

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Stereoselektivní separace a izolace sloučenin s axiální chiralitou
pomocí HPLC**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Marek Krejča
Studijní obor:	Chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.
Konzultant práce:	doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

2020 Olomouc

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Marek Krejča
Název práce: Stereoselektivní separace a izolace látek s axiální chiralitou
Typ práce: bakalářská
Pracoviště: Katedra analytické chemie
Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.
Konzultant: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.
Rok odevzdání práce: 2020
Anotace:

Cílem této bakalářské práce bylo studium vhodných podmínek pro separaci racemátů čtyř vzorků axiálně chirálních benzimidazolů na HPLC s využitím polysacharidových kolon na bázi celulosy. Na základě výsledků měření byl diskutován vliv změny složení mobilních fáze na průběh konkrétní separace. Součástí měření bylo také měření optické otáčivosti separovaných sloučenin.

Klíčová slova: axiální chiralita, stereoselektivní separace, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, chirální stacionární fáze
Počet stran: 59
Počet příloh: 0
Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Marek Krejča
Title: Stereoselective separation and isolation of compounds with axial chirality using HPLC
Type of thesis: bachelor's
Department: Department of Analytical Chemistry
Supervisor: RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.
Consultant: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.
The year of submission: 2020
Annotation:

The aim of this bachelor thesis was the study of adequate condition for the separation of four axially chiral benzimidazoles by HPLC with the use of polysaccharide type chiral stationary phases. The effect of changes in mobile phase composition on individual separations was discussed in the light of measured values. The measurement of optical rotation of separated compounds was performed as well.

Keywords: axial chirality, stereoselective separation, high-performance liquid chromatography, chiral stationary phase
Number of pages: 59
Number of appendices: 0
Language: Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. 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 5.6.2020

.....

Podpis

Rád bych poděkoval svému vedoucímu RNDr. Ondřeji Kurkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, velkou trpělivost a neutichající podporu při zpracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat za cenné rady a podporu také doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. Chtěl bych poděkovat také celé Katedře analytické chemie a spolužákům za ochotu při řešení všech problémů, které se při tvorbě této práce vyskytly. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat za podporu i své rodině, bez které by tato práce nevznikla.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantů IGA_PrF_2019_028 a IGA_PrF_2020_030.

Obsah

1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1. Chiralita.....	2
2.1.1. Centrální chiralita	4
2.1.2. Axiální chiralita	5
2.1.3. Planární chiralita	8
2.1.4. Helicita.....	9
2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	10
2.2.1. Chromatografické systémy	11
2.2.1.1. Systémy s normálními fázemi	11
2.2.1.2. Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)	11
2.2.1.3. Systémy s reverzními fázemi.....	12
2.2.2. Detekční systémy	13
2.2.2.1. Metody určování optické aktivity.....	14
2.3. Chirální chromatografie	16
2.4. Metody separace v chirální chromatografii.....	16
2.4.1.1. Přímá separace	16
2.4.1.2. Nepřímá separace	18
2.4.1.3. Chirální ligandově výměnná chromatografie	18
2.4.2. Chirální stacionární fáze	19
2.4.2.1. Chirální stacionární fáze na bázi polysacharidů	19
2.4.2.2. Makrocyclická antibiotika.....	21
2.4.2.3. Crown-ethery	22
2.4.2.4. Glykoproteiny	22
2.4.2.5. Cyklodextriny	23
2.4.2.6. Chirální stacionární fáze pro ligandově výměnnou chromatografii	24
2.5. Benzimidazoly.....	25
2.5.1. Příprava benzimidazolů	27
2.5.2. Chirální benzimidazoly	29
2.5.3. Separace chirálních benzimidazolů	31
3. Experimentální část	32
3.1. Chemikálie	32
3.2. Instrumentální vybavení.....	32
3.3. Příprava vzorků	32

3.4.	Podmínky chromatografických analýz.....	32
3.5.	Měření optické otáčivosti	33
4.	Diskuze a výsledky.....	35
4.1.	Analytická separace látky A.....	35
4.2.	Analytická separace látky B.....	38
4.3.	Analytická separace látky C.....	41
4.4.	Analytická separace látky D.....	44
4.5.	Využití detektoru optické otáčivosti	46
4.6.	Shrnutí optimálních metod separací axiálně chirálních benzimidazolů.....	49
5.	Závěr.....	50
6.	Seznam použité literatury	51

Seznam použitých zkratek

ACN – acetonitril

AGP – α_1 -kyselý glykoprotein

BINAP – (2,2'-Bis(difenylfosfino)-1,1'-binaftyl)

BINOL – 1,1'-bi-2-naftol

BSA – hovězí sérový albumin

CDX – chirální deriváty xanthonu

CSP – chirální stacionární fáze

EtOH – ethanol

HILIC – hydrofilní interakční chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HSA – lidský sérový albumin

GC – plynová chromatografie

i-PrOH – isopropanol

LC – kapalinová chromatografie

LEC – ligandově výměnná chromatografie

MEKC – micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

MeOH – methanol

n-PrOH – propanol

NA – nevodný

NP – normální fáze

ODS – oktadecylsilan

ORD – optická rotační disperze

OVM - ovomukoid

POM – polární organický mód

QUINAP – 1-[2-(difenylfosfino)-1-naftyl]isochinolin

RP – reverzní fáze

SFC – superkritická fluidní chromatografie

THF – tetrahydrofuran

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

1. Úvod

Velká část farmaceutického průmyslu je dnes založená na využití jevu chiralidy. Více než polovinu dostupných léčiv totiž tvoří opticky aktivní látky a okolo 90 % z nich jsou racemáty nebo směsi stereoizomerů v různých poměrech. Znat vlastnosti všech stereoizomerů je důležité, neboť mohou mít v lidském těle odlišné farmakologické, toxické či metabolické účinky. Z tohoto důvodu jsou dnes důležitou součástí farmaceutického průmyslu chirální separace a analýza opticky aktivních látek. Pro chirální separace využíváme především vysoko účinnou kapalinovou chromatografii, plynovou chromatografii, superkritickou fluidní chromatografii či kapilární elektroforézu ^[1].

Benzimidazoly jsou látky, jejichž deriváty dnes využíváme především v medicíně jako biologicky aktivní látky. Existují jak achirální, tak chirální látky tohoto typu. Mezi chirálními nacházíme takové, které jsou pacientům podávány v racemické směsi (omeprazol), ale také takové, jenž jsou pouze v podobě jednoho z enantiomerů (veliparib) ^[2]. Kromě toho nacházejí chirální deriváty benzimidazolu uplatnění jako katalyzátory v asymetrických syntézách. Také v tomto případě proto chirální separace hraje velkou roli ^[3].

V této práci se zabýváme chirálními separacemi axiálně chirálních benzimidazolů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Cílem je optimalizovat podmínky pro separaci čtyř nově syntetizovaných sloučenin s imidazolovou strukturou s využitím izokratické eluce bez přídavku aditiv. Analytická separace realizována s těmito omezeními umožňuje snadnější následný transfer metody do semipreparativních rozměrů a následnou izolaci separovaných enantiomerů pro jejich další studium.

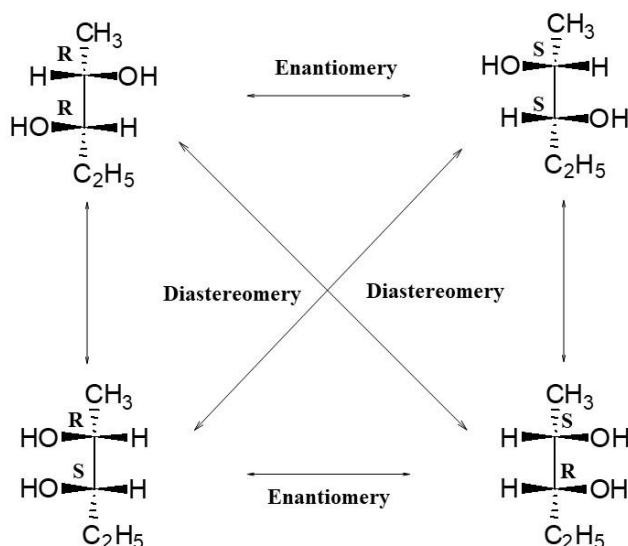
2. Teoretická část

2.1. Chiralita

První definici chiralitly vyslovil v roce 1848 Louis Pasteur při zkoumání kyseliny vinné. Pasteur je definoval takto: „Copak není zřejmé, že vlastnost určitých molekul stáčet polarizační rovinu způsobuje nebo alespoň blízce souvisí s disymetrií těchto molekul?“ Pojmem „disymetrie“ zde Pasteur myslel chiralitu^[4]. Význam slova chiralita pochází z řečtiny (chiros = ruka). Jako první však použil tento pojem až Lord Kelvin, jenž chiralitu definoval jako „atribut jakéhokoliv geometrického útvaru nebo množiny bodů, jehož obraz v ideálním zrcadle s ním nelze ztotožnit“. O rozšíření tohoto pojmu se poté zasloužili především Cahn, Ingold a Prelog při studiu chiralitly molekul^[5]. V roce 1966 jimi byla vydána přelomová publikace v oblasti chiralitly, která shrnovala dosavadní poznatky v této oblasti. Byla v ní také popsána chiralita koordinačních sloučenin a v neposlední řadě byl zaveden nový systém pro určování konfigurace chirálních center známý jako CIP (*Carl-Ingold-Prelog*) systém^[6].

Chiralita je vlastnost látky, která disponuje optickou aktivitou. Tato aktivita se projevuje stáčením roviny polarizovaného světla doprava či doleva na základě prostorového uspořádání molekuly. Látky s touto schopností nazýváme opticky aktivními. Podle toho, na kterou stranu látka stačí rovinu polarizovaného světla rozlišujeme dva optické antipody. Dle počtu chirálních center v molekule existuje 2^n stereoisomerů, kde n značí počet chirálních center. Stereoisomery dělíme na enantiomery a diastereomery na základě jejich vzájemných strukturních vztahů. Jednotlivé vztahy mezi těmito formami jsou popsány na molekule 2,3-pentandiolu na **Obr. 1**. Prostorovou orientaci jednotlivých stereoisomerů konkrétní molekuly lze zapsat více způsoby. Prvním způsobem je označení „+“ (stereoisomer stačí rovinu polarizovaného světla ve směru hodinových ručiček) a „-“ (stačí ji proti směru). Starší alternativou je označení „d“, tedy dextrorotary (pravotočivý) – analogie s „+“ a „l“, tedy levorotary (levotočivý) – analogie s „-“. Pro značení absolutní konfigurace na chirálním centru lze využít označení enantiomerů jako D a L (konvence dle Fischera a Roschanoffa). Písmenem D je myšlen termín dexter (pravý) a písmenem L je myšlen termín leavus (levý). Z těchto písmen vychází označení „d“ a „l“ a využívá se často pro určení absolutní konfigurace v biomolekulách (např. D-fruktosa). Není však pravidlem, že biomolekula s absolutní konfigurací D je také pravotočivá (+, d). Například v případě D-fruktosy se jedná o levotočivou molekulu. Důvodem je, že tato konvence pouze posuzuje stereochemii

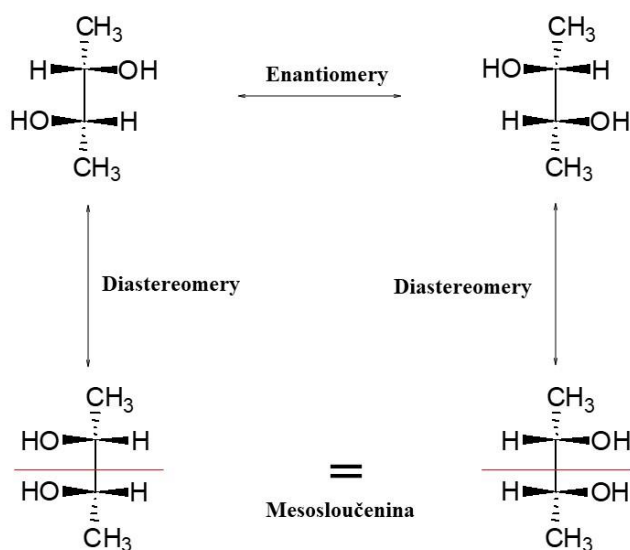
sloučeniny vzhledem ke struktuře glycerinaldehydu, ze kterého vychází. Druhým typem označení absolutních konfigurací na chirálním centru je R (rectus = pravý) a S (sinister = levý) dle konvence CIP. Tato konvence posuzuje každé chirální centrum zvlášť a proto název molekuly s více chirálními centry obsahuje více stereodeskriptorů oproti konvenci Fischera a Roschanoffa (např. „(2R, 3R)-2,3-pentandiol“) [5,7,8].



Obrázek 1: Jednotlivé isomerní vztahy mezi 2,3-pentandiolem

Jednotlivé formy mají vzhledem k odlišnému prostorovému uspořádání rozdílné vlastnosti. Jako enantiomery označujeme, jak je patrné z obrázku, sloučeninu a její zrcadlový obraz; ve svých chemických a fyzikálních vlastnostech se enantiomery navzájem nijak neliší. Pokud jsou oba enantiomery (pravotočivý i levotočivý) přítomny ve směsi v poměru 1:1, hovoříme o tzv. racemátu, který se navenek projevuje jako opticky neaktivní látka. Diastereomery se od sebe liší orientací na některých chirálních centrech, ne však na všech. Nejsou tedy přesnými zrcadlovými obrazy a mají navzájem odlišné fyzikální a chemické vlastnosti. Speciálním případem látek, které mají na uhlíku čtyři různé substituenty, a přesto nejsou opticky aktivní jsou tzv. mesosloučeniny. Tato anomálie vyplývá z faktu, že mesosloučeniny mají rovinu symetrie. Tím je porušen základní předpoklad pro optickou aktivitu sloučeniny (tj. asymetričnost). Vzájemný vztah enantiomerů a mesoformy je zobrazen na molekule 2,3-butandiolu na **Obr. 2** [7, 9].

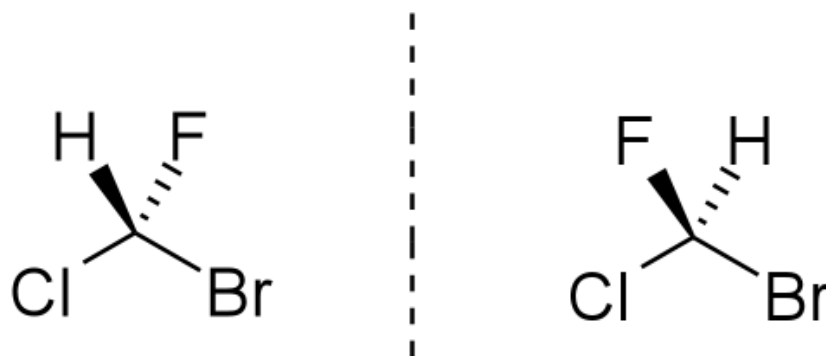
Během 20. století došlo k velkému vývoji ve studiu chiralit a jejího uplatnění. To nacházíme především ve farmacii při vývoji léčiv. Často je totiž v lidském těle aktivní pouze jeden z enantiomerů. Za zmínku stojí thalidomidová aféra z padesátých let minulého století. Zatímco enantiomer R měl pro těhotné ženy sedativní účinky, enantiomer S působil na embryo jako silný teratogen. Následkem toho se narodilo několik tisíc dětí se špatně vyvinutými končetinami. Od té doby klade farmaceutický průmysl veliký důraz na kontrolu enantiomerní čistoty (optická čistota udává přebytek jednoho enantiomeru oproti druhému). Z toho důvodu nacházejí chirální separace velké uplatnění právě ve vývoji léčiv ^[10].



Obrázek 2: Vztah mezi enantiomery a mesoformou 2,3–butandiolu

2.1.1. Centrální chiralita

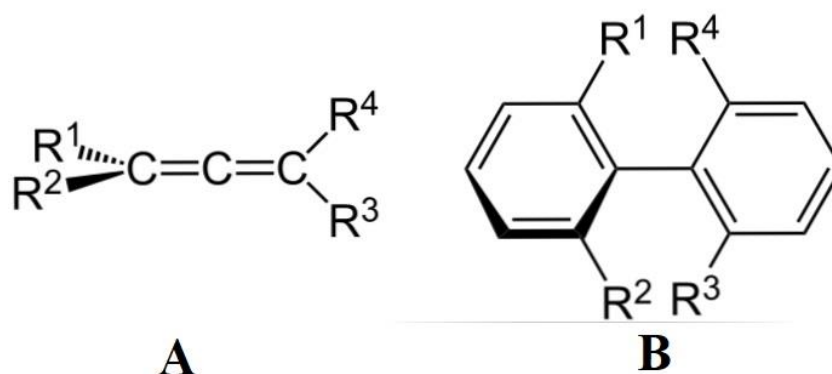
Sloučeniny mohou vykazovat několik typů chiralit. Tam, kde je centrem chiralit asymetrický atom, hovoříme o chiralitě centrální. Nejčastějším případem je atom uhlíku, na který jsou navázány čtyři různé substituenty; tento atom se stává centrem chiralit. Tento typ chiralit vykazuje většina dosud objevených chirálních sloučenin. Existují také chirální sloučeniny s centrem chiralit na jiném atomu, než je uhlík. V takovém případě je centrálním atomem například dusík, fosfor nebo síra. Typickým příkladem sloučenin s centrem chiralit na dusíku jsou kvartérní amoniové soli. U fosforu můžeme zmínit chirální fosfátové triestery. Chirální sloučeninou se sírou jako centrálním atomem je například lék armodafinil ^[11, 12]. Typický zástupce sloučeniny s centrální chiralitou je zobrazen na **Obr. 3**.



Obrázek 3: Příklad stereoisomerů s centrální chiralitou na molekule bromochlorofluoromethanu

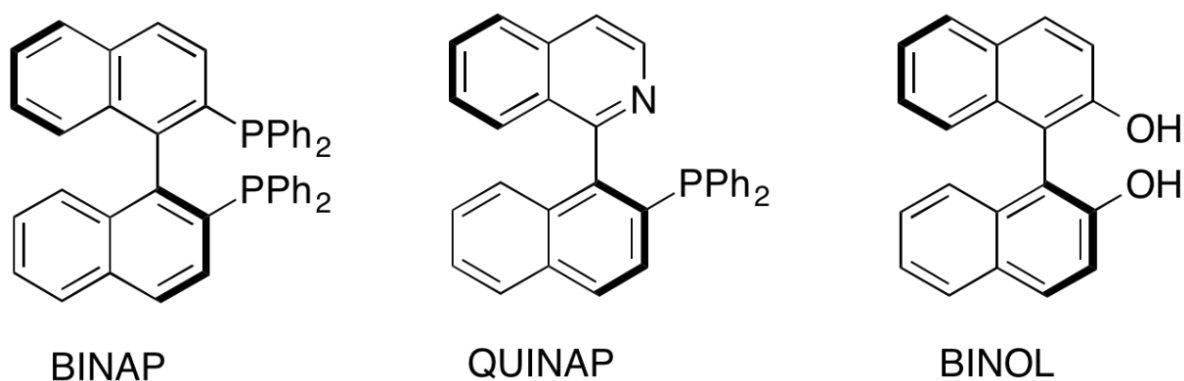
2.1.2. Axiální chiralita

Tento jev byl poprvé pozorován v roce Christiem a Kennerem při zkoumání 6,6'-dinitro-2,2'-difenolové kyseliny ^[13]. Na rozdíl od chiraloty centrální zde není přítomen symetricky substituovaný atom, ale zdrojem chiraloty je asymetrie vazby – nejčastěji mezi dvěma atomy uhlíku, dalšími možnostmi jsou například vazba uhlík-dusík, uhlík-síra nebo uhlík-kyslík ^[16]. Pro jednotlivé izomery (atropoisomery) musí navíc platit, že jejich vzájemná konverze mezi jednotlivými izomery proběhne s poločasem přeměny nejméně 1000 sekund při laboratorní teplotě, což odpovídá energetické bariéře pro konverzi 23,3 kcal/mol (v opačném případě se nejedná o chirální sloučeninu). Pojem *atropoisomerismus* vychází z řečtiny („a“ = „ne“, „tropos“ = „otočit“). Jak již bylo zmíněno, centrem chiraloty je v tomto případě osa (tj. vazba). Na této ose se pak nacházejí čtyři různé substituenty, popřípadě aromtická jádra, na nichž se nacházejí asymetricky rozmístěné substituenty (**Obr. 4**).



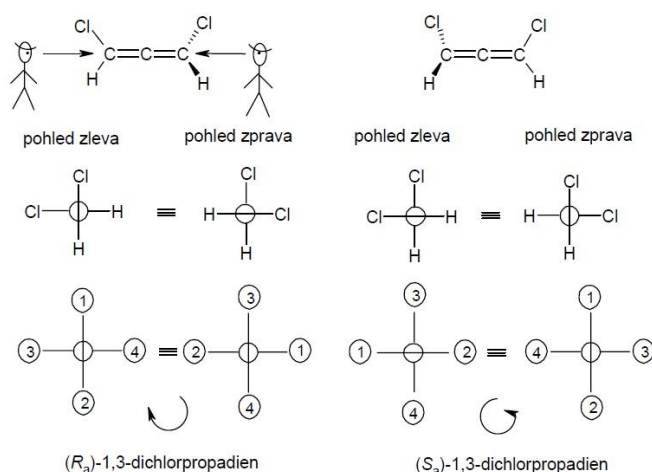
Obrázek 4: Obecná struktura molekuly s axiální chiralitou

Volná rotace těchto substituentů je pak znemožněna násobnými vazbami (**Obr. 4A**) nebo sterickým bráněním – tedy zamezení rotace jedné části molekuly kolem vazby – způsobeným přítomností objemných substituentů (**Obr. 4B**). Sterické bránění tvoří dostatečně velký energetický rozdíl k vytvoření bariéry, v důsledku čehož pozorujeme existenci atropoisomerů ^[14,15]. Pokud dojde k překonání energetické bariéry (například zvýšením teploty) bránící rotaci, mohou jednotlivé atropoisomery libovolně interkonvergovat (přecházet jeden ve druhý), což ve výsledku vede k racemizaci. Energie nutná k překonání této bariéry je specifická pro každou látku ^[13]. Axiálně chirální látky našly uplatnění v mnoha odvětvích chemie, v organické chemii například jako ligandy v asymetrických syntézách (látky BINAP, QUINAP, BINOL; struktury viz **Obr. 5**). Dále nacházejí využití např. jako katalyzátory v organokovových syntézách či při Suzuki-Miyaura reakci ^[16]. Velká část takových látek však dnes našla uplatnění především v medicíně ^[17], příkladem může být glykopeptid vankomycin, který je využíván jako antibiotikum ^[18].



Obrázek 5: Struktury ligandů využívaných v asymetrických syntézách

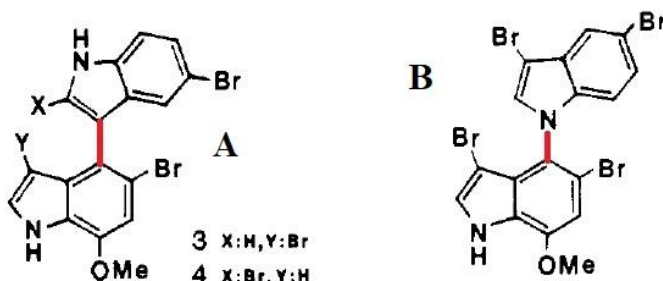
Stejně jako u sloučenin s chiralitou centrální lze i u axiálně chirálních sloučenin určit jejich konfiguraci. Ta se označuje jako R_a (resp. M) či S_a (P). Pro určení nejprve označíme substituenty čísly 1-4. V prvním kroku to však není podle jejich molekulových hmotností (jako v případě chiralitu centrální), ale podle toho, kde se substituenty nacházejí. Teprve ve druhém kroku využijeme molekulové hmotnosti substituentů. Při natočení molekuly chirální vazbou směrem od pozorovatele označíme těžší substituent vpředu jako „1“, lehčí ze dvojice substituentů vzadu zase „4“. (viz **Obr. 6**). Poté převedeme molekulu do Newmanovy projekce: substituenty vpředu jsou zobrazeny na vertikální ose, zatímco ty vzadu na horizontální. Následné určení konfigurace je již identické jako u chiralitu centrální. Pokud jsou substituenty seřazeny po směru hodinových ručiček, jedná se o konfiguraci R_a ($M =$ „mínus“), pokud jsou v protisměru, jedná se S_a ($P =$ „plus“) [19].



Obrázek 6: Schéma pro určování absolutní konfigurace na chirální ose atropoisomeru [19]

S látkami s axiální chiralitou se můžeme setkat v přírodě. Naprostá většina těchto látek obsahují jeden nebo dva pětičlenné kruhy, (nejčastěji indol, pyrrol nebo karbazol) [14]. Prvním takovýmto zástupcem je marinopyrrol. Tato látka prokázala vysokou inhibiční aktivitu vůči bakterii *Staphylococcus aureus* a byla vyizolována z bakterie rodu *Streptomyces* [14, 20]. Další látkou, jenž je účinná mimo jiné proti bakterii *S. aureus* je Rugulosin. Tato látka byla původně získána z bakterie *Penicillium Radicum* [20, 21]. Třetím příkladem je alkaloid murrastifolin, který obsahuje chirální C-N vazbu. Murrastifolin byl izolován z acetonového extraktu z kořene stromu kari (*Murraya koenigii*) [22]. Zajímavou látkou je také gossypol. Tato látka byla izolována z rostliny bavlníku a v Číně byla testována

jako mužský antikoncepční prostředek, neboť jeho R-enantiomer je toxický pro spermie [23, 24]. Jako poslední látku zde uvedu polybromovaný biindol, získaný z mořské řasy *Rivularia firma*. Zajímavostí je, že biindoly mohou mít axiální vazbu mezi dvěma uhlíky (A) nebo uhlíkem a dusíkem (B) (Obr. 7) [25].

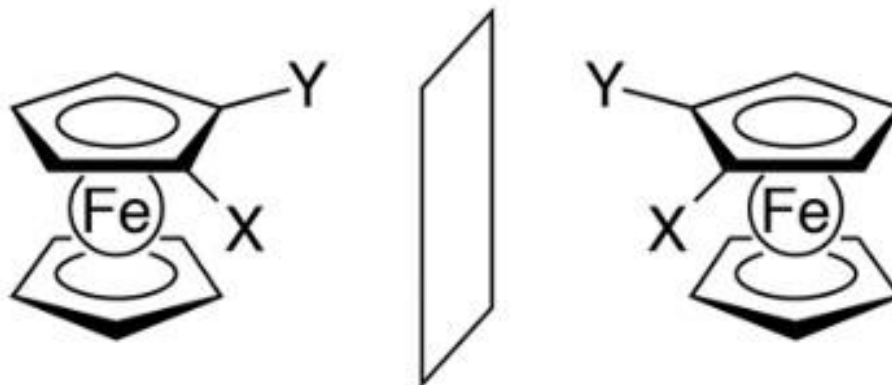


Obrázek 7: Polybromovaný biindol s axiální vazbou mezi dvěma uhlíky, resp. uhlíkem a dusíkem [25]

Kromě přírodních látek obsahující osu chiralitu, existují také uměle připravené. První doložená syntéza axiálně chirální sloučeniny vůbec byla provedena v roce 1931. Jednalo se o nestereoselektivní syntézu, kterou byla připravena směs enantiomerů N-2-karboxyfenyl-2,5-dimethyl-3-karboxypyrrolu – sloučeniny řadící se mezi arylpyrroly [14, 26]. Dalšími příklady asymetrických syntéz anilidů, amidů a imidů, diastereoselektivních syntéz chirálních indolů, chinazolinů a dalších se zabývá a detailně je popisuje review E. Kumarasamy [16].

2.1.3. Planární chiralita

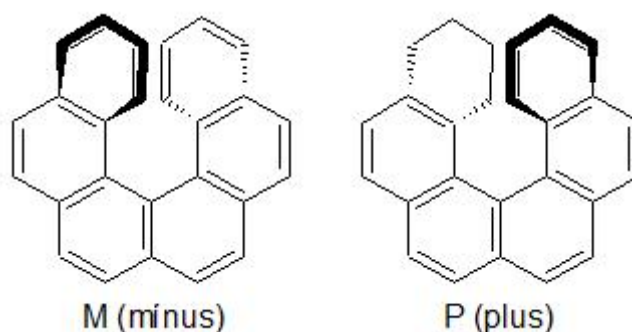
Chirálním centrem může být také rovina, která obsahuje největší počet atomů v molekule. Tento druh chiralitu se projevuje dvěma substituenty ležícími ve stejné rovině a třetím, který leží mimo ni. Příkladem sloučenin s planární chiralitou mohou být trans-cykloalkeny s osmi a vícečetnými uhlíkovými cykly, dále pak ansasloučeniny, metalloceny či paracyklofany [5]. Struktura metallocenu vykazujícího planární chiralitu je uvedena na Obr. 8.



Obrázek 8: Struktura 1,2- disubstituovaného ferrocenu vykazujícího planární chiralitu ^[27]

2.1.4. Helicita

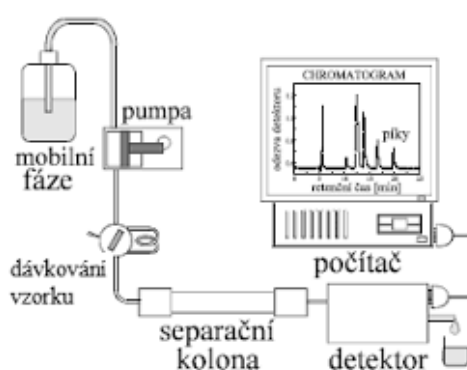
S tímto jevem se setkáváme u látek s helikální (šroubovicovou) strukturou. Typicky se vyskytuje u peptidů složených z jednotlivých aminokyselin. Jejich prostorové uspořádání zaujímá tvar pravotočivé nebo levotočivé šroubovice – je tedy možné odlišit dva enantiomery. Pokud je pravá část prstence šroubovice blíž pozorovateli a levá část prstence dál od pozorovatele, šroubovice se otáčí „doprava“ a jedná se o pravotočivý helix, který značíme P („plus“). Pokud je tomu opačně, jde o šroubovici levotočivou, která nese označení M („mínus“) ^[5, 23]. Helikálními molekulami však nemusí být pouze peptidy. Tento jev vykazují například benzoanthraceny, foldamery ^[23] či hexahelicen ^[28]. Na **Obr. 9** je znázorněna struktura obou enantiomerů hexahelicenu vykazujícího helicitu.



Obrázek 9: Jednotlivé enantiomery hexahelicenu

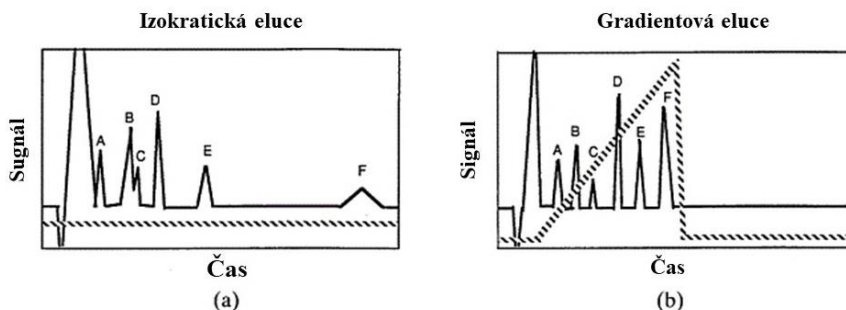
2.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (*HPLC z angl. high performance liquid chromatography*) je separační metoda založená na rozdílné distribuci dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. Jako mobilní fáze je v této technice využita kapalina, stacionární fázi pak může být pevná látka, popřípadě kapalina ukotvená na tuhém nosiči. Rozdílná distribuce látek je vyjádřena distribuční konstantou K_D . Pro distribuční konstantu platí vztah $K_D = c_s/c_m$, kde c_s je koncentrace látky ve stacionární fázi a c_m koncentrace látky ve fázi mobilní. S rostoucí hodnotou distribuční konstanty, roste hodnota retence. Čím vyšší má látka retenci, tím déle je zadržována na koloně [29].



Obrázek 10: Blokové schéma kapalinové chromatografu [30]

Pro separaci látek můžeme využít izokratickou nebo gradientovou eluci. U eluce izokratické se v průběhu analýzy nemění složení mobilní fáze. U eluce gradientové se složení mění. Tento typ eluce je využíván zejména pro separaci směsi více látek s nerovnoměrnými rozdíly v distribučních konstantách [29, 31] (**Obr. 11**).



Obrázek 11: Porovnání izokratické a gradientové eluce, kdy u gradientové eluce dochází k úplné separaci všech látek. Šrafovaná část značí rostoucí obsah jednoho z rozpouštědel ve směsi. Převzato a upraveno z knihy K. Robbards a kol., Principles and practise of modern chromatographic methods [31]

2.2.1. Chromatografické systémy

Pro separaci v kapalinové chromatografii lze využít několik různých kombinací mobilní a stacionární fáze (tzv. módů/systémů). Jejich výběr záleží na povaze separovaných látek. Mezi ty nejpoužívanější patří kapalinová chromatografie na obrácených fázích. Pro separaci iontů je často využívána iontově výměnná chromatografie, dále separace v systému normálních fází (NP-HPLC), hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) či micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC). Méně tradiční metodou je pak separace chirální. Jednotlivé systémy jsou popsány níže s výjimkou chirální separace, které je věnována samostatná kapitola, protože se jedná o mód využitý v experimentální části této práce ^[29].

2.2.1.1. Systémy s normálními fázemi

NP-HPLC (*normal phase HPLC*) představovala dominantní variantu HPLC do 70. let minulého století (kdy došlo k rozvoji kapalinové chromatografie na reverzních fázích, viz níže). Pro separaci látek v tomto systému se využívá polární stacionární fáze a méně polární mobilní fáze. Mobilní fáze „soutěží“ o adsorpční centra stacionární fáze se separovanou látkou (analytem). Adsorpce je pak důsledkem rozdílných polárních interakcí mezi analytem, sorbentem a mobilní fází. Jako stacionární fáze je používán nemodifikovaný silikagel nebo silikagel modifikovaný polárními sloučeninami, které jsou na něj kovalentně navázány. Za polaritu stacionární fáze je zodpovědná dominantní funkční skupina navázaná na silikagel (např. diolová skupina pro slabě polární fáze). Mobilní fázi tvoří v tomto případě nejčastěji binární směs látek s rozdílnou polaritou. Typicky jde o alifatický uhlovodík nemísitelný s vodou (heptan, hexan) a polární složku, kterou může být například isopropanol. Separace na normálních fázích je často využívána také pro TLC (*thin-layer chromatography*) separace, purifikaci surových vzorků atd. V současnosti je častěji využívána moderní obdoba této metody, která nese název HILIC (*hydrophilic interaction liquid chromatography*) ^[29, 32].

2.2.1.2. Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Tento systém je založen na rozdělování analytu mezi vodou obsaženou v mobilní fázi a vodou adsorbovanou na povrchu fáze stacionární. Na povrchu stacionární fáze se nacházejí polární centra, kde se přednostně adsorbují molekuly vody. Retence je tedy tím vyšší, čím je analyt polárnější a tím nižší, čím polárnější je mobilní fáze. Nejpoužívanější stacionární fází je čistý silikagel či modifikovaný aminopropylovou funkční skupinou, existují však také

stacionární fáze tvořené dioly, aminy či sulfobetainy. Mobilní fáze je tvořena nepolární organickou složkou (nejčastěji acetonitril) a vodnou polární složkou (voda nebo pufr); organická složka je zpravidla v nadbytku. Zvýšením koncentrace vodné složky dochází k výraznému zvýšení eluční síly mobilní fáze a snížení retence analytu. Voda může být nahrazena jiným polárním rozpouštědlem (zpravidla se jedná o alkohol jako je methanol, ethanol či isopropanol) – z části nebo také úplně. V takovém případě hovoříme o NA-HILIC (*non-aqueous HILIC*)^[33]. HILIC v podstatě nahrazuje systém normálních fází, protože využívá podobný mechanismus separace, nicméně jeho výsledky jsou reprodukovatelnější, nepoužívají se zde toxická organická rozpouštědla atd. Systém poskytuje dostatečnou retenci polárním látkám, vzhledem k vysokému obsahu organické složky nevzniká v systému vysoký zpětný tlak a lze využít vyšších průtoků mobilní fáze. Tato metoda je také vhodná pro spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem z důvodu vysokého obsahu ACN. Acetonitril je pro ionizaci vhodný díky nízké viskozitě rozpouštědla. Metoda HILIC se stala velice využívanou ve farmaceutických a bioanalytických aplikacích^[29, 34].

2.2.1.3. Systémy s reverzními fázemi

V současnosti nerozšířenějším systémem využívaným v HPLC je RP-HPLC (*Reversed phase HPLC*), tedy kapalinová chromatografie na obrácených fázích. Polarita mobilní a stacionární fáze je zde oproti systému s normálními fázemi opačná: mobilní fáze je polární, zatímco stacionární fáze nepolární.

RP-HPLC využívá rozdílné distribuce složek mezi polární mobilní fází a nepolární stacionární fází. Mobilní fáze je kombinací vodné složky (čistá voda, zředěný roztok kyseliny či báze, pufr, ...) a polárního organického rozpouštědla mísitelného s vodou. Eluční síla mobilní fáze roste s rostoucím podílem organické složky. Nejmenší eluční sílu by tak měla mít voda, největší naopak tetrahydrofuran, neboť se jedná o aprotické nepolární rozpouštědlo s velmi nízkou relativní permitivitou (ta vyjadřuje míru odporu látky při vytváření elektrického pole). Polární rozpouštědla s molekulami s elektrickým dipólem budou mít vysokou hodnotu permitivity (např. $\epsilon_R(\text{H}_2\text{O}) = 80$), zatímco permitivita nepolárních rozpouštědel, u kterých je rozdíl elektronegativit mezi atomy velmi nízký a dipól zde nevzniká, se bude blížit nule ($\epsilon_R(\text{THF}) = 7,58$). Aktivní složkou stacionární fáze je zpravidla delší alkylový řetězec (obvykle se jedná o oktadecylsilan (ODS) označovaný také jako C₁₈) navázaný na povrch nosiče. Tím je nejčastěji silikagel, ale může jím být také hybridní sorbent nebo kovový oxid. Retenci v systému reverzních fází lze ovlivnit také volbou vhodné stacionární fáze. Retence analytu roste s délkou alkylového řetězce fáze, dále

vlivem substituentů na nosiči jako jsou aromatická jádra nebo objemné substituenty (halogeny). Naopak retenci snižují polární a iontové substituenty jako jsou aminy, hydroxyly a další. Retence analytu je samozřejmě ovlivňována i jeho chemickou strukturou. Silně polární a iontové látky nejsou zadržovány prakticky vůbec, a proto je potřeba jejich retenci ovlivnit změnou pH tak, aby byla potlačena disociace slabých kyselin nebo slabých bází, a tedy došlo ke zvýšení retence. Tento typ separace lze využít pro separaci malých molekul, ale také pro analýzu složitých směsí jako jsou např. rostlinné extrakty. RP-HPLC je dominantní separační technikou v HPLC. Ze všech vydaných prací zabývajících se kapalinovou chromatografií za poslední desetiletí, představují práce využívající tento systém zhruba 90 % [29, 35].

2.2.2. Detekční systémy

Nedílnou součástí každého kapalinového chromatografu je detekční systém. Detektor je zařazen za kolonou a zaznamenává rozdíly v signálu při průchodu čisté mobilní fáze a mobilní fáze obohacené o analyt. Detektory dělíme na koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v efluentu dm/dV nezávisle na rychlosti přívodu složky do detektoru (spektrofotometrický detektor). Naproti tomu hmotnostní detektor reaguje na změnu hmotnostního toku složky v efluentu dm/dt do detektoru (detektor rozptylu světla). Druhým možným způsobem dělení detektorů je jejich rozdělení na destruktivní či nedestruktivní. Rozdíl mezi těmito typy detektorů je ten, že v nedestruktivním nedochází k chemické změně detekovaného analytu (např. spektrofotometrický detektor), zatímco v destruktivním probíhá chemicky ireverzibilní děj spojený se ztrátou původní formy analytu (např. hmotnostní spektrometr). Mezi základní typy detektorů používaných v HPLC patří spektrofotometrický detektor, fluorescenční detektor, elektrochemický detektor a hmotnostní spektrometr [29].

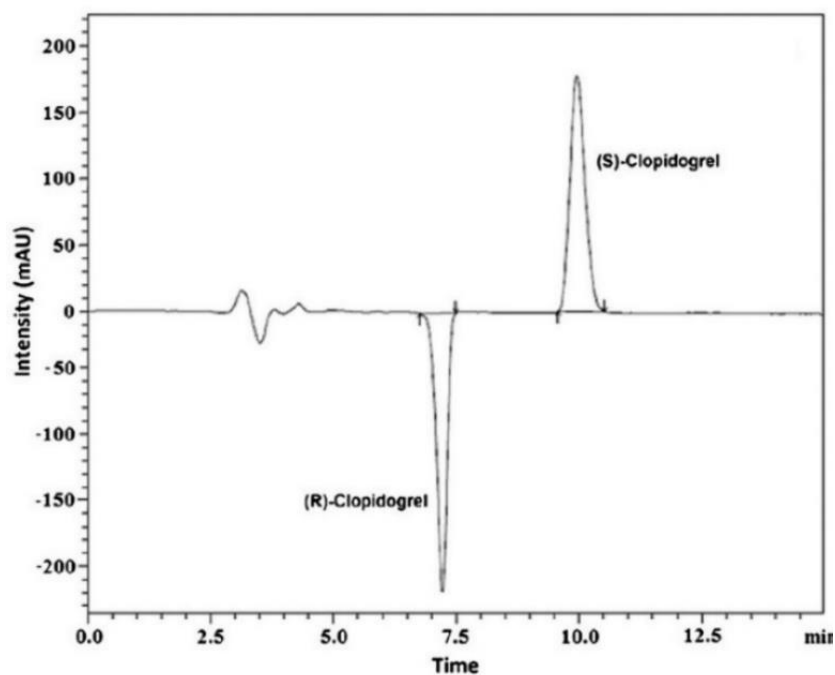
UV/Vis detektor ve spojení s kapalinovou chromatografií byl poprvé použit roku 1966 Horváthem a Lipským. Tento detektor využívá absorpce záření analytem v teoretickém rozmezí 190-800 nm. V praxi jsou tato rozmezí daleko užší v závislosti na konstrukci konkrétního detektoru. Mezi základní typy spektrofotometrických detektorů patří detektory s fixní vlnovou délkou, u něhož nelze změnit vlnovou délku při které měří. Můžeme se setkat také s detektory s variabilní vlnovou délkou, u kterých lze nastavit příslušnou vlnovou délku. Tu však nelze během analýzy měnit. Třetím typem je detektor s programovatelnou vlnovou délkou. Vlnová délka je zde měnitelná během analýzy, přičemž některé detektory umí měřit

při dvou až čtyřech vlnových délkách současně. Posledním typem detektorů je detektor s diodovým polem, který snímá celé spektrum v reálném čase bez přerušení [32].

2.2.2.1. Metody určování optické aktivity

Pojem „světlo“ lze považovat za elektromagnetické vlnění o vlnové délce v rozmezí 360-780 nm [36]. Polarizované světlo je speciálním případem šíření světla, při kterém vektor světla kmitá pouze v jedné rovině, za vzniku lineárně polarizovaného světla. Při průchodu polarizovaného světla chirální sloučeninou dochází (vlivem rozdílných indexů lomu pro pravotočivou a levotočivou složku polarizovaného světla) ke stočení roviny polarizovaného světla a vzniku kruhově polarizovaného světla. Rozdílný index lomu je důsledkem různé rychlosti polarizovaného světla obou složek ve stejném optickém prostředí [37].

Součástí chirální separace je často také sledování optické aktivity studovaných látek pomocí vhodného detektoru. Analýzou optické aktivity sloučenin se zabývají tzv. chiroptické metody. Tou nejjednodušší z nich je polarimetrie. Tato metoda je založena na měření úhlu otočení roviny polarizovaného světla při průchodu vzorkem. Polarizované světlo vzniká při průchodu přes Nikolovy hranoly a po průchodu přes vzorek dopadá na analyzátor (druhý polarizační hranol), ze kterého odečítáme úhel otočení. Vzhledem k tomu, že pro každou látku je měrná otáčivost jiná, byla pro každou látku definována specifická otáčivost daná pro každou látku při délce kyvety 1 dm, koncentraci vzorku 1 g.cm⁻³, teplotu 20 °C a vlnovou délku D-linie sodíkového světla 589,3 nm. Metoda polarimetrie byla využita ve spojení s HPLC např. v práci Rao a kol. při chirální separaci léku Klopidoogrelu [38] (**Obr. 12**).

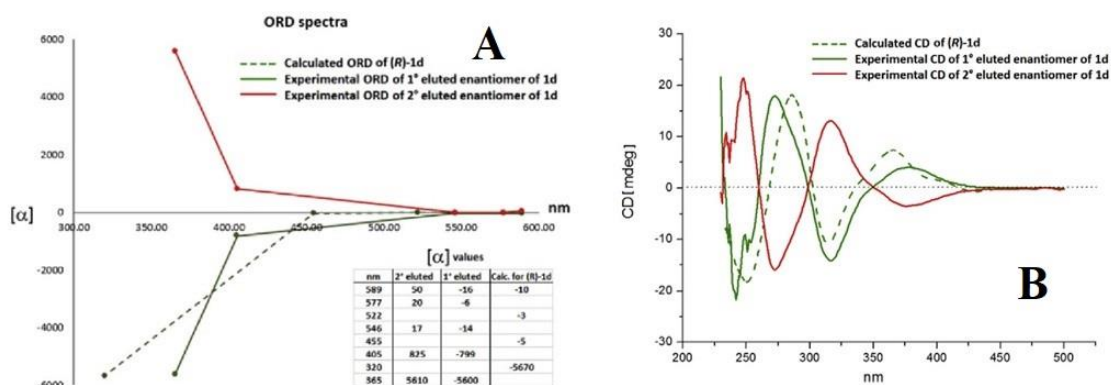


Obrázek 12: Chromatografický záznam separace enantiomerů Klopidoogrelu na HPLC s polarimetrickou detekcí ^[38]

Metoda optické rotační disperze sleduje měrnou otáčivost v celé oblasti elektronového spektra. Průběh absorpční křivky nazýváme Drudeho křivkou; zaznamenává závislost měrné otáčivosti na vlnové délce. Při měření v oblasti vlnových délek, kde absorbuje opticky aktivní chromofor, dochází k prudkému růstu a vzniku lokálního maxima a poté k prudkému poklesu a vzniku lokálního minima či k přesně opačnému procesu (tj. prudkému poklesu a poté prudkému růstu). Tento jev nazýváme jako „Cottonův efekt“. Analyticky využitelným faktem je, že měření enantiomerů poskytuje křivky, které jsou svými zrcadlovými obrazy (podle osy x), a strukturně podobné látky poskytují při stejné absolutní konfiguraci podobné křivky. Optická rotační disperze byla využita ve spojení s HPLC například v práci Rossi a kol. při studiu chirální separace alkylthiopyrimidinů ^[39] či Bai a kol. při separaci racemátu cyklopentadienového komplexu železa ^[40].

Cirkulární dichroismus využívá kromě různé rychlosti šíření polarizovaného světla v chirálním prostředí i odlišné míry absorpce záření konkrétních vlnových délek (a tedy různého molární absorpčního koeficientu) pro pravotočivou a levotočivou složku. Výstupem z takového prostředí vzniká elipticky polarizované světlo. Na křivce cirkulárního dichroismu tak pozorujeme závislost změny molárního absorpčního koeficientu na vlnové délce. Stejně jako v případě ORD křivky zde vzniká maximum a minimum a enantiomery

mají zrcadlové spektrum ^[37]. Cirkulární dichroismus byl využit například při studiu chiraloty v aminech a aminoalkoholech Yashimou a kol. ^[41]. Často bývá cirkulární dichroismus používán v kombinaci s optickou rotační disperzí. Ve spojení s HPLC byl proto použit např. ve stejných pracích jako v případě ORD ^[39, 40]. Porovnání ORD spektra a CD spektra nabízí **Obr. 13**.



Obrázek 13: ORD (A) a CD (B) spektrum při separaci racemátu cyklopentadienového komplexu železa ^[40]

2.3. Chirální chromatografie

Jednotlivé enantiomery opticky aktivní látky není možné od sebe oddělit pomocí achirálních separačních módů (využívajících pro separaci odlišné fyzikální a chemické vlastnosti látek). Důvodem je, že enantiomery mají tyto vlastnosti shodné. Pro jejich separaci je tedy nutné využít podmínek separace chirální. Tu lze realizovat jako přímou nebo nepřímou. Třetí druh (chirální chromatografie ligandové výměny), jehož principem je přidavek aditiva (nejčastěji opticky aktivní aminokyseliny či kovového iontu), se nepoužívá příliš často z důvodu nižší selektivity a účinnosti ^[42].

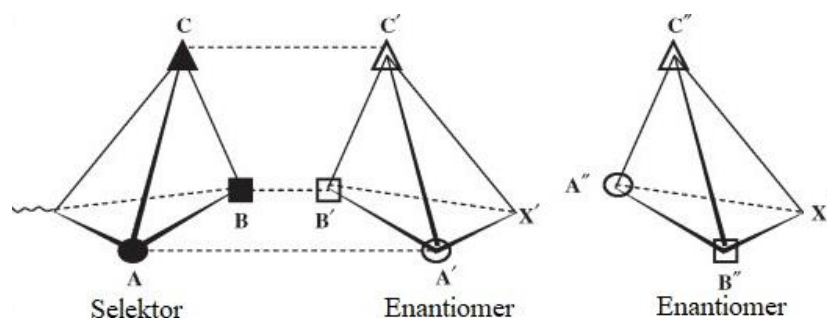
Při optimalizaci podmínek chirálních separací může být mnohdy obtížné určit správnou kombinaci mobilní a stacionární fáze. Důvodem je, že pro separaci může stačit pouze jedna funkční skupina stacionární fáze, nebo být důležité vhodné geometrické uspořádání celé molekuly ^[29].

2.4. Metody separace v chirální chromatografii

2.4.1.1. Přímá separace

Přímá separace využívá vzniku tzv. tranzitního diastereomeru vznikajícího interakcí chirální stacionární fáze nebo chirálního selektoru s analytem nacházejícím se v mobilní

fázi. Aby mohlo dojít k separaci, je nutné, aby došlo alespoň ke třem simultánně působícím interakcím (model tříbodové interakce – **Obr. 14** ^[43]). Díky těmto interakcím dochází k tvorbě krátkodobého diastereomerního komplexu a zadržení analytu. Výhodou této metody oproti metodě nepřímé je fakt, že enantiomery analytu nepotřebují žádnou předúpravu a je možné je ihned separovat. Nevýhodou může být vysoká cena chirálních stacionárních fází a také možná racemizace enantiomerů v průběhu analýzy ^[29]. K tomuto jevu může dojít, pokud je překonána energetická bariéra bránící interkonvertování enantiomerů mezi sebou, čímž je jejich separace znemožněna. K překonání energetické bariéry může dojít například zvýšením teploty, při které se separace provádí, či přidáním acidobazického aditiva do roztoku ^[44]. Optimalizací racemizace enantiomerů při rostoucí teplotě se zabýval například Xu a kol. při studiu syntézy L-glufosinátu z N-fenylacetyl-D-glufosinátu ^[45].



Obrázek 14: Model tříbodové interakce ^[46]

Přímá separace může probíhat ve třech módech. Prvním z nich je reverzní mód. Ten používá vodné nebo pufrované mobilní fáze ve směsi s acetonitrilem či alkoholy (methanol, ethanol, ...). Pufry jsou používány pro úpravu iontové síly a pH. Pokud je analyt kyselý, mobilní fáze se volí také kyselá, aby se potlačila jeho disociace. Obdobně se pak volí mobilní fáze pro bazický analyt. Jako pufry je možno volit jak anorganické (fosforečnany, sírany), tak organické (mravenčany, octany) soli. V tomto módu je možné také upravovat pH, čímž lze ovlivnit retenci i selektivitu separace. Reverzní mód byl využit například Tanakou a kol. při studiu separace chirálních benzimidazolů ^[47] či Haglundem při separaci atropoisomerů polychlorovaných bifenyliů ^[48].

Druhým typem je polárně organický mód (POM – *Polar organic mode*). Jako mobilní fáze je zde používána směs organického rozpouštědla (například acetonitrilu) s organickými kyselinami nebo bázemi. Výhodou tohoto módu je vyšší účinnost a

rozpuštěnost analytů. Tento mód (společně s reverzním) použili Padivitage a kol. ve studii separace propylimidazolového, methylbenzimidazolového a dalších derivátů cyklofruktanu 6 [49].

Posledním používaným módem je mód normální. Zde mobilní fázi tvoří nepolární organická rozpouštědla (např. hexan) společně s modifikátorem mobilní fáze. Jako modifikátor může být použit alkohol, acetonitril, ether nebo chlorovaný uhlovodík. Zhang a kol. využili tohoto módu pro separaci binaftolu a jeho derivátů na koloně Lux Amylose-2 [50]. Pro neutrální molekuly bývá polárně organický a normální mód obecně vhodnější než reverzní [29, 51].

2.4.1.2. Nepřímá separace

Druhou metodou je tzv. nepřímá separace. Na rozdíl od metody přímé separace je zde nutná předúprava enantiomerů před samotnou separací. Ta probíhá reakcí chirálního činidla s párem enantiomerů za vzniku nových (zpravidla kovalentně vázaných) sloučenin, které jsou navzájem v pozici diastereomerů. Tento proces bývá označován jako „chirální derivatizace“. Nevýhodou tohoto kroku je fakt, že chirální derivatizační činidlo (např. S-naproxen, S-levofloxin) musí být opticky čisté (enantiomerní čistota >99%). Optická čistota udává přebytek jednoho enantiomeru oproti druhému. Následná separace diastereomerů probíhá již v achirálním prostředí, a může využívat jakýkoliv achirální systém. Důvodem je, že vzniklé diastereomery se liší svými chemickými i fyzikálními vlastnostmi. [52, 53].

2.4.1.3. Chirální ligandově výměnná chromatografie

Ligandově výměnná chromatografie (LEC) je metoda chirální separace, která byla poprvé popsána Rogozhinem a Davankovem v šedesátých letech minulého století [54]. Je založena na interakci enantiomeru s kationtem (nejčastěji Cu^{II}), který je přidán do mobilní fáze. Chirálním selektorem je chirální ligand (např. (S,S)-N,N'-bis(fenylalanyl)ethandiamin), který tvoří ternární komplex s kationtem a enantiomerem. Selektor může tvořit stacionární fázi: je pak buď kovalentně vázán na nosiči nebo na něj může být pouze nanesen. Alternativní možností je přidání chirálního selektoru do mobilní fáze. V praxi však převažuje první způsob a nosičem je zpravidla silikagel. Separace je proveditelná tehdy, pokud jsou konstanty stability jednotlivých komplexů dostatečně rozdílné. Tato metoda je blízká nepřímé separaci. Důvodem jejího menšího využití je fakt, že vznikají různě stabilní diastereomerní komplexy s chirálním selektorem a separace mívají nižší selektivitu [55].

2.4.2. Chirální stacionární fáze

Chirální stacionární fáze je tvořena chirálním selektorem a nosičem. Chirální selektor je chemicky (kovalentní nebo iontovou vazbou) nebo fyzikální sorpcí (dynamicky) vázán na nosiči – vzniklou kombinaci označujeme jako „stacionární fázi“. Jako nosič se nejčastěji využívá silikagel či různé polymery.

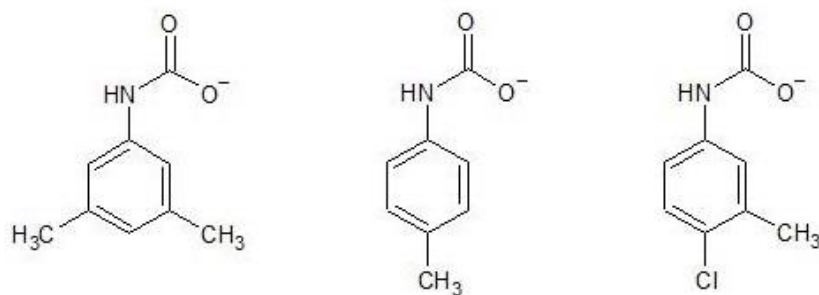
Chirální selektory rozdělujeme dle původu do tří kategorií. Jsou to selektory *přirodní* (mezi které patří nativní cyklodextriny, makrocyclická antibiotika, proteiny a polysacharidy), dále *semisyntetické* (derivatizované cyklodextriny, deriváty polysacharidů a modifikovaná makrocyclická antibiotika) a *syntetické* (chirální polyethery a methakrylátové polymery) [29]. Kromě chirálních selektorů literatura často rozlišuje i samotné stacionární fáze. Mezi ty nejčastější patří stacionární fáze polysacharidové, které jsou zpravidla tvořeny amylosou nebo celulosou, fáze na bázi makrocyclických antibiotik jako je vankomycin nebo teikoplanin, fáze na bázi cyklodextrinů, glykoproteinů či chirálních crown-etherů a stacionární fáze pro chirální ligandově výměnnou chromatografii. I v současnosti pokračuje vývoj nových stacionárních fází jako jsou například deriváty xanthonu (CDX) [56]. Retence analytu v systému je dosaženo kombinací interakcí, jako jsou coulombické síly, vodíkové vazby, sterické bránění, π - π interakce, interakce ion-dipól a další [32].

2.4.2.1. Chirální stacionární fáze na bázi polysacharidů

Zřejmě nejpoužívanějšími chirálními stacionárními fázemi, které se uplatňují v chirální chromatografii, jsou stacionární fáze na bázi polysacharidů [87]. Těmito polysacharidy bývají zpravidla amylosa a celulosa. Oba tyto polysacharidy jsou opticky aktivní, díky čemuž mají potenciál pro uplatnění v chirální separaci. Amylosa je tvořena jednotkami α -D-glukosy, které jsou vzájemně spojeny 1, 4-glykosidickou vazbou. Počet opakujících se jednotek glukosy je v rozmezí 300-3000 jednotek. Celulosa je tvořena asi 3000 jednotkami β -D-glukosy, spojenými 1, 4-glykosidickou vazbou [57]. Nativní celulosa ani amylosa se ale jako chirální selektory neosvědčily z důvodu příliš nízké selektivity. Prakticky se proto využívají jejich deriváty. Mezi nejpoužívanější patří 3, 5-dimethylfenylkarbamát, 4-methylfenylbenzoát či 4-methylfenylkarbamát. Přehled všech derivátů a jim odpovídajících komerčních názvů kolon je uveden v **Tab. I**. Příklad struktury takového derivátu je zobrazen na **Obr. 15**.

Tabulka I: Komerčně dostupné stacionární fáze na bázi polysacharidů [29, 58-60]

Chirální selektor	Polysacharid	Komerční název
4-methylfenylbenzoát	celulosa	Chiralcel OJ-RH, Chiralcel OJ&OJ-H, Eurocel-03
acetát	celulosa	Chiralcel OA
4-chlorofenylkarbamát	celulosa	Chiralcel OF
4-methylfenylkarbamát	celulosa	Chiralcel OG
cinnamát	celulosa	Chiralcel OK
benzoát	celulosa	Chiralcel OB&OB-H, Eurocel-02
fenylkarbamát	celulosa	Chiralcel OC&OC-H, Eurocel-04
3,5-dimethylfenylkarbamát	amylosa	Chiralpak AD-3R, Chiralpak AD&AD-H, Chiralpak IA, Chiralpak D-SFC, Nucleocel Alpha, AmyCoat, AmyCoat RP, Chiral Art Amylose-SA, Amylose C, Amylose-C Neo, Reprisil Chiral-AM
	celulosa	Chiralcel OD-3R, Chiralcel OD&OD-H, Chiralpak IB, Lux Cellulose-1, Eurocel-01, Nucleocel Delta, CelluCoat, CelluCoat RP, Chiral Art Cellulose-SB, Cellulose C, Reprisil Chiral-OM
1-fenylethylkarbamát	amylosa	Chiralpak AS-3R, Chiralpak AS&AS-H, Chiralpak AS-SFC
5-chloro-2-methylfenylkarbamát	amylosa	Chiralpak AY-3R, Chiralpak AY&AY-H, Chiralpak AY-SFC, Lux Amylose-2
	celulosa	Chiralcel OY-3R, Chiralcel OY&OY-H3
3-chloro-4-methylfenylkarbamát	amylosa	Chiralpak AZ-3R, Chiralpak AZ&AZ-H
	celulosa	Chiralcel OZ-3R, Chiralcel OZ&OZ-H, Lux Cellulose-2
4-chloro-3-methylfenylkarbamát	celulosa	Lux Cellulose-4
4-methylbenzoát	celulosa	Lux Cellulose-3, Chiral Art Cellulose-SJ
3,5-dichlorofenylkarbamát	celulosa	Chiral Art Cellulose-SC



2,4-dimethylfenylkarbamát 4-methylbenzoát 4-methylfenylkarbamát

Obrázek 15: Chemické struktury derivátů používaných pro chirální kolony na bázi polysacharidů ^[84]

Mezi nejznámější výrobce náplní chirálních kolon patří společnosti Daicel Corporation, YMC, Merck, Agilent Technologies, Phenomenex či Restek Corporation. První čtyři zmiňované pak ovládají okolo 85 % celosvětového trhu s chirálními kolonami. Největší část produkovaných kolon tvoří analytické a preparativní kolony. Nejčastěji jsou pak vyráběny kolony pro kapalinovou chromatografii (LC – *liquid chromatography*), jejíž podíl celosvětově produkce dosahuje 82 %, dále se jedná o plynovou chromatografii (GC – *gas chromatography*) a superkritickou fluidní chromatografii (SFC – *supercritical fluid chromatography*) ^[61,62].

Významným parametrem chirálních kolon je technologie, jakou je selektor „přichycen“ k nosiči (tím je nejčastěji silikagel). Derivát polysacharidu (selektor) může být na nosič vázán kovalentně (pak mluvíme o tzv. „imobilizované“ stacionární fázi), nebo pouze dynamicky nanesen (tzv. „pokrytá“ stacionární fáze) ^[63]. Výhodou imobilizované kolony je použití širšího spektra rozpouštědel. Agresivnější rozpouštědla jako aceton či tetrahydrofuran totiž mohou „pokrytou“ kolonu nenávratně poškodit. Důvodem je, že tato rozpouštědla mohou chirální selektor vymýt, čímž kolona ztratí separační schopnost ^[64]. První vyvinutá kolona s derivátem polysacharidu naneseným na silikagel byla představena skupinou Okamoto a kol. roku 1984 ^[65], první kolona s derivátem imobilizovaným na silikagelu pak v roce 1987 ^[66]. Padró a kol. publikovali review shrnující (mimo jiné) padesát vybraných prací zabývajících se separacemi látek na polysacharidových kolonách ^[67]

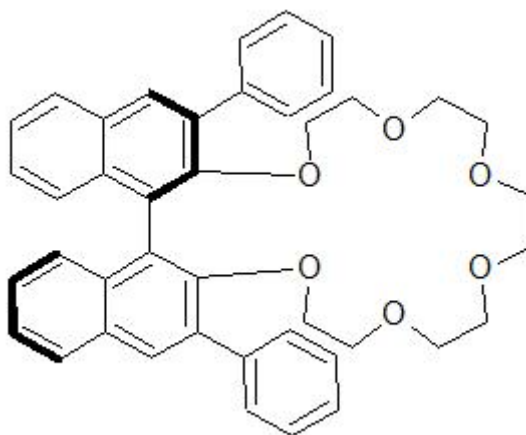
2.4.2.2. Makrocyclická antibiotika

Nejpoužívanějšími glykopeptidy pro chirální separaci jsou avoparcin, vankomycin, teikoplanin, teikoplanin aglykon a ristocetin. Struktura těchto látek obsahuje aglykonovou

„misku“ tvořenou makrocyclickým kruhem a peptidickým řetězcem s různým počtem ethericky vázaných cukerných jednotek. Makrocyclická antibiotika mohou být použita ve všech třech chirálních módech. Na nosič jsou vázány kovalentně a používají se například pro separaci aminokyselin, β -blokátorů či profenů [68, 69]. Tento typ chirálních selektorů byl použit například Alothmanem a kol. pro separaci enantiomerů primachinu, mepakrinu a tafenochinu [70] či Gao a kol. pro separaci axiálně chirálního dimethyldifenylkarboxylátu [71].

2.4.2.3. Crown-ethery

Crown-ethery se jako chirální selektory uplatnily například při separaci látek obsahujících primární aminovou skupinu. Pro separaci používáme crown-ethery založené na (3,3'-difenyl-1,1'-binaftyl)-20-crown-6-etheru (**Obr. 16**), které mohou být kovalentně vázané (imobilizované) či nanesené („coated“) na silikagelu nebo oktadecylsilikagelu. Kolony jsou známy například pod komerčním názvem Crownpak CR. Byla publikována řada prací zabývajících se separací α -aminokyselin, β -aminokyselin, aminoalkoholů, kathinonu či valacikloviru na těchto fázích [72-75]. Dalšími často používanými selektory jsou (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetrakarboxylová kyselina (ChiroSil RCA) a (-)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetrakarboxylová kyselina (ChiroSil SCA). Poprvé byla tato kyselina využita pro chirální separaci v roce 1998. Tato látka byla mimo jiné využita jako selektor pro označení enantiomerů v NMR, kapilární elektroforéze a hmotnostní spektrometrii [76].



Obrázek 16: Struktura (3,3'-difenyl-1,1'-binaftyl)-20-crown-6-etheru

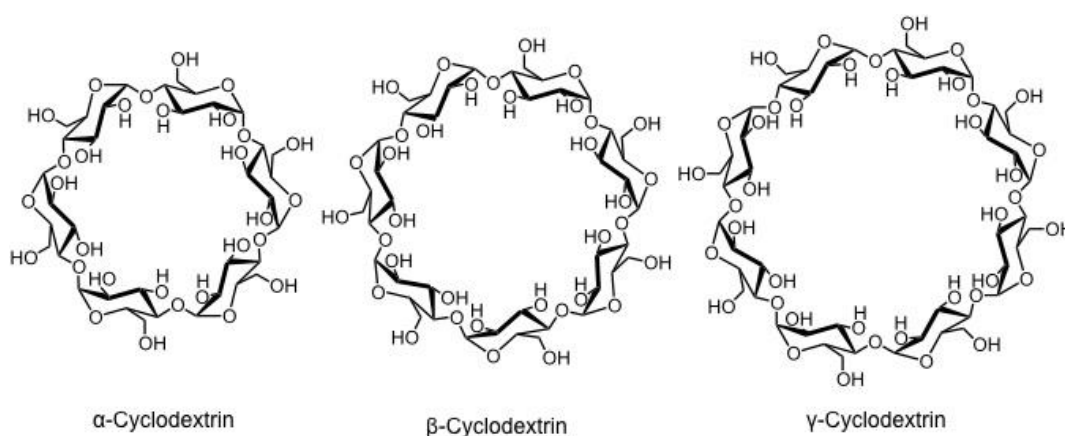
2.4.2.4. Glykoproteiny

Glykoproteiny jsou makromolekulární látky složené z proteinové části (L-aminokyseliny spojené peptidickou vazbou) a sacharidů, které jsou na proteinovou část

vázány glykosidickou vazbou. Výhodou těchto stacionárních fází je možnost separace různých druhů chirálních látek, aniž by byla potřeba je derivatizovat či možnost použití vodných mobilních fází. Nevýhodou je možnost práce pouze při teplotách do 40 °C z důvodu degradace samotné stacionární fáze. Další nevýhodou je nízká kapacita kolony, kvůli které není možné použít vyšší koncentrace analytů. Při použití vyšší koncentrace dochází ke snížení účinnosti kolony. Jako chirální selektory jsou využívány sérové transportní proteiny (α 1-kyselý glykoprotein (AGP), lidský a hovězí sérový albumin (HSA a BSA)), enzymy (cellobiohydrolázy, α -chymotrypsin, ...) a další proteiny, jako je ovomukoid (OVM), avidin a další [29]. Separaci na glykoproteinových stacionárních fázích se podrobněji věnuje review Bi a kol. [77]. Příkladem prací, ve kterých byly glykoproteinové fáze využity, jsou například separace antihistaminik od Zhu a kol. [78] či stanovení cetirizinu Choi a kol. [79].

2.4.2.5. Cyklodextriny

Dalším typem stacionární fáze, jejíž struktura zahrnuje sacharidy, je fáze cyklodextrinová. Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy, které se skládají ze šesti až osmi glukosových jednotek spojených α -1,4-glykosidickou vazbou. Dextriny jsou produktem částečné hydrolyzy škrobu a k uzavření kruhu dochází působením enzymu CD-glykosyl-transferázy. Nejznámějšími cyklodextriny jsou α -CD, β -CD a γ -CD. Tyto látky se od sebe liší počtem glukosových jednotek, jak je patrné z **Obr. 17**.



Obrázek 17: Chemické struktury jednotlivých cyklodextrinů [29]

Pro účely samotné separace je využíváno jak nativních cyklodextrinů, tak jejich derivátů. Deriváty vznikají například substitucí vodíku v hydroxylové skupině či celé hydroxylové skupiny alkylem, aminem, acylem či glukosou a vykazují lepší rozpustnost

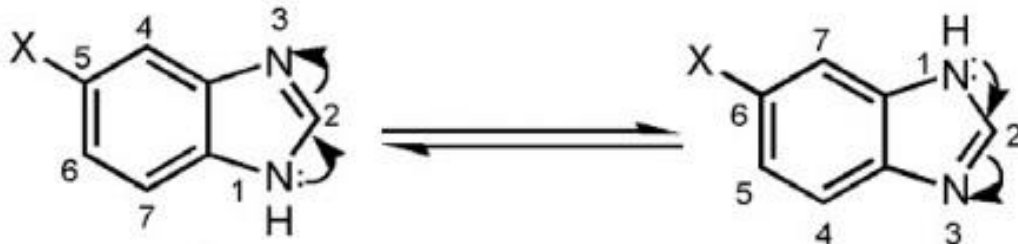
v rozpouštědlech, lepší selektivitu vůči analytu a další požadované vlastnosti. Komerčně vyráběné cyklodextrinové kolony jsou prodávány například pod názvem Cyclobond, Nukleodex či ChiraDex^[80, 81]. β -CD jako chirální selektor byl použit například při stanovení axiálně chirálního ketotifenu a norketotifenu ve studii Fenga a kol.^[82] či pro separaci enantiomerů ferocenalkylbenzimidazolů^[83].

2.4.2.6. Chirální stacionární fáze pro ligandově výměnnou chromatografii

Jak již bylo zmíněno výše, v tento typ separace využívá tvorbu ternárního komplexu separované látky s kationtem kovu a chirálním selektorem. Stacionární fáze jsou tedy tvořené chirálním selektorem ((S,S)-N,N'-bis(fenylalanyl)ethandiamin) kovalentně navázaným či pouze dynamicky naneseným na nosič (silikagel). Komerčně dostupné kolony jsou známé například pod názvem Chirex, Astec CLC, Nucleosil Chiral-1 nebo Chiralpak WH & MA(+). Tuto metodu využíváme pro separaci chelatujících látek jako jsou aminokyseliny, aminoalkoholy, dioly či malé peptidy^[55, 60].

2.5. Benzimidazoly

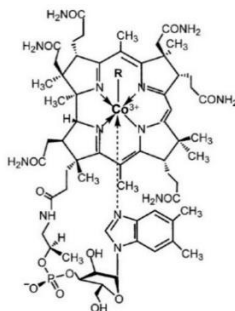
Benzimidazoly jsou bicyklické sloučeniny se sumárním vzorcem $C_7H_6N_2$. Jejich skelet je tvořen benzenovým a imidazolovým kruhem (spojenými na čtvrtém a pátém uhlíku imidazolu). Vzhledem k přítomnosti dvojné vazby mezi C2 a N3 existují tyto látky ve dvou tautomerních formách (**Obr. 18**).



Obrázek 18: Tautomerní formy benzimidazolu ^[2]

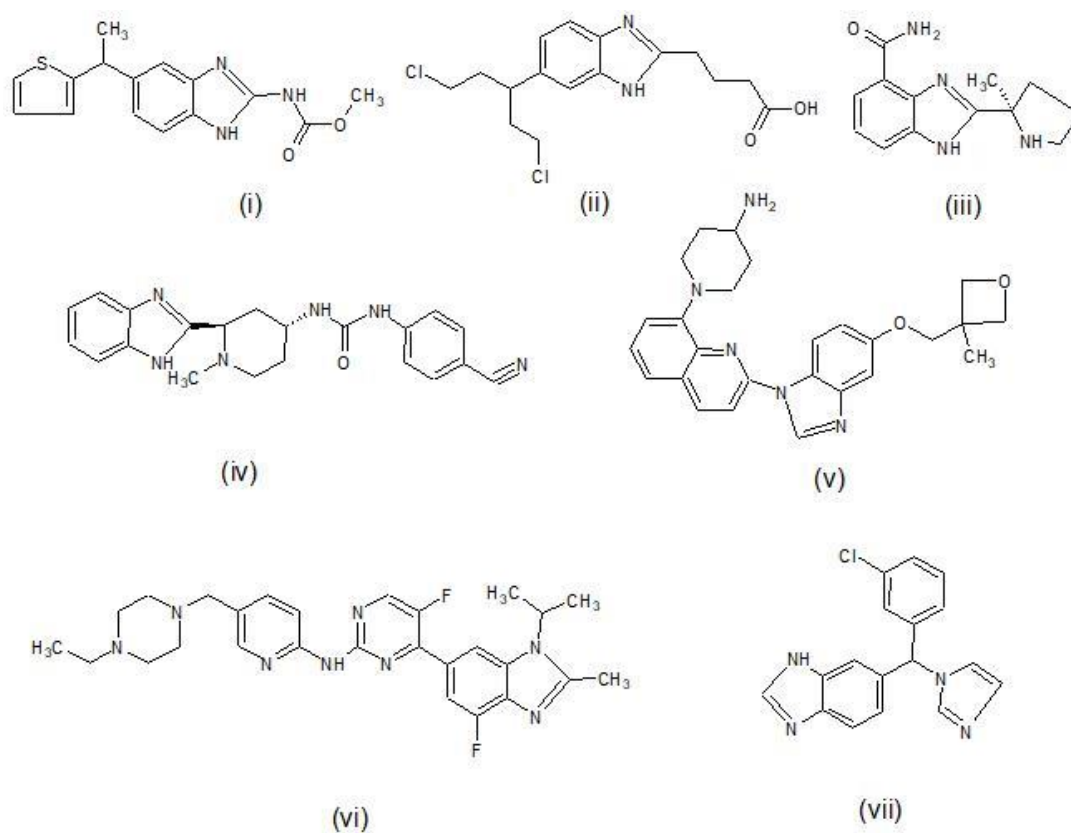
Jedná se o slabě bazickou látku s $pK_{a1} = 5,3$ a $pK_{a2} = 12,3$. Benzimidazol je Brønstedovou kyselinou, schopnou tvořit vodíkové vazby. Je rozpustný v polárních rozpouštědlech (například v horké vodě nebo alkoholu), naopak v nepolárních rozpouštědlech (jako je benzen) je zcela nerozpustný. Slabě rozpustný je pak v diethyletheru. Jeho rozpustnost však lze ovlivnit vhodnou substitucí. Například 2-methylbenzimidazol je dobře rozpustný v etherech, zatímco 2-aminobenzimidazol je dobře rozpustný ve vodě ^[85].

Benzimidazoly existují jak přírodní, tak syntetické. Důležitou přírodní látkou, která obsahuje benzimidazol ve svém skeletu je vitamín B12, známý také jako kobalamin, je porfyrinový komplex s kobaltem jakožto centrálním atomem. Benzimidazol se v něm vyskytuje jako jeden z ligandů, vázaných na centrální atom (**Obr. 19**) ^[86]. Dalším příkladem přírodního benzimidazolu je bromogaliferin. Tato látka se nachází se v mořské houbě *Agelas* a má profylaktické účinky proti bakterii *Rhodothalassium salexigens* ^[87].



Obrázek 19: Chemická struktura vitamínu B12 ^[86]

Syntetické benzimidazoly jsou produkty medicínální chemie, které jsou využívány v medicíně pro své analgetické, antivirové, protirakovinné, protiplísňové či antihelmintické vlastnosti. Většina farmakologicky aktivních benzimidazolů spadá do skupiny se substituocí na N1, C2, C5 či C6. Chemické struktury vybraných zástupců využívaných jako léčiva jsou uvedené na **Obr. 20**. Jde o nokodazol (i), bendamustin (ii), veliparib (iii), glasdegib (iv), crenolanib (v), abemaciclib (vi) a liarozol (vii). Byly nalezeny také deriváty, které jsou efektivní proti tuberkulóze nebo viru Epstein-Barrové. Dokonce byl připraven derivát, který dokáže působit jako inhibitor viru HIV. Existuje rovněž řada prací zabývajících tvorbou nových derivátů benzimidazolů a jejich uplatněním ve farmaceutickém průmyslu [88-91].



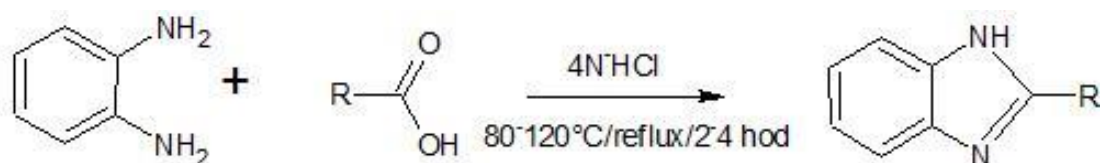
Obrázek 20: Chemické struktury substituovaných benzimidazolů využívaných jako komerčně dostupná léčiva

Velké využití mají chirální benzimidazoly, jenž jsou používány jako inhibitory protonových pump (slouží jako blokátory H^+/K^+ ATPasy). Jedná se o látky jako omeprazol, lansoprazol či rabeprazol [92]. Veliparib je chirální benzimidazol, jehož R-enantiomer je potencionální protirakovinným léčivem. Tato látka je schopna inhibovat účinek enzymu PARP zodpovědného za podporu opravy DNA a přežití poškozené buňky [93]. Ve farmacii našly uplatnění také achirální benzimidazoly, mezi něž patří např. antihelminika jako

albendazol či fenbendazol sloužící k inhibici polymerace tubulinu, což je protein nacházející se ve všech živočišných buňkách. Tento protein je podstatný pro tvorbu mikrotubulů v buňkách parazitů. Dochází tedy k přerušení buněčného transportu a tvorby buněk parazitů [94]. Důvodem širokého spektra využití benzimidazolů je fakt, že jejich chemická struktura je podobná mnoha přírodním i syntetickým molekulám. Díky tomu mohou snadno interagovat s biomolekulami v živých organismech [95]. Využití těchto látek však není omezeno pouze na oblast léčiv, ale možné je také v oblasti palivových článků či antikorozi ochrany. Předpokladem antikorozi ochrany je adsorpce molekuly na povrch kovu. Adsorpce může být dvojího typu – prvním typem je fyzikální sorpce, tím druhým pak chemisorpce. Adsorpce molekuly inhibitoru na povrch kovu je ovlivněna jejími fyzikálně chemickými vlastnostmi jako jsou její funkční skupiny, sterické faktory, aromaticita, elektronová hustota na donorovém atomu a π charakter donorovaných elektronů [96, 3].

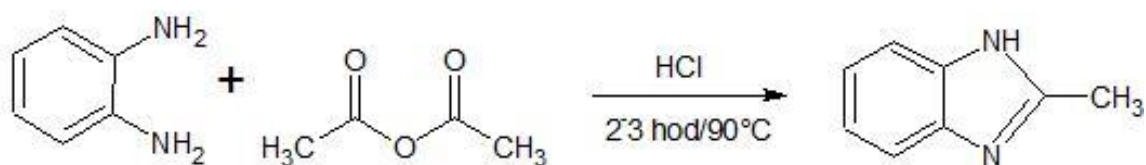
2.5.1. Příprava benzimidazolů

Existuje mnoho obecných reakcí pro přípravu benzimidazolů, tato kapitola proto popisuje pouze vybrané způsoby syntézy. Výchozí látkou pro většinu reakcí je o-fenylendiamin. Druhý reaktant pak ovlivňuje strukturu výsledného produktu. Prvním způsobem přípravy je reakce s karboxylovou kyselinou. Při reakci o-fenylendiaminu s kyselinou mravenčí vzniká benzimidazol, při použití víceuhlíkatých kyselin pak jeho příslušný alkylderivát. Jedná se o laboratorní přípravu probíhající v kyselém prostředí s výtěžkem okolo 75 % (Obr. 21).



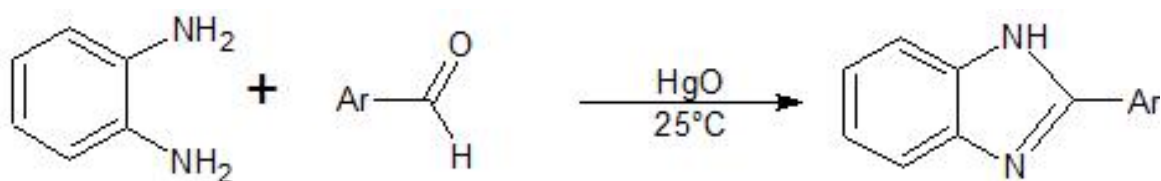
Obrázek 21: Příprava benzimidazolu reakcí o-fenylendiaminu a karboxylové kyseliny

Druhý typ přípravy vychází z reakce s acetanhydridem v kyselém prostředí. Produktem takové reakce je 2-methylbenzimidazol. Výtěžek reakce je asi 68 % (Obr. 22).



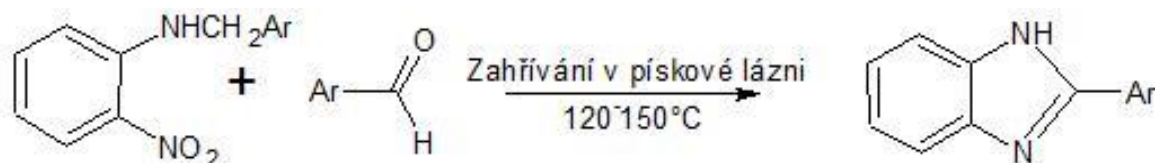
Obrázek 22: Příprava benzimidazolu reakcí o-fenylendiaminu s acetanhydridem

Třetí způsob přípravy je založen na reakci o-fenylendiaminu s arylaldehydy nebo alkylaldehydy v různých prostředích. Výslednými produkty jsou 2-arylbenzimidazoly nebo 2-alkylbenzimidazoly v závislosti na použitém reaktantu (**Obr. 23**).



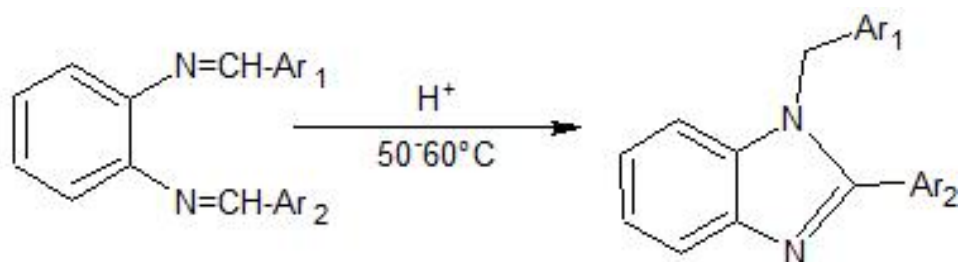
Obrázek 23: Příprava arylbenzimidazolu reakcí o-fenylendiaminu s arylaldehydem

Další zmíněný typ přípravy jako jediný nevychází z o-fenylendiaminu, ale o-nitroarylaminu nebo dinitroarenů. Reakce probíhající v přítomnosti niklu jako katalyzátoru vede k tvorbě 1-aryl-2-aminobenzenu. Dalším zahříváním dojde ke vzniku substituovaného benzimidazolu na C2. Naproti tomu v případě, že budeme v pískové lázni zahřívat N-substituovaný o-nitroanilin, bude produktem reakce 2-arylbenzimidazol (**Obr. 24**).



Obrázek 24: Příprava arylbenzimidazolu zahříváním o-nitroarylaminu v pískové lázni

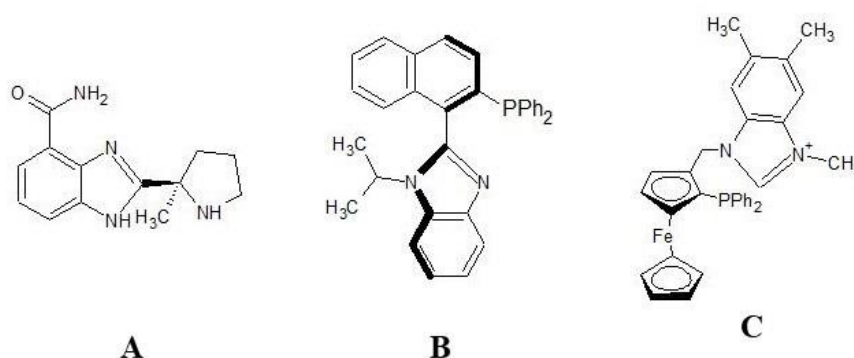
Pro přípravu benzimidazolů substituovaných na N1 lze využít cykлизace N,N-disubstituovaného fenylendiaminu v kyselém prostředí za teploty 50-60°C. Produktem takové reakce je 1,2-disubstituovaný benzimidazol (viz **Obr. 25**). Další typy příprav jsou rozebrány například v článku Sing a kol.^[97] či v knize P. N. Prestona^[98].



Obrázek 25: Příprava benzimidazolu substituovaného na N2

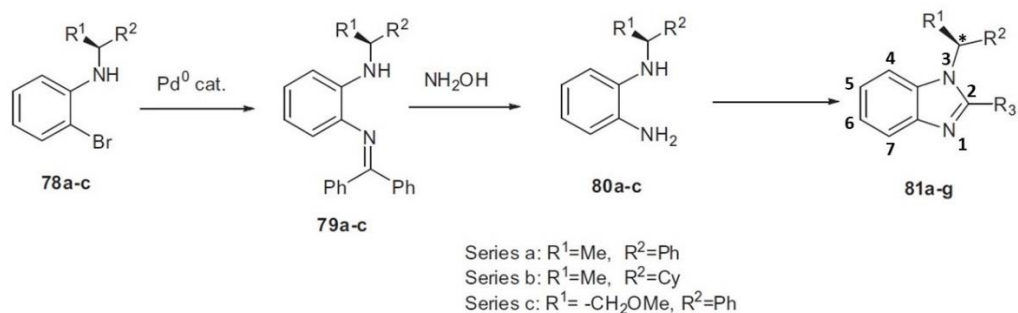
2.5.2. Chirální benzimidazoly

Benzimidazoly využívané v medicíně, syntéze atd. jsou často substituované na uhlíku, dusíku (příp. obojím). Mnoho takovýchto substituovaných benzimidazolů je díky přítomnosti vhodně orientovaných substituentů opticky aktivních. Benzimidazoly mohou vykazovat centrální, axiální i planární chiralitu (**Obr. 26**). Takovéto látky našly především uplatnění jako součást katalyzátorů v organických syntézách či katalyzátorech na bázi kovu využívaných v asymetrických syntézách. Nelze pak opomenout jejich využití v oblasti zjišťování optické čistoty v látkách. Zde benzimidazoly fungují jako reaktanty v metodě kinetického rozlišení a také v metodě indukovaného cirkulárního dichroismu pro zjištění optické čistoty chirálních karboxylových kyselin využívaných jako intermediáty ve výzkumu léčiv ^[3].



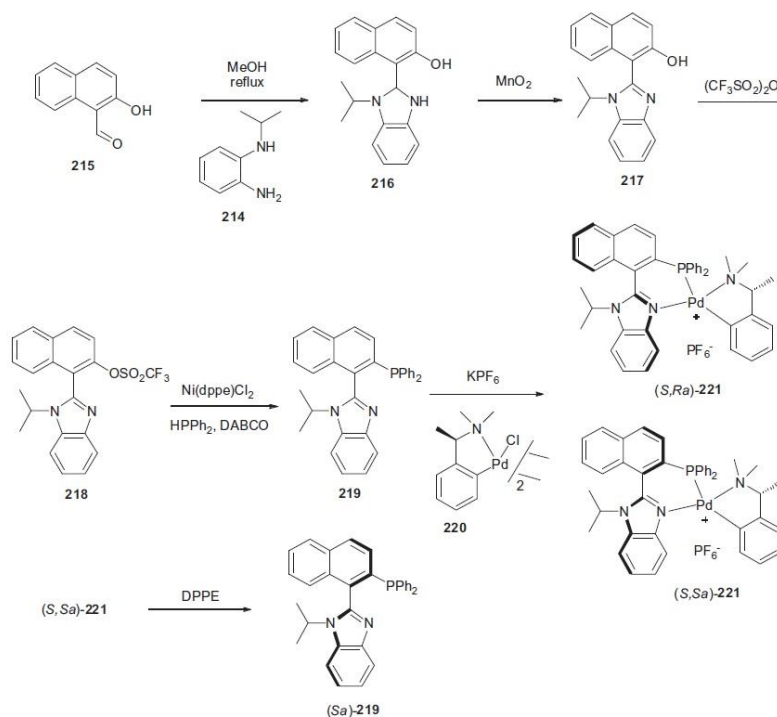
Obrázek 26: Struktury vybraných benzimidazolů vykazující centrální chiralitu (A), axiální chiralitu (B) a planární chiralitu (C)

Centrálně chirální benzimidazoly tvoří nejrozšířenější skupinu chirálních benzimidazolů. Důvodem je jednoduchost jejich syntézy a dostupnost reaktantů jako jsou chirální kyseliny, karbohydráty, aldehydy či aminy. Jednou z nejpoužívanějších příprav chirálních benzimidazolů substituovaných na C2 je Philipsova kondenzace. Při tomto typu přípravy spolu reagují o-fenylendiamin a chirální karboxylová kyselina (například kyselina vinná) za vzniku benzimidazolu s chirálním centrem na uhlíku mimo benzimidazolový skelet. Pro přípravu chirálních benzimidazolů substituovaných na dusíku lze využít Buchwald-Hartwigovu aminaci. Tento způsob přípravy vede ke vzniku benzimidazolu substituovaného na C2 a na dusíku. Chirálním centrem se v tomto případě nestává uhlík C2, nýbrž uhlík na isoalkylovém zbytku (**Obr. 27**) ^[3].

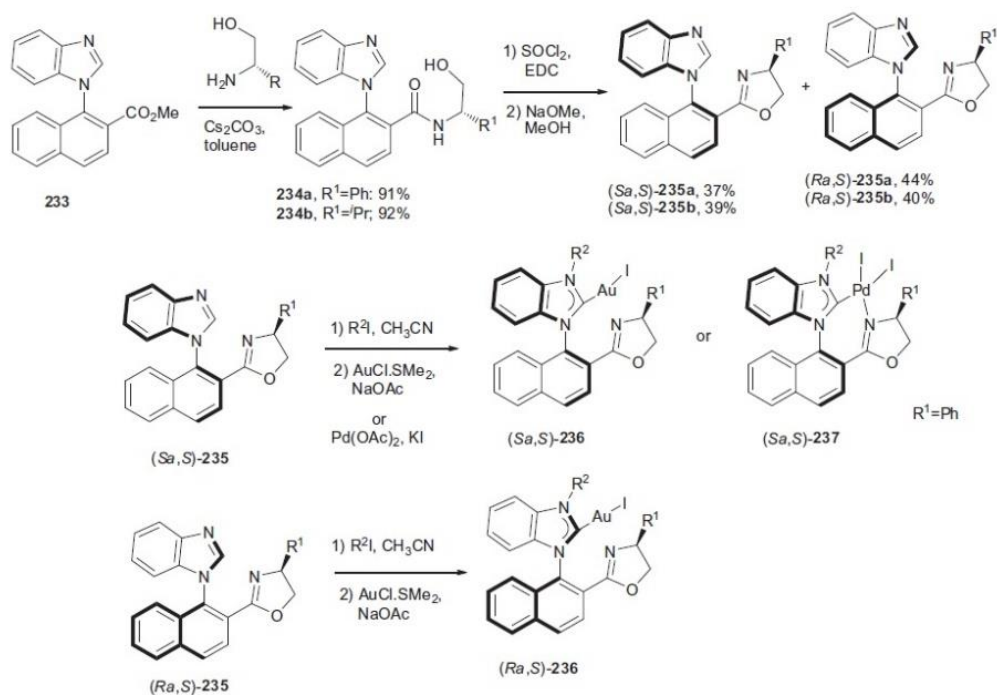


Obrázek 27: Buchwald-Hartwigova aminace vedoucí k centrálně chirálnímu benzimidazolu ^[3]

Velký rozvoj výzkumu axiálně chirálních látek používaných v organokatalýze nastal s objevem přípravy látek BINOL a BINAP. Axiálně chirální látky se vyskytují i mezi heterocykly a potažmo tedy i mezi benzimidazoly. Pro přípravu axiálně chirálních benzimidazolů byla Altenbachem a kol. vyvinuta metoda vedoucí ke vzniku axiální chirality na vazbě C-C mezi molekulou naftalenu a benzimidazolu (**Obr. 28**). Shi a kol. pak vyvinuli metodu pro přípravu látky s axiální chiralitou na vazbě C-N mezi molekulou naftalenu a benzimidazolu (**Obr. 29**) ^[3].



Obrázek 28: Příprava benzimidazolu s axiální chiralitou na vazbě C-C ^[3]



Obrázek 29: Příprava benzimidazolů s axiální chiralitou na vazbě C-N [3]

2.5.3. Separace chirálních benzimidazolů

Byla publikována řada prací zabývajících se separacemi chirálních benzimidazolů. Zde uvedu pouze některé. Separovat lze centrálně, axiálně i planárně chirální benzimidazoly. Pro jejich separaci jsou zpravidla využívány chirální stacionární fáze na bázi polysacharidů, což dokazuje že tento typ CSP (*chiral stationary phases*) je tím nejpoužívanějším v oblasti chirálních separací. Například Galinella a kol. separovali omeprazol na derivátu celulosy [99]. V literatuře lze najít separace derivátů benzimidazolů na polysacharidové koloně na bázi amylosy i celulosy. Pro jejich separaci je využíván normální mód, kdy je jako mobilní fáze využíván hexan s alkoholem (např. ethanol). Takový typ separace byl využit skupinou Vaccher a kol. při studiu separace enantiomerů AMP aktivované proteinkinázy [100]. Lze však také využít reverzní mód (například Tanaka a kol. použili tento typ CSP pro separaci enantiomerů pantoprazolu [47]) nebo polárně organický mód (separace omeprazolu na derivátu amylosy Ferretim a kol. [101]).

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie

Methanol (HPLC – gradient grade, Fisher Scientific, UK), Ethanol (UVAPUR, BCCChemservis, Česká republika), 1-propanol (Lachner, Česká republika), 2-propanol (Lachner, Česká republika), n-Hexan (PENTA, Česká republika), Acetonitril (HPLC – super gradient, VWR Chemicals, Francie), deionizovaná voda (Milipore, Francie), vzorky axiálně chirálních benzimidazolů dodané Katedrou organické chemie Univerzity Palackého.

3.2. Instrumentální vybavení

Chirální separace látek pracovně označených jako vzorky A-D (systematické názvy viz 3.4.) byly provedeny na systému HPLC řady Smartline (Knauer, Berlín, Německo). Tento systém se skládá z modulů Smartline Pump 1000, Smartline Manager 5000 a Smartline UV Detector 2600. Optická otáčivost separovaných látek byla sledována na detektoru optické otáčivosti Chiralyser-MP (IBZ Messtechnik GmbH, Springe, Německo). Pro vyhodnocení dat byl použit program Clarity (DataApex, Česká republika).

3.3. Příprava vzorků

Vzorky A-D byly dodány rozpuštěné v methanolu koncentraci 5,16 g/l (vzorek A), 8 g/l (vzorek B), 40 g/l (vzorek C) a 17 g/l (vzorek D). Vzorky byly skladovány při -18 °C a pro nástřik ředěny 25× (vzorky A a B), resp. 50× (vzorky C a D) použitou mobilní fází. Pro vybranou analýzu se zapojeným polarimetrickým detektorem byl vzorek D zředěn 500× postupným ředěním ve dvou krocích.

3.4. Podmínky chromatografických analýz

Analytická separace racemátu 1N-[2-((2,6-diisopropylfen-1-yl)karbamoyl)fen-1-yl]-2-(pyridin-2-yl)-benzimidazol (dále označen jako „vzorek A“)

Mobilní fáze: methanol:voda 3:1 (v/v)

Kolona: Lux Cellulose-1, 250 x 4,6 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$ (Phenomenex, Torrance, USA)

Průtok: 1ml/min

Nástřik: 20 μl

Detekce: UV, $\lambda = 274 \text{ nm}$

Analytická separace racemátu 1N-[2-(1H-benzimidazol-2-yl)fen-1-yl]-2-(pyridin-2-yl)benzimidazol (dále označen jako „vzorek B“)

Mobilní fáze methanol:voda 3:1 (v/v)

Kolona: Lux Cellulose-1, 250 x 4,6 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$ (Phenomenex, Torrance, USA)

Průtok: 1ml/min

Nástřík: 20 μl

Detekce: UV, $\lambda = 274 \text{ nm}$

Analytická separace racemátu 1N-[2-((2,4,6-trimethylfen-1-yl)karbamoyl)fen-1-yl]-2-(pyridin-2-yl)-benzimidazol (dále označen jako „vzorek C“)

Mobilní fáze: methanol:voda 9:1

Kolona: Lux Cellulose-3, 250 x 4,6 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$ (Phenomenex, Torrance, USA)

Průtok: 1ml/min

Nástřík: 20 μl

Detekce: UV, $\lambda = 274 \text{ nm}$

Analytická separace racemátu 1N-[2-(benzyloxykarbonyl)fen-1-yl]-2-(pyridin-2-yl)benzimidazol (dále označen jako „vzorek D“)

Mobilní fáze: hexan:voda 3:1 (v/v)

Kolona: Lux Cellulose-3, 250 x 4,6 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$ (Phenomenex, Torrance, USA)

Průtok: 1ml/min

Nástřík: 20 μl

Detekce: UV, $\lambda = 274 \text{ nm}$

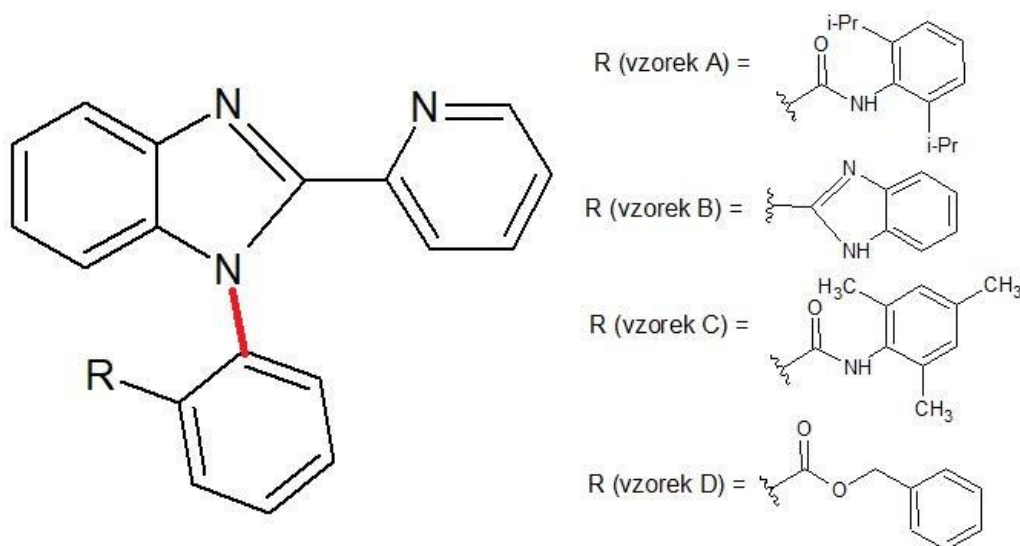
3.5. Měření optické otáčivosti

Pro měření optické otáčivosti enantiomerů byl použit polarimetrický detektor CHIRALYSER-MP, který byl nastaven na nejvyšší citlivost („range limit“ = 4,0 mdeg. / 1000 mV). Základní linie byla ponechána v základním nastavení („base offset“ = 500,0 mV). Detektor byl připojen do série za UV/Vis detektor kapalinového chromatografu a optická otáčivost jednotlivých separovaných enantiomerů byla snímána v reálném čase souběžně

s probíhající analýzou. Detektor byl použit pro potvrzení přítomnosti obou enantiomerů v analyzovaném vzorku a pro jejich identifikaci v UV/Vis chromatogramu.

4. Diskuze a výsledky

Cílem práce bylo vyvinout metody pro chirální separaci nově syntetizovaných benzimidazolů s axiální chiralitou na vazbě C-N (**Obr. 30**). Pro účel byly použity chirální kolony Lux Cellulose-1 a Lux Cellulose-3, lišící se chirálním selektorem vázaným na polysacharid, kterým je v obou případech celuloza. Zatímco Lux Cellulose-1 obsahuje selektor 3,5-dimetylfenylkarbamát, u Lux Cellulose-3 je selektorem 4-metylbenzoát.



Obrázek 30: Struktura axiálně chirálních benzimidazolů s vyznačenou chirální vazbou

Většina vzorků byla studována na obou zmíněných kolonách s použitím většiny možných rozpouštědel kompatibilních s použitými (pokryvanými) polysacharidovými kolonami. Veškeré níže uvedené poměry použitých mobilních fází jsou objemové (v/v). Kromě studia vhodných podmínek pro separaci byla sledována změna selektivity, retenčních časů a rozlišení separace vlivem změny složení rozpouštědla, příp. kolony.

4.1. Analytická separace látky A

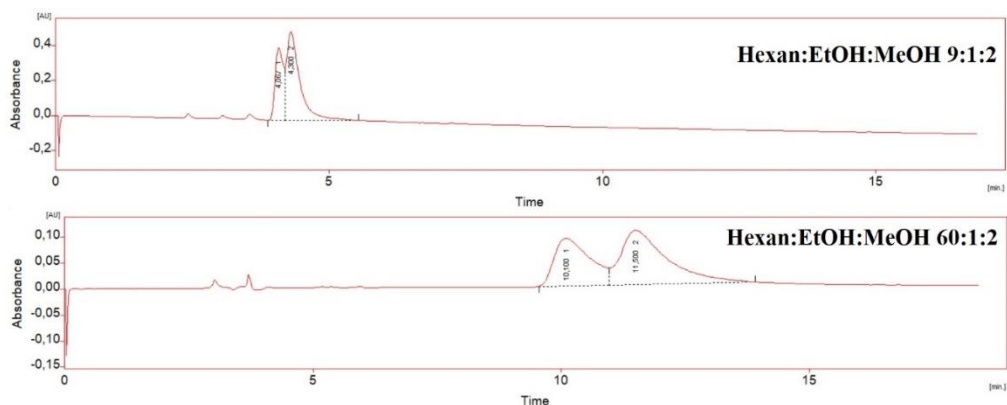
Látka A je benzimidazol substituovaný pyridinem na C2 a také substituovaným fenylem na N1. Substituent na fenylu způsobuje sterické bránění, v jehož důsledku je znemožněna volná rotace fenylu kolem vazby C-N. Toto bránění je příčinou axiální chiralitě látky A na vazbě C-N, která se projevuje její optickou aktivitou.

Testování látky A bylo započato na koloně Lux Cellulose-1. Prvotní analýza byla provedena v mobilní fázi methanolu. Separace úspěšná nebyla, nicméně na chromatogramu bylo vidět částečné rozdělení píku, a tedy informace o potencionální selektivě methanolu.

Poté byla analýza provedena v ethanolu. Ani zde nebyla separace úspěšná, ale na chromatogramu byl opět vidět náznak separace, a tedy potenciální selektivity ethanolu.

Literatura často jako vhodné složení mobilních fází pro separaci na polysacharidových kolonách uvádí směs polárního organického rozpouštědla s jiným rozpouštědlem – např. hexanem, či vodou ^[100, 101]. V tomto případě byl nejprve zvolen hexan, neboť má nižší viskozitu a vyšší těkavost oproti vodě. Vyšší těkavost je výhodná ve spojení s případnou izolací cílových analytů.

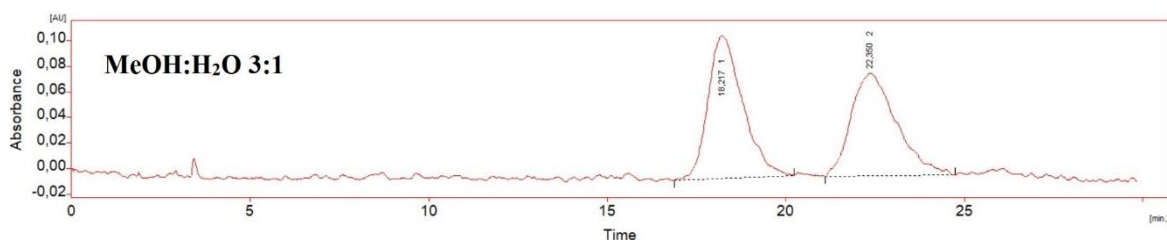
V dalším kroku byl proto použit pro separaci normální mód s mobilní fází hexan:EtOH v poměru 1:1. Nebylo dosaženo žádné separace, a proto byl poměr mobilní fáze změněn na hexan:EtOH 3:1. Ani v tomto případě však k separaci nedošlo. Do mobilní fáze byl proto přidán MeOH. Vzhledem k tomu, že směs hexan:MeOH tvoří emulzi, je nutné pro zjištění dokonalé mísitelnosti obou rozpouštědel do směsi přidat třetí složku, která je mísitelná s oběma zbylými. Jako takový emulgátor lze využít například EtOH, popřípadě i-PrOH, resp. n-PrOH. Empiricky bylo zjištěno, že na dostatečnou homogenizaci takové emulze postačí poloviční množství emulgátoru oproti méně zastoupené složce emulze. Byla proto připravena mobilní fáze hexan:EtOH:MeOH 9:1:2. Jejím použitím bylo dosaženo částečné separace obou enantiomerů s rozlišením $R = 0,59$. V dalším kroku optimalizace bylo zvýšeno procentuální zastoupení hexanu ve směsi na konečný poměr 60:1:2 (**Obr. 31**). Při tomto složení mobilní fáze bylo dosaženo lepší separace enantiomerů látky A s rozlišením 0,89 a retenčními časy $t_{R,1} = 10,10$ min a $t_{R,2} = 11,50$ min. Vzhledem k nedokonalé separaci i po velkém zvýšení procentuálního zastoupení hexanu ve směsi se však v optimalizaci s využitím nepolárního rozpouštědla (tedy hexanu) dále nepokračovalo. Důvodem byla především stále nízká kapacita, neboť se nám pomocí hexanu nepodařilo zadržet separovaný analyt déle na koloně.



Obrázek 31: Separace vzorku A v mobilní fázi hexan:EtOH:MeOH v uvedených poměrech na koloně Lux Cellulose-1

V další fázi optimalizace byl proto testován reverzní mód s využitím polárně-organického rozpouštědla s nejlepšími dosavadními výsledky (tj. methanolu) a vody. První pokus proběhl ve směsi MeOH:H₂O v poměru 1:1, k eluci enantiomerů však nedošlo ani po 60 min a proto byla analýza ukončena a analyty byly z kolony eluovány pomocí čistého MeOH. Následně bylo zvýšeno procentuální zastoupení MeOH ve směsi na poměr 2:1 MeOH:H₂O. Nebylo dosaženo žádné separace a analyt byl eluován z kolony v čase $t_R = 22,61$ min.

V rámci dalšího pokusu o separaci byl opět zvýšen obsah MeOH v mobilní fázi, a to na poměr 3:1 MeOH: H₂O. Bylo dosaženo separace enantiomerů s rozlišením $R = 1,96$, $t_{R,1} = 18,22$ min a $t_{R,2} = 22,35$ min (**Obr. 32**). Pro ověření reprodukovatelnosti výsledků byla tato separace zopakována ještě třikrát. Při opakování byly enantiomery separovány s $R = 1,97 \pm 0,01$ a $t_{R1} = 18,47 \pm 0,19$ min a $t_{R2} = 20,66 \pm 0,26$ min (viz. **Tab. II**).



Obrázek 32: Separace látky A v mobilní fázi MeOH:H₂O 3:1 na koloně Lux Cellulose-1

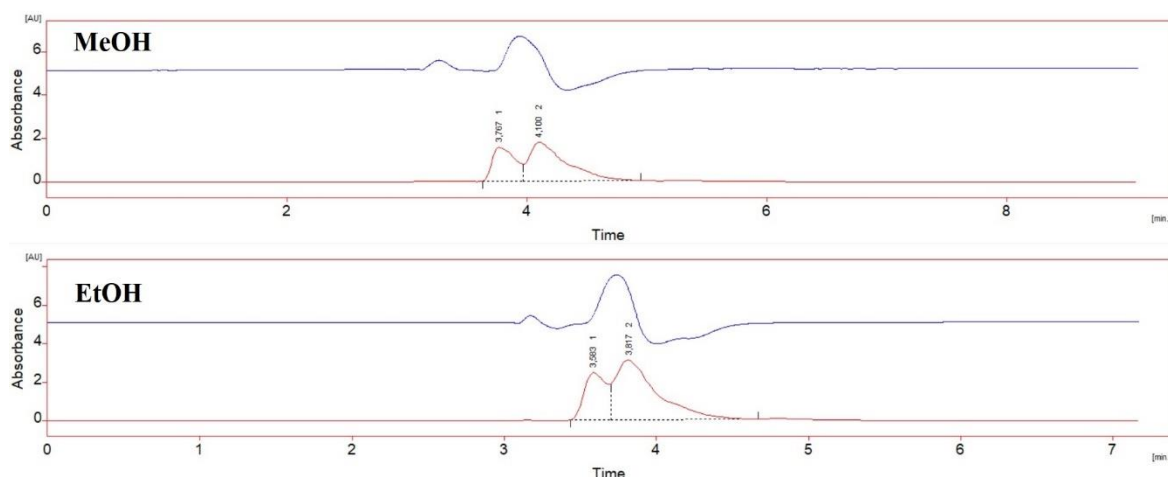
Tabulka II: Retenční časy jednotlivých enantiomerů vzorku A při separaci MeOH:H₂O 3:1 na koloně Lux Cellulose-1

Pokus	t _R 1 (min)	t _R 2 (min)	R
1	18,22	22,35	1,96
2	18,66	22,67	1,96
3	18,55	22,98	1,99
Průměr	18,47	22,66	1,97
Směrodatná odchylka	±0,19	±0,26	±0,01

Byla nalezena vhodná metoda pro analytickou chirální separaci látky A rozpuštěné v methanolu využívající kombinaci kolony Lux Cellulose-1 a mobilní fáze MeOH:H₂O 3:1 při průtoku m.f. 1 ml/min.

4.2. Analytická separace látky B

Struktura látky B se od ostatních vzorků liší poměrně zásadně přítomností druhého benzimidazolového cyklu vázaného uhlíkem C2 na fenylový zbytek (viz. **Obr. 30**). Testování látky B bylo započato na koloně Lux Cellulose-1 v mobilních fázích tvořených čistým MeOH, resp. EtOH. V obou případech bylo dosaženo částečné separace (**Obr. 33**) a oba alkoholy tedy mají potenciál zvyšovat selektivitu separace.



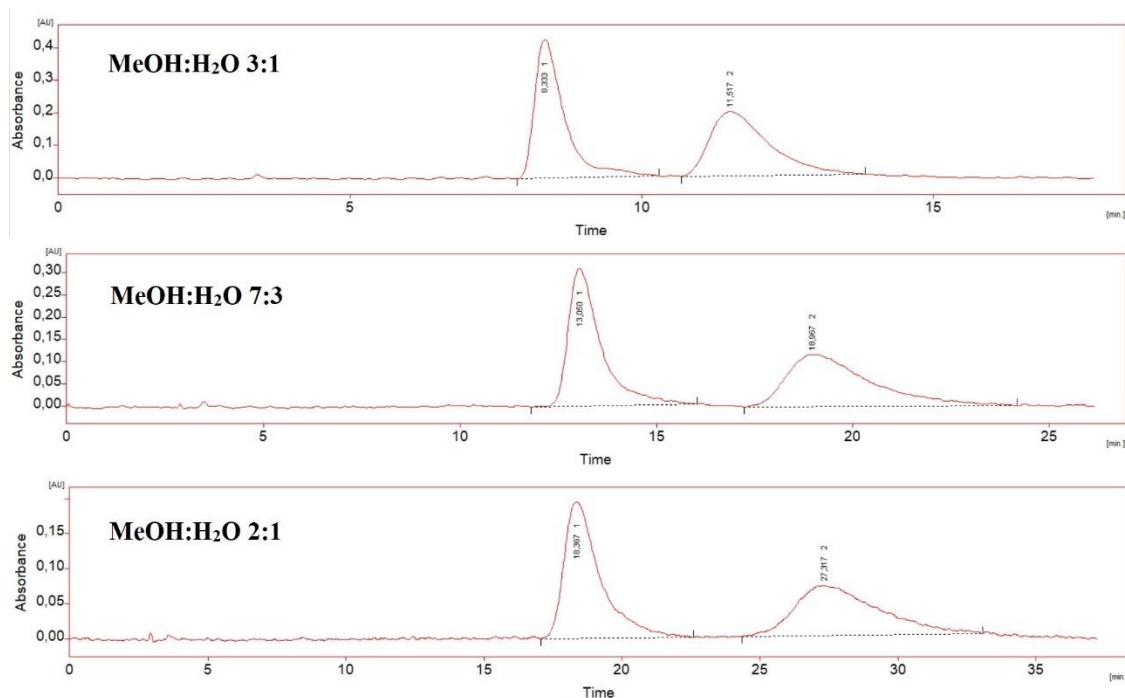
Obrázek 33: Separace látky B v uvedených mobilních fázích

Vzhledem k pozitivní zkušenosti s použitím polárně organického módu při separaci enantiomerů látky A byla v dalším kroku připravena mobilní fáze MeOH:H₂O 3:1. Bylo dosaženo separace této látky s rozlišením $R = 2,36$, přičemž první enantiomer byl z kolony eluován v čase $t_{R,1} = 8,33$ min, druhý poté v čase $t_{R,2} = 11,53$ min. Dále byla separace testována v různých poměrech methanolu a vody s cílem fokusovat druhý pík, který se

v podmínkách první analýzy rozmýval. Nejprve byla použita mobilní fáze MeOH:H₂O 3:2, zde však k separaci nedošlo. Vysoký obsah vody v mobilní fázi způsobil přílišné zadržení vzorku na koloně ($t_R = 41,82$ min) a především koeluci obou píků. Dále byla látka B separována za použití mobilní fáze s nižším obsahem vody. Při analýze v mobilní fázi o složení MeOH:H₂O 2:1 došlo k separaci s rozlišením $R = 2,33$ a retenčním časy enantiomerů $t_{R,1} = 18,37$ min, resp. $t_{R,2} = 27,32$ min. Snížení obsahu MeOH ve směsi (oproti poměru 3:1) tedy způsobilo nárůst retenčních časů o více než deset minut. Tento fakt je zajímavým při porovnání s podmínkami separace látky A, kde vyšší obsah vody v mobilní fázi snižoval retenci analytu. Mobilní fáze byla dále upravena zvýšením obsahu MeOH na poměr 7:3. V takovéto mobilní fázi byl vzorek separován s rozlišením $R = 2,34$ a retenčními časy $t_{R,1} = 13,05$ min a $t_{R,2} = 18,97$ min. K lepší fokusaci píku však nedošlo (viz. **Obr. 34**), a proto bylo dále hledáno složení mobilní fáze, u které by bylo tomuto jevu zamezeno.

Tabulka III: Retenční časy eluovaných látek a rozlišení pro různé poměry MeOH a H₂O v mobilní fázi při separaci látky B na koloně Lux Cellulose-1

Poměr mobilní fáze MeOH:H ₂ O	t_R 1 (min)	t_R 2 (min)	R
3:1	8,33	11,53	2,36
7:3	13,05	18,97	2,34
2:1	18,37	27,32	2,33

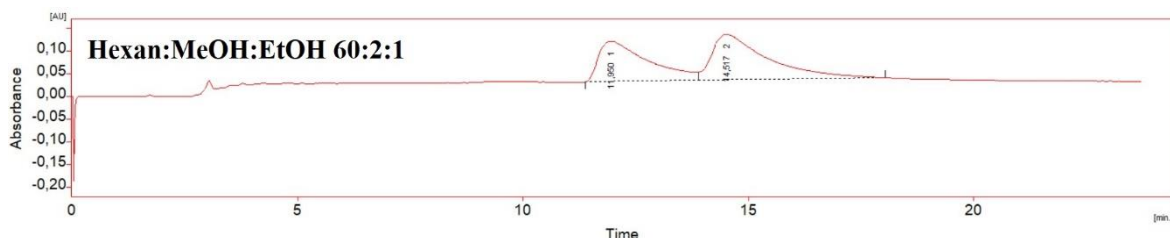


Obrázek 34: Separace látky B na koloně Lux Cellulose-1 s použitím mobilní fáze lišící se poměrem MeOH a H₂O

Pro další separace na koloně Lux Cellulose-1 byl zaměněna (polární) voda za (nepolární) hexan. Pro účely úvodního experimentu byl MeOH zcela nahrazen EtOH a vzorek byl separován s využitím mobilní fáze hexan:EtOH 1:1. K separaci v tomto případě nedošlo, analyt navíc nebyl téměř zadržen na koloně a byl eluován v čase 3,62 min. Poměr mobilní fáze byl proto změněn na hexan:EtOH 3:1. K separaci sice opět nedošlo, nicméně díky zvýšenému obsahu hexanu ve směsi byl analyt na koloně zadržován déle a eluován v čase 4,65 min. Pro další pokus byl do mobilní fáze přidán MeOH. Mobilní fáze obsahovala hexan, MeOH a EtOH v poměru 9:2:1. Enantiomery však byly eluovány příliš brzy (v čase 4,77 min) a nebyly dokonale separovány ($R = 1,30$). Obsah hexanu byl proto zvýšen a další separace proběhla s využitím mobilní fáze o složení hexan:MeOH:EtOH 30:2:1. Došlo ke zvýšení retence, nicméně rozlišení zůstalo nízké ($R = 1,25$), navíc došlo k poměrně velkému rozmytí píků. Mobilní fáze byla proto opět pozměněna ve prospěch hexanu na konečný poměr 60:2:1 hexan:MeOH:EtOH. Vysoký podíl hexanu ve směsi způsobil zadržení enantiomerů na koloně na téměř dvacet minut, MeOH zvýšil selektivitu a účinnost separace. Na druhou stranu v tomto případě došlo k chvostování obou píků (**Obr. 35**).

Tabulka IV: Retenční časy a rozlišení pro separaci látky B v různých mobilních fázích na koloně Lux Cellulose-1

Mobilní fáze	t_R 1 (min)	t_R 2 (min)	R
Hexan:MeOH:EtOH 9:2:1	4,77	5,30	1,30
Hexan:MeOH:EtOH 30:2:1	11,95	14,52	1,25
Hexan:MeOH:EtOH 60:2:1	19,17	24,83	2,05



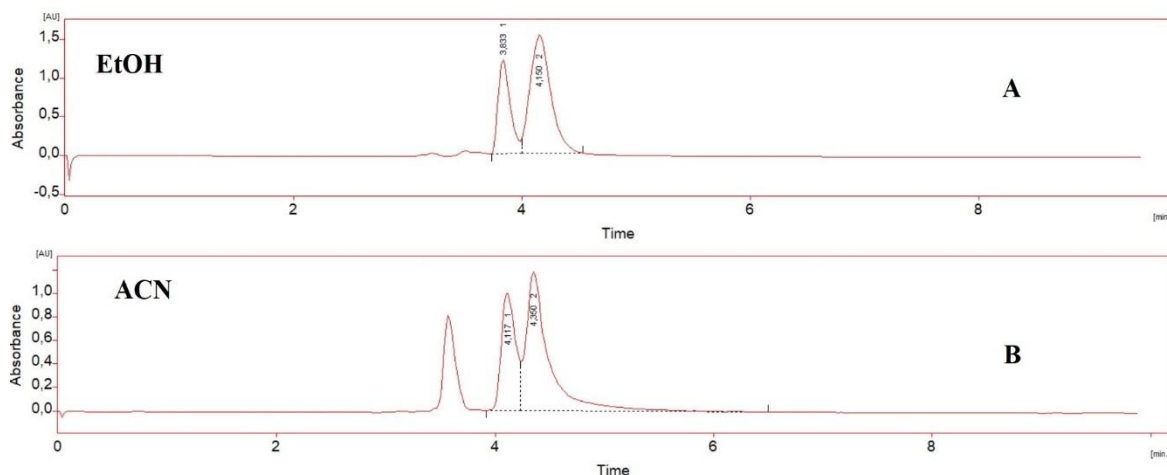
Obrázek 35: Separace MK080 v mobilní fázi hexan:MeOH:EtOH 60:2:1 na koloně Lux Cellulose-1

Pro separaci enantiomerů tohoto axiálně chirálního benzimidazolu byla nalazena metoda s použitím mobilní fáze pro separaci jeho enantiomerů MeOH:H₂O v poměru 3:1 a to z důvodu nejvyššího rozlišení. Jako zajímavá se jeví také metoda s použitím m. f. hexan:MeOH:EtOH 60:2:1 a to z důvodu zajímavého rozlišení, možnosti odlišného chování na semipreparativní koloně a lepším vlastnostem hexanu (viskozita, těkavost) oproti vodě.

4.3. Analytická separace látky C

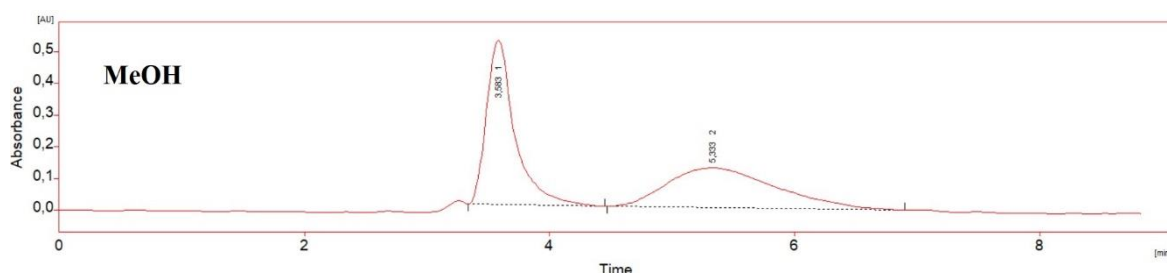
Další ze separovaných analytů se oproti látce A liší přítomností tří methylových zbytků na fenyلكarbamátovém substituentu namísto dvou isopropylových (viz **Obr. 30**). Vzhledem k podobnosti s látkou A jsme předpokládali, že by tento benzimidazol mohl být separován také na koloně Lux Cellulose-1. Byly provedeny analýzy s využitím homologické řady alkoholů a acetonitrilu jako mobilní fáze. Nejlepší výsledky vykazoval ethanol a acetonitril – analyt byl při použití ethanolu jako mobilní fáze separován s rozlišením $R = 1,12$ a retenčním časem enantiomerů $t_{R1} = 3,83$ min a $t_{R2} = 4,15$ min (**Obr. 36A**). V případě acetonitrilu došlo ke koeluci obou píků s retenčními časy $t_{R1} = 4,12$ min, $t_{R2} = 4,35$ min a s rozlišením separace $R = 0,78$. Dalším problémem bylo, že se před elucí enantiomerů objevoval další pík (**Obr. 36B**). V dalším kroku byla proto do systému přidána voda (m.f. se složením ACN:H₂O 5:1). Voda sice zvýšila retenci analytu, ale zároveň silně snížila selektivitu separace. V dalších krocích se proto již s vodou nepracovalo.

Další úpravy mobilní fáze spočívaly v přidavcích jiného rozpouštědla, které by zvýšilo kapacitu separace. Na základě dříve zmíněných výsledků se jako vhodné rozpouštědlo pro tento účel jeví hexan. Byl proto vyzkoušen normální mód s m.f. o složení hexan:EtOH 3:1, a poté v poměru hexan:EtOH 9:1. Ani jedna změna podmínek však nezvýšila selektivitu separace.



Obrázek 36: Separace látky C v EtOH na koloně Lux Cellulose-1

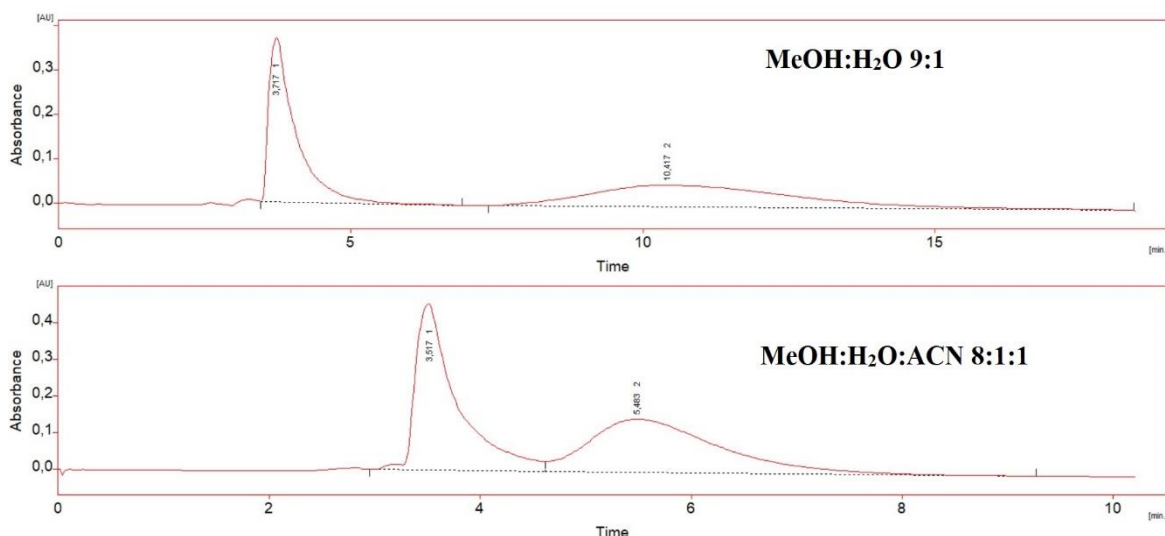
Z důvodu neúspěšné separace látky C na koloně Lux Cellulose-1 byla v dalších experimentech testována separace této látky na koloně Lux Cellulose-3. Nejprve byla postupně zkoušena kompatibilní organická rozpouštědla (EtOH, MeOH, i-PrOH, n-PrOH, hexan, ACN). K úspěšné separaci došlo při použití methanolu jako mobilní fáze. Eluční časy jednotlivých enantiomerů činily $t_{R1} = 3,85$, resp. $t_{R2} = 5,33$ min. hodnota rozlišení pak $R = 1,72$ (**Obr. 37**). Za těchto podmínek však dochází k přílišnému rozmytí eluční zóny druhého píku.



Obrázek 37: Separace enantiomerů látky C v MeOH na koloně Lux Cellulose-3

Za účelem zvýšení kapacity separace byla provedena analýza s mobilní fází tvořenou hexanem, i-PrOH a MeOH v m.f. v poměru 30:1:1. I-PrOH byl použit jakožto emulgátor namísto EtOH. K separaci však nedošlo, a proto byl obsah hexanu v m.f. snížen na poměr 5:1:1. Došlo pouze k částečné separaci. V dalším kroku jsme proto přešli do REVERZNÍHO módu a byla připravena m.f. MeOH:H₂O v poměru 3:1. K separaci v tomto případě nedošlo. Poměr byl proto dále změněn na MeOH:H₂O 9:1 za účelem zvýšení selektivity separace. Došlo k separaci enantiomerů s rozlišením $R = 1,89$ a retenčními časy $t_{R1} = 3,72$ min a $t_{R2} = 10,42$ min. Druhý pík však zůstal stejně rozmytý jako v případě MeOH. Mobilní fáze byla

proto upravena přidavkem ACN na poměr rozpouštědel 8:1:1 MeOH:ACN:H₂O. Došlo k vylepšení fokusace píku, nicméně za cenu nižšího rozlišení separace ($R = 1,42$) (**Obr. 38**).



Obrázek 38: Separace látky C v uvedených mobilních fázích na koloně Lux Cellulose-3

Dále byly testovány kombinace MeOH s EtOH, i-PrOH, n-PrOH a ACN v poměru 9:1, přičemž MeOH byl vždy složkou s vyšším obsahem v m.f. V případě kombinace s EtOH, i-PrOH a n-PrOH bylo dosaženo vždy téměř stejného výsledku, tj. separace s nižším rozlišením oproti čistému MeOH (viz. **Tab. V**). Eluční zóna druhého píku ve všech případech však zůstala rozmytá stejně jako v případě čistého MeOH. Při použití mobilní fáze tvořené směsí MeOH s ACN nebylo dosaženo ani částečné separace a oba enantiomery eluovaly současně.

Tabulka V: Srovnání klíčových parametrů jednotlivých separací látky C na kolonách Lux Cellulose-1 a Lux Cellulose-3

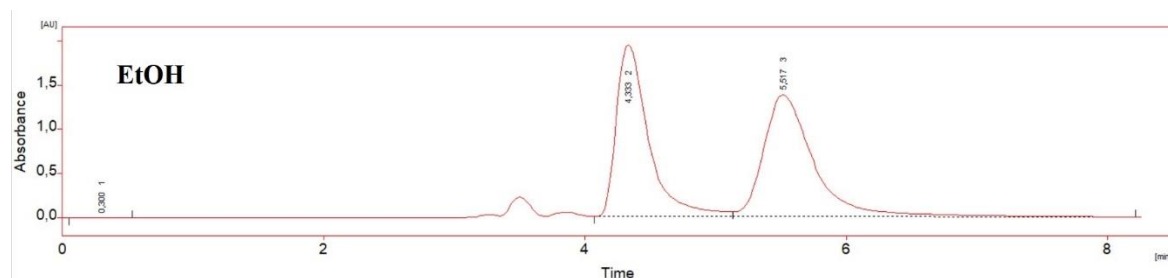
Mobilní fáze	Kolona	$t_{R 1}$ [min]	$t_{R 2}$ [min]	R
EtOH	Lux Cellulose-1	3,83	4,15	1,12
MeOH	Lux Cellulose-3	3,58	5,33	1,63
MeOH:H ₂ O 9:1	Lux Cellulose-3	3,72	10,42	1,89
MeOH:ACN:H ₂ O 8:1:1	Lux Cellulose-3	3,52	5,48	1,42

Pro separaci enantiomerů látky C využívá vhodná metoda kolonu Lux Cellulose-3 a mobilní fázi o složení MeOH:H₂O v poměru 9:1 jako mobilní fáze. Ačkoliv dochází k rozmytí druhého eluovaného píku, nebylo nalezeno složení mobilní fáze, které by tomuto

jevu zabránilo. Pro vylepšení tvaru druhého píku by se dalo teoreticky využít aditiv jako jsou kyseliny, báze či soli. Vzhledem k tomu, že vyvinuté metody je v plánu převést do semipreparativního rozměru a izolovat s jejich pomocí optické čisté enantiomery, je však podstatné, aby byl systém co nejjednodušší. Ze srovnání podmínek separace se separací látky A navíc vyplývá, že i pouhá záměna substituentu ve struktuře molekuly může způsobit silně odlišné chování látky při separaci na stejné koloně.

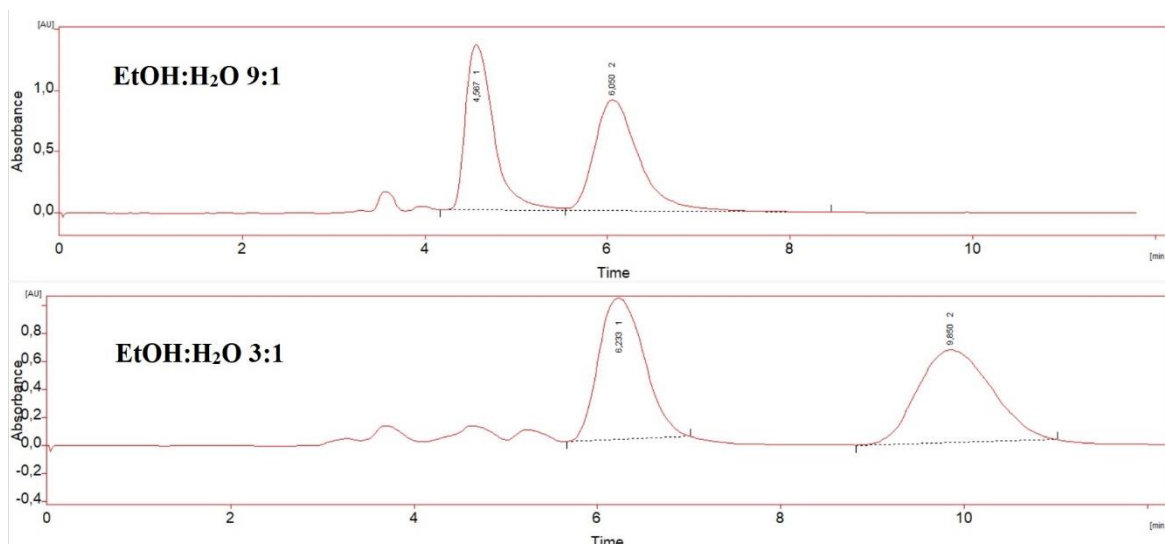
4.4. Analytická separace látky D

Také tento benzimidazol se oproti ostatním liší strukturou substituentu, a to přítomností esterové vazby, na kterou je navázán benzylní (Obr. 30). Optimální podmínky byly studovány na koloně Lux Cellulose-3. Nejprve byl jako mobilní fáze použit čistý EtOH. Došlo k separaci enantiomerů s rozlišením $R = 2,15$ a s retenčním časem $t_{R1} = 4,33$ min pro první enantiomer a $t_{R2} = 5,52$ min pro druhý enantiomer (viz. Obr. 39).



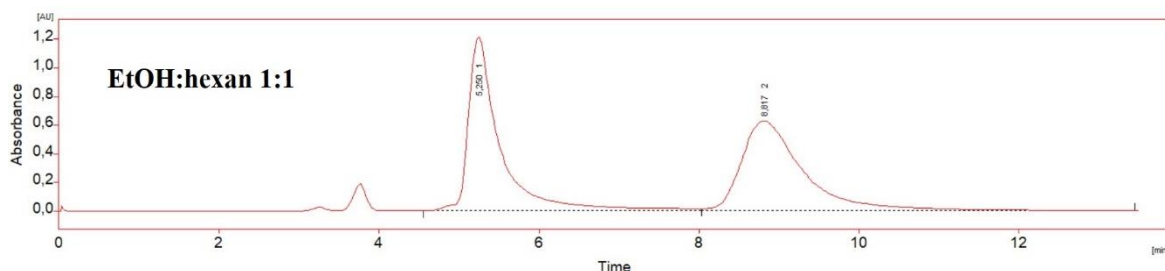
Obrázek 39: Separace látky D v EtOH na koloně Lux Cellulose-3

Další pokusy byly věnovány snaze o navýšení kapacity separace. Za tímto účelem byl použit reverzní mód a do mobilní fáze byla přidána voda. Jako první byla testována mobilní fáze o složení EtOH:H₂O 9:1. Došlo k separaci s rozlišením $R = 2,10$. Dále byl poměr složek m.f. změněn na EtOH:H₂O 3:1. Opět došlo k separaci obou enantiomerů, tentokrát s rozlišením $R = 2,82$ (Obr. 40). Z porovnání těchto výsledků s výsledky separace v čistém EtOH tedy vyplývá, že navýšením kapacity pomocí vody selektivita separace neroste. V dalším kroku byl zkoumán normální mód s mobilní fází tvořenou hexanem a EtOH.



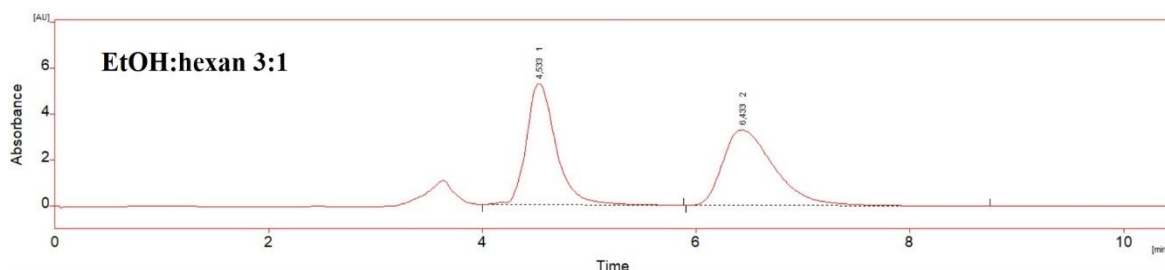
Obrázek 40: Separace látky D v uvedených mobilních fázích na koloně Lux Cellulose-3

Nejprve byla připravena mobilní fáze o složení EtOH:hexan 1:1 (**Obr. 41**). Analyt byl separován s rozlišením 3,83. První z enantiomerů byl eluován v čase 5,25 min, druhý v čase 8,82 min. Došlo tedy ke zvýšení selektivity (a tedy i rozlišení) separace, neboť druhý enantiomer byl na koloně zadržen podstatně déle.



Obrázek 41: Separace látky D v mobilní fázi EtOH:hexan 1:1 na koloně Lux Cellulose-3

Pro další zvýšení selektivity byl poměr mobilní fáze změněn na hexan:EtOH 3:1. Došlo k dalšímu navýšení kapacity separace, což však bylo vzhledem k předchozímu výsledku analýzy spíše kontraproduktivní. V dalším kroku byl proto poměr mobilní fáze obrácen a byla použita m.f. o složení EtOH:hexan 3:1. Došlo k separaci s rozlišením 2,67 a především s nižší kapacitou oproti předchozí separaci (**Obr. 42**).



Obrázek 42: Separace látky D v mobilní fázi EtOH:hexan 3:1 na koloně Lux Cellulose-3

Tabulka VI: Srovnání retenčních časů a rozlišení pro separaci látky D v různých mobilních fázích na koloně Lux Cellulose-3

Mobilní fáze	tr 1 [min]	tr 2 [min]	R	k1	k2
EtOH:voda 3:1	6,23	9,85	2,82	206,66	327,33
EtOH:voda 9:1	4,57	6,05	2,10	150,66	199,00
EtOH	4,33	5,52	2,15	143,33	183,00
hexan:EtOH 1:3	4,50	6,50	2,67	89,60	127,60
hexan:EtOH 1:1	5,25	8,82	3,83	95,40	146,60
hexan:EtOH 3:1	7,07	14,42	4,86	140,40	287,40

Vzhledem k velmi výhodným podmínkám separace (krátký čas analýzy, použití těkavé mobilní fáze) nebyly testovány podmínky separace na koloně Lux Cellulose-1. Pro separaci této látky byly nalezeny optimální metody na koloně Lux Cellulose-3. Za vhodnou metodu lze považovat separaci v mobilní fázi EtOH, protože píky eluují s dostatečným časovým rozestupem. Pro separaci se však dá využít kterákoliv z metod uvedených v **tabulce VI**.

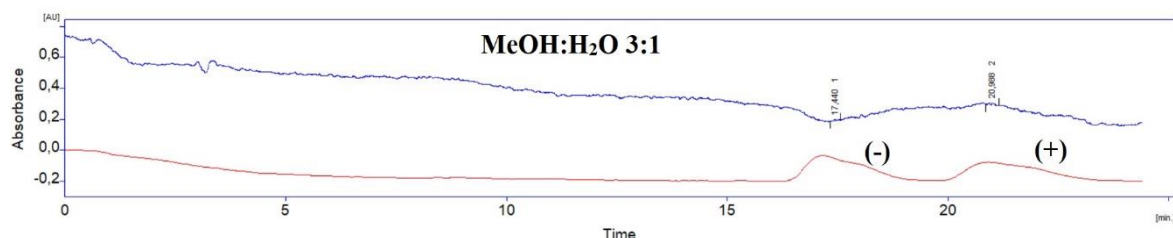
4.5. Využití detektoru optické otáčivosti

Při vybraných analýzách byl do systému zapojen také detektor optické otáčivosti potvrzující přítomnost enantiomerů ve směsi. Uplatnění našel zejména v případě analýz látky C. Při její chirální separaci na koloně Lux Cellulose-1 s využitím ACN, resp. EtOH byl poměr ploch píků obou eluovaných složek na UV/Vis detektoru roven 70:30. Takový výsledek neodpovídá racemické směsi (poměr píků 50:50) jako tomu bylo u předchozích vzorků. Nicméně při analýze vzorku C v MeOH, kde je plně separován, činil poměr obou hlavních píků 1:1 a navíc detektor optické otáčivosti prokázal, že oba píky vykazují optickou aktivitu (s opačným znaménkem optické rotace) a mělo by se tedy jednat o enantiomery látky C (**Obr. 45**). Tento fenomén je pravděpodobně spjatý s použitím rozpouštědlem a také

nedokonalou separací. Žádná z dalších analýz totiž tento špatný poměr eluovaných píků nepotvrdila.

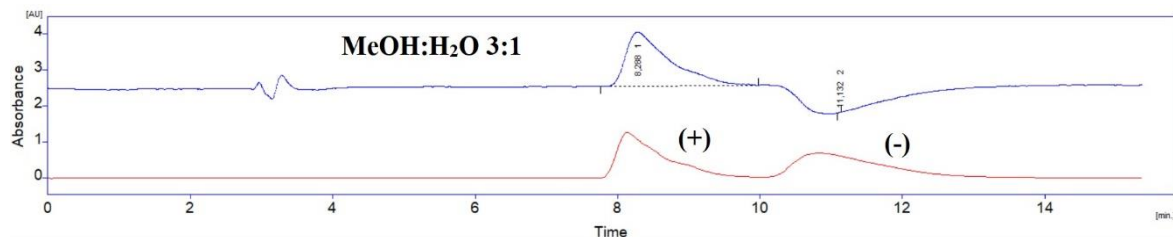
Níže jsou uvedeny analýzy látek A-D za optimálních podmínek včetně záznamu z polarimetrického detektoru. Z prezentovaných výsledků jasně vyplývá, že citlivost detektoru vůči analyzovaným sloučeninám se může podstatně lišit, jak ukazují i data z literatury [102]. Pro určení znaménka optické otáčivosti v kombinaci se známým elučním časem zjištěným pomocí UV/Vis detektoru je však tato identifikace postačující.

Vzorek A byl měřen s použitím mobilní fáze MeOH:H₂O 3:1. Na polarimetrickém záznamu lze vidět, že v době eluce prvního enantiomeru je na polarimetru současně detekován záporný pík a v době eluce druhého enantiomeru byl detekován kladný pík (**Obr. 43**).



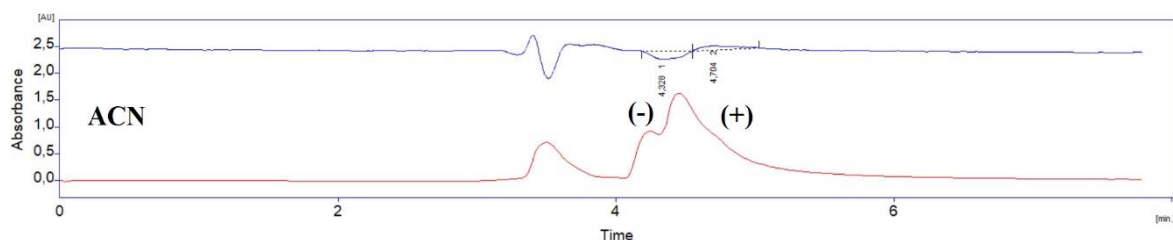
Obrázek 43: Separace látky A s využitím polarimetrického detektoru (modrá křivka)

Látka B byla analyzována v mobilní fázi MeOH:H₂O 3:1. V tomto případě bylo pořadí eluce enantiomerů opačné, než tomu bylo v případě látky A – (+) enantiomer byl eluován jako první a (-) enantiomer jako druhý (**Obr. 44**).



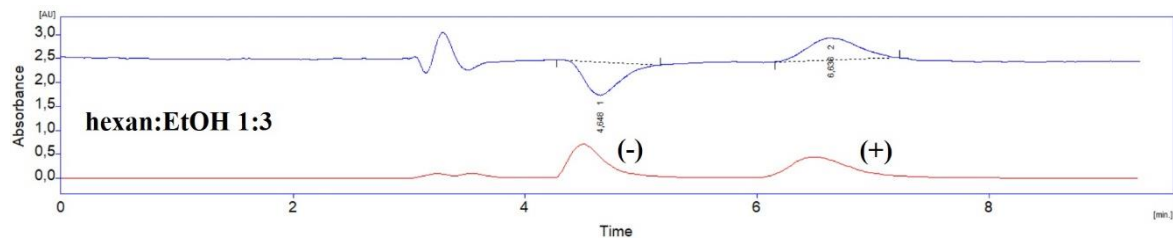
Obrázek 44: Separace látky B s polarimetrickým detektorem

U látky C bylo měření optické otáčivosti enantiomerů značně ztíženo rozmýváním druhého píku, což se projevilo i na polarimetrickém záznamu. Proto pro byla pro účel křivky optické otáčivosti použita analýza na koloně Lux Cellulose-1 v m.f. ACN (**Obr. 45**).



Obrázek 45: Separace látky C s využitím polarimetrického detektoru

V případě látky D byla detekce provedena v mobilní fázi hexan:EtOH 1:3, nicméně vzorek musel být ještě desetkrát zředěn, protože prvotní analýza poskytla příliš intenzivní výsledky absorbance obou píků a polarimetrický záznam byl mimo mez detekce. Oba hlavní píky vykazují optickou aktivitu, což potvrzuje, že se jedná o enantiomery látky D. Za studovaných podmínek byl eluován nejprve (-) enantiomer a poté (+) enantiomer (**Obr. 46**).



Obrázek 46: Separace látky D s využitím polarimetrického detektoru

4.6. Shrnutí optimálních metod separací axiálně chirálních benzimidazolů

Byly nalezeny vhodné podmínky pro separaci čtyř vzorků axiálně chirálních benzimidazolů. Separace byly prováděny na analytických chirálních polysacharidových kolonách Lux Cellulose-1 a Lux Cellulose-3 za využití normálního, polárně organického módu a reverzního módu. Ve všech případech platilo, že alkoholová složka mobilní fáze ovlivňuje zejména selektivitu separace, zatímco hexan a voda zejména kapacitu. Z důvodu plánovaného transferu metod dosemipreparativních rozměrů za účelem izolace separovaných látek nebyly testovány podmínky využívající aditiv, která se obvykle používají pro vylepšení tvaru (symetrie) eluovaných píků. Optimální podmínky pro separaci vzorků A-D shrnuje **tabulka VII**.

Tabulka VI: Shrnutí optimálních podmínek pro separaci racemátů předložených vzorků axiálně chirálních benzimidazolů

Vzorek	Kolona	Mobilní fáze	t _R 1 [min]	t _R 2 [min]	R
A	Lux Cellulose-1	MeOH:H ₂ O 3:1	18,55	22,98	1,99
B	Lux Cellulose-1	MeOH:H ₂ O 3:1	8,33	11,53	2,36
C	Lux Cellulose-3	MeOH:H ₂ O 9:1	3,72	10,42	1,89
D	Lux Cellulose-3	hexan:EtOH 1:1	5,25	8,82	3,83

5. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá fenoménem axiální chiralitity a separacemi látek, které tento jev vykazují. V teoretické části jsme se nejprve věnovali obecnému popisu chiralitity s důrazem na chiralitu axiální. Dále byla popsána instrumentální technika, se kterou jsme pracovali v experimentální části – tedy HPLC. Převážná část kapitoly o HPLC byla věnována právě chirálním separacím a jejich specifikům. Poslední kapitola teoretické části je věnována benzimidazolům, mezi něž patří látky, jejichž separace byla náplní experimentální části práce.

Cílem experimentální části bylo najít vhodnou metodu pro analytickou separaci čtyř nově syntetizovaných axiálně chirálních benzimidazolů substituovaných různě substituovaným fenylem na dusíku N1 a pyridinem na uhlíku C2. Separace byly provedeny pomocí HPLC v analytickém módu s využitím izokratické eluce na dvou chirálních kolonách (Lux Cellulose-1 a Lux Cellulose-3), lišících se derivátem vázaným na polysacharid celulosu. Jako mobilní fáze byly využity směsi alkoholu (methanol, ethanol, isopropanol či n-propanol) s vodou, hexanem či acetonitrilem bez přídavku aditiv z důvodu možnosti případného transferu vyvinutých metod do semipreparativního rozměru. Součástí analýz bylo rovněž měření optické otáčivosti separovaných enantiomerů. Vyvinuté metody umožňují separovat cílové látky s dostatečnou účinností tak, aby bylo možno transferovat je do semipreparativního rozměru a následně izolovat jednotlivé optické izomery za účelem dalšího studia těchto látek, což bude předmětem navazující diplomové práce.

6. Seznam použité literatury

- [1] L. A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, Chiral Drugs: An Overview, *Int. J. Biomed. Sci.* 2 (2006) 85-100.
- [2] Y. Bansal, O. Silakari, The therapeutic journey of benzimidazoles: A review, *Bioorganic Med. Chem.* 20 (2012) 6208–6236.
- [3] V. Khose, M. E. John, A. D. Pandey, A. V. Karnik. Chiral benzimidazoles and their applications in stereodiscrimination processes. *Tetrahedron Asymmetry.* 28 (2017) 1233–1289.
- [4] G. B. Kauffman, R. D. Meyers. The resolution of racemic acid a classic stereochemical experiment for the undergraduate laboratory. *J. Chem. Educ.* 52 (1975) 777–781.
- [5] O. Červinka, Chiralita a pojmy s ní související, *Chem. Listy.* 93 (1999) 294-305.
- [6] R. S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog. Specification of Molecular Chirality. *Angew. Chemie Int. Ed. English.* 5 (1966) 385–415.
- [7] G.P. Moss, Basic terminology of Stereochemistry, *Pure & Appl. Chem.* 68 (1996) 2193-2222.
- [8] Preferred IUPAC Names, Specification of configuration and conformation. Chapter 9 (2004).
- [9] D. Nasipuri, *Stereochemistry of Organic Compounds: Principles and Applications*, New Age International, New Delhi, 1994
- [10] E. Tokunaga, T. Yamamoto, E. Ito, N. Shibata, Understanding the Thalidomide Chirality in Biological Processes by the Self-disproportionation of Enantiomers, *Sci. Rep.*
- [11] J. McMurry, *Organic Chemistry*, Brooks/Cole, a Thompson Learning Company, 2004
- [12] J. Schwartz, Armodafinil in the treatment of sleep/wake disorders, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* (2010) 417.
- [13] Christie, G. H.; Kenner, J. The Molecular Configurations of Polynuclear Aromatic Compounds. *J. Chem. Soc., Trans.* 1922, 121, 614–620.
- [14] D. Bonne, J. Rodriguez, A Bird's Eye View of Atropisomers Featuring a Five-Membered Ring, *Eur. J. Org. Chem.* 20-21 (2018) 2417–2431.
- [15] G. Bringmann, A. J. Price Mortimer, P. A. Keller, M. J. Gresser, J. Garner, M. Breuning, Atroposelective Synthesis of Axially Chiral Biaryl Compounds, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 5384–5427.

- [16] E. Kumarasamy, R. Raghunathan, M. P. Sibi, J. Sivaguru, Nonbiaryl and Heterobiaryl Atropisomers: Molecular Templates with Promise for Atropselective Chemical Transformations, *Chem. Rev.* 115 (2015) 11239–11300.
- [17] R. Laplante et al., Assessing atropisomer axial chirality in drug discovery and development, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 7005–7022. [52] R. S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog. Specification of Molecular Chirality. *Angew. Chemie Int. Ed. English.* 5 (1966) 385–415.
- [18] M. H. McCormick, J. M. McGuire, G. E. Pittenger, R. C. Pittenger, W. M. Stark, *Antibiot. Annu.* 3 (1955) 606–611.
- [19] F. Liška, Mnemotechnika při výuce stereochemického názvosloví, *Chem. Listy.* 102 (2008) 527-534.
- [20] P. A. Keller, N. M. Butler, P. M. McCosker, Axially Chiral Natural Products and Bioactive Compounds, v knize: J. M. Lasalleta (ed.), *Atropisomerism And Axial Chirality*, World Scientific Publishing Europe Ltd., London 2019, str. 611-642.
- [21] H. Yamazaki, N. Koyama, S. Oura, H. Tomoda, New rugulosins, Anti-MRSA antibiotics, produced by *Penicillium radicum* FKI-3765-2, *Org. Lett.* 12 (2010) 1572–1575.
- [22] C. Ito, Y. Thoyama, M. Omura, I. Kajjura, H. Furukawa, Alkaloidal constituents of *Murraya koenigii*. Isolation and structural elucidation of novel binary carbazolequinones and carbazole alkaloids, *Chem. Pharm. Bull.* 41 (1993) 2096-2100.
- [23] B. Testa, Other Stereogenic Elements: Axes of Chirality, Planes of Chirality, Helicity, and (E,Z)-Diastereoisomerism, *Helv. Chim. Acta* 96 (2013) 1–3.
- [24] K. Dodou. Investigations on gossypol: past and present developments. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 14 (2005) 1419-1434.
- [25] R. S. Norton, R. J. Wells, A Series of Chiral Polybrominated Biindoles from the Marine Blue-Green Alga *Rivularia firma*. Application of ¹³C NMR Spin-Lattice Relaxation Data and Coupling Constants to Structure Elucidation, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 3628-3635
- [26] L.H. Bock, R. Adams. The stereochemistry of n-phenylpyrroles. The preparation and resolution of n-2-carboxyphenyl-2,5-dimethyl-3-carboxypyrrole. XIII. *J. Am. Chem. Soc.* 53 (1931) 374–376.
- [27] K. Yoshida et al. Versatile and enantioselective preparation of planar-chiral metallocene-fused 4-dialkylaminopyridines and their application in asymmetric organocatalysis. *ACS Catal.* 10 (2020) 292–301.
- [28] J.-L. Schmitt, A.-M. Stadler, N. Kyritsakas, J.-M. Lehn, Helicity-Encoded Molecular Strands: Efficient Access by the Hydrazone Route and Structural Features, *Helv. Chim. Acta* 86 (2003) 1598–1624.

- [29] L. Nováková, M. Douša a kol., *Moderní HPLC separace v teorii i praxi I.*, Europrint, Praha, 2013
- [30] <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>, staženo 26.2.2020
- [31] K. Robbards, P.R.Haddad, P.E.Jackson, *High-performance Liquid Chromatography—Instrumentation and Techniques*, v knize: K. Robbards, P.R.Haddad, P.E.Jackson, *Principles and practise of modern chromatographic methods*, Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands 2004, str. 207-223.
- [32] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch. *Practical HPLC Method Development*. Wiley-Interscience (1997)
- [33] W. Bicker, J. Y. Wu, M. Lämmerhofer, W. Lindner, Hydrophilic interaction chromatography in nonaqueous elution mode for separation of hydrophilic analytes on silica-based packings with noncharged polar bondings, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2971–2987.
- [34] B. Buszewski, S. Noga. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231–247.
- [35] P. Žuvela, M. Skoczylas, J. J. Liu, T. Bączek, R. Kaliszan, M. W. Wong, B. Buszewski, Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Chem. Rev.* 119 (2019) 3674–3729.
- [36] D. H. Sliney, What is light? the visible spectrum and beyond, *Eye.* 30 (2016) 222–229.
- [37] V. Milata, P. Segľa, V. Brezová, A. Gatial, V. Kováčik, M. Miglierini, Š. Stankovský, J. Šíma, *Aplikovaná molekulová spektroskopia*, Vydavateľstvo STU v Bratislave, Bratislava 2008.
- [38] R. N. Rao, K. G. Prasad, P.B. Priya, S. Bijarji. HPLC-PDA-ORD Bioassay of S-(+) and R-(-) Clopidogrel on Rat Dried Blood Spots. *Chirality.* 26 (2014) 102-107.
- [39] D. Rossi, R. Nasti, A. Marra, S. Meneghini, G. Mazzeo, G. Longhi, M. Memo, B. Cosimelli, G. Greco, E. Novellino, F. Da Settimo, C. Martini, S. Taliani, S. Abbate, S. Collina, Enantiomeric 4-Acylamino-6-alkyloxy-2 Alkylthiopyrimidines As Potential A3 Adenosine Receptor Antagonists: HPLC Chiral Resolution and Absolute Configuration Assignment by a Full Set of Chiroptical Spectroscopy, *Chirality.* 28 (2016) 434-440.
- [40] X. Bai et al., Chiral (cyclopentadienone)iron complexes with a stereogenic plane as pre-catalysts for the asymmetric hydrogenation of polar double bonds, *Tetrahedron.* 75 (2019) 1415–1424.

- [41] E. Yashima, T. Matsushima, Y. Okamoto, Chirality assignment of amines and amino alcohols based on circular dichroism induced by helix formation of a stereoregular poly((4-carboxyphenyl)acetylene) through acid-base complexation, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 6345–6359.
- [42] F. Ianni, L. Pucciarini, A. Carotti, S. Natalini, G. Z. Raskildina, R. Sardella, B. Natalini, Last ten years (2008–2018) of chiral ligand-exchange chromatography in HPLC: An updated review, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 21–37.
- [43] C.E. Dalgliesh, The Optical Resolution of Aromatic Amino-acids on Paper, *J. Chem. Soc.*, 132 (1952) 3940-3942.
- [44] Z. Huang et al., HPLC semi-preparative separation of diclazuril enantiomers and racemization in solution, *J. Sep. Sci.* 43 (2020) 1240–1247.
- [45] J. M. Xu, F. L. Li, Y. P. Xue, Y. G. Zheng, Efficient racemization of N-phenylacetyl-D-glufosinate for L-glufosinate production, *Chirality* 31 (2019) 513–521.
- [46] B. L. Young, L. Wu, R. Graham Cooks, Mass spectral methods of chiral analysis, v knize: K. W. Busch, M. A. Busch (ed.), *Chiral Analysis*, Baylor University, Waco, Texas, USA 2006, str. 595-659.
- [47] M. Tanaka et al., Direct HPLC separation of enantiomers of pantoprazole and other benzimidazole sulfoxides using cellulose-based chiral stationary phases in reversed-phase mode, *Chirality*. 7 (1995) 612-615.
- [48] P. Haglund, Isolation and characterisation of polychlorinated biphenyl (PCB) atropoisomers, *Chemosphere*. 32 (1996) 2133–2140.
- [49] N. L. Padivitage, J. P. Smuts, Z. S. Breitbach, D. W. Armstrong, A. Berthod, Preparation and Evaluation of HPLC Chiral Stationary Phases Based on Cationic/Basic Derivatives of Cyclofructan 6, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 38 (2015) 550–560.
- [50] H. Zheng, D. L. Guo, Y.W. Deng, B. X. Yao, W. Weng, Unusual Endothermic Retention and Reversal of Elution Order in Enantioseparation of Binaphthol on a Coated Amylose-derived Chiral Stationary Phase, *Chinese J. Anal. Chem.* 41 (2013) 1209-1213.
- [51] E. Ferencza, B. Kovács, F. Boda, M. Foroughbakhshfasaei, É. Katalin Kelemen, G. Tóth, Z. Szabó, Simultaneous determination of chiral and achiral impurities of ivabradine on a

cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate) chiral column using polar organic mode, European Journal of Medicinal Chemistry 151 (2018) 628-685.

[52] T. Toyo'oka, Resolution of chiral drugs by liquid chromatography based upon diastereomer formation with chiral derivatization reagents, J. Biochem. Biophys. Methods 54 (2002) 25–56.

[53] T. J. Ward, Chiral separations, Anal. Chem. 78 (2006) 3947–3956.

[54] S. V. Rogozhin, V. A. Davankov, Chromatographic Resolution of Racemates on Dissymmetric Sorbents, Russ. Chem. Rev., 37 (1968) 565–575.

[55] F. Ianni et Al. Last ten years (2008–2018) of chiral ligand-exchange chromatography in HPLC: An updated review. J. Sep. Sci., 42 (2019) 21–37.

[56] Y.Z. Phyto, J. Teixeira, M. E. Tiritan, S. Cravo, A. Palmeira, L. Gales, C. Fernandes, New chiral stationary phases for liquid chromatography based on small molecules: Development, enantioresolution evaluation and chiral recognition mechanisms, Chirality, (2019) 1–17.

[57] Z. Šípál, P. Anzenbacher, P. Peč, J. Pospíšil, I. Růžička, Biochemie, Státní nakladatelství Praha, Praha, 1992

[58] http://www.ymc.co.jp/en/columns/chiral_art_i/, staženo 24. března 2020

[59] Dr. Maisch HPLC GmbH, Columns made by Dr. Maisch, Dr. Maisch, Ammerbuch, <http://www.dr-maisch.com/bilder/ChiralFlyerblau.pdf>, staženo 24. března 2020

[60] Macherey Nagel GmbH & Co.KG, LC-Columns – Macherey Nagel, Macherey Nagel, Düren, https://www.hichrom.com/assets/ProductPDFs/Chiral/CHIRAL_MN.pdf, staženo 24. března 2020

[61] <https://www.marketwatch.com/press-release/chiral-separation-column-market-2020-top-countries-data-global-analysis-market-size-growth-defination-opportunities-and-forecast-to-2024-2020-02-24>, staženo 14. dubna 2020

[62] <https://www.marketintellica.com/report/MI89019-global-chiral-separation-column-market-report>, staženo 14. dubna 2020

[63] Shen, J., Ikai, T., & Okamoto, Y., Synthesis and application of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparation by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 1363 (2014) 51–61.

- [64] D’Orazio, G., Fanali, C., Karchkhadze, M., Chankvetadze, B., & Fanali, S., Enantiomeric separation of some chiral analytes using amylose 3,5-dimethylphenylcarbamate covalently immobilized on silica by nano-liquid chromatography and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1520 (2017) 127–134.
- [65] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Yamamoto, K. Hatada, Useful Chiral Packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution. Cellulose triacetate and tribenzoate coated on macroporous silica gel, *Chem. Lett.* (1984) 739-742
- [66] T. Ikai, C. Yamamoto, M. Kamigaito, Y. Okamoto, Immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for HPLC, *Polym. J.* 38 (2006) 91–108.
- [67] J. M. Padró, S. Keunchkarian, State-of-the-art and recent developments of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparations by high-performance liquid chromatography (2013–2017), *Microchem. J.* 140 (2018) 142–157.
- [68] P. A. Cardoso, I. C. César, Chiral Method Development Strategies for HPLC using Macrocyclic Glycopeptide-Based Stationary Phases, *Chromatographia*, 81 (2018) 841–850.
- [69] E. N. Shapovalova, I. A. Fedorova, I. A. Anan’eva, O. A. Shpigun, Macrocyclic Antibiotics as Chiral Selectors in High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis, *Journal of Analytical Chemistry*, 73 (2018) 1064–1075.
- [70] Z. A. Alothman, A. G. Alanazi, I. Ali, Enantiomeric resolution of primaquine, quinacrine and tafenoquine antibacterial medicines using ristocetin macrocyclic glycopeptide antibiotics CSP, *J. Taibah Univ. Sci.* 14 (2020) 412–416.
- [71] W. Gao, J. Kang, Separation of atropisomers of anti-hepatitis drug dimethyl diphenyl bicarboxylate analogues by capillary electrophoresis with vancomycin as the chiral selector, *J. Chromatogr. A* 1108 (2006) 145–148.
- [72] M. H. Hyun, S. C. Han, B. H. Lipshutz, Y. Shin, C. J. Welch, New chiral crown ether stationary phase for the liquid chromatographic resolution of α -amino acid enantiomers, *J. Chromatogr. A*, 910 (2001) 359–365.
- [73] H. J. Choi, H. J. Ha, S. C. Han, M. H. Hyun, Liquid chromatographic resolution of β -amino acids on CSPs based on optically active (3,3'-diphenyl-1,1'-binaphthyl)-20-crown-6, *Anal. Chim. Acta*, 619 (2008) 122–128.
- [74] M. H. Hyun, G. Tan, Y. J. Cho, Liquid chromatographic enantioseparation of aryl α -amino ketones on crown ether-based chiral stationary phase. *Biomed. Chromatogr.* 19 (2005) 208–213.

- [75] A. A. Seong, M. H. Hyun, Liquid Chromatographic Resolution of Amino Acid Esters of Acyclovir Including Racemic Valacyclovir on Crown Ether-Based Chiral Stationary Phases, *Chirality*, 27 (2015) 268–273.
- [76] M. H. Hyun, Development of HPLC Chiral Stationary Phases Based on (+)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic Acid and Their Applications, *Chirality*, 27 (2015) 576–588.
- [77] C. Bi, X. Zheng, S. Azaria, S. Beeram, Z. Li, D. S. Hage, Chromatographic studies of protein-based chiral separations, *Separations* 3 (2016).
- [78] B. Zhu, M. Xue, B. Liu, Q. Li, X. Guo, Enantioselective separation of eight antihistamines with α 1-acid glycoprotein-based chiral stationary phase by HPLC: Development and validation for the enantiomeric quality control, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 176 (2019) 112803.
- [79] S. O. Choi, S. H. Lee, H. S. Kong, E. J. Kim, H. Y. P. Choo, Stereoselective determination of cetirizine and studies on pharmacokinetics in rat plasma. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 744 (2000) 201–206.
- [80] F. Bressolle, M. Audran, T. Pham, J. J. Vallon, Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments, *Journal of Chromatography*, 687 (1996) 303-336.
- [81] C.R. Mitchell, D. W. Armstrong, Cyclodextrin-Based Chiral Stationary Phases for Liquid Chromatography, v knize: G. Gübitz, M. G. Schmid (ed.), *Chiral Separations*, Karl-Franzens Univerzity, Graz, Austria 2013, str. 61-112.
- [82] F. Feng, J. P. Fawcett, H. Zhang, I. G. Tucker, Cell-based, animal and H1 receptor binding studies relative to the sedative effects of ketotifen and norketotifen atropisomers, *J. Pharm. Pharmacol.* 72 (2020) 507–518.
- [83] L. V. Snegur et al., Synthesis and structure of biologically active ferrocenylalkyl polyfluoro benzimidazoles, *J. Organomet. Chem.* 580 (1999) 26–35.
- [84] C.-C. Chang et al. Validation of LC method in determining enantiomeric purity of pramipexole using polysaccharide-derived chiral stationary phases under organic-aqueous mode. *SN Appl. Sci.* 1 (2019).
- [85] O. Silikari, *Key Heterocyclic Cores for Designing Multitargeting Molecules*, Elsevier, 2018
- [86] R. Banerjee, S. W. Ragsdale. The Many Faces of Vitamin B 12 : Catalysis by Cobalamin-Dependent Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 72 (2003) 209–247.

- [87] M. S. Majik et al. Construction and screening of 2-aryl benzimidazole library identifies a new antifouling and antifungal agent. *RSC Adv.* 4 (2014) 28259–28264.
- [88] A. S. Alpan et al., Synthesis, biological activity and molecular modeling studies on 1H-benzimidazole derivatives as acetylcholinesterase inhibitors, *Bioorganic Med. Chem.*, 21 (2013) 4928–4937.
- [89] M. Andrzejewska et al., Synthesis, and antiprotozoal and antibacterial activities of S-substituted 4,6-dibromo- and 4,6-dichloro-2-mercaptobenzimidazoles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 21 (2004) 323–329.
- [90] K. C. S. Achar, K. M. Hosamani, H. R. Seetharamareddy, In-vivo analgesic and anti-inflammatory activities of newly synthesized benzimidazole derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, 45 (2010) 2048–2054.
- [91] M. Gaba et al, Benzimidazole derivatives: Search for GI-friendly anti-inflammatory analgesic agents, *Acta Pharm. Sin.*, 5 (2015) 337–342.
- [92] T. Furuta, N. Shirai, M. Sugimoto, A. Nakamura, A. Hishida, T. Ishizaki, Influence of CYP2C19 pharmacogenetic polymorphism on proton pump inhibitor-based therapies., *Drug Metab. Pharmacokinet.* 20 (2005) 153–167.
- [93] C. K. Donawho et al., ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 2728–2737.
- [94] Mechanisms of Action of Anthelmintics. <https://www.merckvetmanual.com/pharmacology/anthelmintics/mechanisms-of-action-of-anthelmintics>, staženo 14. února 2020
- [95] S. Tahlan, S. Kumar, S. Kakkar, B. Narasimhan, Benzimidazole scaffolds as promising antiproliferative agents: a review, *BMC Chem.*, 13 (2019) 1–16.
- [96] J. Aljourani, K. Raeissi, M. A. Golozar, Benzimidazole and its derivatives as corrosion inhibitors for mild steel in 1M HCl solution, *Corros. Sci.* 51 (2009) 1836–1843.3
- [97] V. K. Singh, Am. Parle. The Intriguing Benzimidazole: A Review. 10 (2019) 1540–1552.
- [98] P. N. Preston, *Benzimidazoles and Congeneric Tricyclic Compounds*, Wiley, New Jersey, 1981
- [99] B. Gallinella, R. Ferretti, L. Zanitti, I. Sestili, A. Mosca, R. Cirilli, Comparison of reversed-phase enantioselective HPLC methods for determining the enantiomeric purity of (S)-omeprazole in the presence of its related substances, *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 132–136.

- [100] M. P. Vaccher, J. Charton, A. Guelzim, D. H. Caignard, J. P. Bonte, C. Vaccher, Preparative enantiomeric separation of potent AMP-activated protein kinase activator by HPLC on amylose-based chiral stationary phase. Determination of enantiomeric purity and assignment of absolute configuration, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 920–928.
- [101] R. Ferretti, L. Zanitti, A. Casulli, R. Cirilli, Unusual retention behavior of omeprazole and its chiral impurities B and E on the amylose tris (3-chloro-5-methylphenylcarbamate) chiral stationary phase in polar organic mode, *J. Pharm. Anal.* 8 (2018) 234–239.
- [102] L. Kott, W. Brian Holzheuer, M. M. Wong, G. K. Webster, An evaluation of four commercial HPLC chiral detectors: A comparison of three polarimeters and a circular dichroism detector, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 57–65.