

**Instytut Chemii Fizycznej
Polskiej Akademii Nauk**

ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warszawa



Kompleksy potrójne w chromatografii cieczowej

Praca doktorska zrealizowana w ramach Międzynarodowych Studiów
Doktoranckich w Zakładzie Fizykochemii Kompleksów
Supramolekularnych Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk
w Warszawie

Kamila Szwed

PROMOTOR:

Prof. dr hab. Janusz Lipkowski

A-21-7
A-21-9
K-c-124 K-c-119
K-ob-134
K-g-161
K-g-186

WARSZAWA, LIPEC 2013

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.452/13



30000000130050



B. 452/13



Instytut Chemii Fizycznej,
Polskiej Akademii Nauk

Pracę współfinansowano ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka nr POIG.01.01.02-14-102/09 –

„Cukry jako surowce odnawialne w syntezie produktów o wysokiej wartości dodanej”



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Podziękowania

Panu Profesorowi Januszowi Lipkowskiemu

serdecznie dziękuję za stworzenie optymalnych warunków do pracy laboratoryjnej, naukowej i dydaktycznej, jak również za cenne wskazówki i okazaną pomoc.

Pani dr Monice Asztemborskiej

szczególne podziękowania za cenne wskazówki i dyskusje w trakcie realizacji pracy oraz pomoc w jej redagowaniu.

Świętej pamięci Pani dr Annie Bielejewskiej

dziękuję za wszelką pomoc i cenne uwagi merytoryczne.

Wszystkim kolegom i koleżankom z zakładu II za bezinteresowną pomoc i stworzenie milej atmosfery pracy.

Dziękuję Rodzicom i Piotrowi za okazane wsparcie i pomoc.

SPIS TREŚCI

CZĘŚĆ LITERATUROWA	4
WPROWADZENIE	4
1 ROZPOZNAWANIE CHIRALNE. METODY ROZDZIELANIA ENANCJOMERÓW	5
1.1 IZOMERIA	5
1.2 CHIRALNOŚĆ	6
1.2.1 Konfiguracja chiralnej cząsteczki	10
1.3 ZNACZENIE ENANCJOMERÓW W FARMAKOLOGII	12
1.4 METODY ROZDZIELANIA ENANCJOMERÓW	13
1.4.1 Rozdział enancjomerów przez ekstrakcję	15
1.4.2 Rozdzielanie enancjomerów w chromatografii cieczowej	17
2 CYKLODEKSTRYNY	22
2.1 BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE	22
2.2 POCHODNE	24
2.3 KOMPLEKSY INKLUZYJNE	25
2.4 ZASTOSOWANIE CYKLODEKSTRYN W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ JAKO DODATKU DO FAZY RUCHOMEJ	26
2.4.1 Wyznaczanie stałych trwałości kompleksów	27
2.5 ROZPUSZCZALNOŚĆ	30
3 CHROMATOGRAFIA PAR JONOWYCH	33
3.1 PODSTAWY TEORETYCZNE CHROMATOGRAFII	33
3.1.1 Podział chromatografii	35
3.2 PODSTAWY CHROMATOGRAFII PAR JONOWYCH	37
3.2.1 Oddziaływania jon-jon w środowisku rozpuszczalnika	38
3.2.2 Mechanizm retencji	39
3.2.3 Odczynniki par jonowych	43
CEL PRACY	45
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	46
4 CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	47
4.1 APARATURA	47
4.2 KOLUMNY	47

4.3	ODCZYNNIKI	47
4.4	SUBSTANCJE BADANE	48
4.5	SKŁAD FAZY RUCHOMEJ	50
4.6	BADANIA NMR	51
4.7	EKSTRAKcja	52
4.8	OKREŚLANIE KONFIGURACJI ABSOLUTNEJ ENANCJOMERÓW CYKLOPENTOLATU	52
5	ROZDZIELANIE ENANCJOMERÓW W UKŁADZIE β-CYKLODEKSTRYNA ORAZ HYDROKSYKWASY JAKO SKŁADNIKI FAZY RUCHOMEJ W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ	53
5.1	WPLYW STĘŻENIA β -CYKLODEKSTRYNY W OBECNOŚCI HYDROKSYKWASÓW NA RETENCJĘ	53
5.2	WYZNACZANIE STAŁYCH TRWAŁOŚCI KOMPLEKSÓW	56
5.3	WPLYW RODZAJU HYDROKSYKWASU I STĘŻENIA β -CD NA ENANCJOSELEKTYWNOŚĆ	59
6	ROZDZIELANIE ENANCJOMERÓW Z ZASTOSOWANIEM β-CYKLODEKSTRYNY ORAZ ODCZYNNIKÓW PAR JONOWYCH, JAKO SKŁADNIKÓW FAZY RUCHOMEJ W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ	63
6.1	ADSORPCJA ODCZYNNIKÓW PAR JONOWYCH W UKŁADZIE FAZ ODWRÓCONYCH	63
6.2	WPLYW RODZAJU ODCZYNNIKA PAR JONOWYCH NA RETENCJĘ ZWIĄZKÓW MODELOWYCH	64
6.3	ODDZIAŁYWANIE MIĘDZY β -CYKLODEKSTRYNA, A ODCZYNNIKAMI PAR JONOWYCH	68
6.4	WPLYW STĘŻENIA β -CYKLODEKSTRYNY NA RETENCJĘ W OBECNOŚCI ODCZYNNIKÓW PAR JONOWYCH	69
6.4.1	<i>Szacowanie stałych trwałości kompleksów</i>	72
6.5	WPLYW DŁUGOŚCI ŁAŃCUCHA ALKILOWEGO ODCZYNNIKÓW PAR JONOWYCH NA RETENCJĘ I ZDOLNOŚĆ ROZDZIELCZĄ ENANCJOMERÓW	75
6.6	WPLYW STĘŻENIA ODCZYNNIKÓW PAR JONOWYCH NA RETENCJĘ I ROZDZIELCZOŚĆ ENANCJOMERÓW	78
6.7	BADANIA EFEKTÓW TEMPERATUROWYCH	83
6.8	WPLYW TEMPERATURY NA RETENCJĘ ZWIĄZKÓW W BADANYCH UKŁADACH	83
6.8.1	<i>Wpływ temperatury na enancjoseparację związków w badanych układach</i>	87
7	ROZDZIELANIE ENANCJOMERÓW W UKŁADZIE γ-CYKLODEKSTRYNA ORAZ ODCZYNNIKI PAR JONOWYCH, JAKO SKŁADNIKI FAZY RUCHOMEJ W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ	90
7.1	PORÓWNYWANIE UKŁADÓW MODYFIKOWANYCH β -CYKLODEKSTRYNA I γ -CYKLODEKSTRYNA	90
7.2	WPLYW STĘŻENIA γ -CYKLODEKSTRYNY NA RETENCJĘ W OBECNOŚCI ODCZYNNIKÓW PAR JONOWYCH	93

7.2.1	<i>Szacowanie stałych trwałości kompleksów</i>	96
7.3	WPLYW RODZAJU ODCZYNNIKÓW PAR JONOWYCH NA ZDOLNOŚĆ ROZRÓŻNIENIA CHIRALNEGO UKŁADU MODYFIKOWANEGO Γ -CYKLODEKSTRYNĄ	100
8	ROZDZIAŁ ENANCJOMERÓW CYKLOPENTOLATU W EKSTRAKCJI CHIRALNEJ	102
8.1	METODA IDENTYFIKACJI ENANCJOMERÓW CYKLOPENTOLATU W FAZIE ORGANICZNEJ	103
8.2	WPLYW RODZAJU ROZPU SZCZALNIKA ORGANICZNEGO NA PARAMETRY EKSTRAKCJI CHIRALNEJ	107
8.3	WPLYW POCHODNYCH β -CYKLODEKSTRYNY NA PARAMETRY CHIRALNEJ EKSTRAKCJI	108
8.4	WPLYW POCHODNYCH KWASU WINOWEGO NA PARAMETRY CHIRALNE EKSTRAKCJI	108
8.5	WPLYW STĘŻENIA CHIRALNYCH SELEKTORÓW NA PARAMETRY CHIRALNE EKSTRAKCJI	110
8.6	WPLYW pH NA PARAMETRY CHIRALNE EKSTRAKCJI	112
9	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	114
	WYKAZ LITERATURY	121

CZĘŚĆ LITERATUROWA

WPROWADZENIE

Praca dotyczy wykorzystania procesu tworzenia potrójnych kompleksów z udziałem cyklodekstryn w układach chromatograficznych w celu optymalizacji rozdzielania związków chiralnych o znaczeniu farmaceutycznym. W związku z koncepcją pracy opracowanie literaturowe składa się z trzech rozdziałów:

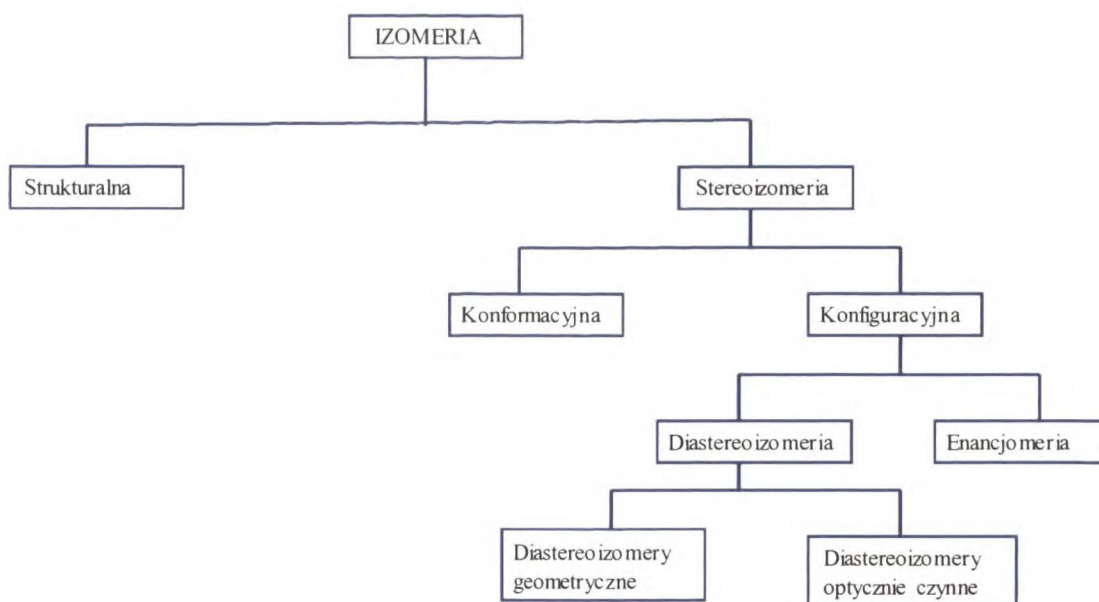
- ✓ W rozdziale 1 opisano metody uzyskiwania związków homochiralnych i znaczenie rozdziału chiralnego związków biologicznie czynnych.
- ✓ Rozdział 2 poświęcony jest budowie i właściwościom cyklodekstryn i ich pochodnych.
- ✓ Rozdział 3 zawiera opis podstaw teoretycznych zakresu chromatografii cieczowej ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii par jonowych.

1.1 Izomeria

Izomery to związki chemiczne o tym samym wzorze sumarycznym, ale o innej strukturze cząsteczki. Zjawisko występowania związków w postaci izomerów to izomeria. Na Rys.1.1 przedstawiono podstawowe rodzaje izomerii i jej wzajemne powiązania [1, 2]. Istnieją dwa podstawowe typy izomerii:

1. Izomeria strukturalna - izomery różnią się kolejnością połączenia atomów w cząsteczce.
2. Stereoizomeria (izomeria przestrzenna) - izomery, które mają taką samą strukturę, ale różnią się rozmieszczeniem atomów w przestrzeni.

Szczególną postacią stereoizomerii jest izomeria konfiguracyjna (optyczna), której następstwem jest zjawisko chiralności.



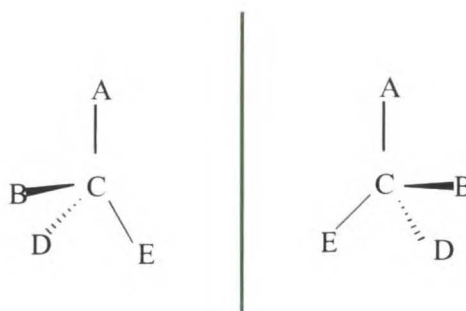
Rys. 1.1 Rodzaje izomerii

1.2 Chiralność

Chiralność jest to właściwość polegająca na tym, że cząsteczka i jej lustrzane odbicie nie są identyczne i nie można ich nałożyć na siebie na drodze translacji i obrotu w przestrzeni. Chiralność jest warunkiem koniecznym i wystarczającym do istnienia enancjomerów [3].

Enancjomery mają identyczne właściwości fizyczne i chemiczne. Różnią się znakiem skręcalności światła spolaryzowanego w płaszczyźnie. Zjawisko to jest nazywane czynnością optyczną i może służyć do odróżnienia enancjomerów. Jeśli jeden z enancjomerów skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego w lewo, to drugi skręca o taki sam kąt w prawo. W nomenklaturze znakiem (+) oznacza się enancjomery prawoskrętne, a znakiem (-) enancjomery lewoskrętne. Mieszanina równych ilości enancjomerów jest, więc optycznie nieczynna. Mieszanina taka jest nazywana racematem.

Chiralność jest związana z symetrią cząsteczki. Najczęściej spotykana jest chiralność centryczna (Rys. 1.2). Występuje ona w przypadku cząsteczek nieposiadających żadnych elementów symetrii. Takie cząsteczki zawierają np. atom węgla związany z czterema różnymi podstawnikami. Ten atom nazywany jest centrum stereogenicznymi, centrum asymetrii lub centrum chiralności. Centrami asymetrii także mogą być atomy inne niż atom węgla np. krzem, azot, fosfor, siarka.

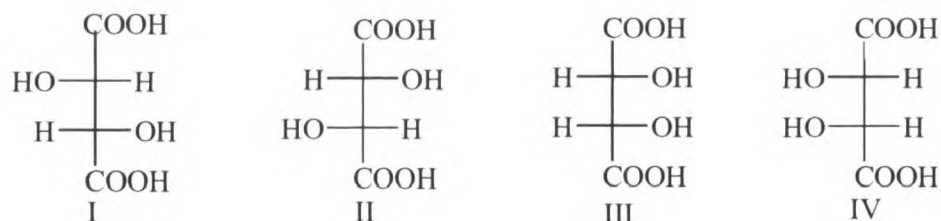


Rys. 1.2 Chiralność centryczna

W przypadku, kiedy centrów asymetrii jest więcej niż jeden, cząsteczka nie zawsze jest chiralna. Stereoizomery związków zawierające więcej niż jedno centrum asymetryczne

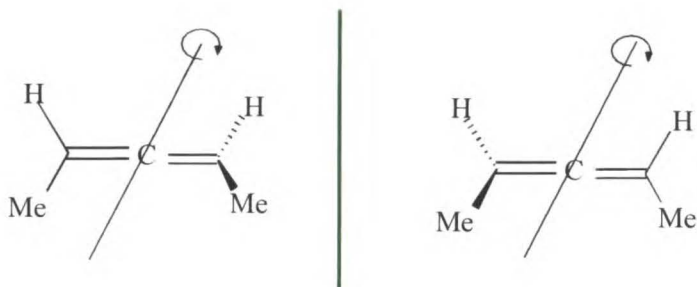
mogą być względem siebie enancjomerami lub diastereoizomerami. Diastereoizomery są stereoizomerami, które nie są wzajemnymi odbiciami lustrzanymi i wykazują różne właściwości fizyczne i chemiczne.

Zwiększenie liczby centrów asymetrycznych zwiększa liczbę stereoizomerów. Największa liczba możliwych do uzyskania stereoizomerów wynosi 2^n , gdzie n jest liczbą centrów chiralnych. Przykładem może być kwas winowy. Ponieważ kwas winowy ma dwa centra asymetryczne, możliwe są cztery stereoizomery, jak widać na Rys. 1.3. Struktury I i II są chiralne i mają się do siebie jak odbicia lustrzane, a zatem są enancjomerami. Struktury III i IV są achiralne, ponieważ mają płaszczyznę symetrii dzielącą cząsteczkę na dwie części w ten sposób, że grupy atomów leżące z jednej strony tej płaszczyzny są lustrzanymi odbiciami grup leżących z drugiej strony tej płaszczyzny. Związki, które są achiralne, ale zawierają asymetryczne centrum nazywane są odmianami mezo. Wobec tego kwas winowy istnieje w trzech formach izomerycznych; w postaci dwóch enancjomerów i jednej formy mezo.



Rys. 1.3 Stereoizomery kwasu winowego

Asymetryczny atom nie jest warunkiem koniecznym do istnienia chiralności cząsteczki. Znane są związki, które pozbawione są asymetrycznego atomu węgla, a mimo tego są chiralne. W takim przypadku geometryczną przyczyną czynności optycznej może być oś chiralności. Wówczas mówimy o chiralności aksjalnej, spotykanej w chiralnych allenach lub bifenylach (Rys. 1.4) [1].

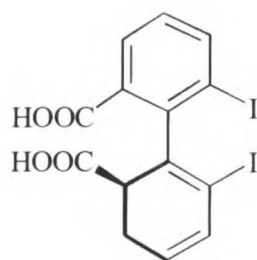


Rys. 1.4 Chiralność aksjalna

W przypadku struktury allenu, aby cząsteczka była chiralna musi mieć przynajmniej dwa różne podstawniki przy każdym końcowym atomie węgla (Rys. 1.4). Oczywiście cząsteczki z trzema, czterema różnymi podstawnikami także są chiralne. Orto-podstawione bifenyle również wykazuje czynność optyczną pomimo braku centrum asymetrycznego, jeśli:

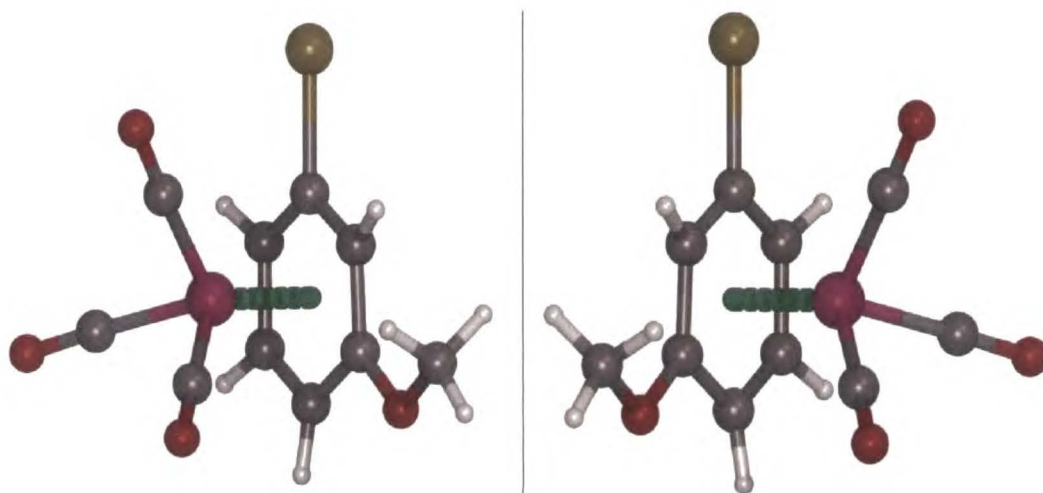
- podstawniki są wystarczająco tak duże, żeby rotacja wokół wiązania pojedynczego łączącego pierścienie aromatyczne była zahamowana,
- pozycje orto na każdym pierścieniu są podstawione różnymi grupami.

W odpowiednio podstawionych bifenylach chiralność spowodowana jest przez zahamowanie rotacji wokół wiązania pojedynczego. Tak powstałe izomery nazywane są atropoizomerami, a zjawisko jest nazywane atropoizomerią [4].



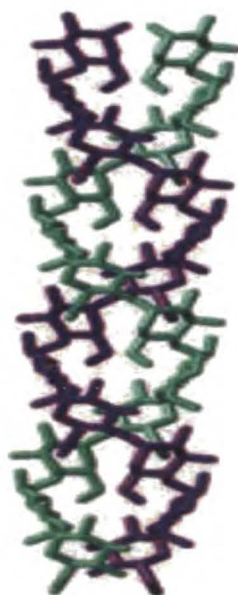
Rys. 1.5 Chiralność aksjalna. Pochodne bifenolu

Kolejnym rodzajem chiralności jest chiralność planarna, uwarunkowaną obecnością płaszczyzny chiralności. Przykładem związków posiadających ten typ chiralności mogą być pochodne cyklopentadienylotrikarbonylochromu (Rys. 1.6). Lokalizacja podstawników po prawej lub lewej stronie płaszczyzny generuje dwa nie dające się nałożyć na siebie odbicia lustrzane [1].



Rys. 1. 6 Chiralność planarna

Innym rodzajem chiralności, w której nie występuje centrum stereogeniczne jest helisowość (Rys. 1.7). Chiralność helisy jest określona wyłącznie na podstawie czynności optycznej. Helisy mogą być prawoskrętne (P – plus) i lewoskrętne (M – minus) [1, 5]. Struktura ta występuje głównie w dużych cząsteczkach biologicznych takich jak; białka wiążące DNA i białka wiążące wapń, kwasy nukleinowe albo polisacharydy.



Rys. 1.7 Struktura podwójnej helisy w amylopektynie

1.2.1 Konfiguracja chiralnej cząsteczki

Konfiguracją cząsteczki chiralnej nazywa się rozmieszczenie podstawników w przestrzeni wokół asymetrycznego atomu. Ustalenie rzeczywistego, przestrzennego układu atomów w cząsteczce jest możliwe na podstawie badań (np. rentgenowskich, krystalograficznych, przy pomocy mikroskopu elektronowego). Obecnie stosuje się dwa, umowne systemy określania konfiguracji cząsteczek chiralnych:

- system konfiguracji absolutnej R–S,
- system konfiguracji względnej D–L.

W systemie oznaczeń konfiguracji absolutnej Cahna-Ingolda-Preloga do opisu związków zawierających centra chiralne stosuje się symbole R, S (R z łac. Rectus – prawy i S sinister – lewy) [6]. Konfiguracja absolutna umożliwia jednoznaczny opis przestrzennego rozmieszczenia podstawników wokół asymetrycznego atomu. W celu odczytania konfiguracji trzeba przypisać podstawnikom przy asymetrycznym atomie numery według

regul pierwszeństwa. Reguły pierwszeństwa są bardzo szczegółowe i złożone. Wystarczające wyobrażenie o obowiązujących zasadach dają trzy reguły:

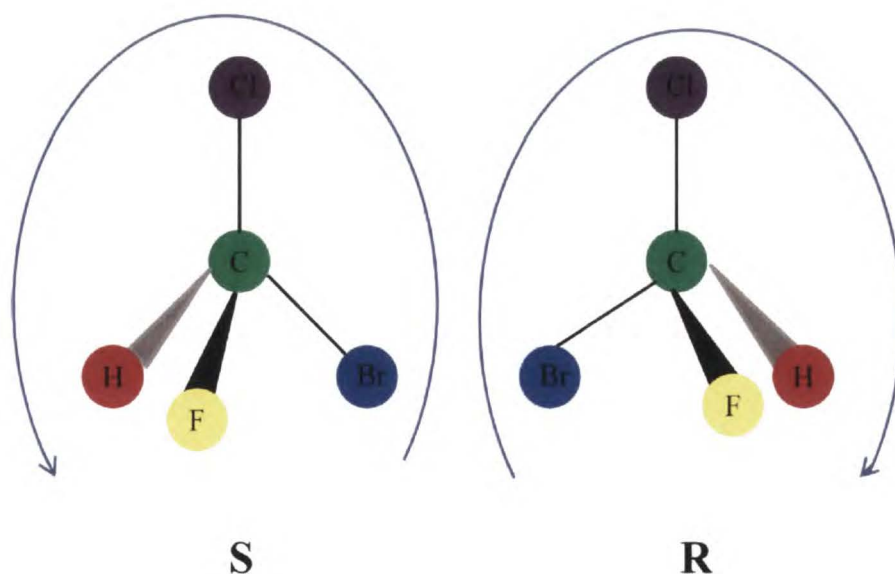
1. Podstawniki szereguje się według malejących liczb atomowych, np. w bromofluorometanie:



2. W przypadku izotopów decyduje masa atomowa. Cięższy ma pierwszeństwo.
3. Jeśli z atomem asymetrycznym bezpośrednio związane są identyczne atomy to porównuje się atomy bardziej oddalone od atomu asymetrycznego, np. w 2-metylo-1-butanol:

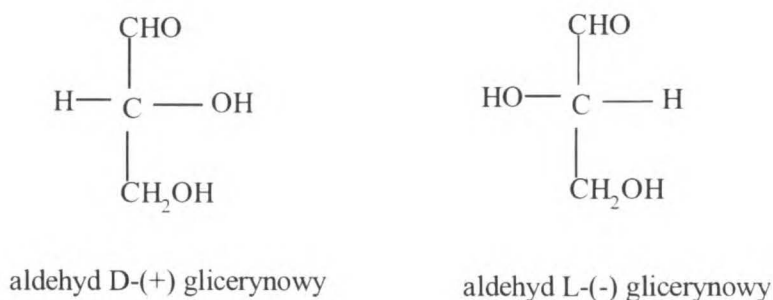


Po ustaleniu kolejności pierwszeństwa podstawników należy ustawić tak cząsteczkę, aby podstawnik o najniższym pierwszeństwie był jak najdalej oddalony od obserwatora. Jeżeli kolejność ustawienia podstawników jest zgodna z ruchem wskazówek zegara, to taką konfigurację oznaczamy symbolem R, zaś w odwrotnej sytuacji konfiguracji przypisujemy symbol S (Rys. 1.8).



Rys. 1.8 Konfiguracja R i S enancjomerów bromochlorofluorometanu

Odmienne system, zaproponowany przez Fischera jest stosowany do określania konfiguracji hydroksykwasów, aminokwasów i węglowodanów. System ten polega na porównaniu wzoru rzutowego wybranego enancjomeru ze wzorem rzutowym wzorca. Za wzorzec przyjmuje się aldehyd glicerynowy (Rys. 1.9).



Rys. 1.9 Wzory enancjomerów aldehydu glicerynowego

Tworzenie tej projekcji, polega na tym, że jest wykonywany rzut cząsteczki cukru ułożonej w ten sposób, żeby grupa alde
 dole. Jeżeli grupa -OH na
 stronie to dany cukier ma
 mamy konfigurację L.



Określenie konfiguracji względnej α -aminokwasów dokonuje się rysując cząsteczkę w projekcji Fishera ustawiając grupę karboksylową -COOH na górze, łańcuch boczny aminokwasu ustawia się na dole natomiast w poziomych ustawieniach znajdują się grupa -NH₂ oraz -H. Położenie grupy aminowej determinuje szereg D lub L aminokwasu. Aminokwasy tworzące białka to L-aminokwasy. D-Aminokwasy występują znacznie rzadziej i nie są spotykane w białkach.

1.3 Znaczenie enancjomerów w farmakologii

Ponad połowa leków obecnych na rynku farmaceutycznym to substancje chiralne [7]. Działanie farmakologiczne jest w większości przypadków ograniczone do jednego z

enancjomerów. Niemniej jednak tylko 25 % leków sprzedawane jest w postaci czystych enancjomerów [8].

W Tab. 1.1 pokazano kilka przykładów stereoizomerów leków, które różnią się pod względem działania farmakologicznego i farmokinetycznego. W wielu przypadkach jeden z enancjomerów jest składnikiem aktywnym farmaceutycznie, podczas gdy drugi może być nieaktywny lub nawet toksyczny. Klasycznym przykładem jest Talidomid, który był sprzedawany w formie racemicznej. Obecnie jest wiadomo że S-talidomid ma własności teratogenne i był odpowiedzialny za poważne efekty uboczne. Tysiące dzieci urodziło się z anomalnymi defektami kończyn. Innym przykładem jest Ibuprofen, który podawany, jako racemat ulega inwersji. Nieaktywny R – enancjomer ulega metabolicznej inwersji konfiguracji w celu utworzenia aktywnego S – enancjomeru [9].

W związku z tym rozdzielenie enancjomerów stanowi duże wyzwanie z powodu skuteczności i bezpieczeństwa stosowania leków. Stosowanie leku w postaci pojedynczego enancjomeru umożliwia zmniejszenie dawki leku, zwiększenie efektu terapeutycznego, uniknięcie niekorzystnych interakcji lekowych, zmniejszenie toksyczności. Wzrost zapotrzebowania na leki w postaci pojedynczych enancjomerów wpływa na rozwój metod otrzymywania związków homochiralnych.

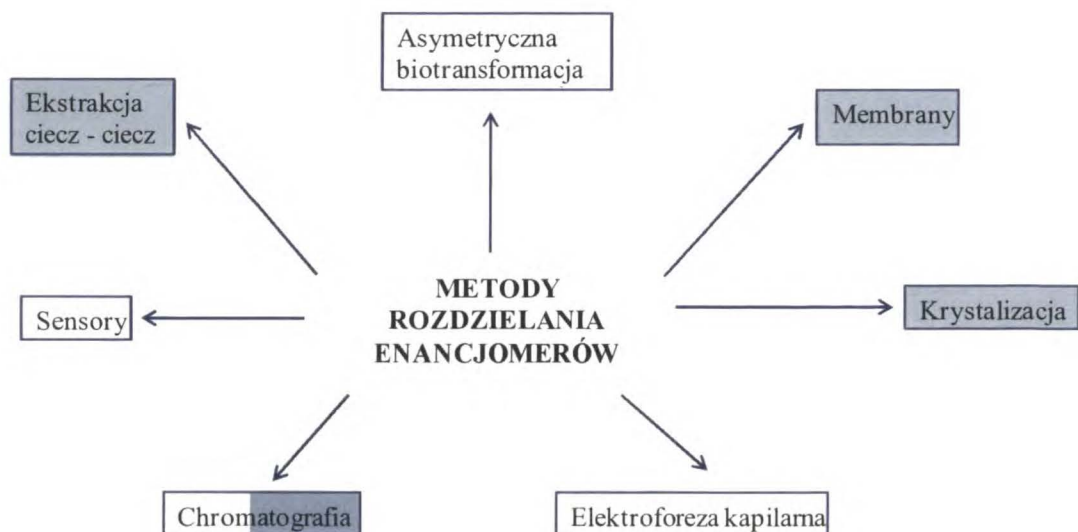
Tab. 1.1 Farmakologiczne działanie enancjomerów leków [10]

Związek	Działanie	
	(+) - enancjomer	(-) - enancjomer
Ibuprofen	przeciwzapalne	nieaktywny
Talidomid	uspokajające	teratogenne
Ketamine	silnie znieczulające	slabo znieczulające
Penicylamina	antyreaumatyczne	silnie toksyczne

1.4 Metody rozdzielania enancjomerów

Ze względu na identyczność niemal wszystkich właściwości fizycznych, enancjomery nie mogą być rozdzielone za pomocą powszechnie stosowanych metod np. destylacja

frakcyjna – z powodu identycznej temperatury wrzenia. Rozdzielenie mieszaniny racemicznej jest skomplikowanym zadaniem i wymaga specjalnego podejścia. Z tego powodu opracowano rozmaite metody rozdzielania enancjomerów. Niektóre z tych metod przedstawiono na Rys. 1.10.



Rys. 1. 10 Metody ■ preparatywne i □ analityczne stosowane do rozdzielania enancjomerów [11]

Do preparatywnych metod rozdzielania enancjomerów zaliczamy:

1. Krystalizację

Po raz pierwszy rozdzieli enancjomerów dokonał Ludwik Pasteur. W wyniku procesu krystalizacji winianu sodowo-amonowego, otrzymał on dwa różne rodzaje kryształów, które były wzajemnymi odbiciami lustrzanymi. Pasteur poprzez manualną selekcję kryształów, rozdzielił je na enancjomery. W praktyce tylko w niewielu przypadkach udało się w ten sposób pomyślnie dokonać rozdzielania mieszanin racemicznych. Rozdzielenie enancjomerów można uzyskać również stosując mniej żmudne metody krystalizacji np. [12,13]:

- krystalizacja diastereoizomeryczna - ta metoda składa się z dwóch etapów. Pierwszy to konwersja enancjomerów do diastereoizomerów na drodze reakcji chemicznej. Następny etap to krystalizacja frakcyjna. Do rozdzielania mieszaniny

diastereoizomerów można również stosować inne metody fizyczne jak np. destylacja,

- krystalizacja związków racemicznych z optycznie czynnych rozpuszczalników,
- krystalizacja przez zaszczerpienie nasyconego roztworu mieszaniny racemicznej czystym kryształem jednego z enancjomerów. Roztwór staje się przesycony w stosunku do dodanego enancjomeru i w większości przypadków pierwszy zaczyna krystalizować.

2. Membrany

Procesy membranowe mają również zastosowanie do chiralnego rozdziału związków. Najczęściej stosowanymi membranami chiralnymi są [14]:

- ciekłe membrany unieruchomione, w których czynnik chiralny stanowi fazę membranową,
- membrany, w których czynnik chiralny jest chemicznie związany z łańcuchem polimerowym.

3. Syntezy biochemiczne

Do innych przykładów metod rozdziału enancjomerów można zaliczyć biochemiczne syntezy przebiegające pod wpływem enzymów lub mikroorganizmów [15, 16]. Enzymy są optycznie czynnymi katalizatorami białkowymi, pochodzenia zwierzęcego. W wyniku reakcji katalizowanej enzymem transformacji chemicznej ulega jeden z enancjomerów, podczas gdy drugi enancjomer pozostaje niezmienny.

4. Ekstrakcję (została szczegółowo omówiona w następnym podrozdziale 1.4).

1.4.1 Rozdział enancjomerów przez ekstrakcję

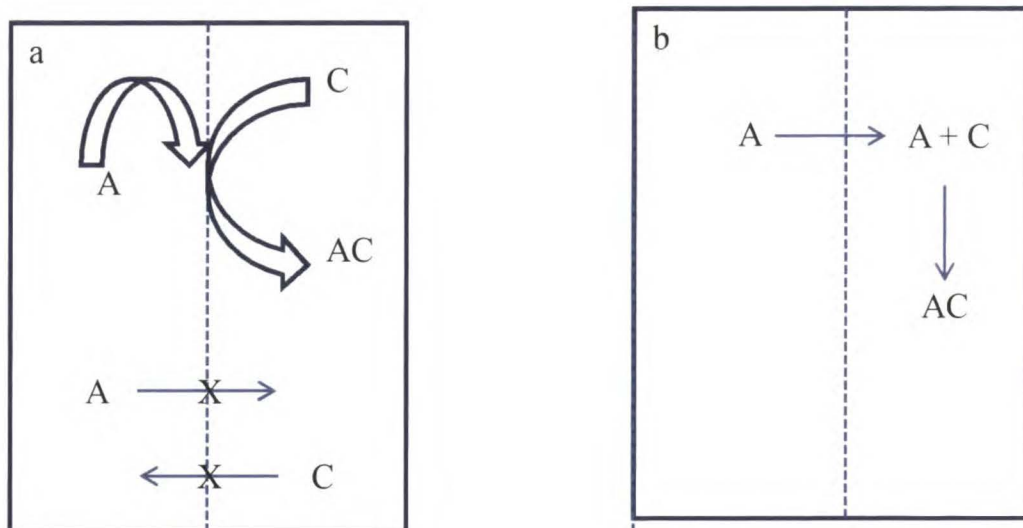
Ekstrakcja jest metodą preparatywną wykorzystującą zjawisko podziału substancji między dwie niemieszające się fazy lub inaczej ujmując - przechodzenia substancji rozpuszczonej w danej fazie do drugiej fazy, niemieszającej się z pierwszą. W przypadku ekstrakcji chiralnej zdolność przechodzenia enancjomerów ekstrahowanej substancji z jednej fazy do drugiej jest powiązana z oddziaływaniem z czynnikiem chiralnym.

W literaturze są omówione dwa modele opisujące mechanizm przebiegu procesu ekstrakcji [17]: model oddziaływań międzyfazowych i model konwersji homogenicznej. Model oddziaływań międzyfazowych jest stosowany do systemów, w których każdy z reagentów jest całkowicie nierozpuszczalny w drugiej fazie. W rezultacie, miejsce reakcji chemicznej ogranicza się do styku faz (Rys. 1.11 a). Reakcja chemiczna i transport masy zachodzą w kilku etapach:

1. Transport reagentów do przestrzeni międzyfazowej,
2. Sorpcja,
3. Reakcja kompleksowania w przestrzeni międzyfazowej,
4. Desorpcja produktu,
5. Transport produktu z przestrzeni międzyfazowej do wnętrza fazy.

Model ten znalazł zastosowanie w ekstrakcji penicyliny [18].

Natomiast, model konwersji homogenicznej zakłada ograniczoną rozpuszczalność przynajmniej jednego z reagentów w obu ciekłych fazach. W rezultacie, reakcja odbywa się w głębi jednej lub obu faz (Rys. 1.11 b). Szybkość reakcji jest wyrażona prawem działania mas. Adsorpcja reagentów i produktów w przestrzeni międzyfazowej nie jest rozpatrywana. Proces chiralnej ekstrakcji naproksenu [19] i flurbiprofenu [20] był analizowany z wykorzystaniem homogenicznego modelu reakcji.



Rys. 1.11 Schemat przebiegu ekstrakcji według (a) modelu oddziaływań międzyfazowych i (b) modelu konwersji homogenicznej. Przyjęto następujące oznaczenia A, C - reagenty, AC - produkt.

Oba modele są wykorzystywane do identyfikowania zmiennych, takich jak: obszar międzyfazowy i szybkość mieszania w odpowiednim reaktorze, w celu otrzymania najkorzystniejszych warunków procesu ekstrakcji.

Istotnymi parametrami opisującymi wydajności procesu ekstrakcji chiralnej są współczynnik podziału enancjomerów i enancjoselektywność. Współczynnik podziału jest zdefiniowany jako:

$$k_R = \frac{\text{Stężenie R enancjomeru w fazie organicznej}}{\text{Stężenie R enancjomeru w fazie wodnej}} \quad \text{Równ. 1.1}$$

$$k_S = \frac{\text{Stężenie S enancjomeru w fazie organicznej}}{\text{Stężenie S enancjomeru w fazie wodnej}} \quad \text{Równ. 1.2}$$

Natomiast enancjoselektywność jest opisana równaniem

$$\alpha = \frac{k_R}{k_S} \quad \text{Równ. 1.3}$$

1.4.2 Rozdzielanie enancjomerów w chromatografii ciekowej

Innymi technikami, które mają zastosowanie do rozdzielania enancjomerów są metody analityczne takie jak: elektroforeza kapilarna, chromatografia gazowa, elektrochromatografia. Chromatografia ciekowa okazała się jedną z najlepszych metod do analitycznego rozdzielania enancjomerów [21, 22]. W chiralnej chromatografii ciekowej są stosowane metody:

1. Metoda pośrednia

W metodzie pośredniej mieszanina racemiczna reaguje z chiralnym czynnikiem tworząc parę diastereoizomerów, które różnią się właściwościami fizycznymi i chemicznymi, dlatego można je rozdzielić na achiralnych fazach stacjonarnych.

Do rozdzielania racemicznych kwasów stosuje się chiralne czynniki takie jak; trychnina, brucyna, morfina, efedryna, cynchonina, chinina i chinidyna. Natomiast racemiczne zasady



można rozdzielić pośrednio za pomocą optycznie czynnych kwasów takich jak; kwas kamforowy, kwas kamforo-10-sulfonowy, kwas α -bromokamforo- π -sulfonowy, kwas metoksyoctowy i kwas pirolidono-5-karboksylowy [23, 24]. Metoda stosowana do rozdzielania alkoholi racemicznych polega na utworzeniu diastereoizomerycznych estrów kwasów chiralnych [25].

W praktyce metoda pośrednia nastęca wiele trudności. Wymagane jest, aby diastereoizomery w łagodnych warunkach szybko powstawały, łatwo dawały się oczyścić i były trwałe stereochemicznie.

2. Metoda bezpośrednia

Bezpośrednie rozdzielanie enancjomerów w chromatografii ciekowej jest możliwe jedynie w układach, które zawierają chiralny selektor. Może on być na stałe związany z powierzchnią materiału stanowiącego wypełnienie kolumny lub stanowić dodatek do fazy ruchomej.

Interakcja racematu z selektorem chiralnym powoduje powstawanie dwóch odwracalnych kompleksów diastereoizomerycznych. Różnica w stabilności tych kompleksów powoduje zróżnicowaną elucję. W przypadku chiralnych faz stacjonarnych enancjomer, który tworzy bardziej stabilny kompleks z selektorem chiralnym, będzie dłużej wymywany z kolumny. Natomiast, chiralna faza ruchoma zmniejsza retencję enancjomerów, tym bardziej im tworzą one silniejszy kompleks z chiralnym selektorem.

Jednakże wprowadzenie chiralnego selektora nie jest warunkiem wystarczającym do otrzymania rozróżnienia chiralnego w układach chromatograficznych. W celu rozróżnienia par enancjomerów selektor chiralny, musi przyjąć odpowiednią konfigurację względem enancjomerów, tak aby zachodziły oddziaływania enancjoselektywne.

Opis teoretyczny mechanizmu chiralnego różnicowania został opublikowany przez Easson i Stedman [26]. W ich modelu, aby doszło do chiralnego różnicowania pomiędzy enancjomerami, a selektorem muszą wystąpić minimum trzy oddziaływania, przy czym jedno z nich powinno być zależne od konfiguracji centrum stereogenicznego. Kompleks trójpunktowy enancjomeru z selektorem chiralnym chemicznie związany z powierzchnią fazy stacjonarnej charakteryzuje się wyższą trwałością. W konsekwencji silniej oddziałuje z chiralną fazą stacjonarną i jest wymywany jako drugi z kolumny chromatograficznej.

Model trójpunktowy był używany przez Dalgliesha do opisu chromatograficznych rozdzielen enancjomerów aminokwasów [27] i przez Pirkle przy tworzeniu stacjonarnych faz chiralnych stosowanych do rozdzielania związków o określonej budowie chemicznej [28,29].

Jednym z problemów związanym z wykorzystaniem modelu trójpunktowego jest jego ograniczone zastosowanie. Kwestia ta została poruszona przez Del Rio podczas badań nad zastosowaniem fazy chiralnej Whelk-01 CSP do chiralnego rozdziału pochodnych 1-(4-fluorowco-fenilo)-1-etyloaminy [30]. Na podstawie tych danych autorzy wnioskowali, że model trójpunktowy nie wydaje się być ogólnie obowiązującą zasadą i tylko ligandy z kilkoma stopniami swobody uwzględniają ten uproszczony model. Bezpośrednie wykorzystanie modelu trójpunktowego jest bardzo kłopotliwe w przypadku selektorów chiralnych pochodzenia naturalnego takich jak np.; cyklodekstryny, białka, polisacharydy.

Dodatkowym problemem przy interpretacji mechanizmów rozdziału chiralnego jest wpływ odczynników achiralnych na rozdział enancjomerów. Achiralne dodatki mogą mieć ogromne znaczenie w procesie powstawania kompleksów diastereoizomerycznych, a tym samym wpływać na różnicowanie trwałości tych kompleksów [31].

1.4.2.1.1 Rodzaje chiralnych faz stacjonarnych.

Obecnie dostępnych na rynku jest ponad 100 chiralnych faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii cieczowej.

Według Weinera istnieje pięć głównych rodzajów chiralnych faz stacjonarnych [32]. Dokonał on klasyfikacji na podstawie typu kompleksowego połączenia utworzonego pomiędzy fazą stacjonarną a analitem. W fazach typu pierwszego kompleks analit – faza stacjonarna powstaje przez oddziaływanie elektron – donoro – akceptorowe.

Przykładem faz drugiego typu są estrowe pochodne celulozy. Mechanizm działania tych faz opiera się na inkluzji cząstek. Typ trzeciej fazy to obsadzone na nośniku stałym cyklodekstryny i etery koronowe. Wypełnienia te rozpoznają chiralne cząsteczki poprzez tworzenie kompleksów inkluzyjnych. W typie czwartym fazy analit jest częścią diastereoizomerycznego kompleksu metalu w wyniku wymiany ligandów. Wypełnienia te są stosowane do rozdzielania enancjomerów aminokwasów i ich pochodnych. Typ piąty

stanowią białka, np. albuminy surowicy wołowej, α – glikoproteina i albumina surowicy ludzkiej. Kompleks analit – faza stacjonarna powstaje poprzez oddziaływania hydrofobowe i polarne. Tabela 1.2 przedstawia przykłady chiralnych faz stacjonarnych dostępnych na rynku.

Tab. 1.2 Klasyfikacja chiralnych faz stacjonarnych

Typ	Opis	Przykłady
1	Fazy elektronowo - donoro - akceptorowe	DNB - leucyna DNB - fenyloglicyna
2	Pochodne celulozy	Chiralcel OB, OD, OA, OF
3	Cyklodekstryny i etery koronowe	Cyclobond I, II, III Chiralpak OP, OT
4	Fazy ligandowymienne	Proliny, hydroksyproliny
5	Proteiny	Chiral – AGP Resolvosil EnantioPac

1.4.2.1.2 Chiralne dodatki do faz ruchomych

Inną powszechnie stosowaną metodą rozdziału enancjomerów w chromatografii cieczowej jest tworzenie diastereoizomerycznych kompleksów z chiralnym selektorem rozpuszczonym w fazie ruchomej. Wynikiem tego procesu jest rozdzielanie enancjomerów na achiralnych kolumnach.

Przewagą tej metody nad zastosowaniem chiralnych faz stacjonarnych jest niska cena klasycznych achiralnych kolumn, szeroki zakres chiralnych dodatków, szybka zmiana parametrów analizy (stężenie selektora chiralnego, pH itp.).

W zależności od rodzaju rozdzielanych enancjomerów, można stosować przeróżne dodatki chiralne do fazy ruchomej. Zostały one podzielone ze względu na mechanizm rozdzielania:

1. Wymiana ligandów
2. Kompleksy typu par jonowych
3. Kompleksy inkluzyjne

Ad.1 Chiralna wymiana ligandów jest metodą stosowaną do rozdzielania aminokwasów i ich pochodnych. Mechanizm chiralnego rozdzielania jest oparty na tworzeniu diastereoizomerycznego, trójskładnikowego kompleksu pomiędzy jonem metalu, selektorem, a analitem. Rozdział następuje na skutek różnicy trwałości tych dwóch kompleksów. Powyżej opisany mechanizm obrazują równania 1.4 i 1.5.



gdzie A oznacza analit, a L-Sel selektor.

Ad.2 Chiralna chromatografia par – jonowych jest metodą stosowaną do rozdzielania związków obdarzonych ładunkiem elektrycznym. Podstawą tej metody jest formowanie obojętnych kompleksów diastereoizomerycznych (tzw. par jonowych) pomiędzy analitem, a optycznie czynnym przeciwjonem. Rozdział tych par jonowych następuje w wyniku różnicy w ich solwatacji lub zróżnicowanym oddziaływaniu z fazą stacjonarną. Kwas (+)-10-kamforosulfonowy, chinina, chinidyna, kwas (+)-di-n-butyłowinowy oraz białka albumin zostały pomyślnie zastosowane jako chiralne pary jonowe w chromatografii [33, 34].

Ad.3 Kolejną grupę stanowią dodatki do fazy ruchomej, które działają na zasadzie tworzenia kompleksów inkluzyjnych. Zaliczamy do nich cyklodekstryny i etery koronowe. Chiralne etery koronowe stereoselektywnie inkludują związki zawierające pierwszorzędową grupę aminową. Podstawą mechanizmu rozpoznania chiralnego jest tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy trzema wodorami w sprotonowanej grupie aminowej $-\text{NH}_3^+$, a atomem tlenu wielopierscieniowego eteru. Te związki chemiczne zostały użyte w chiralnym rozdzielaniu aminokwasów, dipeptydów i leków zawierających pierwszorzędowe grupy aminowe [35].

Najbardziej powszechnie stosowanymi chiralnymi dodatkami do fazy ruchomej są cyklodekstryny i ich pochodne. Zastosowanie cyklodekstryn w chromatografii ciekłowej zostało opisane szczegółowo w rozdziale drugim.

2 CYKLODEKSTRYNY

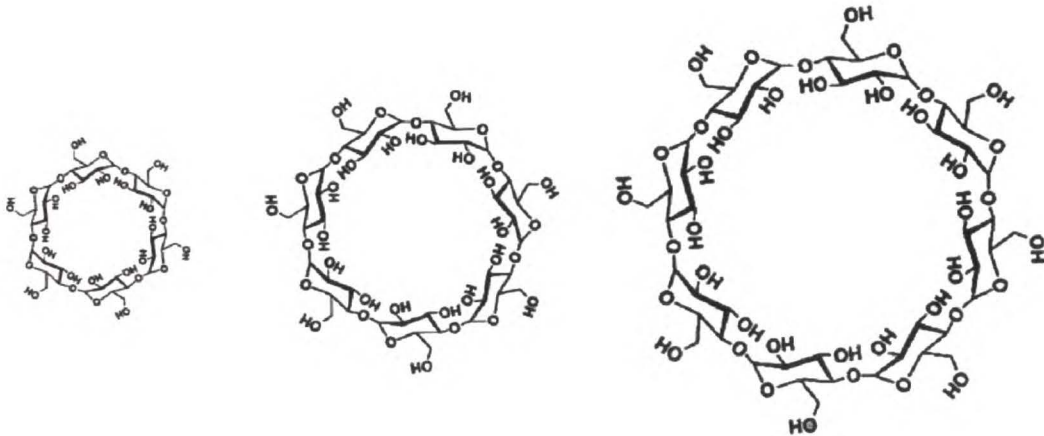
Każdego roku cyklodekstryny są przedmiotem niemal 1000 artykułów naukowych. Liczne wynalazki z użyciem cyklodekstryn zostały opisane w ponad 1000 patentach w ciągu ostatnich 5 lat [36]. Pierwsze Międzynarodowe Sympozjum na temat cyklodekstryn zostało zorganizowane w 1981 roku [37] i od tej pory odbywa się co dwa lata.

W 1973 roku cena 1 kg β -CD wynosiła około 2000 USD. 30 lat później, na całym świecie już ponad kilkadziesiąt firm produkuje cyklodekstryny, a cena produktu β -CD wynosi tylko kilka dolarów za kg, w zależności od jakości [36].

Przedstawione powyżej informacje, a także niektóre najnowsze monografie o cyklodekstrynach [38-40] potwierdzają jednogłośnie poprawności prognozy stałego rozwoju rynku cyklodekstrynowego w nadchodzącym dziesięcioleciu. Potencjał cyklodekstryn nie został jeszcze w pełni wykorzystany.

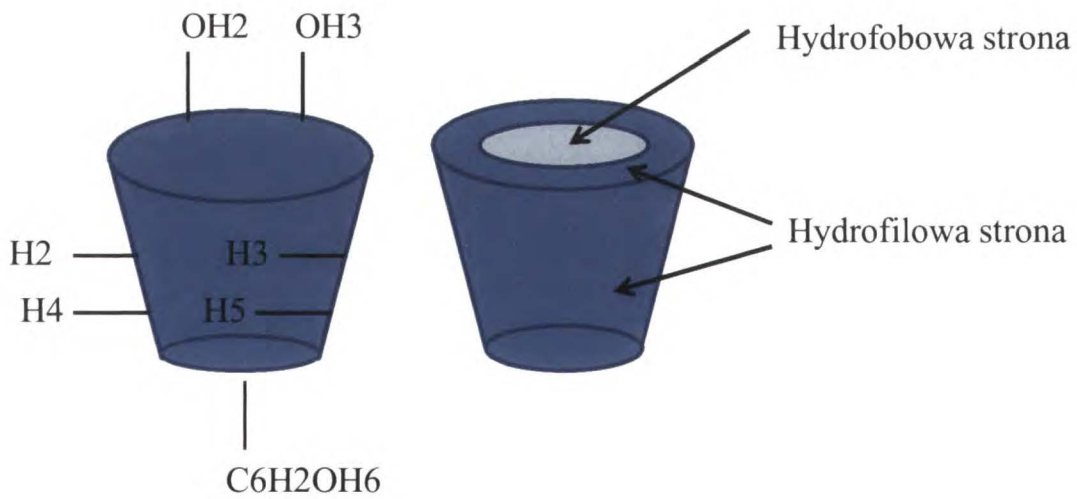
2.1 Budowa i właściwości fizykochemiczne

Cyklodekstryny są to makrocykliczne oligosacharydy składające się z pierścieni α -D-glukopiranozy, połączonych między sobą mostkami tlenowymi α -(1,4). Produkowane są w wyniku enzymatycznej degradacji skrobi. Najbardziej rozpowszechnione są cyklodekstryny α , β i γ , zbudowane odpowiednio z 6, 7 i 8 jednostek (Rys. 2.1). Istnieją doniesienia literaturowe o cyklodekstrynach zbudowanych z większej liczby jednostek [41]. Największą cyklodekstryną, która została szczegółowo zbadana, jest zbudowana z 32 pierścieni glukopiranozy [42]. Znane są również gigantyczne cykliczne oligosacharydy, składające się, z co najmniej 150-pierścieni glukopiranozy [43]. Przez wiele lat uważano, że niemożliwe jest otrzymanie z powodów przestrzennych cyklicznej struktury składającej się z mniej niż 6 monomerów. Jednak Nakagawo udało się uzyskać pięcioczłonową cyklodekstrynę [44].



Rys. 2.1 Struktura chemiczna α -, β - i γ -cyklodekstryn

Cyklodekstryny mają kształt ściętego stożka, z grupami hydroksylowymi przy pierwszorzędowych atomach węgla usytuowanymi przy węższej części stożka i grupami hydroksylowymi przy drugorzędowych atomach węgla znajdującymi się przy szerszym końcu stożka (Rys. 2.2). Wnętrze cyklodekstryny ma charakter hydrofobowy, natomiast część zewnętrzna ma właściwości hydrofilowe [45].



Rys. 2.2 Schemat budowy cyklodekstryny

Główne właściwości α -, β - i γ -cyklodekstryn zestawiono w Tab. 2.1.

Tab. 2.1 Główne właściwości α -, β - i γ -cyklodekstryn [46]

CD	Liczba pierścieni glukopiranozy	Masa molowa	Rozpuszczalność		Przybliżona objętość luki Å ³	Zawartość wody krystalicznej [% w / w]
			w wodzie g / 100 mL w 25 °C	Średnica luki Å		
α	6	972	14,5	4,7 – 5,3	174	10,2
β	7	1135	1,85	6,0 – 6,5	157	13,2 – 14,5
γ	8	1297	23,2	7,5 – 8,3	256	8,13 – 17,7

2.2 Pochodne

Cyklodekstryny posiadają grupy hydroksylowe w liczbie 18 α -CD, 21 β -CD, 24 γ -CD, które mogą być modyfikowane. Ze względu na dużą liczbę grup hydroksylowych, możliwa do uzyskania liczba pochodnych cyklodekstryn jest bardzo wysoka. Jednakże na skale przemysłową produkuje się niewiele pochodnych cyklodekstryn, ponieważ uzyskanie cyklodekstryn mających podstawione grupy hydroksylowe w określonych pozycjach jest bardzo trudnym i mało wydajnym procesem. W wyniku reakcji podstawienia grup hydroksylowych, oprócz pożądanego produktu otrzymuje się pochodne cyklodekstryn różnie podstawione, przez co konieczne jest zastosowanie żmudnych technik oczyszczania (najczęściej chromatograficznych) w celu uzyskania czystego produktu.

Tworzenie pochodnych cyklodekstryn prowadzi do powstania ich analogów o różnych właściwościach fizykochemicznych. Pochodne cyklodekstryn możemy podzielić na trzy grupy; hydrofobowe, hydrofilowe i jonowe [47].

Główne zainteresowanie skupia się na cyklodekstrynach dobrze rozpuszczalnych w wodzie, losowo podstawionych pochodnych hydroksyalkilowych beta-i gamma-CD,

takich jak 2-hydroksypropylo-beta-cyklodekstryna (2-HP-beta-CD) i pochodna jonowa sulfobutylova [48, 49].

β -cyklodekstryna jest najslabiej rozpuszczalna w wodzie. Tymczasem częściowe zastąpienie grup hydroksylowych β -cyklodekstryny grupami metylowymi daje trzydziestokrotny wzrost rozpuszczalności dimetylo- β -cyklodekstryny (Tab. 2.2). W wyniku dalszej metylacji, produkt staje się mniej rozpuszczalny w wodzie. Pomimo to, trimetylo- β -cyklodekstryny jest lepiej rozpuszczalna w wodzie niż naturalna β -cyklodekstryny.

Bardzo słaba rozpuszczalność β -cyklodekstryny w wodzie może być spowodowana przez powstanie wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi przy atomie węgla 2 i grupami OH przy atomie węgla 3 sąsiedniej jednostki glukozy. Te wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe nie mogą już powstać w pochodnej cyklodekstryny, a więc grupa hydroksylowa przy atomie węgla 3 może oddziaływać z cząsteczkami wody w otaczającym ją środowisku. To daje znaczny wzrost rozpuszczalności dimetylo- β -cyklodekstryny. Derywatywacja wpływa nie tylko na rozpuszczalność w wodzie, ale także na rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych. Metylowe pochodne są bardzo dobrze rozpuszczalne w metanolu, etanolu i sulfotlenku dimetylu, podczas gdy naturalna β -cyklodekstryna jest praktycznie nierozpuszczalna w tych rozpuszczalnikach [50].

Tab. 2.2 Rozpuszczalność β -cyklodekstryny, dimetylo- β -cyklodekstryny i trimetylo cyklodekstryny beta w wodzie

	β -cyklodekstryna	Dimetylo- β - cyklodekstryna	Trimetylo- β - cyklodekstryna
Rozpuszczalność w wodzie g / 1000 mL w 25°C	18,5	570	31

2.3 Kompleksy inkluzyjne

Najbardziej zauważalną cechą cyklodekstryn jest ich zdolność do tworzenia kompleksów typu gość-gospodarz. Tworzenie kompleksu opiera się na dopasowaniu

cząsteczki gościa do luki gospodarza. Główną siłą napędową tworzenia kompleksu inkluzyjnego jest wypieranie cząsteczek wody z wnętrza cyklodekstryny przez mniej polarną cząsteczkę gościa obecnego w roztworze. Skutkiem tego procesu jest spadek napięcia pierścienia cyklodekstryny i uzyskanie bardziej stabilnego stanu o niższej energii [51].

Ogólnie ujmując, istnieją cztery przyczyny umożliwiające powstawanie kompleksu inkluzyjnego:

- wypchnięcie hydrofilowych cząsteczek wody z hydrofobowej luki cyklodekstryny,
- tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy gościem, a gospodarzem,
- oddziaływania Van der Waalsa pomiędzy gościem, a gospodarzem,
- steryczne dopasowanie rozmiarów gościa do luki cyklodekstryny.

Tworzenie kompleksu inkluzyjnego wywiera ogromny wpływ na fizykochemiczne właściwości cząsteczek gości [52]. Te właściwości to:

- zwiększenie rozpuszczalności,
- zmniejszenie reaktywności chemicznej,
- zwiększenie stabilności chemicznej,
- zmiana widma UV/VIS,
- modyfikacja smaku,
- maskowanie nieprzyjemnego zapachu,
- kontrolowane uwalnianie leków.

Z tego powodu, cyklodekstryny znalazły szerokie zastosowanie m. in. w przemyśle spożywczym [53], farmacji [54] kosmetykach [55] ochronie środowiska [56], przemyśle włókienniczym [57]. Ze względu na tematykę pracy doktorskiej ograniczono się do opisu zastosowania cyklodekstryn w chromatografii cieczowej.

2.4 Zastosowanie cyklodekstryn w chromatografii cieczowej jako dodatku do fazy ruchomej

W chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami cyklodekstryny jako dodatek do fazy ruchomej zostały po raz pierwszy zastosowane w zespole Prof. Sybilskiej w Instytucie Chemii Fizycznej PAN. Cyklodekstryny i ich pochodne zostały wykorzystane do

rozdzielania izomerów konstytucyjnych np.: krezoli i ksylenów, do rozdzielania izomerów cis i trans kwasu cynamonowego, oraz do rozróżnienia związków chiralnych takich jak kwas migdałowy i jego pochodne, barbiturany, kamfora i α -pinen i inne [58-63].

Cyklodekstryny w fazie ruchomej mogą być również wykorzystane do dynamicznego generowania achiralnych faz stacjonarnych (np. RP-18). W pracach Bielejewskiej przedstawiono wykorzystanie metylowanych pochodnych cyklodekstryn w układzie faz odwróconych do generowania achiralnych faz stacjonarnych [64,65].

Dalsze prace z cyklodekstrynami wykazały, iż układ chromatograficzny z dwiema cyklodekstrynami umożliwia skrócenie czasu analizy i wzmocnienie enancjoselektywności układów [66-68]. Następnie badania rozszerzono o inne selektory chiralne. Wykazano, że kwasy cholowe i cyklodekstryny jako dodatki do fazy ruchomej wpływają pozytywnie na enancjoselektywność układu [69].

2.4.1 Wyznaczanie stałych trwałości kompleksów

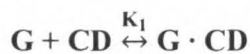
Układy chromatograficzne z cyklodekstryną w fazie ruchomej mogą służyć do wyznaczenia stałych trwałości kompleksów związków z cyklodekstrynami. Warto wspomnieć, iż stałe trwałości kompleksów mogą być wyznaczone również innymi technikami [70]. Często stosowanymi technikami badania kompleksów są miareczkowanie spektrofotometryczne, spektrofluorometryczne, NMR [71], metody rozpuszczalnościowe [72] i ekstrakcyjne [73].

W tym rozdziale szczegółowo będzie omówiona technika chromatograficzna wyznaczenia stałych trwałości kompleksów. W układzie chromatografii cieczowej z fazą ruchomą modyfikowaną cyklodekstrynami następuje równowaga termodynamiczna opisana równaniem:

$$K_R = \frac{[G]_s}{[G]_m} \quad \text{Równ. 2. 1}$$

gdzie K_R jest stałą równowagi przeniesienia molekuł G z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej. $[G]_s$ i $[G]_m$ oznaczają odpowiednio stężenia molekuł w fazie stacjonarnej i ruchomej.

Kiedy proces kompleksowania przez cyklodekstryny występuje w środowisku achiralnego rozpuszczalnika, to powinien być brany pod uwagę następujący stan równowagi:



$$K_1 = \frac{[G \cdot CD]}{[G][CD]} \quad \text{Równ. 2.2}$$

gdzie G oznacza cząsteczkę gościa, a K_1 stałą trwałości kompleksu CD. Gdy stechiometria kompleksu jest 1:2 wówczas należy dodatkowo uwzględnić następujące stany równowagi:



$$K_2 = \frac{[G \cdot 2CD]}{[G][CD]} \quad \text{Równ. 2.3}$$

które można zapisać jako:

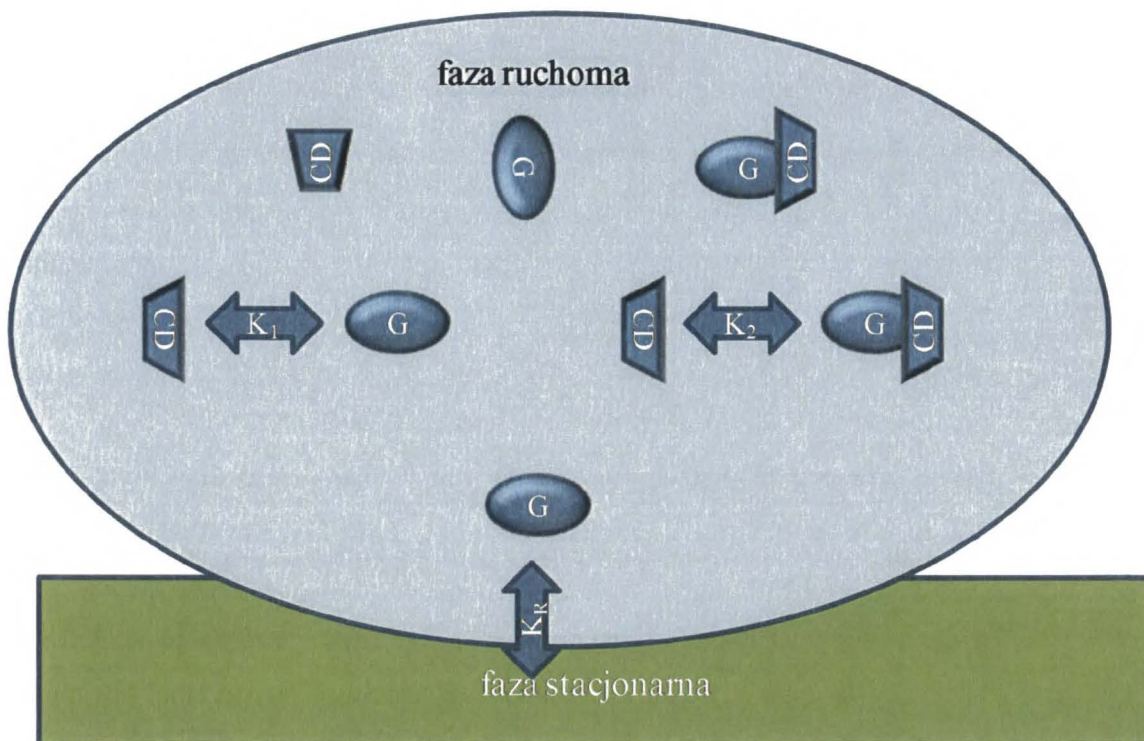


$$K_2 K_1 = \frac{[G \cdot 2CD]}{[G][CD]^2} \quad \text{Równ. 2.4}$$

Przy następujących założeniach:

1. Adsorpcja CD na powierzchni fazy stacjonarnej jest bardzo mała, a więc CD nie wpływa na jej właściwości [74, 75],
2. Cząsteczki substancji rozpuszczonej G są adsorbowane na fazie stacjonarnej,
3. Kompleks pomiędzy CD, a cząstkami substancji rozpuszczonej G może być o stechiometrii 1:2 lub 1:1,
4. Adsorpcja tych kompleksów ($G \cdot CD$ i $G \cdot CD_2$) na fazie stacjonarnej jest znikoma.

Proces chromatograficzny można uprościć do następującego stanu równowagi, zaprezentowanego na Rys. 2.3.



Rys. 2.3 Schemat równowagi w RP-HPLC z fazą ruchomą modyfikowaną cyklodekstrynami. K_R – stała podziału, K_1 , K_2 - stałe trwałości kompleksów utworzonych pomiędzy cząsteczką gościa i cyklodekstryny o stechiometrii 1:1 i 1:2

Kiedy kompleks utworzony przez substancję G z CD ma stechiometrię 1:1, to zależność pomiędzy współczynnikiem retencji, a stężeniem CD jest opisana liniowym równaniem [76]:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_R} + \frac{[CD]K_1}{k_R} \quad \text{Równ. 2.5}$$

gdzie k_R , k są odpowiednio współczynnikami retencji w układzie obserwowanym bez cyklodekstryny i z dodatkiem cyklodekstryny, a K_1 oznacza stałą trwałości kompleksu o stechiometrii 1:1.

W przypadku, gdy substancja G tworzy kompleks z CD o stechiometrii 1:2 zależność pomiędzy $1/k$, a stężeniem CD staje się paraboliczna i wówczas obowiązuje równanie [77]:

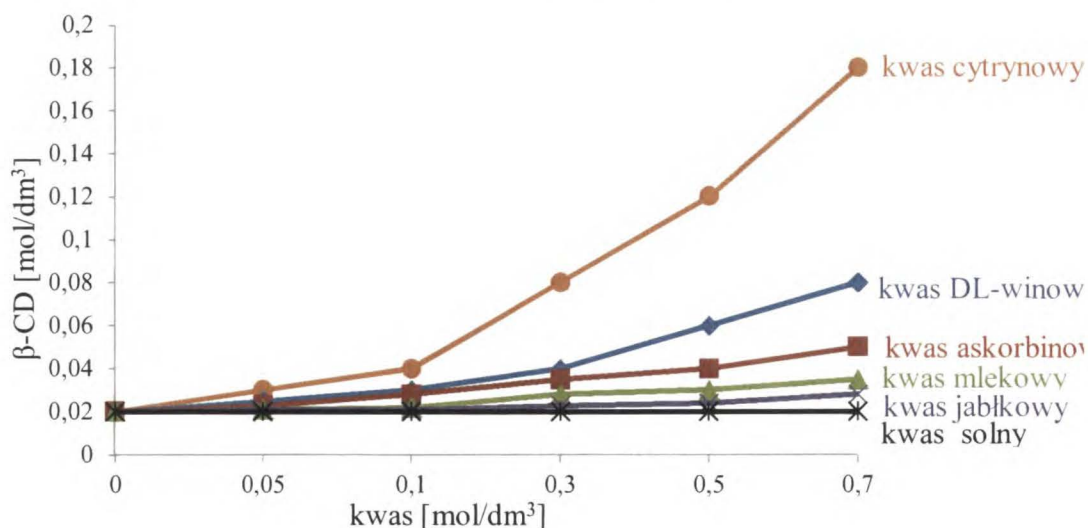
$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_R} + \frac{[CD]K_1}{k_R} + \frac{[CD]^2K_1 K_2}{k_R} \quad \text{Równ. 2.6}$$

gdzie K_2 oznacza stałą trwałości kompleksu o stechiometrii 1:2.

2.5 Rozpuszczalność

β -cyklodekstryna jest najtańszą i najłatwiej dostępną z cyklodekstryn. Jednak jej niska rozpuszczalność w wodzie jest czynnikiem ograniczającym jej zastosowanie. Mniejsza rozpuszczalność β -cyklodekstryny w wodzie w porównaniu z α -, γ -cyklodekstryną jest tłumaczona jej sztywną strukturą [78]. β -cyklodekstryna tworzy wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, które zmniejszają jej zdolność do tworzenia wiązań wodorowych z otaczającymi ją cząsteczkami wody.

Jednym ze sposobów zwiększenia rozpuszczalności β -CD w wodzie jest zastosowanie dodatku hydroksykwasów [79]. Hydroksykwasy, takie jak kwas cytrynowy, kwas winowy i kwas askorbinowy znacząco zwiększają rozpuszczalność β -CD w wodzie (Rys. 2.4). Na przykład, 11-krotne zwiększenie rozpuszczalności (tj. 200 mg / ml) β -CD może być otrzymane w roztworze kwasu cytrynowego o stężeniu 140 mg / ml. Dodatek kwasu winowego i askorbinowego może zwiększyć rozpuszczalność β -CD 4-5 krotnie. Natomiast kwas mlekowy i jabłkowy mają znacznie mniejszy wpływ na rozpuszczalność β -CD. Kwas octowy, kwas solny i potasowy nie wpływają na rozpuszczalność β -CD. Najprawdopodobniej, wzrost rozpuszczalności β -CD w roztworze hydroksykwasów polega na zdolności grup hydroksylowych kwasów do modyfikowania wewnętrznych i międzycząsteczkowych wiązań wodorowych β -cyklodekstryny [79].



Rys. 2.4 Zmiana rozpuszczalności β -cyklodekstryny w zależności od dodatku kwasu organicznego [79]

Inną metodą zwiększenia rozpuszczalności β -CD jest zastosowanie dodatku rozpuszczalnika organicznego. Rozpuszczalności β -cyklodekstryny w wodnych roztworach metanolu, etanolu, izopropanolu, tetrahydrofuranu, sulfonotlenku dimetylu i acetonitrylu przedstawiono w Tab. 2.3 [80].

Tab. 2.3 Rozpuszczalność (g / 100 mL) β -cyklodekstryny w roztworach wodnych w zależności od wzrostu stężenia rozpuszczalnika organicznego

% rozp. organ.	MeOH	EtOH	DMSO	CH ₃ CN	THF	2-PrOH
0	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60
10	1,00	1,82	2,00	3,11	2,10	3,41
20	0,71	2,01	2,10	3,70	2,20	7,00
30	0,50	2,10	2,20	2,60	1,88	6,90
40	0,40	1,80	2,70	1,80	1,30	3,60
50	0,34	1,30	6,30	0,88	0,90	2,32
60	0,26	0,80	16,0	0,30	0,50	1,10

Rozpuszczalność β -CD początkowo wzrasta wraz ze wzrostem dodatku rozpuszczalnika organicznego, a następnie maleje (z wyjątkiem DMSO i MeOH). Rozpuszczalność osiąga maksymalną wartość w 20% wodnych roztworach; acetonitrylu, tetrahydrofuranu i izopropanolu. Natomiast dla wodnego roztworu etanolu maksymalna wartość rozpuszczalności odpowiada 30% ułmkowi molowemu. Zwiększona rozpuszczalność β -cyklodekstryny może być związana z powstawianiem kompleksu inkluzyjnego.

Dla metanolu wraz ze wzrostem stężenia następuje obniżenie rozpuszczalności β -CD. Rozpuszczalność β -CD w roztworze wodnym DMSO, zawierającym mniej niż 30% molowych DMSO lekko wzrasta. Rozpuszczalność w obszarze powyżej 40% molowych DMSO szybko wzrasta.

W Tab. 2.4 przedstawiono rozpuszczalność natywnych cyklodekstryn w rozpuszczalnikach organicznych i ich roztworach wodnych. γ -CD w porównaniu z β -CD

ma bardziej elastyczną strukturę, co czyni ją podatną na rozpuszczanie w wodnych roztworach organicznych [81].

Tab. 2.4 Rozpuszczalność cyklodekstryn w rozpuszczalnikach organicznych w 25°C (g / 100 mL)

Rozp. organ.	α -	β -	γ -
Metanol 100%	n	n	>0,1
50% r. wodny	0,3	0,3	208
Etanol 100%	n	n	>0,1
50% r. wodny	>0,1	1,3	2,1
Izopropanol	n	n	>0,1
Tetrahydrofuran	n	n	n
Gliceryna	n	4,3	n

n-nierozpuszczalna

3 CHROMATOGRAFIA PAR JONOWYCH

3.1 Podstawy teoretyczne chromatografii

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) jest jedną z najczęściej stosowanych technik analitycznych. Proces chromatograficzny można zdefiniować, jako metodę rozdzielania składników w zależności od ich podziału między fazę ruchomą i stacjonarną. Fazą stacjonarną nazywamy ciecz lub złoże, które stanowi wypełnienie kolumny. Natomiast fazę ruchomą stanowi ciecz [82].

Chromatograficzny rozdział składników mieszaniny następuje w wyniku różnic w ich współczynnikach podziału (K) pomiędzy fazę ruchomą i fazę stacjonarną. Jeżeli C_s i C_m oznaczają stężenia eluowanego składnika odpowiednio w fazie stacjonarnej i ruchomej, to:

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{Równ. 3.1}$$

Zatem większa wartość K oznacza, że składniki oddziałujące silniej z fazą stacjonarną i później opuszczają kolumnę. Między liczbą cząstek znajdujących się w fazie stacjonarnej i ruchomej ustala się równowaga dynamiczna.

Proces chromatograficzny można opisać za pomocą parametrów retencji. Czas retencji jest często używanym parametrem do opisu zachowania analitu w układzie chromatograficznym i jest on łatwy do zmierzenia. Pomimo to, jest on najmniej uniwersalnym parametrem. Czas retencji analitu jest zależny od stabilności przepływu. Współczynnik retencji jest bardziej uniwersalnym parametrem, ponieważ w mniejszym stopniu zależy od parametrów instrumentalnych. Współczynnik retencji jest zdefiniowanym wyrażeniem:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0} \quad \text{Równ. 3.2}$$

gdzie czas retencji (t_R) oznacza całkowity czas przebywania substancji na fazie stacjonarnej, a czas zerowy (t_0) odpowiada czasowi przepływu fazy ruchomej, która nie oddziałuje z fazą stacjonarną. Różnica pomiędzy czasem retencji, a czasem zerowym nazywana jest zredukowanym czasem retencji (t'_R).

Dwie substancje będą odpowiednio rozdzielone tylko wtedy, gdy ich współczynniki retencji wystarczająco różnią się między sobą. Zdolność systemu chromatograficznego do rozdzielania dwóch analitów jest nazywana selektywnością (α) i jest zdefiniowana następująco:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Równ. 3.3}$$

Im większa jest wartość α , tym lepszy jest rozdział. Jednakże wzrostowi selektywności α , towarzyszy niekorzystne wydłużenie czasu analizy. W praktyce dąży się do współczynników selektywności $\alpha = 1,5$ [83].

Zdolność rozdzielcza danego systemu chromatograficznego zależy od wielu czynników. Istotnym parametrem jest sprawność kolumny chromatograficznej, której miarą jest liczba pólek teoretycznych (N). Wysokość półki teoretycznej można zdefiniować jako teoretyczną wysokość wypełnienia kolumny, w zakresie, której ustala się stan równowagi stężenia w fazie stacjonarnej i w fazie ruchomej. W praktyce, ze względu na określoną dynamikę rozdzielania, do stanu równowagi nie dochodzi. Dla pików o kształcie zbliżonym do krzywej Gaussa, liczbę pólki teoretycznych można obliczyć z równania:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad \text{Równ. 3.4}$$

gdzie $w_{0,5}$ oznacza szerokość pików w połowie jego wysokości.

Sprawność kolumny można zmieniać poprzez zmianę parametrów fizycznych [84] takich jak: długość kolumny, średnica i budowa ziaren stanowiących złożę kolumny lub prędkość przepływu fazy ruchomej. Im mniejszy rozmiar ziarna i bardziej równomierne ich upakowanie w kolumnie, tym wyższa jest sprawność. Im szybszy przepływ, tym mniej czasu mają cząsteczki analitu na dyfuzję w porach wypełnienia (nie występuje zjawisko rozmycia pasma). Jednocześnie szybszy przepływ, powoduje oddalanie cząsteczek analitu od stanu równowagi termodynamicznej z fazą stacjonarną.

Rozdzielczość (R_S) jest natomiast terminem używanym do opisanie stopnia oddzielenia dwóch sąsiadujących pików i jest definiowana wzorem:

$$R_S = \frac{2d}{w_1 + w_2} \quad \text{Równ. 3.5}$$

gdzie d oznacza odległość między maksimami obu pików, a w_1, w_2 szerokość dwóch pików przy podstawie. Dla rozdziału jakościowego R powinno wynosić 1, a dla oznaczeń ilościowych należy dążyć do rozdzielczości $R = 1,5$ [85].

Równanie Purnella opisuje związek między powyżej opisanymi parametrami i wskazuje jak można nimi manipulować w celu zwiększenia rozdzielczości między dwoma pikami.

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{1+k_2} \quad \text{Równ. 3.6}$$

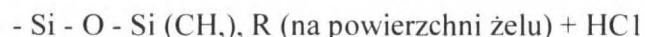
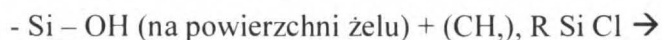
Najbardziej skutecznym sposobem na zwiększenie rozdzielczości jest poprawa selektywności lub sprawności kolumny. Efekt zwiększenia sprawności kolumny można osiągnąć m.in. przez zwiększenie jej długości. Jednakże musi być osiągnięty kompromis między rozdzielczością a czasem analizy.

3.1.1 Podział chromatografii

Klasyfikacji metod chromatograficznych można dokonać na podstawie fundamentalnych procesów zachodzących podczas elucji [86]:

1. Chromatografia adsorpcyjna

Podstawowym zjawiskiem decydującym o rozdzielaniu jest adsorpcja na powierzchni fazy stacjonarnej. W układzie faz normalnych (NP.) fazą stacjonarną jest zwykle żel krzemionkowy i jest on znacznie bardziej polarny niż faza ruchoma (heksan, heptan, izopropanol). W chromatografii faz odwróconych (RP) warunki są dokładnie przeciwne. Faza stacjonarna jest mniej polarna, niż faza ruchoma. Fazy stacjonarne stosowane w układzie faz odwróconych otrzymuje się najczęściej w wyniku reakcji powierzchniowych grup hydroksylowych żelu krzemionkowego z odpowiednimi silanami. Reakcję z monochlorosilanem można przedstawić w uproszczeniu za pomocą równania:



R jest łańcuchem węglowodorowym (C_{18} , C_8 , C_4 , itp.), albo inną grupą funkcyjną (fenylową, nitrylową itp.). Jest to przykład fazy monomerycznej, w której z jednym atomem krzemu związana jest jedna cząsteczka silanu. W przypadku zastosowania silanu z

trzema grupami aktywnymi, np. trichlorosilanu, można otrzymać fazy monomeryczne lub spolimeryzowane, usieciowane przestrzennie poprzez wiązania siloksanowe. Hydrofobowość powierzchni zależy od właściwości silanu oraz od stopnia pokrycia fazą stacjonarną. Fazę ruchomą w chromatografii faz odwróconych najczęściej stanowi mieszanina rozpuszczalników organicznych, takich jak: acetonitryl, metanol, etanol izopropanol, tetrahydrofuran lub aceton z wodą.

2. Chromatografia wykluczania (żelowa)

Składniki mieszaniny rozdzielane są według wielkości lub masy cząsteczkowej. Faza stacjonarna składa się z porowatego usieciowanego żelu polimerowego. Mniejsze cząstki są w stanie przenikać do porów i są zatrzymywane. Wraz ze wzrostem rozmiarów cząsteczki maleją jej oddziaływania z porami. Składniki mieszaniny są eluowane według malejącej masy cząsteczkowej lub rozmiarów. Chromatografia wykluczenia jest szeroko stosowana w celu usunięcia małych cząsteczek i soli nieorganicznych z cennych produktów o wyższej masie cząsteczkowej, takich jak peptydy, białka i enzymy.

3. Chromatografia jonowymienna

W tego rodzaju chromatografii są stosowane fazy stacjonarne, na których powierzchni są mocowane wiązaniami kowalencyjnymi grupy jonowe. Najczęściej w chromatografii kationów są to grupy kwasu sulfonowego, a w chromatografii anionowej są to czwartorzędowe grupy amonowe. Rozpuszczone w fazie ruchomej jony o przeciwnym ładunku są przyciągane do fazy stacjonarnej siłami elektrostatycznymi. Proces wymiany jonowej prowadzi do stanu równowagi. Strona, po której znajduje się równowaga zależy od powinowactwa jonów uczestniczących w wymianie do grup funkcyjnych fazy stacjonarnej [76]. Chromatografia jonowymienna znalazła powszechne zastosowanie w procesach przemysłowych. Technika ta jest stosowana przy rozdzielaniu metali przejściowych, usuwaniu metali śladowych ze ścieków przemysłowych i oczyszczaniu wielu organicznych związków i leków. Chromatografia jonowymienna jest powszechnie stosowana w dużej skali, lecz jest ograniczona do cząsteczek jonowych rozpuszczalnych w wodzie.

4. Chromatografia podziałowa

W chromatografii podziałowej fazą stacjonarną jest ciecz, która nie miesza się z fazą ruchomą. Rozdział opiera się na różnicy rozpuszczalności analitów w dwóch fazach.

W idealnym przypadku obowiązuje prawo podziału Nernsta [87]. Zgodnie z tym prawem, stosunek stężeń w obu fazach w stanie równowagi jest wielkością stałą i charakterystyczną w danych warunkach dla danej substancji.

5. Chromatografia powinowactwa

Chromatografia powinowactwa umożliwia rozdzielenie mieszanin substancji wykorzystując siły selektywne lub oddziaływania specyficzne [88] oddziaływanie substancji rozpuszczonej w fazie ruchomej z unieruchomionym ligandem może mieć różny charakter, mogą to być oddziaływania pomiędzy:

- hormonem i receptorem,
- enzymem i koenzymem,
- enzymem i inhibitorem,
- przeciwciałem i antygenem,
- kwasami nukleinowymi i białkami,
- lektynami i glikoproteinami,
- dopełniaczem i przeciwciałami.

Najczęściej chromatografia powinowactwa jest przeprowadzana w dwóch etapach.

W pierwszym etapie kolumna jest przemywana roztworem zawierający molekuly komplementarne do liganda. Przemieszczające się w obrębie złoża molekuly są wiązane przez unieruchomiony ligand. W drugim etapie zachodzi dysocjacja powstałych kompleksów i elucja molekuł. Dysocjacji kompleksów można dokonać stosując specyficzny eluent, zawierający kompetytor współzawodniczący o miejsca wiążące z ligandem.

6. Chromatografia par jonowych jest opisana szczegółowo w następnym rozdziale.

3.2 Podstawy chromatografii par jonowych

Odkryta przez dr Gordona Schilla w 1973, chromatografia par jonowych (CPI) bazuje na dodaniu przeciwjonu do fazy ruchomej w celu promowania tworzenia par jonowych z naładowanymi analitami [88]. Odczynniki par jonowych są zwykle związkami jonowymi, zawierającymi łańcuch alkilowy, który nadaje im charakter hydrofobowy.

Zatem odczynniki par jonowych zaadoptowane do układu faz odwróconych chromatografii cieczowej przyczyniają się do selektywnego zwiększania retencji naładowanych analitów.

Chromatografia par jonowych znalazła szerokie zastosowanie przy analizie leków ze względu na ich naturę jonową. Biorąc pod uwagę fakt, że wiele leków występuje w postaci kationowej, głównym typem odczynników stosowanym do ich analizy w CPI są anionowe sulfoniany alkilowe.

3.2.1 Oddziaływania jon-jon w środowisku rozpuszczalnika

Teoria Debye-Hückel'a [89] uwzględnia wkład jonowych oddziaływań elektrostatycznych do wolnej energii rozpuszczalnika i zapewnia rozwiązanie wyrażenia określającego współczynnik aktywności. Podstawowa koncepcja teorii D-H dotyczy oddziaływań kulombowskich o szerokim zasięgu pomiędzy dwoma jonami znajdującymi się w roztworze rozpuszczalnika. Głównymi założeniami modelu D-H są:

- Jony są uważane za sztywne punkty obdarzone ładunkiem elektrycznym w dielektryku w ośrodku ciągłym.
- Obecność substancji rozpuszczonych nie wpływa na stałą dielektryczną rozpuszczalnika.
- Siły inne niż siły kulombowskie nie są brane pod uwagę.
- Każdy jon jest otoczony przeciwnie naładowanymi jonami i cząsteczkami rozpuszczalnika, które tworzą atmosferę wokół jonu centralnego.
- Liniowe przybliżenie rozkładu Boltzmanna pozwala obliczyć czas średniego zagęszczenia przestrzeni wokół jonu centralnego jonami o przeciwnym ładunku i zakłada, że jest to prawdziwe tylko dla bardzo małych stężeń jonowych.
- Przy danym stężeniu, przybliżenie rozkładu Boltzmanna daje wiarygodniejsze wyniki w wyższych temperaturach i przy niezmienniej wartości stałej dielektrycznej.

Taki model umożliwia w przypadku bardzo małych stężeń obliczenie średniego współczynnika aktywności.

$$\log \gamma_{\pm} = -|z_+ z_-| A I^{1/2}$$

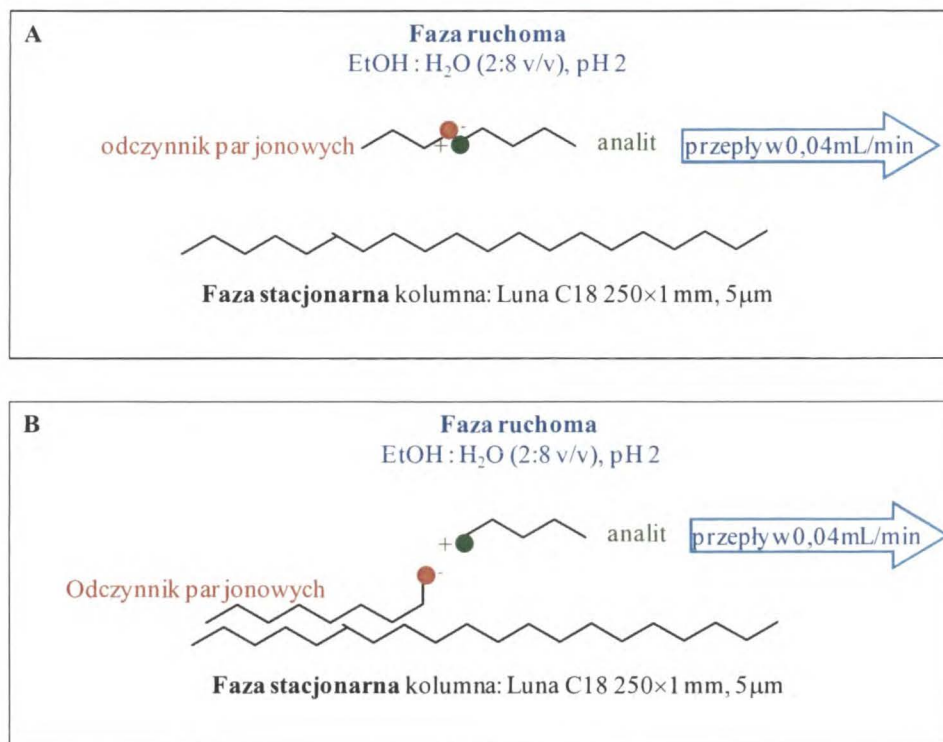
Równ. 3.7

W wyrażeniu tym z_+z_- jest ładunkiem jonu (dodatni dla kationów, ujemny dla anionów), A stałą zależną od temperatury roztworu i stałej dielektrycznej roztworu, natomiast I siłą jonową.

3.2.2 Mechanizm retencji

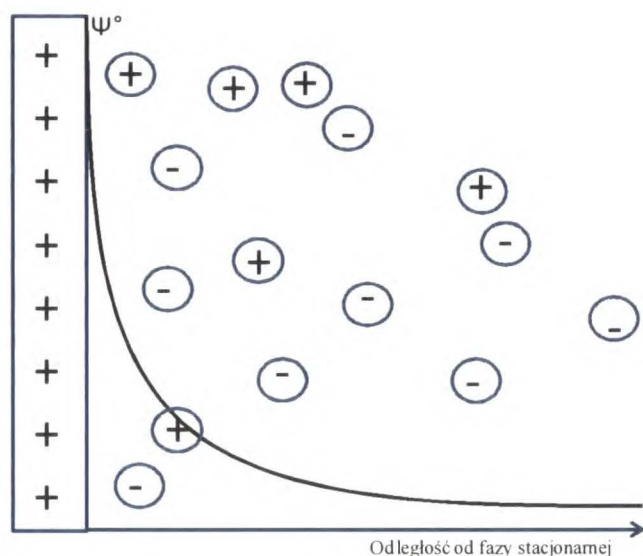
W chromatografii par jonowych są proponowane dwie fundamentalne teorie opisujące mechanizm retencji: stechiometryczna i niestechiometryczna [87]. Według pierwszej z nich jony substancji rozpuszczonej oddziałują z jonami stanowiącymi składnik eluentu tworząc pary jonowe pozbawione ładunku elektrycznego, które mogą być wiązane z fazą stacjonarną poprzez oddziaływania hydrofobowe (Rys.3.1 A). Rozdział jest możliwy ze względu na różnice w adsorpcji par jonowych na powierzchni fazy stacjonarnej.

Według alternatywnego modelu niestechiometrycznego lipofilowe jony eluentu są adsorbowane na powierzchni fazy stacjonarnej i powstaje dynamicznie generowana, naładowana powierzchnia, z którą oddziałują jony substancji rozpuszczonej (Rys. 3.1 B). Można spekulować, że oba mechanizmy koegzystują ze sobą w proporcjach zależnych od warunków procesu chromatograficznego i właściwości jonów stanowiących składnik eluentu.



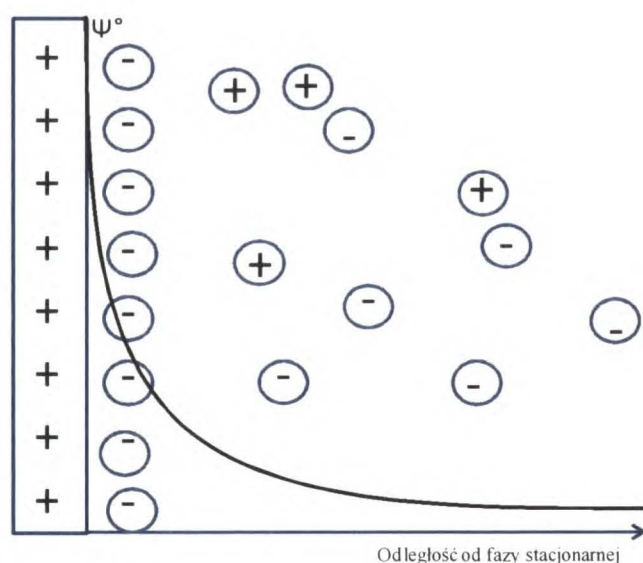
Rys. 3.1 Mechanizmy w chromatografii par jonowych

Ponadto istnieje termodynamiczny opis tego zjawiska tzw. teoria niestechiometryczna. Według teorii Gouy-Chapmana (G-C) następuje adsorpcja jonów eluentu na fazie stacjonarnej, która powoduje nagromadzenie się ładunku jednego znaku w sąsiedztwie granicy faz, dla zachowania elektroobojętności układu jako całości. W rezultacie następuje wytworzenie rozmytego ładunku przeciwnego znaku we wnętrzu fazy ruchomej, analogia do struktury atmosfery jonowej w teorii oddziaływań między jonowych Debye'a i Hückla. W opisanym powyżej przypadku powstaje na granicy faz ciało stałe – roztwór tzw. elektryczna warstwa podwójna (Rys. 3.2).



Rys. 3.2 Schemat podwójnej warstwy elektrycznej według modelu Gouy-Champana

Model budowy warstwy podwójnej rozwinął Stern (Rys. 3.3). Uwzględnił on adsorpcję jonów na granicy faz, otrzymując warstwę ściśle przylegającą do powierzchni fazy stacjonarnej. W warstwie tej, zwanej warstwą Helmholza – Sterna, występuje liniowy spadek potencjału, natomiast w warstwie rozmytej spadek ten jest wolniejszy. Potencjał panujący tuż przy powierzchni fazy stacjonarnej jest nazywany elektrostatycznym powierzchniowym potencjałem Ψ^0 .



Rys. 3.3 Schemat podwójnej warstwy elektrycznej według modelu Gouy-Champana-Sterna

W ciągu ostatnich kilku lat opisano różne wersje modelu warstwy podwójnej w celu wyjaśnienia mechanizmu retencji w chromatografii par jonowych [87]. Najbardziej uniwersalny opis mechanizmu uwzględniający powstawanie elektrostatycznej warstwy podwójnej został zaproponowany przez I. Stahlberga i współpracowników [90]. Uznali, że procesy związane z chromatografią par jonowych są oparte wyłącznie na tworzeniu podwójnej warstwy elektrycznej i pominieli proces powstawania par jonowych w eluencie. W elektrostatycznym modelu Stahlberga, podstawą opisu warstwy podwójnej jest teoria Gouy-Chapmana i założenie, że retencja analitu jest regulowana przez energię swobodną adsorpcji $\Delta G_{t, E}^{\circ}$, która składa się z dwóch części. Część chemiczna $\Delta G_{c, E}^{\circ}$ odpowiada swobodnej energii adsorpcji analitu przy absencji odczynników par jonowych (OPI) i pozostaje stała w obecności OPI. Drugi składnik $\Delta G_{el, E}^{\circ}$ oznacza elektrostatyczną pracę związaną z przeniesieniem naładowanego analitu z głębi eluentu do powierzchni fazy stacjonarnej. $\Delta G_{el, E}^{\circ}$ zależy od elektrostatycznego potencjału powierzchni fazy stacjonarnej, według następującego równania:

$$\Delta G_{el, E}^{\circ} = z_E F \Psi^{\circ} \quad \text{Równ. 3.8}$$

gdzie z_E stanowi ładunek elektryczny analitu, zaś F oznacza stałą Faradaya. Następnie otrzymano równanie:

$$\Delta G_{t, E}^{\circ} = \Delta G_{c, E}^{\circ} + z_E F \Psi^{\circ} \quad \text{Równ. 3.9}$$

Współczynnik retencji analitu w warunkach tworzenia par jonowych jest związany z energią swobodną adsorpcji następującym równaniem:

$$k = \varphi \exp\left(-\frac{z_E F \Psi^{\circ} + \Delta G_{c, E}^{\circ}}{RT}\right) = k_0 \exp\left(-\frac{z_E F \Psi^{\circ}}{RT}\right) \quad \text{Równ. 3.10}$$

w którym φ oznacza stosunek powierzchni fazy stacjonarnej do objętości fazy ruchomej, R stałą gazową, T temperaturę bezwzględną, a k_0 to współczynnik retencji, przy absencji odczynników par jonowych. Powierzchniowy potencjał w uproszczonej formie można przedstawić jako:

$$\Psi^{\circ} = \frac{\sigma}{k \epsilon_0 \epsilon_r} \quad \text{Równ. 3.11}$$

gdzie σ jest to gęstość powierzchniowa, ϵ_0 przenikalność elektryczna próżni, ϵ_r stała dielektryczna fazy ruchomej, k długość Debye'a.

Najbardziej istotny wpływ na retencje i rozdzielczość analitów w chromatografii par jonowych mają następujące parametry: hydrofobowość i stężenie odczynników par jonowych, stężenie i rodzaj organicznego modyfikatora fazy ruchomej, temperatura, pH. Wszystkie te parametry są zawarte w Równ. 3.10 za pośrednictwem potencjału powierzchniowego i energii swobodnej adsorpcji. Zwiększenie hydrofobowości i stężenia odczynników par jonowych prowadzi do wzrostu ich adsorpcji na powierzchni fazy stacjonarnej, a tym samym wzrostu potencjału powierzchniowego, co z kolei jest przyczyną dłuższego czasu elucji analitów. Natomiast rodzaj i stężenie modyfikatora organicznego wywiera wpływ na wartość stałej dielektrycznej fazy ruchomej. Im wyższa hydrofobowość i stężenie modyfikatora organicznego tym niższa wartość stałej dielektrycznej fazy ruchomej i mniejsze prawdopodobieństwo adsorpcji odczynników par jonowych na powierzchni fazy stacjonarnej. Ważną rolę odgrywa również pH fazy ruchomej. Oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy analitami i odczynnikami par jonowych o podobnym ładunku elektrycznym nie występują. Zatem chcąc zwiększyć retencję, należy wybrać taką wartość pH eluentu, aby wzmocnić stopień dysocjacji analitu.

3.2.3 Odczynniki par jonowych

OPI powinny mieć przeciwny ładunek do analitu. Zazwyczaj mają hydrofobowy człon wykazujący powinowactwo do fazy stacjonarnej, jak i naładowany człon oddziałujący z analitem. Długość łańcucha (hydrofobowość) OPI znacząco wpływa na zwiększenie retencji analitów. Przy stałym składzie eluentu, $\log k$ analitu przeciwnie naładowanego względem OPI rośnie liniowo z liczbą atomów węgla w łańcuchu alkilosulfonianu [91, 92]. Im krótszy łańcuch OPI, tym niższa jego adsorpcja na fazie stacjonarnej.

Powszechne zastosowanie chromatografii par jonowych doprowadziło do dynamicznego rozwoju nowych klas OPI. Rys. 3.4 przedstawia zakres stosowania tradycyjnych i innowacyjnych OPI.



Rys. 3.4 Zakres stosowania tradycyjnych i innowacyjnych odczynników par jonowych [87].

Istotną rolę w analizie analitów zasadowych pełnią klasyczne sulfonowe jony organiczne, a w analizie kwasowych analitów są zazwyczaj stosowane tetraalkiloamonowe jony organiczne.

W niektórych przypadkach właściwe jest stosowanie innowacyjnych OPI. Jednym z przykładów jest technika LC-MS. Tradycyjne nielotne OPI nie są kompatybilne z techniką MS, ponieważ są źródłem zanieczyszczeń powodujących osłabienie sygnału detektora. Ostateczna liczba naładowanych jonów, które docierają do detektora jest obniżona przez jon parujący dodany do fazy ruchomej. Z tego powodu małe organiczne kwasy (np. kwas mrówkowy i octowy) znalazły zastosowanie, jako lotne OPI w technice LC-MS.

Natomiast czynniki chaotropowe, takie jak mocznik, chlorowodorek guanidyny, jak również nieorganiczne jony zgrupowane w szeregu Hofmeistera, są efektywnie stosowane, jako OPI w separacji białek [93, 94]. Również zastosowanie kwasu perfluorooktanowego, jako OPI [95, 96] do rozdzielania białek okazało się metodą skuteczną.

Ponadto należy wspomnieć o nietypowej metodzie polegającej na jednoczesnym zastosowaniu anionowych i kationowych OPI, która znalazła zastosowanie do osiągnięcia lepszej rozdzielczości i skrócenia czasu analizy [97, 98].

CEL PRACY

Jednym z najtrudniejszych i najistotniejszych zadań przemysłu farmaceutycznego jest produkcja substancji enancjomerycznie czystych. Enancjomery tego samego związku farmakologicznie czynnego mogą różnić się między sobą pod względem właściwości farmakokinetycznych, farmakodynamicznych, skuteczności bądź też profilu działań niepożądanych. Stosowanie leku w postaci pojedynczego enancjomeru umożliwia zmniejszenie dawki, zwiększenie efektu terapeutycznego, zmniejszenie toksyczności. Wzrost zapotrzebowania na preparaty farmaceutyczne w postaci pojedynczych enancjomerów wpływa na rozwój metod otrzymywania związków homochiralnych. Z tego powodu opracowano wiele procedur skierowanych na tematykę rozpoznania chiralnego. W tym kontekście zagadnieniem ogromnej wagi jest szybka i skuteczna analityka substancji chiralnych. Chromatografia niesie ze sobą wielki potencjał. Z jednej strony pozwala na powiększenie skali procesów rozdzielania do skali preparatywnej lub nawet przemysłowej, zaś z drugiej strony jest wybitnie praktyczną metodą oznaczania składu i stopnia czystości badanych preparatów. Wiele substancji chiralnych może ulegać czasowej degradacji, w tym zmianom strukturalnym, i zmieniać swoje właściwości farmakologiczne. Wymaga to systematycznej kontroli analitycznej, do czego opracowywane metody wnoszą istotny wkład.

Celem pracy było wykorzystanie procesu tworzenia potrójnego kompleksu inkluzyjnego w układach chromatograficznych do optymalizacji efektywnych procesów rozdzielania związków farmakologicznie czynnych.

Zbadano wpływ dodatkowych substancji na efektywność rozdziału chiralnego opartego o oligosacharydy makrocycliczne. Dodatkowe substancje takie jak: hydroksykwasy, odczynniki par jonowych mają ogromne znaczenie w procesie powstawania kompleksu trójskładnikowego, gdyż pełnią rolę „regulatora przestrzennego”. Przeprowadzono interpretację mechanizmów rozdziału chiralnego, a także zbadano właściwości fizykochemiczne powstających kompleksów (wyznaczanie stałych trwałości, stechiometrii, funkcji termodynamicznych). Z powyższych względów podjęte w tej pracy badania mogą znaleźć praktyczne wykorzystanie zarówno w skali analitycznej jak też preparatywnej.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

WPROWADZENIE

Część doświadczalna składa się z pięciu rozdziałów:

- ✓ Rozdział 4 zawiera opis wykorzystanej aparatury, kolumn, faz ruchomych, odczynników i badanych związków.
- ✓ W rozdziale 5 zaprojektowano nowatorską metodę rozdzielania enancjomerów w układzie modyfikowanym β -cyklodekstryną z dodatkiem hydroksykwasów w celu zwiększenia enancjoselektywności układu. Badano wpływ rodzaju hydroksykwasów na trwałość kompleksów związków modelowych z cyklodekstryną.
- ✓ W rozdziale 6 przedstawiono połączenie dwóch selektorów (β -CD z OPI) w celu sprawdzenia ich efektywności w rozdzielaniu enancjomerów. Badano wpływ temperatury, stężenia i rodzaju OPI na efektywność rozróżnienia chiralnego układu. Dodatkowo wyznaczono stałe trwałości kompleksów potrójnych.
- ✓ W rozdziale 7 zbadano wpływ rodzaju odczynników par jonowych na proces powstawania kompleksu potrójnego analit- γ -CD-OPI i na zdolność rozpoznania chiralnego układu.
- ✓ W rozdziale 8 przedstawiono optymalizację metody dwufazowej ekstrakcji do rozdzielania enancjomerów cyklopentolatu.
- ✓ Rozdział 9 zawiera podsumowanie otrzymanych wyników i wnioski końcowe.

4 CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

4.1 Aparatura

Badania zostały wykonane na dwóch układach: chromatografie cieczowym firmy Waters (Wiedeń, Austria), składającego się z dwóch pomp Model 515, detektora UV-vis Model 248, autosamplera Model 717 plus, termostat firmy WO Industrial Electronics (Langenzersdorf, Austria) Typ Jetstream 2 oraz chromatografie cieczowym Acquity UPLC firmy Waters (Wiedeń, Austria) złożonego z detektorów PDA i RI 2414, autosamplera Model 996. W badaniach był wykorzystany.

4.2 Kolumny

Stosowano następujące kolumny:

1. Mikrokolumny firmy Phenomenex (Torrance, CA, USA) o wymiarach 250 x 1 mm oraz 150 x 1 mm z wypełnieniem C18(2) o średnicy ziarna 5 μm .
2. Kolumna polisacharydowa Chiralpak AD firmy daicel (Chiral Technologies Europe, Cedex, Francja) o wymiarach 25 cm x 0,46 cm.

Przepływ fazy ruchomej wynosił 0,04 mL / min na mikrokolumnach oraz 1 mL / min na kolumnie Chiralcel AD. Kolumny były kondycjonowane w zależności od rodzaju fazy ruchomej od godziny do kilkunastu godzin. Chromatogramy rejestrowano przy dwóch długościach fali 220 nm i 254 nm w temperaturze 20°C.

4.3 Odczynniki

β i γ cyklodekstryny pochodziły z firmy Wacker Chemie AG (Burghausen, Niemcy). Hydroksy-propylo- β -cyklodekstryna, trimetylo- β -cyklodekstryna, kwas

cytrynowy, L-, D- i DL- kwasy winowe uzyskano z firmy Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

W badaniach, jako eluenty stosowano wodne roztwory etanolu cz.d.a. (EtOH) i metanolu cz.d.a. (MeOH) z firmy Chempur (Piekary Śląskie, Polska). Jako bufor stosowano 10 mM roztwór dihydrofosforanu sodu (NaH_2PO_4) doprowadzony do pH 2,5 za pomocą kwasu ortofosforowego. Odczynniki NaH_2PO_4 i H_3PO_4 nabyto w firmie Fluka (Buchs, Szwajcaria). Odczynniki par jonowych (1-dodekanosulfonian sodu C12, 1-oktylosulfonian sodu C8, 1- butylosulfonian sodu C4) dostarczyła firma TCI Europe (Zwijndrecht, Belgia).

W ekstrakcji fazę organiczną stanowiły rozpuszczalniki: n-dekanol, n-oktanol, n-heptanol, n-heksanol, 1,2-dichloroetan z firmy Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

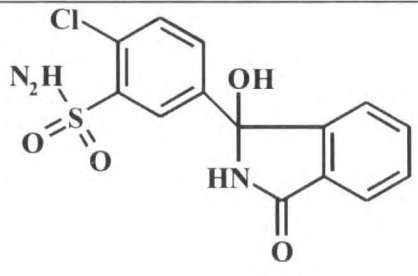
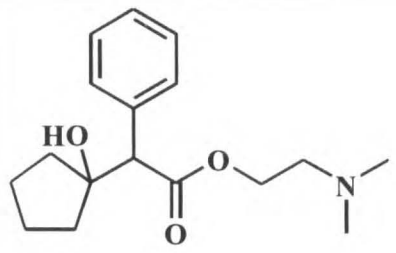
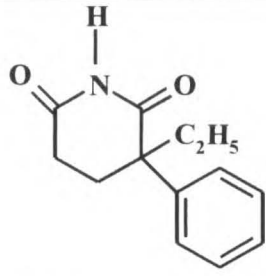
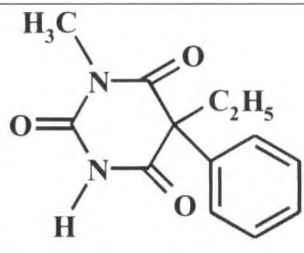
Jako dodatek chiralny do fazy organicznej stosowano pochodne kwasu winowego: ester ditertbutylowy L-kwasu winowego, ester di butylowy L- i D- kwasów winowych z firmy TCI Europe (Zwijndrecht, Belgia) oraz ester ditertbutylowy D-kwasu winowego z firmy Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

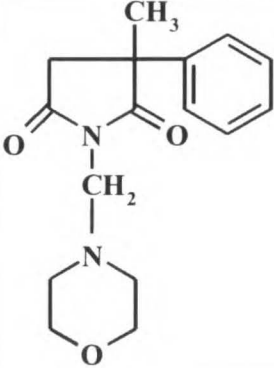
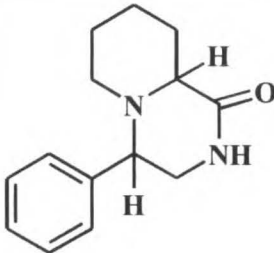
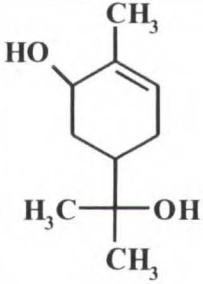
4.4 Substancje badane

Badane związki: chlortalidon, cyklopentolat, glimid, sobrerol, morfolep, metylofenobarbital dostarczyła firma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), 2,6-DKP zostały zsyntezowane w Zakładzie Technologii Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Warszawie przez dr Macieja Dawidowskiego. Tabela 4.1 przedstawia nazwy związków, ich wzory strukturalne oraz zastosowanie.

Cechą wspólną większości badanych związków jest to, że posiadają one pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowy atom azotu aminowego oraz pierścień fenylowy.

Tab. 4.1 Struktura i zastosowanie badanych związków

Nazwa związku	Wzór	Właściwości farmakologiczne
Chlortalidon		moczopędne
Cyklopentolat		rozszerzający źrenice
Glimid		nasenne i uspokajające
Metylofenobarbital		nasenne uspokajające i przeciwdrgawkowe

Morfolep		uspokajające i przeciwdrgawkowe
Pochodna 2,6-diketopiperazyny (2,6-DKP)		przeciwdrgawkowe
Sobrerol		ułatwiający oddychanie

Próbki badanych związków były rozpuszczone w wodnym etanolu (20% v/v etanolu w wodzie) o stężeniu ok. 1 mg/ml.

4.5 Skład fazy ruchomej

Do rozdzielania enancjomerów używano następujących eluentów:

1. Wodne roztwory etanolu (20% v/v etanolu w wodzie) z dodatkiem β -cyklodekstryny o stężeniu od 0 do 40 mM, 0,5 M hydroksykwasów (kwas

cytrynowy, L-, D- i DL-kwasu winowego) i 10 mM NaH_2PO_4 . Całość doprowadzano do pH 2,5 za pomocą H_3PO_4 .

2. Wodne roztwory etanolu (20% v/v etanolu w wodzie) z dodatkiem β -cyklodekstryny o stężeniu od 0 do 20 mM, 10 mM NaH_2PO_4 , odczynników par jonowych (C4, C8, C12), których stężenie mieściło się w zakresie od 1 mM do 10 mM. Całość doprowadzano do pH 2,5 za pomocą H_3PO_4 .
3. Wodne roztwory metanolu (20% v/v metanolu w wodzie) z dodatkiem γ -cyklodekstryny o stężeniu od 0 do 40 mM, 10 mM NaH_2PO_4 , odczynników par jonowych (C4, C8, C12), których stężenie mieściło się w zakresie od 1 mM do 10 mM. Całość doprowadzano do pH 2,5 za pomocą H_3PO_4 .

Do oznaczania enancjomerów cyklopentolatu po ekstrakcji zostały użyte następujące eluenty:

1. Wodny roztwór etanolu (20% v/v etanolu w wodzie) z dodatkiem 20mM β -cyklodekstryny, 1 mM sodu 1-oktylosulfonianu, 10 mM NaH_2PO_4 . Całość doprowadzano do pH 2,5 za pomocą H_3PO_4 .

Eluenty przygotowano bezpośrednio przed rozpoczęciem analizy i przesączono przez sączek Nylon 66 Membranes 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Niemcy).

4.6 Badania NMR

Widma NMR zostały zmierzone w Laboratorium Specjalistycznym Magnetycznego Rezonansu Jądrowego w Zakładzie Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych Instytutu Chemii Fizycznej PAN przez dr Mariusza Pietrzaka.

Widma ^1H NMR zostały wykonane na aparacie Bruker Avance II 300 MHz w roztworach D_2O . Jako wzorzec wewnętrzny przesunięcia chemicznego przyjęto sygnał soli sodowej kwasu 2,2-dimetylo-2-silapentano-5-sulfonowego (DSS) przy 0,015 ppm względem TMS.

4.7 Ekstrakcja

Faza wodna zawierała 0,05 mM/L cyklopentolatu, β -CD lub jej pochodne (HP- β -CD, DM- β -CD lub TM- β -CD) i 0,10 mM/L buforu $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$. Pochodne kwasu winowego (ester ditertbutylowy L- i D- kwasów winowych, ester di butylowy L- i D- kwasów winowych) były rozpuszczane w fazie organicznej. 5 ml fazy organicznej i 5 ml fazy wodnej umieszczano w 25 ml rozdzielaczu i wstrząsano (10 h) w stałej temperaturze (20 ° C), w celu osiągnięcia stanu równowagi termodynamicznej. Po rozdzieleniu faz, stężenie enancjomerów cyklopentolatu w fazie wodnej oznaczano metodą HPLC.

4.8 Określanie konfiguracji absolutnej enancjomerów cyklopentolatu

Określanie konfiguracji absolutnej enancjomerów cyklopentolatu zostało wykonane w Pracowni Spektroskopii Optycznej Instytutu Chemii Organicznej PAN przez mgr Marcina Góreckiego.

Badania przeprowadzono stosując chromatograf ciekowy Jasco wyposażony w dwie pompy PU-2089 Plus, reodynę z pętlą 20 μl i detektor diodowy UV-VIS MD-2010. Pomiar aktywności optycznej został przeprowadzony za pomocą detektorów chiralnych: ECD Jasco J-715 (elektronowy detektor dichroizmu kołowego) i Jasco OR-2090 (detektor rotacji optycznej). Chromatogram ECD otrzymano przy stałej długości fali (220 nm). Chromatogram OR otrzymano przy użyciu detektora Jasco OR-2090 wyposażonego w lampę pracującą Xe Hg 150W w zakresie światła białego (900 ~ 350 nm). Sygnał był przetwarzany przez oprogramowanie ChromNAV Jasco.

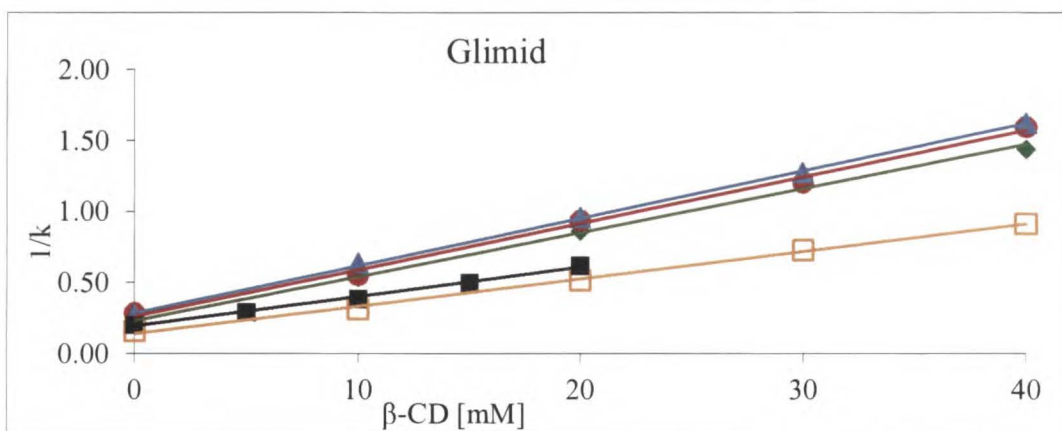
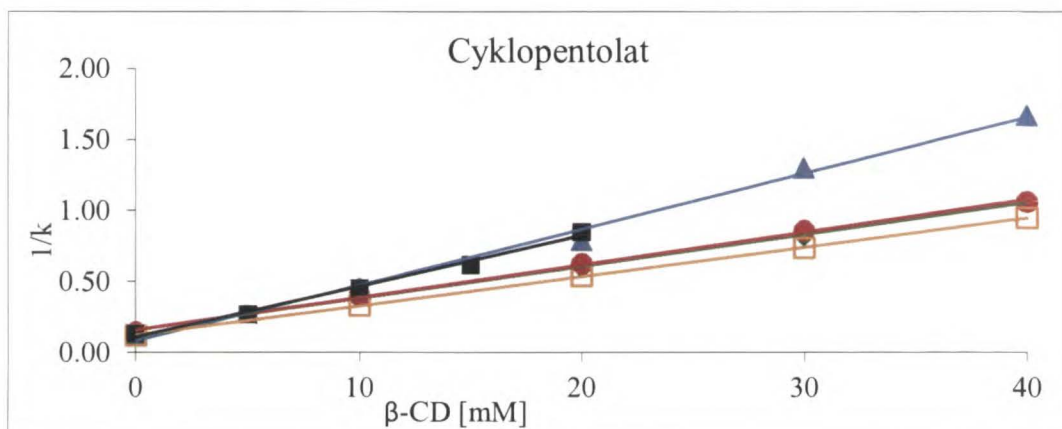
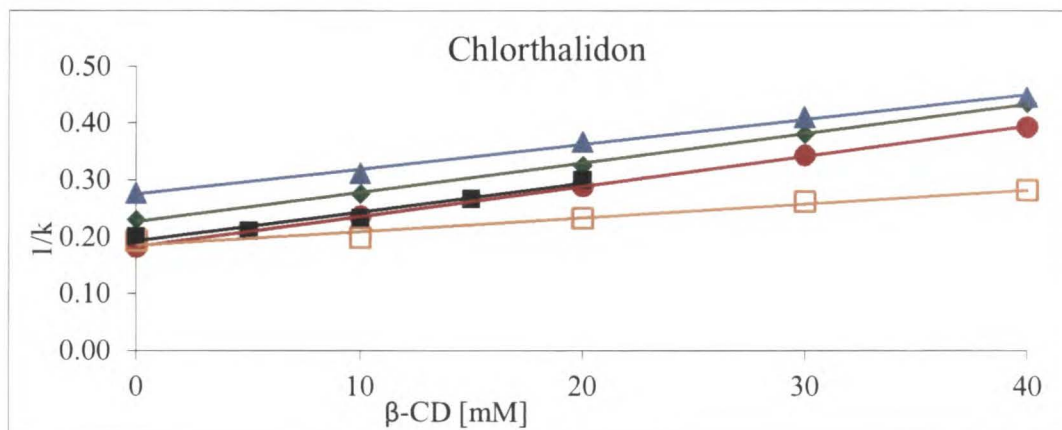
Enancjomery cyklopentolatu rozdzielono na kolumnie CHIRALPAK AD (250 mm, 4,6 mm, 5 μm). Użyto fazę ruchomą o składzie n-heksan / izopropanol (90 / 10 v / v) Przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min. Temperatura termostatowania kolumny wynosiła 20°C.

5 ROZDZIELANIE ENANCJOMERÓW W UKŁADZIE β -CYKLODEKSTRYNA ORAZ HYDROKSYKWASY JAKO SKŁADNIKI FAZY RUCHOMEJ W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

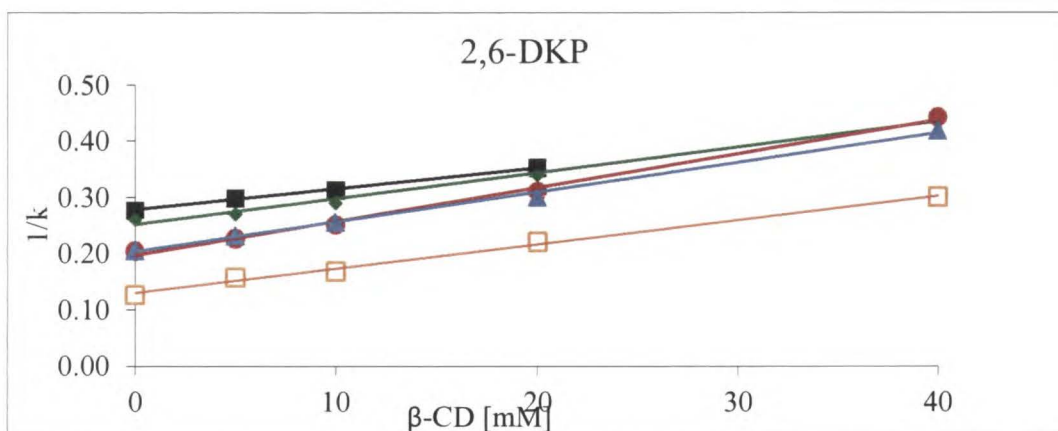
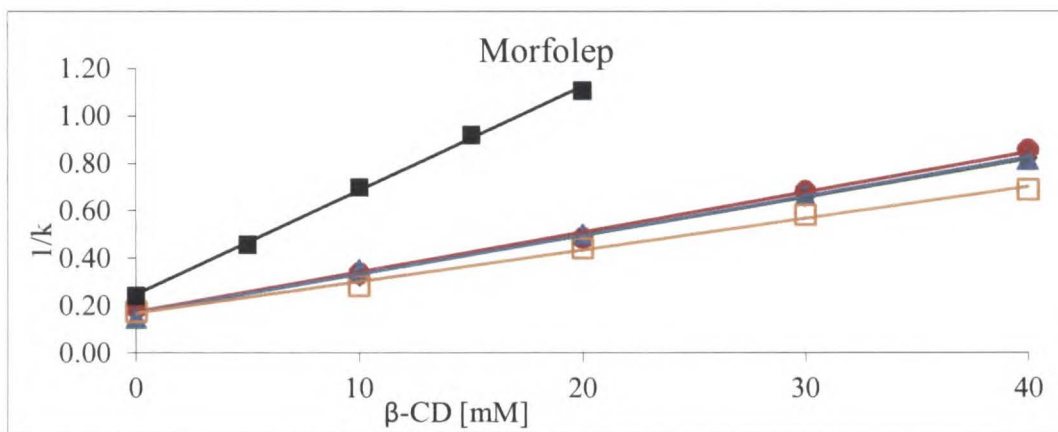
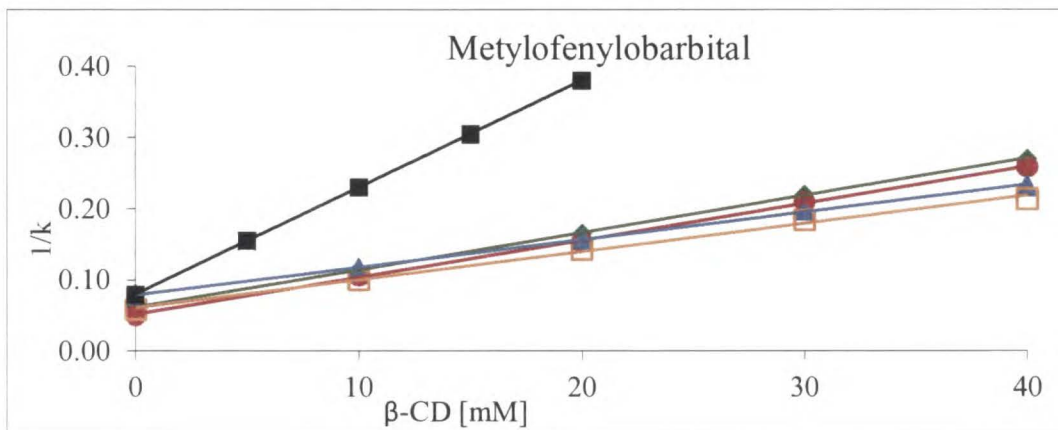
β -CD jest najczęściej używaną wśród cyklodekstryn, ze względu na jej niski koszt. Jej podstawową wadą jest niska rozpuszczalność w wodzie, w porównaniu do α -CD i γ -CD. Jednakże, dodatek hydroksykwasów może znacznie poprawić rozpuszczalność β -CD. Stwierdzono, że jedynie kwas cytrynowy i winowy ma istotny wpływ na rozpuszczalność β -CD [79]. Istotne było zbadanie jak dodatek hydroksykwasów wpływa na jej właściwości enancjoselektywne.

5.1 Wpływ stężenia β -cyklodekstryny w obecności hydroksykwasów na retencję

W pierwszym etapie pracy był badany wpływ stężenia β -CD i rodzaju hydroksykwasów na retencję związków modelowych. Wpływ stężenia β -CD na retencję badano przy stałym stężeniu 0,5 M hydroksykwasów (kwas cytrynowy oraz kwasy D-, L- lub DL-winowy) w pH 2,5. Hydroksykwasy użyto w celu zwiększenia stężenia β -CD z 20mM do 40 mM w fazie ruchomej. Stężenie β -CD było zmieniane w zakresie od 0 do 40 mM. Rysunki od 5.1 do 5.3 przedstawiają zależności odwrotności współczynnika retencji $1/k$ od stężenia β -CD.

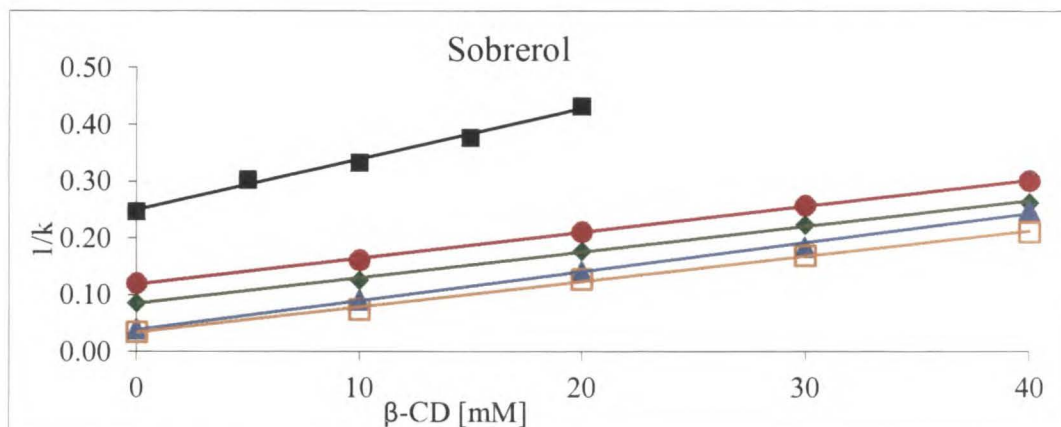


Rys. 5.1 Zależność odwrotności współczynnika retencji od stężenia β -CD bez dodatku hydroksykwasu ■ lub w obecności 0,5 M kwasów: L-winowego ◆, D-winowego ●, DL-winowego ▲ i cytrynowego □.



Rys. 5.2 Zależność odwrotności współczynnika retencji od stężenia β -CD bez dodatku hydroksykwasu

■ lub w obecności 0,5 M kwasów: L-winowego ◆, D-winowego ●, DL-winowego ▲ i cytrynowego □.



Rys. 5.3 Zależność odwrotności współczynnika retencji od stężenia β -CD bez dodatku hydroksykwasu ■ lub w obecności 0,5 M kwasów: L-winowego ◆, D- winowego ●, DL-winowego ▲ i cytrynowego □.

Na podstawie przedstawionych wyników widzimy, że w każdym przypadku wzrost stężenia β -CD powoduje zmniejszenie retencji związków modelowych. Zastosowanie dodatku kwasu cytrynowego do roztworu β -CD powoduje wydłużenie retencji wszystkich związków modelowych. Dla morfolepu, 2,6-DKP, metylofenylobarbitalu i sobrerolu zaobserwowano wzrost retencji po zastosowaniu dodatku wszystkich analizowanych hydroksykwasów. Natomiast retencja cyklopentolatu, chlortalidonu i glimidu w obecności kwasu DL-winowego maleje. Powyższe zjawisko może być związane z tworzeniem bardziej stabilnych kompleksów inkluzyjnych. Wpływ β -CD na retencję związków jest tym silniejszy, im trwalsze tworzy ona z nimi kompleksy. Ponadto zmiany retencji związków modelowych mogą wynikać ze znacznego wzrostu lepkości fazy ruchomej przy dużym stężeniu (0,5 M) hydroksykwasów.

5.2 Wyznaczanie stałych trwałości kompleksów

Rysunki od 5.1 do 5.3 przedstawiają zależności odwróconego współczynnika retencji ($1/k$) w funkcji stężenia β -CD z dodatkiem lub bez dodatku hydroksykwasów dla wybranych związków. Ponieważ zależności te są liniowe, można obliczyć wartości

stałych K według równania (2.5) dotyczącego tworzenia kompleksów o stechiometrii 1:1. Równanie to zostało szczegółowo przedstawione w części literaturowej w rozdziale 2.3.1.

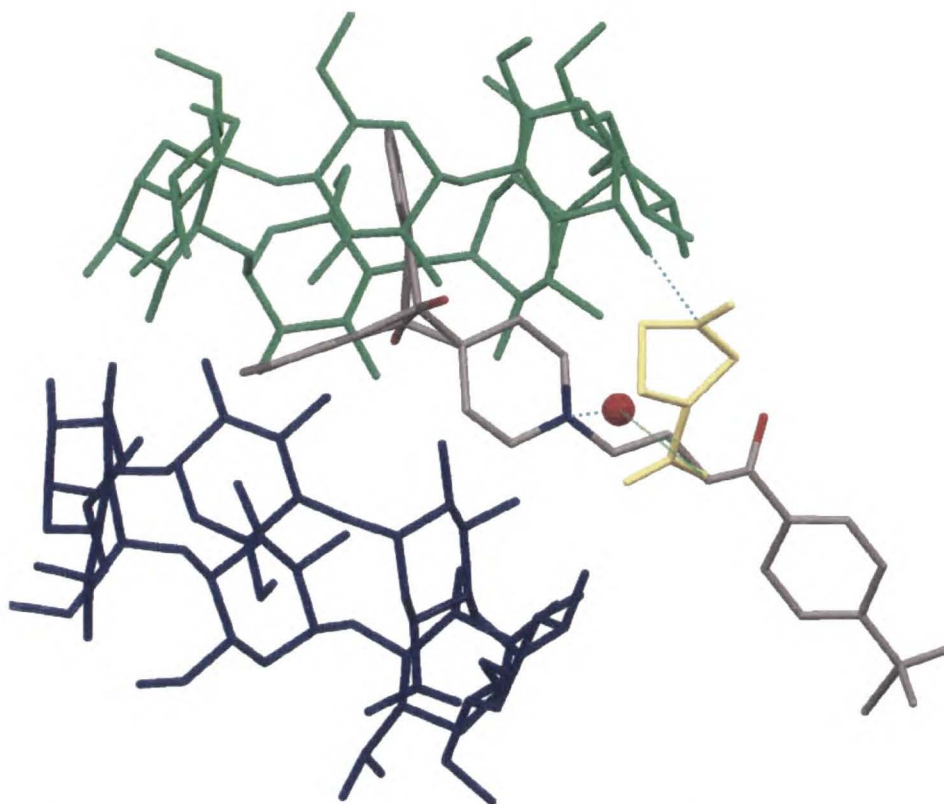
W tabeli 5.1 są podane wartości stałych trwałości kompleksów badanych związków z β -CD w obecności hydroksykwasów. Na podstawie zestawionych w tabeli wyników, można zauważyć, że dodatek kwasu cytrynowego powoduje spadek trwałości badanych kompleksów. Prawdopodobnie jest to spowodowane przez tworzenie bardziej stabilnego kompleksu β -CD z kwasem cytrynowym ($K_1 = 12,8$), niż z kwasem winowym ($K_1 = 4,1$). Pomiar stałych trwałości kompleksów hydroksykwasów z β -CD wykonał Fenyvesi z współpracownikami [8].

Tab. 5.1 Stałe trwałości kompleksów badanych związków z β -CD w obecności 0,5 M hydroksykwasów; warunki: kolumna 1 x 150 mm z wypełnieniem C18 (2) o średnicy ziarna 5 μ m; przepływ 0,04 ml/min, detektor UV-VIS (254 nm); eluent EtOH / H₂O (20 / 80 v / v) o pH 2,5 z dodatkiem β -CD i 0,5 M hydroksykwasów.

K ₁ [M ⁻¹]	β -CD	β -CD i	β -CD i	β -CD i	β -CD i
		kwas cytrynowy	kwas L-winowy	kwas D-winowy	kwas DL-winowy
Chlortalidon	25,9 \pm 0,5	13,5 \pm 0,8	29,3 \pm 0,3	22,9 \pm 0,8	32,1 \pm 1,7
	13,5 \pm 0,8	7,0 \pm 0,4	20,6 \pm 0,7	14,8 \pm 0,9	25,6 \pm 1,3
Cyklopentolat	190,2 \pm 2,8	183,2 \pm 5,3	215,7 \pm 5,0	221,0 \pm 6,4	318,1 \pm 6,1
	160,6 \pm 1,8	132,5 \pm 3,4	175,4 \pm 9,8	176,9 \pm 4,4	190,5 \pm 6,5
Glimid	177,0 \pm 2,3	51,1 \pm 4,2	347,2 \pm 5,2	352,1 \pm 7,6	377,2 \pm 5,2
Metylofenylobar- bital	170,4 \pm 1,6	49,7 \pm 2,1	101,8 \pm 4,9	85,3 \pm 1,4	71,2 \pm 2,6
	151,7 \pm 2,8	44,9 \pm 2,2	93,1 \pm 3,6	76,9 \pm 1,3	65,5 \pm 4,5
Morfolep	185,4 \pm 1,4	76,3 \pm 2,2	95,0 \pm 5,7	98,3 \pm 1,1	83,6 \pm 5,3
2,6 - DKP	19,5 \pm 6,5	18,0 \pm 2,6	20,7 \pm 7,8	22,9 \pm 5,8	35,6 \pm 3,3
	12,4 \pm 4,4	13,6 \pm 2,6	15,1 \pm 7,6	17,0 \pm 6,1	25,7 \pm 4,1
Sobrerol	37,2 \pm 2,7	9,7 \pm 0,4	13,3 \pm 2,9	13,2 \pm 3,1	11,3 \pm 2,8
	37,2 \pm 2,7	10,7 \pm 1,3	15,5 \pm 2,1	14,7 \pm 3,5	14,1 \pm 2,1

Dodatek kwasów winowych ma pozytywny wpływ na stabilność kompleksów β -CD z większością badanych związków. Wyjątek stanowią kompleksy: β -CD-Morfolep oraz β -CD-Metylofenylobarbital. Dla chlortalidonu, cyklopentolatu, glimidu i 2,6-DKP obserwujemy efekt synergizmu. Interakcja obydwu enancjomerów L- i D- kwasu winowego wzajemnie się uzupełnia, czego efektem są trwalsze kompleksy β -CD z badanymi związkami w obecności racemicznego kwasu winowego, niż przy udziale pojedynczych enancjomerów tego kwasu.

Literatura dostarcza pewnych informacji na temat molekularnych oddziaływań pomiędzy lekami, cyklodekstrynami, a hydroksykwasami. Jedną z teorii mówi o tworzeniu kompleksu trójskładnikowego lek-cyklodekstryna-hydroksykwas. Takie kompleksy potrójne zostały niedawno uznane za cenne farmaceutycznie substancje [99]. Organiczne hydroksykwasy są często używane w celu polepszenia rozpuszczalności lub stabilności leków w formie kompleksu z cyklodekstryną. Na przykład, rozpuszczalność i szybkość przyswajania karwedilolu poprawiła się poprzez tworzenie kompleksu potrójnego karwedilol- β -CD-kwas cytrynowy [100]. Podobny lub nawet lepszy efekt zwiększenia rozpuszczalności i poprawy biodostępności uzyskano dla Terfenadyny [101] poprzez kompleksowanie z β -CD i tworzenie winianu soli. Struktura krystaliczna kompleksu Terfenadyny- β -CD-kwas winowy została ukazana na rysunku 5.8, gdzie gość przyjmuje konformację, w której grupa difenylowa jest zdokowana we wnęce utworzonej przez połączenia dwóch niezależnych cząsteczek CD przez wiązania wodorowe. Dwa pierścienie aromatyczne inaczej oddziałują z CD tworząc dimer. Jeden z aromatycznych pierścieni jest centralnie zawarty we wnęce CD (oznaczonej na zielono), natomiast drugi jest umiejscowiony równolegle do powierzchni styku dwóch CD. Centralna część gościa jest otoczona przez cząsteczki wody i kwasu winowego, które tworzą hydrofilowe środowisko w szczelinach między dimerami. Zwiększona rozpuszczalność wieloskładnikowego systemu może być związana z istnieniem wiązań wodorowych pomiędzy kwasem winowym (oznaczonym na żółto), a atomami tlenu znajdującymi się przy szerszym końcu CD.



Rys. 5.4 Fragment struktury krystalicznej kompleksu Terfenadyna- β -CD-kwas winowy [101].

W roztworze ten trójskładnikowy układ jest bardziej dynamiczny. Cząsteczki wody i cząsteczki kwasu winowego są w nieustającym ruchu. Pod warunkiem, że pewien fragment cząsteczki kwasu winowego ustawi się dostatecznie blisko dimeru CD, a atom azotu gościa (oznaczony na niebiesko) i atom tlenu kwasu przyjmą względem siebie odpowiednie położenie, to struktura taka może być stabilniejsza.

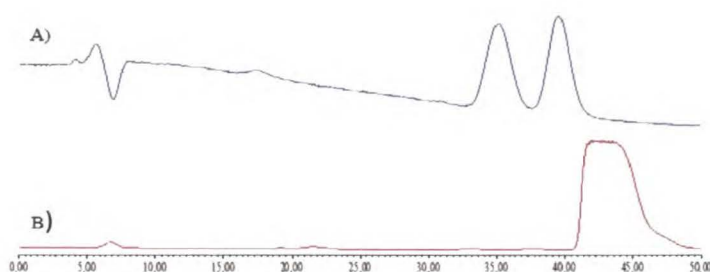
5.3 Wpływ rodzaju hydroksykwasu i stężenia β -CD na enancjoselektywność

Wpływ stężenia β -CD i dodatku hydroksykwasów na proces rozdzielania enancjomerów przedstawiono w Tab. 5.2. Zwiększenie rozpuszczalności β -CD do 40 mM otrzymano poprzez dodatek 0,5 M hydroksykwasów.

Tab. 5.2 Wpływ rodzaju hydroksykwasu i stężenia β -CD na enancjoselektywność

	β -CD [mM]	enancjoselektywność α				
		bez	0,5 M	0,5 M	0,5 M	0,5 M
		kwasu cytrynowy	kwasu L-winowy	kwasu D-winowy	kwasu DL-winowy	kwasu
Chlortalidon	0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	20	1,20	1,08	1,10	1,10	1,08
	30	----	1,13	1,15	1,15	1,13
	40	----	1,16	1,17	1,18	1,16
Cyklopentolat	0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	10	1,14	1,25	1,21	1,22	1,24
	20	1,31	1,27	1,26	1,24	1,31
	30	----	1,28	1,31	1,33	1,40
	40	----	1,31	1,31	1,35	1,45
Metylofenylo- barbital	0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	10	1,07	1,00	1,06	1,06	1,07
	20	1,09	1,00	1,08	1,08	1,08
	30	----	1,10	1,08	1,08	1,08
	40	----	1,10	1,10	1,09	1,09
2,6-DKP	0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	10	1,11	1,00	1,09	1,07	1,06
	20	1,12	1,09	1,10	1,11	1,09
	30	----	1,07	1,12	1,12	1,13
	40	----	1,11	1,13	1,13	1,19
Sobrerol	0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	30	----	1,15	1,20	1,36	1,53
	40	----	1,16	1,30	1,85	1,90

Zaobserwowano, że zwiększenie stężenia β -CD może poprawić zdolność rozpoznania chiralnego układu. Nie uzyskano rozróżnienia chiralnego sobrerolu w układzie z β -CD bez dodatku hydroksykwasu, dopiero zwiększenie rozpuszczalności β -CD do 40 mM w obecności kwasu DL-winowego doprowadziło do całkowitego rozdzielenia enancjomerów (Rys. 5.5).



Rys. 5.5 Chromatogram enancjomerów sobrerolu uzyskany w warunkach chromatograficznych: kolumna 1 x 150 mm z wypełnieniem C18(2) o średnicy ziarna 5 μ m; przepływ 0,04 ml/min, detektor UV-VIS (220 nm); eluent EtOH / H₂O (20 / 80 v / v) o pH 2,5 z dodatkiem:

- A) 20 mM β ,
- B) 40 mM β -CD z dodatkiem 0,5 M kwasu DL-winowego.

Jednakże nie dla wszystkich związków modelowych w układzie z β -CD modyfikowanym hydroksykwasami uzyskano lepsze wyniki niż w układzie pojedynczym. Dla chlortalidonu i metylofenylobarbitalu nie otrzymano wzmocnienia enancjoselektywności. Poprawę enancjoselektywności uzyskano dla cyklopentolatu, 2,6-DKP i sobrerolu w wyniku połączenia 40 mM β -CD i 0,5 M kwasu DL-winowego, podczas gdy kwasy L- i D-winowe stosowane oddzielnie mają słabszy wpływ na wzrost wartości enancjoselektywności. Kwas cytrynowy spośród analizowanych hydroksykwasów ma najmniej korzystny wpływ na rozdział enancjomerów wszystkich związków modelowych. Powyższe zjawisko może wynikać z faktu, że występuje zawada przestrzenna hydroksykwasu, która utrudnia utworzenie kompleksu inkluzyjnego z β -CD. Jeżeli przyjmiemy, że tworzenie kompleksu polega na występowaniu wiązań wodorowych pomiędzy hydroksykwasem, a atomami tlenu znajdującymi się przy zewnętrznym, szerszym końcu β -CD to w ten sposób oddziaływania pomiędzy związkiem rozdzielanym,

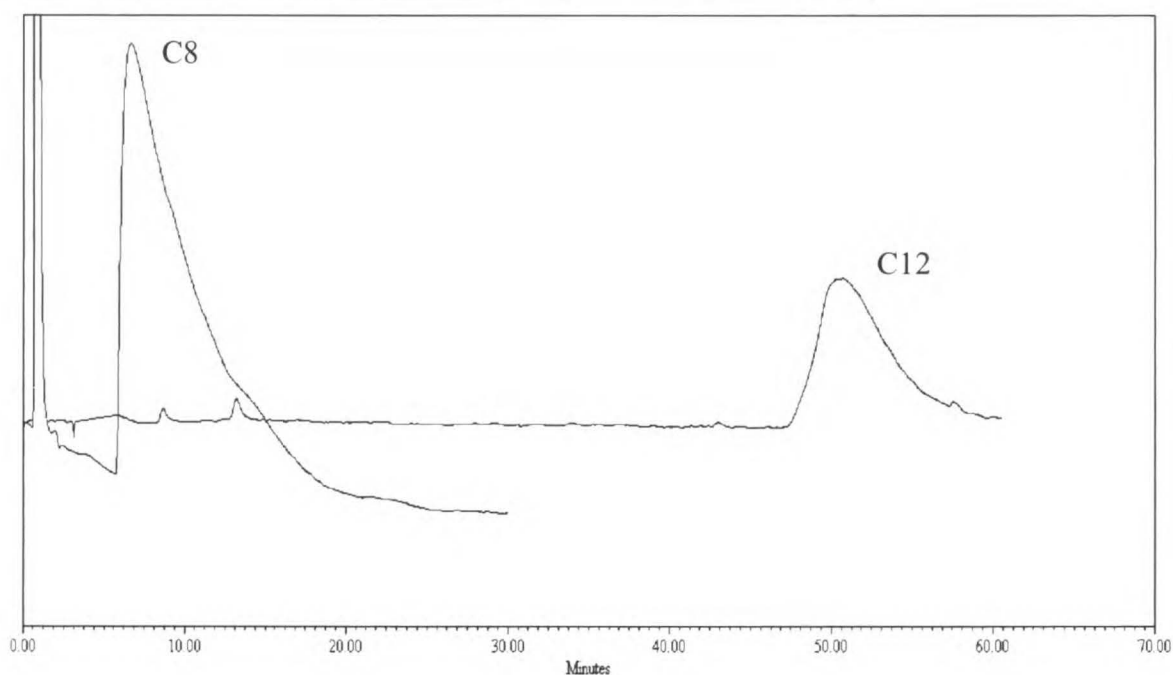
a β -CD mogą być osłabione. Niewielka cząsteczka kwasu winowego nie utrudnia w dotarciu gościa do luki CD. Natomiast większa cząsteczka kwasu cytrynowego jest silniej wiązana przez β -CD a zawada przestrzenna grup karboksylowych kwasu cytrynowego jest bardziej rozległa. Wobec tego im większy rozmiar cząsteczki i liczba grup funkcyjnych hydroksykwasu, tym słabsze są oddziaływania pomiędzy gościem, a β -CD. Powiększenie zawady sferycznej w pobliżu miejsca kompleksowania może doprowadzić do osłabienia lub zaniku oddziaływań enancjoselektywnych.

Wyniki zaprezentowane w tym rozdziale potwierdzają, że zastosowanie połączenia β -CD z hydroksykwasami może poprawić rozdzielanie enancjomerów związków. Kwasy DL-, D- i L-winowe pomimo tego, że same nie są w stanie rozróżnić enancjomerów badanych związków, a ich dodatek zmniejsza enancjoseparację w zakresie stężeń β -CD poniżej 20 mM, to mogą wpływać korzystnie na zdolność rozróżnienia chiralnego układu za sprawą zwiększenia rozpuszczalności β -CD.

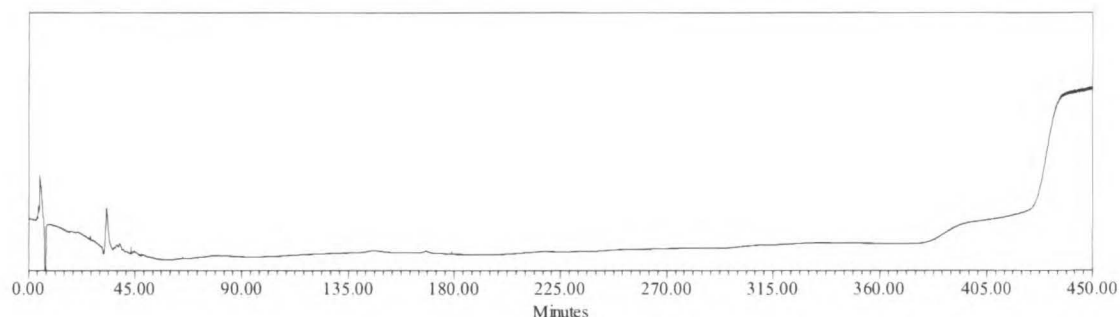
6 ROZDZIELANIE ENANCJOMERÓW Z ZASTOSOWANIEM β -CYKLODEKSTRYNY ORAZ ODCZYNNIKÓW PAR JONOWYCH, JAKO SKŁADNIKÓW FAZY RUCHOMEJ W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

6.1 Adsorpcja odczynników par jonowych w układzie faz odwróconych.

W badaniach wstępnych sprawdzono zachowanie się OPI (C4, C8 i C12) w układzie faz odwróconych z fazą stacjonarną RP C18. Jako fazę ruchomą zastosowano wodny roztwór etanolu. Rysunek 6.1 przedstawia kolejność wymywania OPI. Jest ona zgodna ze wzrostem ich hydrofobowości. Najsilniejsze powinowactwo do fazy stacjonarnej wykazuje C12. W przypadku C4 nie zaobserwowano adsorpcji na fazie stacjonarnej.



Rys. 6.1 Chromatogram odczynników par jonowych C8 i C12. Warunki chromatograficzne; kolumna 4,6 x 50 mm wypełnienie 3,5 μ m RP 18; eluent: etanol – woda (20:80 v/v); detektor refraktometryczny.



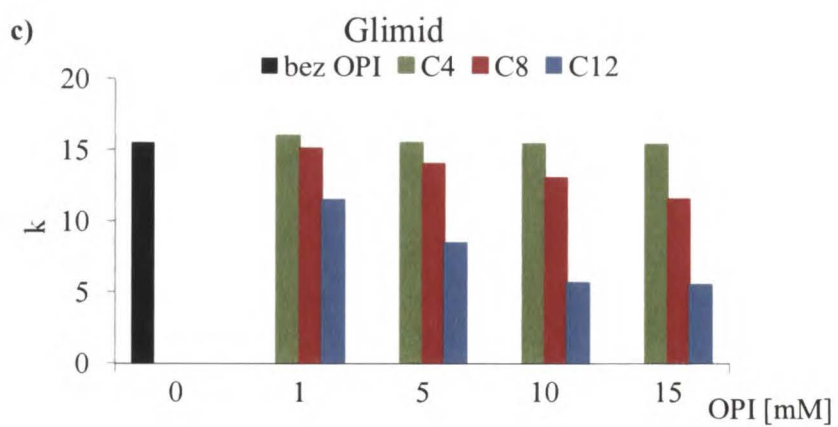
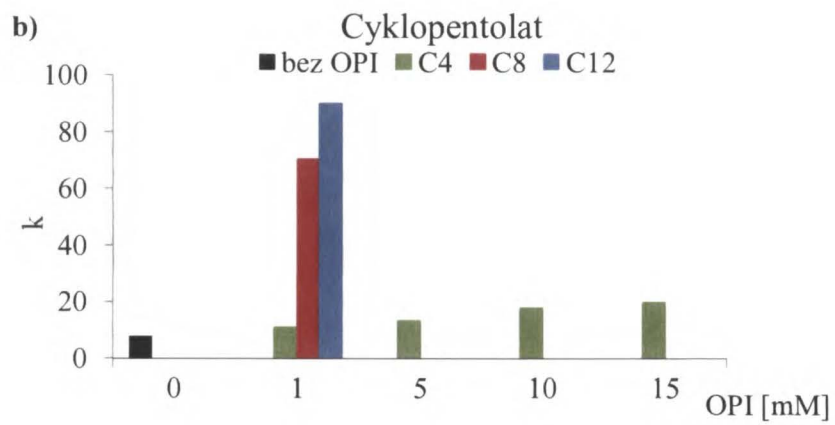
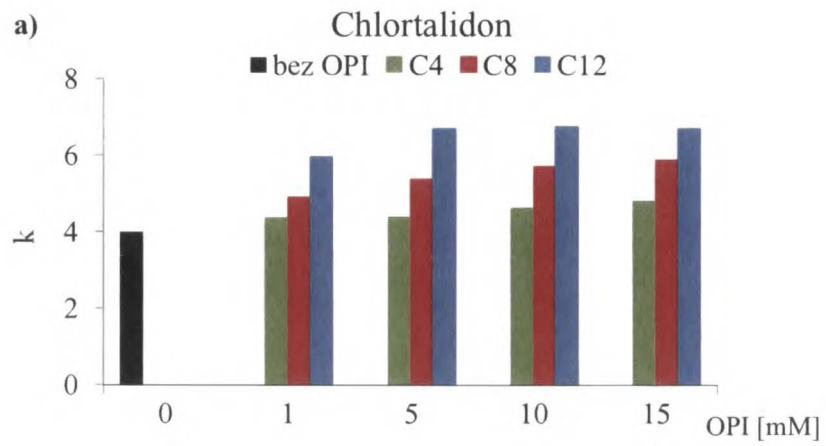
Rys. 6.2 Chromatograficzna krzywa adsorpcji C12 na fazie stacjonarnej C18. Warunki chromatograficzne: kolumna 4,6 x 250 mm wypełnienie 3,5 μ m RP 18; eluent: etanol – woda (20:80 v/v), 5 mM C12, detekcja 190 nm.

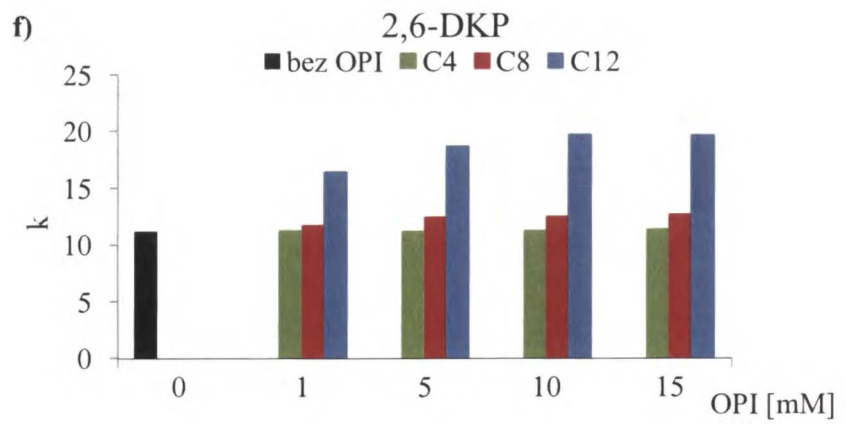
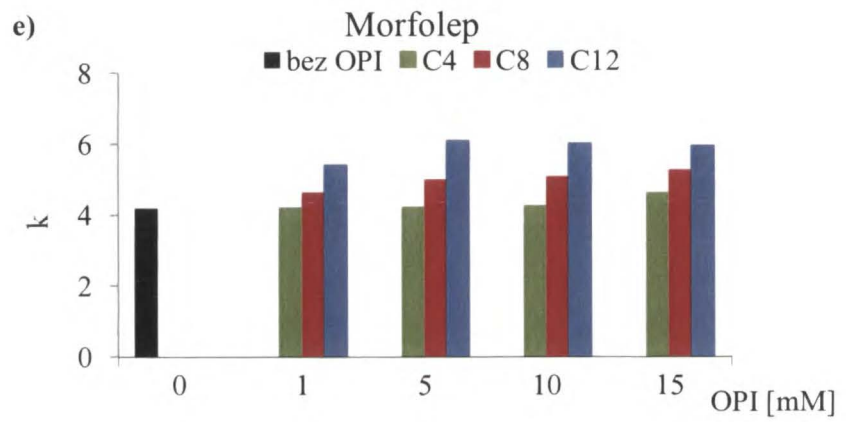
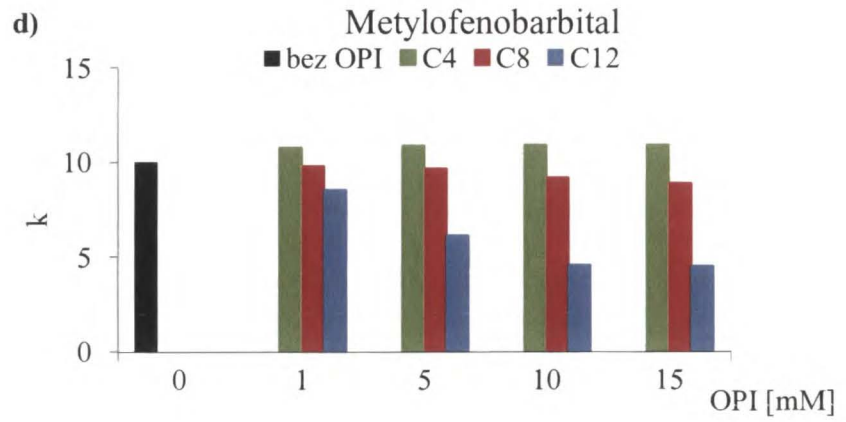
Sprawdzono również adsorpcję C12 na fazie stacjonarnej C18. Doświadczenie wykonano w następujący sposób: kolumna była obsadzana 5 mM C12 w temperaturze 20 °C przy przepływie 0,04 ml/min. Czas retencji substancji niezatrzymywanej na kolumnie wynosił 2,5 min.

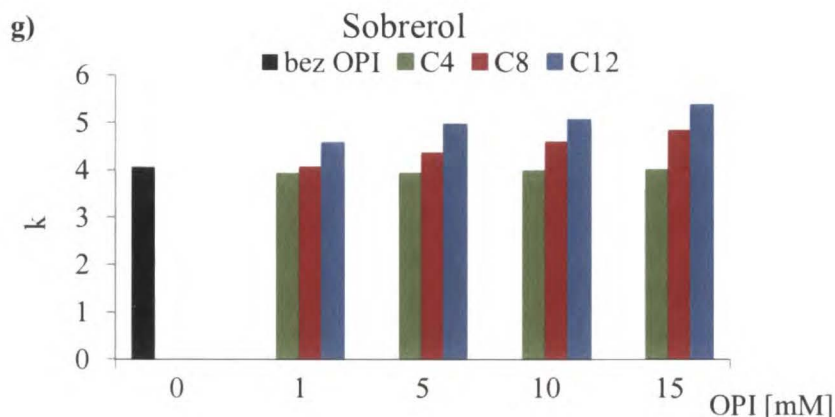
Na rysunku 6.2 przedstawiono krzywą przejścia dla 5 mM roztworu C12. W przebiegu krzywej zaobserwowano skok wartości sygnału detektora przy ok. 400 min. Oznacza to, iż cała powierzchnia adsorpcyjna w kolumnie została zapełniona C12, aż do warunków równowagi termodynamicznej (przeładowanie objętościowe kolumny). Znając stężenie C12, natężenie przepływu fazy ruchomej oraz masę wypełnienia kolumny wyznaczono masę zaadsorbowanego odczynnika par jonowych. Masa zaadsorbowanego C12 wynosiła 157,955 mg na 1 g wypełnienia kolumny.

6.2 Wpływ rodzaju odczynnika par jonowych na retencję związków modelowych

W pierwszym etapie badań sprawdzono wpływ stężenia i długości łańcucha alkilowego odczynników par jonowych (OPI) na retencje związków modelowych. Stężenie OPI mieściło się w zakresie 0-15 mM. Na rysunku 6.3 przedstawiono zależności współczynnika retencji związków modelowych od stężenia i długości łańcucha alkilowego OPI.







Rys. 6.3 Wpływ rodzaju i stężenia OPI na współczynnik retencji związków modelowych. Warunki chromatograficzne: kolumna 250 x 1 mm z wypełnieniem C18(2) o średnicy ziarna 5 μm ; przepływ 0,04 ml/min, detektor UV-VIS (220 nm); eluent OPI w EtOH / H₂O (20 / 80 v / v).

Jak widać na rysunkach w miarę wzrostu stężenia i długości łańcucha alkilowego OPI wartość współczynnika retencji (k) rośnie dla chlortalidonu, cyklopentolatu, morfolepu, 2,6-DKP i sobrerolu. W przypadku cyklopentolatu uzyskano pokaźny wzrost retencji, nawet przy bardzo niskim stężeniu C8 i C12. Czas retencji CP przy stężeniach wyższych niż 1 mM C8 i C12 był zbyt długi do wyznaczenia (> 600 min). Natomiast glimid, metylofenylobarbitały wykazują całkiem odmienne zachowanie; wartość k maleje wraz ze wzrostem stężenia i długości łańcucha alkilowego OPI. Efekty te wynikają z różnic w budowie i właściwościach fizykochemicznych molekuł. Przy dodawaniu jonów wodorowych molekule takie jak; chlortalidon, cyklopentolat, morfolepu i 2,6-DKP przyjmują ładunek dodatni, który zlokalizowany jest przy grupie NH^{3+} . W przypadku większości badanych molekuł atom azotu jest zlokalizowany w pierścieniu i jest on słabo zasadowy. Aminy aromatyczne są mniej zasadowe niż aminy alifatyczne, ponieważ wolna para elektronowa atomu azotu ulega delokalizacji w wyniku oddziaływania z układem elektronów π pierścienia aromatycznego. Z tego powodu elektrony wolnej pary są mniej zdolne do tworzenia oddziaływań jonowych. W strukturze cyklopentolatu atom azotu znajduje się w łańcuchu alkilowym i jest sterycznie dostępny, co może przyczyniać się do jego silniejszych oddziaływań z OPI powodującej znaczny wzrost retencji.

Sobrerol znacząco różni się od pozostałych molekuł, gdyż jako jedyny nie posiada atomu azotu. Należy on do grupy związków chemicznych zwanych alkoholami. Alkohole

są słabo zasadowe i słabo kwasowe. Jako zasady ulegają odwracalnemu protonowaniu przez kwasy, dając jon oksoniowy, ROH_2^+ . Efekty indukcyjne mają duży wpływ na stabilność jonu oksoniowego. Sobrerol posiada dwie grupy metylowe, które dostarczają elektrony stabilizując jon oksoniowy, powodując, że alkohol ma charakter bardziej zasadowy niż kwasowy i oddziałuje z przeciwnie naładowanymi OPI.

Glimid i metylofenylobarbitol należą do grupy związków chemicznych zwanych amidami. Amidy w wodnym roztworze mocnego kwasu ulegają hydrolizie tworząc kwas karboksylowy i aminę. Mechanizm tej reakcji polega na addycji cząsteczki wody do protonowanego amidu, po której następuje odszczepienie cząsteczki amoniaku. Zatem glimid i metylofenylobarbitol w badanych warunkach ($\text{pH} = 2,5$) występują w formie niezjonizowanej. W tym przypadku brak jest oddziaływań jonowych.

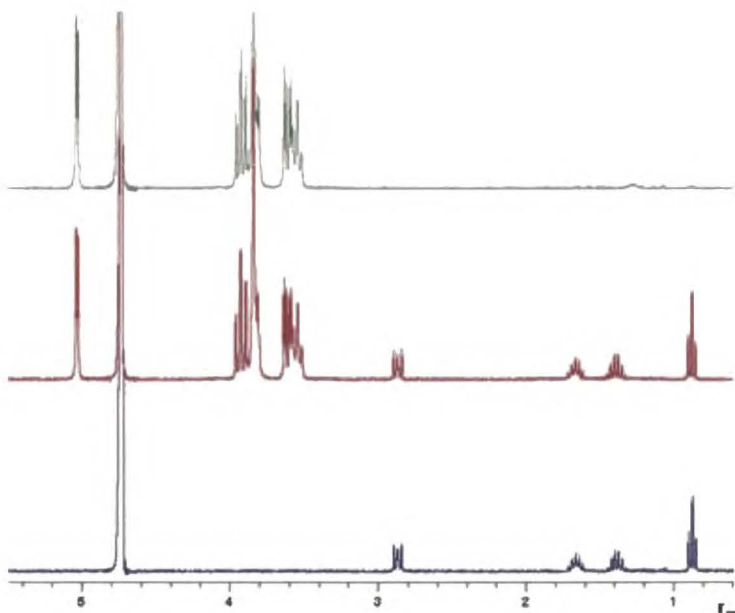
Uzyskane wyniki zgadzają się z teorią podaną w rozdziale trzecim. Potwierdzają one, że OPI powodują zwiększenie retencji przeciwnie naładowanych molekul. Wpływ OPI na retencję obojętnych molekul nie może być wyjaśniony poprzez oddziaływania jonowe. Taylor i Hung [91] zaproponowali jonowymienny model desolvatacji w celu wyjaśnienia spadku retencji neutralnych molekul. Model ten przewiduje, że spadek dostępnej powierzchni hydrofobowej w odwróconym układzie faz - spowodowany przez adsorpcję OPI - jest odpowiedzialny za powstanie efektu osłabienia retencji.

Powyższe dane stały się punktem wyjściowym do przeprowadzenia badań w układzie modyfikowanym cyklodekstryną w połączeniu z OPI.

6.3 Oddziaływanie między β -cyklodekstryną, a odczynnikami par jonowych.

Z danych literaturowych wiadomo, że β -CD tworzy kompleksy z C8 i C12. β -CD tworzy bardziej trwały kompleks z C12 ($K = 2980$), niż z C8 ($K_1 = 2520$). Pomiar stałych trwałości kompleksów OPI z β -CD wykonał Lu Runhua z współpracownikami [104]. W celu potwierdzenia braku zdolności β -cyklodekstryny do tworzenia kompleksu inkluzyjnego z C4 wykonano badania ^1H NMR dla roztworów wodnych (D₂O): C4, β -CD i równomolowej mieszaniny C4 z β -CD. Otrzymane widma zostały przedstawione na

rysunku 6.7. W widmie mieszaniny brak jest zmiany przesunięć chemicznych zarówno dla β -CD jak i C4, co wskazuje na brak procesu kompleksowania.

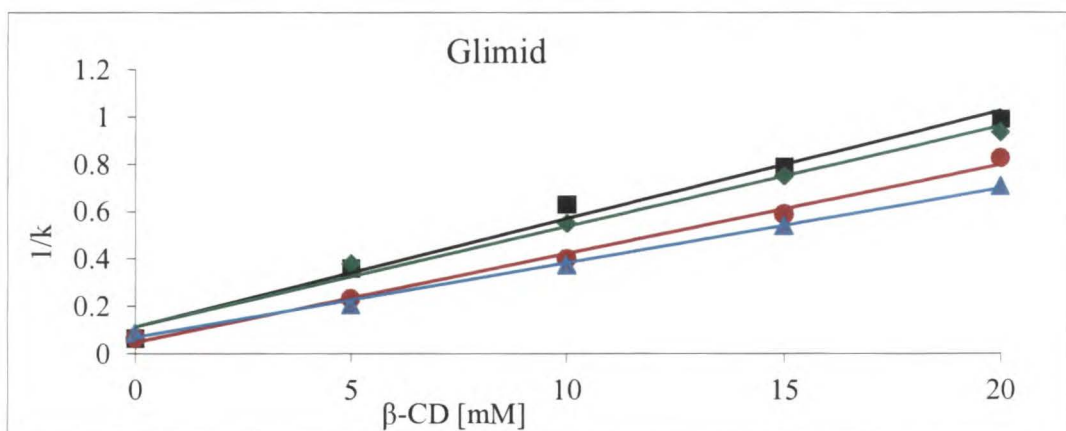
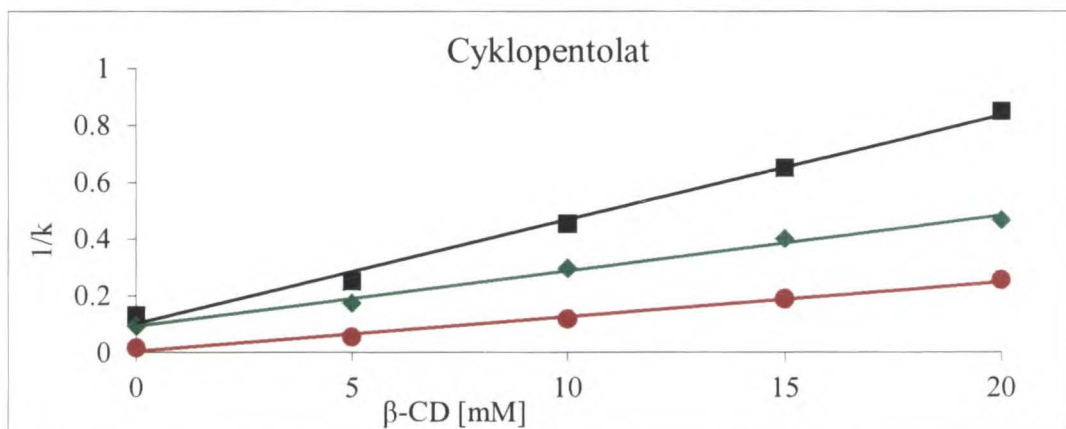
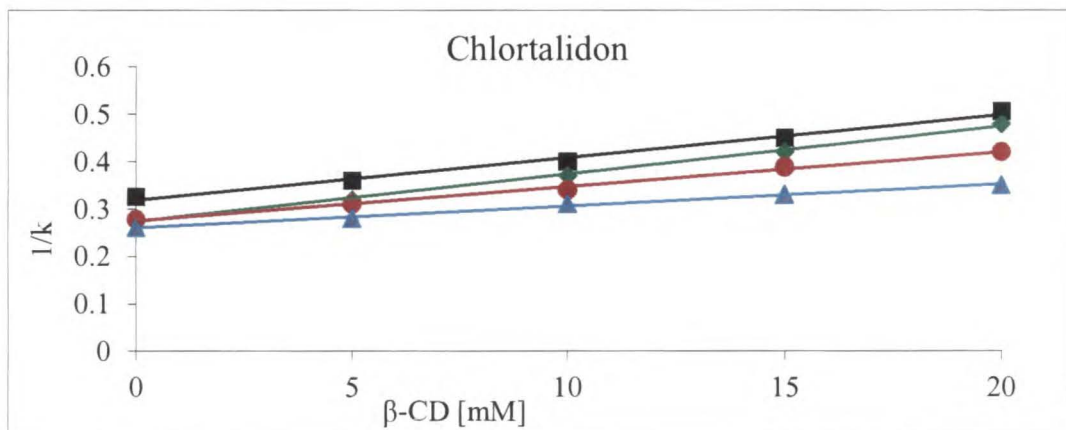


Rys. 6.4 Widmo ¹H NMR kolejno od góry:

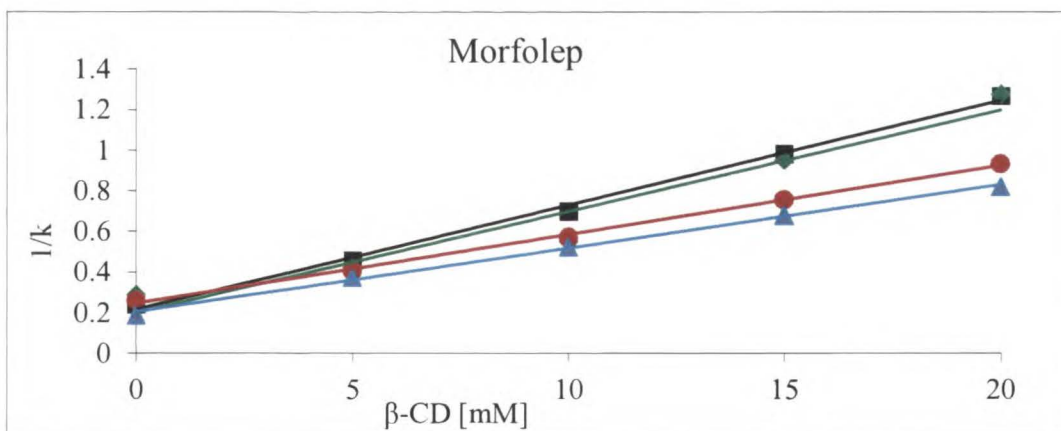
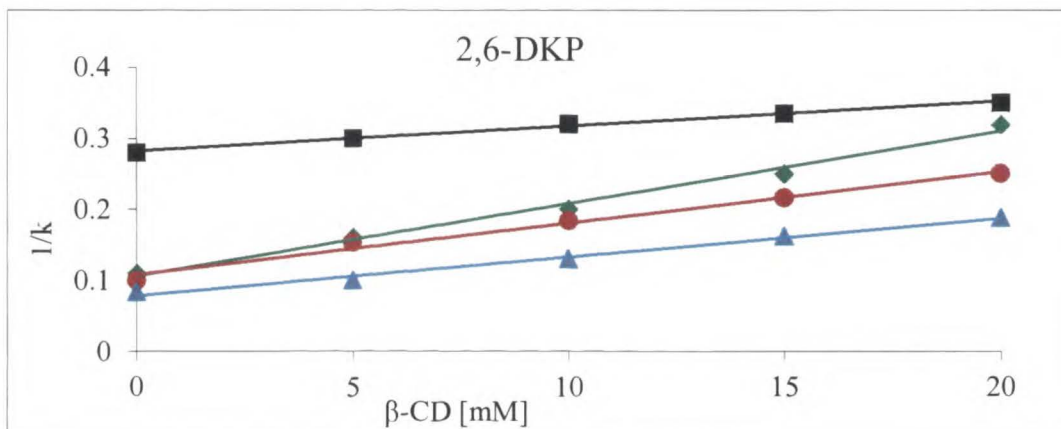
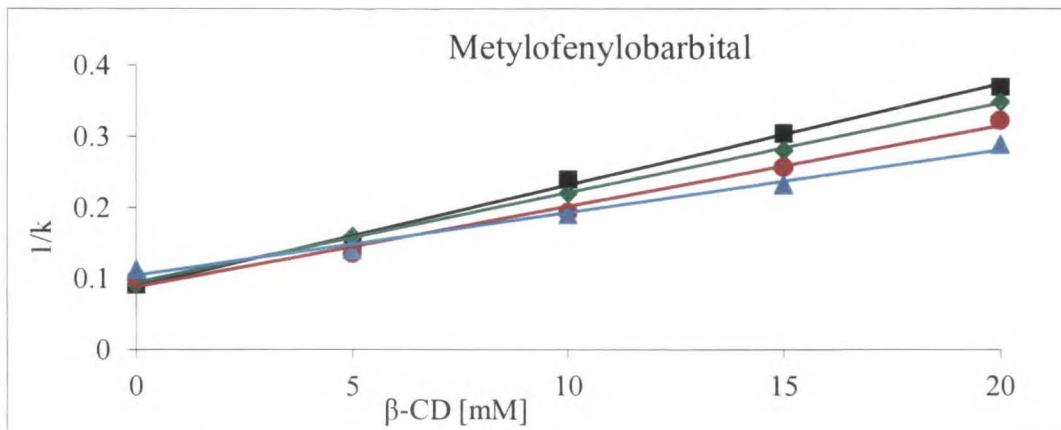
- β -CD
- β -CD z C4
- C4

6.4 Wpływ stężenia β -cyklodekstryny na retencję w obecności odczynników par jonowych.

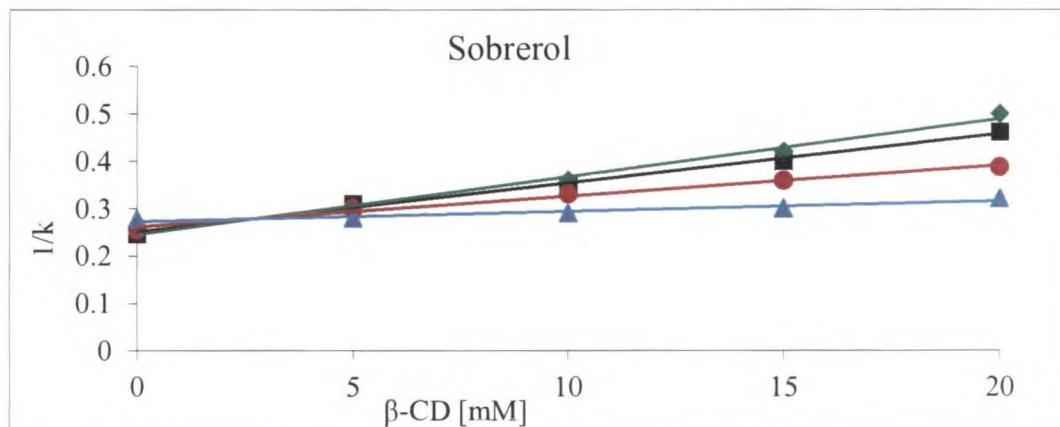
Wpływ stężenia β -CD na retencję związków modelowych badano przy stałym stężeniu OPI (1 mM). Stężenie β -CD było zmieniane w zakresie 0-20 mM. Rysunki od 6.4 do 6.6 przedstawiają zależność odwrotności współczynnika retencji ($1/k$) enancjomerów (wymywanych z kolumny jako pierwsze) od stężenia β -CD bez i z dodatkiem OPI.



Rys. 6.5 Zależność odwrotności współczynnika retencji od stężenia β -CD bez dodatku OPI ■ lub w obecności 1 mM C4 ♦, C8 ● i C12 ▲.



Rys. 6.6 Zależność odwrotności współczynnika retencji od stężenia β -CD bez dodatku OPI ■ lub w obecności 1 mM C4 ◆, C8 ● i C12 ▲.



Rys. 6.7 Zależność odwrotności współczynnika retencji od stężenia β -CD bez dodatku OPI ■ lub w obecności 1 mM C4 ◆, C8 ● i C12 ▲.

Na podstawie przedstawionych wyników widzimy, że wzrost stężenia cyklodekstryny powoduje spadek retencji związków modelowych. Natomiast dodatek OPI przyczynia się do wydłużenia czasu przebywania analitów w układzie. Układ ten jest bardzo złożony. Zachodzi w nim wiele procesów tj.; adsorpcja analitów i OPI (C8 i C12) na powierzchni fazy stacjonarnej, kompleksowanie analitów z β -CD, oddziaływania jonowe pomiędzy OPI, a analitami itp. Zatem wzrost retencji analitów może być spowodowany synergistycznym efektem wielu zjawisk. Chcąc określić charakter tych zjawisk w dalszej części pracy wyznaczono stałe trwałości kompleksów pomiędzy analitem a β -CD w obecności OPI.

6.4.1 Szacowanie stałych trwałości kompleksów

Przedstawiony model retencji w rozdziale 2.3.1 uwzględnia jedynie wpływ dodatku β -CD do fazy ruchomej. Niniejszy system (chromatografii par jonowych w połączeniu z β -CD) jest dużo bardziej złożony. Układ składa się z wielu stanów równowag np. powstawanie par jonowych, dystrybucja analitów i odczynników par jonowych pomiędzy fazą ruchomą i fazą stacjonarną itp. Z tego względu należy rozważyć nowy model retencji.

W przypadku braku CD w układzie chromatograficznym par jonowych, naładowany analit Q^+ może być dystrybuowany do fazy stacjonarnej w towarzystwie przeciwjonu X^- [93].



gdzie indeksy m i s wskazują na fazę stacjonarną i fazę ruchomą. Stała ekstrakcji K_{ex} wyrażona jest jako:

$$K_{ex} = \frac{[QX]_s}{[X^-]_m [Q^+]_m} \quad \text{Równ. 6.2}$$

W chromatografii par jonowych współczynnik retencji jest określony następującym równaniem:

$$k = \phi K_{ex} [X^-]_m \quad \text{Równ. 6.3}$$

gdzie ϕ jest stosunkiem objętości faz.

System oparty na połączeniu β -CD z OPI obejmuje następującą równowagę:



gdzie QXCD jest kompleksem inkluzyjnym CD, a K_T oznacza stałą trwałości kompleksu trójskładnikowego pomiędzy CD, analitem oraz OPI. Można wykluczyć, iż kompleks QXCD i β -CD są adsorbowane na fazie stacjonarnej [102]. Biorąc pod uwagę wyłącznie równanie (6.1 i 6.4) współczynnik retencji może być wyrażony jako [103]:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_R} + \frac{K_T [X^-] [CD]}{k_R} \quad \text{Równ. 6.5}$$

Jak wynika z w równaniu. (6.5) współczynnik retencji zależy m. in. od rodzaju i stężenia OPI.

Tabela 6.1 podaje stałe trwałości kompleksów (K) obliczone na podstawie nachylenia prostych przedstawionych na rysunkach od 6.4 do 6.6. Natomiast stałe trwałości kompleksów potrójnych K_T wyznaczono z równania (6.5) dla faz ruchomych z dodatkiem OPI.

Tab. 6.1 Stałe trwałości kompleksów badanych związków z β -CD w obecności 1 mM OPI. Warunki chromatograficzne: kolumna 250 x 1 mm z wypełnieniem C18 (2) o średnicy ziarna 5 μ m; przepływ 0,04 ml / min, detektor UV-VIS (220 nm); eluent EtOH / H₂O (20 / 80 v / v) o pH 2,5 z dodatkiem β -CD i 1 mM OPI.

	β -CD i C4	β -CD i C8	β -CD i C12
	$K_T [M^{-1}]$	$K_T [M^{-1}]$	$K_T [M^{-1}]$
Chlortalidon	$4,792 \times 10^5$	$2,934 \times 10^5$	$2,742 \times 10^5$
	$3,222 \times 10^5$	$1,471 \times 10^5$	$1,369 \times 10^5$
Cyklopentolat	$2,147 \times 10^5$	$7,391 \times 10^5$	-----
	$1,493 \times 10^5$	$5,657 \times 10^5$	-----
Glimid	$1,519 \times 10^5$	$0,631 \times 10^5$	$0,505 \times 10^5$
Metylofenylobarbita	$1,423 \times 10^5$	$0,910 \times 10^5$	$0,484 \times 10^5$
	$1,256 \times 10^5$	$0,761 \times 10^5$	$0,413 \times 10^5$
Morfolep	$1,510 \times 10^5$	$1,385 \times 10^5$	$1,252 \times 10^5$
2,6-DKP	$1,240 \times 10^5$	$0,549 \times 10^5$	$0,399 \times 10^5$
	$9,688 \times 10^5$	$0,336 \times 10^5$	$0,251 \times 10^5$
Sobrerol	$1,654 \times 10^5$	$1,225 \times 10^5$	$0,360 \times 10^5$

Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego OPI (od C4 do C12) następuje spadek trwałości kompleksów β -CD z prawie wszystkimi badanymi związkami. Prawdopodobnie, powodem tego zjawiska jest konkurencyjne wiązanie OPI przez cyklodekstrynę [104].

Cyklopentolat wykazuje całkiem odmienne zachowanie w stosunku do badanych związków. Stałe trwałości kompleksów cyklopentolatu z β -CD rosną wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego OPI.

6.5 Wpływ długości łańcucha alkilowego odczynników par jonowych na retencję i zdolność rozdzielczą enancjomerów.

W celu porównania wpływu rodzaju OPI na proces rozróżnienia chiralnego pomiary prowadzono w układach modyfikowanych β -CD z dodatkiem odpowiednio: 1 mM C4, 1 mM C8 i 1 mM C12. Współczynnik retencji k , enancjoselektywność α i rozdzielczość pików R_s związków modelowych w badanych układach porównano w Tab. 6.2.

Dodatek 1 mM C4 do układu modyfikowanego β -CD ma znikomy wpływ na parametry chromatograficzne (k , α , R_s) większości związków modelowych (z wyjątkiem cyklopentolatu i 2,6-DKP). Powyżej opisane zjawisko można tłumaczyć następującymi faktami:

- C4 wykazało znikomą interakcję z większością związków modelowych,
- C4 charakteryzuje się większym powinowactwem do polarnej fazy ruchomej, niż fazy stacjonarnej,
- β -CD nie tworzy kompleksu z C4

Analiza wyników dla układów β -CD w połączeniu odpowiednio z C8 i C12 wykazała, że zwiększenie długości łańcucha alkilowego w cząsteczce OPI powoduje wzrost wartości k prawie wszystkich związków modelowych. Prawdopodobnie jest to zasługa procesów:

- oddziaływań jonowych pomiędzy bardziej hydrofobowymi OPI, a analitami o przeciwnym ładunku,
- tworzeniem się mniej trwałych kompleksów większości związków modelowych z β -CD w obecności odpowiednio C8, C12.

Wartość k dla metylofenylobarbitalu i glimidu w badanych układach pozostała prawie niezmienną. Prawdopodobnie jest to wynikiem braku oddziaływań elektrostatycznych molekul z OPI.

W większości przebadanych przypadkach (z wyjątkiem cyklopentolatu) zaobserwowano utratę zdolności rozróżnienia chiralnego układu wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego w cząsteczce OPI. Prawdopodobnie zjawisko to wynika z wzajemnej konkurencji analitu i OPI do luki β -CD.

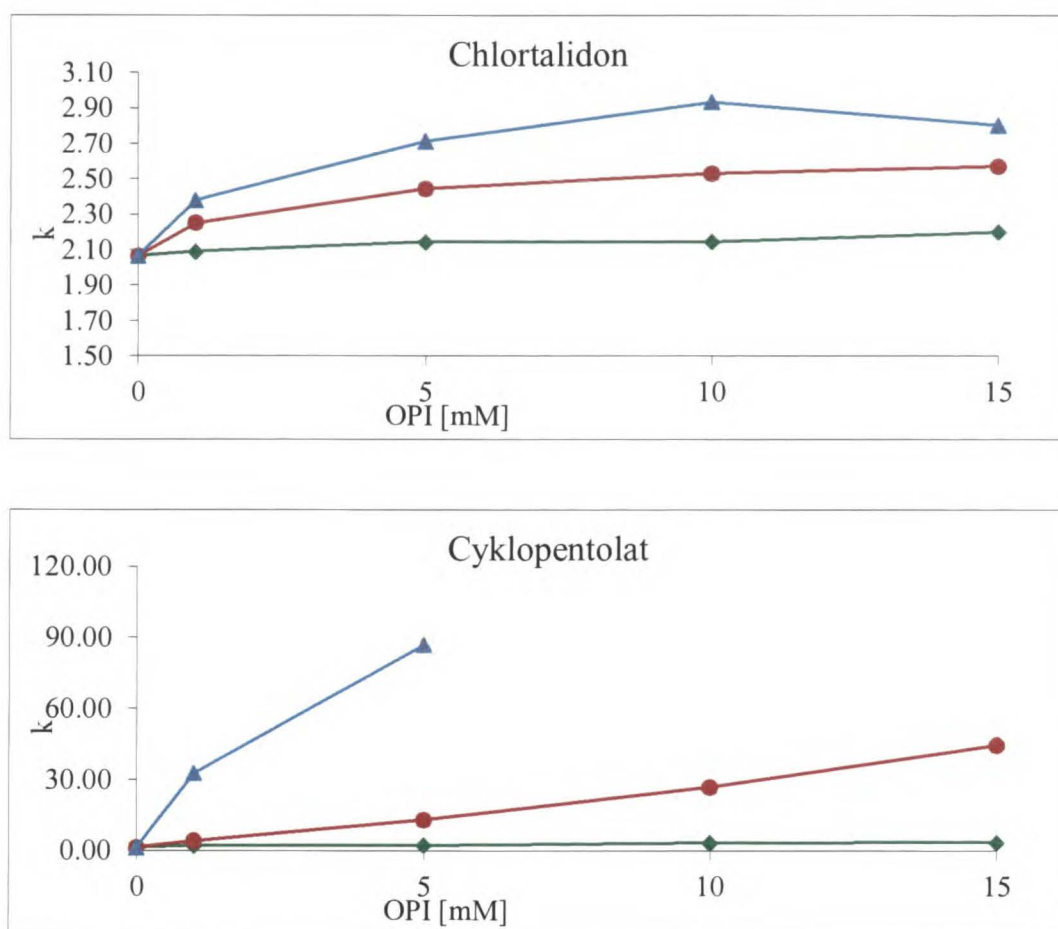
W przypadku cząsteczki cyklopentolatu zaobserwowano odmienny wpływ długości łańcucha alkilowego OPI na retencję i zdolność chiralnego rozróżnienia przez β -CD. Przy dodatku 1 mM C12, C8 odnotowano znaczący wzrost wartości k i poprawę rozdzielania enancjomerów. Ten wynik pozwala postawić następującą hipotezę: prawdopodobnie powstaje kompleks analit-OPI, który łatwiej ulega rozpoznaniu chiralnemu przez β -CD.

Tab. 6.2 Wpływ długości łańcucha alkilowego OPI na parametry chromatograficzne związków modelowych. Warunki chromatograficzne: kolumna 250 x 1 mm z wypełnieniem C18(2) o średnicy ziarna 5 μm ; przepływ 0,04 ml/min, detektor UV-VIS (220 nm); eluent EtOH/H₂O (20/80 v/v) o pH 2,5 z dodatkiem 20 mM β -CD i 1 mM OPI.

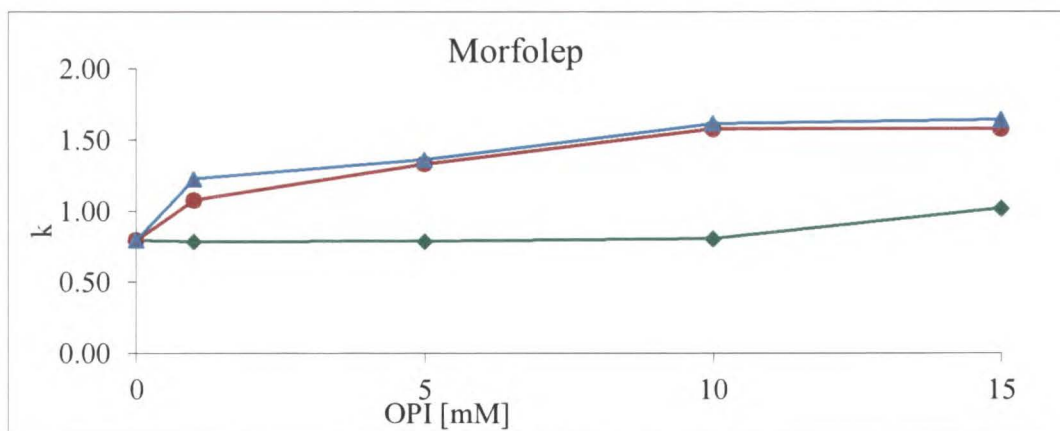
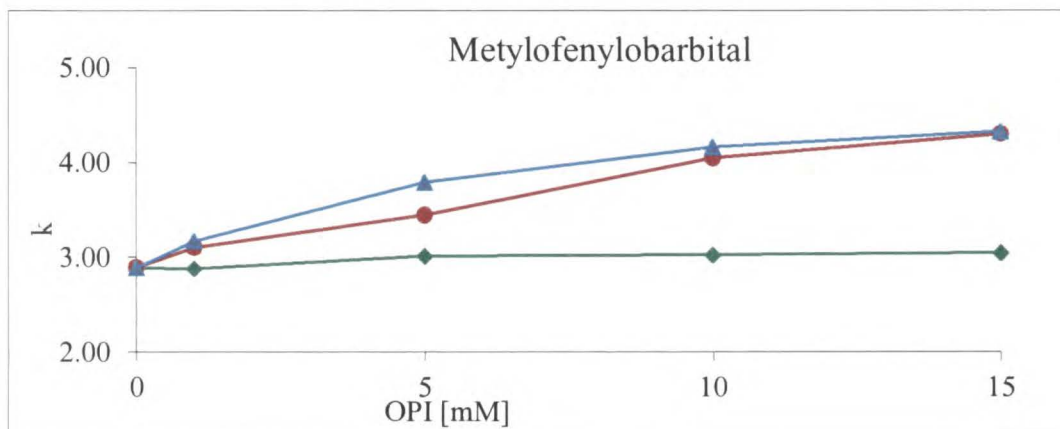
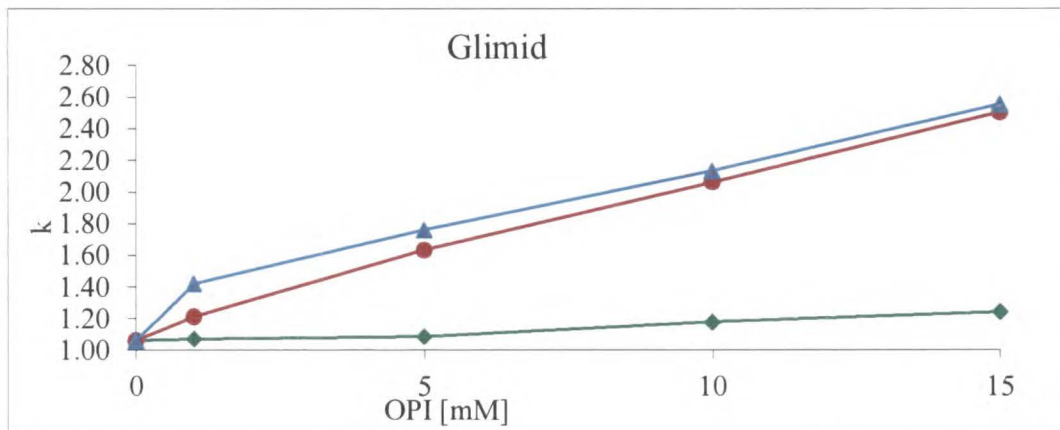
Związki modelowe	20 mM β -CD				20 mM β -CD i 1 mM C4				20 mM β -CD i 1 mM C8				20 mM β -CD i 1 mM C12			
	k ₁	k ₂	α	R _s	k ₁	k ₂	α	R _s	k ₁	k ₂	α	R _s	k ₁	k ₂	α	R _s
Chlortalidon	2,06	2,40	1,15	1,04	2,09	2,41	1,16	1,06	2,22	2,55	1,13	1,04	2,38	2,77	1,12	1,03
Cyklopentolat	1,18	1,54	1,31	1,09	2,15	2,82	1,32	1,11	3,80	5,20	1,37	2,46	31,12	43,23	1,39	2,66
Glimid	1,06	1,06	1,00	0,00	1,07	1,07	1,00	0,00	1,21	1,21	1,00	0,00	1,35	1,35	1,00	0,00
Metylofenylo- barbital	2,87	3,16	1,09	1,09	2,89	3,18	1,10	1,08	3,01	3,28	1,10	1,07	3,07	3,29	1,09	1,05
Morfolep	0,79	0,79	1,00	0,00	0,79	0,79	1,00	0,00	1,07	1,07	1,00	0,00	1,22	1,22	1,00	0,00
2,6-DKP	4,40	5,25	1,19	1,76	4,59	5,50	1,20	1,88	4,91	5,66	1,18	1,63	5,32	6,27	1,17	1,60
Sobrerol	2,17	2,17	1,00	0,00	2,15	2,15	1,00	0,00	2,58	2,58	1,00	0,00	3,12	3,12	1,00	0,00

6.6 Wpływ stężenia odczynników par jonowych na retencję i rozdzielczość enancjomerów

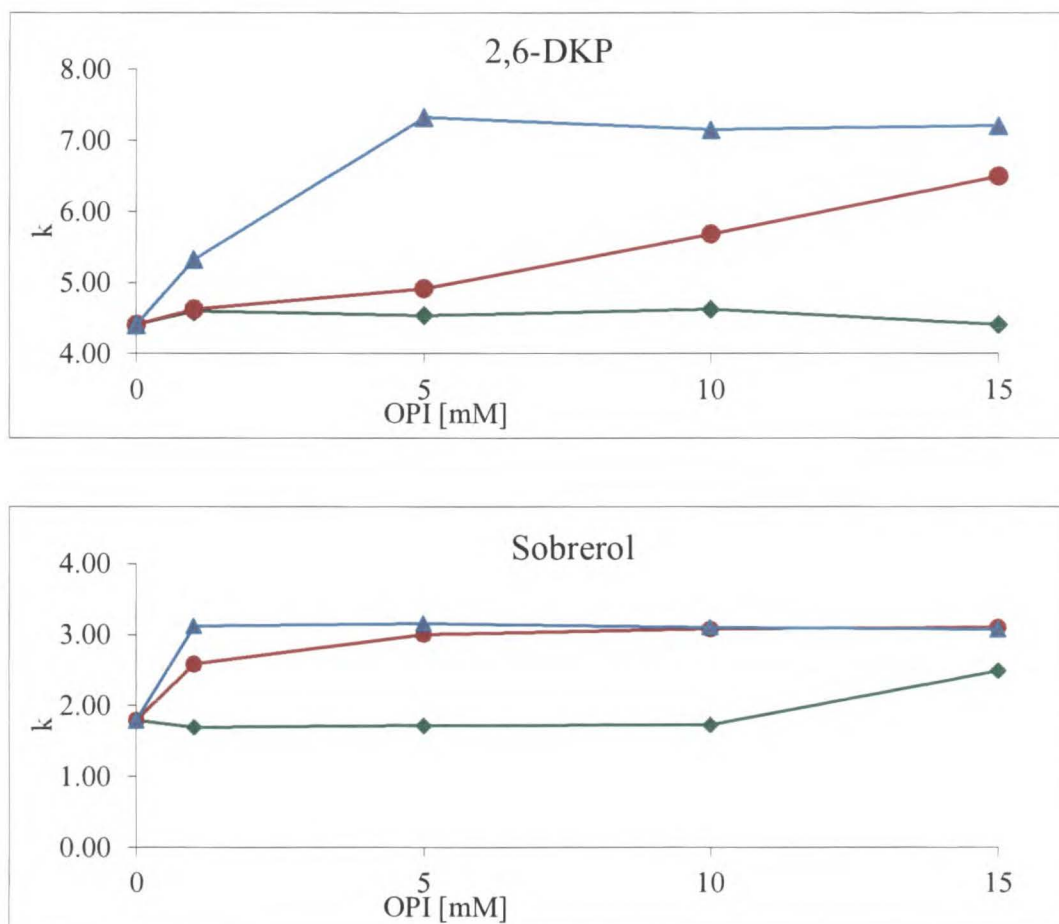
Wpływ stężenia OPI na współczynnik retencji k i rozdzielczość pików R_s związków modelowych został zbadany przy niezmiennym stężeniu β -CD równym 20 mM. Stężenie OPI zmieniano w zakresie 0-15 mM. Współczynniki retencji związków modelowych w układach podwójnych porównano na rysunkach od 6.8 do 6.10. Nie uzyskano parametrów chromatograficznych dla cyklopentolatu w zakresie stężeń powyżej 5 mM C12, ze względu na zbyt długie czasy analizy ($t_r > 600$ min).



Rys. 6.8 Zależność współczynnika retencji od stężenia OPI (C4 \blacklozenge , C8 \bullet i C12 \blacktriangle) w obecności 20 mM β -CD.



Rys. 6.9 Zależność współczynnika retencji od stężenia OPI (C4 \blacklozenge , C8 \bullet i C12 \blacktriangle) w obecności 20 mM β -CD.



Rys. 6.10 Zależność współczynnika retencji od stężenia OPI (C4 ◆, C8 ● i C12 ▲) w obecności 20 mM β -CD.

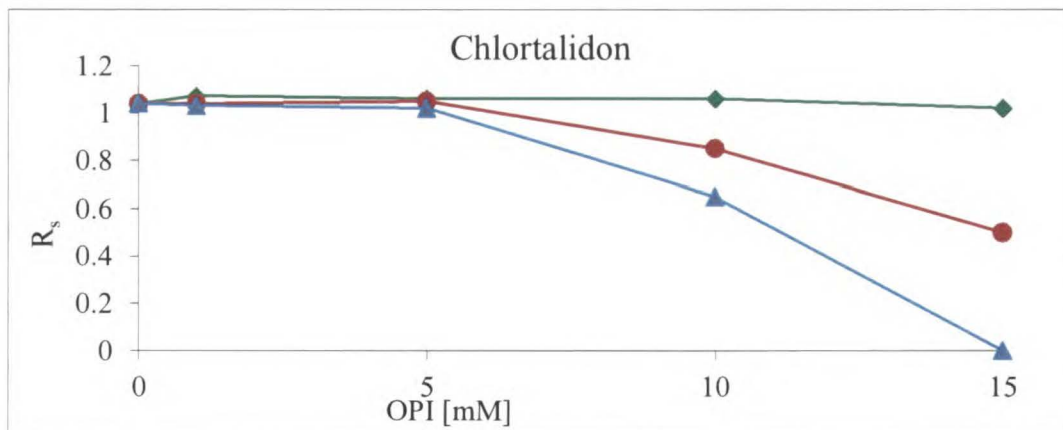
Dla wszystkich związków modelowych zaobserwowano, że dodatek C4 w zakresie stężeń 0-15 mM do układu modyfikowanego β -CD powoduje znikomy przyrost współczynnika retencji. Bardziej intensywny wzrost retencji związków modelowych następuje wraz ze wzrostem stężenia C8 i C12. Widoczny przyrost retencji jest głównie spowodowany osłabieniem kompleksowania analitów z β -CD oraz wzrostem oddziaływań jonowych pomiędzy OPI, a analitami.

Na wykresach od 6.11 do 6.12 przedstawiono zmiany R_s dla układu o stężeniu 20 mM β -CD oraz różnej ilości OPI. Analizując przedstawione wyniki można stwierdzić:

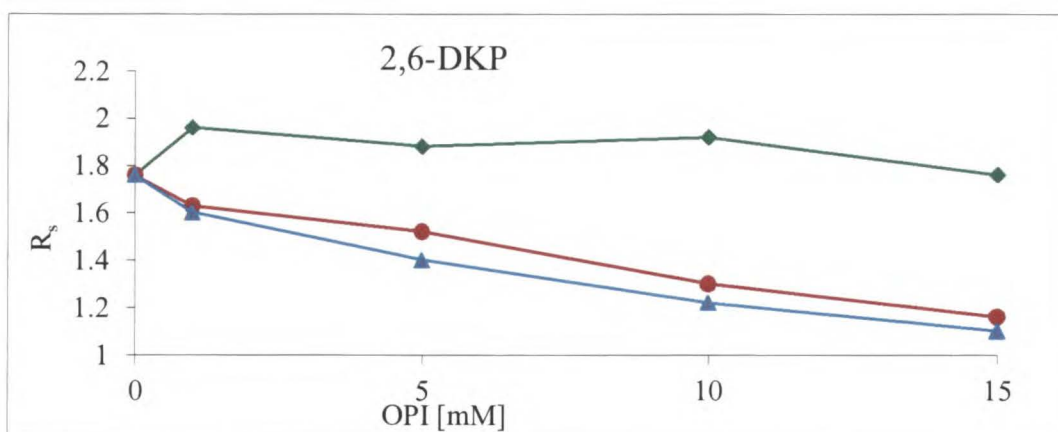
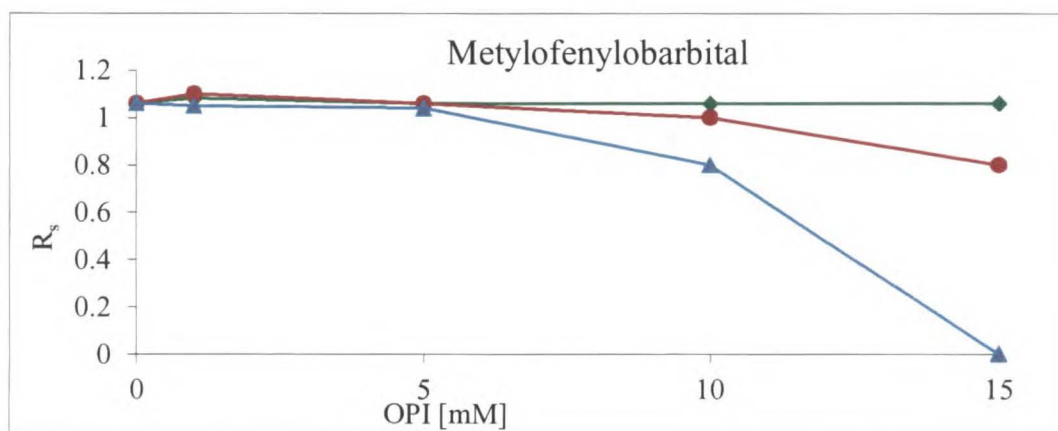
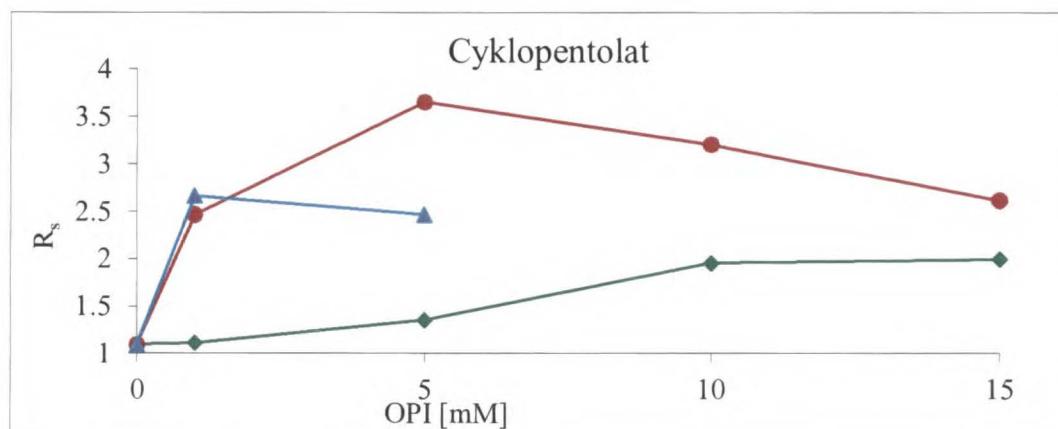
- W prawie każdym przypadku w miarę wzrostu stężenia OPI rośnie wartość k i maleje zdolność rozdzielcza układu. Efekt ten może świadczyć o słabnącym oddziaływaniu pomiędzy cząsteczkami analitu, a β -CD.

- Wskutek zastosowania dodatku C4 w zakresie stężeń 1-10 mM do układu modyfikowanego β -CD nastąpiła znacząca poprawa rozdziału enancjomerów 2,6-DKP. Oddziaływania elektrostatyczne przyciągające pomiędzy C4, a przeciwnie naładowanymi enancjomerami mogą wpływać korzystnie na zdolność chiralnego rozpoznania β -CD.
- W układzie podwójnym z dodatkiem 15 mM C12 nastąpił zanik rozróżnienia izomerów optycznych chlortalidonu i metylofenylobarbitalu.
- Wzrost stężenia C4 i C8 (do wartości 5 mM) znacząco wpływa na poprawę rozdziału enancjomerów cyklopentolatu.

Analiza zależności stężeniowych pozwoliła ustalić optymalne warunki rozdziału enancjomerów związków modelowych. W przypadku 2,6-DKP optymalne stężenie C4, dla którego się uzyskuje najkorzystniejszą wartość R_s , wynosi 1 mM. Najwłaściwszą i najbardziej odpowiednią metodą do rozdziału enancjomerów cyklopentolatu jest zastosowanie układu podwójnego złożonego z 20 mM β -CD i 1 mM C8. Ta metoda pozwala uzyskać zadawalający współczynnik rozdziału enancjomerów cyklopentolatu ($R_s = 2,46$) przy stosunkowo krótkim czasie analizy ($t_{r1} = 26,59$, $t_{r2} = 32,77$).



Rys. 6.11 Zależność współczynnika rozdzielania enancjomerów od stężenia OPI (C4 \blacklozenge , C8 \bullet i C12 \blacktriangle) w obecności 20 mM β -CD.



Rys. 6.12 Zależność współczynnika rozdzielania enancjomerów od stężenia OPI (C4 ◆, C8 ● i C12 ▲) w obecności 20 mM β -CD.

6.7 Badania efektów temperaturowych

Zbadano wpływ temperatury na retencję i rozdział enancjomerów dla wybranego związku modelowego 2,6-DKP w poszczególnych układach. Badania prowadzono w zakresie temperatur 15-40 °C. W pomiarach zastosowano układy modyfikowane: OPI, 15 mM β -CD bez lub z dodatkiem 1 mM OPI. W tym eksperymencie stężenie β -CD jest ograniczone do wartości 15 mM, z powodu słabej rozpuszczalności β -CD w niskich temperaturach.

Obliczono parametry termodynamiczne na podstawie krzywych van't Hoffa w celu uzyskania informacji na temat mechanizmu retencji i separacji enancjomerów. Współczynnik retencji (k), jest związane ze stałą równowagi (K) zgodnie z następującym równaniem [105, 106]:

$$k = K\phi \quad \text{Równ. 6.6}$$

w którym ϕ oznacza stosunek faz (stosunek objętości fazy stacjonarnej do objętości fazy ruchome). Stała równowagi jest funkcją różnicy energii swobodnej Gibbsa (ΔG°) analitu, co można przedstawić za pomocą wzoru:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{Równ. 6.7}$$

gdzie ΔH° i ΔS° są odpowiednio standardową entalpią i entropią przejścia analitu z fazy ruchomej do stacjonarnej, R to stała gazowa, zaś T oznacza temperaturę.

Przekształcając to równanie otrzymujemy następującą zależność dla procesu chromatograficznego:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi \quad \text{Równ. 6.8}$$

Parametry termodynamiczne w przypadku separacji dwóch enancjomerów można przedstawić za pomocą następującego równania:

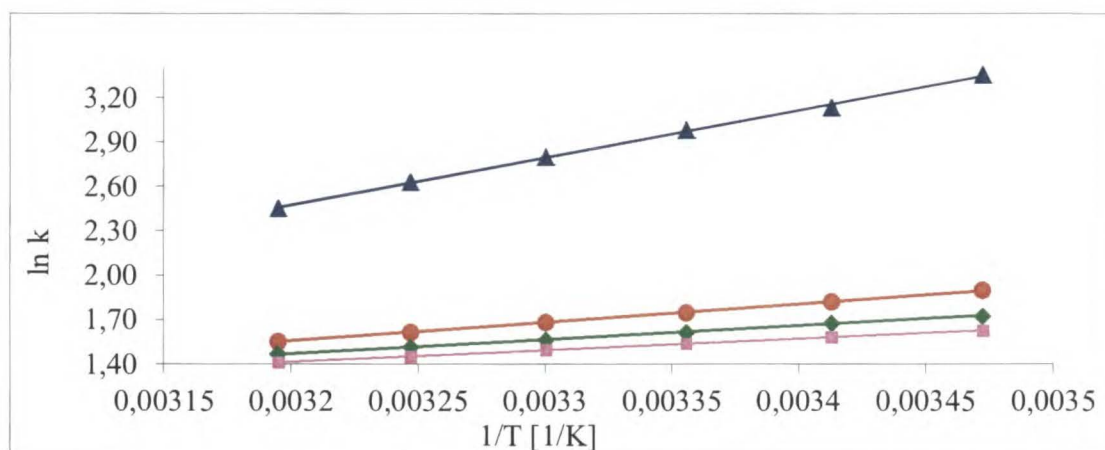
$$\ln \alpha = \ln \frac{k_2}{k_1} = -\frac{\Delta\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta\Delta S^\circ}{R} \quad \text{Równ. 6.9}$$

gdzie $\Delta\Delta H^\circ$ i $\Delta\Delta S^\circ$ są odpowiednio różnicami molowej entalpii i entropii dwóch enancjomerów.

6.8 Wpływ temperatury na retencję związków w badanych układach

Na Rys 6.13 przedstawiono wykresy liniowe van't Hoff uzyskane dla 2,6-DKP w układach bez lub z dodatkiem 1 mM OPI. W miarę wzrostu temperatury maleje adsorpcja analitu na fazie

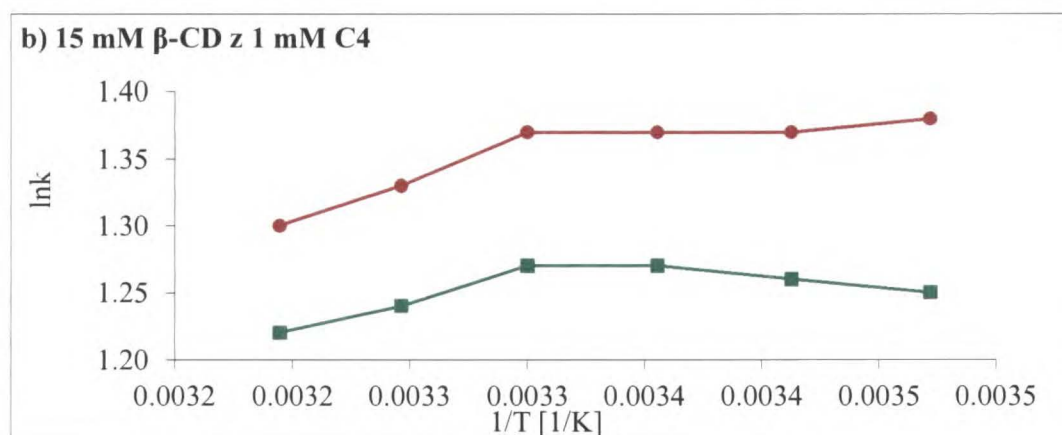
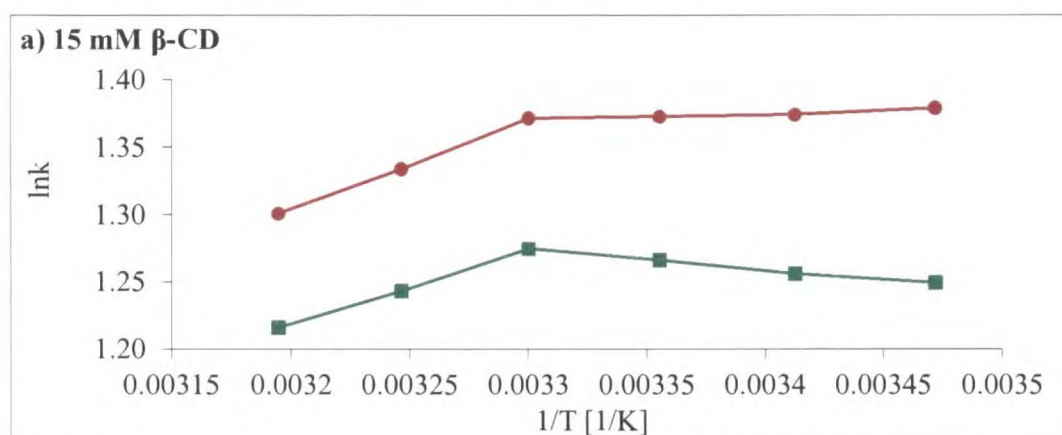
stacjonarnej i maleje kompleksowanie analitu z OPI, zatem proces zatrzymywania przez fazę stacjonarną jest coraz słabszy. Dla układów bez i z dodatkiem 1 mM OPI (C4, C8, C12) wzrost temperatury powoduje spadek wartości współczynnika retencji.

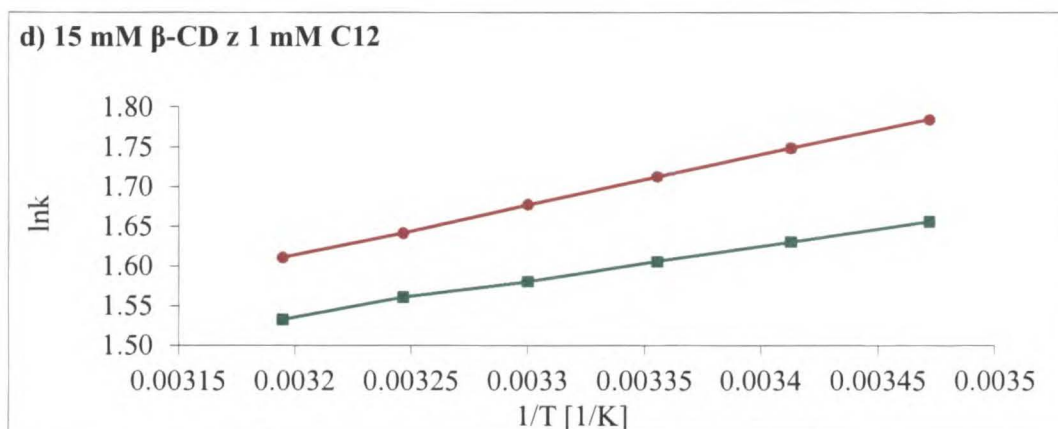
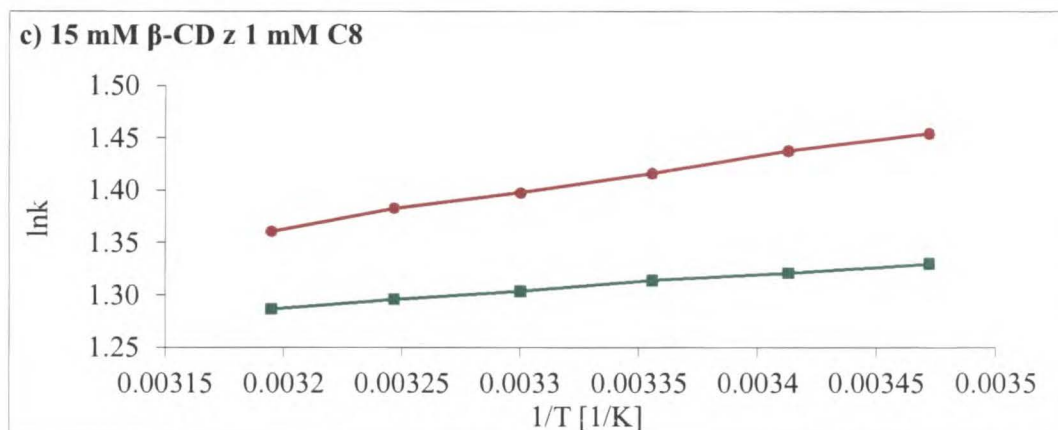


Rys. 6.13 Zależność $\ln k$ w funkcji $1/T$ wyznaczona w układach: bez OPI ■, z 1 mM C4 ◆, z 1 mM C8 ● i 1 mM C12 ▲ dla 2,6-DKP.

Na Rys 6.14 przedstawiono wykresy liniowe van't Hoff uzyskane dla 2,6-DKP w układach modyfikowanych β -CD z dodatkiem 1 mM OPI. Dla układów modyfikowanych β -CD bez lub z dodatkiem 1 mM C4 zaobserwowano odchylenia od liniowej zależności van't Hoffa (Rys. 6.14 a i b). W zakresie temperatur od 15 do 25 °C współczynnik retencji rośnie wraz ze wzrostem temperatury, natomiast w zakresie temperatur od 25 do 40 °C odnotowano spadek wartości współczynnika retencji wraz ze wzrostem temperatury. Dla fazy ruchomej zawierającej C8 z β -CD i C12 z β -CD $\ln k$ liniowo rośnie wraz ze wzrostem wartości $1/T$. W prezentowanych fazach ruchomych zawierających β -CD współczynniki retencji zależą od dwóch procesów, które zachodzą w dwóch różnych fazach: procesu kompleksowania w fazie ruchomej i procesu oddziaływania z fazą stacjonarną. Stwierdzono poprzednio że [102], kiedy entalpia kompleksowania w fazie ruchomej jest bardziej ujemna niż entalpia interakcji z fazą stacjonarną, obserwowany jest "normalny" przebieg zależności Van't Hoff (spadek retencji wraz ze wzrostem temperatury). Natomiast, kiedy entalpia kompleksowania w fazie ruchomej jest bardziej ujemna niż entalpia oddziaływania z fazą stacjonarną obserwowany jest wzrost retencji wraz ze wzrostem temperatury. Wydaje się, że dla faz ruchomych zawierających β -CD z C4 i β -CD w niższym zakresie temperatur

(od 15 do 25 °C) dominuje proces kompleksowania w fazie ruchomej, a w zakresie temperatur od 25 do 40 °C większą rolę odgrywa oddziaływanie z fazą stacjonarną. Dla fazy ruchomej z β -CD zawierającej C8 lub C12 proces oddziaływania z fazą stacjonarną przeważa nad procesem kompleksowania w fazie ruchomej w całym badanym zakresie temperatur. Potwierdza to fakt, iż stała trwałości kompleksu 2,6-DKP-C4- β -CD jest 2-3 razy wyższa, niż stałe trwałości kompleksów 2,6-DKP-C8- β CD-i 2, 6-12-DKP β -CD (Tab. 6.1).





Rys. 6.14 Zależność $\ln k$ w funkcji $1/T$ wyznaczona w układach: a) 15 mM β -CD, b) 15 mM β -CD i 1 mM C4 c) 15 mM β -CD i 1 mM C8, d) 15 mM β -CD i 1 mM C12 dla \bullet (R,R)-2,6-DKP i \blacksquare (S,S)-2,6-DKP.

Z nachylenia prostych przedstawionych na rysunku 6.14 wyliczono wartości ΔH° , zaś z punktu przecięcia wyznaczono wartości $\Delta S^\circ + \ln$. Obliczone dane termodynamiczne zestawiono w postaci Tab. 6.3. Analiza termodynamicznych parametrów dla układów z dodatkiem OPI wykazała, że zwiększenie długości łańcucha alkilowego w cząsteczce OPI powoduje wzrost zmian entalpii przejścia enancjomerów między fazą ruchomą i stacjonarną. Dodatek OPI wzmacnia oddziaływanie enancjomerów z fazą stacjonarną. Odtwarza się to we współczynnikach retencji, które wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego w cząsteczce OPI wydłużają się.

Tab. 6.3 Parametry termodynamiczne procesu asocjacji 2,6-DKP na fazie stacjonarnej dla wybranych układów.

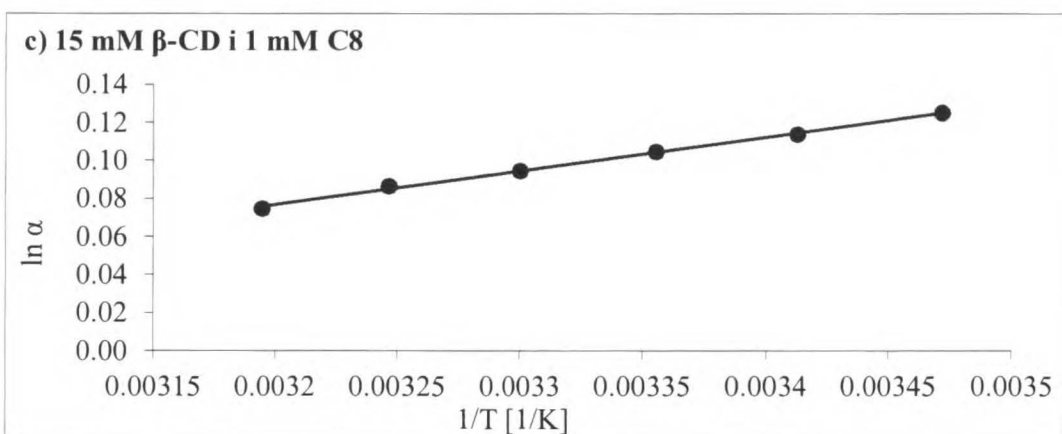
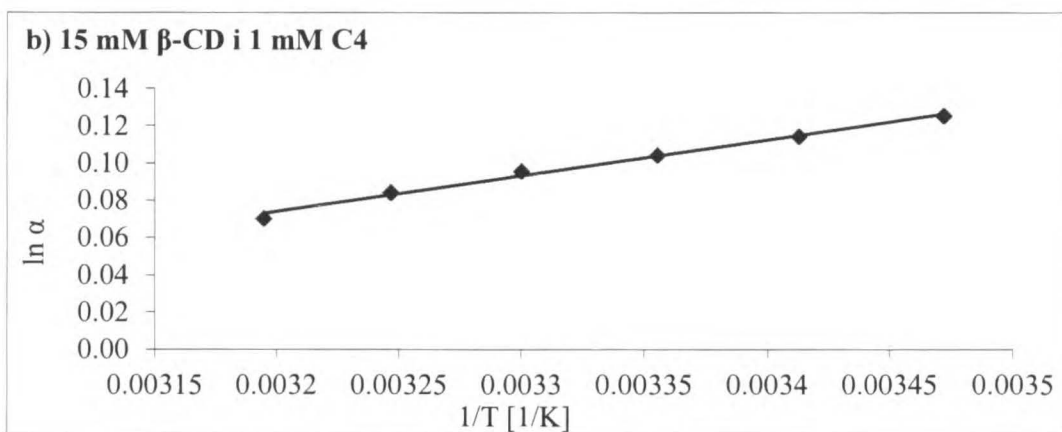
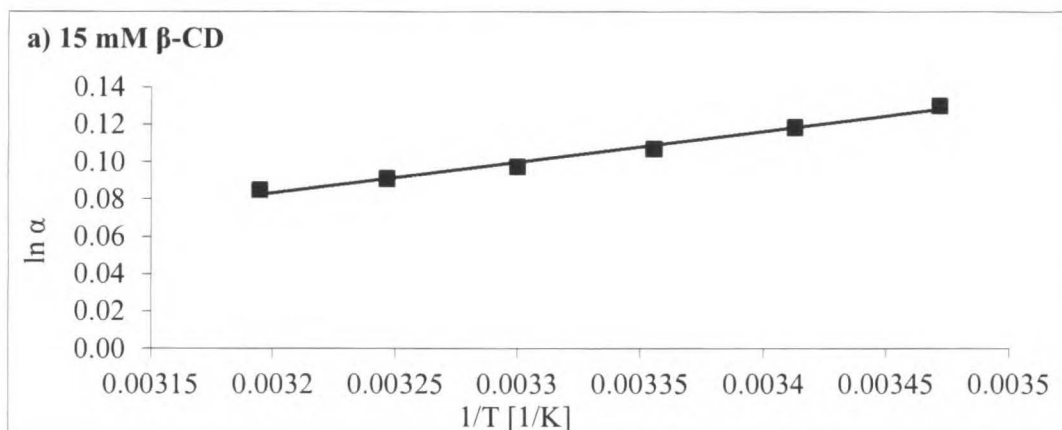
	Skład fazy ruchomej	ΔH° [kJ · mol ⁻¹]	$\Delta S^\circ + \ln$ [J · mol ⁻¹ · K ⁻¹]	R ²
2,6-DKP	20% EtOH	- 6,60	- 1,10	0,999
2,6-DKP	C4	- 7,76	- 1,51	0,998
2,6-DKP	C8	- 10,30	- 2,40	0,999
2,6-DKP	C12	- 26,58	- 6,75	0,998
(<i>R,R</i>)-2,6-DKP	β -CD i C8	- 2,79	0,10	0,997
(<i>S,S</i>)-2,6-DKP	β -CD i C8	- 1,29	0,14	0,997
(<i>R,R</i>)-2,6-DKP	β -CD i C12	- 5,24	0,29	0,999
(<i>S,S</i>)-2,6-DKP	β -CD i C12	- 3,69	0,79	0,998

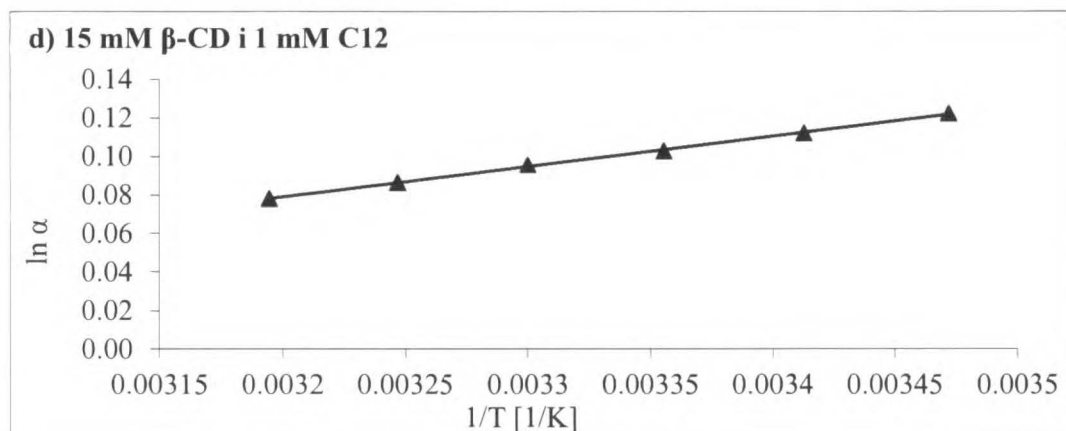
W analizowanych układach wraz ze wzrostem hydrofobowości OPI rośnie stopień uporządkowania molekularnego procesu adsorpcji analitu na fazie stacjonarnej, dzieje się to kosztem wzrostu wyrażenia $|\Delta S^\circ + \ln|$.

Dla analizowanych układów pojedynczych ΔH° i ΔS° przyjmują wartości ujemne. Zatem czynnikiem determinującym oddziaływania analitu z fazą stacjonarną jest czynnik entalpowy. Zastosowanie połączenia β -CD z OPI wpłynęło na zmianę właściwości procesu.

6.8.1 Wpływ temperatury na enancjoseparację związków w badanych układach

Na rysunku 6.15 przedstawiono wykresy $\ln \alpha$ od $1/T$ dla 2,6-DKP w badanych układach. Otrzymane zależności są liniowe w całym zakresie badanych temperatur (15-40 °C). Otrzymane wyniki wskazują, iż enancjoselektywność 2,6-DKP maleje wraz ze wzrostem temperatury we wszystkich badanych układach. W trakcie badania efektów temperaturowych nie odnotowano zmiany kolejności wymywania enancjomerów.





Rys. 6.15 Zależność $\ln \alpha$ w funkcji $1/T$ w układach: a) 15 mM β -CD, b) 15 mM β -CD i 1 mM C4 c) 15 mM β -CD i 1 mM C8, d) 15 mM β -CD i 1 mM C12 dla enancjomerów 2,6-DKP.

Dane termodynamiczne dla procesu enancjoseparacji 2,6-DKP przedstawiono w Tab.6.4. Dla wszystkich badanych układów $\Delta\Delta H^\circ$ i $\Delta\Delta S^\circ$ przyjmują wartości ujemne. Zatem czynnikiem determinującym proces enancjoseparacji jest czynnik entalpowy.

Porównując $\Delta\Delta G^\circ$ w zależności od składu fazy ruchomej, można zauważyć, że zastosowanie połączenia C8 lub C12 z β -CD powoduje zmniejszenie zmian entalpii swobodnej. Może to oznaczać, że domieszka C8 i C12 wpływa niekorzystnie na enancjoselektywność układu. Natomiast użycie dodatku C4 do fazy ruchomej z β -CD wpłynęło korzystnie na różnicę zmian entalpii swobodnej kompleksowania dwóch enancjomerów. Świadczy to o większej zdolności rozpoznania chiralnego układu złożonego z β -CD i C4, niż układu pojedynczego.

Tab. 6.4 Parametry termodynamiczne procesu enancjoseparacji wyznaczone dla 2,6-DKP w badanych układach.

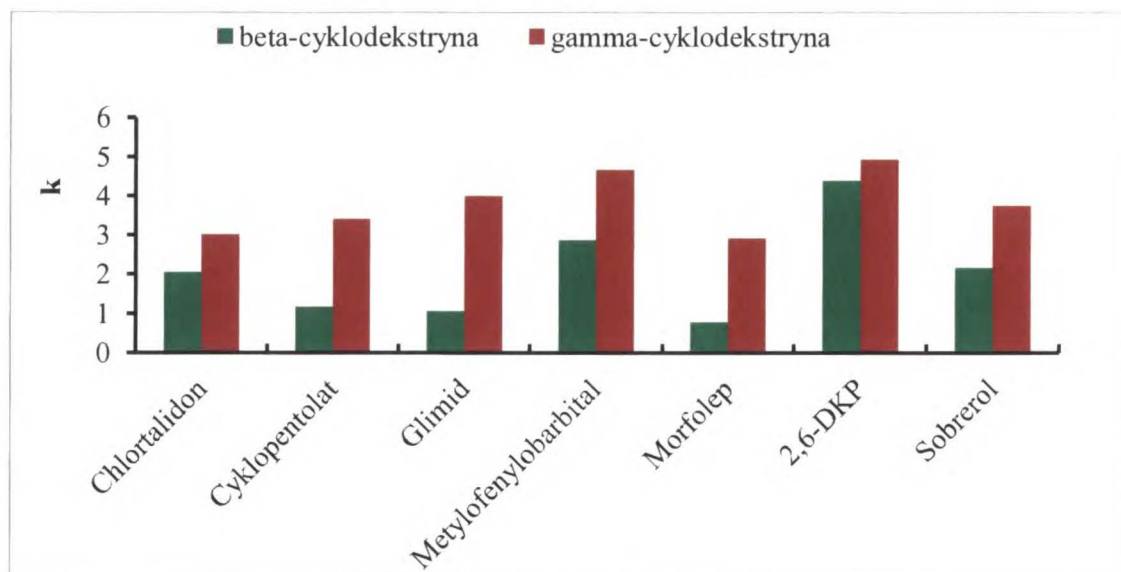
	$\Delta\Delta H^\circ$ [kJ · mol ⁻¹]	$\Delta\Delta S^\circ$ [J · mol ⁻¹ · K ⁻¹]	R ²	$\Delta\Delta G^\circ$ [kJ · mol ⁻¹]
β -CD	- 1,36	- 3,66	0,992	- 0,27
β -CD i C4	- 1,6	- 4,41	0,995	- 0,29
β -CD i C8	- 1,47	- 4,07	0,999	- 0,25
β -CD i C12	- 1,31	- 3,58	0,999	- 0,24

7 ROZDZIELANIE ENANCJOMERÓW W UKŁADZIE γ -CYKLODEKSTRYNA ORAZ ODCZYNNIKI PAR JONOWYCH, JAKO SKŁADNIKI FAZY RUCHOMEJ W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

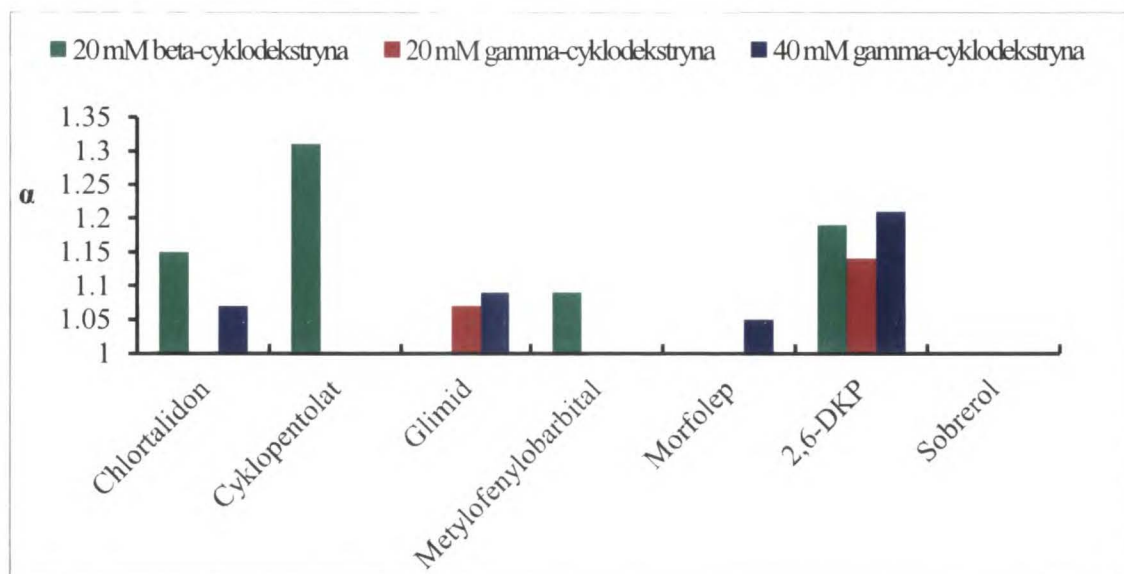
7.1 Porównywanie układów modyfikowanych β -cyklodekstryną i γ -cyklodekstryną

W celu porównania układów z dodatkiem β -CD i γ -CD wyznaczono podstawowe parametry chromatograficzne: współczynnik retencji (k), enancjoselektywność (α) oraz wyznaczono stałe trwałości kompleksów.

Rysunek 7.1 przedstawia zestawienie współczynników retencji (k) związków modelowych w układzie z β -CD i γ -CD. Na podstawie przedstawionych danych można zauważyć, że współczynniki retencji wszystkich związków modelowych są niższe dla β -CD niż γ -CD. Powyższe zjawisko może być związane z tworzeniem bardziej trwałych kompleksów związków modelowych z β -CD niż γ -CD. Wpływ cyklodekstryny na retencje jest tym silniejszy im trwalsze tworzy ona kompleksy.

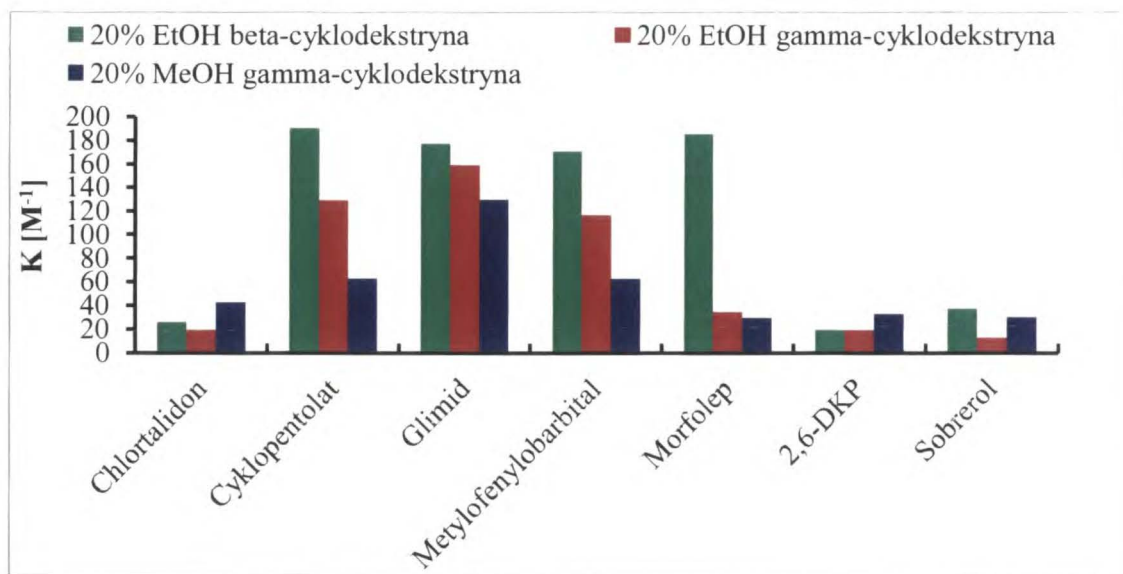


Rys. 7.1 Porównanie współczynnik retencji (k) związków modelowych w układzie z β -CD i γ -CD. Warunki chromatograficzne: kolumna 250 x 1 mm z wypełnieniem C18(2) o średnicy ziarna 5 μ m; przepływ 0,04 ml/min, detektor UV-VIS (220 nm); eluent EtOH/H₂O (20 / 80 v / v) o pH 2,5 z dodatkiem 20 mM β -CD lub γ -CD.



Rys. 7.2 Porównanie zdolności chiralnego rozpoznania enancjomerów związków modelowych przez β -CD i γ -CD. Warunki chromatograficzne: kolumna 250 x 1 mm z wypełnieniem C18(2) o średnicy ziarna 5 μ m; przepływ 0,04 ml / min, detektor UV-VIS (220 nm); eluent 1) EtOH / H₂O (20 / 80 v / v) o pH 2,5 z dodatkiem 20 mM β -CD lub 20 mM γ -CD, 2) MeOH/H₂O (20 / 80 v / v) o pH 2,5 z dodatkiem 40 mM γ -CD

Na rysunku 7.2 przedstawiono wartości α związków modelowych uzyskanych w układach modyfikowanych β -CD lub γ -CD. Przy wartości stężenia 20 mM CD, większa ilość chiralnych związków ulega podziałowi z β -CD niż z γ -CD. Jednakże γ -CD wykazuje bardzo dobrą rozpuszczalność w wodnym roztworze metanolu. Zastąpienie 20 % wodnego roztworu etanolu, roztworem metanolowym umożliwiło zwiększenie stężenia γ -CD (z 20 mM do 40 mM) w fazie ruchomej. W wyniku tej czynności uzyskano dodatkowy rozdział enancjomerów chlortalidonu i morfolepu oraz otrzymano znaczącą poprawę rozdziału enancjomerów glimidu i 2,6-DKP. Biorąc pod uwagę ten fakt w dalszych badaniach stosowano, jako fazę ruchomą 20% wodny roztwór metanolu modyfikowany γ -CD.



Rys. 7.3 Porównanie stałych trwałości kompleksów (K) związków modelowych z β -CD i γ -CD. Warunki chromatograficzne: kolumna 250 x 1 mm z wypełnieniem C18(2) o średnicy ziarna 5 μ m; przepływ 0,04 ml/min, detektor UV-VIS (220 nm); eluent 1) EtOH / H₂O (20 / 80 v / v) o pH 2,5 z odpowiednim dodatkiem β -CD lub γ -CD, 2) MeOH/H₂O (20 / 80 v / v) o pH 2,5 z odpowiednim dodatkiem γ -CD

W celu porównania zdolności γ -CD i β -CD do tworzenia kompleksów inkluzyjnych ze związkami modelowymi, wyznaczono stałe trwałości kompleksów z γ -CD. Analogiczne pomiary przeprowadzone z udziałem β -CD opisano w rozdziale 6.3.1.

Rysunek 7.3 przedstawia zestawienie stałych trwałości kompleksów (K) związków modelowych z β -CD i γ -CD. Na podstawie przedstawionych danych można zauważyć, że wszystkie badane związki są zdolne do tworzenia kompleksów z β -CD i γ -CD. Podczas tworzenia kompleksu cyklodekstryn z innymi cząsteczkami, rozmiar luki odgrywa bardzo ważną rolę. Stałe trwałości tych kompleksów są niższe dla γ -CD niż β -CD. Prawdopodobnie wskazuje to na nieprecyzyjne wkomponowanie związków do luki γ -CD.

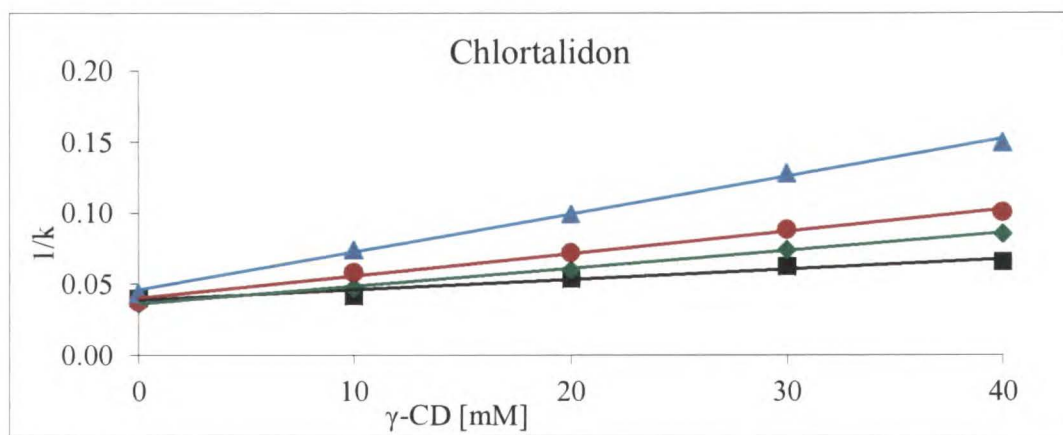
Warto również zauważyć, że istotny jest wpływ rodzaju modyfikatora organicznego w eluencie na wartość stałych trwałości kompleksów (K) związków modelowych z γ -CD.

7.2 Wpływ stężenia γ -cyklodekstryny na retencję w obecności odczynników par jonowych

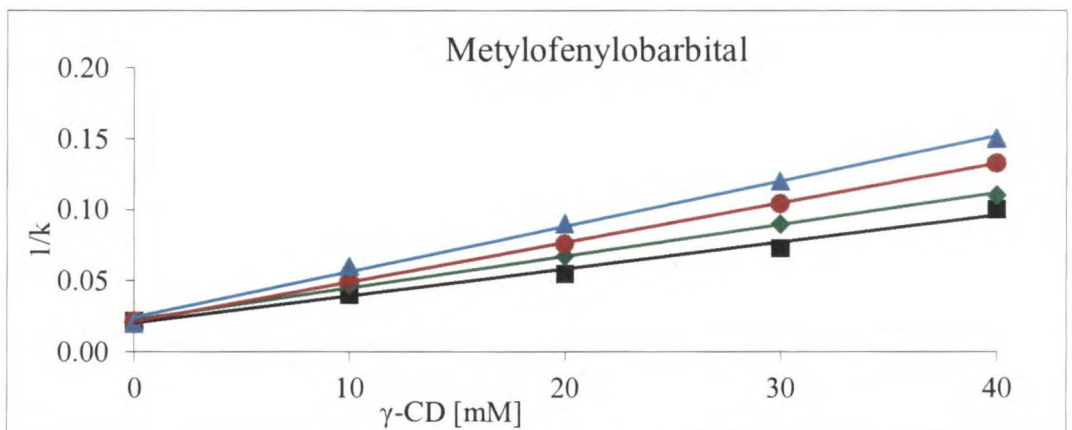
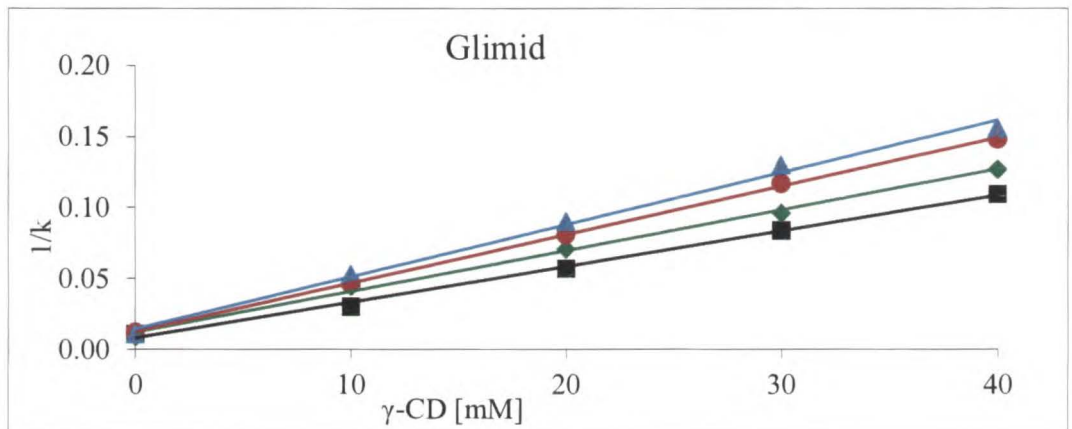
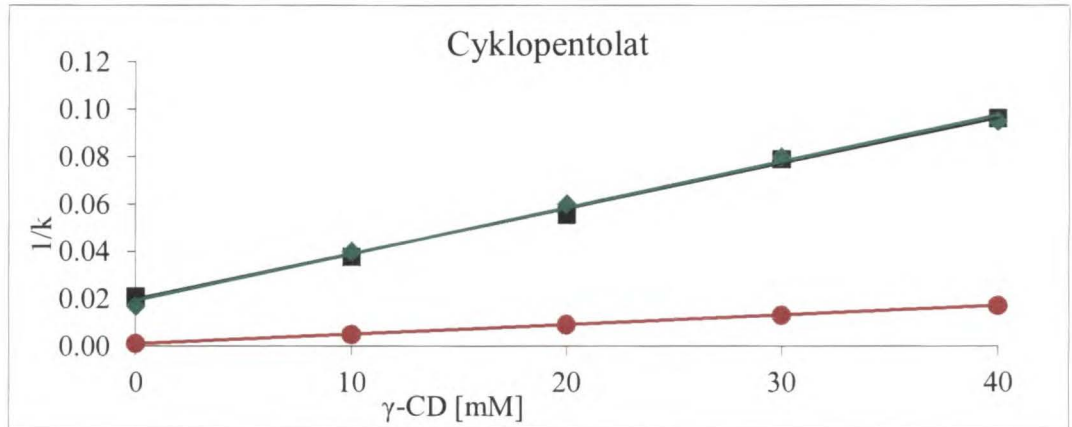
Wpływ stężenia γ -CD na retencję związków modelowych badano przy stałym stężeniu OPI (1 mM). Stężenie γ -CD zmieniano w zakresie 0-40 mM. Rysunki 7.4 od 7.6 do przedstawiają zależność odwrotności współczynnika retencji ($1/k$) enancjomerów wymywanych z kolumny jako pierwsze od stężenia γ -CD bez i z dodatkiem OPI.

Dla wszystkich badanych związków w układzie pojedynczym (γ -CD) odnotowano typowy przebieg zależności. Wraz ze wzrostem stężenia γ -CD obserwowano spadek retencji. Wskutek zastosowania dodatku OPI do układu modyfikowanego γ -CD otrzymano skrócenie czasów elucji większości badanych analitów. Otrzymano następujące powiązanie, im dłuższy łańcuch alkilowy OPI tym krótszy czas retencji. Prawdopodobnie wynika to z faktu, iż związki modelowe są silniej kompleksowane przez γ -CD w obecności OPI.

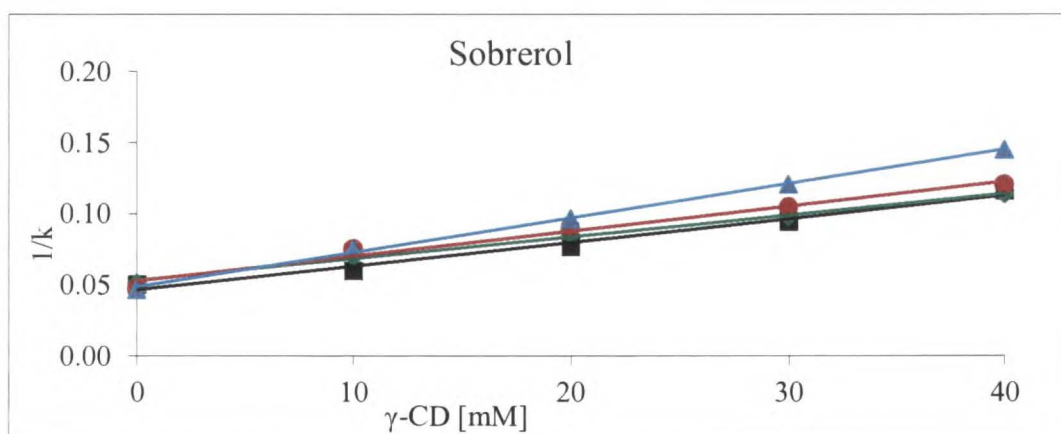
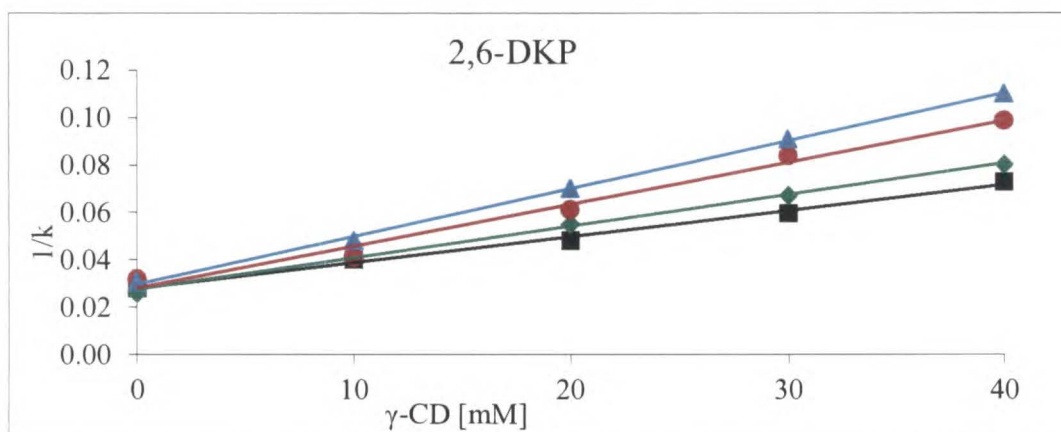
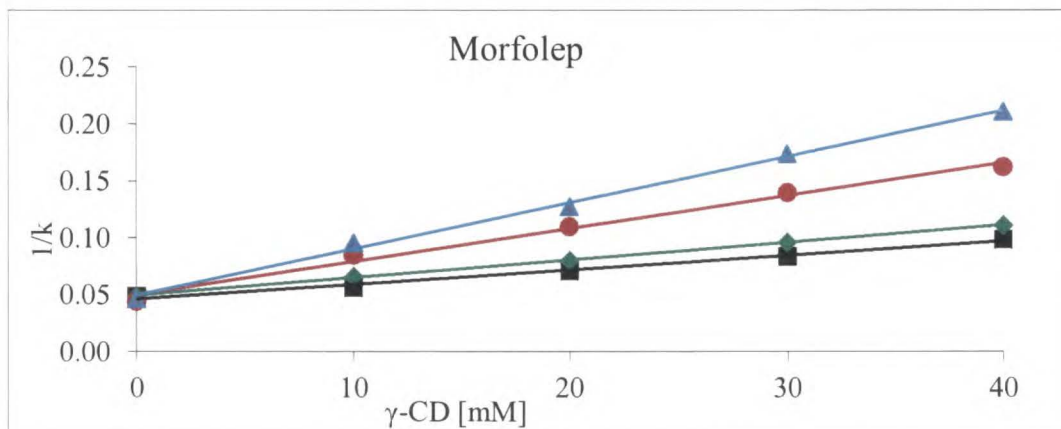
Natomiast cyklopentolat cechuje odmienne zachowanie od pozostałych badanych związków. Zaobserwowano intensywny wzrost retencji wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego OPI. Czas retencji cyklopentolatu w układzie z dodatkiem 1 mM C12 nie został oznaczony z powodu zbyt długiego czasu elucji ($t_r > 1200$ min).



Rys. 7.4 Zależność odwrotności współczynnika retencji od stężenia γ -CD bez dodatku OPI ■ lub w obecności 1 mM C4 ◆, C8 ● i C12 ▲.



Rys. 7.5 Zależność odwrotności współczynnika retencji od stężenia γ -CD bez dodatku OPI ■ lub w obecności 1 mM C4 ◆, C8 ● i C12 ▲.



Rys. 7.6 Zależność odwrotności współczynnika retencji od stężenia γ -CD bez dodatku OPI ■ lub w obecności 1 mM C4 ◆, C8 ● i C12 ▲.

7.2.1 Szacowanie stałych trwałości kompleksów

7.2.1.1 Stałe trwałości kompleksów badanych związków z γ -CD w obecności odczynników par jonowych

Tabela 7.1 podaje stałe trwałości kompleksów (K), które obliczono z nachylenia prostych przedstawionych na rysunkach od 7.3 do 7.5. Stałe trwałości kompleksów potrójnych wyznaczono z równania (6.5) dla faz ruchomych z dodatkiem OPI.

Tab. 7.1 Stałe trwałości kompleksów badanych związków z γ -CD w obecności 1mM OPI. Warunki chromatograficzne: kolumna 250 x 1 mm z wypełnieniem C18(2) o średnicy ziarna 5 μ m; przepływ 0,04 ml / min, detektor UV-VIS (220 nm); eluent MeOH / H₂O (20 / 80 v / v) o pH 2,5 z dodatkiem γ -CD i 1 mM OPI.

K [M ⁻¹]	γ -CD i C4	γ -CD i C8	γ -CD i C12
Chlortalidon	$0,311 \times 10^5$	$0,331 \times 10^5$	$0,493 \times 10^5$
	$0,262 \times 10^5$	$0,342 \times 10^5$	$0,351 \times 10^5$
Cyklopentolat	$1,020 \times 10^5$	$3,951 \times 10^5$	-----
Glimid	$2,013 \times 10^5$	$2,279 \times 10^5$	$2,407 \times 10^5$
	$1,775 \times 10^5$	$1,927 \times 10^5$	$2,047 \times 10^5$
Metylofenylobarbital	$1,002 \times 10^5$	$1,319 \times 10^5$	$1,465 \times 10^5$
Morfolep	$0,255 \times 10^5$	$0,266 \times 10^5$	$0,279 \times 10^5$
	$0,232 \times 10^5$	$0,266 \times 10^5$	$0,279 \times 10^5$
2,6-DKP	$0,350 \times 10^5$	$0,469 \times 10^5$	$0,591 \times 10^5$
	$0,231 \times 10^5$	$0,362 \times 10^5$	$0,456 \times 10^5$
Sobrerol	$0,215 \times 10^5$	$0,227 \times 10^5$	$0,230 \times 10^5$

Otrzymane wyniki wskazują, że wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego OPI (od C4 do C12) następuje wzrost trwałości kompleksów γ -CD z wszystkimi badanymi związkami. Wpływ długości łańcucha alkilowego na wartość stałej trwałości kompleksu potrójnego OPI- γ -CD-analit jest odmienny od tego, który zaobserwowano dla kompleksów OPI- β -CD-analit. Dla tego przypadku, wartość stałej potrójnego kompleksu OPI- β -CD-analit malała wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego OPI, co prawdopodobnie wynikało z konkurencyjnego wiązania OPI w luce cyklodekstryny.

7.2.1.2 Stałe trwałości kompleksów odczynników par jonowych z γ -CD

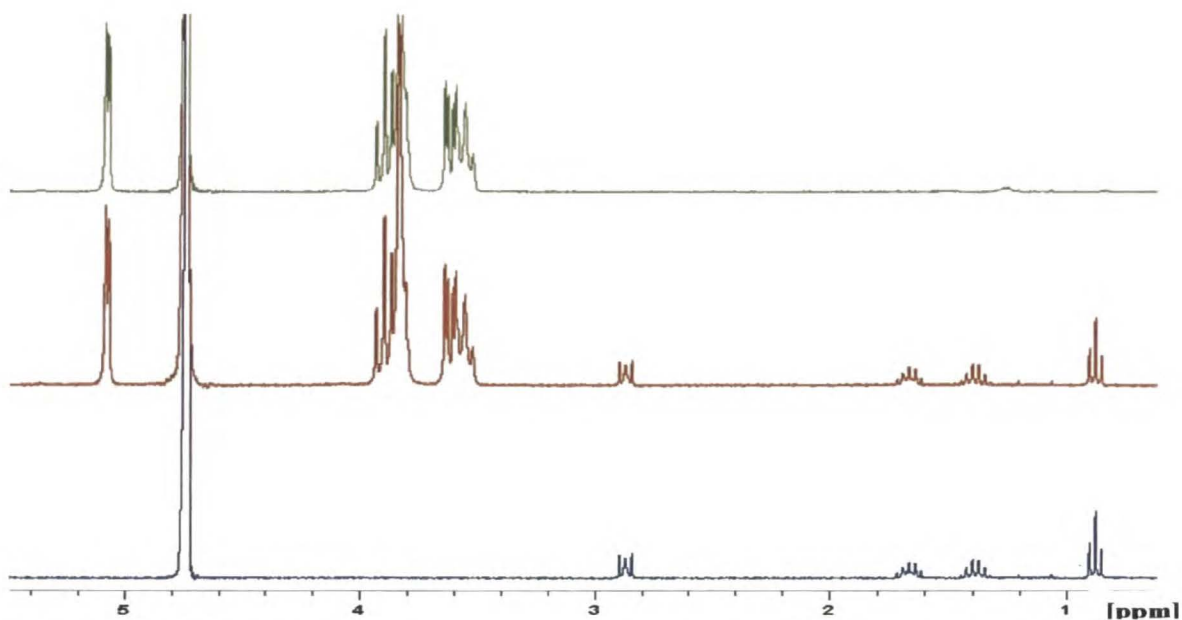
Przesunięcia chemiczne wyznaczone na podstawie pomiarów $^1\text{HNMRC}$ nie wykazały powstawania kompleksów C4 z γ -CD i C8 z γ -CD (Rys. 7.7 i 7.8). Jednakże było możliwe wyznaczenie wartości stałej trwałości kompleksu γ -CD z C12 ($K = 120 \text{ M}^{-1}$) na podstawie widm $^1\text{HNMRC}$ (Rys. 7.9). Wymagało to serii eksperymentów, wykonywanych przy zmiennym stosunku komponentów w roztworze. Zastosowano metodę stosunków molowych, w której stężenie γ -CD pozostawało stałe (1 mM), natomiast zmieniano stężenie C12 w zakresie 0-4 mM. Następnie badano przebieg zależności stosunku molowego $[\text{OPI}] / [\gamma\text{-CD}]$ od wartości zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta = \delta\gamma\text{-CD} - \delta\gamma\text{-CD-C12}$) odpowiadające protonowi H-3 i H-2 γ -CD (Rys. 7.10). Stosując równanie Benesi-Hildebranda [107], wyznaczono wartość K.

$$\frac{1}{K} = \frac{Q \cdot \text{OPI}_0}{\Delta\delta} + \frac{\Delta\delta \cdot \text{CD}_0}{Q} - (\text{CD}_0 + \text{OPI}_0)$$

gdzie $\text{OPI}_0, \text{CD}_0$ oznaczają odpowiednio całkowite stężenie γ -CD i C12, zaś Q jest granicznym przesunięciem chemicznym, definiowanym jako wartość położenia sygnału rezonansowego jednego ze składników kompleksu przy dążącym do nieskończoności nadmiarze drugiego reagenta.

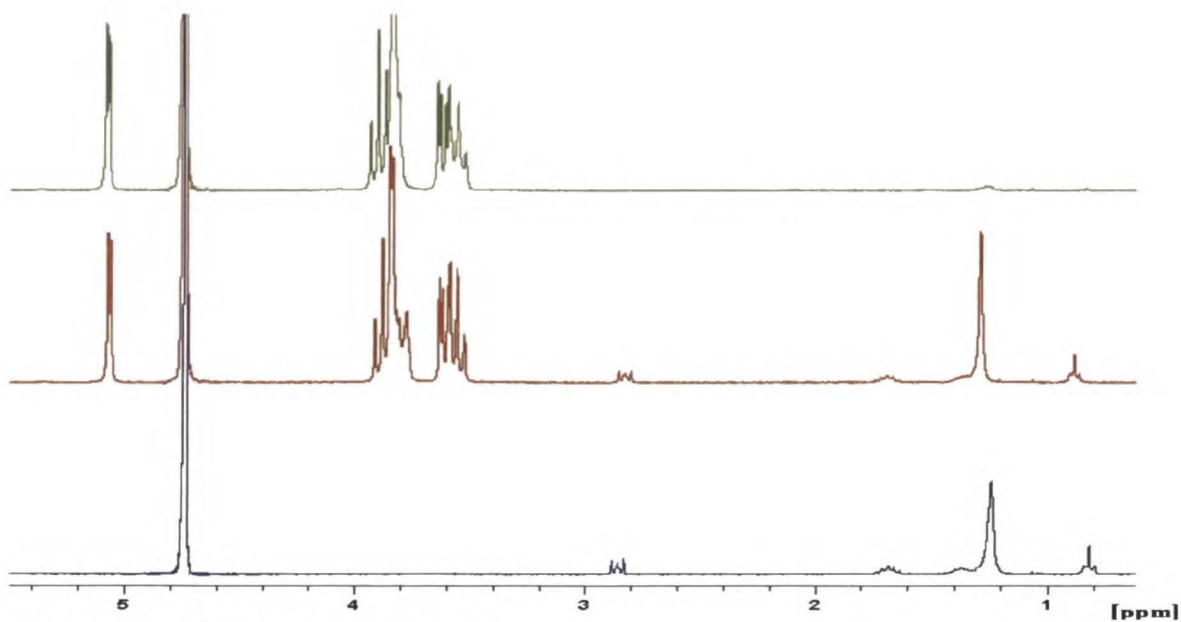
Przeprowadzone badania sugerują, że OPI mogą działać jak "regulatory przestrzeni" w formowaniu trójskładnikowego kompleksu (OPI- γ -CD-analit). Można przypuszczać, że OPI ułatwiają tworzenie trwalszego kompleksu poprzez lepsze dopasowanie do wnęki γ -CD. Podobne zależności zaobserwowano dla kompleksu γ -CD z pirenem w obecności różnych alkoholi [108].

Stałe trwałości kompleksu γ -CD-piren wzrosły gwałtownie wskutek dodatku alkoholi. Cykloheksanol spowodował największy wzrost wartości stałej trwałości kompleksu (37 krotny). Im alkohol jest bardziej hydrofobowy i rozbudowany przestrzennie, tym większa trwałość kompleksu .



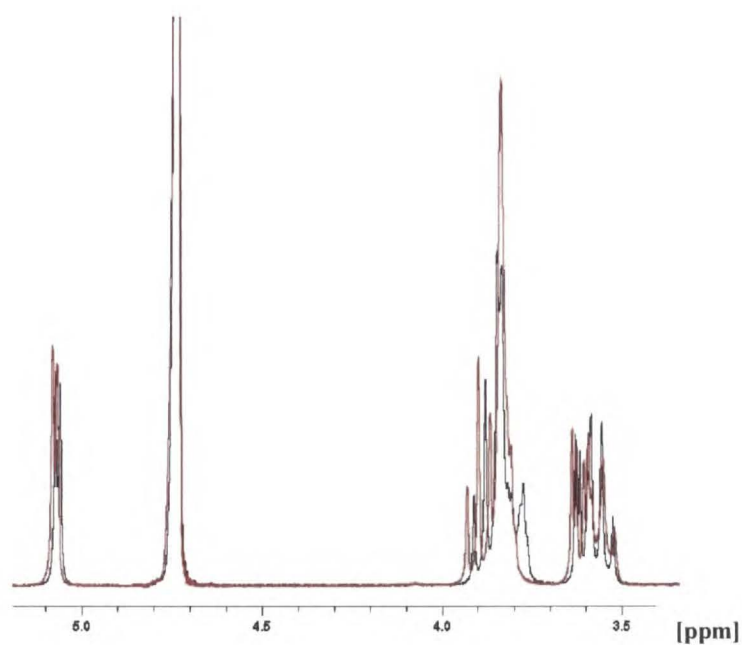
Rys. 7.7 Widmo ¹H NMRC kolejno od góry:

- γ-CD
- γ-CD z C4
- C4

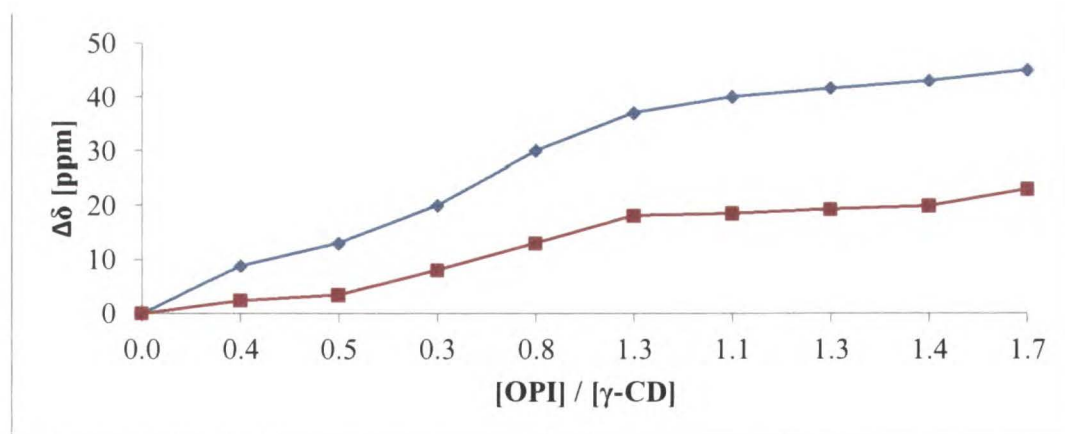


Rys. 7.8 Widmo ¹H NMRC kolejno od góry:

- γ-CD
- γ-CD z C8
- C8



Rys. 7.9 Widmo ^1H NMRC (-) γ -CD i (-) γ -CD z C12.



Rys. 7.10 Przebieg zależności stosunku molowego [OPI] / [γ-CD] od wartości zmiany przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta\gamma\text{-CD} - \delta\gamma\text{-CD-C12}$ odpowiadające protonowi \blacklozenge H-3 i \blacksquare H-2 γ -CD.

7.3 Wpływ rodzaju odczynników par jonowych na zdolność rozróżnienia chiralnego układu modyfikowanego γ -cyklodekstryną.

Wpływ rodzaju OPI na współczynnik retencji k , enancjoselektywność α i rozdzielczość pików R_s związków została zbadana przy niezmiennym stężeniu γ -CD równym 40 mM. Wpływ OPI zbadano dla dwóch stężeń 1 i 5 mM. Wyniki zestawiono w tabeli 7.2.

Analiza danych dla układów γ -CD w połączeniu odpowiednio z C4, C8 i C12 wykazała, że zwiększenie długości łańcucha alkilowego OPI powoduje spadek wartości k , α i R_s . W układzie podwójnym z dodatkiem 5 mM C12 nastąpił zanik rozróżnienia izomerów optycznych morfolepu.

Do wygaszenia oddziaływań stereoselektywnych mógł się przyczynić wzrost stałych trwałości kompleksów związków modelowych z γ -CD w obecności OPI (od C4 do C12). Trwałemu wiązaniu gość-gospodarz nie zawsze musi towarzyszyć wysoka enancjoselektywność. W literaturze istnieją przykłady, kiedy wzrost trwałości kompleksu wywołuje odpowiadający mu spadek enancjoselektywności [109,110]. Rozpoznanie chiralne wymaga dopasowania rozmiarów, kształtów i funkcji nie całych cząsteczek tylko ich fragmentów odpowiedzialnych za oddziaływania stereoselektywne. Rozpoznanie chiralne zależy m. in. od ograniczenia geometrycznego, które jest wynikiem wpływu OPI.

Tab. 7.2 Wpływ długości łańcucha alkilowego OPI na parametry chromatograficzne związków modelowych. Warunki chromatograficzne: kolumna 250 x 1 mm z wypełnieniem C18(2) o średnicy ziarna 5 μm ; przepływ 0,04 ml/min, detektor UV-VIS (220 nm); eluent MeOH / H₂O (20 / 80 v / v) o pH 2,5 z dodatkiem 40 mM γ -CD i 1 mM OPI.

Skład fazy ruchomej	Chlortalidon				Glimid				Morfolep				2,6-DKP			
	k ₁	k ₂	α	R _s	k ₁	k ₂	α	R _s	k ₁	k ₂	α	R _s	k ₁	k ₂	α	R _s
40 mM γ -CD	15,42	16,54	1,07	1,17	12,19	13,13	1,09	1,26	10,17	10,63	1,05	1,08	13,71	16,55	1,21	2,85
40 mM γ -CD z 1 mM C4	15,35	16,50	1,07	1,15	11,95	13,05	1,09	1,16	10,11	10,50	1,04	0,85	13,31	16,14	1,21	2,83
40 mM γ -CD z 5 mM C4	14,98	15,93	1,06	0,85	11,69	12,57	1,08	1,11	10,03	10,35	1,03	0,84	13,28	16,01	1,20	2,71
40 mM γ -CD z 1 mM C8	13,61	14,39	1,06	0,89	11,16	11,97	1,07	1,14	8,51	8,84	1,04	0,84	13,24	15,93	1,20	2,69
40 mM γ -CD z 5 mM C8	12,66	13,30	1,05	0,83	10,07	10,71	1,06	1,07	8,41	8,41	1,00	0,96	13,12	15,61	1,19	2,61
40 mM γ -CD z 1 mM C12	11,55	12,13	1,05	0,85	8,74	9,09	1,04	0,91	8,17	8,37	1,02	0,70	12,61	15,00	1,19	2,66
40 mM γ -CD z 5 mM C12	8,75	9,02	1,03	0,81	7,31	7,50	1,03	0,82	6,44	6,44	1,00	0,00	12,59	14,60	1,16	2,35

8 ROZDZIAŁ ENANCJOMERÓW CYKLOPENTOLATU W EKSTRAKCYI CHIRALNEJ

Przedmiotem badań niniejszej pracy był rozdział enancjomerów cyklopentolatu w ekstrakcji z udziałem dwóch selektorów chiralnych (HP- β -CD w fazie wodnej i D-winianu tertbutylowego).

W ekstrakcji z udziałem jednego selektora chiralnego w fazie organicznej, proces rozdziału enancjomerów polega na tworzeniu dwóch diastereoizomerycznych kompleksów pomiędzy pochodnymi kwasów D- i L- winowego, a enancjomerami R i S w wyniku oddziaływań międzycząsteczkowych, takich jak: wiązania wodorowe, oddziaływania indukcyjne lub elektrostatyczne. Grupa aminowa cyklopentolatu pełni rolę donora protonów, a atom tlenu estru kwasu winowego jest akceptorem. Ponieważ tworzą się wiązania wodorowe pomiędzy enancjomerami cyklopentolatu, a chiralnym selektorem, system można opisać następującymi zależnościami:



lub



Rozdział (*R*)-enancjomeru i (*S*)-enancjomeru może być przypisany głównie różnicy swobodnej energii $-\Delta(\Delta G)$ obu kompleksów w fazie organicznej.

$$\mathbf{-\Delta(\Delta G)_D = -\Delta G_{R-D} - (-\Delta G_{S-D}) = RT \ln \alpha_D} \quad \text{Równ. 8. 5}$$

$$\mathbf{-\Delta(\Delta G)_L = -\Delta G_{R-L} - (-\Delta G_{S-L}) = RT \ln \alpha_L} \quad \text{Równ. 8. 6}$$

W ekstrakcji bez chiralnego selektora w fazie organicznej, a z pochodnymi β -CD w fazie wodnej, otrzymano rozdział enancjomerów cyklopentolatu w wyniku powstawiania dwóch diastereoizomerycznych kompleksów.



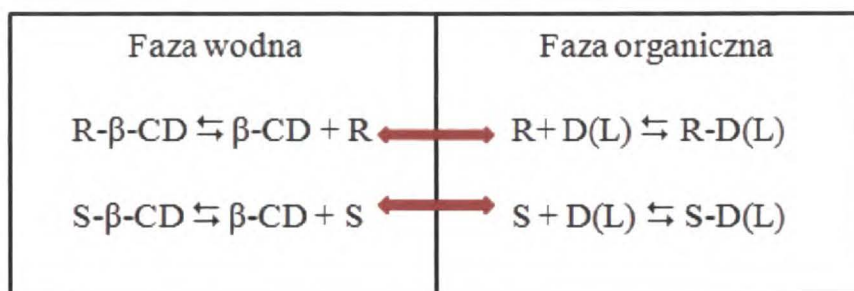
Różnica swobodnej energii $-\Delta(\Delta G)$ pomiędzy dwoma diastereoizomerycznymi kompleksami w fazie wodnej jest opisana równaniem:

$$\mathbf{-\Delta(\Delta G)_{\beta\text{-CD}} = -\Delta G_{S\text{-}\beta\text{-CD}} - (-\Delta G_{R\text{-}\beta\text{-CD}}) = RT \ln \alpha_{\beta\text{-CD}}} \quad \text{Równ. 8. 9}$$

W wielu przypadkach uzyskano poprawę wydajności ekstrakcji stosując połączenie dwóch selektorów chiralnych (pochodnych β -CD w fazie wodnej i pochodnych kwasu winowego w fazie organicznej (Rys. 8.1)) [111112-113]. Siła napędzająca proces ekstrakcji z udziałem dwóch selektorów chiralnych jest opisana następującymi równaniami:

$$-\Delta(\Delta G) = -\Delta(\Delta G)_D - (-\Delta(\Delta G)_{\beta\text{-CD}}) = RT \ln \alpha \quad \text{Równ. 8. 10}$$

$$-\Delta(\Delta G) = -\Delta(\Delta G)_L - (-\Delta(\Delta G)_{\beta\text{-CD}}) = RT \ln \alpha \quad \text{Równ. 8. 11}$$



Rys. 8.1 Schemat rozdziału enancjomerów w dwufazowej ekstrakcji chiralnej.

Jeśli $-\Delta(\Delta G)_D$, $-\Delta(\Delta G)_L$, $-\Delta(\Delta G)_{\beta\text{-CD}}$ są większe od zera, to siła napędowa $-\Delta(\Delta G)$ rozdziału enancjomerów cyklopentolatu jest wyższa w ekstrakcji przy zastosowaniu dwóch selektorów chiralnych niż z udziałem jednego selektora chiralnego. W rezultacie, otrzymane wartości α są korzystniejsze.

8.1 Metoda identyfikacji enancjomerów cyklopentolatu w fazie organicznej.

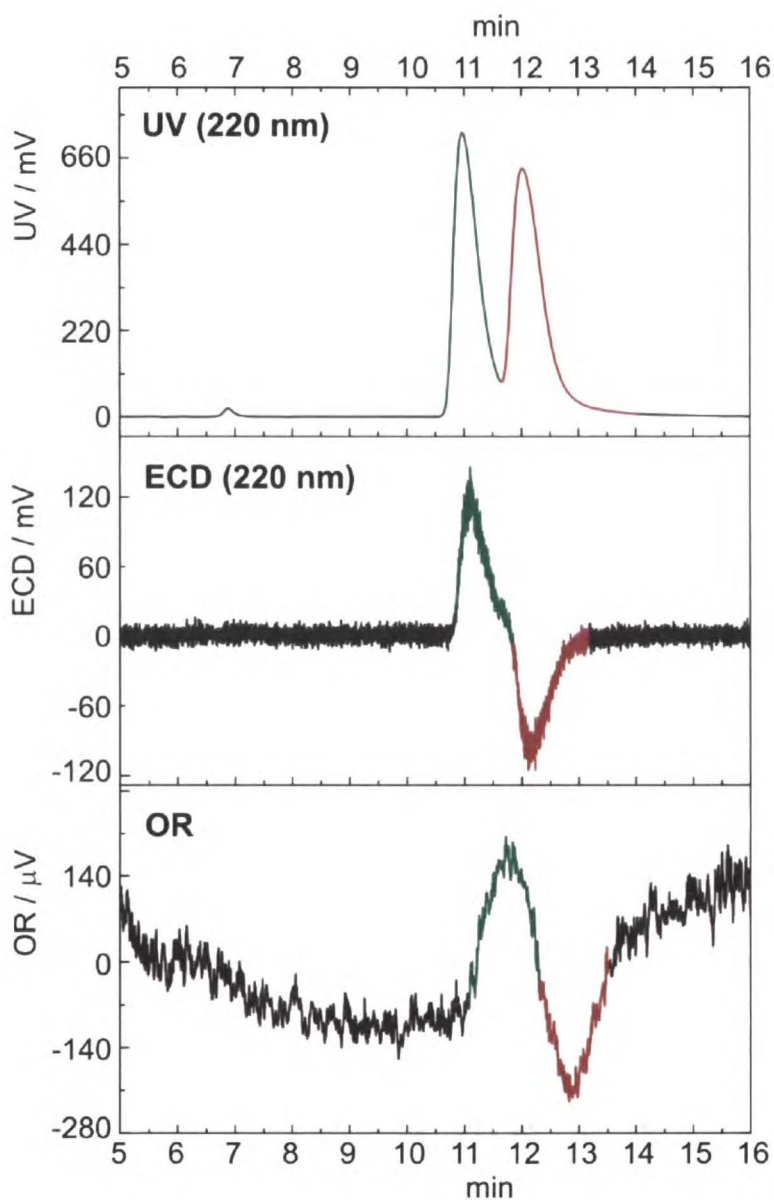
Cyklopentolat jest powszechnie używany w badaniach pediatrycznych wzroku [114] wyłącznie w postaci racemicznej. Do tej pory nie zbadano aktywności biologicznej obu enancjomerów cyklopentolatu oraz nie opisano metody identyfikacji enancjomerów.

Analiza ilościowa enancjomerów została przeprowadzona z fazy wodnej metodą chiralnej chromatografii cieczowej (opisaną w rozdziale 4.5). W celu określenia, w który z enancjomerów została wzbogacona faza organiczna opracowano metodę identyfikacji enancjomerów z fazy organicznej. Rozdział enancjomerów przeprowadzono w układzie faz normalnych stosując dwa detektory chiralne ECD (elektronowy dichroizmu kołowego) i OR (rotacji optycznej). Pierwszy

eluowany enancjomer scharakteryzowany jest przez pozytywną wartość ECD i OR, podczas gdy drugi jest opisany przez negatywną wartość (Rys. 8.2). Absolutną konfigurację enancjomerów cyklopentolatu określono na podstawie porównania widm doświadczalnych i obliczeniowych ECD i OR. Obliczenia kwantowo-mechaniczne wykonano metodami funkcjonalów gęstości zależnymi od czasu (DT-DFT, Time Dependent Density Functional Theory) [115,116].

W celu wiarygodnego przyporządkowania konfiguracji absolutnej, najpierw została przeprowadzona dokładna analiza konformacyjna w celu znalezienia konformerów o najniższej energii. Następnie wszystkie konformery zostały zoptymalizowane na B3LYP/6-31G (d) poziomie teorii. W celu doprecyzowania danych, przeprowadzono ponownie optymalizację na wyższym poziomie (B3LYP/aug-cc-pVDZ). W końcowym etapie siedemnaście konformerów w zakresie od 3 kcal/mol ECD zostało wybranych do dalszych obliczeń. Obliczenia przeprowadzono przy długości fali 589 nm.

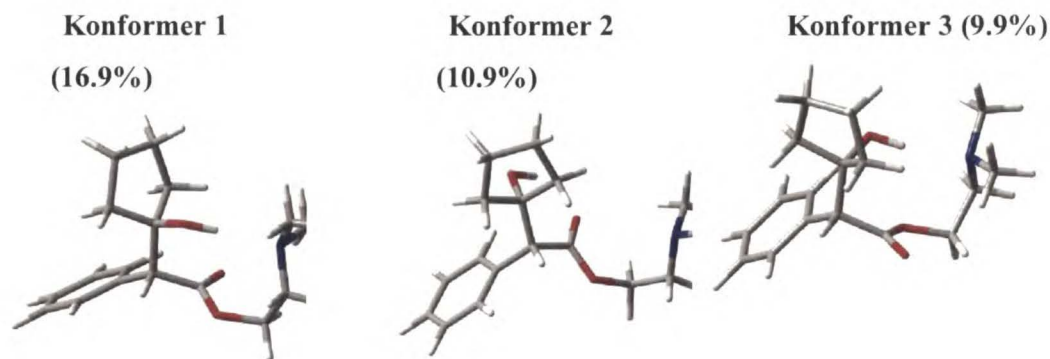
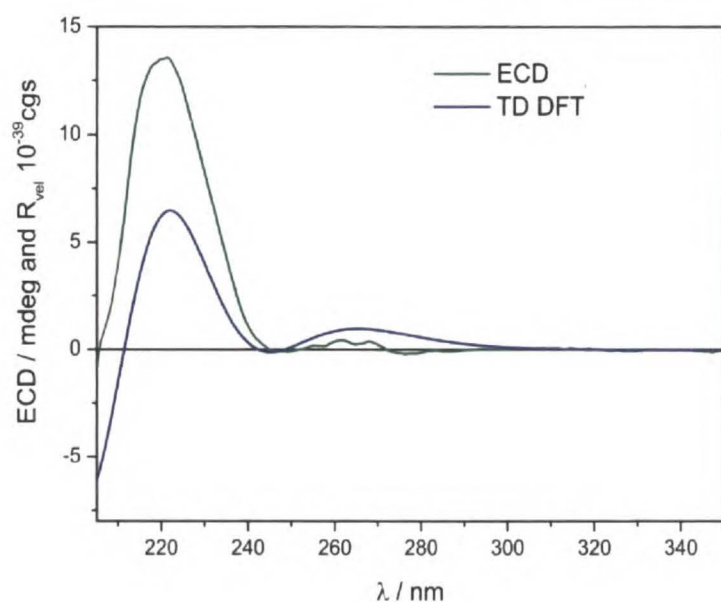
Jak widać na rysunku 8.2, widmo ECD (*R*)-enancjomeru jest adekwatne z widmem otrzymanym doświadczalnie dla pierwszego pików. Dodatkowy dowód pochodzi z obliczeń OR przy długości fali 589 nm, dla tego samego zbioru konformerów. Symulowana wartość średnia Boltzmanna OR jest dodatnia. Podsumowując, połączenie doświadczalnej i teoretycznej analizy ECD i OR danych umożliwiło przypisanie absolutnej konfiguracji (*R*) pierwszemu eluowanemu pikowi i (*S*) drugiemu. Metodę tę wykorzystano do zidentyfikowania enancjomeru przenikającego do fazy organicznej. Nadmiar enancjomeryczny (*R*)-cyklopentolatu był w fazie organicznej.



Rys. 8.2 UV (górny) i ECD (środkowy) i OR (dolny) chromatogramy mieszaniny racemicznej (*R*) – i (*S*)-cyklopentolatu.

Jak wynika z Rys.8.3, widmo ECD dla (*R*)-enancjomeru jest adekwatne z widmem eksperymentalnym dla pierwszego eluowanego piku. Dodatkowy dowód pochodzi z obliczeń OR, dla tego samego zbioru konformerów.

Podsumowując, połączenie doświadczalnej i teoretycznej analizy ECD i OR umożliwiło przypisanie konfiguracji absolutnej (*R*) pierwszemu eluowanemu enancjomerowi i (*S*) drugiemu. Metodę tę wykorzystano do zidentyfikowania enancjomeru przenikającego do fazy organicznej. Nadmiar enancjomeryczny (*R*)-cyklopentolat był w fazie organicznej.



Rys. 8.3 Widmo obliczeniowe ECD na poziomie teorii B3LYP/aug-cc-pVDZ otrzymane jako ważona suma populacji w temperaturze 293 K poszczególnych konformerów (*R*)-cyklopentolatu w odniesieniu do doświadczalnego widma ECD pików eluowanego jako pierwszy ($t_R = 10,9$ min).

8.2 Wpływ rodzaju rozpuszczalnika organicznego na parametry ekstrakcji chiralnej

W Tabeli 8.1 przedstawiono wpływ rodzaju rozpuszczalników organicznych na współczynniki podziału k i enancjoselektywność α . Faza wodna zawierała 0,05 mM racemicznego cyklopentolatu, 0,1 M buforu $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ i 0,1 M HP- β -CD. W fazie organicznej nie występował ekstrahent. Znaczący wpływ rozpuszczalnika organicznego na wydajność procesu ekstrakcji był wcześniej badany [117-119].

Stosując jako fazę organiczną 1,2-dichloroetan uzyskano wysoką wartość α , ale przy bardzo niskim współczynniku podziału. Prawdopodobnie wynika to z faktu, iż cyklopentolat jest słabo ekstrahowany do tej fazy organicznej.

Zastosowania alkoholi jako fazy organicznej spowodowało poprawę współczynnika podziału. Zaobserwowano dla badanej grupy alkoholi wzmocnienie enancjoselektywności wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego. Rozpuszczalniki organiczne mogą przedostawać się do fazy wodnej tworząc kompleksy inkluzyjne o różnej trwałości z HP- β -CD [120]. Im bardziej hydrofilowy rozpuszczalnik organicznym, tym w większym stężeniu występuje w fazie wodnej. Ponadto, rozpuszczalniki organiczne w fazie wodnej, mogą powodować wypieranie analitu z wnętrza CD. Wynikiem tego procesu jest spadek enancjoselektywności. Dekanol, ze względu na odpowiednią skuteczność procesu wybrano, jako rozpuszczalnik organiczny w chiralnej ekstrakcji cyklopentolatu.

Tab. 8.1 Wpływ rozpuszczalnika organicznego na współczynnik podziału (k) i enancjoselektywność (α). Faza wodna: [HP- β -CD] = 0,10 M, [Cyklopentolat] = 0,05 mM, pH 6,0.

Rozpuszczalnik organiczny	k_R	k_S	α
1,2-Dichloroetan	0,050	0,041	1,22
Heksanol	0,36	0,25	1,41
Heptanol	0,39	0,27	1,46
Oktanol	0,46	0,26	1,75
Dekanol	0,48	0,27	1,83

8.3 Wpływ pochodnych β -cyklodekstryny na parametry chiralnej ekstrakcji

Cyklodekstryny mogą tworzyć kompleksy inkluzyjne z molekułami o kształcie i polaryzacji zgodnej z wymiarami ich wnęki. Cyklopentolat tworzy kompleksy inkluzyjne z następującymi pochodnymi β -CD: HP- β -CD, DM- β -CD, TM- β -CD. Stałe trwałości kompleksów cyklopentolatu z pochodnymi β -CD zostały wyznaczone techniką elektroforezy kapilarnej [121]. Cyklopentolat tworzy najtrwalsze kompleksy z DM- β -CD, zaś najmniej trwale z TM- β -CD. Stała trwałości kompleksu cyklopentolatu z HP- β -CD ma pośrednią wartość.

Współczynniki podziału i enancjoselektywność oznaczano metodą chiralnej ekstrakcji cieczy. Faza wodna zawierała 0,1 M pochodnych β -CD, zaś faza organiczna nie zawierała dodatku pochodnych kwasu winowego. Wyniki przedstawione w tabeli 8.2 wskazują, iż najwyższą enancjoselektywność i wysokie współczynniki podziału osiągnięto stosując HP- β -CD w porównaniu z DM- β -CD i TM- β -CD. W związku z tym, HP- β -CD została wybrana, jako chiralny selektor w fazie wodnej.

Tab. 8.2 Wpływ pochodnych β -CD na współczynnik podziału (k) i enancjoselektywność (α). Faza wodna: [pochodna β -CD] = 0,10 M, [Cyklopentolat] = 0,05 mM, pH 6,0.

Pochodne β -CD	k_R	k_S	α
HP- β -CD	0,52	0,27	1,96
DM- β -CD	0,45	0,30	1,49
TM- β -CD	0,48	0,35	1,33

8.4 Wpływ pochodnych kwasu winowego na parametry chiralnej ekstrakcji

Efektywność chiralnej ekstrakcji zależy od struktury chiralnego selektora. W kolejnym etapie pracy zbadano wpływ rozgałęzienia łańcucha alkilowego pochodnych kwasu winowego na współczynniki podziału i enancjoselektywność. Oznaczono współczynniki podziału i enancjoselektywność techniką chiralnej ekstrakcji stosując 0,1 M HP- β -CD w fazie wodnej i 0,2 M pochodnych kwasu winowego w fazie organicznej.

Tabela 8.3 przedstawia wpływ pochodnych kwasu winowego na współczynnik podziału i enancjoselektywność cyklopentolatu. Można zauważyć, że otrzymano poprawę współczynników podziału i enancjoselektywności poprzez zastosowanie drugiego czynnika chiralnego w fazie organicznej. Wartość k_R jest zawsze wyższa od k_S . Wynik ten oznacza, że pochodne kwasu winowego wykazują silniejsze oddziaływanie z enancjomerem (*R*)-cyklopentolatu, niż (*S*)-cyklopentolatu.

Zaobserwowano również wzrost współczynnika podziału i enancjoselektywności wraz ze zwiększeniem stopnia rozgałęzienia łańcucha alkilowego pochodnych kwasu winowego. Wyniki te są zgodne z obserwacjami poczynionymi przez Preloga [122], iż rozbudowane przestrzennie alkohole wykazują silniejsze i bardziej stereospecyficzne oddziaływania z chiralnymi molekułami. Jednakże różnice w wartościach współczynników podziału i enancjoselektywności są zbyt małe do wyciągnięcia ogólnych wniosków na temat wpływu struktury selektora na mechanizm chiralnego rozpoznania. D-winian tertbutylowy został wybrany jako chiralny selektor w fazie organicznej.

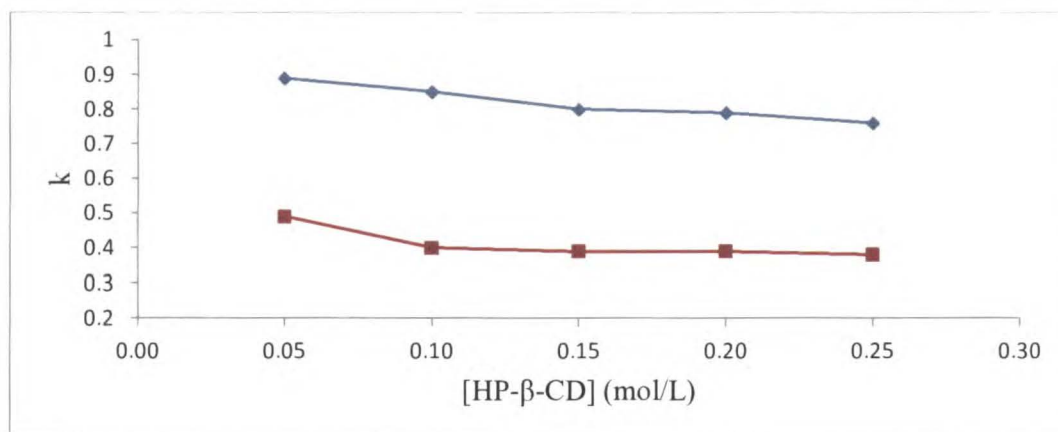
Tab. 8.3 Wpływ pochodnych kwasu winowego na współczynnik podziału (k) i enancjoselektywność (α). Faza wodna: [HP- β -CD] = 0,10 M, [Cyklopentolat] = 0,05 mM, pH 6,0. Faza organiczna: [Pochodna kwasu winowego] = 0,2 M.

Pochodne kwasu winowego	k_R	k_S	α
L-winian etylu	0,67	0,34	1,97
D-winian etylu	0,75	0,38	1,98
L-winian butylu	0,66	0,34	1,94
D-winian butylu	0,68	0,35	1,95
L-winian isobutylu	0,82	0,40	2,02
D-winian isobutylu	0,85	0,42	2,06
L-winian tertbutylu	0,82	0,39	2,09
D-winian tertbutylu	0,85	0,40	2,13

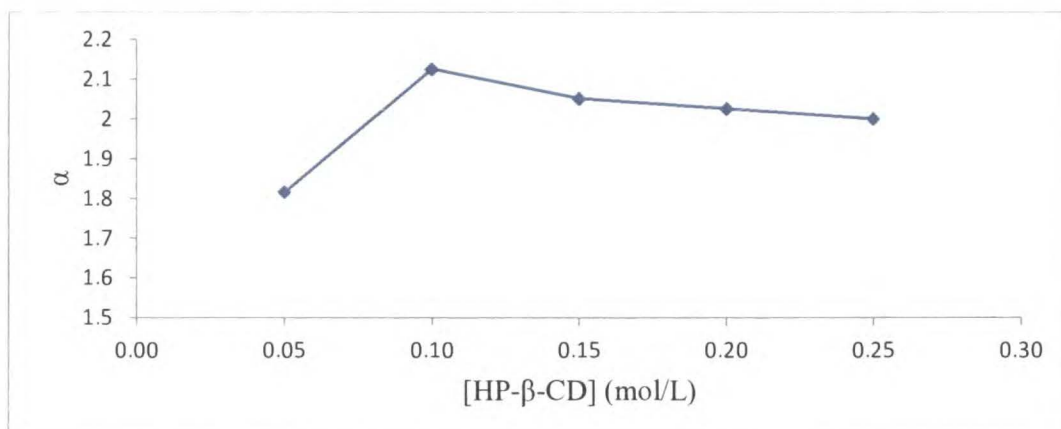
8.5 Wpływ stężenia chiralnych selektorów na parametry chiralne ekstrakcji

Rysunki 8.4 i 8.5 przedstawiają wpływ stężenia HP- β -CD w fazie wodnej na współczynnik podziału i enancjoselektywność. Wartość współczynnika podziału maleje wraz ze wzrostem stężenia HP- β -CD. Wynika to z faktu, iż cyklopentolat występuje w większej ilości w postaci kompleksów z HP- β -CD w fazie wodnej i w takiej postaci nie będzie rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych.

W badanych warunkach enancjoselektywność wzrasta stopniowo, aż do momentu osiągnięcia wartości stężenia 0,1 M HP- β -CD. Nieznaczny spadek enancjoselektywności następuje powyżej wartości stężenia 0,1 M HP- β -CD. Można to wyjaśnić konkurencyjnością oddziaływania enancjomerów cyklopentolatu z HP- β -CD w fazie wodnej, a D-winianem tertbutylowym w fazie organicznej.



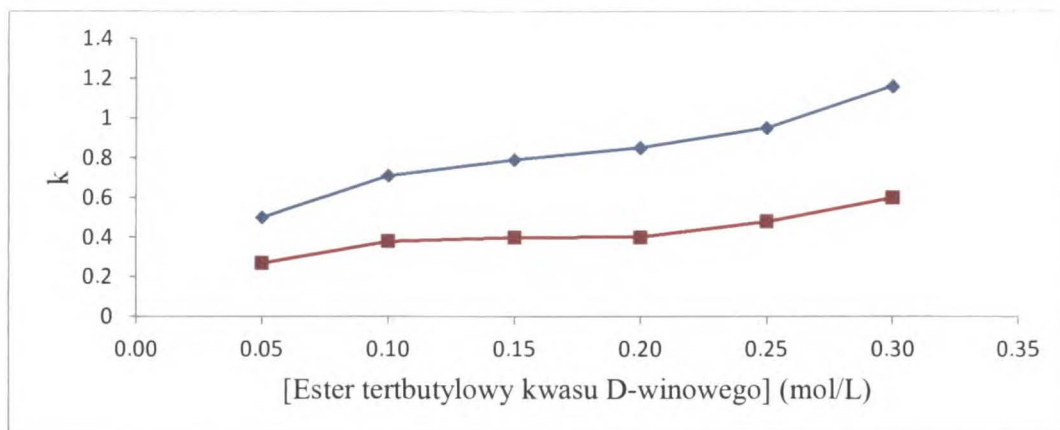
Rys. 8.4 Wpływ stężenia HP- β -CD na współczynnik podziału (k). Faza organiczna: [D-winian tertbutylowy] = 0,2 M.



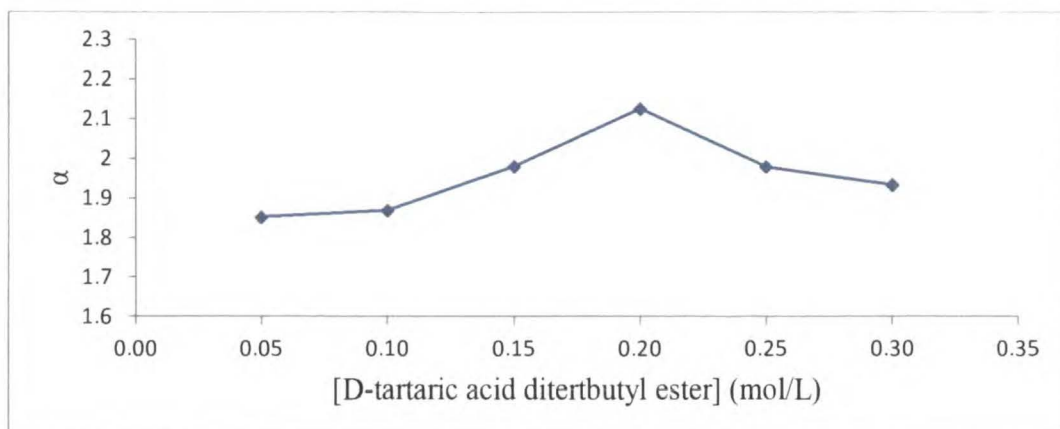
Rys. 8.5 Wpływ stężenia HP-β-CD na współczynnik enancjoselektywności (α). Faza organiczna: [D-winian tertbutylowy] = 0,2 M.

Na rysunkach 8.6 i 8.7 przedstawiono zależności współczynnika podziału i enancjoselektywności od stężenia D-winianu tertbutylowego. Wzrost stężenia D-winianu tertbutylowego ma pozytywny wpływ na wartość współczynnika podziału. Efekt ten wynika z przyrostu ilości powstałych diastereoizomerycznych kompleksów w fazie organicznej.

Ponadto, wzrost stężenia D-winianu tertbutylowego w zakresie 0,1 – 0,2 M wpływa korzystnie na enancjoselektywność. Po przekroczeniu stężenia 0,2 M enancjoselektywność maleje. Enancjoselektywność osiąga maksimum, przy stosunku molowym stężenia D-winianu tertbutylowego do HP-β-CD 2:1. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tego zachowania jest konkurencyjność oddziaływań w fazie wodnej i organicznej. HP-β-CD korzystniej oddziałuje z enancjomerem (*S*)-cyklopentolatu w fazie wodnej, zaś D-winian tertbutylowy oddziałuje silniej z enancjomerem (*R*)-cyklopentolatu w fazie organicznej.



Rys. 8.6 Wpływ stężenia D-winianu tertbutylowego na współczynnik podziału (k). Faza wodna: [HP- β -CD] = 0,10 M, [Cyklopentolat] = 0,05 mM, pH 6,0.

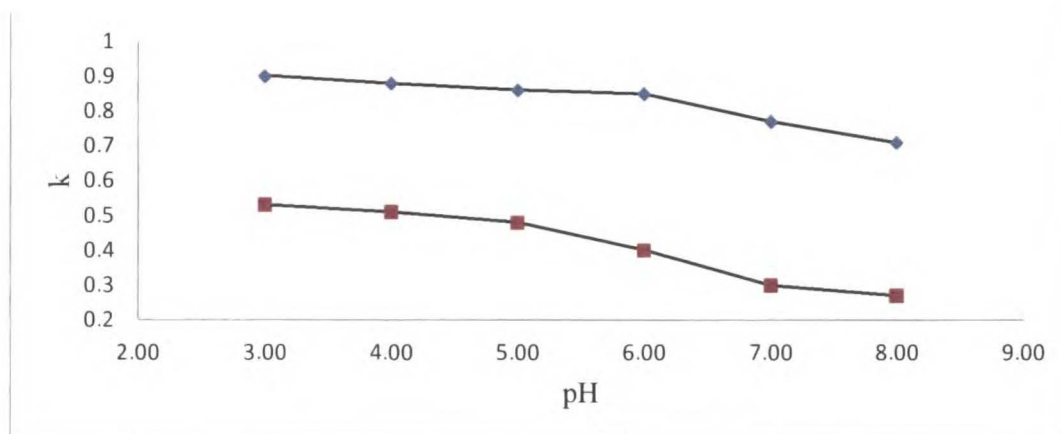


Rys. 8.7 Wpływ stężenia D-winianu tertbutylowego na enancjoselektywność (α). Faza wodna: [HP- β -CD] = 0,10 M, [Cyklopentolat] = 0,05 mM, pH 6,0.

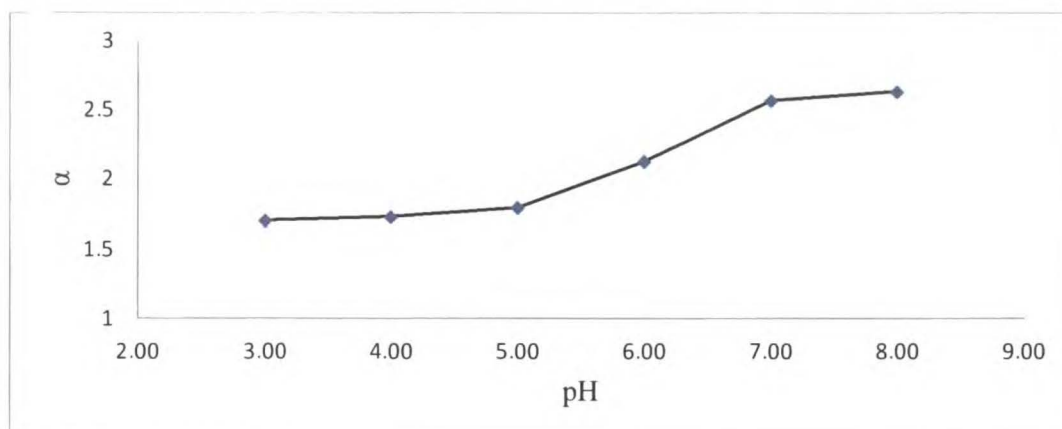
8.6 Wpływ pH na parametry chiralne ekstrakcji

Rysunki 8.8 i 8.9 przedstawiają wpływ pH na współczynnik podziału i enancjoselektywność enancjomerów cyklopentolatu. Współczynnik podziału maleje wraz ze wzrostem pH. Natomiast wzrost pH powoduje zwiększenie zdolności rozdzielczej badanego układu. Prawdopodobnie ma to związek ze spadkiem stosunku formy obojętnej cyklopentolatu do formy zjonizowanej wraz ze wzrostem pH. D-winian tertbutylowy ma większą zdolność rozpoznania chiralnego obojętnych molekuł cyklopentolatu. Natomiast forma jonowa cyklopentolatu występuje głównie w fazie

wodnej. Optymalne wartości współczynnika podziału i enancjoselektywności uzyskano dla wartości pH 6.



Rys. 8.8 Wpływ pH na współczynnik podziału (k). Faza wodna: [HP- β -CD] = 0,10 M, [Cyklopentolat] = 0,05 mM. Faza organiczna: [D-winian tertbutylowy] = 0,2 M.



Rys. 8.9 Wpływ pH na enancjoselektywność (α). Faza wodna: [HP- β -CD] = 0,10 M, [Cyklopentolat] = 0,05 mM. Faza organiczna: [D-winian tertbutylowy] = 0,2 M.

9 PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W niniejszej rozprawie doktorskiej podjętą tematykę zastosowania kompleksów trójskładnikowych opartych o makrocykliczne oligosacharydy, w enancjoseparacji substancji biologicznie czynnych. Do realizacji tego celu wybrano, jako selektory chiralne naturalne cyklodekstryny (β -CD, γ -CD), jak również dodatkowe substancje: odczynniki par jonowych i hydroksykwasy. Do zdobycia informacji na temat mechanizmów rozdziału chiralnego w układach podwójnych głównie wykorzystano proste eksperymenty chromatograficzne. Zbadano właściwości fizykochemiczne powstających kompleksów podwójnych i potrójnych (wyznaczono stałe trwałości kompleksów, stechiometrię, funkcje termodynamiczne kompleksów).

W **rozdziale 5** zamieszczono wyniki otrzymane w nowatorskim układzie modyfikowanym β -CD w połączeniu z hydroksykwasami. Celem tej pracy było zbadanie wpływu hydroksykwasów na trwałość kompleksów związków modelowych z cyklodekstryną i na zdolność rozróżnienia chiralnego układu modyfikowanego β -CD. Na podstawie wyników badań sformułowano następujące wnioski:

- Hydroksykwasy mogą być wykorzystane do zwiększenia stężenia β -CD w fazie ruchomej w układzie HPLC.
- Odnotowano spadek trwałości kompleksów badanych związków z β -CD w obecności kwasu cytrynowego.
- Dodatek kwasów winowych ma pozytywny wpływ na trwałość kompleksów β -CD z większością badanych związków.
- Wzrost trwałości kompleksów, może być tłumaczony na podstawie doniesień literaturowych powstawaniem kompleksu trójskładnikowego lek-cyklodekstryna-kwas winowy.
- Stwierdzono, że wzrost stężenia β -CD, w obecności hydroksykwasów: L-, D-, LD-winowych wzmacnia enancjoselektywność układu.
- Połączenie β -CD i kwasu cytrynowego ma negatywny wpływ na zdolność rozróżnienia chiralnego układu.
- Dla wszystkich związków modelowych największą wartość enancjoselektywności zaobserwowano w układzie modyfikowanym β -CD w obecności kwasu DL-winowego.

- Dla sobrerolu uzyskano najbardziej widoczną poprawę rozdziału enancjomerów. Nie otrzymano rozróżnienia chiralnego sobrerolu w układzie pojedynczym (z β -CD bez dodatku hydroksykwasu), dopiero zwiększenie rozpuszczalności β -CD do 40 mM w obecności kwasu DL-winowego doprowadziło do całkowitego rozdzielenia enancjomerów.
- Najprawdopodobniej, powyższej przedstawione wyniki wynikają z konkurencji pomiędzy hydroksykwasami, a związkami modelowymi. Kiedy β -CD ma najniższą trwałość kompleksu z hydroksykwasem, uzyskano najwyższą enancjoselektywność układu.

W **rozdziale 6** opisano zastosowanie β -CD w połączeniu z OPI w chromatografii cieczowej. Zbadano wpływ temperatury, stężenia i rodzaju OPI na retencję i enancjoselektywność związków modelowych. Ponadto wyznaczono stałe trwałości podwójnych i potrójnych kompleksów. Wyniki wykazały, że:

- W wodnym roztworze etanolu o stężeniu 20 %, C8 i C12 są adsorbowane na fazie RP-18. Natomiast C4 nie ulega adsorpcji w wyżej opisanych warunkach.
- W miarę wzrostu stężenia i długości łańcucha alkilowego OPI wartość współczynnika retencji rośnie (dla chlortalidonu, cyklopentolatu, morfolepu, 2,6-DKP i sobrerolu) lub maleje (dla glimidu i metylofenylobarbitalu) w zależności od budowy i właściwości fizykochemicznych molekuł.
- Wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego OPI (od C4 do C12) następuje spadek trwałości kompleksów β -CD z prawie wszystkimi badanymi związkami. Wyłącznie w przypadku kompleksów cyklopentolatu z β -CD odnotowano znaczący przyrost trwałości wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego OPI.
- Dodatek OPI do fazy ruchomej modyfikowanej β -CD może promować lub degradować zdolność rozpoznania chiralnego układu w zależności od charakteru związków modelowych (kwas, zasada, amfoter).
- W wyniku zastosowania dodatku OPI uzyskano znaczący wzrost rozdziału enancjomerów cyklopentolatu. Prawdopodobnie ze względu na silny charakter zasadowy tego związku.
- Poprawa rozdziału enancjomerów jest mniej oczywista dla 2,6-DKP i niezauważalna dla chlortalidonu i metylofenylobarbitalu.

- W miarę wzrostu stężenia OPI rośnie wartość współczynnika retencji i maleje zdolność rozdzielcza układu. Efekt ten może świadczyć o słabnącym oddziaływaniu pomiędzy cząsteczkami analitu, a β -CD. Cyklopentolat wykazał odchylenia od tej prawidłowości. Wzrost stężenia C4 i C8 (do wartości 5 mM) znacząco wpływał na poprawę rozdziału enancjomerów cyklopentolatu.
- Analiza termodynamicznych parametrów dla układów modyfikowanych β -CD z dodatkiem OPI wykazała, że zwiększenie długości łańcucha alkilowego w cząsteczce OPI wzmacnia oddziaływanie enancjomerów z fazą stacjonarną. W efekcie dla fazy ruchomej z β -CD zawierającej C8 lub C12 proces oddziaływania z fazą stacjonarną przeważa nad procesem kompleksowania w fazie ruchomej. Dla faz ruchomych zawierających samą β -CD lub z C4 współczynniki retencji zależą od dwóch procesów: procesu kompleksowania w fazie ruchomej i procesu oddziaływania z fazą stacjonarną.

W **rozdziale 7** zbadano wpływ rodzaju odczynników par jonowych (OPI) na proces powstawania kompleksu potrójnego analit- γ -CD-OPI i na zdolność rozpoznania chiralnego układu. Zestawienie otrzymanych danych pozwoliło na sformułowanie następujących wniosków:

- Dodatek OPI do układu modyfikowanego γ -CD powoduje skrócenie czasów elucji większości badanych analitów.
- Zwiększenie długości łańcucha alkilowego OPI wywołuje spadek zdolności rozróżnienia chiralnego układu modyfikowanego γ -CD
- Wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego OPI następuje wzrost trwałości kompleksów γ -CD z wszystkimi badanymi związkami.
- γ -CD tworzy kompleksy inkluzyjne spośród badanych OPI (C4, C8, C12) wyłącznie z C12
- OPI mogą działać jak "regulatory przestrzeni" w formowaniu trójskładnikowego kompleksu (OPI- γ -CD-analit)

W **rozdziale 8** sprawdzono możliwość wykorzystania techniki dwufazowej ekstrakcji do rozdzielania enancjomerów stosując połączenie dwóch sektorów chiralnych (pochodnych β -CD w fazie wodnej i pochodnych kwasu winowego w fazie organicznej). Ekstrakcja okazała się skutecznym narzędziem do osiągnięcia separacji enancjomerów cyklopentolatu. W celu uzyskania

wystarczającej enancjoselektywności, konieczna jest optymalizacja warunków procesu. Zbadano wpływ rodzaju i stężenia chiralnych selektorów, pH, rodzaju rozpuszczalnika organicznego na enancjoselektywność i współczynnik podziału. Analiza ilościowa enancjomerów została przeprowadzona z fazy wodnej metodą chiralnej chromatografii cieczowej (opisaną w rozdziale 4.5). W celu określenia, w który z enancjomerów została wzbogacona faza organiczna opracowano metodę identyfikacji enancjomerów z fazy organicznej. Rozdział enancjomerów przeprowadzono w układzie faz normalnych stosując dwa chiralne detektory: elektronowego dichroizmu kołowego (ECD) i polarymetryczny (OR). Na podstawie eksperymentalnej weryfikacji wykazano, że:

- Maksymalna wartość enancjoselektywności ($\alpha = 2,13$) i optymalny współczynnik podziału ($k_R = 0,85$, $k_S = 0,40$) uzyskano w następujących warunkach: 0,10 M HP- β -CD w fazie wodnej o pH 6 i 0,20 M D-winianu diterbutylowego zawartego w dekanolu.
- Połączenie doświadczalnej i teoretycznej analizy ECD i OR umożliwiło przypisanie konfiguracji absolutnej (*R*) pierwszemu eluowanemu enancjomerowi i (*S*) drugiemu. Metodę tę wykorzystano do zidentyfikowania enancjomeru przenikającego do fazy organicznej. Nadmiar enancjomeryczny (*R*)-cyklopentolatu był w fazie organicznej.

Nie można pominąć faktu, iż chiralna ekstrakcja jest tanią techniką i może być zastosowana w skali przemysłowej.

W niniejszej pracy udowodniono, że odpowiednia modyfikacja cyklodekstryn wpływa na znaczny wzrost trwałości ich kompleksów z substancjami farmakologicznie czynnymi. Zagadnienie to może być zastosowane w produkcji nowych form leków. Przykładem są leki charakteryzujące się szkodliwym działaniem i niską wartością stałej kompleksowania z cyklodekstrynami [123]. Jedną z metod ograniczenia niepożądanego wpływu leku na organizm jest wytworzenie kompleksów inkluzyjnych z makrocyklicznymi oligosacharydami. Odpowiednia modyfikacja cyklodekstryny może umożliwić zastosowanie ich jako nośników tych leków.

Analiza układów bazujących na cyklodekstrynach w połączeniu z substancjami dodatkowymi (hydroksykwas, OPI) pozwoliła ustalić najkorzystniejsze warunki rozdziału enancjomerów związków modelowych. Analizowane substancje dodatkowe pomimo, że nie są w stanie rozróżnić enancjomerów związków modelowych, wpływają korzystnie w odpowiednich warunkach na enancjoselektywność układu. Uzyskano częściowy lub całkowity rozdział wszystkich związków

modelowych, pomimo ich zróżnicowanych właściwości chemicznych. Można przypuszczać, że w wyniku dalszej optymalizacji otrzymano by rozdział do podstawy pików.

Warto nadmienić o innych zaletach zaprezentowanych układów, na które składa się stosunkowo niski koszt β -CD i γ -CD w porównaniu z jonowymi pochodnymi cyklodekstryn. Ponadto uzyskano niskie zużycie rozpuszczalników, w wyniku zastosowania kolumn mikroborowych. Z tego powodu, nie ma potrzeby stosowania kosztownych chiralnych faz stacjonarnych. Zmniejszenie rozmiarów kolumny oznacza, że wielkość próbki i szybkość przepływu fazy ruchomej została zredukowana, co ułatwiło stosowanie drogich dodatków do fazy ruchomej.

STRESZCZENIE

Ponad połowa leków obecnych na rynku farmaceutycznym to substancje chiralne. Jednym z najtrudniejszych zadań przemysłu farmaceutycznego jest produkcja substancji enancjomerycznie czystych. Wzrost zapotrzebowania na preparaty farmaceutyczne w postaci pojedynczych enancjomerów wpływa na rozwój metod otrzymywania związków homochiralnych. Z tego powodu opracowano wiele procedur skierowanych na tematykę rozpoznania chiralnego. W tym zadaniu chromatografia cieczowa okazała się jedną z najskuteczniejszych strategii głównie do analizy czystości enancjomerów.

Jednym z podejść stosowanym w chiralnej chromatografii cieczowej jest interakcja racematu z selektorem chiralnym, stanowiącym dodatek do fazy ruchomej. Cyklodekstryny, ze względu na łatwość tworzenia kompleksów inkluzyjnych, wysoką czystość enancjomeryczną i niską cenę stanowią istotną grupę selektorów chiralnych.

W niniejszej pracy doktorskiej opisano wpływ dodatkowych substancji na efektywność rozdzielania chiralnego opartego o cyklodekstryny. Ponadto dodatkowe substancje takie jak: hydroksykwasy i odczynniki par jonowych mają ogromne znaczenie w procesie powstawania trójskładnikowego kompleksu. Przeprowadzono interpretację mechanizmów rozdzielania chiralnego i retencji, a także zbadano właściwości fizykochemiczne powstających kompleksów (wyznaczanie stałych trwałości, stechiometrii, funkcji termodynamicznych).

Pierwsza część pracy zawiera opis badań wykonanych w układzie modyfikowanym β -CD z dodatkiem hydroksykwasów. Uzyskane wyniki potwierdziły, iż wzrost stężenia β -CD w obecności kwasów L-, D-, LD-winowych ma pozytywny wpływ na proces rozróżnienia chiralnego większości związków modelowych. Natomiast dla mieszaniny β -CD z kwasem cytrynowym uzyskano znaczne pogorszenie rozdzielania enancjomerów wszystkich związków modelowych. Wyznaczono stałe trwałości badanych związków z β -CD bez i w obecności hydroksykwasów. Dodatek kwasów winowych miał pozytywny wpływ na trwałość kompleksów β -CD z większością badanych związków. Zagadnienie to może mieć zastosowanie w produkcji nowych form leków z uwagi na to, iż kompleksy potrójne lek - kwas winowy - cyklodekstryna są od niedawna stosowane jako substancje farmaceutyczne.

Druga część pracy dotyczyła rozdzielania enancjomerów z zastosowaniem cyklodekstryn (β -CD lub γ -CD) oraz odczynników par jonowych (OPI), jako składników fazy ruchomej w chromatografii cieczowej. Wykazano, że połączenie tych dwóch typów selektorów (OPI i CD) może prowadzić do poprawy rozdzielania enancjomerów. Badania dotyczące wpływu stężenia i rodzaju OPI pozwoliły na przeprowadzenie interpretacji mechanizmów retencji w układach OPI z CD. Wyznaczone parametry termodynamiczne (entalpia, entropia, energia swobodna Gibbsa) wykorzystano do opisu mechanizmu rozdzielania enancjomerów.

W ostatniej części eksperymentalnej pracy sprawdzono możliwość wykorzystania ekstrakcji do rozdzielania enancjomerów cyklopentolatu stosując połączenie dwóch selektorów chiralnych (pochodnych β -CD w fazie wodnej i pochodnych kwasu winowego w fazie organicznej). Analizowane były różne parametry związane z enancjoseparacją m.in.: typ i stężenie selektorów chiralnych, wartość pH oraz rodzaj rozpuszczalnika organicznego.

Wyznaczono kolejność wymywania enancjomerów cyklopentolatu wykorzystując dwa chiralne detektory elektroniczne dichroizmu kołowego (ECD) i skręcalności optycznej (OR).

Na podstawie zebranych wyników zoptymalizowano rozdzielanie enancjomerów cyklopentolatu w dwufazowej ekstrakcji chiralnej.

WYKAZ LITERATURY

1. Potapov, V. M. *Stereochemia*. (Państwowe Wydaw. Naukowe, 1986).
2. Kalsi, P. S. *Stereochemistry Conformation And Mechanism*. (New Age International, 2005).
3. Nógrádi, M. *Stereochemia: podstawy i zastosowania*. (Państwowe Wydaw. Naukowe, 1988).
4. Morris, D. G. *Stereochemia*. (Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008).
5. Dodziuk, H. & Mirowicz, M. A proposal for a modification of the Cahn, Ingold and Prelog classification of chirality. *Tetrahedron: Asymmetry* **1**, 171–186 (1990).
6. Cahn, R. S., Ingold, C. & Prelog, V. Specification of Molecular Chirality. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **5**, 385–415 (1966).
7. Mitra, S. & Chopra, P. Chirality and anaesthetic drugs: A review and an update. *Indian J. Anaesth.* **55**, 556–562 (2011).
8. Hutt, A. J. The development of single-isomer molecules: why and how. *CNS Spectr.* **7**, 14–22 (2002).
9. Tracy, T. S. & Hall, S. D. Metabolic inversion of (R)-ibuprofen. Epimerization and hydrolysis of ibuprofenyl-coenzyme A. *Drug Metab. Dispos.* **20**, 322–327 (1992).
10. Hutt, A. & Patel, B. *Chirality in Drug Design and Development* (Marcel Dekker, 2004).
11. Maier, N. M., Franco, P. & Lindner, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *J. Chromatogr. A* **906**, 3–33 (2001).
12. Liao, J. *et al.* Facile resolution of racemic terbutaline and a study of molecular recognition through chiral supramolecules based on enantiodifferentiating self-assembly. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 1080–1085 (2003).
13. Alvarez Rodrigo, A., Lorenz, H. & Seidel-Morgenstern, A. Online monitoring of preferential crystallization of enantiomers. *Chirality* **16**, 499–508 (2004).
14. Xie, R., Chu, L.-Y. & Deng, J.-G. Membranes and membrane processes for chiral resolution. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1243–1263 (2008).
15. Ghanem, A. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry* **15**, 3331–3351 (2004).

16. Ghanem, A., Aboul-Enein, M. N., El-Azzouny, A. & El-Behairy, M. F. Lipase-mediated enantioselective kinetic resolution of racemic acidic drugs in non-standard organic solvents: Direct chiral liquid chromatography monitoring and accurate determination of the enantiomeric excesses. *J Chromatogr A* **1217**, 1063–1074 (2010).
17. Steensma, M., Kuipers, N. J. M., de Haan, A. B. & Kwant, G. Modelling and experimental evaluation of reaction kinetics in reactive extraction for chiral separation of amines, amino acids and amino-alcohols. *Chem. Eng. Sc.* **62**, 1395–1407 (2007).
18. Lee, S. C. Kinetics of reactive extraction of penicillin G by amberlite LA-2 in kerosene. *AIChE Journal* **50**, 119 – 126 (2004).
19. Tang, K., Li, H. & Liu, Y. Kinetic Study for Biphasic Recognition Chiral Extraction of Naproxen Enantiomers with Hydrophobic L-iso-butyl Tartrate and Hydrophilic Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *Solvent Extr. Ion Exc.* **30**, 291–305 (2012).
20. Tang, K., Song, L., Liu, Y., Pan, Y. & Jiang, X. Separation of flurbiprofen enantiomers by biphasic recognition chiral extraction. *Chem. Eng. J.* **158**, 411–417 (2010).
21. *Chiral Separations by Hplc: Applications to Pharmaceutical Compounds.* (Taylor & Francis Ltd, 1989).
22. Pirkle, W. H. & Pochapsky, T. C. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatography separation of enantiomers. *Chem. Rev.* **89**, 347–362 (1989).
23. Sun, X. X., Sun, L. Z. & Aboul-Enein, H. Y. Chiral derivatization reagents for drug enantioseparation by high-performance liquid chromatography based upon pre-column derivatization and formation of diastereomers: enantioselectivity and related structure. *Biomed. Chromatogr.* **15**, 116–132 (2001).
24. Toyooka, T. *Modern Derivatization Methods for Separation Science.* (Wiley, 1999).
25. Hallas, G. *Stereochemia Związków Organicznych.* (Państwowe Wydaw. Naukowe, 1968)
26. Stedman, E. Studies on the Relationship between Chemical Constitution and Physiological Action. *Biochem. J.* **20**, 719–734 (1926).

27. Dalgliesh, C. E. The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms. *J. Chem. Soc.* **756**, 3940–3942 (1952).
28. Pirkle, W. H., Murray, P. G. & Burke, J. A. Use of homologous series of analytes as mechanistic probes to investigate the origins of enantioselectivity on two chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* **641**, 21–29 (1993).
29. Lipkowitz, K. B. & Baker, B. Computational analysis of chiral recognition in Pirkle phases. *Anal. Chem.* **62**, 770–774 (1990).
30. Del Rio, A., Hayes, J. M., Stein, M., Piras, P. & Roussel, C. Theoretical reassessment of Whelk-O1 as an enantioselective receptor for 1-(4-halogeno-phenyl)-1-ethylamine derivatives. *Chirality* **16**, S1–S11 (2004).
31. Davankov, V. A. Analytical chiral separation methods (IUPAC Recommendations 1997). *Pure Appl. Chem.* **69**, 1469–1474 (1997).
32. Weiner, S. J. *et al.* A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765–784 (1984).
33. Pettersson, C. & Schill, G. Separation of enantiomeric amines by ion-pair chromatography. *J. Chromatogr. A* **204**, 179–183 (1981).
34. Pettersson, C. & Schill, G. Separation of Enantiomers in Ion-Pair Chromatographic Systems. *J. Chromatogr.* **9**, 269–290 (1986).
35. Schmid, M. G. & Gübitz, G. in *Chiral Separations* (Gübitz, G., Schmid, M. G. & Walker, J. M.) **243**, 317–321 (Humana Press, 2004).
36. Del Valle, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* **39**, 1033–1046 (2004).
37. Szejtli, J. *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrins in Budapest, Hungary, from 30. Sept. to 2. Oct., 1981.* (Kluwer Boston 1982).
38. Russell, N. R. New trends in cyclodextrins and derivatives. *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **15**, 399–400 (1993).
39. Szejtli, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *J. Mater. Chem.* **7**, 575–587 (1997).
40. Szejtli, J. Cyclodextrins in the Textile Industry. *Starch - Stärke* **55**, 191–196 (2003).

41. Taira, H., Nagase, H., Endo, T. & Ueda, H. Isolation, Purification and Characterization of Large-Ring Cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **56**, 23–28 (2006).
42. Zheng, M., Endo, T. & Zimmermann, W. Enzymatic Synthesis and Analysis of Large-Ring Cyclodextrins. *Aust. J. Chem.* **55**, 39–48 (2002).
43. Endo, T. & Ueda, H. Large Ring Cyclodextrins: Recent Progress. *ChemInform* **37**, no–no (2006).
44. Nakagawa, T., Ueno, K., Kashiwa, M. & Watanabe, J. The stereoselective synthesis of cyclomaltopentaose. A novel cyclodextrin homologue with D.P. five. *Tetrahedron Lett.* **35**, 1921–1924 (1994).
45. Dodziuk, H. *Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*. (John Wiley & Sons, 2006).
46. Frömring, K.-H. & Szejtli, J. *Cyclodextrins in Pharmacy*. (Springer, 1899).
47. Matsuda, H. & Arima, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **36**, 81–99 (1999).
48. Uekama, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 900–915 (2004).
49. Stella, V. J. & Rajewski, R. A. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Res.* **14**, 556–567 (1997).
50. Szente, L. & Szejtli, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug Delivery Rev.* **36**, 17–28 (1999).
51. Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **98**, 1743–1754 (1998).
52. Qi, Q. & Zimmermann, W. Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **66**, 475–485 (2004).
53. Kawakami, K. *et al.* Formation of rice flavor powder with α -cyclodextrin by spray drying. *Eur. Food Res. Technol.* **229**, 239–245 (2009).
54. Bhardwaj, R., Dorr, R. T. & Blanchard, J. Approaches to reducing toxicity of parenteral anticancer drug formulations using cyclodextrins. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **54**, 233–239 (2000).

55. Buschmann, H.-J. & Schollmeyer, E. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. *J. Cosmet. Sci.* **53**, 185–191 (2002).
56. Lezcano, M., Al-Soufi, W., Novo, M., Rodríguez-Núñez, E. & Tato, J. V. Complexation of several benzimidazole-type fungicides with alpha- and beta-cyclodextrins. *J. Agric. Food. Chem.* **50**, 108–112 (2002).
57. Hedges, A. R. Industrial Applications of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **98**, 2035–2044 (1998).
58. Sybilska, D. *et al.* Chromatographic studies on the inclusion of isomeric dimethylnaphthalenes by β - and γ -cyclodextrin. *Chromatogr.* **35**, 637–642 (1993).
59. Bielejewska, A., Lukasik, B., Duszczak, K. & Sybilska, D. Cyclodextrins as chiral additives for chromatographic separation of some mandelic acid esters into enantiomers. *Anal. Chem.* **47**, 419–427
60. Sybilska, D., Żukowski, J. & Bojarski, J. Resolution of Mephénytoin and Some Chiral Barbiturates into Enantiomers by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography via β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *J. Chromatogr. A* **9**, 591–606 (1986).
61. Sybilska, D., Debowski, J., Jurczak, J. & Zukowski, J. α - and β -cyclodextrin complexation as a tool for the separation of o-, m- and p-nitro-cis and trans-cinnamic acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **286**, 163–170 (1984).
62. Bielejewska, A., Duszczak, K. & Sybilska, D. Influence of organic solvent on the behaviour of camphor and α -pinene enantiomers in reversed-phase liquid chromatography systems with α -cyclodextrin as chiral additive. *J. Chromatogr. A* **931**, 81–93 (2001).
63. Asztemborska, M. & Bielejewska, A. *Cyclodextrins and Their Complexes* (Dodziuk, H.) 106–118 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006).
64. Kwaterczak, A. & Bielejewska, A. Comparison of retention of native cyclodextrins and its permethylated derivatives on porous graphite carbon and silica C18 stationary phases. *Anal. Chim. Acta* **537**, 41–46 (2005).

65. Bielejewska, A., Kozbial, M., Nowakowski, R., Duszczyk, K. & Sybilska, D. Studies on the behaviour of α -, β - and γ -cyclodextrins and some derivatives under reversed-phase liquid Chromatographic conditions. *Anal. Chim. Acta* **300**, 201–206 (1995).
66. Kwaterczak, A., Duszczyk, K. & Bielejewska, A. Comparison of chiral separation of basic drugs in capillary electrophoresis and liquid chromatography using neutral and negatively charged cyclodextrins. *Anal. Chim. Acta* **645**, 98–104 (2009).
67. Sybilska, D., Bielejewska, A., Nowakowski, R., Duszczyk, K. & Jurczak, J. Improved chiral recognition of some compounds via the simultaneous use of β -cyclodextrin and its permethylated derivative in a reversed-phase high-performance liquid chromatographic system. *J. Chromatogr. A* **625**, 349–352 (1992).
68. Nowakowski, R., Bielejewska, A., Duszczyk, K. & Sybilska, D. Chiral discrimination by high-performance liquid chromatography with joint use of two cyclodextrin additives. *J. Chromatogr. A* **782**, 1–11 (1997).
69. Bielejewska, A., Duszczyk, K., Kwaterczak, A. & Sybilska, D. Comparative study on the enantiomer separation of 1,1'-binaphthyl-2,2'-diyl hydrogenphosphate and 1,1'-bi-2-naphthol by liquid chromatography and capillary electrophoresis using single and combined chiral selector systems. *J. Chromatogr. A* **977**, 225–237 (2002).
70. Dodziuk, H. *Cyclodextrins and Their Complexes* 255–332 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006).
71. Yujuan, C. & Runhua, L. ¹H NMR titration and quantum calculation for the inclusion complexes of cis-cyclooctene, cis, cis-1, 3-cyclooctadiene and cis, cis-1, 5-cyclooctadiene with beta-cyclodextrin. *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **73**, 713–718 (2009).
72. Reddy, M. N., Rehana, T., Ramakrishna, S., Chowdary, K. P. R. & Diwan, P. V. β -cyclodextrin complexes of celecoxib: Molecular-modeling, characterization, and dissolution studies. *AAPS PharmSci.* **6**, 68–76 (2004).
73. Balogh, K., Szaniszló, N., H-Otta, K. & Fenyvesi, É. Can cyclodextrins really improve the selectivity of extraction of BTEX compounds? *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **57**, 457–462 (2007).

74. Bielejewska, A., Kozbial, M., Nowakowski, R., Duszczyk, K. & Sybilska, D. Studies on the behaviour of α -, β - and γ -cyclodextrins and some derivatives under reversed-phase liquid Chromatographic conditions. *Anal. Chim. Acta* **300**, 201–206 (1995).
75. Nowakowski, R., Cardot, P. J. P., Coleman, A. W., Villard, E. & Guiochon, G. Elution Mechanisms of Cyclodextrins in Reversed Phase Chromatography. *Anal. Chem.* **67**, 259–266 (1995).
76. Mohseni, R. M. & Hurtubise, R. J. Retention characteristics of several compound classes in reversed-phase liquid chromatography with β -cyclodextrin as a mobile phase modifier. *J. Chromatogr. A* **499**, 395–410 (1990).
77. Armstrong, D. W., Nome, F., Spino, L. A. & Golden, T. D. Efficient detection and evaluation of cyclodextrin multiple complex formation. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 1418–1421 (1986).
78. Frömring, K.-H. & Szejtli, J. *Cyclodextrins in Pharmacy*. (Springer, 1993).
79. Fenyvesi, E. *et al.* Interaction of Hydroxy Acids with β -Cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **33**, 339–344 (1999).
80. Chatjigakis, A. K., Donze, C., Coleman, A. W. & Cardot, P. Solubility behavior of β -cyclodextrin in water/cosolvent mixtures. *Anal. Chem.* **64**, 1632–1634 (1992).
81. Loftsson, T., Másson, M. & Brewster, M. E. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J Pharm. Sci.* **93**, 1091–1099 (2004).
82. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography 2nd Edition*. (John Wiley & Sons, 2011).
83. Meyer, V. R. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie: Flüssigchromatographie*. (Wiley-VCH, 2004).
84. Katz, E., Ogan, K. L. & Scott, R. P. W. Peak dispersion and mobile phase velocity in liquid chromatography: the pertinent relationship for porous silica. *J. Chromatogr. A* **270**, 51–75 (1983).
85. Dyson, N. *Chromatographic Integration Methods*. (Royal Society of Chemistry, 1998).
86. Schwedt, G.: *Chromatographische Trennmethode. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen*. (Wiley-VCH Verlag GmbH, 1994).

87. Buszewski, B. Teresa Cecchi: Ion-pair chromatography and related techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 1199–1200 (2012).
88. Meyer, V. R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography* 225–230 (John Wiley & Sons, Ltd, 2010).
89. Holtzer, A. M. The collected papers of Peter J. W. Debye. Interscience, *J. Polym. Sci.* **13**, 548–548 (1954).
90. Bartha, Á. & Ståhlberg, J. Electrostatic retention model of reversed-phase ion-pair chromatography. *J. Chromatogr. A* **668**, 255–284 (1994).
91. Zappoli, S., Morselli, L. & Osti, F. Application of ion interaction chromatography to the determination of metal ions in natural water samples. *J. Chromatogr. A* **721**, 269–277 (1996).
92. Bidlingmeyer, B. A., Deming, S. N., Price Jr., W. P., Sachok, B. & Petrussek, M. Retention mechanism for reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **186**, 419–434 (1979).
93. Nugent, K. D., Burton, W. G., Slattery, T. K., Johnson, B. F. & Snyder, L. R. Separation of proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. II. Optimizing sample pretreatment and mobile phase conditions. *J. Chromatogr. A* **443**, 381–397 (1988).
94. Tennikova, T. B., Svec, F. & Belenkii, B. G. High-Performance Membrane Chromatography. A Novel Method of Protein Separation. *J. Liq. Chromatogr.* **13**, 63–70 (1990).
95. Shibue, M., Mant, C. T. & Hodges, R. S. Effect of anionic ion-pairing reagent concentration (1–60 mM) on reversed-phase liquid chromatography elution behaviour of peptides. *J. Chromatogr. A* **1080**, 58–67 (2005).
96. Shibue, M., Mant, C. T. & Hodges, R. S. Effect of anionic ion-pairing reagent hydrophobicity on selectivity of peptide separations by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1080**, 68–75 (2005).
97. Yalçın, G. & Yüктаş, N. An efficient separation and method development for the quantifying of two basic impurities of Nicergoline by reversed-phase high performance liquid chromatography using ion-pairing counter ions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42**, 434–440 (2006).

98. Amin, A. S., Shahat, M. F. E., Edeen, R. E. & Meshref, M. A. Comparison of Ion-Pairing and Reversed Phase Liquid Chromatography in Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim. *Anal. Lett.* **41**, 1878–1894 (2008).
99. Redenti, E., Szente, L. & Szejtli, J. Drug/cyclodextrin/hydroxy acid multicomponent systems. Properties and pharmaceutical applications. *J. Pharm. Sci.* **89**, 1–8 (2000).
100. Pokharkar, V., Khanna, A., Venkatpurwar, V., Dhar, S. & Mandpe, L. Ternary complexation of carvedilol, beta-cyclodextrin and citric acid for mouth-dissolving tablet formulation. *Acta Pharm.* **59**, 121–132 (2009).
101. Bacchi, A. *et al.* The Molecular Structure and Crystal Organization Of Rac - terfenadine/ β -cyclodextrin/tartaric Acid Multicomponent Inclusion Complex. *J. Supramol. Chem.* **14**, 67–74 (2002).
102. Walhagen, A. & Edholm, L.-E. Chiral separation on achiral stationary phases with different functionalities using β -cyclodextrin in the mobile phase and application to bioanalysis and coupled columns. *Chromatogr.* **32**, 215–223 (1991).
103. Deng, Y. *et al.* Mechanism of enantioseparation of salsolinols, endogenous neurotoxins in human brain, with ion-pair chromatography using beta-cyclodextrin as a mobile phase additive. *Anal. Chem.* **68**, 2826–2831 (1996).
104. Guo, Q.-X., Li, Z.-Z., Ren, T., Zhu, X.-Q. & Liu, Y.-C. Inclusion complexation of sodium alkyl sulfates with β -cyclodextrin. A¹H NMR study. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **17**, 149–156 (1994).
105. Antal, P. G. T. Effect of temperature on retention of enantiomers of β -methyl amino acids on a teicoplanin chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* 177–190 doi:10.1016/S0021-9673(98)00835-8.
106. Morin, N., Guillaume, Y. ., Peyrin, E. & Rouland, J.-C. Peculiarities of an imidazole derivative retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: β -cyclodextrin concentration and temperature considerations. *J. Chromatogr. A* **808**, 51–60 (1998).
107. Hernáinz-Bermúdez de Castro, F., Gálvez-Borrego, A. & Calero-de Hoces, M. Surface Tension of Aqueous Solutions of Sodium 1-Dodecanesulfonate from 20 °C to 50 °C and pH between 4 and 12. *J. Chem. Eng. Data* **44**, 142–143 (1999).

108. Zung, J. B., Munoz de la Pena, A., Ndou, T. T. & Warner, I. M. Influence of alcohol addition on the γ -CD:pyrene complex. *J. Phys. Chem.* **95**, 6701–6706 (1991).
109. Hoof, N. V., Russell, N. R., McNAMARA, M. & Darcy, R. Enantioselective Complexation of Amino Acids by 6A-Deoxy-6A-hydroxyethylamino- β -Cyclodextrin and its Metallo-Derivatives in Aqueous Solution. *J. Incl. Phenom.* **36**, 179–189 (2000).
110. Wu, B., Wang, Q., Liu, Q., Xie, J. & Yun, L. Capillary electrophoresis direct enantioseparation of aromatic amino acids based on mixed chelate-inclusion complexation of aminoethylamino- β -cyclodextrin. *Electrophoresis* **26**, 1013–1017 (2005).
111. Tang, K., Chen, Y., Huang, K. & Liu, J. Enantioselective resolution of chiral aromatic acids by biphasic recognition chiral extraction. *Tetrahedron: Asymmetry* **18**, 2399–2408 (2007).
112. Tang, K., Song, L., Liu, Y., Pan, Y. & Jiang, X. Separation of flurbiprofen enantiomers by biphasic recognition chiral extraction. *Chem. Eng. J.* **158**, 411–417 (2010).
113. Tong, S., Yan, J., Guan, Y.-X., Fu, Y. & Ito, Y. Separation of α -cyclohexylmandelic acid enantiomers using biphasic chiral recognition high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3044–3052 (2010).
114. Ismail, E. E., Rouse, M. W. & De Land, P. N. A comparison of drop instillation and spray application of 1% cyclopentolate hydrochloride. *Optom. Vis. Sci.* **71**, 235–241 (1994).
115. Di Bari, L. Synthesis, resolution, and absolute configuration of two novel and selective cyclooxygenase-2 inhibitors based on the 1,5-diarylpyrrole structure. *Tetrahedron: Asymmetry* **17**, 3430–3436
116. Jastrzębska, I. Photoinduced Isomerization of 23-Oxosapogenins: Conformational Analysis and Spectroscopic Characterization of 22-Isosapogenins. *J. Org. Chem.* **77**, 11257–11269 (2012).
117. Tian, L., Yang, W., Chen, X. & Xie, Y. Enantioselective Extraction of Racemic Ofloxacin by Di(2-ethylhexyl)phosphoric Acid and Tartaric Acid Derivatives as Mixed Complex Chiral Selectors. *J. Chil. Chem. Soc.* **56**, 642–645 (2011).

118. Takeuchi, T., Horikawa, R. & Tanimura, T. Enantioselective solvent extraction of neutral DL-amino acids in two-phase systems containing N-n-alkyl-L-proline derivatives and copper(II) ion. *Anal. Chem.* **56**, 1152–1155 (1984).
119. Tang, K., Yi, J., Liu, Y., Jiang, X. & Pan, Y. Enantioselective separation of R,S-phenylsuccinic acid by biphasic recognition chiral extraction. *Chem. Eng. Sci.* **64**, 4081–4088 (2009).
120. Másson, M., Karlsson, F. J., Valdimarsdóttir, M., Magnúsdóttir, K. & Loftsson, T. Cyclodextrins and the liquid-liquid phase distribution of progesterone, estrone and prednicarbate. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **57**, 481–487 (2007).
121. Kwaterczak, A., Duszczyk, K. & Bielejewska, A. Comparison of chiral separation of basic drugs in capillary electrophoresis and liquid chromatography using neutral and negatively charged cyclodextrins. *Anal. Chim. Acta* **645**, 98–104 (2009).
122. Prelog, V., Mutak, S. & Kovačević, K. Über die Enantiomerentrennung durch Verteilung zwischen flüssigen Phasen. 3. Mitteilung. Selektivität der lipophilen Weinsäureester für chirale Ammonium-Salze verschiedener Konstitution und Konfiguration. *Helv. Chim. Acta* **66**, 2279–2284 (1983).
123. Bekers, O. *et al.* Inclusion complex formation of anthracycline antibiotics with cyclodextrins; a proton nuclear magnetic resonance and molecular modelling study. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **11**, 185–193 (1991).

B. 452/93



Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.452/13



30000000130050