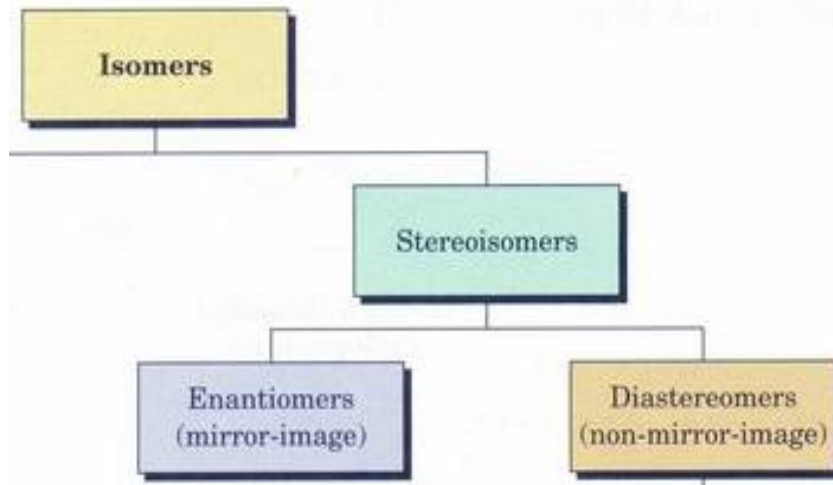


# Separace chirálních látek

n Zuzana Bosáková

# Enantiomery



opticky aktivní



*R*-enantiomer

*S*-enantiomer

nechirální prostředí × chirální prostředí

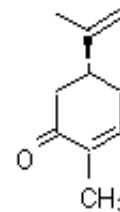
živé organismy - chirální environmentální prostředí (proteiny – L-aminokyselin)

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

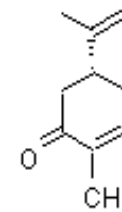
## Potravinářská chemie

n karvon

n S-(+) mátová, R-(-) kmínová



(+)-carvone



(-)-carvone

## Agrochemie - používání pesticidů

odlišné účinky jednotlivých enantiomerů

fenoxypropanové kyseliny R-enantiomer aktivní, S-enantiomer neaktivní

## Farmaceutický průmysl - rozdílné terapeutické účinky léčiv

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

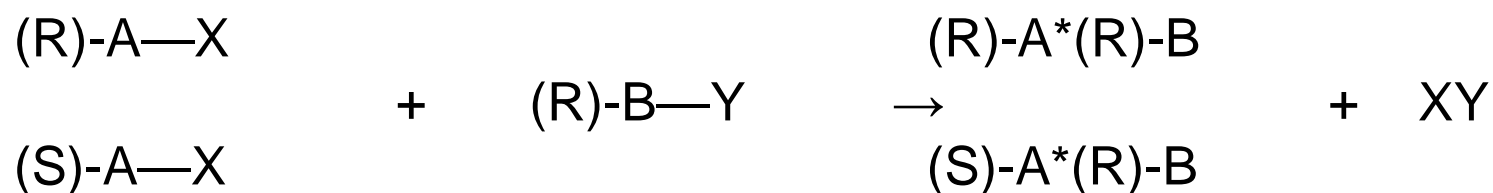
60 % léčiv – chirální povaha – většina je dostupná jako racemát (stejné zastoupení obou enantiomerů)

Snaha po produkci enantiomerně čistých léčivých preparátů

# Chirální separace

## Nepřímá metoda

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



## Přímá metoda

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



## Výhody a nevýhody nepřímé separace

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



## Výhody a nevýhody přímé chirální separace

chirální separace pomocí chirální stacionární fáze nebo chirálního separačního systému

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



# Přímá chirální separace

## Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

- chirální stacionární fáze (CSP)
- přídavek chirálního selektoru (CS) do mobilní fáze

n levnější

n větší flexibilita

n dobrá sterická dostupnost volného CS

n rozpustnost CS v roztoku

n stabilita CS

n absorbance



## Klasifikace chirálních selektorů

### původ:

přírodní

- cyklodextriny, makrocyclická antibiotika, proteiny

semisyntetické

- derivatizované cyklodextriny, deriváty polysacharidů, modifikovaná makrocyclická antibiotika

syntetické

- chirální polyethery, methakrylátové polymery

### skupina:

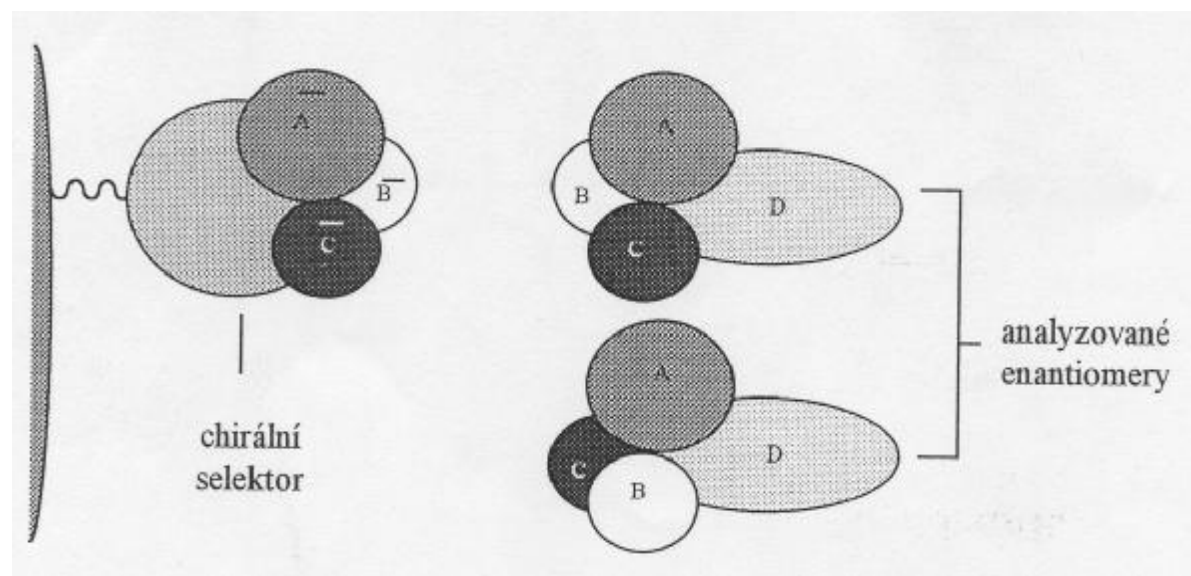
makrocycly, polymery, malé molekuly

### typ převládající interakce:

- inkluze
- $\pi$ - $\pi$  interakce (doprovázené vodíkovou vazbou, stericou repulzí)
- hydrofobní nebo polárních interakcí



# Model tříbodové interakce





## Chirální stacionární fáze

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

- vyvinuté pro specifické enantioseparační účely (tailor-made)
- aplikovatelné pro široký okruh chirálních analytů

n Proteinové chirální stacionární fáze

n Pirklovy chirální stacionární fáze

n Polysacharidové chirální stacionární fáze

n Cyklodextrinové chirální stacionární fáze

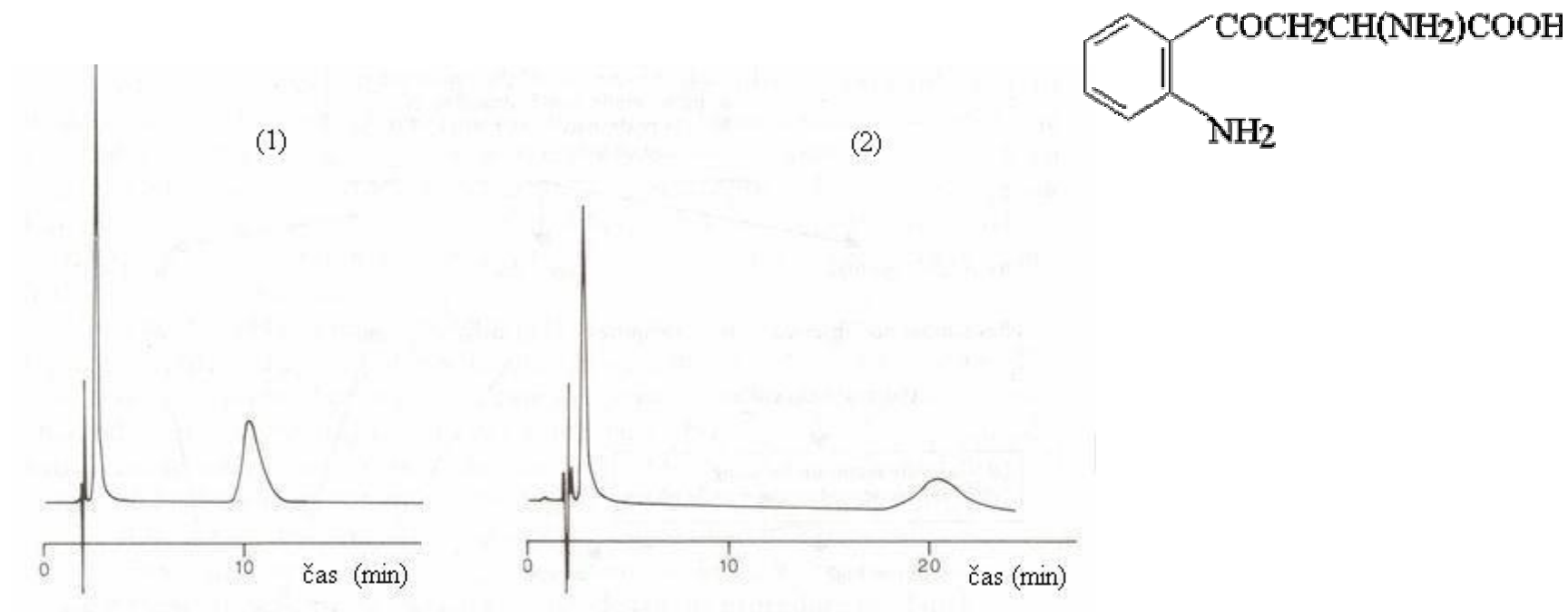
n CSP na bázi makrocyclických antibiotik



# Proteinové CSP

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

# Podmínky separace



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

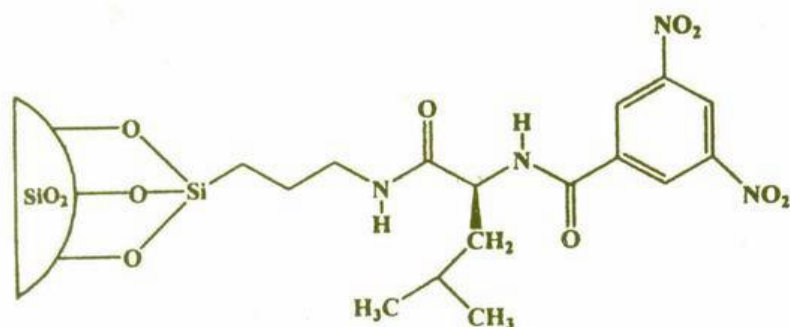


## Pirklovy CSP

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

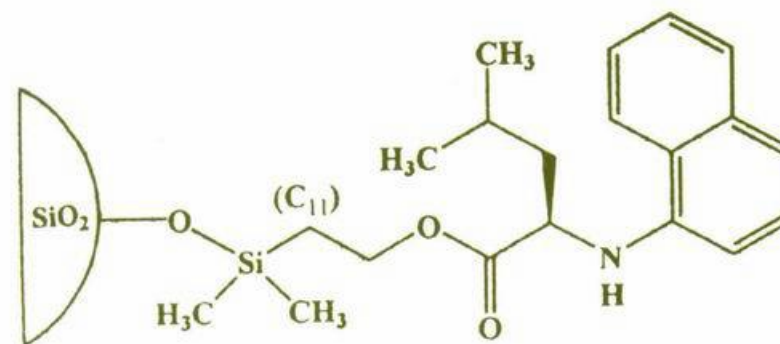
# $\pi$ -elektron akceptorové CSP

## $\pi$ -elektron donorové CSP



leucin

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



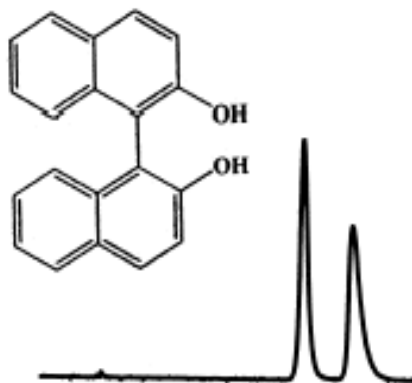
naftylleucin

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

# Aplikace

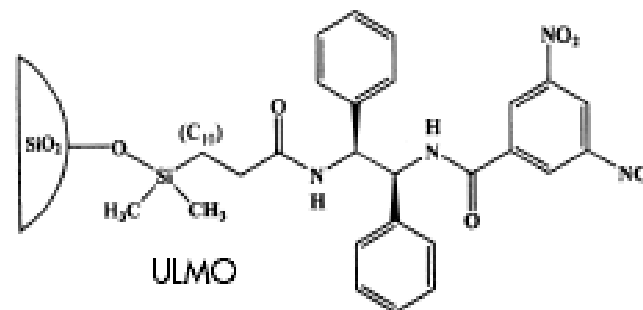
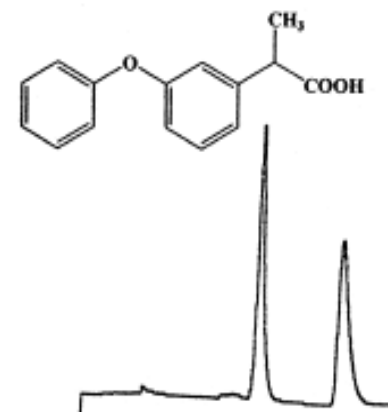
## 1,1'-Bi-2-Naphthol

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



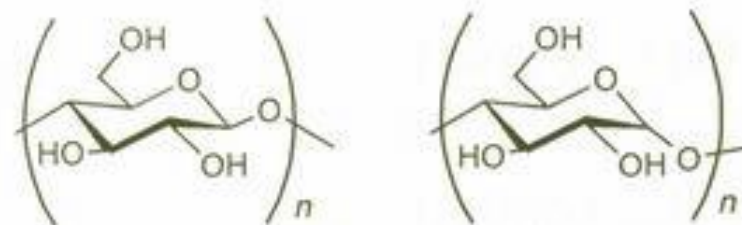
## Fenoprofen

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



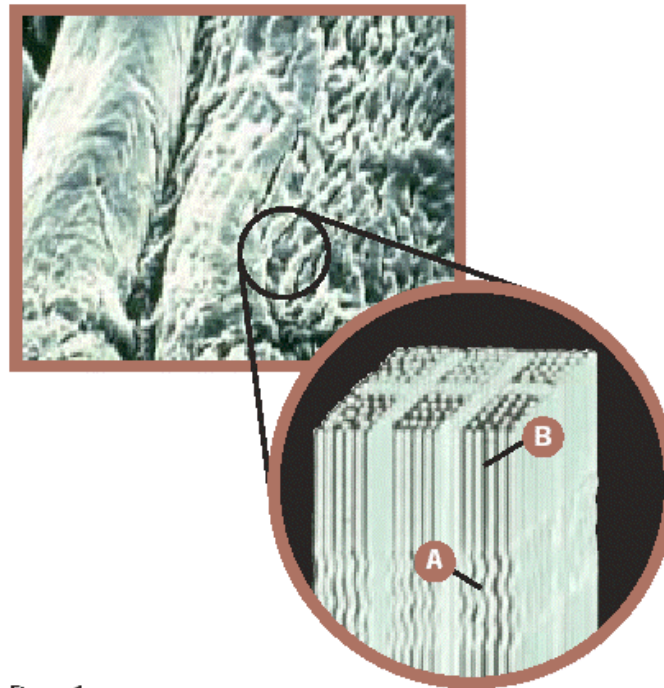
# Polysacharidové CSP

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





# Mikrokrystalická celuloza



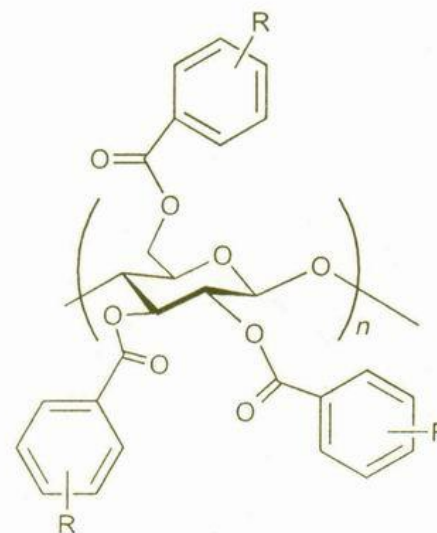
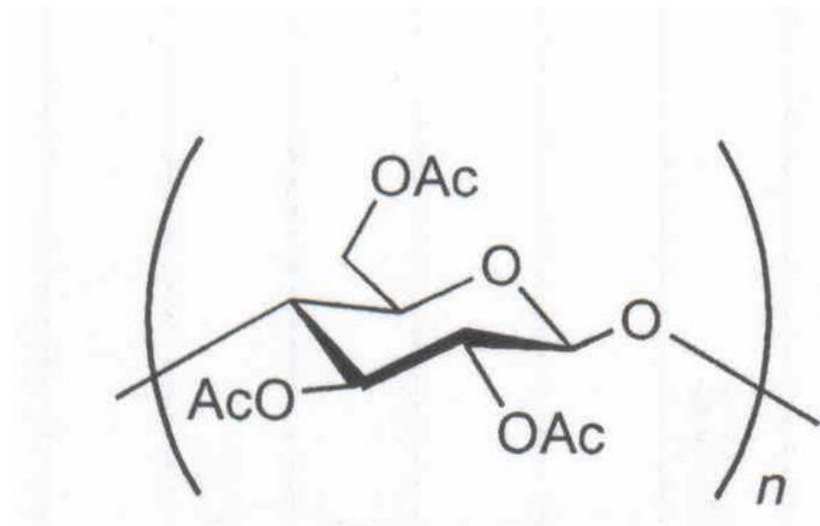
**Figure 1**

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

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

kyselá hydrolýza  
vyšší krystalinita - Avicel

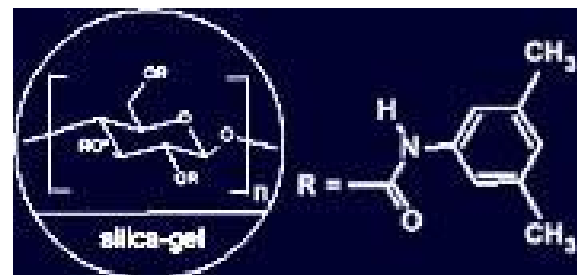
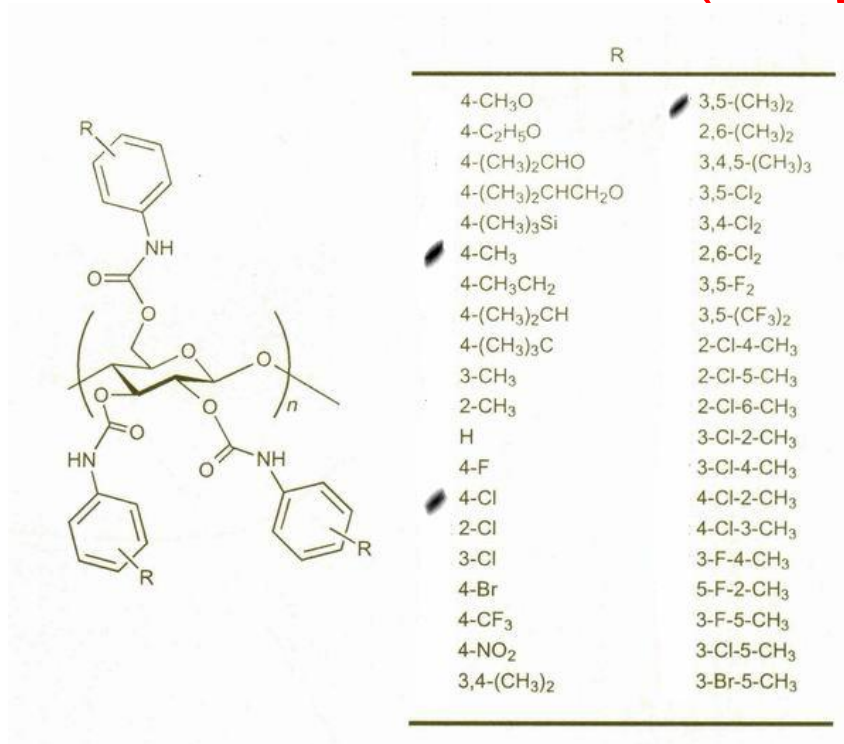
# Deriváty celulosy a amylosy



R
4-CH <sub>3</sub> O
3,5-(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub>
4-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C
4-CH <sub>3</sub>
3-CH <sub>3</sub>
2-CH <sub>3</sub>
H
4-F
4-CF <sub>3</sub>
3,5-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
3,5-Cl <sub>2</sub>

- navázány na silikagelové matrici
- estery, karbamáty
- převážně normální separační mód
- více interakčních možností

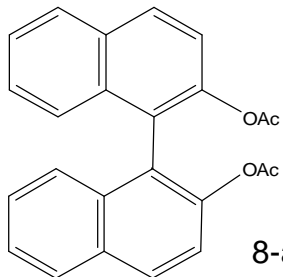
# tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy (amylosy)



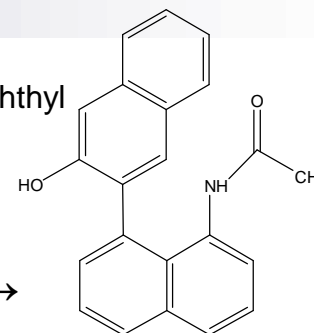
normální separační mód – široké spektrum aromatických analytů, s karbonylovou skupinou, s P jako stereogenním centrem

reversní separační mód - neutrální, kyselé i bazické analyty

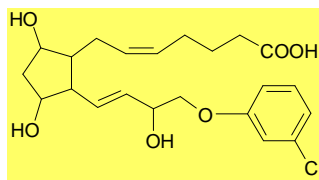
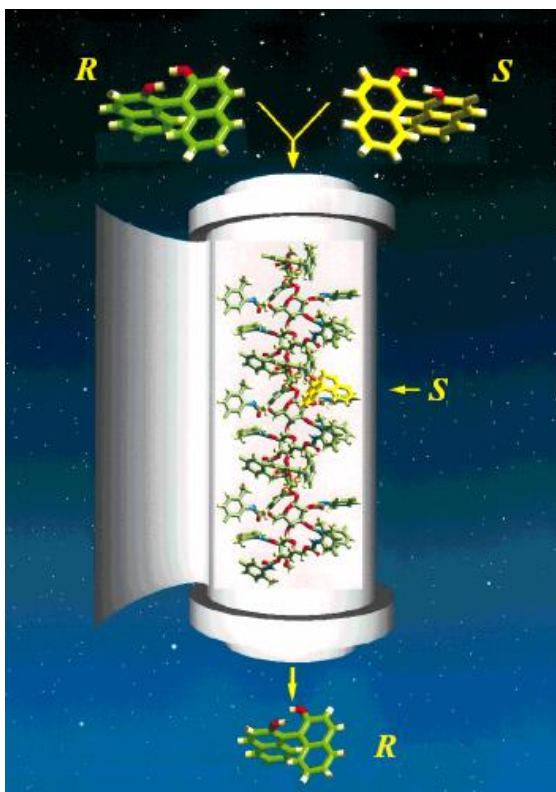
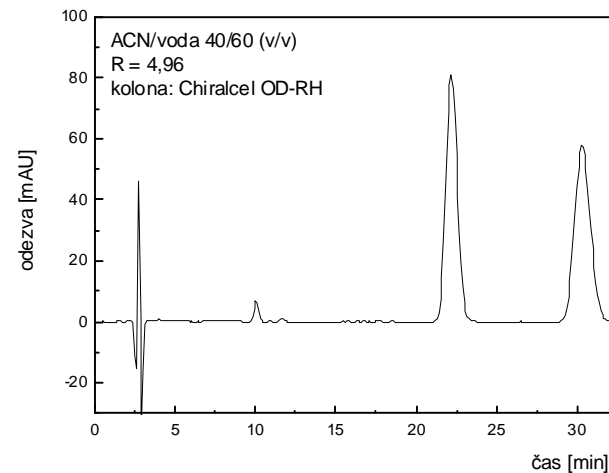
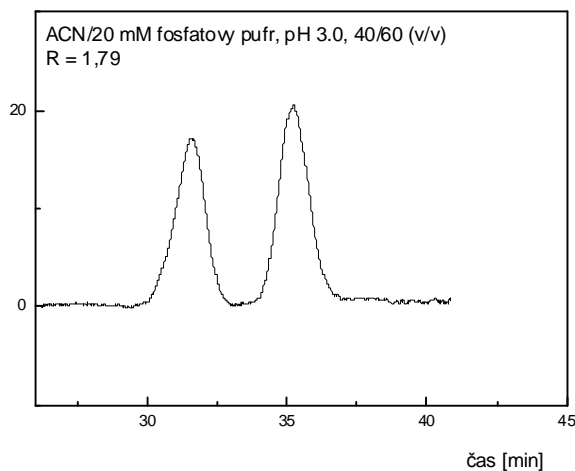
# Aplikace



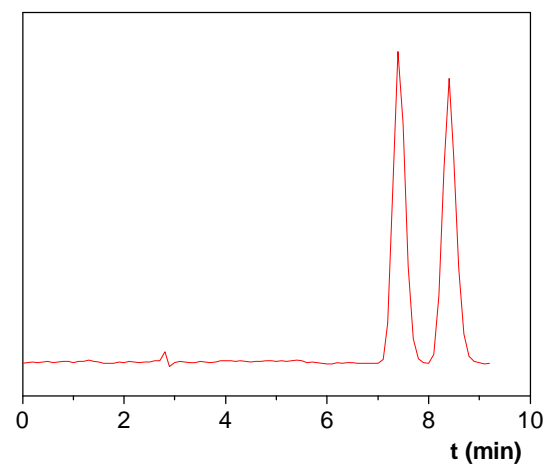
← OBIN diAc, 2,2'-diacetyl-1,1'-binaphthyl



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

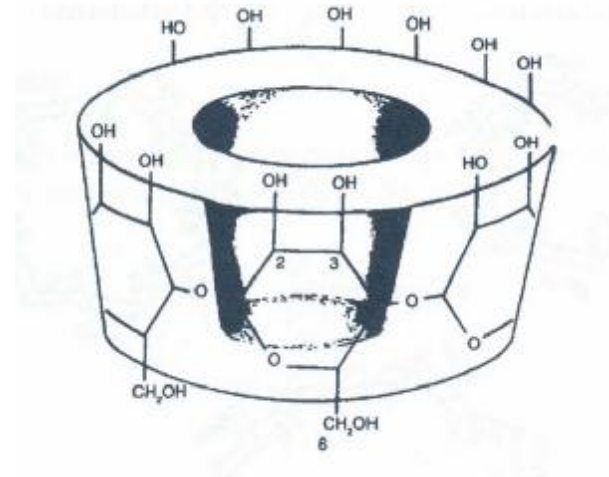
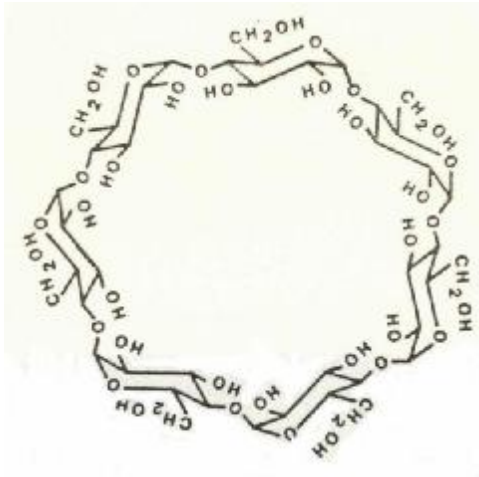


ACN- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 3,0; 20 mM) (33:67, v/v)  
 $k_1 = 1,63$ ;  $k_2 = 1,98$ ;  $R = 2,1$



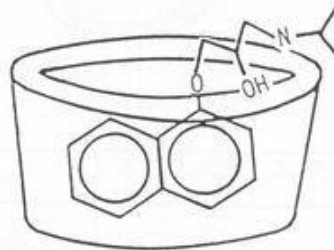
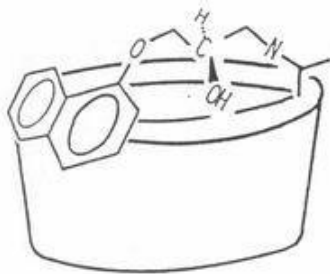
# Cyklodextrinové CSP

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



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

# Retenční mechanismus

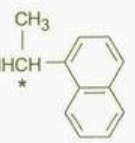
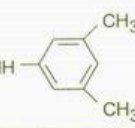


## tři separační módy

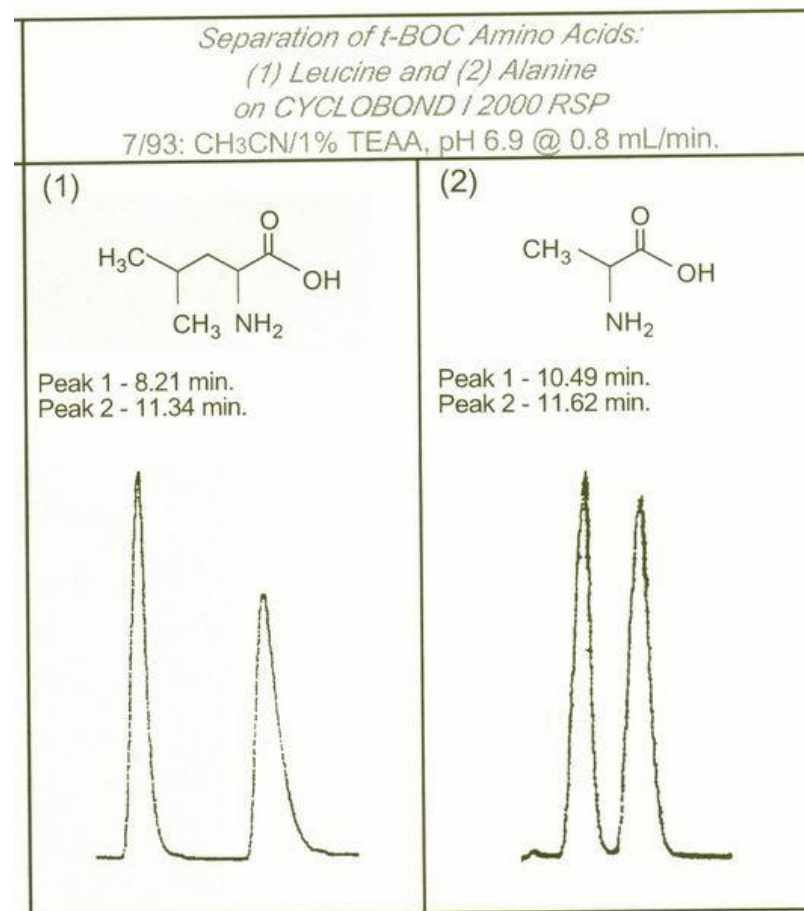
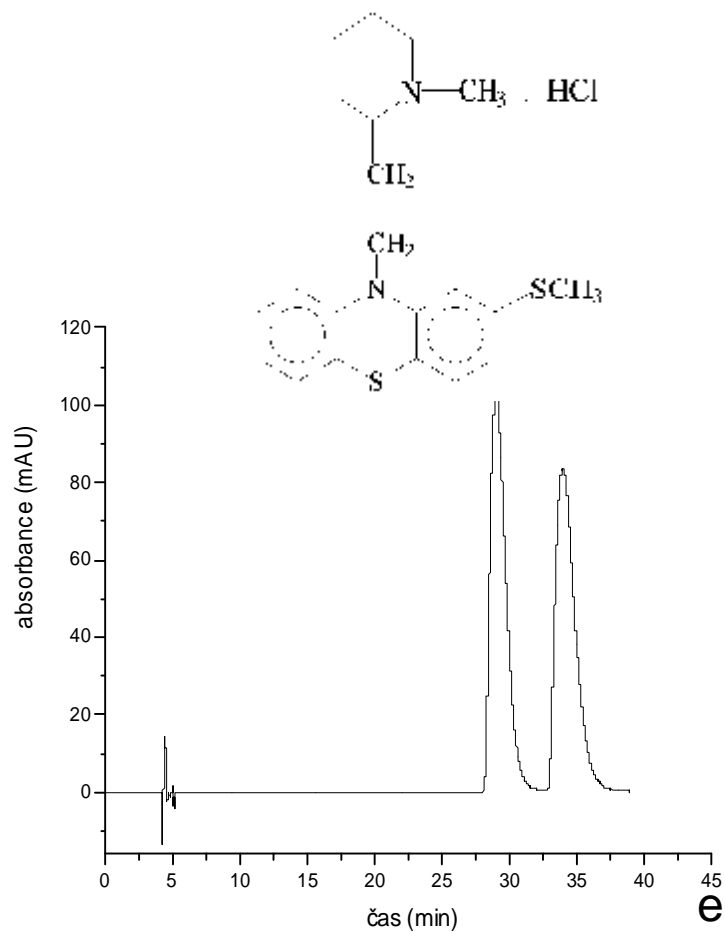
- reversní - organický modifikátor/vodný roztok pufrů
- normální - nepolární/polární rozpouštědlo
- polárně-organický -  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HAc}/\text{TEA}$

## derivatizace CD

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

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

# Aplikace



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

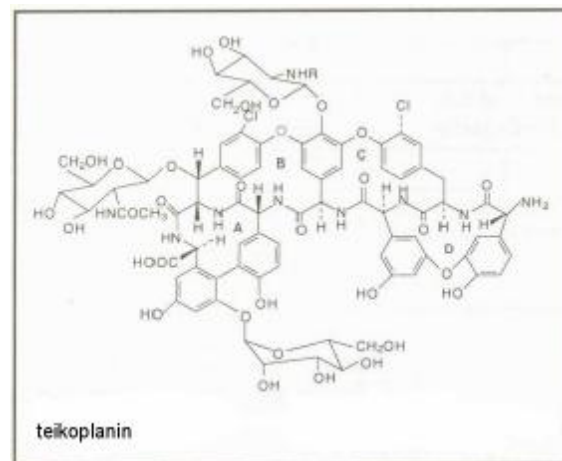
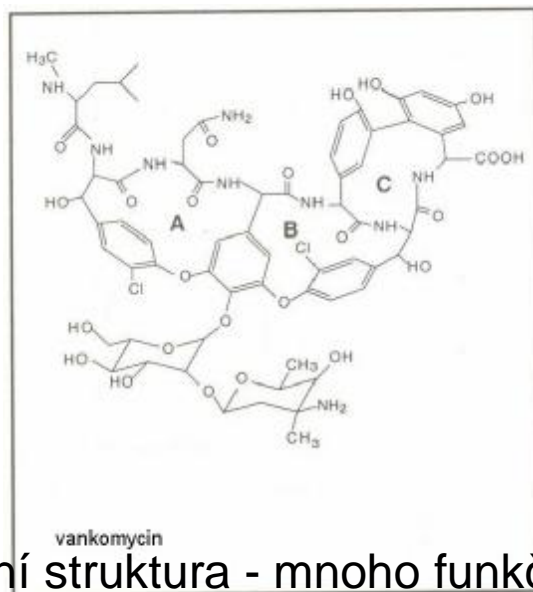


## CSP na bázi makrocyclických antibiotik

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



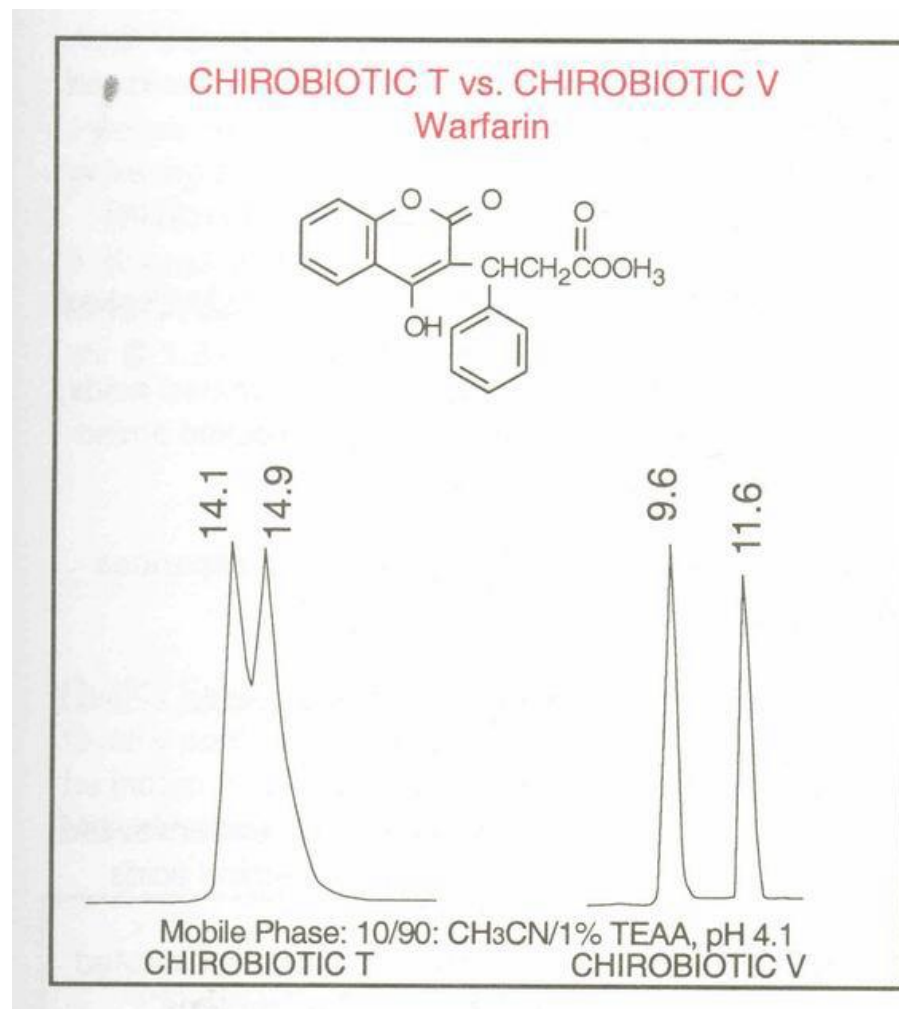
# Separační módy



komplexní struktura - mnoho funkčních skupin a chirálních center, 3 (4) mělké dutiny → multimodální charakter  
interakční mechanismus p-p interakce, vodíková vazba, dipolové interakce, inkluze, sterické efekty

reversní mód - OM/vodný roztok pufru (vliv OM, pufru, pH)  
normální mód - nepolární/polární organické rozpouštědlo  
(nový) polárně-organický mód - CH<sub>3</sub>OH/HAc/TEA

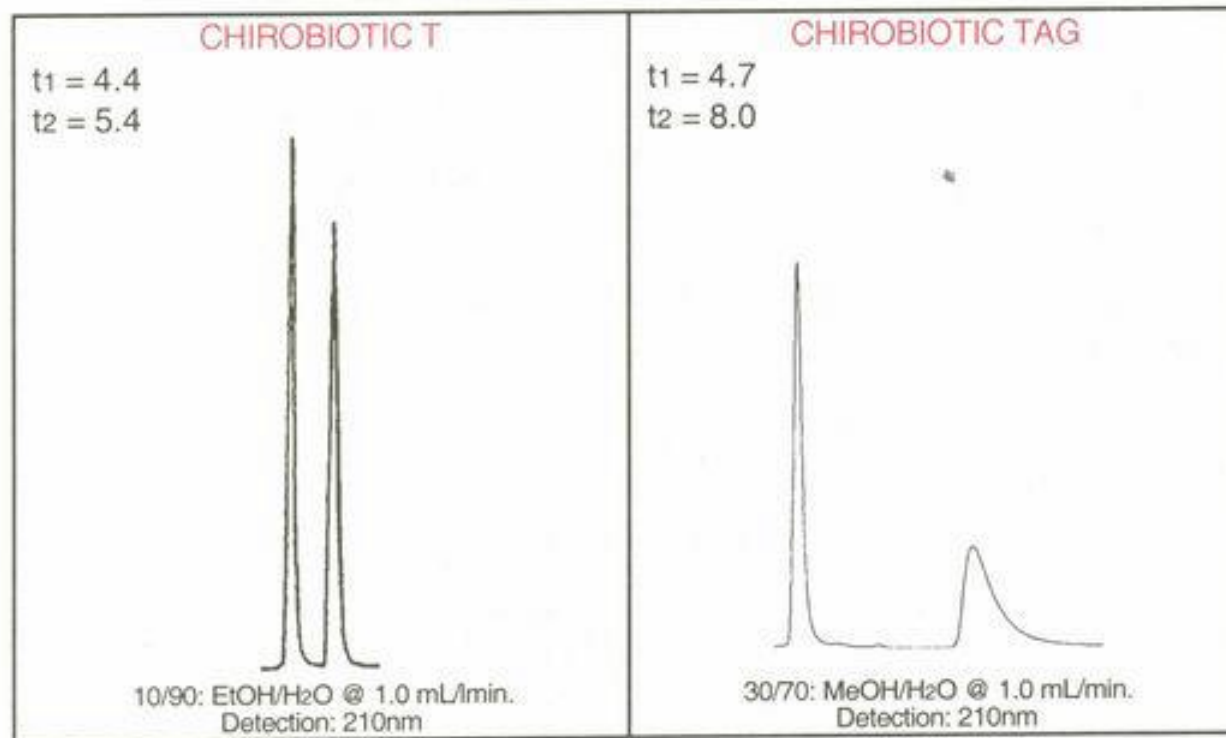
# Chirobiotic T vs Chirobiotic V



komplementární charakter MA

# Chirobiotic T vs Chirobiotic TAG

Separace D, L-methioninu

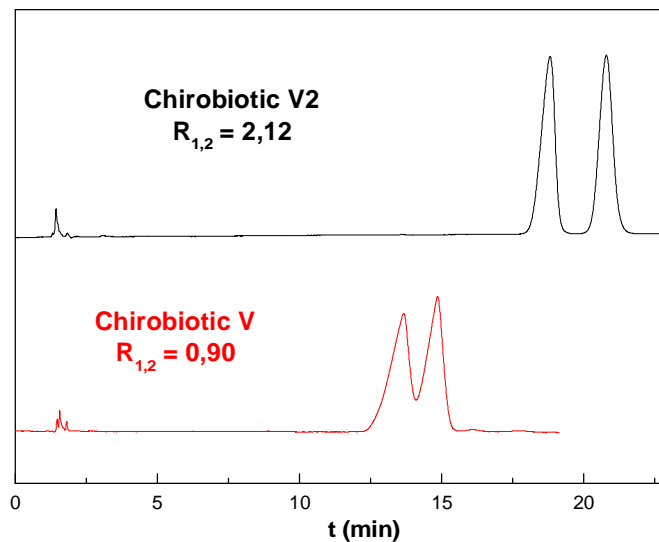
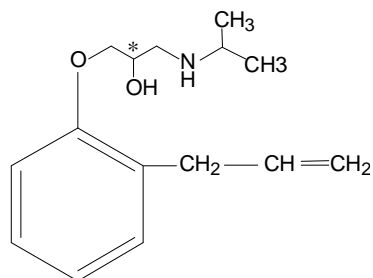


modifikované glykopeptidy

teikoplanin-aglykon, (permethylovaný teikoplanin)

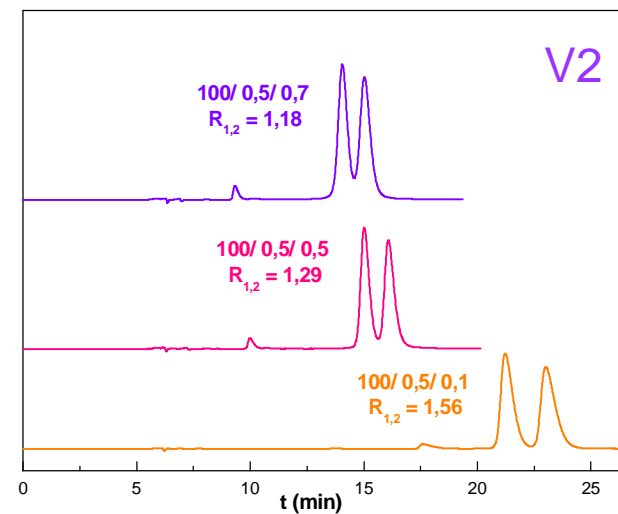
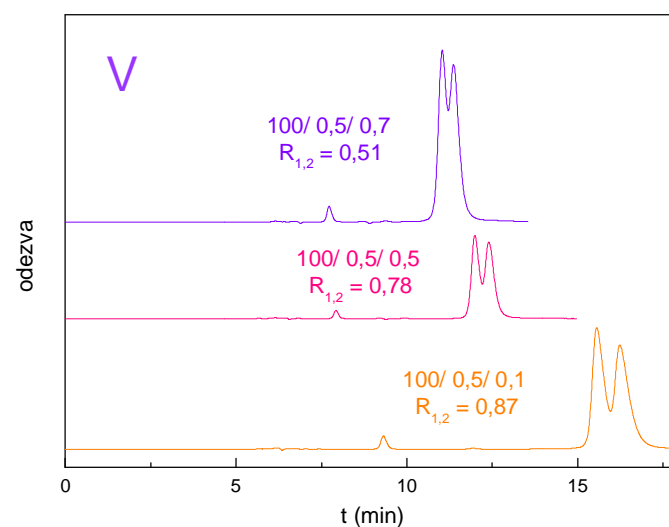
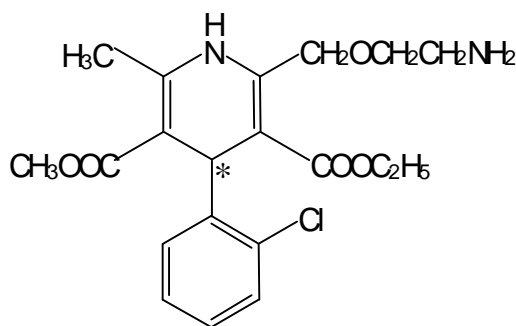
# Chirobiotic V vs Chirobiotic V2

alprenolol



polárně organický separační mód  
MeOH /HAc/ TEA 100/ 0,005/ 0,005  
(v/v/v)

1,4-dihydropyridiny  
- amlodipin



polárně organický separační mód - MeOH /HAc/ TEA



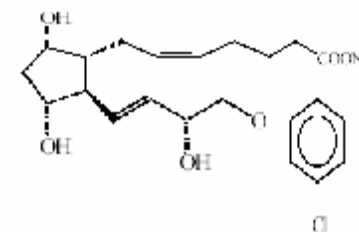
## Optimalizace separace

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

# Proces optimalizace

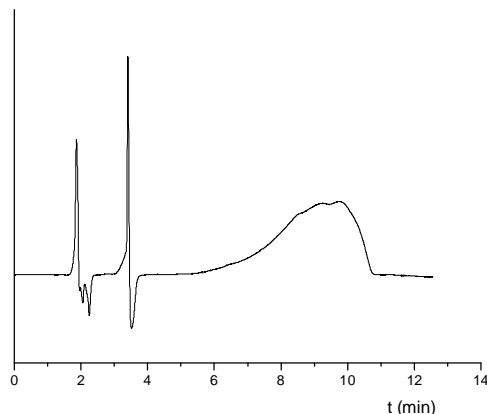


## (+)-cloprostenol

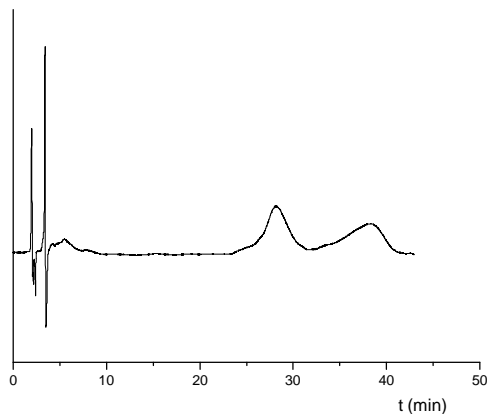


synteticky připravený analog prostaglandinu F2 $\alpha$  – děložní kontrakce, luteolýza, produkce racemátu ( $\pm$ )-cloprostenolu, (+)-enantiomer vykazuje podstatně vyšší biologickou aktivitu a pouze on vykazuje luteolytickou aktivitu

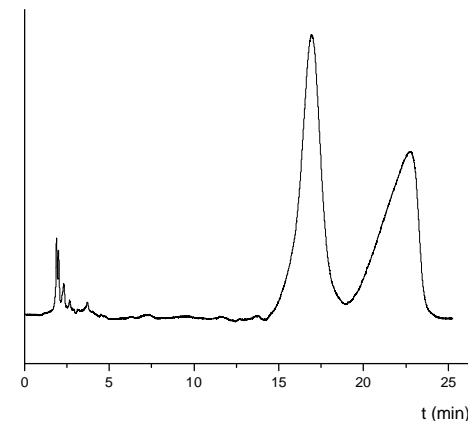
## MA - tecoplanin-aglykon



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

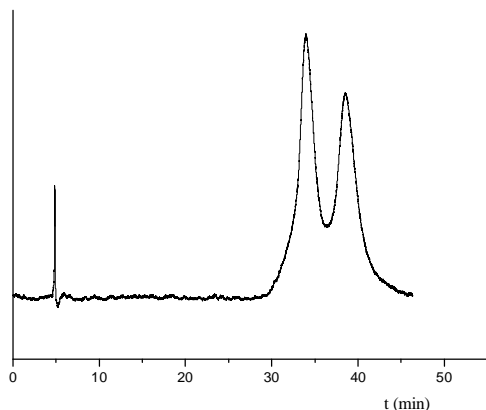


IPA/hex/MeOH/TEA 15/60/25/0,5  
(v/v/v/v), 1ml/min,  
 $k_1 = 12,71$ ;  $k_2 = 17,65$ ;  $R = 2,05$

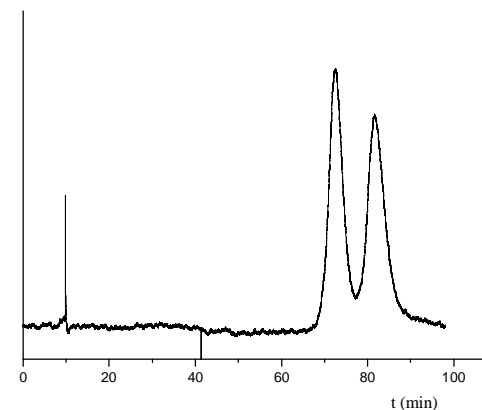


IPA/hex/MeOH/TEA 10/60/30/1,1  
(v/v/v/v), 1ml/min,  $k_1 = 6,97$ ;  $k_2 = 9,69$ ;  
 $R = 1,86$

## teikoplanin-aglykon

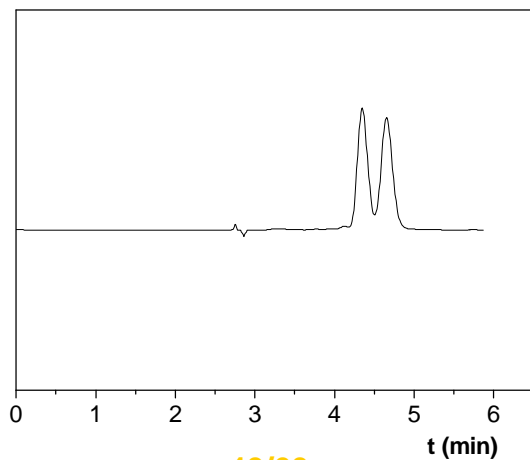


ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,1/0,1 (v/v/v/v),  
0,6 ml/min,  
 $k_1 = 5,99$ ;  $k_2 = 6,95$ ;  $R = 1,22$

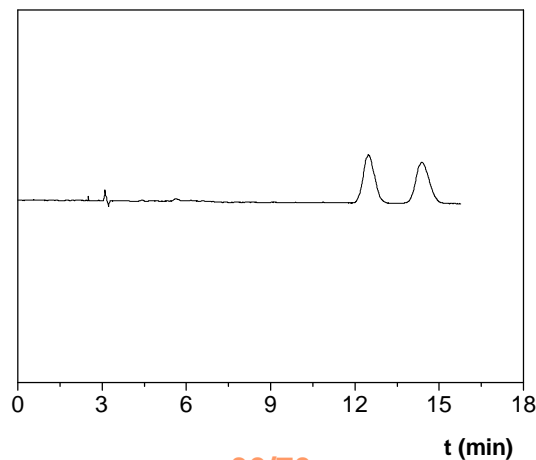


ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,1/0,1  
(v/v/v/v), 0,6 ml/min, 2 kolony  
zapojené za sebou  
 $k_1 = 7,33$ ;  $k_2 = 8,36$ ;  $R = 1,35$

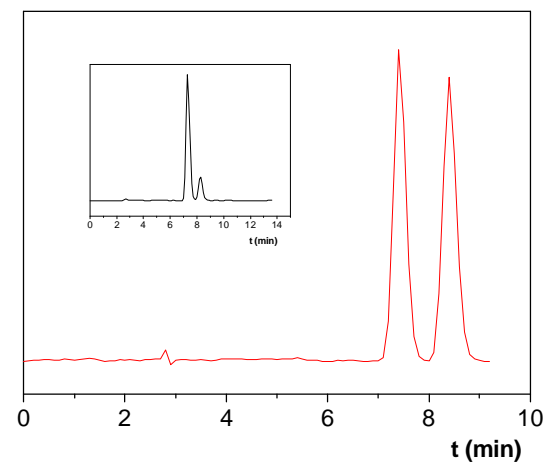
## tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy



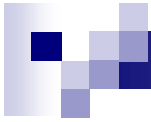
40/60  
 $k_1 = 0,58$ ;  $k_2 = 0,68$ ;  $R = 1,1$



30/70  
 $k_1 = 3,03$ ;  $k_2 = 3,64$ ;  $R = 2,3$



33/67  
 $k_1 = 1,63$   $k_2 = 1,98$   $R = 2,1$



Děkuji Vám za pozornost