

Magdalena Gorska

**Wpływ czynników achiralnych na chromatograficzne rozdzielanie
enancjomerów wybranych pochodnych pirolidyn-2-onu
na sacharydowych fazach stacjonarnych**

Promotor: prof. dr hab. Janusz Lipkowski
Opiekun naukowy: dr inż. Anna Bielejewska



A-21-9

K-9-126

Praca doktorska wykonana w ramach Międzynarodowych Studiów Doktoranckich
w Zakładzie Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych
Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk
M. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

Praca częściowo finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
Grant numer N204 04432/1046

Warszawa 2010

dr. inż. Kar

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.426/10





B. 426/10

*Panu prof. Januszowi Lipkowskiemu
serdecznie dziękuję za stworzenie możliwości realizacji interesującej
pracy oraz za wszelką pomoc w trakcie jej wykonywania
i redagowania.*

*Pani dr inż. Annie Bielejewskiej
składam gorące podziękowania za wybór tematu, opiekę, cierpliwość,
liczne dyskusje oraz wszelką pomoc podczas wykonywania i redakcji
niniejszej pracy.*

*Pani prof. Helenie Dodziuk oraz panu prof. Andrzejowi Lesiowi
dziękuję za profesjonalne i cenne uwagi w trakcie redakcji niniejszej
pracy.*

*Wszystkim Pracownikom
Zakładu Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych
a w szczególności
pani mgr Kazimierze Duszczyk oraz panu mgr Pawłowi Widomskiemu
serdecznie dziękuję za szczerą, bezinteresowną, koleżeńską pomoc
oraz stworzenie milej atmosfery pracy.*

*Wszystkim moim Bliskim i Przyjaciółom dziękuję za okazane wsparcie,
miłość i pomoc.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	5
CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	7
1. Chiralność i jej znaczenie	7
1.1 Podstawowe pojęcia.....	7
1.2 Znaczenie chiralności w układach biologicznych.....	15
2. Metody otrzymywania i analizy enancjomerów	17
2.1 Metody chromatograficzne	18
2.2 Mechanizmy rozdzielania enancjomerów w chromatografii cieczowej	19
2.3 Chiralne fazy stacjonarne.....	21
2.3.1 Polisacharydowe fazy stacjonarne.....	24
2.3.2 Cyklodekstrynowe fazy stacjonarne.....	30
3. Wpływ achiralnego środowiska na rozróżnienie chiralne.....	36
3.1 Wpływ modyfikatorów organicznych na rozróżnienie chiralne	39
3.2 Woda jako modyfikator faz normalnych	49
4. Badania temperaturowe w chromatografii.....	51
4.1 Termodynamiczne parametry rozdzielania enancjomerów	51
CEL PRACY	60
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	61
1. Aparatura	61
2. Badane związki.....	61
3. Kolumny.....	62
4. Odczynniki.....	63
5. Skład fazy ruchomej	63
6. Badania temperaturowe	64
7. Mikropreparatywne rozdzielanie enancjomerów	65

8. Ilościowe zależności struktura-retencja QSRR	65
9. Badania NMR	67
WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA	69
1. Wpływ środowiska achiralnego na rozróżnienie chiralne pochodnych pirydyno-2-onu na kolumnie cyklodekstrynowej.....	70
1.1 Fazy normalne.....	71
1.2 Fazy odwrócone	76
1.3 Polarne fazy organiczne	83
1.4 Podsumowanie i wnioski	88
2. Wpływ alkoholi na rozróżnienie chiralne pochodnych pirolidyno-2-onu na kolumnach polisacharydowych	90
2.1 Kolumny amylozowe: Chiralpak AD i Chiralpak IA	90
2.2 Kolumna Chiralcel OD	109
2.3 Badania NMR faz polisacharydowych.....	118
2.4 Kolejność wymywania enancjomerów	124
2.5. Badania temperaturowe.....	127
2.5.1 Kolumna Chiralpak AD.....	128
2.5.1.1 Kompensacja entalpowo-entropowa	131
2.5.2 Kolumna Chiralpak IA	136
2.5.2.1 Kompensacja entalpowo-entropowa	138
2.5.3 Kolumna Chiralcel OD	139
2.5.3.1 Kompensacja entalpowo-entropowa	142
2.6 Określanie czystości enancjomerycznej pochodnych pirolidyno-2-onów	146
2.7 Podsumowanie i wnioski	148
PODSUMOWANIE KOŃCOWE.....	151
STRESZCZENIE	155
LITERATURA	157

WYKAZ SKRÓTÓW

Związki

AA	- Kwas octowy
ACN	- Acetonitryl
AGP	- Kwaśna α - glikoproteina
CD	- Cyklodekstryna
DMSO	- Dimetylosulfotlenek
EtOH	- Etanol
IPA	- 2-propanol (izopropanol)
TEA	- Trietyloamina
TFA	- Kwas trifluorooctowy

Symbole

α	- Współczynnik rozdzielenia (dla enancjomerów enancjoselektywność)
CPS	- Chiralna faza stacjonarna (ang. Chiral Stationary Phase)
CP-MAS	- Polaryzacja skrośna (ang. Cross Polarisation)
ΔG°	- Różnica entalpii swobodnej (energii Gibbsa)
$\Delta\Delta G^\circ$	- Różnica zmian entalpii swobodnej kompleksowania dla dwóch enancjomerów
ΔH°	- Standardowa entalpia przejścia analitu z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej
$\Delta\Delta H^\circ$	- Różnica zmian entalpii kompleksowania dla dwóch enancjomerów
k	- Współczynnik retencji
K	- Stała podziału
N_{ef}	- Efektywna liczba pól
R_s	- Rozdzielczość pików
ΔS°	- Standardowa entropia przejścia analitu z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej
$\Delta\Delta S^\circ$	- Różnica zmian entropii kompleksowania dla dwóch enancjomerów

Metody instrumentalne

- HPLC - Chromatografia cieczowa wysokosprawna (ang. High Performance Liquid Chromatography)
- LSER - Liniowe zależności energii solwatacji (ang. Linear Solvation Energy Relationship)
- NMR - Magnetyczny rezonans jądrowy (ang. Nuclear Magnetic Resonance)
- TLC - Chromatografia cienkowarstwowa (ang. Thin Layer Chromatography)
- QSRR - Ilościowa zależność struktura - retencja (ang. Quantitative Structure - Retention Relationships)

CZEŚĆ LITERATUROWA

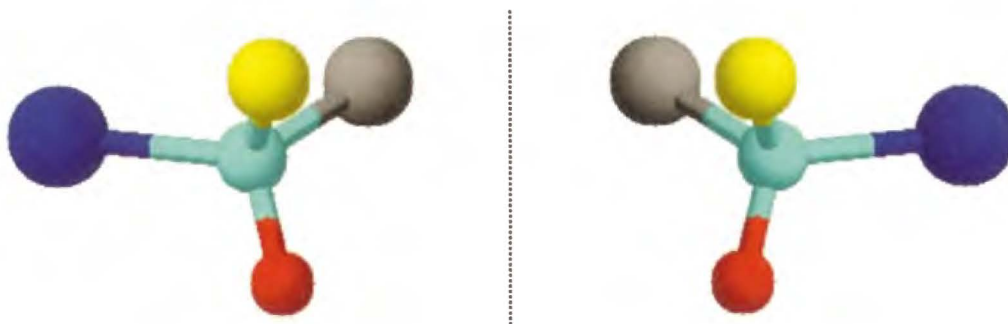
1. Chiralność i jej znaczenie

1.1 Podstawowe pojęcia

Termin chiralność (pochodzi od greckiego słowa *cheir* - ręka) oznacza właściwość przedmiotu polegającą na tym, że nie jest on identyczny ze swoim odbiciem w lustrze. Jedynymi elementami symetrii, jakie może posiadać przedmiot chiralny są osie C_n . Natomiast przedmiot achiralny, czyli identyczny ze swoim odbiciem lustrzanym posiada środek symetrii, płaszczyznę symetrii, oś przemienną lub inwersyjną [1,2].

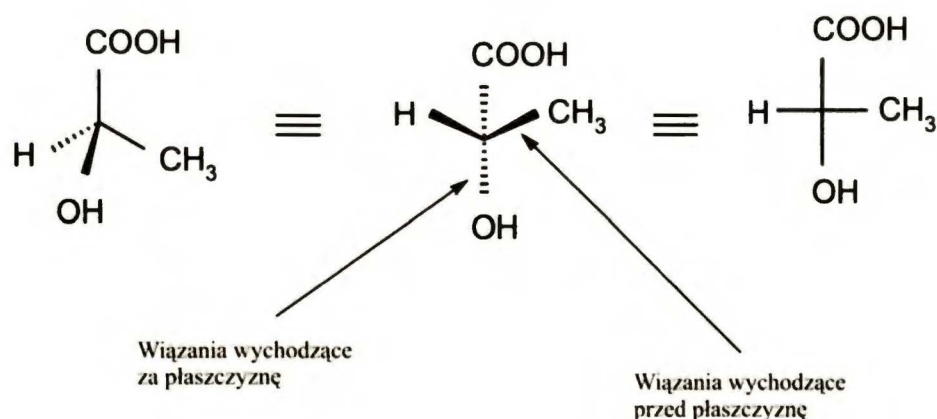
Chiralne pary związane relacją przedmiot i jego odbicie lustrzane, których nie da się na siebie nałożyć nazywamy enancjomerami (Rys.1). Mają one takie same właściwości fizyczne i chemiczne w środowisku achiralnym. To, co je różnicuje to obecność czynników chiralnych, np. skręcają one płaszczyznę światła spolaryzowanego o tę samą wartość, lecz w przeciwne strony stąd nazywane są również izomerami optycznymi. Natomiast mieszanina enancjomerów w stosunku 1:1 nazywana racematem jest optycznie nieaktywna.

Najprostszym przykładem chiralnej cząsteczki jest atom węgla z czterema różnymi podstawnikami (Rys. 1). Mówimy wtedy o **chiralności centrycznej**, a taki asymetryczny atom nazywamy centrum chiralności cząsteczki. Atomem asymetrycznym może być nie tylko węgiel, ale również azot, siarka, fosfor, krzem, arsen i inne.



Rys. 1. Cząsteczka chiralna i jej odbicie lustrzane.

Uproszczony wzór cząsteczki zawierającej centrum chiralne można przedstawić za pomocą wzorów projekcyjnych Fischera. Cząsteczkę przedstawiamy rysując krzyż a do jego czterech ramion przyłączamy podstawniki. Przecięcie ramion krzyża określa położenie atomu chiralnego. Linia pionowa przedstawia wiązania podstawników leżące poza płaszczyzną rysunku, natomiast linie poziome przedstawiają wiązania wychodzące przed płaszczyznę rysunku (Rys. 2). Tak utworzone wzory możemy obracać w płaszczyźnie papieru tylko o 180° . Obrócenie o 90° zmienia konfigurację centrum chiralności na przeciwną.

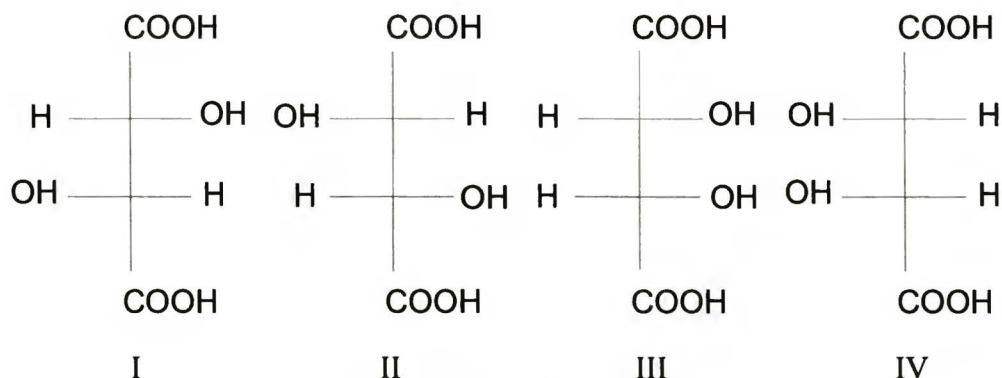


Rys. 2. Schemat obrazujący zasady projekcji Fischera.

W przypadku, kiedy cząsteczki posiadają więcej niż jedno centrum chiralności, liczba izomerów jest równa 2^n , gdzie „n” to liczba centrów chiralności. Stereoizomery (izomery przestrzenne), które nie są względem siebie enancjomerami nazywamy diastereoizomerami. Różnią się one właściwościami chemicznymi i fizycznymi np. temperaturą wrzenia, topnienia, rozpuszczalnością itp.

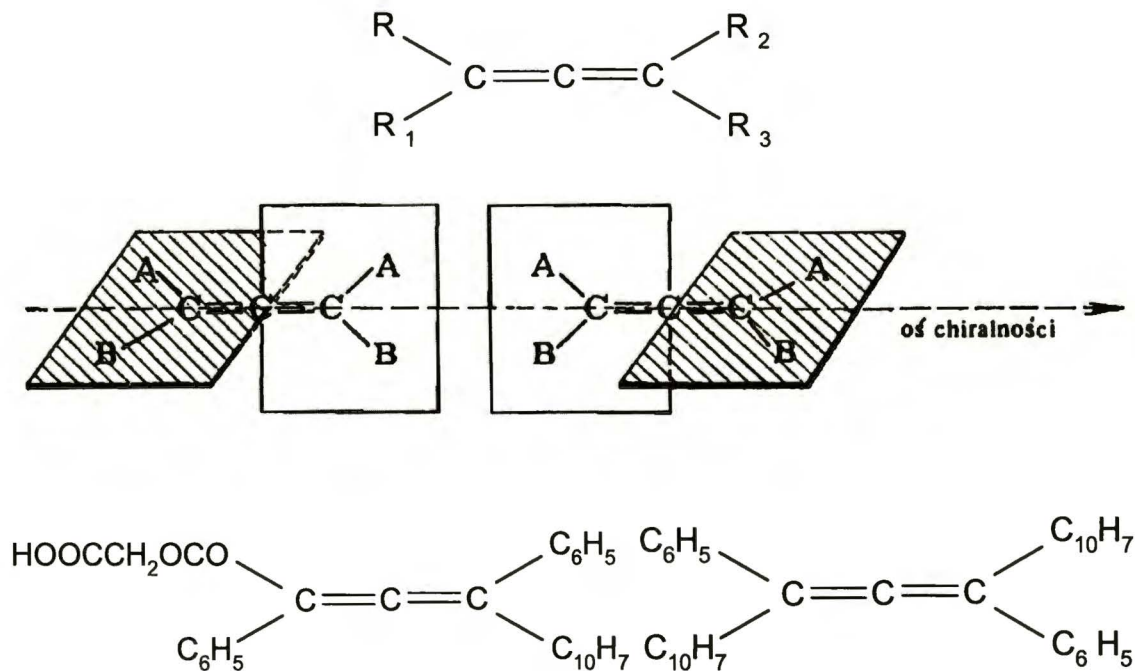
Cząsteczki z jednym asymetrycznym atomem są zawsze asymetryczne. Jednakże wśród diastereoizomerów, które posiadają kilka asymetrycznych atomów z jednakowymi podstawnikami występuje również tzw. forma *mezo*. Jest to forma nieaktywna optycznie, gdyż efekty centrów chiralności wzajemnie się kompensują. Klasycznym przykładem jest kwas winowy. Wzory I i II (Rys. 3) przedstawiają enancjomery kwasu winowego, które po zmieszaniu dają optycznie nieczynną odmianę racemiczną. Natomiast wzory III i IV są identyczne. Związek IV można otrzymać przez obrót III o 180° w płaszczyźnie rysunku, jest to więc ten sam stereoizomer. Związek ten

tworzy formę *mezo*, gdyż w cząsteczce występuje płaszczyzna symetrii czyniąc ją achiralną. Pary I i III oraz II i III są względem siebie diastereoizomerami.



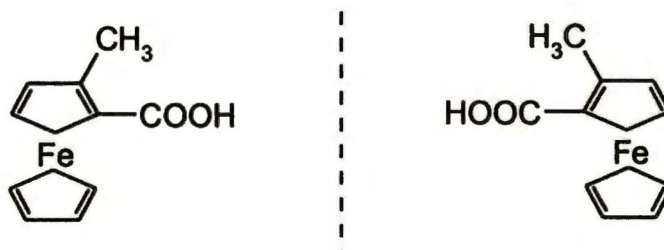
Rys. 3. Stereoizomery kwasu winowego: I i II para enancjomerów, III = IV forma *mezo*.

Jednakże asymetryczny atom nie jest warunkiem koniecznym, aby występowała chiralność. Również cząsteczki, których jedynymi elementami symetrii są proste osie symetrii C_n są chiralne. Taki rodzaj chiralności nazywany **chiralnością aksjalną**; występuje ona np. w chiralnych allenach czy też bifenylach. Cząsteczki allenu są asymetryczne podstawione względem osi zwanej osią chiralności biegnącej przez układ skumulowanych wiązań podwójnych (Rys. 4).



Rys. 4. Chiralność aksjalna. Struktura allenów [2].

Chiralność cząsteczek może występować również względem wyróżnionej płaszczyzny nazywanej płaszczyzną chiralności. Mamy w tym przypadku tzw. **chiralność planarną**. Związki posiadające taki typ chiralności to np. pochodne ferrocenu zawierające co najmniej dwa nieidentyczne podstawniki w jednym pierścieniu (Rys. 5) [2].

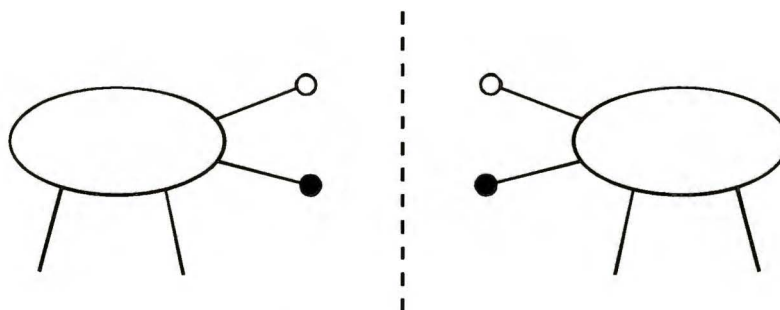


Rys. 5. Przykład chiralności planarnej. Pochodne ferrocenu [2].

Innym przykładem są pochodne cyklopentadienylotrikarbonylomanganu, benzenotrikarbonylochromu i rutenocenu (Rys. 6). Wymienione związki różnią się podstawnikami leżącymi w płaszczyźnie pierścienia, co schematycznie zostało pokazane na Rys. 7 [2].

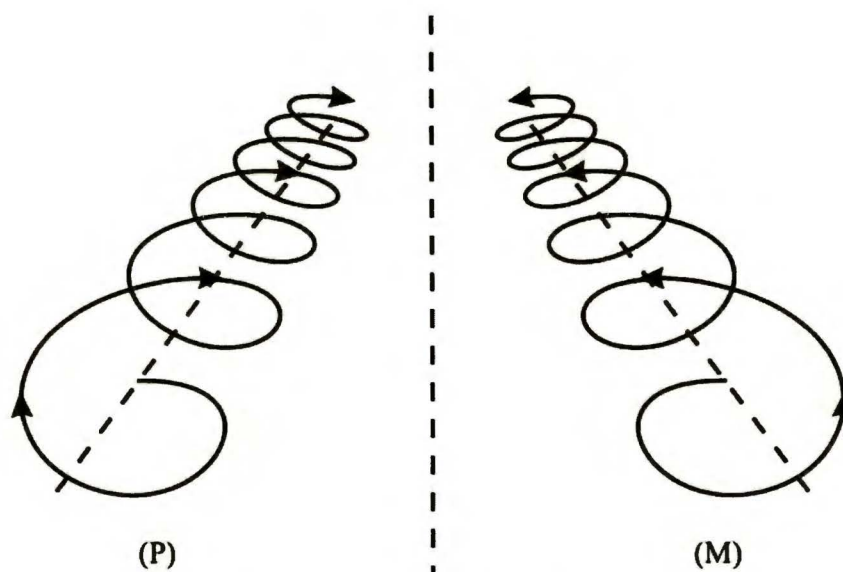


Rys. 6. Przykład chiralności planarnej. Pochodne benzenotrikarbonylochromu i cyklopentadienylotrikarbonylomanganu [2].



Rys. 7. Schemat obrazujący chiralność planarną w pochodnych cyklopentadienylotrikarbonylomanganu, benzenotrikarbonylochromu [2].

Jeszcze innym rodzajem chiralności cząsteczek jest **helikalność**. Wchodzące w skład cząsteczki atomy rozłożone są wzdłuż linii śrubowej (helisy). Wyróżniamy helisy prawe (P) i lewe (M) w zależności od tego czy kierunek skrętu helisy jest zgodny czy przeciwny do ruchu wskazówek zegara (Rys. 8) [1,2]. Struktury helikalne tworzą się w wyniku braku możliwości koplanarnego rozmieszczenia skrajnych fragmentów układu ze względu na zawadę steryczną. Występują często w makrocząsteczkach np. polisacharydy, proteiny.



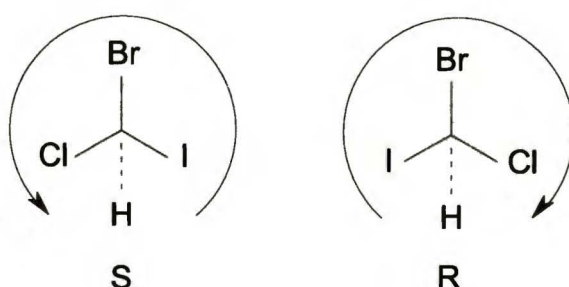
Rys. 8. Helisa prawoskrętna (P) i lewoskrętna (M) [2].

Jednakże należy zauważyć, że w 1990r. Dodziuk i Mirowicz [3] wprowadzili modyfikacje do powszechnie uznawanej klasyfikacji chiralności według Cahn, Ingold i Prelog. Autorzy twierdzą, iż chiralne związki można podzielić tylko na dwie grupy: chiralność centryczną i helikalne osie.

Enancjomery i związki optycznie czynne często opisujemy za pomocą znaku skręcalności światła spolaryzowanego (+) dla prawoskrętnych lub (-) dla lewoskrętnych związków umieszczając go, jako przedrostek przed nazwą. Jednakże należy pamiętać, iż na podstawie skręcalności nie jesteśmy w stanie określić konfiguracji cząsteczki.

Do opisu absolutnej konfiguracji związków zawierających centra chiralne stosuje się konwencję wprowadzoną przez Cahn, Ingolda i Preloga, tzw. system R, S (R z łac. *rectus* - prawy i S *sinister* - lewy) [4]. Ustalanie konfiguracji danego centrum chiralności przeprowadza się w następujący sposób:

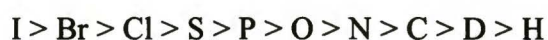
1. Ustalamy kolejność pierwszeństwa podstawników wokół centrum chiralnego zgodnie z regułami pierwszeństwa omówionymi poniżej.
2. Ustawiamy cząsteczkę tak, aby podstawnik o najmniejszej ważności był jak najbardziej oddalony od nas.
3. Następnie określamy kierunek, w jakim maleje pierwszeństwo poszczególnych grup. Jeśli kierunek jest zgodny z ruchem wskazówek zegara to konfigurację oznaczamy symbolem R. Jeśli przesuwamy się przeciwnie do ruchu wskazówek zegara to konfigurację określamy symbolem S (Rys. 9).



Rys. 9. Konfiguracje S i R bromochlorojodometanu.

Reguły pierwszeństwa:

1. Pierwszeństwo uzyskują atomy o największej liczbie atomowej. W przypadku izotopów tego samego pierwiastka pierwszeństwo uzyskuje atom o większej liczbie masowej. Porządek pierwszeństwa dla niektórych atomów wygląda następująco:

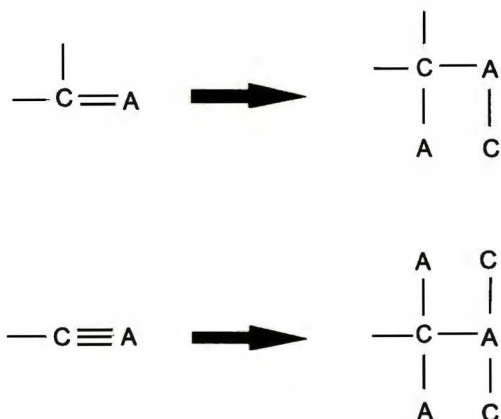


2. Jeżeli nie można na podstawie reguły 1 ustalić pierwszeństwa grup to porównujemy atomy oddalone o jeden atom dalej od centrum chiralności. Jeśli taka operacja nie przyniesie rozwiązania to przesuwamy się o kolejny atom aż dojdziemy do takiej pary atomów, z których jeden ma większą liczbę atomową niż drugi.
3. W przypadku atomów z wiązaniami wielokrotnymi (podwójnymi, potrójnymi) sprowadza się je do wiązań pojedynczych dodając „wirtualne” atomy tego samego rodzaju, co krotnie związany partner (Rys. 10).

Zgodnie z tą regułą:

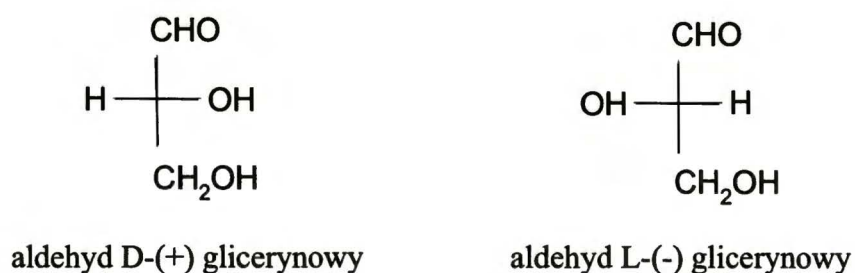


ponieważ rozwinięty wzór grupy karboksylowej zawiera trzy atomy tlenu, aldehydowej dwa a alkoholowej jeden.



Rys. 10. Zamiana wiązań podwójnych i potrójnych na pojedyncze według trzeciej reguły pierwszeństwa.

Do opisu węglowodanów oraz α -hydroksykwasów i α -aminokwasów stosuje się również konwencję Fischera – system D, L. Metoda ta polega na porównaniu wzoru projekcyjnego wybranego enancjomeru ze wzorem projekcyjnym wzorca. Wzorcem w tym przypadku jest aldehyd glicerynowy (Rys. 11).



Rys. 11. Wzory projekcyjne enancjomerów aldehydu glicerynowego.

W przypadku węglowodorów oznaczenie ustala się na podstawie położenia grup: -OH i -H położonych przy centrum chiralności znajdującym się najbliżej grupy CH_2OH , (czyli na dole we wzorze cząsteczki). Jeśli po lewej stronie wzoru znajduje się grupa -OH to mamy konfigurację L natomiast, jeśli grupa -OH jest położona po prawej stronie centrum chiralnego to mamy konfigurację D.

Ustalając konfiguracje dla α -hydroksykwasów i α -aminokwasów porównujemy górną część wzoru projekcyjnego. Cząsteczki ustawiamy tak, aby grupa -COOH znajdowała się w miejscu grupy -CHO, a grupa -NH₂ w przypadku aminokwasów w miejscu grupy -OH. Jeśli grupa -OH dla α -hydroksykwasów a grupa -NH₂ dla α -aminokwasów znajduje się po lewej stronie atomu chiralnego znajdującego się najbliżej grupy -COOH to mamy konfigurację L, a jeśli znajduje się po prawej to mamy konfigurację D.

Podstawowe pojęcia

Chiralność

Właściwość przedmiotu polegająca na tym, że nie jest on identyczny ze swoim odbiciem w lustrze. Jedyne elementy symetrii są osie C_n .

Achiralność

Właściwość przedmiotu polegająca na tym, że jest on identyczny ze swoim odbiciem w lustrze. Posiada środek symetrii, płaszczyznę symetrii, oś przemienną lub inwersyjną.

Stereoizomery

Nieidentyczne obiekty cząsteczkowe posiadające tę samą konstytucję tzn. ten sam sposób i kolejność powiązania atomów, ale różniące się budową przestrzenną.

Enancjomery

Chiralne związki (stereoizomery) związane relacją przedmiot i jego odbicie lustrzane, których nie da się na siebie nałożyć.

Diastereoizomery

Pozostałe stereoizomery niezwiązane relacją przedmiot i jego odbicie lustrzane.

Racemat

Mieszanka enancjomerów w stosunku 1:1. Optycznie nieaktywna.

1.2 Znaczenie chiralności w układach biologicznych

Chiralność jest cechą organizmów żywych. Większość związków biorących udział w procesach życiowych jest optycznie aktywna i występuje na ogół w postaci jednego enancjomeru. Dotyczy to białek złożonych z L-aminokwasów, D-cukrów, kwasów nukleinowych, enzymów, witamin i innych. W konsekwencji m.in. reakcje enzymatyczne, procesy metaboliczne, oddziaływania efektor-receptor są bardzo czułe na stereochemię.

Enancjomery w środowisku chiralnym mogą wykazywać różne właściwości. Ciekawym przykładem są ludzkie receptory węchowe, które potrafią rozróżnić parę enancjomerów (Tabela 1).

Tabela 1. Właściwości wybranych enancjomerów [1].

Związek	Zapach	
	(-)enancjomer	(+)enancjomer
Mentol	miętowy	stęchliżny
Limonen	cytrynowy	pomarańczowy
Karwon	miętowy	kminkowy

Znajomość właściwości poszczególnych enancjomerów staje się niezwykle ważna w przypadku wprowadzania do organizmu chiralnych leków. Początkowo stosowano leki tylko w postaci racematów. Okazało się jednak, że poszczególne enancjomery mogą różnić się właściwościami farmakodynamicznymi jak również farmakokinetycznym (czyli szybkością wchłaniania, dystrybucji i eliminacji leku). Zwykle tylko jeden z enancjomerów wykazuje efekt terapeutyczny, drugi posiada mniejszy efekt, nie wykazuje efektu lub może być toksyczny [5-7]. Przykłady chiralnych leków, których enancjomery wykazują różne działanie przedstawione zostały w Tabeli 2.

W ostatnich latach zwiększyło się zainteresowanie produkcją leków w postaci jednego enancjomeru. Rozwija się metoda nazywana „chiral switch”, która polega na wdrażaniu leku w postaci pojedynczego enancjomeru z leku, który jest stosowany na

rynku w postaci racematu. Metoda ta jednakże czasami służy jedynie przedłużaniu patentów [7,8]. Zastąpienie racematu jednym enancjomerem może się wiązać z poprawieniem skuteczności leku, ze zmniejszeniem objawów ubocznych, zwiększeniem bezpieczeństwa. W niektórych przypadkach leki w postaci pojedynczego enancjomeru ujawniają nowe właściwości. Takim przykładem jest (S)-fluoksetyna, która ma działanie przeciwmigrenowe, natomiast podawana w postaci racematu, jako lek antydepresyjny, takich właściwości nie ma [6].

Należy jednak pamiętać, iż wprowadzenie leku w postaci jednego enancjomeru nie zawsze jest dobrym rozwiązaniem, gdyż w organizmie może nastąpić jego racemizacja, inwersja (np. ibuprofen). Dlatego też w przypadku rejestracji leku w postaci enancjomerów wymagana jest pełna dokumentacja właściwości farmakodynamicznych, farmakokinetycznych, toksykologii leku i jego metabolitów, dla poszczególnych enancjomerów oraz ich mieszaniny [6].

Wraz z rozwojem metod otrzymywania związków chiralnych jako potencjalnych leków istnieje również konieczność opracowania metod analitycznych zarówno w celu rozdzielania enancjomerów jak również do oznaczania ich czystości enancjomerycznej.

Tabela 2. Właściwości enancjomerów wybranych leków [8].

Związek	Izomer	Działanie
Barbiturany	S	uspokajające
	R	wywołujący drgawki
Talidomid	S	teratogenne
	R	uspokajające
Labetalol	S,R	α -bloker
	R,R	β -bloker
Ketamina	S	silnie znieczulające
	R	słabo znieczulające i halucynogenne
Penicylamina	D	antyreumatyczne
	L	toksyczne

2. Metody otrzymywania i analizy enancjomerów

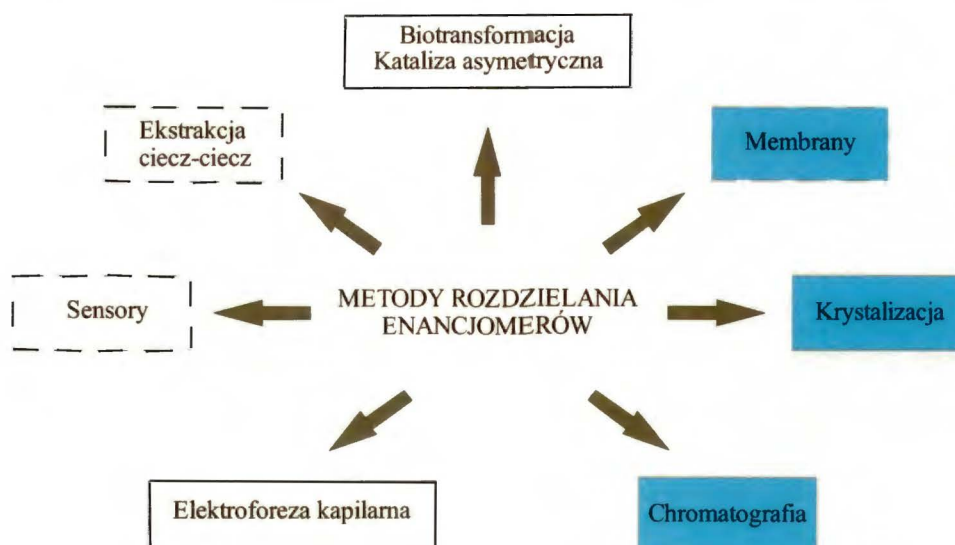
Pierwszego w historii rozdzielania mieszaniny racemicznej dokonał Ludwik Pasteur w 1848r. Rozdzielił on mechanicznie (ręcznie) kryształy winianu amonowo-sodowego, które były względem siebie jak przedmiot i jego odbicie w lustrze [2]. Obecnie otrzymywanie związków w postaci pojedynczego enancjomeru nabiera coraz większego znaczenia szczególnie w przemyśle farmaceutycznym.

Enancjomery w przyrodzie często występują w czystej postaci. Można, więc część związków optycznie czynnych uzyskać poprzez wyodrębnienie ich ze źródeł naturalnych (np. z roślin: terpeny, morfina, atropina). Wykorzystuje się również zdolność układów enzymatycznych mikroorganizmów (np. pleśń *Penicillium glaucum*) do wybiórczego reagowania z jednym z enancjomerów, który w ten sposób ulega destrukcji - metoda biochemiczna. Metoda ta często jest stosowana do otrzymywania optycznie czynnych aminokwasów. [2,9,10].

Jednakże większość wykorzystywanych związków chiralnych są to związki syntetyczne. Otrzymuje się je na drodze syntezy stereospecyficznej, która prowadzi do otrzymania pojedynczego enancjomeru lub jego nadmiaru w stosunku do drugiego, jak również w wyniku rozdzielania mieszaniny racemicznej [2,6,9-12]. Współczesne metody rozdzielania racematów wykorzystywane zarówno analitycznie jak i preparatywnie przedstawione są na schemacie (Rys. 12) [6].

Enancjomery w środowisku achiralnym posiadają takie same właściwości chemiczne i fizyczne i nie można ich rozdzielić bezpośrednio za pomocą destylacji, krystalizacji itp. Dlatego też we wszystkich metodach otrzymywania enancjomerów warunkiem niezbędnym jest obecność czynnika homochiralnego, czyli pojedynczego enancjomeru. Bardzo ważne jest dobranie odpowiedniego czynnika homochiralnego. Powinien on wielkością i strukturą odpowiadać rozdzielanym związkom tak, aby doszło do oddziaływań prowadzących do powstawania diastereoizomerów, które różnią się już właściwościami.





Rys. 12. Techniki analityczne wykorzystywane do separacji enancjomerów [6].

- analityczne, ■ analityczne/preparatywne,
 — często używane, - - - - - rozwijające techniki.

2.1 Metody chromatograficzne

Metody chromatograficzne wykorzystywane do enancjoseparacji można podzielić na dwie kategorie [5,13]:

- **Metody bezpośrednie** - oparte są na tworzeniu tymczasowych diastereoizomerów w trakcie analizy na chiralnych fazach stacjonarnych (kolumny polisacharydowe, cyklodekstrynowe, proteinowe i inne) lub w fazie ruchomej poprzez dodanie do niej czynnika chiralnego (np. cyklodestryny, proteiny itp).
- **Metody pośrednie** - w których najpierw racemat jest przekształcany się w mieszaninę diastereoizomerów za pomocą chiralnego czynnika pomocniczego, a następnie rozdzielany na kolumnach achiralnych lub chiralnych.

Metody chromatograficzne często mają przewagę nad syntezą stereospecyficzną w początkowej fazie badań jeszcze w skali laboratoryjnej. Dużą zaletą tej metody jest

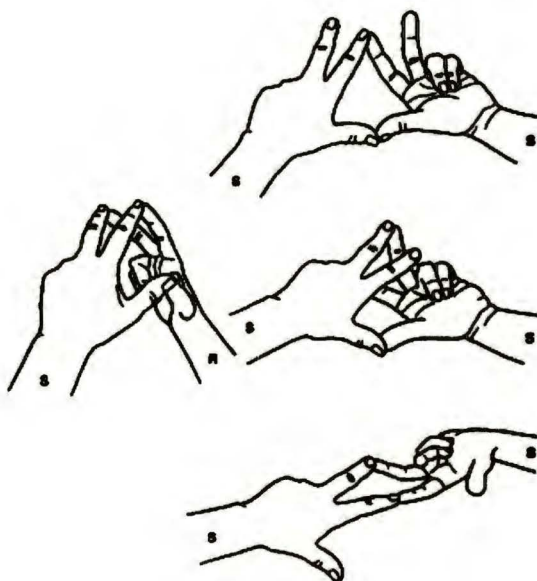
to, iż dostarcza ona oba enancjomery o wysokim stopniu czystości optycznej. Jest to szczególnie ważne w badaniach biomedycznych jak również w przemyśle farmaceutycznym, gdyż do badań wstępnych oba enancjomery są niezbędne. Ponadto skraca to czas i koszty otrzymywania optycznie czystych związków. Najczęściej stosuje się wtedy metody bezpośrednio z wykorzystaniem chiralnych faz stacjonarnych. Zastosowanie chiralnych selektorów w fazie ruchomej napotyka na dodatkowe trudności w odzyskiwaniu selektora po rozdzieleniu enancjomerów, co zwiększa znacznie koszty analizy. Ponadto metody chromatograficzne wykorzystywane są w badaniach wstępnych do uzyskiwania wzorców zanim jeszcze zostanie opracowana synteza stereospecyficzna. Umożliwia to opracowanie analitycznej metody kontrolowania czystości enancjomerycznej substratów oraz powstałych półproduktów i produktów [6,14,15].

2.2 Mechanizmy rozdzielania enancjomerów w chromatografii cieczowej

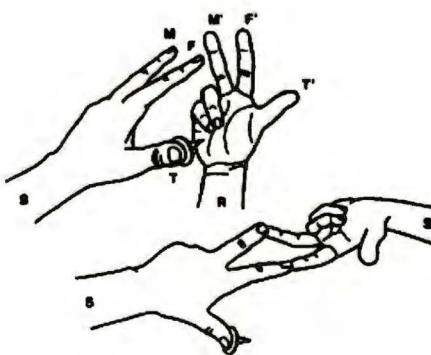
Poszukiwanie mechanizmów odpowiedzialnych za chiralne rozróżnienie jest bardzo ważne nie tylko w celu lepszego zaplanowania eksperymentu, ale również w projektowaniu nowych, chiralnych selektorów. Rozdzielenie enancjomerów za pomocą chromatografii jest możliwe dzięki tworzeniu się odwracalnych diastereomerów między enancjomerami a chiralnym selektorem. Mechanizm rozdzielania enancjomerów oparty na trójpunktowym modelu oddziaływań po raz pierwszy został opisany w 1933r. przez Eassona i Stedmana w celu wyjaśnienia różnic w farmakologicznym oddziaływaniu stereochemicznych leków z chiralnymi receptorami biologicznymi [16]. Później model ten został wykorzystany przez Ogstona w 1948r. do wyjaśnienia chiralnych reakcji enzymatycznych [17]. W 1952r. został zaadaptowany przez Dalgliesha w chromatografii cienkowarstwowej (TLC) do opisu rozdzielania aromatycznych aminokwasów na celulozie [18].

Model trójpunktowego oddziaływania pomiędzy enancjomerami a chiralnym selektorem (zobrazowany za pomocą rąk w pracy Meyer i Rais (Rys. 13 i 14) [19]) oparty jest na następujących założeniach: aby nastąpiło chiralne rozróżnienie wymagane są przynajmniej trzy oddziaływania przyciągające (Rys. 13) lub dwa przyciągające i jedno odpychające (Rys. 14) pomiędzy chiralnym selektorem i jednym z

enancjomerów. Co najmniej jedno z tych oddziaływań musi również zależeć od stereochemii centrum chiralnego zarówno enancjomeru jak i chiralnego selektora [5,19]. Enancjomer, który z chiralnym selektorem wiąże się trójpunktowo tworzy bardziej trwały diastereoizomer, czyli silniej oddziałuje z fazą stacjonarną i jest wymywany jako drugi.



Rys. 13. Trójpunktowe oddziaływania przyciągające pomiędzy selektorem S (lewa ręka) i enancjomerem R (prawa ręka). Oddziaływania selektora S (lewa ręka) z enancjomerem S (lewa ręka) prowadzą tylko do dwupunktowych oddziaływań [19].



Rys. 14. Trójpunktowe oddziaływania dwa przyciągające: MM' i FF' i jedno odpychające TT' pomiędzy selektorem S (lewa ręka) i enancjomerem R (prawa ręka). Oddziaływania selektora S (lewa ręka) z enancjomerem S (lewa ręka) prowadzące tylko do dwupunktowych oddziaływań [19].

Trójpunktowy mechanizm rozdzielania znalazł szerokie zastosowanie do opisu rozróżnienia chiralnego na tzw. fazach Pirkle'a. Pierwsze fazy tego typu to 3,5-dinitrobenzoilofenyloglicyna lub 3,5-dinitrobenzoiloleucyna powleczone na żelu krzemionkowym. Natomiast wiele selektorów szczególnie pochodzenia naturalnego jest dużo bardziej skomplikowanych i mechanizmy odpowiedzialne za chiralne rozróżnienie nie są dotąd całkowicie poznane. Dodatkową trudność stanowi fakt, że wpływ czynników achiralnych jest również nie bez znaczenia, o czym będzie mowa w rozdziale 3. Dlatego też powszechnie akceptowany mechanizm trójpunktowego rozdzielania zaczął być przez niektórych kwestionowany. Mesecar i Koshland wyjaśniają zdolności proteiny do rozróżnienia L i D izomerów izocytrynianu czteropunktowym modelem oddziaływania [20]. Natomiast Davankov [21] oraz Booth i inni [22] twierdzą, iż w przypadku dużych selektorów takich jak biopolimery (np. polisacharydy czy proteiny), kiedy chiralna powierzchnia (wnęka, rowek, kieszeń) oddziaływania jest duża o rozróżnieniu chiralnym często decyduje steryczne dopasowanie selektora z enancjomerem. Nie jest wtedy możliwe wyszczególnienie trzech wyraźnie aktywnych punktów lub grup funkcyjnych na oddziałującej powierzchni, z reguły jest ich więcej niż trzy. W takich przypadkach Booth i inni [22] zaproponowali ogólny model chiralnego oddziaływania oparty na czterech krokach:

1. Formowanie kompleksu pomiędzy selektorem i selektandem.
2. Wzajemnie przemieszczenie się selektora i selektanda w celu zoptymalizowania oddziaływań (konformacyjne dostosowanie się).
3. Formowanie się dodatkowych wiążących oddziaływań (aktywacja kompleksu).
4. W wyniku, czego następuje chiralne rozróżnienie.

2.3 Chiralne fazy stacjonarne

Chiralne fazy stacjonarne zbudowane są z chiralnego selektora związanego lub obsadzonego na nośniku stałym. Chiralne selektory posiadają specyficzną strukturę przestrzenną zbudowaną z rowków, wnęk, wgłębień itp., z którą enancjomery mogą oddziaływać stereospecyficznie. Oddziaływania te są stabilizowane za pomocą wiązań wodorowych, oddziaływań π - π , oddziaływań dipol-dipol, oddziaływań elektrostatycznych, van der Waalsa, sił dyspersyjnych itp. [23,24]. W Tabeli 3

przedstawiono charakterystykę wiązań. W zależności od selektora wpływ poszczególnych wiązań może być różny.

Tabela 3. Charakterystyka oddziaływań molekularnych [24].

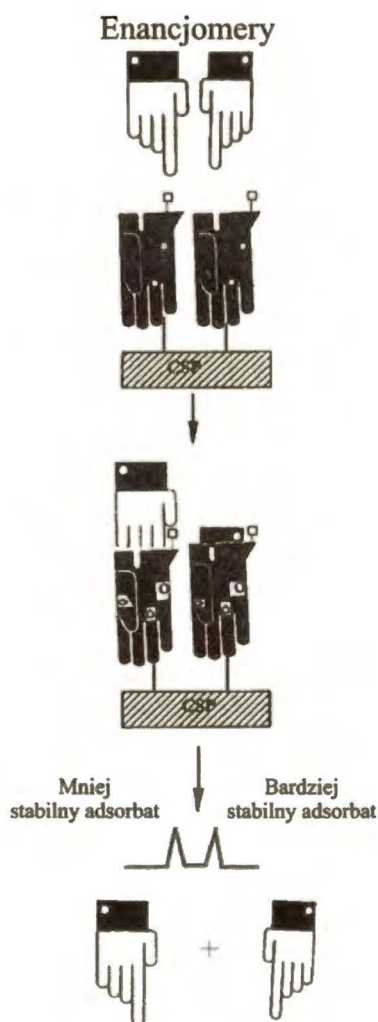
Typ oddziaływań	Siła	Kierunek	Zasięg (d)
Kulombowskie lub elektrostatyczne	Bardzo silne	Przyciągające lub odpychające	Średni ($1/d^2$)
Wiązanie wodorowe	Bardzo silne	Przyciągające	Długi
Zawada steryczna	Bardzo silne	Odpychające	Bardzo krótki
π - π	Silne	Przyciągające (donor lub akceptor) lub odpychające	Średni
Jon-dipol	Silne	Przyciągające	Krótki
Dipol-dipol	Średnie	Przyciągające	Krótki ($1/d^3$)
Dipol-indukowany dipol	Słabe	Przyciągające	Bardzo krótki ($1/d^6$)
Oddziaływania dyspersyjne	Bardzo słabe	Przyciągające	Bardzo krótki ($1/d^6$)

Pierwsza komercyjnie dostępna chiralna faza stacjonarna (CSP) dla HPLC została wprowadzona przez Pirkla w 1981r [25]. Obecnie istnieje ponad 200 komercyjnie dostępnych kolumn. Ze względu na budowę i zasadę działania fazy stacjonarne możemy podzielić na kilka grup. Weiner zaproponował podział faz stacjonarnych w zależności od sposobu tworzenia kompleksów pomiędzy chromatografowaną substancją a fazą stacjonarną [26]:

- Typ I: kompleksy substancja rozpuszczona-CSP tworzone są poprzez kombinacje oddziaływań takich jak wiązania wodorowe, oddziaływania π - π i zawada steryczna. Do tej grupy należą fazy Pirkle'a.
- Typ II: mechanizm rozdzielania enancjomerów oparty jest na formułowaniu wiązań wodorowych, oddziaływań π - π , oddziaływań dipol-dipol jak również tworzeniu kompleksów inkluzyjnych. Do tej grupy zaliczamy fazy polisacharydowe (pochodne amylozy i celulozy).

- Typ III: selektory posiadające chiralne wnęki, dzięki czemu główny mechanizm rozdzielania związków polega na tworzeniu kompleksów inkluzyjnych. Zaliczamy do nich cyklodekstryny, glikopeptydy, chiralne etery koronowe.
- Typ IV: fazy tworzące połączenia kompleksowe na zasadzie wymiany ligandów.
- Typ V: mechanizm chiralnego rozróżniania oparty na kombinacji oddziaływań hydrofobowych i polarnych. Do tej grupy należą fazy proteinowe.

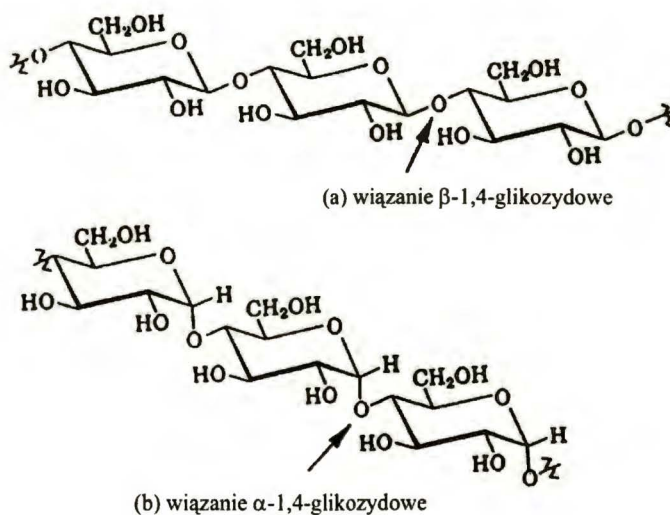
Przykładowy schemat rozdzielania racematu na fazach stacjonarnych przedstawiony jest na Rys. 15 [23]. Chiralne fazy stacjonarne wykorzystywane w niniejszej pracy zostały szerzej omówione w następnych punktach.



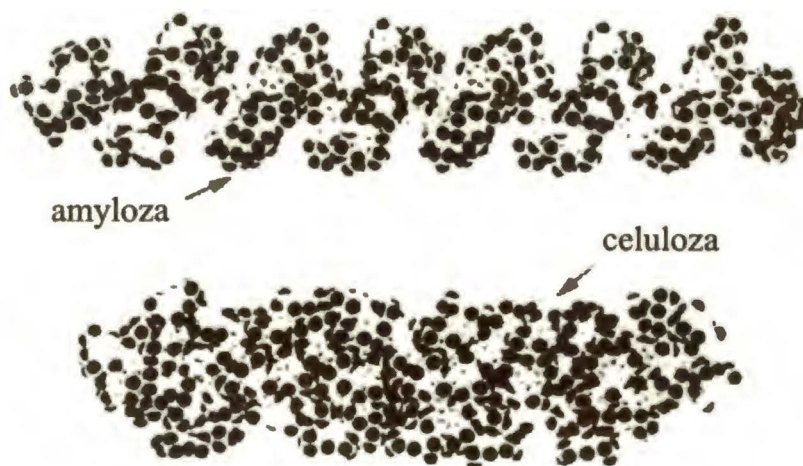
Rys. 15. Schemat mechanizmu rozdzielania racematu na chiralnych fazach stacjonarnych [23].

2.3.1 Polisacharydowe fazy stacjonarne

Polisacharydy są to naturalnie występujące polimery, które dzięki swojej asymetrycznej strukturze wykorzystywane są jako chiralne selektory. Do najważniejszych z nich należą celuloza i amyloza. Zbudowane są one z jednostek D-glukozy połączonych w długie nierozgałęzione łańcuchy wiązaniami 1,4-glikozydowymi o konfiguracji α w przypadku amylozy i o konfiguracji β w przypadku celulozy (Rys. 16) [27,28]. Ponadto amyloza tworzy strukturę heliakalną z dobrze zdefiniowanymi rowkami (grooves), a celuloza posiada strukturę bardziej płaską i sztywną (Rys. 17).



Rys. 16. Chemiczna struktura (a) celulozy i (b) amylozy [29].



Rys. 17. Trójwymiarowa struktura (a) amylozy i (b) celulozy [29].

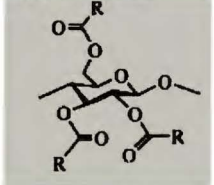

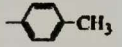
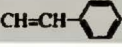
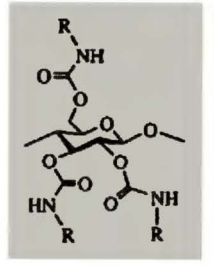

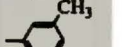
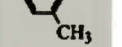
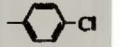
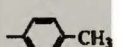
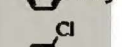
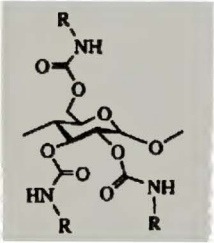

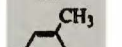
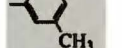
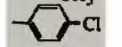

Jednakże naturalne polisacharydy nie są wykorzystywane jako komercyjne chiralne fazy stacjonarne z powodu ich niskiej enancjoselektywności i problemów z mechaniczną obróbką (nieodporne na ściskanie). W celu zwiększenia właściwości rozdzielczych polisacharydów grupy hydroksylowe zostały zastąpione różnymi podstawnikami [30,31]. Pierwsza użyteczna pochodna celulozy - triacetylceluloza została opisana przez Heese i Hagel w 1973r. [32]. Inne popularne pochodne to benzoesany oraz fenylokarbamiany celulozy i amylozy. Kolejnym krokiem było obsadzenie pochodnych polisacharydów na krzemionce makroporowatej, co po raz pierwszy zostało wykonane przez grupę profesora Okamoto w 1984r. [33]. Dzięki temu fazy Okamoto charakteryzują się większą stabilnością i efektywnością. Powstałe w ten sposób fazy zostały skomercjonalizowane przez firmę Daicel pod nazwami Chiralcel i Chiralpak odpowiednio dla pochodnych celulozy i amylozy. Natomiast w celu zwiększenia trwałości na organiczne rozpuszczalniki, a także możliwości zastosowania szerszego zakresu rozpuszczalników opracowano nową technologię unieruchomiania (immobilization) na silikażelu. Jednakże proces ten może powodować zmianę w strukturze polisacharydów i fazy te mogą różnić się selektywnością w stosunku do ich obsadzonych na silikażelu odpowiedników [34,35]. Fazy polisacharydowe zostały zaprojektowane do zastosowania ich w układzie faz normalnych. Okazało się, że równie efektywne rozdzielania można na nich uzyskać w układzie faz odwróconych. Kolumny do faz odwróconych oznaczone są literą R na końcu nazwy. Pojawiły się również badania wykorzystujące polarną fazę organiczną do rozdzielania związków na fazach polisacharydowych [36-38]. Wybrane fazy stacjonarne pochodnych polisacharydów zostały przedstawione w Tabeli 4.

Komercyjne fazy polisacharydowe mają szeroki zakres zastosowań. Wykorzystywane są do rozdzielania alifatycznych i aromatycznych związków, ketonów, amin i ich pochodnych, alkoholi i ich pochodnych, eterów, alkaloidów, β -blokerów i wielu innych [29,39,40].

Jednymi z najbardziej popularnych i wszechstronnych faz są karbaminiany tri (3,5-dimetylofenylowe) celulozy i amylozy: powleczone na silikażelu Chiralcel OD i Chiralpak AD oraz ich unieruchomione odpowiedniki - Chiralcel IB i Chiralpak IA. Niektóre enancjomery na kolumnie Chiralcel OD eluują w odwróconej kolejności w porównaniu do kolumny Chiralpak AD, bądź rozdzielają się tylko na jednej z nich, co może sugerować, że są to wzajemnie uzupełniające się chiralne selektory [30,41]. W

przypadku kolumn Chiralpak AD i Chiralpak IA, które różnią się sposobem osadzenia na silikażelu (powleczona, unieruchomiona) również zauważono wzajemnie uzupełniające się właściwości [35,42,43]. Okamoto i Kaida [44] przebadali 510 racematów na kolumnie Chiralcel OD i Chiralpak AD. Z ich badań wynika, iż 186 racematów rozdziela się tylko na kolumnie Chiralcel OD i 85 tylko na kolumnie Chiralpak AD oraz 129 związków na obu kolumnach. Tak więc 400 racematów, co stanowi 78% badanych związków rozdziela się na przynajmniej jednej z tych dwóch kolumn.

Tabela 4. Wybrane fazy stacjonarne pochodnych polisacharydów.

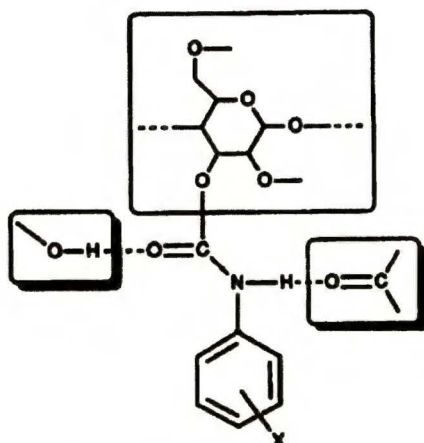
Pochodne polisacharydów	R=	Nazwa komercyjna
 <p>Estry celulozy</p>	-CH ₃	Chiralcel OA
		Chiralcel OB
		Chiralcel OJ
		Chiralcel OK
 <p>Karbaminiany celulozy</p>		Chiralcel OC
		Chiralcel OD
		Chiralcel OF
		Chiralcel OG
		-
		-
 <p>Karbaminiany amylozy</p>		-
		Chiralpak AD
		-
		Chiralpak AS
		-

Mechanizm rozdzielania enancjomerów na mikrokrystalicznej triacetylocelulozie (CTA-I) został zaproponowany przez Hesse i Hagel [45]. Według autorów enancjomery mogą być inkludowane w chiralnych rowkach fazy stacjonarnej. Rozróżnienie chiralne zależy od dopasowania kształtów molekuly do wnęk fazy stacjonarnej. Mechanizm ten został również później potwierdzony przez Francotte i inni [46].

Generalnie przyjmuje się, że na fazach powleczonych na silikażelu będących estrowymi pochodnymi celulozy głównymi miejscami adsorpcji są polarne grupy karbonylowe estru, które oddziałują ze związkami rozdzielanymi przez wiązania wodorowe oraz oddziaływania dipol-dipol, a w przypadku pochodnych benzoesanu mogą również występować oddziaływania π - π [30,39,44]. Wainer i inni [47,48] opierając się na eksperymentach nad grupą aromatycznych amidów i alkoholi na kolumnie Chiralcel OB zaproponowali kolejny mechanizm. Autorzy twierdzą, iż najpierw tworzą się diastereomeryczne kompleksy między enancjomerami a fazą stacjonarną dzięki oddziaływaniom przyciągającym (takim jak wiązania wodorowe, oddziaływania dipol-dipol, oddziaływania π - π). Później następuje stabilizacja kompleksów poprzez dopasowanie asymetrycznych części enancjomerów do chiralnych wnęk, otworów fazy stacjonarnej. W wyniku różnic w sterycznym dopasowaniu enancjomerów do chiralnych wnęk następuje chiralne rozróżnienie.

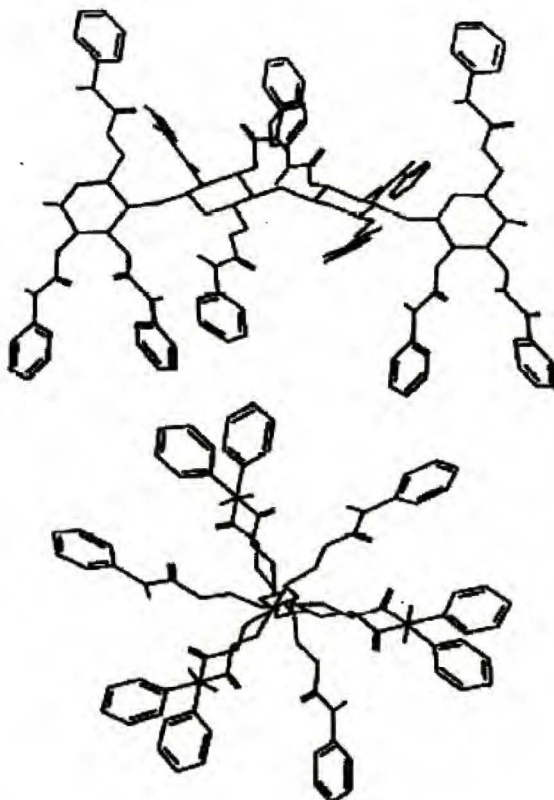
Na fazach stacjonarnych zbudowanych z fenylokarbaminianowych pochodnych celulozy i amylozy przyjmuje się, że główne miejsca adsorpcji znajdują się na polarnych grupach karbaminianowych. Grupy te mogą oddziaływać z enancjomerami tworząc wiązania wodorowe poprzez grupy -NH- i $>C=O$ (Rys. 18) oraz oddziaływania dipol-dipol z grupą $>C=O$. Mogą również występować oddziaływania π - π pomiędzy fenyłowymi pierścieniami związków racemicznych i fazy stacjonarnej [23,29,31,39,44,49-51]. Ponadto podstawniki na grupie fenylovej pochodnych celulozy i amylozy mogą wpływać na polarność grupy karbaminianowej a przez to zmieniać jej właściwości rozdzielcze [30,31,50]. Fazy stacjonarne z podstawnikami elektrodonorowymi (np. grupy alkilowe) lub podstawnikami elektonoakceptorowymi (np. grupy halogenowe) zwykle wykazują większe zdolności rozdzielcze w porównaniu do faz z niepodstawionym pierścieniem fenylowym. Jednakże wprowadzenie polarnych podstawników takich jak CH_3O , NO_2 powodowało, iż reagowały one z polarnymi racematami, co wpływało na obniżenie zdolności rozdzielczych fazy stacjonarnej [44].

Istotna jest też liczba i rozłożenie podstawników. W przypadku grup metylowych i chlorowych najlepsze właściwości rozdzielcze uzyskano, gdy podstawniki znajdowały się w położeniu *meta* i/lub *para*. [30,31,41,49,50]. Przykładem takich kolumn są Chiralcel OD i Chiralpak AD.



Rys. 18. Schematyczne oddziaływanie racematu z resztą karbaminianową [44].

W celu lepszego zrozumienia mechanizmów rozróżnienia chiralnego na fazach polisacharydowych zostały wykonane badania struktur karbaminianu trifenyłowego celulozy i amylozy. Wykazały one, iż pochodna celulozy posiada konformację lewoskrętnej helisy potrójnej (3/2), a reszty glukozy są regularnie rozłożone wzdłuż osi helisy. Chiralne kanały z polarnymi resztami karbaminianowymi rozlokowane są równoległe wzdłuż głównego łańcucha. Przy czym grupy karbaminianowe leżą w środku, a hydrofobowe grupy aromatyczne na zewnątrz łańcucha polimerowego (Rys. 19) [30,44]. Tak więc polarne grupy enancjomerów muszą wnikać w chiralne kanały fazy stacjonarnej, aby w ten sposób poprzez wiązanie wodorowe łączyć się z grupą karbaminianową. Takie oddziaływania wydają się istotne w rozróżnieniu chiralnym szczególnie w układzie faz normalnych. Natomiast struktura karbaminianu trifenyłowego amylozy ma konformację lewoskrętnej helisy poczwórnej (4/1). Różnice w enancjoselektywności pochodnych amylozy i celulozy tłumaczy się ich różnicą w konformacji helisy [44].

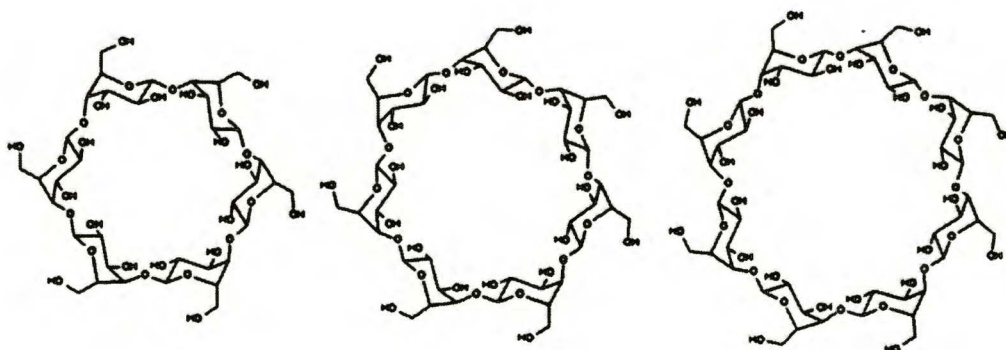


Rys. 19. Struktura karbaminianu trifenyłowego celulozy; na górze - wzdłuż osi łańcucha, na dole - prostopadle do osi łańcucha [44].

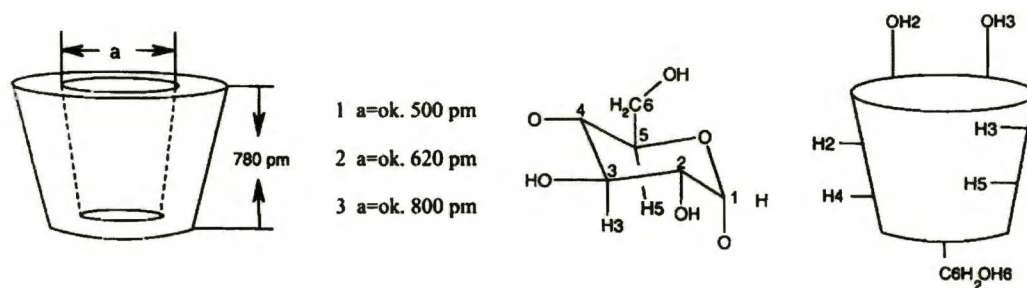
Na podstawie badań nad grupą kwasów α -alkiloarylokarboksylowych Booth i Wainer zaproponowali mechanizm chiralnego rozróżnienia na kolumnie Chiralpak AD [52]. Autorzy wyróżniają kilka etapów. Najpierw wstępne formowanie się kompleksu analit - faza stacjonarna za pomocą wiązań wodorowych. Następnie wprowadzenie analitu do kanałów fazy stacjonarnej i konformacyjnie dopasowanie się ich do siebie nawzajem. Następuje stabilizacja kompleksu w wyniku tworzenia dodatkowych wiązań wodorowych wewnątrz kanałów fazy stacjonarnej. Oba enancjomery mogą tworzyć takie same wiązania z fazą stacjonarną jednakże w trakcie ich tworzenia ulegają zmianom konformacyjnym. Zmiany te zależą od chiralnej budowy fazy stacjonarnej, dlatego też jeden z enancjomerów musi wnosić większą ilość energii do tworzenia się kompleksu, przez co następuje różnica w ich stabilności i następuje rozróżnienie chiralne.

2.3.2 Cyklodekstrynowe fazy stacjonarne

Cyklodekstryny (CD) są to cykliczne oligosacharydy powstające w wyniku enzymatycznej degradacji skrobi. Najczęściej wykorzystywane cyklodekstryny składają się z sześciu (α -CD), siedmiu (β -CD), bądź ośmiu (γ -CD) jednostek D-glukozy połączonych wiązaniami α -1,4 glikozydowymi (Rys. 20) [23,29,51,53-56]. Zazwyczaj schematycznie uśredniona struktura cyklodekstryny przedstawiana jest za pomocą ściętego stożka z wnęką (Rys. 21). We wnęce CD znajdują się atomy H3 i H5 oraz niezwiązane elektrony z tlenów glikozydowych leżących w jej płaszczyźnie, co nadaje im charakter hydrofobowy. Natomiast grupy hydroksylowe znajdujące się na brzegach cyklodekstryny powodują, iż jej powierzchnia wykazuje charakter hydrofilowy [55,56]. Pierwszorzędowe grupy hydroksylowe (w pozycji C-6) leżące wokół węższego brzegu mogą swobodnie się obracać i częściowo blokować wnękę CD. Natomiast drugorzędowe grupy hydroksylowe (w pozycji C-2 i C-3) zlokalizowane są wokół szerszego brzegu stożka cyklodekstryny. Należy pamiętać, iż struktura cyklodekstryny nie jest sztywna. Za elastyczność CD odpowiedzialne są glikozydowe mostki C1OC4 znajdujące się pomiędzy sztywnymi jednostkami glukopiranozowymi [56]. Ta elastyczność cyklodekstryny a także jej hydrofobowo-hydrofilowy charakter umożliwia jej tworzenie kompleksów inkluzyjnych typu „gospodarz - gość”, co ma zastosowanie w rozróżnieniu enancjomerów.



Rys. 20. Wzory kolejno α -, β -, γ - cyklodekstryny.

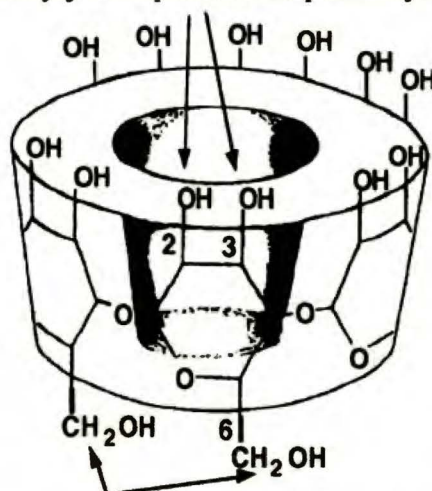


Rys. 21. Schematyczny wygląd pierścienia glukopiranozowego z numeracją atomów, rozmiary niepodstawiomych cyklodekstryn i średniej orientacji najważniejszych atomów i grup OH [55].

Cyklodekstryny wykorzystywane są jako chiralne selektory zarówno w postaci dodatku do fazy ruchomej jak również jako fazy stacjonarne. Zastosowaniem CD jako chiralnego dodatku do fazy ruchomej na achiralnej fazie stacjonarnej w układzie faz odwróconych zajmowała się grupa prof. Sybilskiej [57,58]. Późniejsze prace z cyklodekstrynami i ich pochodnymi wykazały, iż mogą się również obsadzać na achiralnej kolumnie (np. RP-18) tworząc fazę pseudostacjonarną [59,60]. W pracy Pawłowskiej i Lipkowskiego [61] przedstawiono również wykorzystanie cyklodekstryn w chromatografii podziałowej do generowania fazy stacjonarnej przez eluent.

Pierwsza stabilna chiralna faza stacjonarna zawierająca β -CD przyłączoną chemicznie do silikażelu została wykonana przez Armstronga i De Mond w 1984r. [62]. Następnie faza ta została skomercjalizowana przez firmę Advances Separation Technologies (Astec). Obecnie dostępne są fazy z α , β , γ cyklodekstryną nazwane kolejno Cyclobond III, Cyclobond I, Cyclobond II. W celu zwiększenia właściwości rozdzielczych cyklodekstryn, a także możliwości zastosowania szerszego rodzaju rozpuszczalników grupy hydroksylowe na brzegu cyklodekstryny w pozycjach 2, 3 zostały zastąpione różnymi podstawnikami. W pierwszej kolejności wykorzystuje się grupę w pozycji 2, gdyż jest bardziej reaktywna. Następnie jedna bądź dwie grupy hydroksylowe w pozycji 6 wykorzystywane są do przyłączenia cyklodekstryny do silikażelu (Rys. 22) [53]. Zwykle nie podstawia się wszystkich grup hydroksylowych z powodu zawady sterycznej podstawników, co może powodować osłabienie separacji enancjomerów [63].

Pozycje 2 i 3 podstawiane pochodnymi



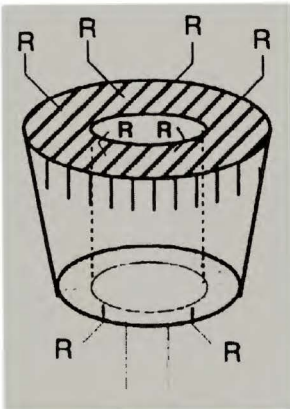
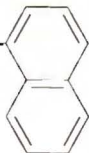
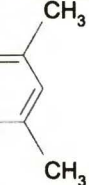
Pozycje 6 używane do przyłączenia CD do silikażelu

Rys. 22. Miejsca wiążące na cyklodekstrynie [53].

Komercyjnie dostępne kolumny cyklodekstrynowe stały się kolejną grupą jednych z najbardziej popularnych chiralnych faz stacjonarnych. Można je podzielić na trzy grupy: niepodstawione cyklodekstryny, podstawione cyklodekstryny i aromatycznie podstawione cyklodekstryny [40]. Pochodne CD zwykle oparte są na β -CD, gdyż wykazuje ona enancjoselektywność dla dużej grupy związków. Wybrane fazy stacjonarne zostały przedstawione w Tabeli 5. Fazy cyklodekstrynowe wykorzystywane są do rozdzielania wielu klas związków takich jak β -blokery, barbiturany, aminokwasy, alkohole, alkany, amidy, etery koronowe, flawony i wiele innych [29,40,53,64].

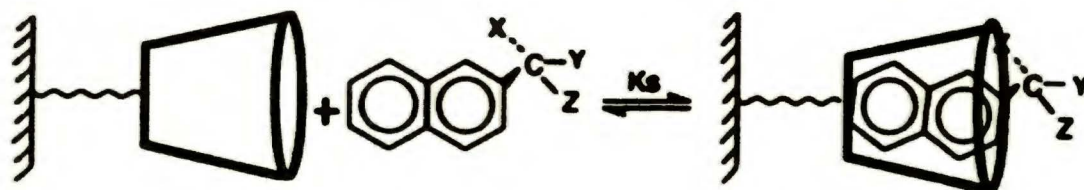
Początkowo wykorzystywano cyklodekstryny tylko w fazach odwróconych, później również w polarnych fazach organicznych i fazach normalnych. Niektóre kolumny nazywane „multi-mode” chiralnymi selektorami można stosować we wszystkich trzech układach faz ruchomych. Przykładem takiej kolumny jest Cyclobond I DMP (karbaminian 3, 5 - dimetylofenylowy β -cyklodekstryny) [34,63-65]. Zmiana układu faz ruchomych np. z faz normalnych na fazy odwrócone może wpływać na zmianę mechanizmu retencji i enancjoseparacji analizowanych związków. Efekt ten jest tłumaczony przez reorganizację oddziaływań w zależności od użytego eluentu.

Tabela 5. Wybrane fazy stacjonarne pochodnych β -cyklodekstryny.

Pochodna β -CD	R=	Nazwa komercyjna
 <p>Silikażel</p>	—OCH_3	Cyclobond I DM
	—COCH_3	Cyclobond I AC
	$\text{—CH}_2\underset{\star}{\text{CH}}(\text{OH})\text{CH}_3$	Cyclobond I SP lub Cyclobond I RSP
	$\text{—CONH}\underset{\star}{\text{CH}}(\text{CH}_3)$ 	Cyclobond I RN lub Cyclobond I SN
	—CONH 	Cyclobond I DMP

W układzie faz odwróconych przyjmuje się, że główny mechanizm retencji i enancjoseparacji polega na tworzeniu kompleksów inkluzyjnych z cyklodekstryną typu „gospodarz - gość”. Niepolarne molekuly bądź ich fragmenty wnikają do hydrofobowej luki cyklodekstryny [34,40]. Zatem analizowany związek powinien posiadać przynajmniej jeden aromatyczny pierścień lub łańcuch węglowodorowy, który również może wnikać do wnęki CD (Rys. 23) [34,64]. Analizowane związki powinny być ściśle dopasowane do wielkości luki, dlatego też w zależności od ich wielkości stosuje się odpowiednią cyklodekstrynę. Enancjomery posiadające pierścienie fenyłowe, naftyłowe, bifenyłowe zwykle rozdzielane są na β -CD, mniejsze związki na α -CD, a anality posiadające w swojej strukturze od 3 do 5 pierścieni np. steroidy najlepiej rozdzielane są na γ -CD. Ponadto Armstrong w swoich pracach [66-68] podaje, iż dodatkowym czynnikiem poza sterycznym dopasowaniem się molekuly do wnęki cyklodekstryny jest oddziaływanie jej chiralnego centrum bądź podstawnika na chiralnym centrum z grupami hydroksylowymi na brzegu cyklodekstryny. Powstałe wiązania wodorowe analitu z grupami hydroksylowymi CD są niezbędne do uzyskania rozróżnienia chiralnego. W przypadku pochodnych CD oprócz wiązań wodorowych

mogą również występować oddziaływania dipol-dipol, oddziaływania π - π , enancjomerów z podstawnikami u ujścia cyklodekstryny [40].

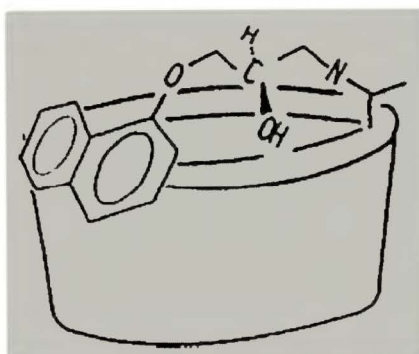


Rys. 23. Schematyczne przedstawienie kompleksu inkluzyjnego z cyklodekstryną [64].

W **układzie faz normalnych** tworzenie tradycyjnych kompleksów z cyklodekstryną jest utrudnione, ponieważ niepolarny rozpuszczalnik (heksan, heptan) zajmuje wnękę CD i nie może być łatwo wyparty przez analit [63,66,67,69]. W tym przypadku mechanizmy odpowiedzialne za retencję i chiralne rozróżnienie pochodzą od oddziaływań z polarną powierzchnią CD oraz oddziaływań z jej podstawnikami. Jednakże do rozróżnienia chiralnego w układzie faz normalnych najbardziej efektywne są fazy stacjonarne z aromatycznie podstawionymi cyklodekstrynami (np. Cyclobond I DMP, Cyclobond I RN lub SN) [40]. Analizowane związki mogą oddziaływać z fazą stacjonarną poprzez tworzenie wiązań wodorowych, oddziaływania dipol-dipol, oddziaływania π - π między aromatycznymi pierścieniami związków i fazy stacjonarnej [70,71]. Prace Armstronga i innych [70,72] pokazują, iż w tym układzie faz istotną częścią w strukturze analitu jest obecność aromatycznego pierścienia, a zatem oddziaływania π - π pomiędzy analizowanym związkiem a fazą stacjonarną odgrywają tu istotną rolę.

Polarne fazy organiczne są to fazy, które składają się z polarnych składników takich jak acetonitryl, metanol ale nie zawierają wody. Gubitz i Schmid uważają, iż organiczny solwent zajmuje wnękę cyklodekstryny, co uniemożliwia tworzenie kompleksów inkluzyjnych [40]. Mechanizm oddziaływania związków z fazą stacjonarną w tej fazie ruchomej jest powierzchniowy. Anality obejmują wejście do wnęki cyklodekstryny tworząc nad nią „wieczko” jak to przedstawiono na Rys. 24. [29,64,73,74]. Chiralne rozróżnienie związków następuje głównie poprzez

oddziaływania wodorowe z grupami hydroksylowymi bądź pochodnymi na brzegach CD, chociaż oddziaływania dipol-dipol i czynniki steryczne również mogą odgrywać istotną rolę. Związki rozdzielane w polarnych fazach organicznych powinny posiadać co najmniej dwie grupy tworzące wiązania wodorowe, przy czym jedna z nich musi być zlokalizowana na lub blisko centrum chiralnego. Korzystne jest również, jeśli analit posiada duży fragment cząsteczki taki jak grupy aromatyczne lub rozgałęziony łańcuch węglowodorowy znajdujący się blisko centrum chiralnego [34,64,74,75].



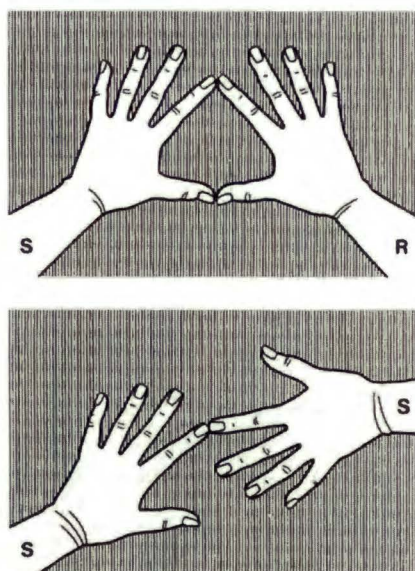
Rys. 24. Oddziaływanie między propranololem a β -CD z w polarnej fazie organicznej. Analit oddziałuje z grupami hydroksylowymi na wejściu do cyklodekstryny, podczas gdy polarny organiczny rozpuszczalnik zajmuje jej wnękę [40].

3. Wpływ achiralnego środowiska na rozróżnienie chiralne

Chiralne rozróżnienie jest wypadkową oddziaływań między enancjomerami a fazą ruchomą i fazą stacjonarną dobranymi tak, aby zachodziło oddziaływanie stereoselektywne. Jednakże nie jest proste stwierdzenie, które z oddziaływań stanowią kluczową rolę w tworzeniu chiralnych kompleksów pomiędzy analitem a selektorem. Ponadto zaobserwowano, iż achiralne środowisko ma również wpływ na rozróżnienie chiralne.

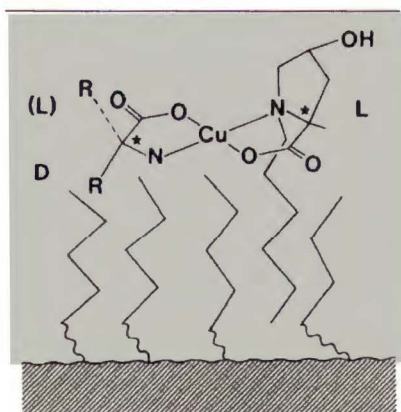
Pierwsze informacje na ten temat pojawiły się w pracach Davankov`a i współautorów dotyczących chromatografii wymiany ligandu. Zauważono, że achiralne składniki fazy stacjonarnej bądź ruchomej mogą brać udział w chiralnym rozróżnieniu poprzez udział w formowaniu diastereomerycznych kompleksów między enancjomerem a selektorem lub przez oddziaływanie z jednym z diastereoizomerów stabilizując je w ten sposób w różnym stopniu [76-79]. Autorzy sugerują, iż do rozróżnienia chiralnego wystarczą dwa oddziaływania enancjomeru z chiralnym selektorem i jedno z achiralnym czynnikiem. Jednakże warunkiem jest, aby trzecie oddziaływanie achiralnego czynnika było równoczesne dla enancjomeru i selektora. Obrazowo zostało to przedstawione używając prawej (R) i lewej ręki (S), jako prostego modelu chiralnych obiektów. Lewa ręka jednej osoby przedstawia chiralny selektor natomiast obie ręce drugiej osoby symbolizują dwa enancjomery. Oddziaływania przyciągające zachodzą, jeśli dwa palce tego samego rodzaju dotykają się [77]. Wyróżniono następujące przypadki:

Pierwszy, w którym **powierzchnia achiralna** pośredniczy w rozróżnieniu chiralnym. Zarówno chiralny selektor jak i rozdzielane enancjomery adsorbują się na sztywnej powierzchni achiralnego adsorbentu. Taka sytuacja przedstawiona jest za pomocą rąk leżących na stole, gdzie wewnętrzna strona dłoni jest przyciągana przez powierzchnię lub zewnętrzna odpychana przez otoczenie. Dzięki temu dwupunktowe oddziaływanie jest wystarczające, aby nastąpiło chiralne rozróżnienie (Rys. 25). W tym przypadku tylko lewa i prawa ręka mogą dotykać się dwoma palcami tworząc kompleksy RS. Natomiast utworzenie kompleksów RR i SS za pomocą więcej niż jednego punktu jest niemożliwe, dlatego też są one mniej stabilne niż kompleksy RS [77].



Rys. 25. Dwa punkty oddziaływań wystarczające do chiralnego rozróżnienia w przypadku dłoni leżących na powierzchni [77].

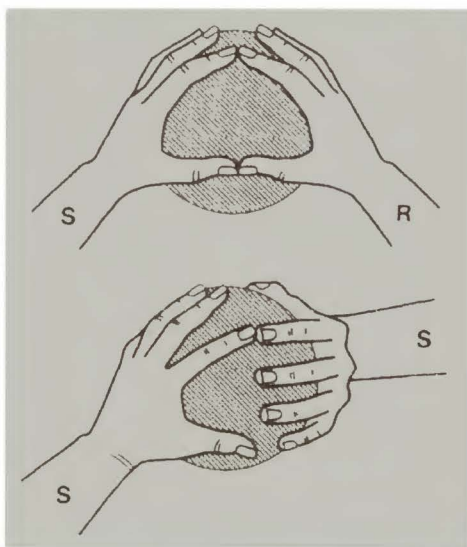
Takie oddziaływania są dobrze widoczne szczególnie w odwróconym układzie faz w roztworach wodnych, gdzie czynnik chiralny jest dodawany do fazy ruchomej. Przykład takiej sytuacji jest przedstawiony na Rys. 26.



Rys. 26. Chiralne rozróżnienie indukowane przez achiralną powierzchnię [77].

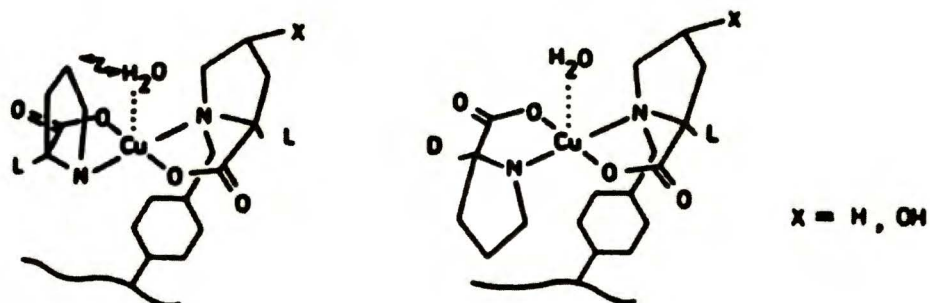
Występują tu hydrofobowe oddziaływania pomiędzy achiralną fazą stacjonarną C-18 a węglowodorowymi grupami utworzonego diastereoizomeru. D-aminokwas jest silniej zatrzymywany dzięki dodatkowemu oddziaływaniu grupy R z fazą stacjonarną. Występuje tu trzypunktowe oddziaływanie, przy czym dwa przyciągające oddziaływania między enancjomerem a jonem miedzi chiralnego selektora oraz trzecie oddziaływanie z achiralną fazą stacjonarną [76,77].

W drugim przypadku **molekuły achiralne** uczestniczą w rozróżnieniu chiralnym. Zobrazowane jest to za pomocą rąk trzymających piłkę, której rozmiar jest porównywalny lub mniejszy z rozmiarami dłoni. Piłka wypełnia tylko przestrzeń między nimi i utrzymując je na przeciwko siebie. Odpowiednia orientacja dłoni umożliwia dwupunktowe oddziaływanie wystarczające do chiralnego rozróżnienia (Rys. 27) [77].



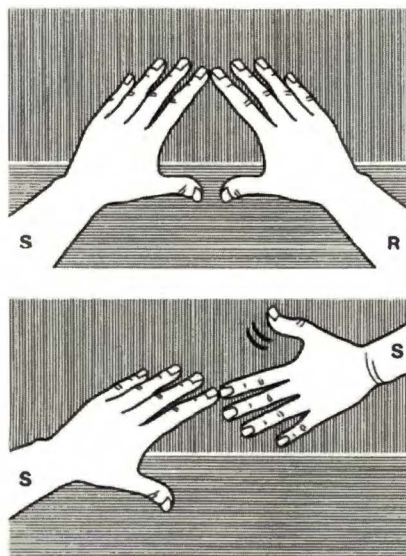
Rys. 27. Dwa punkty oddziaływań wystarczające do chiralnego rozróżnienia w przypadku dłoni trzymających piłkę [77].

Przykładem takiego oddziaływania jest molekula wody, która jest koordynowana w pozycji aksjalnej jonu miedzi (II) chiralnego selektora (Rys. 28). W ten sposób pośredniczy w sterycznych oddziaływaniach między enancjomerem (proliną) a chiralnym selektorem (L-proliną lub L-hydroksyproliną). W tym przypadku cząsteczka wody obniża stabilność L-L kompleksów, czyli zmniejsza retencję L-Pro [78].



Rys. 28. Chiralne rozróżnienie pośredniczone przez achiralną cząsteczkę [78].

Trzecia sytuacja pokazuje możliwość połączenia wpływu kilku achiralnych czynników pośredniczących w chiralnym rozróżnieniu. Przedstawione to zostało za pomocą dwóch dłoni leżących na skraju dwóch płaszczyzn o różnych właściwościach adsorpcyjnych (Rys. 29). Kompleks RS jest silniej adsorbowany niż kompleks SS. W takim układzie pomimo jednego punktu oddziaływania między dwoma chiralnymi cząsteczkami również zachodzi rozróżnienie chiralne [77].



Rys. 29. Jeden punkt oddziaływania wystarczający do rozróżnienia chiralnego w przypadku dłoni leżących na skraju dwóch powierzchni [77].

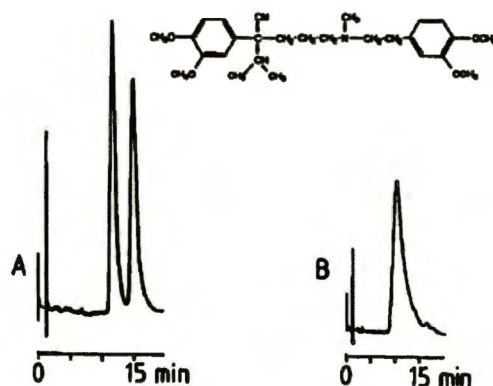
Taka sytuacja może występować w przypadku połączenia wpływu achiralnej powierzchni sorpcyjnej i molekuł solwenta na rozróżnienie chiralne [77].

3.1 Wpływ modyfikatorów organicznych na rozróżnienie chiralne

Organiczne modyfikatory wykorzystywane są w układach faz normalnych jak również w fazach odwróconych jako czynniki regulujące retencję badanych związków. Zwykle wykorzystuje się alkohole np. metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, ale również acetonitryl i inne. W trakcie badań przeprowadzonych na wielu różnych fazach stacjonarnych okazało się, iż mogą one wpływać nie tylko na retencję, ale i na enancjoseparację badanych związków.

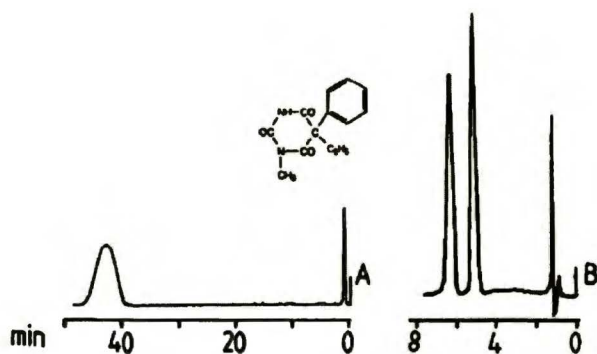
Badania wykonane na fazach Pirkla przez Ziefa i współautorów [80] oraz Peschera i współautorów [81] dotyczą wpływu alkoholi (etanol, 2-propanol, *tert*-butanol, *n*-butanol) w mieszaninie z heksanem na retencję i rozróżnienie chiralne badanych związków. Otrzymane wyniki pokazują, iż enancjoseparacja wzrasta wraz z wielkością (objętością) zastosowanych modyfikatorów. Dobrze jest to widoczne w pracy Ziefa i innych [80]. Współczynniki rozdzielenia 2,2,2-trifluoro-1-(9-antrylo)etanolu wrastają wraz z wielkością zastosowanego alkoholu i wynoszą $\alpha=1,33$ dla etanolu, $\alpha=1,56$ dla 2-propanolu, $\alpha=1,63$ dla *tert*-butanolu. Autorzy uważają, iż otrzymane różnice w rozróżnieniu chiralnym spowodowane są strukturą alkoholi, gdyż polarność fazy ruchomych były podobne. Tak więc enancjoselektywność układu wzrasta wraz z wzrastającą zawadą steryczną alkoholu [80,81].

Kolejną fazą, na której zaobserwowano silny wpływ dodatków achiralnych do fazy ruchomej w układzie faz odwróconych jest kolumna z kwaśną α -glikoproteiną (AGP). Hermansson [82] dzięki zamianie modyfikatora z 1-propanolu na acetonitryl uzyskał rozdzielanie enancjomerów werapamilu (Rys. 30). Natomiast dodanie 2-propanolu do fazy ruchomej umożliwiło enancjoseparację metylofenylobarbitалу (Rys. 31).



Rys. 30. Wpływ organicznego modyfikatora na enancjoseparację werapamilu [82]:

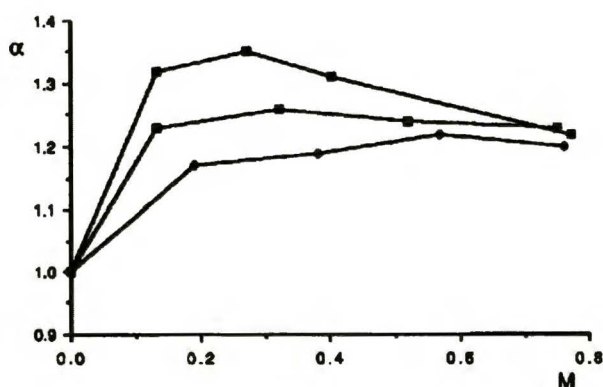
- (A) 10% acetonitrylu w 0,01 M buforze fosforowym, pH=7,0,
- (B) 4% 1-propanolu w 0,01 M buforze fosforanowym, pH=7,0.



Rys. 31. Rozdzielenie enancjomerów metylofenylobarbitalu przez dodanie 2-propanolu do fazy ruchomej [82]

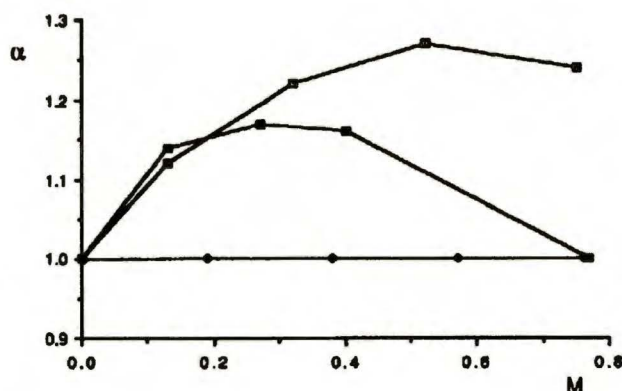
- (A) 0,01 M bufor fosforanowy, pH=7,0,
 (B) 2% 2-propanolu w 0,01 M buforze fosforanowym, pH=7,0.

W kolejnych pracach Enquist i Hermansson [83,84] zaobserwowali, że poza odpowiednim dobraniem modyfikatora fazy ruchomej ważne jest również jego stężenie. Zbyt duże stężenie modyfikatora może powodować zmniejszenie współczynnika rozdzielania (α) jak to przedstawiono dla mefenytoiny i metylofenylobarbitalu na Rys. 32 i Rys. 33. Badano również wpływ różnych alkoholi (metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-propanol, (R,S)-2-butanol, (S)-2-butanol) na rozdzielanie chiralne tych dwóch związków. Wyniki pokazują, że dodatek alkoholu z wyjątkiem metanolu wpływa na powstawanie enancjoseparacji badanych związków. Ponadto w przypadku metylofenylobarbitalu zauważono, iż współczynnik rozdzielania zwiększa się wraz ze wzrostem długości łańcucha alkoholu bądź dodatku alkoholu z łańcuchem rozgałęzionym.



Rys. 32. Wpływ zwiększenia stężenia modyfikatora w 0,01 M buforze fosforowym (pH=7,2) na współczynnik rozdzielania mefenytoiny:

- 1-propanol, □ 2-propanol, ◆ acetonitryl.



Rys. 33. Wpływ zwiększenia stężenia modyfikatora w 0,01 M buforze fosforowym (pH=7,2) na współczynnik rozdzielania metylofenylobarbitalu:

■ 1-propanol, □ 2-propanol, ◆ acetonitryl.

Hermansson J and Hermansson I. [85] badali wpływ pięciu modyfikatorów: metanolu, etanolu, 1-propanolu, 2-propanolu, acetonitrylu na retencję i enancjoseparację niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Stwierdzili, że organiczne modyfikatory poza tym, iż skracają czasy retencji mogą również nieznacznie wpływać na zwiększenie bądź zmniejszenie rozdzielania badanych związków w porównaniu do fazy bez dodatku modyfikatora. Ciekawy wynik otrzymano dla tiaprofenu, którego enancjomery rozdzielają się jedynie w fazie z dodatkiem 1-propanolu lub 2-propanolu. Przy czym stężenie 2-propanolu nie powinno być większe niż 2%.

Autorzy sugerują dwa wyjaśnienia omówionych wyżej przykładów: pierwsze, że modyfikatory mogą współzawodniczyć z badanymi enancjomerami poprzez oddziaływania z wiążącymi miejscami proteiny. Natomiast różna hydrofobowość i różne właściwości w tworzeniu wiązań wodorowych (akceptor, donor) organicznych modyfikatorów powodują, że w odmienny sposób wpływają one na enancjoselektywność. Drugie wyjaśnienie opiera się na tym, iż organiczne dodatki adsorbują się na proteinie indukując w ten sposób odwracalne zmiany w jej konformacji [82-85].

W celu potwierdzenia, iż organiczne modyfikatory fazy ruchomej w sposób odwracalny adsorbują się silnie na fazie AGP Enquist i Hermansson do bardziej szczegółowych badań wybrali 1-propanol i acetonitryl [83]. Modyfikatory te różnią się hydrofobowością i posiadają różne właściwości w tworzeniu wiązań wodorowych (1-propanol - akceptor i donor w tworzeniu wiązania wodorowego, acetonitryl - akceptor w tworzeniu wiązania wodorowego). Badania wykazały, że bardziej

hydrofobowy 1-propanol silniej adsorbuje się na kolumnie niż acetonitryl. Rozpuszczalniki te tworzą monowarstwę, gdy stężenia 1-propanolu jest 1,3 M (10% v/v) a acetonitrylu 2,8 M (15% v/v). Natomiast przy większych stężeniach powstaje wielowarstwa, która nie jest jednak przeszkodą do tego, aby nastąpiło rozróżnienie chiralne np. związki trimipramina i alprenolol rozdzielają się przy 7,61 M (40% v/v) stężeniu acetonitrylu w fazie ruchomej (współczynnik rozdzielania odpowiednio $\alpha=1,12$ i 1,25). Natomiast w celu sprawdzenia oddziaływania organicznego modyfikatora na konformację proteiny zmierzono widma dichroizmu kołowego dla AGP w buforze fosforanowym (pH=7) z i bez 2-propanolu. Widma w obu przypadkach były identyczne nawet, jeśli stężenie 2-propanolu zwiększono do 40%. Na tej podstawie wysnuto przypuszczenie, iż zmiany enancjoselektywności wywoływane przez modyfikatory organiczne wynikają głównie z ich współzawodniczenia w obsadzaniu miejsc aktywnych z enancjomerami. Jednakże autorzy podkreślają, że nie można zaniedbywać niewielkich zmian w konformacji proteiny, które powodują powstawanie nowych miejsc wiążących. Zmiany te mogą być istotne w przypadku oddziaływania pomiędzy małymi molekułami i białkiem, których nie można rozpoznać za pomocą metody dichroizmu kołowego [83].

Natomiast Gyimesi-Forras i inni [86,87] do pomiarów wpływu modyfikatorów na konformację białka wybrali acetonitryl i dioksan ze względu na różne właściwości oddziaływania z powierzchnią proteiny (acetonitryl jest słabym, natomiast dioksan silnym akceptorem wiązania wodorowego). Wyniki ich prac pokazują, że oba modyfikatory adsorbują się na powierzchni proteiny z tym, że acetonitryl silniej przy pH=7,2, a dioksan przy pH=4. Ponadto w pH=4 po nasyceniu miejsc wiążących ilość zaadsorbowanych cząsteczek obu modyfikatorów zwiększa się prawie dwukrotnie, co może wskazywać na tworzenie się drugiej warstwy organicznych rozpuszczalników na powierzchni AGP bądź następują zmiany w konformacji selektora umożliwiające oddziaływania z wcześniej niedostępnymi grupami wiążącymi. Zmierzone widma dichroizmu kołowego dla AGP w acetonitrylu o różnych stężeniach (0%, 10%, 15%, 20%) w pH=4 pokazują, iż ze wzrostem stężenia zmienia się intensywność i przesunięcie pasm odpowiadających fragmentom AGP, co wskazuje na stopniowe zmiany w jej strukturze. Radykalne zmiany występują przy zmianie stężenia acetonitrylu z 20% na 30% co już wyraźnie wskazuje na zmiany w drugorzędowej strukturze proteiny. Natomiast przy zmianie pH z 4 na 7,2 widma dichroizmu kołowego

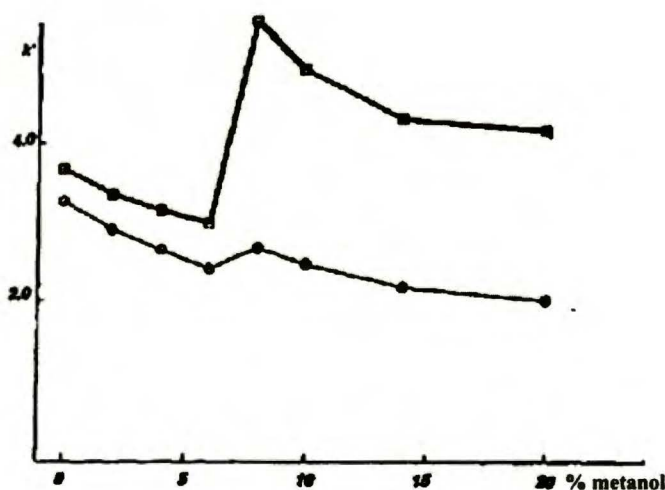
dla AGP w acetonitrylu w różnych stężeniach niewiele się różnią, nawet w przypadku zwiększenia jego stężenia do 30%. Świadczy to o tym, iż zachodzące niewielkie zmiany w mikrośrodkowisku białka zachodzące przy pH=7,2 nie prowadzą do większych zmian w jego strukturze [86]. Wykonano również badania zależności stałej wygaszania (K_{sv}) fluorescencji dla AGP w acetonitrylu przy różnych stężeniach (0%, 10%, 15%, 20%, 30%) w roztworze o pH=4 i pH=7. Jako hydrofobowego wygaszacza fluorescencji użyto trichloroetanolu, który określał stopień dostępności reszt tryptofanowych w AGP. W pH=7 nie zauważono znaczących zmian nawet w obecności 30% acetonitrylu, co wskazuje, iż nie zachodzą strukturalne zmiany w mikrośrodkowisku reszt tryptofanowych. Może to być spowodowane tym, iż fluorofory nie są zlokalizowane w hydrofobowej części molekuly lub są one niedostępne dla wygaszacza. W tym wypadku reszty tryptofanu są prawdopodobnie utrzymywane wewnątrz proteiny za pomocą silnych oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych stabilizujących jej konformację. W pH=4 dodatek acetonitrylu wyraźnie zwiększył wartość stałej wygaszania (K_{sv}), co wskazuje na zwiększenie dostępności reszt tryptofanu dla wygaszacza. Wyniki te sugerują, iż zmiana konformacji AGP indukowana jest przez organiczny modyfikator – acetonitryl [87]. Znaczyłyby to, iż w przypadku tej fazy zmiany konformacji wywołwane przez organiczny modyfikator oraz pH fazy ruchomej wpływają na zmianę enancjoselektywności.

Z kolei A. Karlsson i A. Nystrom [88] badając wpływ różnych modyfikatorów (metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, acetonitryl i dimetylosulfotlenek (DMSO)) na enancjoselektywność clevidipine zauważyli zmianę kolejności wymywania enancjomerów w przypadku zastosowania 1-propanolu w porównaniu do pozostałych modyfikatorów. Wyniki ich pracy pokazują, że zmiana ta pojawia się wraz ze zwiększeniem długości łańcucha alkoholi pierwszorzędowych (w 2-propanolu związek nie dzieli się) natomiast zastosowanie acetonitrylu oraz DMSO nie prowadzi do tego efektu. Autorzy sugerują, iż powodem występowania tego zjawiska może być zmiana konformacji AGP w zależności od zastosowanego modyfikatora w fazie ruchomej bądź analit hydrofobowy może tworzyć kompleksy z modyfikatorem organicznym, które w różny sposób adsorbują się na powierzchni proteiny.

Fazy polisacharydowe również należą do grupy kolumn, które są bardzo czułe na zmianę środowiska achiralnego. W układzie faz normalnych na tych kolumnach retencję badanych związków reguluje się poprzez dodatek alkoholi zwykle 2-propanolu,

etanolu, a także metanolu, 1-propanolu, 1-butanolu, itp. do heksanu. Podobnie jak i dla wcześniej omówionych selektorów zauważono, iż zmiana składu fazy ruchomej prowadzi do zmiany nie tylko retencji, ale i enancjoselektywności układu.

Balmer i współautorzy [89] porównali wpływ alkoholi (metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol) na rozróżnienie chiralne omeprazolu i jego strukturalnego analogu timoprazolu na kolumnie Chiralpak AD. Zastąpienie etanolu 1-propanolem lub 2-propanolem spowodowało nie tylko zmniejszenie współczynnika rozdzielania (α) omeprazolu z 1,8 na 1,1-1,3, ale również i zmianę kolejności wmywania enancjomerów. Dodatek etanolu i propanolu w odpowiednich proporcjach (4% etanolu i 10% propanolu) powoduje zanik rozdzielania enancjomerów ($\alpha=1,0$). Natomiast dodatek metanolu (użytego razem z 2-propanolem z powodu słabej rozpuszczalności w heksanie) powoduje tą samą kolejność wmywania enancjomerów jak w przypadku etanolu. Ciekawy efekt zauważono w przypadku rozdzielania timoprazolu stosując stopniowo dodatek metanolu od 0 do 20% do fazy 2-propanol/heksan (20/80 v/v). Stężenie metanolu do ok. 6% powodowało niewielki wpływ na współczynnik rozdzielania ($\alpha \sim 1,2$). Natomiast wraz ze zwiększeniem stężenia metanolu od 6% do 8% współczynnik rozdzielania wzrósł do około 2,2 i utrzymywał się na podobnym poziomie nawet gdy stężenie metanolu wzrosło do 20%. Zauważono, iż dodatek metanolu powoduje zwiększenie retencji tylko (+) enancjomeru, podczas gdy (-) enancjomer zachowuje się tak jak przy zwiększaniu polarności fazy ruchomej, czyli wraz ze wzrostem ilości metanolu w fazie jego współczynnik retencji maleje (Rys. 34).



Rys. 34. Wpływ dodatku metanolu do fazy ruchomej 2-propanol/heksan (20/80, v/v) na współczynnik retencji enancjomerów timoprazolu na kolumnie Chiralpak AD:

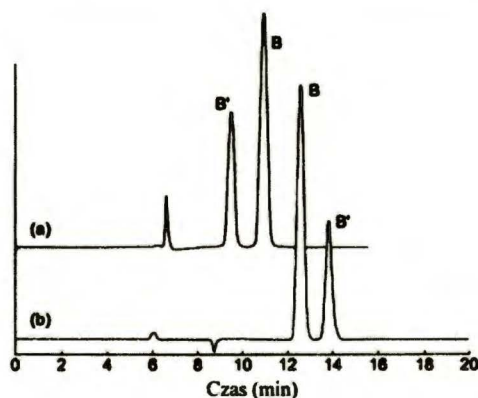
□ - (+) enancjomer, ○ - (-) enancjomer [89].

Autorzy interpretują to zjawisko jako współzawodnictwo pomiędzy alkoholami zawartymi w fazie ruchomej w adsorbowaniu się na fazie stacjonarnej. Metanol w wyższym stężeniu wypiera 2-propanol zaadsorbowany na fazie stacjonarnej. Poszczególne enancjomery oddziałują z różnymi miejscami wiążącymi na chiralnej fazie stacjonarnej. Dodatek modyfikatora może wpływać na miejsca wiążące tylko dla jednego z enancjomerów zmieniając jego retencję a tym samym i wpływając na enancjoselektywność.

Kunath i inni badali wpływ alkoholi (2-propanol, etanol, mieszanina etanol-metanol) a także ich stężenia (20%, 10%, 5%, 2%) na rozróżnienie chiralne na kolumnach Chiralcel OD i Chiralpak AD [90,91]. Wyniki ich prac pokazują, że badane związki lepiej rozdzielają się na kolumnie AD. Ponadto na tej kolumnie zaobserwowano, że chociaż wyższa polarność alkoholu powinna prowadzić do osłabienia wiązania wodorowego pomiędzy analitem i fazą stacjonarną to zamiana 2-propanolu na etanol bądź mieszaninę etanol-metanol prowadziła do znacznego zwiększenia współczynnika retencji i separacji dla większości związków. Natomiast zmniejszenie stężenia modyfikatora może prowadzić zarówno do zmniejszenia jak i zwiększenia enancjoseparacji badanych związków. Autorzy wzięli pod uwagę dwie możliwości takiego wpływu polarnych modyfikatorów na chiralne rozróżnienie. W zależności od zastosowanego modyfikatora może zmieniać się solwatacja albo konformacja zarówno analitu jak i fazy stacjonarnej. Bądź też modyfikator wywołuje zmianę w sterycznym otoczeniu chiralnej wnęki fazy stacjonarnej. Jednakże wykonane widma dichroizmu kołowego dla wybranych związków w 2-propanolu i metanolu były identyczne, co potwierdziło, że modyfikatory nie wpływają na konformacje badanych związków. Zaobserwowany wpływ modyfikatorów jest prawdopodobnie związany ze zmianą geometrii lub/i rozmiaru chiralnych kanałów fazy stacjonarnej w zależności od rodzaju użytego alkoholu.

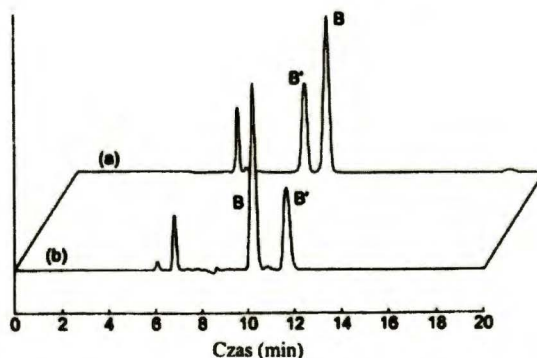
Wang i współautorzy porównali wpływ modyfikatorów (etanol, 2-propanol) na retencję i separację trzech par strukturalnie powiązanych enancjomerów z jednym, dwoma i trzema centrami chiralności [92] oraz wybranych półproduktów farmaceutycznych [93] na celulozowej kolumnie Chiralcel OD i jej amylozowym odpowiedniku Chiralpak AD. W pracach tych również zauważono, iż na kolumnie Chiralpak AD polarność fazy ruchomej nie jest czynnikiem dominującym w określaniu współczynnika retencji badanych związków i zamiana 2-propanolu na etanol powoduje

zwiększenie retencji badanych związków. W większości przypadków enancjomery rozdzielają się dobrze na obu kolumnach w obu fazach ruchomych. Jednakże zauważono interesujące zjawisko, iż enancjomery wymywają się na kolumnie Chiralpak AD w odwróconej kolejności w porównaniu do kolumny Chiralcel OD (Rys. 35, 36). Ponadto na kolumnie Chiralpak AD zmiana kolejności wymywania kilku enancjomerów spowodowana była zamianą modyfikatora fazy ruchomej z etanolu na 2-propanol. Autorzy sugerują, iż różnice w retencji, separacji i kolejności wymywania badanych związków na kolumnach Chiralcel OD i Chiralpak AD są wynikiem różnic w konformacji pomiędzy tymi selektorami. Natomiast efekty na kolumnie Chiralpak AD takie jak zamiana kolejności wymywania enancjomerów w zależności od zastosowanego modyfikatora czy też zwiększona retencja związków poprzez dodatek etanolu do fazy ruchomej jest prawdopodobnie spowodowana zmianą sterycznych właściwości chiralnej wnęki na fazie stacjonarnej przez dany alkohol.



Rys. 35. Zmiana kolejności wymywania enancjomerów w układzie heksan-IPA [92]:

- (a) kolumna Chiralpak AD, heksan/IPA (98/2, v/v),
- (b) kolumna Chiralcel OD, heksan/IPA (90/10, v/v).



Rys. 36. Zmiana kolejności wymywania enancjomerów w układzie heksan-etanol [92]:

- (a) kolumna Chiralpak AD, heksan/etanol (98/2, v/v),
- (b) kolumna Chiralcel OD, heksan/etanol (92/8, v/v).

W pracy Bielejewskiej i innych [94] badany był wpływ alkoholi (etanolu, 1-propanolu, 2-propanolu) na rozdzielanie linezolidu na kolumnach Chiralpak AD i Chiralcel OD. Otrzymane wyniki wskazują, iż lepszą enancjoseparację i krótsze czasy retencji otrzymano na fazie Chiralpak AD. Ponadto enancjomery wymywają się w odwróconej kolejności na obu kolumnach. Jednakże zmiany kolejności enancjomerów można też dokonać zamieniając modyfikator fazy ruchomej z etanolu na 2-propanol lub 1-propanol. Zmiana retencji i enancjoseparacji powodowana jest prawdopodobnie wpływem alkoholi na steryczne otoczenie chiralnych wnęk i kanałów faz stacjonarnych. Autorzy zwracają również uwagę na to, że obie fazy posiadają ten sam podstawnik a zatem to struktura chiralnego selektora może odgrywać główną rolę w chiralnym rozróżnieniu.

Wang i współautorzy [95,96] za pomocą NMR-u ciała stałego badali strukturalne zmiany fazy Chiralpak AD w zależności od składu fazy ruchomej zawierającej mieszaninę heksanu z alkoholem (etanolem, 1-propanolem, 2-propanolem, 1-butanołem, *t*-butanołem). W pierwszej pracy [95] porównali widma CP-MAS Chiralpak AD dla fazy suchej, przemytej 100% heksanem oraz mieszaninami heksan:etanolem i heksan:2-propanolem w różnych stężeniach. Wyniki wskazują, iż heksan wbudowuje się w strukturę fazy stacjonarnej. Zastosowanie fazy ruchomej z dodatkiem alkoholowych modyfikatorów pokazuje, iż stopniowo wypierają one heksan i wbudowują się w strukturę Chiralpak AD. Przy czym 2-propanol silniej niż etanol wypiera heksan z fazy stacjonarnej. Ponadto alkohole te dają wyraźnie różny wkład w konformacyjny rozkład fazy Chiralpak AD, co jest prawdopodobnie spowodowane różnicą w obszerności cząsteczek etanolu i 2-propanolu. W drugiej pracy [96] zbadano kolejne alkohole: 1-propanol, 1-butanol, *t*-butanol. Wyniki pokazują, że te alkohole również wbudowują się w fazę stacjonarną. Zostało potwierdzone, że struktura fazy Chiralpak AD różni się w zależności od zastosowanego alkoholu. Alkohole o budowie rozgałęzionej (2-propanol, *t*-butanol) w porównaniu do alkoholi o budowie linowej (etanolem, 1-propanolem, 1-butanołem) powodują większe skrócenie jednostek glukozy w helikalnej strukturze fazy stacjonarnej. Różnice w chiralnym rozróżnieniu autorzy przypisują zaobserwowanym strukturalnym zmianom spowodowanym przez przestrzenne różnice poszczególnych alkoholi. Zmiany te tworzą specyficzne stereootoczenie chiralnej wnęki, co wpływa na enancjoselektywność badanych związków. Autorzy nie wykluczają jednak możliwości solwatacji analitu przez alkohole. Związki solwatowane

różnymi alkoholami mogą posiadać różną wielkość i kształt, przez co w inny sposób dopasowują się do chiralnej wnęki powodując różnice w ich enancjoseparacji.

Aboul-Enein i Ali [97] badali wpływ alkoholi (metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol) na rozróżnienie chiralne nebiwololu w układzie faz normalnych na kolumnie Chiralpak AD i w układzie faz odwróconych na kolumnie Chiralpak AD-RH. Autorzy twierdzą, iż rozdzielanie nebiwololu jest kontrolowane zarówno przez polarność jak i lepkość zastosowanych alkoholi. Najbardziej odpowiednie są etanol, 1-propanol, 2-propanol jako modyfikatory fazy ruchomej, gdyż tylko w tych przypadkach uzyskano rozdzielanie enancjomerów do linii bazowej. W układzie faz normalnych zamiana modyfikatora: metanolu, etanolu bądź 1-propanolu na 2-propanol lub 1-butanol spowodowała zmianę kolejności wymywania enancjomerów. Natomiast w układzie faz odwróconych takiej sytuacji nie zaobserwowano. Może to wynikać z faktu, że alkohole silniej oddziałują z fazą stacjonarną w układzie faz normalnych niż w układzie faz odwróconych. Słabsze oddziaływania alkoholi na kolumnie Chiralpak AD-RH mogą być spowodowane obecnością odpychania między alkilowymi łańcuchami alkoholi i alkilowymi łańcuchami fazy stacjonarnej nadającymi jej właściwości fazy odwróconej.

3.2 Woda jako modyfikator faz normalnych

Balmer i współautorzy [98,99] badali wpływ zawartości wody w fazie organicznej na enancjoseparację aminoalkoholi. Zauważyli, iż sterując zawartością wody w fazie organicznej można znacząco wpłynąć na retencję oraz chiralne rozdzielanie związków na kolumnie Chiralcel OD. Zwiększenie zawartości wody w fazie ruchomej z 200 do 1400 mg/l wpłynęło głównie na enancjomer S metoprololu, którego retencja zmniejszyła się o połowę natomiast retencja enancjomeru R prawie się nie zmieniła. Spowodowało to zmniejszenie współczynnika rozdzielania z 2,4 do 1,4 [98]. Podobną zależność zaobserwowano dla analogu metoprololu dla którego zwiększanie zawartości dodatku wody od 0 do 1600 mg/l również silnie oddziaływało na retencję tylko jednego enancjomeru (S), podczas gdy retencja drugiego (R) pozostała prawie bez zmian. W tym przypadku nie tylko zmieniły się współczynniki rozdzielania, ale nastąpiła zmiana kolejności wymywania enancjomerów. Autorzy sądzą, że

aminoalkohole wmywane są dzięki oddziaływaniu z dwoma różnymi miejscami chiralnymi fazy stacjonarnej. Właściwości wiążące jednego z nich silnie zależą od tworzenia wiązań wodorowych i jego wpływ na selektywność oraz zmianę kolejności wmywania enancjomerów może być kontrolowany przez zawartość wody w fazie ruchomej [99].

Interesujący efekt zauważono w pracach omawianej wcześniej przy wpływie alkoholi na kolumnie Chiralpak AD [89,94]. W pierwszej dodatek wody (1 g/l) do fazy ruchomej, w której zastosowano 1-propanol jako modyfikator zmniejsza współczynnik retencji badanego związku, natomiast dla 2-propanolu jako modyfikatora współczynnik retencji zwiększa się. Podobne efekty zostały zauważone w pracy Bielejewskiej i innych [94]. Dodatek niewielkiej ilości wody (0,2%) do fazy ruchomej z 1-propanolem lub 2-propanolem na kolumnie Chiralpak AD powodował zwiększenie współczynnika retencji jednakże wpływał na obniżenie enancjoseparacji badanego związku. Natomiast w fazie z etanolem dodatek wody obniżał zarówno współczynnik retencji jak i współczynnik rozdzielenia badanego związku. Z kolei na kolumnie Chiralcel OD dodatek wody do fazy ruchomej wywoływał efekt odwrotny. Współczynniki retencji badanych enancjomerów w fazie z 1-propanolem i 2-propanolem zmniejszały się natomiast w fazie z etanolem zwiększały. Po dodaniu wody do fazy ruchomej w fazie z etanolem i 2-propanolem enancjoselektywność zwiększyła się.

Ning [100] rozdzielając chiralne analogi 2-okso-3-piperidynoacetamidu na kolumnie Chiralcel OD wykorzystał wodę jako polarny modyfikator faz normalnych. Ilość dodanej wody jest ograniczona jej rozpuszczalnością w fazie ruchomej, jednakże w tym przypadku niewielki dodatek do fazy: etanol/heksan/TFA (10/90/0,01 v/v/v) jest niezbędnym, aby otrzymać rozdzielenie enancjomerów. Wzrost zawartości wody z 0,01% przez 0,18%, 0,28%, do 0,38% powoduje zwiększenie rozdzielczości pików od 0 do wartości 1,45. Zaobserwowano także, podobnie jak w poprzednio omówionych pracach, iż dodatek wody silniej wpływa na zmniejszenie retencji tylko jednego z enancjomerów poprawiając w ten sposób współczynniki rozdzielenia. Autor przedstawił następującą propozycję prawdopodobnego mechanizmu separacji. Ponieważ woda jest bardziej polarnym rozpuszczalnikiem niż etanol jej niewielki dodatek do fazy ruchomej znacznie zwiększa jej hydrofilowość. W ten sposób powstaje bardziej polarne środowisko zarówno dla analitu jak i fazy stacjonarnej. Zwiększona hydrofilowość

może umożliwiać aminie zawartej w analizie tworzenie par jonowych z kwasem trifluorooctowym w fazie ruchomej. Dzięki czemu enancjomery różnie oddziałują z fazą stacjonarną i następuje ich rozdzielanie.

4. Badania temperaturowe w chromatografii

Temperatura jest parametrem, który może wpływać zarówno na enancjoselektywność jak i na retencję badanych związków. Badania wpływu temperatury na rozdzielanie chiralne mogą pomóc w dobraniu optymalnych warunków analizy jak również mogą dostarczyć informacji ułatwiających zrozumienie fizykochemicznych podstaw tworzenia się kompleksów pomiędzy fazą stacjonarną i analizowanym związkiem. W tym celu wyznacza się parametry termodynamiczne.

Temperatura może wpływać na rozdzielanie badanych substancji na dwa różne sposoby. Pierwszy to efekt kinetyczny, w którym temperatura wpływa na poprawę sprawności układu (szerokość piku). Wynika on z jej wpływu na lepkość i współczynnik dyfuzji. Wzrost temperatury obniża lepkość fazy ruchomej i zwiększa współczynnik dyfuzji analitu zarówno w fazie ruchomej jak i w fazie stacjonarnej [101,102]. Drugi, nazywany efektem termodynamicznym, związany jest ze zmianą współczynnika rozdzielania α (gdyż $\Delta\Delta G^\circ = -RT \ln \alpha$). Współczynnik rozdzielania na ogół maleje ze wzrostem temperatury, chociaż znane są też przypadki wzrostu enancjoselektywności ze wzrostem temperatury [101,102].

Wpływ temperatury w chromatografii cieczerwowej badany był na wielu różnych fazach stacjonarnych z cyklodekstryną, α -glikoproteina, pochodnymi celulozy i amylozy [94,103-108].

4.1 Termodynamiczne parametry rozdzielania enancjomerów

W układzie chromatograficznym z chiralnymi fazami stacjonarnymi współczynnik retencji analizowanej substancji zależy od procesu jej podziału pomiędzy fazę mobilną i stacjonarną. Stała podziału (K) analitu jest funkcją różnicy entalpii

swobodnej (energii Gibbsa) (ΔG°) analitu w tych dwóch fazach, co możemy przedstawić za pomocą wzoru [101,106,107]:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (1)$$

gdzie:

R - stała gazowa [J/mol*K]

T - temperatura [K]

K – stała podziału

Podstawiając k/ϕ w miejsce K zgodnie ze wzorem:

$$K = k/\phi \quad (2)$$

gdzie:

k – współczynnik retencji

ϕ – stosunek faz (stosunek objętości fazy stacjonarnej do objętość fazy ruchomej)

oraz wyrażając ΔG° za pomocą równania:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (3)$$

gdzie:

ΔH° - standardowa entalpia przejścia analitu z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej

ΔS° - standardowa entropia przejścia analitu z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej

otrzymujemy:

$$-RT \ln (k/\phi) = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (4)$$

co przekształcając daje nam równanie van't Hoffa dla procesu chromatograficznego:

$$\ln k = -(\Delta H^\circ/RT) + (\Delta S^\circ/R) + \ln \phi \quad (5)$$

Jeśli ΔH° , ΔS° , ϕ są niezależne od temperatury, to wtedy według równania (5) zależność $\ln k$ od $1/T$ jest liniowa. Z nachylenia prostej otrzymujemy $-\Delta H^\circ/R$ a z przecięcia $\Delta S^\circ/R + \ln \phi$.

Współczynnik retencji k jest sumą achiralnych i chiralnych oddziaływań analitu z fazą stacjonarną. Natomiast współczynnik rozdzielania (α) dla pary enancjomerów jest miarą enancjoselektywności i jest ważnym parametrem mierzącym względne chiralne różnice retencji pomiędzy enancjomerami [106].

$$\alpha = k_1/k_2 \quad (6)$$

Współczynnik rozdzielania (α) jest powiązany z różnicą zmian entalpii swobodnej oddziaływań enancjomerów z fazą stacjonarną ($\Delta\Delta G^\circ$) za pomocą równania:

$$\Delta\Delta G^\circ = -RT \ln \alpha \quad (7)$$

Wykorzystując równanie (3) otrzymujemy:

$$\ln \alpha = -\Delta\Delta G^\circ/RT = -(\Delta\Delta H^\circ/RT) + (\Delta\Delta S^\circ/R) \quad (8)$$

gdzie:

$\Delta\Delta G^\circ$ - różnica zmian entalpii swobodnej kompleksowania dla dwóch enancjomerów

$\Delta\Delta H^\circ$ - różnica zmian entalpii kompleksowania dla dwóch enancjomerów

$\Delta\Delta S^\circ$ - różnica zmian entropii kompleksowania dla dwóch enancjomerów

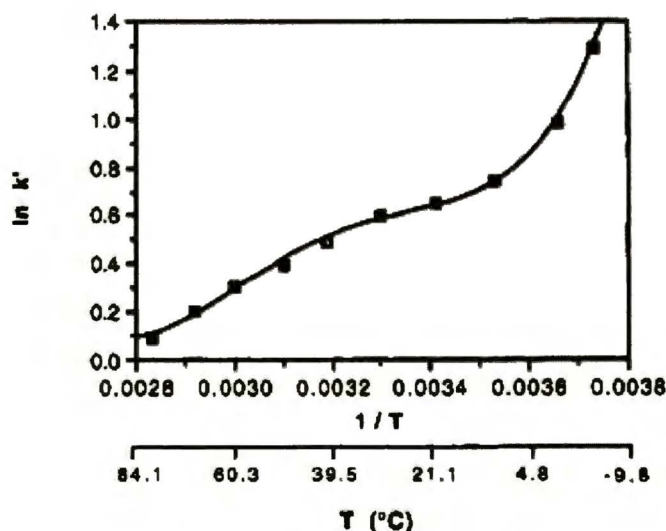
Parametry termodynamiczne $\Delta\Delta H^\circ$ i $\Delta\Delta S^\circ$ możemy otrzymać dwoma sposobami: obliczając różnicę $\Delta H_2^\circ - \Delta H_1^\circ$ i $\Delta S_2^\circ - \Delta S_1^\circ$ bądź jeśli zależność $\ln \alpha$ od $1/T$ jest liniowa to wyliczając z nachylenia prostej ($-\Delta\Delta H^\circ/R$) oraz przecięcia ($\Delta\Delta S^\circ/R$). Wartości otrzymane obiema metodami powinny być identyczne z uwzględnieniem błędu eksperymentalnego [101].

Równanie (8) wskazuje ponadto, że istnieje teoretyczna temperatura T_{iso} , w której enancjoselektywność zanika ($\alpha=1$):

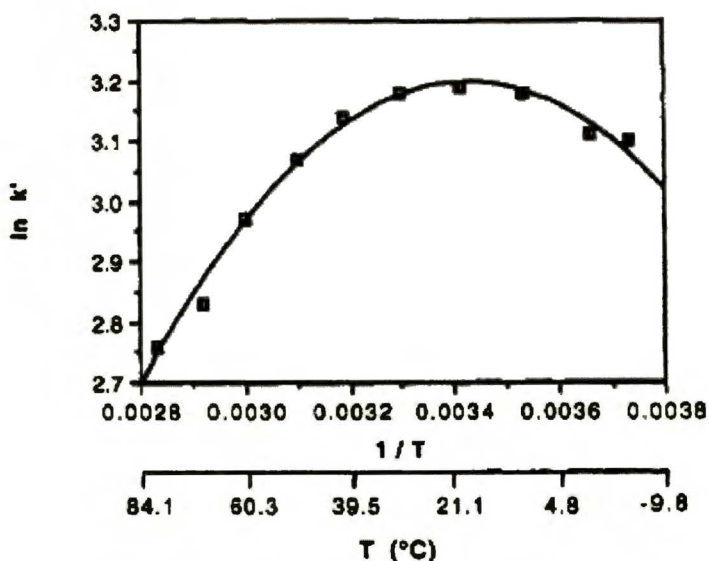
$$T_{iso} = \Delta\Delta H^\circ / \Delta\Delta S^\circ \quad (9)$$

W temperaturze powyżej T_{iso} kolejność elucji enancjomerów zostaje odwrócona. Z praktycznego punktu widzenia T_{iso} jest często zbyt wysoka do osiągnięcia w chromatografii cieczowej z uwagi na ograniczenie temperaturowe dla stosowanych kolumn [106,109].

Liniowa zależność równania van't Hoffa sugeruje, iż konformacja fazy stacjonarnej jest sztywna oraz że mechanizm rozróżnienia chiralnego nie zmienia się w zakresie temperatur zastosowanych w eksperymencie [110]. Jednakże nie we wszystkich przypadkach zależność van't Hoffa jest liniowa. Zależności nieliniowe były obserwowane w badaniach temperaturowych na fazach stacjonarnych w odwróconym układzie faz (Rys. 37 i Rys. 38). Mogą być one przejawem zmian w mechanizmie retencji [101,111-113].



Rys. 37. Zależność van't Hoffa dla benzenu w układzie faz odwróconych w fazie ruchomej: acetonitryl/woda (60/40 v/v) [113].



Rys. 38. Zależność van't Hoffa dla benzenu w układzie faz odwróconych w fazie ruchomej: woda/1-propanol (95/5 v/v) [111].

Aby zachodziło rozróżnienie chiralne enancjomerów, ΔG° tworzonych kompleksów analitu z fazą stacjonarną musi być różna dla poszczególnych enancjomerów. Nawet niewielkie zmiany entalpii swobodnej kompleksowania dwóch enancjomerów są wystarczające do ich rozdzielenia $\Delta\Delta G=0,024$ kJ/mol odpowiada $\alpha=1,01$ [79]. Jednakże rozdzielenie związków do linii podstawowej (rozdzielczość pików $R_S=1,5$) przy enancjoselektywności $\alpha=1,01$ wymagałoby zastosowania kolumny o bardzo wysokiej sprawności (efektywna liczba pól teoretycznych $N_{ef} \approx 367000$).

Kusters i inni [103] w badaniach temperaturowych przeprowadzonych na kolumnach Chiralcel OB i Chiralcel OD sugerują, iż na podstawie wielkości $\Delta\Delta H$ można stwierdzić, jakie oddziaływania są odpowiedzialne za rozróżnienie chiralne. Autorzy wyróżnili trzy grupy. W pierwszej, w której wartości $\Delta\Delta H$ mieszczą się między $-0,05$ a $-0,1$ kcal/mol za rozróżnienie chiralne odpowiedzialne są zawady steryczne. Wartości $\Delta\Delta H$ między $-0,5$ i $-1,0$ kcal/mol wkład zawady sterycznej jest wzmacniany przez drugi rodzaj oddziaływań takich jak słabe oddziaływania $\pi-\pi$ lub słabe oddziaływania wodorowe. Trzecia grupa, gdy wartości $\Delta\Delta H$ są większe od $-1,0$ kcal/mol wtedy rozróżnienie chiralne wydaje się być rezultatem dodatkowych silnych oddziaływań $\pi-\pi$ lub wiązań wodorowych dla enancjomeru wmywanego w drugiej kolejności.

5. Ilościowa zależność struktura - retencja (QSRR)

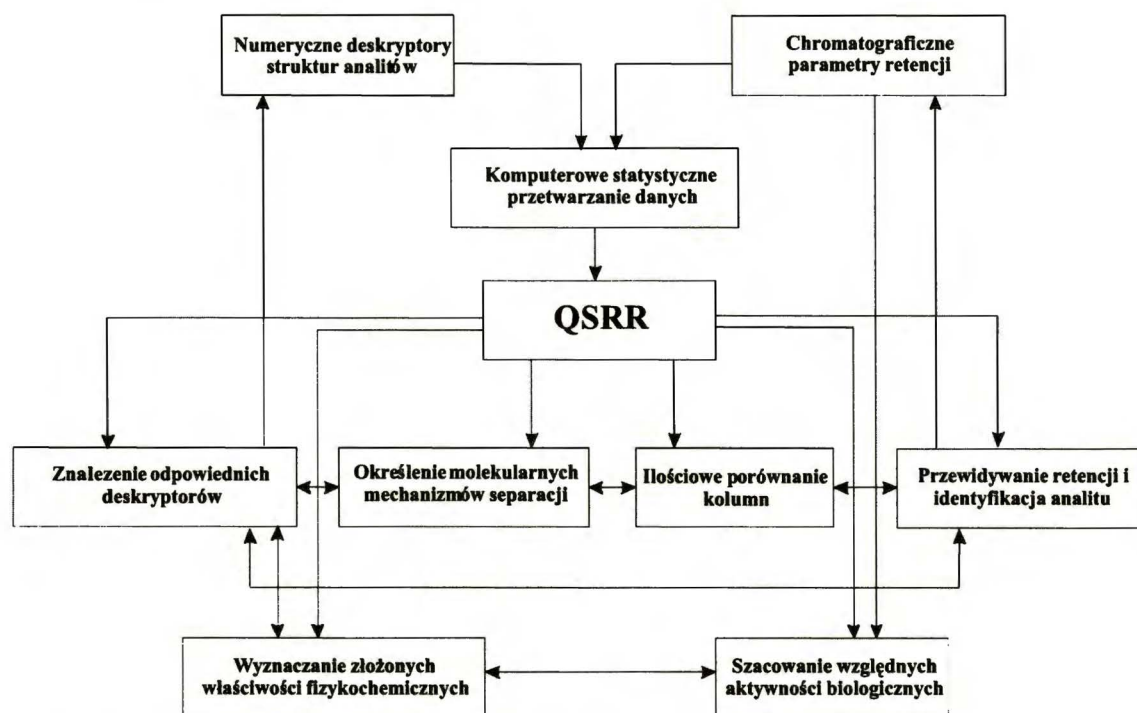
Jedną z rozwijających się w ostatnich czasach metod jest przewidywanie z parametrów strukturalnych związku chemicznego jego właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Ilościowe zależności struktura – retencja (QSRR) (ang. Quantitative Structure - Retention Relationships) jest statystycznie wyprowadzonym modelem, który opisuje zależność między retencją a fizykochemicznymi właściwościami związku jak również fazy stacjonarnej i ruchomej. Jedne z pierwszych doniesień zastosowania tej metody w chromatografii pojawiły się w 1977 roku. Dotyczyły one korelacji parametrów retencji z indeksami topologicznymi [114,115].

Metoda QSRR w chromatografii cieczowej polega na korelacji parametrów retencji odpowiednio dużej strukturalnie reprezentatywnej serii analitów testowych oraz odpowiednio dobranych deskryptorów molekularnych. Jeśli otrzymane wyniki są statystycznie i fizycznie wiarygodne to metodę tą możemy zastosować do [116,117]:

- przewidywania retencji nowych analitów i identyfikacji nieznanymi analitów,
- wyjaśnianiu mechanizmów retencji i separacji w danym układzie chromatograficznym,
- określania właściwości faz stacjonarnych oraz złożonych fizykochemicznych właściwości analitu,
- identyfikacji deskryptorów najbardziej użytecznych pod względem właściwości strukturalnych,
- ilościowego porównywania właściwości separacyjnych różnych typów wypełnień kolumn chromatograficznych.

Metodologia i zastosowanie badań QSRR przedstawione zostały schematycznie na Rys. 39 [116].

Jednym z zasadniczych problemów jest odpowiednie przedstawienie struktury molekularnej w modelu QSRR. W tym celu wykorzystywane są deskryptory. Deskryptory molekularne są to parametry bezpośrednio odnoszące się do właściwości molekuli, które mogą być obliczone lub wyznaczone eksperymentalnie. Deskryptory możemy podzielić na kilka grup: fizykochemiczne (np. parametry rozpuszczalności, temperatury wrzenia, wartości pK_a), związane z polarnością cząsteczki (np. momenty dipolowe), związane z wielkością cząsteczki (np. objętość van der Waalsa, polaryzowalność) topologiczne i wiele innych [116].



Rys. 39. Metodologia i zastosowanie badań QSRR [116].

Drugim poważnym problemem jest wyselekcjonowanie z szeregu deskryptorów najbardziej wiarygodnie opisujących oddziaływanie pomiędzy fazami (stacjonarną, ruchomą) i analitem w każdym konkretnym przypadku. Ze względu na sposób wybrania kompletu odpowiednich deskryptorów w metodzie QSRR można wyróżnić trzy główne podejścia [116-119]:

Najprostsze składa się z regresji parametrów retencji (np. $\log k$) w stosunku do teoretycznie obliczonego logarytmu współczynnika podziału n-oktanol/woda ($\text{clog}P$). Wartości $\log P$ obliczone są ze strukturalnego wzoru analitu. Proste równanie regresji przedstawia się następująco:

$$\log k = k_1 + k_2 \log P \quad (10)$$

gdzie k_1 i k_2 są to współczynniki regresji.

Drugi typ równań QSRR wiąże retencję z parametrami kwantowo-chemicznymi (np. moment dipolowy, polaryzowalność) i/lub innymi strukturalnymi deskryptorami analitów z chemii obliczeniowej. Równania te są z powodzeniem wykorzystywane dla

opisu układu RP-HPLC przy wykorzystaniu następujących deskryptorów: moment dipolowy (μ), nadmiar ładunku elektronowego najbardziej ujemnie naładowanego atomu (σ_{Min}), obszar powierzchni molekularnej dostępnej dla wody (A_{WAS}). Każdy z tych parametrów jest powiązany z fizykochemicznymi właściwościami cząsteczki. Parametr μ opisuje oddziaływania dipol-dipol i dipol-dipol indukowany pomiędzy analitem i składnikami fazy ruchomej lub fazy stacjonarnej, σ_{Min} odzwierciedla lokalną częściową polarność analitu i wskazuje na jego zdolność do brania udziału w oddziaływaniach polarnych z fazą (np. przeniesienie ładunku albo tworzenie wiązania wodorowego). Natomiast parametr A_{WAS} opisuje oddziaływania dyspersyjne analitu i faz chromatograficznych. Ogólne równanie przyjmuje następującą postać:

$$\log k = k_1 + k_2 \mu + k_3 \sigma_{\text{Min}} + k_4 A_{\text{WAS}} \quad (11)$$

gdzie $k_1 - k_4$ są to współczynniki regresji.

Trzeci typ równań został opisany przez Abrahama i współautorów [120-122]. Metoda ta nazywana liniowymi zależnościami energii solwatacji (ang. LSER: Linear Solvation Energy Relationship) jest oparta na połączeniu teorii solwatochromizmu z metodą QSRR. Ogólne równanie LESR przedstawia się w następującej formie:

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (12)$$

gdzie:

k – współczynnik retencji

c - stała, zależna od układu chromatograficznego, ale niezależna od natury analitu

Deskryptory:

E - nadmiarowa refrakcja molowa (R_2),

S - stosunek dipolarności do polaryzowalności π_2^{H} ,

A - kwasowość wiązania wodorowego (H-donor) $\sum \alpha_2^{\text{H}}$,

B - zasadowość wiązania wodorowego (H-akceptor) $\sum \beta_2^{\text{H}}$,

V – charakterystyczna objętość molekularna McGowanana V_x

e, s, a, b, v - współczynniki regresji przedstawiające różnice w oddziaływaniu analitu z fazą ruchomą i fazą stacjonarną:

e - wskazuje na tendencję oddziaływania fazy ruchomej i stacjonarnej z analitem za pomocą oddziaływań wynikających z polaryzowalności cząsteczki,

s - opisuje oddziaływania elektrostatyczne dipol-dipol oraz dipol-dipol indukowany,

a - opisuje różnice w zasadowości wiązania wodorowego między fazami i kwasowym analitem,

b - opisuje różnice w kwasowości wiązania wodorowego między fazami i zasadowym analitem,

v - opisuje różnicę w energii tworzenia wnęki pomiędzy fazą ruchomą a stacjonarną.

Dodatknie wartości współczynników regresji wskazują na silniejsze oddziaływania analitu z fazą stacjonarną a zatem wpływają na zwiększenie jego czasu retencji. Natomiast ujemne wartości współczynników regresji odpowiadają silniejszym oddziaływaniom analitu z fazą ruchomą i powodują zmniejszenie czasów retencji.

Berthod i współautorzy [123,124] wykorzystali metodę LSER w celu uzyskania informacji o mechanizmie rozdzielania związków chiralnych. Metoda LSER przewiduje identyczny zestaw deskryptorów do opisu enancjomerów. Jednakże enancjomery oddziałują z różnymi domenami chiralnej fazy stacjonarnej tworząc dwa różne diastereomeryczne kompleksy z CSP. Na tej podstawie autorzy opisali enancjoselektywność (α) za pomocą wzoru:

$$\log k_2 - \log k_1 = \log \alpha = (\Delta e)E + (\Delta s)S + (\Delta a)A + (\Delta b)B + (\Delta v)V \quad (13)$$

gdzie:

k_1 i k_2 są to współczynniki retencji pierwszego i drugiego wymywanego enancjomeru, parametry Δ odnoszą się do zmian energii oddziaływań odpowiedzialnych za obserwowaną enancjoselektywność.

CEL PRACY

Jak starałam się wyjaśnić w części literaturowej, zasadniczym problemem nowoczesnej chromatografii związków chiralnych jest opanowanie mechanizmów regulujących przebieg rozdzielania mieszanin enancjomerów. Przy tym jest to problem złożony i nie ogranicza się bynajmniej do oddziaływań pomiędzy czynnikami chiralnymi w kolumnie: na fazie stacjonarnej czy w fazie ruchomej. Bardzo istotną rolę pełnią czynniki achiralne, które mogą być znacznie łatwiej dostępne i tańsze w stosowaniu. Dlatego analiza tego problemu wydaje się być szczególnie aktualna i zasługująca na szczegółowe przebadanie.

Do badań wybrane zostały pochodne 1-[2-hydroksy-3-(4-fenylpiperazyn-1-ylo)-propylo]-pirolidyn-2-onu, substancje ważne ze względu na ich potencjalne zastosowania farmakologiczne. Zadaniem głównym było zanalizowanie molekularnych mechanizmów rozdzielania enancjomerów tych związków. W tym celu przeprowadziłam badania parametrów chromatograficznych w funkcji składu fazy ruchomej i w funkcji temperatury. Zaś zadaniem praktycznym było zaproponowanie szczegółowej procedury, jaką należy zastosować w pracach nad optymalizacją rozdzieleń w wybranych układach faza stacjonarna/eluent. Nie wymaga bowiem dodatkowego uzasadnienia potrzeba prac nad mikropreparatywnymi wariantami rozdzieleń chromatograficznych w przypadku związków nowo syntezowanych: w rozmaitych zastosowaniach trudno obejść się bez wzorców enancjomerycznie czystych, nie mówiąc już o potrzebie badań czynności farmakologicznych każdego z enancjomerów z osobna. Zadanie dla analityka w tych kwestiach polega na osiągnięciu umiejętności skutecznego i wydajnego rozdzielenia złożonych mieszanin.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Aparatura

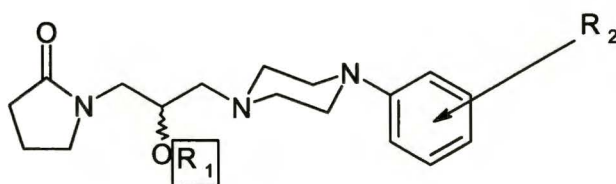
Badania zostały wykonane na dwóch układach: chromatografie ciekowym firmy Waters (Wiedeń, Austria) złożonego z pompy Model 590, detektora UV-vis Model 490, próbki dozowane za pomocą reodyny z pętlą 5 μ l oraz chromatografie ciekowym firmy Waters (Wiedeń, Austria) złożonego z dwóch pomp Model 515, detektora UV-vis Model 2487 oraz autosamplera Model 717 plus.

W badaniach temperaturowych wykorzystywany był termostat firmy WO Industrial Electronics (Langenzersdorf, Austria) Typ Jetstream 2.

2. Badane związki

Związki modelowe w postaci racematów i wybranych enancjomerów zostały zsyntezowane w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku Katedrze Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum przez dr Katarzynę Kulig i dr hab. Barbarę Malawską. Wykazują aktywność farmakologiczną i są badane jako potencjalne nowe leki na arytmie i nadciśnienie.

Związki modelowe są to pochodne pirolidyn-2-onu, które zostały zsyntezowane przez modyfikacje struktury podstawowej 1-[2-hydroksy-3-(4-fenylpiperazyn-1-yl)-propylo]-pirolidyn-2-on (Ph1) [125-127]. Różnią się podstawnikami R_1 (grupa hydroksylowa, grupa acetoksyłowa i grupa N-alkilokarbamailoksowa) przy centrum chiralnym oraz podstawnikami R_2 na pierścieniu fenyłowym (H, Cl, OMe) (Rys. 40). Grupa związków wykorzystana w badaniach została przedstawiona w Tabeli 6.



Rys. 40. Struktura badanych związków.

Tabela 6. Badane związki.

$R_2=H$	$R_2=OCH_3$	$R_2=Cl$
Ph1 $R_1=H$	MeO1 $R_1=H$	Cl1 $R_1=H$
Ph2 $R_1=$	MeO2 $R_1=$	Cl2 $R_1=$
Ph3 $R_1=$	MeO3 $R_1=$	
Ph4 $R_1=$	MeO4 $R_1=$	
Ph5 $R_1=$	MeO5 $R_1=$	
Ph6 $R_1=$	MeO6 $R_1=$	Cl6 $R_1=$

Badane próbki zostały przygotowane przez rozpuszczenie odpowiedniej naważki w etanolu, stężenie próbki ok. 1 mg/ml.

3. Kolumny

W badaniach wykorzystane zostały kolumny polisacharydowe firmy Daicel (Chiral Technologies Europe, Cedex, Francja) o wymiarach 25 cm × 0,46 cm oraz kolumna cyklodekstrynowa firmy Astec (Advanced Separation Technologies Inc.) o wymiarach 25 cm × 0,46 cm:

- Chiralcel OD – karbaminian tri(3,5-dimetylofenylowy) celulozy powleczonej na silikażelu (grubość ziarna 10 μm),
- Chiralpak AD – karbaminian tri(3,5-dimetylofenylowy) amylozy powleczonej na silikażelu (grubość ziarna 10 μm),

- Chiralpak IA – karbaminian tri(3,5-dimetylofenylowy) amylozy unieruchomiony na silikażelu (grubość ziarna 5 μm),
- Cyclobond I beta DMP – karbaminian 3,5-dimetylofenylowy β -cyklodekstryny unieruchomiony na silikażelu.

Przepływ fazy ruchomej wynosił 0,8 ml/min na kolumnach Chiralpak AD, Chiralpak IA i Cyclobond I beta DMP oraz 1,2 ml/min na kolumnie Chiralcel OD. Kolumny były kondycjonowane fazą ruchomą przez godzinę przed rozpoczęciem pomiarów chromatograficznych. Chromatogramy rejestrowano przy dwóch długościach fali 220 nm i 240 nm w temperaturze 20°C - 23°C w klimatyzowanym pokoju.

4. Odczynniki

Stosowano następujące odczynniki: n- heksan do HPLC firmy POCH, Gliwice, Polska; 2-propanol cz.d.a. (IPA), etanol cz.d.a. (EtOH), acetonitryl cz.d.a. (ACN), kwas octowy cz.d.a. (AA), trietyloamina cz.d.a. (TEA) z firmy Chempur, Piekary Śląskie, Polska.

5. Skład fazy ruchomej

Składy faz ruchomych dla poszczególnych kolumn przedstawione są poniżej. Fazy sporządzono przez zmieszanie podanej objętości poszczególnych składników. Przed zastosowaniem fazy zostały przesączone i odgazowane.

Kolumny Chiralpak AD i Chiralcel OD:

- n-heksan/EtOH (85/15 v/v)
- n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v)
- n-heksan/IPA (90/10 v/v)
- n-heksan/IPA/H₂O (90/10/0,2 v/v/v)

Kolumna Chiralpak IA:

- n-heksan/EtOH (85/15 v/v)
- n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v)
- n-heksan/IPA (80/20 v/v)
- n-heksan/IPA/H₂O (80/20/0,2 v/v/v)

Kolumna Cyclobond I beta DMP:

1. Fazy normalne:

- n-heksan/EtOH (85/15 v/v)
- n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v)
- n-heksan/IPA (60/40 v/v)
- n-heksan/IPA/H₂O (60/40/0,2 v/v/v)

2. Fazy odwrócone:

- woda/ACN (95/5 v/v) + 0,1% trietyloamina + kwas octowy pH=3,2
- woda/ACN+(90/10 v/v) + 0,1% trietyloamina + kwas octowy pH=5,2

3. Polarne fazy organiczne:

- ACN + 0,2% kwasu octowego
- ACN + 0,1% trietyloamina + 12 ml kwasu octowego

6. Badania temperaturowe

Badania temperaturowe zostały wykonane dla sześciu związków: Ph1, Ph2, MeO1, MeO2, Cl1, Cl2. Temperatura była zmieniana co 5 stopni w zakresie 20°C - 40°C. Pomiary zostały wykonane na kolumnach polisacharydowych:

Chiralcel OD, Chiralpak AD w układach:

- n-heksan/EtOH (85/15 v/v)
- n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v)
- n-heksan/IPA (90/10 v/v)
- n-heksan/IPA/H₂O (90/10/0,2 v/v/v)

oraz na Chiralpak IA w układach:

- n-heksan/EtOH (85/15 v/v)
- n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v)

7. Mikropreparatywne rozdzielanie enancjomerów

W celu sprawdzenia kolejności wymywania enancjomerów rozdzielono mikropreparatywnie sześć związków: Ph1, Ph2, MeO1, MeO2, C11, C12.

Związki: Ph1, Ph2, MeO1, C11, C12 zostały rozdzielone na kolumnie Chiralpak IA w układzie n-heksan/EtOH (85/15 v/v). Natomiast związek MeO2 został rozdzielony na kolumnie Chiralpak AD w układzie n-heksan/EtOH (85/15 v/v). Objętość nastrzyku poszczególnych próbek o stężeniu 5mg/ml wynosiła 20 μ l. Poszczególne frakcje rozdzielanych enancjomerów zbierane były do osobnych kolbek a następnie rozpuszczalnik został odparowany na wyparce. Czystość enancjomeryczna uzyskanych w ten sposób próbek została sprawdzona chromatograficznie.

8. Ilościowe zależności struktura-retencja QSRR

Badania ilościowych zależności struktura - retencja (QSRR) zostały oparte na metodzie Liniowych zależności energii solwatacji (ang. LSER Linear Solvation Energy Relationship) poszerzonej o dodatkowe deskryptory: $\log P$ oraz moment dipolowy. Obliczenia QSRR zostały wykonane w Pracowni Chemii Kwantowej, Zakład Chemii Teoretycznej i Krystalografii, Uniwersytet Warszawski przez prof. dr. hab. Andrzeja Lesia.

Deskryptory molekularne związków modelowych: A, B, L, S, E, V (gdzie: A - kwasowe wiązania wodorowe $\sum \alpha_2^H$, B - zasadowe wiązania wodorowe $\sum \beta_2^H$, L – współczynnik podziału faza gazowa - heksadekan, S - stosunek dipolarności do polaryzowalności π_2^H , E - nadmiarowa refrakcja molowa (R_2), V – charakterystyczna objętość molekularna McGowana V_x) uzyskano za pomocą programu ADME z Advanced Chemistry Devenlopment, Toronto Ontario, Kanada.

Deskrytory $\log P$ zostały otrzymane eksperymentalnie. Wykorzystano w tym celu kolumnę RP-18 (Waters Symmetry 15 × 0,46 cm, grubość ziarna 3 μm), na której mierzono parametry retencji badanych związków w różnych stężeniach acetonitrylu. Następnie $\log P$ został wyznaczony poprzez ekstrapolację logarytmu retencji do zerowego stężenia acetonitrylu. Natomiast momenty dipolowe badanych związków zostały obliczone z rozkładu gęstości elektronowej cząsteczek. Geometrię 15 badanych związków (w postaci monochlorowodorków) uzyskano za pomocą kwantowo mechanicznej metody obliczeniowej RHF/6-31G*, która została zrealizowana w programie Gaussian G03 [128]. Otrzymane deskrytory molekularne związków modelowych zostały przedstawione w Tabeli 7.

Tabela 7. Deskrytory molekularne związków modelowych.

Związek	A	B	L	S	E	V	moment dipolowy [Debye]	Eksperymentalny $\log P$
Ph1	0,19	2,10	13,189	2,16	2,03	2,4229	7,22	1,29
Ph2	0,00	2,02	13,808	2,38	1,84	2,7204	10,83	1,81
Ph3	0,21	2,22	15,593	2,69	2,03	2,9611	10,38	2,1
Ph4	0,21	2,22	16,087	2,69	2,03	3,1020	10,47	2,43
Ph5	0,21	2,23	16,582	2,69	2,02	3,2429	10,46	3,06
Ph6	0,21	2,25	15,973	2,67	2,04	3,1020	10,22	2,2
MeO1	0,19	2,30	14,154	2,26	2,08	2,6225	7,84	1,49
MeO2	0,00	2,22	14,773	2,48	1,88	2,9200	9,45	1,95
MeO3	0,21	2,42	16,558	2,79	2,07	3,1607	10,65	2,26
MeO4	0,21	2,42	17,052	2,79	2,07	3,3016	9,82	2,69
MeO5	0,21	2,43	17,547	2,79	2,07	3,4425	9,85	3,31
MeO6	0,21	2,45	16,938	2,77	2,08	3,3016	9,58	2,68
Cl1	0,19	2,09	13,937	2,24	2,16	2,5453	8,99	2,02
Cl2	0,00	2,00	14,556	2,46	1,96	2,8428	10,79	2,22
Cl6	0,21	2,24	16,721	2,76	2,16	3,2244	12,00	3,14

Korelacja pomiędzy parametrami retencji k_1 , k_2 i deskrytorami molekularnymi x zostały opisane za pomocą równań:

$$k = \exp\left(d_0 + \sum_i d_i x_i\right) \quad (14)$$

lub

$$\log(k) = d_0 + \sum_i d_i x_i \quad (15)$$

Linijowe współczynniki d w równaniu zostały wyznaczone za pomocą metody najmniejszych kwadratów z eliminacją nieistotnych statystycznie członów z poziomem istotności $\alpha=0,10$ za pomocą programu do obliczeń statystycznych SAS 9.1 [129].

Uzyskane wyniki dla badanych kolumn w zależności od zastosowanej fazy ruchomej zostały przedstawione w rozdziale: Wyniki badań i dyskusja w Tabelach 11, 15, 18.

9. Badania NMR

Badania NMR zostały wykonane na wypełnieniach kolumn: Chiralpak AD i Chiralcel OD w układach z: n-heksanem, etanolem, izopropanolem, wodą, mieszaniną etanol/woda (90/10 v/v) oraz mieszaniną izopropanol/woda (90/10 v/v). Badane próbki zostały przygotowane dzień przed pomiarem poprzez mieszanie złożeń z badanym roztworem na mieszadle magnetycznym przez około 5 godzin. Roztwór został zdekantowany bezpośrednio przed pomiarem.

Widma NMR zostały zmierzone w Laboratorium Specjalistycznym Magnetycznego Rezonansu Jądrowego do Badań Ciała Stałego Zakład Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych Instytut Chemii Fizycznej PAN przez dr Mariusza Pietrzaka.

Seria widm ^{13}C NMR w ciele stałym została wykonana na aparacie Bruker Avance II 500. Widma uzyskano stosując standardową sekwencję impulsową CP/MAS przy częstotliwości rotacji 6 kHz. Parametry akwizycji:

- czas kontaktu – 2 ms
- zwłoka relaksacyjna (d1) – 5s

Widma ^{13}C NMR zostały skalibrowane względem sygnału glicyny w temperaturze pokojowej.

Wykonano następujące widma ^{13}C NMR:

- Chiralpak AD , temp. pokojowa
- Chiralpak AD + n-heksan, temp. pokojowa
- Chiralpak AD + etanol, temp. pokojowa
- Chiralpak AD + izopropanol, temp. pokojowa

- Chiralpak AD + H₂O
- Chiralpak AD + etanol/H₂O (90/10 v/v), temp. pokojowa
- Chiralpak AD + izopropanol/H₂O (90/10 v/v), temp. pokojowa
- Chiralcel OD + heksan, temp. pokojowa
- Chiralcel OD + etanol, temp. pokojowa
- Chiralcel OD + izopropanol, temp. pokojowa
- Chiralcel OD + etanol/H₂O (90/10 v/v), temp. pokojowa
- Chiralcel OD + izopropanol/H₂O (90/10 v/v), temp. Pokojowa

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

W pracy zbadano zmiany retencji oraz enancjoseparacji serii 15 racemicznych związków - pochodnych prolidyn-2-onu (Tabela 6) w zależności od składu fazy ruchomej (patrz część doświadczalna, punkt 5) na kolumnie cyklodekstrynowej: Cyclobond I DMP oraz na kolumnach polisacharydowych: Chiralcel OD, Chiralpak AD, Chiralpak IA.

Badane związki różnią się podstawnikami R_1 (grupa hydroksylowa, grupa acetoksylova i grupa N-alkilokarbamailoksowa) oraz podstawnikami R_2 (H, Cl, OMe) - Rys. 40. W zależności od podstawnika R_2 badane związki zostały podzielone na trzy grupy: Ph, Cl, OMe.

W celu lepszego zrozumienia mechanizmów retencji i enancjoseparacji badanych związków zachodzących na wymienionych wyżej fazach stacjonarnych została przeprowadzona analiza QSRR (patrz część doświadczalna, punkt 8). Korelacja współczynników retencji $\log k$ (k po transformacji logarytmicznej) z deskryptorami związków modelowych (Tabela 7) dla poszczególnych układów chromatograficznych na kolumnach Cyclobond I DMP, Chiralpak AD, Chiralpak IA, Chiralcel OD została wyliczona na podstawie równania:

$$\log k = d_0 + aA + bB + lL + sS + eE + vV + qDIP + p\log P \quad (16)$$

gdzie:

d_0 - stały wyraz

deskryptory (czynniki) to :

A - kwasowe wiązania wodorowe $\sum \alpha_2^H$,

B - zasadowe wiązania wodorowe $\sum \beta_2^H$,

L - współczynnik podziału faza gazowa - heksadekan,

S - stosunek dipolarności do polaryzowalności π_2^H ,

E - nadmiarowa refrakcja molowa (R_2),

V - charakterystyczna objętość molekularna McGowan V_x ,

DIP - moment dipolowy,

$\log P$ - wartość eksperymentalna, wyznaczona poprzez ekstrapolację logarytmu współczynnika retencji do zaniku stężenia modyfikatora w fazie ruchomej, a, b, l, s, e, v, q, p są to parametry korelacji wyznaczone za pomocą metody najmniejszych kwadratów z eliminacją członów statystycznie nieistotnych.

Oba enancjomery posiadają identyczne deskryptory jednakże ich separacja jest możliwa dzięki temu, iż tworzą dwa różne diastereomeryczne kompleksy z fazą stacjonarną. W związku z tym współczynnik rozdzielania (α) może być przedstawiony za pomocą równania :

$$\log k_2 - \log k_1 = \log \alpha = (\Delta a)A + (\Delta b)B + (\Delta l)L + (\Delta s)S + (\Delta e)E + (\Delta v)V + (\Delta q)DIP + (\Delta p)\log P \quad (17)$$

Na tej podstawie wyliczone zostały parametry Δ odnoszące się do zmian czynników energii oddziaływań odpowiedzialnych za obserwowaną enancjoselektywność.

1. Wpływ środowiska achiralnego na rozróżnienie chiralne pochodnych pirydyno-2-onu na kolumnie cyklodekstrynowej

W pierwszej części pracy wyznaczono parametry chromatograficzne dla związków modelowych na kolumnie cyklodekstrynowej Cyclobond I DMP. Jak podano w części literaturowej, kolumna ta może być stosowana w trzech różnych układach faz ruchomych: fazach normalnych, fazach odwróconych i polarnych fazach organicznych. Uzyskane wyniki dla różnych faz ruchomych ukazujące wpływ zmiany składu eluentu na retencję i selektywność przedstawione zostały w dalszej części tego rozdziału. Ponadto zamieszczone zostały parametry korelacji współczynników retencji $\log k$ z deskryptorami związków modelowych dla poszczególnych układów chromatograficznych wyliczone na podstawie równania (16) oraz parametry Δ odnoszące się do zmian czynników odpowiedzialnych za obserwowaną enancjoselektywność wyliczone na podstawie równania (17).

1.1 Fazy normalne

W układach faz normalnych stosowano mieszaninę n-heksanu z modyfikatorami organicznymi izopropanolem (IPA) lub etanolem (EtOH). Badano również wpływ niewielkiego dodatku wody (0,2%) dla każdego z dwóch układów n-heksan : alkohol. Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 8.

Retencja

Zamiana etanolu na izopropanol w mieszaninie z n-heksanem spowodowała znaczne wydłużenie czasów retencji badanych związków. Etanol jest bardziej polarnym rozpuszczalnikiem i jego siła elucji jest większa od izopropanolu. Dlatego też w celu uzyskania podobnej retencji badanych związków dla obu modyfikatorów stosowano większe stężenie izopropanolu niż etanolu (40% IPA i 15% EtOH). Kolejność wymywania badanych związków z kolumny cyklodekstrynowej jest w przybliżeniu jednakowa dla obu alkoholi, jak również dla faz z niewielkim dodatkiem wody.

Na podstawie analizy QSRR (patrz część doświadczalna, punkt 8) można zauważyć, iż dominujące oddziaływania w mechanizmie retencji badanych związków w układzie faz normalnych to wiązania wodorowe. Wskazują na to dodatnie wartości parametrów regresji a i b (patrz Tabela 11, str 86). Poza tym również oddziaływania hydrofobowe reprezentowane przez wkłady v i l jak również oddziaływania zależne od polaryzowalności cząsteczek częściowo reprezentowane przez refrakcję molową (e) mogą wpływać na retencję badanych związków.

W fazach ruchomych z etanolem i izopropanolem jako modyfikatorami fazy ruchomej udało się dobrze skorelować dane wykorzystując tylko dwa czynniki: dodatni czynnik b reprezentujący zasadowe wiązania wodorowe analitu z fazą stacjonarną oraz ujemny czynnik v . Na tej podstawie można stwierdzić, iż mechanizm oddziaływania analitu z fazą stacjonarną w tych dwóch fazach ruchomych może być podobny. Prawdopodobnie polarne cząsteczki fazy ruchomej (etanol, izopropanol) adsorbują się na fazie stacjonarnej tworząc wiązania wodorowe z grupą C=O reszty karbaminianowej fazy stacjonarnej. Unieruchomienie grupy C=O powoduje, iż badane związki oddziałują z fazą stacjonarną tworząc wiązania wodorowe z grupą NH reszty karbaminianowej fazy stacjonarnej, o czym może świadczyć dodatni współczynnik regresji b .

Tabela 8. Parametry retencji i enancjoselektywności związków modelowych na kolumnie Cyclobond I DMP w układzie faz normalnych.

Związek modelowy	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)				n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)				n-heksan/IPA (60/40 v/v)				n-heksan/IPA/H ₂ O (60/40/0,2 v/v/v)			
	k ₁	k ₂	α	α teoret.	k ₁	k ₂	α	α teoret.	k ₁	k ₂	α	α teoret.	k ₁	k ₂	α	α teoret.
Ph1	10,3	10,8	1,05	1,04	9,9	10,3	1,04	1,02	11,4	11,7	1,03	1,02	11,7	12,1	1,03	1,01
Ph2	6,6	7,0	1,06	1,06	6,8	7,2	1,06	1,07	5,1	5,3	1,04	1,03	5,6	5,9	1,05	1,06
Ph3	7,0	7,2	1,03	1,04	6,5	6,6	1,02	1,03	5,4	5,4	1,00	1,01	4,9	4,9	1,00	1,00
Ph4	6,0	6,1	1,02	1,04	5,3	5,4	1,02	1,04	4,5	4,5	1,00	1,01	4,0	4,0	1,00	1,00
Ph5	5,0	5,1	1,02	1,05	4,4	4,5	1,02	1,04	4,5	4,5	1,00	1,01	3,7	3,7	1,00	1,00
Ph6	8,9	9,2	1,03	1,04	7,0	7,6	1,08	1,03	7,1	7,1	1,00	1,01	5,9	5,9	1,00	1,00
MeO1	13,2	13,2	1,00	1,02	12,5	12,5	1,00	1,01	18,5	18,5	1,00	1,00	17,1	17,1	1,00	1,01
MeO2	7,0	7,6	1,09	1,04	6,2	6,6	1,06	1,06	6,5	6,8	1,05	1,01	5,9	6,2	1,05	1,05
MeO3	9,1	9,4	1,03	1,02	7,7	7,9	1,03	1,02	7,4	7,4	1,00	0,99	6,5	6,5	1,00	1,00
MeO4	6,9	7,1	1,03	1,02	6,3	6,4	1,02	1,03	5,2	5,2	1,00	1,00	5,2	5,2	1,00	1,00
MeO5	5,8	6,0	1,03	1,03	5,2	5,5	1,06	1,03	4,5	4,5	1,00	1,00	4,3	4,3	1,00	1,00
MeO6	5,7	5,9	1,04	1,02	5,8	5,9	1,02	1,03	4,9	4,9	1,00	0,99	5,0	5,0	1,00	1,00
Cl1	9,3	9,5	1,02	1,04	7,6	7,7	1,01	1,02	10,6	10,6	1,00	1,02	8,8	8,8	1,00	1,01
Cl2	4,8	5,3	1,10	1,07	4,2	4,5	1,07	1,07	3,7	3,9	1,05	1,03	3,0	3,2	1,07	1,06
Cl6	4,2	4,3	1,02	1,04	3,4	3,5	1,03	1,03	3,3	3,3	1,00	1,01	2,9	2,9	1,00	1,00

α teoret.- zostały uzyskane z obliczeń k₁ i k₂ z równania regresji (16) (deskryptory Tabela 7) oraz ze wzoru $\alpha=k_2/k_1$.

Natomiast ujemny parametr ν sugeruje, że oddziaływania hydrofobowe oraz wielkość cząsteczki analizowanego związku mogą wpływać na zmniejszenie jego retencji. Niewykluczone, że ma to związek z zaadsorbowanymi na fazie stacjonarnej cząsteczkami etanolu i izopropanolu, które w ten sposób mogą zwiększać jej polarność, bądź też z solwatacją analitu przez cząsteczki z fazy ruchomej, przez co dostęp do miejsc wiążących staje się utrudniony.

Niewielki dodatek wody do faz normalnych powoduje wzrost polarności fazy ruchomej. Można, więc oczekiwać, iż w pewnym stopniu będzie wpływać na obniżenie współczynnika retencji k . W przypadku fazy z etanolem niewielki dodatek wody (0,2%) powoduje obniżenie współczynników retencji większości badanych związków (z wyjątkiem Ph2 i MeO6). Natomiast w fazie z izopropanolem powyższa sugestia nie sprawdza się dla związków Ph1, Ph2, MeO4, MeO6, których retencja jest dłuższa w układzie z dodatkiem wody. Tak więc dodatek wody wpływa zarówno na skrócenie jak i wydłużenie czasów retencji, a zatem jego wpływu nie da się wyjaśnić jedynie zmianą polarności fazy ruchomej.

Analiza równań QSRR pokazuje, iż w przypadku niewielkiego dodatku wody do fazy ruchomej ujawniają się różnorodne oddziaływania wpływające na mechanizm retencji badanych związków. Woda w fazie ruchomej powoduje, iż oba typy wiązań wodorowych (określane jako zasadowe, kwasowe [122,130]) mają znaczenie w objaśnieniu retencji badanych związków, o czym świadczą dodatnie parametry a i b . Natomiast oddziaływania hydrofobowe oraz oddziaływania związane z polaryzowalnością cząsteczki (parametry l , e) wpływają na zmniejszenie parametrów retencji. Podobnie jak cząsteczki etanolu i izopropanolu cząsteczki wody mogą również konkurować w obsadzaniu miejsc aktywnych na fazie stacjonarnej. Mogą one tworzyć wiązania wodorowe zarówno z grupą C=O jak i z grupą NH reszty karbaminianowej fazy stacjonarnej. Zaadsorbowane cząsteczki wody mogą oddziaływać z analizowanymi związkami zarówno jako akceptory jak i donory wiązania wodorowego z wyjątkiem związków Ph2, MeO2, Cl2, które nie mają grupy, która mogłaby być donorem wiązania wodorowego.

Pierwsze w kolejności związki z każdej grupy oznaczone Ph1, MeO1, Cl1 mają najdłuższe retencje we wszystkich czterech fazach ruchomych. Związki te najsilniej oddziałują z fazą stacjonarną prawdopodobnie dzięki tworzeniu silniejszego wiązania wodorowego poprzez grupę hydroksylową znajdującą się w pozycji R₁ w porównaniu

do wiązań wodorowych tworzonych przez pozostałe związki. Ponadto wielkość (objętość cząsteczki) i geometria (kształt 3-D) cząsteczki nie mogą być pominięte. Rozpatrując pozostałe związki w grupach wymywają się one w kolejności wzrostu wielkości cząsteczek (wyjątek stanowi związek Ph6).

Porównując badane związki w grupach: Ph, OMe, Cl można zauważyć, że związki z grupą metoksyową mają większe wartości współczynników retencji, natomiast związki posiadające grupę Cl mają mniejsze wartości współczynników retencji w stosunku do odpowiednich związków z grupy Ph. Wyjątek stanowi tu MeO6, (substancja z rozgałęzionym łańcuchem jako podstawnikiem w pozycji R₁). Wzrost współczynnika retencji może być spowodowany obecnością dodatkowego wiązania wodorowego, które może tworzyć się pomiędzy grupą metoksyową a fazą stacjonarną [71]. W rezultacie porównania wkładów *bB* do równań QSRR poszczególnych związków można stwierdzić, iż największy wkład w tworzenie wiązań wodorowych wykazują związki z grupy OMe.

Dla związków z grupy Ph i OMe z podstawnikiem N-alkilokarbamailoksowym w pozycji R₁ współczynniki retencji zmniejszają się wraz ze zwiększeniem długości łańcucha w podstawniku. Zwiększenie się hydrofobowości cząsteczki może sprzyjać lepszej solwatacji przez hydrofobowy rozpuszczalnik i w ten sposób blokować oddziaływania z fazą stacjonarną i skracać czas retencji. Wyjątek stanowi związek z rozgałęzionym łańcuchem: Ph6, dla którego współczynnik retencji jest największy we wszystkich fazach.

Enancjoselektywność

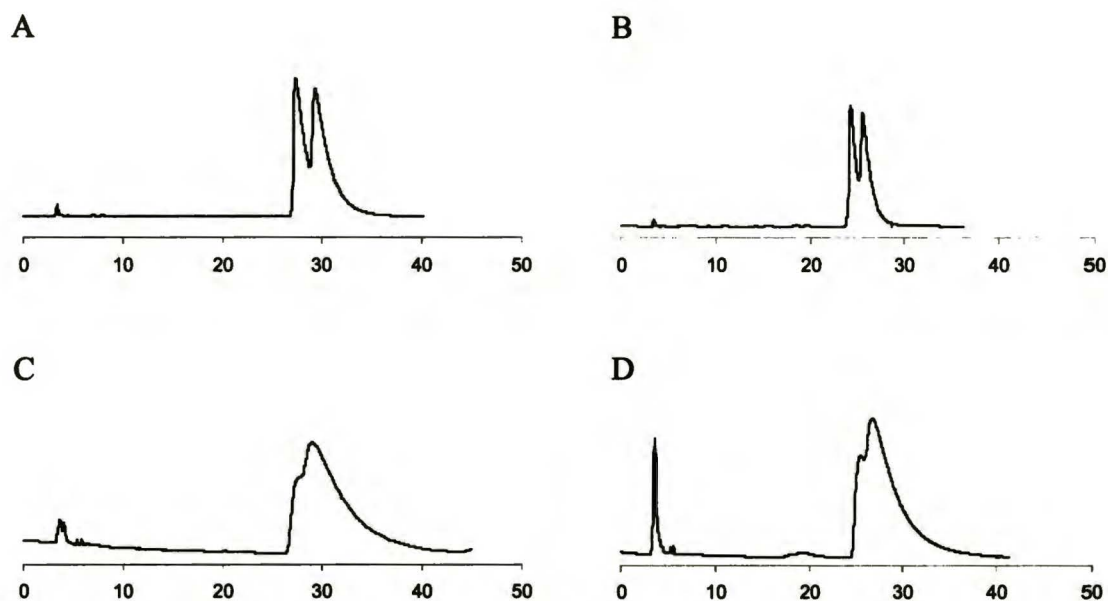
Zastosowanie fazy ruchomej n-heksanu z izopropanolem jako alkoholowym modyfikatorem fazy ruchomej daje w wyniku rozróżnienia chiralne tylko dla czterech związków: Ph1, Ph2, MeO2, Cl2. Zamiana IPA na etanol powoduje rozróżnienie chiralne wszystkich związków z wyjątkiem MeO1.

Mały dodatek wody do fazy ruchomej z etanolem w niewielkim stopniu obniża enancjoseparację Ph1, Ph3, MeO2, MeO4, MeO6, Cl1, Cl2 natomiast zwiększa enancjoseparację pozostałych związków. W przypadku fazy z izopropanolem dodatek wody powoduje lepsze rozdzielanie dwóch związków Ph2 i Cl2. Ponadto kształt pików wskazuje, iż po dodaniu wody do fazy ruchomej wzrasta sprawność układu.

Analiza parametrów Δ (Tabela 12, str 87) pokazuje iż dominujący wpływ na enancjoseparację badanych związków w układzie z etanolem i izopropanolem mają oddziaływania międzycząsteczkowe określane jako zasadowe wiązania wodorowe [122,130] oraz w mniejszym stopniu oddziaływania hydrofobowe. Jednakże w przypadku fazy z izopropanolem wartości te są znacznie mniejsze. Oznacza to, iż różnice oddziaływań enancjomerów w tej fazie z fazą stacjonarną są niewielkie. W przypadku faz z niewielkim dodatkiem wody istotny wkład do enancjoseparacji wnoszą różnice w tworzeniu kwasowych wiązań wodorowych enancjomerów z fazą stacjonarną.

W układzie faz normalnych najlepsze rozdzielania uzyskano dla związków z grupą acetoksyłową w pozycji R_1 (Ph2, MeO2, Cl2). Na Rys. 41 przedstawiono wpływ zmiany modyfikatora organicznego i dodatku wody w fazie ruchomej na enancjoselektywność związku MeO2.

Chociaż większy współczynnik retencji oznacza silniejsze oddziaływanie związku z fazą stacjonarną, nie zawsze jest to związane z lepszą selektywnością. Przykładem są związki Cl2, MeO6 i Ph2, które mimo iż wymywały się stosunkowo szybko z kolumny rozdzielały się lepiej ($\alpha=1,1$; 1,04; 1,06 odpowiednio w układzie faz z etanolem); niż związki Cl1, MeO3, MeO1, które dłużej oddziaływały z fazą stacjonarną ($\alpha =1,02$; 1,03; 1,00 odpowiednio w układzie faz z etanolem).



Rys. 41. Związek MeO2 w układzie faz normalnych w czterech różnych fazach ruchomych:

- (A) n-heksan/EtOH (85/15 v/v),
- (B) n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v),
- (C) n-heksan/IPA (90/10 v/v),
- (D) n-heksan/IPA/H₂O (90/10/0,2 v/v/v).

1.2 Fazy odwrócone

W układzie faz odwróconych przebadano związki modelowe w dwóch fazach ruchomych woda : acetonitryl w pH=3,2 i pH=5,2. W fazie o wyższym pH retencja związków była dużo większa, więc aby ją zmniejszyć zwiększono stężenie acetonitrylu z 5% do 10%. Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 9.

Retencja

Badane związki w układach faz odwróconych wymywają się w odwróconej kolejności w porównaniu do faz normalnych. Tak, więc np. związki Ph1, MeO1 wymywane jako ostatnie w układzie faz normalnych w fazach odwróconych wymywają się teraz w pierwszej kolejności.

Tabela 9. Parametry retencji i enancjoselektywności związków modelowych na kolumnie Cyclobond I DMP w układzie faz odwróconych.

Związek modelowy	H ₂ O/ACN (95/5 v/v) 0,1% trietyloamina+kwas octowy pH=3,2				H ₂ O/ACN (90/10 v/v) 0,1% trietyloamina+kwas octowy pH=5,2			
	k ₁	k ₂	α	α teoret.	k ₁	k ₂	α	α teoret.
Ph1	1,5	1,7	1,13	1,09	2,3	2,4	1,04	1,04
Ph2	3,8	4,3	1,13	1,15	15,5	16,2	1,05	1,05
Ph3	2,9	3,2	1,10	1,11	7,2	7,4	1,03	1,03
Ph4	6,2	6,8	1,10	1,09	13,4	13,9	1,04	1,04
Ph5	12,1	13,4	1,11	1,07	25,3	26,9	1,06	1,05
Ph6	2,7	3,0	1,10	1,08	-	-	-	1,03
MeO1	0,9	0,9	1,00	1,03	1,7	1,7	1,00	1,00
MeO2	2,1	2,2	1,05	1,08	6,5	6,7	1,03	1,02
MeO3	2,2	2,4	1,09	1,04	4,6	4,6	1,00	0,99
MeO4	4,4	4,4	1,00	1,02	7,8	7,8	1,00	1,01
MeO5	8,8	8,8	1,00	1,00	13,6	13,9	1,02	1,02
MeO6	3,7	3,7	1,00	1,01	6,7	6,7	1,00	1,00
C11	3,0	3,3	1,11	1,09	4,5	4,7	1,03	1,05
C12	7,4	8,4	1,14	1,15	22,0	23,4	1,06	1,07
C16	10,3	10,7	1,04	1,08	29,3	30,2	1,03	1,03

α teoret.- zostały uzyskane z obliczeń k₁ i k₂ z równania regresji (16) (deskryptory

Tabela 7) oraz ze wzoru $\alpha=k_2/k_1$.

Dla obu układów faz odwróconych uzyskano bardzo dobrą korelację parametrów regresji ($R^2 = 0,94-0,99$ patrz Tabela 11, str 86). Uzyskane wyniki pokazują, iż w fazach odwróconych oddziaływania odpowiedzialne za retencję badanych związków znacznie różnią się od oddziaływań w fazach normalnych. Również zmiana pH fazy ruchomej wpływa na zmianę oddziaływań między analitem a fazami ruchomą i stacjonarną. W fazie ruchomej o wyższym pH zwiększa się różnorodność oddziaływań wpływających na retencje badanych związków.

Analiza QSRR pokazuje, że zasadowe wiązanie wodorowe oraz oddziaływania dipol-dipol w fazach odwróconych wpływają na skrócenie czasów retencji (ujemne wartości współczynników *b* i *s*). Analizowane związki tworzą silniejsze wiązania

wodorowe ze składnikami fazy ruchomej niż fazy stacjonarnej. Prawdopodobnie woda łączy się z polarnymi częściami cząsteczki za pomocą wiązań wodorowych solwując polarną część cząsteczki i wpływając w ten sposób na skrócenie czasów retencji analitów. Mechanizm retencji w układzie faz odwróconych oparty jest na koncepcji tworzenia się kompleksów inkluzyjnych niepolarnych fragmentów cząsteczki z cyklodekstryną. Jest to dobrze widoczne w przypadku związków z podstawnikiem N-alkilokarbamailoksowym w pozycji R₁. Wzrost retencji dla związków o coraz dłuższym łańcuchu w pozycji R₁ sugeruje, że węglowodorowe łańcuchy inkludują we wnęce cyklodekstryny powiększając wzajemne oddziaływanie. Wraz ze wzrostem długości łańcucha w podstawniku zwiększają się czasy retencji związków (odwrotnie niż w fazach normalnych Rys. 42, 43). Natomiast związki z podstawnikiem z łańcuchem rozgałęzionym zachowują się inaczej. Ich czasy retencji są krótsze, co może świadczyć o zawadzie przestrzennej, która utrudnia wejście cząsteczki do wnęki cyklodekstryny.

Pierwsze w kolejności związki z każdej grupy Ph1, Cl1, MeO1 mają najkrótsze czasy retencji w obu fazach ruchomych (odwrotnie niż w fazach normalnych). Może być to spowodowane tym, iż związki te, silniej oddziałują z fazą ruchomą za pomocą wiązań wodorowych i oddziaływań dipol-dipol. Oddziaływania niepolarnych fragmentów cząsteczek z wnęką cyklodekstryny (w tych przypadkach grupy aromatycznej) są dużo słabsze w porównaniu do oddziaływań z fazą ruchomą.

Porównując badane związki w grupach Ph, Cl, OMe widać, że obecność grupy metoksylowej wpływa na zmniejszenie współczynników retencji (z wyjątkiem związku MeO6 w pH=3,2), natomiast obecność grupy Cl wpływa na zwiększenie współczynników retencji w stosunku do związków grupy Ph. Silniejsze oddziaływanie związków z podstawnikiem Cl na pierścieniu fenylovym z fazą stacjonarną może być spowodowane silniejszym powinowactwem tej grupy do wnęki cyklodekstryny [65]. Ponadto grupa metoksylova może tworzyć wiązania wodorowe z cząsteczkami wody z fazy ruchomej, co może utrudniać inkluzję grupy aromatycznej do wnęki cyklodekstryny.

Enacjoselektywność

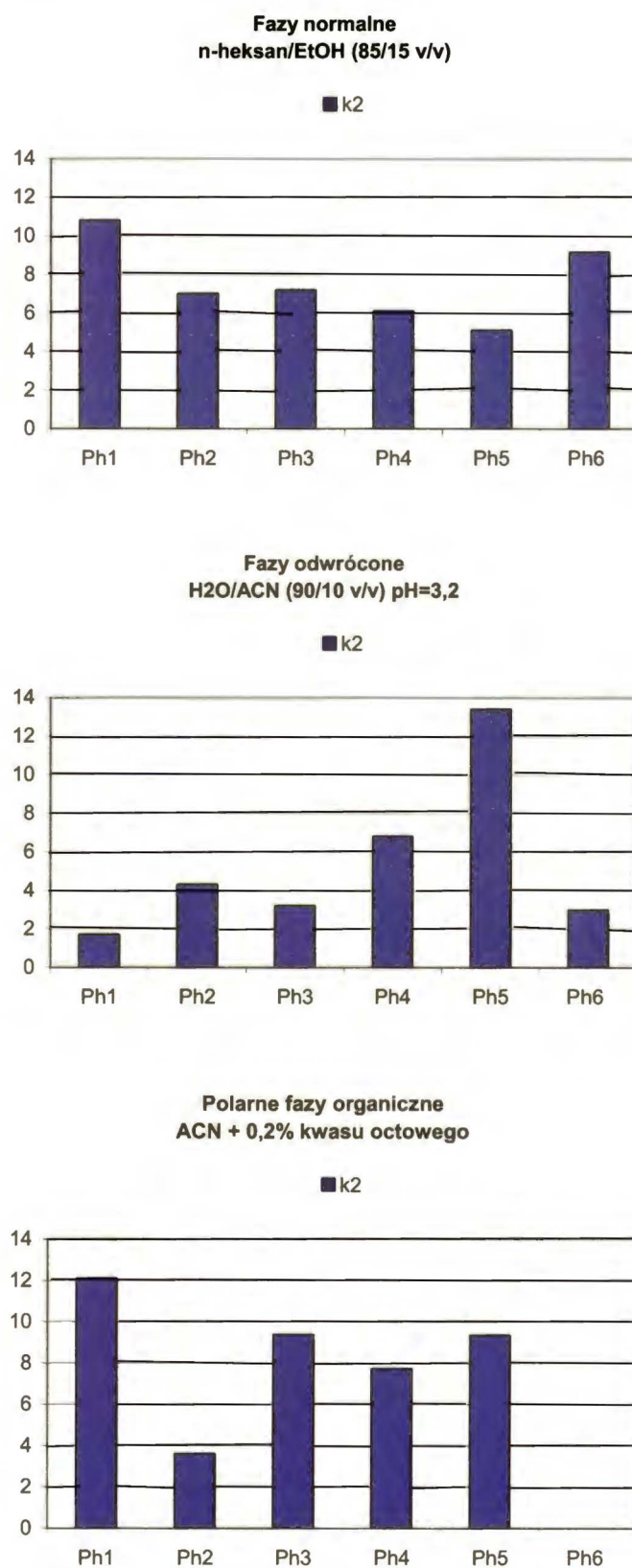
Badane związki dużo lepiej rozdzielają się w fazie ruchomej w pH=3,2 z wyjątkiem związku MeO5.

Najlepiej rozdzielają się związki z grupy Ph, natomiast związki z grupy OMe nie rozdzielają się z wyjątkiem MeO2, MeO3 w pH=3,2 i MeO2 i MeO5 w pH=5,2. Prawdopodobnie przyczyną są właściwości grupy metoksylowej, która może tworzyć wiązanie wodorowe ze składnikami fazy ruchomej. W ten sposób może powstawać zawada steryczna uniemożliwiająca tworzenie wiązania odpowiedzialnego za rozróżnienie chiralne. Obecność grupy aromatycznej w związkach modelowych prawdopodobnie ma znaczenie dla ich rozróżnienia chiralnego.

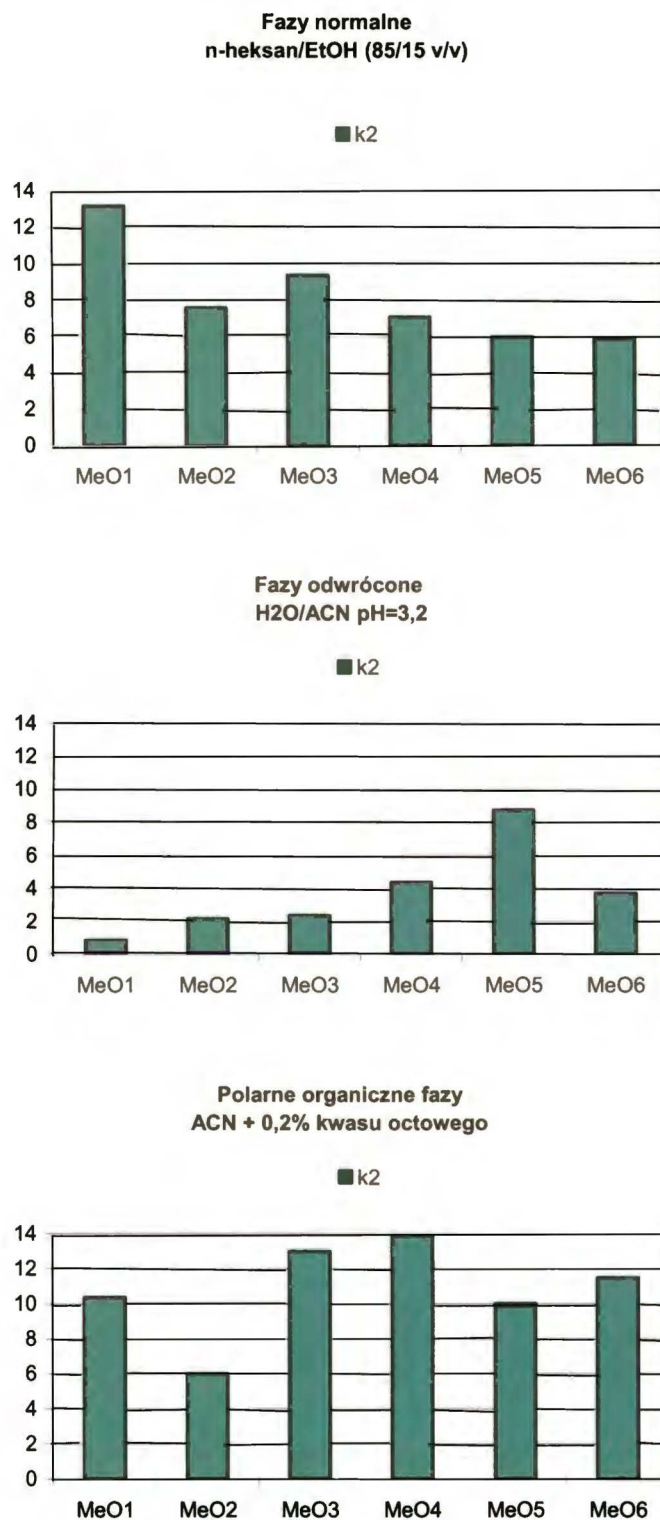
Na podstawie analizy parametrów Δ (Tabela 12, str. 87) można zauważyć, iż dla fazy ruchomej w pH=3,2 dominujące oddziaływania wpływające na zróżnicowanie oddziaływań enancjomerów związków modelowych to oddziaływania elektrostatyczne dipol - dipol indukowany oraz oddziaływania określane jako zasadowe wiązania wodorowe. W fazie ruchomej o pH=5,2 oddziaływaniami wpływającymi na rozróżnienie chiralne są zasadowe wiązania wodorowe, natomiast oddziaływania dipol - dipol indukowany można zaniedbać. Może to wskazywać, iż zmiana pH fazy ruchomej wpływa na zmianę proporcji wkładów do oddziaływań odpowiedzialnych za rozróżnienie chiralne badanych związków.

W układach faz odwróconych dłuższy czas retencji nie koreluje się z lepszą selektywnością. Separacja związków MeO3, MeO2, Ph1 ($\alpha=1,09$; 1,05; 1,13 w fazie H₂O/ACN (95/5 v/v) + TEA +AA pH=3,2) które szybciej wymywane są z kolumny jest lepsza niż związków MeO4, MeO5, Cl6 ($\alpha=1,00$; 1,00; 1,04 w fazie H₂O/ACN (95/5 v/v) + TEA +AA pH=3,2), które dłużej oddziałują z fazą stacjonarną.

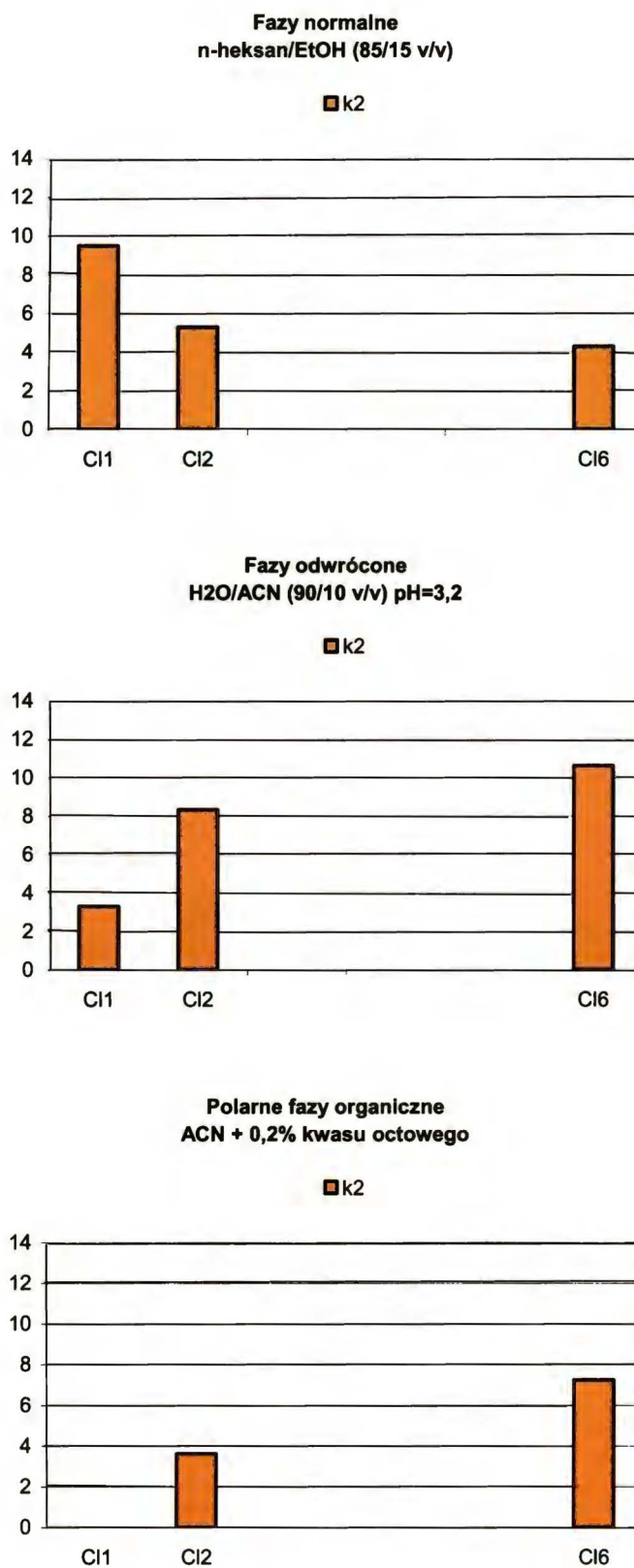
W fazach odwróconych uzyskano większe współczynniki enancjoselektywności badanych związków niż w układach faz normalnych z wyjątkiem związków z grupy MeO.



Rys. 42. Porównanie współczynników retencji k_2 związków modelowych z grupy Ph w trzech układach faz ruchomych.



Rys. 43. Porównanie współczynników retencji k_2 związków modelowych z grupy OMe w trzech układach faz ruchomych.



Rys. 44. Porównanie współczynników retencji k₂ związków modelowych z grupy CI w trzech układach faz ruchomych.

1.3 Polarne fazy organiczne

Związki modelowe badane były w dwóch ruchomych polarnych fazach organicznych: acetonitryl z dodatkiem kwasu octowego oraz acetonitryl z dodatkiem trietyloaminy i kwasu octowego. Wyniki dla tych faz zostały umieszczone w Tabeli 10.

Tabela 10. Parametry retencji i enancjoselektywności związków modelowych na kolumnie Cyclobond I DMP w polarnych fazach organicznych.

Związek modelowy	ACN + 0,2% kwas octowy				ACN + 0,1% trietyloamnia +kwas octowy			
	k_1	k_2	α	α teoret.	k_1	k_2	α	α teoret.
Ph1	10,9	12,1	1,11	1,07	1,5	1,5	1,00	0,97
Ph2	3,6	3,6	1,00	1,02	0,6	0,7	1,13	1,24
Ph3	9,2	9,4	1,02	1,02	0,8	0,8	1,00	1,00
Ph4	7,5	7,7	1,03	1,03	0,7	0,7	1,00	1,01
Ph5	8,8	9,3	1,06	1,03	0,7	0,7	1,03	1,03
Ph6	-	-	-	1,03	1,4	1,4	1,00	1,01
MeO1	10,0	10,4	1,03	1,06	1,0	1,0	1,00	0,99
MeO2	5,7	6,0	1,06	1,05	0,5	0,7	1,23	1,27
MeO3	12,8	13,0	1,02	1,02	0,7	0,7	1,00	1,02
MeO4	13,4	13,9	1,04	1,04	0,5	0,5	1,00	1,03
MeO5	9,4	10,0	1,07	1,05	0,6	0,7	1,06	1,05
MeO6	11,3	11,5	1,02	1,05	0,4	0,4	1,00	1,03
C11	-	-	-	1,04	1,0	1,0	1,00	0,98
C12	3,5	3,6	1,05	1,02	0,5	0,6	1,22	1,26
C16	7,3	7,3	1,00	1,00	0,4	0,4	1,00	1,02

α teoret.- zostały uzyskane z obliczeń k_1 i k_2 z równania regresji (16) (deskryptory Tabela 7) oraz ze wzoru $\alpha=k_2/k_1$.

Retencja

Współczynniki retencji badanych związków mają mniejsze wartości w przypadku fazy z trietyloaminą i kwasem octowym niż w fazie z dodatkiem tylko kwasu octowego. Trietyloamina prawdopodobnie blokuje oddziaływania niespecyficzne, co z

kolei wpływa na poprawę kształtu pików i sprawność układu. Niestety, wpływa również na znaczne obniżenie wartości współczynników retencji wszystkich związków.

Analiza QSRR (Tabela 11, str. 86) wykazała dobrą korelację tylko dla układu ACN + kwas octowy ($R^2=0,94-0,95$). W przypadku drugiej fazy ACN + 0,1% trietyloamnia + kwas octowy korelacja jest słabsza ($R^2=0,64-0,73$). Może to wynikać z bardzo krótkich czasów retencji i występowania znacznych rozrzutów wyników.

Jak to było omówione w części literaturowej, w polarnych fazach organicznych, podobnie jak w fazach normalnych, rozpuszczalnik fazy ruchomej zajmuje wnękę cyklodekstryny, przez co anality nie tworzą związków inkluzyjnych z CD. Jednakże, co potwierdzają również badania QSRR, za retencję związków modelowych odpowiadają inne rodzaje oddziaływań w porównaniu do faz normalnych. Główny wkład w retencję związków w fazie ACN + kwas octowy mają prawdopodobnie oddziaływania elektrostatyczne dipol-dipol oraz zespół oddziaływań odpowiedzialnych za lipofilowość cząsteczek (dip i l). Natomiast oddziaływania hydrofobowe oraz wielkość (objętość) cząsteczki, jak również oddziaływania zależne od polaryzowalności cząsteczki powodują zwiększenie oddziaływań badanych związków z fazą ruchomą, przez co wpływają na zmniejszenie czasów retencji (ujemnie wartości e i ν).

Podobnie jak w fazach normalnych związki Ph1, MeO1, Cl1 mają najdłuższe czasy retencji. Jednakże pozostałe związki wymywają się w innej kolejności niż dla faz normalnych (Rys. 42, 43, 44), co sugeruje występowanie innego typu oddziaływań odpowiedzialnych za retencję badanych związków.

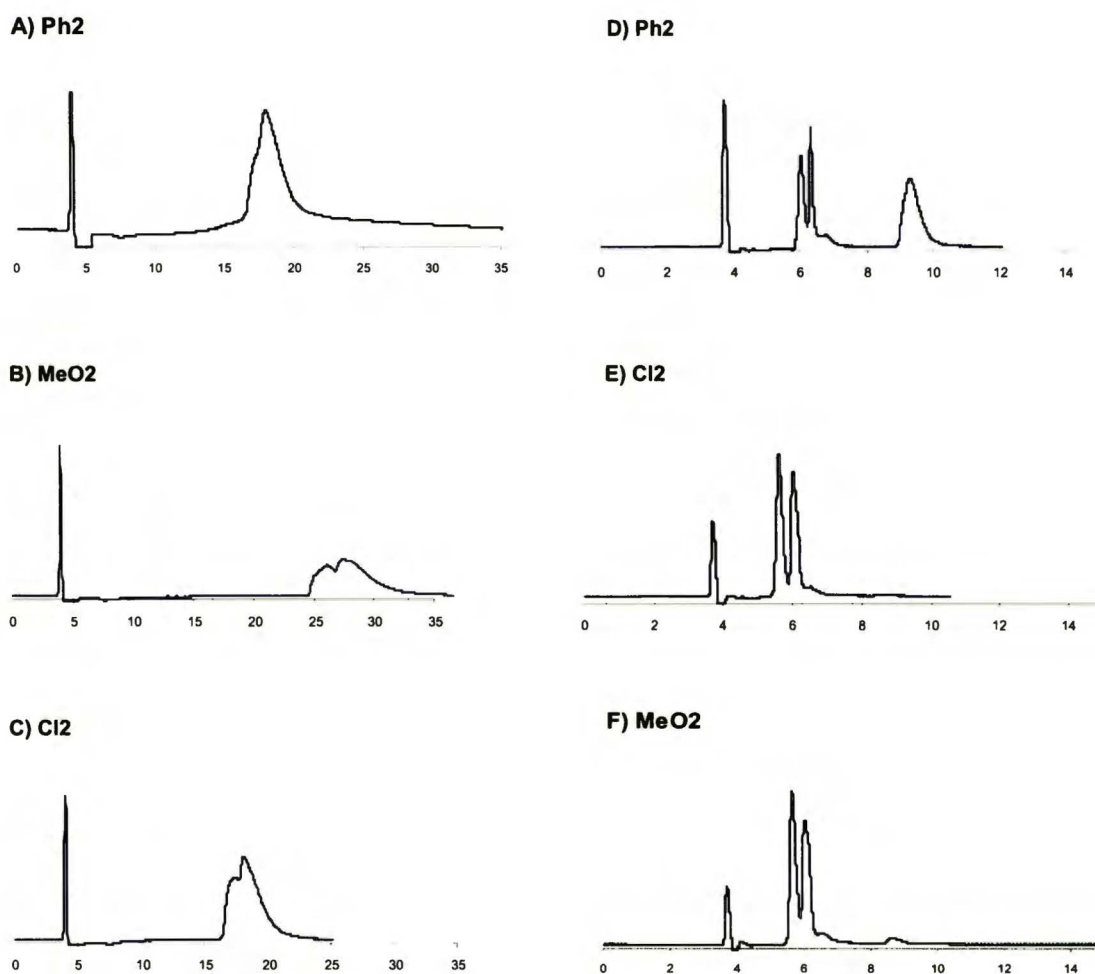
Enacjoselektywność

Trietyloamina wpływa silnie na obniżenie enacjoseparacji w większości przypadków. Jednakże dla trzech związków Ph2, MeO2, Cl2 powoduje najlepszą separację nie tylko w układzie faz polarnych (Rys. 45), ale również we wszystkich badanych układach faz.

Enacjoselektywność związków z podstawnikiem N-alkilokarbamailoksowym w pozycji R_1 w fazie acetonitryl z kwasem octowym wzrasta wraz z długością prostego łańcucha w podstawniku, natomiast separacja związku z podstawnikiem rozgałęzionym zmniejsza się.

Związek MeO1 rozdziela się tylko w jednej fazie ruchomej: acetonitryl z kwasem octowym.

Obliczone wartości parametru Δ (Tabela 12, str. 87) wskazują, iż różnice oddziaływań wpływających na chiralne rozróżnienie w fazie ACN + kwas octowy są niewielkie, natomiast w fazie ACN + trietyloamina + kwas octowy dominujący wpływ na enancjoselektywność układu mają kwasowe wiązania wodorowe.



Rys. 45. Porównanie wyników chromatograficznych dla związków w polarnych fazach ruchomych:

(A, B, C) związki w układzie ACN + 0,2 % kwasu octowego,

(D, E, F) związki w układzie ACN + 0,1% trietyloamina + kwas octowy.

Wyniki badań i dyskusja

Tabela 11. Parametry regresji dla kolumny Cyclobond I DMP w układach faz normalnych, fazach odwróconych, polarnych organicznych fazach.

Układ		log(k)	Współczynniki liniowego równania regresji (16)									
			d ₀	a	b	l	s	e	v	q	p	R ²
Fazy normalne	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)	log(k ₂)	1,462		1,973					-1,303		0,81
		log(k ₁)	1,227		2,099					-1,332		0,81
	n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)	log(k ₂)	4,512	1,896	2,346	-0,356			-1,312			0,91
		log(k ₁)	4,314	2,011	2,403	-0,364			-1,242			0,93
	n-heksan/IPA (60/40 v/v)	log(k ₂)	1,361		2,953					-2,058		0,90
		log(k ₁)	1,155		3,046					-2,062		0,89
n-heksan/IPA/H ₂ O (60/40/0,2 v/v/v)	log(k ₂)	2,230	1,425	3,483	-0,549						0,95	
	log(k ₁)	2,117	1,653	3,501	-0,547						0,94	
Fazy odwrócone	H ₂ O/ACN (95/5) pH=3	log(k ₂)	4,267		-7,219	1,354	-3,015					0,95
		log(k ₁)	3,689		-6,955	1,387	-3,249					0,94
	H ₂ O/ACN (90/10) pH=5	log(k ₂)	5,664	1,523	-6,187		-3,381		5,728	0,233	-0,272	0,99
		log(k ₁)	5,230	1,483	-5,953		-3,375		5,671	0,240	-0,283	0,99
Polarne organiczne fazy	ACN+AA	log(k ₂)	2,011			1,666		-2,265	-6,464	-0,187		0,95
		log(k ₁)	1,812			1,682		-2,265	-6,561	-0,167		0,94
	ACN+ TEA +AA	log(k ₂)	7,877	4,525		-0,248		-2,490				0,64
		log(k ₁)	7,914	5,702		-0,271		-2,455				0,73

Tabela 12. Parametry Δ odnoszące się do zmian energii oddziaływań odpowiedzialnych za obserwowaną enancjoselektywność dla kolumny Cyclobond I DMP w układach faz normalnych, fazach odwróconych, polarnych organicznych fazach.

		Parametry Δ , równanie (17)								
Układ		log	Δa	Δb	Δl	Δs	Δe	Δv	Δq	Δp
Fazy normalne	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)	$\log\alpha$		-0,127				0,029		
	n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)	$\log\alpha$	-0,116	-0,057	0,008		-0,070			
	n-heksan/IPA (60/40 v/v)	$\log\alpha$		-0,093				0,004		
	n-heksan/IPA/H ₂ O (60/40/0,2 v/v/v)	$\log\alpha$	-0,228	-0,017	-0,002					
Fazy odwrócone	H ₂ O/ACN (95/5) pH=3	$\log\alpha$		-0,264	-0,033	0,234				
	H ₂ O/ACN (90/10) pH=5	$\log\alpha$	0,040	-0,235		-0,006		0,056	-0,007	0,011
Polarne organiczne fazy	ACN+AA	$\log\alpha$			-0,017		0,000	0,097	-0,020	
	ACN+ TEA +AA	$\log\alpha$	-1,178		0,023		-0,035			

1.4 Podsumowanie i wnioski

Z przedstawionych wyników widać, że w celu efektywnego rozdzielania enancjomerów dobór odpowiedniej fazy ruchomej jest niezwykle ważny, ponieważ faza ruchoma może wpływać nie tylko na retencję, ale i na enancjoselektywność badanych związków.

W układzie faz normalnych dominujące oddziaływania w mechanizmie retencji związków modelowych to wiązania wodorowe. Zastosowanie etanolu jako modyfikatora fazy ruchomej powoduje znaczne skrócenie czasów retencji w porównaniu do fazy z IPA. W układzie faz normalnych związki lepiej się rozdzielają, kiedy organiczny modyfikator izopropanol zastąpimy etanolem. Natomiast dodatek wody wpływa w niewielkim stopniu na retencję jak również i na selektywność badanych związków powodując w niektórych przypadkach zwiększenie, a w innych zmniejszenie wartości obu parametrów. Tylko cztery związki: Ph1, Ph2, MeO2, Cl2 rozdzielają się we wszystkich fazach. Uzyskane różnice nie tylko w retencji, ale i w enancjoselektywności badanych związków mogą być spowodowane adsorpcją polarnych składników fazy ruchomej (etanol, izopropanol, woda) na fazie stacjonarnej. Mogą one w różny sposób zmieniać geometrię jej centrów aktywnych a przez to powodować zmianę oddziaływań międzycząsteczkowych w tworzeniu się diastereomerycznych kompleksów analitów z cyklodekstryną.

Zmiana chromatograficznego systemu z układu faz normalnych na układ faz odwróconych powoduje zmianę kolejności wymywania badanych związków. To zjawisko jest prawdopodobnie spowodowane tworzeniem kompleksów inkluzyjnych z cyklodekstryną w układzie faz odwróconych. Jeżeli badane związki tworzą kompleksy inkluzyjne z CD obecność grupy -OMe przyłączonej do pierścienia fenylogo odgrywa znaczącą rolę w rozróżnieniu chiralnym. Prawdopodobnie grupa ta tworząc wiązania wodorowe ze składnikami fazy ruchomej blokuje oddziaływania wpływające na enancjoselektywność analitów. Retencja i enancjoselektywność zależy od pH fazy ruchomej i w niższym pH związki rozdzielają się lepiej.

W układach polarnych faz organicznych mechanizm retencji związków modelowych, podobnie jak i w fazach normalnych, nie jest oparty na tworzeniu kompleksów inkluzyjnych z cyklodekstryną. Jednakże kolejność wymywania związków jest całkiem inna niż w powyżej omówionych fazach. Dominujące oddziaływania w

polarnych fazach organicznych to prawdopodobnie oddziaływania elektrostatyczne dipol-dipol. Dodatek trietyloaminy wprowadzie prowadzi do poprawienia sprawności systemu, jednakże w większości przypadków obniża separację badanych związków.

Porównując wszystkie układy najlepszy wynik został otrzymany dla związku MeO2 w fazie acetonitryl z trietyloaminą i kwasem octowym ($\alpha=1,23$). Związek MeO1 rozdziela się tylko w jednej fazie: acetonitryl z kwasem octowym. Ze wszystkich badanych związków Cl2 i MeO2 wykazują najlepszą enancjoseparację - rozdzielają się we wszystkich badanych układach faz ruchomych.

Przedstawione wyniki retencji i enancjoseparacji otrzymane w trzech różnych układach faz ruchomych uzupełnione analizą QSRR potwierdzają, że badane związki mogą oddziaływać z fazą stacjonarną w różny sposób. Różne są zatem mechanizmy odpowiedzialne za retencje oraz enancjoseparację w zależności od zastosowanego układu faz. Obliczone parametry współczynników rozdzielania (α) dla wszystkich układów chromatograficznych dobrze korelują się ze współczynnikami uzyskanymi eksperymentalnie.

Niestety, z powodu uzyskania względnie słabej enancjoselektywności badanych związków, kolumny Cyclobond I DMP nie można zastosować do praktycznej analizy oznaczania czystości enancjomerycznej pochodnych pirolidyn-2-onów.

2. Wpływ alkoholi na rozróżnienie chiralne pochodnych pirolidyno-2-onu na kolumnach polisacharydowych

Retencję i enancjoselektywność związków modelowych sprawdzono na trzech fazach polisacharydowych: Chiralpak AD i Chiralpak IA (pochodne amylozy) oraz Chiralcel OD (pochodna celulozy). Badania prowadzono w układzie faz normalnych stosując mieszaninę n-heksanu z etanolem lub izopropanolem. Dodatkowo dla obu alkoholi stosowano niewielki dodatek wody (0,2%) jako modyfikatora fazy ruchomej. Jak już wcześniej omówiono w części literaturowej alkohole i woda mogą współzawodniczyć z analitami w obsadzaniu miejsc aktywnych, jak również mogą zmieniać steryczne środowisko chiralnych wnęk i kanałów na polisacharydowych fazach stacjonarnych. Uzyskane wyniki wpływu zmiany składu eluentu na parametry chromatograficzne związków modelowych, parametry korelacji współczynników retencji ($\log k$) z desktyptorami związków modelowych w badanych układach wyliczone na podstawie równania (16) oraz parametry Δ odnoszące się do zmian czynników odpowiedzialnych za obserwowaną enancjoselektywność wyliczone na podstawie równania (17), przedstawione zostały w dalszej części tego rozdziału.

2.1 Kolumny amylozowe: Chiralpak AD i Chiralpak IA

Fazy stacjonarne Chiralpak AD i Chiralpak IA są to pochodne amylozy, które różnią się sposobem obsadzenia czynnika enancjoselektywnego na silikażelu (Chiralpak AD - powleczony, natomiast Chiralpak IA - unieruchomiony). Otrzymane wyniki wpływu modyfikatorów na retencję i enancjoselektywność jak również sposobu obsadzenia czynnika enancjoselektywnego przedstawiono w Tabelach 13 i 14. Natomiast Tabele 15 i 16 przedstawiają wliczone parametry regresji oraz parametry Δ dla poszczególnych układów na obu kolumnach.

Tabela 13. Parametry retencji i enancjoselektywności związków modelowych na kolumnie Chiralpak AD w układzie faz normalnych.

Chiralpak AD																
Związek modelowy	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)				n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)				n-heksan/IPA (90/10/ v/v)				n-heksan/IPA/H ₂ O (90/10/0,2 v/v/v)			
	k ₁	k ₂	α	α teoret.	k ₁	k ₂	α	α teoret.	k ₁	k ₂	α	α teoret.	k ₁	k ₂	α	α teoret.
Ph1	8,9	31,1	3,49	2,84	7,5	22,0	2,93	2,26	5,0	5,4	1,08	0,99	10,6	10,8	1,02	1,05
Ph2	3,2	5,3	1,65	1,26	3,3	5,2	1,55	1,73	3,6	4,3	1,21	1,12	6,4	8,0	1,26	1,22
Ph3	4,0	4,1	1,18	1,41	3,3	5,8	1,76	1,95	4,6	5,4	1,16	1,33	8,3	9,2	1,11	1,12
Ph4	3,7	4,3	1,17	1,36	3,0	5,4	1,81	1,94	4,2	4,8	1,14	1,26	7,2	8,2	1,13	1,16
Ph5	3,6	4,8	1,35	1,31	2,8	6,1	2,15	1,94	4,2	4,7	1,13	1,20	6,8	8,0	1,17	1,21
Ph6	4,0	5,0	1,25	1,31	3,6	6,6	1,83	1,80	4,6	5,6	1,22	1,24	10,7	13,3	1,24	1,18
MeO1	5,8	6,6	1,13	1,37	5,8	5,8	1,00	1,40	6,1	6,1	1,00	1,01	9,9	9,9	1,00	1,01
MeO2	3,2	4,2	1,31	1,32	2,8	3,6	1,30	1,09	3,7	4,1	1,11	1,14	8,0	8,8	1,11	1,18
MeO3	3,0	3,0	1,00	0,77	3,0	3,0	1,00	1,23	3,7	5,2	1,41	1,36	9,1	10,1	1,11	1,08
MeO4	2,9	2,9	1,00	1,07	1,2	1,7	1,43	1,23	3,4	4,9	1,44	1,29	6,8	8,1	1,19	1,13
MeO5	2,6	2,9	1,11	1,02	2,2	2,8	1,25	1,20	3,3	4,7	1,44	1,22	6,4	7,6	1,19	1,17
MeO6	2,2	2,2	1,00	1,03	1,8	2,0	1,09	1,14	2,7	3,4	1,25	1,26	5,4	6,1	1,13	1,14
Cl1	5,0	9,7	1,92	1,80	4,9	9,7	1,98	1,76	4,6	4,6	1,00	1,02	7,2	7,2	1,00	0,96
Cl2	2,3	2,9	1,26	1,67	2,0	2,6	1,29	1,40	2,6	2,9	1,11	1,16	4,0	4,7	1,19	1,13
Cl6	2,1	2,1	1,00	0,87	1,6	2,4	1,52	1,43	2,5	3,1	1,24	1,29	4,5	4,5	1,00	1,09

α teoret.- zostały uzyskane z obliczeń k₁ i k₂ z równania regresji (16) (deskrytory Tabela 7) oraz ze wzoru $\alpha = k_2/k_1$.

Tabela 14. Parametry retencji i enancjoselektywności związków modelowych na kolumnie Chiralpak IA w układzie faz normalnych.

Związek modelowy	Chiralpak IA													
	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)				n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)				n-heksan/IPA (80/20/ v/v)			n-heksan/IPA/H ₂ O (80/20/0,2 v/v/v)		
	k ₁	k ₂	α	α teoret.	k ₁	k ₂	α	α teoret.	k ₁	k ₂	α	k ₁	k ₂	α
Ph1	7,3	12,7	1,74	1,63	6,7	11,0	1,64	1,40	5,7	5,7	1,00	6,6	6,6	1,00
Ph2	3,7	4,3	1,17	1,06	3,4	4,0	1,19	1,10	5,9	5,9	1,00	3,1	3,1	1,00
Ph3	4,2	5,4	1,28	1,41	4,2	4,2	1,00	1,06	3,5	3,5	1,00	3,3	3,3	1,00
Ph4	3,8	5,1	1,32	1,43	4,0	4,0	1,00	1,04	2,9	2,9	1,00	3,0	3,0	1,00
Ph5	3,6	4,6	1,26	1,30	3,9	3,9	1,00	1,03	2,8	2,8	1,00	2,9	2,9	1,00
Ph6	3,6	4,4	1,22	1,20	3,5	3,7	1,07	1,13						
MeO1	6,0	10,4	1,72	1,63	5,7	7,6	1,33	1,52	5,1	5,1	1,00	6,2	6,2	1,00
MeO2	3,2	3,3	1,04	1,13	2,8	3,0	1,06	1,19	2,2	2,2	1,00	2,5	2,5	1,00
MeO3	3,0	4,1	1,37	1,49	2,9	3,5	1,22	1,14	3,4	3,4	1,00	3,9	3,9	1,00
MeO4	3,0	4,1	1,37	1,45	2,7	3,2	1,19	1,13	2,6	2,6	1,00	3,0	3,0	1,00
MeO5	2,9	3,9	1,35	1,28	2,5	3,0	1,19	1,12	2,8	2,8	1,00	2,9	2,9	1,00
MeO6	2,4	3,1	1,31	1,11	2,2	2,6	1,16	1,22	2,0	2,0	1,00	2,5	2,5	1,00
Cl1	6,2	7,4	1,19	1,37	5,3	6,9	1,31	1,35	3,7	3,7	1,00	4,6	4,6	1,00
Cl2	2,6	2,8	1,07	1,07	2,4	2,6	1,08	1,05	2,0	2,0	1,00	2,2	2,2	1,00
Cl6	2,3	3,3	1,47	0,94	2,3	2,6	1,16	1,08	2,1	2,1	1,00	2,2	2,2	1,00

α teoret.- zostały uzyskane z obliczeń k₁ i k₂ z równania regresji (16) (deskrytory Tabela 7) oraz ze wzoru $\alpha = k_2/k_1$.

Tabela 15. Parametry regresji dla kolumn Chiralpak IA i Chiralpak AD w układach faz normalnych.

Kolumna	Układ	Współczynniki liniowego równania regresji (16)										
		log	d ₀	a	b	l	s	e	v	q	p	R ²
Chiralpak IA	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)	log(k ₂)	13,127	3,400	-1,282	2,129	-4,109	-5,741	-6,403		-0,423	0,99
		log(k ₁)	8,889	3,942			-1,645	-1,972				0,94
	n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)	log(k ₂)	10,539	3,783		0,733	-1,963	-3,322	-3,131			0,99
		log(k ₁)	11,480	3,614	-0,885	1,046	-1,654	-4,204	-4,117			0,97
Chiralpak AD	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)	log(k ₂)	17,677	5,284	-3,442			-2,680		-0,391		0,92
		log(k ₁)	11,354	5,360			-1,789	-3,135				0,94
	n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)	log(k ₂)	18,900	9,502	-1,858	-0,379		-4,374				0,89
		log(k ₁)	10,778	5,275		-0,374		-2,335				0,84
	n-heksan/IPA (90/10 v/v)	log(k ₂)	7,180	3,747				-2,524	-0,384			0,68
		log(k ₁)	8,298	3,900			-0,959	-2,522				0,76
	n-heksan/IPA/H ₂ O (90/10/0,2 v/v/v)	log(k ₂)	9,289	4,325	1,080	-0,179		-3,711				0,72
		log(k ₁)	7,999	3,725	1,188			-3,225	-0,916			0,77

Tabela 16. Parametry Δ odnoszące się do zmian energii oddziaływań odpowiedzialnych za obserwowaną enancjoselektywność dla kolumn Chiralpak IA i Chiralpak AD w układach faz normalnych.

Kolumna	Układ	Parametry Δ , równanie (17)								
		log	Δa	Δb	Δl	Δs	Δe	Δv	Δq	Δp
Chiralpak IA	n-heksan/EtOH (85/15)	log(α)	-0,543	-1,282	2,129	-2,465	-3,768	-6,403		-0,423
	n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2)	log(α)	0,169	0,885	-0,313	-0,309	0,882	0,986		
Chiralpak AD	n-heksan/EtOH (85/15)	log(α)	-0,076	-3,442		1,789	0,455		-0,391	
	n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2)	log(α)	4,226	-1,858	-0,005		-2,039			
	n-heksan/IPA (90/10)	log(α)	-0,152			0,959	-0,003	-0,384		
	n-heksan/IPA/H ₂ O (90/10/0,2)	log(α)	0,600	-0,108	-0,179		-0,486	0,916		

Retencja

W celu uzyskania podobnych czasów retencji związków modelowych zastosowano stężenie 10% IPA na kolumnie Chiralpak AD, 20% IPA na kolumnie Chiralpak IA, natomiast stężenie etanolu wynosiło 15% dla obu faz. Otrzymano podobną kolejność wymywania związków dla obu alkoholi na kolumnie Chiralpak AD z wyjątkiem związków MeO3 i Cl1. Natomiast na kolumnie Chiralpak IA zamiana etanolu na izopropanol w mieszaninie z n-heksanem powoduje zmianę kolejności elucji dla większej liczby związków (MeO2, Ph5, Ph4, MeO3, Ph2). Dodatek wody do obu faz na obu kolumnach wprowadza liczne zmiany z wyjątkiem związków: Cl6, MeO6, Cl2 wymywanych z kolumn w pierwszej kolejności we wszystkich fazach ruchomych oraz związków MeO1 i Ph1, które wymywane są, jako ostatnie. Porównując dwie kolumny Chiralpak AD i Chiralpak IA kolejność elucji związków (z wyjątkiem związku Ph6) jest taka sama tylko w fazie z etanolem. Na obu fazach stacjonarnych rozrzut retencji jest dużo szerszy w przypadku zastosowania etanolu zamiast izopropanolu, jako modyfikatora fazy ruchomej.

Analiza QSRR (patrz część doświadczalna, punkt 8) pokazuje, iż na mechanizm retencji badanych związków na kolumnach amylozowych wpływa wiele różnych oddziaływań. Należą do nich przede wszystkim wiązania wodorowe (czynniki *a* i *b*), ale również oddziaływania elektrostatyczne dipol-dipol lub dipol - dipol indukowany, o czym świadczą wkłady *s* i *q*, oddziaływania zależne od polaryzowalności reprezentowane przez refrakcję molową (*e*) oraz oddziaływania hydrofobowe (czynniki *v* i *l*) (patrz Tabela 15). Warto zauważyć, iż na kolumnach amylozowych odwrotnie niż w układzie faz normalnych na kolumnie cyklodekstrynowej oddziaływania określane jako kwasowe wiązania wodorowe odgrywają dominującą rolę w mechanizmie retencji.

Retencja związków modelowych na kolumnie Chiralpak AD w fazach ruchomych zarówno w fazie z etanolem jak i izopropanolem zależy głównie od tworzenia wiązań wodorowych (dodatni parametr *a*) natomiast oddziaływania związane z polaryzowalnością cząsteczki (czynnik *e*) wpływają na obniżenie współczynników retencji. Analiza równań QSRR pokazuje, iż również sposób obsadzenia czynnika chiralnego wpływa na zmianę oddziaływań badanych związków z fazą stacjonarną. Na kolumnie Chiralpak IA w fazie z etanolem dodatkowo oddziaływania hydrofobowe (czynniki *l* i *v*) jak również oddziaływania dipol - dipol indukowany reprezentowane

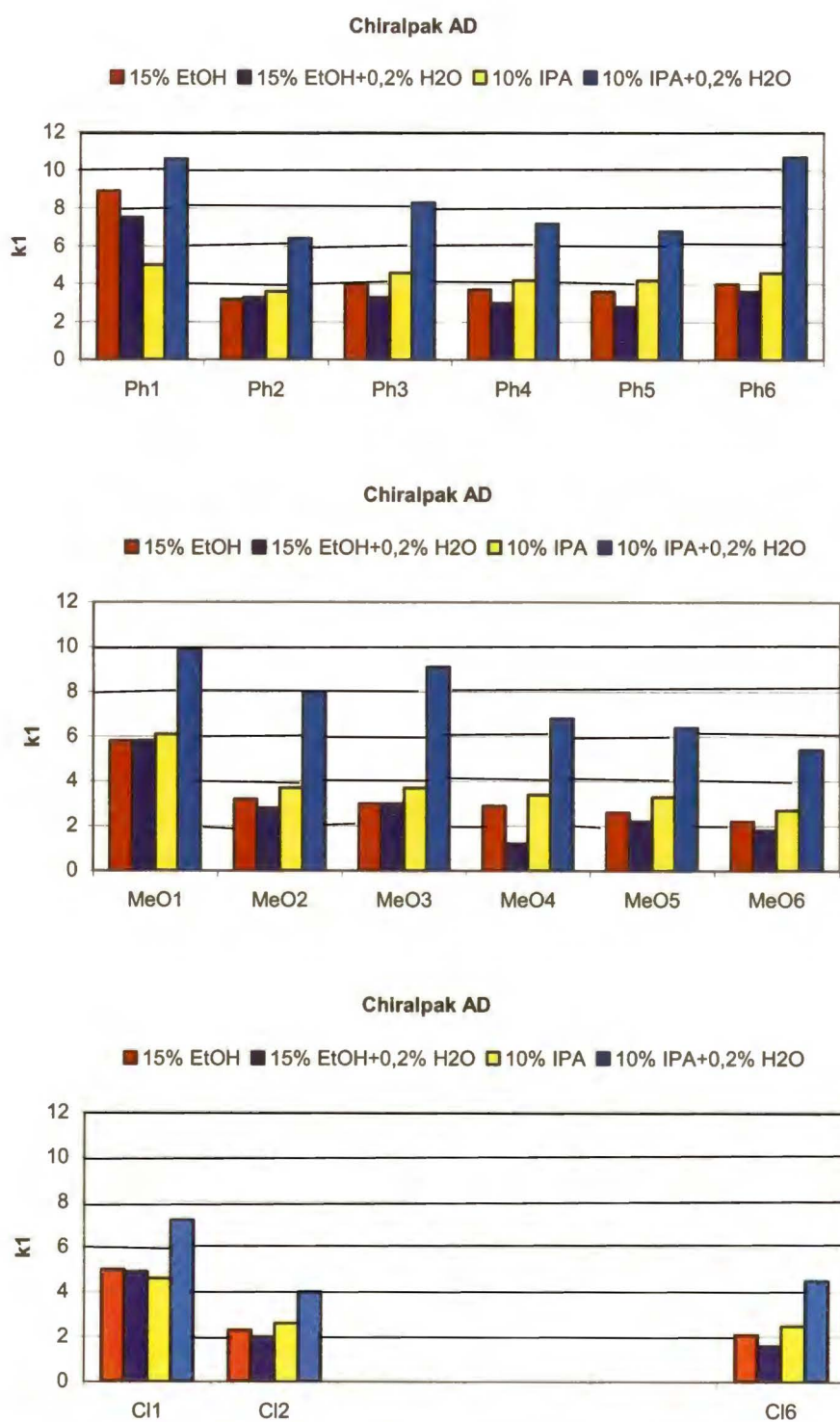
przez czynnik s zaczynają odgrywać istotną rolę w mechanizmie retencji badanych związków.

Dodatek wody do fazy ruchomej, jak już wcześniej wspomniano omawiając fazę cyklodekstrynową, zwiększa polarność układu faz normalnych w wyniku czego mogłoby wpływać na zmniejszenie wartości współczynników retencji. Taką sytuację możemy zaobserwować w przypadku fazy ruchomej z etanolem na obu kolumnach. Jednakże i tutaj występują wyjątki. Dodatek wody dla związków Ph2, Ph3, Ph4, Ph5, Ph6, Cl6 na kolumnie Chiralpak AD oraz Ph4, Ph5 a na kolumnie Chiralpak IA powoduje, iż jeden z enancjomerów zachowuje się inaczej i wartość jego współczynnika retencji się zwiększa. Natomiast niewielka ilość wody w fazie z izopropanolem zwiększa wartości współczynników retencji badanych związków na obu kolumnach z wyjątkiem Ph2, Ph3 na kolumnie Chiralpak IA. Wyniki te potwierdzają stwierdzenie Koller i inni [131], iż polarność eluentu nie jest czynnikiem determinującym siłę elucji na polisacharydowych fazach stacjonarnych. Zarówno woda jak i alkohole mogą w różny sposób wpływać na steryczne środowisko chiralnych wnęk i kanałów fazy stacjonarnej i w ten sposób wpływać na zmiany retencji badanych związków.

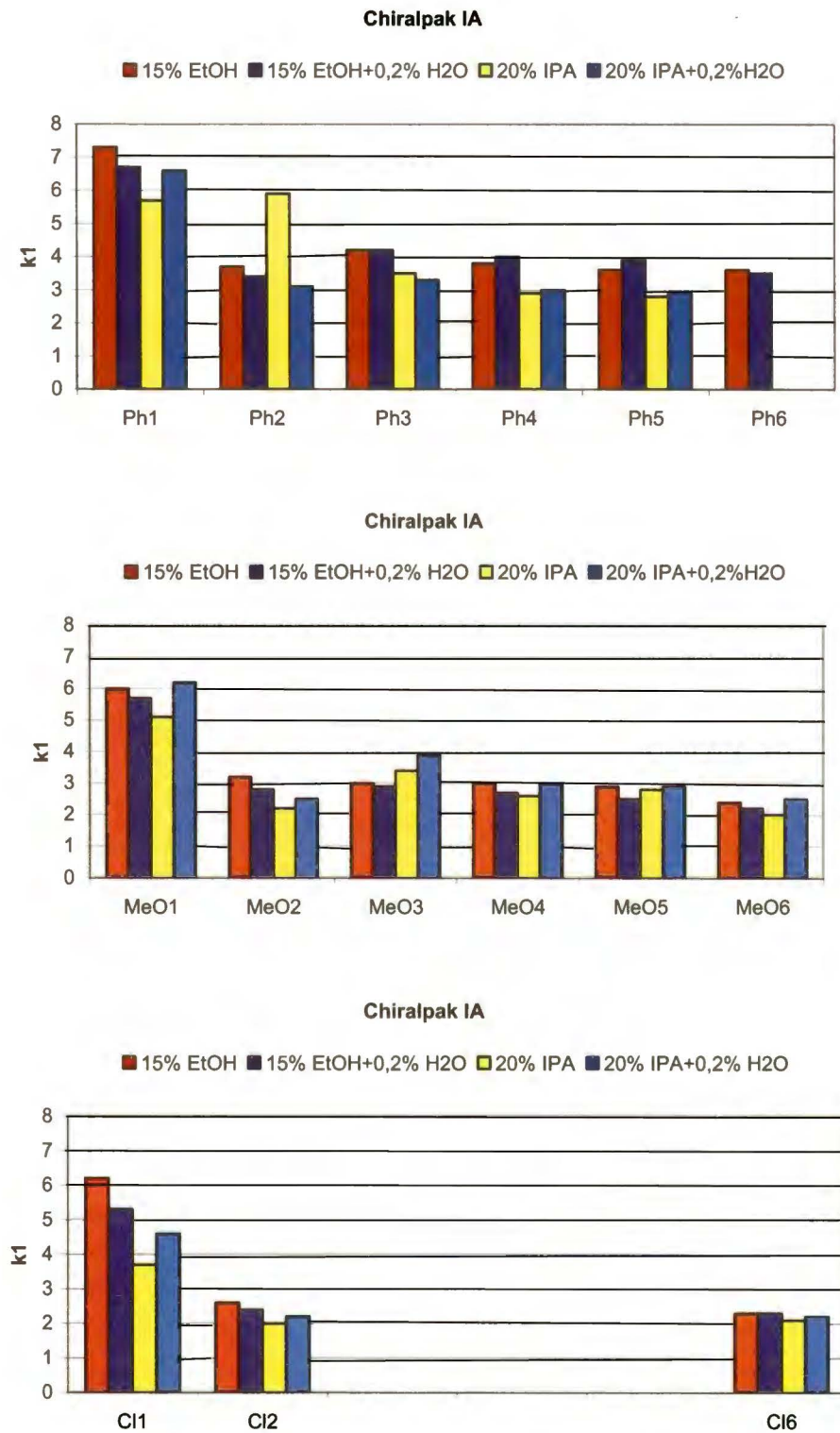
Analiza równań QSRR pokazuje, iż dodatek wody do faz ruchomych z etanolem na obu kolumnach amylozowych wpływa na zmianę oddziaływań obu enancjomerów z fazą stacjonarną. Dobrze widoczne jest to w przypadku wiązań wodorowych. Obecność wody w fazie ruchomej wpływa korzystniej na tworzenie kwasowych wiązań wodorowych przez enancjomer wymywany w drugiej kolejności (dla k_2 parametr a zwiększa się) i mniej korzystnie dla enancjomeru wymywanego w pierwszej kolejności (dla k_1 wartość a zmniejsza się). Ponadto na kolumnie Chiralpak AD w fazie z izopropanolem dodatek wody powoduje, iż oba typy wiązań wodorowych wpływają na zwiększenie retencji (dodatnie parametry a i b). Zaobserwowano również, iż hydrofobowość (czynnik l) wpływa na zmniejszenie retencji badanych związków w fazach ruchomych z dodatkiem wody na kolumnie Chiralpak AD. Niewykluczone, że cząsteczki wody mogą adsorbować się we wnękach fazy stacjonarnej zmieniając właściwości jej centrów aktywnych.

Pierwsze w kolejności związki z każdej grupy (Ph1, MeO1, Cl1) mają największe wartości współczynników retencji na obu kolumnach we wszystkich czterech fazach ruchomych (Rys. 46 i 47) (Wyjątek na kolumnie Chiralpak IA w fazie z 20% IPA czas retencji Ph2 dłuższy niż Ph1). Związki prawdopodobnie najsilniej oddziałują z fazą stacjonarną poprzez tworzenie wiązania wodorowego za pomocą grupy hydroksylowej znajdującej się w pozycji R₁. W tym przypadku nie bez znaczenia może być zarówno polarność jak i wielkość, objętość cząsteczek gdyż, jak to było wcześniej omówione w części literaturowej, amyloza tworzy kanały, wnęki do wewnątrz których skierowane są grupy polarne odpowiedzialne między innymi za tworzenie wiązań wodorowych oraz oddziaływań dipol-dipol. Związki Ph1, MeO1, Cl1 charakteryzują się najmniejszą objętością w swoich grupach i prawdopodobnie dzięki temu łatwiej wnikają do kanałów i dłużej oddziałują z fazą stacjonarną.

W porównaniu do związków modelowych z grupy Ph, związki z grup OMe oraz Cl mają z reguły krótsze czasy retencji na obu kolumnach (Rys. 46 i 47). Wyjątki stanowią związki: MeO1 w fazie z izopropanolem, MeO2 i MeO3 w fazie z izopropanolem i wodą na kolumnie Chiralpak AD oraz MeO3 w fazie izopropanolem i wodą na kolumnie Chiralpak IA. Wyniki pokazują, że obecność podstawników na grupie fenyłowej wpływa w większości przypadków na zmniejszenie wartości współczynników retencji. Mogą one wpływać na zmianę oddziaływań π - π , ale również mogą tworzyć zawadę steryczną uniemożliwiającą związkom odpowiednie dopasowanie się do fazy stacjonarnej. Wiązanie wodorowe, które może tworzyć grupa metoksyłowa, jak to prawdopodobnie ma miejsce na kolumnie cyklodekstrynowej, w tym przypadku może nie mieć miejsca gdyż grupy aromatyczne zwrócone są na zewnątrz łańcucha polisacharydowego (Rys. 19 w części literaturowej str. 29).

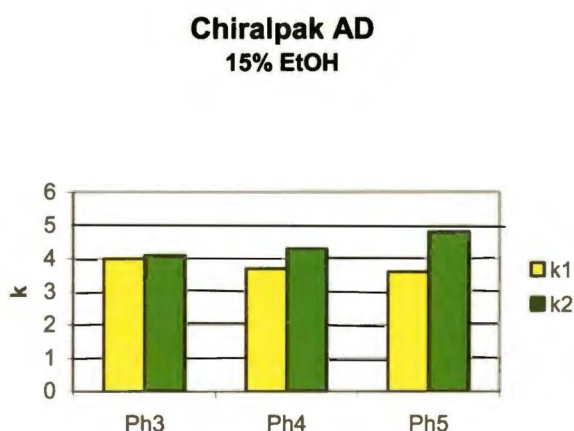


Rys. 46. Porównanie współczynników retencji k_1 w układzie faz normalnych na kolumnie Chiralpak AD.



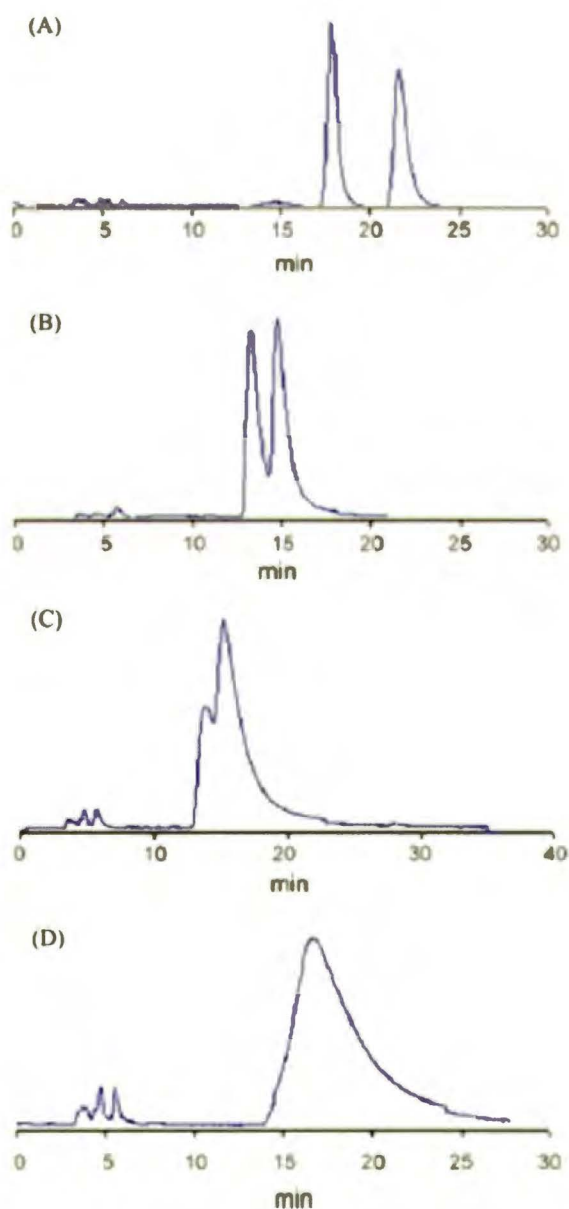
Rys. 47. Porównanie współczynników retencji k_1 w układzie faz normalnych na kolumnie Chiralpak IA.

Wartości współczynników retencji związków z grup Ph i OMe z podstawnikiem N-alkilokarbamailoksowym w pozycji R₁ maleją wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowodorowego we wszystkich czterech fazach ruchomych na kolumnie Chiralpak IA. Na kolumnie Chiralpak AD tylko w przypadku faz z izopropanolem i izopropanolem z wodą, jako modyfikatorami fazy ruchomej oraz związku z grupy OMe w fazie z etanolem. Może być to związane ze zwiększaniem się hydrofobowości związków wraz ze wzrostem długości łańcucha w podstawniku, dzięki czemu związki chętniej oddziałują z mniej polarną fazą ruchomą. Ciekawy przypadek stanowią poszczególne enancjomery związków z grupy Ph w fazach z etanolem oraz etanolem z niewielką ilością wody na kolumnie Chiralpak AD. W tych fazach tylko współczynniki retencji k₁ maleją, natomiast współczynniki k₂ zwiększają się wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowodorowego (Rys. 48). Związki z łańcuchem rozgałęzionym (Ph6 i MeO6) na kolumnie Chiralpak IA mają mniejsze wartości współczynników retencji w porównaniu ze związkami z prostym łańcuchem we wszystkich fazach ruchomych. Natomiast na kolumnie Chiralpak AD wartości współczynników retencji dla związku Ph6 są większe a dla związku MeO6 mniejsze niż dla związków z prostym łańcuchem węglowodorowym.



Rys. 48. Porównanie współczynników retencji k₁ i k₂ związków z grupy Ph z podstawnikiem N-alkilokarbamailoksowym w pozycji R₁.

W trakcie eksperymentów zaobserwowano również, iż zamiana etanolu na izopropanol w mieszaninie z n-heksanem i odwrotnie na kolumnie Chiralpak IA w przeciwieństwie do kolumny Chiralpak AD wymaga długiego czasu ustalania równowagi (Rys. 49). Przyczyną tego może być sposób obsadzenia czynnika enancjoselektywnego na silikażelu, który w przypadku kolumny unieruchomionej może wpływać na wolniejszą zmianę jej konformacji molekularnej w trakcie zamiany alkoholowych modyfikatorów fazy ruchomej.



Rys. 49. Chromatogramy związku Ph₃ na kolumnie Chiralpak IA (A) w układzie faz z etanolem (B-D) z izopropanolem odpowiednio po 0, 5, 8 godzinach.

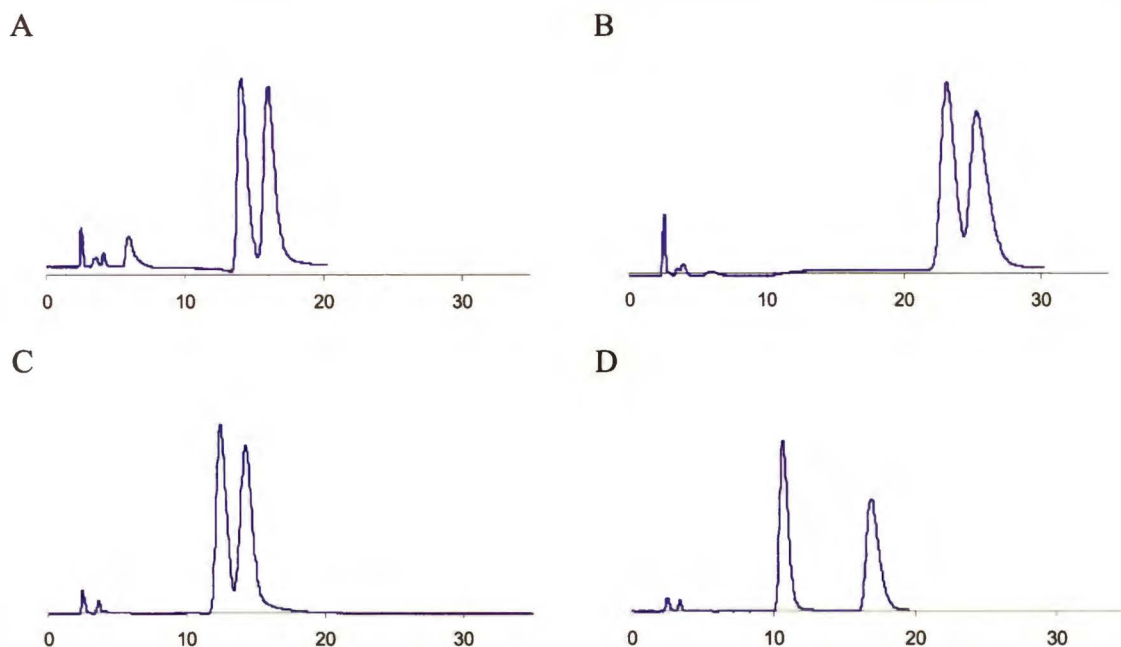
Enancjoselektywność

Na kolumnach amylozowych uzyskano rozróżnienie chiralne dla wszystkich badanych związków. Jednakże wyniki różnią się znacznie na poszczególnych kolumnach. Na kolumnie Chiralpak IA otrzymano rozdzielanie wszystkich związków w układzie faz z etanolem, jako modyfikatorem fazy ruchomej, natomiast w fazie z izopropanolem oraz izopropanolem i wodą związki w ogóle nie rozdzielają się. W przypadku zastosowania kolumny Chiralpak AD uzyskanie enancjoselektywności dla wszystkich badanych związków wymaga zmiany składu fazy ruchomej. W tym celu należy zamienić modyfikator z etanolu na izopropanol, (aby rozdzielić np. MeO4) lub odwrotnie (np. Cl1) bądź też dodać niewielką ilość wody do fazy ruchomej (np. Cl6).

Uzyskane wyniki pokazują, iż zamiana izopropanolu na etanol w mieszaninie z n-heksanem powoduje w większości przypadków lepszą separację związków na obu kolumnach. Wyjątek na kolumnie Chiralpak AD stanowią związki z grupy MeO z podstawnikiem N-alkilokarbamailoksowym w pozycji R₁: MeO3, MeO4, MeO5, MeO6 oraz związek Cl6, które lepiej rozdzielają się w fazie z izopropanolem.

Dodatek niewielkiej ilości wody do fazy z etanolem na kolumnie Chiralpak AD znacząco zwiększa rozróżnienie chiralne większości związków, a zmniejsza tylko Ph1, Ph2, MeO1, MeO2. Natomiast na kolumnie Chiralpak IA tendencja jest odwrotna - dodatek wody zmniejsza separację większości związków a zwiększa enancjoselektywność tylko czterech związków: Ph2, MeO2, Cl1, Cl2. W fazie z izopropanolem na kolumnie Chiralpak IA dodatek wody nie wpływa na enancjoselektywność badanych związków natomiast na kolumnie Chiralpak AD poprawia rozróżnienie chiralne tylko dla czterech związków: Ph2, Ph5, Ph6 i Cl2. Wpływ dodatku wody do fazy ruchomej na enancjoselektywność związku Ph3 na kolumnie Chiralpak AD przedstawiono na Rys. 50.

W niektórych przypadkach dodatek wody do fazy ruchomej jest niezbędny, aby uzyskać rozróżnienie chiralne, ale również jego obecność może znieść enancjoselektywność. Przykładem jest tu związek Cl6, który na kolumnie Chiralpak AD w fazie etanol : n-heksan nie rozdziela się ($\alpha=1,00$) natomiast po dodaniu wody współczynnik rozdzielania wzrasta do $\alpha=1,52$. W fazie izopropanolem jest odwrotnie po dodaniu do fazy niewielkiej ilości wody nie ma rozdzielania enancjomerów (bez wody $\alpha=1,24$).



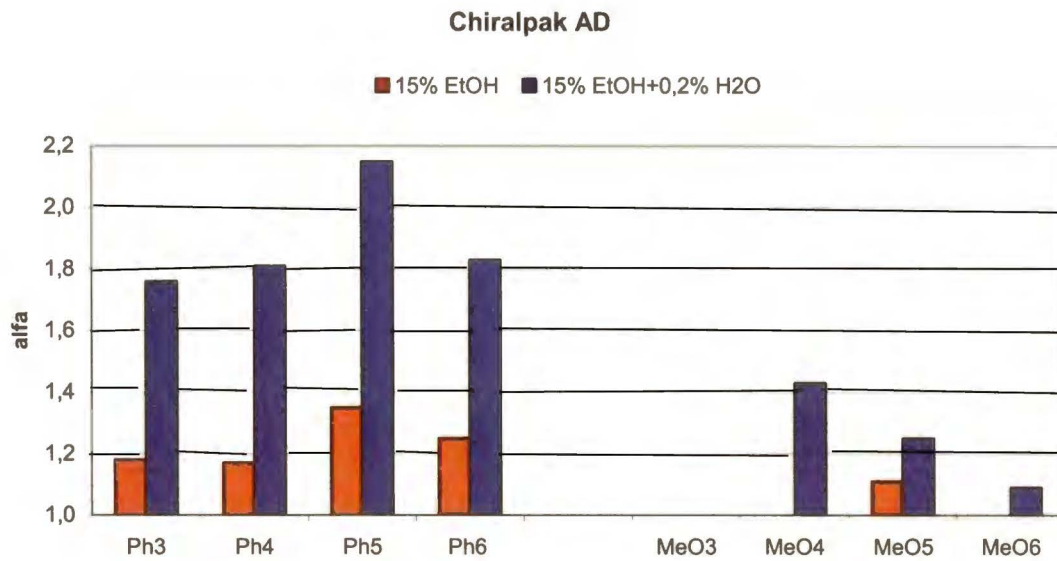
Rys. 50. Wpływ dodatku wody na rozróżnienie chiralne związku Ph3 na kolumnie Chiralpak AD w czterech różnych fazach ruchomych:

- (A) n-heksan/IPA (90/10 v/v),
- (B) n-heksan/IPA/H₂O (90/10/0,2 v/v/v),
- (C) n-heksan/EtOH (85/15 v/v),
- (D) n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).

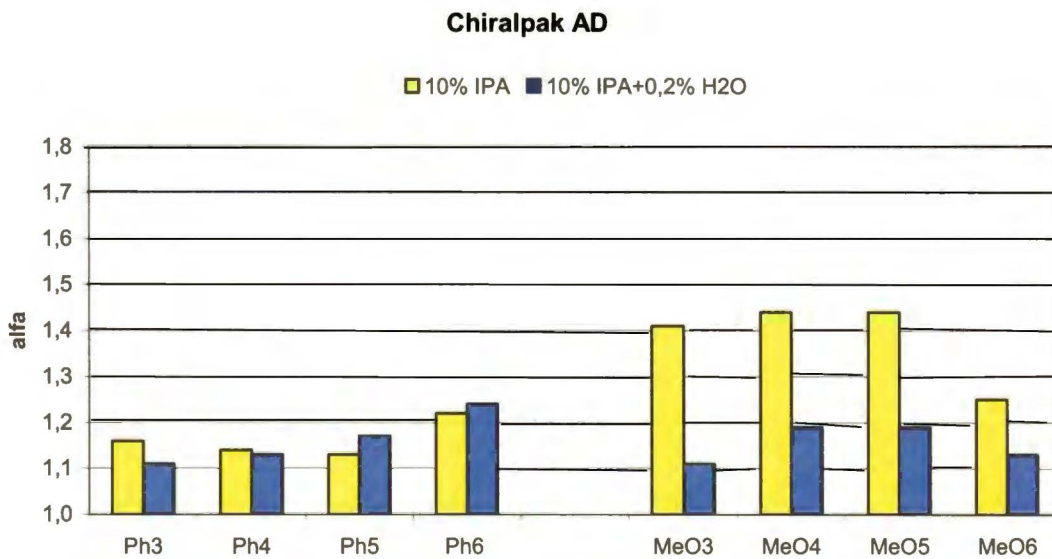
Analiza parametrów Δ (Tabela 16) pokazuje, iż na rozróżnienie chiralne związków modelowych na kolumnie Chiralpak IA w układzie z etanolem jako modyfikatorem fazy ruchomej wpływa wiele oddziaływań. Do najbardziej istotnych należą oddziaływania hydrofobowe, oddziaływania związane z polaryzowalnością cząsteczki oraz w mniejszym stopniu wiązania wodorowe. Niewielki dodatek wody do fazy ruchomej z etanolem powoduje, że w zasadzie te same różnice w oddziaływaniach enancjomerów z fazą stacjonarną wpływają na enancjoseparację badanych związków. Jednakże wartości te są znacznie mniejsze, a zatem i różnice oddziaływań enancjomerów z fazą stacjonarną są mniejsze, co odzwierciedlają wyniki uzyskane eksperymentalnie. Natomiast na kolumnie Chiralpak AD obliczone wartości parametrów Δ (Tabela 16) wskazują iż dominujące oddziaływania w układach faz z etanolem oraz etanolem z dodatkiem wody to przede wszystkim wiązania wodorowe oraz oddziaływania związane z polaryzowalnością cząsteczki. W fazie z izopropanolem

jako modyfikatorem fazy ruchomej różnice oddziaływań enancjomerów z fazą stacjonarną wpływające na enancjoseparację to oddziaływania elektrostatyczne dipol - dipol indukowany, oddziaływania hydrofobowe oraz kwasowe wiązania wodorowe. Niewielki dodatek wody do fazy z izopropanolem powoduje, że oddziaływania te zmieniają się. Najbardziej istotne dla rozróżnienia chiralnego wydają się oddziaływania hydrofobowe, kwasowe i zasadowe wiązania wodorowe oraz oddziaływania związane z polaryzowalnością czasteczki.

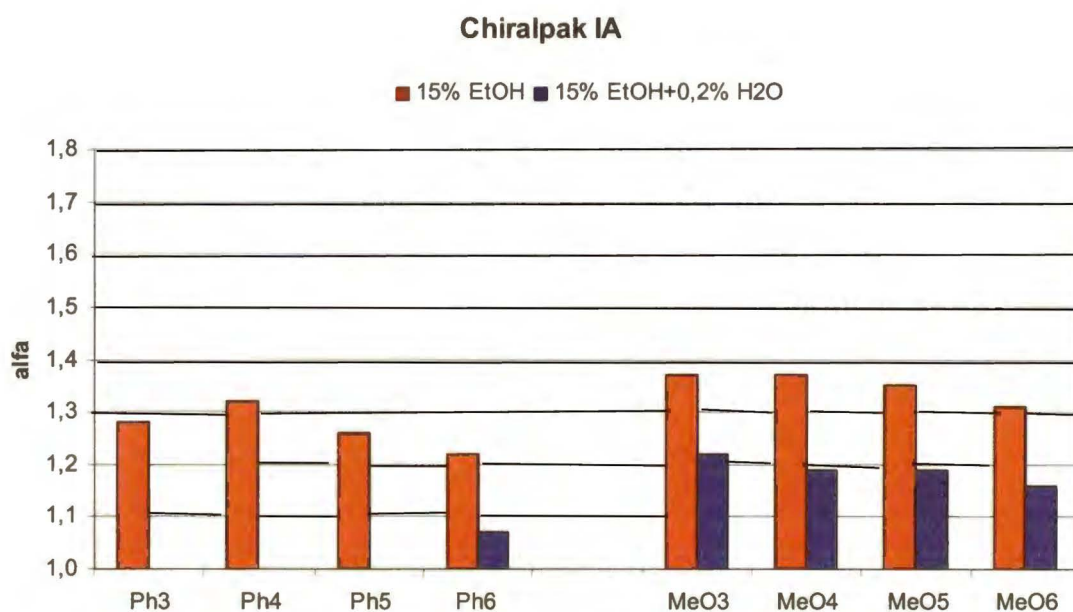
Rozpatrując grupy związków z podstawnikiem N-alkilokarbamailoksowym w pozycji R₁, można zauważyć, iż na kolumnie Chiralpak AD w fazie z etanolem oraz etanolem z wodą związki z grupy Ph rozdzielają się lepiej w porównaniu do związków z grupy OMe (Rys. 51). Jednakże dla obu grup dla fazy z etanolem widzimy dodatni wpływ niewielkiej ilości wody na uzyskanie enancjoselektywności. Natomiast w fazach z izopropanolem lepszą enancjoselektywność uzyskano dla związków z grupy OMe w porównaniu do związków z grupy Ph (Rys. 52). Dla fazy z izopropanolem dodatek wody na rozróżnienie chiralne jest dla związków z grupy OMe zdecydowanie niekorzystny. Jednakże na kolumnie Chiralpak IA, sytuacja przedstawia się inaczej. Enancjoselektywność grupy związków OMe w fazie z etanolem oraz etanolem z wodą jest większa niż uzyskana dla związków z grupy Ph (Rys. 53). Natomiast w obu fazach z izopropanolem nie otrzymano żadnego chiralnego rozróżnienia badanych związków.



Rys. 51. Porównanie enancjoselektywności na kolumnie Chiralpak AD dla grupy związków Ph i OMe z podstawnikiem N-alkilokarbamailoksowym w układzie faz n-heksan/EtOH (85/15 v/v) oraz n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).

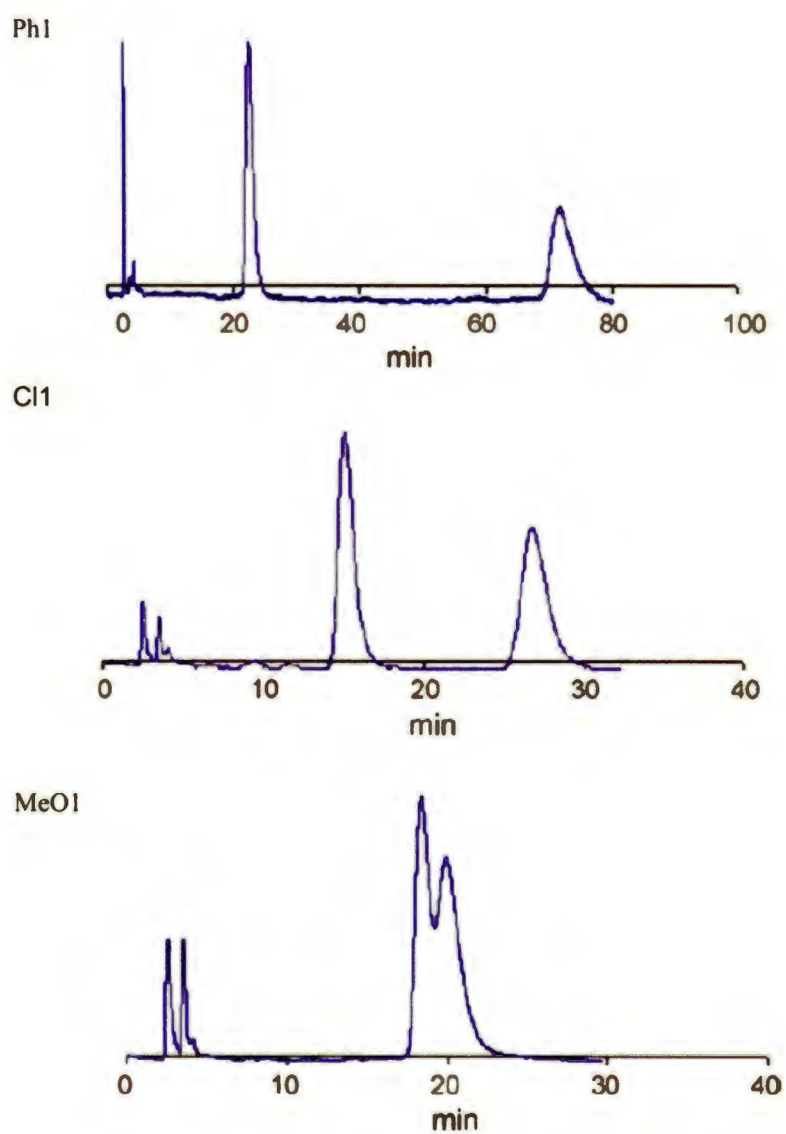


Rys. 52. Porównanie enancjoselektywności na kolumnie Chiralpak AD dla grupy związków Ph i OMe z podstawnikiem N-alkilokarbamailoksowym w układzie faz n-heksan/IPA (90/10 v/v) oraz n-heksan/IPA/H₂O (90/10/0,2 v/v/v).

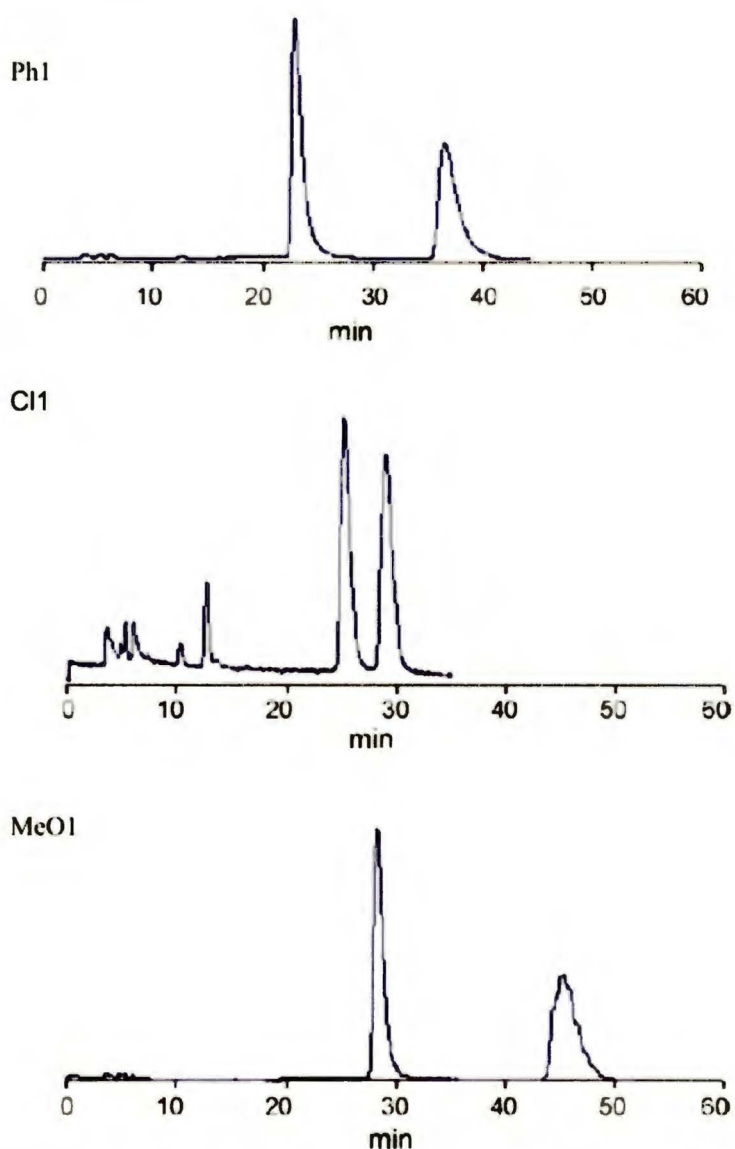


Rys. 53. Porównanie enancjoselektywności na kolumnie Chiralpak IA dla grupy związków Ph i OMe z podstawnikiem N-alkilokarbamailoksowym w układzie faz n-heksan/EtOH (85/15 v/v) oraz n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).

Na kolumnie Chiralpak AD lepszą enancjoseparację uzyskano dla związków z grupy Ph w fazach z etanolem oraz etanolem i wodą, jako modyfikatorów fazy ruchomej w porównaniu ze związkami z grup OMe i Cl. Wpływ budowy związku na zmianę rozróżnienia chiralnego dla kolumn Chiralpak AD i Chiralpak IA poprzez zmianę podstawnika R₂ jest szczególnie dobrze widoczny dla pierwszych w kolejności związków z każdej grupy Ph1, MeO1, Cl1. Zmiana podstawnika R₂ prawdopodobnie wpływa na zmianę oddziaływań π - π co odzwierciedla się w enancjoselektywności $\alpha=3,49$; 1,13; 1,92 w fazie ruchomej etanol : n-heksan na kolumnie Chiralpak AD, $\alpha=1,74$; 1,72; 1,19 w fazie ruchomej etanol : n-heksan na kolumnie Chiralpak IA (Rys. 54, 55). Ponadto wyniki pokazują, iż sposób obsadzenia czynnika enancjoselektywnego ma istotny wpływ na uzyskanie rozróżnienia chiralnego.



Rys. 54. Chromatogramy związków Ph1, Cl1, MeO1 na kolumnie Chiralpak AD w fazie ruchomej n-heksan/EtOH (85/15 v/v).



Rys. 55. Chromatogramy związków Ph1, Cl1, MeO1 na kolumnie Chiralpak IA w fazie ruchomej n-heksan/EtOH (85/15 v/v).

Dobrym przykładem obrazującym wpływ sposobu obsadzenia czynnika chiralnego na silikażelu na enancjoselektywność jest związek MeO3. Na kolumnie Chiralpak AD (powleczonej) w fazach z etanolem oraz etanolem z niewielkim dodatkiem wody nie uzyskano rozdzielania związku ($\alpha=1,00$). Wystarczyło zmienić kolumnę na Chiralpak IA (unieruchomiona) i osiągnięto $\alpha=1,37$ w fazie z etanolem oraz $\alpha=1,22$ w fazie z etanolem i dodatkiem wody. Natomiast w fazach z izopropanolem sytuacja jest odwrotna związek MeO3 nie rozdziela się na kolumnie Chiralpak IA ($\alpha=1,00$), natomiast na kolumnie Chiralpak AD $\alpha=1,41$ w fazie z izopropanolem oraz $\alpha=1,11$ w fazie z izopropanolem i wodą.

2.2 Kolumna Chiralcel OD

Faza stacjonarna Chiralcel OD jest to pochodna celulozy powleczone na silikażelu. Jest ona celulozowym odpowiednikiem kolumny Chiralpak AD. Uzyskane wyniki wpływu modyfikatorów na retencję i enancjoselektywność przedstawiono w Tabeli 17. Natomiast wyliczone parametry korelacji współczynników retencji z deskryptorami badanych związków oraz parametry Δ dla poszczególnych układów faz ruchomych przedstawiono w Tabelach 18 i 19.

Retencja

Stężenie modyfikatorów fazy ruchomej etanolu, izopropanolu oraz dodatku wody zastosowano takie samo jak w przypadku kolumny Chiralpak AD (15% etanol, 10% izopropanol, 0,2% woda). Jednakże wartości współczynników retencji badanych związków w fazie z etanolem oraz etanolem z wodą są dużo mniejsze na kolumnie Chiralcel OD w porównaniu do kolumny Chiralpak AD. Natomiast dla fazy z izopropanolem tendencja jest odwrotna i wartości współczynników retencji na kolumnie Chiralcel OD są większe. Zamiana etanolu na izopropanol na kolumnie Chiralcel OD w zasadzie nie zmienia kolejności wymywania związków modelowych z wyjątkiem związków Ph6 i Ph3. Niewielki dodatek wody przyspiesza elucję związku Ph6 w fazie etanol : woda natomiast w fazie izopropanol : woda przyspiesza wymywanie związków Ph5 i Ph3 a opóźnia MeO4. Uzyskana kolejność wymywania związków na kolumnie Chiralcel OD różni się od kolejności elucji otrzymanej na kolumnie Chiralpak AD.

Na podstawie analizy QSRR (patrz część doświadczalna, punkt 8) można, zauważyć, iż mechanizm retencji związków modelowych zależy od wielu oddziaływań takich jak wiązania wodorowe (czynniki a i b), oddziaływania elektrostatyczne dipol - dipol indukowany (parametr s), oddziaływania zależne od polaryzowalności czasteczek reprezentowane przez refrakcję molową (e) oraz oddziaływania hydrofobowe (v i l). Na wzrost wartości współczynników retencji badanych związków oddziaływania międzycząsteczkowe określane jako zasadowe wiązania wodorowe odwrotnie niż dla faz amylozowych a podobnie jak dla fazy cyklodekstrynowej odgrywają istotną rolę (dodatni parametr b).

Wyniki badań i dyskusja

Tabela 17. Parametry retencji i enancjoselektywności związków modelowych na kolumnie Chiralcel OD w układzie faz normalnych.

Chiralcel OD																
Związek modelowy	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)				n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)				n-heksan/IPA (90/10 v/v)				n-heksan/IPA/H ₂ O (90/10 v/v/v)			
	k ₁	k ₂	α	α teoret.	k ₁	k ₂	α	α teoret.	k ₁	k ₂	α	α teoret.	k ₁	k ₂	α	α teoret.
Ph1	2,8	2,8	1,00	0,98	2,6	2,7	1,06	1,03	8,2	8,2	1,00	0,98	8,4	8,4	1,00	1,01
Ph2	2,5	2,7	1,08	1,03	2,4	2,6	1,07	1,04	6,8	7,7	1,14	1,10	6,0	6,6	1,10	1,04
Ph3	1,7	1,7	1,00	1,05	1,7	1,7	1,00	1,00	5,7	5,7	1,00	1,05	4,1	4,3	1,05	1,07
Ph4	1,5	1,5	1,00	1,00	1,6	1,6	1,00	1,00	4,9	4,9	1,00	1,02	4,3	4,6	1,07	1,10
Ph5	1,6	1,6	1,00	1,03	1,5	1,5	1,00	1,01	4,2	4,6	1,11	1,08	3,7	4,0	1,10	1,13
Ph6	1,6	1,6	1,00	0,95	1,5	1,5	1,00	0,96	4,3	4,5	1,05	1,06	4,2	4,4	1,05	0,96
MeO1	2,8	3,0	1,09	1,07	2,6	2,9	1,13	1,16	8,7	9,3	1,07	1,05	9,4	10,0	1,07	1,09
MeO2	2,8	3,0	1,08	1,10	2,6	2,9	1,11	1,17	8,9	10,0	1,13	1,14	7,6	8,6	1,13	1,14
MeO3	1,8	1,9	1,07	1,13	1,7	1,9	1,10	1,13	5,6	6,2	1,10	1,09	5,4	6,1	1,13	1,18
MeO4	1,5	1,7	1,12	1,10	1,5	1,7	1,15	1,13	4,7	5,4	1,14	1,10	4,6	5,3	1,16	1,21
MeO5	1,4	1,6	1,16	1,14	1,4	1,6	1,16	1,13	4,2	5,0	1,19	1,18	4,1	4,9	1,18	1,23
MeO6	1,4	1,6	1,15	1,11	1,4	1,6	1,16	1,09	4,1	4,7	1,15	1,21	3,9	4,6	1,18	1,05
Cl1	2,0	2,3	1,12	1,16	1,9	2,2	1,16	1,12	6,9	8,2	1,19	1,21	5,8	6,7	1,16	1,14
Cl2	1,9	2,0	1,09	1,10	1,7	1,9	1,07	1,14	5,6	6,7	1,18	1,21	4,3	4,9	1,12	1,20
Cl6	1,1	1,1	1,00	1,20	1,1	1,1	1,00	1,05	3,1	3,5	1,16	1,38	2,6	2,9	1,10	1,09

α teoret.- zostały uzyskane z obliczeń k₁ i k₂ z równania regresji (16) (deskryptory Tabela 7) oraz ze wzoru $\alpha = k_2/k_1$

Tabela 18. Parametry regresji dla kolumny Chiralcel OD w układach faz normalnych.

Kolumna	Układ	Współczynniki liniowego równania regresji (16)										
		log	d ₀	a	b	l	s	e	v	q	p	R ²
Chiralcel OD	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)	log(k ₂)	3,693	-1,115	1,934			-1,422	-1,640		0,272	0,98
		log(k ₁)	5,186		1,173		-0,617	-1,844	-0,626			0,97
	n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)	log(k ₂)	5,014	-1,684	1,153	0,874	-1,331	-2,863	-3,687			0,99
		log(k ₁)	5,988		0,912	0,380	-0,811	-2,676	-1,955			0,98
	n-heksan/IPA (90/10 v/v)	log(k ₂)	3,941	-2,746	1,767	0,622		-1,641	-4,237		0,305	0,97
		log(k ₁)	6,840	-2,105	0,891	1,339	-1,105	-3,579	-5,849			0,97
	n-heksan/IPA/H ₂ O (90/10/0,2 v/v/v)	log(k ₂)	5,669	-1,995	1,778	1,127	-1,926	-3,179	-4,589			0,98
		log(k ₁)	5,169		2,183		-0,940	-1,784	-0,805			0,96

Tabela 19. Parametry Δ odnoszące się do zmian energii oddziaływań odpowiedzialnych za obserwowaną enancjoselektywność dla kolumn Chiralcel OD w układach faz normalnych.

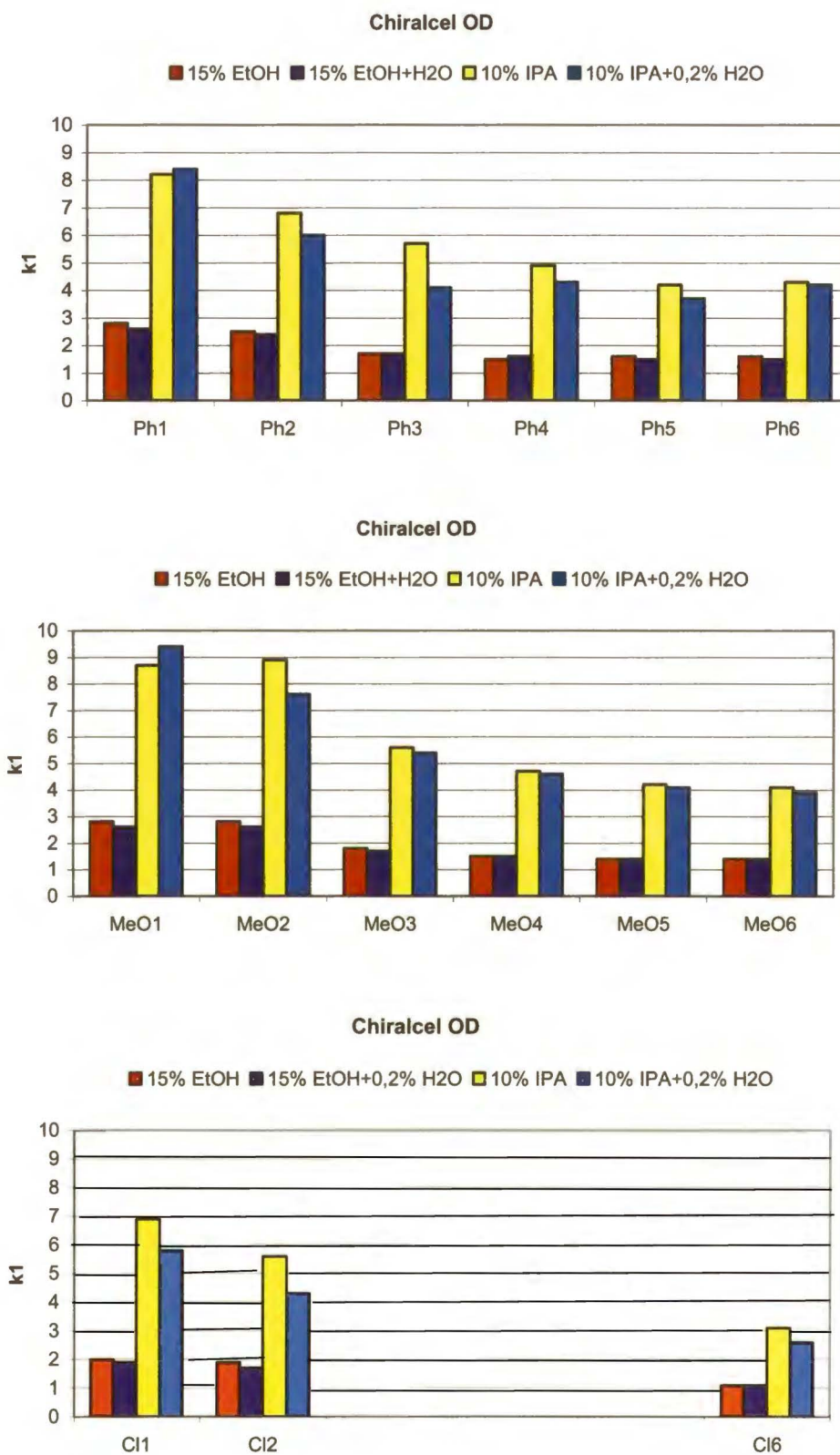
Kolumna	Układ	Parametry Δ , równanie (17)								
		log	Δa	Δb	Δl	Δs	Δe	Δv	Δq	Δp
Chiralcel OD	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)	log(α)	-1,115	0,760		0,617	0,423	-1,014		0,272
	n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)	log(α)	-1,684	0,241	0,494	-0,520	-0,186	-1,732		
	n-heksan/IPA (90/10 v/v)	log(α)	-0,641	0,876	-0,717	1,105	1,937	1,612		0,305
	n-heksan/IPA/H ₂ O (90/10/0,2 v/v/v)	log(α)	-1,995	-0,405	1,127	-0,986	-1,395	-3,784		

W fazach ruchomych z etanolem jak i izopropanolem jako modyfikatorami fazy ruchomej mechanizm retencji związków modelowych zależy głównie od zasadowych wiązań wodorowych (dodatni parametr b). Dodatkowo w fazie z izopropanolem lipofilowość (parametr l) również wpływa na zwiększenie retencji. Natomiast oddziaływania hydrofobowe (parametr v), oddziaływania związane z polaryzowalnością cząsteczki (czynniki s i e) oraz kwasowe wiązania wodorowe (ujemny parametr a) wpływają na zmniejszenie retencji badanych związków.

Wyniki uzyskane na kolumnie Chiralcel OD najbardziej potwierdzają stwierdzenie, iż dodatek wody wpływając na zwiększenie polarności fazy zmniejsza wartości współczynników retencji. Tylko jeden związek (Ph4) w fazie etanol z wodą oraz dwa w fazie izopropanol z wodą (Ph1, MeO1) zachowują się inaczej. Wartości współczynników retencji pozostałych związków zmniejszają się w fazie ruchomej z dodatkiem wody.

Analiza równań QSRR (Tabela 18) pokazuje, że dodatek wody wpływa na zmianę oddziaływań poszczególnych enancjomerów z fazą stacjonarną. Najbardziej istotny wydaje się wpływ na wiązania wodorowe, które są dominującymi oddziaływaniami w mechanizmie retencji badanych związków. Dodatek wody obniża parametry regresji zasadowego wiązania wodorowego obu współczynników retencji w fazie ruchomej z etanolem natomiast zwiększa w fazie ruchomej z izopropanolem. Ponadto w fazie z etanolem dodatek wody sprawia, iż lipofilowość wpływa na zwiększenie retencji badanych związków (parametr l).

Tak jak na wszystkich omówionych wcześniej kolumnach tak i w przypadku Chiralcel OD w fazach normalnych pierwsze związki z każdej grupy (Ph1, MeO1, Cl1) mają największe wartości współczynników retencji (Rys. 56). Wyjątek w fazie z izopropanolem: jako pierwszy wymywa się MeO2 (MeO1 jako drugi). Związki: Ph1, MeO1, Cl1 mogą tworzyć wiązanie wodorowe dzięki grupie hydroksylowej w pozycji R_1 , co prawdopodobnie tak jak na fazie cyklodekstrynowej i fazach amylozowych jest powodem ich najdłuższego oddziaływania z fazą stacjonarną.



Rys. 56. Porównanie współczynników retencji k_1 w układzie faz normalnych na kolumnie Chiralcel OD.

Porównując retencję badanych związków w grupach: Ph, OMe, Cl zachowują się one odwrotnie niż dla kolumny amylozowej a podobnie jak dla kolumny cyklodekstrynowej w fazach normalnych. Związki z grupy OMe mają większe wartości współczynników retencji przynajmniej dla jednego z enancjomerów danego związku, natomiast związki z grupy Cl mają mniejsze we wszystkich fazach ruchomych w porównaniu do związków z grupy Ph. Wyjątek stanowią związki MeO5 i MeO6 w fazie z etanolem, jako modyfikatorem fazy ruchomej. Może to być spowodowane różnicą w konformacji łańcucha celulozy i amylozy. Prawdopodobnie dzięki temu grupa metoksylova może tworzyć wiązanie wodorowe podobnie jak na kolumnie cyklodekstrynowej zwiększając współczynniki retencji dla związków z tej grupy. Uzyskane wyniki pokazują, iż podobnie jak i na amylozowych fazach stacjonarnych, podstawnik na pierścieniu fenylovym może wpływać na oddziaływania π - π przez co również i na retencję badanych związków.

Współczynniki retencji związków z grupy OMe z podstawnikiem, N-alkilokarbamailoksowym w pozycji R₁ maleją wraz ze wzrostem długości łańcucha we wszystkich fazach ruchomych. Natomiast związków z grupy Ph z tym samym podstawnikiem tylko w fazie etanol z wodą oraz w fazie z izopropanolem. Współczynniki retencji związków z łańcuchem rozgałęzionym (Ph6 i Me6) są takie same bądź mniejsze niż dla związku z najdłuższym łańcuchem prostym z wyjątkiem związku Ph6 w fazie izopropanol : woda.

Enancjoselektywność

Na kolumnie celulozowej Chiralcel OD uzyskano gorsze wyniki rozróżnienia chiralnego związków modelowych (zakres współczynnika rozdzielania 1,00 - 1,19) w porównaniu do jej amylozowwgo odpowiednika (zakres współczynnika rozdzielania 1,00 - 3,49). Podobnie jak na kolumnie Chiraplak AD rozdzielanie wszystkich związków wymaga zmiany modyfikatora (etanol, izopropanol, dodatek wody) fazy ruchomej.

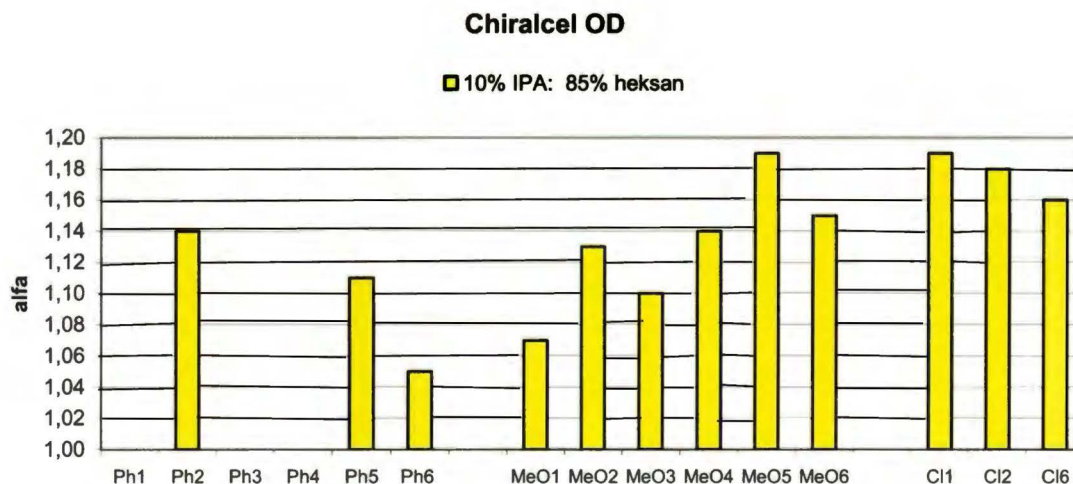
W przeciwieństwie do kolumn amylozowych na kolumnie Chiralcel OD zamiana modyfikatora fazy ruchomej z etanolu na izopropanol powoduje na ogół zwiększenie enancjoseparacji badanych związków.

W przypadku fazy z etanolem dodatek niewielkiej ilości wody wpływa na zwiększenie enancjoseparacji dla 7 związków (Ph1, MeO1, MeO2, MeO3, MeO4, MeO6, Cl1). Rozróżnienie chiralne Ph2, Cl2 zmniejsza się, a pozostałych związków

pozostaje bez zmian. W fazie z izopropanolem obecność wody również wpływa zarówno na zwiększenie (Ph3, Ph4, MeO3, MeO4, MeO5, MeO6) jak i pogorszenie (Ph2, Ph5, MeO5, Cl1, Cl2, Cl6) enancjoseparacji badanych związków.

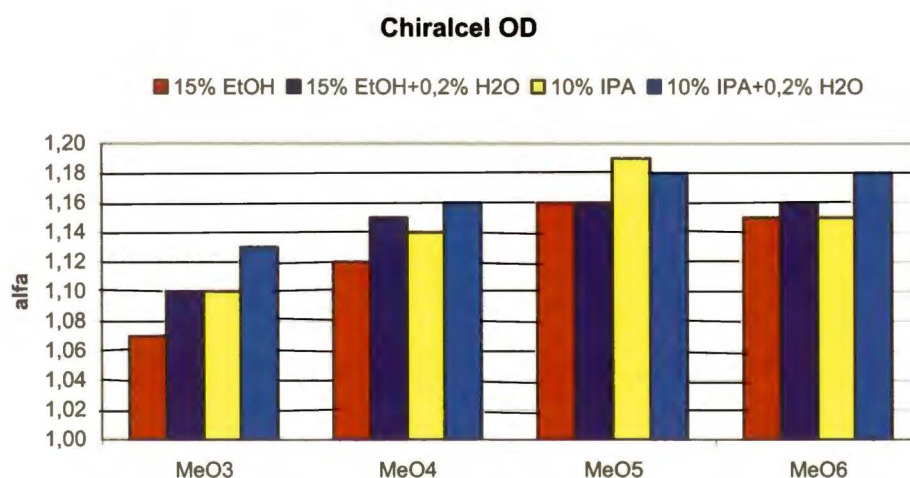
Analiza parametrów Δ (Tabela 19) wskazuje, iż otrzymana enancjoseparacja związków modelowych na kolumnie Chiralpak OD we wszystkich fazach ruchomych zależy od wielu różnych oddziaływań. Należą do nich oddziaływania hydrofobowe, kwasowe i zasadowe wiązania wodorowe oraz oddziaływania związane z polaryzowalnością cząsteczki.

Rozpatrując wpływ struktury związków modelowych na rozróżnienie chiralne można zauważyć, iż związki z grupy OMe i Cl w większości przypadków rozdzielają się lepiej w we wszystkich fazach ruchomych w porównaniu do związków z grupy Ph (wyjątek związek MeO2 w układzie faz izopropanol : n-heksan). Wydaje się, że dla fazy celulozowej obecność podstawnika R_2 na pierścieniu fenylovym może wpływać na poprawę enancjoseparacji badanych związków (Rys. 57). Pierwsze w kolejności związki z grup (Ph1, MeO1) nie wykazują na tej kolumnie najlepszej enancjoselektywności (tak jak to było dla kolumny amylozowej) z wyjątkiem związku Cl1, który rozdziela się najlepiej w grupie w każdym układzie faz.



Rys. 57. Porównanie enancjoselektywności na kolumnie Chiralcel OD w układzie faz n-heksan/EtOH (85/15 v/v).

Dla grupy związków z podstawnikiem N-alkilokarbamailoksowym w pozycji R₁ większą enancjoselektywność uzyskano dla grupy związków OMe w porównaniu do związków z grupy Ph. Zaobserwowano wzrost współczynników rozdzielczości wraz ze zwiększaniem długości łańcucha węglowodorowego w podstawniku (Rys. 58). Wyjątek stanowią związki z grupy Ph, które nie rozdzielają się w układzie faz etanol i etanol z dodatkiem wody. Natomiast enancjoselektywność związków z podstawnikiem z łańcuchem rozgałęzionym jest mniejsza bądź taka sama jak dla związku z najdłuższym łańcuchem prostym.



Rys. 58. Porównanie enancjoselektywności na kolumnie Chiralcel OD dla związków z grupy OMe z podstawnikiem N-alkilokarbamailoksowym w pozycji R₁.

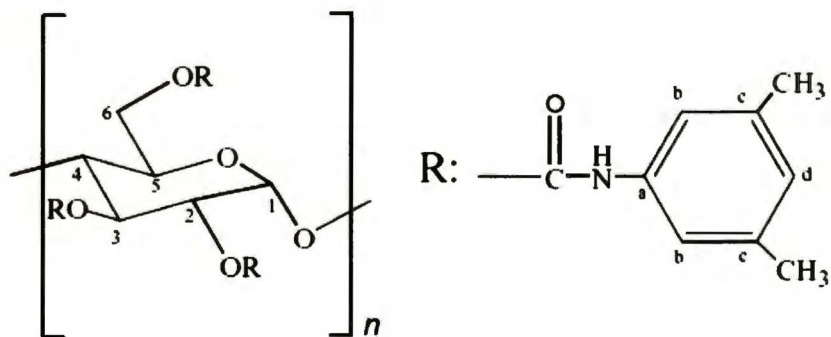
2.3 Badania NMR faz polisacharydowych

W celu sprawdzenia, jak modyfikatory wpływają na strukturę fazy stacjonarnej, na podstawie publikacji Wang i Wenslow [96] zostały wykonane badania NMR ciała stałego dla złoża Chiralpak AD w rozpuszczalnikach: n-heksan, etanol, izopropanol i woda oraz mieszaninie tych alkoholi z wodą.

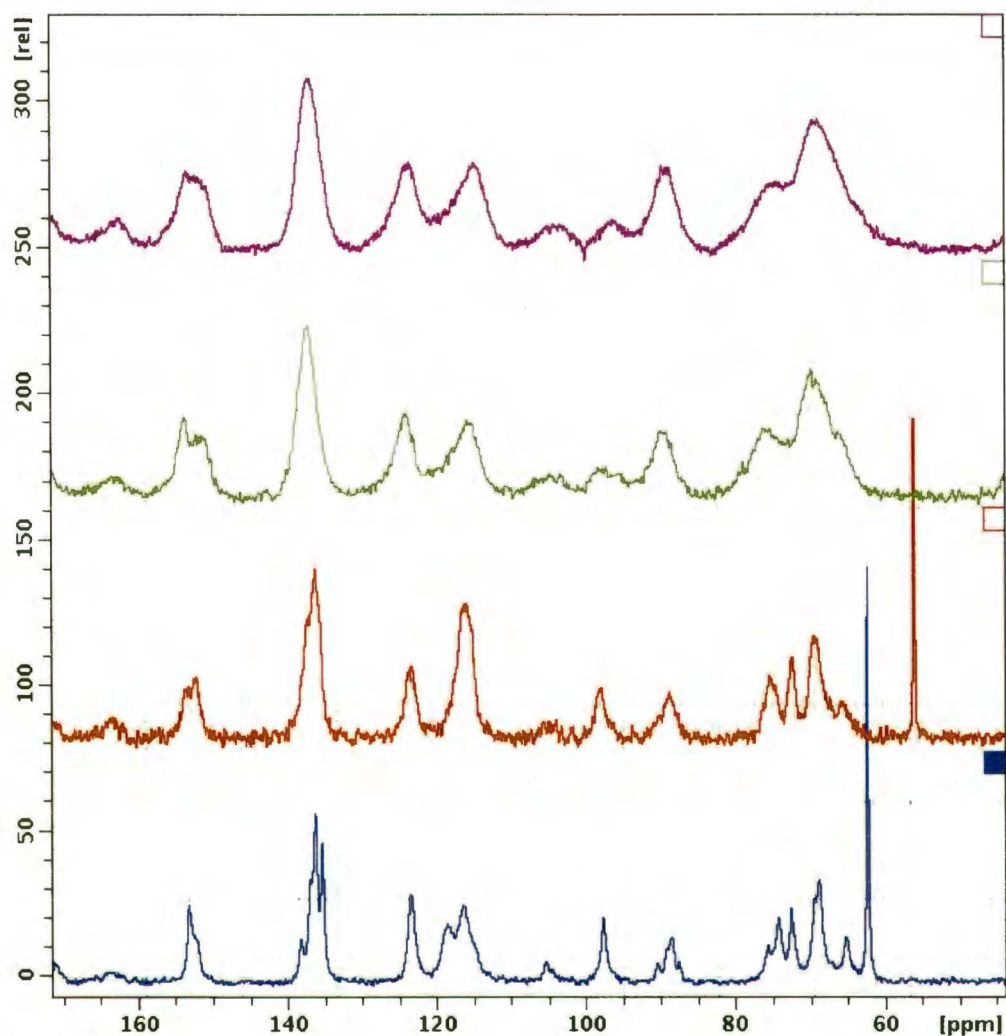
Najpierw sprawdzono oddziaływanie Chiralpak AD z n-heksanem oraz z alkoholami etanolem i izopropanolem. Otrzymane widma zostały przedstawione na Rys. 60. Zaobserwowano następujące sygnały/grupy sygnałów (atomy węgla przypisane do stuktury według Rys. 59):

- około 153 ppm – C=O
- około 138 ppm, 123ppm i 117 ppm – sygnały C(a-d) = aromatyka sygnału fenylowego
- około 98 ppm – sygnały C1 = węgiel alfa grupy cukrowej
- około 65-75 ppm – sygnały C2-C6 = węgle grupy cukrowej.

Wąskie sygnały pochodzą od alkoholi. Piki przy 90 i 105 ppm to satelity rotacyjne.



Rys. 59. Struktura Chiralpak AD z ponumerowanymi atomami węgla [96]

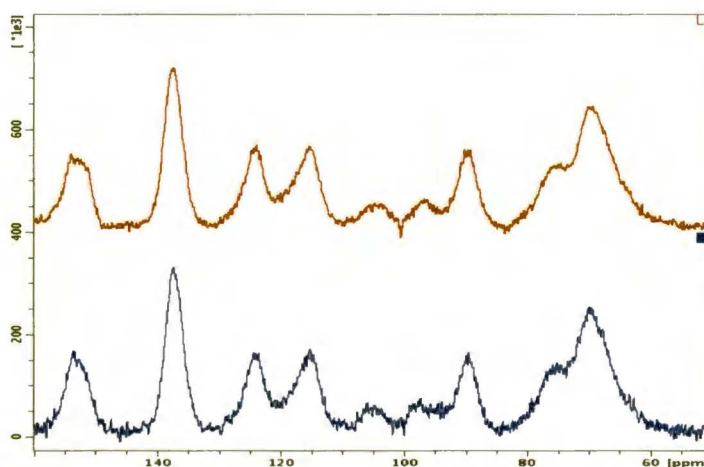


Rys. 60. Widma ^{13}C NMR kolejno od góry:

- Chiralpak AD,
- Chiralpak AD z n-heksanem,
- Chiralpak AD z etanolem,
- Chiralpak AD z izopropanolem.

Sygnały w widmie Chiralpak AD są najszersze co wskazuje na nieuporządkowanie struktury (bądź poszerzenie wynikające z dynamiki). Natomiast sygnały Chiralpak AD w n-heksanie są nieco węższe, a w alkoholach - znacząco węższe. Oznacza to, iż oddziaływanie Chiralpak AD z alkoholami jest silniejsze niż z n-heksanem.

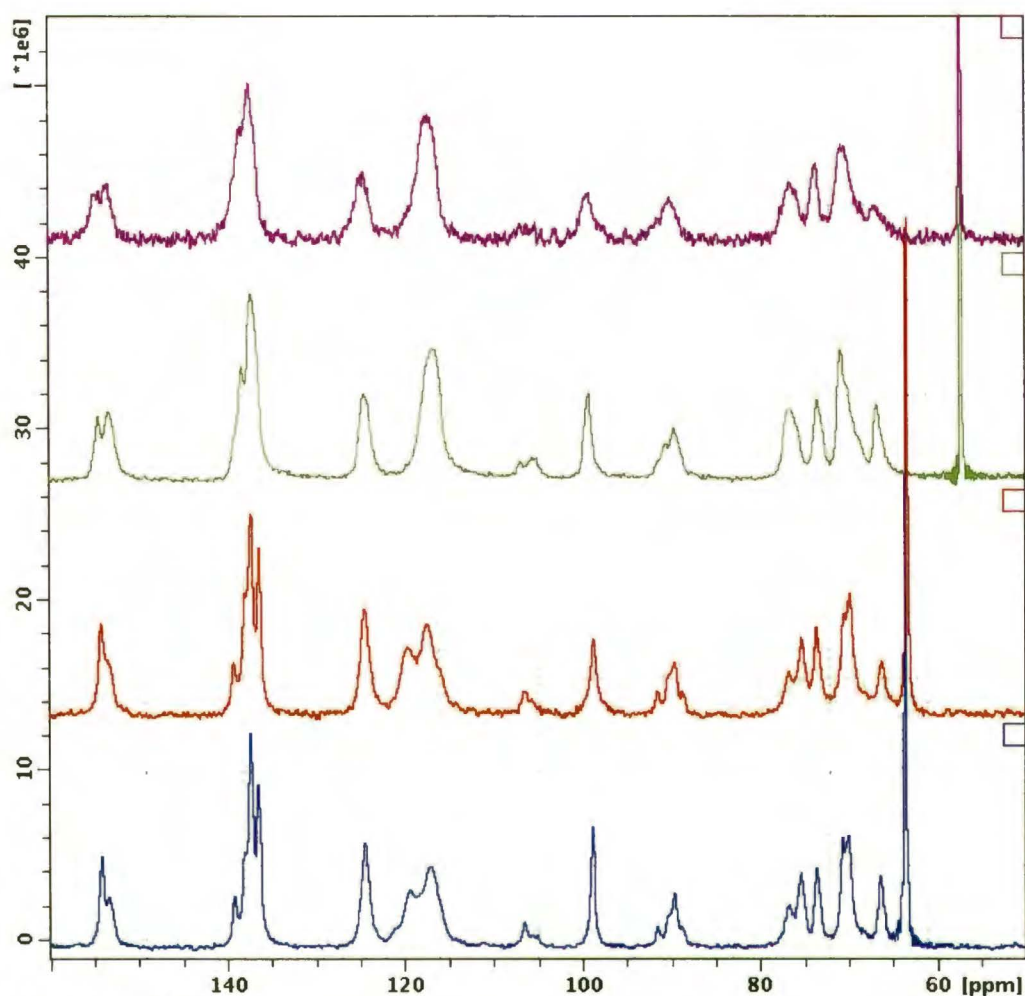
Sprawdzono również oddziaływania czystego Chiralpak AD z wodą (Rys. 61). Oba widma są identyczne co sugeruje, że czysta woda nie oddziałuje z Chiralpak AD.



Rys. 61. Widma ^{13}C NMR kolejno od góry:

- Chiralpak AD,
- Chiralpak AD z wodą.

Następnie zbadano rolę wody w oddziaływaniu alkoholi z Chiralpak AD. Na Rys. 62 przedstawiono widma Chiralpak AD z: etanolem, etanolem/ H_2O (90/10 v/v), izopropanolem oraz izopropanolem/ H_2O (90/10 v/v). Pierwsze dwa widma dotyczą etanolu, dwa następne izopropanolu. W obu przypadkach po dodaniu wody do alkoholu obserwujemy niewielkie zmiany w widmie. Największa zmiana (zwięźlenie linii, zwiększenie intensywności) ma miejsce na sygnałach 98 ppm oraz 67 ppm, które zostały przypisane do węgla C1 i C6 cukru [96].



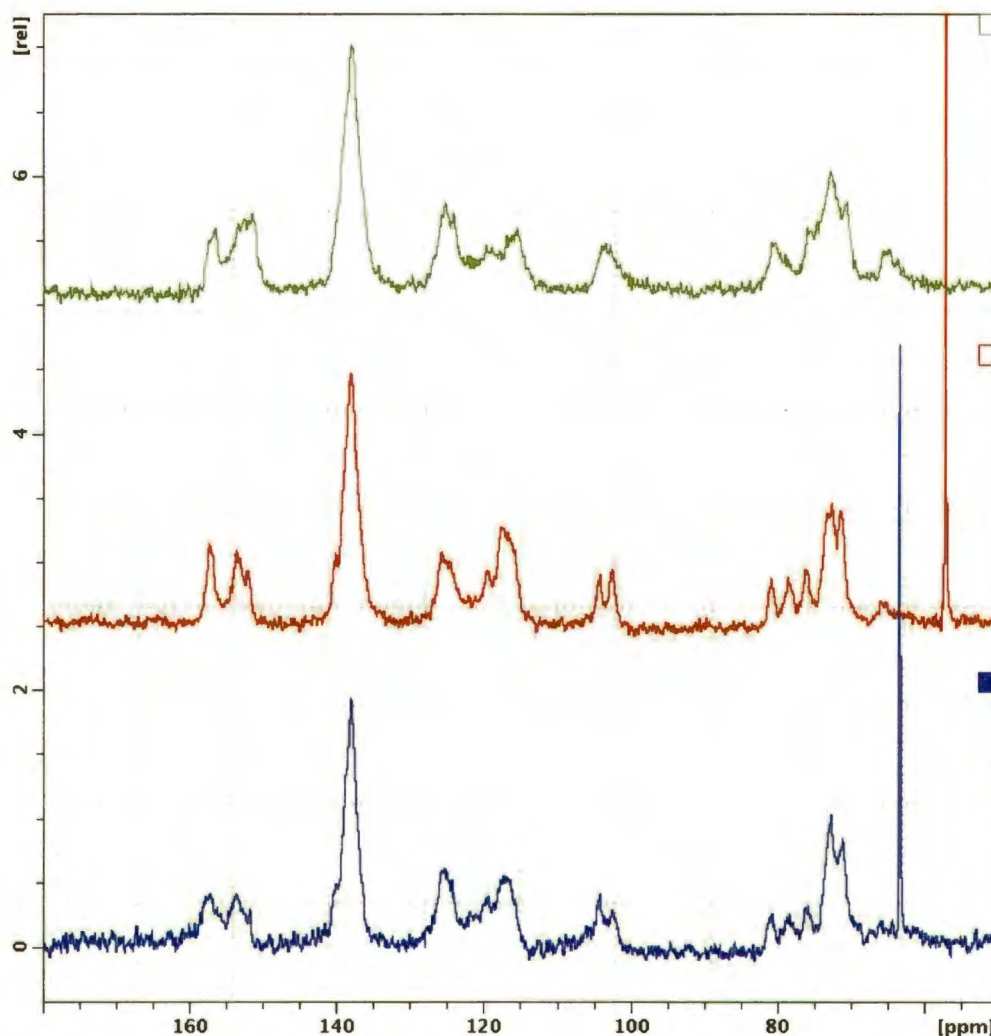
Rys. 62. Widma ^{13}C NMR kolejno od góry:

- Chiralpak AD z etanolem,
- Chiralpak AD z mieszaniną etanol/ H_2O (90/10 v/v/),
- Chiralpak AD z izopropanolem,
- Chiralpak AD z mieszaniną izopropanol/ H_2O (90/10 v/v).

Dla złoża Chiralcel OD również wykonano badania NMR ciała stałego w rozpuszczalnikach z: n-heksanem, etanolem, izopropanolem oraz mieszaniną tych alkoholi z wodą na podstawie publikacji Wang i Wenslow [96].

Widma Chiralcel OD z heksanem, etanolem i z izopropanolem przedstawiono na Rys. 63. Sygnały przypisano analogicznie jak w widmach z Chiralpak AD. Wąskie sygnały pochodzą od alkoholi. Brak satelitów rotacyjnych, dzięki zastosowaniu sekwencji TOSS. Niektóre sygnały Chiralcelu OD w alkoholach są węższe niż w n-heksanie, w szczególności sygnały jąder węgla w grupie cukrowej (około 105 ppm –

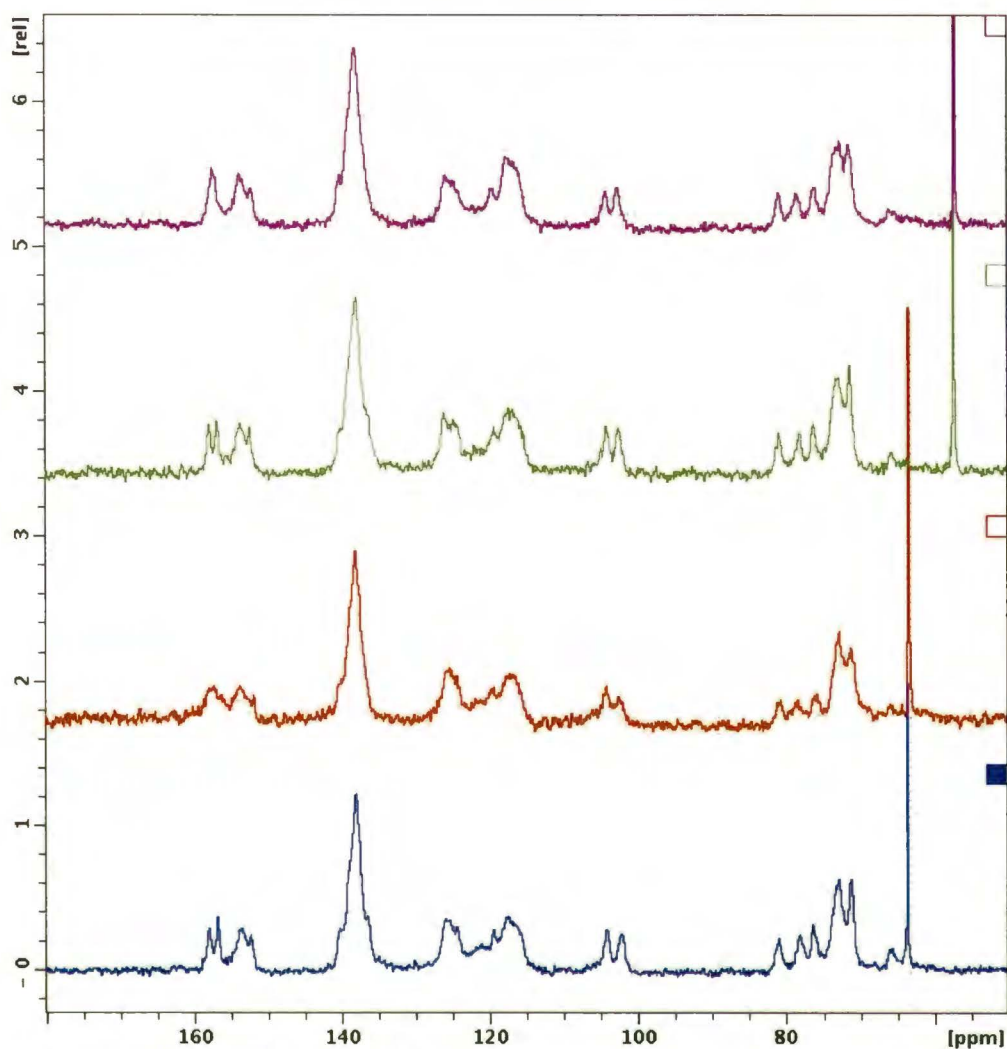
sygnały C1, około 65-85 ppm – sygnały C2-C6). Natomiast widma Chiralcelu OD w etanolu i izopropanolu są identyczne.



Rys. 63. Widma ^{13}C NMR kolejno od góry:

- Chiralcel OD z n-heksanem,
- Chiralcel OD z etanolem,
- Chiralcel OD z izopropanolem.

Następnie zbadano rolę wody w oddziaływaniu alkoholi ze złożem Chiralcel OD. Widma Chiralpak OD z etanolem, etanolem/ H_2O (90/10 v/v), izopropanolem, oraz z izopropanolem/ H_2O (90/10 v/v) zostały przedstawione na Rys. 64. Pierwsze dwa widma dotyczą etanolu, dwa następne izopropanolu. W obu przypadkach po dodaniu wody do alkoholu widma pozostają praktycznie niezmienione. Jediną widoczną zmianą jest rozszczepienie sygnału przy 158 ppm, który odpowiada jądrom węgla w grupach $\text{C}=\text{O}$.



Rys. 64. Widma ^{13}C NMR kolejno od góry:

- Chiralcel OD z etanolem,
- Chiralcel OD z mieszaniną etanol/ H_2O (90/10 v/v/),
- Chiralcel OD z izopropanolem
- Chiralcel OD z mieszaniną izopropanol/ H_2O (90/10 v/v).

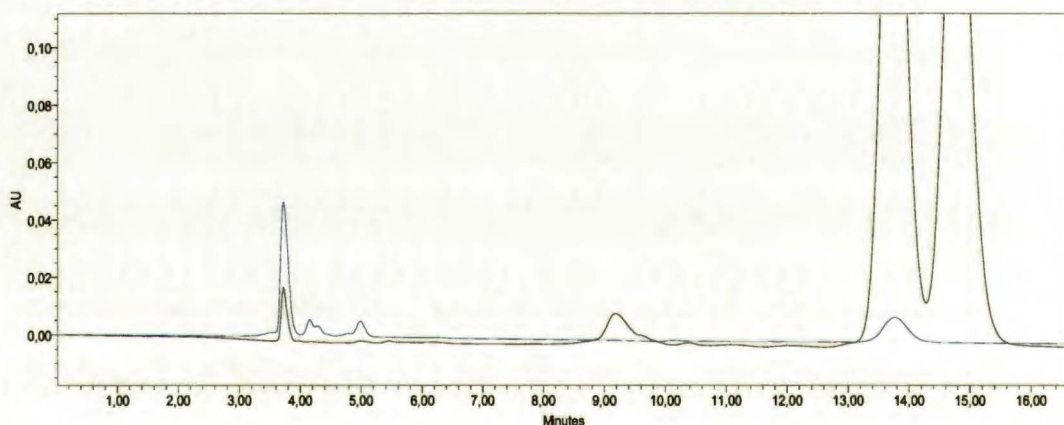
Uzyskane wyniki NMR dla Chiralpak AD i Chiralcel OD potwierdzają wpływ alkoholi na zmianę struktury fazy stacjonarnej (różne widma dla heksanu i alkoholi). Dla Chiralpak AD widać różnicę dla etanolu i izopropanolu. Na Chiralcel OD nie widać różnicy dla obu alkoholi. Dodatek wody do alkoholi w niewielkim stopniu wpływa na zmianę widma jedynie dla Chiralpak AD.

2.4 Kolejność wymywania enancjomerów

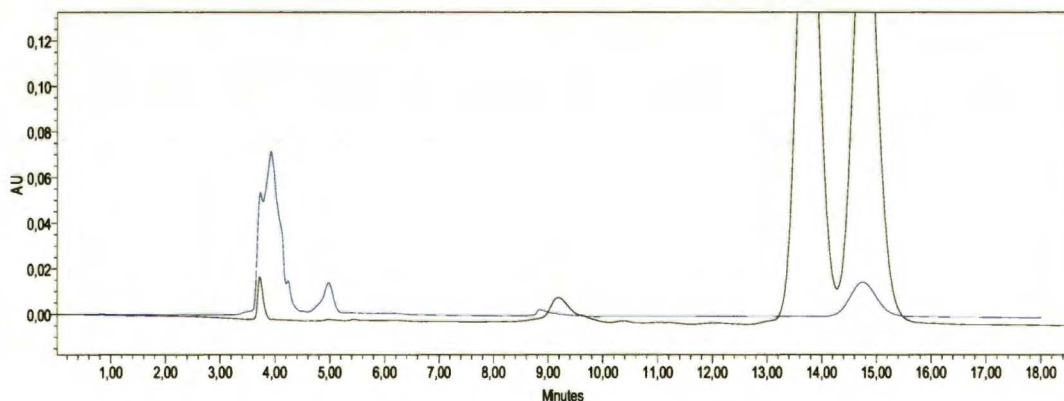
Rozdzielono mikropreparatywnie (w skali mg) następujące związki: Ph1, Ph2, MeO1, MeO2, Cl1, Cl2 (patrz część doświadczalna, punkt 7). Czystość enancjomeryczna uzyskanych próbek została sprawdzona chromatograficznie. Przykładowe chromatogramy dla wybranych związków przedstawiono na Rys. 65 - 66.

Kolejność wymywania rozdzielonych enancjomerów została zbadana na poszczególnych fazach stacjonarnych we wszystkich fazach ruchomych. Wyniki przedstawione zostały w Tabeli 20. Konfiguracja R, S została ustalona na podstawie wzorców enancjomerów.

A



B

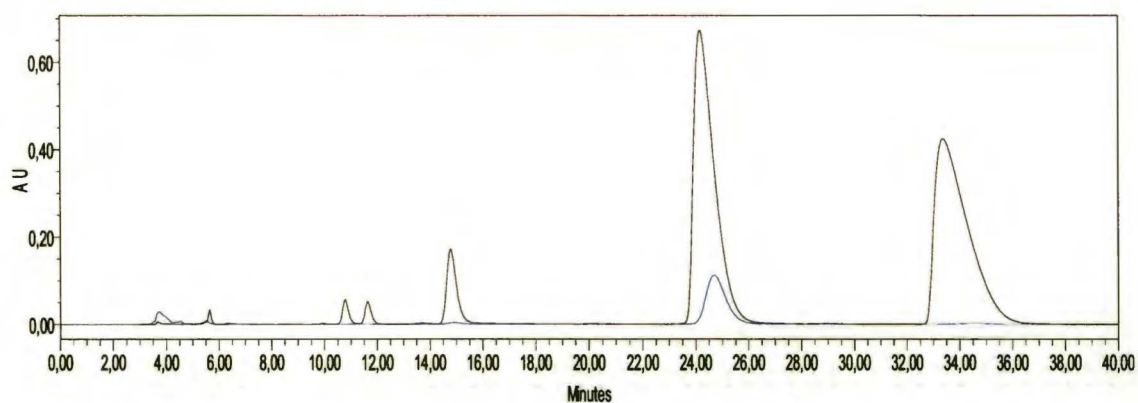


Rys. 65. Sprawdzenie kolejności wymywania rozdzielonych enancjomerów w układzie: kolumna Chiralcel OD, faza ruchoma: n-heksan/EtOH (85/15 v/v). Wykresy przedstawiają nałożenie dwóch chromatogramów:

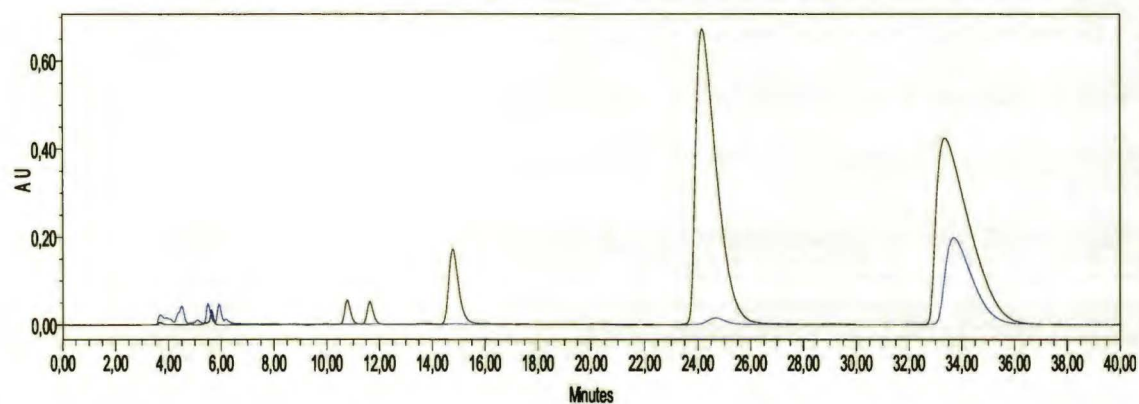
(A) recemat związku MeO1 i enancjomer1 (S) związku MeO1,

(B) racemat związku MeO1 i enancjomer2 (R) związku MeO1.

A



B



Rys. 66. Sprawdzenie kolejności wymywania rozdzielonych enancjomerów w układzie: kolumna Chiralpak IA, faza ruchoma: n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v). Wykresy przedstawiają nałożenie dwóch chromatogramów: (A) racemat związku C11 i enancjomer1 (R) związku C11, (B) racemat związku C11 i enancjomer2 (S) związku C11.

Tabela 20. Kolejność wmywania enancjomerów Ph1, Ph2, Me1, Me2, C11, C12 na kolumnach Chiralpak IA, Chiralpak AD, Chiralcel OD w układach faz normalnych.

Kolumna	Układ	Kolejność wmywania enancjomerów											
		Ph1		Ph2		MeO1		MeO2		C11		C12	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Chiralpak IA	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	1	2
	n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	1	2
Chiralpak AD	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	1	2
	n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)	R	S	R	S	-	-	R	S	R	S	1	2
	n-heksan/IPA (90/10 v/v)	R	S	R	S	-	-	R	S	-	-	1	2
	n-heksan/IPA/H ₂ O (90/10/0,2 v/v/v)	-	-	R	S	-	-	R	S	-	-	1	2
Chiralcel OD	n-heksan/EtOH (85/15 v/v)	-	-	S	R	S	R	S	R	S	R	2	1
	n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	2	1
	n-heksan/IPA (90/10 v/v)	-	-	S	R	S	R	S	R	S	R	2	1
	n-heksan/IPA/H ₂ O (90/10/0,2 v/v/v)	-	-	S	R	S	R	S	R	S	R	2	1

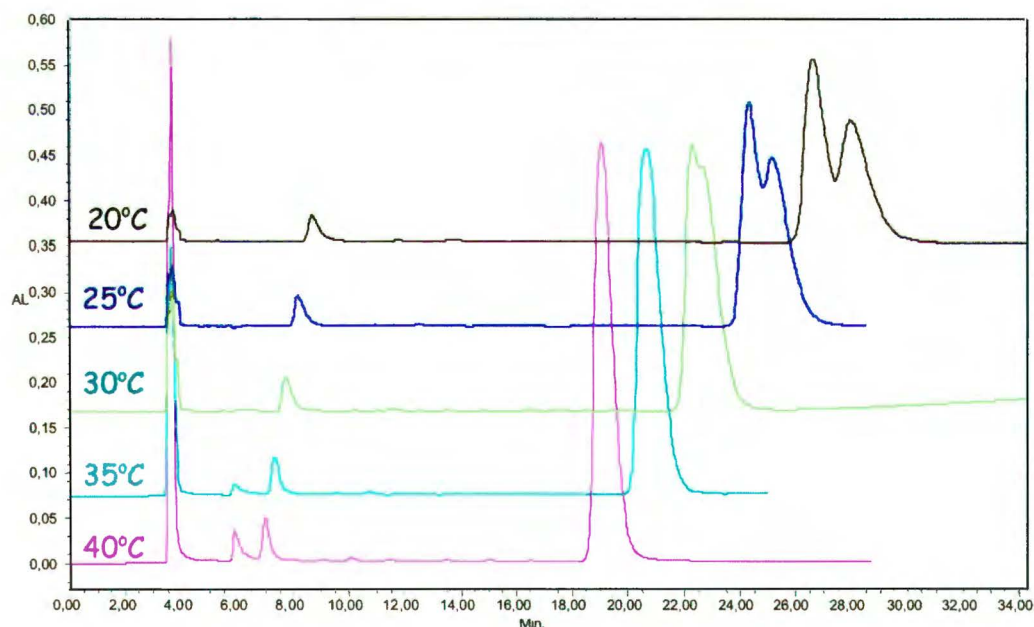
Konfiguracja R, S została ustalona na podstawie wzorców enancjomerów.

Uzyskane wyniki pokazują, że zmiana modyfikatorów fazy ruchomej na poszczególnych kolumnach nie wpływa na zmianę kolejności wmywania enancjomerów. Natomiast, jeśli porównać fazy stacjonarne to kolejność wmywania poszczególnych enancjomerów na kolumnie celulozowej Chiralcel OD jest odwrotna (z wyjątkiem związku MeO1) w porównaniu do kolumn amylozowych. Informacja ta jest szczególnie ważna w analizie czystości enancjomerycznej, kiedy istotne jest aby małe ilości zanieczyszczeń wychodziły przed głównym pikiem.

2.5. Badania temperaturowe

Badania temperaturowe zostały przeprowadzone dla 6 wybranych związków (Ph1, Ph2, MeO1, MeO2, Cl1, Cl2) w zakresie temperatur 20°C - 40°C na kolumnach polisacharydowych: Chiralpak AD, Chiralcel OD we wszystkich badanych układach faz ruchomych. Natomiast na kolumnie Chiralpak IA tylko w fazie ruchomej z etanolem oraz z etanolem i niewielkim dodatkiem wody.

Otrzymane wyniki pokazują, iż czasy retencji jak również enancjoselektywność badanych związków maleją wraz ze wzrostem temperatury (Rys. 67). Wyjątkiem jest związek Cl2 na kolumnie Chiralpak AD w fazie ruchomej: n-heksan/EtOH (85/15 v/v) oraz związki MeO1, Ph2 na kolumnie Chiralpak IA w fazie ruchomej n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v), dla których mimo zmniejszających się współczynników retencji wraz ze wzrostem temperatury enancjoselektywność nieznacznie się zwiększa.



Rys. 67. Wpływ temperatury na retencje i rozdzielanie chiralne związku MeO1 na kolumnie Chiralpak AD w fazie ruchomej n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).

Otrzymano liniowe zależności van't Hoffa w badanym zakresie temperatur dla wszystkich badanych układów (zakres współczynnika korelacji 0,92-1,00). Dzięki temu na podstawie wzorów omówionych w rozdziale 4.1 w części literaturowej wyliczono funkcje termodynamiczne przejścia enancjomerów pomiędzy fazą ruchomą i stacjonarną. Wyniki zostały przedstawione w Tabelach 21-30. Liniowe zależności świadczą o tym, iż w badanym zakresie temperatur nie ma zmiany mechanizmu retencji. Ponadto w celu uzyskania dodatkowych informacji o oddziaływaniach enancjomerów z fazą stacjonarną w zależności od składu fazy ruchomej sprawdzono kompensację entalpowo-entropową dla badanych układów (Rys. 68-83). Uzyskanie liniowych wykresów kompensacji entalpowo-entropowej ΔH od $(\Delta S/RT + \ln \phi)$ może oznaczać, iż enancjomery oddziałują z fazą stacjonarną według tego samego mechanizmu [132]. Natomiast wykresy zależności $\Delta\Delta H$ od $T\Delta\Delta S$ pozwalają nam na uzyskanie informacji o fizykochemicznej naturze rozróżnienia chiralnego.

2.5.1 Kolumna Chiralpak AD

Wyniki badanych związków na kolumnie Chiralpak AD przedstawione w Tabelach 21-24 pokazują, iż zmiana fazy ruchomej wpływa na zmianę entalpii i entropii przejścia enancjomerów między fazą ruchomą i stacjonarną. Zmiany entalpii przejścia z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej we wszystkich fazach ruchomych są z reguły bardziej ujemne dla enancjomeru wymywanego w drugiej kolejności. Zatem oddziaływania pomiędzy fazą stacjonarną i drugim enancjomerem są bardziej korzystne entalpowo. Natomiast zmiany entropii przejścia pierwszego enancjomeru dla większości związków we wszystkich fazach ruchomych są mniej ujemne dla pierwszego enancjomeru. Oznacza to iż zmiany entropii sprzyjają dłużej retencji dla enancjomeru wymywanego w pierwszej kolejności. Wyjątek stanowi związek Cl2 w fazie ruchomej n-heksan/EtOH (85/15 v/v), dla którego entalpia przejścia do fazy stacjonarnej jest korzystniejsza dla pierwszego enancjomeru, a więc jego retencja powinna być dłuższa. Jednakże bardziej niekorzystne zmiany entropii powodują skrócenie retencji. Wyjątki zostały zaznaczone w tabelach kolorem czerwonym.

Porównując wartości termodynamiczne w zależności od fazy ruchomej można zauważyć, iż zamiana alkoholu z etanolu na izopropanol powoduje zmniejszenie zmian

entalpii i entropii badanych związków. Wynika z tego, że dla fazy ruchomej z etanolem oddziaływania związków z fazą stacjonarną są korzystniejsze entalpowo natomiast mniej korzystne entropowo w porównaniu do fazy z izopropanolem.

Niewielki dodatek wody do fazy ruchomej z etanolem powoduje zmniejszenie zmian entalpii i entropii przejścia z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej badanych związków. Natomiast w fazie ruchomej z izopropanolem jest odwrotnie: zmiany entalpii i entropii badanych związków nieznacznie zwiększyły się po dodaniu niewielkiej ilości wody do fazy ruchomej. Wynika z tego, iż w przypadku fazy z etanolem woda powoduje osłabienie oddziaływań z fazą stacjonarną, a w fazie z izopropanolem dodatek wody wpływa na zwiększenie oddziaływań enancjomerów z fazą stacjonarną. Odzwierciedla się to we współczynnikach retencji, które w fazie z etanolem po dodaniu niewielkiej ilości wody skracają się natomiast w fazie z izopropanolem dodatek wody zwiększa współczynniki retencji.

Tabela 21. Termodynamiczne dane badanych enancjomerów na kolumnie Chiralpak AD w fazie ruchomej n-heksan/EtOH (85/15 v/v).

Chiralpak AD							
n-heksan/EtOH (85/15 v/v)							
Związek	Kolejność enancjomerów	ΔH (kJ/mol)	$\Delta S/R + \ln \phi$	$\Delta \Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta \Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G (=RT \ln \alpha)$
MeO1	2 (R)	$-20,8 \pm 0,2$	$-6,2 \pm 0,4$	-2,2	-1,6	-0,6	-0,6
	1 (S)	$-18,5 \pm 0,1$	$-5,6 \pm 0,3$				
MeO2	2 (S)	$-23,4 \pm 0,4$	$-8,0 \pm 0,9$	-1,6	-1,1	-0,5	-0,5
	1 (R)	$-21,8 \pm 0,4$	$-7,5 \pm 0,9$				
Cl1	2 (S)	$-19,6 \pm 0,1$	$-5,5 \pm 0,3$	-2,8	-1,5	-1,4	-1,4
	1 (R)	$-16,8 \pm 0,03$	$-4,9 \pm 0,1$				
Cl2	2	$-20,5 \pm 0,2$	$-7,0 \pm 0,5$	1,4	1,7	-0,3	-0,2
	1	$-21,9 \pm 0,5$	$-7,7 \pm 1,2$				
Ph1	2 (S)	$-24,0 \pm 0,1$	$-6,6 \pm 0,3$	-7,1	-4,5	-2,6	-2,5
	1 (R)	$-16,9 \pm 0,02$	$-4,7 \pm 0,1$				
Ph2	2 (S)	$-22,5 \pm 0,1$	$-7,4 \pm 0,1$	-3,0	-2,0	-1,0	-1,0
	1 (R)	$-19,5 \pm 0,1$	$-6,6 \pm 0,2$				

Tabela 22. Termodynamiczne dane badanych enancjomerów na kolumnie Chiralpak AD w fazie ruchomej n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).

Chiralpak AD							
n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)							
Związek	Kolejność enancjomerów	ΔH (kJ/mol)	$\Delta S/R + \ln \phi$	$\Delta \Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta \Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G (=RT \ln \alpha)$
MeO1	2	-17,5 ± 0,1	-5,3 ± 0,2	-2,4	-2,3	-0,1	-0,1
	1	-15,2 ± 0,1	-4,4 ± 0,1				
MeO2	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-				
Cl1	2 (S)	-17,0 ± 0,1	-4,6 ± 0,3	-2,3	-0,7	-1,6	-1,6
	1 (R)	-14,7 ± 0,03	-4,3 ± 0,1				
Cl2	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-				
Ph1	2 (S)	-19,4 ± 0,1	-4,7 ± 0,2	-4,1	-1,6	-2,5	-2,5
	1 (R)	-15,3 ± 0,1	-4,1 ± 0,2				
Ph2	2 (S)	-20,9 ± 0,1	-6,8 ± 0,2	-2,3	-1,3	-1,0	-1,0
	1 (R)	-18,6 ± 0,1	-6,3 ± 0,3				

Tabela 23. Termodynamiczne dane badanych enancjomerów na kolumnie Chiralpak AD w fazie ruchomej n-heksan/IPA (10/90 v/v).

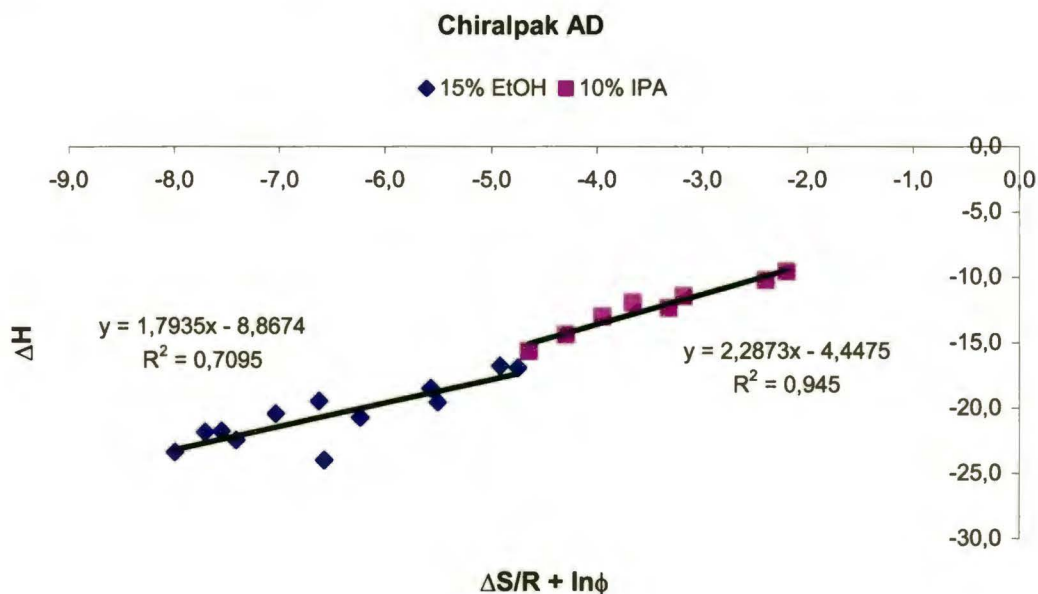
Chiralpak AD							
n-heksan/IPA (10/90 v/v)							
Związek	Kolejność enancjomerów	ΔH (kJ/mol)	$\Delta S/R + \ln \phi$	$\Delta \Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta \Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G (=RT \ln \alpha)$
MeO1	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-				
MeO2	2 (S)	-15,7 ± 0,2	-4,6 ± 0,4	-1,3	-0,9	-0,4	-0,4
	1 (R)	-14,4 ± 0,3	-4,3 ± 0,7				
Cl1	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-				
Cl2	2	-13,0 ± 0,2	-3,9 ± 0,6	-1,1	-0,7	-0,4	-0,3
	1	-12,0 ± 0,2	-3,7 ± 0,6				
Ph1	2 (S)	-10,2 ± 0,2	-2,4 ± 0,5	-0,7	-0,5	-0,2	-0,2
	1 (R)	-9,6 ± 0,2	-2,2 ± 0,5				
Ph2	2 (S)	-12,4 ± 0,1	-3,3 ± 0,2	-0,9	-0,4	-0,5	-0,6
	1 (R)	-11,5 ± 0,1	-3,2 ± 0,2				

Tabela 24. Termodynamiczne dane badanych enancjomerów na kolumnie Chiralpak AD w fazie ruchomej n-heksan/IPA/H₂O (90/10/0,2 v/v/v).

Chiralpak AD							
n-heksan/IPA/H ₂ O (90/10/0,2 v/v/v)							
Związek	Kolejność enancjomerów	ΔH (kJ/mol)	$\Delta S/R + \ln\phi$	$\Delta\Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta\Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta G (=RT\ln\alpha)$
MeO1	- -	- -	- -	-	-	-	-
MeO2	2 (S) 1 (R)	-20,6 ± 0,2 -19,8 ± 0,2	-6,0 ± 0,5 -5,8 ± 0,4	-0,8	-0,5	-0,3	-0,3
Cl1	- -	- -	- -	-	-	-	-
Cl2	2 1	-16,5 ± 0,2 -15,1 ± 0,1	-4,8 ± 0,4 -4,5 ± 0,3	-1,4	-0,9	-0,5	-0,5
Ph1	- -	- -	- -	-	-	-	-
Ph2	2 (S) 1 (R)	-17,2 ± 0,2 -16,1 ± 0,1	-4,7 ± 0,4 -4,5 ± 0,4	-1,1	-0,5	-0,6	-0,6

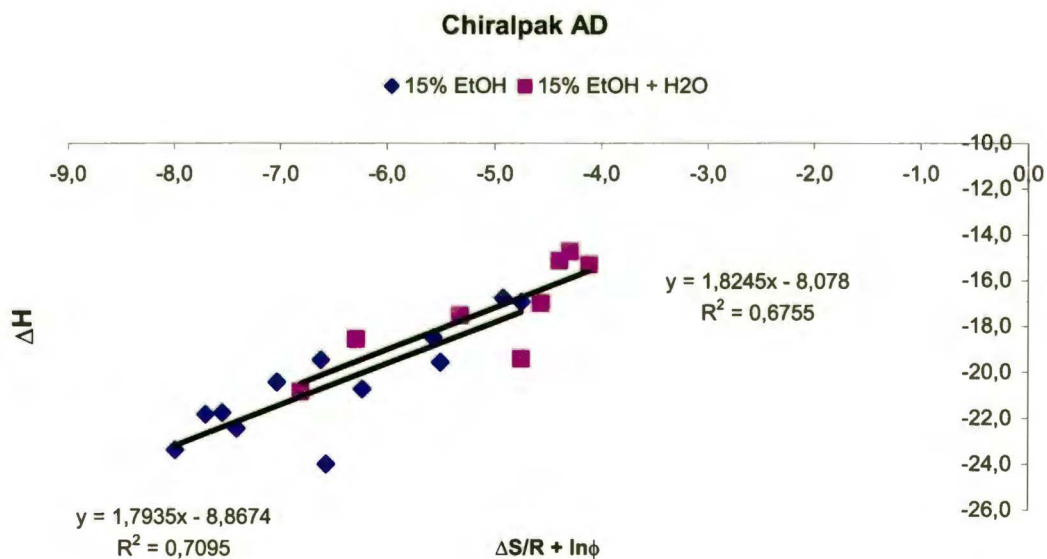
2.5.1.1 Kompensacja entalpowo-entropowa

Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresach jako $\Delta H = f(\Delta S/R + \ln\phi)$ (Rys. 68-70). Dla badanych układów uzyskano różne zależności mogące świadczyć o zmianie fizykochemicznych mechanizmów retencji w zależności od zastosowanego eluentu. W przypadku faz z izopropanolem oraz izopropanolem z niewielką ilością wody uzyskano dobre liniowe korelacje dla obu enancjomerów (Rys. 70). Może to wskazywać na podobny mechanizm oddziaływania pomiędzy enancjomerami i fazą stacjonarną w poszczególnych fazach ruchomych. Natomiast dla fazy z etanolem, jako organicznym modyfikatorem oraz etanolem i wodą lepsze korelacje zostały uzyskane wykreślając wykresy dla poszczególnych enancjomerów. Z tym, że korelacje poprawiły się i są liniowe w obu przypadkach tylko dla enancjomerów wymywanych w pierwszej kolejności (Rys. 71-72). Może to oznaczać, iż fizykochemiczne oddziaływania enancjomerów z fazą stacjonarną są różne dla obu enancjomerów, ale podobne dla enancjomerów wymywanych w pierwszej kolejności zarówno w fazie z etanolem jak i w fazie z etanolem i dodatkiem wody.



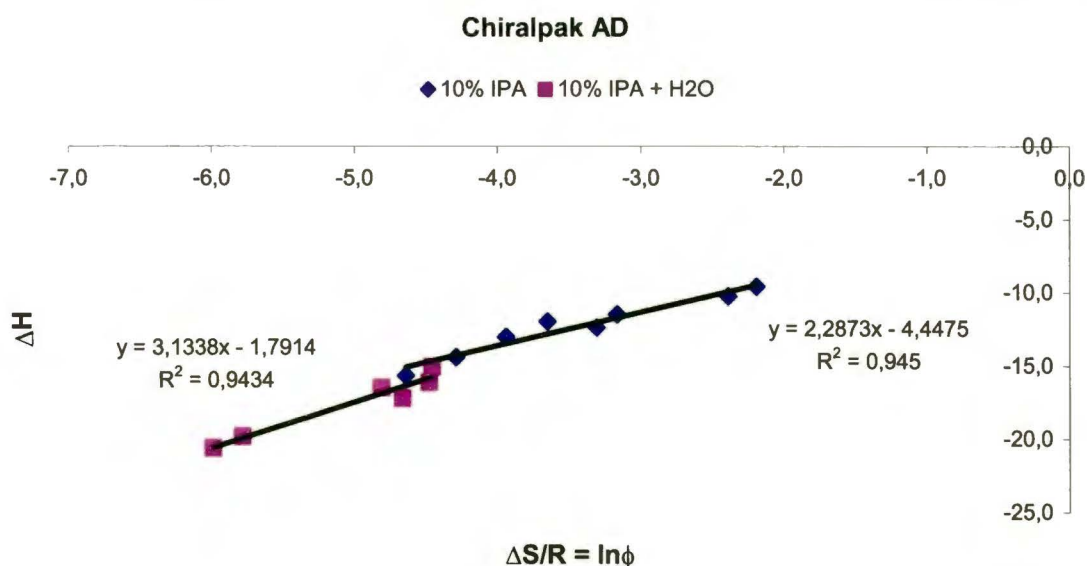
Rys. 68. Wykres zależności ΔH od $\Delta S/R + \ln\phi$ badanych związków na kolumnie Chiralpak AD w fazach ruchomych:

- ◆ n-heksan/EtOH (85/15 v/v),
- n-heksan/IPA (90/10 v/v).



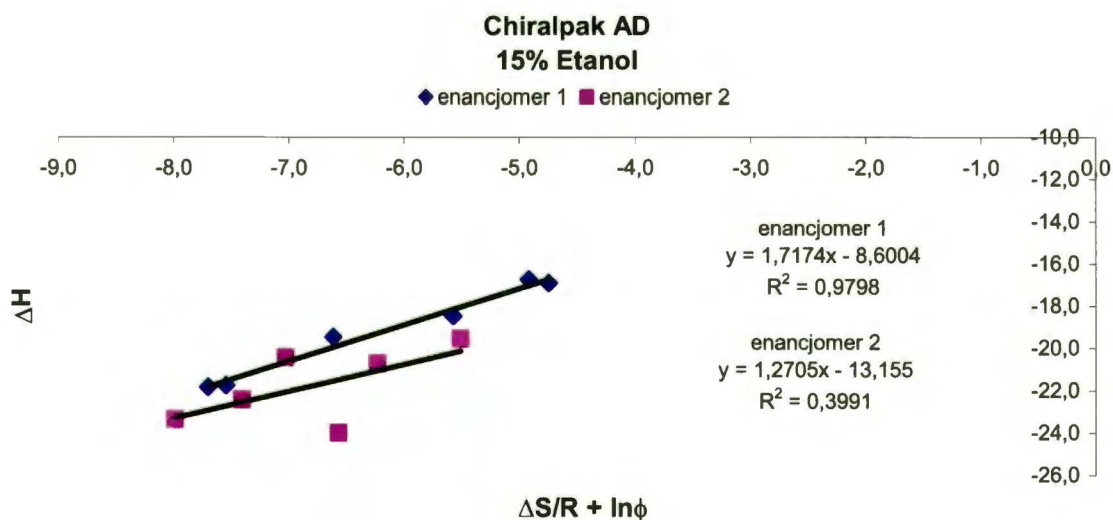
Rys. 69. Wykres zależności ΔH od $\Delta S/R + \ln\phi$ badanych związków na kolumnie Chiralpak AD w fazach ruchomych:

- ◆ n-heksan/EtOH (85/15 v/v),
- n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).



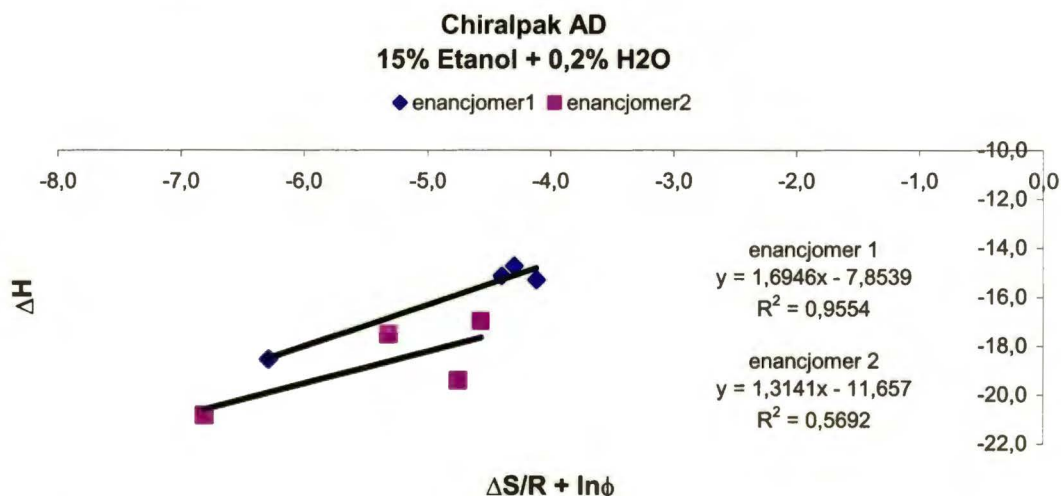
Rys. 70. Wykres zależności ΔH od $\Delta S/R + \ln\phi$ badanych związków na kolumnie Chiralpak AD w fazach ruchomych:

- ◆ n-heksan/IPA (90/10 v/v),
- n-heksan/IPA/H₂O (90/10/0,2 v/v/v).



Rys. 71. Wykres zależności ΔH od $\Delta S/R + \ln\phi$ poszczególnych enancjomerów badanych związków na kolumnie Chiralpak AD w fazie ruchomej n-heksan/EtOH (85/15 v/v):

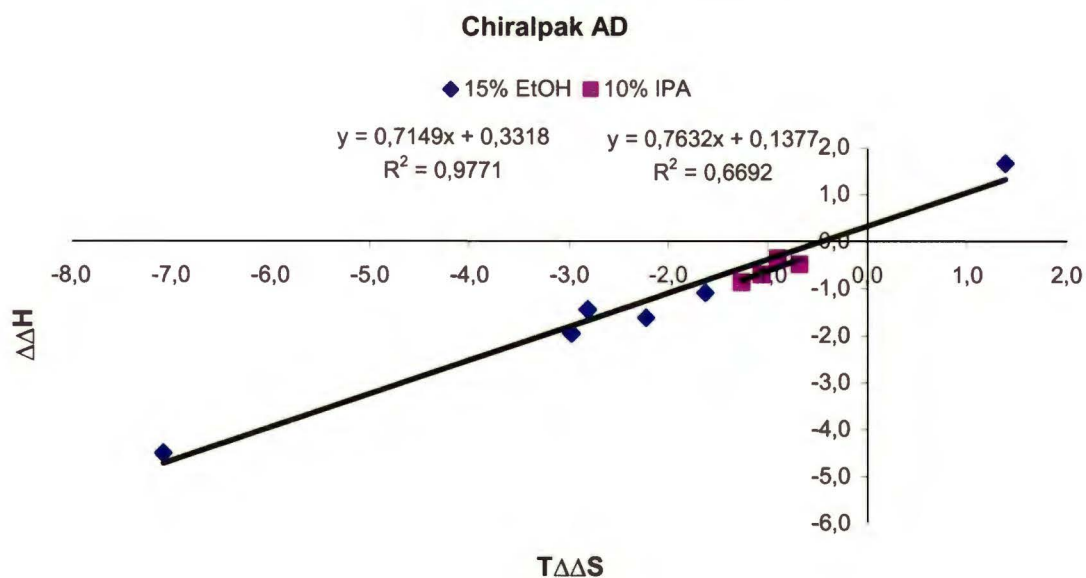
- ◆ enancjomer 1,
- enancjomer 2.



Rys.72. Wykres zależności ΔH od $\Delta S/R + \ln\phi$ poszczególnych enancjomerów badanych związków na kolumnie Chiralpak AD w fazie ruchomej n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v):

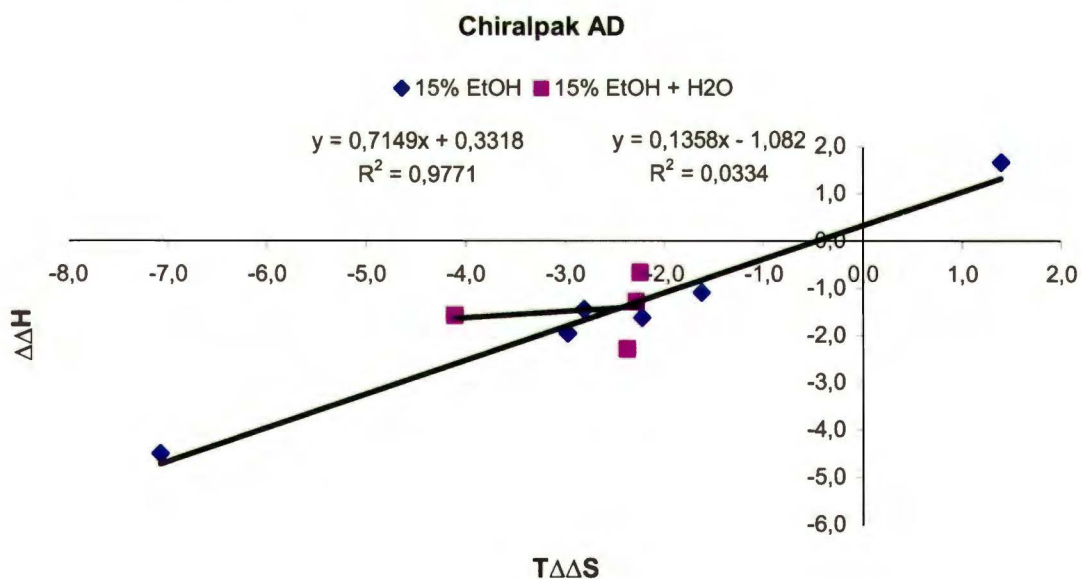
- ◆ enancjomer 1,
- enancjomer 2.

Przedstawione wyniki kompensacji entalpowo - entropowej ($\Delta\Delta H$ od $T\Delta\Delta S$) (Rys. 73-75) pokazują, iż fizykochemiczna natura rozróżnienia chiralnego zależy od zastosowanej fazy ruchomej. W przypadku fazy z etanolem, jako organicznym modyfikatorem uzyskano liniową korelację, co może oznaczać, iż mechanizm rozróżnienia chiralnego jedynie w tej fazie jest taki sam dla wszystkich związków. Natomiast w pozostałych układach faz ruchomych mechanizm rozróżnienia jest dużo bardziej skomplikowany.



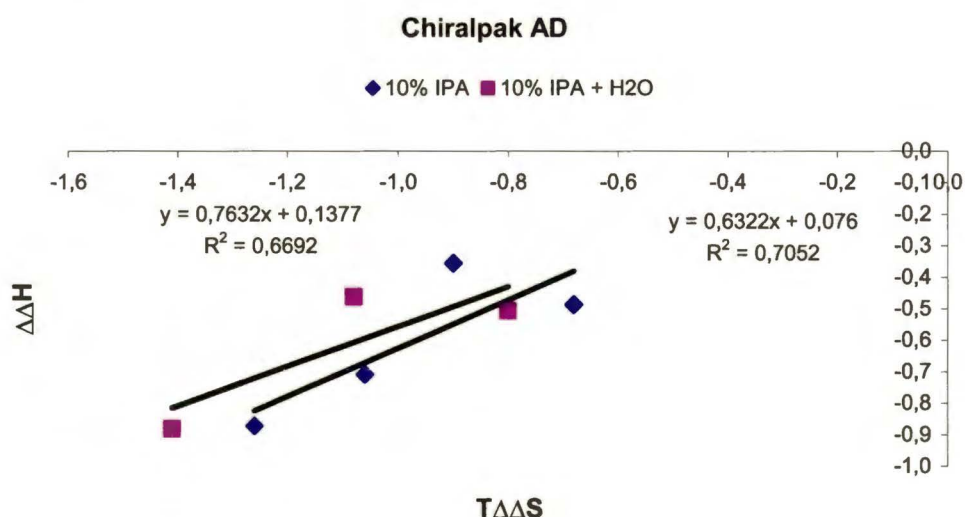
Rys. 73. Wykres zależności $\Delta\Delta H$ od $T\Delta\Delta S$ enancjomerów badanych związków na kolumnie Chiralpak AD w fazach ruchomych:

- ◆ n-heksan/EtOH (85/15 v/v),
- n-heksan/IPA (90/10 v/v).



Rys. 74. Wykres zależności $\Delta\Delta H$ od $T\Delta\Delta S$ enancjomerów badanych związków na kolumnie Chiralpak AD w fazach ruchomych:

- ◆ n-heksan/EtOH (85/15 v/v),
- n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).



Rys. 75. Wykres zależności $\Delta\Delta H$ od $T\Delta\Delta S$ enancjomerów badanych związków na kolumnie Chiralpak AD w fazach ruchomych:

- ◆ n-heksan/IPA (90/10 v/v),
- n-heksan/IPA/H₂O (90/10/0,2 v/v/v).

2.5.2 Kolumna Chiralpak IA

Wyliczone dane termodynamiczne uzyskane dla kolumny Chiralpak IA przedstawione zostały w Tabelach 25-26. Również i na tej kolumnie wielkości entalpii i entropii zmieniają się w zależności od zastosowanej fazy ruchomej. Podobnie jak na kolumnie Chiralpak AD w fazie ruchomej z etanolem zmiany entalpii przejścia enancjomerów z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej są większe dla drugiego enancjomeru. Oznacza to, że silniej oddziałują z fazą stacjonarną i dlatego też wymywane są w drugiej kolejności. Natomiast zmiany entropii przejścia związków z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej sprzyjają dłuższej retencji pierwszego enancjomeru.

Dodatek wody do fazy ruchomej z etanolem na kolumnie Chiralpak IA wpływa (odwrotnie niż na kolumnie Chiralpak AD) na zwiększenie entalpii dla związków MeO₂, Cl₁, Ph₁, co oznacza ich silniejsze oddziaływanie z fazą stacjonarną. Jednakże ich współczynniki retencji tego nie potwierdzają, gdyż zmniejszają się w fazie ruchomej z dodatkiem wody. Prawdopodobnie zwiększenie zmian entropowych po dodaniu wody do fazy ruchomej powoduje osłabienie oddziaływań związków z fazą stacjonarną. Natomiast w przypadku związków MeO₁ oraz Ph₂ entalpia pierwszego enancjomeru

jest większa niż drugiego, co sugeruje, iż bardziej niekorzystne zmiany entropowe powodują wymywanie się tych enancjomerów w pierwszej kolejności.

Tabela 25. Termodynamiczne dane badanych enancjomerów na kolumnie Chiralpak IA w fazie ruchomej n-heksan/EtOH/ (85/15/ v/v).

Chiralpak IA							
n-heksan/EtOH/ (85/15/ v/v)							
Związek	Kolejność enancjomerów	ΔH (kJ/mol)	$\Delta S/R + \ln \phi$	$\Delta \Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta \Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G (=RT \ln \alpha)$
MeO1	2 (R)	$-21,6 \pm 0,1$	$-6,5 \pm 0,3$	-3,1	-1,9	-1,2	-1,1
	1 (S)	$-18,5 \pm 0,3$	$-5,7 \pm 0,7$				
MeO2	2 (S)	$-17,3 \pm 0,3$	$-5,8 \pm 0,7$	-0,6	-0,4	-0,2	-0,2
	1 (R)	$-16,6 \pm 0,3$	$-5,6 \pm 0,7$				
Cl1	2 (S)	$-18,6 \pm 0,02$	$-5,4 \pm 0,04$	-1,9	-1,1	-0,8	-0,8
	1 (R)	$-16,7 \pm 0,1$	$-4,9 \pm 0,3$				
Cl2	2	$-18,1 \pm 0,2$	$-6,2 \pm 0,5$	-0,6	-0,4	-0,2	-0,2
	1	$-17,5 \pm 0,2$	$-6,1 \pm 0,5$				
Ph1	2 (S)	$-20,6 \pm 0,4$	$-5,5 \pm 0,9$	-5,0	-3,0	-2,0	-1,9
	1 (R)	$-15,6 \pm 0,5$	$-4,3 \pm 1,3$				
Ph2	2 (S)	$-19,0 \pm 0,4$	$-6,2 \pm 1,0$	-0,4	0,0	-0,4	-0,4
	1 (R)	$-18,6 \pm 0,4$	$-6,2 \pm 1,0$				

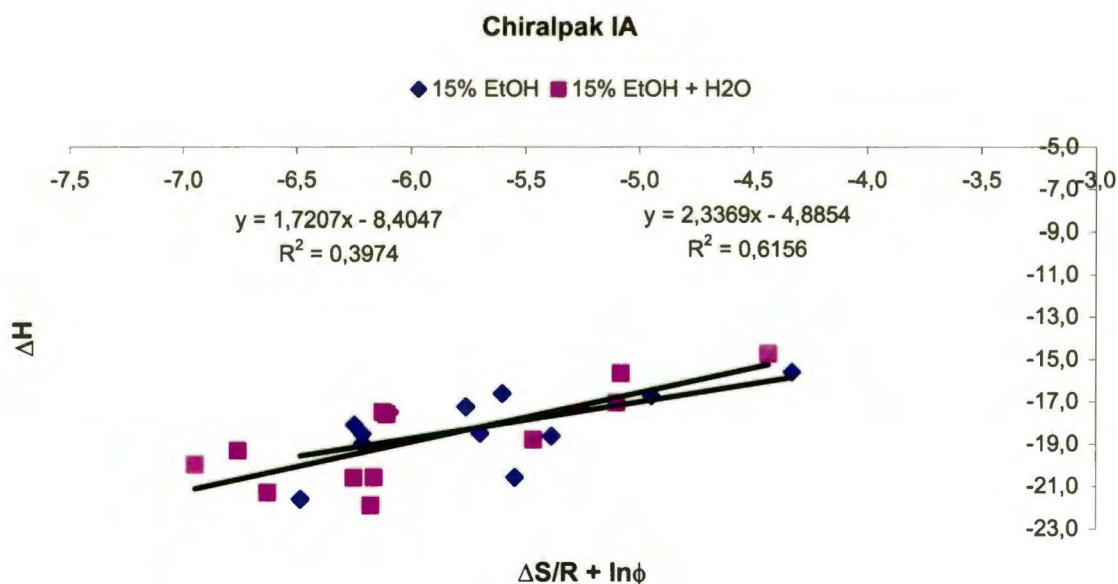
Tabela 26. Termodynamiczne dane badanych enancjomerów na kolumnie Chiralpak IA w fazie ruchomej n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).

Chiralpak IA							
n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)							
Związek	Kolejność enancjomerów	ΔH (kJ/mol)	$\Delta S/R + \ln \phi$	$\Delta \Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta \Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G (=RT \ln \alpha)$
MeO1	2 (R)	$-20,6 \pm 0,2$	$-6,2 \pm 0,5$	0,7	1,2	-0,5	-0,5
	1 (S)	$-21,3 \pm 0,3$	$-6,6 \pm 0,7$				
MeO2	2 (S)	$-20,0 \pm 0,2$	$-6,9 \pm 0,5$	-0,7	-0,5	0,2	-0,2
	1 (R)	$-19,3 \pm 0,2$	$-6,8 \pm 0,5$				
Cl1	2 (S)	$-18,8 \pm 0,4$	$-5,5 \pm 0,9$	-1,8	-0,9	-0,9	-0,8
	1 (R)	$-17,1 \pm 0,3$	$-5,1 \pm 0,9$				
Cl2	2	$-17,6 \pm 0,3$	$-6,1 \pm 0,8$	-0,1	0,0	-0,2	-0,2
	1	$-17,5 \pm 0,3$	$-6,1 \pm 0,8$				
Ph1	2 (S)	$-21,9 \pm 0,2$	$-6,2 \pm 0,5$	-1,3	0,2	-1,5	-1,4
	1 (R)	$-20,6 \pm 0,1$	$-6,2 \pm 0,3$				
Ph2	2 (S)	$-14,7 \pm 0,7$	$-4,4 \pm 1,9$	0,9	1,6	-0,7	-0,7
	1 (R)	$-15,7 \pm 0,5$	$-5,1 \pm 1,3$				

2.5.2.1 Kompensacja entalpowo-entropowa

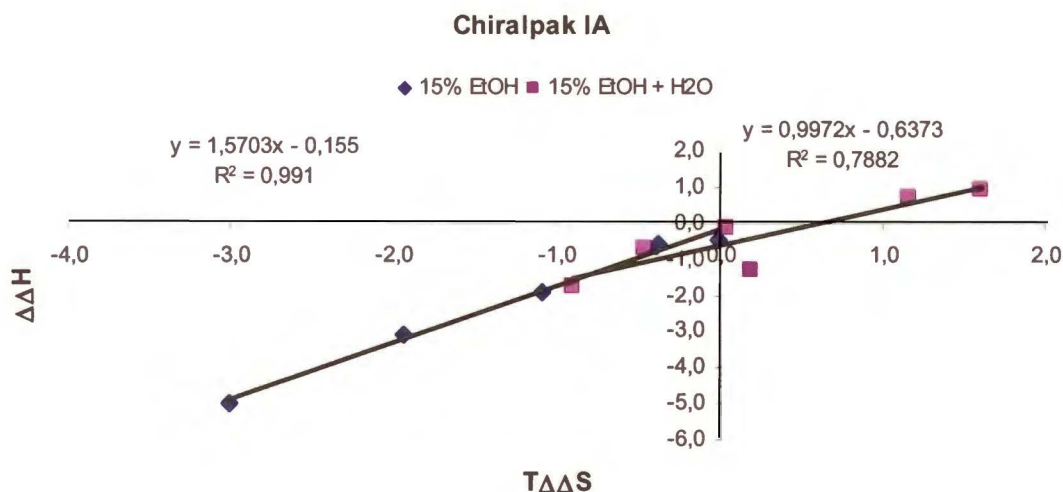
Na kolumnie Chiralpak IA zarówno w fazie ruchomej z etanolem jak i etanolem z dodatkiem wody nie otrzymano liniowych zależności $\Delta H = f(\Delta S/R + \ln\phi)$ (Rys. 76). Może to oznaczać, iż enancjomery w różny sposób oddziałują z fazą stacjonarną w obu fazach ruchomych bądź, iż mechanizm jest dużo bardziej skomplikowany.

Zależności $\Delta\Delta H = f(T\Delta\Delta S)$ (Rys. 77) pokazały, iż badane związki w fazie ruchomej z etanolem prawdopodobnie rozdzielają się według tego samego mechanizmu. W przypadku fazy ruchomej etanol z dodatkiem wody (odwrotnie w porównaniu do kolumny Chiralpak AD) nie uzyskano liniowej korelacji, co może wskazywać, iż woda wpływa na zmianę mechanizmu rozróżniania enancjomerów. Wynik ten pokazuje, że różnica między kolumną Chiralpak AD i Chiralpak IA polegająca na sposobie obsadzenia selektora na silikażelu (unieruchomiony, powleczony) może wpływać na zmianę enancjoselektywności układu.



Rys. 76. Wykres zależności ΔH od $\Delta S/R + \ln\phi$ badanych związków na kolumnie Chiralpak IA w fazach ruchomych:

- ◆ n-heksan/EtOH (85/15 v/v),
- n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).



Rys. 77. Wykres zależności $\Delta\Delta H$ od $T\Delta\Delta S$ enancjomerów badanych związków na kolumnie Chiralpak IA w fazach ruchomych:

- ◆ n-heksan/EtOH (85/15 v/v),
- n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).

2.5.3 Kolumna Chiralcel OD

Podobnie jak na fazach amylozowych uzyskane wyniki termodynamiczne sześciu badanych związków na kolumnie Chiralcel OD (Tabele 27-30) różnią się w zależności od zastosowanej fazy ruchomej. Zmiana entalpii przejścia związków z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej tak jak i na poprzednich kolumnach na ogół jest większa dla drugiego enancjomeru we wszystkich fazach ruchomych. Natomiast zmiana entropii przejścia związków z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej jest korzystniejsza dla pierwszego enancjomeru. Wyjątek tu stanowią związki: Ph₂ w fazie ruchomej n-heksan/EtOH (85/15 v/v) oraz Cl₂ w fazie n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v). Prawdopodobnie w tych przypadkach bardziej niekorzystne zmiany entropii dla pierwszego enancjomeru powodują, iż wymywają się one w pierwszej kolejności pomimo większej entalpii, która wskazuje na silniejsze oddziaływania z fazą stacjonarną.

Zamiana organicznego modyfikatora fazy ruchomej z etanolu na izopropanol wpływa na zwiększenie zmian entalpii przejścia z fazy ruchomej do stacjonarnej dla większości związków (odwrotnie niż na fazie stacjonarnej Chiralpak AD). Wyjątkiem

jest tu związek Ph2. Oznacza to silniejsze oddziaływania związków z fazą stacjonarną w fazie ruchomej z izopropanolem, jako organicznym modyfikatorem w porównaniu z etanolem. Zmiany entropii przejścia związków z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej są bardziej korzystne w fazie ruchomej z etanolem dla MeO2, Cl1 natomiast w fazie z izopropanolem dla MeO1, Cl2, Ph2.

Dodatek wody do faz ruchomych zarówno z etanolem jak i izopropanolem wpłynął na zmniejszenie entalpii i entropii dla większości badanych związków. Wyjątek stanowi związek Ph2 w układzie n-heksan/IPA/H₂O (90/10/0,2 v/v/v). Uzyskane wyniki pokazują, że dodatek wody wpływa na osłabienie oddziaływań związków z fazą stacjonarną. Odzwiedla się to we współczynnikach retencji, które w większości przypadków zmniejszają się w fazach z dodatkiem wody.

Tabela 27. Termodynamiczne dane badanych enancjomerów na kolumnie Chiralcel OD w fazie ruchomej n-heksan/EtOH/ (85/15/ v/v).

Chiralcel OD							
n-heksan/EtOH/ (85/15/ v/v)							
Związek	Kolejność enancjomerów	ΔH (kJ/mol)	$\Delta S/R + \ln \phi$	$\Delta \Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta \Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G (=RT \ln \alpha)$
MeO1	2 (R)	-17,5 ± 0,1	-6,2 ± 0,4	-0,5	-0,2	-0,2	-0,2
	1 (S)	-17,0 ± 0,1	-6,1 ± 0,3				
MeO2	2 (R)	-20,2 ± 0,1	-7,1 ± 0,3	-0,9	-0,7	-0,2	-0,2
	1 (S)	-19,3 ± 0,1	-6,8 ± 0,3				
Cl1	2 (R)	-13,7 ± 0,1	-4,8 ± 0,2	-0,7	-0,4	-0,3	-0,3
	1 (S)	-13,0 ± 0,1	-4,6 ± 0,2				
Cl2	2	-17,2 ± 0,1	-6,3 ± 0,3	-0,3	-0,1	-0,2	-0,2
	1	-16,9 ± 0,1	-6,2 ± 0,3				
Ph1	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-				
Ph2	2 (R)	-17,7 ± 0,2	-6,4 ± 0,6	0,5	0,7	-0,2	-0,2
	1 (S)	-18,2 ± 0,2	-6,7 ± 0,5				

Tabela 28. Termodynamiczne dane badanych enancjomerów na kolumnie Chiralcel OD w fazie ruchomej n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).

Chiralcel OD							
n-heksan/EtOH/H ₂ O (85/15/0,2 v/v/v)							
Związek	Kolejność enancjomerów	ΔH (kJ/mol)	$\Delta S/R + \ln \phi$	$\Delta \Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta \Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G (=RT \ln \alpha)$
MeO1	2 (R)	-13,6 ± 0,1	-4,5 ± 0,1	-0,7	-0,3	-0,3	-0,3
	1 (S)	-13,0 ± 0,1	-4,3 ± 0,2				
MeO2	2 (R)	-16,4 ± 0,3	-5,6 ± 0,9	-0,8	-0,5	-0,2	-0,2
	1 (S)	-15,6 ± 0,4	-5,4 ± 1,0				
Cl1	2 (R)	-11,2 ± 0,1	-3,8 ± 0,1	-1,0	-0,7	-0,4	-0,4
	1 (S)	-10,1 ± 0,1	-3,5 ± 0,1				
Cl2	2	-13,0 ± 0,04	-4,7 ± 0,1	0,1	0,3	-0,2	-0,2
	1	-13,1 ± 0,04	-4,8 ± 0,1				
Ph1	2 (R)	-11,0 ± 0,1	-3,5 ± 0,2	-0,7	-0,5	-0,2	-0,2
	1 (S)	-10,3 ± 0,1	-3,3 ± 0,2				
Ph2	2 (R)	-11,4 ± 0,1	-3,6 ± 0,4	-0,4	-0,2	-0,2	-0,2
	1 (S)	-11,0 ± 0,3	-3,5 ± 0,7				

Tabela 29. Termodynamiczne dane badanych enancjomerów na kolumnie Chiralcel OD w fazie ruchomej n-heksan/IPA (90/10 v/v).

Chiralcel OD							
n-heksan/IPA (90/10 v/v)							
Związek	Kolejność enancjomerów	ΔH (kJ/mol)	$\Delta S/R + \ln \phi$	$\Delta \Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta \Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta G (=RT \ln \alpha)$
MeO1	2 (R)	-21,0 ± 0,1	-6,2 ± 0,3	-0,7	-0,5	-0,2	-0,2
	1 (S)	-20,3 ± 0,1	-6,0 ± 0,2				
MeO2	2 (R)	-24,8 ± 0,3	-7,9 ± 0,7	-0,6	-0,3	-0,3	-0,3
	1 (S)	-24,3 ± 0,3	-7,8 ± 0,8				
Cl1	2 (R)	-17,3 ± 0,1	-5,1 ± 0,3	-1,6	-1,2	-0,4	-0,4
	1 (S)	-15,7 ± 0,1	-4,6 ± 0,2				
Cl2	2	-18,3 ± 1,2	-5,9 ± 3,0	-0,7	-0,3	-0,4	-0,4
	1	-17,6 ± 1,2	-5,7 ± 2,9				
Ph1	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-				
Ph2	2 (R)	-13,8 ± 0,4	-3,5 ± 1,0	-0,7	-0,3	-0,3	-0,3
	1 (S)	-13,2 ± 0,4	-3,4 ± 0,9				

Tabela 30. Termodynamiczne dane badanych enancjomerów na kolumnie Chiralcel OD w fazie ruchomej n-heksan/IPA/H₂O (90/10/0,2 v/v/v).

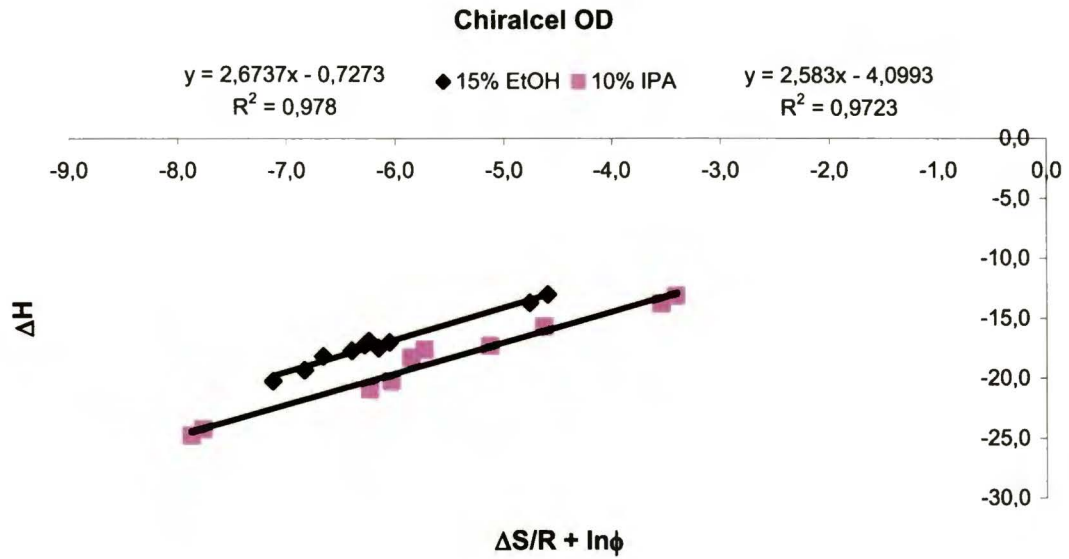
Chiralcel OD							
n-heksan/IPA/H ₂ O (90/10/0,2 v/v/v)							
Związek	Kolejność enancjomerów	ΔH (kJ/mol)	$\Delta S/R + \ln\phi$	$\Delta\Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta\Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta G (=RT\ln\alpha)$
MeO1	2 (R)	-16,8 ± 0,2	-4,6 ± 0,5	0,0	0,2	-0,2	-0,2
	1 (S)	-16,8 ± 0,2	-4,7 ± 0,5				
MeO2	2 (R)	-20,6 ± 0,2	-6,3 ± 0,4	-0,3	0,0	-0,3	-0,3
	1 (S)	-20,3 ± 0,2	-6,3 ± 0,4				
Cl1	2 (R)	-13,2 ± 0,1	-3,6 ± 0,2	-1,0	-0,6	-0,4	-0,4
	1 (S)	-12,2 ± 0,1	-3,3 ± 0,2				
Cl2	2	-16,1 ± 0,1	-5,0 ± 0,3	-0,3	0,0	-0,3	-0,3
	1	-15,8 ± 0,1	-5,0 ± 0,3				
Ph1	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-				
Ph2	2 (R)	-17,9 ± 0,1	-5,4 ± 0,2	-0,2	0,0	-0,2	-0,2
	1 (S)	-17,7 ± 0,1	-5,5 ± 0,2				

2.5.3.1 Kompensacja entalpowo-entropowa

Otrzymane liniowe zależności przedstawione na wykresie jako $\Delta H = f(\Delta S/R + \ln\phi)$ (Rys. 78) na kolumnie Chiralcel OD dla modyfikatorów fazy ruchomej etanolu i izopropanolu wskazują, iż fizykochemiczne oddziaływania enancjomerów badanych związków z fazą stacjonarną są różne dla obu alkoholi.

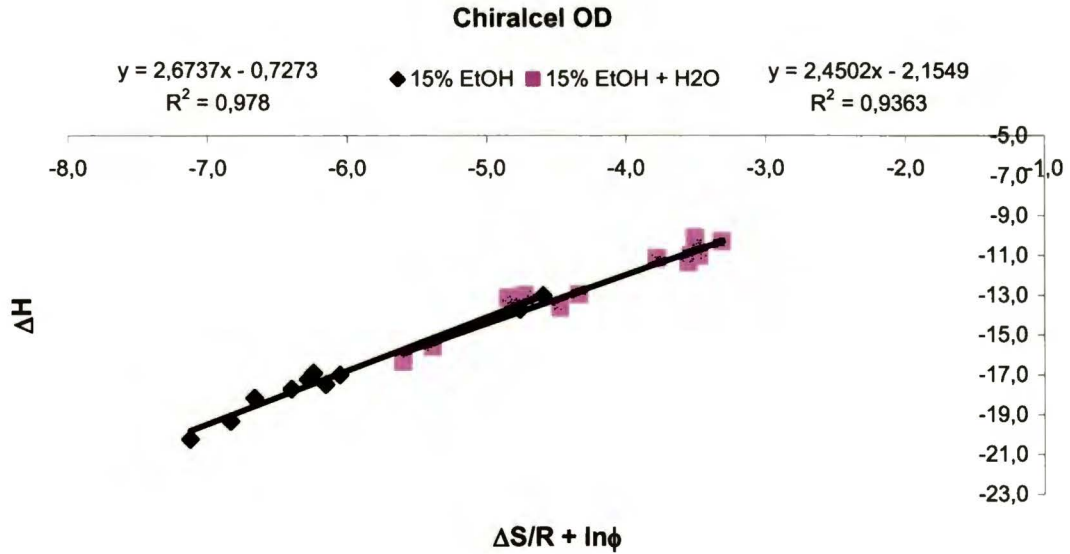
Dodatek wody do faz ruchomych prawdopodobnie nie powoduje istotnych różnic w mechanizmie oddziaływania enancjomerów z fazą stacjonarną. Otrzymane kompensacje entalpowo - entropowe (ΔH od $\Delta S/R + \ln\phi$) (Rys. 79-80) dla faz ruchomych: etanol z dodatkiem wody oraz izopropanol z dodatkiem wody są również liniowe i praktycznie pokrywają się z uzyskanymi kompensacjami dla poszczególnych alkoholi. Może to oznaczać, iż w przypadku fazy Chiralcel OD dodatek wody nie wpływa znacząco na sposób oddziaływania enancjomerów z fazą stacjonarną.

Wykresy zależności $\Delta\Delta H = f(T\Delta\Delta S)$ (Rys. 81-83) we wszystkich fazach ruchomych wykazują liniową korelację a ponadto praktycznie nakładają się na siebie. Może wskazywać to, iż mechanizm rozróżnienia chiralnego na kolumnie Chiralcel OD jest podobny dla obu alkoholi i nie wpływa również na nań niewielki dodatek wody.



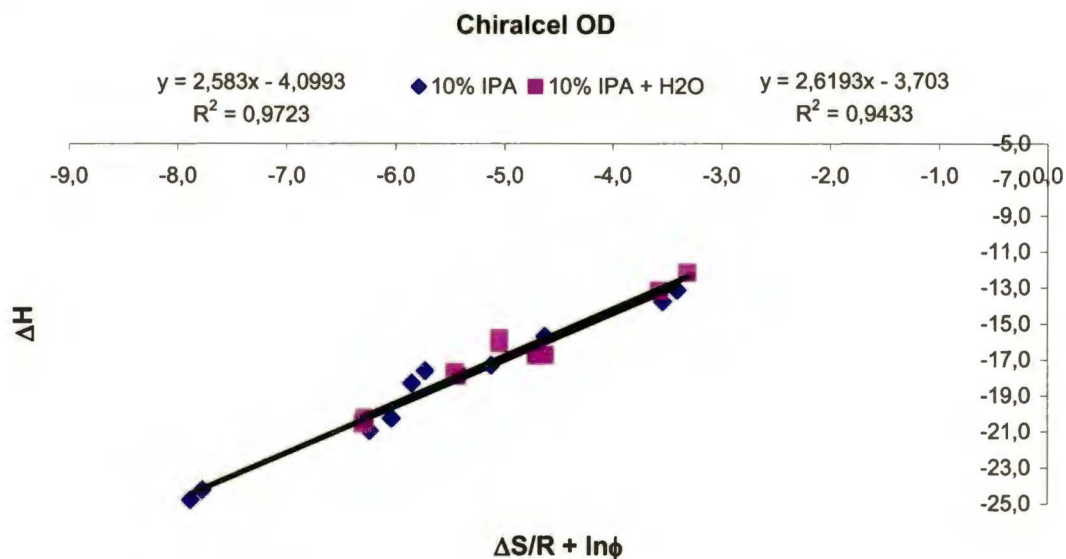
Rys. 78. Wykres zależności ΔH od $\Delta S/R + \ln\phi$ badanych związków na kolumnie Chiralcel OD w fazach ruchomych:

- ◆ n-heksan/EtOH (85/15 v/v),
- n-heksan/IPA (90/10 v/v).



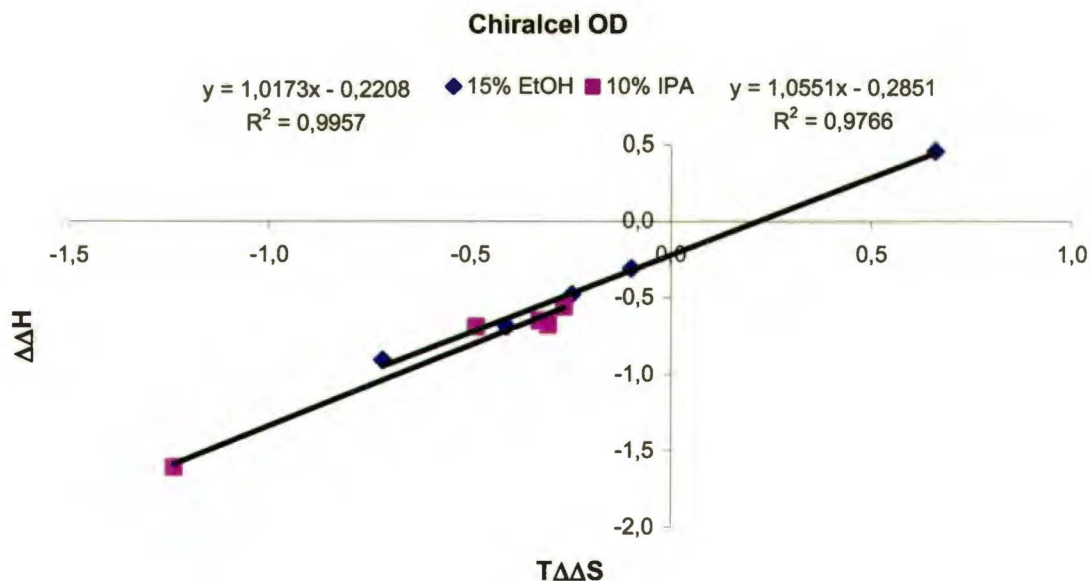
Rys. 79. Wykres zależności ΔH od $\Delta S/R + \ln\phi$ badanych związków na kolumnie Chiralcel OD w fazach ruchomych:

- ◆ n-heksan/EtOH (85/15 v/v),
- n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).



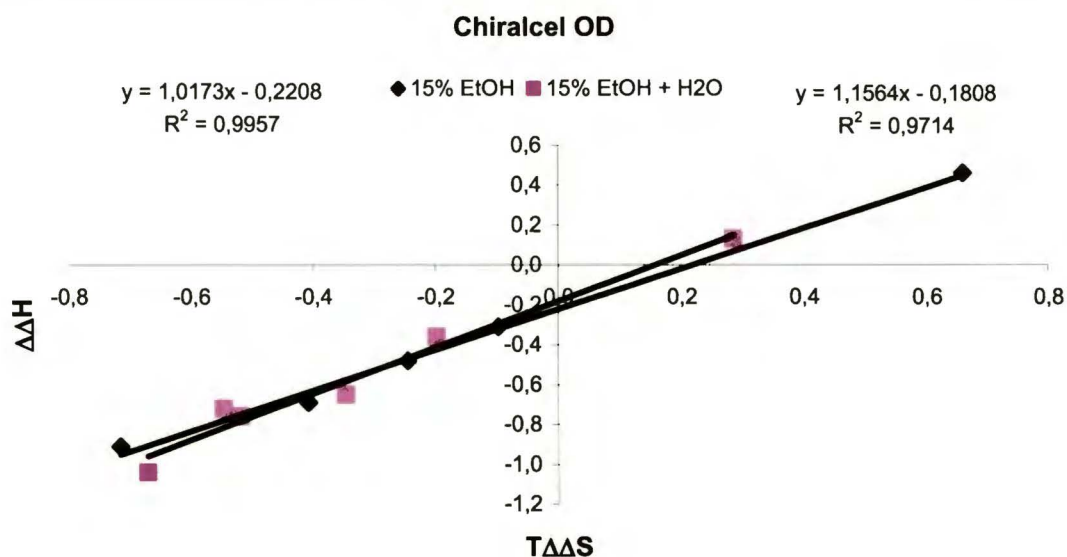
Rys. 80. Wykres zależności ΔH od $\Delta S/R + \ln\phi$ badanych związków na kolumnie Chiralcel OD w fazach ruchomych:

- ◆ n-heksan/IPA (90/10 v/v),
- n-heksan/IPA/H₂O (90/10/0,2 v/v/v).



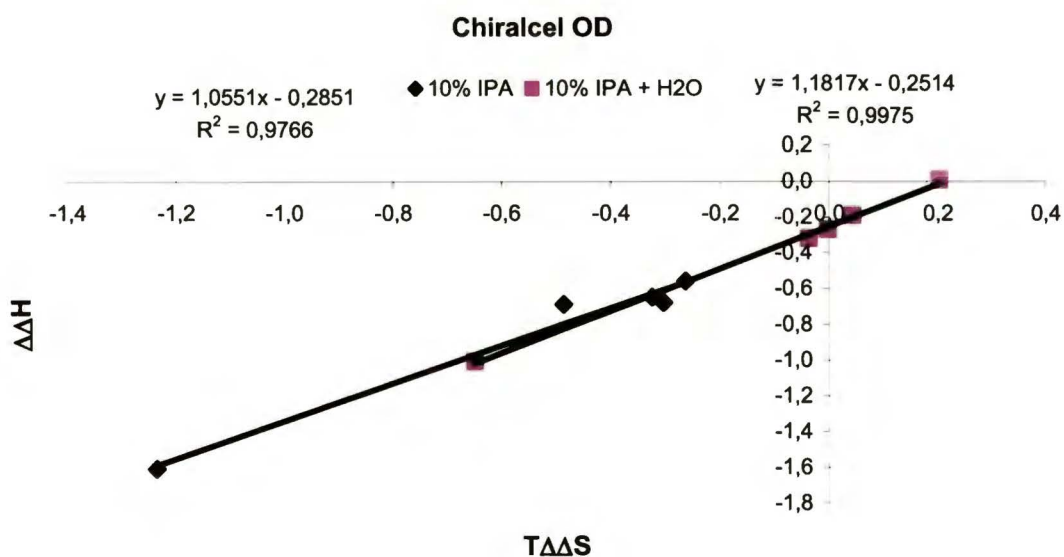
Rys. 81. Wykres zależności $\Delta\Delta H$ od $T\Delta\Delta S$ enancjomerów badanych związków na kolumnie Chiralcel OD w fazach ruchomych:

- ◆ n-heksan/EtOH (85/15 v/v),
- n-heksan/IPA (90/10 v/v).



Rys. 82. Wykres zależności $\Delta\Delta H$ od $T\Delta\Delta S$ enancjomerów badanych związków na kolumnie Chiralcel OD w fazach ruchomych:

- \blacklozenge n-heksan/EtOH (85/15 v/v),
- \blacksquare n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).



Rys. 83. Wykres zależności $\Delta\Delta H$ od $T\Delta\Delta S$ enancjomerów badanych związków na kolumnie Chiralcel OD w fazach ruchomych:

- \blacklozenge n-heksan/IPA (90/10 v/v),
- \blacksquare n-heksan/IPA/H₂O (90/10/0,2 v/v/v).

2.6 Określanie czystości enancjomerycznej pochodnych pirolidyno-2-onów

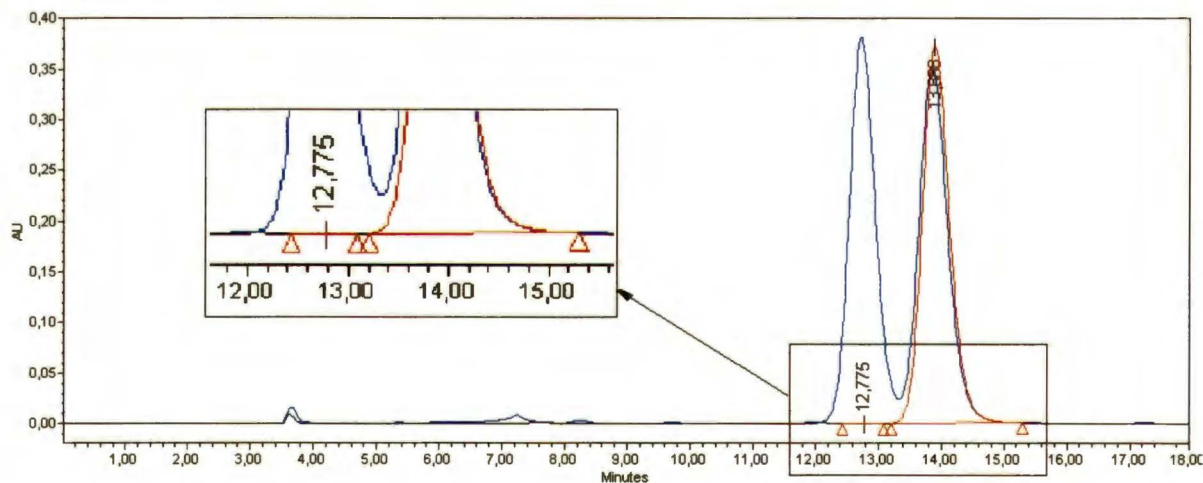
Uzyskane wyniki dla faz polisacharydowych zostały wykorzystane do opracowania analitycznej metody oznaczania czystości enancjomerycznej wybranych zsintezowanych związków (Ph1, Ph2, MeO1, MeO2, Cl1).

Rozpatrując badane układy pod względem czasu analizy badanych związków i uzyskanej enancjoselektywności wybrano następujące układy:

- Związki z grupy OMe oraz Ph2, Cl1, Cl2 - kolumna Chiralcel OD, faza ruchoma: n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v).
- Pozostałe związki (Ph1, Ph3, Ph4, Ph5, Ph6, Cl6) - kolumna Chiralpak IA, faza ruchoma n-heksan/EtOH (85/15 v/v).

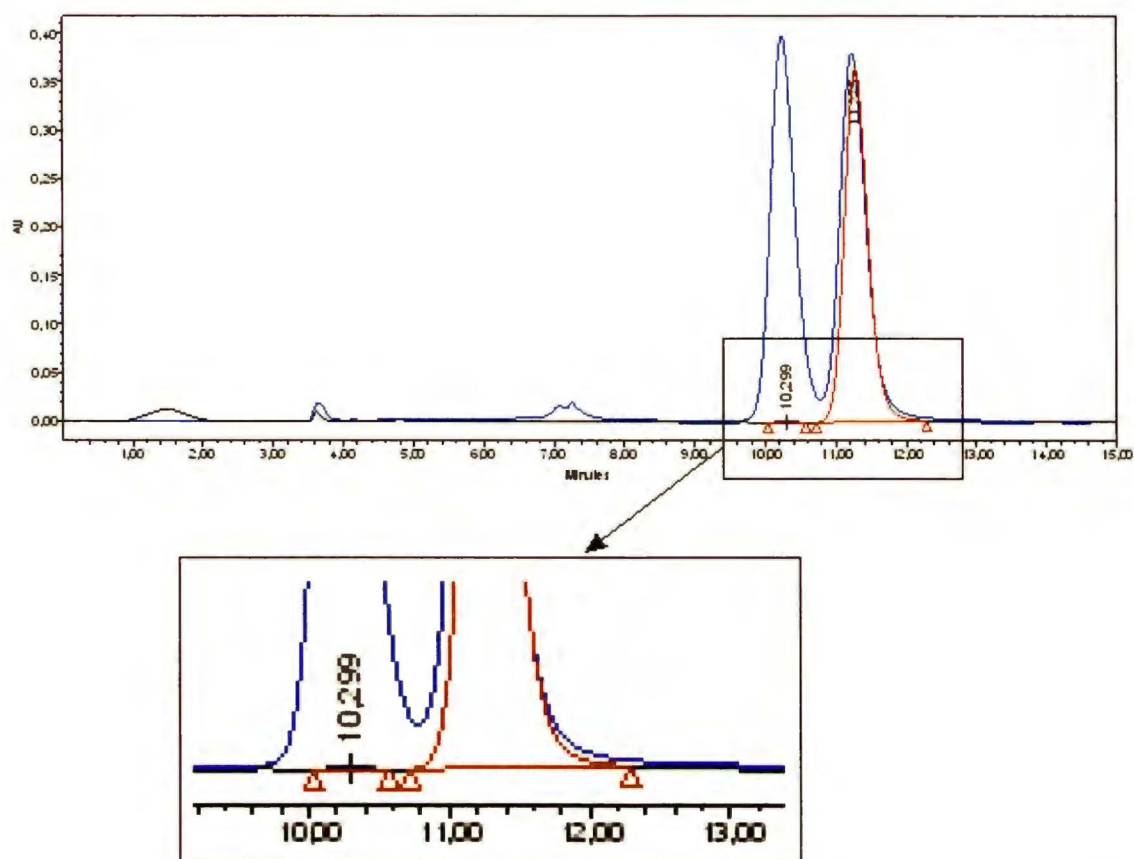
Badania przeprowadzono w temperaturze 25°C.

Przykładowe chromatogramy dla dwóch związków przedstawiono poniżej na Rys. 84-85.



Rys. 84. Sprawdzenie czystości enancjomeru MeO1 (R) kolumna Chiralcel OD , faza ruchoma: n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v). Wykres przedstawia nałożenie dwóch chromatogramów racematu związku MeO1 i enancjomeru (R) związku MeO1.

enancjomer	Czas retencji	Czystość enancjomeryczna w %
MeO1 (S)	12,8	0,04
MeO1 (R)	13,8	99,96



Rys. 85. Sprawdzenie czystości enancjomeru C11 (R) kolumna Chiralcel OD, faza ruchoma: n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v). Wykres przedstawia nałożenie dwóch chromatogramów racematu związku C11 i enancjomeru (R) związku C1.

enancjomer	Czas retencji	Czystość enancjomeryczna w %
C11 (S)	10,3	0,16
C11 (R)	11,3	99,84

2.7 Podsumowanie i wnioski

Na kolumnie Chiralcel OD otrzymano dużo niższą enancjoselektywność w porównaniu do jej amylozowych odpowiedników. Zakres współczynnika rozdzielania α wynosi 1,00-1,19 na Chiralcel OD, natomiast na kolumnach amylozowych: Chiralpak AD, Chiralpak IA wynosi odpowiednio 1,00-3,49; 1,00-1,74. Wyniki pokazują, iż wszystkie badane związki mogą zostać rozdzielone na kolumnie Chiralpak IA stosując jako fazę ruchomą mieszaninę n-heksanu z dodatkiem etanolu, jako modyfikatora fazy ruchomej. Rozdzielenie związków na pozostałych fazach stacjonarnych: Chiralpak AD i Chiralcel OD wymaga zmiany modyfikatorów (etanol, izopropanol, niewielka ilość wody) fazy ruchomej. Najlepszy wynik otrzymano dla związku Ph1 na kolumnie Chiralpak AD w fazie ruchomej: n-heksan/EtOH (85/15 v/v) ($\alpha=3,49$).

Zamiana izopropanolu na etanol jest korzystna w przypadku faz amylozowych Chiralpak AD i Chiralpak IA. Powoduje ona w większości przypadków zwiększenie rozróżnienia chiralnego badanych związków. Szczególnie jest to istotne dla kolumny Chiralpak IA, dla której w fazie z izopropanolem nie uzyskano żadnego rozdzielania. Natomiast na kolumnie celulozowej Chiralcel OD jest odwrotnie: to zamiana etanolu na izopropanol powoduje wzrost enancjoselektywności dla związków modelowych.

Dodatek wody do fazy ruchomej może wpływać zarówno na polepszenie jak i na pogorszenie enancjoselektywności. Na 90 przeprowadzonych eksperymentów (15 związków na 3 kolumnach, 2 alkohole) niewielki dodatek wody (0,2%) wpływa na poprawę rozdzielania enancjomerów w 9 przypadkach dla fazy ruchomej z IPA jako modyfikatorem fazy ruchomej i w 23 przypadkach dla fazy z etanolem. Pogarsza enancjoselektywność dla 15 związków w fazie z IPA i 16 w fazie z etanolem. Natomiast nie ma wpływu na 21 przypadków z IPA, (z czego 15 na kolumnie Chiralpak IA) i 7 w przypadku faz z etanolem. Natomiast dla 6 związków obecność wody w fazie ruchomej jest niezbędna, aby uzyskać rozróżnienie chiralne. Dodatek wody jest bardziej zauważalny na kolumnach amylozowych w porównaniu do kolumny celulozowej. Przeprowadzone badania NMR wykazały, że dodatek wody może zmieniać strukturę fazy amylozowej, jednakże zmiany te nie były widoczne dla złoża celulozy.

Kolumny Chiralpak AD i Chiralcel OD mogą być wzajemnie uzupełniającymi się selektorami. Potwierdza to zmiana kolejności wymywania poszczególnych enancjomerów na obu kolumnach zbadana dla 6 wybranych związków. Ponadto na

kolumnie Chiralcel OD z etanolem jako modyfikatorem fazy ruchomej grupy związków OMe, Cl rozdzielają się lepiej od grupy związków Ph, natomiast na kolumnie Chiralpak AD w tej samej fazie zachowują się odwrotnie i enancjoseparacja związków z grupy Ph jest lepsza w porównaniu do związków z grup OMe i Cl.

Wzrost temperatury w większości przypadków wpływa na zmniejszenie współczynników retencji jak i enancjoseparacji badanych związków. Uzyskane liniowe zależności van't Hoffa związków modelowych świadczą, że nie ma zmiany mechanizmu retencji związków modelowych w badanym zakresie temperatur. Wyliczone na tej podstawie funkcje termodynamiczne wskazują, iż zmiana składu fazy ruchomej (etanol, izopropanol, dodatek wody) wpływają na zmianę entalpii i entropii przejścia enancjomerów z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej. W większości przypadków wielkość ΔH jest bardziej ujemna dla enancjomeru dłużej przebywającego na fazie stacjonarnej, a rozróżnienie chiralne badanych związków wynika z różnic entalpowych (czyli proces retencji oraz enancjoselektywności jest kontrolowany entalpowo).

Uzyskane wyniki kompensacji entalpowo-entropowych pokazują, iż mechanizmy retencji oraz rozróżnienia chiralnego badanych związków na kolumnach polisacharydowych różnią się w zależności od zastosowanego w fazie ruchomej alkoholu. Najbardziej widoczne jest to na kolumnie Chiralcel OD, na której otrzymano liniowe zależności dla poszczególnych faz alkoholowych. Dodatek wody nie wpływa znacząco na mechanizmy retencji i enancjoselektywności (kompensacje pokrywają się z uzyskanymi dla odpowiednich alkoholi). W przypadku faz amylozowych (Chiralpak AD i Chiralpak IA) otrzymane wyniki pokazują, iż mechanizmy retencji oraz enancjoseparacji związków w poszczególnych układach są dużo bardziej skomplikowane (liniową retencję uzyskano tylko dla faz z etanolem).

Otrzymane wyniki analizy QSRR pokazują, iż dominującymi oddziaływaniami na polisacharydowych fazach stacjonarnych wpływającymi na retencję badanych związków są wiązania wodorowe oraz oddziaływania związane z polaryzowalnością cząsteczek. Przy czym na kolumnach amylozowych są to oddziaływania określane jako kwasowe wiązania wodorowe, a na kolumnie celulozowej są to zasadowe wiązania wodorowe. Proces enancjoseparacji na fazach polisacharydowych jest wynikiem licznych, ale słabych oddziaływań. Analiza QSRR wykazała, że zależy on od wielu parametrów i nie jest możliwe określenie, które z nich stanowią kluczową rolę w rozróżnieniu chiralnym.

Kolumny polisacharydowe można wykorzystać w oznaczaniu czystości enancjomerycznej badanych związków. Wydaje się, że najlepsze pod względem czasu analizy oraz enancjoseparacji badanych związków w temperaturze nie większej niż 25°C są następujące metody: - kolumna Chiralcel OD, faza ruchoma: n-heksan/EtOH/H₂O (85/15/0,2 v/v/v) dla związków z grupy OMe oraz Ph1, Ph2, C11, C12 oraz kolumna Chiralpak IA, faza ruchoma: n-heksan/EtOH (85/15 v/v) dla pozostałych związków (Ph3, Ph4, Ph5, Ph6, C16).

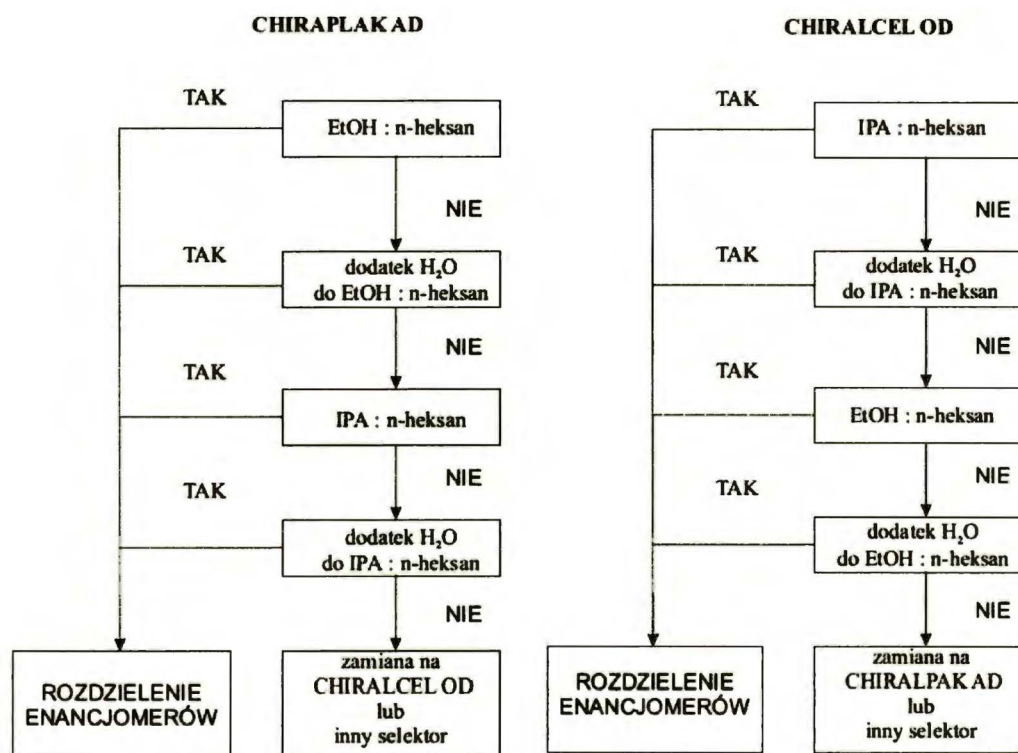
PODSUMOWANIE KOŃCOWE

Technicznie najłatwiejszym a zarazem najtańszym sposobem modyfikowania selektywności i efektywności rozdzieleń chromatograficznych jest zmiana składu fazy ruchomej. Jednocześnie jednak jest to sposób najtrudniejszy, gdyż nie poddaje się, w większości przypadków, intuicyjnemu przewidywaniu skutków. Modyfikatory bowiem mogą wpływać nie tylko na retencję, ale i na enancjoseparację poprzez oddziaływania z badaną substancją w fazie ruchomej bądź też konkurować z nią w sorpcji na miejscach aktywnych fazy stacjonarnej. Finalny obraz jest więc złożony, czego znakomitą ilustracją jest np. wpływ czynników achiralnych na enancjoseparację.

Temu zagadnieniu poświęcona jest niniejsza praca, w której przedstawiono analizę wpływu środowiska achiralnego na rozdzielenie enancjomerów grupy związków modelowych, pochodnych piroolidyn-2-onu. Do badań wykorzystano chiralne kolumny polisacharydowe (Chiralpak AD, Chiralpak IA, Chiralcel OD) oraz kolumnę cyklodekstrynową (Cyclobond I DMP), których cechą wspólną jest posiadanie tego samego podstawnika karbamanianu 3,5-dimetylofenylowego. Analiza QSRR pozwoliła na statystyczną ocenę zachodzących oddziaływań w badanych układach. Za pomocą wybranych deskryptorów molekularnych i prostego modelu udało się dość dobrze odwzorować retencję i enancjoselektywność związków w badanych układach. Badania pokazują jak bardzo oddziaływania te mogą się zmieniać w zależności od zastosowanej fazy ruchomej.

W oparciu o doświadczenia praktyczne zebrane w trakcie wykonywania doświadczeń (dla substancji podobnych do zbadanych w niniejszej pracy) można podać kilka wskazówek praktycznych w celu opracowania efektywnej metody rozdzielania enancjomerów. Postępowanie dla faz Chiralpak AD i Chiralcel OD przedstawiono na Rys. 86. Na fazie stacjonarnej Chiralpak AD w pierwszej kolejności zaleca się zastosowanie etanolu w mieszaninie z n-heksanem jako modyfikatora fazy ruchomej. W przypadku uzyskania niewystarczającego rozdzielenia bądź nie uzyskania go w ogóle należy do fazy ruchomej etanol : n-heksan dodać niewielką ilość wody (około 0,2%). Jeżeli nadal nie uzyskamy rozdzielenia zamieniamy modyfikator z etanolu na izopropanol. Kolejnym krokiem jest dodatek wody do fazy ruchomej izopropanol : n-heksan. Jeżeli mimo to nie uzyskamy rozdzielenia należy zmienić selektor na inny, np. na Chiralcel OD. Na kolumnie Chiralcel OD schemat postępowania jest odwrotny

(Rys. 86). Zaczynamy od izopropanolu jako modyfikatora fazy ruchomej. W następnej kolejności odpowiednio dodatek wody, zamiana izopropanolu na etanol i na końcu dodatek wody do fazy etanol : n-heksan. W przypadku nie uzyskania rozdzielania należy poszukać innego selektora. Należy tu zaznaczyć, iż niewielki dodatek wody do fazy ruchomej na fazach polisacharydowych może nam posłużyć również jedynie jako czynnik do optymalizacji uzyskanego rozdzielania.



Rys. 86. Schemat kolejności stosowania modyfikatorów na fazach Chiralpak AD i Chiralcel OD

Ciekawym przypadkiem jest kolumna Chiralpak IA, w której zastosowanie techniki unieruchomienia selektora na silikazelu miało na celu zwiększenie trwałości jak również zakresu zastosowań rozpuszczalników. Doświadczenie pracy z tą kolumną wskazuje, że zastosowanie izopropanolu jako modyfikatora fazy ruchomej nie jest najlepszym wyborem, wręcz należy go unikać. Zamiana modyfikatora fazy ruchomej z izopropanolu na etanol powoduje długi czas ustalania równowagi. Ponadto w fazach ruchomych z izopropanolem nie uzyskano żadnego rozdzielania. Jednakże w przypadku

zastosowania etanolu jako modyfikatora fazy ruchomej kolumna Chiralpak IA wykazuje równie dobre właściwości rozdzielcze jak Chiralpak AD.

Na kolumnach polisacharydowych zauważono zmianę kolejności wymywania enancjomerów co może zostać wykorzystane w analizie czystości enancjomerycznej, gdyż wtedy istotne jest aby zanieczyszczenia wychodziły przed głównym pikiem. W przypadku badanych związków można to uzyskać zamieniając kolumnę amylozową (Chiralpak AD lub Chiralpak IA) na kolumnę celulozową (Chiralcel OD) lub odwrotnie.

W przypadku fazy cyklodekstrynowej (Cyclobond I DMP) nie uzyskano zadowalającego rozdzielania badanych związków. Jednakże pewne wnioski z pracy z tą fazą się nasuwają. Przede wszystkim praca w układach normalnych pokazuje, iż wpływ modyfikatora organicznego jak również dodatek wody nie jest tu tak efektywny jak na fazach polisacharydowych. Dodatek wody w zasadzie głównie poprawia sprawność układu, tylko w nieznacznym stopniu wpływa na polepszenie enancjoseparacji badanych związków. Zastosowanie odpowiedniego układu faz ruchomych zmienia mechanizm oddziaływania związków z fazą stacjonarną. Można to wykorzystać w praktyce jeśli retencja związku jest bardzo długa. Należy wtedy zmienić układ faz normalnych na fazy odwrócone lub odwrotnie.

Należy jednakże podkreślić, że nie jest możliwe na podstawie wzoru cząsteczki określenie, na której fazie na pewno uzyskamy satysfakcjonujące nas rozdzielanie. Różnorodność oddziaływań, jak to pokazała analiza QSRR, na badanych fazach jest bardzo duża co umożliwia nam jedynie wyciągnięcie raczej ogólnych wniosków dotyczących mechanizmów retencji i enancjoseparacji. Rozróżnienie chiralne zależy od wielu parametrów. Przede wszystkim należy dobrać odpowiedni selektor. Jednakże wpływ achiralnego otoczenia na słabe oddziaływania, jakie występują na kolumnach polisacharydowych, a w konsekwencji na rozróżnienie chiralne również nie może zostać pominięty. Praca z kolumnami polisacharydowymi pokazuje, jak bardzo złożony jest to proces. Sądzę, że w przyszłości możliwe będzie wykorzystanie metod typu QSRR jako podstawy komputerowego projektowania optymalnych metod rozdzielania izomerów optycznych w układach supramolekularnych. Niezbędne do tego będzie uzupełnienie wiedzy empirycznej o szereg faktów mało dotąd zbadanych, np. deksyptory molekularne dla biopolimerów w zależności od środowiska, które mogą przyczynić się do lepszego zaplanowania eksperymentu jak również zwiększenia zakresu zastosowań chromatografii chiralnej. Dotychczasowe deskryptory opierają się

na statystycznej analizie charakteru chemicznego związku. Wydaje się, że zastosowanie metody dokowania molekularnego daje nadzieję na lepsze wyjaśnienie oddziaływań zachodzących w poszczególnych układach. Poznanie i zrozumienie mechanizmów oddziaływań zachodzących między badanym związkiem z fazą stacjonarną a także wpływu otoczenia jest bardzo ważny, gdyż daje nam to podstawę do odniesienia do bardziej skomplikowanych układów biologicznych. Problem ten jest wciąż przedmiotem badań i wielkim wyzwaniem dla badaczy.

STRESZCZENIE

Chromatograficzna analiza chiralnych związków nabiera ciągle coraz większego znaczenia. Bez wątpienia najbardziej istotna jest ona w przemyśle farmaceutycznym oraz w badaniach klinicznych, gdzie analiza czystości optycznie czynnych leków, toksyn oraz ich metabolitów ma bardzo duży wpływ na ludzkie zdrowie czy też na efektywną terapię. Ze względu na duże zdolności rozdzielcze do analizy lub rozdzielania enancjomerów często wykorzystuje się fazy stacjonarne cyklodekstrynowe i polisacharydowe. Wiedza odnośnie mechanizmów oddziaływań związków na tych fazach stacjonarnych jest wciąż niewystarczająca. Odpowiednie dobranie fazy ruchomej jest niezwykle ważne w chromatografii cieczonej, gdyż może ona oddziaływać z badanymi związkami jak również z fazą stacjonarną. Wydaje się to szczególnie ważne w przypadku faz polisacharydowych, na których rozróżnienie chiralne jest wynikiem licznych, ale słabych oddziaływań. Dodatkowym utrudnieniem jest obserwacja, że czynniki achiralne mogą wpływać nie tylko na retencję, ale również i na enancjoselektywność układu.

Celem pracy było zbadanie wpływu składu fazy ruchomej na rozróżnienie chiralne grupy związków modelowych w układach chromatografii cieczonej z wykorzystaniem cyklodekstrynowej (Cyclobond I DMP) i polisacharydowych (Chiralpak AD, Chiralpak IA, Chiralcel OD) faz stacjonarnych. Do badań wykorzystano grupę 15 związków pochodnych 1-[2-hydroksy-3-(4-fenylpiperazyn-1-yl)-propylo]-pirolidyn-2-onu, które zostały zsyntezowane w trakcie poszukiwania nowych leków na arytmię i nadciśnienie w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku Katedrze Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Podjęto próbę wyjaśnienia molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za rozdzielanie enancjomerów w badanych układach z pomocą metody QSRR opartej na ilościowej korelacji pomiędzy deskryptorami molekularnymi a parametrami chromatograficznymi badanych związków.

W pierwszej części pracy wykonano badania w układzie HPLC na kolumnie ze związaną cyklodekstryną Cyclobond I DMP. Kolumna ta umożliwia zastosowanie trzech różnych układów: faz normalnych, polarnej organicznej fazy oraz układu faz odwróconych. Uzyskane wyniki retencji i enancjoseparacji związków modelowych uzupełnione analizą QSRR potwierdzają, iż zmieniają się mechanizmy retencji,

separacji enancjomerów, a także kolejność wymywania związków z kolumny w zależności od zastosowanego układu faz ruchomych. Analiza QSRR wykazuje dobrą korelację parametrów regresji dla badanych układów (R^2 powyżej 0,8). Obliczone wartości współczynników rozdzielania ($\alpha_{\text{teor.}}$) dla wszystkich układów chromatograficznych dobrze korelują się ze współczynnikami uzyskanymi eksperymentalnie.

Druga część pracy dotyczyła faz polisacharydowych: Chiralpak AD, Chiralpak IA, Chiralcel OD. W układach normalnych zbadano wpływ alkoholi: etanolu i 2-propanolu oraz niewielkiego dodatku wody na retencję i enancjoselektywność badanych związków. Otrzymane wyniki pokazują, iż na polisacharydowych fazach stacjonarnych czynniki takie jak skład fazy ruchomej, struktura związków modelowych jak również sposób obsadzenia czynnika enancjoselektywnego na silikażelu mogą wpływać na zmianę intermolekularnych oddziaływań odpowiedzialnych za retencję, a także rozróżnienie chiralne związków modelowych. Zmiana składu fazy ruchomej może również prowadzić do zupełnie nowych właściwości kolumny. Uzyskanie tak dużych różnic w enancjoselektywności związków modelowych w różnych fazach ruchomych może być wynikiem wpływu modyfikatorów na zmianę otoczenia chiralnych wnęk i kanałów na fazach polisacharydowych. Prawdopodobnie modyfikatory w różny sposób oddziałują z fazą stacjonarną prowadząc do zmiany bądź też blokady oddziaływań odpowiedzialnych za chiralne rozróżnienie. Może być to powodem uzyskania lepszej, gorszej lub nie uzyskania w ogóle enancjoseparacji badanych związków tak jak w przypadku faz z izopropanolem na kolumnie Chiralpak IA. Analiza QSRR dla faz polisacharydowych potwierdza jak bardzo skomplikowane są to układy i jak wiele różnych oddziaływań może wpływać na uzyskaną retencję i enancjoseparację badanych związków. Powoduje to, że nawet niewielkie zmiany składu fazy ruchomej mogą w znaczącym stopniu wpływać na uzyskanie rozdzielania badanych substancji. Dlatego też odpowiednie dobranie fazy ruchomej w przypadku tych faz jest niezwykle istotne.

W związku z tym, że do badań wykorzystano związki o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym opracowanie metody analizy czystości enancjomerycznej ma znaczenie praktyczne. Przeprowadzone badania wskazują, że do tego celu najlepiej nadają się fazy polisacharydowe.

LITERATURA

- [1] I.Z. Siemion, *Biostereochemia*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1985.
- [2] W.M. Potapow, *Stereochemia*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1986.
- [3] H. Dodziuk, M. Mirowicz, *Tetrahedron: Asymmetry* 1 (1990) 171.
- [4] R.S. Cahn, C. K. Ingold, V. Prelog, *Angewandte Chemie International Edition* 5, 358 (1966).
- [5] C. Misl'anova, M. Hutta, *Journal of Chromatography B* 797 (2003) 91.
- [6] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, *Journal of Chromatography A* 906 (2001) 3.
- [7] A. Somogyi, F. Bochner, D. Foster, *Australian Prescriber* 27 (2004) 47.
- [8] A.J. Hutt, J. Valentova, *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae* 50 (2003) 7.
- [9] D. Nasipuri, *Stereochemistry of organic compounds, principles and applications*, Wiley Eastern Limited, New Delhi, India, 1991.
- [10] P.S. Kalsi, *Stereochemistry: conformation and mechanism*, Wiley Eastern Limited, New Delhi, India, 1990.
- [11] M. Nogradi, *Stereochemia podstawy i zastosowania*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1988.
- [12] H. Lorenz, A. Perlberg, D. Sapoundjiev, M. P. Elsner, A. Seidel-Morgenstern, *Crystallization of enantiomers* 45 (2006) 863.
- [13] E.R. Francotte, *Journal of Chromatography A* (2001) 379.
- [14] T. Toyooka, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 54 (2002) 25.
- [15] J. Haginaka, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 27 (2002) 357.
- [16] L.H. Easson, E. Stedman, *Biochemical Journal* 27 (1933) 1257.
- [17] A.G. Ogston, *Nature* 4129 (1948) 963.
- [18] C.E. Dalglish, *Journal of Chemical Society* 137 (1952) 3940.
- [19] V.R. Meyer, M. Rais, *Chirality* 1 (1989) 167.
- [20] A.D. Mesecar, D.E. Koshland, *Nature* 403 (2000) 614.
- [21] V. A. Davankov, *Chirality* 9 (1997) 99.
- [22] T.D. Booth, D. Wahnnon, I.W. Wainer, *Chirality* 9 (1997) 96.
- [23] I. Ali, K. Kumerer, H.Y. Aboul-Enein, *Chromatographia* 63 (2006) 295.
- [24] A. Berthod, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 2093.
- [25] W.H. Pirkle, J.M. Finn, J.L. Schreiner, B.C. Hamper, *Journal of American Chemical Society* 103 (1981) 3964.
- [26] I.W. Weiner, *Trends in Analytical Chemistry* 6 (1987) 125.
- [27] P. Mastalerz, *Podręcznik chemii organicznej*, Wydawnictwo Chemiczne, Wrocław, 1997.
- [28] R.T. Morrison, R.N. Boyd, *Chemia organiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1997.
- [29] G. Subramanian, *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1994.
- [30] Y. Okamoto, E. Yashima, *Angewandte Chemie International Edition* 37 (1998) 1020.
- [31] Y. Okamoto, Y. Kaida, *Journal of High Resolution Chromatography* 13 (1990) 708.
- [32] G. Hesse, R. Hagel, *Chromatographia* 6 (1973) 277.

- [33] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Yamamoto, K. Hatada, *Chemistry Letters* (1984) 739.
- [34] Y. Zhang, D.-R. Wu, D.B. Wand-Iverson, A.A. Tymiak, *Drug Discovery Today* 10, 8 (2005) 571.
- [35] I. Ali, H.Y. Aboul-Enein, *Journal of Separation Science* 29 (2006) 762.
- [36] B. Chankvetadze, I. Kartoziya, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 27 (2002) 467.
- [37] H.Y. Aboul-Enein, V. Serignese, J. Bojarski, *Journal of Liquid Chromatography* 16 (1993) 2741.
- [38] B. Chankvetadze, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Journal of Chromatography A* 922 (2001) 127.
- [39] H.Y. Aboul-Enein, I. Ali, *Chiral Separations by Liquid Chromatography and Related Technologies*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 2003.
- [40] G. Gubitz, M.G. Schmid, *Chiral separations Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2004.
- [41] K. Oguni, H. Oda, A. Ichida, *Journal of Chromatography A* 694 (1995) 91.
- [42] A. Ghanem, H. Hoenen, H.Y. Aboul-Enein, *Talanta* 68 (2006) 602.
- [43] A. Ghanem, L. Naim, *Journal of Chromatography A* 1101 (2006) 171.
- [44] Y. Okamoto, Y. Kaida, *Journal of Chromatography A* 666 (1994) 403.
- [45] G. Hesse, R. Hagel, *Liebigs Annalen der Chemie* (1976) 996.
- [46] E. Francotte, R.M. Wolf, D. Lohmann, R. Mueller, *Journal of Chromatography* 347 (1985) 25.
- [47] I.W. Wainer, M.C. Alembik, *Journal of Chromatography* 358 (1986) 85.
- [48] I.W. Wainer, R.M. Stiffin, T. Shibata, *Journal of Chromatography* 411 (1987) 139.
- [49] E. Yashima, *Journal of Chromatography A* 906 (2001) 105.
- [50] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *Journal of Chromatography* 363 (1986) 173.
- [51] G. Gubitz, M.G. Schmid, *Molecular Biotechnology* 32 (2006) 159.
- [52] T.D. Booth, I.W. Wainer, *Journal of Chromatography A* 737 (1996) 157.
- [53] T.E. Beesely, R.P.W. Scott, *Chiral Chromatography*, John Wiley and Sons, Chichester, England, 1998.
- [54] Eva Schneiderman, A.M. Stalcup, *Journal of Chromatography B* 745 (2000) 83.
- [55] H. Dodziuk, *Cyclodextrin and their complexes*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.
- [56] H. Dodziuk, *Introduction to supramolecular chemistry*, Kulwer Academic Publishers, 2002.
- [57] J. Dębowski, D. Sybilska, J. Jurczak, *Journal of Chromatography* 237 (1982) 303.
- [58] A.M. Krstulovic, *Chiral Separation by HPLC*, John Wiley & Sons, New York, 1989.
- [59] A. Bielejewska, M. Kozbial, R. Nowakowski, K. Duszczyk, D. Sybilska, *Analytica Chimica Acta* 300 (1995) 201.
- [60] A. Kwatereczak, A. Bielejewska, *Analytica Chimica Acta* 537 (2005) 41.
- [61] M. Pawłowska, J. Lipkowski, *Journal of Chromatography* 547 (1991) 59.
- [62] D.W. Armstrong, W. DeMond, *Journal of Chromatographic Science* 22 (1984) 411.
- [63] Qiqing Zhong, Lingfeng He, Thomas E. Beesley, Walter S. Trahanovsky, Ping Sun, Chunlei Wang, D.W. Armstrong, *Journal of Chromatography A* 1115 (2006) 19.

- [64] Cyclobond Handbook, Astec Advanced Separation Technologies Inc., 1999.
- [65] X. Han, T. Yao, Y. Liu, R.C. Larock, D.W. Armstrong, *Journal of Chromatography A* 1063 (2005) 111.
- [66] D.W. Armstrong, T.J. Ward, R.D. Armstrong, T.E. Beesley, *Science* 232 (1986) 1132.
- [67] D.W. Armstrong, *Journal of Chromatography* 7 (1984) 353.
- [68] T.J. Ward, D.W. Armstrong, *Journal of Chromatography* 9 (1986) 407.
- [69] P. Macaudiere, M. Caude, R. Rosset, *Journal of Chromatography A* 405 (1987) 135.
- [70] D.W. Armstrong, A.M. Stalcup, M.L. Hilton, J.D. Duncan, J.R. Faulkner, J. i S.-C. Chang, *Analytical Chemistry* 62 (1990) 1610.
- [71] R. Berkecz, I. Ilisz, A. Ivanov-Sztojkov, I. Szatmari, F. Fulop, D.I. W. Armstrong, A. Peter, *Chromatographia* 65 (2007) 337.
- [72] A.M. Stalcup, S.-C. Chang, D.W. Armstrong, *Journal of Chromatography* 540 (1991) 113.
- [73] D.W. Armstrong, S. Chen, C. Chang, S. Chang, *Journal of Liquid Chromatography* 15 (1992) 545.
- [74] J. Zukowski, M. Pawlowska, M. Nagatkina, D.W. Armstrong, *Journal of Chromatography* 629 (1993) 169.
- [75] S.C. Chang, G.L. Reid III, S. Chen, C.D. Chang, D.W. Armstrong, *Trends in analytical chemistry* 12 (1993) 144.
- [76] V.A. Davankov, A.A. Kurganov, *Chromatographia* 17 (1983) 686.
- [77] V.A. Davankov, V.R. Meyer, M. Rais, *Chirality* 2 (1990) 208.
- [78] V.A. Davankov, *Journal of Chromatography A* 666 (1994) 55.
- [79] V.A. Davankov, *Chromatographia* 27 (1989) 475.
- [80] M. Zief, L.J. Crane, J. Horvath, *Journal of Liquid Chromatography* 7(4) (1984) 709.
- [81] P. Pescher, M. Caude, R. Rosset, A. Tambute, *Journal of Chromatography* 371 (1986) 159.
- [82] J. Hermansson, *Trends in analytical chemistry* 8 (1989) 251.
- [83] M. Enquist, J. Hermansson, *Journal of Chromatography* 519 (1990) 271.
- [84] M. Enquist, J. Hermansson, *Journal of Chromatography* 519 (1990) 285.
- [85] Jorgen Hermansson, I. Hermansson, *Journal of Chromatography A* 666 (1994) 181.
- [86] K. Gyimesi-Forras, G. Szasz, Z. Budvari-Barany, A. Gergely, *Chirality* 11 (1999) 212.
- [87] K. Gyimesi-Forras, G. Szasz, G. Bathory, G. Meszaros, A. Gergely, *Chirality* 15 (2003) 377.
- [88] A. Karlsson, A. Nystrom, *Chromatographia* 53 (2001) 135.
- [89] K. Balmer, B.-A. Persson, P.-O. Lagerstrom, *Journal of Chromatography A* 660 (1994) 269.
- [90] A. Kunath, F. Theil, J. Wagner, *Journal of Chromatography A* 684 (1994) 162.
- [91] A. Kunath, F. Theil, K. Jahnisch, *Journal of Chromatography A* 728 (1996) 249.
- [92] T. Wang, Y.W. Chen, *Journal of Chromatography A* 855 (1999) 411.
- [93] T. Wang, Y.W. Chen, A. Vailaya, *Journal of Chromatography A* 902 (2000) 345.
- [94] A. Bielejewska, K. Duszczuk, J. Zukowski, *Acta Chromatographica* 15 (2005) 183.
- [95] R.M. Wenslow, J.i.T. Wang, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 4190.
- [96] T. Wang, R.M. Wenslow, *Journal of Chromatography A* 1015 (2003) 99.

- [97] H.Y. Aboul-Enein, I. Ali, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 48 (2001) 175.
- [98] K. Balmer, A. Presson, P.-O. Lagerstrom, B.-A. Persson, G. Schill, *Journal of Chromatography* 553 (1991) 391.
- [99] K. Balmer, P.-O. Lagerstrom, B.-A. Persson, G. Schill, *Journal of Chromatography* 592 (1992) 331.
- [100] J.G. Ning, *Enantiomer* 5 (2000) 323.
- [101] A. Peter, G. Torok, D. W. Armstrong, G. Toth, D. Tourwe, *Journal of Chromatography A* 828 (1998) 177.
- [102] A. Peter, E. Vekes, D.W. Armstrong, *Journal of Chromatography A* 958 (2002) 89.
- [103] E. Kusters, V. Loux, E. Schmid, P. Floersheim, *Journal of Chromatography A* 666 (1994) 421.
- [104] A. Kamienska-Duda, P.A. Baran, A. Bielejewska, *Chemia Analityczna* 53 (2008) 241.
- [105] N. Morin, Y.C. Guiaume, E. Peirin, J.-C. Rouland, *Journal of Chromatography A* 808 (1998) 51.
- [106] A. Berthod, *Chirality* 21 (2009) 167.
- [107] T. O'Brien, L. Crocker, R. Thompson, K. Thompson, P. H. Toma, D. A. Conlon, B. Feibush, C. Moeder, G. Bicker, N. Grinberg, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 1999.
- [108] M. Kazusaki, T. Shoda, H. Kawabata, H. Matsukura, *Journal of Liquid Chromatography* 24(2) (2001).
- [109] R.J. Smith, D.R. Taylor, S.M. Wilkins, *Journal of Chromatography A* 697 (1995) 591.
- [110] W. Weng, Q. Zeng, B. Yao, Q. Wang, S. Li, *Chromatographia* 61 (2005) 561.
- [111] L.A. Cole, J.G. Dorsey, K.A. Dill, *Analytical Chemistry* 64 (1992) 1324.
- [112] L.C. Sander, S.A. Wise, *Analytical Chemistry* 61 (1989) 1749.
- [113] L.A. Cole, J.G. Dorsey, *Analytical Chemistry* 64 (1992) 1317.
- [114] R. Kaliszan, H. Foks, *Chromatographia* 10 (1977) 346.
- [115] R. Kaliszan, *Chromatographia* 10 (1977) 529.
- [116] R. Kaliszan, *Chemical Reviews* 107 (2007) 3212.
- [117] K. Heberger, *Journal of Chromatography A* 1158 (2007) 273.
- [118] T. Baczek, R. Kaliszan, K. Novotna, P. Jandera, *Journal of Chromatography A* 1075 (2005) 109.
- [119] R. Kaliszan, M.A. van Straten, M. Markuszewski, C.A. Cramers, H.A. Claessens, *Journal of Chromatography A* 855 (1999) 455.
- [120] M.H. Abraham, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 613.
- [121] M.H. Abraham, H.S. Chadha, G.S. Whiting, R.C. Mitchell, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83 (1994) 1085.
- [122] M.H. Abraham, A. Ibrahim, A.M. Zissimos, *Journal of Chromatography A* 1037 (2004) 29.
- [123] A. Berthod, C. R. Mitchell, D.W. Armstrong, *Journal of Chromatography A* 1166 (2007) 61.
- [124] C.R. Mitchell, D.W. Armstrong, A. Berthod, *Journal of Chromatography A* 1166 (2007) 70.
- [125] B. Malawska, K. Kulig, A. Gippert, B. Filipek, J. Sapa, D. Maciag, *Il Farmaco* 60 (2005) 793.
- [126] B. Filipek, J. Sapa, B. Malawska, K. Kulig, L. Antkiewicz-Michaluk, *Arch. Pharm. Med. Chem.* 330 (1997).

- [127] B. Malawska, K. Kulig, B. Filipek, J. Sapa, D. Maciag, M. Zygmunt, L. Antkiewicz-Michaluk, *European Journal of Medicinal Chemistry* 37 (2002) 183.
- [128] G.W.T. M. J. Frisch, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria,, J.R.C. M. A. Robb, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven,, J.C.B. K. N. Kudin, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi,, B.M. V. Barone, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega,, H.N. G. A. Petersson, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota,, J.H. R. Fukuda, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao,, M.K. H. Nakai, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross,, C.A. V. Bakken, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann,, A.J.A. O. Yazyev, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski,, K.M. P. Y. Ayala, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg,, S.D. V. G. Zakrzewski, A. D. Daniels, M. C. Strain,, D.K.M. O. Farkas, A. D. Rabuck, K. Raghavachari,, J.V.O. J. B. Foresman, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford,, B.B.S. J. Cioslowski, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz,, R.L.M. I. Komaromi, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham,, A.N. C. Y. Peng, M. Challacombe, P. M. W. Gill,, W.C. B. Johnson, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople,, *I. Gaussian*, Wallingford CT, 2004., E.S. S. Miertus, J. Tomasi, *Chem. Phys.* 55 : 177 (1981), V.B. M. Cossi, R. Cammi, J. Tomasi, *Chem. Phys. Lett.* 255: 327 (1996), J.T. B. Mennucci, *J. Phys. Chem.* 106: 5151 (1997), a.r.i.t.G.G.s.o.p. <http://www.gaussian.com>, Gaussian 03, Revision E.01.
- [129] SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.
- [130] M. Vitha, P.W. Carr, *Journal of Chromatography A* 1126 (2006) 143.
- [131] H. Koller, K.H. Rimbock, A. Mannschreck, *Journal of Chromatography* 283 (1983) 89.
- [132] W. Melander, D.E. Campbell, C. Horvath, *Journal of Chromatography* 158 (1978) 215.



B. 426/10

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.426/10



90000000083105