OBSAH

1. **Chirální organické sloučeniny - přehled typů a jejich názvosloví 3**

   Mgr. Jiří Kroutil, Ph.D.

2. **Chirální chování v přírodě a chirální separace 13**

   doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

3. **Chirální separace v plynové chromatografii 21**

   RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

4. **Enantioselektivní separace v HPLC 31**

   doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

5. **Studium interakčních mechanismů v separačních systémech - LFER 38**

   RNDr. Jana Lokajová, Mgr. Květa Kalíková a doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

6. **Kapilárna elektroforéza v analýze opticky aktivních látok 47**

   RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D., RNDr. Jan Petr, MSc. Joanna Znaleziona, prof. RNDr. Juraj Ševčík, Ph.D.

7. **Capillary zone electrophoresis as a suitable technique for studying the interactions between analytes and (chiral) selectors 56**

   RNDr. Kateřina Ušelová, PhD., RNDr. Iva Zusková, CSc.

8. **Chiroptické spektroskopie ve strukturní chemii 63**

   Ing. Petr Maloň,CSc.

9. **Spektroskopie vibračního cirkulárního dichroismu 69**

   doc. RNDr. Marie Urbanová, CSc.

10. **Výpočty chirálních vlastností molekul a simulace spekter 83**

    doc. RNDr. Petr Bouř, CSc.

11. **Ramanova optická aktivita – proč a nač ? 97**

    doc. RNDr. Vladimír Baumruk, DrSc.

12. **Využiti CD spektroskopie při studiu konformačních vlastností DNA 107**

    doc. RNDr. Michaela Vorlíčková, DrSc., RNDr. Jaroslav Kypr, CSc.

1. CHIRÁLNÍ ORGANICKÉ SLOUČENINY – PŘEHLED TYPŮ A JEJICH NÁZVOSLOVÍ

RNDr. Jiří Kroutil, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra organické a jaderné chemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2
kroutil@natur.cuni.cz

Chiralita je jedním ze základních fenoménů, který organické molekuly vhodné konstituce mohou vykazovat. Projevuje se existencí dvou konstitučně identických molekul (enantiomerů), které se liší pouze ve vzájemném uspořádání atomů a vazeb v prostoru. Nutné podmínky v konstituci vyžadované pro existenci chirality jsou lehce splnitelné pro většinu jednoduchých a pro téměř všechny složitější organické deriváty, a tak není překvapující, že většina přírodních látek představuje chirální sloučeniny. To mj. komplikuje jejich separaci a identifikaci a ústí v rozdílné chemické, biologické a farmakologické vlastnosti enantiomerů.

Tato přednáška se bude věnovat prostorové izomerii organických molekul z pohledu její nejvýznačnější části – chirálních stereoizomerů. Vychází ze dvou Doporučení komise IUPAC (cit.[1,2]), které upravují definice a správné používaní pojmů ze stereochemie (organických sloučenin).

Každý z vás je jistě seznámen s existencí pojmů **opticky aktivní**, **chirální** nebo (**a**)**symetrický**. Používají se pro označení prostorového uspořádání atomů v molekulách a velice často se nesprávně vzájemně zaměňují.

1.1 Chiralita, symetrie, optická aktivita – definice a vzájemný vztah

Organická chemie popisuje strukturu organických molekul hierarchickým způsobem. Při uvažování pouze určitého (omezeného) množství znalostí o struktuře můžeme popsat tuto strukturu pouze na určité úrovni. S hierarickým popisem sruktury velmi úzce souvisí jev **izomerie**, tj. situace, kdy mají dvě molekuly stejné složení (strukturu) na nižší úrovni a ve vyšší(ch) se liší. Z tohoto pohledu se **stereoizomery** liší prostorovým uspořádáním atomů a vazeb, zatímco jejich konstituce (počet a typ atomů a chemických vazeb) je stejná.

Příklad: cis-1,2-dichlorcyklobutan a *trans*-1,3-dichlorcyklobutan jsou konstituční izomery a ne stereoizomery, přestože mají různé prostorové uspořádání atomů a vazeb.

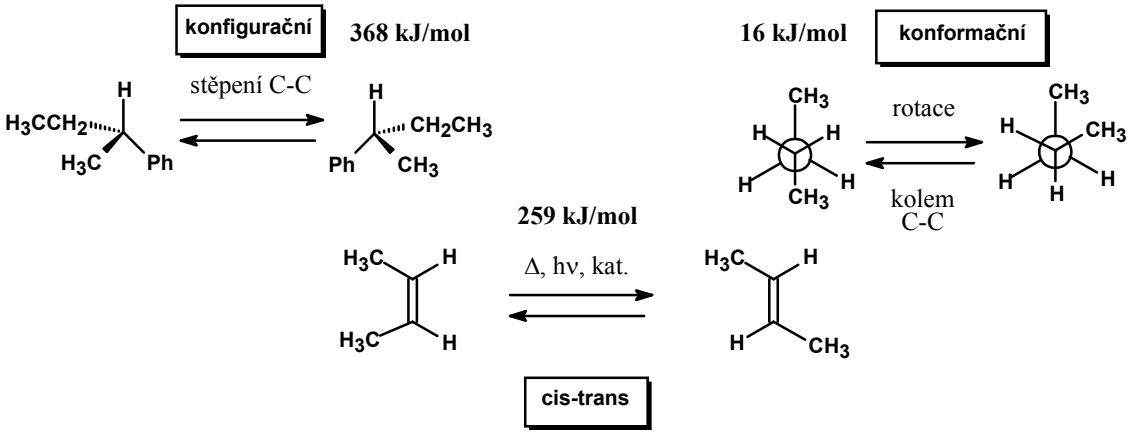
Existence stereoizomerů vyžaduje, aby v molekule organické sloučeniny byly přítomny určité strukturní motivy, zvané **stereogenní prvky** (definice viz cit. [1]). Stereoizomerie potom znamená, že pro jednu konstituci existuje více než jedna možnost, jak atomy v prostoru rozmístit. Změna prostorového uspořádání atomů (přeměna jednoho stereoizomeru na jiný) je principiálně dvojího druhu:

A. zahrnující štěpení vazeb,

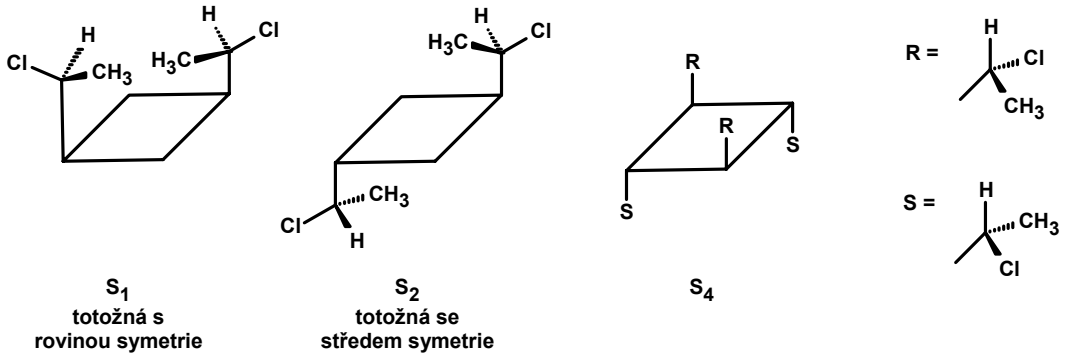
B. realizovaná pouze rotací kolem jednoduchých vazeb.

První typ stereoizomerů označujeme jako **konfigurační**, druhý jako **konformační**. O snadnosti izomerizace (a tím také o stálosti a případné separovatelnosti stereoizomerů) rozhoduje energie, kterou musíme na přeměnu jednoho izomeru na druhý vynaložit (izomerizační bariéra). Pro konfi-

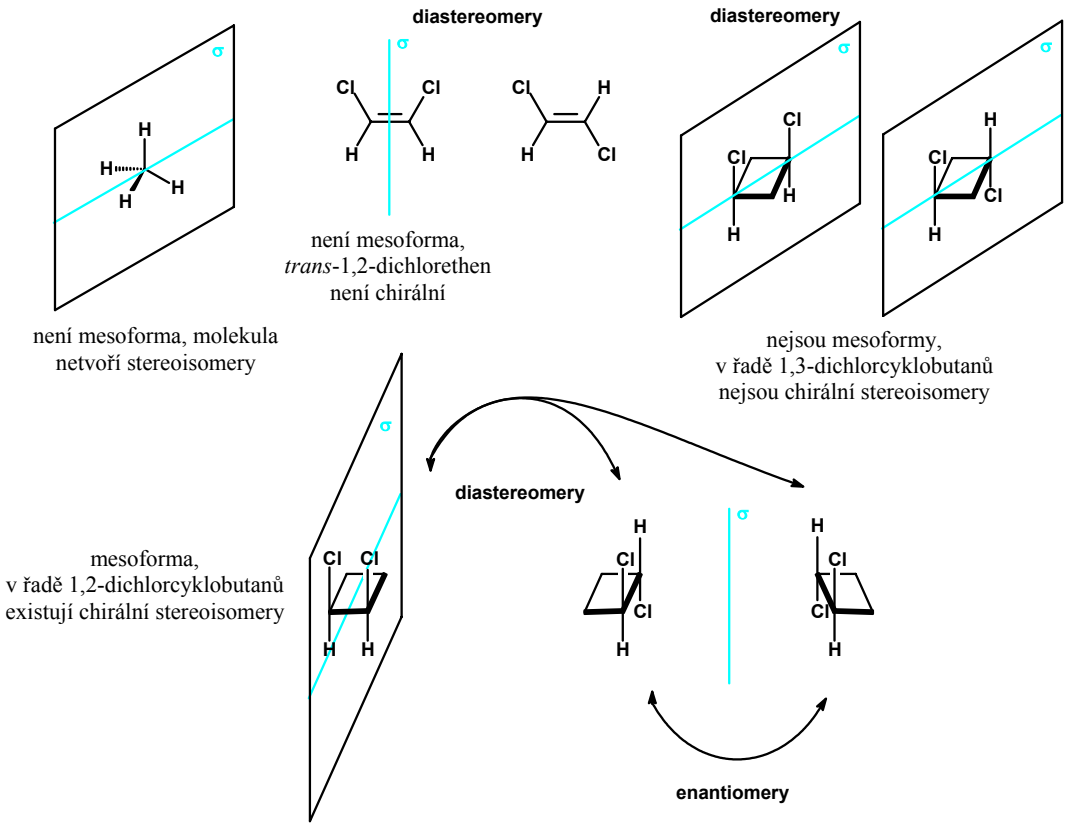
gurační izomery (např. uhlovodíků) můžeme izomerizační bariéru přirovnat k disociační energii jednoduchých C-H, C-C vazeb, zatímco přeměna konformačních izomerů (volná nebo bráněná rotace) je energeticky mnohem méně náročný proces. Na pomezí obou skupin izomerů stojí izomery na dvojné vazbě - izomery *cis-trans*, u kterých při izomerizaci musí dojít k rozštěpení π-vazby a následně k rotaci na vazbě C–C.



Získaná prostorová uspořádání mohou mít některé prvky symetrie (potom jsou symetrická), a nebo je nemají, a pak jsou asymetrická. Z hlediska chirality je důležité, zda mezi přítomnými prvky symetrie jsou **rotačně-reflexní osy** symetrie S_n. Nejsou-li přítomny, pak je molekula chirální.



Než přejdeme k definici chirality, je důležité si uvědomit, že se vůbec netýká samotných atomů v molekule, ale pouze a jen vztahu celé molekuly (nebo obecněji celého objektu, např. krystalu) ke svému zrcadlovému obrazu. Z hlediska definice je chirálním objektem každý objekt, který není ztotožnitelný (prostřednictvím prosté rotace a/nebo translace objektu v prostoru jako celku, tedy v případě molekul bez rozštěpení vazeb nebo změny dihedrálních úhlů) se svým zrcadlovým obrazem. Achirální objekt potom je takový opbjekt, který ztotožnitelný je. Dva chirální objekty, které jsou ve vzájemném vztahu **vzor a jeho zrcadlový obraz**, nazýváme **enantiomery**. Stereoizomery jiné než enantiomery se nazývají **diastereoizomery** (**diastereomery**). Pokud nejsou chirální, označují se jako **mesoforma**. Pojem mesoformy ovšem nelze použít pro označení struktury ve skupině stereoizomerů, ve které nejsou žádné chirální stereoizomery. Achiralita mesoformy je způsobena existencí rotačně-reflexní osy symetrie (nejčastěji roviny nebo středu symetrie).



Chiralita molekuly může být vyvolána přítomností určitých strukturních částí v molekule organické sloučeniny, zvaných **prvky chirality**. Setkáváme se se třemi prvky chirality:

1. **chirální centrum** (centrální chiralita),
2. **chirální osa** (axiální chiralita),
3. **chirální rovina** (planární chiralita).

Chiralitu molekuly lze také vyvolat chirální výstavbou z achirálních částí, potom je to **inherentní chiralita** (chiralita **bez** prvků chirality). Existence jednoho z prvků v molekule automaticky vede k chiralitě molekuly jako celku, zatímco existence dvou a více prvků může vést i k jejich vzájemnému vyrušení (vznikne mesoforma). Prostorové uspořádání na každém z prvků chirality popisujeme pomocí **absolutní konfigurace**. Je to přiřazení symbolů *R*/*S* (R_a/S_a, R_p/S_p) nebo *P*/*M* každému z prvků pomocí definované sady pravidel za předpokladu, že známe prostorové rozmístění atomů v molekule. V případě existence více prvků chirality v molekule můžeme rovněž určovat **relativní konfiguraci**.

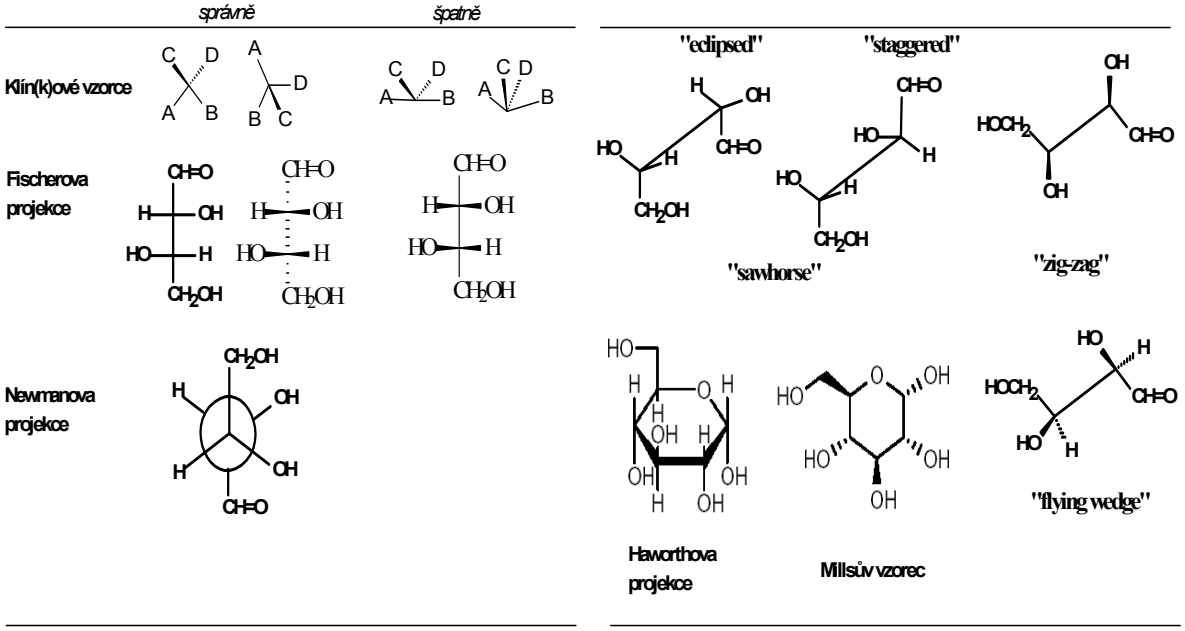
Posledním pojmem souvisejícím s chiralitou je **optická aktivita**. Je to popis situace, kdy makroskopický vzorek (tedy **nikoliv** jediná molekula) stáčí rovinu polarizovaného světla o určitý experimentální úhel α. Tabelujeme potom **specifickou optickou rotaci** $[\alpha]_D$ jako jeden z parametrů identifikujících chirální sloučeniny (především jejich čistotu). Všechny chirální látky by měly být opticky aktivní. Optická aktivita je ovšem veličina stanovovaná na **souboru** (např. 1 mol, tj. řádově 10^{25} částic) chirálních objektů, zatímco chiralita je vlastnost pouze tohoto objektu. Ne pro všechny chirální molekuly se musí podařit stanovit jejich optickou aktivitu!

Závěrem této úvodní partie můžeme shrnout: molekula může být chirální i symetrická, přitom každá asymetrická molekula musí být chirální. Označení opticky aktivní molekula postrádá smysl, neboť optická aktivita je vlastnost souboru chirálních molekul (s jiným než ekvimolárním zastoupením enantiomerů).

1.2 Prostorová izomerie organických molekul: „geometrické” *vs.* „optické” izomery

1.2.1 Prostorové vzorce

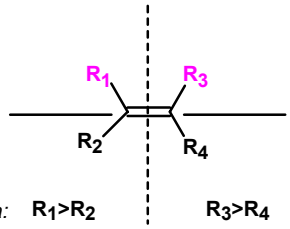
Prostorové uspořádání popisujeme v rovině pomocí několika druhů **prostorových vzorců**, z nichž ěkteré jsou univerzální (klínkové vzorce), jiné mají partikulární užití (konformace – Newmanova projekce, sacharidy – Haworthova projekce).



„Geometrické” *vs.* „optické” izomery

Je to zastaralý a nedoporučený způsob kategorizace stereoizomerů. „Optické” izomery představují prostorová uspořádání lišící se svými optickými vlastnostmi (tj. jde o enantiomery a chirální diastereomery). „Geometrické” izomery představují prostorová uspořádání nevykazující různé optické vlastnosti (achirální diastereomery, patří sem izomerie *cis-trans* na dvojné vazbě a prostorová izomerie kruhových systémů). Obě kategogie se mohou překrývat. Izomerie *cis-trans* je z hlediska definice rozdílné **relativní** uspořádání substituentů na dvojné vazbě nebo na **planarizovaném** kruhu. V případě cyklických sloučenin se neuvažuje reálná konformace kruhu. Pro dvojnou vazbu se symbolů *cis*/*trans* užívá pouze jde-li o relativní konfiguraci (vzhledem ke koncům dvojné vazby) stejné dvojice substituentů, jinak se používá obecnějších stereodeskriptorů *E*/*Z*. *E*/*Z*; naproti tomu **nelze** použít pro popis relativní konfigurace na kruzích. U cyklických molekul v případě více než dvou substituentů zavádíme pojem **referenčního** substituentu (má dle CIP-pravidel nejvyšší prioritu). V případě můstkových kruhových systémů se často setkáváme s existencí stereoizomerie „bez asymetrických uhlíků“. Je to stav, kdy existuje více než jedna možnost uspořádání substituentů vůči pomyslné rovině kruhu, která však nezpůsobuje existenci asymetrických atomů uhlíku. Tyto molekuly většinou nebývají chirální, nicméně musí existovat způsob popisu jejich (relativní) konfigurace. U jednodušších molekul si vystačíme s popisem pomocí stereodeskriptorů *cis*/*trans*, u komplikovanějších (můstkové sloučeniny) využíváme stereodeskriptorů *endo*/*exo*/*syn*/*anti*.

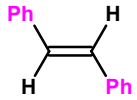
Dvojná vazba



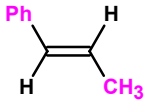
CIP priorita: $R_1>R_2$ $R_3>R_4$

stejná strana
***Z*-isomer**

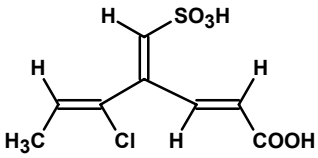
opačná strana
***E*-isomer**



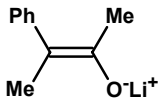
***trans*-isomer**



***E*-isomer**

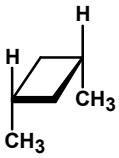


(2*E*,5*Z*)-5-chloro-4-(*E*-sulfomethylen) hepta-2,5-dienová kyselina

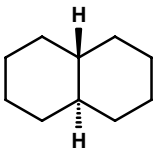


lithium-*E*-3-fenylbut-2-en-2-oxid

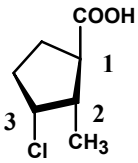
Systémy s kruhy



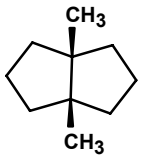
***cis*-isomer**

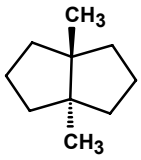


***trans*-isomer**

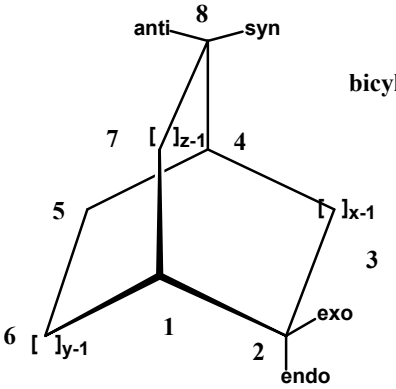


1t,2c,3r-isomer



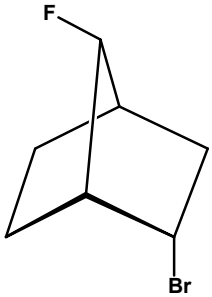


***cis*-isomer** ***trans*-isomer**
1,5-dimethylbicyklo[3.3.0]oktany existují dva způsoby vzájemné orientace methylových skupin, ani jeden isomer není chirální

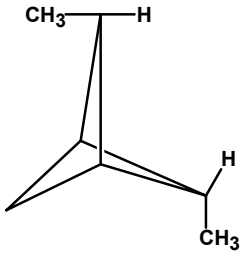


bicyklo[x.y.z]alkany

x>y>z>0



2-*endo*-brom-7-*anti*-fluorbicyklo[2.2.1]heptan



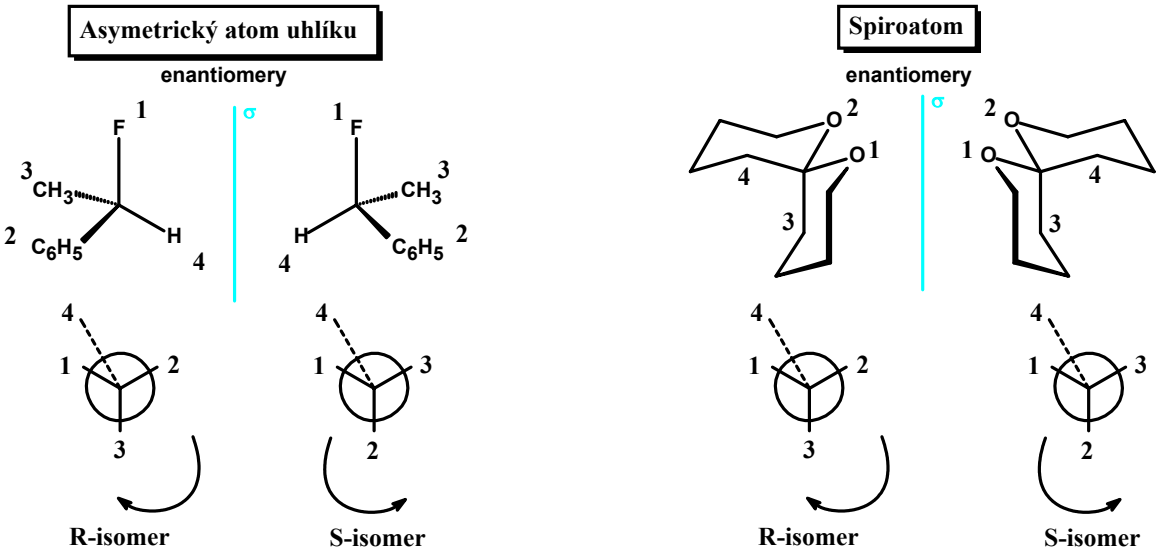
2-*exo*-4-*exo*-isomer

1.3 Centrální, axiální, planární a inherentní chiralita

1.3.1 Centrální chiralita

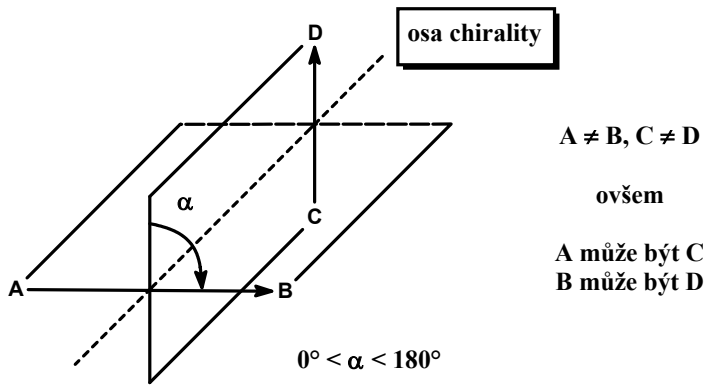
Asymetrický atom uhlíku představuje nejvýznamnější způsob realizace chirálního centra v molekulách organických sloučenin. Asymetrický atom uhlíku nese (z definice) čtyři různé substituenty.

Substituenty jsou různé buď z hlediska své konstituce, nebo své konfigurace. Pomocí definované sady pravidel, tzv. Cahnova-Ingoldova-Prelogova (CIP) systému, seřadíme tyto čtyri substituenty na základě atomového čísla od nejvyšší (č. 1) po nejnižší (č. 4) prioritu a stanovíme absolutní konfiguraci přiřazením stereodeskriptoru *R* nebo *S*. Některé spirosloučeniny rovněž tvoří chirální molekuly. „Chirální spiroatom“ je situace, kdy jsou dva kruhy v molekule spojené přes společný atom uhlíku a liší se substitucí ve větvích kruhu vycházejících ze spiroatomu. Dříve byly tyto sloučeniny klasifikovány jako axiálně chirální, absolutní konfigurace podle pravidel pro axiální chiralitu je přesně opačná.



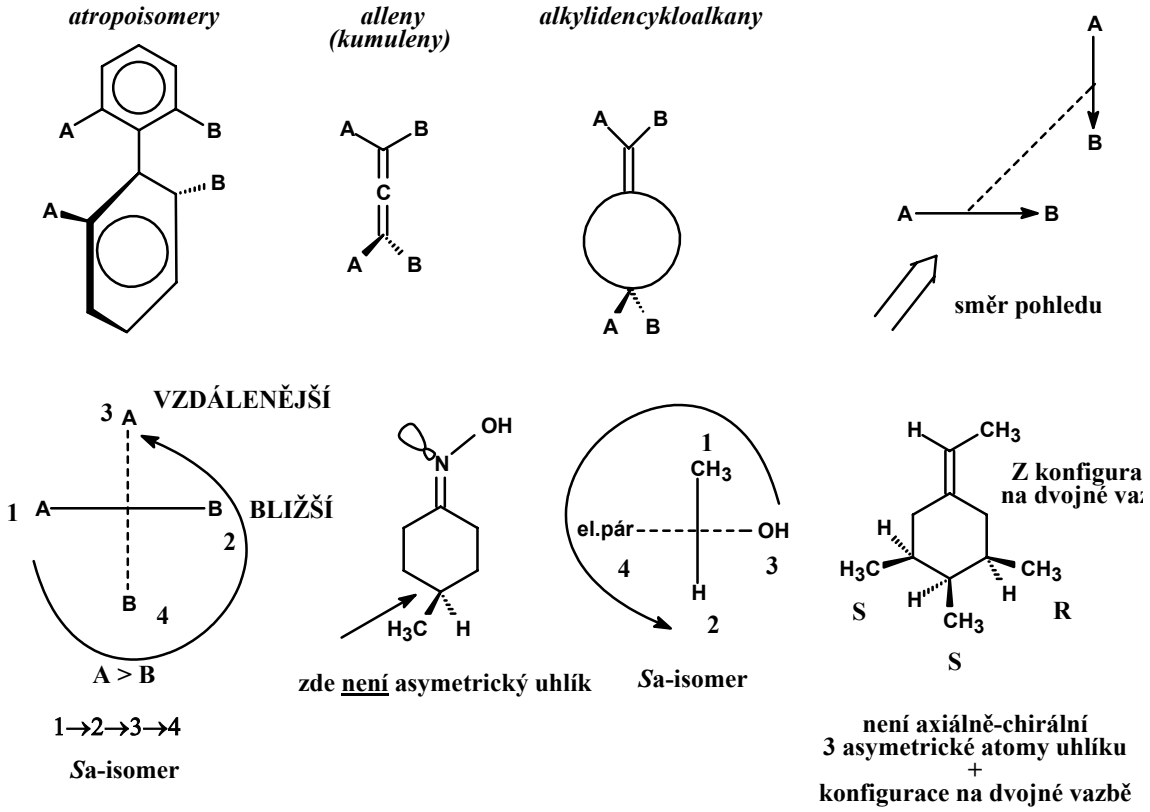
1.3.2 Axiální chiralita

Axiální chiralita je vyvolána existencí čtyř substituentů neležících v jedné rovině; osa chirality potom leží na spojnicích dvojic substituentů.



Strukturní reprezentaci v molekulách organických sloučenin představují **atropoizomery** (molekuly s bráněnou rotací, např. *o,o´*-disubstituované bifenyly nebo binaftyly), alleny (kumule-

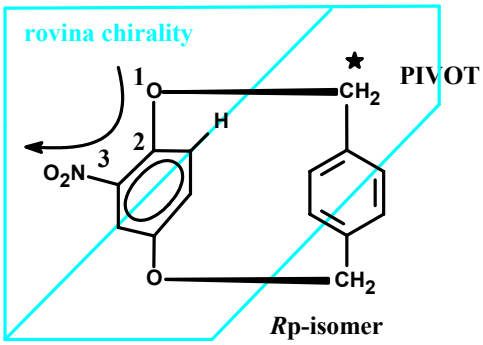
ny) nebo alkylidencykloalkany s exocyklickou dvojnou vazbou. Absolutní konfigurace se stanovuje přiřazením stereodeskriptorů R_a/S_a s využitím priority substituentů A, B, C, D podle CIP-systému. Bližší dvojici substituentů se definičně přiřazuje priorita 1 a 2. Konfigurace nezávisí od směru pohledu na chirální osu! Bližší dvojici substituentů znázorňujeme při určovaní konfigurace plnou čarou, vzdálenější čarou přerušovanou.



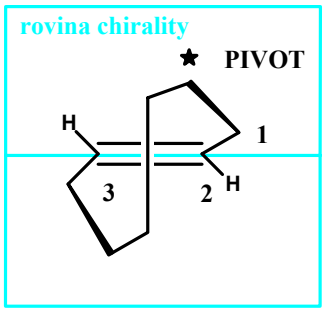
1.3.3 Planární chiralita

Planární chiralita je vyvolána existencí dvojice různých substituentů ležících ve společné rovině (rovině chirality) a minimálně jednoho substituentu (tzv. pivota) ležícího mimo tuto rovinu a spojeného s touto rovinou chemickou vazbou. Orientace tohoto substituentu vůči rovině pak může být dvojí (nahoru nebo dolů vůči rovině orientované po směru substituentů A → B). Absolutní konfigurace se stanovuje přiřazením stereodeskriptorů R_p/S_p (nebo volitelně P/M, definičně $R_p = P$) s využitím priority substituentů podle CIP-systému. Strukturní reprezentace je například v molekulách *trans*-cykloalkenů (rovina chirality = dvojná vazba) nebo paracyklofanů (rovina chirality je substituované benzenové jádro).

paracyklofany



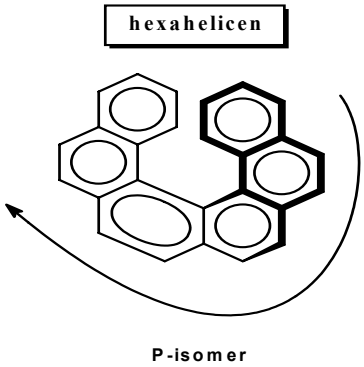
***trans*-cyklookten**

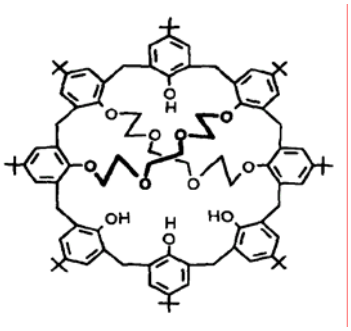


***R*p-isomer**
také *P*-isomer

1.3.4 Inherentní chiralita

Nejznámějšími představiteli jsou *heliceny*. Absolutní konfigurace se stanovuje přiřazením stereodeskriptorů *P*/*M* podle směru jakým se po šroubovici **vzdalujeme** od bližších ke vzdálenějším částem v molekule. Jiným příkladem mohou být deriváty kalixarenů, jako např. níže uvedený. Chirality molekuly je dosaženo dvěma možnými způsoby křížení ethylen-1,2-dioxy můstků.



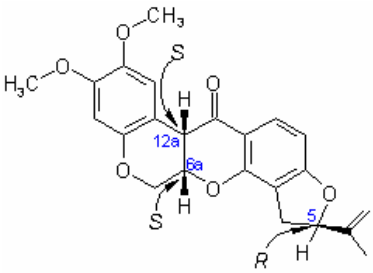


1.4 Stereodeskriptory a jejich použití

Obecně se při tvorbě systematického názvu (podle Doporučení IUPAC) stereodeskriptory předřazují před název základního hydridu (nebo složeného substituentu), jehož název sám o sobě tuto stereoinformaci nenese. Pro rozlišení stereocenter se používají lokanty.

Stereodeskriptory absolutní konfigurace

Užívají se *R*/*S* (R_a/S_a, R_p/S_p) a *P*/*M*.

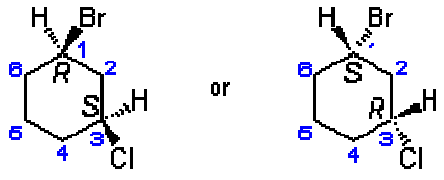


(5*R*,6a*S*,12a*S*)-rotenon

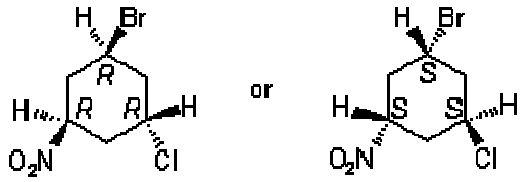
Stereodeskriptory relativní konfigurace

Slouží k vyjádření vzájemného prostorového vztahu atomů v molekule **bez** použití jejich přesné prostorové lokace.

Deskriptory *R*/S a *rel:*** Stereogenní jednotka s nejmenším lokantem má arbitrárně konfiguraci *R** (čte se „er s hvězdičkou"), ostatní pak relativně k této první. Ve složitých případech lze hvězdičky vynechat a použít *rel-* před celým názvem.

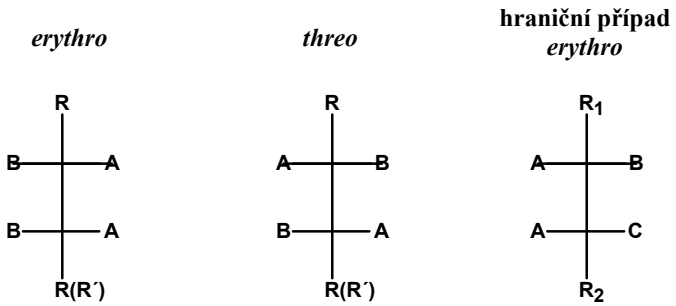


(1*R**,3*S**)-1-brom-3-chlorcycklohexan

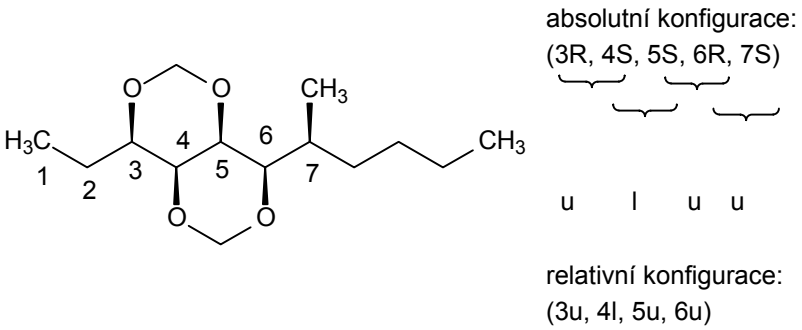


rel-(1*R*,3*R*,5*R*)-1-brom-3-chlor-5-nitrocyklohexan

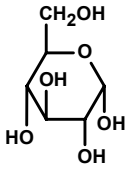
Deskriptory *erythro*/*threo*: Tyto deskriptory byly původně určeny pro popis konfigurace hydroxylových skupin na dvou po sobě jdoucích asymetrických atomech uhlíku u cukerných derivátů; odvozeny jsou z názvů tetros: erythrosy a threosy. Použití bylo následně rozšířeno pro popis relativní konfigurace na vicinálních stereogenních centrech, ale nelze je použít vždy. Obecnější je použití deskriptorů ***like*/*unlike*** (*l*/*u*), a to pro popis relativní konfigurace dvojice po sobě následujících stereocenter. Pokud je konfigurace stejná (např. *RR* nebo *SS*), jde o typ ***l***, pokud je odlišná (např. *RS* nebo *SR*), jde o typ ***u***.



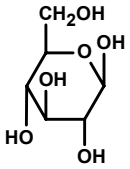
S několika málo vyjímkami **není definována** směrová orientace uhlíkového řetězce!



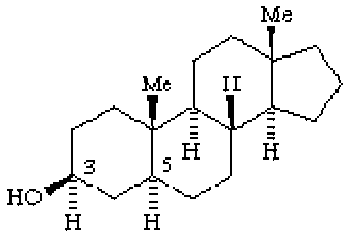
Deskriptory *α/β*: Používají se pro vyznačení relativní polohy poloacetalového hydroxylu v sacharidech nebo pro kruhové systémy (především steroidní deriváty), kde α označuje spodní stranu (směr substituentu dolů) pomyslné roviny kruhu(ů). Je nutno znát (a dodržovat při kreslení) správnou orientaci vzorce v rovině papíru.



α-D-glc*p*



β-D-glc*p*



5α-androstan-3β-ol

Jako deskriptory relativní konfigurace slouží rovněž *cis*/*trans* a *syn*/*anti*/*endo*/*exo* pro dvojné vazby a kruhové systémy.

Literatura

1. G. P. Moss (Ed.): Basic Terminology of Stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996), http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/stereo nebo Pure Appl. Chem. **68**, 2193-2222 (1996).
2. J. Brecher: Graphical Representation of Stereochemical Configuration (IUPAC Recommendations 2006), Pure Appl. Chem. **78**, 1897–1970 (2006).

2. CHIRÁLNÍ CHOVÁNÍ V PŘÍRODĚ A CHIRÁLNÍ SEPARACE

doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2
tesarove@natur.cuni.cz

2.1 Úvod

Většina přírodních látek je chirální a vyskytuje se ve formě enantiomerů nebo racemátů. Živé organismy představují chirální prostředí, a jsou tudíž schopny jednotlivé enantiomery rozlišovat. To je důležitým faktorem pro komunikaci mezi organismy prostřednictvím semiochemikálií, jako jsou feromony. Mnohé metabolické cesty jsou stereoselektivní, proto je nutno se podrobně zabývat chirálními a prochirálními látkami, které do organismu vstupují. Již v polovině 19. století bylo zjištěno, že enantiomery mají rozdílné biologické vlastnosti. Větší důraz na výzkum v této oblasti se však začal klást až s vývojem efektivních metod pro separaci a identifikaci enantiomerů v druhé polovině 20. století.

Důsledkem rozdílných enantioselektivních interakcí v organismu jsou odlišné terapeutické účinky enantiomerů, rozdílné pesticidní vlastnosti, různé chutě a vůně aj. Proto je oprávněná pozornost věnována sledování stereoselektivního chování a působení sloučenin a z toho vyplývajících důsledků při aplikaci léčiv, agrochemikálií i při kontrole složek potravin.

2.2 Teorie vzniku života na Zemi – úloha chirality

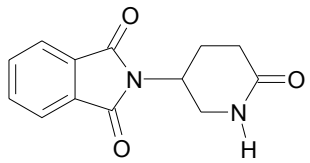
V souvislosti se vznikem života a s metabolismem se často diskutuje otázka chirality. Pro vysvětlení homochirality, tj. existence jednoho typu enantiomerů v živých organismech, existují různé teorie. Některé tvrdí, že život závisel na achirálních molekulách a racemátech a že homochiralita se vytvořila až během následné biologické evoluce. Jiné hypotézy jsou postaveny na představě, že homochiralita byla nutnou podmínkou pro vznik života na Zemi, a tudíž enantiomerně obohacené sloučeniny vznikaly nebo se dostaly na Zemi předtím, než se vytvořily první organismy. Analýzy aminokyselin z meteoritů potvrdily vyšší obsah L-enantiomerů. Tato skutečnost byla přisuzována fotochemické degradaci meteoritů kruhově polarizovaným světlem ve Vesmíru. Také asymetrické krystalické struktury jsou spojovány se vznikem biochemické homochirality. Chiralita stavebních bloků aminokyselin by měla být absolutně dokonalá, aby vznikly homochirální makrostruktury. Velké neuroproteiny požadují čisté L-aminokyseliny jako stavební bloky, zatímco pro molekuly DNA jsou potřeba D-monosacharidy. Bez stereochemické jednoznačnosti výchozích látek by v obou případech vznikly makromolekuly, které by nikdy nezapadly do systému „akceptor–receptor“, který je potřebný pro látkovou výměnu. Metabolismus v buňce se dá znázornit jako sterická interakce molekul analogická fitu správné ruky do správné rukavice. L-Aminokyseliny v buňce pak lze přirovnat k levým rukám, které musí zapadnout do „levých“ receptorů. Protože jsou L-aminokyseliny spojeny v proteinových řetězcích jako levé rukavice, pak do takového útvaru hladce vklouzne pouze útvar levých rukou. Pokud je v řetězci L-aminokyselin zapojena některá

D-forma, pak dojde k chybě vzájemné komunikace nebo metabolismu. Řetězec levých a pravých rukavic vytvořený náhodně nikdy nebude padnout na náhodně vytvořený řetězec levých a pravých rukou. Toto je argumentace proti tvrzení, že by život mohl vzniknout z aminokyselin a jiných stavebních bloků, jež obsahují oba enantiomery.

Na druhé straně existují i zastánci teorie, že náhodnými reakcemi by se bývaly mohly vytvořit nejprve polymerní produkty složené s mononerů–enantiomerů L- i D-, jež by pak byly donuceny sterickými požadavky dalších molekul, aby poskytovaly požadovanou chiralitu. Sterické požadavky by podmiňovaly volbu mezi enantiomery. Některé vědecké týmy se snaží simulovat vznik života v laboratorních podmínkách a potvrdit, zda původní stavební kameny proteinů byly čistými enantiomery, či nikoliv.

2.3 Chiralita léčiv

Především odlišnému chování enantiomerů léčiv je věnována pozornost již delší dobu. Velkým impulsem pro sledování enantiomerní čistoty farmaceutických produktů byl všeobecně nechvalně známý případ thalidomidu, který způsobil v 60. letech minulého století velké problémy, zvláště ve Švédsku. Thalidomid byl prodáván jako racemát a podáván jako neškodný lék těhotným ženám proti ranní nevolnosti. Přitom *R*-enantiomer je sedativum, zatímco *S*-enantiomer má teratogenní účinky.



thalidomid

Méně dramatické rozdíly v terapeutickém působení byly pozorovány u řady dalších léčiv. Askorbová kyselina je aktivní pouze ve své *S*-formě, *R*-enantiomer je neaktivní. Také *R*-enantiomer propranololu není aktivní, ale *S*-analog působí jako β-blokátor. V případě sotalolu je *S*-enantiomer také β-blokátor, avšak *R*-enantiomer je antiarytmikum. Indacrinon je používán jako diuretikum, přičemž oba enantiomery mají močopudné účinky, S-enantiomer je ale více účinný jako natriuretikum. Ukázalo se, že je vhodné používat léčivo, ve kterém zastoupení obou enantiomerů indacrinonu R-/S- je 1:4. Zajímavou vlastnost mají například chirální diazepiny, oxazepam a lorazepam, u nichž dochází k racemizaci (snadnému přechodu jednoho enantiomeru na druhý, resp. vytváření racemátu z čistého enantiomeru). V takovém případě je snaha po přípravě a podávání léku tvořeného jedním enantiomerem zbytečná, i kdyby enantiomery měly rozdílné terapeutické účinky. Z těchto několika příkladů je vidět, že jednotlivé enantiomery léčiv se mohou lišit v účinnosti, toxicitě a farmakologických účincích.

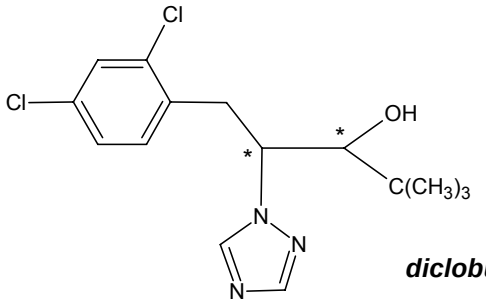
Současné požadavky na čistotu farmaceutických přípravků zahrnují i nutnou studii na enantiomerní čistotu resp. znalost účinků obou enantiomerů, pokud je přípravek používán ve formě racemátu. Uvádí se, že v současné době je z 50 % chirálních léčiv na trhu asi 75 % v racemické podobě a pouze 25 % je tvořeno jedním enantiomerem. Lze však předpokládat, že bude docházet stále více k posunu ve prospěch čistých enantiomerů.

2.4 Chiralita agrochemikálií

V posledních letech se zájem o zkoumání odlišného působení enantiomerů, resp. odlišnou rychlost jejich odbourávání v životním prostředí rozšiřuje do oblasti agrochemikálií. Mnoho látek používaných jako pesticidy má chirální strukturu. Ačkoliv je žádaná biologická aktivita často způsobena pouze jedním enantiomerem, je většina z nich vyráběna a distribuována ve formě racemátu. Některé agrochemikálie, např. pyrethroidy či deriváty triazolu, jsou však prodávány ve formě enantiomerně čistých sloučenin. Snahou je, aby v případě značných rozdílů v biologické aktivitě jednotlivých enantiomerů byl aplikován pouze ten enantiomer, který má žádanou biologickou aktivitu. Tento krok má vést ke snížení nepříznivého dopadu nadbytku agrochemikálií na živé organismy a na životní prostředí.

Studie organofosforových sloučenin (stereogenní centrum tvoří atom fosforu), které jsou široce rozšířené jako insekticidy a fungicidy, ukazují, že *R*-enantiomery mají obvykle mnohonásobně vyšší aktivitu než *S*-enantiomery. Existují však výjimky, kdy je naopak toxičtější *S*-forma dané sloučeniny.

Diclobutrazol tvoří čtyři enantiomery, z nichž nejvyšší fungicidní aktivitu a inhibiční aktivitu biosyntézy sterolu vykazuje (2*R*,3*R*)-enantiomer.



diclobutrazol

Uniconazol má fungicidní vlastnosti a působí rovněž jako růstový regulátor. Vyšší fungicidní aktivitu vykazuje jeho *R*-enantiomer, zatímco *S*-enantiomer má větší aktivitu pro regulaci rostlinného růstu.

Rozdílnou pesticidní aktivitu vykazují také enantiomery metolachloru. *R*-Enantiomer má silné fungicidní vlastnosti, ale zanedbatelné herbicidní účinky, zatímco *S*-metolachlor je aktivní herbicid, který téměř neprojevuje fungicidní aktivitu.

Významná je skupina pesticidů na bázi 2-aryloxypropanových kyselin, kde *R*-enantiomery vykazují vyšší herbicidní aktivitu než *S*-enantiomery. V případě mecopropu je za herbicidní aktivitu zodpovědný dokonce pouze *R*-enantiomer.

Současnou snahou je, aby byly u všech chirálních agrochemikálií určeny rozdílné vlastnosti, způsob působení, toxicita a dopad na lidské zdraví a na životní prostředí. V případě velkých odlišností v biologické aktivitě jednotlivých enantiomerů je žádoucí, aby byly tyto sloučeniny distribuovány ve formě enantiomerně čistých látek. Závažným problémem je však skutečnost, že separace enantiomerů pesticidů při mnohatunové aplikaci představuje technicky i finančně velmi náročný proces. Proto je nutné důkladně zhodnotit a vyčíslit užitek z používání enantiomerně čistých sloučenin místo racemátu.

2.5 Chiralita složek potravin

Potraviny obsahují přírodní sloučeniny, a proto se v zásadě očekává, že se bude jednat o enantiomery, a to buď čisté, nebo v určitém specifickém poměru, anebo racemáty.

Chiralita byla poprvé zmíněna právě v souvislosti s nápojem. L. Pasteur si všiml, že krystalky soli vinné kyseliny vytvořené kolem hrdla vinné lahve a na dně se vzájemně lišily. Obě rozdílné krystalické struktury byly později identifikovány jako enantiomery. Pasteur z této skutečnosti vyvodil závěr, že přírodní síly nejsou zrcadlově symetrické.

Chiralita složek potravin nemá tak závažné důsledky jako třeba použití nevhodného enantiomeru léčiva, nicméně stanovení enantiomerního zastoupení může dobře posloužit v řadě aplikací. Enantiomery se vyznačují rozdíly v chuti, vůni, výživové hodnotě, a tím ovlivňují celkovou kvalitu potravin. Enantioselektivní analýza může být využita při kontrole technologického zpracování, identifikaci příměsí, kontrole fermentačních procesů, stáří, hodnocení mikrobiální kontaminace a skladovacích podmínek, určování zeměpisného původu a při studiu a kontrole příchutí a aditiv v potravinách a nápojích.

Chuťové a čichové vnímání je způsobeno interakcí molekuly s receptorem, který je tvořen chirálními látkami (např. proteiny). Receptor má tedy možnost enantioselektivního rozpoznávání daného rozdílnou interakcí s enantiomery. Chirální chuťové a vonné složky v přírodních produktech jsou obecně charakterizovány specifickou distribucí enantiomerů; sloučeniny nejsou vždy přítomné ve formě jednoho čistého enantiomeru, ale vyskytují se ve specifickém enantiomerním poměru. Tento poměr se může lišit podle druhu a stupně zrání, ale i podle zeměpisného původu. Vyhodnocením specifického enantiomerního zastoupení sloučenin, které nejsou citlivé k racemizaci, mohou být rozlišeny přírodní a umělé (obvykle racemické) složky přidané do potravin. Racemické přísady obvykle produkt znehodnocují, neboť enantiomery mohou mít rozdílné výživové hodnoty.

Škála chirálních složek potravin, o jejichž sledování je zájem, se stále rozšiřuje. Patří sem především aminokyseliny (AA), karboxylové kyseliny a jejich deriváty, ketony, aldehydy, cukry, ethery, laktony a řada dalších.

D-Aminokyseliny mohou sloužit jako vhodné ukazatele podmínek zpracování potravin. Všechny aminokyseliny přítomné v peptidech a proteinech racemizují, avšak rozdílnou rychlostí, což je dáno odlišnými konstantami racemizace. Rychlost racemizace je dále ovlivňována vnějšími faktory, jakými jsou vysokoteplotní úprava, fermentační procesy, extrémní hodnoty pH aj. D-Aminokyseliny by neměly být přítomné v kvalitních nekvašených či nijak nezpracovaných potravinách. Výskyt D-aminokyselin v kvašených potravinách je naopak přirozený. Důvodem je jednak přítomnost D-aminokyselin v buněčné stěně bakterií, odkud se mohou uvolňovat do okolí, a dále pak působení bakteriálních racemas či epimeras, které přeměňují L-aminokyseliny na jejich D-analogy. V sýru, jogurtu, víně, octu atd. jsou ve větším množství zastoupené D-alanin, D-glutamová kyselina a D-asparagová kyselina.

Příkladem využití enantioselektivní analýzy ke kontrole kvality potravin, k ověření pravosti přírodní vinné šťávy, je *S*-vinná (2,3-dihydroxybutandiová) kyselina, která je rozšířená zejména v hroznech vinné révy, zatímco *R*-vinná kyselina není v přírodě běžná.

Jiným příkladem důsledku výskytu enantiomerů v potravinách mohou být kyseliny 3-methylpentanová, 4-methyloktanová, 4-ethyloktanová a 4-methylnonanová, které byly detegovány v sýrech. Ve všech případech měly *S*-enantiomery dvojnásobně nižší práh zápachu než

R-enantiomery. Je zřejmé, že stáří či kvalitu sýrů je možné určovat podle zastoupení *R*-forem příslušných kyselin, a to jak pouhým čichem, tak instrumentální analytickou metodou.

Karvon (2-methyl-5-(1-methylethenyl)-2-cyklohexen-1-on) se vyskytuje v rozdílném enantiomerním složení v mátě, kopru, kmínu, pomerančích a grapefruitech. *S*-(+)-Karvon má kmínovou vůni, ale *R*-(-)-karvon voní po mátě.

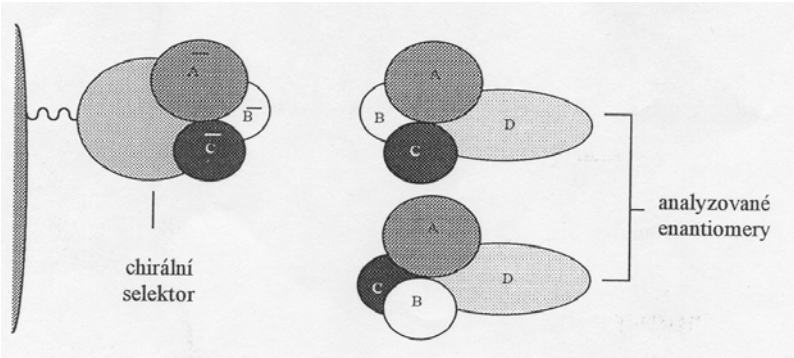
Menthol (5-methyl-2(1-methylethyl)cyklohexanol), chirální monoterpenický alkohol, má tři chirální centra, tedy osm stereoizomerů, avšak známé mentholové aroma má pouze izomer 1R,2S,5R.

S-Limonen voní po citronech, zatímco *R*-enantiomer má pomerančové aroma. V olejích ze sicilských a španělských sladkých pomerančů je hlavní složkou *S*-linalool, v olejích z hořkých pomerančů převládá *R*-forma. Stanovení poměru enantiomerů proto umožňuje detegovat znehodnocení olejů z hořkých pomerančů příměsí levnějšího oleje ze sladkých pomerančů.

Toto byly pouze některé ukázky odlišných chutí, vůní nebo dalších parametrů určujících kvalitu potravin. Stanovování enantiomerního zastoupení v potravinách a nápojích má tudíž velkou vypovídací hodnotu a je důležitou součástí potravinářské analýzy.

2.6 Chirální rozlišení

Enantioselektivní rozpoznávání patří mezi základní vlastnosti přírody, neboť enantiomery vykazují shodné vlastnosti pouze v izotropním prostředí, zatímco v chirálním, což je obecně řečeno prostředí živých organismů, mají vlastnosti odlišné. Pro rozdělení enantiomerů je proto také potřeba vytvořit prostředí, které dovede analyty stereoselektivně rozpoznat. Pro vytvoření enantioselektivních separačních systémů je nejjednodušší cestou kopírování přírody, resp. modifikace přírodních enantioselektivních systémů. Nejstarší představa (Ogston, r. 1948) o takovém rozpoznávání spadá do oblasti biochemie, konkrétně jde o interakci mezi enzymem a substrátem, která má vysoce stereospecifický charakter. Dalgliesh odvodil na základě této představy tzv. **model tříbodové interakce**, podle kterého je pro enantioselektivní rozpoznání třeba, aby analyt (substrát, enantiomer) současně interagoval třemi různými interakcemi s chirálním selektorem (CS) – viz obr. 2.1 – alespoň jedna interakce má mít stereoselektivní charakter.



Obr. 2.1: Enantioselektivní rozpoznávání – model tříbodové interakce

Má-li dojít k rozlišení enantiomerů, pak každý z nich musí interagovat s CS různě silně. V původní Dalglieshově interpretaci se předpokládalo, že všechny tři síly jsou přitažlivé. Následně se ukázalo, že rovněž repulsní interakce mohou mít důležitou úlohu v mechanismu rozpoznávání. Navíc celková síla interakce mezi analytem a chirálním selektorem není tak důležitá jako rozdíl v interakčních energiích mezi CS a jednotlivými enantiomery. Z tohoto pohledu jsou slabší interakce stejně důležité jako silné. Tabulka 2.1 shrnuje typy molekulových interakcí, které se uplatňují při chirálním rozpoznávání.

Tab. 2.1: Typy interakcí podílejících se na molekulárním rozpoznávání

Typ interakce	Síla a charakter
elektrostatické	velmi silné, přitažlivé i odpudivé
vodíková vazba	velmi silná, přitažlivá
sterické stínění	velmi silné, repulzní
π–π	silné, přitažlivé i odpudivé
ion–dipól	silné, přitažlivé
dipól–dipól	střední, přitažlivé
dipól–indukovaný dipól	slabé, přitažlivé
van der Waalsovy síly	slabé, přitažlivé

K získání informací o celkové síle vazby mezi chirálním selektorem a enantiomery i o úloze jednotlivých mezimolekulových interakcí slouží různé fyzikálně-chemické přístupy – měření konstant stability komplexu enantiomer–CS, využití van´t Hoffovy závislosti, korelace mezi chromatografickou retencí a molekulovými deskriptory analytů (LFER, viz kap. 5) i počítačové simulace. Přes současné znalosti v oblasti enantioselektivního rozpoznávání je však úplné pochopení mechanismu chirálního rozlišení, které by umožňovalo jednoznačně zvolit separační sytém pro úspěšnou požadovanou enantioseparaci, stále nedořešeným problémem.

2.7 Chirální separace

První separace enantiomerů je připisována Pasteurovi, který již v roce 1848 oddělil pod mikroskopem odlišné krystalky enantiomerů vínanu sodno-amonného. Různé přírodní materiály jako bramborový škrob, celulosa, bavlna, hedvábí aj. byly prvními sorbenty zkoušenými pro oddělení enantiomerů začátkem 20. století.

Použití moderní chromatografické instrumentace pro enantioselektivní separaci následovalo až o mnoho let později. Gil-Av publikoval první úspěšnou separaci enantiomerů derivátů *N*-trifluoroacetylaminokyseliny v plynové chromatografii v roce 1966. O něco později (r. 1971) Davankov úspěšně rozdělil deriváty aminokyselin pomocí ligandově výměnné kapalinové chromatografie. Tím odstartoval dramatický vývoj enantioselektivních separačních systémů, soustředěný především na přípravu nových chirálních stacionárních fází pro HPLC.

První dělení enantiomerů pomocí elektromigračních metod je spojováno se jménem Terabeho (r. 1985) a s použitím chirálního selektoru jako aditiva do základního elektrolytu v kapilární zónové elektroforéze.

Přímé metody chirální separace moderními separačními metodami resp. způsoby vytváření enantioselektivního prostředí v nich shrnuje tab. 2.2.

O jednotlivých enantioselektivních separačních metodách používaných v současné době bude podrobně pojednáno v následujících kapitolách.

Tab. 2.2: Způsoby realizace enantioselektivního prostředí v moderních separačních technikách

Separační metoda	Umístění chirálního selektoru
Chromatografické metody	
GC kapilární GC	chirální stacionární fáze **CS pokrytý nebo navázaný na stěnu kapiláry**
HPLC	**chirální stacionární fáze** CS přidán do mobilní fáze
kapilární, nano aj. LC	**chirální stacionární fáze** **CS přidán do mobilní fáze**
superkritická fluidní chromatografie	chirální stacionární fáze
Elektromigrační metody	
kapilární zónová elektroforéza	CS přidán do základního elektrolytu
izotachoforéza	CS přidán do vedoucího elektrolytu
micelární kapilární elektroforéza	chirální micely, směsné micely CS a achirální micelární systém
kapilární gelová elektroforéza	CS zabudován v gelu CS přidán do základního elektrolytu
kapilární elektrochromatografie	**chirální stacionární fáze** CS přidán do základního elektrolytu

Pozn. Je-li více možností pro vytvoření separačního prostředí, zvýrazněný systém je běžnější.

Doporučená literatura

Berthod A.: Anal.Chem. 78 (2006) 2093

E.Tesařová, D.W.Armstrong: *Enantioselective separation* (Chapter 5) v *"Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences*, Ed. Z.Deyl, I.Mikšík, F.Tagliaro, E.Tesařová, Elsevier, Amsterdam, 1998, s. 197

M. Gilar, E. Tesařová, V. Patzelová, Z. Deyl: *Chem. Listy* 88 (1994) 514

Srkalová S.: Bakalářská práce, PřF UK v Praze, 2007

Tylová T.: Bakalářská práce, PřF UK v Praze, 2007

3. CHIRÁLNÍ SEPARACE V PLYNOVÉ CHROMATOGRAFII

RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie
cabala@natur.cuni.cz

3.1 Úvod

3.1.1 Základní chromatografické veličiny

Abychom mohli srovnávat a popisovat chování jednotlivých látek v GC, je nutno tyto látky nějak charakterizovat – popsat. Základní chromatografickou veličinou charakterizující látky v záznamu chromatografického děje, chromatogramu, je **retenční čas**. Univerzálnější veličinou, která nezávisí na experimentálních podmínkách, kromě teploty a druhu stacionární fáze, je **separační koeficient** (dříve se nazýval **kapacitní faktor**) k:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R^{'}}{t_M}$$

kde t_r je retenční čas, t_M – mtrvý retenční čas a $t_r^{'}$ – redukovaný retenční čas. Tyto veličiny chrakterizují chování dané látky v separačním systému za daných experimentálních podmínek. V případě určení kvality oddělení dvou látek sousedících na chromatogramu se v praxi používá veličina **separační faktor** α:

$$\alpha = \frac{t_{R2}^{'}}{t_{R1}^{'}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{V_{R2}^{'}}{V_{R1}^{'}}$$

kde $t_{R1}^{'} < t_{R2}^{'}$, K je rozdělovací konstanta a $V_R^{'}$ – redukovaný retenční objem. Ze vztahu je patrná provázanost separačního faktoru α dvojice látek a jejich separačních koeficientů k. Pro úplnost uveďme, že účinnost separačního systému (míra rozmytí úzké zóny vzorku během jejího průchodu separačním systémem) pro danou látku je vyjadřována jako **počet teoretických pater** N:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 = 5.545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2 = 4 \cdot \left(\frac{t_R}{w_i}\right)^2$$

kde w s indexy b, h a i odpovídá šířkám píku u základní linie, v polovině výšky píku a v inflexním bodě.

3.1.2 Principy chirální separace

Při chirální separaci, tj. oddělování enantiomerů, stojíme před nelehkým úkolem oddělit dvě téměř identická individua, která se chovají rozdílně pouze při interakci s chirálním prostředím. V běžném, achirálním prostředí jsou oba enantiomery identické.

Pokud chceme enantiomery pouze pozorovat, lze výhodně využít jejich interakci s polarizovaným světlem. K tomuto účelu slouží metody jako polarimetrie, cirkulární dichroismus a optická rotační disperze.

Složitější situace nastane pokud chceme oba enantiomery fyzicky oddělit. Zde máme k dispozici buď tvorbu diastereomerů, tj. v podstatě zopakovat to, co už udělal Pasteur, nebo asociaci, kdy dochází v nějaké formě k interakci s jinou chirální látkou či prostředím.

3.2 Chirální plynová chromatografie

Kapilární chirální GC je nejrozšířenější chirální separační metodou v evropských akademických a průmyslových laboratořích [1] a zřejmě také nejrozšířenější analytickou chirální separační metodou vůbec. Důvodem je její vysoká účinnost a rychlost separace, citlivost a jednoduchá detegovatelnost analytů, možnost teplotního programování analýz, možnost propojení se spektrometrickými a spektroskopickými metodami a možnosti vícekolonového či dokonce multidimenzionálního uspořádání. Jedinými omezujícími kritérii jsou požadavek dostatečné těkavosti a teplotní stability, stereochemické integrity a rozpustnosti chirálního selektoru za normální a zvýšené teploty. Pokud není potřeba analyzovat enatiomery v komplexních matricích, jedná se v podstatě o binární systém dvou enantiomerů, který lze separovat na velmi krátkých kolonách v krátkém čase, nebo analyzovat méně těkavé látky. Vysoká separační účinnost GC umožňuje často rozdělit multikomponentní směsi enantiomerů v jediné analýze. Využitím SIM-módu v GC-MS lze detegovat i stopová množství enantiomerů přítomných ve velmi komplexních matricích. Detekční limity (limit of detection, LOD) dosahované použitím citlivých detektorů (FID, NPD, ECD a GC) dosahují hodnot pg a méně. Chirální GC je používána pro analýzy speciálních chemikálií, meziproduktů, prekursorů, metabolitů, léčiv, drog, mnoha druhů pesticidů, feromonů, vonných látek atd. Vzhledem k rostoucímu významu a používání chirálních léčiv roste také význam chirální GC pro jejich legislativní kontrolu.

Separaci enantiomerů v GC lze provést dvěma základními způsoby:

Nepřímá metoda: Nejdříve provedena mimokolonová konverze enantiomerů na diastereomerní deriváty reakcí s enantiomericky čistým činidlem a následně jejich separace na konvenční achirální koloně. U této metody se však může uplatnit diskriminace (zdánlivé snížení množství) jednoho z diastereomerů v důsledku buď diskriminačního efektu při nástřiku do GC (zvýšení podílu těkavějších složek vzorku na úkor méně těkavých v důsledku nestejné rychlosti jejich odpařování), nebo neúplné reakce enantiomerů na diasteroemery- Může také dojít k rozkladu nebo ztrátě enantiomerů během přípravy vzorku, izolace a manipulace se vzorkem.

Přímá metoda: Separace enantiomerů probíhá na chirální stacionární fázi obsahující rozlišující látku vysoké enantiomerní čistoty (chirální selektor). Podstatou metody je rychlá a reverzibilní tvorba diastereomerních asociátů mezi chirální stacionární fází (sf) a racemickým či neracemickým analytem. Tato metoda je nezávislá na enatiomerní čistotě sf, ovšem malá enantiomerní čistota snižuje *k* a při racemickém složení sf by už nedošlo k separaci. Dále je vhodná pro stanovení optické čistoty látek (viz dále), která vyžaduje efektivní separační systém vykazující vysoké chirální rozlišení pro páry chirální selektor–analyt. Tyto požadavky GC naštěstí splňuje.

3.2.1 Interakce v chirálních separacích

Veškeré molekulární interakce chirální selektor–analyt jsou založeny, stejně jako interakce achirálních látek, na pěti základních silách. Jsou to síly disperzní (polarizibilita) a elektrostatické (náboj),

interakce dipól–dipól (dipólový moment) a indukční síly (dipólový moment–polarizibilita). Jako samostatný pátý druh interakce se uvádějí vodíkové vazby díky jejich specifickým vlastnostem. Teprve specifické prostorové uspořádání atomů v molekulách a z toho vyplývající prostorová anizotropie součtu všech příspěvků sil jsou příčinou rozdílů v interakcích enantiomerů a chirálního selektoru.

Je třeba si uvědomit, že v chromatografii často používané označení látek jako hydrofilní a hydrofóbní jsou do značné míry intuitivní a postrádají, až na výjimky, kvantitativní měřítko. Je nepříliš známou skutečností, že i doměle čistě polární interakce jsou z alespoň 50 % tvořeny disperzními, tedy čistě "nepolárními" interakcemi.

3.3 Stacionární fáze pro chirální separace v GC

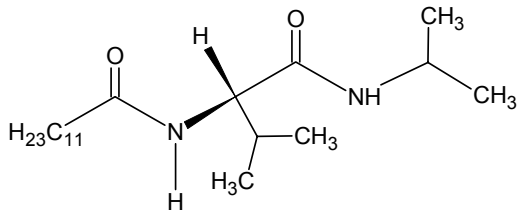
Chirální stacionární fáze (*chiral stationary phases*, CHSP) v GC bývají klasifikovány nejčastěji podle typu interakce selektor–analyt. Rozlišovány jsou tak CHSF tvořící vodíkové vazby a užívané především pro analýzu aminokyselin, dále CHSP tvořící komplexy sloučenin kovů a CHSP tvořící inkluzní sloučeniny, většinou cyklodextriny a jejich deriváty.

Chirální stacionární fáze mohou mít různou formu a jsou imobilizovány v chromatografické koloně různými způsoby. Jednou možností je použití čistého netěkavého chirálního selektoru či jeho roztoku ve skvalanu či polysiloxanu naneseném mechanicky na stěnu GC kolony. Druhou možností je chemicky vázaný selektor v polysiloxanové matrici (typ Chirasil), která je též chemicky vázaná na stěny GC kolony. Tyto tzv. chemicky vázané GC kolony vykazují výrazně zvyšený teplotní rozsah a stabilitu, účinnost a robustnost.

3.3.1 CHSP založené na tvorbě vodíkových můstků

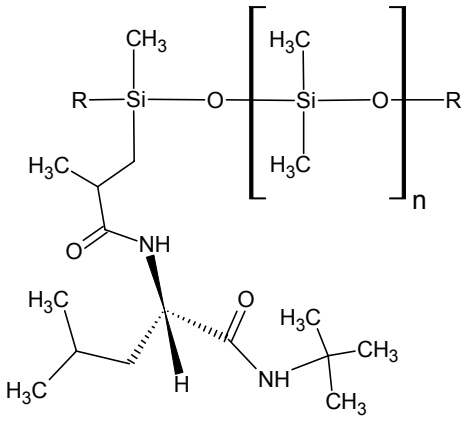
Pro analýzu enantiomerů aminokyselin se výhodnými chirálními selektory ukázaly být samotné aminokyseliny, a to především valin (Val). Postupným vývojem a výzkumem bylo zjištěno, že pro optimální chirální separaci aminokyselin (přesněji jejich těkavých derivátů) je nezbytná dodatečná amidová vazba pro tvorbu intenzivní vodíkové vazby.

Aby bylo možno analyzovat aminokyseliny, musí být zvýšena jejich těkavost, tj. musejí být derivatizovány. NH_2- a OH-skupina se většinou převedou na acetyl (FID), trifluoroacetyl (ECD, MS) nebo pentafluoropropanoyl (ECD, MS) deriváty, zatímco karboxylová skupina na methyl či perfluorethyl estery, popřípadě na alkyl amidy.

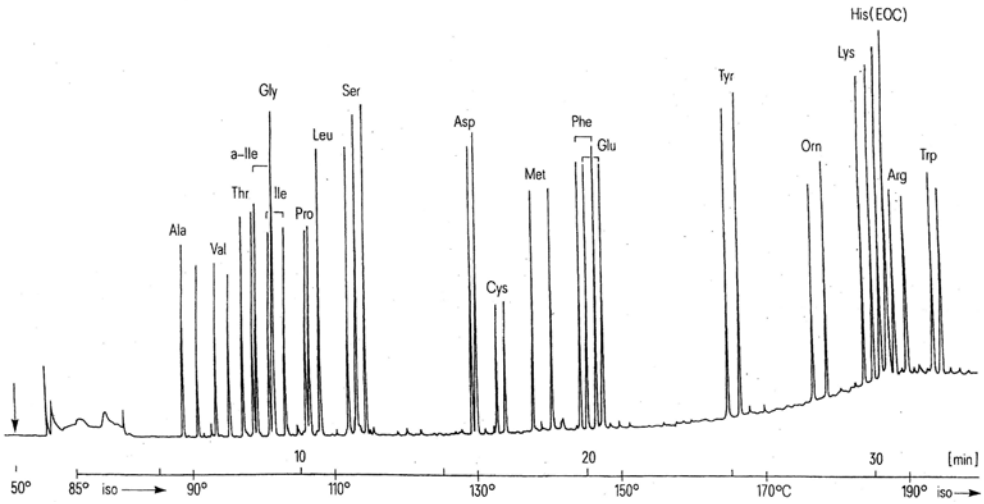


N-undecenoyl-L-valin isopropylamid

Chirasil-Val je jednou z nejužívanějších CHSP a je komerčně dostupný ve formě L- i D-, což umožňuje stanovení enantiomerního složení a rovněž dovoluje stanovit až 0,04 % minoritního enantiomeru.



Obr 3.1: Struktura CHSP Chirasil-Val



Obr. 3.2: Separace enantiomerů 20 biogeních aminokyselin ve formě N,O,S-pentafluoropropanoyl-O-2-propylesterů (histidin jako N_{im}-ethoxykarbonyl) na 0.13 mm Chirasil-Val při 4 kPa H_2.

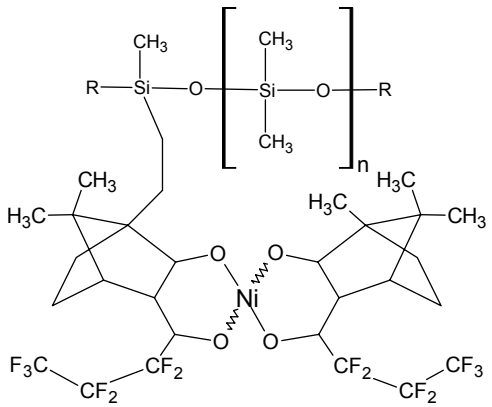
Teplotní program: 50 °C, 5 °C min^{-1} do 85 °C, 3 min izotermálně, 4 °C min^{-1} do 190 °C. Kolona: 20 m × 0,3 mm I.D. skleněná kapilára. D-enantiomery eluují před L-enantiomery [2].

3.3.2 CHSP založené na interakcích s komplexy kovů

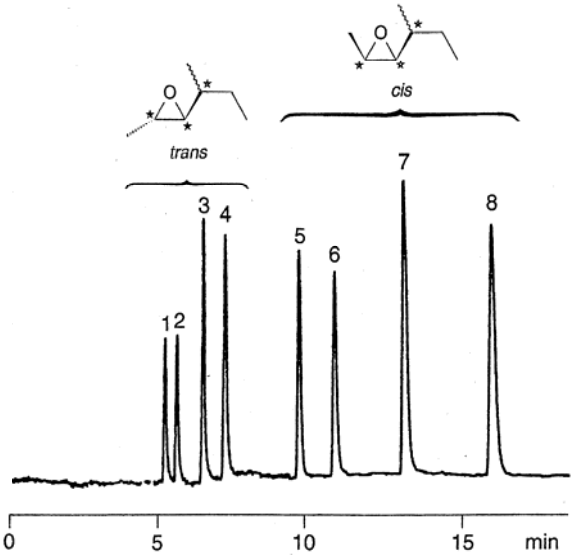
Chirální koordinační sloučeniny kovů odvozené od terpenů jako např. 1*R*- a 1*S*-kafru, 3- a 4-pinanonu, thujonu, nopinonu, menthonu, izomenthonu, karvonu a pulegonu byly ve formě svých kovových (*bis*)chelátů perfluoracylovaných diketonů použity na chirální separace celé řady látek. Níže je uveden příklad struktury koordinační CHSP.

Nevýhodu volných chelátů, nízkou pracovní teplotu (25-120 °C), se podařilo překonat imobilizací komplexu do polysiloxanové matrice a chemická vazba na křemenné kapilární GC kolony (chemicky vázané kolony) umožnila zvýšit pracovní teplotu analýzy (viz 1S-Chirasil-Nikl).

Použití těchto CHSP při enantioselektivní komplexační chromatografii vedlo k objevu čtyř enantioselektivních dějů, isoenantioselektivní teploty a efektu tvorby plošiny mezi píky při enantiomerizaci (viz dále). Koordinační CHSP umožnily separaci těkavých látek netvořících vodíkové vazby, jako jsou např. feromony, vonné látky a oxirany, tudíž látky, které nebylo možno rozdělit za pomoci aminokyselinových chirálních selektorů uvedených v předcházejícímj oddílu a z tohoto hlediska k nim jsou tedy komplementární. Tento typ CHSP byl využíván hlavně před objevem a nasazením cyklodextrinů (viz dále). Na následujícím obrázku je uveden příklad separace za použití Ni-koordinační CHSP.



1S-Chirasil-Nikl



Obr 3.3: ***Separace osmi stereoizomerů sec-butyloxiranu na Ni(II) bis[3-(hepta-fluorobutanoyl)-10-ethyliden)-1S-kafrátu] (0.125 mol/kg v OV-101) při 90 °C.***

Skleněná kolona: 25 m × 0.25 mm I.D. Tučné a čárkované čáry ve vzorcích představují izomerii *cis/trans* a nezobrazují absolutní konfiguraci. [3]

3.3.3 CHSP založené na tvorbě inkluzních komplexů

Inkluze

Pod tímto pojmem je myšleno uzavření molekuly "hosta" do hostitelské struktury. Inkluze je důsledkem schopnosti jedné sloučeniny pomocí vhodných sterických vlastností a polarity prostorově uzavřít druhou složku. Tvorba inkluzních komplexů může probíhat v plynné, kapalné i tuhé fázi a je podmíněna prostorovým uspořádáním, interakcemi typu van der Waalsových sil a orientačními dipólovými interakcemi. Permanentní struktura hostitele umožňuje jednoduchý vznik inkluze stykem v roztoku (cyklodextriny, škrob) nebo v tuhé fázi (zeolity, bentonit, grafit). Hostitelská molekula musí obsahovat volné prostory molekulárních rozměrů (často se tvoří až v přítomnosti hostují-

cích látek) odpovídající velikosti objemu hostující látky. Volný prostor, do kterého se začleňuje hostující molekula mívá tvar klícky, kanálku nebo vrstvy. Tvorbu inkluzního komplexu nelze odvodit ani z chemické afinity ani z reaktivity podílejících se složek. Vzhledem ke specifickým prostorovým nárokům tvorby inkluzních komplexů je jejich vznik velmi selektivní a závislý na prostorových a chemických vlastnostech. Inkluzní sloučeniny mohou být monomolekulární nebo polymolekulární.

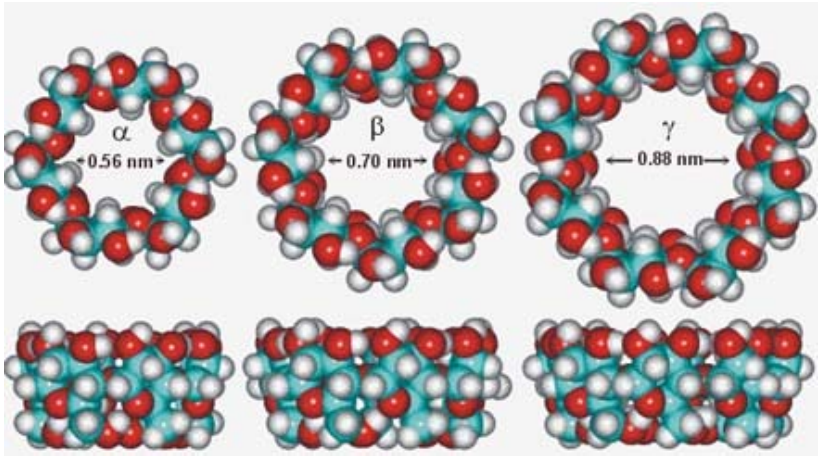
Vlastnosti inkluzních sloučenin

Stabilita inkluzních sloučenin je s ohledem na jejich různorodost značně variabilní. Stabilita hostitelské mřížky je v některých případech podmíněna přítomností hostů. Ke stabilizaci mřížky hostitele nemůže dojít, jsou-li molekuly hosta malé (thiomočovina dává přednost isoalkanům před nerozvětvenými alkany, β-cyklodextrin inkluduje brombenzen a jodbenzen, nikoliv chlorbenzen). Stálost inkluzních sloučenin v tuhém stavu je ovlivněna teplotou a tlakem a může se také měnit v přítomnosti rozpouštědla. Při rozpouštění ve vodě se inkluzní sloučenina obvykle rozpadá na své komponenty (s výjimkou cyklodextrinů a cholové kyseliny). Mezi materiály schopné tvorby inkluzních komplexů patří např. močovina, cyklodextriny, calixareny, zeolity, bentonit a grafit.

Významnou vlastností inkluzních sloučenin je jejich schopnost selektivně interagovat s molekulami se zcela určitými prostorovými seskupeními, čehož se právě využívá v chirálních GC separacích.

3.3.4 Cyklodextrinové CHSP

Cyklodextriny (CD) jsou známy od r. 1891 a jsou to produkty enzymatické degradace škrobu glukosyltransferázami bakterií *Bacilus macerans*. Chemicky jde o cyklické oligosacharidy složené ze šesti a více D-glukopyranosových jednotek spojených α-1,4 vazbami. Nejvíce zastoupenými produkty jsou kruhy se 6 (α), 7 (β) a 8 (γ) jednotkami. Typickou vlastností CD je přítomnost sekundárních OH-skupin na vnějším širším okraji a primárních OH-skupin na vnějším užším okraji. Touto konfigurací dochází ke stavu, kdy je vnější povrch hydrofilní a kavita (vnitřní prostor) lipofilní.



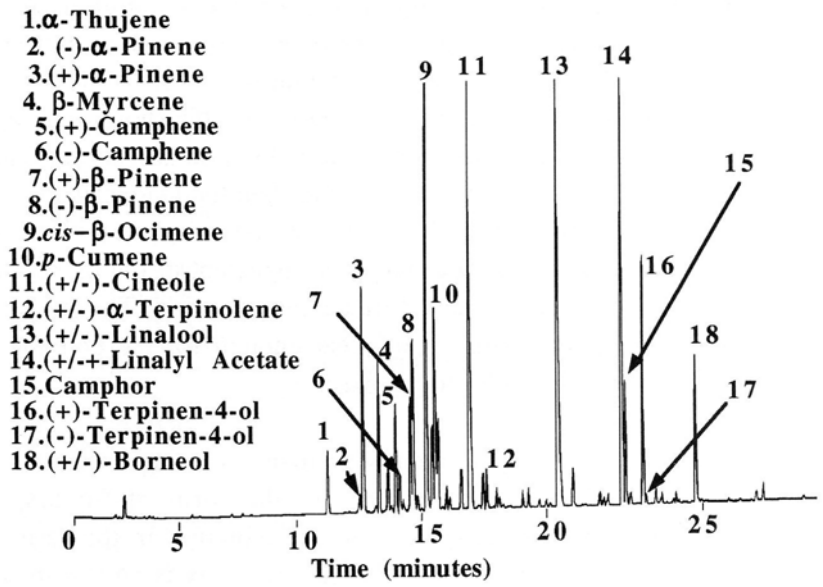
Obr. 3.4: Struktura α, β a γ CD s uvedenými rozměry kavit

CD mohou tvořit inkluzní sloučeniny jak s organickými tak i anorganickými látkami v polárních rozpouštědlech, jejich směsích a na rozhraních pevné a plynné fáze.

Stacionární fáze na bázi CD v GC mohou být nativní (čisté) CD, které vykazují veliké hodnoty α, trpí ovšem malou účinností a krátkou životností. Modifikované CD tyto nevýhody postrádají. Permethylované CD mají vysoký bod tání a bývají často používány jako roztoky v polysiloxanech. Per-n-pentylované CD (Lipodex™) mají naopak nízký bod tání. Polárnější jsou hydroxypropyl-, acetyl- a trifluoroacetyl-deriváty CD. V případě potřeby lze užší okraj CD kavity blokovat navázáním objemného substituentu, např. silanizováním, čehož lze současně také použít k chemickému navázání fáze do GC kolony (Chirasil-Dex).

Při výzkumu CD-CHSP se ukázalo, že použití vysokých koncentrací CD ve vhodné matrici (např. v polysiloxanech, OV-1701, apod.) nevede k velkému zvýšení α. Naopak bylo zjištěno, že koncentrace nad 30 % (v/w) pro permethylované a nad 50 % pro vysokomolekulární CD žádné zlepšení nepřináší a optimální separace je dosahováno většinou pro nízké koncentrace CD. Bylo též zjištěno, že separační faktor a je nelineárně závislý na koncentraci CD.

Na separační děj má, kromě dalších experimentálních parametrů, samozřejmě značný vliv druh použitého CD (velikost kavity) a také druh derivátu resp. derivatizace použitý pro málo těkavé analyty (např. je velký rozdíl mezi acetyl-, trichloracetyl- a trifluoracetyl-deriváty).



Obr. 3.5: Chromatogram levandulového oleje, kolona 30 m × 0,25 mm, 0,25 μm β-DEX™, 0-220 °C při 4 °C min^{-1}, He 35 cm s^{-1}, vzorkování headspace 30 °C 30 s, ©Supelco

3.4 Termodynamika chirálních separací

Veličinou rozhodující o chirální separaci enantiomerů R a S je rozdíl Gibbsových energií *Δ(ΔG)* interakce enantiomer-chirální selektor ve sf:

$$-\Delta_{R,S}\left(\Delta G\right)=-\left(\Delta G_R-\Delta G_S\right)=RT\ln\frac{K_R}{K_S}=-\Delta_{R,S}\left(\Delta H\right)+T\cdot\Delta_{R,S}\left(\Delta S\right)$$

kde K je rozdělovací konstanta mezi sf a mf (resp. konstanty stability asociátů,$K_R > K_S$), $\Delta(\Delta H)$ je změna enthalpie, $\Delta(\Delta S)$ je změna entropie a T je absolutní teplota.

Teplotní závislost entalpického a entropického příspěvku je opačná, což vede k jevu, kdy jsou za určité teploty oba příspěvky rovnocenné (tzv. *H-S* kompenzace). Potom platí, že

$$-\Delta_{R,S}\left(\Delta G\right)=0\text{, tudíž }\Delta_{R,S}\left(\Delta H\right)=T_{iso}\cdot\Delta_{R,S}\left(\Delta S\right)$$

Tato teplota se nazývá isoenantioselektivní teplota, T_{iso}, při které je chirální separace nulová a dochází ke splynutí píků obou enantiomerů. Platí, že pod T_{iso} je chirální separace kontrolována entalpií a pořadí eluce je S, R, zatímco nad T_{iso} je chirální separace kontrolována entropií a pořadí eluce je R, S. Většina chirálních separací je obvykle kontrolována entalpií, protože se separace provádějí při nejnižší možné teplotě. V chirální GC lze rozdělit enantiomery lišící se v $\Delta(\Delta G)$ o 0,1 kJ/mol a více.

3.5 Určení absolutní konfigurace enantiomerů

Velmi důležitým úkolem je zjištění asolutní konfigurace enantiomerů. Chirální GC umí tento úkol vyřešit dvěmi metodami.

Přímá metoda používá dávkování čisté referenční látky o známé konfiguraci a srovnání výsledku s analýzou určovaného enantiomeru. Tato metoda poskytuje absolutní jistotu určení konfigurace, ovšem její nevýhodou je malá dostupnost oticky čistých referenčních látek. Tento nedostatek zčásti eliminuje druhá metoda.

Nepřímá metoda je založena na použití empirických pravidel vyjadřujících korelaci absolutní konfigurace a retenčního pořadí enantiomerů homologické řady látek. Použití této metody však v sobě nese vždy zbytkovou nejistotu určení konfigurace. Navíc je metoda omezená na měření prováděná za stejné teploty (viz. ΔH-ΔS kompenzace nebo multimodální rozlišovací mechanizmus).

3.6 Vyjadřování složení směsi enantiomerů

Enantiomerní složení látek se v praxi vyjadřuje několika způsoby znichž dále jsou uvedeny Enatiomeric Excess (ee) a Chromatographic Purity (ChP).

Enantiomeric Excess (ee)

Označíme-li E_1 a E_2 jako obsahy enantiomerů ve vzorku, pak ee lze vypočíst dle vzorce

$$ee=\left[\frac{E_1-E_2}{E_1+E_2}\right]\cdot 100\qquad(\%)$$

přičemž indexem 1 se označí majoritní enantiomer. Platí, že ee = 0 (0 %) pro racemát, zatímco ee = 1 (100 %) pro čistý enantiomer 1.

Chromatographic Purity (ChP)

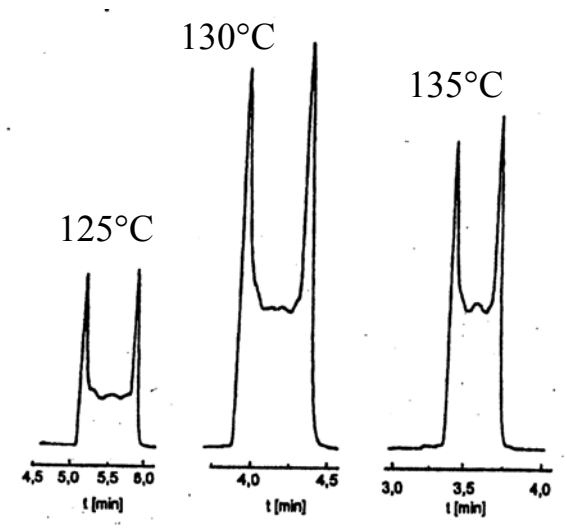
$$ChP = \left[\frac{E_1}{E_1 + E_2} \right] \cdot 100 \quad (\%)$$

Pro ChP platí, že ChP = 50 % pro racemát a ChP = 100 % pro čistý enantiomer 1.

3.7 Dynamická chirální plynová chromatografie

Pokud dochází u enantiomerů k dynamické konverzi jejich konfigurace během chromatografické analýzy, lze na chromatogramech pozorovat proměnlivé eluční profily s plošinou mezi píky enantiomerů (tzv. batman-peaks, viz obr. 3.6). Tento proces je označován jako enantiomerizace. Enantiomerizace slouží někdy jako diagnostická pomůcka určení stability enantiomerů z minimálního množství racemického vzorku. Analýzou tvaru píků a jejich teplotní závislosti lze určit velikost enantiomerizační bariéry.

Navzájem se měnící enantiomery mají rozdílné chemické potenciály ve sf a tudíž také rozdílné rozdělovací konstanty zodpovědné za chirální separaci. Proto jsou i rychlosti konverze jednoho enantiomeru v druhý rozdílné a pokud je např. první eluovaný enantiomer S ($K_S < K_R$) konvertován rychleji na R ($k_{S\text{-}R} > k_{R\text{-}S}$), setrvá tento déle ve sf a tudíž se obohacení či ochuzení R vyruší navzájem a neobjeví se celková deracemizace vzorku.



Obr. 3.6: Enantiomerizace dimethyl-2,3-pentadiendioatu na Chrasil-Ni

3.8 Enantiomerické značkování (labelling)

Množství enantiomeru v komplexních vzorcí lze stanovit v chirální GC metodou enantimerického značkování [4]. V této metodě je přesně známé množství enantiomerně čistého standardu nebo racemátu přidáno do vzorku jako interní standard (IS) a původní množství enantiomeru ve vzorku je určeno ze změny poměrného zastoupení enantiomerů způsobené tímto přídavkem. Předpokladem metody je, že poměrné zastoupení enantiomerů není ovlivněno manipulací se vzorkem, derivatizací, ředěním, nástřikem, detekcí ani ztrátami. Další podmínkou použití této metody je znalost enantiomerní čistoty vzorku a standardu. Enantiomerní složení vzorku lze pak vypočítat následovně.

Pokud A je podíl koncentrací (ploch píků) enantiomerů R a S v původním vzorku, $A = \frac{[R]}{[S]}$, a B je tentýž podíl po přídavku C mg IS, $B = \frac{[\mathrm{R}']}{[\mathrm{S}']}$, pak lze v případě značkování čistým enantiomerem R vypočítat zastoupení enantiomerů následovně $m_R = \frac{AC}{B-A}$ (mg), $m_S = \frac{m_R \text{ (mg)}}{A}$ (mg).

V případě použití racemátu jako IS jsou $m_R = \frac{C}{2} \cdot \frac{1-B}{\frac{B}{A}-1}$ (mg) a $m_S = \frac{C}{2} \cdot \frac{1-B}{B-A}$ (mg).

Literatura

1. LC.GC Int., April (1997) 252.
   V. Schurig, *J. Chromatogr.A,* 666 (1994) 111.
   W.Vetter, V. Schurig, *J. Chromatogr.A,* 774 (1997) 143.
   V. Schurig, *J. Chromatogr.A,* 906 (2001) 275.
   V. Schurig, Trends in analytical chemistry, 21 (9+10) 2002.
2. V. Schurig, M. Juza, M. Preschel, G.J. Nicholson, E. Bayer, *Enantiomer* 4, 1999, 153.
3. Schurig V., Betschinger F., *Chem.Rew.,* 92 (1992) 873.
4. H. Frank, G.J. Nicholson, E. Bayer, *J.Chromatogr.* 167 (1978) 187.

4. ENANTIOSELEKTIVNÍ SEPARACE V HPLC

doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta , Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2
tesarove@natur.cuni.cz

4.1 Úvod

Enantioselektivní separaci v HPLC lze docílit dvěma odlišnými způsoby:

1. První cestou je vytvoření diastereomerů derivatizací analytu před vlastní separací. Vlastní dělení vzniklých diastereomerů, které mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti i v achirálním prostředí, je následně možné provádět v běžném (nechirálním) kapalinově chromatografickém systému. Takový postup se nazývá ***nepřímé dělení enantiomerů***.

2. Druhý způsob je ***přímé dělení enantiomerů*** ve stereoselektivním separačním prostředí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Tento postup tedy nevyžaduje žádnou předchozí derivatizaci, separační systém je však třeba upravit tak, aby umožňoval stereoselektivní rozpoznávání.

4.2 Nepřímé metody – derivatizace

Nepřímé metody separace enantiomerů jsou klasickým přístupem k analýze chirálních sloučenin v HPLC. Derivatizace enantiomerně čistými sloučeninami – chirálními selektory (CS) vede k tvorbě kovalentně vázaných diastereomerů. Rozdílné rychlostní konstanty derivatizačních reakcí pro jednotlivé enantiomery a možnost racemizace během derivatizačního procesu představují dvě hlavní úskalí použití nepřímých metod při stanovení enantiomerů. Pro derivatizační reakce jsou potřeba CS vysoké enantiomerní čistoty. Výhodou je možnost použití achirální stacionární fáze, a dále možnost záměny elučního pořadí enantiomerů, použije-li se pro derivatizaci opačný enantiomer jako derivatizační činidlo.

Řada derivatizačních činidel byla vyzkoušena pro tento účel. Funkční skupiny, na nichž derivatizace probíhá nejčastěji, jsou aminoskupiny, karboxylové a hydroxylové skupiny. Jako derivatizační činidla se využívají např. isokyanáty nebo isothiokyanáty, dansyl chlorid (DNS-Cl) a další dansyl-deriváty, fluorenylmethyloxykarbonyl-L-prolin (FMOC-L-prolin), *o*-ftalaldehyd (OPA) spolu s chirálními thioly pro chirální derivatizaci aminokyselin či aminů. Esterifikace chirálními alkoholy nebo amidace aminy jsou ukázky možných postupů pro derivatizaci karboxylové skupiny. Pro derivatizaci hydroxyskupin analytů lze použít rovněž esterifikaci, tentokrát chirálními kyselinami či jejich deriváty nebo acylkyanidy a isokyanáty. Bližší informace o chirálních derivatizačních činidlech a postupech lze najít v pracích věnovaných této problematice (viz doporučená literatura).

Je třeba poznamenat, že derivatizaci lze využít i ke snížení detekčního limitu. Takový přístup lze zařadit mezi nepřímé metody, když derivatizační činidlo vede jak k tvorbě kovalentního diastereomeru, tak ke vzniku derivátu umožňujícího citlivější detekci (tj. diastereomer má větší absorbanci, vodivost aj. než analyt sám). Derivatizace však může být použita i tehdy, když se diastereomer nevytváří. Pak se jedná o přímou metodu separace (viz část 4.3) enantiomerů a derivatizace vede pouze ke zvýšení citlivosti detekce, příkladem může být vnesení fluorescenční skupiny do struktury analytu.

4.3 Přímé metody

Na rozdíl od tvorby stabilních diastereomerů derivatizací popsanou v části 4.2, v případě přímých metod dochází k tvorbě labilních diastereomerních komplexů odlišné stability.

K realizaci enantioselektivních separačních systémů v HPLC jsou možné dva přístupy:

1. použití chirální stacionární fáze (CSP),
2. přidání chirálního aditiva do mobilní fáze.

Je zřejmé, že obě možnosti mají své výhody a nevýhody. Použití chirálních stacionárních fázi je v zásadě omezeno komerčně dostupnými typy CSP, případně vlastními schopnostmi experimentátorů tyto fáze připravit. Výhody a nevýhody použití přídavku chirálního selektoru do mobilní fáze jsou shrnuty v tab. 4.1. Zmíněné výhody tohoto uspořádání lze využít především v kapilárních systémech kapalinové chromatografie, kde je výrazně snížena spotřeba často drahého chirálního selektoru. Jako chirální aditiva se používají CS stejné nebo analogické těm, které se využívají při přípravě/výrobě chirálních stacionárních fází. Koncentrace CS v mobilní fázi je pak vedle volby pufru (typu, koncentrace a pH) a organického modifikátoru resp. rozpouštědel (a jejich poměru) dalším faktorem významně ovlivňujícím chirální rozlišení.

Přes řadu výhod používání chirálního aditiva do mobilní fáze se v současné chirální HPLC více uplatňují separační systémy využívající chirální stacionární fáze v kombinaci s nechirální fází mobilní. Proto také v následující části textu bude této problematice věnována hlavní pozornost.

Tab. 4.1: Výhody a nevýhody přídavku chirálního selektoru do mobilní fáze

Výhody	Nevýhody
levnější achirální stacionární fáze s větší separační účinností	CS může absorbovat
široký výběr CS	velká spotřeba CS
snadná výměna nevhodně zvoleného CS	špatná rozpustnost CS
snadná záměna elučního pořadí *R*-/*S*-enantiomerů	pro preparativní použití - nutnost rozrušit komplex CS-analyt
v některých případech odlišná enantioselektivita	

4.4 Chirální stacionární fáze

První zdařilá separace enantiomerů (až na základní linii) v HPLC byla popsána Davankovem začátkem sedmdesátých let minulého století. Od roku 1981 se začaly objevovat první komerční chirální stacionární fáze – tzv. Pirklovy fáze.

V současné době je k dispozici bohatý výběr rozličných chirálních stacionárních fází od řady výrobců. Z pohledu spotřebitele jsou nejvýhodnější takové fáze, které umožňují dělení co nejrozmanitější škály chirálních analytů. Pro konkrétní aplikační účely, často v preparativním měřítku, se však dobře hodí i tzv. na míru šité CSP (tailor-made CSP), které umožňují dělit pouze danou dvojici enantiomerů nebo velmi omezenou skupinu podobných analytů.

Chirální stacionární fáze lze dělit podle různých kriterií. Nejvhodnější se jeví dělení podle podstatného typu interakce, který má největší vliv na chirální rozlišení, neboť tak lze nejlépe vyhledávat vhodnou chirální stacionární fázi pro danou aplikaci. Vzhledem k tomu, že o stereoselektivním rozlišení rozhoduje více interakcí současně (viz kapitola 2.6), a navíc zastoupení jednotli-

vých interakcí resp. celý interakční mechanismus se zásadně liší podle použitého separačního módu (pokud daná CSP umožňuje práci ve více módech, s různými mobilními fázemi), i toto dělení často selhává. Tab. 4.2 se snaží o určitou kategorizaci chirálních stacionárních fází používaných v HLPC.

Tab. 4.2: Chirální stacionární fáze pro HPLC a ukázky používaných chirálních selektorů

Typ CSP	Příklady CS
ligandově-výměnné	aminokyseliny + Cu, Ni, Zn (II)
π-komplexy, vodíková vazba (Pirkle)	3,5-dinitrobenzoylderiváty AA
inkluzní	
chirální crown ethery	16-crown polyether
cyklodextriny	nativní a derivatizované CD
přírodní polymery	
polysacharidy	derivatizovaná celulosa (amylosa)
proteiny	sérové albuminy
enzymy	trypsin, pepsin
syntetické polymery	
vtištěné polymery (MIP)	vtištěné aminokyseliny
makrocyclická antibiotika	teikoplanin, vankomycin
chininové alkaloidy	mnoho derivátů – karbamáty
různé	námelové alkaloidy

Komerční CSP nejčastěji používané pro analytické účely využívají jako chirální selektory polysacharidy, cyklodextriny nebo makrocyklická antibiotika, případně proteiny nebo deriváty aminokyselin. Charakteristické vlastnosti a možnosti aplikací těchto chirálních stacionárních fází budou proto probrány podrobněji.

4.4.1 CSP na bázi polysacharidů

Polysacharidové chirální stacionární fáze jsou v současnosti k dispozici ve dvou principiálně odlišných variantách: (1) nosič, převážně silikagel, je pokryt chirálním selektorem (coated CSP) a (2) chirální selektor je chemicky vázán na nosič (immobilized CSP). Stabilita pokrývaných CSP byla nízká vzhledem k rozpustnosti derivátů polysacharidů ve vodě a jiných polárních rozpouštědlech, a tak tyto fáze měly značně omezený výběr kompatibilních mobilních fázi. Musely být používány směsi alkanů s alkoholy nebo obecně mobilní fáze s nízkým obsahem vodné složky. U imobilizovaných CSP se vazba polysacharidů často uskutečňuje prostřednictvím 3-aminopropylu na silikagelu a diisokyanát se přidává jako síťovací činidlo. Novější možností je kopolymerace s vinylovým monomerem, který je navázán na celulose.

Jako polysacharidů se využívá různých derivátů jak celulosy, tak amylosy. Oba polysacharidy mají levotočivou helikální strukturu. Stabilnější konformace celulosy je méně ovlivňována substitucí než flexibilnější struktura amylosy. Tím je vysvětlována odlišná enantioselektivita obou polysacharidů. Mezi deriváty se nejvíce osvědčily triacetáty, trifenylkarbamáty nebo benzoáty. Šroubovice trifenylkarbamátu je uzpůsobena tak, že má polární karbamátové skupiny uvnitř, zatímco nepolární aromatické skupiny jsou vně. Hlavní mechanismus enantiosektivního rozlišení je připisován vodíkovým vazbám a π-π interakcím.

Současně vyráběné CSP na bázi polysacharidů jsou dostatečně stabilní a lze je již používat i v reverzním módu, tj. s mobilními fázemi tvořenými vodou/pufrem s přídavkem organického modifikátoru.

4.4.2 Cyklodextrinové CSP

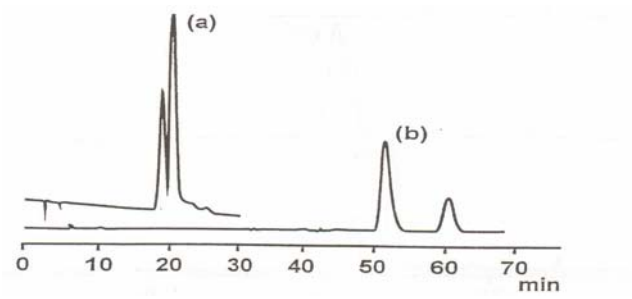
Cyklodextriny (CD) a jejich deriváty patří všeobecně mezi nejznámější chirální selektory. Jsou to cyklické oligosacharidy tvořené různým počtem glukopyranosových jednotek. Nejvíce se uplatňují α-CD, β-CD a γ-CD, jejichž kruhy tvoří šest, sedm resp. osm stavebních jednotek. Z těchto základních cyklodextrinů se nejčastěji používá β-CD, jehož rozměry kavity nejlépe vyhovují pro inkluzi hydrofobních částí řady molekul. Nativní cyklodextriny lze derivatizovat na hydroxylových skupinách v polohách 2, 3 a 6. Derivatizace vede k modifikaci funkčních skupin, ale ovlivňuje i tvar, velikost a přístupnost kavity cyklodextrinu pro inkluzi analytu. Deriváty cyklodextrinu, které se nejvíce uplatňují jako CS pro výrobu chirálních stacionárních fází jsou dimethyl-β-CD, acetyl-β-CD, hydroxypropyl ether-β-CD, naftylethylkarbamoyl-β-CD nebo 3,5-dimethylfenylkarbamoy-β-CD.

Popularita cyklodextrinových chemicky vázaných CSP je dána jejich schopností dělit strukturně velmi rozmanité enantiomerní páry a možností použití v různých mobilních fázích – separačních módech bez nebezpečí ztráty jejich separační účinnosti. Vzhledem k tomu, že se v jednotlivých separačních módech uplatňují rozdílné interakce, lze pouhou změnou mobilní fáze zásadně ovlivnit enantioseparaci. Hydrofobní interakce, a tudíž inkluze hydrofobní časti analytu do kavity cyklodextrinu, se uplatňuje v reverzním separačním módu. V normálním systému, s méně polární mobilní fází, převládají vodíkové vazby, π-π- a dipól-dipól interakce. Inkluze analytu do kavity CD se neuplatňuje. Při použití polárně-organické mobilní fáze tvořené převážně acetonitrilem s malým přídavkem methanolu a řádově desetinami či setinami procenta triethylaminu a octové kyseliny mají na chirální rozlišení vliv vzájemné interakce funkčních skupin chirálního selektoru a analytu (měl by mít dvě funkční skupiny, alespoň jednu v blízkosti chirálního centra), významná je role vodíkové vazby. Polárně organický separační mód představuje velmi účinný systém pro separaci řady enantiomerů. Jeho předností jsou vysoká účinnost separace, velmi dobrá symetrie píků a dobré rozlišení při kratší době analýzy.

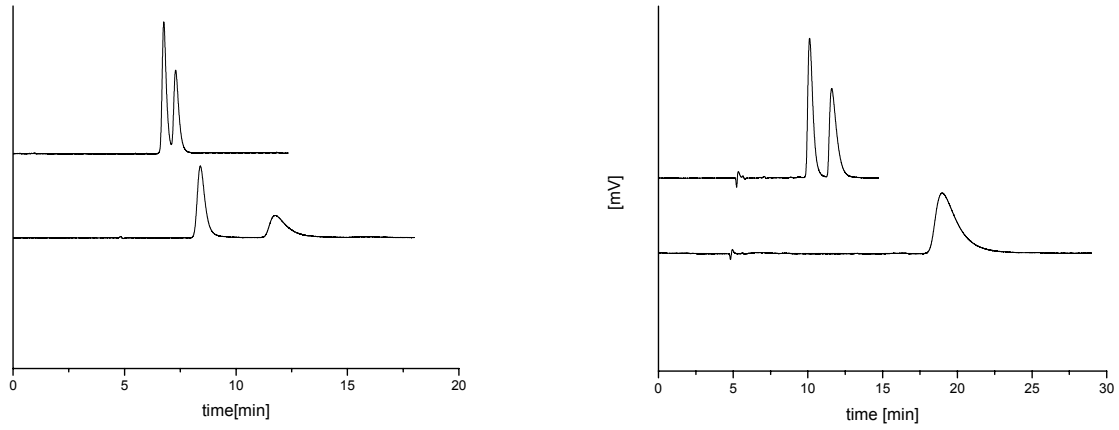
4.4.3 CSP na bázi makrocyklických antibiotik

Makrocyklická antibiotika (MA), především glykopeptidy – teikoplanin, vankomycin, ristocetin A, avoparcin – tvoří další významnou skupinu chirálních selektorů, které našly velké uplatnění pro výrobu chirálních stacionárních fází s širokými aplikačními možnostmi. Tyto glykopeptidy mají mnoho chirálních center a funkčních skupin, které se mohou podílet na celé řadě simultánních interakcí potřebných pro chirální rozlišení. Navíc je možné s MA CSP pracovat také ve všech separačních módech zmiňovaných u cyklodextrinových fází. Polárně organická mobilní fáze zde má poněkud jiné složení. Základní komponenty zůstávají stejné, výrazně se však zvýšil podíl methanolu. Úspěšné separace jsou tak často dosahovány v čistém methanolu s minimálními přídavky kyseliny a báze. CSP s různými MA vykazují komplementární separaci, tzn. pokud např. na vankomycinové CSP dojde v určité mobilní fázi k částečné enantioseparaci daného analytu, při zachování stejného složení mobilní fáze se na jiné, třeba teikoplaninové fázi, často docílí úplného rozdělení enantiomerů – viz obr. 4.1.

Struktura teikoplaninu resp. teikoplaninové CSP, která se výborně osvědčila při separaci aminokyselin, byla úspěšně modifikována odštěpením cukerných částí molekuly za vzniku teikoplaninu aglykonu (TAG) resp. TAG CSP. Na obr. 4.2 je ukázáno srovnání separace aminokyselin a jejich *N-terc*-butyloxykarbonyl-derivátů na teikoplaninové a teikoplan aglykonové chirální stacionární fázi. Je patrné, že použití TAG CSP vede v obou případech ke zvýšení retence, které je u aminokyselin převážně doprovázeno zvýšením hodnoty chirálního rozlišení. Je-li však aminoskupina aminokyseliny blokována, k enantioseparaci nedojde.



Obr. 4.1: ***Separace meluolu (semisyntetického námelového alkaloidu) na (a) vankomycinové CSP, (b) teikoplaninové CSP; mobilní fáze: vždy 60% MeOH v 0,1% TEAA, pH 4,0.***



(a) (b)

Obr. 4.2: ***Separace enantiomerů tyrosinu (a) a N-terc-butyloxykarbonyl-tyrosinu (b) na teikoplaninové CSP (horní chromatogramy) a teikoplanin aglykonové CSP (dolní chromatogramy); mobilní fáze: vždy 20% MeOH v 1,0% TEAA, pH 4,2.***

4.4.4 Proteinové CSP

Schopnost proteinů tvořit trojrozměrnou strukturu a stereoselektivně interagovat s léčivy, lze obecně využít i při tvorbě enantioselektivního prostředí v HPLC. Na enantioselektivních interakcích se podílejí především interakce hydrofobní, elektrostatické síly a vodíkové vazby. Lidský sérový albumin (HSA) a hovězí sérový albumin (BSA), stejně jako α_1-kyselý glykoprotein (AGP), ovomukoid, avidin a některé enzymy jsou nejčastěji používané proteinové selektory pro přípravu chirálních stacionárních fází. Velmi důležitou úlohu u těchto fází hraje charakter vazby na nosič (spacer). Hydrofobnější spacer zřejmě vede k vytvoření rigidnější struktury CSP, a tím k zlepšení schopnosti chirálního rozpoznávání. S proteinovými CSP je vhodné pracovat ve vodném prostředí, avšak přídavek několika procent např. 2-propanolu má většinou pozitivní vliv na chirální rozlišení. Naopak vysoký obsah organického rozpouštědla by mohl vést k nežádoucí změně konformace a ke ztrátě separačních schopností kolony.

4.4.5 Ligandově-výměnné CSP

Enantioselektivní separační systémy, které pracují na principu ligandově-výměnné interakce mezi analytem a chirálním selektorem jsou používané v obou uspořádáních, tj. s CS a centrálním ato-

mem komplexu (nejčastěji Cu^{2+}) v mobilní fázi nebo může být chirální selektor vázán na nosič. První CSP tohoto typu využívaly polymérní, polystyrén-divinylbenzenové nosiče. K výraznému zlepšení účinnosti separace a chirálního rozlišení došlo až s vazbou těchto chirálních selektorů na silikagel. Aminokyseliny a jejich deriváty, které se nejvíce osvědčily jako CS jsou enantiomery prolinu, hydroxyprolinu, leucinu, valinu a fenylalanin amidu.

4.4.6 Syntetické polymery jako CSP

Zatímco přírodní polymery jako polysacharidy či proteiny a jejich deriváty našly poměrně široké uplatnění jako chirální selektory resp. CSP jak v analytickém, tak v preparativním měřítku, čistě syntetické polymery doposud v chirální HPLC takové využití nezaznamenaly. Přesto se vývoj v této oblasti nezastavuje. Důvodem je především bohatá škála chemických struktur, které makromolekulární chemie poskytuje, a možnosti jejich modifikace a snadná syntéza CS s opačnou konfigurací. Pro přípravu CSPs na bázi syntetických polymerů byly použity čtyři různé postupy:

(1) Kopolymerace chirálních monomerů s achirálním síťovacím činidlem, příkladem mohou být chirální akrylamidy nebo metakrylamidy s ethylen diakrylátem.

(2) Asymetricky katalyzovaná polymerace prochirálních monomerů použitá třeba v případě trifenylmethylmetakrylátu a difenyl-2--pyridylmethylmetakrylátu. Tyto polymery pak byly vázány na silikagel.

(3) Katalyzovaná kopolymerace chirálních monomerů s diallylovými skupinami s multifunkčními hydrosilany. Jako monomery byly použity např. deriváty *N*, *N′*-diallyl-L-tartradiamidu. I tyto polymery byly následně vázány na povrch silikagelu.

(4) Vytvoření chirálního lineárního homopolymeru, který se naváže na silikagelový nosič. Tímto postupem byly vytvořeny CSPs s polyakrylamidem nebo polymetakrylamidem modifikovaným např. fenylalaninem nebo mentolem. Univerzálnějšího použití však našla chirální stacionární fáze na bázi *trans*-1,2-diaminocyklohexanu, s komerčním označením P-CAP, nebo *trans*-1,2--difenylethylen diaminu, vyráběná pod názvem P-CAP-DP.

4.4.7 Polymerní CSP s vtištěnými templáty

Speciální variantou syntetických polymerních chirálních stacionárních fází jsou vtištěné polymery (MIP, molecular imprinted polymers). Připravují se polymerací monomerů (např. kyselina metakrylová) se síťovacím činidlem (např. ethylenglykol dimetakrylát) za přítomnosti enantiomeru templátové molekuly. Následně se teplát ze struktury polymeru uvolní, a tak se vytvoří jeho otisk, který je pak vysoce selektivní pro interakci s templátovými molekulami (příp. strukturně velmi blízkými látkami). Jako templáty byly nejvíce používány enantiomery aminokyselin.

4.4.8 CSP na bázi derivátů chininu

Komerčně dostupné CSP na bázi chininu vznikly na základě rozsáhlého studia celé řady laboratorně připravených derivátů. Kombinatoriální přistup umožnil pochopení interakčního mechanismu těchto systémů a jejich optimalizaci. Iontové interakce, vodíkové vazby, π-π interakce a sterické stínění jsou zodpovědné za dosažené hodnoty faktorů selektivity (často několik desítek), které vedly k využití těchto fází hlavně pro preparativní účely.

4.5 Závěr

Robustní metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie našly významné uplatnění v analýze enantiomerů. Dnešní bohatý výběr komerčních CSP, včetně takových, které jsou schopny rozdělit mnoho strukturně velmi odlišných analytů, usnadňuje vytvoření potřebné analytické metody. Volba separačního systému je však přes stále lepší pochopení interakčního mechanismu vedoucího k chirálnímu rozlišení relativně náročný proces. Multimodální screening chirálních stacionárních fází s širokými možnostmi uplatnění je, především ve farmaceutickém průmyslu, hlavní cestou k nalezení vhodné analytické metody pro požadovanou aplikaci.

Doporučená literatura

G. Gubitz, M.G. Schmid: Biopharm. Drug Dispos. 22 (2001) 291.

Beesley T. E., Scott R. P. W.: *Chiral Chromatography*. JohnWiley & Sons, Chichester 1998.

E.Tesařová, D.W.Armstrong: *Enantioselective separation* (kap. 5) v *"Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences*, Eds. Z.Deyl, I.Mikšík, F.Tagliaro, E.Tesařová, Elsevier, Amsterdam, 1998, s. 197.

Z.Deyl, I.Mikšík, E.Tesařová: *Selected derivatization reactions* (kap. 4) v *"Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences*, Eds. Z.Deyl, I.Mikšík, F.Tagliaro, E.Tesařová, Elsevier, Amsterdam, 1998, s. 141.

5. STUDIUM INTERAKČNÍCH MECHANISMŮ V SEPARAČNÍCH SYSTÉMECH – LFER

RNDr. Jana Lokajová, Mgr. Květa Kalíková a doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2

5.1 Úvod

Separace enantiomerů je důležitou podskupinou aplikací separačních metod. Pro kontrolu enantiomerní čistoty se velmi často využívá metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Pro výběr separačních podmínek, tj. výběr vhodné chirální stacionární fáze a mobilní fáze nebo chirálního selektoru přidávaného do mobilní fáze, je nutné hlubší poznání interakčních a retenčních mechanizmů. V posledních desetiletích byly retenční mechanizmy reverzního módu vysokoúčinné kapalinové chromatografie intenzivně studovány a byly navrhovány různé modely sloužící k jejich objasnění. Přesto není žádný model všeobecně akceptován. Důvodem je komplexnost chromatografického systému a početnost různých parametrů ovlivňujících retenci. Jedním ze semiempirických přístupů uplatňovaných v analýze retenčního mechanizmu je metoda lineárních vztahů volných energí (LFER). Jak vyslovil Horváth et al. (1996): „HPLC goes beyond the usual analytical or preparative applications and falls in the domain of molecular chromatography".

5.2 Vztah mezi chemickou strukturou a separačním chováním – testové metody

Reverzní mód vysokoúčinné kapalinové chromatografie (RP HPLC) patří mezi velmi často používané HPLC módy. Touto technikou mohou být separovány téměř všechny typy sloučenin. S rostoucím využitím RP HPLC vzniká i široké spektrum reverzních stacionárních fází. Známé, výrobcem udávané technické parametry chromatografických kolon nejsou ve většině případů postačujícím kriteriem k výběru optimální kolony pro danou separaci. Z hlediska posuzování a následného rovnání účinnosti a selektivity separačních systémů je žádoucí nalézt vztah mezi chemickou strukturou analytů, fyzikálně–chemickými vlastnostmi stacionárních fází a jejich separačními účinky.

Během posledních desetiletí bylo navrženo několik typů testů pro charakterizaci separačních kolon. Používané testy využívají spektroskopické techniky, statistické metody, van`t Hoffovy závislosti (termodynamické měření), určení fyzikálních vlastností stacionární fáze a v neposlední řadě se využívají chromatografické testovací metody.

Přestože první čtyři jmenované typy testů poskytují informaci o stacionární fázi, pro výběr optimálního typu separační kolony je nutné použít chromatografické testovací metody. Použití chromatografických testů umožňuje charakterizaci kolon obecně pomocí parametrů, jakými jsou hydrofobicita, silanolová aktivita, obsah uhlíku, či pomocí parametrů charakterizujících fyzikálně-chemické vlastnosti stacionární fáze. Mezi chromatografické testy se řadí například metody založené na určitém modelu – Horváthův model, Galushkův model, model interakčních indexů dle Jandery a modely LFER. Dále se do chromatografických testů řadí Tanakův test, Engelhardtův test a Waltersův test, pomocí kterých je možné určit například silanolovou aktivitu.

Volné silanolové skupiny silikagelového nosiče umožňují další, často nežádoucí interakce mezi stacionární fází a analytem, což negativně ovlivňuje především retenci bazických solutů. Tyto interakce způsobené van der Waalsovými silami mohou zahrnovat interakce ion-ion (iontově-výměnné), ion-dipól, dipól-dipól (vodíkové vazby), dipól-indukovaný dipól a indukovaný dipól-indukovaný dipól (Londonovy síly). Poslední dva typy interakcí částečně závisí na polarizibilitě analytů a stacionární fáze. Tyto mezimolekulární interakce dosahují u interakcí ion-ion několika stovek kJ mol^{-1}, v případě Londonových sil jednotek kJ mol^{-1}. V RP-HPLC se mezi analytem a silikagelovým nosičem nejvíce uplatňují iontově-výměnné a vodíkové interakce.

Pro popis vztahů mezi chemickou strukturou analytu a interakcemi, kterých se analyt v chromatografickém systému účastní, je třeba zahrnout celé spektrum fyzikálně–chemických interakcí, které ovlivňují retenci analytu v daném systému. Mezi tyto interakce patří hydrofobní interakce, interakce prostřednictvím vodíkové vazby, elektrostatické interakce, disperzní síly, vazby spojené s přenosem náboje, koordinační vazba či sterické repulze.

Síla hydrofobní interakce se koreluje rozdělovacím parametrem mezi oktan-1-ol a vodu (log P), či parametrem V_x (McGowanův objem solutu). Interakční energie této interakce dosahuje asi 4,2 kJ mol^{-1}. Síla vodíkové vazby se koreluje parametry α (acidita vodíkové vazby), β (bazicita vodíkové vazby) nebo elektronovou hustotou na atomech účastnících se této interakce. Interakční energie vodíkové vazby činí 4 až 45 kJ mol^{-1}. Sílu elektrostatické interakce vyjadřuje parametr π, její energie dosahuje 4 až 30 kJ mol^{-1}. Disperzní interakce je dána součinem molekulové refrakce a ionizačního potenciálu s interakční energií 2,1 až 4,2 kJ mol^{-1}. Síla vazby v komplexu s přenosem náboje je dána energií nejvyššího obsazeného molekulového orbitalu a molekulového orbitalu s nejnižší energií. Interakční energie této vazby činí 4 až 30 kJ mol^{-1}. Sílu sférické repulze popisuje van der Waalsův poloměr, či sterické Taftovy konstanty. Pro srovnání: interakční energie kovalentní vazby činí 167-460 kJ mol^{-1}.

V reverzním módu chromatografických separací obvykle nejvýznamněji ovlivňují retenci hydrofobní interakce. Těmi obyčejně rozumíme vytěsňování analytů z jejich vodného okolí, založené na omezení energeticky nevýhodné interakce nepolárních látek s vodním prostředím. Hydrofobicita vypovídá o schopnosti analytu preferovat nevodná prostředí před vodnými.

5.3 Model lineárních vztahů volných energií – LFER

Popis chování analytů z hlediska výše zmíněných interakcí dává možnost predikce retence na základě kvantitativní korelace retence analytu s vlastnostmi stacionární fáze, strukturou látky, či biologickou aktivitou. Obecně se takové postupy řadí mezi modely lineárních vztahů volných energií (LFER – Linear Free Energy Relationship), které jsou založené na lineární korelaci mezi změnami volné energie fyzikálně-chemických procesů.

Modelem, který se široce využívá v toxikologii, či farmakologii, je kvantitativní vztah mezi strukturou a aktivitou léčiv, funkčních skupin v homologických řadách, apod. (QSAR – Quantitative Structure Activity Relationship). Jiné modely korelují retenci analytu s rozdělovacím koeficientem mezi oktan-1-ol a vodu (log P), se změnou pH, teploty, apod. (QSRR – Quantitative Structure Retention Relationship). V rovnicích QSRR figurují různé druhy parametrů. Mezi modely LFER patří i lineární vztah solvatačních energií (LSER – Linear Solvation Energy Relationship), který využívá soubor solvatochromních parametrů Kamleta a Tafta a proto bývá často nazýván solvatochromní rovnice.

5.3.1 Princip lineárních vztahů volných energií, aplikace v HPLC

Lineární vztahy volných energií (LFER) vyjadřují lineární závislost změny Gibbsovy energie, a tím i všech vlastností, které s ní souvisejí (např. retenční faktor), na charakteristikách prostředí. Se změnou Gibbsovy energie systému (ΔG) je v HPLC spojen přenos analytu z mobilní do stacionární fáze (rovn. 5.1) a může na něj být tedy aplikován vztah volných energií.

$$\ln k = \frac{-\Delta G}{RT} + \ln \Phi \tag{5.1}$$

kde k je retenční faktor příslušného analytu, ΔG je změna Gibbsovy energie systému, R univerzální plynová konstanta, T termodynamická teplota a θ fázový poměr.

Změna Gibbsovy energie při přenosu analytu mezi fázemi může být díky konceptu LFER korelována s charakteristikami (deskriptory) analytu a tím může být rozdělena na příspěvky jednotlivých typů interakcí. Toto rozdělení retence analytu do příspěvků různých nezávislých interakcí mezi analytem a složkami chromatografického systému je hlavní výhodou modelu LFER. Jednotlivé příspěvky jsou navzájem nezávislé a každý z nich lze vyjádřit jako součin dvou členů – fyzikálně-chemických parametrů (deskriptorů) analytů a vlivu prostředí na danou interakci. Tento přístup umožňuje detailní studii chromatografického systému kvantitativním určením dílčích interakcí.

V systému HPLC je retence analytu určena celkovým součtem všech interakcí analytu se systémem. Pokud je daná interakce analytu silnější se stacionární fází než s mobilní, bude zvyšovat retenci a naopak. Rovnice LFER vyjadřuje korelaci experimentálně získaných logaritmů retenčních faktorů s parametry (deskriptory) analytů dle rovnice:

$$\log k = \mathbf{c} + \mathbf{v}\, V_x + \mathbf{a}\, \Sigma\alpha_2^H + \mathbf{b}\, \Sigma\beta_2^H + \mathbf{s}.\pi_2^H + \mathbf{r}\, R_2 \tag{5.2}$$

kde k je retenční faktor, V_x je McGowanův charakteristický objem solutu ($cm^3\ mol^{-1}$), $\Sigma\alpha_2^H$ charakteristika protondonorní schopnosti analytu pro tvorbu vodíkové vazby, $\Sigma\beta_2^H$ charakteristika protonakceptorní schopnosti analytu pro tvorbu vodíkové vazby, π_2^H dipolarita/polarizibilita a R_2 rozsah molární refrakce (cm^3). Objem solutu V_x se dělí stem a rozsah molární refrakce deseti, aby byly deskriptory ve stejném měřítku. Členy **c**, **v**, **a**, **b**, **s**, **r** jsou regresní koeficienty rovnice, které budou podrobněji popsány níže v této kapitole.

Jak již bylo dříve uvedeno, LFER koreluje retenci s vlastnostmi analytu, které jsou vyjádřené parametry – deskriptory analytu. Deskriptory kvantitativně charakterizují strukturní odlišnosti mezi sloučeninami. Jsou to empirické parametry a rozdělují se obvykle dle metody, pomocí které byly získány. V roce 1993 Abraham představil nové solvatační parametry (deskriptory), které nyní patří k často aplikovaným charakteristikám látek. Tyto parametry byly publikovány pro velký počet sloučenin, mají jasný fyzikální smysl a způsob jejich aplikace i získávání je poměrně jednoduchý. Abrahamovy solvatační deskriptory jsou odvozeny z rovnovážných měření (plynová chromatografie, rozdělovací koeficienty, apod.) a jsou tudíž s určitou experimentální chybou termodynamickými parametry. Solvatační parametry jsou vhodné k vyjádření chromatografické retence, která je též spjatá se změnou Gibbsovy energie. V rovnici se vyskytuje pět na sobě nezávislých parametrů znázorněných v tab. 5.1, které charakterizují fyzikálně-chemické vlastnosti analytů resp. schopnost analytu podílet se na určitých typech interakcí.

Tab. 5.1: Přehled deskriptorů analytu využívaných pro LFER

Symbol deskriptoru Typ interakce	Popis
V_x [cm^3 mol^{-1} 10^{-2}] hydrofobní	*McGowanův objem solutu*. Tento deskriptor odpovídá za disperzní a kohezivní interakce analytu s chromatografickým systémem (schopnost tvorby kavity). Deskriptor lze jednoduše vypočítat ze struktury analytu pomocí tabelovaných hodnot molárních objemů pro jednotlivé prvky a délky vazby.
$\Sigma\alpha_2^H$ vodíková	*Celková nebo efektivní acidita vodíkové vazby solutu*. Parametr popisuje protondonorní schopnost analytu pro tvorbu vodíkové vazby s molekulami mobilní a stacionární fáze. Stupnice těchto hodnot je vztažena ke změně Gibbsovy energie pro reakce v tetrachlormethanu s referenční bází.
$\Sigma\beta_2^H$ vodíková	*Celková nebo efektivní bazicita vodíkové vazby*. Index udává protonakceptorní schopnost pro tvorbu vodíkové vazby analytu s molekulami mobilní či stacionární fáze. Deskriptor je určen pomocí Abrahamovy stupnice. Nebazické soluty mají nulovou hodnotu tohoto deskriptoru.
π_2^H elektrostatická	*Parametr dipolarity/polarizibility, parametr solubility*. Tento parametr je získaný pomocí plynové chromatografie za využití polární stacionární fáze.
R_2 [cm^3 10^{-1}] disperzní	*Rozsah* molární refrakce/disperzní síl. Získává se z indexu lomu zkoumané látky.

Regresní koeficienty rovnice LFER (viz tab. 5.2) jsou získávány multidimenzionální lineární regresí pomocí statistických programů (např. NCSS, BMDP). Koeficienty reflektují míru citlivosti chromatografického systému vůči dané interakci. Popisují rozdíly v dané fyzikální vlastnosti (molekulární interakci) mezi stacionární a mobilní fází. Kladná hodnota regresního koeficientu indikuje silnější interakci analyt/stacionární fáze než analyt/mobilní fáze. Koeficient vyšší než nula zvyšuje retenci. Pokud je hodnota regresního koeficientu negativní, daná interakce analyt/stacionární fáze je slabší než interakce analyt/mobilní fáze. Výsledná retence je dána součtem příspěvků všech koeficientů.

Regresní koeficienty jsou charakteristické pro daný systém, tzn. stacionární fázi a složení mobilní fáze. Pokud je při separacích použita fixní mobilní fáze a mění se pouze fáze stacionární, regresní koeficienty charakterizují přímo stacionární fázi. Mobilní fáze sice separaci ovlivňuje, ale pokud je její složení v různých separačních systémech neměnné, regresní koeficienty jsou na toto složení mobilní fáze vztažené a popisují pouze rozdíly ve stacionárních fázích.

Vlastnosti separačního systému vyjádřené pomocí regresních koeficientů se testují pomocí tzv. testovací sady solutů. Sada testovacích solutů by měla pokrývat celou škálu interakcí vyjádřených molekulovými deskriptory. Soluty mají být tudíž strukturně odlišné, distribuce hodnot jednotlivých deskriptorů by měla být rovnoměrná, aby se nepreferovala žádná z interakcí na úkor jiné.

Výsledek metody LFER má tím větší váhu, čím větší počet látek je do regrese zahrnut; na každý regresní parametr se počítají alespoň tři až čtyři látky.

Tab. 5.2: Charakteristika regresních koeficientů získaných z LFER

Regresní koeficient	Popis
v	Koeficient v popisuje rozdíl v hydrofobicitě mezi stacionární a mobilní fází, který závisí na změně kohezivity obou fází a na rozsahu disperzních interakcí mezi analytem a stacionární fází a analytem a mobilní fází. V reverzním chromatografickém systému je energie na vytvoření kavity velikosti solutu ve stacionární fázi nižší ve srovnání s tvorbou kavity v mobilní fázi (z důvodu vyšší kohezivní hustoty), což vede k silnějším disperzním interakcím mezi solutem a stacionární fází a kladné hodnotě tohoto koeficientu.
a	Regresní koeficient a odráží rozdílnou bazicitu (schopnost působit jako akceptor vodíku pro vodíkovou vazbu) stacionární a mobilní fáze. Mobilní fáze se sorbuje na povrch stacionární, a tím ovlivňuje její bazicitu.
b	Rozdíl ve schopnosti působit jako donor vodíku pro vodíkovou vazbu mezi stacionární a mobilní fází popisuje regresní koeficient b. V systému RP HPLC je mobilní fáze tvořena vodou nebo vodným pufrem a organickým modifikátorem. Tento typ mobilní fáze má silnou aciditu danou především deskriptorem $\Sigma\alpha_2^H$ vody, který činí 1,17, což vede k záporné hodnotě koeficientu b. Stacionární fáze reverzního typu vykazují podstatně menší aciditu vyvolanou především nasorbovanými molekulami vody z mobilní fáze.
s	Regresní koeficient s odráží rozdíl v dipolaritě/polarizibilitě mezi stacionární a mobilní fází. Tento koeficient vypovídá o schopnosti účastnit se interakcí dipól-dipól a dipól-indukovaný dipól.
r	Regresní koeficient r poukazuje na rozdíl mezi stacionární a mobilní fází ve schopnosti interagovat s *n*- a π-elektrony solutu. Člen rR_2 kompenzuje zahrnutí celkové polarity a polarizability do jednoho parametru (π_2^H) a vyjadřuje disperzní interakce.
c	Člen c regresní rovnice LFER není vysvětlován solvatačními parametry. Tato konstanta reflektuje změny ve fázovém poměru, tj. poměru objemů stacionární a mobilní fáze. V koeficientu c jsou též sečteny různé vlivy na retenci nepokryté ostatními koeficienty LFER.

5.4 Separace enantiomerů

Protože enatiomery mají v achirálním prostředí stejné fyzikálně-chemické vlastnosti, lze je rozlišit pouze za chirálních neracemických podmínek. Principem separace enantiomerů je jejich rozdílná interakce v chromatografickém systému. Vznikají přechodné diastereomery, které mají odlišnou konstantu stability a tím i rozdílnou retenci. Na interakci mezi chirální stacionární fází (CSP) a analytem se dle druhu CSP mohou podílet π–π interakce, vodíkové můstky, hydrofobní, dipólové a sterické interakce. Jako chirální selektory (CS), či chirální stacionární fáze jsou v kapalinové chromatografii používány přírodní i syntetické látky, především cyklodextriny, polysacharidy, proteiny a makrocyklická antibiotika, která reprezentují poměrně novou třídu chirálních selektorů a mají schopnost separovat celou škálu strukturně odlišných enantiomerů. (Detailněji je pojednáno o jednotlivých CS/CSP v předchozích kapitolách.) Makrocyklická antibiotika jsou poměrně složité organické látky, mají větší počet stereogenních center i mnoho funkčních skupin, které se mohou podílet na interakcích s analytem v separačním systému. Vzájemné působení mezi chirálním selektorem a molekulou analytu zahrnuje více typů mezimolekulárních interakcí (vodíkové vazby, π–π interakce, dipól-dipól interakce, inkluze, sterické bránění apod.). Při stereoselektivním mechanizmu

se nemusí nutně uplatňovat všechny z těchto interakcí. Síla mezimolekulárních interakcí je též ovlivněna výběrem mobilní fáze.

Struktura teikoplaninu (T), který patří mezi často používané chirální selektory ze skupiny makrocyklických antibiotik, je charakterizována velkým počtem možných interakčních míst. Teikoplanin ve své molekule obsahuje 23 chirálních center, 7 benzenových kruhů, tři etherové skupiny spojující aromatické kruhy, jednu primární amino skupinu, jednu volnou karboxylovou skupinu, hydrofobní „kapsu“ a 3 cukerné zbytky (viz obr. 5.1A). Molekula teikoplanin aglykonu (TAG) se liší od teikoplaninu absencí cukerných podílů a skupin na ně navázaných (hydrofobní acylový řetězec) (obr. 5.1B). Díky nepřítomnosti cukerných složek jsou jeho ionizovatelné skupiny odhalenější a tím přístupnější interakcím s analyty. Methylací fenolických skupin a karboxylové skupiny molekuly TAGu vzniká další CS resp. CSP – methylovaný teikoplanin aglykon MTAG (obr. 5.1C) .

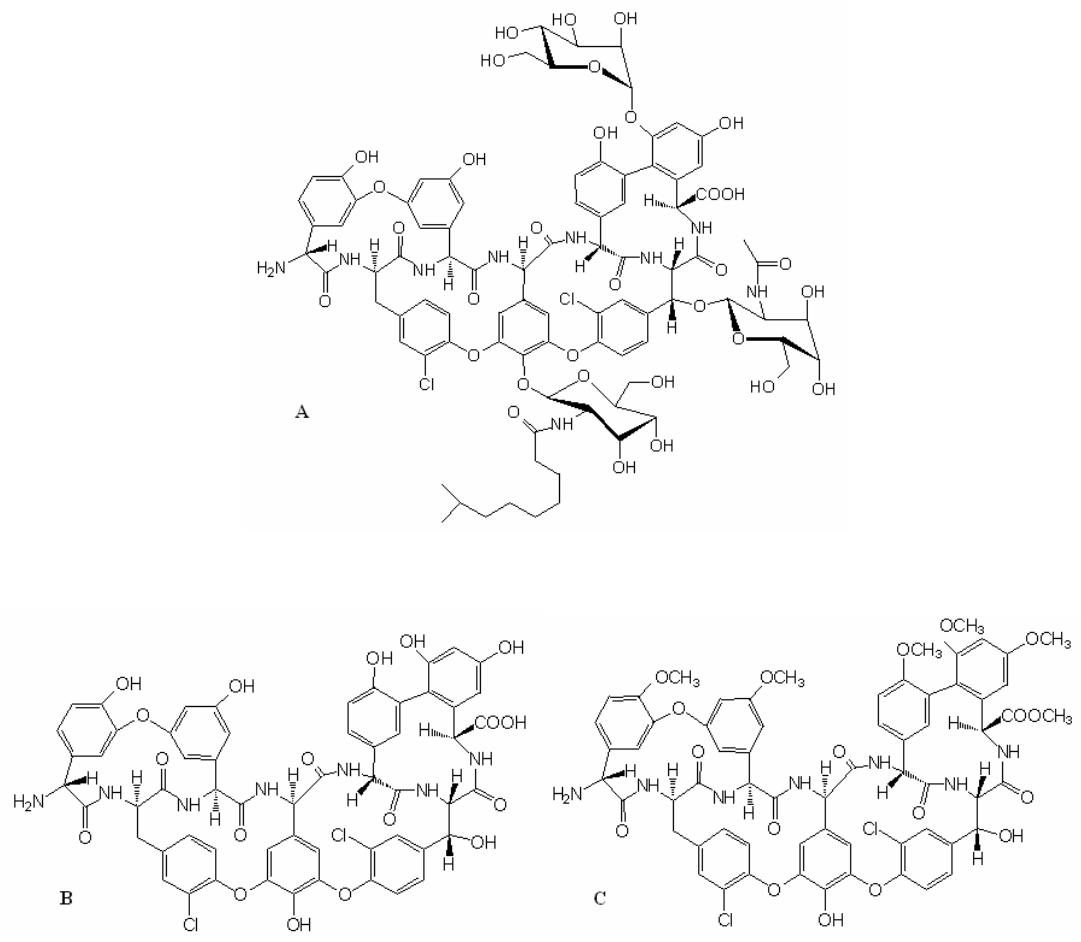
Jak vyplývá z výčtu možných interakčních míst, chirální separace na CSP na bázi teikoplaninu jsou komplexním procesem zahrnujícím různé vlivy včetně specifických interakcí mezi CSP a enantiomery a vlivu mobilní fáze. Volba vhodného typu chirální stacionární fáze podle chemické podstaty solutu není dosud beze zbytku možná, protože u řady z nich není dosud znám přesný mechanizmus interakce. Volba je tedy často empirická, podepřená jen údaji o separaci podobných sloučenin z dostupné literatury.

Sofistikovanější charakterizaci a porovnání tří chirálních stacionárních fází na bázi teikoplaninu pomocí modelu LFER použijeme jako příklad využití této metody. Metoda LFER převádí experimentálně získané výsledky z úrovně retenčních dat do roviny intermolekulárních interakcí, které jsou základem pro pochopení retenčního mechanizmu. Kvantitativním určením jednotlivých interakcí můžeme předpovědět retenci nových solutů a zvolit vhodný typ CSP pro daný typ analytu.

5.5 Příklad použití modelu LFER

Model LFER byl použit pro porovnání tří chirálních stacionárních fází – teikoplaninové, teikoplanin aglykonové a methylované teikoplanin aglykonové ve čtyřech mobilních fázích, které se lišily poměrem methanolu a pufru. Mobilní fáze byla složená z methanolu (MeOH) a 1% triethylaminooctanového pufru (TEAA) o pH 4,20 (v/v). Množství organického modifikátoru v mobilní fázi se pohybovalo v rozmezí od 20 do 80 objemových procent. Všechny chirální selektory jsou vázány na silikagelový nosič. Použitím pufru o pH 4,20 byla potlačena disociace silanolových skupin, triethylamin přítomný v mobilní fázi kompenzuje volné silanolové skupiny tím, že se na ně váže. Za těchto podmínek jsou interakce vyvolatelné silanoly značně omezené a retenci analytů ovlivňují především interakce analyt/chirální selektor resp. analyt/mobilní fáze. Testovací sada solutů obsahovala 34 látek a pokrývala celou škálu interakcí vyjádřených molekulovými deskriptory. Rozložení hodnot jednotlivých deskriptorů bylo rovnoměrné, aby se nepreferoval žádný typ interakce na úkor jiného.

Pro srovnání těchto různých chromatografických systémů byly použity regresní koeficienty optimálních LFER modelů (obr. 5.2) získané multidimenzionální lineární regresí.

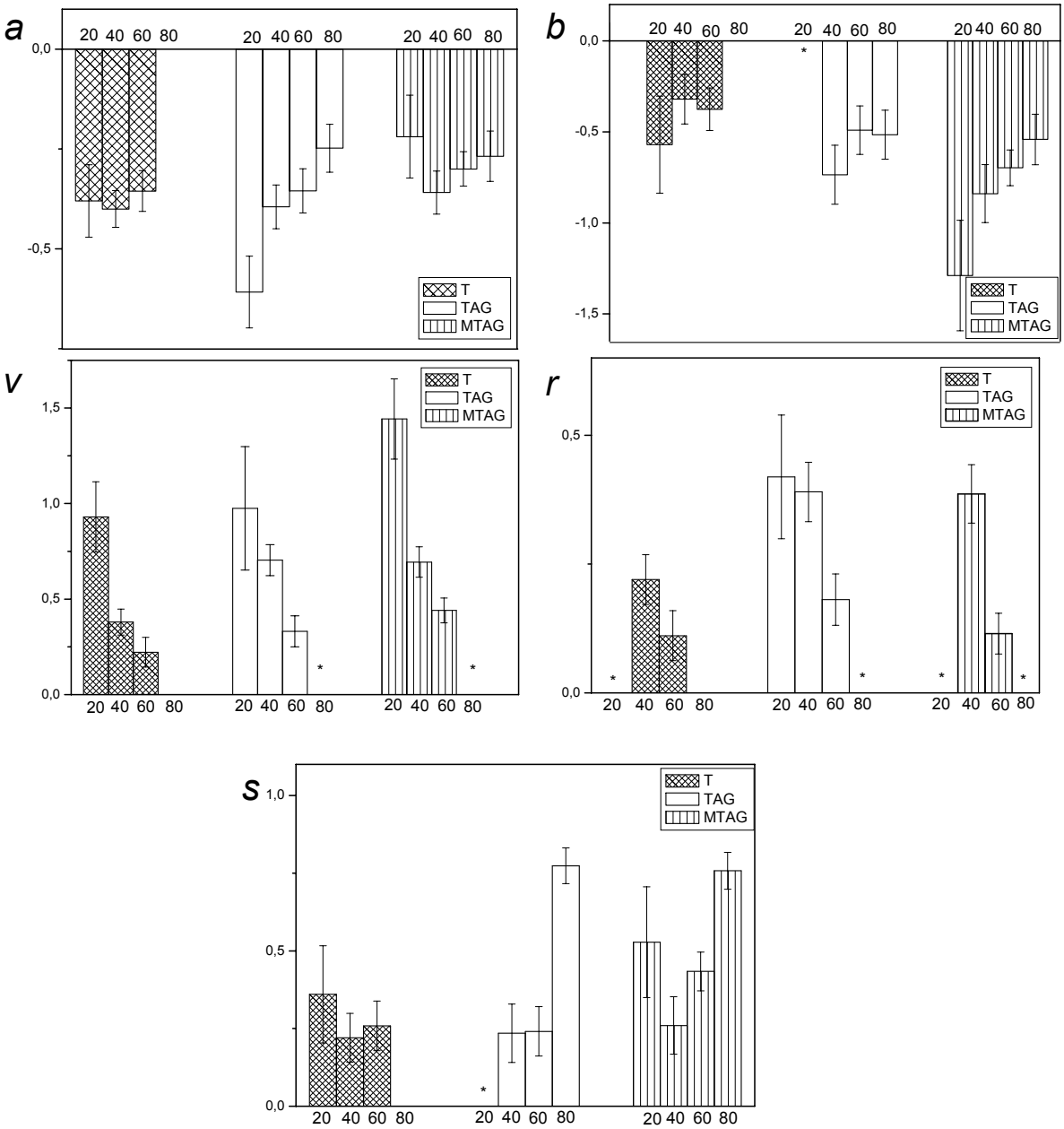


Obr. 5.1: ***Struktura teikoplaninu (A), teikoplanin aglykonu (B) a předpokládaná struktura methylovaného teikoplanin aglykonu (C)***

Záporné hodnoty regresních koeficientů **a** a **b** ve všech studovaných systémech značí, že daný typ interakce je silnější mezi analytem a mobilní fází než mezi analytem a stacionární fází. Acidita a bazicita tedy patří mezi faktory snižující retenci analytů, které mají předpoklady k těmto typům interakcí. Regresní koeficient **b** je v systému tvořeném mobilní fází MeOH-1% TEAA, pH 4,20 (20/80, v/v) a TAG CSP statisticky nevýznamný, což znamená, že acidita stacionární a mobilní fáze je velmi podobná.

Jak je patrné z obr. 5.2, hydrofobicita (reprezentovaná koeficientem **v**) roste se zvyšujícím se množstvím pufru v mobilní fázi. Nejvyšší hodnota koeficientu **v** byla získána pro MTAG CSP ve všech použitých mobilních fázích, což souvisí se zvýšením hydrofobicity daného chirálního selektoru methylací karboxylové skupiny a fenolických skupin teikoplanin aglykonu. Pořadí významnosti hydrofobních interakcí je MTAG>TAG>T ve všech studovaných separačních systémech.

Schopnost interagovat s *n*- a *π*- elektrony analytu (vyjádřená regresním koeficientem **r**) také roste s rostoucím obsahem pufru v mobilní fázi. Nižší hodnoty koeficientu **r** ukazují, že příspěvek tohoto typu interakce k celkové retenci analytů je menší než příspěvek hydrofobicity. Nejnižší hodnoty koeficientu **r** byly získány na T CSP (oproti TAG a MTAG CSP při použití stejné mobilní fáze), která má hůře přístupná aromatická jádra a karbonylové skupiny díky přítomnosti cukerných zbytků.



Obr. 5.2: ***Porovnání regresních koeficientů (a,b,v,r,s) optimálních LFER modelů pro T, TAG a MTAG CSP v závislosti na obsahu methanolu (%) v mobilní fázi MeOH-1% TEAA, pH 4,20 (v/v); chybové úsečky jsou střední chyby regresních koeficientů, * značí statisticky nevýznamnou interakci***

Regresní koeficient **s** je kladný pro téměř všechny studované systémy, neboť CSP na bázi teikoplaninu obsahují mnoho polárních (hydroxylové skupiny, amino skupiny atd.) a polarizovatelných skupin. V mobilní fázi obsahující 80% methanolu se interakce dipól- dipól a dipól-indukovaný dipól stávají významným faktorem ovlivňujícím retenci na TAG a MTAG CSP (nahrazují hydrofobní a *n*- a *π*- elektronové interakce).

5.6 Závěr

Zatímco řada používaných chromatografických testů, např. podle Walterse, Tanaky aj., poskytuje pouze dílčí informace o testovaných kolonách, model LFER představuje mnohem exaktnější a komplexnější přístup. LFER je obecná metoda sloužící k charakterizaci separačních systémů nejen v HPLC. Ačkoliv stereoselektivní interakce nejsou v tomto modelu zahrnuty, a přitom faktory, jako jsou velikost solutu ve srovnání s velikostí kavity nebo sterické uspořádání chirálních center na CSP a v molekule analytu, hrají velmi důležitou roli při chirálním rozpoznávání, model LFER může významně posloužit nejen při vzájemném porovnávání CSP, ale i pro predikci retence, a při znalosti struktury analytu (a tudíž interakcí potřebných k chirálnímu rozlišení) také k predikci enantioseparace.

Literatura

1. H. A. Claessens, M.A. Straten, C.A. Cramers, M. Jezierska, B. Buszewski, *J. Chromatogr. A* 1998, 826, 135.
2. V. Bekárek, T. Nevěčná. Rozpouštědlové vlivy v chemii a jejich hodnocení. Academia, Praha, ČR, 1992, 129, s. 20.
3. Á. Sándi, L. Szepesy, *J. Chromatogr.* A 1998, 818, 1.
4. M.H. Abraham, J.A. Haftvan, G.S. Whiting, A. Leo, R.S. Taft, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1994, 8,1777.
5. K. Kalíková, J. Lokajová, E. Tesařová, *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1476.

6. KAPILÁRNA ELEKTROFORÉZA V ANALÝZE OPTICKY AKTÍVNYCH LÁTOK

RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D., RNDr. Jan Petr, MSc. Joanna Znaleziona, a prof. RNDr. Juraj Ševčík, Ph.D.

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta , Katedra analytické chemie, Třída Svobody 8, 771 46 Olomouc
sevcik@prfnw.upol.cz

6.1 Úvod

Kapilárna elektroforéza je dnes sebavedomou analytickou separačnou technikou, ktorá vďaka dobre prepracovanej teórii, množstvu pracovných módov, vysokej účinnosti, rýchlosti analýzy, jednoduchému vývoju metód a dostupnosti automatizovaných prístrojov na trhu nachádza svoje široké uplatnenie v rôznych oblastiach aplikácií. Príkladmi môžu byť jej použitia pri analýzach a štúdiu biomakromolekúl – proteínov, cukrov, oligonukleotidov, DNA restrikčných fragmentov (projekt Hugo zameraný na dešifrovanie ľudského genomu), obsahu buniek či častí vírusov, amínokyselín, organických kyselín, liečiv, vitamínov, potravinárskych farieb, anorganických iónov, pesticídov či detergentov.

Jednou z oblastí analytickej chémie, v ktorej kapilárna elektroforéza dnes v plnom rozsahu prezentuje svoje možnosti, je problematika separácií chirálnych látok. Separácie opticky aktívnych zlúčenín majú okrem lákavého analytického problému (enancioméry vykazujú v achirálnom prostredí totožné fyzikálno-chemické vlastnosti) i značný praktický význam, pretože jednotlivé enancioméry chirálnych zlúčenín vo väčšine prípadov vykazujú značne odlišné farmakologické, toxikologické či pesticídne vlastnosti pri svojich interakciách so živými – tj. chirálnymi – systémami. Doposiaľ však pri tvorbe analytických postupov separácií konkrétnych chirálnych zlúčenín prevláda empirický prístup spojený ako s výberom vhodného chirálneho činidla, tak i s množstvom nutných krokov pri hľadaní najvhodnejších experimentálnych parametrov.

Separácie optických izomérov pomocou metód kapilárnej elektroforézy sú založené na interakciách enanciomérov s chirálnym selektorom buď pred, alebo počas separačného procesu za tvorby diastereoizomérnych komplexov líšiacich sa vo svojich fyzikálno-chemických vlastnostiach. Rozdiely vo fyzikálno-chemických vlastnostiach sa využívajú k ovplyvneniu rozdielov vo výsledných efektívnych pohyblivostiach enanciomérneho páru. Teória diskriminácie chirálnych látok je založená na predstave minimálne trojbodovej interakcie enanciomérov s chirálnym selektorom, pričom minimálne jedna z týchto interakcií musí byť stereochemicky definovaná.

Transformácia enanciomerického páru na stabilné diastereoizoméry derivatizáciou s chirálnym selektorom pred vlastnou separáciou v achirálnom prostredí je princípom tzv. nepriamych metód analýzy chirálnych látok. Výhodou tohoto postupu je značná flexibilita vo voľbe elektroforetických separačných podmienok a možnosť zníženia detekčného limitu analyzovaných látok. Nevýhody tohoto postupu spočívajú v nutnosti validácie derivatizačného kroku (výťažok reakcie, tvorba vedľajších produktov, možnosť racemizácie, vplyv vzorkovej matrice), v nárokoch na čistotu chirálnych selektorov určených k derivatizácii, v potrebe analytu vlastniť vhodné funkčné skupi-

ny schopné reakcie s chirálnym selektorom a v časovej náročnosti metódy. Pomocou tohoto postupu boli separované napr. enancioméry amínokyselín derivatizáciou s Marfeyovým činidlom (1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alaninamid), s GITC (2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glukopyranozyl izotiokyanátom), methamfetamínu, amfetamínu a ich prekurzorov s GITC či deriváty tryptofanu s anhydridom kyseliny (+)-O,O´-diacetyl-L-vínnej.

Priame metódy analýzy enanciomérov sú založené na ich priamej separácii v chirálnom prostredí. Chirálny selektor je najčastejšie pridávaný do základného elektrolytu, ale môže byť inkorporovaný do gélu, naviazaný na nosič či imobilizovaný na stenách kapiláry. Zaujímavé možnosti dnes prináša používanie chirálnych „monolitických kolón". Jednotlivé enancioméry sú diskriminované na základe tvorby rôzne stabilných diastereomérnych komplexov s chirálnym selektorom. Tento postup je dnes najčastejšie používaný, pretože eliminuje všetky nevýhody spomínané u nepriamych metód (nie je vyžadovaná derivatizácia, čistota chirálneho selektoru nie je dominantná, atd.). Určitá nevýhoda tohoto postupu spočíva vo výbere vhodného chirálneho selektoru.

Princípy používaných priamych metód podľa typu použitého chirálneho selektoru a separačného mechanizmu spolu s niektorými aplikáciami sú bližšie diskutované v následujúcich odsekoch. Je si treba uvedomiť, že uvedené rozdelenie selektorov podľa separačného mechanizmu nie je najpresnejšie, pretože v interakčnom mechanizme chirálny selektor – analyt sa často kombinuje viacero typov interakcií.

6.2 Mechanizmus ligandovej výmeny

Enancioseparácia výmenou ligandov je založená na tvorbe koordinačných komplexov pozostávajúcich z centrálneho iónu tranzitného kovu (napr. Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{3+},...) a prinajmenšom dvoch chirálnych bifunkčných ligandov (chirálneho ko-selektoru a separovaného enancioméru). Tieto koordinačné komplexy sú charakterizované svojími konštantami stability, ktoré sú závislé na geometrii a orientácii ligandov vznikajúcich ternárnych komplexov, na vzájomných interakciách krátkeho dosahu ko-selektoru s jednotlivými enanciomérmi a sú významne ovplyvňované separačným prostredím (zložením základného elektrolytu).

Týmto postupom bolo v kapilárnej elektroforéze vykonaných relatívne málo experimentov, pretože dvojica enanciomérov, ktorá má byť separovaná, musí obsahovať minimálne dve funkčné skupiny schopné poskytovať elektrónový pár centrálnemu kovu (napr. amino- a karboxylovú či hydroxy- a karboxylovú skupinu). Navyše stabilita vznikajúcich koordinačných komplexov klesá s narastajúcou početnosťou atómov chelátového kruhu.

Princíp tvorby diastereomérnych kovových komplexov bol využitý, podobne ako rovnaký princíp v kvapalinovej chromatografii, najmä pri analýzach enanciomérov amínokyselín (s Co^{3+}-etyléndiamínom v prostredí kyseliny (L)-(+)-vinnej, Cu^{2+}-(L)-hydroxyprolínom), danzylderivátov amínokyselín (pomocou Cu^{2+}-L(D)-histidínu, Cu^{2+}-aspartámu, Cu^{2+}-N,N-didecyl-L-alanínu), dipeptidov obsahujúcich histidín (komplexy Zn^{2+}), α-hydroxykyselín (s Cu^{2+}-(L)-hydroxyprolínom).

6.3 Tvorba inklúznych komplexov

Podstata separácií chirálnych analytov pomocou tvorby labilných inklúznych komplexov spočíva v rozdielnej afinite jednotlivých enanciomérov s rigídnym vnútorným prostredím kavity chirálneho selektoru a jeho okolia. Reprezentantmi tejto skupiny chirálnych selektorov sú najmä cyklodextríny

a deriváty crown etérov. Avšak v literatúre sa objavujú i ďalšie typy selektorov, ktoré aspoň čiastočne využívajú hosť-hostitelské interakcie (napr. makrocyklické antibiotiká, kalixareny, boromycín,…).

Zo širokého spektra crown etérov bola k chirálnym separáciam doposiaľ použitá iba [18]-crown-6-tetrakarboxylová kyselina, ktorá vďaka rozmerom svojho kruhu vytvára s protonizovanými primárnymi amínmi selektívne inklúzne komplexy (interakcie medzi vodíkovými atómami amínoskupiny s kyslíkovými atómami polyetérového kruhu). Teória chirálnej diskriminácie je založená na predstave, že štyri karboxylové skupiny na crown etérovom kruhu vytvárajú chirálnu bariéru pre inkludujúce sa enanciomérne molekuly, pričom sa súčasne medzi nimi uplatňujú i interakcie krátkeho dosahu (najmä elektrostatické interakcie karboxylových skupín a vodíkové mostíky). Je zaujímavé, že so vzrastajúcou koncentráciou [18]-crown-6-tetrakarboxyklovej kyseliny v základnom elektrolyte dochádza k lepšiemu rozlíšeniu bez významného poklesu pohyblivostí analytov. Enancioseparáciu môžu negatívne ovplyvňovať ióny alkalických kovov prítomné v separačnom elektrolyte, pretože taktiež tvoria s crown etérmi komplexy.

[18]-Crown-6-tetrakarboxyklová kyselina bola úspešne použitá pri separáciách niektorých amínokyselín, dipeptidov, amínoalkoholov a ďalších zlúčenín majúcich primárnu amínoskupinu.

Cyklodextríny v natívnom stave, alebo modifikované rôznymi či už ionizovateľnými (sulfobutyl-, sukcinyl-, fosfo-, karboxymetyl-, acetyl-, metylamíno-, amínoetylamíno-...), alebo neionizovateľnými (hydroxypropyl-, metyl-,...) skupinami patria medzi najpopulárnejšie a najčastejšie používané chirálne selektory. Cyklodextríny sú neutrálne prírodné cyklické oligosacharidy majúce tvar zrezaného kužela. Ich relatívne hydrofóbna kavita s vysokou elektrónovou hustotou umožňuje vytvárať inklúzne komplexy s nepolárnymi analytmi (resp. ich skupinami) o vhodných rozmeroch. Objem kavity variuje s počtom glukózových jednotiek. Enancioselektivita cyklodextrínov je daná asymetrickými uhlíkmi glukózy a hydroxylovými skupinami primárnych a sekundárnych alkoholov na vstupných prstencoch. Afinita cyklodextrínovej kavity k analytu vzrastá s jeho narastajúcou hydrofóbicitou. Chirálny analyt môže byť inkludovaný do kavity úplne, alebo čiastočne, pričom vznikajúci komplex je stabilizovaný interakciami so sekundárnymi hydroxylovými skupinami glukózových jednotiek, ktoré sú zodpovedné za enanciodiskrimináciu. Stabilita vznikajúcich inklúznych komplexov spolu s efektívnymi pohyblivosťami jednotlivých enanciomérov, a tým i výsledné chirálne rozlíšenie, sú ovplyvňované množstvom rôzne vyvážených experimentálnych parametrov, ktorých vplyv je bližšie diskutovaný v následujúcom texte. Derivatizáciou hydroxylových skupín dochádza k zmene v molekulárnej štruktúre natívnych cyklodextrínov, čo sa následne odráža napr. v zmene veľkosti a hydrofóbicity kavity, novej ponuke stereoselektívnych centier umožňujúcich ďalšie interakcie, alebo v ich solvatácii či stabilite. U β-cyklodextrínov sa navyše často zvýši ich rozpustnosť vo vodnom prostredí. Priaznivým dôsledkom chemickej modifikácie najmä u β-cyklodextrínov je významné zvýšenie selektivity separácie enanciomérov. Nabité deriváty cyklodextrínov ďalej rozširujú možnosti použitia týchto chirálnych selektorov pre separáciu analytov, ktoré sami nenesú vlastný náboj. Nový rozmer do diskriminačného procesu separácie enanciomérov vnáša použitie β-cyklodextrínových oligomérov, u ktorých sa môže uplatňovať vplyv ich konformácie.

Cyklodextríny použili ako chirálne aditíva v jednotlivých elektromigračných technikách medzi prvými prof. Smolková-Keulemansová v izotachoforéze, prof. Karger v gelovej elektroforéze, prof. Terabe a prof. Fanali v kapilárnej zónovej elektroforéze a prof. Terabe v micelárnej elektrokinetickej chromatografii. Odvtedy bolo rôznymi autormi analyzované nespočetné množstvo

enanciomérov fyziologicky významných látok a lečiv, amínokyselín, aromatických hydroxykyselín, pesticídov a ďalších a ďalších zlúčenín.

6.4 Afinitné interakcie

Názov tohoto odseku nie je najpresnejší, pretože afinitné interakcie zahrňujú celý rad interakcií, počínajúc elektrostatickými, cez vodíkové väzby, hydrofóbne interakcie a končiac napríklad inklúziou. Termín „afinitné“ bol prevziaty z názvu „afinitná kapilárna elektroforéza, ktorý sa používa pre systémy obsahujúce napr. proteíny, alebo iné biomakromolekuly ako aditíva.

Následne prezentované chirálne selektory vykazujú vo svojich molekulách enanciodiskriminačné centrá, ktoré sú definované konformáciou týchto selektorov a sú vysokoselektívne iba pre ten ktorý analyt (enanciomér). Tieto selektory sú väčšinou biologického pôvodu a majú veľké množstvo chirálnych atómov v molekule. Ich použitie je odvodené najmä od ich transportných vlastností v živých organizmoch. Väčšinou ide o polyméry pozostávajúce z chirálnych monosacharidov a amínokyselín.

Proteíny tvoria jednu zo skupín chirálnych biopolymérnych selektorov úspešne použitých k separácii množstva rôznych typov enanciomérov. Substrátová špecifita proteínov determinujúca separačnú selektivitu je však značne závislá na použitých experimentálnych podmienkach (najmä na pH a zložení základného elektrolytu, resp. danej iónovej sile). Vzhľadom k pomalej kinetike a nízkej kapacite proteín – ligandových interakcií sú obdržané píky široké a asymetrické. Určitou nevýhodou použitia proteínov vo vyšších koncentráciách je i ich absorbancia v UV oblasti spektra. Navyše, ich interakcie so stenou kapiláry výrazne znižujú opakovatelnosť meraní a často i negatívne ovplyvňujú výsledné chirálne rozlíšenie. Z proteínových selektorov boli použité najmä sérové albumíny či už navzájom zosieťované (kapilárna gelová afinitná elektroforéza), alebo ako chirálne aditívum pridávané do základných elektrolytov, celobiohydroláza, avidín či kyslé glykoproteíny (orosomucoid, ovomucoid,...).

Lineárne sacharidy tvoria druhú skupinu biopolymérnych selektorov, ktorá bola použitá pre enanciodiskrimináciu. Zo širokej skupiny vo vode rozpustných oligosacharidov boli ako chirálne selektory úspešne použité zmesi maltodextrínov (Maldex, Glucidex, Maltrin, mylóza), dextran a heparín. Zaujímavé enantiodiskriminačné vlastnosti vykazujú tiež chondroitín sulfát A, chondroitín sulfát C či curdlan (lineárny β-1,3-glukan) tvoriaci po zahriatí stabilný gel.

Treťou, veľmi populárnou skupinou chirálnych selektorov sú makrocyklické antibiotiká, ktoré „vlastnia“ množstvo stereogénnych centier a funkčných skupín využiteľných pri enancioselekciách (aromatické skupiny, amidové väzby, skupiny poskytujúce tvorbu vodíkových väzieb, hydrofóbne regióny, kavity,...). Pomocou makrocyklických glykopeptidových antibiotík vankomycínu a teikoplanínu bolo rozlíšené široké spektrum rôznych racemátov zahrňujúcich nesteroidné protizápalové látky, antineoplastické zlúčeniny či derivatizované amínokyseliny. K chirálnemu rozlíšeniu amínoalkoholov boli tiež použité antibiotiká rifamicínového typu, Ristocetin A či Avoparcin.

Z ďalších prírodných látok boli pre separáciu opticky aktívnych zlúčenín použité pozitívne nabitý ergotový alkaloid (+)-(5R, 8S, 10R)-1-allyl-tergurid, cinchonový alkaloid quinin či polymérny chitosan (deacetylovaný chitín).

6.5 Micelárne systémy a mikroemulzie

Pri separáciách opticky aktívnych látok pomocou micelárnych systémov sú chirálne centrá zodpovedné za enanciodiskrimináciu väčšinou inkorporované v micelách. Tenzidy tvoriace micely či mikroemulzie plnia obyčajne jednu z dvoch funkcií – buď vytvárajú vlastné chirálne micelárne prostredie či už zo samotných chirálnych tenzidov, alebo z nechirálnych tenzidov zmiešaných s chirálnymi selektormi, ktoré sú v základnom elektrolyte nerozpustné, alebo málo účinné (zmesné micely), alebo na druhej strane solubilizujú a transportujú neutrálne či nenabité analyty v základnom elektrolyte.

Medzi najčastejšie používané chirálne tenzidy patria deriváty žlčových kyselín (cholová, deoxycholová, taurocholová a taurodeoxycholová kyselina). Mechanizmus ich chirálnej diskriminácie však nie je doposiaľ dostatočne objasnený. Pomocou týchto chirálnych tenzidov boli analyzované niektoré danzylované amínokyseliny a rozne liečivá. Ďalšími používanými chirálnymi tenzidmi sú dodekanoylové deriváty niektorých amínokyselín (L-valínu, L-alanínu, L-glutamátu), ktoré boli použité pri separáciách enanciomérov derivatizovaných amínokyselín či cukrov. Zvýšenie selektivity tohoto typu chirálnych tenzidov sa docieli tvorbou zmesných miciel s dodecylsulfátom sodným (SDS) (kombináciou elektrostatických a hydrofóbnych interakcií s chirálnymi centrami a micelárnym jadrom zmesného systému). Komicelárne systémy SDS s digitonínom a SDS s niektorými saponínmi (glycinrhizovou kyselinou či β-escinom) boli použité pri analýze derivátov amínokyselín. Tenzidy (najmä SDS) sú významnými aditívami pridávanými do základného elektrolytu pri enancioseparáciách pomocou γ-cyklodextrínov, kedy okrem modifikácie vnútra kavity plnia i solubilizačnú a transportnú funkciu. Súčasne makrocyklické antibiotiká boli úspešne použité v micelárnych systémoch s SDS. Teikoplanín tvorí sám agregáty, ktorých prítomnosť v elektrolyte enantioseparáciu skôr zhoršuje. Boli použité i zmesné systémy cyklodextrínov s chirálnymi tenzidmi (taurodeoxycholát).

Mikroemulzie možno zjednodušene označiť ako „micelárne systémy s veľmi vysokým agregačným číslom“. Sú preto vhodné predovšetkým pre separácie hydrofóbnych zlúčenín. Avšak širšieho uplatnenia mikroemulzné systémy pre separácie opticky aktívnych látok nedosiahli. Príkladom použitia mikroemulzií môže byť úspešná separácia efedrínu pomocou lipofilného (2R,3R)-di-n-butylvínanu s butanolom a SDS.

6.6 Imobilizované chirálne systémy

Alternatívou k priamemu pridávaniu chirálneho aditíva do základného elektrolytu je použitie imobilizovaných chirálnych fází. Toto experimentálne usporiadanie je sice sľubné, ale doposiaľ obtiažne realizovateľné. Použitie tradičných chirálnych HPLC stacionárnych fází (β-cyklodextrínových, glykoproteínových,...), chirálnych aditív navzájom spolymerizovaných (napr. allyl karbamoylový β-cyklodextrín s akrylamidom, β-cyklodextrín s dextranom, hovädzí sérový albumín s glutaraldehydom,...) či zosieťovaných pomocou polyakrylamidových gélov (β-cyklodextrín), alebo priamo vyviazaných na stenách kapiláry (modifikované β-cyklodextríny) nenachádza pri praktických elektrochromatografických enancioseparáciách uplatnenie vzhľadom k problémom spojeným najmä s ich prípravou (napr. gelové matrice sú obtiažne reprodukovateľné, majú krátku dobu životnosti, vytvárajú sa bubliny,...) a malou operačnou flexibilitou. Možné riešenie týchto problémov by mohlo priniesť už spomínané zavedenie monolitov, alebo modifikovaných lineárnych polymérov.

6.7 Ovplyvnenie separácie chirálnych látok – modely versus experiment

Separácia dvoch analytov v kapilárnej elektroforéze je, ako bolo už spomínané, založená na rozdieloch v ich efektívnych elektroforetických pohyblivostiach. Mierou úspešnosti tejto separácie je rozlíšenie R_S, ktoré je funkciou účinnosti N a selektivity S (relatívneho rozdielu v pohyblivostiach) a môže byť definované rovnicou

$$R_S = \frac{1}{4}\sqrt{N}\frac{\Delta\mu}{\overline{\mu} - \mu_{eo}} \tag{6.1}$$

kde $\Delta\mu$ je rozdiel v efektívnych elektroforetických pohyblivostiach dvoch analytov, $\overline{\mu}$ stredná elektroforetická pohyblivosť a μ_{eo} elektroosmotická pohyblivosť.

Separačná selektivita je ovplyvňovaná navzájom množstvom experimentálnych parametrov, pričom vplyv niektorých z nich sa dá takmer predpovedať (pH, koncentrácia chirálneho selektoru, teplota) a predpoveď u iných je obtiažna (typ cyklodextrínu, typ a koncentrácia základného elektrolytu či organického aditíva). Preto je potrebné pri vývoji metódy separácie daných opticky aktívnych látok, či pri testovaní nových chirálnych selektorov študovať vplyv všetkých experimentálnych parametrov a nájsť medzi nimi najvhodnejší kompromis.

Systematické štúdium vplyvu experimentálnych parametrov na separačnú selektivitu je založené buď na menení hodnôt jednoho parametru pri konštantnom zachovaní hodnôt ostatných parametrov (nevariačné postupy), alebo na súčasnom menení viacerých parametrov podľa určitého algoritmu (multivariačné postupy napr. metóda úplných či frakčných faktoriálov (Plackett-Burmanova), simplexová metóda, mapovania prekryvu rozlíšenia či metóda hlavných zložiek). Výhodou multivariačných postupov je podstatné zníženie počtu experimentov a lepšia štatistická interpretácia. Avšak postupy meniace iba jeden parameter prinášajú lepšiu interpretáciu vplyvu daného parametru na enanciodiskriminačný proces.

6.8 Vplyv experimentálnych parametrov na separáciu chirálnych látok

6.8.1 Vplyv typu a koncentrácie použitého chirálneho selektoru

Výber vhodného typu chirálneho selektoru vychádza z chemickej štruktúry analytu a výrazne predurčuje úspěšnosť výsledného chirálneho rozlíšenia. Aby mohlo dôjsť k maximálnemu rozvinutiu všetkých interakcií medzi analytom a chirálnym selektorom musia si obidvaja navzájom maximálne priestorovo vyhovovať. Toto všeobecné pravidlo možno dokumentovať na príklade β-cyklodextrínov. Ak porovnáme natívne a derivatizované β-cyklodextríny, výhoda použitia modifikovaných β-cyklodextrínov spočíva okrem ich lepšej rozpustnosti tiež i vo variabilite objemu a geometrie kavity či ponuke stereoselektívnych interakcií daných rôznorodosťou substituentov. Zavedenie ionizovateľnej skupiny do štruktúry cyklodextrínu zvyšuje separačnú selektivitu (predĺžením účinnej separačnej dráhy, ponukou elektrostatických interakcií).

Koncentrácia cyklodextrínov je dominantným parametrom enancioselektivity. S narastajúcou koncentráciou cyklodextrínov narastá viskozita základného elektrolytu, redukuje sa elektroosmotický tok a predlžuje doba analýzy. Vzhľadom k tomu, že nie sú známe asociačné rovnovážne konštanty inklúznych komplexov jednotlivých enanciomérov, ani ich elektroforetické pohyblivosti, je nutné túto vhodnú koncentráciu zistiť experimentálne.

6.8.2 Vplyv zloženia, koncentrácie a pH základného elektrolytu

Zloženie základného elektrolytu, jeho koncentrácia, pH a iónová sila významne ovplyvňujú účinnosť (vplyv elektrodisperzie, adsorbcie na steny kapiláry, modifikácie elektroosmotického toku) i selektivitu (modifikácia polarity prostredia, hustoty náboja analytov, interakcií analytov či chirálnych selektorov s proti-iónmi) výsledného chirálneho rozlíšenia. pH ovplyvňuje ionizáciu analytov i chirálnych selektorov, a tým dáva možnosť (alebo naopak bráni) vniku nových vzájemných interakcií. Vzrast iónovej sily zvyšuje chirálne rozlíšenie napr. v cyklodextrínom modifikovaných systémoch, pretože vzrastom hydrofilicity pufrovacieho systému sa zintenzivňujú hydrofóbne interakcie medzi analytom a cyklodextrínovou kavitou. K príprave základných elektrolytov je vhodné používať látky s nízkou vodivosťou aby došlo k potlačeniu generovania Joulovho tepla.

6.8.3 Vplyv prídavku organických aditív

Prídavok organických rozpúšťadiel do základného elektrolytu v rôznej miere modifikuje (zmenou rozpustnosti, solvatácie, ionizácie) vzájomnú interakciu analytov a chirálnych selektorov či už v pozitívnom alebo negatívnom zmysle (solvatačná stabilizácia iónov sa zmenšuje, klesá stupeň disociácie, rozpúšťadlá potlačujú tvorbu miciel). Napr. v prípade teikoplanínu má rozrušenie jeho agregátov (zvýšenie kritickej micelárnej koncentrácie) prídavkom niekoľkých percent acetonitrilu za následok zlepšenie enantioselektivity i separačnej účinnosti. Pri použití napr. proteínových chirálnych selektorov môže prídavok organického aditíva spôsobiť zmenu konformácie a tým negatívne ovplyvniť enantioseparáciu. K ovplyvneniu interakčného mechanizmu prispieva i zmena polarity základného elektrolytu (pokles hydrofóbnych interakcií). Vplyv prídavku organických rozpúšťadiel sa odráža i v zmene viskozity základného elektrolytu a zeta potenciálu (pokles elektroosmotického toku). Vzhľadom ku komplexnosti zmien, výsledný efekt vplyvu organických rozpúšťadiel na chirálne rozlíšenie je podstatný a musí byť experimentálne optimalizovaný.

Podobne i tenzidy pridané do základného elektrolytu významne modifikujú selektivitu systému. Svojími nepolárnymi časťami molekúl interagujú napr. s kavitou cyklodextrínov a súťažia s analytmi o jej väzbové miesta. Pravdepodobne i polárne časti tenzidov interagujú s hydrofilným povrchom cyklodextrínov čo sa môže odrážať v modifikácii stereoselektívnych interakcií na vstupných otvoroch kavity. Tenzidy sa sorbujú na steny kapiláry a ovplyvňujú veľkosť a smer (katiónové tenzidy) elektroosmotického toku.

6.8.4 Vplyv pracovných parametrov – voľba kapiláry, aplikovaného napätia a teploty

Výber pokrytej či nepokrytej kapiláry je daný látkami, ktoré majú byť analyzované a použitými chirálnymi selektormi (využitie, alebo potlačenie elektroosmotického toku, potlačenie sorbcie). Všeobecne s poklesom vnútorného priemeru kapiláry a vzrastom dĺžky kapiláry sa zlepšuje chirálne rozlíšenie vďaka lepšej disipácii generovaného Joulovho tepla a predĺženiu separačnej dráhy. Nevýhodou predĺženia kapiláry je nárast času, ktorý je potrebný k analýze. Nižšie priemery kapilár vedú k poklesu citlivosti detekcie.

Intenzita elektrického poľa je pracovný parameter, ktorý musí byť opatrne optimalizovaný. Je potrebné nájsť kompromis medzi elektrickou silou udelujúcou rýchlosť danému analytu a chemickou asociačnou silou (afinitou) vznikajúceho asociátu (v prípade cyklodextrínu inklúzneho komplexu), ktorá umožňuje chirálnu diskrimináciu. S narastajúcou hodnotou aplikovaného napätia narastá účinnosť systému (N) a rýchlosť analýzy, avšak klesá hodnota rovnovážnej asociačnej konštanty inklúzneho komplexu vplyvom generovaného Joulovho tepla a posunom chemickej rovnováhy.

Zmeny v teplote separačného systému vedú k rozdielnym efektom na výsledné chirálne rozlíšenie. S narastajúcou teplotou klesá viskozita základného elektrolytu (zvyšuje sa efektívna pohyblivosť a difúzia separandov), narastá rýchlosť elektroosmotického toku (klesá účinná separačná dráha). Pri použití cyklodextrínov klesá asociačná rovnovážna konštanta vznikajúcich inklúznych komplexov (exotermný charakter vlastnej komplexácie). Všeobecne s nárastom teploty dochádza k poklesu selektivity systému a tým i výsledného chirálneho rozlíšenia. Niektoré chirálne selektory (napr. makrocyklické antibiotiká) sú navyše při vyšších teplotách nestabilné.

Z kinetického hľadiska môže byť výhodné také experimentálne usporiadanie, kde chirálny selektor a jednotlivé enanciomery migrujú oproti sebe. Pokiaľ chirálny selektor absorbuje pri vlnovej dĺžke, ktorá je potrebná k detekcii analytov (napr. vankomycín), je možné si vypomôcť napr. iba čiastočným naplnením kapiláry chirálným selektorom.

6.9 Základné modely a postupy chirálnych separácií pomocou cyklodextrínov

Vzhľadom k tomu, že cyklodextríny v 80. rokoch takmer úplne ovládli pole chirálnych separácií, je väčšina modelov a postupov chirálnych separácií demonštrovaná prostredníctvom použitia cyklodextrínov ako chirálnych selektorov. Následujúce tri príklady ilustrujú prístupy k optimalizácii (resp. hľadaniu najlepších podmienok) enantioseparácie. Skutočnosťou ale je, že doposiaľ žiadny model nedokáže predpovedať podmienky, za ktorých dôjde k najlepšej separácii daného páru enanciomérov. Tieto podmienky musia byť stanovované empiricky.

Wrenov model optimálnej koncentrácie chirálneho selektoru vychádza z predstavy, že meraná efektívna elektroforetická pohyblivosť je vektorovým súčtom pohyblivostí voľného a v komplexe viazaného enanciomeru. Obidve elektroforetické pohyblivosti sú determinované afinitou k chirálnemu selektoru a jeho koncentráciou. Pre rozdiel v efektívnych pohyblivostiach jednotlivých enanciomérov $\Delta\mu$ bola odvodená rovnica (6.2) z ktorej môže byť vypočítaná optimálna koncentrácia chirálneho selektoru poskytujúca najlepšie rozlíšenie.

$$\Delta\mu = \frac{[C]\{K_1(\mu_1 - \mu_0) - K_2(\mu_2 - \mu_0) + K_1K_2[C](\mu_1 - \mu_2)\}}{(1 + K_1[C])(1 + K_2[C])} \tag{6.2}$$

V rovnici (6.2) reprezentuje μ_0 elektroforetické pohyblivosti voľných (nevyviazaných) enanciomérov, μ_1 a μ_2 limitné elektroforetické pohyblivosti oboch enanciomér – cyklodextrínových komplexov (ktoré môžu, ale nemusia byť rozdielne), K_1 a K_2 ich asociačné rovnovážne konštanty, C koncentráciu cyklodextrínu. Pomocou tohoto modelu sa dajú velmi dobre popísať i inverzie v pohyblivostiach jednotlivých enanciomérov pozorované s narastajúcou zmenou koncentrácie chirálneho selektoru.

Modely navrhnuté Vighom korelujú vplyvy koncentrácie cyklodextrínu a pH (zmena disociácie slabých elektrolytov a konštánt stability inklúznych komplexov) spolu so zložením základného elektrolytu (vplyv elektromigračnej disperzie) na efektívnu pohyblivosť voľných i inkludovaných enanciomérov slabých elektrolytov, separačnú selektivitu a symetriu píkov. Snahou tohoto modelu je nájsť sledom zmien jednotlivých experimentálnych parametrov (pH, koncentrácie cyklodextrínu a koncentrácie ko-iónu) tzv. modelové parametre (iónovú pohyblivosť enanciomeru a komplexu enanciomér-cyklodextrín, spolu s hodnotami ich disociačných konštánt), ktorých dosadením do odvodených rovníc môžu byť stanovené tzv. povrchové profily pohyblivosti, separačného faktoru

či rozlíšenia. Modelové parametre sa experimentálne stanovujú tromi setmi meraní – meraním zmien pohyblivostí analytu na zmene pH (bez prídavku cyklodextrínu v základnom elektrolyte) a na zmene koncentrácií cyklodextrínu pri vysokej a nízkej hodnote pH základného elektrolytu.

Technika cyklodextrínového setu analýzy chirálnych látoknavrhnutá Guttmanom popisuje rychlý vývoj metódy enancioseparácie slabých elektrolytov. Vychádza z predstavy, že úspech chirálnej separácie (enancioselektivita) závisí najmä na hodnote pH použitého základného elektrolytu, koncentrácii a type vhodného chirálneho selektoru. Je založená na vykonaní sady experimentov s vybraným setom štyroch cyklodextrínov (β- a γ- cyklodextrín, hydroxypropyl-β-cyklodextrín a dimetyl-β-cyklodextrín) pri dvoch hodnotách pH základného elektrolytu (2,5 a 8,0).

Uvedené príklady ukazujú, že vytvorenie si predstavy o konkrétnom enancioselektívnom separačnom systéme pre rozseparovanie požadovaných enanciomérov nie je jednoduché. Tiež ďalšie prístupy, ako sú napr. modelovanie interakcií medzi chirálnym selektorom a analytom, či stanovovanie konštanty stability takéhoto asociátu, sú omedzené iba na konkrétny systém s daným základným elektrolytom (v prípade modelovania sa dokonca na vplyv pufru úplne zabúda) a nedajú sa jednoducho zovšeobecniť. Preto zatial najlepšou cestou k úspešnému rozdeleniu daného páru enanciomérov ostáva skúsenosť experimentátora spolu s informáciami o enancioseparáciách podobných látok získaných z literatúry.

Literatúra

Chankvetadze B.: *Capillary electrophoresis in chiral analysis*. John Willey, New York 1997.

Tesařová E., Armstrong D. W., v knize *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences* (Deyl D., Mikšík I., Tagliaro F., Tesařová E., eds), str.197, Elsevier, Amsterdam 1998.

Chankvetadze B., Blaschke G.: J. Chromatogr. A **906** (2001) 309-363.

Eeckhaut A., Michotte Y.: Electrophoresis **27** (2006) 2880-2895.

Gübitz G., Schmid M. G.: Electrophoresis **28** (2007) 114-126.