

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Studium chirální separace vybraných sloučenin s axiální
chiralitou**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

2022 Olomouc

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Marek Krejča
Název práce: Studium chirální separace vybraných sloučenin s axiální chiralitou
Typ práce: Diplomová
Pracoviště: Katedra analytické chemie
Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.
Konzultant: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.
Rok odevzdání práce: 2022
Anotace:

Cílem této diplomové práce byla optimalizace vhodných podmínek pro chirální separaci vybraných sloučenin s axiální chiralitou na HPLC s využitím polysacharidových kolon. Optimalizované metody byly transferovány z analytického do semipreparativního módu pro následnou izolaci separovaných enantiomerů. V rámci práce byl sledován vliv složení mobilní fáze, přídavku aditiv a změn teploty na separační podmínky pro jednotlivé analyty. Součástí měření byla také bližší charakterizace izolovaných enantiomerů pomocí polarimetrické a UV/Vis detekce.

Klíčová slova: HPLC, separační módy, izolace, stereoselektivní separace, chirální stacionární fáze, axiální chiralita
Počet stran: 86
Počet příloh: 1
Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Marek Krejča
Title: Study of chiral separation of selected compounds with axial chirality
Type of thesis: Master's
Department: Department of Analytical Chemistry
Supervisor: RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.
Consultant: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.
The year of submission: 2022
Annotation:

The aim of this master thesis was optimization of adequate conditions for chiral separation of selected compounds with axial chirality by HPLC with the use of polysaccharide chiral stationary phases. The optimized separations were transferred from analytical to semipreparative mode for isolation of separated enantiomers. The effect of mobile phase, temperature and additives on separations of individual compounds was discussed. Polarimetric and UV/Vis detection was used as a characterization tool for the isolated enantiomers.

Keywords: HPLC, separation modes, isolation, stereoselective separations, chiral stationary phases, axial chirality
Number of pages: 86
Number of appendices: 1
Language: Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl 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 22. 4. 2022

.....

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_2021_021 a IGA_PrF_2022_023.

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1. CHIRÁLNÍ SEPARACE.....	2
2.1.1. Chirální HPLC.....	3
2.1.2. Systémy chirální separace.....	4
2.1.2.1. Přímá separace.....	4
2.1.2.2. Nepřímá separace.....	6
2.1.3. Chirální selektory.....	7
2.1.3.1. Chirální stacionární fáze.....	7
2.1.3.1.1. Polysacharidové stacionární fáze.....	11
2.1.3.2. Chirální selektory v mobilní fázi.....	12
2.1.4. Možnosti ovlivnění selektivity chirálních separací.....	14
2.1.4.1. Efekt rozpouštědel.....	15
2.1.4.2. Aditiva v chirální separacích.....	17
2.1.4.3. Teplota.....	20
2.1.4.4. Průtok mobilní fáze.....	21
2.2. MÓDY V KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII.....	22
2.2.1. Požadavky na kolony v HPLC.....	24
2.2.2. Instrumentace s ohledem na separační mód.....	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
3.1. CHEMIKÁLIE.....	29
3.2. INSTRUMENTÁLNÍ VYBAVENÍ.....	30
3.3. PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	30
3.4. DÁVKOVÁNÍ VZORKU NA KOLONU.....	30
3.5. PODMÍNKY CHROMATOGRAFICKÝCH ANALÝZ.....	31
3.6. MĚŘENÍ OPTICKÉ OTÁČIVOSTI.....	33
4. DISKUZE A VÝSLEDKY.....	34
4.1. CHIRÁLNÍ SEPARACE SLOUČENINY I.....	35
4.1.1. Analytická separace sloučeniny I.....	35
4.1.2. Semipreparativní separace a izolace sloučeniny I.....	40
4.1.3. Kontrola optické čistoty enantiomerů sloučeniny I.....	41
4.2. CHIRÁLNÍ SEPARACE SLOUČENINY II.....	44
4.2.1. Analytická separace sloučeniny II.....	44
4.2.2. Semipreparativní separace a izolace sloučeniny II.....	47
4.3. CHIRÁLNÍ SEPARACE SLOUČENINY III.....	48
4.3.1. Analytická separace sloučeniny III.....	48
4.3.2. Semipreparativní separace a izolace sloučeniny III.....	52
4.4. CHIRÁLNÍ SEPARACE SLOUČENINY IV.....	55
4.4.1. Analytická separace sloučeniny IV.....	55
4.5. SLEDOVÁNÍ Vlivu ADITIV V MOBILNÍ FÁZI NA SEPARACI SLOUČENINY I.....	62
4.5.1. Diethylamin.....	62
4.5.2. Kyselina mravenčí.....	63
4.6. SLEDOVÁNÍ Vlivu ZMĚNY TEPLoty MOBILNÍ FÁZE NA SEPARACI SLOUČENINY I.....	65
4.7. PŘÍSTUP K IDENTIFIKACI ENANTIOMERŮ V RÁMCI OPTIMALIZACE METOD.....	68

4.7.1. Sloučenina I	68
4.7.2. Sloučenina II	70
4.7.3. Sloučenina III.....	71
4.7.4. Sloučenina IV	72
4.8. OBECNÉ TRENDY V CHIRÁLNÍCH SEPARACÍCH	73
5. ZÁVĚR	75
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	76
7. PŘÍLOHY.....	85

Seznam použitých zkratek

2-BuOH – 2-butanol

2-PrOH – 2-propanol

ACHSA – trans-2-aminocyklohexansulfonová kyselina

ACN – acetonitril

AGP – α 1-kyselé glykoprotein

BSA – hovězí sérový albumin

CCC – protiproudá kapalinová chromatografie

CD – cyklodextriny

CE – kapilární elektroforéza

CLEC – chirální ligandově výměnná chromatografie

CSP – chirální stacionární fáze

DAD – detektor diodového pole

DEA – diethylamin

EtOH – ethanol

FA – kyselina mravenčí

FDA – The United States Food and Drug Administration

FDAA – *N*- α -(2,4-dinitro-5-fluorofenyl)-l-alaninamid

GC – plynová chromatografie

GITC - 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glukopyranosyl isothiokyanát

HILIC – hydrofilní interakční chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LC – kapalinová chromatografie

LLE – extrakce kapalina-kapalina

MeOH – methanol

M.f. – mobilní fáze

MS – hmotnostní spektrometr

OPA-IBLC – *O*-fthalaldehyd/isobutyryl-L-cystein

(S)-NIFE - (*S*)-*N*-(4-nitrofenoxycarbonyl)fenylalanin methoxyethyl ester

(S)-OBS – *O*-benzyl-(*S*)-serin

SFC – superkritická fluidní chromatografie

TLC – tenkovrstvá chromatografie

1. Úvod

Role chirálních separací je z pohledu dnešního světa velmi důležitá. Důvodem je především zastoupení opticky aktivních sloučenin v medicíně. Tyto látky jsou totiž velmi často biologicky aktivní, a to jak v pozitivním, tak v negativním smyslu slova. Příkladem takových látek mohou být analgetikum ibuprofen, anestetikum ketamin či sedativum thiopental. Faktem je, že v těle bývá aktivní pouze jeden z enantiomerů, zatímco druhý je zpravidla inaktivní. Pokud by i druhý z enantiomerů byl aktivní, může nastat situace, kdy bude dokonce vyvolávat negativní účinky. Chirální separace tak nacházejí důležité využití například v kontrole léčiv před jejich uvedením na trh ^[1, 2].

Chirální separace lze realizovat pomocí vícero technik. Mezi ty nejvyužívanější dnes patří vysoko-účinná kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza. Z praktického hlediska totiž nabízejí rychlé, účinné a relativně přesné metody pro kvalitativní i kvantitativní stanovení chirálních sloučenin.

Tato diplomová práce se zabývá chirálními separacemi vybraných sloučenin s axiální chiralitou pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie za využití polysacharidových stacionárních fází. Cílem práce byla optimalizace izokratických metod pro chirální separaci v analytickém módu s ohledem na jejich následný transfer do módu semipreparativního. Ten byl následně využit na izolaci separovaných enantiomerů pro jejich další studium. Optimalizace byla realizována za pomoci dvou chirálních stacionárních fází a kombinace běžných rozpouštědel využívaných jako mobilní fáze v kapalinové chromatografii. Byl také zkoumán vliv změny pH mobilní fáze a změny teploty na enantioseparaci.

2. Teoretická část

2.1. Chirální separace

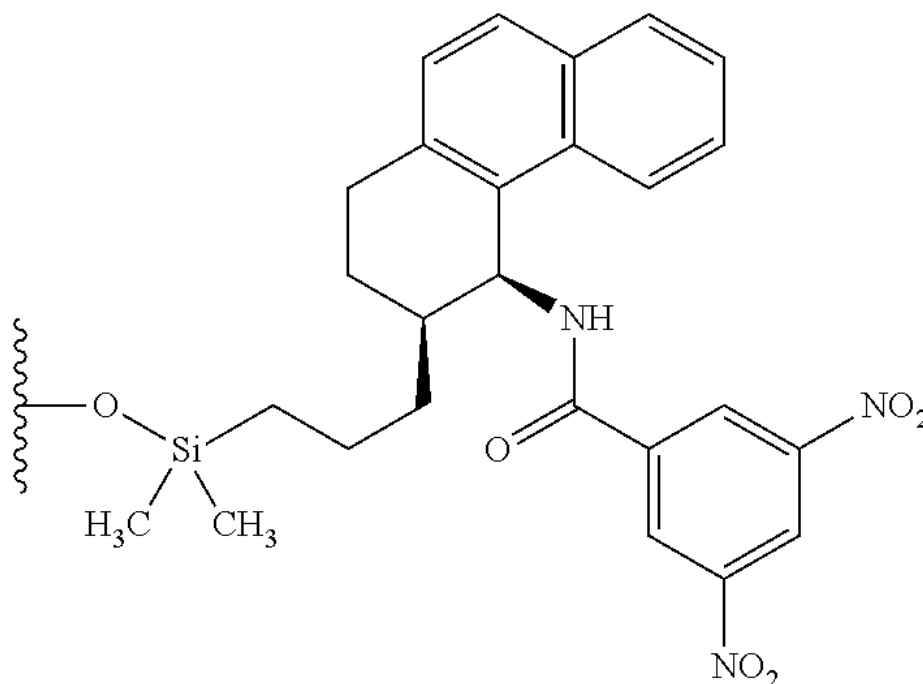
Problematikou separací antipodů opticky aktivních sloučenin se zabývají tzv. chirální separace. Jsou to analytické metody, díky kterým dokážeme rozdělit látky, jež jsou opticky aktivní a vyskytují se tedy ve formě jednotlivých stereoizomerů (prostorových izomerů, jejichž počet závisí na počtu chirálních center v molekule). Komplikací takovýchto separací je fakt, že enantiomery mají shodné fyzikální i chemické vlastnosti – většina separačních metod totiž odděluje jednotlivé analyty právě na základě rozdílných fyzikálních a chemických vlastností [3]. Pro separaci enantiomerů je nutné využít chirální prostředky. Chirální separace lze provádět pomocí různých technik, např. pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC z anglického *high performance liquid chromatography*) [4], plynové chromatografie (GC, z anglického *gas chromatography*) [5], kapilární elektroforézy (CE, z anglického *capillary electrophoresis*) [6] anebo superkritické fluidní chromatografie (SFC, z anglického *supercritical fluid chromatography*) [7]. Dalšími technikami, které jsou oproti výše zmíněným využívány v chirálních separacích spíše okrajově, jsou tenkovrstvá chromatografie (TLC, z anglického *thin layer chromatography*), protiproudá kapalinová chromatografie (CCC, z anglického *countercurrent chromatography*) a extrakce v systému kapalina-kapalina (LLE, z anglického *liquid-liquid extraction*) [8].

Z praktického hlediska jsou chirální separace důležité například ve farmaceutickém průmyslu. Důvodem může být například to, že v léčivu obsahujícím chirální látku má terapeutické vlastnosti pouze jeden optický antipod. Druhý může být inaktivní nebo dokonce pro tělo i škodlivý. Příkladem pro tuto oblast může být látka propranolol. Zatímco enantiomer (S)-(-) působí v těle jako β -blokátor, enantiomer (R)-(+) je v metabolismu inaktivní [9]. Další oblastí, v níž je tento typ separací využíván je průmysl potravinářský. Některé enantiomery opticky aktivních látek mohou totiž například vykazovat rozdílnou chuť. Takovým příkladem je látka limonen. Jeho R(+) enantiomer totiž se z velké části podílí na vůni, kterou vykazuje kůra pomeranče. Naproti tomu enantiomer S(-) je typický pro vůni citrónu [10]. Chiralita hraje roli také v agrochemickém průmyslu. Zde se setkáváme s chirálními separacemi například při použití pesticidů. Důvodem je opět fakt, že jedna z forem je aktivní a druhá neaktivní. Takovým příkladem je fenoxipropanová kyselina. Její (R)-(+) enantiomer je totiž účinným herbicidem, zatímco (S)-(-)-fenoxipropanová kyselina je inaktivní látka [11].

Chirální separace lze také využít například pro stanovení optické čistoty enantiomerů, sledování produktů asymetrických reakcí, analýzy stereochemie přírodních látek či farmakokinetik apod. ^[12].

2.1.1. Chirální HPLC

Chirální chromatografie je speciálním typem HPLC, které se používá pro separaci optických antipodů. S prvními pracemi zabývajícími se chirálním HPLC se setkáváme v 60. letech 20. století. Šlo o práce Davankova, který separoval enantiomery aminokyselin pomocí ligandově výměnné chromatografie ^[13]. V 80. letech došlo k rozvoji chirální HPLC, a to díky vývoji nového typu kolon – tzv. Pirklových stacionárních fází (viz **Obr. 1**). Tento typ stacionárních fází byl také jako první v chirální HPLC komercializován. V následujících letech byly vyvinuty polysacharidové či proteinové kolony, které byly také komercializovány ^[14].



Obrázek 1: Příklad chemické struktury Pirklovy stacionární fáze – kolona Whelk-O 1 ^[15]

Vysokoučinná kapalinová chromatografie využívá – obecně řečeno – rozdílné distribuce látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Fáze označujeme jako stacionární (nejčastěji tuhá látka vázaná na nosič) a mobilní (kapalina). K rozdílné

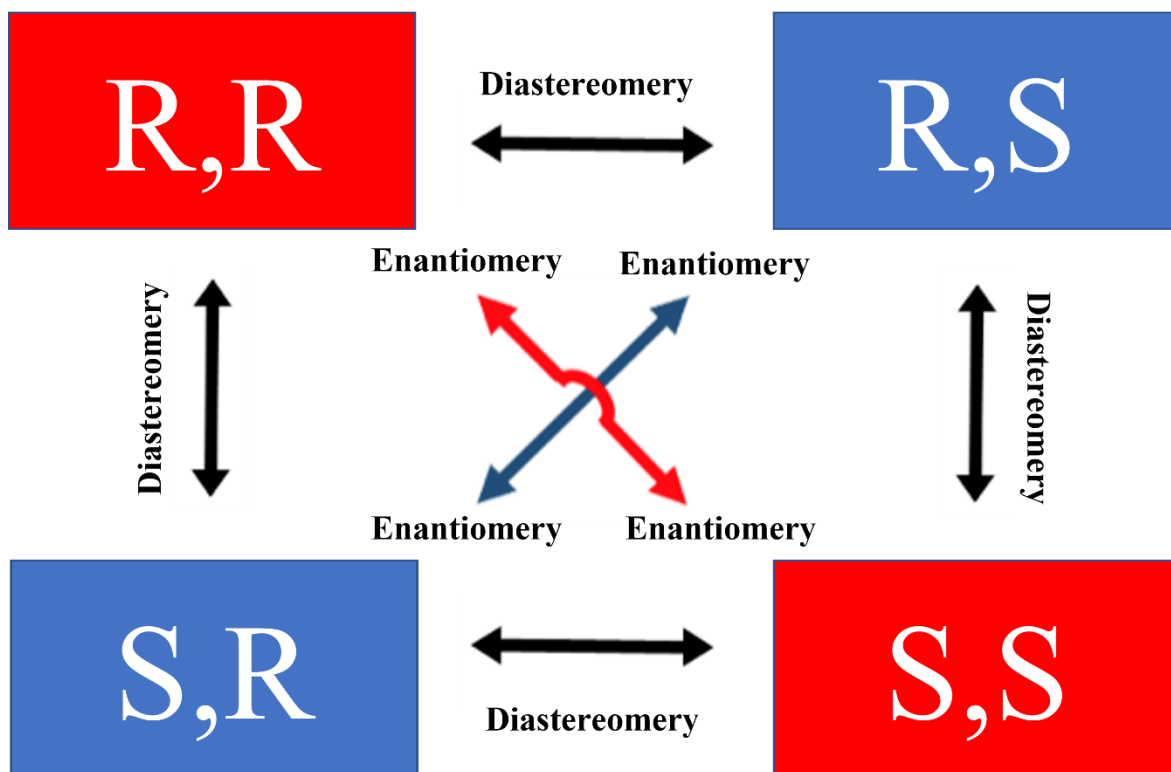
distribuci dochází díky rozdílným chemickým a fyzikálním vlastnostem jednotlivých analytů. Tento princip separace je uplatnitelný i v chromatografii chirální. Chemické a fyzikální vlastnosti dvou optických antipodů se však neliší a na běžně používaných (tj. achirálních) fázích by je proto nebylo možné oddělit. Je proto nutné převést enantiomery na diastereomery, které již odlišné chemické a fyzikální vlastnosti mají. Pro tento krok však bylo proto nutné vyvinout systém, ve kterém by došlo k vytvoření příslušných diastereomerů. Takové systémy jsou dnes dva. Jedná se o separaci přímou (nejpoužívanější), kdy dochází ke vzniku diastereomeru až při samotné separaci a separaci nepřímou, při které je diastereomer připraven ještě před nadávkováním na kolonu [3].

2.1.2. Systémy chirální separace

2.1.2.1. Přímá separace

Systém přímé separace využívá tvorbu tzv. krátkodobého diastereomerního komplexu (též „tranzitního diastereomeru“) vznikajícího při reakci molekuly analytu se stacionární fází nebo chirálním selektorem (nacházejícím se v mobilní fázi). Aby se diastereomerní komplex mohl vytvořit, musí dojít ke třem simultánně působícím interakcím (model tříbodové interakce) [16]. Výhodou páru diastereomerů oproti páru enantiomerů je ten, že diastereomery mají odlišné fyzikální i chemické vlastnosti a vznik krátkodobého diastereomerního komplexu mezi analytem a stacionární fází umožňuje separaci na principu klasického HPLC [3]. Vztah mezi diastereomery a enantiomery je zobrazen na **Obr. 2**. Diastereomery a enantiomery jsou totiž speciálními případy *stereoisomerů*, což je pojem obecně označující jednotlivé varianty konformací opticky aktivních molekul (pro každou molekulu s n chirálními centry existuje 2^n stereoisomerů). Chirálním centrem se rozumí místo v molekule, ze kterého vycházejí čtyři navzájem odlišné substituenty a může jím být atom (centrální chiralita), vazba (axiální chiralita) či například rovina (planární chiralita). Pochopit podstatu chirálního centra je důležité, protože podle rozmístění substituentů vázajících se na chirální centrum můžeme rozlišit typ vztahu mezi dvěma danými konkrétními stereoisomery [17].

STEREISOISOMERY



Obrázek 2: Vztah mezi diastereomery a enantiomery

Z hlediska použitých mobilních fází v přímé kapalinové chromatografii rozlišujeme zpravidla tři módy: reverzní mód, polárně organický mód a normální mód. Reverzní mód využívá vodné nebo pufrované mobilní fáze, a to nejčastěji ve směsi s acetonitrilem (ACN) či alifatickými alkoholy. Pufry nacházejí uplatnění v případě, že je třeba změnit pH mobilní fáze, a tedy například potlačit disociaci analytu ^[3, 18].

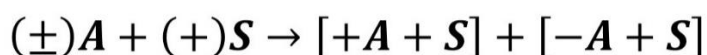
Polárně organickým módem se rozumí použití organického rozpouštědla (acetonitril či alifatický alkohol) nebo směsi takových-to rozpouštědel, příp. v kombinaci s organickou kyselinou či bází. Využití takového módu může být užitečné například v případě, že jsou analyty v mobilní fázi pro reverzní mód nerozpustné ^[3, 18].

Normální mód využívá jako mobilní fázi hexan obohacený o modifikátor. Tím může být například alkohol, ether, acetonitril nebo halogenovaný uhlovodík. Při použití

směsi rozpouštědel je však třeba dbát na jejich mísitelnost a také volbu přizpůsobit dané koloně, tak aby nedošlo k jejímu nenávratnému poškození. Použití některých typů rozpouštědel totiž může způsobit postupnou degradaci či přímé poškození stacionární fáze. Částečná degradace kolony se projevuje například zhoršením selektivity separace [3, 18].

2.1.2.2. Nepřímá separace

Podstatou nepřímé separace je předúprava analytu před jeho samotným nadávkováním na kolonu. Tato předúprava je provedena pomocí činidla, které při reakci s enantiomerem vytvoří zpravidla kovalentně vázaný diastereomerní komplex. Tento krok je nazýván „chirální derivatizací“ a díky tomu, že reakce probíhá před samotnou separací, lze využít pro následnou separaci například achirální prostředí (např. klasické HPLC na reverzních fázích). Výhodou takového kroku je, že cena achirálních kolon je nižší oproti kolonám určeným pro separaci v chirálním prostředí, také lze dosáhnout použitím vhodného derivatizačního činidla lepší citlivosti analytů a lze snadno zaměnit eluční pořadí analytů. Nevýhodou je naopak fakt, že optická čistota derivatizačního činidla musí být vyšší než 99 %, reakce selektoru s enantiomery musí proběhnout kvantitativně, u výsledného produktu nesmí docházet k racemizaci a možnost využití nepřímé separace pro preparativní účely je velmi omezená. Oproti metodám přímé separace se navíc jedná o časově náročný a pracný proces. Vznik diastereomerních produktů je zobrazen na **Obr. 3** [19].



Obrázek 3: Schéma vzniku diastereomerů při reakci racemátu (A) s chirálním selektorem (S)

Jako derivatizační činidla se používají například FDAA (*N*- α -(2,4-dinitro-5-fluorofenyl)-l-alaninamid), GITC (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glukopyranosyl isothiokyanát), S-NIFE ((*S*)-*N*-(4-nitrofenyloxykarbonyl)fenylalanin methoxyethyl ester) či OPA-IBLC (*O*-fthalaldehyd/isobutyryl-L-cystein). Strukturně se jedná o chirální látky, přičemž pro derivatizaci je používán vždy jen jeden z enantiomerů této sloučeniny. V minulosti byly

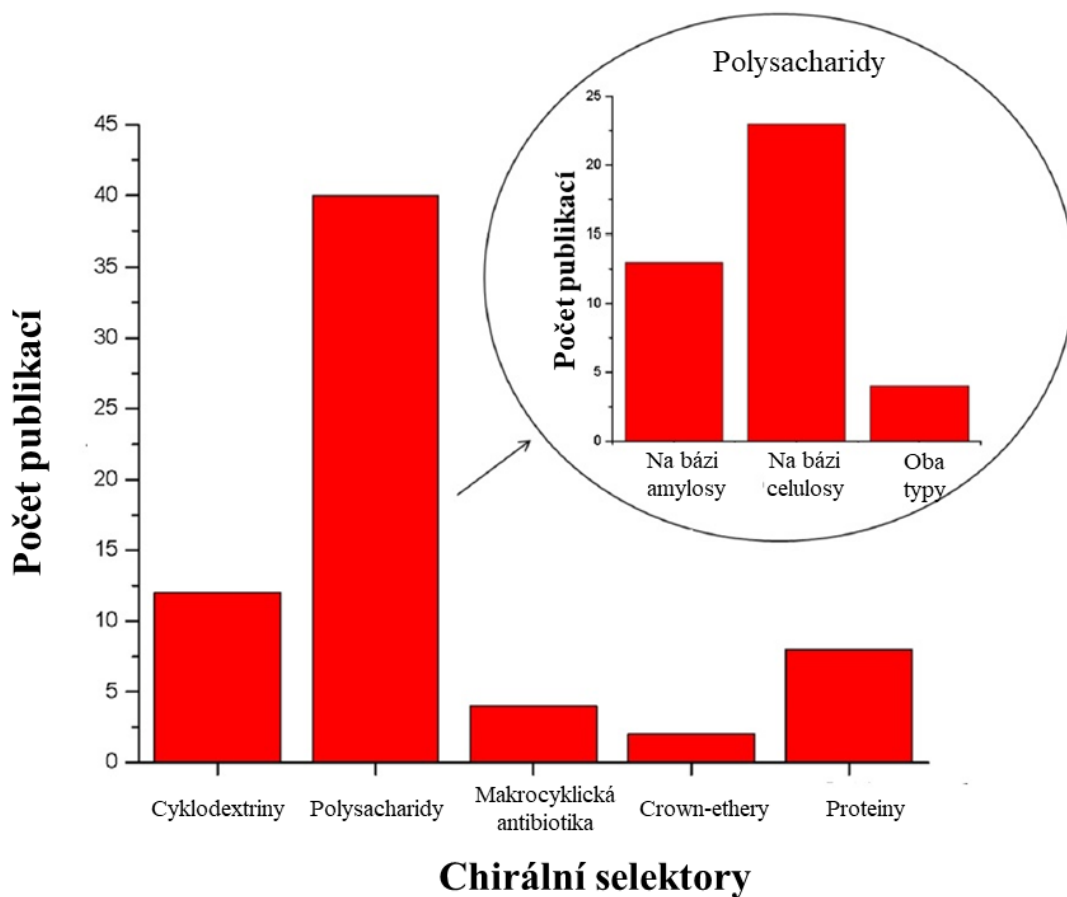
touto metodou separovány například aminokyseliny, polyaminy či karboxylové kyseliny [20].

2.1.3. Chirální selektory

Chirálním selektorem se rozumí látka, která interaguje s analytem v mobilní fázi a je pro svou strukturu, díky které může specificky reagovat s každou látkou, jedním z důležitých faktorů pro úspěšnou enantioselektivní separaci. Chirální selektor může být buď součástí stacionární fáze (zpravidla navázán na inertním sorbentu) nebo může být přidán ve formě aditiva do fáze mobilní. Dále si představíme obě možnosti a jejich využitelnost v chirálních separacích [3]

2.1.3.1. Chirální stacionární fáze

Jak již bylo zmíněno výše, použití chirálních stacionární fází umožňuje pracovat v módu tzv. přímé separace. Chirální stacionární fáze jsou nejčastěji založeny na bázi polysacharidů, makrocyclických antibiotik, cyklodextrinů, glykoproteinů či crownetherů. Nejstarší selektory pro chirální separace jsou pak známy jako Pirklovy stacionární fáze. Dnes nejpoužívanějšími chirálními stacionárními fázemi jsou jednoznačně fáze polysacharidové [21], jak ukazuje také **Obr. 4.**



Obrázek 4: Počet vydaných publikací za poslední tři roky v oblasti separace chirálních léčiv rozdělený podle použitého chirálního selektoru ^[22]

Důvodem pro existenci a používání vícero typů stacionárních fází je fakt, že každý chirální selektor využívá jiných specifických interakcí. Přehled nejpoužívanějších typů stacionárních fází, jejich typických chirálních selektorů a specifických interakcí, které se na takové stacionární fázi uplatňují, je uveden níže v **Tab. I.**

Typ stacionární fáze	Chirální selektor	Mechanismus separace
Pirklovy stacionární fáze	N-ferrocenyl benzoyl- (1S,2R)-1,2-difenyl ethanol	Tvorba tranzitního asociátu selektor-analyt
Polysacharidové stacionární fáze	Deriváty celulosy	Vsunutí analytu do helikální struktury
	Deriváty amylosy	
Makrocyclická antibiotika	Vankomycin	Mnoho vazebných míst
	Teicoplanin	
	Ristocetin	
Iontově výměnné stacionární fáze	Tergurid	Tvorba ion-páru
	Chinin + (S,S)-ACHSA	
Cyklodextriny	α -cyklodextrin	Inkluzní komplexace
	β -cyklodextrin	
Crown-ethery	(3,3'-difenyl-1,1-binaftyl)- 20-crown-6-ether	Inkluzní komplexace
Glykoproteiny	AGP	Mnoho vazebných míst
	BSA	
Cyklofruktany	R-naftylethyl cyklofruktan 6	Inkluzní komplexace
Ligandová výměna	Cu(II)-L-Ornitin	Tvorba komplexu selektor-ion-analyt

Tabulka I: Přehled chirálních stacionárních fází a chirálních selektorů [12, 23,24, 25, 26, 27]

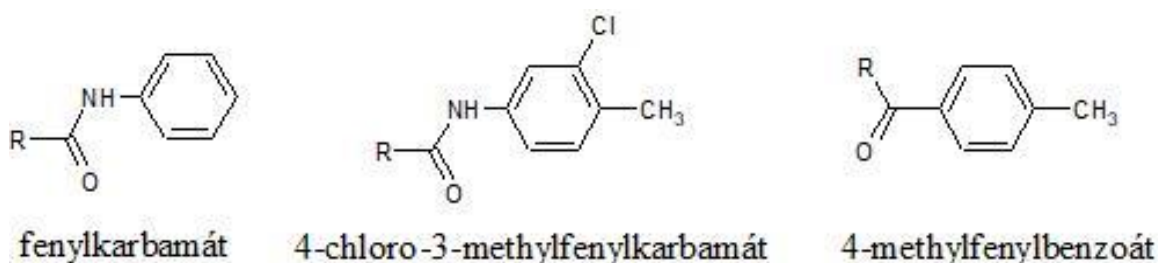
Vzhledem k širokému spektru využití chirálních kolon existuje v komerčním prostředí také mnoho výrobců takových kolon. Mezi nejznámější patří například společnosti Merck, Agilent, YMC, Phenomenex, Daicel aj. **Tab. II** shrnuje jednotlivé výrobce chirálních kolon, jejich komerční názvy a typ stacionární fáze, která obsahují. Největší část vyráběných kolon je určena pro analytické či preparativní účely.

Firma	Komerční název kolony	Chirální selektor
ChiralTek	Chiral CD	Cyklodextriny
	Chiral CE	Celulosa
ChromTech	Chiral-AGP	Glykoproteiny
Cosmosil	Chiral A	Amylosa
	Chiral B	Celulosa
Daicel	Chiralpak	Amylosa
	Chiralcel	Celulosa
	Chiralpak AGP	Glykoproteiny
	Crownpak CR(+)	Crownethery
	Chiralpak WH	CLEC
ES Industries	ChromegaChiral	Polysacharidy
Kromasil	AmyCoat	Amylosa
	CelluCoat	Celulosa
Macherey-Nagel	Nucleodex	Cyklodextriny
	Nucleocel	Celulosa
Merck	ChiraDex®	Cyklodextriny
Phenomenex	Lux Cellulose	Celulosa
	Lux Amylose	Amylosa
	Chiral CD-Ph	Cyklodextriny
Regis	Whelk-O1	Pirklovy fáze
	Reflect-Amylose	Amylosa
	Reflect-Cellulose	Celulosa
Shiseido	Ceramospher	CLEC
YMC	Chiral Art	Polysacharidy

Tabulka II: Přehled výrobců chirálních kolon, jejich komerčních názvů a typů chirálních selektorů, které obsahují [28, 29, 30, 31]

2.1.3.1.1. Polysacharidové stacionární fáze

Polysacharidové stacionární fáze jsou v současnosti nejvyužívanějšími stacionárními fázemi, přičemž jsou známy již od 70. let 20. století [32]. Pro tvorbu kolon bylo vyzkoušeno mnoho sacharidů jako například inulin, chitin, chytosan, xylan či dextran. Nicméně pouze amylosa a celulóza se ukázaly jako cukry s potenciálem využití pro výrobu komerčně dostupných stacionárních fází. Jejich nativní forma se však v praxi pro jejich obecně nízkou selektivitu neuchytila, proto dnes komerční kolony na polysacharidové bázi využívají deriváty těchto dvou sacharidů. Z funkčního hlediska se jedná zejména o sloučeniny vzniklé modifikací sacharidu pomocí fenylových, alkylových, benzylkarbamátových, esterových, benzoátových, arylových či cykloalkylových funkčních skupin [33]. Příklady takových-to derivátů jsou zobrazeny na **Obr. 5**.



Obrázek 5: Příklady derivátů polysacharidů, R = místo vazby na polysacharid

Polysacharidové deriváty mohou být přichyceny k nosiči (nejčastěji silikagel) dvojným způsobem. První možností je, že je derivát na nosič pouze dynamicky nanesen a mezi molekulami tak nevzniká kovalentní vazba. V tomto případě jde o „pokryté“ kolony (tzv. *coated type*). Takové kolony se vyznačují vysokou účinností a mohou být použity v normálním, polárně organickém i reverzním módu. Jejich negativem je fakt, že nelze použít rozpouštědla jako je dichlormethan, chloroform, toluen či aceton. Důvodem je, že by tato rozpouštědla mohla rozpustit adsorbovaný polymer, vymýt chirální selektor a kolonu tak nenávratně poničit [32]. Tento typ kolon byl použit například v pracích Balmér a kol. při separaci omeprazolu [34] či Tanaka a kol. při stanovení enantiomerů pantoprazolu [35].

Druhým způsobem je vznik kovalentní vazby mezi nosičem a derivátem. V takovém případě mluvíme o kolonách imobilizovaných (tzv. *immobilized type*). Ačkoliv použitelnost rozpouštědel je širší, než tomu bylo u „*coated type*“ kolon, reálné využití je

nižší. Důvodem je fakt, že při imobilizačním procesu dochází ke změně stereospecifické konformace derivátu a tím i ke snížení jeho účinnosti v enantioseparačním procesu [36]. Imobilizovaný typ kolon byl použit pro analytické účely například v práci Ghanem a kol. pro enantioselektivní separaci α - a β -blokátorů a dalších farmaceutik [37] nebo v práci Ogasarawa a kol., věnované studiu separace organokovových sloučenin [38]. Oba tyto typy polysacharidových kolon našly využití v analytickém i (semi)preparativním separačním módu [12].

Určit, jaká kolona, respektive který chirální selektor bude pro samotnou separaci ten správný, je velmi obtížné. Mnohdy postačí správné geometrické uspořádání analytu vůči selektoru, jindy je ale potřeba využít například specifických interakcí samotných chirálních selektorů. V případě polysacharidových chirálních selektorů mohou mít vliv na retenci analytů například vodíkové můstky, π - π interakce, interakce dipól-dipól, van der Waalsovy indukční síly, Londonovy disperzní síly, hydrofobní interakce či sterické bránění [39].

2.1.3.2. Chirální selektory v mobilní fázi

Jak již bylo dříve zmíněno, u přímé separace dochází k reakci analytu s chirálním selektorem, který je přítomen buď ve stacionární fázi nebo ve fázi mobilní. Doposud byly popsány chirální selektory přítomné ve stacionární fázi. V této kapitole si proto představíme chirální selektory, které jsou přidávány do fáze mobilní.

Příprava před samotnou enantioseparací spočívá v tomto případě v rozpuštění chirálního selektoru v mobilní fázi. Stacionární fáze zůstává achirální. Vzhledem k tomu že jde opět o metodu přímou dochází ke vzniku tranzitního diastereomerního komplexu mezi analytem a chirálním selektorem. Ten vznikne – stejně jako v případě chirálních stacionárních fází – tehdy, pokud dojde ke třem simultánně působícím interakcím (tyto interakce zahrnují například inkluzní komplexaci, elektrostatické interakce, π - π interakce, vodíkové vazby a interakce dipól-dipól). Vzhledem ke složitosti problému se na celkové enantioseparaci podílí mimo jiné stacionární fáze (např. klasická C18), složení mobilní fáze (včetně koncentrace chirálního selektoru a dalších aditiv), pH a teplota mobilní fáze [3, 40, 41].

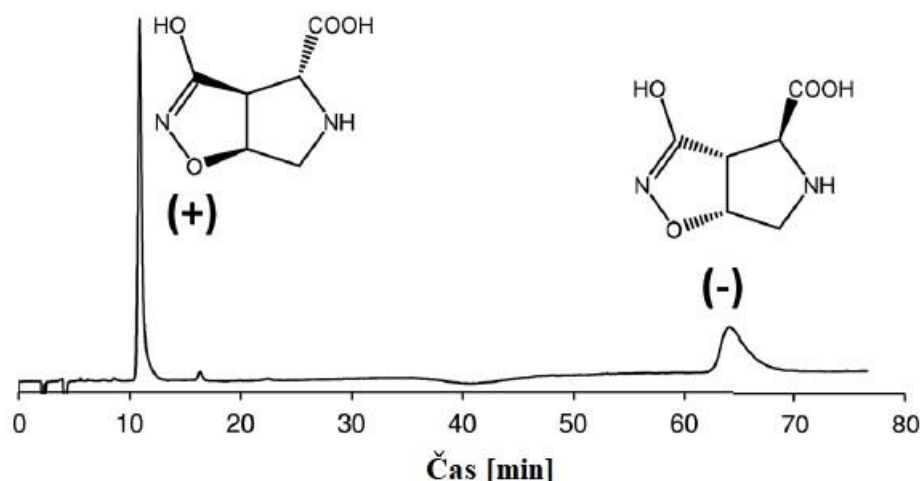
Chirální selektory lze stejně jako chirální stacionární fáze rozdělit do několika skupin. Nejčastěji jde o makrocyclická antibiotika, cyklodextriny a a chirální selektory pro ligandovou výměnu [3].

Makrocyclická antibiotika byla poprvé jako chirální selektory představena v roce 1994 [42]. Nejpoužívanějším selektorem z této skupiny je vankomycin, což je makrocyclické antibiotikum spadající do skupiny glykopeptidů. Díky tomu, že glykopeptidy obsahují velké množství různorodých funkčních skupin jako jsou například aromatické kruhy, hydroxylové, aminové či karboxylové skupiny atd., mohou využívat velkého množství specifických interakcí. Tento typ chirálních selektorů lze použít jak v reverzním, tak v normálním módu [3]. Mezi analyty, které lze separovat pomocí těchto aditiv, patří velké množství aniontových, kationtových i neutrálních sloučenin, jako jsou například aminokyseliny [43]. Dále pak s jejich pomocí mohou být separovány například nesteroidní protizánětlivá léčiva [44].

Cyklodextriny (CD) patří mezi hojně používaná aditiva také v CE, kde jsou dokonce vůbec nejpoužívanějšími skupinou chirálních aditiv. Cyklodextriny jsou oblíbené pro svou dobrou rozpustnost v širokém spektru mobilních fází a nízkou absorpci záření v UV spektru. Navíc je většina nativních i derivatizovaných CD také poměrně cenově dostupná. Enantioseparační účinky CD jsou dány jejich hydrofobní kavitou, do které mohou „zapadnout“ jak polární, tak nepolární molekuly. Separace s použitím těchto aditiv mohou probíhat v reverzním i v normálním módu. Cyklodextriny se ukázaly být účinné pro separaci enantiomerů s různými funkčními skupinami, různými heteroatomy (S, P, N, Si), které jsou zároveň chirálními centry či pro enantiomery axiálně či planárně chirální [3, 45, 46].

Separální mechanismus ligandově výměnné chromatografie (CLEC, z anglického *chiral ligand exchange chromatography*) je založen na reakci analytu s chirálním selektorem (např. (S,S)-N,N'-bis(fenylalanyl)ethylendiamin). Chirální selektor však nejprve musí zreagovat s kationtem kovu (např. Cu^{II}) – až poté reaguje takto vzniklý ternární komplex s enantiomerem analytu. K separaci takto vzniklých komplexů enantiomerů dochází tehdy, pokud jsou konstanty stability vzniklých komplexů dostatečně rozdílné. V praxi lze chirální selektor přidat do mobilní fáze, kovalentně navázat na nosič či je na něj pouze nanést a vytvořit tak stacionární fázi na bázi ligandu. Vzhledem k tomu, že chirální selektor obsahuje polární funkční skupiny, je lépe rozpustný v polárních

rozpouštědlech. V CLEC se tak často jako mobilní fáze používá voda či kombinace vody a organického rozpouštědla, a to v reverzním módu. Zatímco chirální selektor může být zaveden na stacionární fázi, kation kovu je přidáván přímo do mobilní fáze společně s analytem. Analyty, které lze takto separovat typicky obsahují dvě až tři elektrondonorní funkční skupiny (karboxylová, aminová či hydroxylová skupina). Ty totiž mohou simultánně „vstoupit“ do koordinační sféry komplexotvorného kovového iontu a vytvořit bidentátní či tridentátní chelatující ligand. Mezi takové látky patří například derivatizované či nederivatizované aminokyseliny, hydroxykyseliny, aminoalkoholy, dikarboxylové kyseliny či dipeptidy. Příklad separace opticky aktivního derivátu aminokyseliny v módu ligandově výměnné chromatografie lze pozorovat na **Obr. 6** [3, 21, 47, 48, 49].



Obrázek 6: Analytická separace enantiomerů derivátu aminokyseliny v módu CLEC, stacionární fáze: C18, mobilní fáze: (S)-OBS (2mM), $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (1mM) ve vodě, průtok: 1 ml/min, teplota: 25°C, vlnová délka: 254 nm [49]

2.1.4. Možnosti ovlivnění selektivity chirálních separací

Součástí nalezení vhodných podmínek jakékoliv – tedy i chirální – separace je tzv. vývoj a optimalizace metody. Optimalizací metody se rozumí volba chromatografických podmínek, tak aby došlo k separaci stereoisomerů v co nejkratším možném čase. Díky souhrnu postupných analýz během optimalizace pak máme možnost sledovat míru vlivu změny jednotlivých parametrů na separaci daného analytu. „Optimální“ výsledek je závislý na daném požadavku či cíli, kterého je potřeba při separaci daného analytu dosáhnout [50].

Optimalizaci je nutné provádět zvláště pro každou stacionární fázi, neboť úspěšnost separace závisí především na afinitě analytu ke stacionární a mobilní fázi. Mezi parametry v HPLC, které lze sledovat a optimalizovat, tak patří především typ stacionární fáze a složení mobilní fáze. Pokud dojde k situaci, kdy kombinace stacionární a mobilní fáze (neobsahující žádná aditiva) nedostačuje k separaci, lze sledovat a měnit další parametry. V této fázi jde především o optimalizaci průtoku, sledování vlivu pH a teploty na separaci daných analytů. V této kapitole bude tato problematika vyjma volby stacionární fáze blíže probrána.

2.1.4.1. Efekt rozpouštědel

Jak již bylo řečeno, úspěšnost separace zpravidla závisí na afinitě analytů k jednotlivým fázím, a tedy na volbě vhodné mobilní a stacionární fáze. Efekt fáze stacionární byl rozebrán již dříve (viz kapitola 2.1.3.1.), stejně jako kombinace rozpouštědel používaných se v chirálních separacích (viz kapitola 2.1.2.). V tomto odstavci proto představíme spíše efekty jednotlivých typů rozpouštědel na výsledek separace na polysacharidových kolonách. Důvodem zúžení výběrů popisovaných stacionárních fází na polysacharidové je fakt, že spektrum možných typů kolon pro chirální separace je poměrně široké a také to, že v praktické části předkládané práce byly použity právě stacionární fáze na bázi polysacharidů.

V enantioseparacích se často jako mobilní fáze používá kombinace hexanu s primárním alkoholem. Proto byl pomocí NMR studován efekt rostoucí koncentrace alkoholů v mobilní fázi a jeho vliv na strukturu samotné polysacharidové stacionární fáze. Ze studie vyplývá, že obecně nižší obsah alkoholu v mobilní fázi než 10 % (v/v) nemá vliv na strukturu polysacharidu. Postupné zvýšení obsahu až ke 40 % (v/v) pak vedlo k menší dostupnosti vazebných míst na povrchu stacionární fáze. Tato studie tak vysvětluje snižující se retenci analytu v závislosti na rostoucí koncentraci alkoholu v mobilní fázi [51, 52]. Byla publikována řada prací, která rovněž sledovaly vliv koncentrace alkoholu v mobilní fázi na retenci enantiomerů, a i ony potvrzují výsledky této studie [53, 54, 55]

Kromě vlivu koncentrace alkoholu (ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol a t-butanol) na retenci látek byl také studován vliv alkoholu na retenci analytů v závislosti na typu alkoholu, respektive délce jeho alkylového řetězce. Změna ethanolu za 1-propanol vyvolala v prvním případě snížení selektivity separace. V druhé případě tomu však bylo

naopak. Lze tedy předpokládat, že selektivita konkrétních alkoholů silně závisí na povaze separovaného analytu, případně i na typu stacionární fáze ^[44]. Souhrnné porovnání vlivu druhu alkoholu na retenci analytu napříč polysacharidovými kolonami obou typů nabízí práce Thunberg a kol. ^[56].

Alkoholy nejsou jedinou skupinou rozpouštědel pomocí, kterých lze měnit selektivitu separace. Další takovou sloučeninou může být například acetonitril. Ten se i v oblasti chirálních separací používá nejčastěji ve směsích s vodou. Jde tedy o obdobu achirálního separačního módu označovaného jako HILIC (hydrofilní interakční chromatografie). Shedania a kol. studovali vliv zastoupení ACN v mobilní fázi tvořené kombinací vody a ACN na separaci chirálních sulfoxidů na celulosových kolonách. Pro analyty obsahující amidovou skupinu retence analytů s rostoucím zastoupením ACN v mobilní fázi stoupala. Naopak u analytů s aromatickou částí, případně trifluoromethylovou skupinou ve své struktuře, retence se stoupajícím zastoupením ACN v mobilní fázi klesala. Důvodem pro toto různorodé chování jsou vodíkové vazby, které se uplatňují, pokud je v mobilní fázi přítomna voda, což se významně projevuje na separačním faktoru daného analytu. S rostoucím obsahem vody v mobilní fázi, separační faktor klesá pro analyty s amidovou skupinou, a naopak separační faktor roste pro analyty s objemnou hydrofobní skupinou či chybějící amidovou skupinu ^[57].

Vzhledem ke strukturální podobnosti acetonitrilu s methanolem byl porovnán účinek MeOH (methanol) a acetonitrilu v mobilní fázi (MeOH-ACN/voda) na selektivitu separace na celulosových kolonách. Retence chirálních sulfoxidů byla při porovnání obou rozpouštědel vyšší při použití acetonitrilu. Důvodem jsou opět vodíkové vazby. Acetonitril, jako aprotické rozpouštědlo, totiž na rozdíl od methanolu není schopen tohoto typu interakce s analytem. Analyt tak může o to více interagovat s chirálním selektorem a v konečném důsledku být více zadržován na koloně ^[57].

V dalším kroku byl testován efekt přidání vody do mobilní fáze. V případě methanolu došlo ke zvýšení retence analytů, a tedy ke zvýšení retence a separačního faktoru. Důvodem je fakt, že alkoholy obecně „soutěží“ s vodou o polární místa na povrchu stacionární fáze. V konečném důsledku tak klesá koncentrace molekul vody na povrchu stacionární fáze a analyt může se stacionární fází interagovat více a být tak déle zadržován. V případě acetonitrilu je problém složitější. Na jednu stranu acetonitril s vodou o polární místa na povrchu stacionární fáze „nesoutěží“ a retence analytu se tedy nezvýší. Na stranu

druhou však přidání vody znamená zamezení polárních interakcí mezi analytem a selektorem, a tak naopak dochází k většímu uplatnění hydrofobních interakcí mezi analytem a selektorem, což v celkovém důsledku vede ke zvýšení retence analytu na koloně. Celkový efekt je tak kombinací obou výše zmíněných jevů. Bylo pozorováno, že v nižších koncentracích vody v mobilní fázi dominuje spíše první efekt, okolo 30–40 % v/v se situace mění a začíná převažovat spíše druhý efekt [57, 58].

2.1.4.2. Aditiva v chirální separacích

O chirálních aditivech již byla řeč ve smyslu aditiv jako chirálních selektorů. V této kapitole budou představena aditiva pomocí, kterých lze vylepšit enantioseparaci například změnou pH.

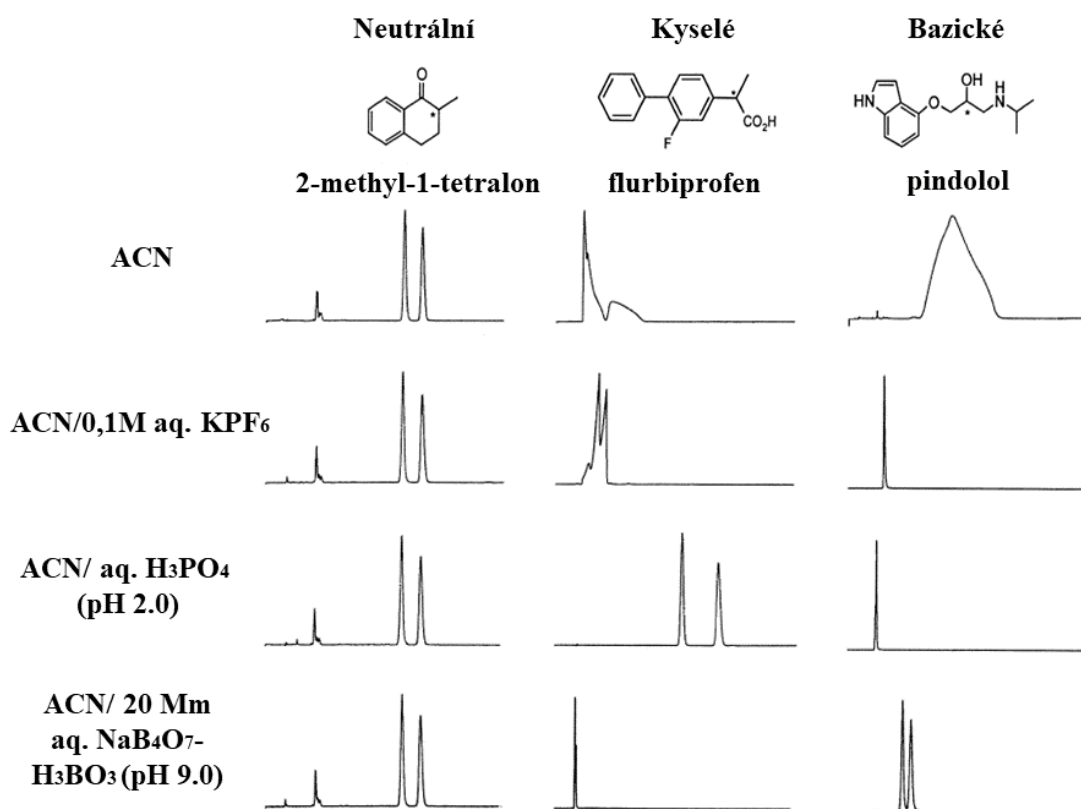
Při separacích neutrálních nepolárních analytů je často využívána kombinace vody a organického rozpouštědla. Použití modifikátorů upravujících pH je v tomto případě poměrně zbytečné. Důvodem je, že zde nedochází ke konkurenčním iontovým interakcím. Proto případné použití pufrů, kyselých či bazických modifikátorů nebude mít na vylepšení separace žádný účinek [59]. Takováto mobilní fáze byla použita například pro separaci enantiomerů warfarinu a to v práci Valliappana a kol. [60]

Pro kyselé analyty se nabízí použití kyselé mobilní fáze, aby došlo k potlačení případné disociace analytu a minimalizaci vzniku iontových interakcí. Například pro separaci analytů obsahujících karboxylovou skupinu bývá dostatečné použití vodných roztoků o $\text{pH} = 2$ v kombinaci s organickým modifikátorem (alkohol, acetonitril). Mnoho organických kyselin je totiž v rozmezí $\text{pH} 2\text{--}4$ v neutrální formě. pH v rozmezí $2\text{--}7$ je navíc možné použít i pro polysacharidové kolony se silikagelovým nosičem, neboť v tomto rozsahu nesnižuje trvanlivost kolony. Aditivy, kterými snižujeme pH roztoku, jsou nejčastěji kyselina mravenčí, trifluoroctová kyselina či kyselina octová (typicky ve formě pufrů) [59, 60, 61]. Takových to aditiv bylo využito například v práci Matarashvili a kol., jejichž cílem byla separace chirálních derivátů karboxylových kyselin na polysacharidových stacionárních fázích [62].

U bazických analytů je možné ovlivnit separace zpravidla dvěma parametry. Tím prvním je výběr vhodného pufru, tím druhým optimalizace pH . Logickým krokem by v tomto případě bylo zvýšit pH nad hodnotu 7. Problémem je však nestabilita silikagelu při vyšším pH . Literatura uvádí pro silikagelové kolony horní limity v oblasti pH okolo 10. I

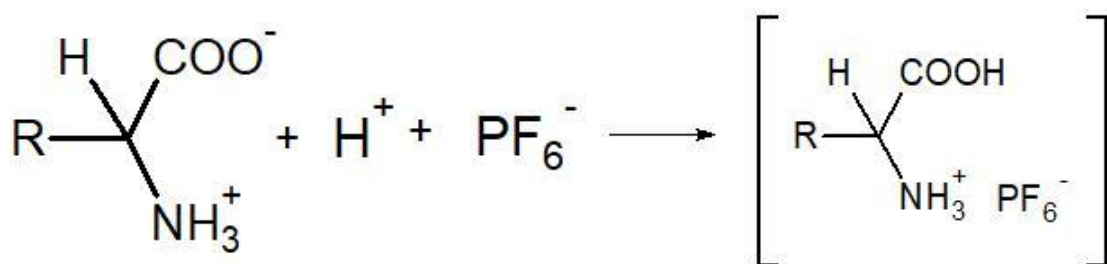
použití mobilní fáze s pH v blízkosti této hranice však rapidně snižuje životnost kolony. Z těchto důvodů jsou stále preferovány systémy s pH nižším než 7, pokud to situace dovoluje. V neutrálních či kyselých mobilních fázích se bazické analyty vyskytují ve formě kladně nabitých iontů. Kladně nabitý analyt však nemůže efektivně interagovat s CSP (chirální stacionární fáze) a analyt je tak eluován prakticky v mrtvém čase. Řešením je přidat do mobilní fáze aniont, který vytvoří se separovaným analytem iontový pár, který se navenek jeví jako elektroneutrální. Mezi nejpoužívanější anionty patří například PF_6^- , BF_4^- , ClO_4^- , SCN^- , I^- . Kromě chemické povahy samotného ion-párového činidla má na separaci vliv i jeho koncentrace: obecně platí, že větší koncentrace činidla přináší lepší selektivitu. Na druhou stranu s sebou zvýšení koncentrace iontů nese větší riziko vysrážení použitých solí při jejich styku s organickým modifikátorem. Existují však případy, kde použití ion-párového činidla nebylo efektivní a bylo proto nutné vystačit si pouze s úpravou pH. Z tohoto důvodu jsou dnes komerčně dostupné i kolony, obsahující modifikace silikagelu stabilní i při pH 9. Pro pH 9 se osvědčilo použití borátového pufru či diethylaminu (DEA) o koncentracích 0,1 %. Všechny tyto podmínky lze aplikovat i na polysacharidových fázích ^[59]. Tato aditiva byla použita například v práci Sardella a kol. pro separaci derivátů benzimidazolů ^[63].

Porovnání separací na polysacharidových kolonách s mobilní fází bez aditiv a s aditivou a jejich porovnáním pro separaci neutrálních, kyselých a bazických analytů se zabýval například Sardella a kol. ^[63]. Ze studie je patrné, že aditiva jsou jedním ze základních prvků, kterými lze vylepšit separace, které nejsou za daných podmínek optimální (například vylepšením tvaru píků). Výsledky separací za vybraných podmínek a porovnání s analyty jsou zobrazeny na **Obr. 7**.



Obrázek 7: Souhrn příkladů aditiv a jejich vlivu na neutrální, kyselé a bazické racemáty konkrétních látek. Kolona: Chiralcel AD-RH (0,4 × 15 cm), m.f. (mobilní fáze): viz obrázek, poměr složek 60/40 (v/v), průtok m.f. 0,5 ml/min, teplota: 25 °C, detekce: UV, $\lambda = 254 \text{ nm}$ ^[63]

Pro bifunkční analyty (jako jsou například aminokyseliny) se ukázalo jako efektivní použití mobilní fáze o nízkém pH obsahující ion-párové činidlo. Tento přístup je postaven na potlačení disociace kyselé skupiny pomocí pH, zatímco disociace bazické skupiny bude v kyselém pH potlačena použitím ion-párového činidla (např. hexafluorofosforečnanový anion). Tato možnost je zobrazena pomocí schématu na **Obr. 8**. Tvar píku je možné také účinně vylepšit použitím velmi malého množství organického aminu (0,1-0,2 % DEA), což potlačí iontové interakce mezi zbytkovými silanolovými skupinami na povrchu kolony a analytem ^[59]. Pucciarini a kol. separovali pomocí této kombinace aditiv enantiomery cysteinu ^[64].



Obrázek 8: Reakce bifunkční molekuly s kyselým vodíkem a ion-párovým činidlem

2.1.4.3. Teplota

Další z metod, jak ovlivnit chirální separace (ale také obecně separace v HPLC) je úprava teploty separačního systému (typicky termostátováním kolony). Enantioseparace je možná pouze tehdy, pokud je rozdíl Gibbsovy volné energie diastereomerického komplexu v mobilní fázi a ve stacionární fázi nenulový. Gibbsova energie je definována Gibbs-Helmholtzovou rovnicí (1), kde ΔG° je standardní Gibbsova energie, α odpovídá faktoru selektivity chromatografické separace, R je molární plynová konstanta a T je termodynamická teplota. ΔH je pak standardní entalpie přenosu látky mezi stacionární a mobilní fázi a ΔS° standardní entropie přenosu látky mezi stacionární a mobilní fázi ^[65].

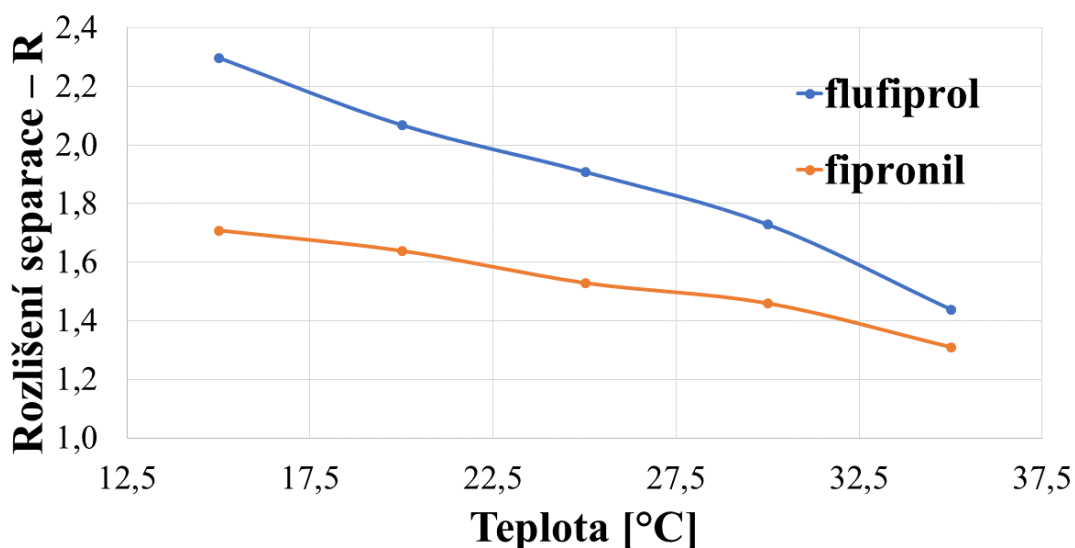
$$\Delta G^\circ = -RT \ln \alpha = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (1)$$

Z rovnice vyplývá úzká spojitost mezi Gibbsovou energií a teplotou, respektive mezi teplotou, entropií a entalpií. Rozdíl v Gibbsově volné energii pro daný enantiomerní pár je tak mírou selektivity jejich separace ^[65].

Vzhledem k vývoji poznatků v oblasti vlivu teploty na enantioseparaci dnes víme, že s růstem teploty obecně dochází ke snížení rozlišení, retenčního faktoru a také separačního faktoru. Tento fakt vyplývá z trendů pro entalpii a entropii molekul. S rostoucí teplotou entalpie pro jednotlivé enantiomery klesá, entropie je na teplotě nezávislá. Hodnoty enthalpie a entropie pro jednotlivé enantiomery lze vypočítat, a to pomocí Van't Hoffovy rovnice (2), kde k je retenční faktor a Φ je fázový poměr každé kolony, který je dán poměrem V_S/V_M (V_S – objem stacionární fáze, V_M – objem mobilní fáze) ^[66, 67].

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln\Phi \quad (2)$$

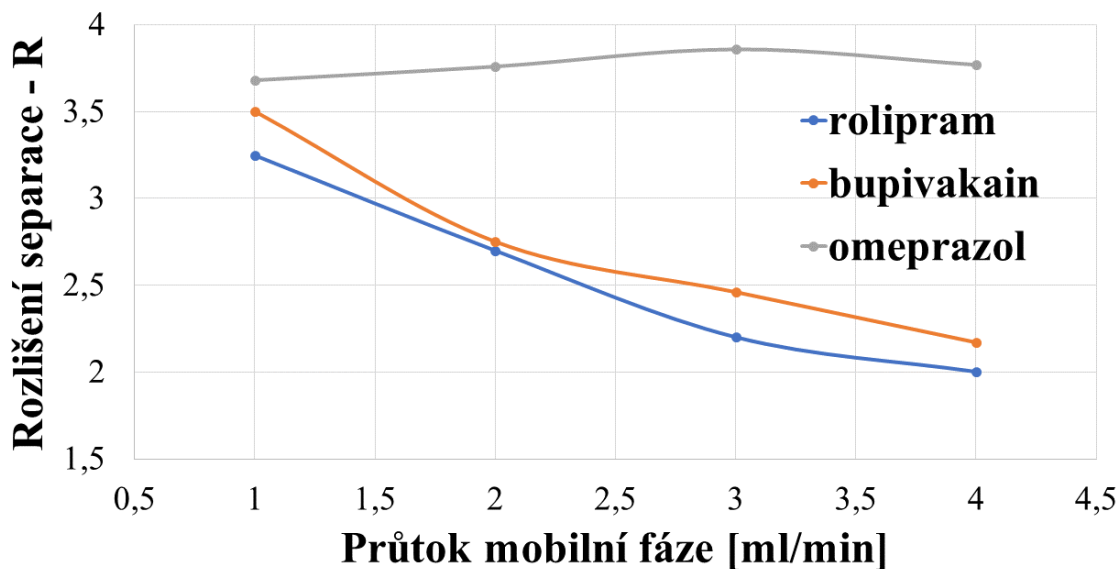
Rozlišení separace, případně zlepšení tvaru píků je tedy často možné zvýšit snížením teploty na koloně (chlazením). Byla publikována řada prací [68, 69, 70], jejichž autoři se zabývali vlivem teploty na enantioseparaci. Příklad vlivu teplot na rozlišení separací je pozorovat na **Obr. 9**, kde byl separován flufiprol a fipronil [69].



Obrázek 9: Graf závislosti rozlišení separace enantiomerů flufiprolu a fipronilu na teplotě kolony

2.1.4.4. Průtok mobilní fáze

Poslední diskutovanou možností vylepšení parametrů chirálních separací je změna průtoku mobilní fáze. Obecně platí, že klesající průtok mobilní fáze má za následek delší dobu interakce mezi analytem a stacionární fází, a tedy zvýšení retence analytu na koloně. Dochází sice ke zvýšení retence, na samotnou selektivitu separace však tato úprava žádný vliv nemá [71]. Závislost retence enantiomerů rolipramu, bupivakainu a omeprazolu na průtoku mobilní fáze sledoval da Silva et al [72]. Výsledky lze pozorovat na **Obr. 10**.



Obrázek 10: Závislost průtoku mobilní fáze na rozlišení separace enantiomerů rolipramu, bupivakainu a omeprazolu

2.2. Módy v kapalinové chromatografii

Kapalinovou chromatografií lze provádět ve několika různých módech. Z hlediska průtoku, rozměrů použitých kolon, používaných objemů a nastříkované koncentrace vzorků lze kapalinovou chromatografií rozdělit do tří různých oblastí. Jde o nanochromatografií, analytickou chromatografií a (semi)preparativní chromatografií. V této kapitole si všechny tyto módy blíže představíme a s ohledem na častou kombinaci analytické a (semi)preparativní chromatografie budou tyto dva módy vzájemně porovnány.

Nano nebo také kapilární kapalinová chromatografie je obdobou klasické kapalinové chromatografie v analytickém módu. Pojem „nano“ je odvozen od nastříkovaného objemu, který se pohybuje právě v řádech nanolitřů. Také průtok se pohybuje pouze v rozmezí 10-1000 nl/min. Kolony používané v nanochromatografii jsou kapilárami naplněnými pětičlým sorbentem – jde často o stejné kapilární kolony, které se používají v kapilární elektroforéze. Nejčastěji používané jsou kapilární kolony o vnitřním průměru 75 μm . Nanochromatografie nabízí oproti klasické analytické LC výhodu v daleko nižší spotřebě mobilní fáze i vzorku. Potenciál využití nachází nanochromatografie především ve spojení s hmotnostní spektrometrií, a to například pro farmaceutické či biomedicínské účely. Také

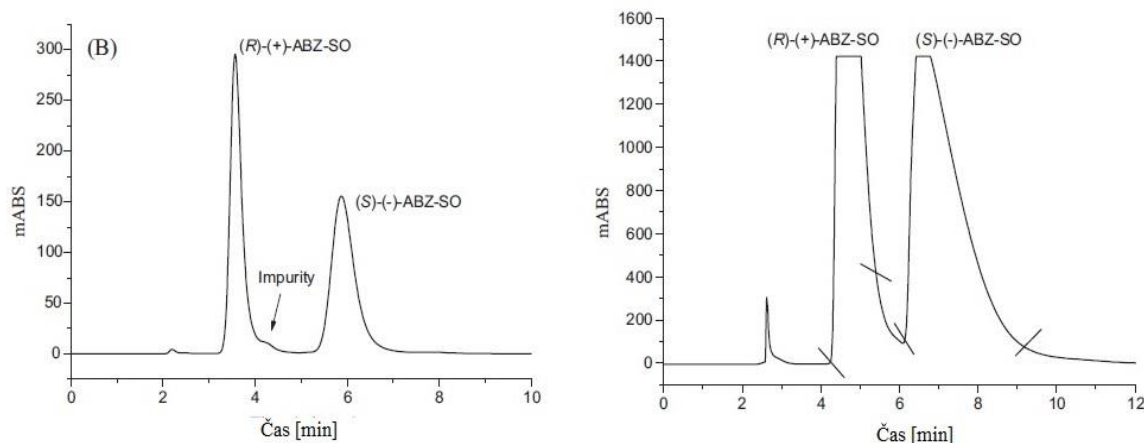
ji lze uplatnit v chirálních separacích. Přístup k separacím je zde stejný jako v HPLC či CE. Využívá se zpravidla přímého módu separace s využitím chirálních stacionární fází či chirálních aditiv přidávaných do mobilní fáze. [73, 74, 75]

Při syntéze nových látek bývá často potřeba výslednou směs purifikovat. Tradiční metody, jako je destilace či extrakce nejsou v mnoha případech použitelné; např. v případě izolace chirálních látek není možné využít destilaci z důvodu shodných chemických a fyzikálních vlastností páru enantiomerů, v případě extrakce je nutno použít speciálních podmínek extrakce kapalina-kapalina [76]. Jedinou metodou, která splňuje požadavky na automaticnost a jednoduchost (vysoká čistota, velké objemy izolovaných analytů, relativně krátký čas separací), je preparativní HPLC. Ačkoliv se jedná o daleko dražší techniku, než tomu je například u destilace, postupem času se stala nepostradatelnou součástí vybavení laboratoří zabývajících se purifikací látek pro jejich následné studium [77].

Předmětem analytického HPLC bývá kvalitativní a kvantitativní analýza látek. Naproti tomu v preparativním systému jsou hlavními cíli separace, izolace a purifikace velkých navážek analytů. Množství vzorku, které je potřeba izolovat, začíná v řádech mikrogramů pro izolaci enzymů; pro izolaci přírodních či nově syntetizovaných chemických látek bývá zpravidla potřeba získat množství v řádech miligramů; v řádech gramů většinou izolujeme standardy, referenční sloučeniny a sloučeniny pro toxikologické a farmaceutické testování. V průmyslu se pak můžeme setkat také s izolací látek v řádech kilogramů [77, 78].

S množstvím analytů dávkovaných na kolonu souvisí také vzhled výsledných chromatogramů a parametry, který u chromatogramu sledujeme. V případě analytické chromatografie pracujeme s daleko nižšími navážkami vzorků, můžeme proto sledovat a optimalizovat píky jednotlivých analytů – lze sledovat symetrii, šířku či ostrost. Ideální pík by se pak měl podobat Gaussovské křivce. Tento faktor je velmi podstatný, protože má často velký vliv na výsledné rozlišení separace a jeho optimalizací se dá výslednou separací zpravidla vylepšit. V případě preparativního HPLC však často dochází k tomu, že množství vzorků dávkovaná na kolonu jsou příliš vysoká, přičemž dochází k porušení linearity adsorpční izotermy pro danou kolonu. Píky se tedy stávají nesymetrickými, dochází k jejich chvostování či frontování a účinnost daného píku klesá. Tento jev v preparativním HPLC nastává, pokud z důvodu velké koncentrace vzorků dojde k přetížení kolony. Z praktického hlediska však nemusí jít o komplikaci: v preparativním módu je totiž důležitá především čistota produktu, kde vzhled píků nehraje roli. Problém

by nastal v případě, pokud bychom však chtěli sledovat koncentraci analytů procházejícího kolonou a na základě plochy píku provést kvantifikaci. V takovémto případě by totiž kvantifikaci nebylo možné provést [3, 77]. Porovnání chromatogramů pro separaci v analytickém a semipreparativním módu lze pozorovat na **Obr. 11**.



Obrázek 11: Porovnání analytické a semipreparativní separace derivátu albendazolu; kolona: amylosa tris(3,5)-dimetylfenylkarbamát, rozměry kolony: (15 × 0,46 cm, 7 μm) pro analytický mód a (20 × 0,70 cm, 7 μm) pro semipreparativní mód; mobilní fáze: MeOH; průtok: 1,0 resp. 2,5 ml/min; λ – 290 nm [79]

2.2.1. Požadavky na kolony v HPLC

Nejpoužívanějším systémem v analytickém HPLC jsou dnes reverzní fáze, a to z důvodu nabídky uplatnění v separacích širokého spektra látek. Jedním z parametrů, na který je v preparativním módu zpravidla kladem vyšší důraz než v módu analytickém, je kapacita kolony. Pro adsorpční chromatografii obecně platí, že se kapacita kolony odvíjí čistě od dostupné plochy stacionární fáze, přičemž větší plocha nabízí větší kapacitní faktor kolony. Konkrétně v případě reverzních fází se pak navíc uplatňuje také rozpustnost analytu, procento pokrytí aktivních míst nosiče použitou stacionární fází a délka alkylového řetězce vázané fáze. Kapacita povrchu kolony je nejčastěji vyjádřena v μmol/m². Typické silikagelové kolony mají kapacitu okolo 8 μmol/m². V systému reverzních fází, kde je silikagel pouze nosičem alkylového řetězce a kde se tedy uplatňují také například hydrofobní interakce, se kapacita kolony pohybuje pouze okolo 2,5-3 μmol/m². Kapacita pak závisí ze sterických důvodů na samotné délce řetězce. C4 kolona,

zabírající menší plochu povrchu nosiče, tak bude mít větší kapacitu než kolona C8 či C18 [77].

Kritériem, na jehož základě rozhodujeme o tom, zda je separace páru analytů (či enantiomerů v případě chirální separace) úplná (tzv. „baseline separace“) či ne, je hodnota rozlišení. Vzhledem k tomu, že v preparativním módu hrozí častěji riziko překročení kapacity kolony, může dojít k situaci, kdy jsou píky deformovány (tj. nemají tvar Gaussovské křivky) a může tak docházet k výraznému snížení rozlišení samotné separace. K tomuto jevu typicky dochází, pokud je koncentrace nastříkovaného analytu příliš vysoká. Na koloně pak dochází k úplnému vysycení aktivních míst stacionární fáze analytem, nadbytečný analyt nemůže se stacionární fází interagovat, a postupuje tedy systémem rychleji. Je proto velice důležité, aby daná kolona poskytla dostatečnou selektivitu pro separované analyty. Při dostatečné selektivitě nebude deformace píků ohrožovat separaci a následnou izolaci separovaných analytů [77, 80].

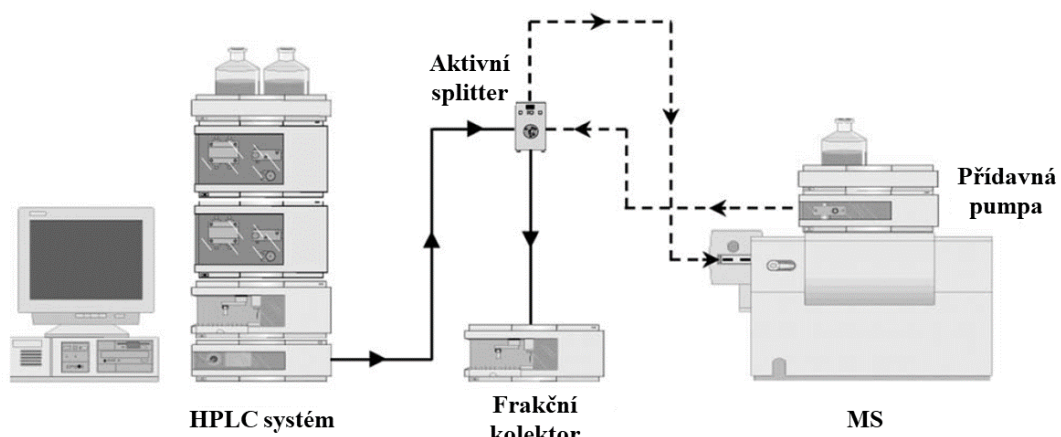
2.2.2. Instrumentace s ohledem na separační mód

Použitému separačnímu módu musí být přizpůsoben také výběr použité instrumentace. Zatímco pro analytický mód se typicky používají kolony s vnitřním průměrem v rozmezí 4,6 – 2,1 mm a velikostí částic 5 μm , pro mód preparativní se průměr kolon pohybuje v oblasti 50-200 mm a velikost částic je zpravidla 10 μm . Takto rozdílné rozměry kolon představují problém ve zpětném tlaku. Ten je totiž pro analytické kolony typicky i desetinásobně vyšší, než by byl u preparativních kolon při stejných průtocích. Při transferu metod na preparativní LC je tedy potřeba optimalizovat všechny parametry (např. zvýšit průtok mobilní fáze) tak, aby bylo dosaženo stejných separačních podmínek a separovaný analyt byl eluován ve stejném čase, jako tomu bylo v analytickém módu [81, 82, 83].

Dalším technickým rozdílem je způsob dávkování vzorku do systému. V případě analytické LC jsou dávkované objemy malé (v závislosti na systému se dávkovaný objem nejčastěji pohybuje v řádech stovek μl). Jako nejvhodnější se proto jeví autosampler, který se dnes také nejvíc využívá. Manuální injektor je dnes používán v analytickém LC spíše okrajově. Naproti tomu v preparativním LC jsou objemy velké. Pro nástřik se proto zpravidla používá právě manuální dávkování, případně peristaltická pumpa [81, 82, 83].

Analytický a preparativní mód se liší také v možnosti využívaných detektorů. Zatímco v analytickém módu lze využít jak destruktivní, tak nedestruktivní typy detektorů,

v případě preparativní chromatografie bývá použití destruktivních typů detektorů omezeno. Důvodem je primární využití preparativní chromatografie pro izolaci analytů, které by byly detektorem destruktivního typu znehodnoceny. Typicky používaným detektorem pro preparativní mód tak může být UV/Vis detektor. Jeho výhodou je fakt, že většina běžně používaných rozpouštědel v této oblasti spektra neabsorbují a neruší tak absorpci analytu. Další výhodou je možnost měření při všech vlnových délkách současně (v případě použití DAD detektoru (detektor diodového pole)), díky čemuž je možné získat kompletní UV/Vis spektrum sledovaného píku, potažmo analytu. Tento fakt lze využít při rozlišování a identifikaci daných látek. Pokud se jedná o známou látku, můžeme navíc dané spektrum porovnat se spektrem látky uloženým v knihovně spekter. Dalším využívaným detektorem v preparativním LC je refraktometrický detektor. Nevýhodou oproti UV detektoru je jeho nižší citlivost. Ta však může být zároveň výhodou, pokud jsou na kolonu dávkovány větší objemy vzorků. Druhým problémem je, že refraktometrický detektor je limitován pouze na isokratickou eluci. Důvodem je odvozování signálu ze změny v indexu lomu mobilní fáze obsahující analyt oproti čisté mobilní fázi. V případě použití gradientu by se měnil v průběhu analýzy i index lomu čisté mobilní fáze, což by komplikovalo vyhodnocení chromatogramu. Jak bylo řečeno, použití destruktivního detektoru v preparativním LC je velmi omezené. Jako destruktivní detektor lze použít hmotnostní spektrometr. Technika LC/MS totiž nabízí možnost automatického sběru frakcí na základě sledování profilu MS spektra eluátu. Lze tedy předejít problému, kdy například kvůli výkyvu retenčního času analytu nedojde ke sběru frakce ve správném čase. Problémem je však instrumentální řešení takového systému. Hmotnostní spektrometr z principu analyt nenávratně zničí a není tedy možný sběr frakcí. Druhým problémem je, že průtok mobilní fáze je pro ionizaci analytu příliš vysoký. Řešením je tedy po separaci vzorku na koloně přidat do systému dělič toku mobilní fáze na dvě cesty. Hlavní větev míří přímo na frakční kolektor. Před kolektor může být přidán navíc nedestruktivní typ detektoru (např. UV/Vis). Druhá větev toku mobilní fáze míří na hmotnostní spektrometr, kde je provedena příslušná identifikace. Samotný dělič toku mobilní fáze může být pasivní (průtok po oddělení je defaultně nastaven a nelze je měnit) nebo aktivní (tzv. splitter – dělení průtoku lze pomocí příslušného softwaru měnit a tím optimalizovat podmínky pro detekci na MS). Instrumentální řešení použití destruktivního typu detektoru pro preparativní kapalinovou chromatografii lze pozorovat na **Obr. 12** ^[77, 81, 84, 85].



Obrázek 12: Schéma instrumentálního řešení preparativního HPLC ve spojení s hmotnostním detektorem ^[85]

Jak již bylo řečeno, preparativní LC je často spojena s následným sběrem jednotlivých píků/frakcí. Ten je zpravidla realizován pomocí frakčního kolektoru, což je přídavný modul pro HPLC systém, který dokáže přepínat mezi výstupy do jednotlivých sběrných nádob. Přepínání mezi jednotlivými frakcemi může být realizováno na základě různých paramaterů, např. času (nastavení „sběrných oken“, které však vyžaduje robustní analýzu bez velkých výkyvů v retenčních časech), nebo na základě změny signálu v detektoru (způsobené přítomností analytu v detekční cele). Některá zařízení dnes navíc kombinují autosampler i frakční kolektor v jedné soustavě, a to jak v uspořádání s jednou jehlou a ventilem pro obojí (dávkování i frakcionaci), tak se samostatnou jehlou a ventilem pro odběr vzorku a pro sběr frakcí ^[77, 80].

Frakční kolektor dokáže přepínat mezi ventily na základě různých vstupů ze systému. První možností je manuální sběr. Ten funguje na základě manuálního přepínání ventilu operátorem stroje, a vyžaduje tak kontinuální přítomnost obsluhy. Dalším typem je sběr na základě času. Frakční kolektor je nastaven na přepnutí ventilu v určitém čase a po určitý časový interval poté sbírá mobilní fázi obsahující danou frakci do vyhrazené vialky. Po skončení intervalu se opět přepne do odpadu, případně může navázat sběrem další frakce. Třetím typem je již výše zmiňovaný sběr na základě změny signálu v detektoru. Pokud dojde ke zvýšení signálu nad určitou hodnotu, dojde k přepnutí ventilu do vialky. Pokud pak dojde k poklesu signálu pod určitou hodnotu, kolektor ventil přepne opět do odpadu.

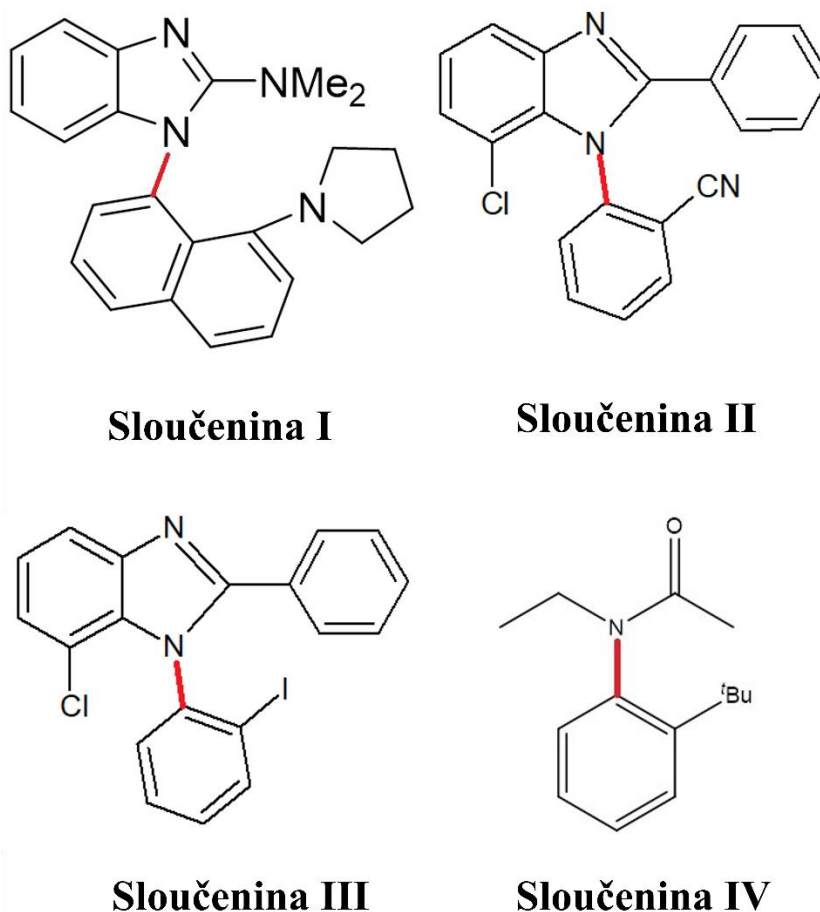
Druhou možností, jak zahájit sběr frakce na základě změny signálu je nastavit hodnotu směrnice sklonu píku. Pokud tak dojde k eluci píku požadovanou rychlostí (která se projeví náhlou změnou signálu), může být na základě určení mezní hodnoty změny směrnice zahájen sběr frakce. Pokud naopak dojde k poklesu hodnoty dané směrnice (analyt opustil systém a signál je opět na baseline), sběr frakce se ukončí. Software pak zpravidla umožňuje oba tyto typy kombinovat. Posledním typem je sběr frakcí na základě detekovaného poměru m/z (viz předchozí odstavec) ^[77, 80].

Frakční kolektory lze také rozdělit dle průtoku, které jsou schopny pojmout. Existuje tak *mikrofrakční kolektor*, s limitem průtoku mobilní fáze v oblasti kolem 100 $\mu\text{m}/\text{min}$. *Analytický frakční kolektor* je konstruován pro průtoky mobilní fáze až do 10 ml/min a *preparativní frakční kolektory* umí pojmout průtok až 100 ml/min ^[77]. Mikrofrakční kolektor byl použit například na screeningový záchyt látek extrahovaných z rostlin využívaných v čínské medicíně ^[86]. Zimba a kol. využili analytický frakční kolektor pro izolaci a identifikaci kyanobakterií *Toxifilum Mysidocida* ^[87]. Nicméně dominantní postavení v počtu publikací, ve kterých byl využit frakční kolektor, má (semi)preparativní typ ^[88-92].

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie

Ethanol (HPLC – gradient grade, HiPerSolv Chromanorm, Francie), acetonitril (HPLC – gradient grade, Chromasolv, Francie), methanol (HPLC – gradient grade, Chromasolv, Francie), 2-propanol (PENTA, Česká republika), 2-butanol (Reanal, Maďarsko), n-hexan (Sigma Aldrich, Germany), diethylamin (Sigma Aldrich, Germany), kyselina mravenčí (PENTA, Česká republika), sloučeniny axiálně chirálních derivátů benzimidazolů (sloučenina I – *N,N*-dimetyl-1-(8-(pyrrolidin-1-yl)naftalen-1-yl)-1H-benzimidazol-2-amin; sloučenina II – 1N-(2-nitrilo-fen-1-yl)-2-(fen-1-yl)-8-chlor-benzimidazol; sloučenina III – 1N-(2-jodo-fen-1-yl)-2-(fen-1-yl)-8-chlor-benzimidazol) a sloučenina axiálně chirálního derivátu acetamidu (sloučenina IV – *N,N*-ethyl-(2-tercbutyl)-fenyl-acetamid) dodané Katedrou organické chemie Univerzity Palackého (viz **Obr. 13**).



Obrázek 13: Struktury jednotlivých sloučenin s chirální vazbou vyznačenou červeně

3.2. Instrumentální vybavení

Chirální separace látek pracovně označených jako vzorky I-IV (systematické názvy viz 3.1.) byly provedeny na systému HPLC řady Smartline (Knauer, Berlín, Německo). Tento systém se skládá z modulů Smartline Pump 1000, Smartline Manager 5000, Smartline UV Detector 2600 a ASM 2.1L. Optická otáčivost separovaných látek byla sledována na detektoru optické otáčivosti Chiralyser-MP (IBZ Messtechnik GmbH, Springe, Německo). Pro termostatování kolony byl využit termostat Haake C1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Látky byly separovány pomocí polysacharidových kolon – analytických kolon (250 × 4,6 mm, $d_p=5 \mu\text{m}$) Lux Cellulose-1 (Phenomenex, Torrance, USA), Lux Cellulose-3 (Phenomenex, Torrance, USA) a Chiral Art Cellulose-SB (YMC, Kjóto, Japonsko); a semipreparativních kolon (250 × 10 mm, $d_p=5 \mu\text{m}$) Lux Cellulose-1 (Phenomenex, Torrance, USA) a Lux Cellulose-3 (Phenomenex, Torrance, USA). Pro vyhodnocení dat byl použit program Clarity (DataApex, Česká republika).

3.3. Příprava vzorků

Sloučeniny I-III byly dodány v krystalickém stavu. Sloučenina IV byla dodána jako olejovitá kapalina. Vzorky byly skladovány při $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Pro práci na HPLC byly všechny sloučeniny rozpuštěny v EtOH (ethanol). Ze sloučeniny I byl připraven roztok o koncentraci 12 mg/ml, ze sloučeniny II byl připraven roztok o koncentraci 11,4 mg/ml, ze sloučeniny III a sloučeniny IV byly připraveny roztoky o koncentraci 4 mg/ml. Před analýzou byly sloučeniny I-IV ředěny příslušným množstvím mobilní fáze pro dosažení výsledné koncentrace 100 mg/l (v případě analytického módu), respektive 4 mg/ml (sloučeniny I a II v semipreparativním módu); sloučenina III byla v semipreparativním módu separována bez dalšího ředění. Pro kontrolu optické čistoty sloučeniny I byl izolovaný (-) enantiomer analyzován po zředění zásobních roztoků na koncentraci 100 mg/l.

3.4. Dávkování vzorku na kolonu

Pro dávkování vzorku na kolonu byla použita metoda dávkování přeplněním smyčky. Pro analytickou separaci byla použita smyčka o objemu 20 μl . Pro separaci v semipreparativním módu byla použita smyčka o objemu 1000 μl .

3.5. Podmínky chromatografických analýz

Sloučenina I

Kolona	Mobilní fáze	Průtok	Teplota	Nástřik	Detekce
Analytická separace – optimalizace metody					
Lux Cellulose-3, 250 × 4,6 mm, d _p =5 μm	hexan:MeOH:EtOH 40:1:1 (v/v/v)	1 ml/min	25 °C	20 μl	UV, λ = 274 nm
Semipreparativní separace – izolace enantiomerů					
Lux Cellulose-3, 250 × 10 mm, d p=5 μm	hexan:MeOH:EtOH 40:1:1 (v/v/v)	5 ml/min	25 °C	1000 μl	UV, λ = 274 nm
Kontrola optické čistoty (-) enantiomeru					
Lux Cellulose-3, 250 × 4,6 mm, d _p =5 μm	hexan:MeOH:EtOH 10:1:1 (v/v/v)	1 ml/min	25 °C	20 μl	UV, λ = 274 nm
Analytická separace – sledování vlivu aditiv na separaci					
Lux Cellulose-3, 250 × 4,6 mm, d _p =5 μm	hexan:MeOH:EtOH 18:1:1 (v/v/v)	1 ml/min	25 °C	20 μl	UV, λ = 274 nm
Lux Cellulose-3, 250 × 4,6 mm, d _p =5 μm	hexan:MeOH:EtOH: DEA 18:1:1:0,05 (v/v/v/v)	1 ml/min	25 °C	20 μl	UV, λ = 274 nm
Lux Cellulose-3, 250 × 4,6 mm, d _p =5 μm	hexan:MeOH:EtOH:FA 18:1:1:0,2 (v/v/v/v)	1 ml/min	25 °C	20 μl	UV, λ = 274 nm
Analytická separace – sledování vlivu teploty na separaci					
Lux Cellulose-3, 250 × 4,6 mm, d _p =5 μm	hexan:MeOH:EtOH 18:1:1 (v/v/v)	1 ml/min	10 °C,	20 μl	UV, λ = 274 nm
Lux Cellulose-3, 250 × 4,6 mm, d _p =5 μm	hexan:MeOH:EtOH 18:1:1 (v/v/v)	1 ml/min	25 °C,	20 μl	UV, λ = 274 nm
Lux Cellulose-3, 250 × 4,6 mm, d _p =5 μm	hexan:MeOH:EtOH 18:1:1 (v/v/v)	1 ml/min	40 °C	20 μl	UV, λ = 274 nm

Tabulka III: Shrnutí podmínek chromatografických analýz provedených pro sloučeninu I

Sloučenina II

Kolona	Mobilní fáze	Průtok	Teplota	Nástřik	Detekce
Analytická separace – optimalizace metody					
Lux Cellulose-3, 250 × 4,6 mm, d _p =5 μm	hexan:EtOH 9:1 (v/v)	1 ml/min	25 °C	20 μl	UV, λ = 274 nm
Semipreparativní separace – izolace enantiomerů					
Lux Cellulose-3, 250 × 10 mm, d _p =5 μm	hexan:EtOH 9:1 (v/v)	5 ml/min	25 °C	1000 μl	UV, λ = 274 nm

Tabulka IV: Shrnutí podmínek chromatografických analýz provedených pro sloučeninu II

Sloučenina III

Kolona	Mobilní fáze	Průtok	Teplota	Nástřik	Detekce
Analytická separace – optimalizace metody					
Lux Cellulose-1, 250 × 4,6 mm, d _p =5 μm	hexan:MeOH:EtOH 40:1:1 (v/v/v)	1 ml/min	25 °C	20 μl	UV, λ = 274 nm
Semipreparativní separace – izolace enantiomerů					
Lux Cellulose-1, 250 × 10 mm, d _p =5 μm	hexan:MeOH:EtOH 40:1:1 (v/v/v)	5 ml/min	25 °C	1000 μl	UV, λ = 274 nm

Tabulka V: Shrnutí podmínek chromatografických analýz provedených pro sloučeninu III

Sloučenina IV

Kolona	Mobilní fáze	Průtok	Teplota	Nástřik	Detekce
Analytická separace – optimalizace metody					
Lux Cellulose-1, 250 × 4,6 mm, d _p =5 μm	hexan:2-PrOH 50:1 (v/v)	0,5 ml/min	25 °C	20 μl	UV, λ = 274 nm

Tabulka VI: Shrnutí podmínek chromatografických analýz provedených pro sloučeninu

3.6. 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 vybranou 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 této práce bylo najít vhodné podmínky pro separaci derivátů axiálně chirálních benzimidazolů a také pro separaci axiálně chirálního derivátu acetamidu s chirálními centry na vazbě C-N pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím chirálních stacionárních fází a kombinace vhodných rozpouštědel. Využita byla také aditiva, regulace teploty a průtoku mobilní fáze. Pro tento účel byly použity kolony Lux Cellulose-1, Lux Cellulose-3 a ChiralArt Cellulose-SB. Ve všech případech jde tedy o chirální kolony na bázi cellulosity lišící se způsobem uchycení stacionární fáze na nosič (silikagel) a samotným derivátem cellulosity. Porovnání jednotlivých kolon nabízí **Tab. VII**. Detekce separovaných enantiomerů byla provedena pomocí UV/Vis spektrometrického a polarimetrického detektoru. Pro získání kvalitativní informace byly použity oba detektory, pro informaci kvantitativní – sledování optické čistoty – byl použit pouze UV/Vis detektor.

Název kolony	Způsob uchycení k nosiči	Chirální selektor
Lux Cellulose-1	pokrytá stacionární fáze	cellulosa tris(3,5-dimethylfenylkarbamát)
Lux Cellulose-3	pokrytá stacionární fáze	cellulosa tris(4-methylbenzoát)
Chiral Art Cellulose-SB	imobilizovaná stacionární fáze	cellulosa tris(3,5-dimethylfenylkarbamát)

Tabulka VII: Srovnání jednotlivých kolon použitých pro separaci látek pomocí HPLC ^[93, 94]

Většina analýz byla realizována s využitím kolon Lux Cellulose-1 a Lux Cellulose-3. Kolona ChiralArt Cellulose-SB byla použita pouze v případě sloučeniny IV. Důvodem byl fakt, že se jedná o chemický ekvivalent kolony Lux Cellulose-1, přičemž byla pouze porovnána účinnost obou kolon vzhledem k analyzované sloučenině.

Při hledání vhodných podmínek byla použita rozpouštědla, která jsou kompatibilní s výše zmíněnými kolonami. Veškeré níže uvedené poměry složek mobilních fází jsou objemové (v/v). Součástí hledání vhodných podmínek pro semipreparativní separaci bylo sledování vlivu změny složek mobilní fáze na selektivitu separace, retenční časy jednotlivých enantiomerů a rozlišení. Součástí vybraných analýz bylo sledování optické otáčivosti pomocí polarimetrické detekce.

Veškeré tabulky k uvedeným grafům jsou uvedeny v příloze 1.

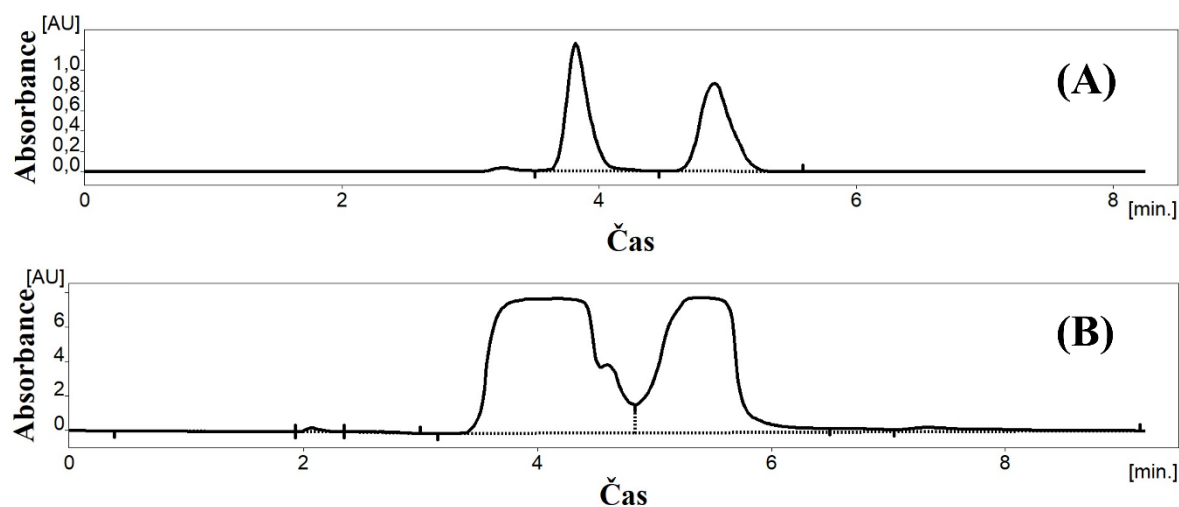
4.1. Chirální separace sloučeniny I

4.1.1. Analytická separace sloučeniny I

Sloučenina I je benzimidazol derivatizovaný dimethylaminem a pyrrolidinylnaftalenem. Axiálně chirální centrum pak vzniká na vazbě C-N mezi benzimidazolem a naftalenem (viz **Obr. 13**, str.29).

Sloučenina I byla testována nejprve na koloně Lux Cellulose-1. Byla vyzkoušena základní rozpouštědla v polárně organickém módu – methanol, ethanol a acetonitril. Při použití ani jednoho z těchto rozpouštědel v čisté formě k separaci enantiomerů sloučeniny I nedošlo.

Stejný postup byl proto opakován také na koloně Lux Cellulose-3. V tomto případě došlo k separaci na základní linii pomocí všech těchto mobilních fází. Nejlepší výsledky byly zaznamenány při použití methanolu. Hodnota rozlišení obou enantiomerů činila 2,74; první enantiomer eluoval v retenčním čase 3,82 min a druhý enantiomer v čase 4,90 min. Tyto podmínky však nebyly dostatečné pro dosažení úplné separace píků při transferu do semipreparativního rozměru, jak je patrné z **Obr. 14**.

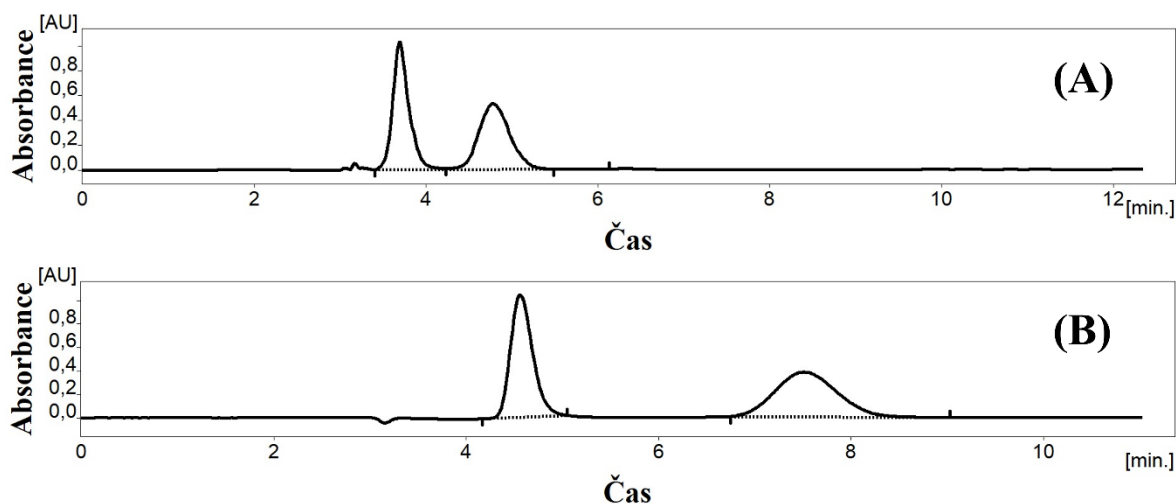


Obrázek 14: Srovnání analytické (A) a semipreparativní (B) separace sloučeniny I při použití MeOH jako mobilní fáze na koloně Lux Cellulose-3

Hledání vhodné mobilní fáze pro separaci sloučeniny I proto pokračovalo v analytickém módu. Pokud čistý alkohol nebo acetonitril nedostačuje svou selektivitou jako mobilní fáze sám o sobě, je často používanou strategií použití jeho směsi

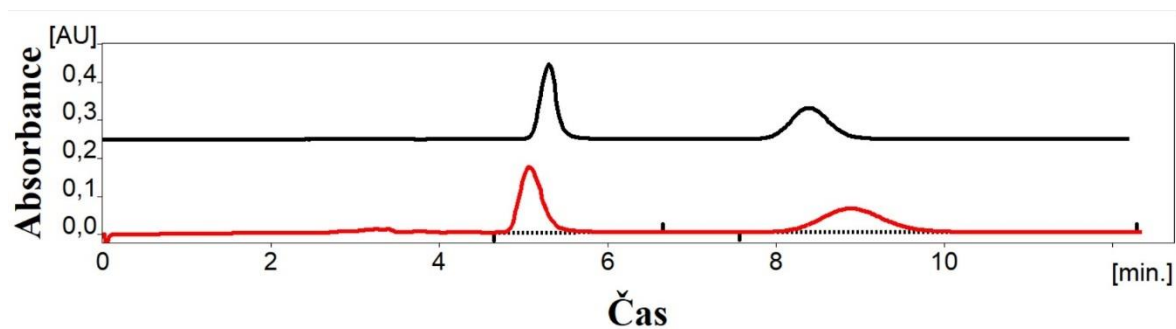
s rozpouštědlem, která samo o sobě nedisponuje výraznou selektivitou, ale zvyšuje retenci analytu v systému. Rozpouštědla, kterými lze dosáhnout takového „naředění“ alkoholu či acetonitrilu, může být jak polární (typicky voda), tak nepolární rozpouštědlo (typicky hexan nebo jiný alifatický alkan). Problémem vody může být její vyšší viskozita v porovnání s většinou organických rozpouštědel běžně používaných jako mobilní fáze. Jako vhodnější se proto jeví použití hexanu, který byl v této práci vždy pro úpravu retence testován přednostně. Problémem hexanu je však jeho nemísitelnost s methanolem, který pro naše sloučeniny vykazoval zpravidla vždy nejvyšší selektivitu.

Jako první řešení byla v tomto případě zvolena záměna methanolu za ethanol. Ethanol sice v prvotním screeningu vykazoval horší separační podmínky ($R = 2,11$) oproti methanolu, stále však naprosto dostačující pro samotnou analytickou separaci. Stejně jako v případě methanolu by ale takovéto podmínky pravděpodobně nevyhovovaly pro semipreparativní separaci. Nejprve byl vyzkoušen poměr ethanol:hexan 3:1. Při tomto poměru složek ke zlepšení separačních podmínek nedošlo. Stejná směs (tj. ethanol:hexan) byla vyzkoušena také v dalších poměrech, a to konkrétně 1:1, 1:3 a 1:9. Se zvyšujícím se obsahem hexanu ve směsi rostly (podle očekávání) retenční časy obou enantiomerů, a to z původních $t_{R1} = 3,67$ min a $t_{R2} = 4,77$ min pro čistý ethanol až na $t_{R1} = 5,07$ min a $t_{R2} = 8,88$ min pro směs ethanol:hexan 1:9. Rozlišení pro tuto mobilní fázi činí 3,97 a jeví se tedy jako dostatečné pro následný transfer metody do semipreparativního módu. Negativním důsledkem zvýšení retence enantiomerů z důvodu snížení selektivity mobilní fáze je rozmývání píku druhého enantiomeru, což ukazuje **Obr. 15.** v porovnání se separací sloučeniny I v ethanolu. Tento jev by mohl mít negativní dopad na eluovaný enantiomer v semipreparativním módu – ve větším množství by ze systému vystupoval značně naředěn mobilní fází, což není žádoucí z hlediska dalšího zpracování.



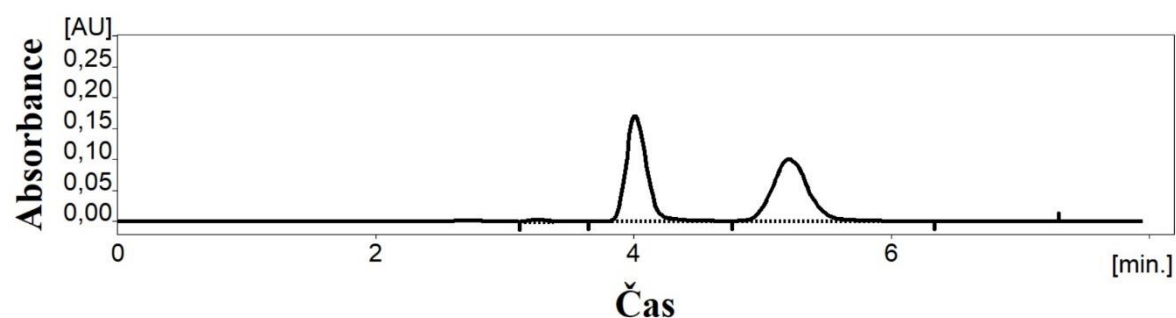
Obrázek 15: Separace sloučeniny 1 na koloně Lux Cellulose-3 v analytickém módu pomocí mobilní fáze EtOH (A) a EtOH:hexan 1:9 (B)

Vzhledem k rozmývání druhého píku byl další krok optimalizace metody věnován pokusu o vyřešení tohoto problému opětovným zvýšením účinnosti mobilní fáze při současném zachování retence analytů. Jako možné řešení se jeví navrácení methanolu do mobilní fáze. Problémem však je, jak již bylo výše zmíněno, jeho nemísitelnost s hexanem. Pokud je však ve směsi přítomen ethanol, lze hexan a methanol smíchat, aniž by vznikla emulze. Nejprve tak byla připravena mobilní fáze, ve které byl zachován poměr hexan:alkohol 9:1, ale zároveň byla polovina objemového množství ethanolu nahrazena methanolem. Výslednou směs je tak možné popsat jako hexan:methanol:ethanol 18:1:1. Takto připravená mobilní fáze sice zvýšila účinnost systému, takže nedošlo k rozmytí druhého enantiomeru, ale rovněž snížila retenci analytů. Poměry složek mobilní fáze byly proto postupně dále upravovány navyšováním obsahu hexanu ve směsi, a to až na poměr 40:1:1 ve prospěch hexanu. Směs 40:1:1 pak téměř odpovídala retenčními časy sledovaných enantiomerů parametrům separace ve směsi ethanol:hexan 1:9 s tím rozdílem, že nedocházelo tak k velkému rozmytí druhého píku. Tuto separaci ukazuje **Obr. 16**.

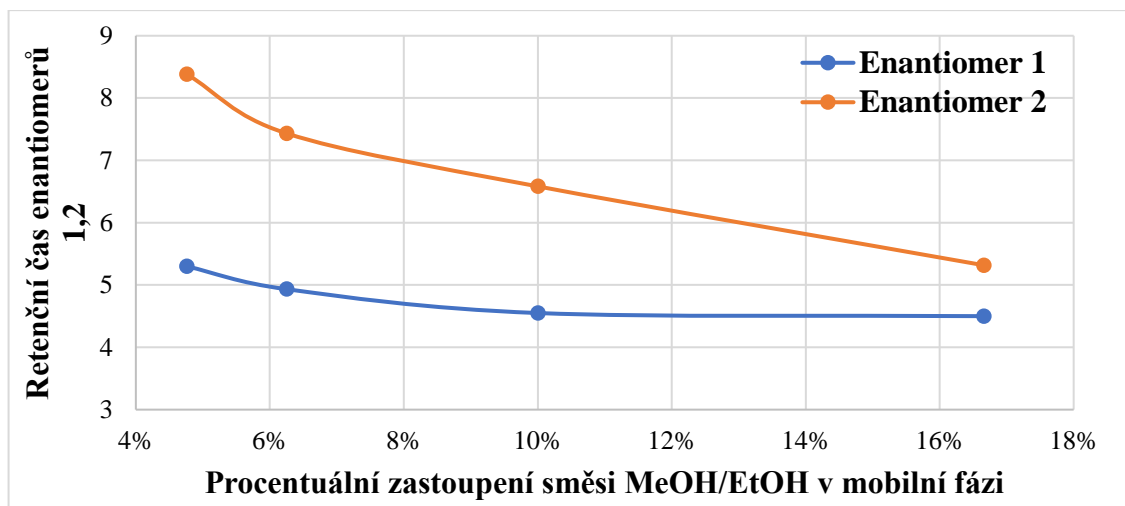


Obrázek 16: Porovnání separace enantiomerů vzorků I na koloně Lux Cellulose-3 v analytickém módu s použitím mobilní fáze o složení hexan:MeOH:EtOH 40:1:1 (černá) a hexan:EtOH 9:1 (červená)

Jako ideální podmínky pro separaci sloučeniny I s přihlédnutím k plánovanému transferu na semipreparativní kolonu se jeví separace na koloně Lux Cellulosa-3 s použitím mobilní fáze hexan:methanol:ethanol 40:1:1. Nicméně pro analytické účely by bylo možné použít mobilní fázi hexan:methanol:ethanol v poměru 10:1:1 (**Obr. 17**). Tato separace nebyla provedena v rámci optimalizace metody separace sloučeniny I na koloně Lux Cellulose-3, ale pouze jako metoda pro kontrolu optické čistoty sloučeniny (viz 4.1.3.). Na **Obr. 18** lze pozorovat závislost retenčních časů enantiomerů na koncentraci binární směsi alkoholů ethanol/methanol v m.f. Hodnoty k tomuto grafu shrnuje **Tab I** v příloze I. Parametry všech separací shrnuje **Tab. VIII**.



Obrázek 17: Separace enantiomerů vzorků I na koloně Lux Cellulose-3 v analytickém módu s použitím mobilní fáze o složení hexan:MeOH:EtOH 10:1:1



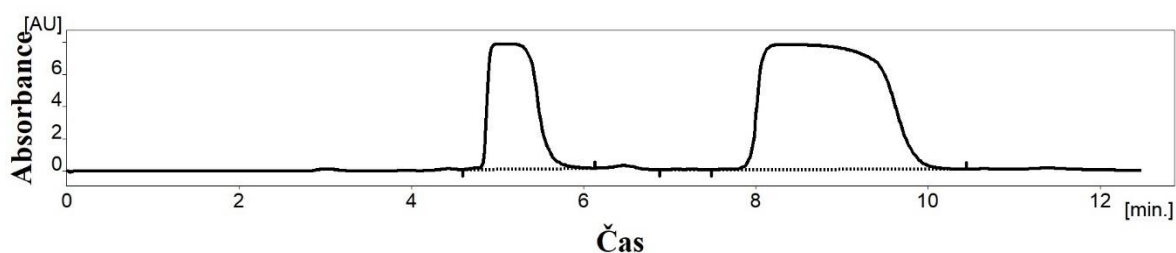
Obrázek 18: Vliv zvyšujícího se obsahu směsi MeOH/EtOH v mobilní fázi s hexanem na koloně Lux Cellulose-3 na retenci enantiomerů 1 a 2 sloučeniny I

Kolona	M.f.	tr ₁ [min]	tr ₂ [min]	R
Lux-Cellulose-1	MeOH	5,05	5,32	0,56
Lux-Cellulose-1	EtOH	4,25	4,78	1,30
Lux-Cellulose-1	ACN	5,13	5,48	0,62
Lux Cellulose-3	MeOH	3,82	4,90	2,74
Lux Cellulose-3	EtOH	3,70	4,78	2,13
Lux Cellulose-3	ACN	4,20	6,72	2,92
Lux Cellulose-3	EtOH:hexan 3:1	3,73	4,77	2,03
Lux Cellulose-3	EtOH:hexan 1:1	3,78	4,90	2,03
Lux Cellulose-3	EtOH:hexan 1:3	4,00	5,45	2,23
Lux Cellulose-3	EtOH:hexan 1:9	5,07	8,88	3,97
Lux Cellulose-3	Hexan:MeOH:EtOH 10:1:1	4,02	5,23	2,87
Lux Cellulose-3	Hexan:MeOH:EtOH 18:1:1	4,55	6,58	3,79
Lux Cellulose-3	Hexan:MeOH:EtOH 30:1:1	4,93	7,43	4,32
Lux Cellulose-3	hexan:MeOH:EtOH 40:1:1	5,30	3,83	5,08

Tabulka VIII: Shrnutí jednotlivých výsledků pro separace sloučeniny I na koloně Lux Cellulose-3 v analytickém módu s použitím příslušných mobilních fází; průtok: 1ml/min; m.f. – mobilní fáze, tr – retenční čas, R – rozlišení separace

4.1.2. Semipreparativní separace a izolace sloučeniny I

Vzhledem k požadavku na separaci a izolaci jednotlivých enantiomerů sloučeniny I byl po úspěšném vyvinutí metody separace této sloučeniny na analytické koloně proveden transfer separační metody do módu semipreparativního. To obnášelo kromě změny kolony také změnu koncentrace analytu, který byl dávkován na kolonu, a to z původních 100 mg/l na 4000 mg/l. Pro separaci byla použita semipreparativní kolona Lux Cellulose-3 a mobilní fáze hexan:methanol:ethanol 40:1:1 (**Obr. 19**). Při použití této mobilní fáze došlo k dostatečné separaci obou enantiomerů na to, aby jednotlivé frakce mohly být izolovány. Izolace proběhla pomocí frakčního kolektoru, který pro patřičné nastavení spínacích parametrů dokáže automaticky přepínat mezi jednotlivými ventily a za detektorem sbírat cílové frakce do různých sběrných míst. Pomocí tohoto systému bylo postupně separováno cca 110 mg sloučeniny, a bylo tak získáno 55 mg od každého z enantiomerů.



Obrázek 19: Separace sloučeniny I na koloně Lux Cellulose-3 v semipreparativním módu s použitím mobilní fáze hexan:MeOH:EtOH 40:1:1

Na chromatogramu lze pozorovat typický problém spojený se separacemi v semipreparativním módu, jímž je deformace píků. Důvodem je daleko vyšší množství vzorku na koloně oproti analytickém módu. Konkrétně v tomto případě jde o dvoutisícinásobné zvýšení hmotnosti analytu dávkovaného na kolonu. Kolona je tak přetížená a dochází k zaplnění aktivních míst na stacionární fázi. Z tohoto důvodu nemusí být enantiomery separovány dokonale, což má za následek deformovaný tvar píků.

4.1.3. Kontrola optické čistoty enantiomerů sloučeniny I

Po dokončení izolace byly na Katedře organické chemie provedeny studie teplotní stability sloučeniny I – rozpouštědlo (mobilní fáze) izolátů obou enantiomerů bylo odpařeno pomocí vakuové odparky a získané odparky čistých enantiomerů byly poté znovu rozpuštěny v ethanolu. Enantiomer 1 byl následně inkubován při teplotách 80, 120 a 160 °C, a to po dobu 0,5; 1; 2; 4; 6 a 8 hodin pro každou z těchto teplot. V dalším kroku proto bylo potřeba ověřit optickou čistotu (tj. enantiomerní přebytek jednoho enantiomeru vůči druhému) izolátu a vliv teploty na interkonverzi enantiomerů (tj. přechod enantiomeru (-) na enantiomer (+) sloučeniny I) v inkubovaných směsích.

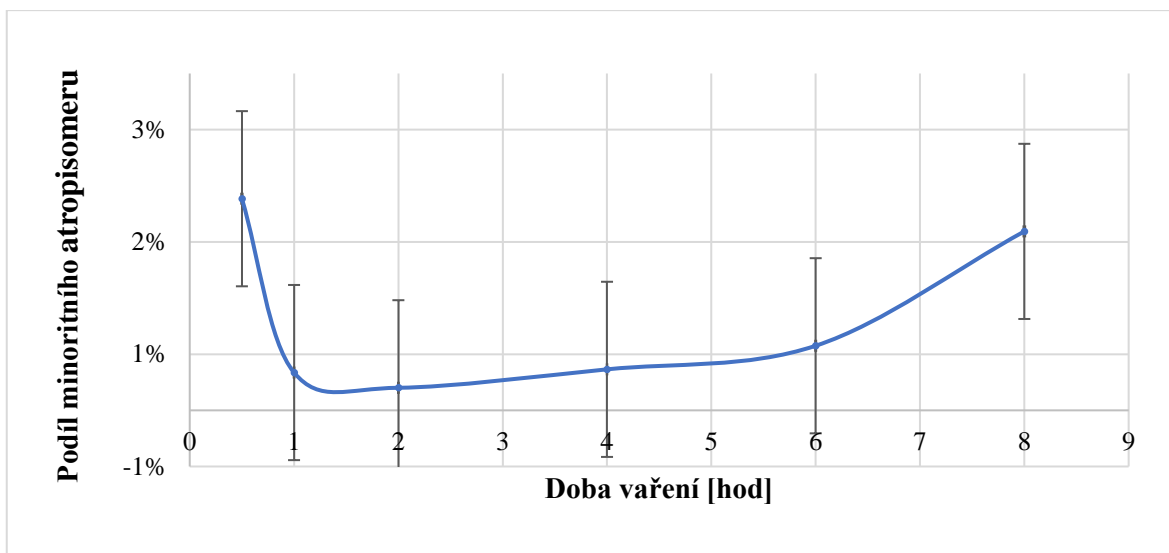
Kontrola optické čistoty byla prováděna na analytické koloně Lux Cellulose-3. Analýza za použití mobilní fáze hexan:methanol:ethanol 40:1:1 je pro daný účel zbytečně dlouhá. Poměr v mobilní fázi byl proto upraven na 10:1:1 ve prospěch hexanu, přičemž došlo ke změně retenčních časů obou enantiomerů. Druhý enantiomer, tak byl eluován již 1,3 minut po eluci prvního enantiomeru a celková doba analýzy se zkrátila z původních 7,5 min na 6,2 min.

Na kontrolu optické čistoty bylo dodáno celkově 18 vzorků (viz **Tab. IX**). Každý z těchto vzorků byl analyzován třikrát a byl určen podíl minoritního atropoisomeru oproti majoritnímu s příslušnou směrodatnou odchylkou a relativní směrodatnou odchylkou. Jednotlivé výsledky lze najít v souhrnné tabulce v příloze 1 v **Tab. II**.

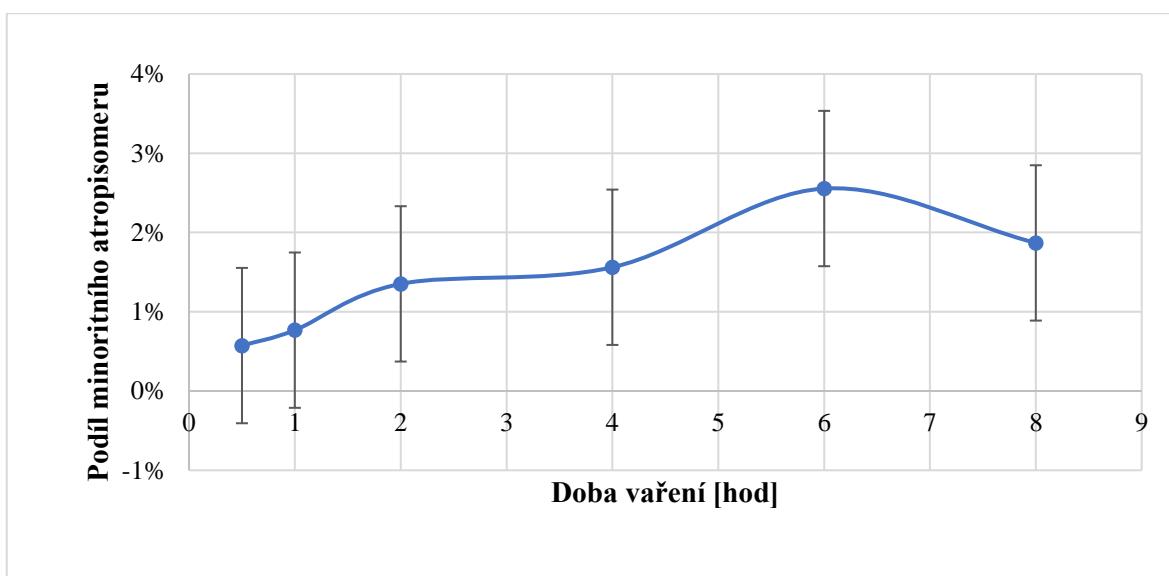
t [hod]	T [°C]		
	60	120	180
0,5	Vzorek 1-6	Vzorek 7-12	Vzorek 13-18
1			
2			
4			
6			
8			

Tabulka IX: Přehled podmínek inkubací pro dodané vzorky na kontrolu optické čistoty sloučeniny I

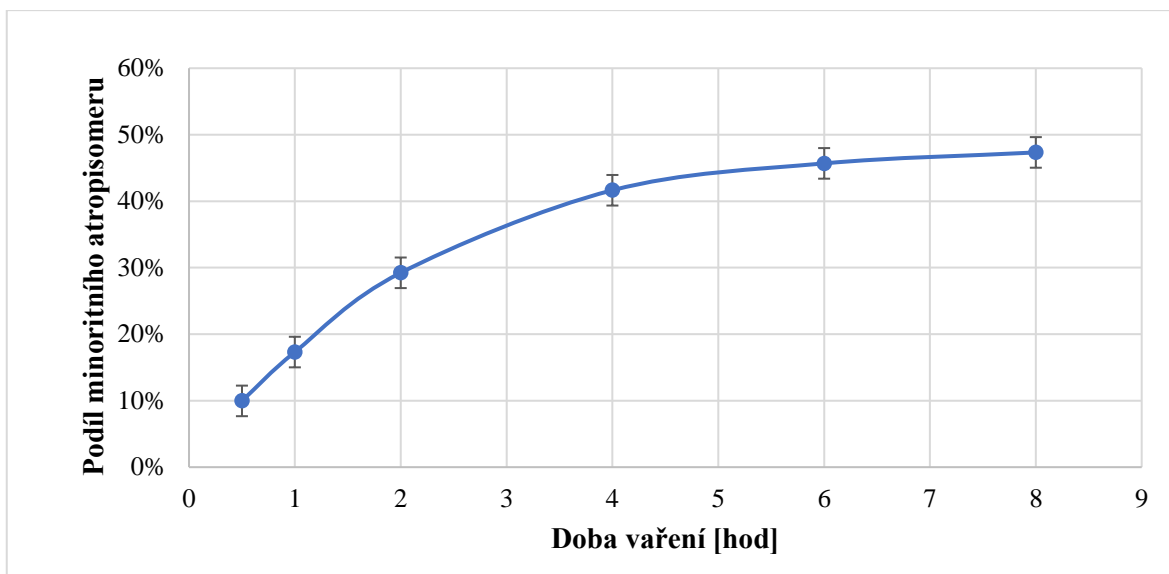
Grafickou závislost stability enantiomeru I (vyjádřenou jako obsah minoritního enantiomeru 2 ve směsi) na době inkubace při příslušné teplotě shrnují **Obr. 20–23**.



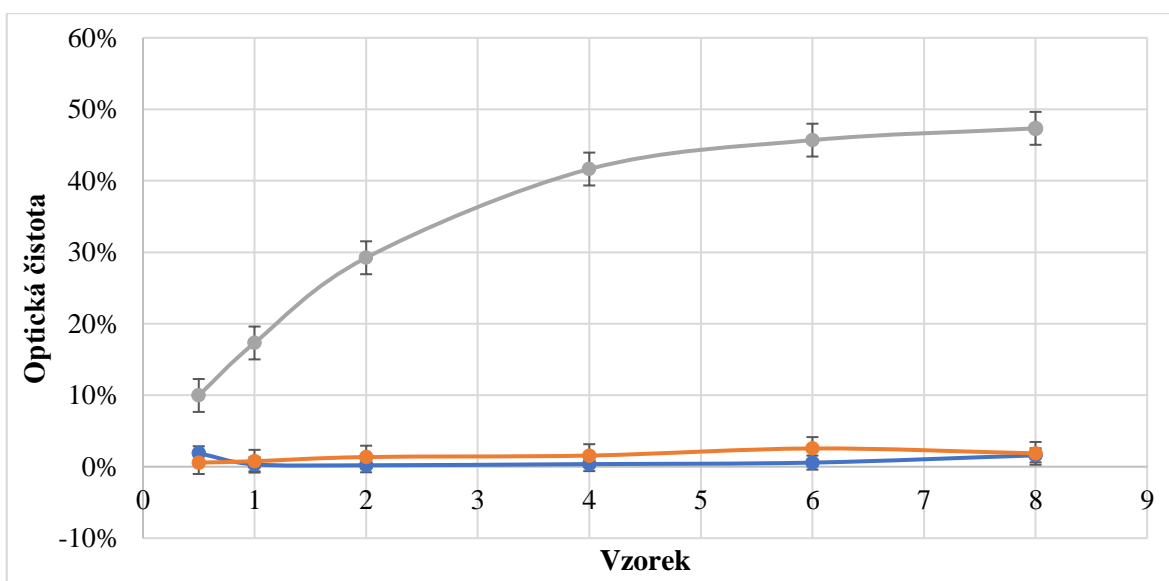
Obrázek 20: Závislost stability enantiomeru 1 na době inkubace při 80 °C



Obrázek 21: Závislost stability enantiomeru 1 na době inkubace při 120 °C



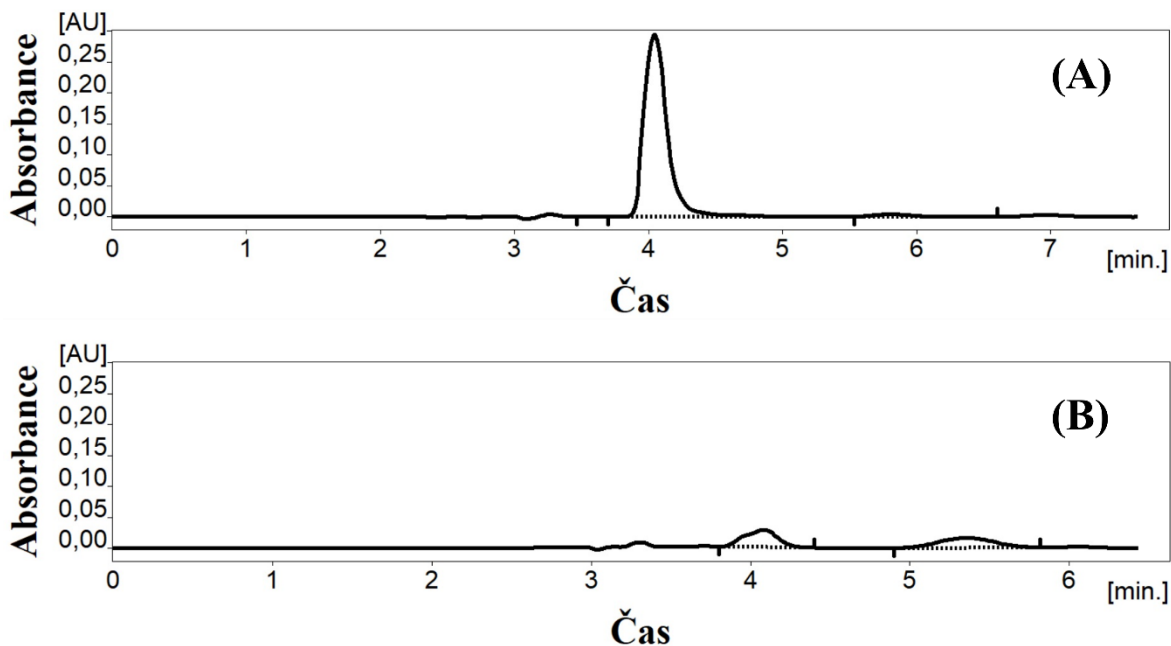
Obrázek 22: Závislost stability enantiomeru 1 na době inkubace při 160 °C



Obrázek 23: Souhrnný graf naměřených optických čistot pro jednotlivé vzorky

Z grafů je patrné, že enantiomer je stabilní při 80 °C a při 120 °C, přičemž nezávisí na době vaření. Teprve pokud byl vzorek povařen při 160 °C, začíná docházet k nárůstu podílu druhého atropoisomeru a to až téměř k 50 % – tedy do fáze, kdy se ze směsi stává opět směs racemická. Na **Obr. 24** lze pozorovat průběh separace vzorku, v němž se obsah

minoritního atropoisomeru pohybuje okolo 1 % (A) a separaci, při které množství minoritního atropoisomeru dosahuje 50 % (B).



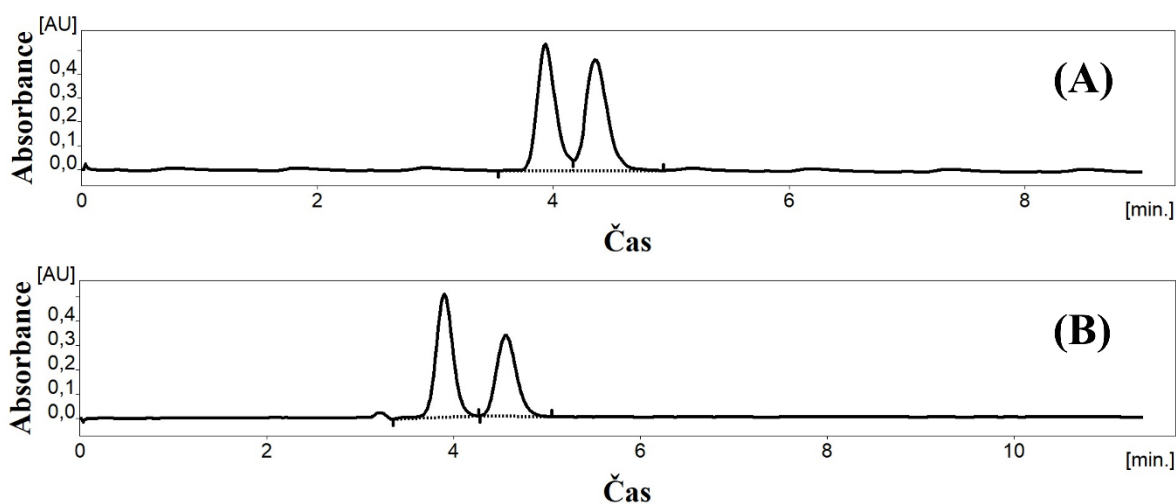
Obrázek 24: Separace sloučeniny I na koloně Lux Cellulose-3 v analytickém módu s použitím mobilní fáze hexan:MeOH:EtOH 10:1:1. (A) - obsah minoritního atropoisomeru činí zhruba 1 %, (B) - obsah sledovaného atropoisomeru činí zhruba 50%

4.2. Chirální separace sloučeniny II

4.2.1. Analytická separace sloučeniny II

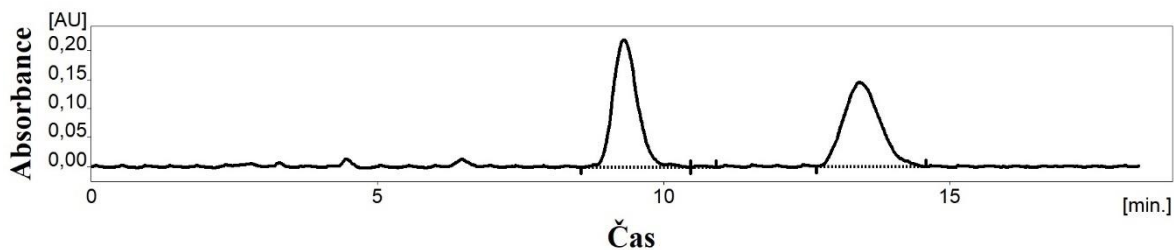
Sloučenina II je axiálně chirální benzimidazol derivatizovaný chlorem, fenylem a nitrilofenylem. Chirální vazba se nachází mezi uhlíkem a dusíkem (viz **Obr. 13**, str. 29)

Optimalizace metody pro separaci sloučeniny II byla nejprve vyzkoušena na analytické koloně Lux Cellulose-3. Jako první mobilní fáze byl testován methanol – sloučenina byla neúplně separována s rozlišením $R = 1,23$ (**Obr. 25A**). V dalším kroku byl proto testován čistý ethanol. Došlo k separaci enantiomerů s rozlišením $R = 1,70$ (**Obr. 25B**). Oba enantiomery však eluovaly v příliš blízkých časech a pro semipreparativní separaci by tak tyto podmínky nebyly použitelné.

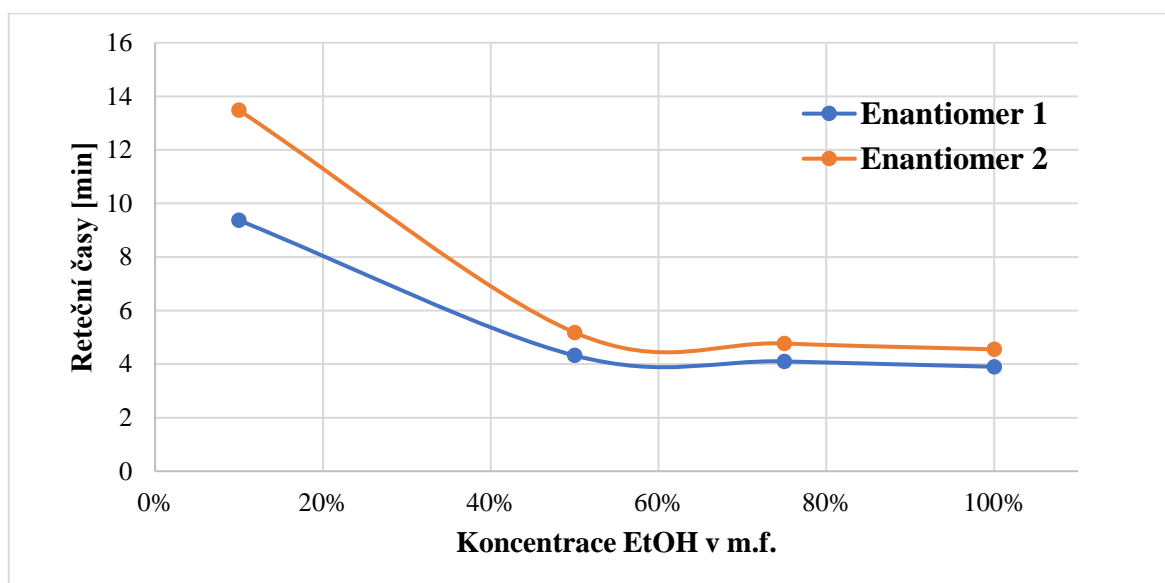


Obrázek 25: Separace sloučeniny II na koloně Lux Cellulose-3 v analytickém módu s použitím mobilní fáze MeOH (A) a EtOH (B)

V dalším kroku byla proto testována separace v normálním módu, přičemž k alkoholu (jako složce m.f. poskytující selektivitu) byl přidán hexan (zajišťující větší retenci analytů). Z důvodu lepší selektivity pro tuto separaci, kterou vykazoval ethanol, byla jako první připravena mobilní fáze ethanol:hexan a to v poměru 3:1. Došlo k separaci enantiomerů sloučeniny II s rozlišením $R = 1,69$, nicméně rozdíl v eluci druhého enantiomeru oproti prvnímu se nezměnil. Bylo proto pokračováno v navyšování obsahu hexanu v mobilní fázi – nejprve na poměr 1:1 (stále s nedostatečným rozdílem retenčních časů) a následně až na 1:9. Za těchto podmínek již došlo k separaci s rozlišením $R = 4,05$ a s dostatečným rozdílem v retenčních časech obou enantiomerů na to, aby došlo k separaci také na semipreparativní koloně. **Obr. 26** znázorňuje separaci enantiomerů při použití mobilní fáze o složení ethanol:hexan 1:9 a **Obr. 27** pak závislost snížení retenčních časů obou enantiomerů na rostoucí koncentraci ethanolu v mobilní fázi. Příslušné data k **Obr. 27** shrnuje **Tab. III** v příloze I.



Obrázek 26: Separace sloučeniny II na koloně Lux Cellulose-3 v analytickém módu s použitím mobilní fáze hexan:EtOH 9:1



Obrázek 27: Graf závislosti retenčních časů eluovaných enantiomerů sloučeniny II na koncentraci EtOH v mobilní fázi

Jako vhodné podmínky pro separaci vzhledem k transferu na semipreparativní kolonu se tedy jeví použití kolony Lux Cellulose-3 a mobilní fáze hexan:ethanol v poměru 9:1. Výsledky všech analýz provedených v rámci optimalizace metody jsou shrnuty v **Tab. X**.

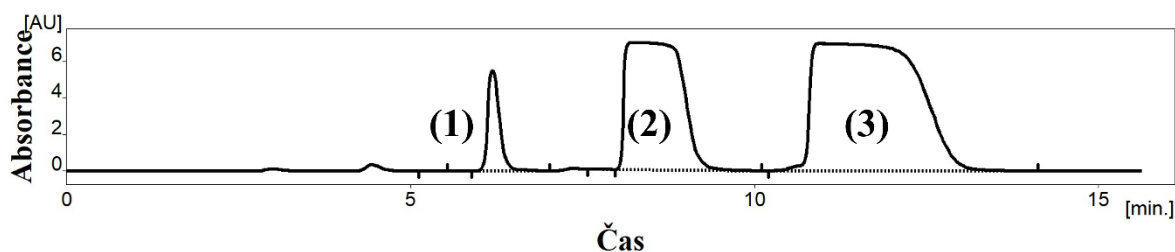
Kolona	M.f.	t _{R1} [min]	t _{R2} [min]	R
Lux Cellulose-3	MeOH	3,93	4,35	1,23
Lux Cellulose-3	EtOH	3,90	4,55	1,70
Lux Cellulose-3	EtOH:hexan 3:1	4,10	4,77	1,69
Lux Cellulose-3	EtOH:hexan 1:1	4,32	5,38	1,98
Lux Cellulose-3	EtOH:hexan 1:9	9,27	13,28	4,05

Tabulka X: Shrnutí podmínek jednotlivých analýz provedených v rámci optimalizace metody pro separaci součenniny II v analytickém módu; průtok: 1 ml/min; m.f. – mobilní fáze, t_R – retenční čas, R – rozlišení separace

4.2.2. Semipreparativní separace a izolace sloučeniny II

Pro účely semipreparativní separaci byla metoda transferována na semipreparativní kolonu Lux Cellulose-3. Analyt byl nejprve rozpuštěn v ethanolu na koncentraci 11,4 mg/ml a poté ředěn příslušnou mobilní fází na koncentraci 4 mg/ml. Takto připravený analyt byl poté separován v semipreparativním módu a jednotlivé frakce byly pomocí frakčního kolektoru sbírány do odběrných míst. Analýza byla provedena celkem 30× a bylo izolováno okolo 60 mg každého z enantiomerů.

Pro samotnou separaci byla použita mobilní fáze hexan:ethanol 9:1, která byla vyhodnocena jako optimální pro separaci sloučeniny II. Chromatogram této analýzy lze pozorovat na **Obr. 28**. Kromě eluovaných píků (2. a 3.) patřících izolovaným enantiomerům, lze pozorovat eluci nečistoty (1. pík). Ten přísluší vedlejšímu produktu syntézy sloučeniny II. I v tomto případě můžeme pozorovat negativní důsledek přetížení kolony – asymetrii píků. I v tomto případě je navýšení nastříkované hmotnosti vzorku oproti analytické koloně dvoutisícinásobné.



Obrázek 28: Separace sloučeniny II na koloně Lux Cellulose-3 v semipreparativním módu s použitím mobilní fáze hexan:EtOH 9:1

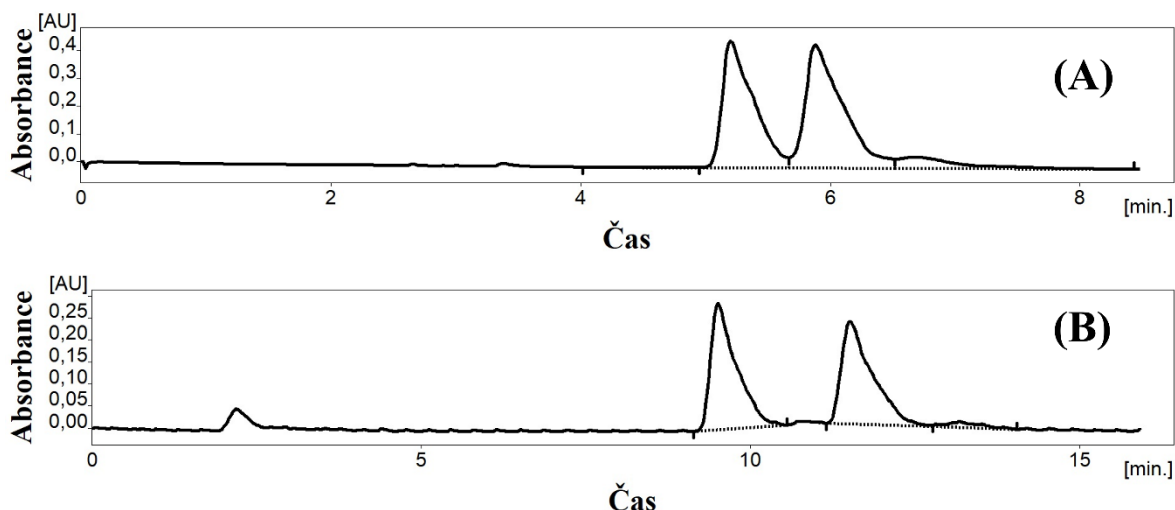
4.3. Chirální separace sloučeniny III

4.3.1. Analytická separace sloučeniny III

Tento axiálně chirální derivát benzimidazolu se od sloučeniny II liší pouze v přítomnosti substituce jodem na fenylu místo nitrilové skupiny (viz **Obr. 13**, str. 29). Tato skutečnost má však za následek významně nižší rozpustnost v ethanolu. Sloučeninu tak bylo možné rozpustit pouze na koncentraci 2 mg/ml. To je výrazně nižší koncentrace, než na kterou byly rozpouštěny předchozí dva analyty (cca 12 mg/ml). Pro analytickou separaci tento fakt nepředstavuje problém, v případě semipreparativního módu je však maximální koncentrace vzorku (navíc ve specifickém rozpouštědle) částečně limitující.

Separace sloučeniny III byla opět nejprve testována na koloně Lux Cellulose-3. Jako mobilní fáze byl použit čistý methanol a ethanol. Ani jeden z těchto alkoholů však neposkytl potřebnou selektivitu a nebyla proto pozorována žádná separace. Od testování dalších rozpouštědel bylo v danou chvíli upuštěno a namísto toho došlo k výměně kolony (a tedy i stacionární fáze) za kolonu Lux Cellulose-1. S využitím této kolony byla vyzkoušena homologická řada primárních alkoholů a acetonitril (opět formou čistých rozpouštědel). U všech těchto mobilních fází došlo k částečné separaci enantiomerů. Rozlišení však nikdy nepřesáhlo hodnotu $R = 1$. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití methanolu. Jak již bylo zmíněné při optimalizaci metody pro separaci sloučeniny I, methanol je s hexanem nemísitelný. Jako řešení se (stejně jako v předchozím případě) nabízela jeho částečná záměna za ethanol.

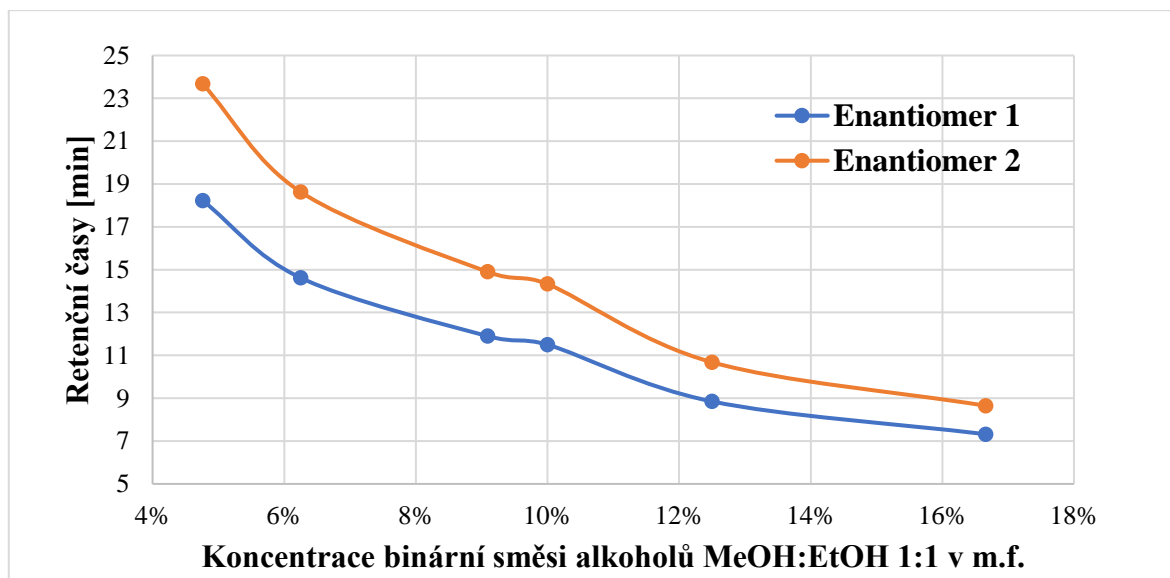
Pro testování této hypotézy byla připravena mobilní fáze v poměru ethanol:hexan 3:1, jejíž použití však vedlo opět pouze k částečné separaci. Navíc oproti čistému ethanolu nedocházelo téměř k žádnému zvýšení retence látek. V dalším kroku proto byl navýšen obsah hexanu v mobilní fázi a to na poměr ethanol:hexan 1:3. Za těchto podmínek došlo opět pouze k částečné separaci, nicméně hodnota rozlišení pro takovou separaci činí $R = 1,34$, což představuje zajímavé podmínky pro další vývoj metody. Problémem však může být trend chvostování píků (**Obr. 29A**), který se dále zvýrazňuje při použití mobilní fáze ethanol:hexan 1:9 ($R = 2,55$) s ještě větším podílem hexanu (**Obr. 29B**). Důvodem pro chvostování je nižší obsah alkoholu ve směsi. Jeho nižší obsah ve směsi společně s vyšším obsahem hexanu ve směsi sice způsobuje delší retenci, a tedy slibuje větší šanci na separaci, na stranu druhou však výrazně snižuje selektivitu separace. Možným problémem pak také může být transfer na semipreparativní mód, kde ani mobilní fáze s takto vysokým obsahem hexanu nemusí být dostatečná pro separaci a následnou izolaci enantiomerů.



Obrázek 29: Separace sloučeniny III na koloně Lux Cellulose-1 v analytickém módu s použitím mobilní fáze hexan:EtOH 3:1 (A) a hexan:EtOH 9:1 (B)

Z výše uvedených důvodů nebyl podíl hexanu v mobilní fázi dále navyšován. Na místo toho byla pozornost zaměřena na opětovné vylepšení selektivity separace. Jako řešení se nabízel přídavek methanolu do mobilní fáze. Byla proto připravena ekvivalentní směs pro mobilní fázi hexan:ethanol 9:1 (s částečnou náhradou ethanolu za methanol), tedy směs hexan:methanol:ethanol 18:1:1. Pro tuto mobilní fázi došlo k separaci enantiomerů sloučeniny III s rozlišením $R = 3,65$. Navíc vzrostly oproti mobilní fázi hexan:ethanol retenční časy enantiomerů z původních $t_{R1} = 9,50$ min a $t_{R2} = 11,52$ min na $t_{R1} = 11,50$ min, resp. $t_{R2} = 14,53$ min. Chvostování píků se však touto úpravou nepodařilo odstranit.

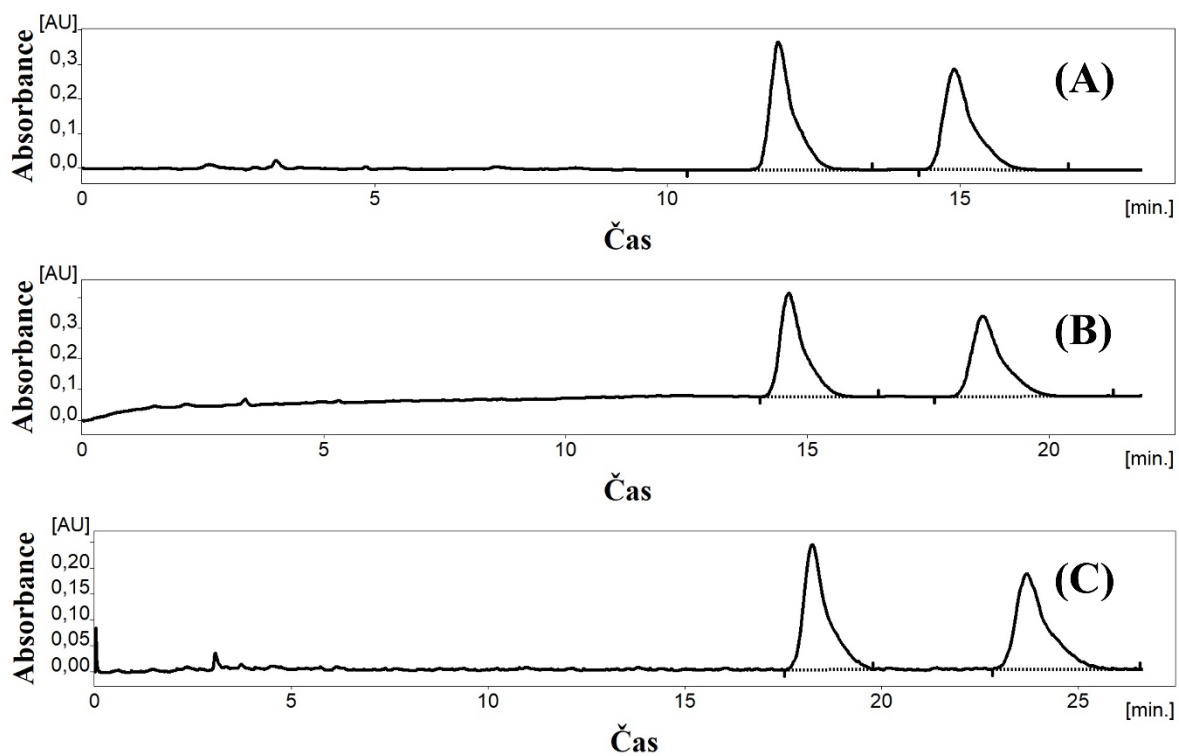
V dalších krocích byla provedena řada separací s mobilními fázemi o složení hexan:methanol:ethanol s měnícími se poměry hexanu a binární směsi alkoholů (poměr směsi zůstal 1:1). **Obr. 30.** popisuje závislost koncentrace binární směsi alkoholů methanol/ethanol na retenci analytu. Data k tomuto grafu shrnuje **Tab IV** v příloze I.



Obrázek 30: Závislost retenčních časů eluovaných enantiomerů na koncentraci binární směsi MeOH:EtOH 1:1 v m.f.

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že pro separaci v semipreparativním módu by mohla být dostačující již mobilní fáze o složení hexan:ethanol:methanol 20:1:1 a separaci by bylo možné provést také s využitím poměru 30:1:1, resp. 40:1:1. Záleží však také na tom jak bude vypadat separace při větším množství vzorku dávkovaném na kolonu. Z tohoto důvodu bylo nutné všechny tyto separace provést i v semipreparativním módu. Na **Obr. 31** lze pozorovat chromatogramy pro všechny tyto analýzy.

Shrnutí všech analýz provedených v rámci optimalizace metody pro separaci enantiomerů sloučeniny III lze najít v **Tab. XI**. Vzhledem k více použitelným metodám byly vhodné podmínky dále testovány na semipreparativní koloně.



Obrázek 31: Analytická separace sloučeniny III na koloně Lux Cellulose-1 s použitím mobilní fáze hexan:MeOH:EtOH a to v poměrech 20:1:1 (A), 30:1:1 (B) a 40:1:1 (C)

Kolona	M.f.	tr ₁ [min]	tr ₂ [min]	R
Lux Cellulose-3	MeOH	3,70	-	-
Lux Cellulose-3	EtOH	3,87	-	-
Lux Cellulose-3	EtOH:hexan 1:1	4,78	-	-
Lux Cellulose-1	MeOH	4,07	4,38	0,98
Lux Cellulose-1	EtOH	3,93	4,18	0,66
Lux Cellulose-1	2-PrOH	5,75	6,22	0,97
Lux Cellulose-1	ACN	3,57	3,80	0,79
Lux Cellulose-1	EtOH:hexan 3:1	3,75	3,93	0,56
Lux Cellulose-1	hexan:EtOH 3:1	5,20	5,88	1,33
Lux Cellulose-1	hexan:EtOH 9:1	9,50	11,52	2,55
Lux Cellulose-1	hexan:MeOH:EtOH 10:1:1	7,32	8,65	2,55
Lux Cellulose-1	hexan:MeOH:EtOH 14:1:1	8,83	10,63	2,55
Lux Cellulose-1	hexan:MeOH:EtOH 18:1:1	11,50	14,33	3,65
Lux Cellulose-1	hexan:MeOH:EtOH 20:1:1	11,90	14,90	4,01
Lux Cellulose-1	hexan:MeOH:EtOH 30:1:1	14,62	18,63	4,24
Lux Cellulose-1	hexan:MeOH:EtOH 40:1:1	18,23	23,68	4,76

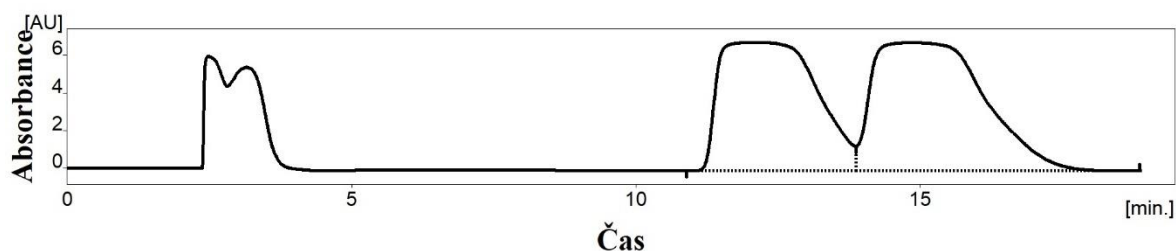
Tabulka XI: Shrnutí podmínek jednotlivých analýz provedených v rámci optimalizace metody separaci sloučeniny III v analytickém módu pro následný transfer do semipreparativního módu; průtok: 1 ml/min; m.f. – mobilní fáze, tr – retenční čas, R – rozlišení separace

4.3.2. Semipreparativní separace a izolace sloučeniny III

Jak již bylo dříve zmíněno, screeningové testy v analytickém módu poukázaly na problém s rozpustností této látky v ethanolu. Tento problém byl pro semipreparativní mód vyřešen přímým rozpuštěním krystalického vzorku v příslušné mobilní fázi, čemuž napomohl vysoký obsah nepolárního rozpouštědla v mobilní fázi. I v tomto případě tedy bylo možno separovat separován racemát o koncentraci 4 mg/ml.

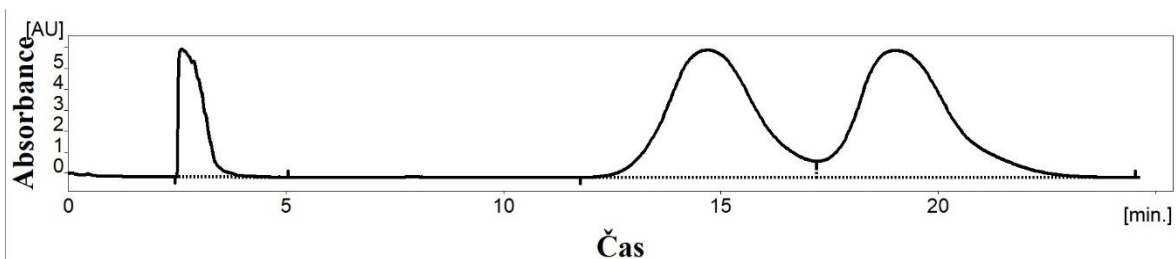
Z předchozích výsledků se jako použitelné pro transfer metody do semipreparativního módu jeví tři mobilní fáze ve složení hexan:methanol:ethanol a to v poměrech 20:1:1, resp. 30:1:1 a 40:1:1. Vzhledem k tomu, že čas analýzy je nejkratší pro variantu poměrů složek

20:1:1, byla vyzkoušena nejprve tato mobilní fáze. Jak lze pozorovat na **Obr. 32**, tato mobilní fáze není dostatečná pro úplnou chirální separaci této sloučeniny. Píky nejsou zcela odděleny a nebylo by možné provést izolaci enantiomerů ze 100 %. Kromě neúplně rozdělených píků obou enantiomerů lze na chromatogramu pozorovat další (částečně separovanou) dvojici píků. I v tomto případě se nejspíše jedná o vedlejší produkt syntézy. Zajímavostí je, že za těchto podmínek jsou píky nečistot částečně vzájemně separovány na rozdíl od následujících analýz.



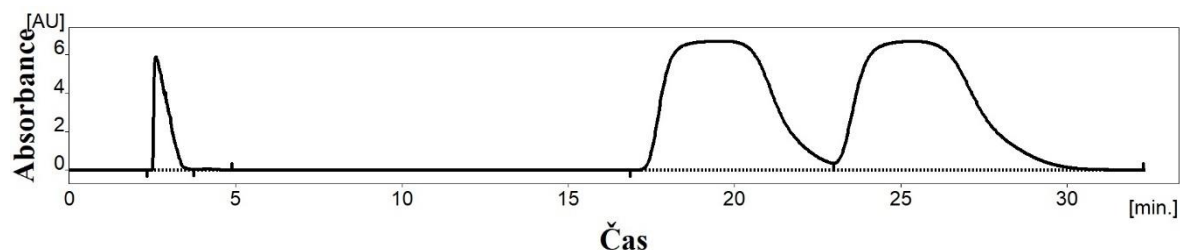
Obrázek 32: Separace sloučeniny III na koloně Lux Cellulose-1 v semipreparativním módu s použitím mobilní fáze hexan:MeOH:EtOH 20:1:1

V dalším kroku byla proto použita mobilní fáze o složení hexan:methanol:ethanol v poměru 30:1:1. Ani tato separace nebyla zcela úspěšná, nicméně díky větší retenci enantiomerů na koloně byla pozorována lepší separace sloučeniny III (ve smyslu relativního snížení „sedla“ mezi oběma píky, viz **Obr. 33**). Optimalizace však dále pokračovala testem poslední z trojice vytipovaných mobilních fází.



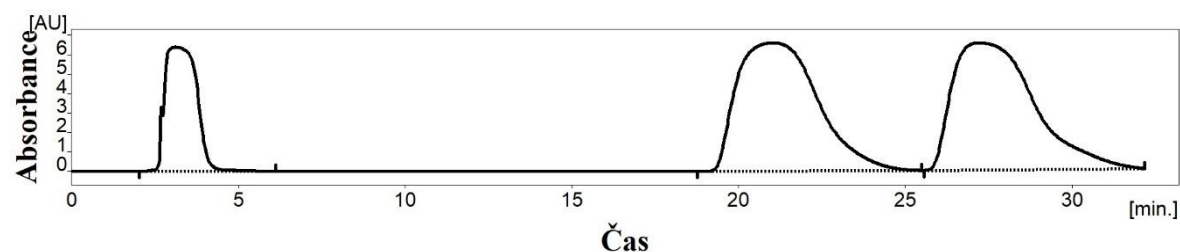
Obrázek 33: Separace sloučeniny III na koloně Lux Cellulose-1 v semipreparativním módu s použitím mobilní fáze hexan:MeOH:EtOH 30:1:1

Při použití mobilní fáze o poměru složek 40:1:1 (hexan:ethanol:methanol) dochází k dalšímu navýšení retence enantiomerů. Ačkoliv ani v tomto případě nedochází k „baseline“ separaci, lze vzhledem k množství látky a velikosti píků považovat tuto separaci a izolaci za proveditelnou bez větších ztrát (**Obr. 34**). V dalších krocích byla proto pro izolaci frakcí použita právě tato mobilní fáze.



Obrázek 34: Separace sloučeniny III na koloně Lux Cellulose-1 v semipreparativním módu s použitím mobilní fáze hexan:MeOH:EtOH 40:1:1

Vzhledem k velké spotřebě mobilní fáze byla použita část mobilní fáze elující v rozmezí, v němž neeluovaly ze systému žádné analyty, sbírána a recyklována. Problémem použití recyklované mobilní fáze je možný posun retenčních časů enantiomerů a celkové zhoršení kvality separace (např. pozorovaná podélná difúze píků), což by v případě této sloučeniny mohl být problém. Pro experimenty využívající recyklovanou mobilní fázi byla proto použita nižší koncentrace racemátu sloučeniny III (tj. 2 mg/ml) pro prevenci případné koeluce enantiomerů (**Obr. 35**). Postupně takto bylo provedeno 34 separací (zahrnujících použití jak čisté, tak recyklované mobilní fáze), během kterých bylo izolováno více než 30 mg od každého z enantiomerů.



Obrázek 35: Separace sloučeniny III (koncentrace 2 mg/ml) na koloně Lux Cellulose-1 v semipreparativním módu s použitím 1x recyklované mobilní fáze hexan:MeOH:EtOH 40:1:1

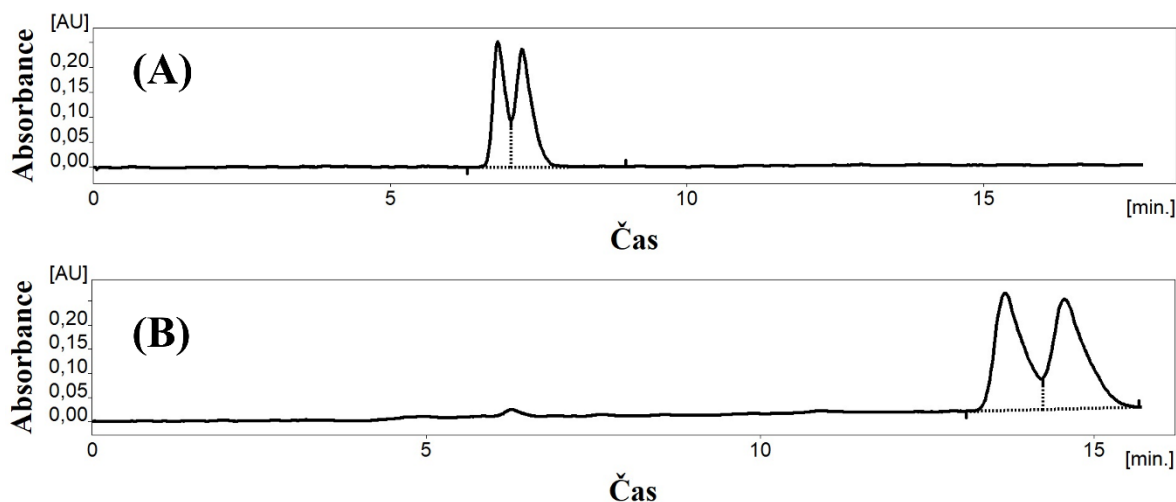
4.4. Chirální separace sloučeniny IV

4.4.1. Analytická separace sloučeniny IV

Sloučenina IV jako jediná ze sloučenin zkoumaných v rámci práce není derivátem benzimidazolu. Jedná se axiálně chirální derivát acetamidu s chirálním centrem na vazbě C-N (viz **Obr. 13**, str. 29). Sloučenina IV byla dodána jako olejovitá kapalina. Po účely screeningových analýz byla ředěna nejprve ethanolem a následně konkrétní mobilní fází.

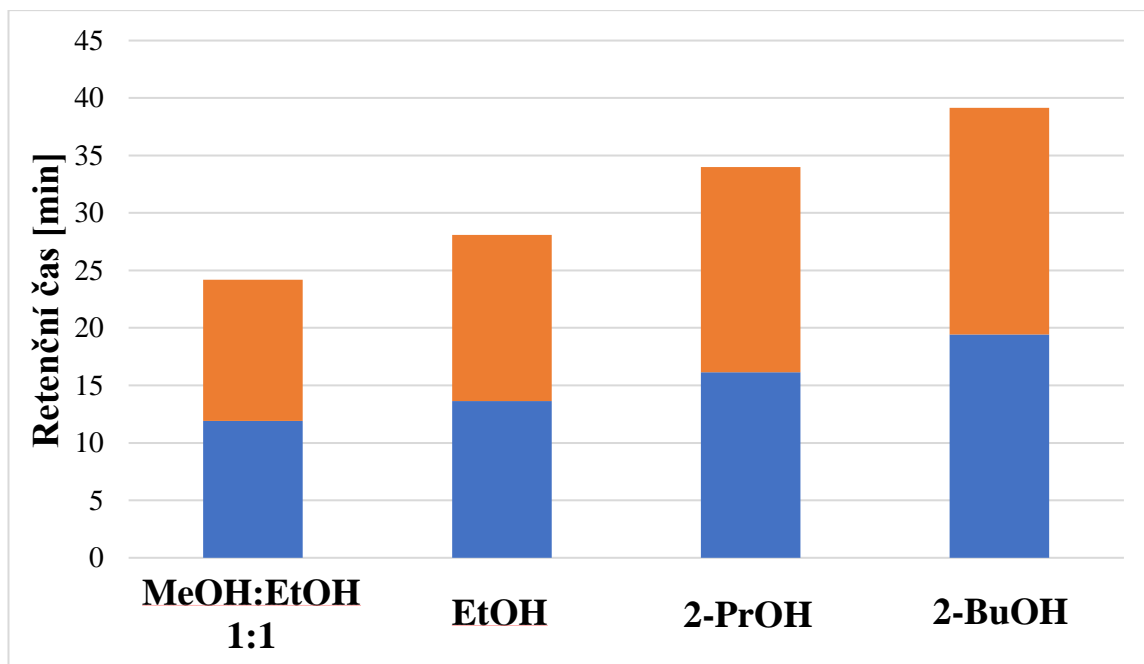
Na koloně Lux Cellulose-3 nebyla pozorována žádná selektivita separace v případě použití mobilních fází tvořené čistým methanolem, ethanolem ani 2-propanolem. Byly vyzkoušeny rovněž směsné mobilní fáze s obsahem hexanu >90 %, a to konkrétně ve směsi s ethanolem, resp. s ethanolem a methanolem, ale ani v těchto případech nebyla pozorována žádná chirální selektivita. V systému proto došlo k záměně kolony za kolonu Lux Cellulose-1.

Na této koloně byly nejprve provedeny testy v mobilní fázi tvořené čistým alkoholem – methanolem, ethanolem, resp. 2-propanolem. Žádná z těchto mobilních fází však neposkytla dostatečnou selektivitu. Jednotlivé alkoholy byly proto testovány ve směsích s hexanem. Vzhledem k nemísitelnosti hexanu s methanolem se jako další v homologické řadě alkoholů nabízí použít směs hexanu a ethanolu. Byly připraveny mobilní fáze hexan:ethanol, a to v poměrech 1:1 a 9:1. Nedošlo sice k separaci píků enantiomerů, ale bylo pozorováno malé narušení symetrie směsného píku racemátu a jeho lehké „naštípnutí“ – takováto kombinace má tedy jistý potenciál dosáhnout požadované selektivity separace. V dalším kroku proto byla připravena mobilní fáze s větším obsahem hexanu – hexan:ethanol 50:1. Pro tuto mobilní fázi sice nedochází k úplné („baseline“) separaci, ale píky jsou již částečně separovány. Cílem dalším kroku proto byl pokus o odstranění tohoto problému zvýšením retence analytu, a to snížením průtoku mobilní fáze z 1 ml/min na 0,5 ml/min. Opět byla pozorována částečná separace, přičemž rozlišení separace se zvýšilo z původního $R = 0,81$ na $R = 0,93$. Porovnání těchto separací ukazuje **Obr. 36**.



Obrázek 36: Separace sloučeniny IV, kolona: Lux Cellulose-1 v analytickém módu, m.f. hexan:EtOH 50:1, průtok 1ml/min (A), průtok: 0,5 ml/min (B)

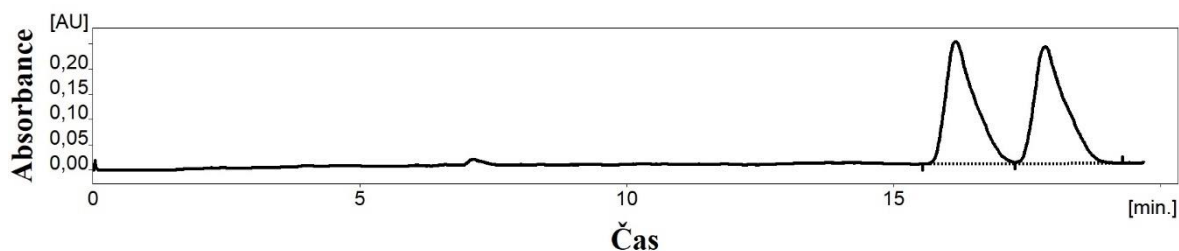
V dalším kroku byla vyzkoušena záměna ethanolu ve výše uvedené směsi za 2-propanol, resp. za směs methanol/ethanol 1:1. Přitom byl dodržen poměr hexanu a alkoholu (či jejich směsi) v mobilní fázi 50:1 a průtok mobilní fáze byl také ponechán na hodnotě 0,5 ml/min. Pro mobilní fázi hexan:2-propanol byla pozorována separace s rozlišením $R = 1,59$ a retenčními časy $t_{R1} = 16,15$ min a $t_{R2} = 17,83$ min. Naopak methanol nejeví dostatečnou selektivitu a analyty eluují společně. Dále byla vyzkoušena záměna 2-propanolu za 2-butanol, nicméně ani tento alkohol neposkytuje dostatečnou selektivitu – přestože dochází k navýšení retenčních časů enantiomerů, separace sloučeniny IV ani v tomto případě není úplná. Porovnání vlivu přidavku jednotlivých alkoholů do mobilní fáze na retenci enantiomerů je uvedeno v grafu na **Obr. 37** (závislost retence na počtu uhlíků v alkoholu). Data pro tento graf shrnuje **Tab V** v příloze I.



Obrázek 37: Závislost retenčních časů enantiomerů na typu alkoholu, enantiomer 1 – modrá, enantiomer 2 - oranžová

Posledním krokem, který byl vyzkoušen pro optimalizaci metody separace enantiomerů sloučeniny IV, byl test eluce dříve použitou mobilní fází o složení hexan:2-propanol v poměru 50:1 při průtoku 0,5 ml/min, avšak s využitím kolonového termostatu a chlazení kolony na teplotu 10 °C. Došlo k navýšení retenčních časů enantiomerů na $t_{R1} = 16,73$ min a $t_{R2} = 18,25$ min. Rozlišení této separace bylo ale nižší ($R = 1,21$) oproti separaci za laboratorní teploty.

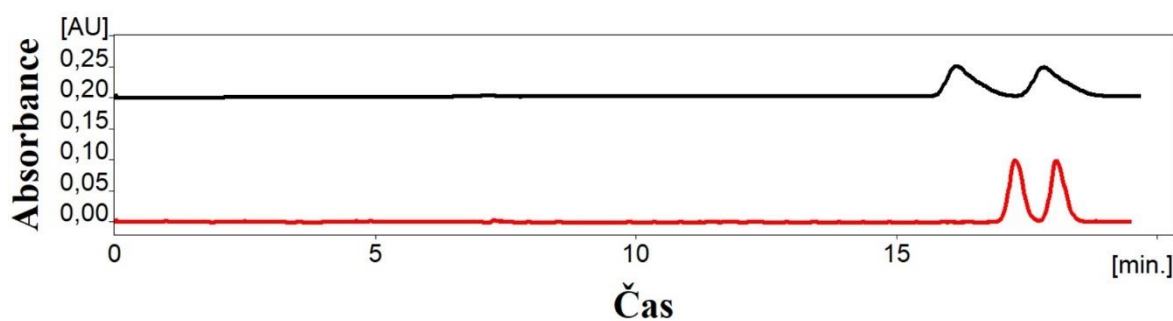
Problémem separací sloučeniny IV je účinnost systému. Jak lze pozorovat na **Obr. 38**, píky nejsou zcela symetrické, protože dochází k jejich chvostování. Tento problém je bohužel pravděpodobně způsoben degradací stacionární fáze na koloně. Jako řešení se tedy nabízí použití nové stacionární fáze.



Obrázek 38: Separace sloučeniny IV na koloně Lux Cellulose-1 v analytickém módu s použitím mobilní fáze hexan:2-PrOH 50:1; průtok: 0,5 ml/min

Vzhledem k tomu, že na pracovišti byla na testování k dispozici kolona Chiral Art Cellulose-SB (obsahující totožnou stacionární fázi jako kolony Lux Cellulose-1) byla vyzkoušena separace sloučeniny IV na této koloně. Je sice možné počítat s jistými odlišnostmi, neboť Cellulose-SB má stacionární fázi kovalentně navázanou na sorbent (tzn. jde o imobilizovanou stacionární fázi), zatímco v případě kolony Lux Cellulose-1 je derivát pouze nanesen na nosič. (tzv. pokrývaná kolona), nicméně selektivita obou kolon by měla být velmi podobná. Rozdíly mezi těmito typy polysacharidových kolon a jejich výhody a nevýhody byly diskutovány v kapitole 2.1.3.1.1.

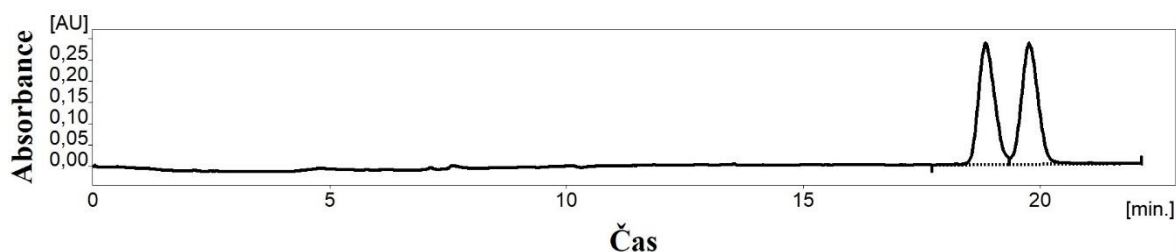
Separace enantiomerů sloučeniny IV byla testována za stejných podmínek jako na koloně Lux Cellulose-1 s použitím mobilní fáze hexan:2-propanol 50:1 při průtoku 0,5 ml/min. Rozlišení páru enantiomerních píků dosáhlo za těchto podmínek hodnoty $R = 1,46$ a retenční časy hodnot $t_{R1} = 17,28$ min a $t_{R2} = 18,07$ min. Rozlišení separace se tedy sice zhoršilo, ale došlo k velkému zvýšení účinnosti píků. Tento fakt poukazuje na horší stav (pravděpodobně způsobený stářím a opotřebením) původní (pokrývané) kolony Lux Cellulose-1. Důvodem pro snížení rozlišení i přes zvýšení účinnosti systému je fakt, že píky díky menšímu rozmývání eluují v kratším časovém intervalu (viz **Obr. 39**).



Obrázek 39: Separace sloučeniny IV na koloně Chiral Art Cellulose-SB (červená) a na koloně Lux Cellulose-1 (černá) v analytickém módu s použitím mobilní fáze hexan:2-PrOH (2-propanol) 50:1; průtok: 0,5 ml/min

V následných krocích byly zkoumány další varianty mobilních fází na koloně Chiral Art Cellulose-SB za účelem snahy o dosažení separace obou enantiomerů s rozlišením $R \geq 1,5$. Nejprve byla připravena mobilní fáze o větším obsahu hexanu, a to v poměru 60:1. Použití této mobilní fáze sice prodloužilo retenci píků, zároveň však došlo ke snížení rozlišení separace. Rozlišení za těchto podmínek je $R = 1,38$.

Vzhledem k tomu, že zvýšení obsahu hexanu ve směsi k lepšímu rozlišení separace nevedlo, byla testována záměna alkoholu použitím dalšího z alkoholů v homologické řadě, tím je butanol. Stejně jako v případě separace sloučeniny IV na koloně Lux Cellulose-1 byl použit 2-butanol, přičemž byla připravena mobilní fáze o složení hexan:2-butanol v poměru 50:1. Při použití této mobilní fáze došlo ke zvýšení eluce, ale také ke snížení rozlišení píků. Rozlišení této separace pak činilo $R = 1,38$ (viz **Obr. 40**). Ani v tomto případě tedy nedošlo ke zlepšení separačních podmínek.



Obrázek 40: Separace sloučeniny IV na koloně Chiral Art Cellulose-SB v analytickém módu s použitím mobilní fáze 2-BuOH (2-butanol) 50:1; průtok: 0,5 ml/min

V dalším kroku bylo proto vyzkoušeno zvýšení selektivity mobilní fáze opět použitím jiného alkoholu. Vhodným kandidátem by v takovém to případě mohl být doposud nevyzkoušený methanol, vzhledem k jeho nemísitelnosti s hexanem bylo však potřeba opět připravit směsnou mobilní fázi s obsahem ethanolu či jiného alkoholu (např. 2-propanol), který zajistí promíchání obou nemísitelných složek m.f. Byla proto připravena mobilní fáze o složení hexan:methanol:2-propanol v poměru 100:1:1 – tedy mobilní fáze o stejném poměru hexan:alkohol jako v analýze s mobilní fází hexan:2-propanol 50:1, ale s jiným složením „alkoholové části“. Při této analýze došlo ke snížení eluce píků a tím také k celkovému snížení rozlišení separace, a to dokonce na hodnotu $R = 1,01$.

V dalším kroku byl testován vliv záměny methanolu za acetonitril. Negativem tohoto rozpouštědla je opět jeho nemísitelnost s hexanem. V tomto případě však nepostačí použít 2-propanol jako emulgátor ve stejném množství jako u methanolu. Byla proto připravena mobilní fáze o složení hexan:2-propanol:acetonitril v poměru 150:2:1. Tato mobilní fáze však nevykazovala žádnou selektivitu a za těchto podmínek k separaci enantiomerů nedošlo.

Jako nejlepší podmínky pro separaci se dle vypočteného rozlišení jeví separace na koloně Lux Cellulose-1 s použitím mobilní fáze hexan:2-propanol 50:1 při průtoku 0,5 ml/min. Z vizuálního hlediska se však jeví jako vhodnější separace na koloně Chiral Art Cellulose-SB (píky jsou symetričtější, nefrontují a nerozmývají se). Výpočet rozlišení separace provedený softwarem Clarity ale nedosahuje hodnoty $R \geq 1,5$. Všechny provedené analýzy pro optimalizaci podmínek separace enantiomerů sloučeniny IV jsou shrnuty v **Tab. XII**.

Kolona	Průtok m.f.	M.f.	tr1 [min]	tr2 [min]	R
Lux Cellulose-3	1 ml/min	MeOH	3,37	-	-
Lux Cellulose-3	1 ml/min	EtOH	3,38	-	-
Lux Cellulose-3	1 ml/min	2-PrOH	4,55	-	-
Lux Cellulose-3	1 ml/min	hexan:EtOH 3:1	3,57	-	-
Lux Cellulose-3	1 ml/min	hexan:EtOH 20:1	4,42	-	-
Lux Cellulose-3	1 ml/min	hexan:MeOH:EtOH 40:1:1	4,38	-	-
Lux Cellulose-1	1 ml/min	MeOH	3,72	-	-
Lux Cellulose-1	1 ml/min	EtOH	3,65	-	-
Lux Cellulose-1	1 ml/min	2-PrOH	4,02	-	-
Lux Cellulose-1	1 ml/min	Hexan:EtOH 1:1	3,42	-	-
Lux Cellulose-1	1 ml/min	Hexan:EtOH 9:1	4,15	-	-
Lux Cellulose-1	1 ml/min	hexan:EtOH 50:1	6,82	7,22	0,81
Lux Cellulose-1	0,5ml/min	hexan:EtOH 50:1	13,63	14,47	0,92
Lux Cellulose-1	0,5ml/min	hexan:2-PrOH 50:1	16,15	17,83	1,59
Lux Cellulose-1	0,5ml/min	hexan:2-BuOH 50:1	19,42	19,72	0,34
Lux Cellulose-1	0,5 ml/min	hexan:MeOH:EtOH 100:1:1	11,92	12,28	0,285
Lux Cellulose-1	0,5ml/min	hexan:2-PrOH 50:1 – 10 °C	16,73	18,25	1,21
Cellulose-SB	0,5ml/min	hexan:2-PrOH 50:1	17,28	18,07	1,46
Cellulose-SB	0,5ml/min	hexan:2-PrOH 60:1	18,37	19,28	1,38
Cellulose-SB	0,5ml/min	hexan:2-PrOH:MeOH 100:1:1	15,87	16,27	1,01
Cellulose-SB	0,5ml/min	hexan:2-PrOH:ACN 150:2:1	15,33	x	x
Cellulose-SB	0,5ml/min	hexan:2-BuOH 50:1	18,85	19,77	1,38

Tabulka XII: Shrnutí podmínek jednotlivých analýz provedených v rámci optimalizace metody pro separaci sloučeniny IV v analytickém módu; m.f. – mobilní fáze, tr – retenční čas, R – rozlišení separace

4.5. Sledování vlivu aditiv v mobilní fázi na separaci sloučeniny I

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, pro úpravu tvarů píků se často používá přídavek aditiva v podobě kyseliny či báze mobilní fáze. Ačkoliv se všechny předložené vzorky podařilo odseparovat bez přídavku aditiva, tvary píků při použití finálních metod nebyly vždy optimální. V rámci této práce byla proto provedena také studie vlivu přídavku aditiv na průběh analýzy, a to s využitím sloučeniny I (vykazující asymetrii píků) jako modelového analytu. Z hlediska struktury by tato sloučenina měla jevit spíše bazický charakter. Předpokladem tedy je, že význam bude mít pouze použití bazického aditiva, zatímco aditivum kyselé povahy separaci neovlivní nebo ji dokonce zhorší. Přidání aditiv je vhodné zejména v analytickém módu. Přítomnost aditiva v semipreparativním módu by totiž mohla být problémem při odpařování izolovaných frakcí – aditivum by nemuselo být dostatečně těkavé a nedošlo by tedy k jeho odpaření.

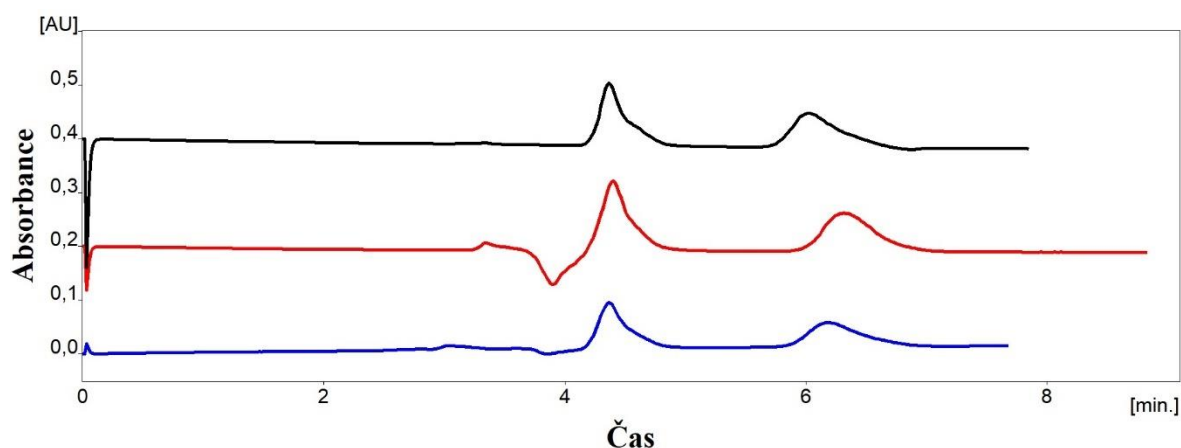
4.5.1. Diethylamin

Cirilli a kol. ^[95] využili pro separaci derivátů benzimidazolů přídavek diethylaminu (DEA) do mobilní fáze. Z důvodu většího rozdílu v retenci enantiomerů I zde byla využita mobilní fáze hexan:methanol:ethanol v poměru 18:1:1 a nikoliv v poměru 10:1:1. Důvodem je, že by případný posun retenčních časů mohl znamenat, že by nedošlo k separaci až na základní linii a vliv aditiva by byl hůř pozorovatelný. Do výše zmíněné mobilní fáze byl tedy přidán diethylamin, a to tak, aby jeho koncentrace v mobilní fázi byla rovna 0,5 %. Složení výsledné mobilní fáze tak lze popsat jako hexan:methanol:ethanol:diethylamin v poměru 18:1:1:0,1. Následně byly porovnány parametry analýzy racemátu sloučeniny I za dříve optimalizovaných podmínek s parametry analýzy vzorku racemátu v nově připravené mobilní fázi. Byl také sledován vliv ředění vzorku mobilní fázi s obsahem aditiva a bez obsahu aditiva na separaci. Pracovně byl analyt ředěný mobilní fázi bez aditiva označen jako vzorek IA a analyt ředěný mobilní fázi s aditivem označen jako vzorek IB.

V případě použití mobilní fáze s 0,5 % DEA však nedošlo k vylepšení tvaru píků. Píky sledovaných enantiomerů eluovaly ve stejném retenčním čase jako při použití původní mobilní fáze nicméně základní linie nebyla v případě vzorku IA ustálená. Ustálenost základní linie se vylepšila při nástřiku vzorku IB. Nicméně ani v tomto případě se separace oproti mobilní fázi bez aditiva nevylepšila – rozlišení separace bylo $R = 2,25$. V dalším kroku byla snížena koncentrace aditiva na polovinu a byla připravena mobilní fáze o

složení hexan:methanol:ethanol:diethylamin 18:1:1:0,05. Opět byl proveden nástřik vzorku IA i IB. V případě separace vzorku IA došlo ke zlepšení tvaru druhého píku nicméně výsledné rozlišení separace se nevylepšílo. V případě vzorku IB se základní linie ustálila a také rozlišení separace se oproti mobilní fázi hexan:methanol:ethanol:diethylamin 18:1:1:0,1 vylepšilo a to na hodnotu $R = 2,70$. Ani v tomto případě však výsledné rozlišení separace nebylo větší než tomu bylo v případě mobilní fáze neobsahující aditivum ($R = 3,78$).

Diethylamin tedy nemá v případě tohoto derivátu benzimidazolu pozitivní vliv na jeho separaci ani tvar píků. Porovnání chromatogramů separací sloučeniny I v mobilní fázi s aditivem a bez aditiva nabízí **Obr. 41**.



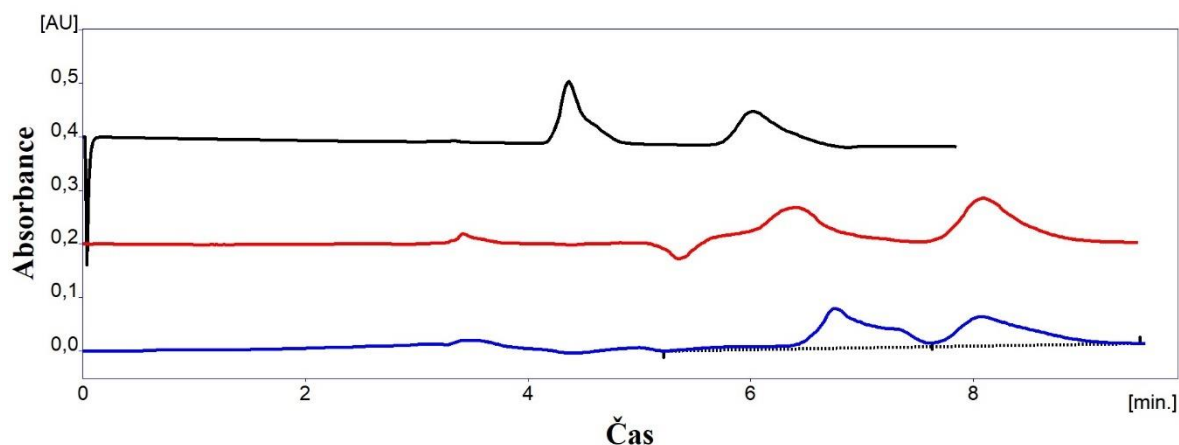
Obrázek 41: Separace sloučeniny I na koloně Lux Cellulose-3 v analytickém módu s použitím mobilní fáze: hexan:MeOH:EtOH 18:1:1 (černá); hexan:MeOH:EtOH:DEA 18:1:1:1 (červená) – vzorek IA; hexan:MeOH:EtOH:DEA 18:1:1:1 (modrá) – vzorek IB

4.5.2. Kyselina mravenčí

Zatímco diethylamin je zástupcem aditiv využívaných pro separace bazických analytů, pro kyselý analyty jsou jako aditiva využívány například karboxylové kyseliny. Paitkowska a kol. ^[96] separovali deriváty benzimidazolu v mobilních fázích obsahujících přísadky kyseliny mravenčí. V rámci separace tak byla sledována rovněž separace enantiomerů sloučeniny I v dříve optimalizované mobilní fázi, do níž byla přidána kyselina mravenčí, a to tak, aby byla dosažena její výsledná koncentrace 0,1 %. I

v tomto případě byl použit vzorek rozpuštěný v původní mobilní fázi (IA) a vzorek rozpuštěný v mobilní fázi obsahující aditivum FA (kyselina mravenčí) – IC.

Byla připravena mobilní fáze hexan:methanol:ethanol:kyselina mravenčí 18:1:1:0,02 a také v tomto případě byl sledován vliv na separaci a tvar píků vzorků (zde IA a IC). V obou případech došlo ke zvýšení retenčního času obou enantiomerů a ke zhoršení tvaru píků, základní linie nebyla ustálená a také rozlišení separace bylo výrazně horší oproti analýze v mobilní fázi bez aditiva: $R = 1,11$, resp. $1,44$ pro vzorek IA, resp IC. Porovnání těchto separací se separací bez aditiva lze pozorovat na **Obr. 42**. Experimentálně tak bylo potvrzeno, že povaha směsi použité pro ředění vzorku před analýzou má vliv na tvar základní linie a tvar píků (a obecně je vhodnější vzorek vždy ředit přímou použitou mobilní fází). Vzhledem k tomu, že sloučenina I je bazického charakteru, bylo předpokládáno, že mobilní fáze obsahující acidické aditivum bude vykazovat horší separační podmínky oproti mobilní fázi bez aditiva, což bylo také experimentálně potvrzeno.



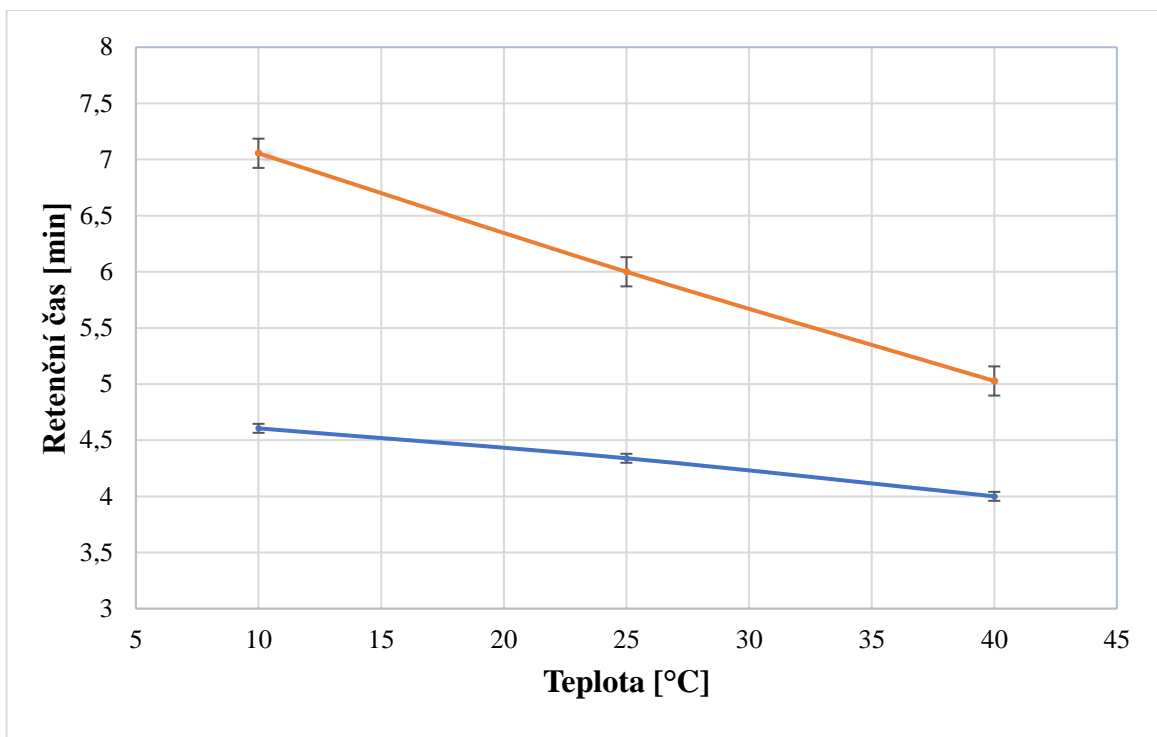
Obrázek 42: Separace sloučeniny I na koloně Lux Cellulose-3 v analytickém módu s použitím mobilní fáze hexan:MeOH:EtOH 18:1:1 (černá); hexan:MeOH:EtOH:FA 18:1:1:1 (červená) – vzorek IA; hexan:MeOH:EtOH:FA 18:1:1:1 (modrá) – vzorek IC

4.6. Sledování vlivu změny teploty mobilní fáze na separaci sloučeniny I

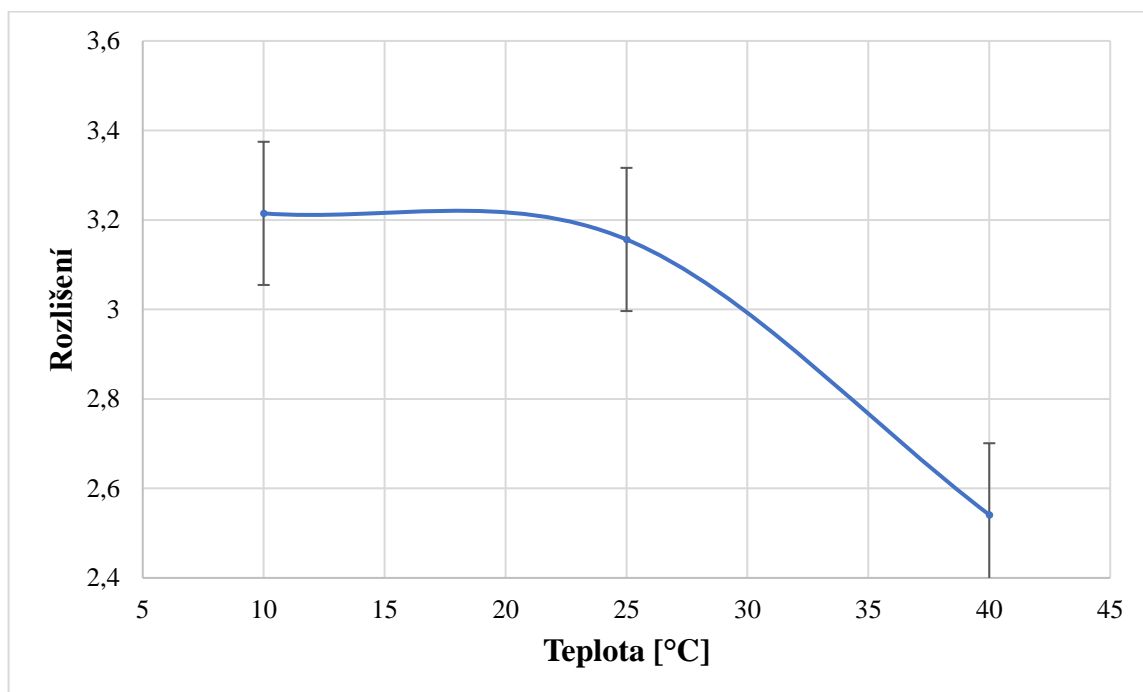
Jak již bylo diskutováno v teoretické části, na separaci analytů v HPLC může mít vliv také teplota – z praktického hlediska se změna teploty kolony provádí s využitím termostatu. Li a kol. ^[97] separovali enantiomery bitertanolu na koloně Lux Celllose-1 a to při teplotách v rozmezí 15–35 °C. Z výsledků vyplývá, že se zvyšující se teplotou klesá retence analytů na koloně. V rámci předkládané práce byl studován vliv změny teploty na separaci enantiomerů sloučeniny I, přičemž zvolené hodnoty teplot byly inspirovány touto publikací. Byla tedy porovnána separace sloučeniny I na koloně Lux Cellulose-3 v mobilní fázi hexan:methanol:ethanol 18:1:1, a to při teplotách 10 °C, 25 °C a 40 °C. Byl sledován vliv změny teploty na retenční časy enantiomerů, rozlišení samotné separace a vliv teploty na tvar píků. Důvodem pro použití poměru 18:1:1 namísto stejné mobilní fáze v poměru 10:1:1 je i v tomto případě větší rozdíl v eluci enantiomerů, a tedy zamezení případné koeluci píků při vyšší teplotě.

Volba teploty kolony při enantioseparacích je do jisté míry omezena možnou interkonverzí atropoisomerů. Druhé omezení pak souvisí s použitým systémem, a to jak se stabilitou samotné kolony (tzn. rozsahem jejich provozních teplot) a pak také s teplotou varu rozpouštědel použitých v mobilní fázi (je nutné zajistit, aby byla mobilní fáze při analýze v kapalném stavu).

Nejprve byla kolona termostatována na teplotu 10 °C. Byla provedena analýza sloučeniny I při této teplotě, a to ve třech opakováních. První enantiomer eluoval v čase $4,61 \pm 0,04$ min a druhý enantiomer v čase $7,05 \pm 0,13$ min. Rozlišení této separace bylo $R = 3,21 \pm 0,07$. Další analýzy byly provedeny při teplotě 25 °C – tedy při teplotě laboratorní. Bylo dosaženo separace sloučeniny I s retenčními časy $4,34 \pm 0,03$ min a $6,00 \pm 0,04$ min. Rozlišení této separace činí $R = 3,15 \pm 0,16$. Poslední testovanou teplotou bylo 40 °C. Při této teplotě dochází k separaci s retenčními časy jednotlivých enantiomerů $4,00 \pm 0,02$ min a $5,03 \pm 0,03$ min. Rozlišení separace pro tuto teplotu je $2,54 \pm 0,09$. Lze tedy pozorovat podobný trend jako v publikacích ^[97, 98, 99], kdy s rostoucí teplotou v termostatu dochází k lineárnímu poklesu retenčních časů obou enantiomerů. Rozlišení separace se s rostoucí teplotou snižuje, neboť vlivem teploty enantiomery nejsou tak dlouho zadržovány na koloně a elují v kratším čase a tím i v menším časovém intervalu. Na **Obr. 43** lze pozorovat závislost retenčních časů na teplotě a na **Obr. 44** lze pozorovat závislost rozlišení separace na teplotě. Data k těmto grafům shrnuje **Tab VI** v příloze I.

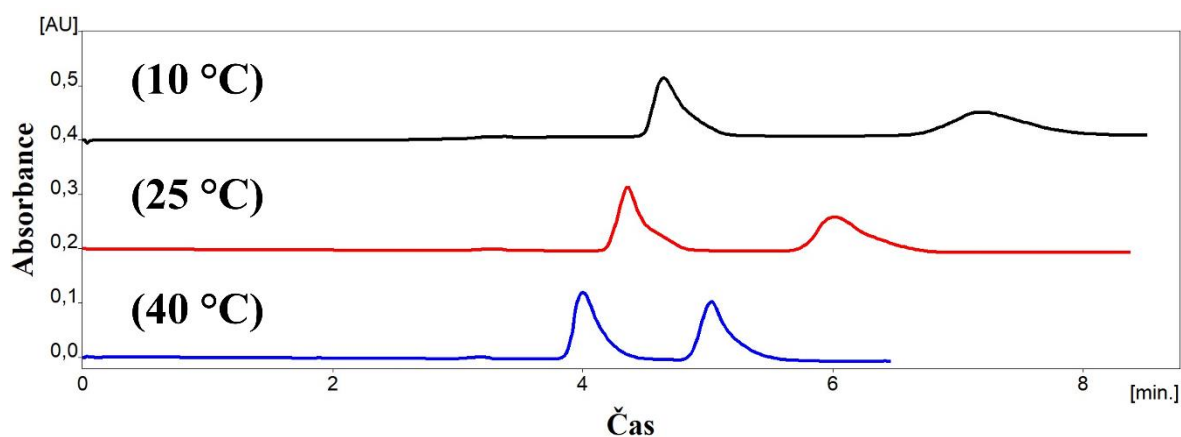


Obrázek 43: Lineární závislost retenčních časů na teplotě separace



Obrázek 44: Závislost rozlišení separace na teplotě separace

Jak již bylo řečeno výše, kromě retenčních časů a rozlišení byl také sledován vliv na tvar separovaných píků. Jak lze pozorovat na **Obr. 45**, teplota má vliv i na tvar píků. Se vzrůstající teplotou totiž dochází ke růstu rychlosti eluce analytu a v konečném důsledku tedy k menšímu rozmývání. Na rozdíl od analýz s použitím aditiv bylo v tomto případě (tj. při ohřevu kolony na 40 °C) dosaženo menšího rozmytí později elujícího enantiomeru. Bohužel z důvodu kratšího časového intervalu eluce mezi enantiomery by tuto teplotu pravděpodobně nebylo možné použít v semipreparativním módu a muselo by být dále optimalizováno složení mobilní fáze, tak aby došlo k delšímu zadržení analytů na koloně. Tyto experimenty nebyly (stejně jako transfer metody využívající ohřev kolony do semipreparativního módu) z časových důvodů provedeny.



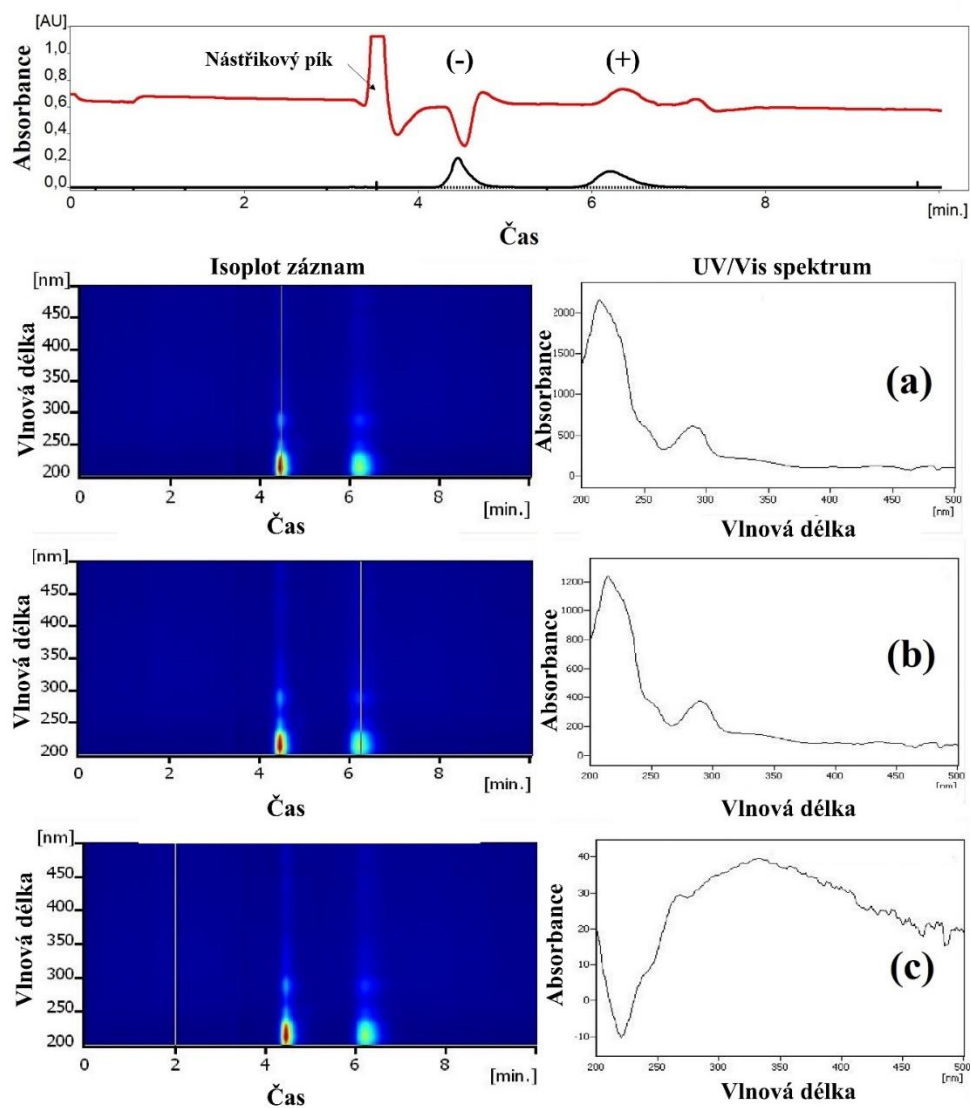
Obrázek 45: Separace sloučeniny I na koloně Lux Cellulose-3 v analytickém módu s použitím mobilní fáze: hexan:MeOH:EtOH 18:1:1 při teplotě 10 °C (černá), 25 °C (červená), 40 °C (modrá)

4.7. Přístup k identifikaci enantiomerů v rámci optimalizace metod

Pro kontrolu, zda izolované píky odpovídají enantiomerům jednotlivých enantiomerů, byly během optimalizace metody prováděny dva testy. Prvním z nich je porovnání UV/Vis spekter obou píků – enantiomery mají díky shodným fyzikálním a chemickým vlastnostem UV/Vis spektra shodná. Druhým testem je polarimetrická detekce obou píků, které by měly vykazovat na polarimetru opačné znaménko optické rotace. Níže jsou přiloženy vybrané analýzy všech vzorků s UV/Vis a polarimetrickou detekcí, jakožto ověřením, že ve všech případech patřily izolované píky atropoisomerům separovaných sloučenin. Enantiomery některých analyzovaných sloučenin však vykazují velmi nízkou optickou otáčivost a online polarimetrická detekce tak v některých případech nemusí být nejspolehlivější metodou pro ověření jejich optické aktivity. Podobný přístup k identifikaci enantiomerů využil např. Wang a kol., kteří identifikovali jednotlivé enantiomery pomocí jejich UV/Vis spekter a spekter cirkulárního dichroismu ^[100].

4.7.1. Sloučenina I

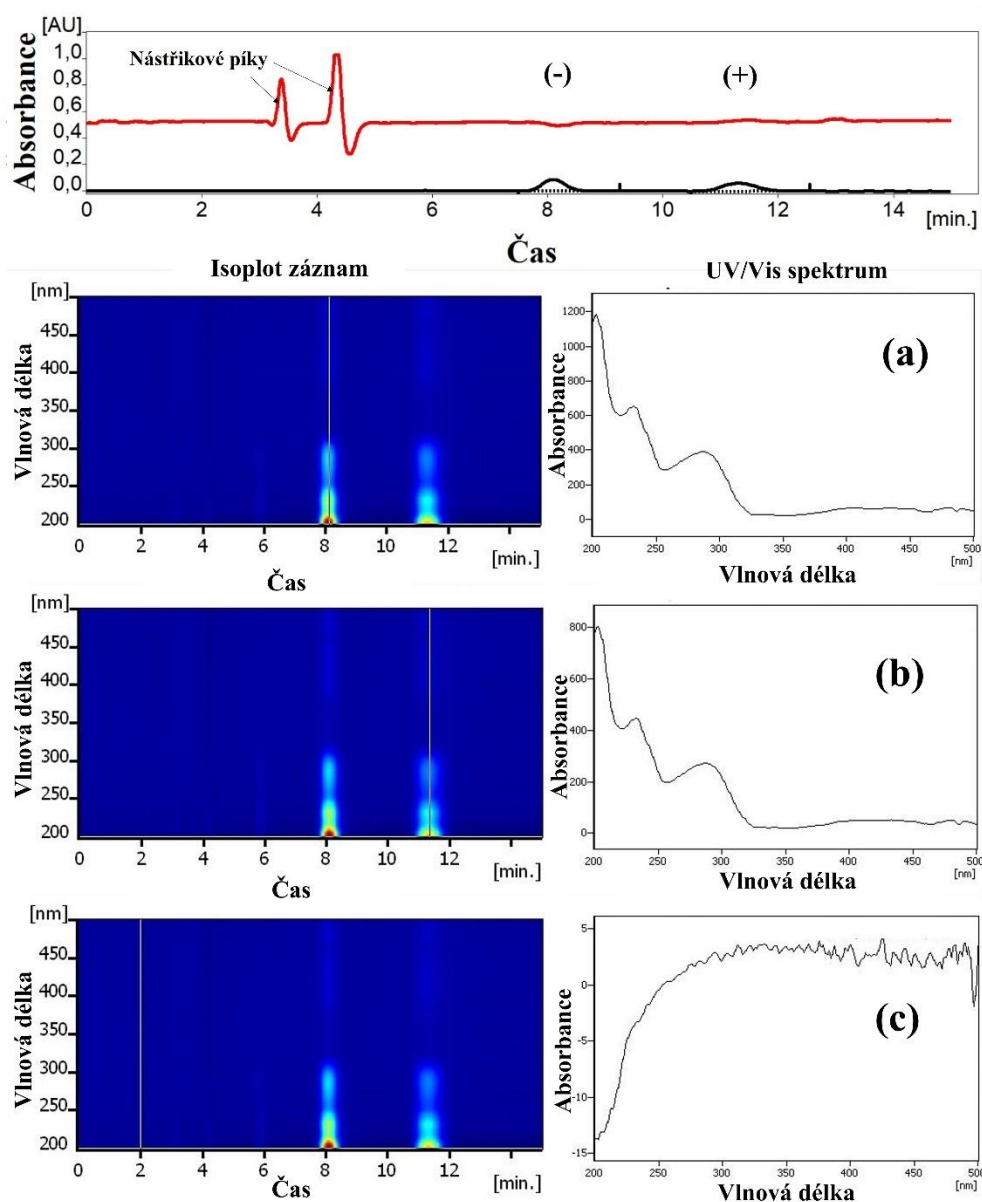
Pro sloučeninu I byla polarimetrická detekce provedena na analytické koloně Lux Cellulose-3 za použití mobilní fáze hexan:MeOH:EtOH 18:1:1. Jako první eluoval (-) enantiomer jako druhý (+) enantiomer. Z UV/Vis spekter lze pozorovat, že spektra obou píků jsou shodná, a tudíž jsou separované píky vůči sobě optickými izomery. Vzhledem k tomu, že plochy píků jsou v poměru 1:1, lze konstatovat, že separovaný vzorek byl původně racemickou směsí. Záznam polarimetrické detekce a porovnání UV/Vis spekter je uveden na **Obr. 46**.



Obrázek 46: Záznam polarimetrické detekce separace sloučeniny I za ideálních podmínek a porovnání UV/Vis spekter pro (-) enantiomer (a); (+) enantiomer (b) a mobilní fázi neobsahující analyt (c)

4.7.2. Sloučenina II

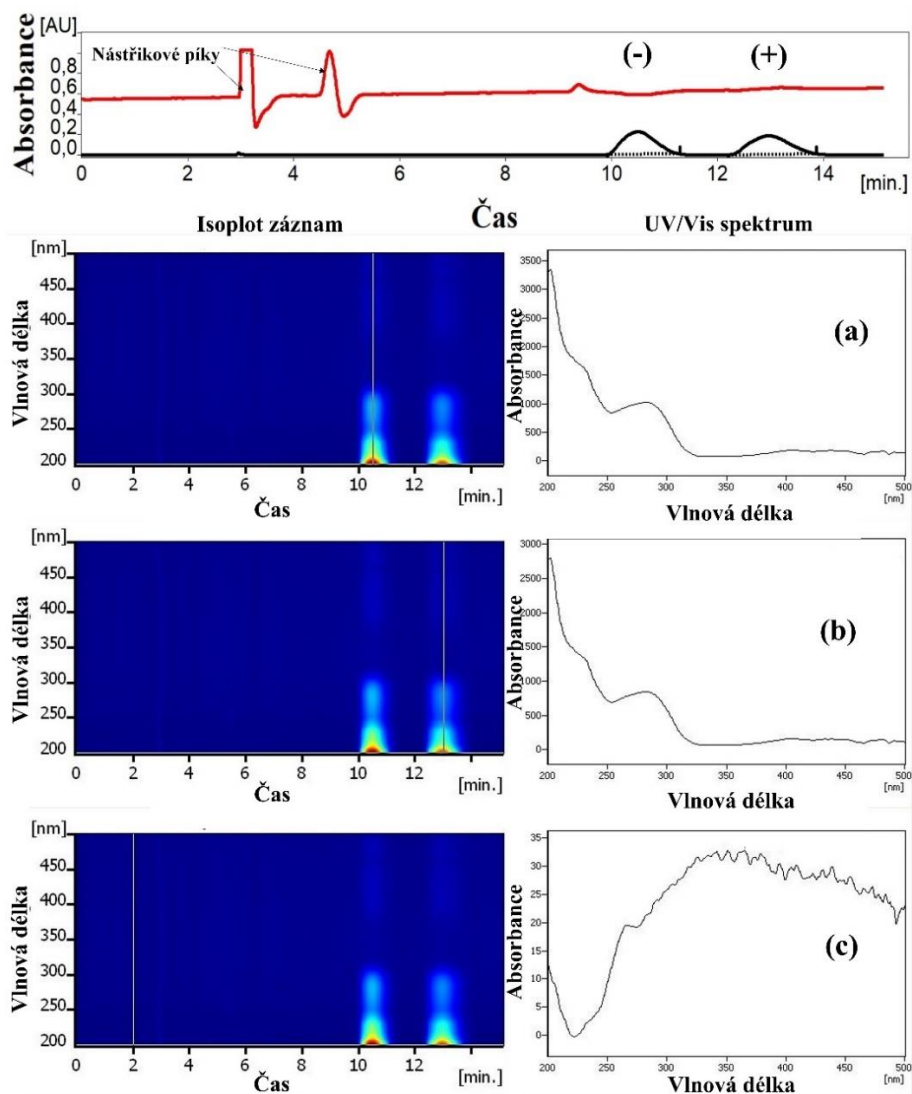
Polarimetrická detekce pro sloučeninu II byla provedena na koloně Lux Cellulose-3 za použití mobilní fáze hexan:EtOH 9:1. Jako první eluoval opět (-) enantiomer a jako druhý (+) enantiomer. Jak lze pozorovat na **Obr. 47**, také UV/Vis spektrum eluovaných píků je stejné a liší se od spektra mobilní fáze. I v tomto případě tedy byly opravdu separovány enantiomery sloučeniny II. I u těchto enantiomerů byly plochy píků v poměru 1:1 a jedná se původně o racemickou směs.



Obrázek 47: Záznam polarimetrické detekce separace sloučeniny II za ideálních podmínek a porovnání UV/Vis spekter pro (-) enantiomer (a); (+) enantiomer (b), mobilní fázi neobsahující analyt (c)

4.7.3. Sloučenina III

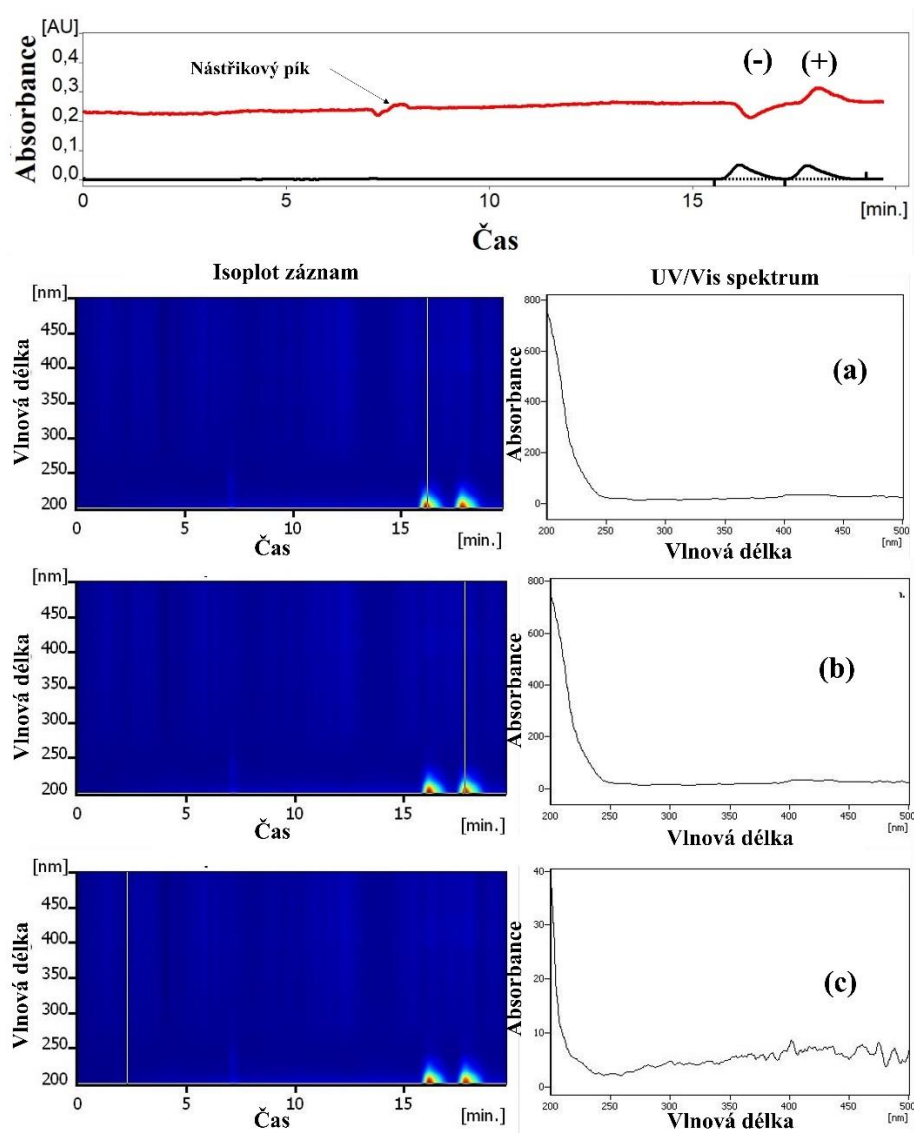
Optimální podmínky pro enantioseparaci sloučeniny III zahrnují použití kolony Lux Cellulose-1a mobilní fáze hexan:methanol:ethanol 18:1:1. Polarimetrická detekce potvrdila, že první pík odpovídá (-) enantiomeru a druhý (+) enantiomeru. UV/Vis spektrum obou píků je shodné a liší se od UV/Vis spektra mobilní fáze. I v tomto případě se plocha píků obou enantiomerů shoduje a původní vzorek je tedy racemickou směsí (viz **Obr. 48**). Vzhledem k tomu, že použitá mobilní fáze je shodná s mobilní fází použitou pro separaci enantiomerů sloučeniny I, byla porovnána rovněž UV/Vis spektra obou mobilních fází. Lze pozorovat, že spektra této směsi jsou opravdu téměř identická (data nejsou prezentována).



Obrázek 48: Záznam polarimetrické detekce separace sloučeniny III za ideálních podmínek a porovnání UV/Vis spekter pro (-) enantiomer (a); (+) enantiomer (b), mobilní fázi neobsahující analyt (c)

4.7.4. Sloučenina IV

Pro měření optické otáčivosti sloučeniny IV byla použita kolona Lux Cellulose-1 a mobilní fáze o složení hexan:2-propanol 50:1. Na rozdíl od sloučenin II a III má tato sloučenina daleko větší měrnou optickou otáčivost. Ze záznamu vyplývá, že jako první eluuje (-) enantiomer a jako druhý (+) enantiomer. I v tomto případě jsou UV/Vis spektra obou majoritních píků shodná a jedná se tedy o hledané enantiomery. Zajímavostí je, že UV/Vis spektrum směsi hexan:2-propanol je velmi podobné spektru analytu (viz **Obr. 49**). Také v tomto případě bylo vyhodnoceno, že dodaná směs enantiomerů je směsí racemickou.



Obrázek 49: Záznam polarimetrické detekce separace sloučeniny IV za ideálních podmínek a porovnání UV/Vis spekter pro (-) enantiomer (a); (+) enantiomer (b), mobilní fázi neobsahující analyt (c)

4.8. Obecné trendy v chirálních separacích

Tato kapitola si klade za cíl shrnutí obecných trendů, které lze pozorovat při chirálních separacích na polysacharidových kolonách s chirálními selektory celluloza tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) a celluloza tris(4-methylbenzoát) při použití normálního módu (kombinace hexanu a modifikátoru, viz kapitola 2.1.2.1.).

V normální módu je za „modifikátor“ považována látka dodávající systému selektivitu. V tomto případě jde alkohol či acetonitril. Z jednotlivých výsledků lze pozorovat tři trendy. Tím prvním je vliv typu modifikátoru na retenci analytů. U všech vzorků zkoumaných v rámci práce se retence enantiomerů zvyšuje s rostoucí délkou uhlíkového řetězce alkoholu použitého jako modifikátoru. Vzhledem k tomu, že acetonitril neposkytoval v porovnání s alkoholy dostatečnou selektivitu, nebyl testován u všech sloučenin. Z naměřených dat však vyplývá, že vliv acetonitrilu závisí na povaze látky. U sloučeniny I totiž čistý acetonitril zajišťoval větší retenci analytů než ekvivalent v podobě alkoholu (tj. methanol), naopak pro sloučeninu III byla situace opačná a retence v případě použití srovnatelného obsahu acetonitrilu byla menší.

Druhým trendem, který lze pozorovat je vliv koncentrace konkrétního modifikátoru na retenci analytů. U všech analytů platí, že s rostoucí koncentrací modifikátoru v mobilní fázi retence analytů klesá.

Třetím sledovaným trendem je vliv modifikátoru na selektivitu separace analytu. Z uvedených dat vyplývá, že pro sloučeniny I a III vykazuje největší selektivitu methanol, pro sloučeninu II ethanol a pro sloučeninu IV 2-propanol. Zajímavostí je, že pokud porovnáme struktury sloučenin II a III, zjistíme, že jsou téměř identické. Nicméně pouhá záměna jednoho substituentu způsobuje naprosto odlišné chování na kolonách při separaci enantiomerů těchto sloučenin.

Pokud data porovnáme s výsledky analýz uvedených v mé bakalářské práci ^[101], zjistíme, že pro tři případy ze čtyř studovaných sloučenin nejselektivnějším alkoholem methanol a pro jednu z nich ethanol. Selektivita tedy v případě polysacharidových kolon nezávisí na druhu na použité stacionární fázi, ale spíše na povaze samotné separované látky.

Co se týče eluce enantiomerů, není možné předpovědět pořadí eluce (-) enantiomeru a (+) enantiomeru. V této předkládané práci sice u všech analyzovaných racemátů eluoval jako první (-) enantiomer, nicméně jak opět vyplývá z výsledků mé bakalářské práce

zaměřené na separaci čtyř jiných axiálně chirálních derivátů benzimidazolů, jde spíše o náhodu. V případě látek separovaných v bakalářské práci totiž v případě tří sloučenin eluoval jako první (-) enantiomer, v případě jedné sloučeniny pak (+) enantiomer. Dalším problémem v tomto ohledu je také možnost ovlivnění elučního pořadí samotnou změnou mobilní či stacionární fáze (resp. volbou separačního systému – normální fáze vs. reverzní fáze) ^[102].

Posledním trendem, který však nesouvisí se samotnými chirálními separacemi, ale obecně s HPLC jako metodou je použití recyklované mobilní fáze. Ta byla použita pro všechny případy semipreparativních izolací z důvodu úspory spotřeby mobilní fáze. Při jejím použití je však potřeba zohlednit fakt, že oproti nově připravené mobilní fázi zpravidla dochází k posunu retenčních časů enantiomerů. V případě sloučeniny I tak dochází k posunu t_R v průměru o 0,02 respektive 0,42 min, v případě sloučeniny III dokonce o 1,63 min resp. 2,32 min (u obou se jednalo o zpoždění eluce). Zajímavostí je, že v případě sloučeniny II došlo naopak k uspíšení eluce enantiomerů, a to o 0,68 min resp. 1,16 min.

5. Závěr

Tato diplomová práce se zabývá chirálními separacemi vybraných sloučenin s axiální chiralitou. V teoretické části byla věnována pozornost především možnostem realizace chirálních separací s využitím vysoko-účinné kapalinové chromatografie, a to se zaměřením na přímou separaci. Ta je diskutována z pohledu chirálních kolon, jejich rozdílů v technickém provedení a praktického využití s bližším zaměřením na polysacharidové stacionární fáze, dále také z pohledu chirálních aditiv v mobilní fázi. V další části je diskutována problematika vlivu rozpouštědel, pH, teploty a průtoku s ohledem na kvalitu chirálních separací. Poslední část se věnuje pohledu na HPLC z hlediska využívaných separačních módů, a to především se zaměřením na analytický a (semi)preparativní mód a na jejich bližší porovnání. Diskutovány jsou jejich rozdíly, a to jak v praktickém využití (nejen v chirálním HPLC), tak s ohledem na rozdíly v instrumentálním vybavení používaném v těchto módech.

Experimentální část práce je věnována především vývoji metod v analytickém módu a jejich optimalizaci pro chirální separace čtyř axiálně chirálních sloučenin. Optimalizace byla provedena s ohledem na navazující transfer metod do semipreparativního módu pro následnou izolaci jednotlivých enantiomerů analyzovaných sloučenin. Pro separace byla využita metoda vysoko-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s online UV/Vis a polarimetrickou detekcí s využitím tří polysacharidových kolon na bázi cellulosity: Lux Cellulose-1, Lux Cellulose-3 a ChiralArt Cellulose-SB. Optimalizace metod byla provedena s využitím normálního módu, a to zpravidla kombinací vhodného alkoholu (methanol, ethanol, 2-propanol či 2-butanol) s hexanem v různých poměrech. Testován byl rovněž vliv pH a teploty na separaci. Detekce jednotlivých enantiomerů byla provedena s využitím porovnání polarimetrického záznamu a UV/Vis spekter jednotlivých píků. Izolace enantiomerů byla provedena v dostatečném množství a s dostatečnou čistotou, aby mohly být separované analyty dále studovány. Jedná se totiž o biologicky aktivní látky s potenciálem uplatnění v oblasti medicínální chemie.

6. Seznam použité literatury

- [1] L. A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, Chiral Drugs: An Overview, *IJBS*. 85 (2006) 85-100.
- [2] B. Li, D. Haynie, Chiral drug separation, *Encycl. Chem. Process*. DOI (2006) 449–458.
- [3] G. K. E. Scriba, *Chiral Separations: Methods and Protocols*, Jena, 2013.
- [4] O. H. Ismail et al., Direct analysis of chiral active pharmaceutical ingredients and their counterions by ultra high performance liquid chromatography with macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1576 (2018) 42–50.
- [5] A. A. Elbashir, H. Y. Aboul-Enein, Multidimensional Gas Chromatography for Chiral Analysis, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48 (2018) 416-427.
- [6] K. Benedek, A. Guttman, High performance capillary electrophoresis: An overview, *HPLC Pract. Ind. Appl. Second Ed.* (2000) 385–426.
- [7] C. West, Recent trends in chiral supercritical fluid chromatography, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 648 (2019) 115-120
- [8] V. A. Davankov, Analytical chiral separation methods, *Pure & Appl. Chem.*, 69 (1997) 1469-1474.
- [9] T. Sedghamiz, M. Bahrami, M. H. Ghatee, Enantiospecific adsorption of propranolol enantiomers on naturally chiral copper surface: A molecular dynamics simulation investigation, *Chem. Phys.* 487 (2017) 48–58.
- [10] J. Isac-García, J. A. Dobado, F. G. Calvo-Flores, H. Martinez-García, *Basic Operation Experiments*, v knize: J. Isac-García, *Experimental Organic Chemistry*, Elsevier, Amsterdam 2016, str. 207-238.
- [11] Y. C. Guillaume, L. Ismaili, T. T. Truong, L. Nicod, J. Millet, M. Thomassin, Chiral discrimination of phenoxypropionic acid herbicide enantiomers on teicoplanin phase: Methanol dependence and eluent pH consideration, *Talanta*. 58 (2002) 951–959.
- [12] J. Teixeira, M. E. Tiritan, M. M. M. Pinto, C. Fernandes, Chiral stationary phases for liquid chromatography: Recent developments, *Molecules* 24 (2019).
- [13] V. A. Davankov, S.V. Rogozhin, Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: stereoselective effects in α -amino acid copper (II) complexes. *Journal of Chromatography A*, 60 (1971) 280-283.
- [14] Bezhan Chankvetadze, *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Tbilisi State University, 1997

- [15] Regis Technologies, INC., Whelk-O®1, Regis Technologies, Austin. <https://www.registech.com/whelk-o1/>, staženo 21.4.2022.
- [16] P. Zhang et al., Chiral separation and determination of etoxazole enantiomers in vegetables by normal-phase and reverse-phase high performance liquid chromatography, *Molecules* 25 (2020) 1–13.
- [17] J. McConathy, M. J. Owens, Stereochemistry in Drug Action, *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry*. 5 (2003) 70–73.
- [18] A. A. Younes, H. Ates, D. Mangelings, Y. Vander, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis A separation strategy combining three HPLC modes and polysaccharide-based chiral stationary phases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 75 (2013) 74–85.
- [19] O. P. Kleidernigg, W. Lindner, Synthesis of new stable aliphatic isothiocyanate-based chiral derivatizing agent and application to indirect separation of chiral amino and thiol compounds, *Chromatographia* 44 (1997) 465–472.
- [20] S. Hess, K. R. Gustafson, D. J. Milanowski, E. Alvira, M. A. Lipton, L. K. Pannell, Chirality determination of unusual amino acids using precolumn derivatization and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 211–219.
- [21] L. Nováková, M. Douša, P. Česla a kol., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, Česká chromatografická škola, Brno, 2021.
- [22] S. Grybinik, Z. Bosakova, An overview of chiral separations of pharmaceutically active substances by HPLC (2018–2020), *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* 152 (2021) 1033–1043.
- [23] T. J. Ward, K. D. Ward, Chiral separations: A review of current topics and trends, *Anal. Chem.* 84 (2012) 626–635.
- [24] T. Zhang, E. Holder, P. Franco, W. Lindner, Zwitterionic chiral stationary phases based on cinchona and chiral sulfonic acids for the direct stereoselective separation of amino acids and other amphoteric compounds, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1237–1247.
- [25] A. Berthod, Chiral Recognition Mechanisms. *Analytical Chemistry* 1 (2006) 2093–2099.
- [26] Z. X. Zheng, Y. Wei, J. M. Lin, Chiral separation based on ligand-exchange capillary electrophoresis using a copper(II)-L-ornithine ternary complex as selector, *Electrophoresis* 26 (2005) 1007–1012.

- [27] R. Berkecz, G. Némethi, A. Péter, I. Ilisz, Liquid chromatographic enantioseparations utilizing chiral stationary phases based on crown ethers and cyclofructans, *Molecules* 26 (2021).
- [28] Chiral Technologies, Inc., Chiral selectors names&structures, Daicel, West Chester. <https://chiraltech.com/wp-content/uploads/2020/07/Chiral-Technologies-Selectors-2020.pdf>, staženo 21. září 2021
- [29] Dr. Weber Consulting Kit, HPLC chiral columns. https://www.hplc.eu/Downloads/Weber_Chiral_HPLC_Columns.pdf., staženo 2. listopadu 2021
- [30] YMC CO, LTD, From Analysis to Plant-Scale Purification, Chiral Separation, YMC CO, Kyoto. https://www.ymc.co.jp/data/download//chiral_separation_E.pdf, staženo 2. listopadu 2021
- [31] Phenomenex, Inc., Polycaccharide Chiral Columns. Phenomenex, Torrance. <https://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/lux#> , staženo 2. listopadu 2021
- [32] S. Fanali, Editorial on “Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases” by M. Lämmerhofer, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 813.
- [33] B. Chankvetadze, Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 26–51
- [34] K. Balmér, B. A. Persson, P. O. Lagerström, Stereoselective effects in the separation of enantiomers of omeprazole and other substituted benzimidazoles on different chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 660 (1994) 269–273.
- [35] M. Tanaka, H. Yamazaki, Direct determination of pantoprazole enantiomers in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a cellulose-based chiral stationary phase and column-switching system as a sample cleanup procedure, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1513–1516.
- [36] I. Ali, H. Y. Aboul-Enein, Impact of immobilized polysaccharide chiral stationary phase on enantiomeric separations, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 762–769.
- [37] A. Ghanem, C. Wang, Enantioselective separation of racemates using CHIRALPAK IG amylose-based chiral stationary phase under normal standard, non-standard and reversed phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1532 (2018) 89–97.

- [38] M. Ogasawara, Y. Enomoto, M. Uryu, X. Yang, A. Kataoka, A. Ohnishi, Application of Polysaccharide-Based Chiral HPLC Columns for Separation of Nonenantiomeric Isomeric Mixtures of Organometallic Compounds, *Organometallics* 38 (2019) 512–518.
- [39] P. Peluso, V. Mamane, S. Cossu, R. Dallochio. Noncovalent interactions in high-performance liquid chromatography enantioseparations on polysaccharide-based chiral selectors, Elsevier, 2020.
- [40] L. Yu, S. Wang, Chiral Mobile Phase Additives in HPLC Enantioseparations, *Chiral separations*. 970 (2013).
- [41] J. Guan, J. Yang, Y. Bi, S. Shi, F. Yan, F. Li, Determination of the enantiomeric impurity in S(-)pantoprazole using high performance liquid chromatography with sulfobutylether-beta-cyclodextrin as chiral additive, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 288–293.
- [42] Armstrong DW et al., Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Anal Chem* 66 (1994) 1473–1484.,
- [43] V. S. Sharp, M. N. Letts, D. S. Risley, J. P. Rose, Enantiomeric Separation of Dansyl Amino Acids Using Macrocyclic Antibiotics as Chiral Mobile Phase Additives by Narrow-Bore High-Performance Liquid Chromatography, *Chirality* 16 (2004) 153–161.
- [44] M. Hatami, K. Farhadi, Analysis of ketoprofen enantiomers in human and rat plasma by hollow-fiber-based liquid-phase microextraction and chiral mobile-phase additive HPLC. *Canadian Journal of Chemistry*. 91 (2013) 1252-1527.
- [45] A. Rocco, A. Maruška, S. Fanali, Cyclodextrins as a chiral mobile phase additive in nano-liquid chromatography: Comparison of reversed-phase silica monolithic and particulate capillary columns, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2935–2943.
- [46] F. Bressolle, M. Audran, T. N. Pham, J. J. Vallon, Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments, *J. Chromatogr. B.* 687 (1996) 303-336.
- [47] S. Sun, Y. Jia, N. Zeng, F. Li, Chiral ligand-exchange chromatography for separation of three stereoisomers of octahydroindole-2-carboxylic acid, *Chromatographia* 63 (2006) 331–335.
- [48] 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.

- [49] R. Sardella, F. Ianni, L. Pucciarini, M. Marinozzi, S. Zlotskii, B. Natalini, Cyclopropyl containing sulfonyl amino acids: exploring the enantioseparation through chiral ligand-exchange chromatography. *Russ. J. Gen. Chem.* 87 (2017) 1079–1084.
- [50] L. Nováková, M. Douša a kol., *Moderní separace v teorii a praxi II.*, Česká chromatografická škola, Brno, 2021.
- [51] B. A. Persson, S. Andersson, Unusual effects of separation conditions on chiral separations, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 195–203.
- [52] T. Wang, R. M. Wenslow, Effects of alcohol mobile-phase modifiers on the structure and chiral selectivity of amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 99–110.
- [53] B. Saleh, T. Ding, Y. Wang, X. Zheng, R. Liu, L. He, Analytical separation of closotel enantiomers by HPLC, *Molecules* 26 (2021) 1–14.
- [54] P. Zhang et al., Direct enantiomeric separation and determination of hexythiazox enantiomers in environment and vegetable by reverse-phase high-performance liquid chromatography, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17 (2020) 1–15.
- [55] M. Podolska, W. Bialecka, A. Kulik, B. Kwiatkowska-Puchniarz, A. Mazurek, HPLC method for separating enantiomers of imidazole derivatives – Antifungal compounds, *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 74 (2017) 777–784.
- [56] L. Thunberg, J. Hashemi, S. Andersson, Comparative study of coated and immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases and their applicability in the resolution of enantiomers, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 875 (2008) 72–80.
- [57] Z. Shedania, R. Kakava, A. Volonterio, T. Farkas, B. Chankvetadze, Separation of enantiomers of chiral sulfoxides in high-performance liquid chromatography with cellulose-based chiral selectors using acetonitrile and acetonitrile-water mixtures as mobile phases, *J. Chromatogr. A* 1609 (2020) 445–460.
- [58] C. F. Poole, S. N. Atapattu, Study of system properties in reversed-phase liquid chromatography for binary and ternary solvent mobile phase compositions using the solvation parameter model, *J. Chromatogr. Open* 2 (2022) 100039.
- [59] K. Tachibana, A. Ohnishi, Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 127–154.
- [60] K. Valliappan, S. J. Vaithyanathan, V. Palanivel, Direct Chiral HPLC method for the simultaneous determination of warfarin enantiomers and its impurities in raw

- material and pharmaceutical formulation: Application of chemometric protocol, *Chromatographia* 76 (2013) 287–292.
- [61] G. D’Orazio, Z. Aturki, M. Cristalli, M. G. Quaglia, S. Fanali, Use of vancomycin chiral stationary phase for the enantiomeric resolution of basic and acidic compounds by nano-liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 105–113.
- [62] I. Matarashvili, L. Chankvetadze, T. Tsintsadze, T. Farkas, B. Chankvetadze, HPLC Separation of Enantiomers of Some Chiral Carboxylic Acid Derivatives Using Polysaccharide-Based Chiral Columns and Polar Organic Mobile Phases, *Chromatographia* 78 (2015) 473–479.
- [63] R. Sardella et al., Chromatographic separation and biological evaluation of benzimidazole derivative enantiomers as inhibitors of leukotriene biosynthesis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 89 (2014) 88–92.
- [64] L. Pucciarini et al., Development and validation of a chiral UHPLC-MS method for the analysis of cysteine enantiomers in biological samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2020).
- [65] C. B. Castells, P. W. Carr, A Study of the Thermodynamics and Influence of Temperature on Chiral High-Performance Liquid Chromatographic Separations Using Cellulose *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate) Coated Zirconia Stationary Phases. *Chromatographia*. 52 (2000) 535-542.
- [66] I. Ilisz, N. Grecsó, M. Palkó, F. Fülöp, W. Lindner, A. Péter, Structural and temperature effects on enantiomer separations of bicyclo[2.2.2]octane-based 3-amino-2-carboxylic acids on cinchona alkaloid-based zwitterionic chiral stationary phases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98 (2014) 130–139.
- [67] J. Gao, H. Qu, C. Zhang, W. Li, P. Wang, Z. Zhou, Direct chiral separations of the enantiomers of phenylpyrazole pesticides and the metabolites by HPLC, *Chirality* 29 (2017) 19–25.
- [68] Q. Tian et al., Enantiomeric separation of chiral pesticides by high performance liquid chromatography on cellulose tris-3,5-dimethyl carbamate stationary phase under reversed phase conditions, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 310–321.
- [69] P. Zhang et al., Chiral separation and determination of etoxazole enantiomers in vegetables by normal-phase and reverse-phase high performance liquid chromatography, *Molecules* 25 (2020) 1–13.

- [70] Ch. Zhang et al., Enantiomeric Separations of Pyriproxyfen and its Six Chiral Metabolites by High-Performance Liquid Chromatography. *Chirality* 28 (2016) 245-252.
- [71] X. He, R. Lin, H. He, M. Sun, D. Xiao, Chiral separation of ketoprofen on a Chirobiotic T column and its chiral recognition mechanisms, *Chromatographia* 75 (2012) 1355–1363.
- [72] I. J. da Silva Junior, J. P. Sartor, P. C. P. Rosa, V. de Veredas, A. G. Barreto Júnior, C. C. Santana, High-performance liquid chromatographic separation of rolipram, bupivacaine and omeprazole using a tartardiamide-based stationary phase. Influence of flow rate and temperature on the enantioseparation, *J. Chromatogr. A* 1162 (2007) 97–102.
- [73] S. Fanali, An overview to nano-scale analytical techniques: Nano-liquid chromatography and capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 38 (2017) 1822–1829.
- [74] M. R. Gama, C. H. Collins, C. B. G. Bottoli, Nano-liquid chromatography in pharmaceutical and biomedical research, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 694–703.
- [75] G. D’Orazio, Chiral analysis by nano-liquid chromatography, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 125 (2020) 115832.
- [76] X. Liu, Enantioselective liquid – liquid extraction of 3 - chloro – phenylglycine enantiomers using (S, S) - DIOP as extractant, (2019) 750–758.
- [77] U. Huber, R. E. Majors, *Principles in Preparative HPLC*, Agilent, Germany 2007.
- [78] J. Silver, Overview of Analytical-to-Preparative Liquid Chromatography Method Development, *ACS Comb. Sci.* 21 (2019) 609–613.
- [79] K. Roberta et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Enantiomeric resolution of albendazole sulfoxide by semipreparative HPLC and in vitro study of growth inhibitory effects on human cancer cell lines, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 66 (2012) 100–108.
- [80] S. Dúbant, S. Read, *Basics of Purification, Tip and Tricks*, Waters Corporation (2011)
- [81] Analytical and Preparative Liquid Chromatography – What Are the Main Differences?. <https://www.analytreguru.com/t5/Blog/Analytical-and-Preparative-Liquid-Chromatography-What-Are-the/ba-p/3312>, staženo 5. prosince 2021

- [82] What is the difference between analytical and preparative HPLC?. <https://www.knauer.net/en/what-is-the-difference-between-analytical-and-preparative-hplc/f24135>, staženo 5. prosince 2021
- [83] A. Jungbauer, Preparative chromatography, *Chem. Eng. Technol.* 28 (2005) 1237.
- [84] U. Rosentreter, U. Huber, Optimal fraction collecting in preparative LC/MS, *J. Comb. Chem.* 6 (2004) 159–164.
- [85] R. Moritz, N. O'Reilly, Mass-based fraction collection of crude synthetic peptides in analytical and preparative scale, *J. Biomol. Tech.* 14 (2003) 136–142.
- [86] J. K. Reinhardt, A. M. Zimmermann-Klemd, O. Danton, M. Smieško, C. Gründemann, M. Hamburger, Compounds from *Toddalia asiatica*: Immunosuppressant Activity and Absolute Configurations, *J. Nat. Prod.* 83 (2020) 3012–3020.
- [87] V. Zimba, I. S. Huang, J. E. Foley, E. W. Linton, Identification of a new-to-science cyanobacterium, *Toxifilum mysidocida* gen. nov. & sp. nov. (Cyanobacteria, Cyanophyceae), *J. Phycol.* 53 (2017) 188–197.
- [88] Z. Huang et al., HPLC semi-preparative separation of diclazuril enantiomers and racemization in solution, *J. Sep. Sci.* 43 (2020) 1240–1247.
- [89] C. I. Keeling, H. T. Ngo, K. D. Benusic, K. N. Slessor, Preparative chiral liquid chromatography for enantiomeric separation of pheromones, *J. Chem. Ecol.* 27 (2001) 487–497.
- [90] P. Malik, R. Bhushan, Synthesis of diastereomeric anhydrides of (RS)-ketorolac and (RS)-etodolac, semi-preparative HPLC enantioseparation, establishment of molecular asymmetry and recovery of pure enantiomers, *New J. Chem.* 41 (2017) 13681–13691.
- [91] C. Lakshmi Narayana, T. Suresh, S. Mahender Rao, P. K. Dubey, J. Moses Babu, A validated chiral HPLC method for the enantiomeric separation of Linezolid on amylose based stationary phase, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 21–28.
- [92] Y. J. Chen et al., Regioisomeric and enantiomeric analysis of primary triglycerides in human milk by silver ion and chiral HPLC atmospheric pressure chemical ionization-MS, *J. Dairy Sci.* 103 (2020) 7761–7774.
- [93] Phenomenex Inc., Lux HPLC Columns Tips for Care and Use, Phenomenex, Torrance, <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/c827ef28-5adb-46b0-a94d-88fa80ddfa7d.pdf>, staženo 9. února 2022

- [94] YMC CO, LTD., Column Care and Use Instructions CHIRAL ART Amylose-SA/Cellulose-SB, YMC CO, Kyoto, https://www.ymc.co.jp/data/download/Amylose-SA_Cellulose-SB_E.pdf, staženo 9. února 2022
- [95] R. Cirilli, R. Ferretti, B. Gallinella, L. Turchetto, L. Zanitti, F. La Torre, Development and validation of an enantioselective and chemoselective HPLC method using a Chiralpak IA column to simultaneously quantify (R)-(+)- and (S)-(-)-lansoprazole enantiomers and related impurities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 9–14.
- [96] M. Piatkowska, P. Jedziniak, J. Zmudzki, Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 197 (2016) 571–580.
- [97] L. Li et al., Stereoselective Separation of the Fungicide Bitertanol Stereoisomers by High-Performance Liquid Chromatography and Their Degradation in Cucumber, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 13303–13309.
- [98] I. Matarashvili et al., The effect of temperature on the separation of enantiomers with coated and covalently immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1599 (2019) 172–179.
- [99] C. Panella, R. Ferretti, A. Casulli, R. Cirilli, Temperature and eluent composition effects on enantiomer separation of carvedilol by high-performance liquid chromatography on immobilized amylose-based chiral stationary phases, *J. Pharm. Anal.* 9 (2019) 324–331.
- [100] P. Wang, D. Liu, S. Jiang, X. Gu, Z. Zhou, The Direct Chiral Separations of Fungicide Enantiomers on Amylopectin Based Chiral Stationary Phase by HPLC, *Chirality*. 19 (2007) 114-119.
- [101] M. Krejča, Stereoselektivní separace a izolace sloučenin s axiální chiralitou pomocí HPLC, bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc, 2020.

7. Přílohy

Mobilní fáze Hexan:MeOH:EtOH	Koncentrace směsi alkoholů	Rt1 [min]	Rt2 [min]	R
40:1:1	4,76 %	5,30	8,38	5,07
30:1:1	6,25 %	4,93	7,43	4,43
18:1:1	10 %	4,55	6,58	3,78
10:1:1	16,66 %	4,50	5,32	2,22

Tabulka XIII: Přehled separací s rostoucím zastoupením binární směsi alkoholů methanol/ethanol v mobilní fázi a jejich vliv na retenční časy jednotlivých enantiomerů sloučeniny I

T [°C]	t [hod]	Podíl minoritního atropoisomeru	σ	RSD
80	0,5	1,88 %	0,64 %	0,65 %
80	1	0,34 %	0,38 %	0,38 %
80	2	0,20 %	0,11 %	0,11 %
80	4	0,37 %	0,26 %	0,26 %
80	6	0,58 %	0,45 %	0,45 %
80	8	1,59 %	0,78 %	0,80 %
120	0,5	0,57 %	0,45 %	0,46 %
120	1	0,77 %	0,61 %	0,61 %
120	2	1,35 %	0,16 %	0,16 %
120	4	1,56 %	0,98 %	0,99 %
120	6	2,55 %	0,17 %	0,18 %
120	8	1,87 %	0,36 %	0,37 %
160	0,5	9,97 %	0,22 %	0,25 %
160	1	17,31 %	0,55 %	0,66 %
160	2	29,23 %	0,55 %	0,78 %
160	4	41,65 %	0,93 %	1,59 %
160	6	45,69 %	2,30 %	4,23 %
160	8	47,34 %	1,82 %	3,45 %

Tabulka II: Shrnutí kontroly optické čistoty sloučeniny I – určení podílu minoritního atropoisomeru při daných teplotách a dané době inkubace

Mobilní fáze	Koncentrace alkoholu	Rt1 [min]	Rt2 [min]	R
EtOH	100 %	3,90	4,55	1,70
EtOH:hexan 3:1	75 %	4,10	4,77	1,69
EtOH:hexan 1:1	50 %	4,32	5,18	1,98
EtOH:hexan 1:9	10 %	9,37	13,48	4,05

Tabulka III: Závislost retenčních časů eluovaných enantiomerů sloučeniny II na koncentraci ethanolu v mobilní fázi

Mobilní fáze hexan:EtOH:MeOH	Koncentrace směsi alkoholů	Rt1 [min]	Rt2 [min]	R
10:1:1	16,66 %	7,32	8,65	2,55
14:1:1	12,50 %	8,85	10,68	2,70
18:1:1	10,00 %	11,50	14,33	3,65
20:1:1	9,09 %	11,90	14,90	4,01
30:1:1	6,25 %	14,62	18,63	4,24
40:1:1	4,76 %	18,23	23,68	4,76

Tabulka IV: Sledování závislosti retenčních časů enantiomerů sloučeniny III na koncentraci binárních směsi alkoholů (ethanol/methanol) v mobilní fázi

Alkohol	Rt1 [min]	Rt2 [min]	R
MeOH/EtOH 1:1	11,92	12,28	1,70
EtOH	13,63	14,47	1,69
IPrOH	16,15	17,83	1,98
Sec-BuOH	19,42	19,72	4,05

Tabulka VXIV: Sledování vlivu typu alkoholu na retenci enantiomerů sloučeniny I

Teplota	Rt1 [min]	σ	Rt2 [min]	σ	R	σ
10	4,61	0,04	7,06	0,13	3,21	0,07
25	4,34	0,03	6,00	0,04	3,15	0,16
40	4	0,02	5,03	0,03	2,54	0,09

Tabulka VI: Sledování vlivu teploty separace na retenční časy enantiomerů a na rozlišení separace sloučeniny I