

## VYUŽITIE CYKLODEXTRÍNOV V PLYNOVEJ CHROMATOGRAFII: PRÍPRAVA KAPILÁRNYCH KOLÓN S CYKLODEXTRÍNOVÝMI STACIONÁRNymi FÁZAMI

DARINA KAČERIAKOVÁ a IVAN ŠPÁNIK

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

Došlo 8.2.13, prijaté 24.6.13.

Kľúčové slová: cyklodextríny, plynová chromatografia, chirálne stacionárne fázy, enantioméry

### Obsah

1. Úvod
2. Neimobilizované cyklodextrínové stacionárne fázy
3. Imobilizované cyklodextrínové stacionárne fázy
4. Kombinované cyklodextrínové stacionárne fázy
5. Záver

### 1. Úvod

Kapilárna plynová chromatografia (GC) patrí medzi najčastejšie používané analytické metódy v separácii opticky aktívnych zlúčenín na ich jednotlivé enantioméry. Aj keď sa táto technika prakticky používa od roku 1966 (cit.<sup>1</sup>), k jej výraznému vývoju došlo až po zavedení cyklodextrínov (CD) a ich derivátov ako stacionárnych fáz, teda koncom 80. rokov minulého storočia<sup>2,3</sup>. Cyklodextríny sú cyklické glukózové oligoméry s glukózovými jednotkami v D(+) konfigurácii a stoličkovej konformácii. Ich molekuly pripomínajú torus so špecifickými rozmermi dutiny a s voľnými hydroxylovými skupinami viazanými na uhlíkových atómoch v polohách 2, 3 a 6 glukózových jednotiek. Hydroxylové skupiny viazané na uhlíkových atómoch v polohách 6 môžu rotovať a spôsobujú čiastočné uzavretie užšieho konca dutiny. Hydroxylové skupiny naviazané na uhlíkových atómoch v polohách 2 a 3 sú umiestnené na širšom konci dutiny. Hydroxylové skupiny na 2 uhlíkovom atóme sú orientované v smere osi CD, zatiaľ čo hydroxylové skupiny na 3 uhlíkovom atóme sú orientované smerom do vnútra dutiny. Vzhľadom na rozdielnu reaktivitu vodíkových atómov v hydroxylových skupinách je možné ich rôzne nahradiť vhodnými substituentmi a takto pripraviť CD deriváty s rozdielnymi vlastnosťami a enantioselektivitou. Obalová konformáciu tvoria glukózové jednotky spojené cez atómy kyslíka viazané na prvom a štvrtom uhlíkovom atóme. Konformácia je stabilizovaná vodíkovou väz-

bou medzi hydroxylovými skupinami na druhom a treťom uhlíkovom atóme. Dutina má hydrofóbny charakter, na rozdiel od hydrofilného povrchu CD<sup>4</sup>. V praxi sa najčastejšie využívajú cyklodextríny so 6 ( $\alpha$ -CD), 7 ( $\beta$ -CD) a 8 ( $\gamma$ -CD) glukózovými jednotkami. Tematika vlastností a využitia CD a ich derivátov ako stacionárnych fáz v GC bola podrobne rozobraná v publikovaných prehľadných prácach<sup>5–13</sup> a ďalších.

Separácia enantiomérov v GC závisí od rôznych faktorov. Okrem základných parametrov, ktoré všeobecne ovplyvňujú plynovochromatografickú separáciu, ako sú parametre kolóny a pracovné podmienky, separáciu enantiomérov ovplyvňujú predovšetkým chirálne vlastnosti stacionárnej fázy. Enantioselektivita chirálnej stacionárnej fázy okrem veľkosti dutiny CD, typu substituentov a ich polohy v molekule CD závisí aj od množstva CD derivátu a polarít polysiloxánu, v ktorom je CD derivát rozpustený<sup>14</sup>. Kapilárne kolóny možno vyrobiť statickou alebo dynamickou metódou. Pre kremenné kapiláry sa doporučuje statická metóda, pretože touto metódou možno zaistiť reprodukovateľné vlastnosti kolón<sup>15</sup>. Detaily o oboch metódach, ako aj rôznych spôsoboch predúpravy kremenných kapilár možno nájsť v práci Groba<sup>16</sup>.

### 2. Neimobilizované cyklodextrínové stacionárne fázy

Spôsob prípravy kapilárnych kolón závisí od skupenstva derivátu. Tuhé CD deriváty s teplotou topenia nad 150 °C ako stacionárne fázy vykazujú v GC malé separačné účinnosti a poskytujú nesymetrické a chvostujúce píky. Tieto problémy možno čiastočne eliminovať kondičiou kolón s týmito fázami pri vyšších teplotách. Zistilo sa, že po vyhriatí kolóny nad 200 °C a jej následnom rýchlom ochladení CD stacionárna fáza zostane ako „podchladená kvapalina“, čo umožňuje jej využitie na enantioméru separácie aj pri teplotách nižších ako 80 °C (cit.<sup>17</sup>). Schurig zistil, že je výhodné ako stacionárne fázy v GC použiť roztoky CD derivátov v polysiloxánoch. V takýchto zmesných fázach sa využíva enantioselektivita CD derivátov a separačná účinnosť polysiloxánov, čo umožňuje výrobu enantioselektívnych kapilárnych kolón s veľmi dobrými separačnými účinnosťami<sup>18,19</sup>. Rozpustnosť CD derivátu v polysiloxáne však závisí tak od jeho polarít, ako aj polarít polysiloxánu. Vo všeobecnosti platí, že pre polárnejšie CD deriváty {(2,3,6-tri-*O*-metyl)-CD, (2,3-di-*O*-acyl-6-*O*-*terc*-butyldimetylsilyl)-CD, alebo (2,6-di-*O*-alkyl-3-*O*-alkyl/acyl)-CD} je potrebné ako rozpúšťadlo použiť polárnejší polysiloxán, zatiaľ čo pre menej polárne CD deriváty, medzi ktoré možno zahrnúť alkylderiváty s vyššie uhlíkatým alkylovým reťazcom, je výhodnejšie použiť

stredne polárne alebo nepolárne polysiloxány. Tuhé CD sú však v polysiloxánoch rozpustné len obmedzene. Zvyšovaním množstva CD v zmesnej fáze kolóna stráca separačnú účinnosť. Hraničná koncentrácia je pre každý derivát CD a polysiloxán iná. Zvyčajne sa pohybuje v rozmedzí od 10 % (cit.<sup>19</sup>) do 50 % (cit.<sup>20</sup>). Teplotný rozsah, v ktorom možno kolóny so zmesnými fázami používať, závisí najmä od teplotnej stálosti CD derivátu. K základným nedostatkom kolón so zmesnými CD derivátmi patrí zriedenie CD derivátu, čo znižuje jej enantioselektivitu. Enantioméry pri separácii interagujú aj s polysiloxánom, čím sa znižuje interakcia s CD derivátom. Medzi výhody kolón so zmesnými CD fázami patria kratší čas analýz, symetrické píky, možnosť separovať vzorky pri nižších teplotách a vysoká stabilita filmu stacionárnej fázy.

Okrem polysiloxánov sa ako rozpúšťadlá CD derivátov používajú aj iónové kvapaliny (IL)<sup>21</sup>. Prvé takto pripravené stacionárne fázy však vzhľadom na ich polysiloxánové analógy vykazovali nielen výrazne nižšie separačné účinnosti, ale aj enantioselektivitu. Zo skupiny 64 chirálnych zlúčenín separovaných na komerčných alkylolovaných CD rozpustených v polydimetylsiloxáne sa na tom istom CD deriváte rozpustenom v 1-butyl-3-metyl-imidazólium chloride podarilo separovať iba 21 zlúčenín. Preto možno predpokladať, že časť IL interaguje s CD dutinou, čo blokuje schopnosť CD derivátu prispievať k rozlíšeniu enantiomérov<sup>22</sup>. Ding a spol. syntetizovali chirálne IL na báze *N,N*-dimetylfedrinu a následne ich použili ako stacionárne fázy v GC. Výhodou takýchto IL je, že sa môžu pripraviť ako čistý D a L-enantiomér a teda je možné cielene ladit' enantioselektivitu a tým pádom aj elučné poradie eluujúcich enantiomérov<sup>23</sup>. Na ich prácu následne nadviazali Huang a spol., ktorí syntetizovali CD deriváty na báze IL (permetyl-6-(butylimidazólium)- $\beta$ -CD a permetyl-6-(tripropylfosfónium)- $\beta$ -CD kation spárovaný s jodidovými a trifalátovými aniónmi)<sup>21</sup>. Následne sa tieto CD deriváty rozpustili v chirálnych a nechirálnych IL. Všetky takto pripravené stacionárne fázy vykazovali vynikajúcu separačnú účinnosť, avšak ich enantioselektivita závisela od typu iónu funkčnej skupiny naviazaného na CD. Porovnaním s komerčnou stacionárnou fázou s polysiloxánovou maticou sa na CD stacionárných fázach na báze IL nielen zlepšili enantioseparácie pre viac ako tretinu testovaných látok, ale tiež sa podarilo separovať enantioméry niektorých zlúčenín, ktoré na komerčnej kolóne nebolo možné oddeliť. Okrem toho tieto stacionárne fázy poskytli symetrické tvary píkov a lepšiu účinnosť pre racemické analyty s vyššou polaritou.

Kvapalnú CD deriváty, ktoré majú lipofilný charakter, sa môžu naviazať priamo na povrch sklenej alebo kreme-nej kapiláry pomocou fyzikálno-chemických interakcií<sup>24</sup>. Takto pripravené kolóny poskytujú vysokú enantioselektivitu, a preto na enantioméru separáciu možno použiť aj veľmi krátke kolóny. Tieto fázy však vykazujú značnú retenciu separovaných zlúčenín, píky sú často nesymetrické a separačné účinnosti kolón s týmito fázami sú pri teplotách nižších ako 50 °C veľmi nízke<sup>25</sup>. Kvalitu týchto kolón ovplyvňuje aj materiál, z ktorého je kapilára vyrobe-

na. Na rozdiel od sklenených kapilár, ktorých povrch možno zmačkat' čistými derivátmi CD, kremenné kapiláry vykazujú veľmi nízke hodnoty povrchového napätia, čo znemožňuje pokryť povrch súvislým filmom stacionárnej fázy a na povrchu sa namiesto filmu vytvárajú kvapky<sup>26</sup>. Homogénny a stály film stacionárnej fázy na povrchoch kremenných kapilár možno získať použitím roztoku kvapalných CD v polysiloxánoch. Na rozdiel od zmesných fáz pripravených z tuhých CD, kde obsah CD v zmesnej fáze je spravidla nižší ako 50 %, v zmesných fázach pripravených z kvapalných CD je možné zvýšiť obsah chirálneho selektora až do 90 %.

### 3. Imobilizované cykloextrínové stacionárne fázy

Ďalšie zlepšenie vlastností kolón s CD stacionárnymi fázami sa dosiahlo kovalentným naviazaním CD derivátu na polysiloxán. Získaný derivát možno ďalej naviazať (imobilizovať) na povrchu kapiláry. Okrem všeobecne známych výhod, ktoré vykazujú kolóny s imobilizovanými stacionárnymi fázami, medzi ktoré patrí teplotná stálosť, malá prchavosť fázy z kolóny a dlhšia životnosť kolón, vykazujú kolóny pripravené z CD fáz naviazaných na polysiloxán ešte ďalšie výhody. Medzi ne patrí možnosť použitia vysokých prietokov nosného plynu, ako aj možnosť použitia prakticky všetkých dávkovacích techník (splitless dávkovanie, priame dávkovanie do kolóny a dávkovanie veľkých objemov). Tieto experimentálne podmienky spôsobujú pri kolónach s CD derivátom rozpusteným v polysiloxáne a zachyteným na stenách kapiláry fyzikálnymi silami vymývanie CD z kolóny a postupné znižovanie enantioselektivity kapilárných kolón. Naviazaním CD derivátu na polysiloxán sa značne zníži teplota, pri ktorej ešte možno enantioméry separovať. Takéto kolóny umožňujú separácie aj pri izbových teplotách. Sprievodným javom imobilizácie je, že kolóny s týmito fázami poskytujú nižšie separačné účinnosti ako kolóny so zmesnými fázami. Pri čiastočnej imobilizácii poklesne účinnosť kolón približne o 10 % (cit.<sup>27,28</sup>). Pri úplnej imobilizácii však separačná účinnosť klesne významne<sup>28–30</sup>.

Imobilizované fázy možno rozdeliť do dvoch skupín. Do prvej skupiny patria stacionárne fázy, kde je CD derivát naviazaný na polysiloxán prostredníctvom jednej éterickej väzby. Syntéza tohto typu stacionárnej fázy je pomerne náročná. V prvom stupni sa na CD naviaže „spacer“, ktorý slúži na naviazanie CD na polysiloxán. Ako spacer sa najčastejšie používa lineárny organický substituent, ktorý obsahuje dvojité väzby. Výťažnosť tohto stupňa je relatívne nízka (asi 30 %) <sup>28</sup>. Tento stupeň syntézy je významný, pretože sa vyžaduje, aby sa spacerom nahradil vodíkový atóm len v jednej hydroxylovej skupine viazanej na 6 uhlíkovom atóme CD. Prípadné nečistoty, alebo syntéza derivátu, v ktorom sa spacerom nahradia viaceré vodíkové atómy, môžu významne ovplyvniť imobilizáciu stacionárnej fázy na povrchu kapiláry. Derivát CD so spacerom slúži ako východisková surovina pre ďalší stupeň

syntézy, v ktorom sa pripraví alkylovaný, alebo alkyl/acylovaný derivát CD. V poslednom stupni sa CD derivát naviaže na polysiloxán hydrosilylačnou reakciou za katalytického účinku  $H_2PtCl_6$ . Tento postup možno použiť aj na imobilizáciu CD obsahujúcich *tert*-butyldimetylsilylovú skupinu<sup>31</sup>. Doteraz bolo pripravených iba päť CD naviazaných na polysiloxán, z ktorých tri sú dostupné komerčne.

Imobilizované CD stacionárne fázy zaviedli do GC Fischer a spol.<sup>32</sup>, ktorí použili na zakotvenie permetylovaného CD alylový spacer a Schurig a spol.<sup>33</sup>, ktorí použili ako spacer 1-pentenyl a 1-oktenyl. Z použitých spacerov vykazuje najlepšie vlastnosti 1-oktenyl, pretože monokis-oktenylácia je omnoho selektívnejšia ako alylácia alebo pentenylácia<sup>34</sup>. Enantioselektivitu stacionárnej fázy ovplyvňuje navyše aj miesto naviazania CD derivátu na polysiloxán. Sledoval sa vplyv polohy okt-7-enylového spaceru (naviazaného v polohe O-2, O-3, alebo O-6) na enantioselektivitu permetylovaného  $\beta$ -CD<sup>35,36</sup>. Zistilo sa, že enantioselektivita sa zhorší, ak sa monooktametylenový spacer nachádza na užšom okraji CD torusu. V prípade spaceru naviazaného na širšom okraji CD torusu, teda v polohách O-2 a O-3 sa nepozoroval významnejší vplyv na enantioselektivitu<sup>35</sup>. Vynikajúce enantioseparačné vlastnosti vykazoval aj nedávno pripravený permetylovaný- $\beta$ -CD s undekametylenovým spacerom<sup>37–40</sup>. Enantioselektivita CD fáz, u ktorých sa použili spacery, ktoré obsahovali aromatickú skupinu, bola nižšia, ako u fáz, pri ktorých sa ako spacer využil alkylový substituent<sup>41</sup>. Z imobilizovaných CD stacionárnych fáz sa podarilo pripraviť (2,6-di-*O*-metyl-3-*O*-trifluóracetyl)- $\gamma$ -CD – komerčne dostupný ako Chirasil-Dex-TFA<sup>27</sup>, (2,6-di-*O*-metyl-3-*O*-pentyl)- $\gamma$ -CD<sup>42</sup>, (2,6-di-*O*-pentyl-3-*O*-butyryl)- $\gamma$ -CD – komerčne dostupný ako Chirasil- $\gamma$ -Dex<sup>43,44</sup> a (6-*O*-*tert*-butyldimetylsilyl)-2,3-di-*O*-metyl)- $\beta$ -CD<sup>31</sup>.

Pri týchto imobilizovaných CD stacionárnych fázach možno použiť väčšie množstvo CD derivátu a tým zlepšiť enantioselektivitu vyrobených kolón<sup>45</sup>. Vo všeobecnosti možno síce na polysiloxán naviazať značné množstvo CD derivátu, zistilo sa však, že zvyšovaním koncentrácie CD v polysiloxáne nad 50 % vzrastá hodnota selektívneho

faktora  $\alpha$  len nepatrne. Preto koncentrácia, pri ktorej sa ešte imobilizuje dostatočné množstvo kopolyméru, sa pohybuje okolo 40 % CD derivátu. Vplyv obsahu CD v kopolymére na imobilizáciu je uvedený v tab. I. V kapilárnych kolónach s veľmi malým priemerom so stacionárnymi fázami, kde bol CD derivát naviazaný na polysiloxán, sa pozorovala nezvyčajná deformácia prvého píku<sup>46</sup>.

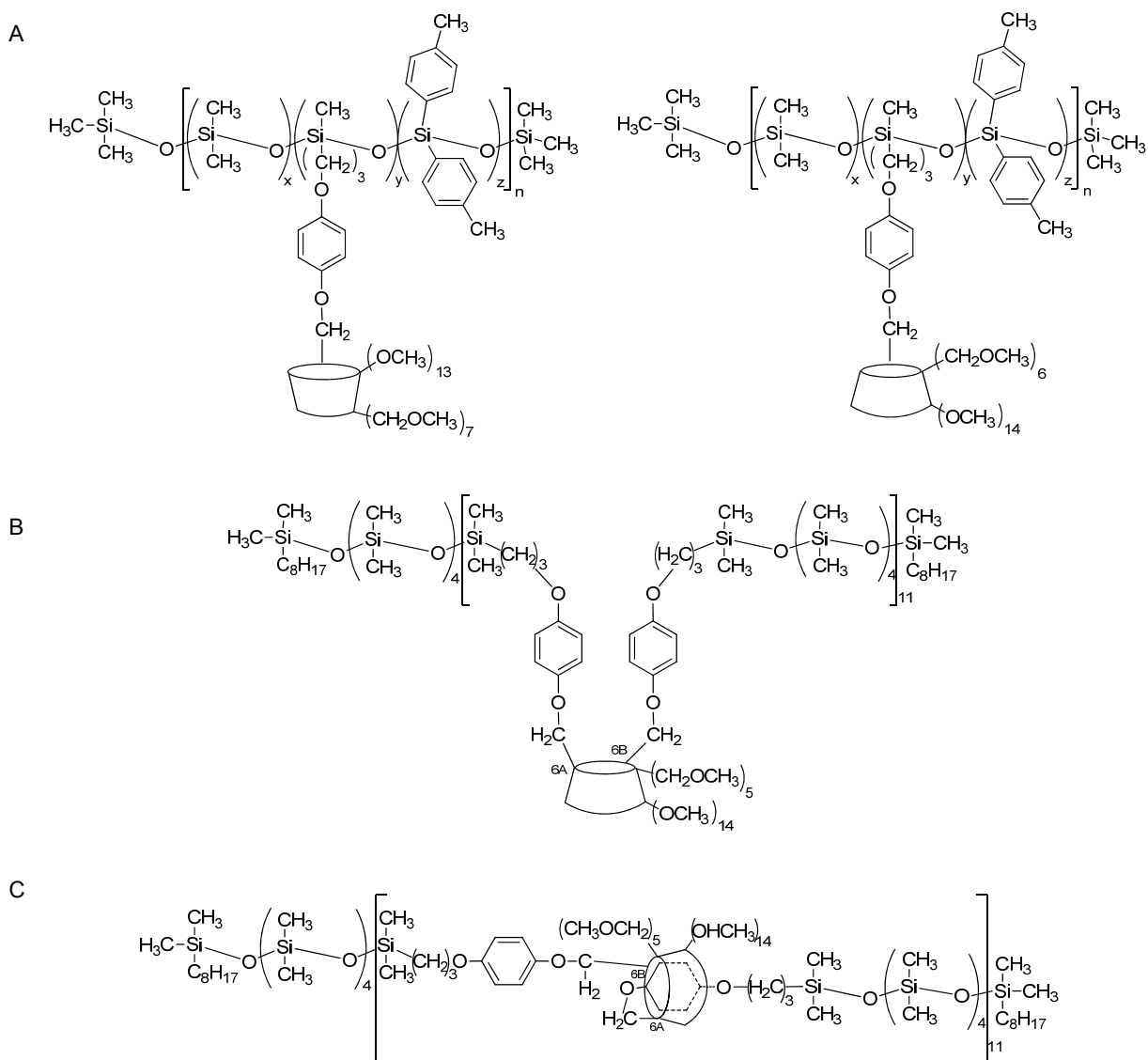
Iný typ imobilizovaných CD navrhli Armstrong a spol.<sup>47</sup>. Na imobilizáciu využili alylový, alebo pentenyl-ový spacer, ale na rozdiel od vyššie spomínaných kopolymérov sa CD derivát naviazal na polysiloxán nie jednou, ale prostredníctvom viacerých hydroxylových skupín viazaných na uhlíkových atómov v polohe 2 a 6. Ostatné voľné hydroxylové skupiny sa v druhom stupni alkylovali, alebo acylovali. Vzniknutý derivát sa potom naviazal na polysiloxán pomocou hydrosilylačnej reakcie za katalytického účinku  $H_2PtCl_6$  (cit.<sup>47</sup>). U týchto fáz sa zistilo, že naviazaním spacerov s menším počtom uhlíkových atómov sa dosiahne vyššia enantioselektivita a separačná účinnosť. Tieto dva parametre navyše výrazne ovplyvňujú obsah polysiloxánu v kopolymére. Vo všeobecnosti možno konštatovať, že stacionárne fázy s vyšším obsahom polysiloxánu poskytujú kolóny s vyššími separačnými účinnosťami a menšou enantioselektivitou<sup>48</sup>. Niektoré ďalšie spôsoby prípravy CD kopolymérov s polysiloxánmi popísali Yi a spol.<sup>49,50</sup>. CD kopolyméry pripravené Armstrongom a spol.<sup>47</sup> a Yi a spol.<sup>49,50</sup> majú všetky výhody imobilizovaných CD stacionárnych fáz a možno ich použiť aj v iných separačných technikách ako HPLC, SFC, alebo CE. Ich štruktúra je zrejmä z obr. 1A.

Do druhej skupiny imobilizovaných fáz možno zaradiť stacionárne fázy, kde je CD derivát zabudovaný do štruktúry polysiloxánu. Takéto polyméry sa nazývajú rotaxánové kopolyméry. Prvý raz boli popísané v roku 1993 (cit.<sup>51</sup>). V týchto rotaxánových kopolyméroch je CD derivát spojený s polysiloxánom prostredníctvom dvoch hydroxylových skupín v 6 polohe. Na sledovanie vplyvu polohy pripojenia CD jednotky k polysiloxánu boli syntetizované kopolyméry, kde CD bol pripojený k polysiloxánu prostredníctvom  $6^{A_6B}$ ,  $6^{A_6C}$  a  $6^{A_6D}$  hydroxylových

Tabuľka I  
Vplyv obsahu cyklodextrínu v kopolymére na imobilizáciu

Stac. fáza	Chirasil-Dex <sup>d</sup>			Chirasil- $\gamma$ -Dex <sup>d</sup>			Chirasil-Dex-TFA <sup>d</sup>			(2,6-DiMe-3-Pe)- $\gamma$ -CD <sup>d</sup>
% CD <sup>e</sup>	10	24	36	20	40	60	10	25	35	50
% imob. <sup>f</sup>	–	61 <sup>c</sup>	88 <sup>b</sup>	78 <sup>b</sup>	71 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup> , 41 <sup>a</sup>	90 <sup>b</sup>	0	0	cca 100 <sup>a</sup>
tep. imob. <sup>g</sup>	240 °C (40 h)			250 °C (36 h)			175 °C (20 h)			tepl. program 40 °C(1 h) 30 °C/h –220 °C

<sup>a</sup> Použitý polysiloxán obsahujúci 15% voľných hydroxylových skupín, <sup>b</sup> použitý polysiloxán obsahujúci 10% voľných hydroxylových skupín, <sup>c</sup> použitý polysiloxán obsahujúci 5% voľných hydroxylových skupín. Syntézu takýchto polysiloxánov publikoval Figge a spol.<sup>70</sup>, <sup>d</sup> prebraté z literatúry<sup>27,33,42,45</sup>, <sup>e</sup> % CD – hmotnostné % imobilizovaného cyklodextrínu, <sup>f</sup> % imob. – stupeň imobilizácie sledovaný meraním separačných faktorov  $\alpha$  a kapacitných faktorov  $k$  vybraných chirálnych látok, <sup>g</sup> tep. imob. – teplota a trvanie imobilizácie



Obr. 1. Štruktúra cyklodextrínových kopolymérov. (A)<sup>50</sup> – kopolymér, kde je cyklodextrínový derivát naviazaný na polysiloxán prostredníctvom jednej éterickej väzby; (B, C)<sup>53</sup> – kopolymér, kde je cyklodextrínový derivát zabudovaný do štruktúry polysiloxánu

skupín<sup>52</sup>. Z hodnôt selektívnych faktorov sa zistilo, že všetky kopolyméry majú približne rovnaké enantioselektívne vlastnosti. Aj u týchto derivátov sa podrobne študoval vplyv dĺžky spaceru a spôsob naviazania CD derivátu v polysiloxáne na enantioselektívne vlastnosti výsledného kopolyméru. Výsledky boli prakticky zhodné s výsledkami, ktoré sa získali s CD derivátmi naviazanými na polysiloxán prostredníctvom jedného spaceru<sup>41</sup>. Podarilo sa vyrobiť aj rotaxánový kopolymér, ktorý má dutinu vyplnenú aromatickým jadrom<sup>53</sup>. Štruktúrne vzorce rotaxánových polymérov obsahujúcich CD sú ukázané na obr. 1B a 1C.

#### 4. Kombinované cyklodextrínové stacionárne fázy

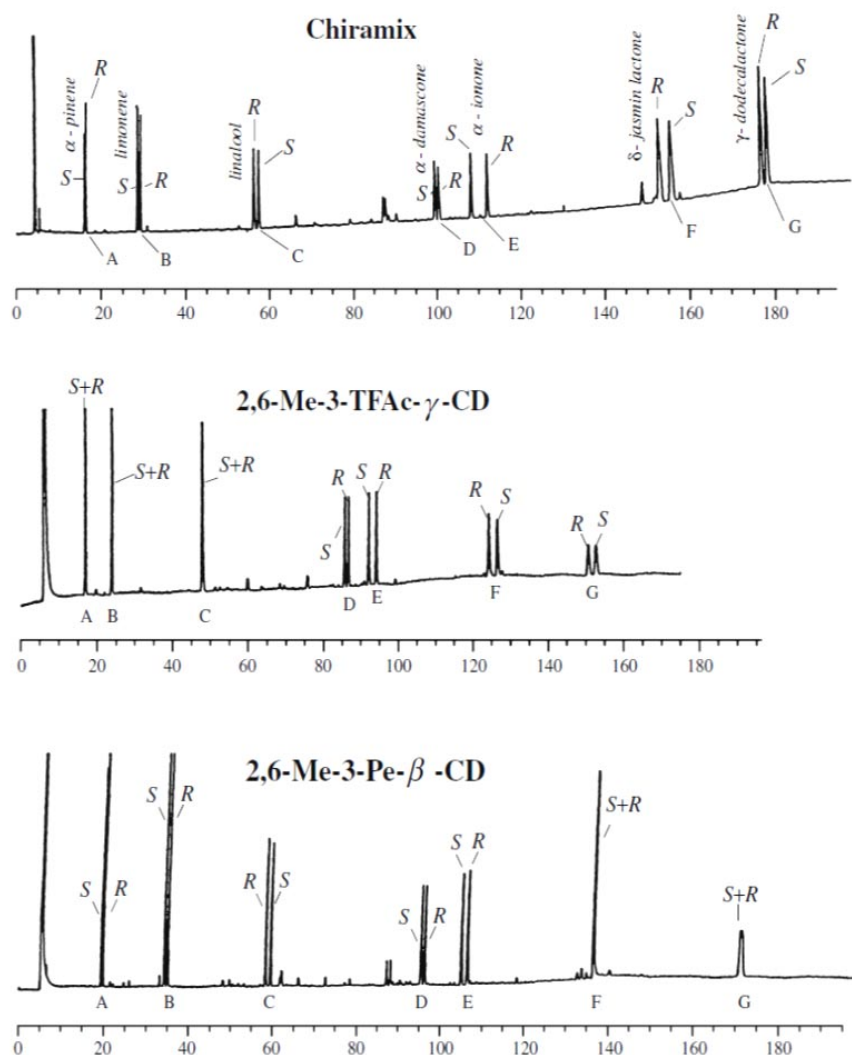
Poslednou skupinou stacionárnych fáz na báze CD sú kombinované fázy, ktoré obsahujú viac typov chirálnych selektorov rozpustených, alebo viazaných na achirálné rozpúšťadlo. Porovnaním separácie enantiomérov na príslušných fázach s jedným selektorom sa zistilo, že niektoré enantioméry, ktoré sa neseperovali na samostatných CD derivátoch, sa na týchto kombinovaných fázach podarilo úplne rozlíšiť<sup>36,54–58</sup>. Navyše pri niektorých separáciách boli pozorované aj synergické účinky použitej zmesi CD

derivátov<sup>54,59</sup>. Príkladom takéhoto synergického efektu môže byť zmes heptakis-(2,6-di-*O*-metyl-3-*O*-pentyl)- $\beta$ -CD a oktakis-(2,6-di-*O*-metyl-3-*O*-trifluóracetyl)- $\gamma$ -CD. Prvá stacionárna fáza ako samostatná kolóna umožňuje separáciu enantiomérov uhľovodíkov, alkoholov a ketónov, ale nie je vhodná na separáciu enantiomérov laktónov. Druhá spomínaná stacionárna fáza je naopak vhodná práve pre enantiomérmé separácie ketónov a laktónov, ale neumožňuje separovať enantioméry uhľovodíkov a alkoholov. Novo pripravená kombinovaná fáza dokázala oddeliť enantioméry všetkých spomínaných skupín zlúčenín, čo možno vidieť na obr. 2 (cit.<sup>60</sup>).

Podobne, kombinovaná stacionárna fáza heptakis(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*terc*-butyldimetylsilyl)- $\beta$ -CD<sup>61</sup> a heptakis(2,3-di-*O*-metyl-6-*O*-*terc*-butyldimetylsilyl)- $\beta$ -CD výrazne

zjednodušila separáciu enantiomérov monoterpénov spolu s linalyl acetátom nachádzajúcich sa v esenciálnych olejoch<sup>62</sup>. Na separáciu enantiomérov chirálnych rozvetvených alkánov je vhodné použiť kombinovanú chirálnu stacionárnu fázu z oktakis(6-*O*-metyl-2,3-di-*O*-pentyl)- $\gamma$ -CD a heptakis(2,3-di-*O*-metyl-6-*O*-*terc*-butyldimetylsilyl)- $\beta$ -CD rozpustených v PS-086, ktorá umožňuje separovať enantioméry väčšiny rôzne alkylovaných pentánov a hexánov so siedmimi a ôsmimi atómami uhlíka<sup>55</sup>.

Xiao a spol. ako prví, sledovali možnosť kombinácie dvoch rozdielnych chirálnych selektorov, v tomto prípade modifikovaného rezorcinarénu a  $\beta$ -CD derivátu<sup>63</sup>. V ich práci neskôr pokračoval Ruderish a spol., ktorí enantiomérmé čistý rezorcinarénový (kalix[4]rezorcinarén) derivát<sup>64</sup> skombinovali s amidickou chirálnou stacionárnou



Obr. 2. Chromatogramy štandardných vzoriek zmesi získané separáciou na kolónach chiramix, 2,6-Me-3-Pe- $\beta$ -CD a 2,6-Me-3-TFAc- $\gamma$ -CD (cit.<sup>60</sup>)

fázou (L-valíndiamidom) a kovalentne zakotvili na polysiloxán OV-101 (Chirasil-Kalixval)<sup>65</sup>. Následne sa Chirasil-Kalixval doplnil o permetylovaný- $\beta$ -CD (Chirasil-Dex), čím vznikla stacionárna fáza s tromi rozdielnymi chirálnymi selektormi (Chirasil-Kalixval-Dex)<sup>56,66</sup>. V tejto kombinovanej fáze sa podarilo zachovať enantioselektivitu jednotlivých chirálnych selektorov, čím vznikla univerzálna chirálna stacionárna fáza vhodná na separáciu enantiomérov uhl'ovodíkov, alkoholov, ketónov, biogénnych aminokyselín a pod. Navyše, zmenou chiralít diamidových selektorov z L na D (inverzné) alebo na DL (racemát) môžu byť dosiahnuté ďalšie zaujímavé poznatky o vplyve dvoch selektorov v kombinovaných chirálnych stacionárnych fázach<sup>67</sup>.

Špecifickým problémom chirálnych separácií je separácia enantiomérov biogénnych aminokyselín v jednej analýze. Doteraz sa na tieto separácie využíva amidická stacionárna fáza (Chirasil-Val), ktorú je možné používať pri teplotách do 180 °C a separácia enantiomérov niektorých aminokyselín (napr. prolínu, kys. asparágovej a histidínu) je problematická. Naproti tomu Chirasil-Dex alebo Chirasil- $\gamma$ -Dex umožňuje separovať enantioméry problematických aminokyselín pri vyšších teplotách (220 °C), ale separácia enantiomérov tryptofánu a arginínu je problematická. Riešením problému je kombinácia Chirasil-Val (L-valín-dibutylamidu) s Chirasil-Dex<sup>36</sup> alebo Chirasil- $\gamma$ -Dex<sup>68</sup>. Takto pripravené kombinované fázy si zachovali enantioselektivitu pre separáciu enantiomérov aminokyselín, zlepšili separáciu enantiomérov problematických aminokyselín a rozšírili použiteľnosť kolóny aj pre iné typy zlúčenín (alkoholy, uhl'ovodíky, ketóny).

Poslednú skupinu kombinovaných chirálnych stacionárnych fáz zahŕňajú CD deriváty pripravené syntézou alebo kopolymerizáciou viacerých chirálnych selektorov. Uccello-Barretta a spol. syntetizovali nový multifunkčný CD (heptakis[2,3-di-*O*-metyl-6-*O*-(L-valín-*terc*-butylamid-*N*<sup>a</sup>-ylkarbonylmetyl)]- $\beta$ -CD), ktorý zahŕňal prvky CD a amidických stacionárnych fáz<sup>69</sup>. Táto zlúčenina bola úspešne použitá ako chirálne rozpúšťacie činidlo v NMR na rozlíšenie enantiomérov širokého spektra derivátov aminokyselín. Stephany a spol. pripravili nové permetylované CD deriváty, ktoré sú kovalentne spojené v polohe 6 s L- alebo D-valín-*terc*-butylamidom<sup>57</sup>. Enantioméry L- a D-valínu boli kovalentne naviazané na permetylovaný CD derivát pomocou peptidickej väzby. Enantioselektivita každej fázy bola hodnotená pomocou separácie 117 racemátov a dáta boli porovnávané s výsledkami získanými separáciou na jednotlivých stacionárnych fázach Chirasil-Val a Chirasil-Dex. Novo pripravené CD deriváty umožnili separovať enantioméry väčšieho počtu racemátov ako jednotlivé stacionárne fázy. V záujme zlepšenia chromatografickej účinnosti pripravených CD derivátov sa odporúča odstrániť valínovu skupinu stacionárnej fázy z dutiny CD pomocou vhodného spaceru.

## 5. Záver

V tomto článku sú zhrnuté poznatky o spôsoboch prípravy kolón pre GC s chirálnymi stacionárnymi fázami na báze cyklodextrínov. Chromatografické kolóny s CD stacionárnymi fázami sa pripravujú dvoma základnými postupmi. V prvom spôsobe sa CD derivát naniesie na vnútorný povrch kapiláry, kde sa uchyť pomocou fyzikálno-chemických interakcií. Kvapalné CD deriváty možno použiť ako stacionárne fázy bezprostredne. Z tuhých (kryštalických) derivátov sa vyrábajú neimobilizované stacionárne fázy ako roztoky CD derivátov vo vhodnom rozpúšťadle, najčastejšie v polysiloxánovom polymére alebo iónovej kvapaline. Zistilo sa, že enantioselektivita týchto stacionárnych fáz závisí tak od obsahu CD derivátu v tomto roztoku ako aj od polarít rozpúšťadla. V druhom prípade sa pripraví kopolymér, v ktorom je CD derivát spojený s polysiloxánovým polymérom pomocou kovalentnej väzby. Pri týchto imobilizovaných CD stacionárnych fázach možno použiť väčšie množstvo CD derivátu a tým zlepšiť enantioselektivitu vyrobených kolón. Takéto kolóny majú omnoho širší teplotný rozsah. Prakticky možno realizovať separácie pri izbových teplotách. Poslednou skupinou stacionárnych fáz na báze CD sú kombinované fázy, ktoré obsahujú viac typov chirálnych selektorov rozpustených, alebo viazaných na achirálnu rozpúšťadla. Väčšina doteraz pripravených kombinovaných fáz si zachováva enantioselektivitu jednotlivých chirálnych selektorov, čím umožňujú pripraviť selektívnu chirálnu stacionárnu fázu na mieru.

*Táto práca bola finančne podporená projektom VEGA 1/0972/12.*

## LITERATÚRA

- Gil-Av E., Feibush B., Charles-Sigler R.: *Tetrahedron Lett.* 7, 1009 (1966).
- Smolková-Keulemansová E., Králová H., Krýsl S., Feltl L.: *J. Chromatogr.* 241, 3 (1982).
- Smolková-Keulemansová E., Neumannová E., Feltl L.: *J. Chromatogr.* 365, 279 (1986).
- Atwood J., Davies J. E. D., MacNicol B. D., Vögtle F.: *Compr. Supramol. Chem.*, (Lehn J. M., chairman editor), Vol. 3 Cyclodextrins, (Szjetli J., Osa T. volume editors), Elsevier, Oxford 1996.
- Schurig V.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 21, 647 (2002).
- Špánik I., Krupčík J.: *Chem. Listy.* 94, 10 (2000).
- Schurig V.: *J. Chromatogr., A* 906, 275 (2001).
- Schurig V.: *Chirality* 17, 205 (2005).
- Schurig V.: *J. Chromatogr., B* 879, 3122 (2011).
- Schurig V.: *Ann. Pharm. Fr.* 68, 82 (2010).
- Sicoli G., Kreidler D., Czesla H., Hopf H., Schurig V.: *Chirality* 21, 183 (2009).
- Xiao Y., Ng S. Ch., Tan T. T. Y., Wang Y.: *J. Chromatogr., A* 1269, 52 (2012).

13. Li L., Zhi M., Ren Ch.: *Prog. Chem.* 19, 393 (2007).
14. Špánik I., Krupčík J.: *Chem. Listy.* 95, 86 (2001).
15. König W. A.: *Chromatographic Enantiomer Separations with Modified Cyclodextrins*, Hüthig Buch Verlag, Heidelberg 1992.
16. Grob K.: *Making and Manipulating Capillary Column for Gas Chromatography*, Hüthig Buch Verlag, Heidelberg 1986.
17. Venema A., Tolsma P. J. A.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 12, 32 (1989).
18. Nowotny H. P., Schmalzing D., Wistuba D., Schurig V.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 12, 383 (1989).
19. Schurig V., Nowotny H. P.: *J. Chromatogr.* 441, 155 (1988).
20. Buda W., Jaques K., Venema A., Sandra P.: *Proceedings of the 15<sup>th</sup> Symposium on Capillary Gas Chromatography*, (Sandra P., ed.) str. 230. Hüthig 1993.
21. Huang K., Zhang X., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr., A* 1217, 5261 (2010).
22. Berthod A., He L., Armstrong D. W.: *Chromatographia* 53, 63 (2001).
23. Ding J., Welton T., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* 76, 6819 (2004).
24. König W.A., Lutz S., Mischnick-Lübecke P., Brassat P., Wenz G.: *J. Chromatogr.* 447, 193 (1988).
25. Shitangkoon A., Staerk G. V., Vigh G.: *J. Chromatogr., A* 657, 387 (1993).
26. Hardt I., König W. A.: *J. Microcolumn Sep.* 5, 35 (1993).
27. Jung M., Schurig V.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 16, 289 (1993).
28. Jung M., Schurig V.: *J. Microcolumn Sep.* 5, 11 (1993).
29. Francotte E., Grolimund K., Juvancz Z.: *Chirality* 5, 232 (1993).
30. Petterson P., Reese S. L., Yi G., Yun H., Malik A., Rossiter B. E., Lee M. L., Markides K. E.: *J. Chromatogr., A* 684, 297 (1994).
31. Dönnecke J., Paul C., König W. A., Stevensson L. A., Gyllenhaal O., Vessman J.: *J. Microcolumn Sep.* 8, 495 (1996).
32. Fischer P., Aichholz R., Bölz U., Juza M., Krimmer S.: *Angew. Chem.* 102, 439 (1990).
33. Schurig V., Schmalzing D., Mühleck V., Jung M., Schleimer M., Mussche P., Duveköt C., Buyten J. C.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 13, 713 (1990).
34. Schmalzing D., Jung M., Mayer S., Rickert J., Schurig V.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 15, 723 (1992).
35. Cousin H., Trapp O., Peulon-Agasse V., Pannecoucke X., Banspach L., Trapp G., Jiang Z., Combret J. C., Schurig V.: *Eur. J. Org. Chem.* 17, 3273 (2003).
36. Levkin P. A., Levkina A., Schurig V.: *Anal. Chem.* 78, 5143 (2006).
37. Ghanem A., Ginatta C., Jiang Z. J., Schurig V.: *Chromatographia* 57, 275 (2003).
38. Ghanem A.: *Talanta* 66, 1234 (2005).
39. Ghanem A.: *Anal. Chem. Insights* 2, 75 (2007).
40. Ghanem A., Schurig V.: *Tetrahedron: Asymmetry* 14, 2547 (2003).
41. Malik A., Yun H., Yi G., Bradshaw J. S., Rossiter B. E., Markides K. E., Lee M. L.: *J. Microcolumn Sep.* 7, 91 (1995).
42. Dönnecke J., König W. A., Gyllenhaal O., Vessman J., Schultze Ch.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 17, 779 (1994).
43. Schurig V., Grosenick H., Juza M.: *Recl. Trav. Chim.* 114, 211 (1995).
44. Jiang Z., Crassous J., Schurig V.: *Chirality* 17, 488 (2005).
45. Grosenick H., Schurig V.: *J. Chromatogr., A* 761, 181 (1997).
46. Juvancz Z., Grolimund K., Schurig V.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 16, 202 (1993).
47. Armstrong D. W., Tang Y., Ward T. W., Nichols M.: *Anal. Chem.* 65, 1114 (1993).
48. Tang Y., Zhou Y., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr., A* 666, 147 (1994).
49. Yi G., Bradshaw J. S., Rossiter B. E., Malik A., Li W., Lee M. L.: *J. Org. Chem.* 58, 4844 (1993).
50. Yi G., Bradshaw J. S., Rossiter B. E., Malik A., Li W., Yun H., Lee M. L.: *J. Chromatogr., A* 673, 219 (1994).
51. Yi G., Bradshaw J. S., Rossiter B. E., Reese S. L., Petterson P., Markides K. E., Lee M. L.: *J. Org. Chem.* 58, 2561 (1993).
52. Yi G., Bradshaw J. S., Rossiter B. E., Malik A., Yun H., Lee M. L.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 32, 621 (1995).
53. Bradshaw J. S., Chen Z., Yi G., Rossiter B. E., Malik A., Pyo D., Yun H., Black D. R., Zimmerman S. S., Lee M. L., Tong W., Souza V. T.: *Anal. Chem.* 67, 4437 (1995).
54. Nie M. Y., Zhou L. M., Wang Q. H., Zhu D. Q.: *Chromatographia* 51, 736 (2000).
55. Kreidler D., Czesla H., Schurig V.: *J. Chromatogr., B* 875, 208 (2008).
56. Levkin P. A., Ruderisch A., Schurig V.: *Chirality* 18, 49 (2006).
57. Stephany O., Dron F., Tisse S., Martinez A., Nuzillard J. M., Peulon-Agasse V., Cardinaël P., Bouillon J. P.: *J. Chromatogr., A* 1216, 4051 (2009).
58. Qi S., Ai P., Wang C., Yuan L., Zhang G.: *Sep. Purif. Technol.* 48, 310 (2006).
59. Shi X. Y., Zhang Y. Q., Fu R. N.: *Anal. Chim. Acta* 424, 271 (2000).
60. Tamogami S., Awano K.-ichi, Amaike M., Takagi Y., Kitahara T.: *Flavour Fragrance J.* 16, 349 (2001).
61. Schmidt R., Roeder M., Oeckler O., Simon A., Schurig V.: *Chirality* 12, 751 (2000).
62. Bayer M., Mosandl A.: *Flavour Fragrance J.* 19, 515 (2004).
63. Xiao D. Q., Ling Y., Wen Y. X., Fu R. N., Gu J. L., Dai R. J., Luo A. Q.: *Chromatographia* 46, 177 (1997).
64. Pfeiffer J., Schurig V.: *J. Chromatogr., A* 840, 145 (1999).

65. Ruderisch A., Pfeiffer J., Schurig V.: *Tetrahedron: Asymmetry* 12, 2025 (2001).
66. Ruderisch A., Pfeiffer J., Schurig V.: *J Chromatogr., A* 994, 127 (2003)
67. Levkin P. A., Schurig V. *J Chromatogr., A* 1184, 309 (2008).
68. Levkin P. A., Levkina A., Czesla H., Nazzi S., Schurig V.: *J. Sep. Sci.* 30, 98 (2007).
69. Uccello-Barretta G., Nazzi S., Balzano F., Levkin P. A., Schurig V., Salvadori P.: *Eur. J. Org. Chem.* 2007, 3219.
70. Figge H., Deege A., Köhler J., Schomburg G.: *J. Chromatogr.* 35, 393 (1986).

**D. Kačeriaková and I. Špánik** (*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*): **Utilization of Cyclodextrins in Gas Chromatography: Preparation of Capillary Columns with Cyclodextrin Stationary Phases**

The columns are prepared by anchoring a cyclodextrin derivative in (polysiloxanes or ionic liquids) to inner capillary surface by physicochemical interactions. The cyclodextrine derivative and solvent polarity are the main factors influencing the efficiency and enantioselectivity of the columns. Alternatively, a cyclodextrin derivative copolymers is covalently attached to polysiloxane. This procedure enabled the column application at both lower and higher temperatures. Another method uses two or more independent chiral selectors, either dissolved in or bonded to an achiral solvent.