

POLYMÉRY S ODTLAČKAMI MOLEKÚL AKO CHIRÁLNE STACIONÁRNE FÁZY V HPLC

ANNA LOMENOVA a KATARÍNA HROBOŇOVÁ

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
katarina.hrobonova@stuba.sk

Došlo 4.6.18, prijaté 7.8.18.

Kľúčové slová: HPLC, polyméry s odtlačkami molekúl, stacionárna fáza, enantioméry

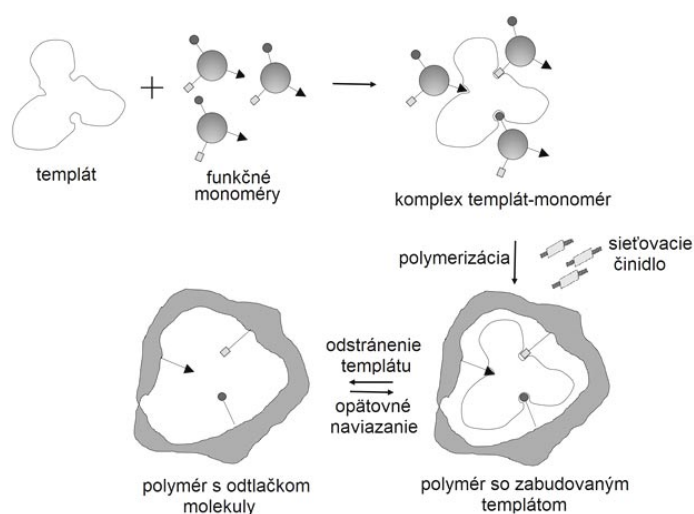
Obsah

1. Úvod
2. MIP stacionárne fázy pre HPLC separáciu enantiomérov
 - 2.1. Limitácie použitia MIP chirálnych stacionárnych fáz
 - 2.2. Selektivita väzbových miest
 - 2.3. HPLC separačné podmienky
3. Príprava MIP stacionárnych fáz
 - 3.1. MIP časticové materiály
 - 3.2. MIP monolitické materiály
4. Použitie MIP chirálnych stacionárnych fáz
5. Zhrnutie a perspektívy MIP chirálnych stacionárnych fáz

1. Úvod

Mnohé biologicky aktívne látky sú chirálneho charakteru. Enantiomérmé formy sa vyznačujú rovnakými fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami, avšak môžu sa líšiť biologickou aktivitou, napr. rozdielne a/alebo opačné farmakologické a toxikologické vlastnosti, rozdielny spôsob metabolizácie, rozdielne interakcie s receptormi (s enzýmami, proteínmi a iné), rozdielna chuť (D-asparagín, D-triptofán, D-tyrozín a D-izoleucín majú sladkú chuť, kým ich L-formy majú horkú chuť¹) a rozdielna vôňa ((–)-karvón má mäťovú vôňu a (+)-karvón má vôňu rasce²). Separácia a stanovenie enantiomérov biologicky aktívnych látok, príp. určenie enantiomérmého pomeru, má uplatnenie v oblasti farmaceutickej analýzy (kontrola enantiomérmého čistoty liečiv, štúdium stability látok), potravinárskej analýzy (kontrola autenticity potravín, geografický pôvod produktov), analýzy agrochemikálií, v enzýmovom inžinierstve a v katalýze^{3,4}.

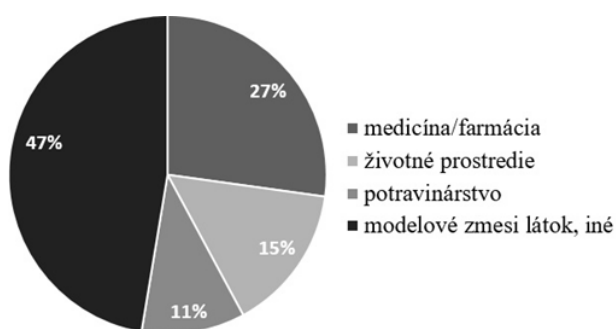
HPLC je jednou z techník (popri GC, CE, CEC, MECK, SFC) v súčasnosti používaných na separáciu enantiomérov. Najčastejšie sa uskutočňuje použitím chirálnych stacionárnych fáz (CSF), ktoré obsahujú chirálne selektory zo skupiny cyklodextrínov, cyklofruktánov, kruhových éterov, derivátov celulózy a amylozy, makrocyclických antibiotík. Dostupné CSF majú buď univerzálne využitie pre širokú škálu látok, alebo vývoj je orientovaný na chirálne selektory stacionárnych fáz s vysokou selektivitou pre jeden typ látok. Jedným z inovatívnych typov CSF sú polyméry s odtlačkami molekúl (MIP, molecularly imprinted polymer). Technológia molekulového odtlačania



Obr. 1. Schéma prípravy polymérov s odtlačkami molekúl

umožňuje pripraviť CSF s predurčenými vlastnosťami pre chirálne rozpoznávanie cieľovej látky. Polyméry sa pripravujú odtlačaním templátu do polymérnej matrice, pričom vzniknú dutiny komplementárne s molekulou templátu (obr. 1). MIP materiály sa vyznačujú vysokou afinitou a selektivitou pre cieľový analyt (templát), fyzikálnou a chemickou stabilitou (odolnosť voči vysokej teplote a tlakom, organickým rozpúšťadlami, kyselinám a zásadám). Ďalšími výhodami sú nízke náklady na ich konečnú prípravu aj keď optimalizácia podmienok prípravy (výber druhu a pomeru polymerizačných zložiek – monomér, sieťovacie činidlo a rozpúšťadlo, reakčné podmienky – teplota a doba polymerizácie) polyméru s vhodnými vlastnosťami ako napr. dostatočná sorpčná kapacita, selektivita a morfológia môže byť časovo náročná^{4,5}. Podrobným popisom typu polymerizačných zložiek, ich voľbou pre skupiny templátov a metódam prípravy MIP sú venované mnohé prehľadové články^{6–9} a preto nebudú podrobnejšie opísané.

Predkladaná prehľadová práca poukazuje na súčasné využitie MIP sorbentov ako HPLC stacionárnych fáz na separáciu enantiomérov. Pozornosť je venovaná výhodám a limitáciám ich použitia ako aj možnostiam zlepšenia obmedzení. Tento inovatívny typ stacionárnych fáz nachádza svoje využitie v mnohých oblastiach analýzy (medicína, farmácia, životné prostredie), no najväčšia časť doposiaľ publikovaných prác sa venovala príprave a hodnoteniu vlastností MIP ako SF na separáciu modelových zmesí látok (obr. 2). Práca tiež poskytuje príklady prípravy a použitia MIP CSF pre vybrané biologicky aktívne látky, predovšetkým zo skupiny liečiv.



Obr. 2. Oblasti využitia MIP ako HPLC stacionárnych fáz (z databázy SCOPUS)

2. MIP stacionárne fázy pre HPLC separáciu enantiomérov

Vďaka selektivitě a robútnosti našli MIP uplatnenie ako stacionárne fázy nielen v HPLC (separácia cholesterolu¹⁰, antibiotík¹¹), ale aj v CEC (separácia neurotransmiterov^{12,13}, amlodipínu, ofloxacinu a zopiklonu¹⁴, antibiotík¹⁵, insekticídov¹⁶, dikarboxylových kyselín¹⁷). Prvá publikácia o použití MIP pre separáciu

enantiomérov 4-nitrofenol- α -D-manopyranozidu bola publikovaná roku 1978 (cit.¹⁸). Výhodou kolón s MIP CSF je predurčené elučné poradie pre tú enantioméru formu látky, ktorá sa použila v procese odtlačania, čo je len zriedkavé u konvenčných CSF. Enantiomér, ktorý bol použitý ako templát, bude danou CSF viac zadržovaný a bude eluovať s dlhším elučným časom v porovnaní s druhou enantioméru formou danej látky.

2.1. Limitácie použitia MIP chirálnych stacionárnych fáz

Limitácie použitia MIP CSF v HPLC súvisia s heterogenitou väzbových miest v stacionárnej fáze z hľadiska dostupnosti a afinity, možnosťou nešpecifických interakcií medzi analytom a stacionárnou fázou, pomalým prenosom hmoty, nízkou kapacitou sorbentu a v niektorých prípadoch aj s nízkou selektivitou vo vodnom prostredí¹⁹. Tieto limitácie sú často príčinou neúplnej separácie enantiomérov a nesymetrie elučných zón. Problematická môže byť aj separácia viacerých látok. Uvedené nedostatky môžu byť čiastočne eliminované zložením mobilnej fázy, prietokom mobilnej fázy a teplotou kolóny.

Nesymetria elučných zón sa vyskytuje hlavne pri separáciách molekúl, ktoré boli použité ako templáty v procese odtlačania. Ak sa pri príprave použila bloková, suspenzná, precipitačná, viackroková napučiacia polymerizácia a polymerizácia v dutinách nosiča, väzbové miesta sa nachádzajú ako na povrchu častíc polyméru tak aj v jeho štruktúre, čo zhoršuje dostupnosť pre viazanie analytu. Zvýšenie symetrie elučných zón ako aj chromatografickej účinnosti možno dosiahnuť použitím MIP CSF pripravených polymerizáciou na povrchu nosiča. Súvisí to predovšetkým s lepšou prístupnosťou väzbových miest, ktoré sú distribuované v tenkom filme na povrchu inertného nosiča. Takto pripravené stacionárne fázy majú veľký špecifický povrch, čo vedie k dostatočnej väzbovej kapacite a vyznačujú sa aj vysokou kinetikou sorpcie a desorpcie analytu^{20,21}.

Kinetika sorpcie a desorpcie na MIP CSF je ovplyvnená povrchovou difúziou molekúl analytu a v menšej miere aj difúziou v póroch MIP častíc. Pri veľmi nízkych koncentráciách analytu dochádza k jeho naviazaniu prednostne na väbové miesta s vysokou afinitou. Kvôli viacbodovým, špecifickým interakciám medzi analytom a funkčnými skupinami väzbových miest s vysokou afinitou je povrchová difúzia pomalá. So zvyšovaním dávkovaného množstva alebo koncentrácie analytu dochádza k jeho viazaniu aj na termodynamicky a kineticky heterogénne väzbové miesta, čím sa zvyšuje povrchová difúzia kvôli nedostatku špecifických interakcií s templátom. Toto má za následok nesymetriu elučných zón (chvostovanie píkov). V prípade malého počtu väzbových miest v polyméri s vysokou afinitou môže dochádzať pri separácii k deformácii píku aj pri nízkych koncentráciách analytu¹⁹.

Heterogenitu väzbových miest možno znížiť optimalizovaním procesu odtlačania templátu. Možnosťou je aj použitie chemickej modifikácie väzbových miest, kedy

sa molekula templátu použije ako *in situ* ochranná skupina a prednostne sa viaže na väzbové miesta s vysokou afinitou. Miesta s nízkou afinitou sú chemicky modifikované funkčnými skupinami nekompatibilnými s molekulami analytu, čo znemožňuje ich naviazanie²². Druhý spôsob spočíva v použití monomolekulového procesu odtlačania, kedy sa templát odtlačí do makromolekuly (dendriméru). Dendrimér, ktorý je buď cieľovým ligandom alebo štruktúrne podobný analóg, sa najprv naviaže na molekuly monoméru a následne dochádza k zosieťovaniu. Chemické modifikácie väzbových miest môžu vplyvať na morfológiu polyméru. Na hodnotenie vplyvu typu modifikácie na vlastnosti výsledného polyméru súvisiace s heterogenitou väzbových miest je vhodné kinetické a termodynamické štúdium²². Kinetické hodnotenie adsorpcie umožňuje prešetriť mechanizmus a rýchlosť sorpcie a desorpcie analytu na/z väzbových miest polyméru. Experimentálne sa sleduje úbytok analytu z roztoku v prítomnosti polyméru v závislosti od času a dátum sa priradí zodpovedajúci model rýchlostnej rovnice pseudo-prvého poriadku, pseudo-druhého poriadku alebo rovnice vnútročasticovej difúzie na základe vyššej hodnoty korelačného koeficienta (R^2)²³. Hodnotenie adsorpcie pomocou adsorpčných izoteriem poskytuje informácie o heterogenite väzbových miest vyskytujúcich sa v polyméri. Pri adsorpčnom štúdiu sa sleduje zmena koncentrácie analytu v roztoku po adsorpcii na MIP sorbent. Pre MIP sorbenty má závislosť adsorpčnej izotermy (závislosť množstva naviazaného analytu do dutín polyméru od koncentrácie voľného analytu v roztoku) nelineárny priebeh, čo poukazuje na prítomnosť väzbových miest, ktoré poskytujú špecifické interakcie s molekulami analytu. Stav, kedy s ďalším zvyšovaním koncentrácie aplikovaného roztoku už nedochádza k nárastu množstva naviazaného analytu do dutín polyméru, naznačuje, že všetky väzbové miesta sú obsadené – dochádza k nasýteniu polyméru. NIP (non-imprinted polymer), ktorý je pripravený rovnakým polymerizačným postupom ako MIP a použitím rovnakého zloženia polymerizačnej zmesi avšak bez prítomnosti templátu, sa používa na hodnotenie nešpecifických interakcií medzi analytom a polymérom. Keďže stacionárne fázy na báze MIP majú často nízku väzbovú kapacitu, adsorpčné izotermy môžu mať nelineárny tvar aj pri veľmi nízkych koncentráciách analytu. Na zjednodušenie opisu väzbových miest a interpretácii adsorpčných izoteriem existuje viacero modelových prístupov. Scatchard závislosť (závislosť pomeru množstva naviazaného analytu do dutín polyméru a koncentrácie voľného analytu v roztoku od koncentrácie voľného analytu v roztoku, $S_b/c_f=f(c_f)$) je vhodná na popis distribúcie väzbových miest. Zo smernice priamkovej závislosti možno získať konštantu afinity pre daný typ väzbových miest. Afinitné spektrum (závislosť počtu väzbových miest od konštanty afinity, $N=f(\ln K)$) je vhodné na popis heterogenity väzbových miest a výpočet celkového počtu väzbových miest. Lineárny tvar adsorpčnej izotermy (logaritmickej závislosti množstva naviazaného analytu do dutín polyméru od koncentrácie voľného analytu v roztoku, $\log S_b=f(\log c_f)$) je vhodný na porovnanie väz-

bových vlastností polymérov, ktoré sú pripravené pre rôzne molekuly templátu²⁴. Na popisanie väzbových vlastností polymérneho sorbentu sa používajú viaceré typy izoteriem: Langmuirova, bi-Langmuirova, Freundlichova a Langmuir-Freundlichova. Typ izotermy sa priradí hodnotenému MIP na základe zhody experimentálnych údajov s matematickým modelom. Ukazovateľom vhodnosti je korelačný koeficient (R^2)^{25–27}.

2.2. Selektivita väzbových miest

Polyméry s odľacami molekúl majú vysokú selektivitu k templátom, ktoré boli použité pri ich príprave, avšak ich selektivita sa znižuje, keď sa na prípravu použijú molekuly s väčšími substituentami (napr. MIP pre templát L-fenylalanin anilid je selektívnejší ako MIP pre L-fenylalanín-*N*-metylanilid)^{28,29}. Veľkosť dutiny v polyméri, ktorá vznikla pri odtlačaní malých molekúl, dovoľuje opätovné naviazanie okrem cieľového analytu aj látky s podobnou veľkosťou molekuly, kým dutiny vzniknuté pri odtlačaní veľkých templátov umožňujú zachytávanie molekúl rôznej veľkosti, čo znižuje selektivitu polymérneho sorbentu. Keďže rozpoznávanie je tiež riadené aj tvarovou komplementaritou medzi väzbovým miestom a analytom, MIP má schopnosť rozlíšiť dva deriváty s rozdielnou konformáciou. Bolo zistené, že MIP pripravený pre určitý templát môže byť selektívny pre viacero štruktúrne podobných zlúčenín, čo závisí od špecifických interakcií medzi analytom a polymérom a aj od veľkosti molekuly. Napr. polymér pripravený pre L-valín anilid dokázal rozoznávať aj anilidy iných aminokyselín³⁰. Ukázalo sa, že substitúcia skupín, ktoré sa nepodieľali na väzbových interakciách medzi analytom a polymérom, spôsobovala iba mierne zníženie účinnosti separácie²⁷.

2.3. HPLC separačné podmienky

Zloženie mobilnej fázy predstavuje dôležitý faktor pri HPLC separácii. MIP stacionárne fázy možno použiť vo viacerých separačných usporiadaniach. Separáčny systém s konvenčným usporiadaním fáz používa ako zložky mobilných fáz aprotické organické rozpúšťadlá (chloroform, acetonitril), ktoré podporujú tvorbu vodíkových väzieb a elektrostatických interakcií medzi väzbovými miestami MIP a analytom. Najčastejšie sa volí rovnaké rozpúšťadlo ako bol porogén použitý pri príprave MIP s cieľom zabrániť deformáciám väzbových miest. Aj napriek tomu, že medzi väzbovými miestami MIP a analytom dochádza iba k tvorbe slabých polárnych interakcií, pri HPLC separácii sa dosahujú dlhé elučné časy separácie enantiomérov. Na zníženie retencie je vhodné pridávať do mobilných fáz modifikátory, ktoré čiastočne minimalizujú tvorbu nešpecifických interakcií. Voľba modifikátora závisí od typu separovaných látok a typu MIP stacionárnej fázy³¹. Využívajú sa tri prístupy k voľbe modifikátora mobilnej fázy, a) zásaditý modifikátor (napr. *n*-butylamin) je vhodný pre separáciu zásaditých alebo neutrálnych látok pomocou MIP CSF pripravenej na báze kyseliny metakrylovej

(kyslá stacionárna fáza)³²; b) kyslý modifikátor (najčastejšie kyselina octová) má podobné využitie ako bázičný modifikátor. Nevýhodou je schopnosť kyseliny octovej dimerizovať v roztoku, čo môže viesť k jej naviazaniu na väzbové miesta v dutinách MIP (cit.³¹). Kyslý modifikátor sa pridáva do mobilnej fázy aj v prípade, keď sa na separáciu použije zásaditá (monomér 4-vinylpyridín³³), alebo neutrálna (monomér akryl amid³⁴) MIP stacionárna fáza pripravená pre kyslý templát. V tomto prípade sú interakcie medzi modifikátorom a väzbovými miestami polyméru silnejšie ako interakcie medzi modifikátorom a analytom. V separačnom systéme s obráteným usporiadaním fáz sa prejavujú silnejšie interakcie medzi analytom a polymérom, v porovnaní s konvenčným usporiadaním fáz. Mobilné fázy obsahujú vodný roztok solí a organické rozpúšťadlá (napr. metanol, acetonitril). Účinnosť enantioseparácie možno ovplyvňovať zmenou pomeru organického modifikátora a vodnej zložky v mobilnej fáze. Použitím mobilnej fázy s veľmi nízkym obsahom organického modifikátora môže dochádzať k tvorbe nešpecifických hydrofóbných interakcií. Pridavok solí (napr. octan amónny³⁵, fosforečnan sodný alebo draselný^{36,37}) na úpravu vhodného pH mobilnej fázy ovplyvňuje elektrostatické interakcie medzi funkčnými skupinami analytu a väzbovými miestami v polyméri. Najvyššia retencia analytov sa dosahuje pri pH mobilnej fázy zodpovedajúcom približne pK_a hodnote analytu³⁷. V prípade, že analyt je silno pútaný elektrostatickými interakciami (príp. aj inými špecifickými a nešpecifickými interakciami) na väzbové miesta polyméru, voľbou pH tlmivého roztoku možno oslabiť alebo potlačiť elektrostatické interakcie a tým aj viazanie analytu na najsilnejšie väzbové miesta polyméru. Voľba pH mobilnej fázy ovplyvňuje elučné charakteristiky separovaných enantiomérov, ich rozlíšenie a aj symetriu pík¹⁹.

Teplota kolóny je ďalším experimentálnym parametrom, ktorý má vplyv na chromatografické rozlíšenie separovaných látok/enantiomérov z termodynamického a kinetického hľadiska. Z mnohých HPLC aplikácií MIP chirálnych stacionárnych fáz vyplynulo, že so zvyšujúcou sa teplotou kolóny dohádzalo k zvýšeniu rozlíšenia enantiomérov separovaných látok (D,L-fenylalanín³⁸, D,L-naproxen³⁹, butyloxykarbonyl-D,L-triptofán⁴⁰, dibenzoyl-D,L-kyselina vínna⁴¹). Možno to vysvetliť rozdielnou dostupnosťou špecifických väzbových a rozpoznávacích miest. Zvyšovaním teploty sa zvyšuje rýchlosť pohybu molekúl enantiomérov, čím sa môže narušiť rozpoznávací schopnosť ľahko dostupných špecifických rozpoznávacích miest. Na druhej strane niektoré ťažko prístupné špecifické rozpoznávacie miesta sa pri nízkej teplote stavajú ľahko prístupnými. Zmeny chromatografických charakteristík enantiomérnych foriem sú rozdielne, čo vedie k zvýšeniu selektivity enantioseparácie aj rozlíšenia. Iným vysvetlením vhodnosti zvýšenej teploty kolóny pre enantioseparáciu je lepšia komplementarita dutín polyméru s templátom, keďže polymerizácia sa uskutočňovala pri zvýšenej teplote^{39,41}.

3. Príprava MIP stacionárnych fáz

3.1. Časticové MIP materiály

Dosiahnutie vysokej účinnosti kolóny aj HPLC separácie dvoch látok súvisí s používaním MIP stacionárnych fáz s vhodnou morfológiou a fyzikálno-chemickými vlastnosťami. V poslednom období sa dôraz kladie na vývoj a zdokonaľovanie polymerizačných postupov pre prípravu MIP s požadovanými parametrami (definovaný tvar, jednotná veľkosť častíc)⁷. Časticové MIP stacionárne fázy pripravené blokovou polymerizáciou majú nepravidelný tvar, čo môže spôsobovať zníženie účinnosti kolóny aj separácie. Aj napriek týmto nevýhodám sa tento spôsob prípravy MIP sorbentov pre HPLC aplikácie často používa (tab. I). Zlepšenie účinnosti HPLC separácie možno dosiahnuť použitím precipitačnej, suspenznej alebo viackrovej napučievacej polymerizácie. Najvhodnejším spôsobom prípravy sa javí polymerizácia na povrchu nosiča, príp. polymerizácia v dutinách nosiča. Polymérny film pokrýva nosič alebo je na neho viazaný vo forme tenkej vrstvy. Pre HPLC aplikácie je vhodným nosičom silikagél, no pre iné aplikácie (SPE) sa využívajú nano vlákna, rúrky, magnetické častice⁴². Jednotný tvar a veľkosť častíc stacionárnej fázy umožňujú efektívnejšie plnenie kolóny, čo sa prejaví zmenšením príspevku vírivkej difúzie analytu v mobilnej fáze, zlepšením symetrie elučných zón separovaných látok, možnosťou použitia vyšších prietokov pri separácii a v konečnom dôsledku zvýšením účinnosti chromatografickej kolóny^{43,44}.

3.2. Monolitické MIP materiály

In situ polymerizácia umožňuje prípravu MIP stacionárnej fázy vo forme monolitu priamo v trubici kolóny. Účinnosť separácie látok pomocou takto pripravených stacionárnych fáz závisí od zvoleného porogénneho rozpúšťadla a podmienok polymerizácie. Pre dosiahnutie vysokej selektivity MIP CSF, vhodné porogénne rozpúšťadlo by malo: a) rozpúšťať templát a ďalšie zložky polymerizačnej zmesi, b) podporovať tvorbu pórov, ktoré umožňujú prietok mobilnej fázy a tým aj menší spätný tlak na kolóne, čo je výhodné v porovnaní s blokovou polymerizáciou a c) mať nízku polaritu (napr. dodekanol, toluén, viaczložkové zmesi)⁷. Stacionárne fázy tohto typu vykazujú vyššiu účinnosť separácie enantiomérov v porovnaní so stacionárnymi fázami pripravenými blokovou polymerizáciou v prípade rovnakých polymerizačných podmienok a rovnakých podmienok HPLC separácie. Termodynamické štúdium ukázalo, že polymér pripravený *in situ* polymerizáciou obsahuje homogénnejšiu distribúciu väzbových miest^{33,45}. Pre väčšinu aplikácií sa používajú MIP monolitické materiály pripravené z organických monomérov napr. kyselina metakrylová, 4-vinylpyridín, akrylamid (tab. I).

Tabuľka I

Zloženie polymerizačnej zmesi, druh polymerizácie pre prípravu MIP chirálnych stacionárnych fáz, podmienky HPLC separácie enantiomérov vybraných biologicky aktívnych látok a dosiahnuté chromatografické charakteristiky (retenčný faktor k ; rozlíšenie R_{ij} ; selektívny koeficient α)

Forma MIP	Templát	Druh polymerizácie	Monomér/porogén/sieťovacie činidlo/initiátor polymerizácie	Mobilná fáza, teplota kolóny (°C)	Separované racemáty látok	$R_{ij}/k/\alpha$	Lit.
	(+), (-)-kafín		MAA/chloroform/EGDMA/AIBN	voda/kyselina octová/acetónitril (2/7/91), 20	(+), (-)-kafín	3,6/1,5/2,4	46
	(-)-efedrin		MAA/chloroform/pentaerytritol triakrylát/AIBN	metanol/octanový tlmivý roztok pH 3,6 (70/30), 23	(+), (-)-efedrin	0,5/1,6/1,7	47
	(-)-isoproterenol		TFMAA/metanol/DVB/AIBN	acetónitril/citrónan sodný pH 3,0 (10/90), 65	(+), (-)-isoproterenol	1,0/1,4/1,3	45
Častice	S-propranolol	bloková	MAA/toluén/EGDMA/AIBN	acetónitril/fosforečnanový tlmivý roztok pH 5,1 (70/30), 25	R,S-propranolol R,S-pindolol R,S-alprenolol	-/4,1/- 0,9/-/4,5 1,0/-/4,3	48
	D-fenylalanín		Cu(VBIDA)/metanol, voda/EGDMA/ABCVA	glicín 1,5 mmol l ⁻¹ , 50	D,L-fenylalanín D,L-tyrozín	1,0/5,1/2,0 0,7/6,0/1,7	49
	Boc-L-Tyr		AAm/acetónitril/EGDMA/AIBN	acetónitril/kyselina octová (99,7/0,3), 23	Boc-D,L-Tyr	2,6/3,5/2,9	34
	L-nateglimid		AA/cyklohexanol, dodekano/EGDMA/AIBN	acetónitril (100%), 25	D,L-nateglimid	1,7/1,8/2,9	50
Častice	D-chlorfeniramin D-bromfeniramin	suspenná	MAA/chloroform/TRIM/AIBN	acetónitril/fosforečnanový tlmivý roztok pH 7,2 (70/30), 25	D,L-chlorfeniramin amin D,L-bromfeniramin	0,9/12,3/1,20,6/ 14,9/1,1 0,5/7,4/1,08	51
	S-nilvadipin		4-VP/toluén/EGDMA/ADVN	acetónitril/fosforečnanový tlmivý roztok pH 4,0 (45/55), 40	R,S-nilvadipin	1,5/8,5/1,5	36
Častice	S-naproxen	viackrová napučia vacia	4-VP/toluén/EGDMA/ADVN	acetónitril/fosforečnanový tlmivý roztok pH 3,2 (50/50), 25	R,S-naproxen R,S-ibuprofen R,S-flurbiprofen	0,8/9,0/1,7 0,6/2,1/1,3 0,6/6,0/0,5	52
	D-chlorfeniramin		TFMAA/toluén/EGDMA/AIBN	acetónitril/kyselina fosforečná 50 mmol.l ⁻¹ (70/30), 70	D,L-chlorfeniramin amin	0,9/11,1/1,6	37
	D-bromfeniramin		TFMAA/toluén/EGDMA/AIBN	acetónitril/kyselina fosforečná 50 mmol.l ⁻¹ (70/30), 25	D,L-bromfeniramin amin	0,9/17,3/2,4	37

Tabuľka I
Pokračovanie

Forma MIP	Templát	Druh polymerizácie	Monomér/porogén/sieťovacie činidlo/initiátor polymerizácie	Mobilná fáza, teplota kolóny (°C)	Separované látky	$R_{ij}/k_i/\alpha$	Lit.
Častice	D-chlorfeniramin		MAA/BA/EGDMA/ADVN	acetonitril/fosforečnanový tlmivý roztok pH 4,5 (70/30), 25	D,L-chlorfeniramin D,L-bromfeniramin D,L-feniramin	0,9/10,5/1,8 1,1/11,9/1,9 0,7/7,9/1,4	53
	(-)-efedrin	viackrovová napučiaivacia	MAA/toluén/EGDMA/AIBN	acetonitril/kyselina octová (99,8/0,2), 25	(+),(-)-efedrin	1,0/1,6/9,8	54
	Boc-L-Trp		4-VP/toluén/EGDMA/AIBN	acetonitril/fosforečnanový tlmivý roztok pH 3,2 (30/70), 25	Boc-D,L-Trp	2,2/10,8/1,1	40
Častice	(-)-isoproterenol	v dutinách nosiča	TFMAA/metanol/DVB/AIBN	acetonitril/citrónan sodný 25 mmol/l, pH 3 (10/90, v/v), 65	(+),(-)-isoproterenol	0,7/0,5/2,2	45
	S-propranolol		MAA/toluén/EGDMA/DPA	acetonitril/fosforečnanový tlmivý roztok pH 5,1 (70/30), 25	R,S-propranolol R,S-pindolol R,S-alprenolol	0,8/3,6/7,7 1,0/-/3,9 1,0/-/5,8	48
	S-citalopram		IA/acetonitril/EGDMA/DCPTS	acetonitril/mravčananový tlmivý roztok pH 4,0 (70/30), 40	citalopram	0,7/4,0/1,7	55
Častice	S-propranolol	na povrchu nosiča	MAA/toluén/EGDMA/-	acetonitril/fosforečnanový tlmivý roztok pH 5,1 (70/30), 25	R,S-propranolol R,S-pindolol R,S-alprenolol	1,1/6,0/2,3 0,6/-/2,1 0,5/-/1,6	48
	L-fenylalanin		akryoyl-b-CD, MAA/acetonitrile, voda/EGDMA/AIBN	acetonitrile/kyselina octová 1% (85/15), 25	D,L-fenylalanin	1,5/3,0/1,4	56
Monolit	L-nateglinid		AA/cyklohexanol, 1-dodekanol/EGDMA/AIBN	acetonitril (100%), 25	D,L-nateglinid	2,4/5,2/2,9	50
	S-amlodipin		MAA/dodekanol/EGDMA/AIBN	acetonitril/fosforečnanový tlmivý roztok pH 4,0 (70/30), 35	R,S-amlodipin	0,7/2,5/2,2	57
	S-naproxen	<i>in situ</i>	BMA a MAA (1/1)/toluén, izooktán/EGDMA/AIBN	acetonitril/octanový tlmivý roztok pH 3,6 (90/10), 53	R,S-naproxen	1,5/0,4/1,4	58
	kyselina R-mandľová		4-VP/DMF, DMSO, [BMIM]BF ₄ /EGDMA/AIBN	acetonitril/octanový tlmivý roztok pH 3,6 (90/10), 40	R,S-kyselina mandľová	1,9/6,3/1,5	59
	Cbz-L-Trp		4-VP/1-dodekanol, toluén/EGDMA/AIBN	acetonitril/ kyselina octová (40/60), 23	Cbz-D,L-Trp	1,0/0,8/2,5	60

AA – akrylamid, ABCVA – kyselina 4,4-azobis(4-kyanovalerová), ADVN- 2,2'-azobis(2,4-dimetylvaleronitril), BA – benzylacetonitril, AIBN – azoizobutyronitril, [BMIM]BF₄ – 1-butyl-3-metylimidazolium tetrafluorborát, BMA – butylmetakrylát, Boc-L-Trp – *tert*-butyloxykarbonyl-L-fenylalanin, Cbz-L-Trp – karbobenzoyloxy-L-tryptofán, CD – cyklo-dextrín, Cu(VBIDA) – *N*-4-vinylbenzyliminodioxán meďnatý, DCPTS – *N,N'*-diethylaminoditioakrylamid(trimetoxysilán), DMF – dimetylformamid, DMSO – dimetylsulfoxid, DPA – 2,2-dimetoxy-2-fenylacetofenón, DVB – divinylbenzen, EGDMA – etylénglykol dimetakrylát, IA – kyselina itakónová, MAA – kyselina metakrylová, TFMAA – kyselina trifluorometakrylová, TRIM – trimetylopropán-trimetakrylát, 4-VP – 4-vinylpyridin

4. Použitie MIP chirálnych stacionárnych fáz

Porovnanie a využitie rôznych spôsobov prípravy MIP stacionárnych fáz pre HPLC separáciu enantiomérov vybraných látok dokumentuje tab. I. Najširšia aplikačná oblasť MIP CSF je farmaceutická analýza a z toho dôvodu tabuľka sumarizuje údaje pre vybrané liečivá ako MIP templáty. Na prípravu MIP stacionárnej fázy sa najčastejšie používala kyselina metakrylová ako funkčný monomér, etylénglykol dimetakrylát ako sieťovacie činidlo a azoizobutyronitril ako iniciátor. Na separáciu enantiomérov boli vhodné mobilné fázy tvorené zmesou organického rozpúšťadla (metanol, acetonitril) a tlmivého roztoku. Dosažené hodnoty chromatografických charakteristík súviseli aj so spôsobom prípravy MIP. MIP stacionárne fázy boli vysoko enantioselektívne, čo naznačili aj hodnoty selektívnych koeficientov, vo väčšine prípadov väčšie ako 1,5. Avšak hodnoty chromatografického rozlíšenia dosahovali nižšie hodnoty ($R_{ij} \sim 0,6-1$) s výnimkou aplikácií CSF pripravených *in situ* polymerizáciou a blokovou polymerizáciou ($R_{ij} > 1,4$). Porovnaním rôznych polymerizačných techník použitých pre rovnaký typ templátu (S-propanol, S-naproxen) možno konštatovať, že účinnejšia separácia enantiomérov sa dosiahla na CSF pripravenej *in situ* polymerizáciou.

Chiralita je neoddeliteľnou vlastnosťou aminokyselín. MIP chirálne stacionárne fázy na separáciu enantiomérov aminokyselín sa väčšinou pripravujú použitím vhodného derivátu jedného z enantiomérov ako templátu pri polymerizácii. Na prípravu polymérov sa používajú kyslé aj zásadité funkčné monoméry. Kyselina metakrylová sa volí v prípade, keď sa ako templáty v procese odtlačania použijú estery alebo amidy aminokyselín. Kyslá skupina monoméru poskytuje silné iónové interakcie s funkčnými skupinami (amínovými alebo amidovými) templátu a s karboxylovými a karbonylovými skupinami vytvára vodíkové väzby^{61,62}. Monoméry 2- a 4-vinilpyridín sú vhodné pre prípravu MIP založenú na tvorbe iónových interakcií pri templátoch ako je *tert*-butyloxykarbonylfenylalanín (t-Boc-fenylalanín), alebo fluorenylmetoxykarbonyl-L-3-nitrotyrozín (Fmoc-L-3-nitrotyrozín). Tieto deriváty s kyselinou metakrylovou tvoria v polárnom rozpúšťadle menej stabilné komplexy templát-monomér, keďže dochádza iba k tvorbe vodíkových väzieb, ktoré sú slabšie v porovnaní s iónovými interakciami^{46,63}. Pre analyty, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú kyslé funkčné skupiny, je vhodnejšie ako monomér použiť aj akrylamid³⁴. Akrylamid poskytuje silnejšie vodíkové interakcie a pri jeho nadbytku dochádza ku vzniku menšieho počtu nespecifických väzbových miest. Môže to byť spôsobené tým, že nenaviazaný akrylamid sa vyskytuje ako dimér³⁸. Bolo tiež zistené, že medzi derivátmi aminokyselín a karboxylovými monomérmi dochádza prednostne k tvorbe vodíkových interakcií, ktoré sú v prostredí polárneho rozpúšťadla oslabené. Často sa pri polymerizácii využívajú dva rozdielne monoméry, napr. kyselina metakrylová a akrylamid, ktoré podporujú tvorbu silnejších interakcií s templátom, a tým aj zlepšenie rozpoznávacej schopnosti MIP (cit.⁶⁴). Nederi-

vativované aminokyseliny ako templáty pre prípravu MIP CSF sa používajú zriedkavejšie. Využívajú sa najmä aminokyseliny obsahujúce vo svojej štruktúre benzénové jadro alebo heteroatómy (fenylalanín, tyrozín a triptofán). Najčastejšie funkčné monoméry sú kyselina metakrylová a akrylamid, ale aj modifikovaný β -cyklodextrín. Keďže cyklodextrín obsahuje hydrofilný povrch a hydrofóbnu kavitu, umožňuje tvorbu viacerých typov možných interakcií s templátom v porovnaní s bežnými monomérmi, čo sa prejavuje dosiahnutím vyšších hodnôt rozlíšenia enantiomérov pri chromatografickej separácii. Pri tvorbe predpolymerizačného komplexu sa využívajú vodíkové väzby a hydrofóbné interakcie s molekulami cieľového analytu⁶⁵. Z porovnania hodnôt získaných zo separácie na MIP CSF pre derivatizované a nederivatizované aminokyseliny vyplýva, že väčšie rozlíšenie sa dosahuje pre MIP pripravené odtlačaním derivátov aminokyselín (tab. I).

5. Zhrnutie a perspektívy MIP chirálnych stacionárnych fáz

Z hľadiska analytickej chémie je potrebné vyvíjať nové typy sorpčných materiálov vhodných ako stacionárne fázy pre pokročilé separačné techniky, ktoré umožnia účinnú separáciu látok/ enantioseparáciu, najmä v prípade biologických, farmaceutických, environmentálnych a potravinových analýz. Technika molekulového odtlačania špecifickej chemickej zlúčeniny spolu s rôznymi polymerizačnými technikami umožňuje pripraviť stacionárne fázy s vysokou selektivitou pre cieľovú látku/enantiomér. Vhodný polymérny materiál používaný ako stacionárna fáza v HPLC (aj v iných separačných technikách) by mal spĺňať viaceré požiadavky, ako je definovaná veľkosť a tvar častíc, vysoká pórovitosť a špecifický povrch. Z tohto dôvodu je proces ich vývoja, prípravy a charakterizácie časovo náročný. Limitácie laboratórne pripravených MIP stacionárnych fáz v porovnaní s komerčnými stacionárnymi fázami vyplývajú z možnosti nespecifických interakcií, pomalšej kinetiky sorpcie a desorpcie analytu na/ zo sorbentu, heterogenity väzbových miest, v niektorých prípadoch nižšej kapacity sorbentu a selektivity pri aplikovaní vzorky. Čiastočne ich možno ovplyvniť zložením mobilnej fázy, prietokom mobilnej fázy a teplotou kolóny. Monolitické MIP CSF pripravené priamo v kolóne a časticové CSF s MIP na povrchu nosiča sa javia ako optimálne riešenia pre separáciu enantiomérov a dosiahnutie vysokej účinnosti separácie chirálnych chemických zlúčenín.

Stacionárne fázy na základe polymérov s odtlačkami molekúl nachádzajú uplatnenie aj v SFC. V porovnaní s HPLC, SFC sa vyznačuje lepšou kinetikou prenosu látky, čo sa prejavuje vyššou účinnosťou kolóny v dôsledku menšieho rozširovania elučných zón separovaných látok. Väčšia dostupnosť väzbových miest v polyméri umožňuje v SFC dávkovanie väčších objemov vzorky. Limitáciou použitia MIP CSF v SFC je možnosť degradácie MIP pri extémnych separačných podmienkach, kvôli čomu je po-

trebná optimalizácia podmienok (tlak, teplota kolóny, zloženie mobilnej fázy). Ako mobilné fázy sa používajú zmesi CO₂ a organických rozpúšťadiel s prídavkom kyslého alebo zásaditého modifikátora na dosiahnutie dostatočnej elučnej sily. Z dlhodobého hľadiska MIP stacionárne fázy predstavujú alternatívu k bežným stacionárnym fázam v SFC^{66,67}. SFC so stacionárnymi fázami na báze MIP sa využila na enantioseparáciu chirálnych liečiv a ich metabolitov (propranolol, fenylalanín anilid⁶⁸, efedrín⁶⁹).

Práca vznikla s finančnou podporou projektu č. APVV-15-0355 Agentúry na podporu výskumu a vývoja. AL ďakuje Programu na podporu mladých vedcov STU.

LITERATÚRA

- Zawirska-Wojtasiak R.: Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 5, 21 (2006).
- Brookes J. C., Horsfield A. P., Stoneham A. M.: J. R. Soc. Interface 6, 75 (2009).
- Rocco A., Aturki Z., Fanali S.: TrAC Trends Anal. Chem. 52, 2016 (2013).
- Vasapollo G., Del Sole R., Mergola L., Lazzoi M. R., Scardino A., Scorrano S., Mele G.: Int. J. Mol. Sci. 12, 5908 (2011).
- Cheong W. J., Yang, S. H., Ali F.: J. Sep. Sci. 36, 609 (2013).
- Sádecká J., Polonský J.: Chem. Listy 99, 222 (2005).
- Machyňáková A., Hroboňová K.: Chem. Listy 110, 609 (2016).
- Wei Z. H., Mu L. N., Huang Y. P., Liu Z. S.: TrAC Trends Anal. Chem. 86, 84 (2017).
- Chen L., Wang X., Lu W., Wu X., Li J.: Chem. Soc. Rev. 45, 2137 (2016).
- Xu Z., Deng P., Tang S., Kuang D., Zhanga F., Lia J.: J. Mater. Chem. B 2, 8418 (2014).
- Zhang H., Dramou P., He H., Tan S., Pham-Huy C., Pan H.: J. Chromatogr. Sci. 50, 499 (2012).
- Huang B. Y., Chen Y. C., Wang G. R., Liu C. Y.: J. Chromatogr. A 1218, 849 (2011).
- Ye N., Li J.: J. Sep. Sci. 37, 2239 (2014).
- Wei Z. H., Mu L. N., Pang Q. Q., Huang Y. P., Liu Z. S.: Electrophoresis 33, 3021 (2012).
- Moreno-Gonzalez D., Lara F. J., Gamiz-Gracia L., Garcia-Campana A. M.: J. Chromatogr. A. 1360, 1 (2014).
- Zhao T., Wang Q., Li J., Qiao X., Xu Z.: J. Sci. Food Agric. 84, 1974 (2014).
- Aydogan C., Karakoc V., Deniyli A.: Food Chem. 187, 130 (2015).
- Wulff G., Vesper W.: J. Chromatogr. 167, 171 (1978).
- Sellergren B.: J. Chromatogr. A 96, 227 (2001).
- Kim H., Kaczmarek K., Guiochon G.: Chem. Eng. Sci. 60, 5425 (2005).
- Gao B., Chen L., Li Y.: J. Chromatogr. A 1443, 10 (2016).
- Alenazi N. A., Manthorpe J. M., Lai E. P. C.: Sensors 16, 1697 (2016).
- Liu J. M., Wei S. Y., Liu H. L., Fang G. Z., Wang S.: Polymers 9, 546 (2017).
- Rampey A. M., Umpleby R. J., Rushton G. T., Iseman J. C., Shah R. N., Shimizu K. D.: Anal. Chem. 76, 1123 (2004).
- Yang G., Wang D., Li Z., Zhou S., Chen Y.: Chromatographia 58, 53 (2003).
- Umpleby R. J., Baxter S. C., Chen Y., Shah R. N., Shimizu K. D.: Anal. Chem. 73, 4584 (2001).
- Turiel E., Perez-Conde C., Martin-Esteban A.: Analyst 128, 137 (2003).
- Sellergren B.: J. Chromatogr. A 906, 227 (2001).
- Sulitzky C., Rückert B., Hall A. J., Lanza F., Unger K., Sellergren B.: Macromolecules 35, 79 (2002).
- Yasuyama T., Matsunaga H., Ando S., Ishizuka T.: Chem. Pharm. Bull. 61, 546 (2013).
- Ou J., Kong L., Pan C., Su X., Lei X., Zhou H.: J. Chromatogr. A 1117, 163 (2006).
- Ansell R. J., Kuah K. L.: Analyst 130, 179 (2005).
- Kim H., Guiochon G.: Anal. Chem. 77, 93 (2005).
- Yu C., Mosbach K.: J. Org. Chem. 62, 4057 (1997).
- Huang X., Zou H., Chen X., Luo Q., Kong L.: J. Chromatogr. A. 984, 273 (2003).
- Fu Q., Sanbe H., Kagawa C., Kunimoto K. K., Haginaka J.: Anal. Chem. 75, 191 (2003).
- Haginaka J., Kagawa C.: J. Chromatogr. B 804, 19 (2004).
- Hroboňová K., Lomenova A.: Monatsh. Chem. 149, 939 (2018).
- Haginaka J., Sanbe H.: J. Chromatogr. A 913, 141 (2001).
- Haginaka J., Kagawa C.: Anal. Bioanal. Chem. 378, 1907 (2004).
- Chen X., Yang W., Zhou Y., Jiao F.: J. Porous Mater. 19, 587 (2012).
- Rutkowska M., Plot-Wasyłka J., Morrison C., Wieczorek P. P., Namiesnik J., Marc M.: TrAC Trends Anal. Chem. 109, 97 (2018).
- Turiel E., Martin-Esteban A.: Anal. Bioanal. Chem. 378, 1876 (2004).
- Liu Y., Hoshina K., Haginaka J.: Talanta 80, 1713 (2010).
- Yilmaz E., Ramstrom O., Moller P., Sanchez D., Mosbach M.: J. Mater. Chem. 12, 1577 (2002).
- Balamurugan K., Gokulakrishnan K., Prakasam T.: Saudi Pharm. J. 20, 53 (2012).
- Dong X., Sun H., Lü X., Wang H., Liu S., Wang N.: Analyst 127, 1427 (2002).
- Fairhurst R. E., Chassaing C., Venn R. F., Mayes A. G.: Biosens. Bioelectron. 20, 1098 (2004).
- Vidyasankar S., Ru M., Arnold F. H.: J. Chromatogr. A 775, 51 (1997).
- Yin J., Yang G., Chen Y.: J. Chromatogr. A 1090, 68 (2005).
- Walsh R., Osmani Q., Hughes H., Duggan P., McLaughlin P.: J. Chromatogr. B 879, 3523 (2011).
- Haginaka J., Sanbe H.: J. Chromatogr. A 13, 141 (2004).

- (2009).
53. Haginaka J., Tabo H., Kagawa C.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**, 877 (2008).
 54. Li Y., Fu Q., Zhang Q., He L. *Anal. Sci.* **22**, 1355 (2006).
 55. Gutierrez-Climente R., Gómez-Caballero A., Halhalli M., Sellergren B., Goicolea M. A., Barrio R. J.: *J. Mol. Recognit.* **29**, 106 (2016).
 56. Zhang Z., Zhang M., Liu Y., Yang X., Luo L., Yao S.: *Sep. Purif. Technol.* **87**, 142 (2012).
 57. Amut E., Fu Q. A., Fang Q., Liu R., Xiao A. P., Zeng A. G., Chang C.: *J. Polym. Res.* **17**, 401 (2010).
 58. Li Z. Y., Liu Z. S., Zhang Q. W., Duan H. Q.: *Chinese Chem. Lett.* **18**, 322 (2007).
 59. Bai L. H., Chen X. X., Huang Y. P., Zhang Q. W., Liu Z. S.: *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 8935 (2013).
 60. Qi J., Guo L., Sang H. F.: *Adv. Mater. Res.* **535**, 1525 (2012).
 61. Sellergren B., Shea K. J.: *J. Chromatogr. A* **635**, 31 (1993).
 62. Takeuchi T., Haginaka J.: *J. Chromatogr. B* **728**, 1 (1999).
 63. Scorrano S., Mergola L., Del Sole R., VasapolloInt G.: *J. Mol. Sci.* **12**, 1753 (2011).
 64. Takeuchi T., Fukuma D., Matsui J.: *Anal. Chem.* **71**, 285 (1999).
 65. Zhang W., Qin L., He X. W., Li W. Y., Zhang Y. K.: *J. Chromatogr. A* **1216**, 4560 (2009).
 66. Ansell R. J., Kuah J. K., Wang D., Jackson C. E., Bartle K. D., Clifford A. A.: *J. Chromatogr. A* **1264**, 117 (2012).
 67. Ansell R. J.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1809 (2005).
 68. Ellwanger A., Owens P. K., Karlsson L., Bayouhd S., Cormack P., Sherrington D., Sellergren B.: *J. Chromatogr. A* **897**, 317 (2000).
 69. Ansell R. J., Kuah J. K., Wang D., Jackson C. E., Bartle K. D., Clifford A. A.: *J. Chromatogr. A* **1264**, 117 (2012).
- A. Lomenova and K. Hroboňová** (*Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Bratislava, Slovakia*): **Molecularly Imprinted Polymers as Chiral Stationary Phases in HPLC**
- The present work is focused on the use of selective sorption materials based on molecularly imprinted polymers in the field of HPLC separation of enantiomers of biologically active compounds. In comparison to traditional chiral stationary phases, the molecularly imprinted sorbents allow one to determine the elution order of enantiomers by selection of a stereoselective template. The review deals with the limitations of the use of the chiral stationary phases and the possibilities of kinetic and thermodynamic evaluations of sorption. A part of the paper is devoted to an overview of their application as sorbents for HPLC separation of enantiomers of some drugs and amino acids.
- Keywords:** HPLC, molecularly imprinted polymers, stationary phase, enantiomers
- Acknowledgements*
The work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract no. APVV-15-0355. AL also thank the Grant scheme for Supporting of Young Researchers at Slovak University of Technology in Bratislava.