

**Pražské analytické centrum inovací**

Projekt CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 spolufinancovaný ESF a Státním rozpočtem ČR

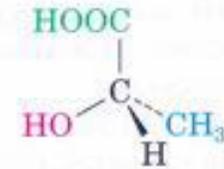
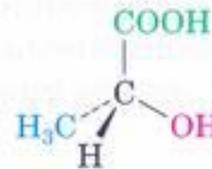
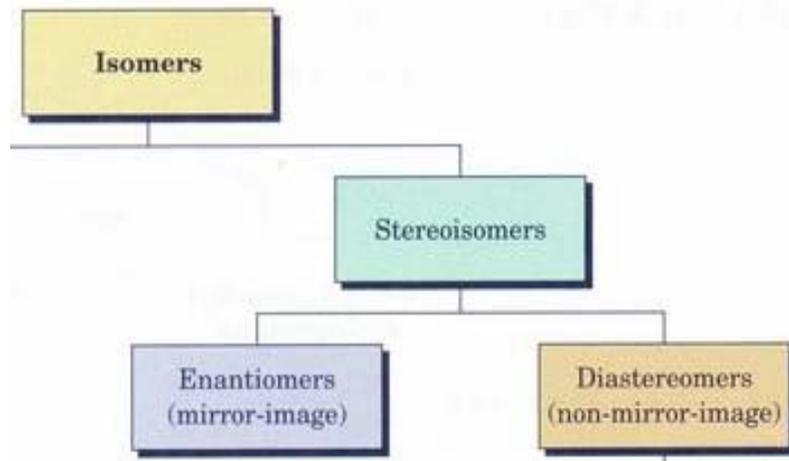
# **Chirální separace v kapalinové chromatografii**

**Zuzana Bosáková**

PřF UK Praha



# Enantiomery



*R* -enantiomer    *S* -enantiomer

nechirální prostředí – stejné fyzikálně-chemické vlastnosti (bod varu, bod tání, rozpustnost)

v chirálním prostředí – odlišné účinky

živé organismy - chirální environmentální prostředí (proteiny – L-aminokyseliny)

z hlediska molekulového rozpoznávání se liší jejich fyziologické a obecně biologické vlastnosti

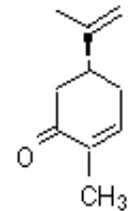
# Praxe

## Potravinářská chemie

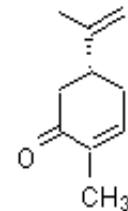
různé vůně

karvon

*S* (+) mátová, *R* (-) kmínová



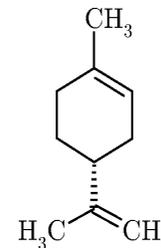
(+)-carvone



(-)-carvone

limonen

*R* (+) pomerančová, *S* (-) citronová



## Agrochemie

používání pesticidů – odlišné účinky jednotlivých enantiomerů  
fenoxypropanové kyseliny *R*-enantiomer aktivní, *S*-enantiomer neaktivní

# Praxe

## Farmakologie

### rozdílné terapeutické účinky léčiv

propranolol	( <i>S</i> )-(-)	$\beta$ -blokátor	( <i>R</i> )-(+)	neaktivní
sotalol	( <i>S</i> )-(-)	$\beta$ -blokátor	( <i>R</i> )-(+)	antiarytmikum
thalidomid	( <i>R</i> )-(-)	sedativum	( <i>S</i> )-(+)	teratogenní

kloprostenol

syntetický analog prostaglandinu  $F_{2\alpha}$   
(*R*) enantiomer několikanásobně vyšší  
luteolytický účinek

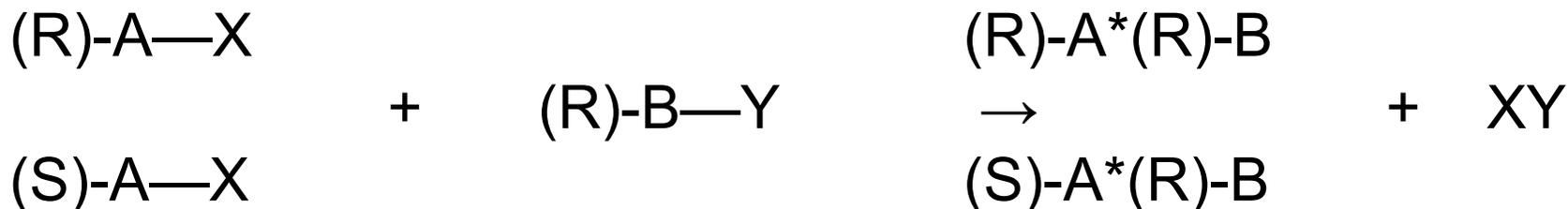
# Zdroje

- zdroje opticky čisté látky - přírodní  
synteticky – asymetrickou syntézou  
(prostaglandin F<sub>2a</sub>)
- syntéza - nutnost oddělit jednotlivé enantiomery
- vývoj metod (účinné, selektivní, rychlé) - vysokoúčinné separační techniky - plynová chromatografie, kapalinová chromatografie, superkritická fluidní chromatografie, kapilární elektroforéza, micelární kapilární elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie
- Vysokoúčinná kapalinová chromatografie -  
vývoj metodik – v analytickém měřítku  
v preparativním měřítku

# Chirální separace

## Nepřímá metoda

- derivatizační reakce mezi racemickým analytem a opticky čistým činidlem
- vytvoření stabilního diastereoizomerního páru
- separace v achirálním prostředí



## Přímá metoda

- přítomnost opticky aktivní látky - chirálního selektoru v separačním systému (vázané nebo volné) – tvorba přechodných diastereoizomerních párů

# Výhody a nevýhody nepřímé separace

- separace na achirální stacionární fázi
  - snadná záměna elučního pořadí enantiomerů
  - možné zvýšení citlivosti detekce
- 
- vysoká optická čistota derivatizačního činidla
  - optimalizace předseparačního kroku
  - možnost racemizace, epimerizace během derivatizace
  - méně vhodné pro kvantitativní účely
  - nevhodné pro semipreparativní nebo preparativní účely

# Výhody a nevýhody přímé chirální separace

chirální separace pomocí chirální stacionární fáze nebo chirálního separačního systému

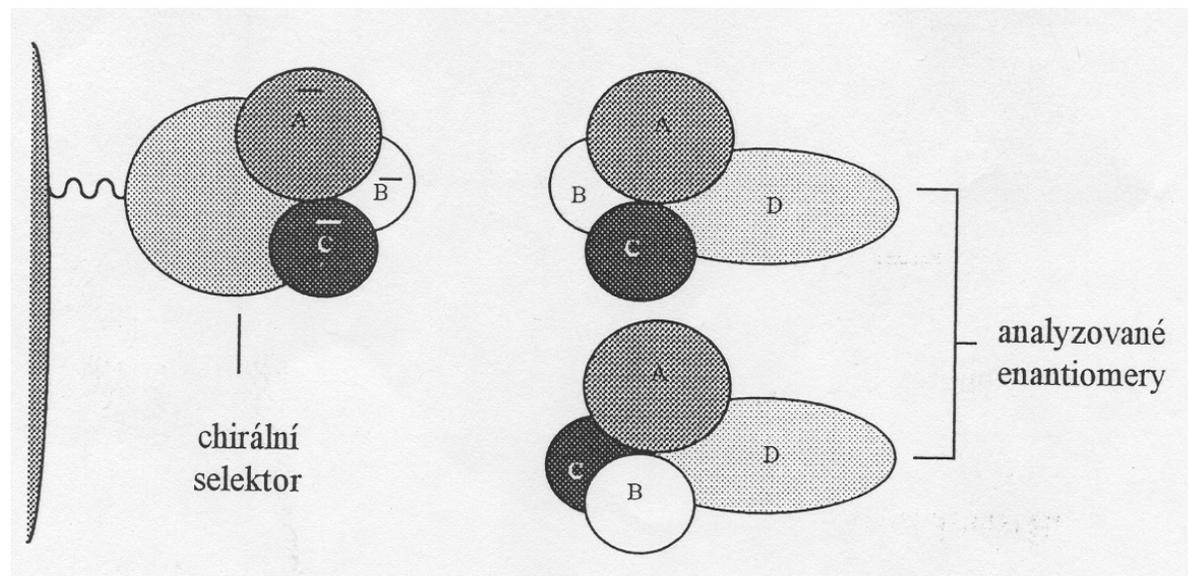
- nevyžaduje chirální předúpravu
- určení poměru enantiomerů pomocí ploch příslušných píků
- rychlé
- snadná izolace čistých enantiomerů
  
- drahé chirální stacionární fáze
- racemizace během separačního procesu

# Přímá chirální separace

## Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

- chirální stacionární fáze (CSP)
- přídavek chirálního selektoru (CS) do mobilní fáze
- levnější
- větší flexibilita
- dobrá sterická dostupnost volného CS
- rozpustnost CS v roztoku
- stabilita CS
- absorbance

# Model tříbodové interakce



obecný požadavek pro chirální interakci analytu s CS – nutnost tří současně působících interakcí

rozdílné hodnoty konstant stabilit (interakčních energií) přechodných diastereoizomerních párů

# Klasifikace chirálních selektorů

## původ:

- přírodní** - cyklodextriny, makrocyclická antibiotika, proteiny
- semisyntetické** - derivatizované cyklodextriny, deriváty polysacharidů, modifikovaná makrocyclická antibiotika
- syntetické** - chirální polyethery, methakrylátové polymery

**skupina:** makrocycly, polymery, malé molekuly

## typ převládající interakce:

- inkluze
- $\pi$ - $\pi$  interakce (doprovázené vodíkovou vazbou, stérickou repulzí)
- hydrofobní nebo polární interakce

# Chirální stacionární fáze

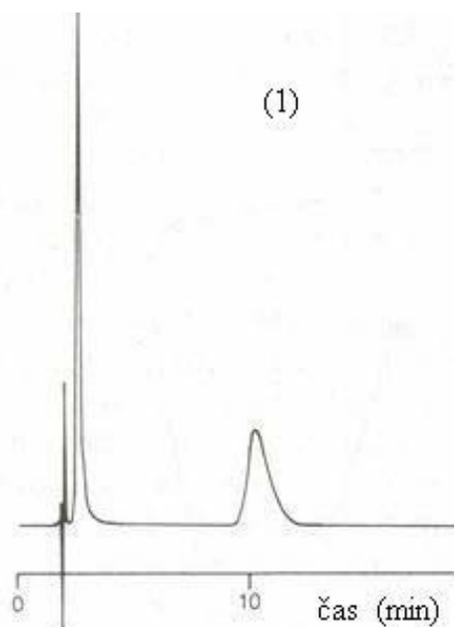
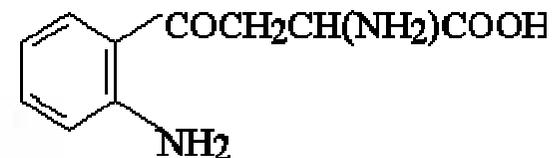
za poslední dvě desetiletí – několik stovek CSP  
200 je komerčně dostupných, řada z nich jak v analytickém,  
tak v semipreparativním až preparativním měřítku

- vyvinuté pro specifické enantioseparační účely (tailor-made)
- aplikovatelné pro široký okruh chirálních analytů
- Proteinové chirální stacionární fáze
- Pirklovy chirální stacionární fáze
- Polysacharidové chirální stacionární fáze
- Cyklodextrinové chirální stacionární fáze
- CSP na bázi makrocyclických antibiotik

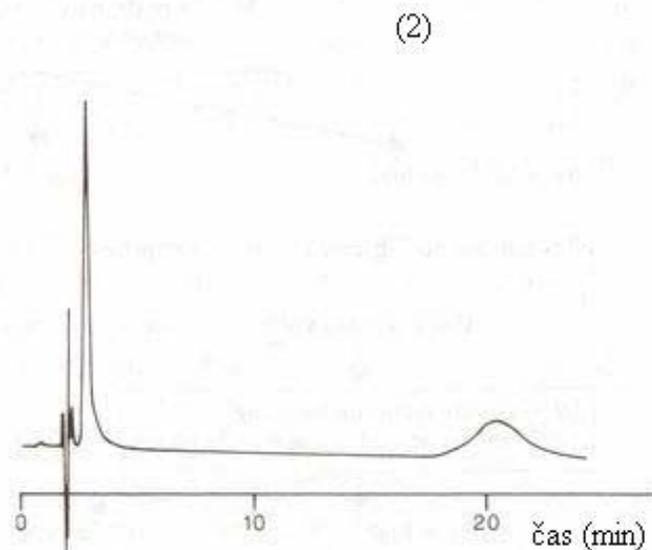
# Proteinové CSP

- přírodní proteiny navázané na silikagelové matrici
- lidský sérový albumin, hovězí sérový albumin,  $\alpha_1$ -kyselý glykoprotein, celobiohydrolasa –I (CHIRAL- HSA, BSA, AGP, CBH)
- velký počet chirálních center, řada vazebných míst
- reversní separační mód- organický modifikátor/vodný roztok pufru (vysoký obsah vodné složky)
- celková retence i chirální selektivita ovlivňována:
  - typ a koncentrace organického modifikátoru
  - iontová síla pufru a hodnota pH
- chirální rozlišení – hydrofobní interakce, vodíková vazba
- kyselé i bazické analyty

# Podmínky separace



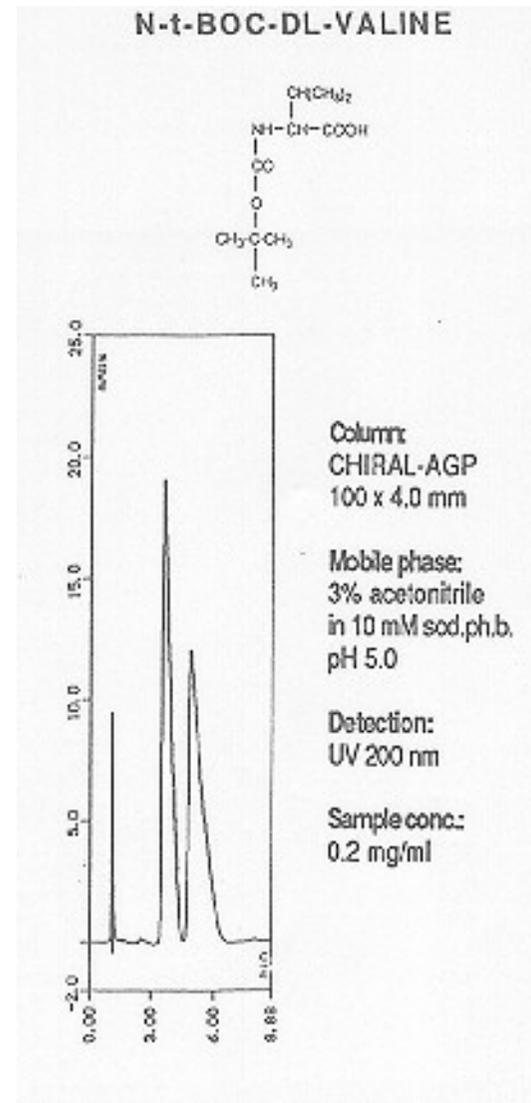
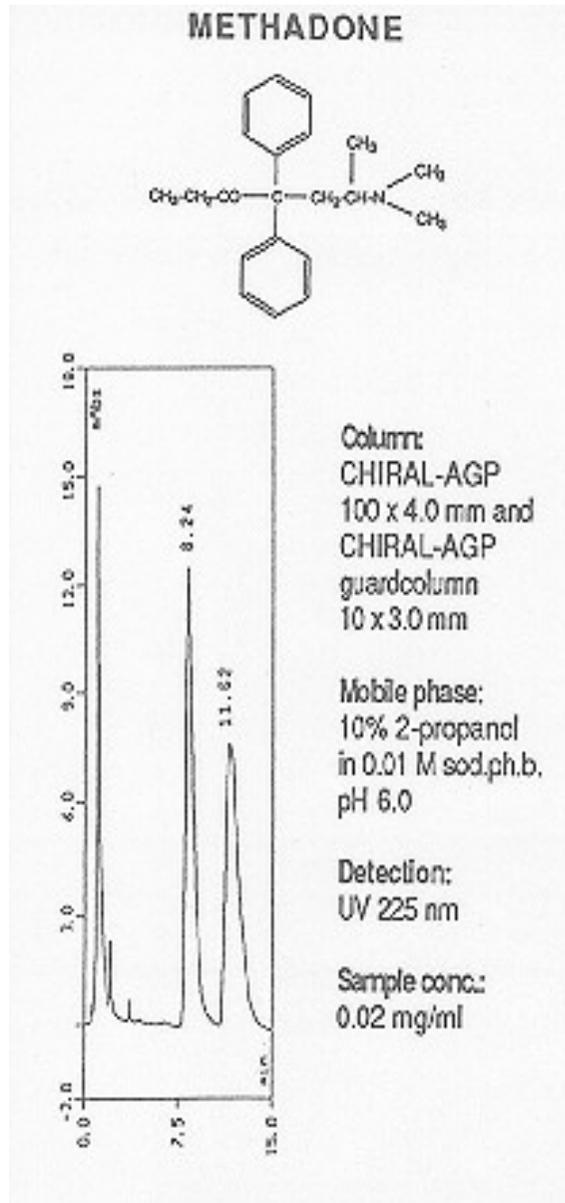
pH 7,1



pH 7,6

Separace D/L kynureninu, CHIRAL-HSA, 2 % propan-2-ol v 10 mM fosfátovém pufru  
(S. Allenmark, Chromatographic enantioseparation, kap. 7, Ellis Horwood, England, 1991)

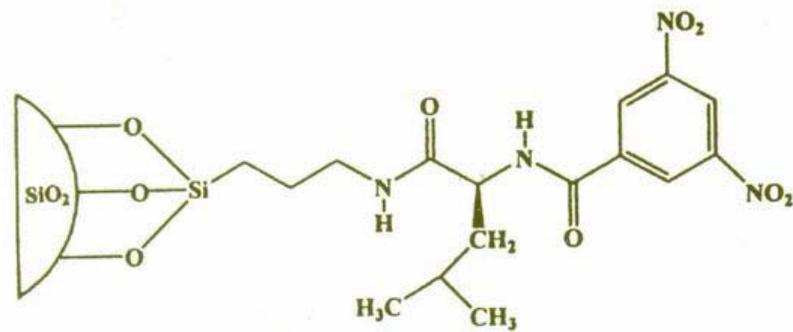
# Aplikace



# Pirklovy CSP

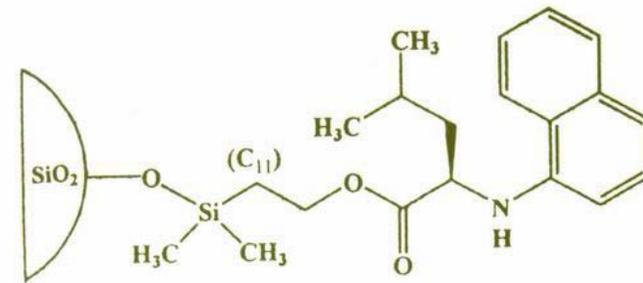
- malé molekuly, omezený počet chirálních center
- $\pi$ -elektron akceptor,  $\pi$ -elektron donor,  $\pi$ -elektron akceptor/ $\pi$ -elektron donor
- kombinace  $\pi$ - $\pi$  interakcí s vodíkovou vazbou (dipol-dipol interakce)
- normální separační mód (nepolární/polární rozpouštědlo)
- možnost záměny elučního pořadí enantiomerů

# $\pi$ -elektron akceptorové CSP $\pi$ -elektron donorové CSP



leucin

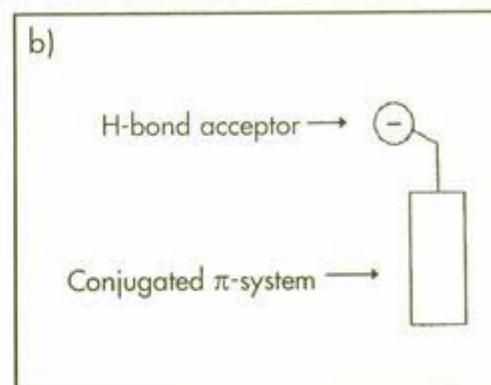
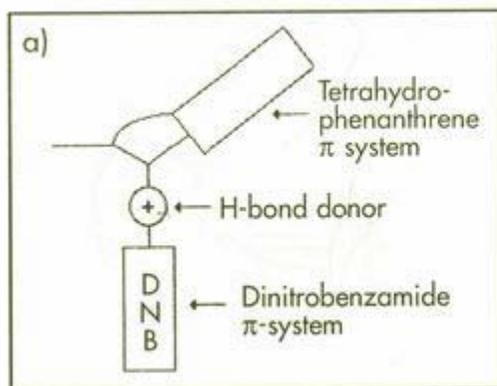
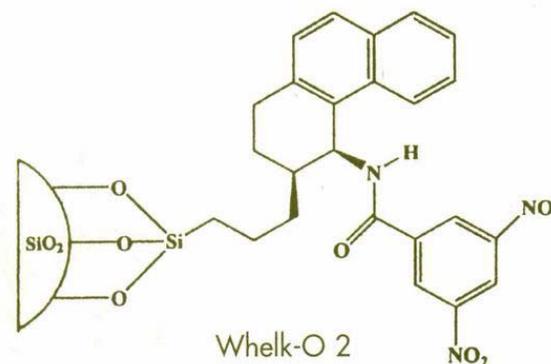
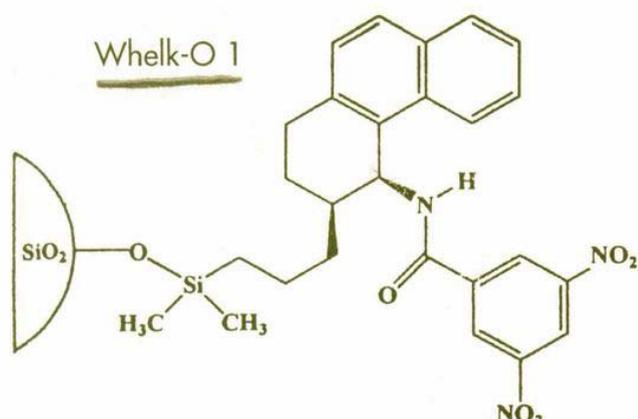
3,5-dinitrobenzoyl derivát leucinu  
nederivatizované analyty  
osahující  $\pi$ -donorovou skupinu



naftylleucin

N-1-(naftyl)derivát leucinu  
RP – DNB deriváty AA  
NP- estery, amidy DNB AA

# $\pi$ -elektron akceptorové/ $\pi$ -elektron donorové CSP

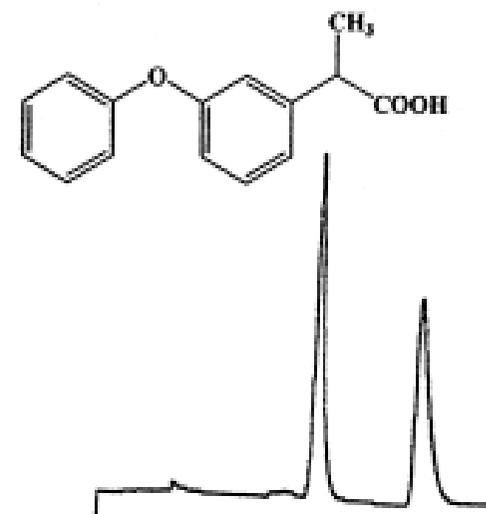


1-(3,5-dinitrobenzamido)-1,2,3,4-tetrahydrofenantren  
aldehedy, ketony, karboxylové kyseliny, profeny

# Aplikace

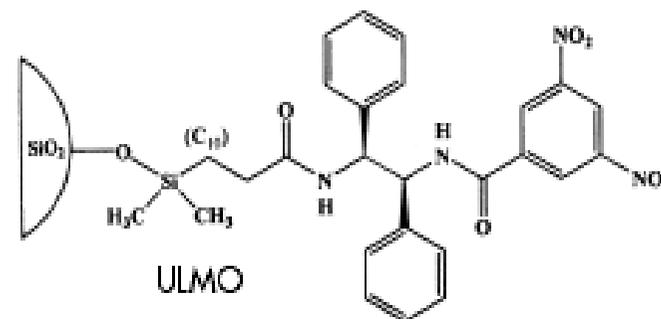
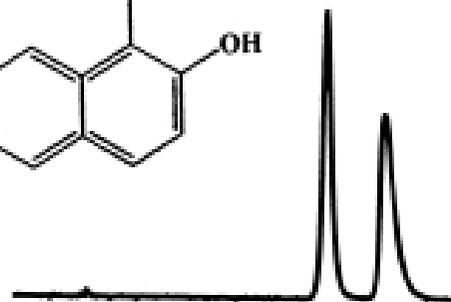
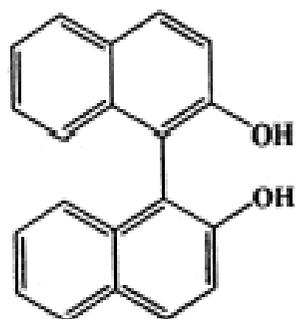
## Fenoprofen

Fenoprofen  
Column = (R,R)-Whelk-O 1  
25 cm x 4.6 mm  
Mobile Phase = (98/2)  
Hexane/IPA +  
0.1% Acetic Acid  
Flow Rate = 1.0 mL/min  
Detection = UV 254 nm  
Run Time = 14.5 min  
 $k'_1 = 2.62$   
 $\alpha = 1.66$   
reference 46



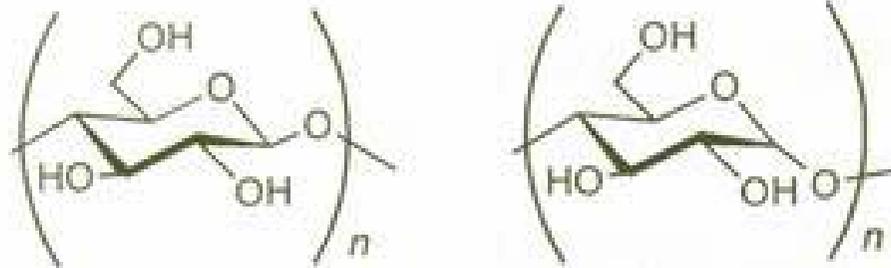
## 1,1'-Bi-2-Naphthol

1,1'-Bi-2-Naphthol  
Column = (S,S)-ULMO  
25 cm x 4.6 mm  
Mobile Phase = (98/2)  
Hexane/IPA + 0.1% TFA  
Flow Rate = 1.0 mL/min  
Detection = UV 254 nm  
Run Time = 18.0 min  
 $k'_1 = 4.84$   
 $\alpha = 1.24$   
reference 48

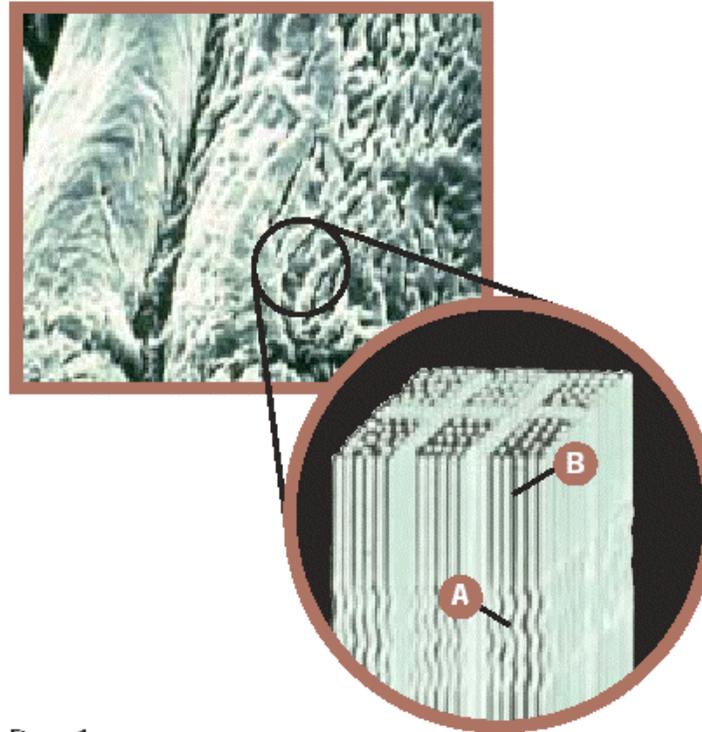


## Polysacharidové CSP

- opticky aktivní biopolymery (celulosa, amyloza) - opakující se jednotky D-glukosy
- přírodní polysacharidy- nízká separační účinnost



# Mikrokrystalická celuloza



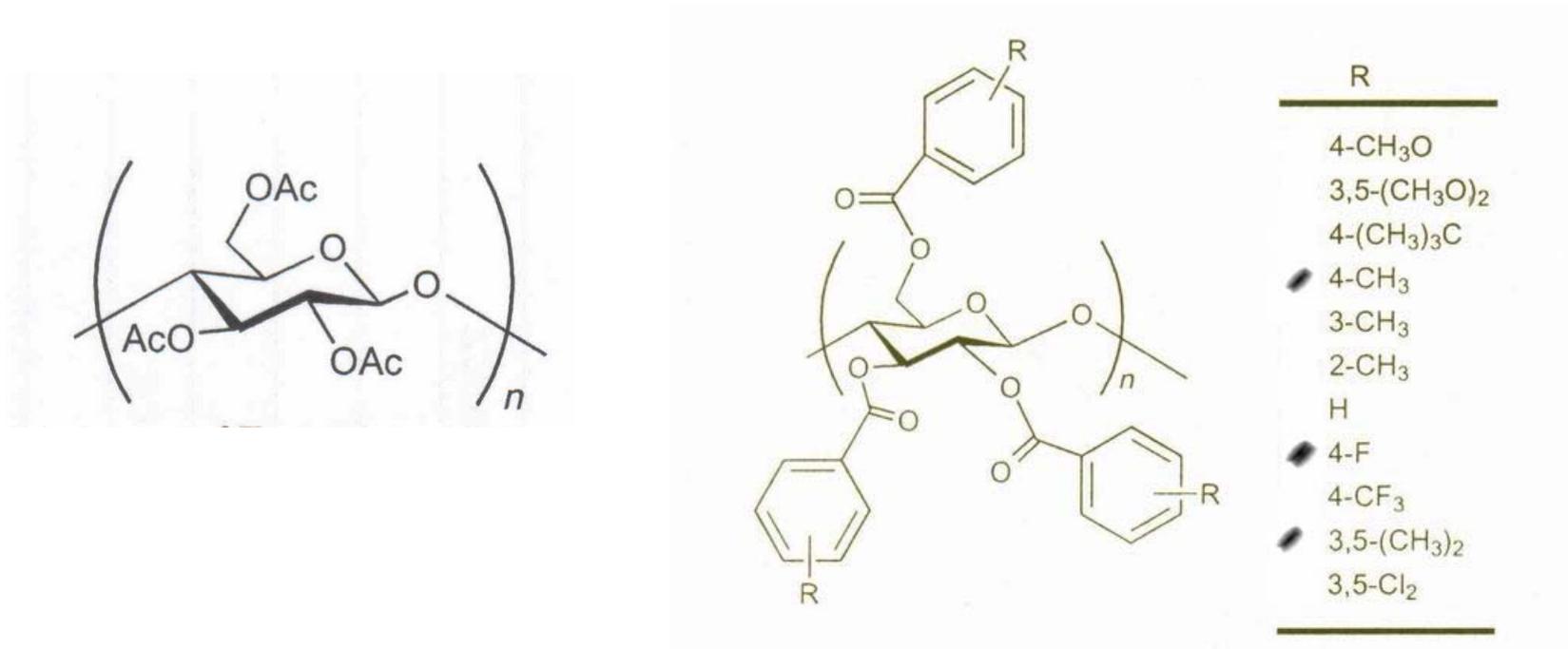
**Figure 1**

A. The **paracrystalline region**, an amorphous flexible mass of cellulose chains, and

B. The crystalline region, which is composed of tight **bundles of microfibrils** in a rigid linear arrangement.

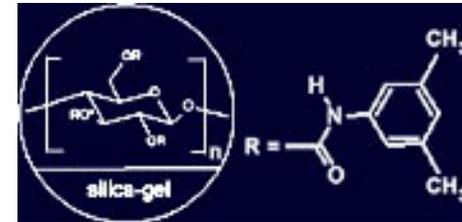
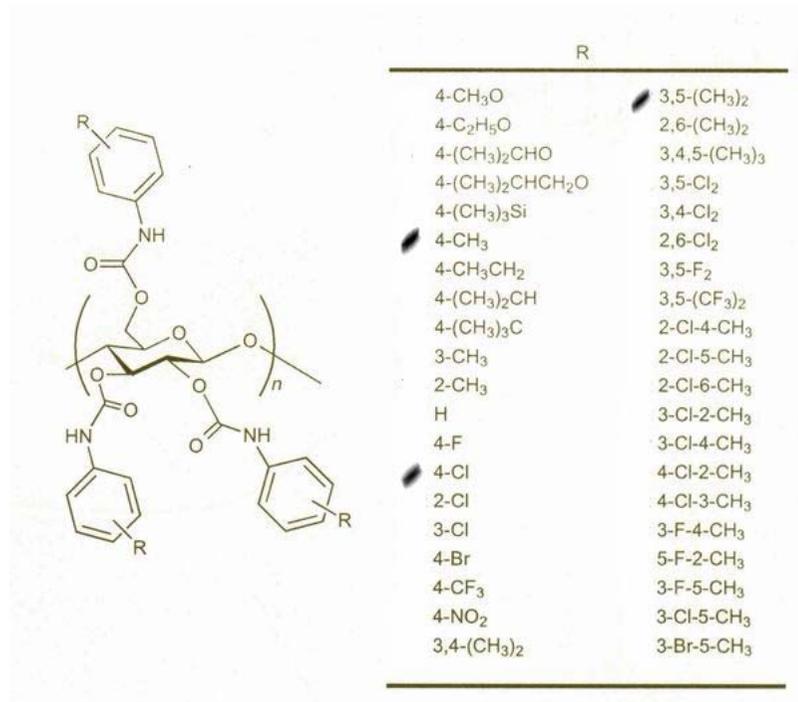
kyselá hydrolýza  
vyšší krystalinita - Avicel

# Deriváty celulosy a amylosy

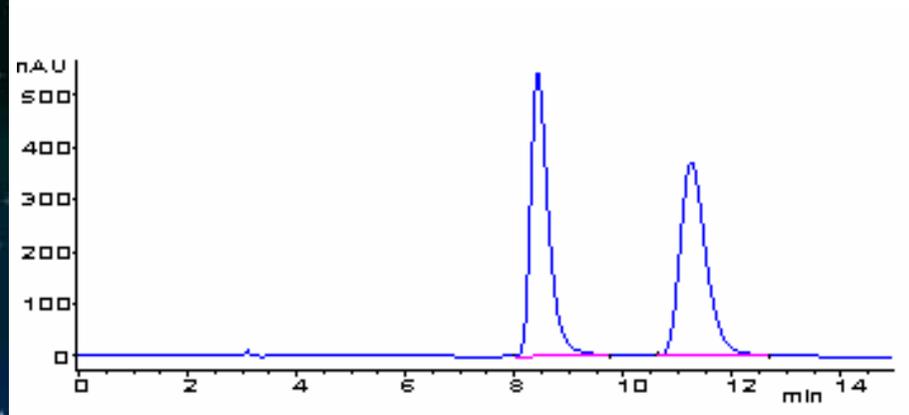
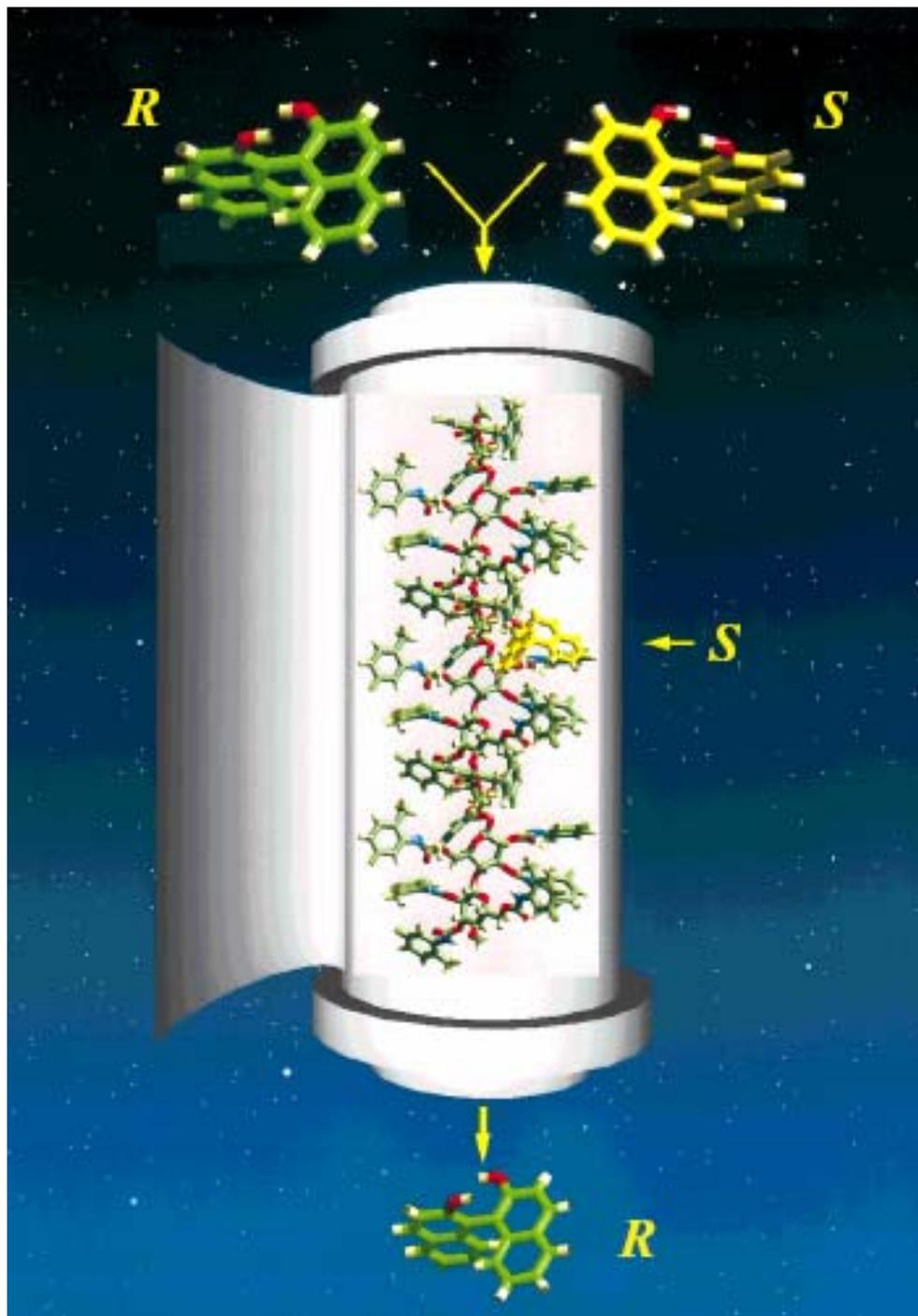


- navázány na silikagelové matrici
- triestery, triskarbamáty
- převážně normální separační mód
- více interakčních možností

# tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy (amylosy)



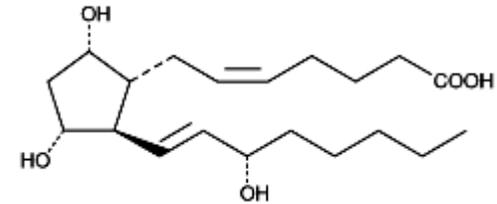
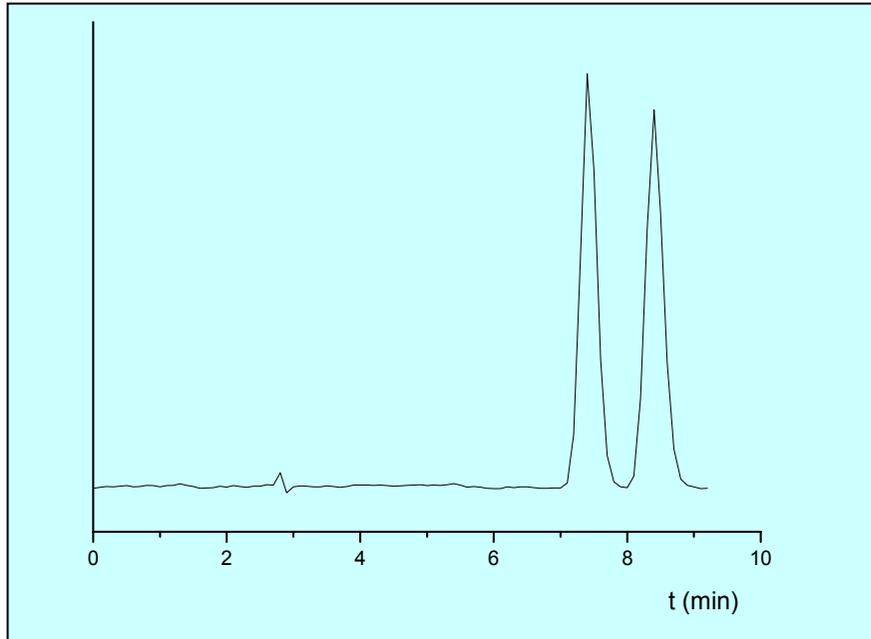
normální separační mód – široké spektrum aromatických analytů, s karbonylovou skupinou, s P jako stereogenním centrem  
 reversním separačním módu (neutrální, kyselá i bazická analyty)



CHIRALCEL® OJ-H
250*4.6 mm
70/30 n-hexane/2-propanol
Normal Phase
1
25
UV at 210 nm
0.005
8.42 / 11.25
1.81 / 2.75
1.52
3.98

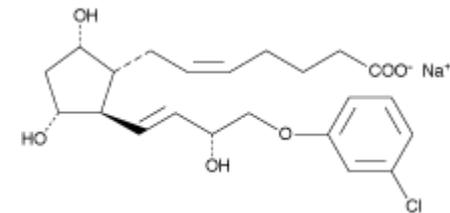
Tris(4-methylbenzoát) celulosy

# Aplikace



prostaglandin F<sub>2α</sub>

↓  
syntetický analog PGF<sub>2α</sub>



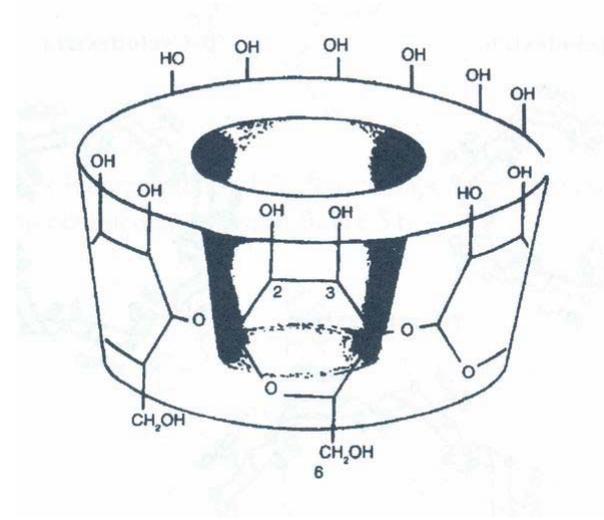
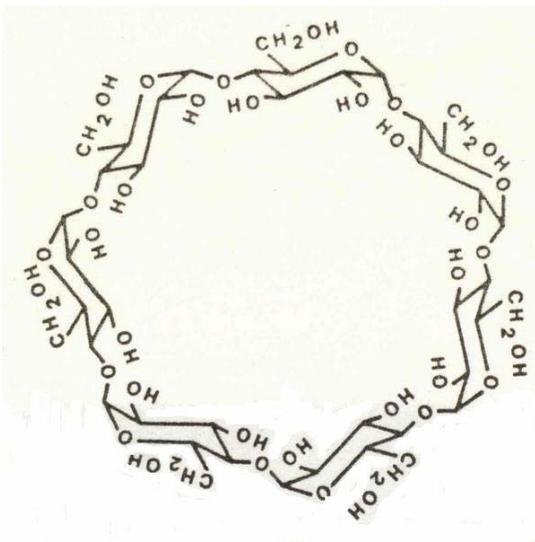
(±) kloprostamol

ACN/20mM fosfátový pufr, pH 3; 33/67 (v/v), 0,7ml/min, 274nm, kolona termostatována při 20 °C, Chiracel OD-RH kolona

$k_1 = 1,63$ ;  $k_2 = 1,98$ ;  $R = 2,16$ ;  $\alpha = 1,21$

# Cyklodextrinové CSP

- cyklické oligosacharidy vznikající enzymatickou degradací škrobu členy 6 - 12 jednotek
- praktický význam – členy s 6 - 8 glukopyranosovými jed.



cyklodextrin	počet gluk. jed.	Mr	průměr kavity (nm)	rozpuštnost ve vodě (g/100 mL)
$\alpha$	6	972	0,57	14,5
$\beta$	7	1135	0,78	1,8
$\gamma$	8	1297	0,95	23,2

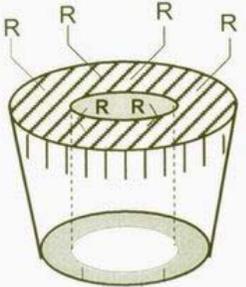
# Retenční mechanismus



## tři separační módy

- reversní - organický modifikátor/vodný roztok pufrů
- normální - nepolární/polární rozpouštědlo
- polárně-organický -  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HAc}/\text{TEA}$

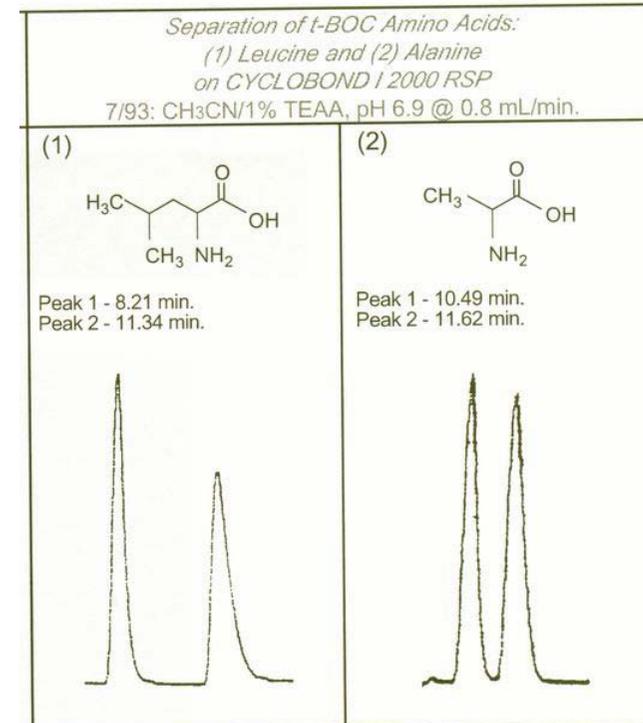
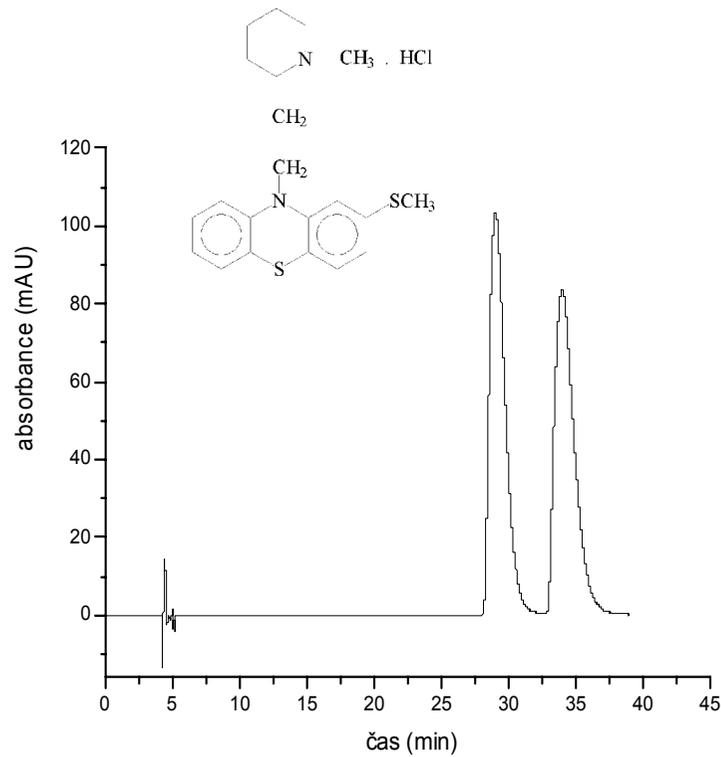
# Deriváty cyklodextrinu



R=	CYCLOBOND
$-\text{OCH}_3$	DM
$-\text{COCH}_3$	AC
$-\text{CH}_2\overset{\text{OH}}{\underset{*}{\text{C}}}\text{HCH}_3$	SP nebo RSP
$-\text{CONH}\overset{\text{CH}_3}{\underset{*}{\text{C}}}\text{H}-\text{C}_6\text{H}_4$	RN nebo SN
$-\text{CONH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)_2$	DMP

- změna některých fyzikálně-chemických parametrů
- nová interakční místa na derivační skupině, (stereogenní centrum)
- širší okruh separovatelných analytů

# Aplikace



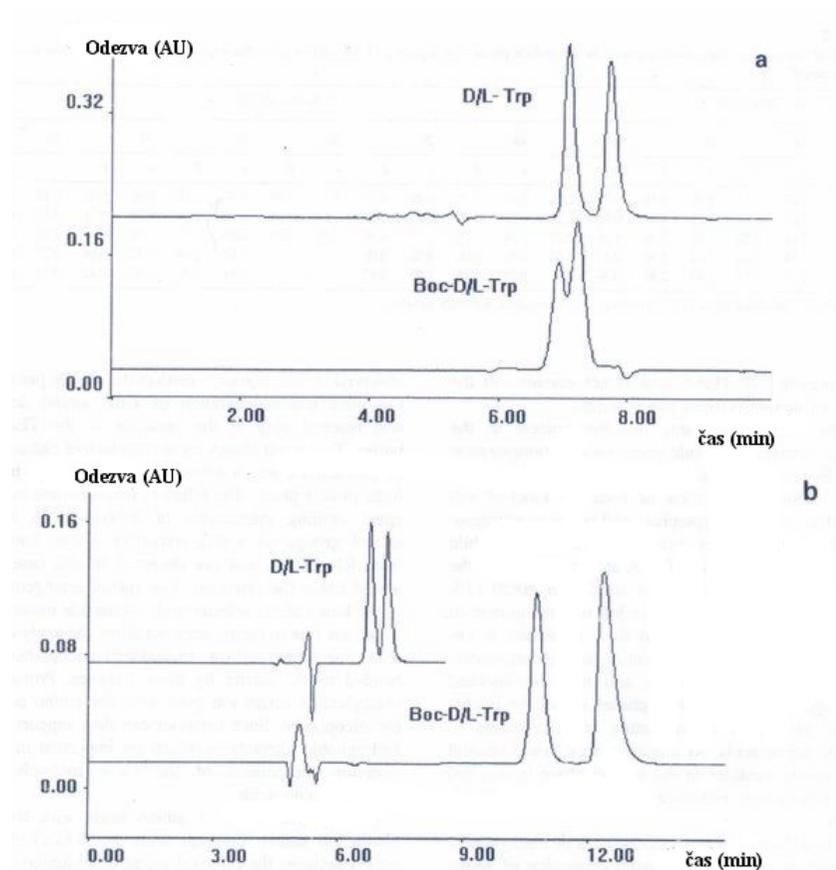
Chromatogram enantioseparace thioridazinu za podmínek:  $\beta$ -cyklodextrinová CSP  
mobilní fáze ACN/1%TEAA pH=4,1, 20:80 (v/v)  
0,7 ml/min, 254 nm.

## CSP na bázi makrocyclických antibiotik

- 1994 prof. D.W. Armstrong -makrocyclická antibiotika- ansamyciny a glykopeptidy
- glykopeptidy -vankomycin, teikoplanin, ristocetin A, avoparcin – fermentační produkty bakterií

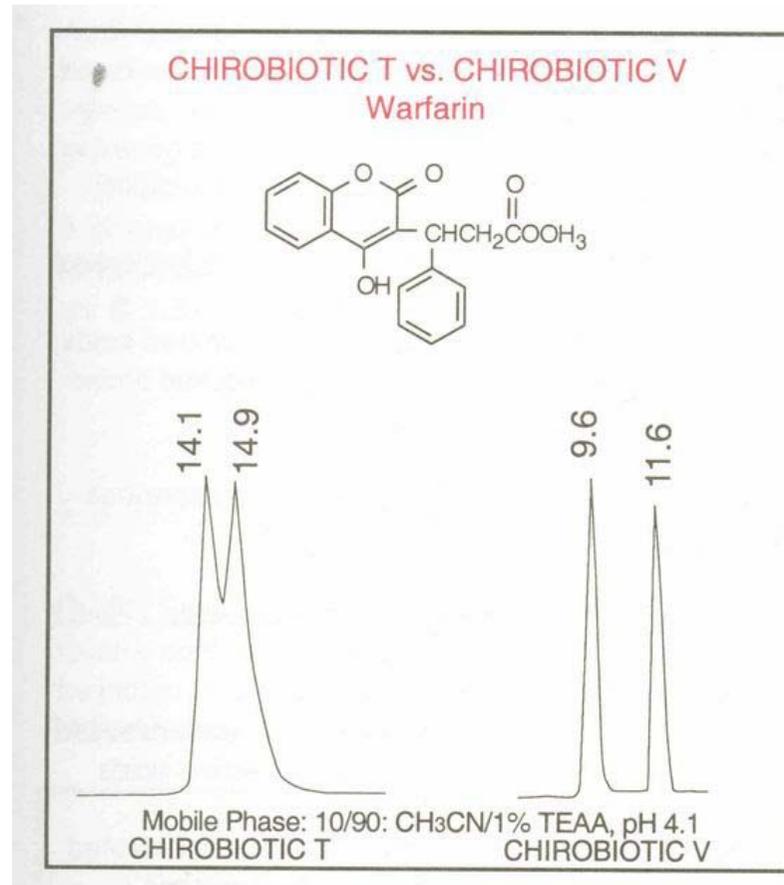


# Enantioseparace aminokyselin a jejich *N-t*-Boc-analogů



Teikoplaninová CSP, m.f. ACN/1% TEAA, pH 4,1; a) 60:40 v/v,  
b) 20:80 v/v; 0,6 ml/min, 255 nm

# Chirobiotic T vs Chirobiotic V

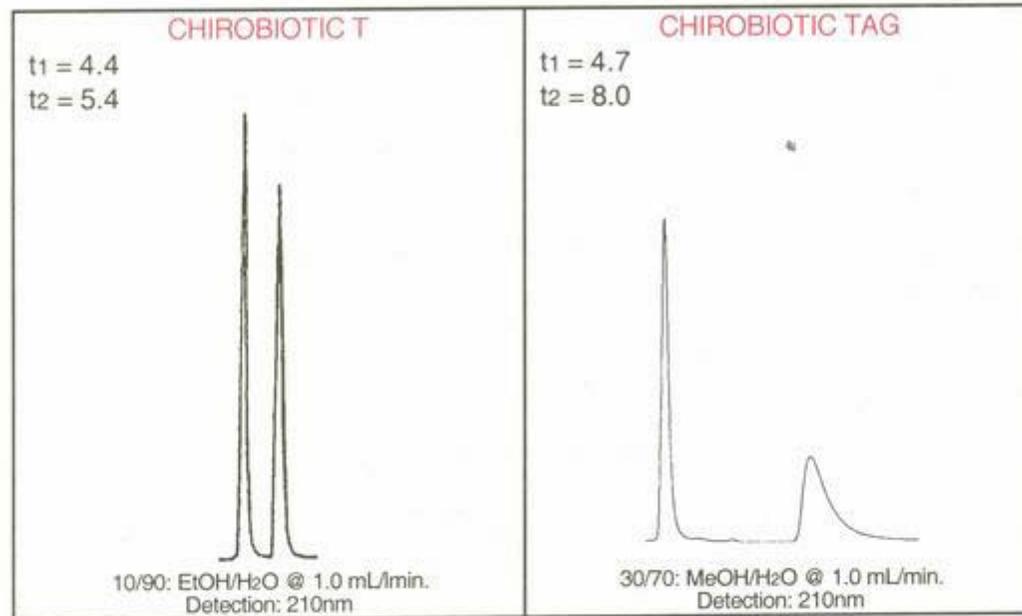


komplementární charakter MA  
modifikované glykopeptidy –

teikoplanin- aglykon

# Chirobiotic T vs Chirobiotic TAG

Separace D, L-methioninu

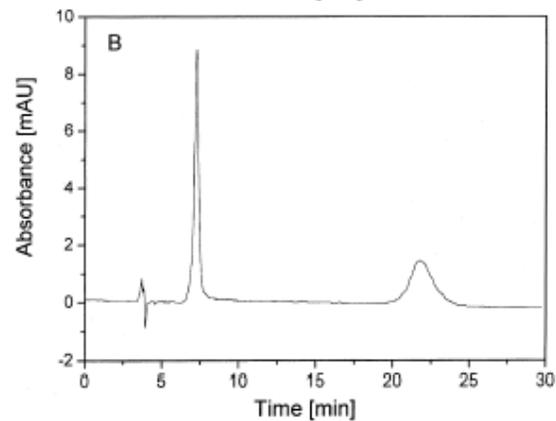
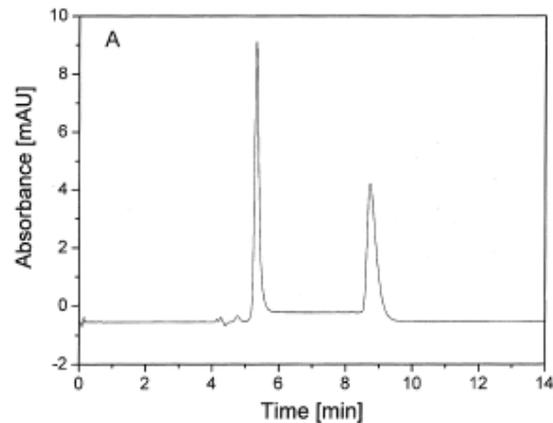


modifikované glykopeptidy      teikoplanin-aglykon

separace nederivatizovaných D, L-aminokyselin

FMOC-, dansyl- t-BOC- derivátů aminokyselin

# Deriváty fenothiazinů a benzodiazepinů



Lorazepam

A) teikoplaninová CSP, ( $R= 4,0$ )

B) tekoplanin-aglykonová CSP ( $R =9,0$ )

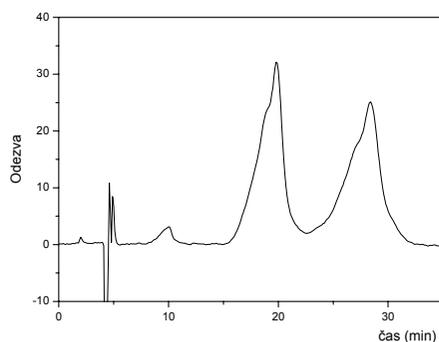
80:20 MeOH/1% TEAA, pH 4,1,

# Optimalizace separace

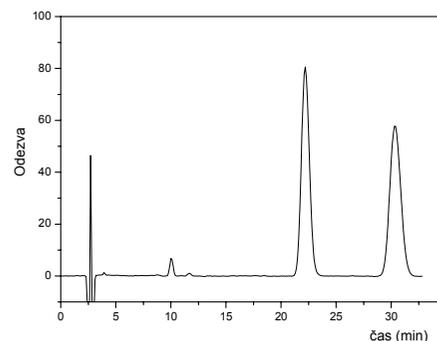
- výběr chirálního selektoru (způsob navázání na silikagelový nosič)
- složení mobilní fáze (typ a obsah organického modifikátoru, typ a koncentrace pufru, hodnota pH)
- teplota

# Enantioseparace disubstituovaných binaftylů

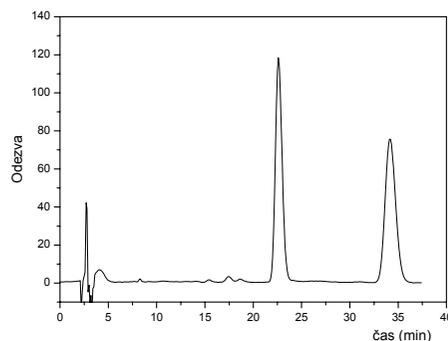
8-acetylamino-3'-hydroxy-1,2'-binaftyl



Cyclobond I, 40/60 (v/v)  
MeOH/voda, 0,7 ml/min, 254 nm



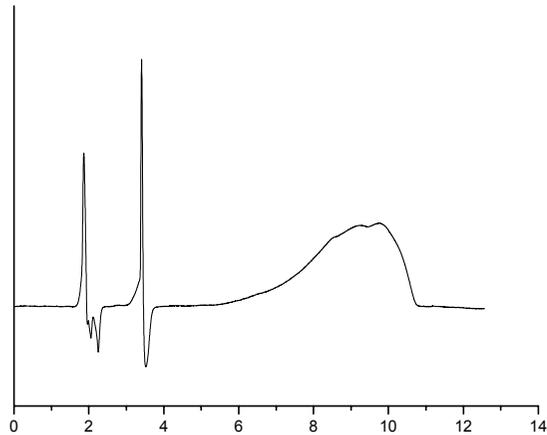
Chiracel OD-RH, 40:60 (v/v)  
ACN/voda, 0,7 ml/min, 254 nm



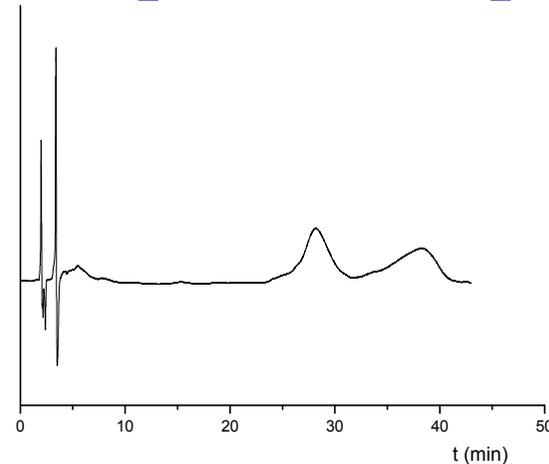
3-karboxy-2-amino-2'-hydroxy-1,1'-binaftyl

Chiracel OD-RH, 40/60 (v/v) ACN/20 mM  
fosf. pufr, pH 3,0, 0,7 ml/min, 254 nm

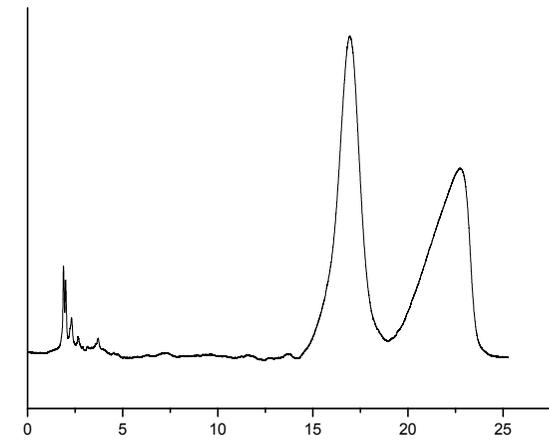
# Enantioseparace kloprostenolu



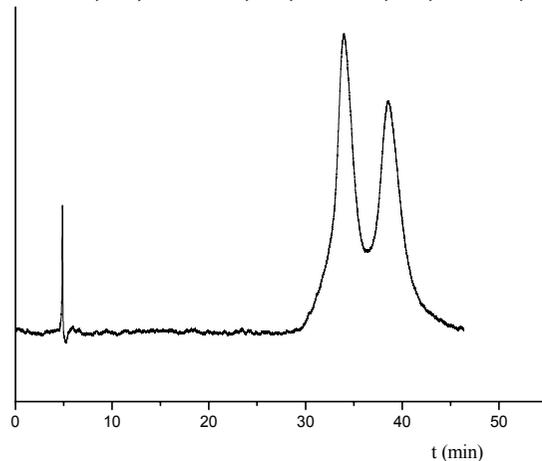
IPA/hex/MeOH 10/60/30 (v/v/v),  
1 ml/min, 276 nm, laboratorní teplota,  
TAG CSP  
 $k_1 = 3,77$ ;  $k_2 = 4,02$ ;  $R = 0,22$ ;  $\alpha = 1,07$



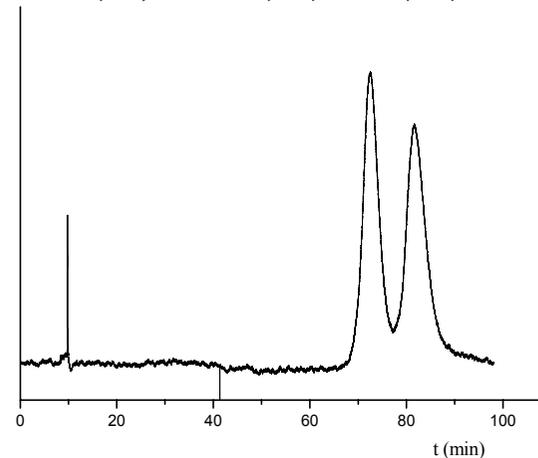
IPA/hex/MeOH/TEA 15/60/25/0,5 (v/v/v/v),  
1 ml/min, 276 nm, laboratorní teplota, TAG  
CSP  
 $k_1 = 12,71$ ;  $k_2 = 17,65$ ;  $R = 2,05$ ;  $\alpha = 1,39$



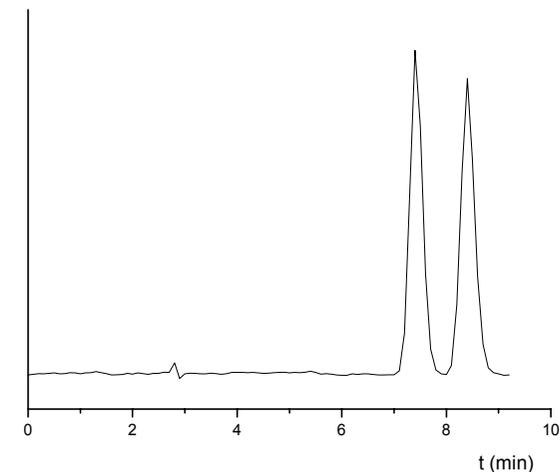
IPA/hex/MeOH/TEA 10/60/30/1,1  
(v/v/v/v), 1 ml/min, 276 nm, laboratorní  
teplota, TAG CSP  
 $k_1 = 6,97$ ;  $k_2 = 9,69$ ;  $R = 1,86$ ;  $\alpha = 1,39$



ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,1/0,1  
(v/v/v/v), 0,6 ml/min, laboratorní  
teplota, TAG CSP,  
 $k_1 = 5,99$ ;  $k_2 = 6,95$ ;  $R = 1,22$ ;  $\alpha = 1,16$



2 kolony zapojené za sebou  
 $k_1 = 7,33$ ;  $k_2 = 8,36$ ;  $R = 1,35$ ;  $\alpha = 1,14$



ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3; 33/67 (v/v),  
0,7 ml/min, 274 nm, kolona termostatována při  
20 °C, Chiracel OD-RH kolona  
 $k_1 = 1,63$ ;  $k_2 = 1,98$ ;  $R = 2,16$ ;  $\alpha = 1,21$

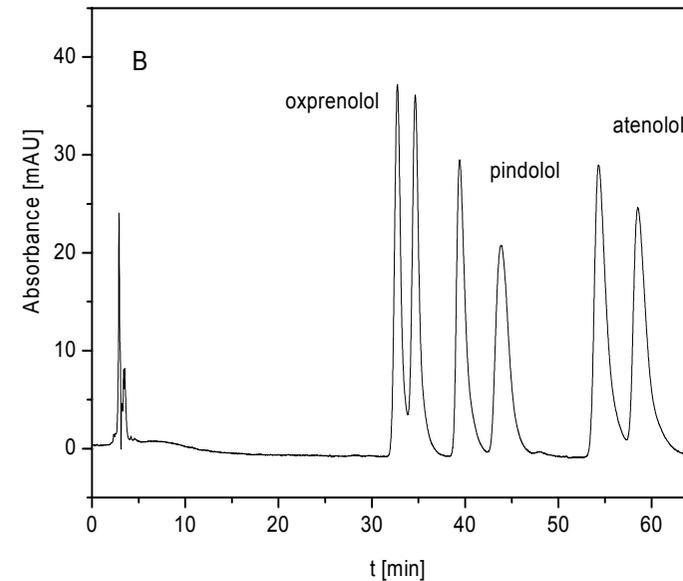
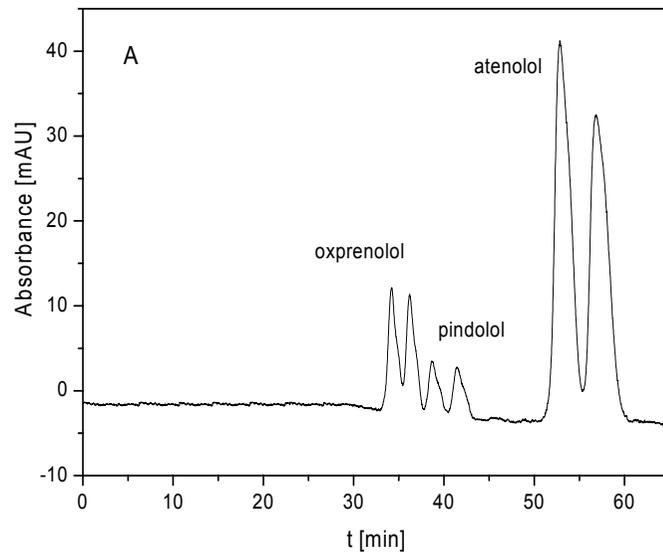
## Nové přístupy

- zavedení nových chirálních selektorů (karbamát chininu)
- modifikace již s úspěchem používaných CS (cyklodextriny, polysacharidy, glykopeptidy)
- inovace ve způsobu navázání CS k silikagelové matici
- vývoj směsných stacionárních fází (kombinace dvou různých chirálních selektorů navázaných na nosiči, např. HSA a AGP)

# Nové přístupy

## Reverzní separační mód

zvýšení obsahu MeOH – k zvýšení retence (50 – 90 obj. %)  
retence všech derivátů vyšší na koloně s vyšším pokrytím

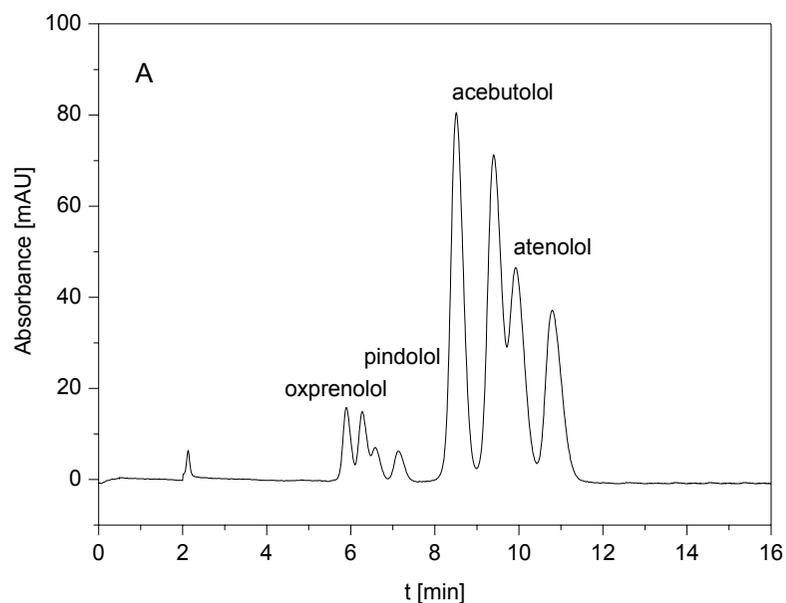


A) Chirobiotic V, (0,7 ml/min) B) Chirobiotic V2, (1 ml/min);  
90/10 (v/v) MeOH/0,1% TEAA, pH 5,0; 230 nm

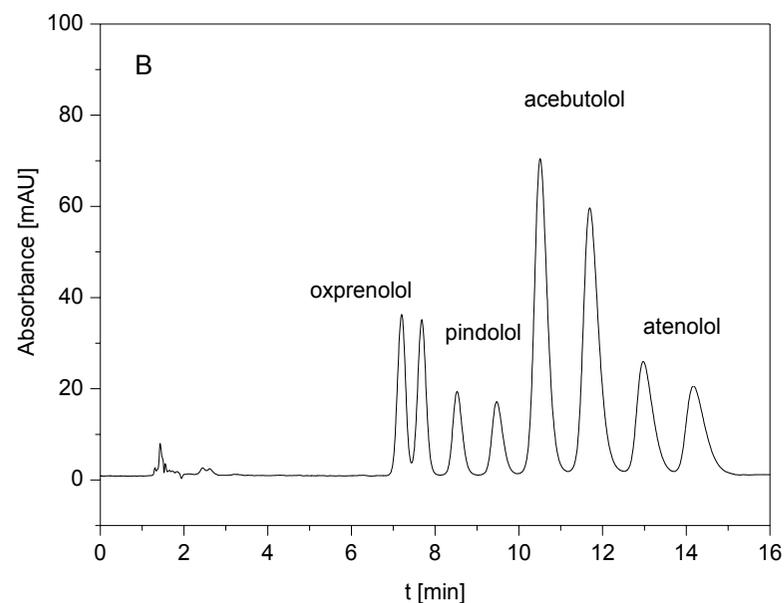
# Nové přístupy

- vyšší pokrytí matrice chirálním selektorem

Chirobiotic V



Chirobiotic V2



Separace vybraných beta-blokátorů; mobilní fáze MeOH/TEA/HAc  
100/0.02/0.02 (v/v/v), 2.0 ml·min<sup>-1</sup>, UV 230 nm.

- preparativní kolony (kapacita kolon, toxicita rozpouštědla, recyklovatelnost)

## Improved Resolution and Capacity CHIROBIOTIC V2

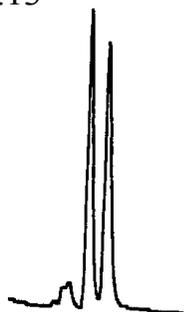
- **Sample:** Basic compound

### Analytical Separation

Peak 1: 10.51 min

Peak 2: 11.53 min

$\alpha$  -1.13



CHIROBIOTIC V (250x4.6 mm)

100/0.2/0.1 MeOH/HOAc/TEA

0.9 mL/min

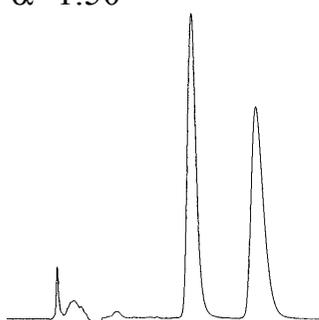
Injection: 10mg

### Analytical Separation

Peak 1: 8.83 min

Peak 2: 11.76 min

$\alpha$  -1.50



CHIROBIOTIC V2 (250x4.6 mm)

100/0.5/0.5 MeOH/HOAc/TEA

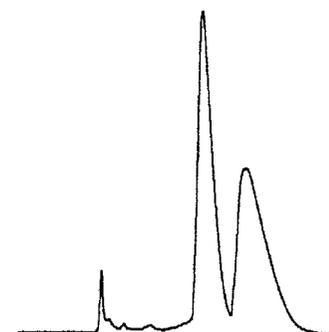
1.0 mL/min

Injection: 50mg

### Preparative Separation

Peak 1: 10.22 min

Peak 2: 12.54 min



CHIROBIOTIC V2 (250x21.2 mm)

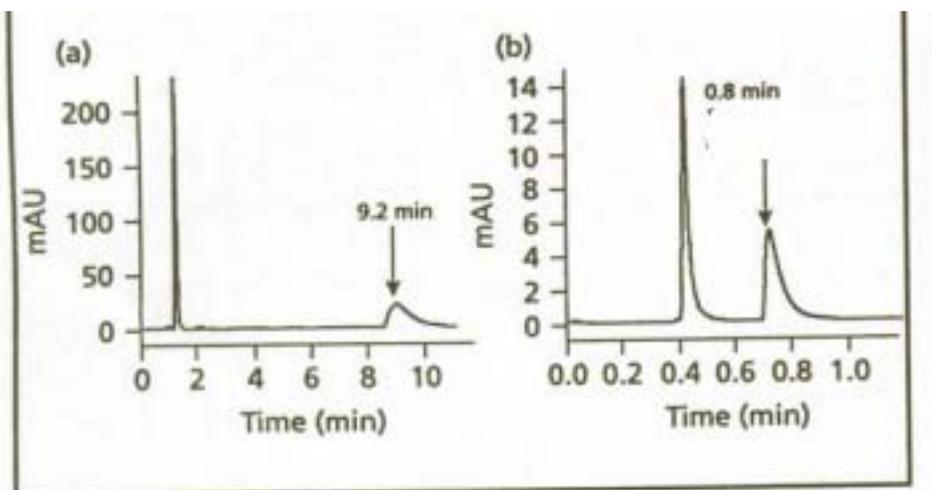
100/0.5/0.5 MeOH/HOAc/TEA

15.0 mL/min

Injection: 140mg

Aplikace ASTEC

- nové matrice – oxid zirkoničitý (porézní, neporézní)



DNB-L-Leu CSP a) porézní

b) neporézní ZrO<sub>2</sub>; m. f. 99/1 hexan/IPA, ester naftylleucinu  
(ZirChrom Separation, USA)

# Miniaturizace -enantioseparace metodou kapilární kapalinové chromatografie

## Miniaturizace

- malé objemy vzorků
- malá spotřeba mobilní fáze ( šetrnější k životnímu prostředí, drahá aditiva)
- možnost porovnat interakci chirálního analytu s chirálním selektorem vázaným/volným
- stacionární fáze – malá spotřeba sorbentu x kapilární kolony (I.D.< 1 mm) s chirální stacionární fází nejsou komerčně dostupné

# Experimentální podmínky

Kapilární kolony 22,5 cm x 320  $\mu\text{m}$  – 5  $\mu\text{m}$  Chirobiotic T, Chirobiotic V, Chirobiotic TAG (Ing. Planeta Ústav analytické chemie, Brno)

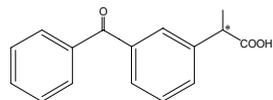
přídavek chirálního selektoru do mobilní fáze (vankomycin, teikoplanin)

$\beta$ -blokátory, NSAID profeny, chlorofenoxypropanové kyseliny (CPPA)

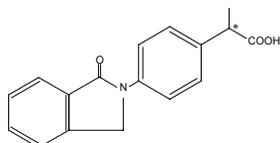
reversní separační mód ( $\beta$ -blokátory, profeny, CPPA)

polárně-organický separační mód ( $\beta$ -blokátory)

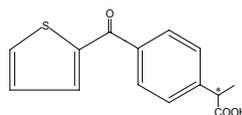
# HPLC vs CLC



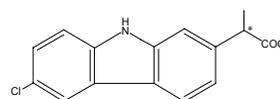
ketoprofen



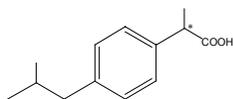
Indoprofen



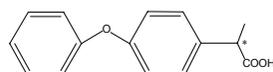
suprofen



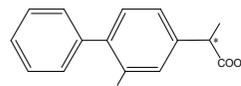
carprofen



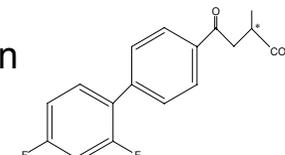
ibuprofen



fenoprofen



flurbiprofen

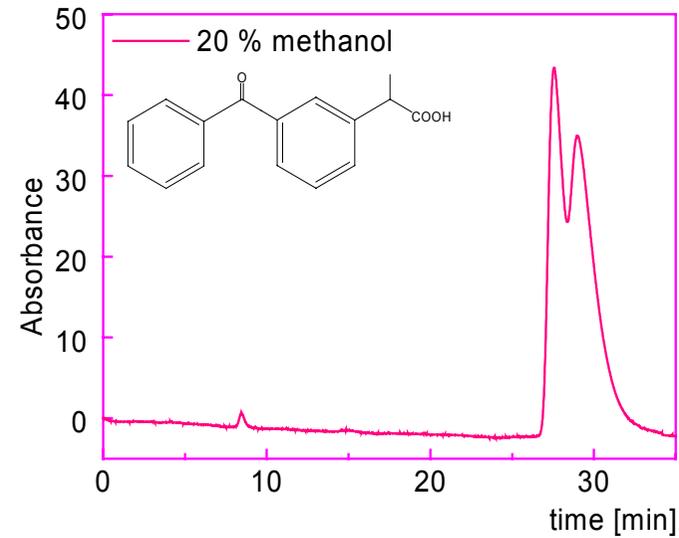
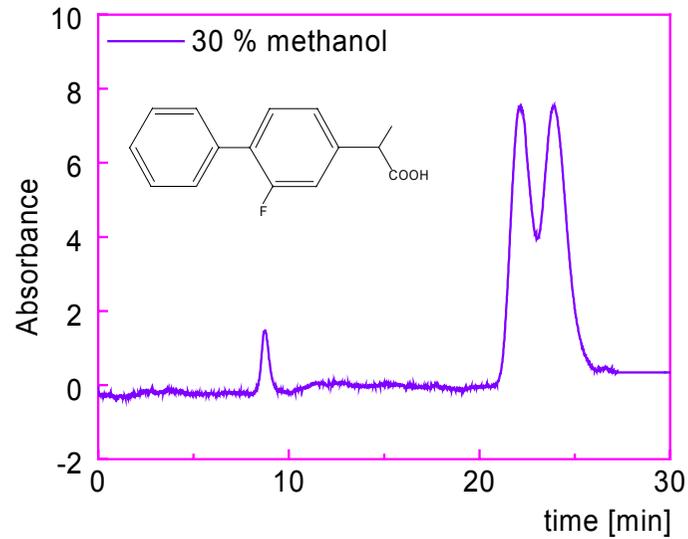


flobufen

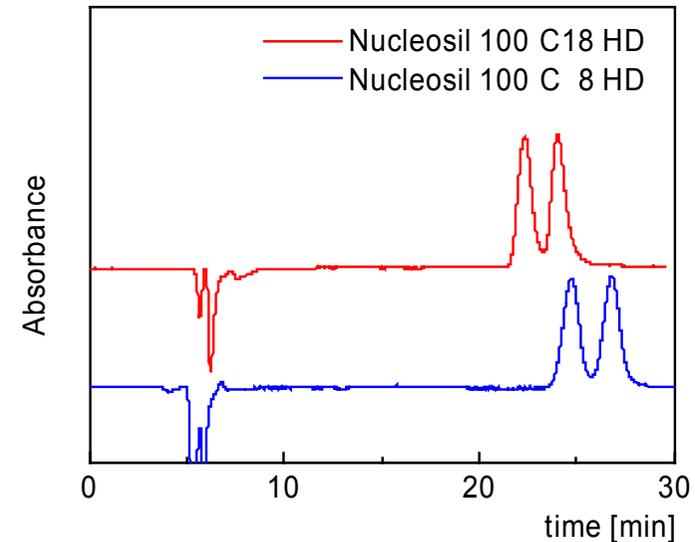
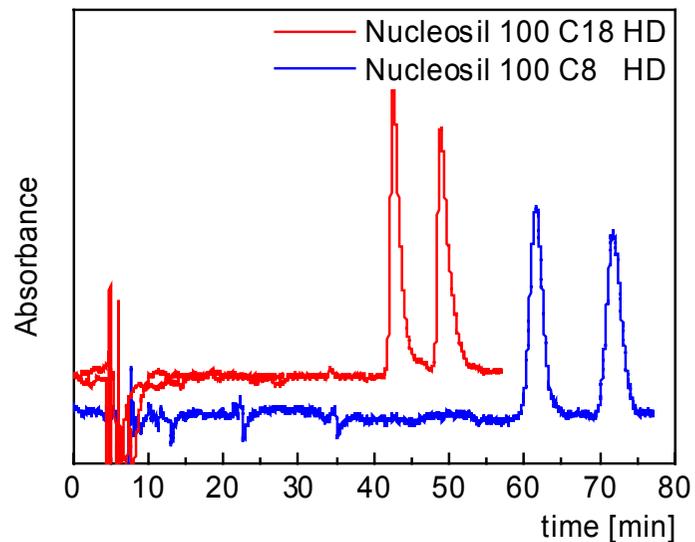
Počet teoretických pater na metr kolony ( $N_1$ ,  $N_2$ ), selektivita ( $\alpha$ ) a rozlišení ( $R$ ) v systému HPLC a CLC. Stacionární fáze: navázaný teikoplanin-aglykon. Mobilní fáze: MeOH/1,0% TEAA pH 4,0, 40/60 (v/v) 270 nm.

	HPLC (0,7ml/min)				CLC (6 $\mu$ l/min)			
	$N_1$	$N_2$	$\alpha$	$R_{1,2}$	$N_1$	$N_2$	$\alpha$	$R_{1,2}$
*Ibu	3420	2824	1,11	0,51	18938	10297	1,09	0,83
*Ind	6167	2842	1,14	0,80	8967	7735	1,11	1,05
*Fen	2245		1,00	0,00	8820		1,00	0,00
*Car	7876	1663	1,08	0,32	17145	5374	1,08	0,69
*Flu	4052	1995	1,16	0,78	11159	5058	1,13	1,19
Ket	1693		1,00	0,00	66239	26435	1,05	0,55
Sup	4115	1685	1,17	1,11	10025	5835	1,13	1,29
Flo	7818	2612	1,07	0,29	21285	8662	1,07	0,81

\*230 nm



Enantioseparace flurbiprofenu a ketoprofenu, vankomycinová CSP, MeOH/0,1% TEAA, pH 5,0; 3  $\mu$ l/min, 270 nm



kolona 25 cm x 300 $\mu$ m, 5 $\mu$ m, 50/50 MeOH/0,1% TEAA, pH 5,0+ 4mM vankomycin, 3 $\mu$ l/min, 270 nm

Děkuji za pozornost