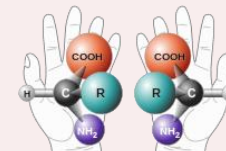


# ZÁKLADY CHIRÁLNÍCH SEPARAČNÍCH TECHNIK A CHIRÁLNÍCH OPTICKÝCH METOD



**Chiralita**

**Chirální separační principy**

**Chirální optické metody**

## Chiralita – I

*Chiralita – jako chirální označujeme sloučeninu, kterou není možné ztotožnit se svým zrcadlovým obrazem; nemá střed ani rovinu symetrie; jde o asymetrii prostorového uspořádání*

*Jedná se o analogii např. levé a pravé ruky*



*Dvě zrcadlové formy chirální sloučeniny nazýváme optickými izomery – enantiomery (v případě dvou center chiralit diastereomery); počet optických izomerů je  $2^n$ , kde  $n$  je počet středů chiralit*

## Chiralita – II

Enantiomery se označují pomocí:

**+ nebo – podle smyslu otáčení roviny polarizovaného světla**

**D- nebo L- pro cukry, aminokyseliny a peptidy**

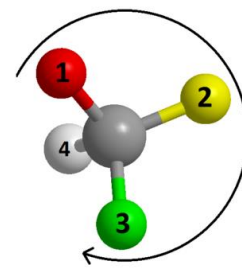
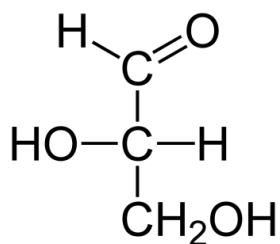
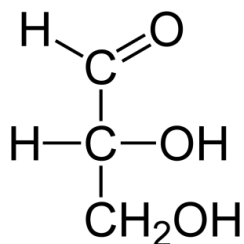
**R nebo S: podle jednoznačného obecně přijatého způsobu**

Formy existence jsou:

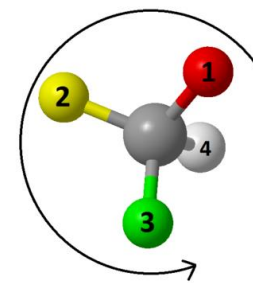
**Čistý enantiomer – R (Rectus) nebo S (Sinister)**

**Pokud R a S je v poměru 1:1, pak se jedná o racemát**

**– označení ± nebo DL nebo RS nebo rac nebo racem**



R



S

## Chiralita – III

Obvykle rozdílné vlastnosti enantiomerů:

*Optická otáčivost*

*Biologická aktivita*

*Senzorické vlastnosti*

*Fyzikálně chemické vlastnosti*

## Chiralita – IV

*Chirální atomy: C, N, P, S, kovy ...*

*Symetrické molekuly: meso – sloučeniny (achirální)*

*Axiální chiralita, planární chiralita, helicity*

# Chirální separační principy – vybrané metody

## Chromatografické a elektromigrační metody

### Aplikace chirálních selektorů (CHS)

*Nepřímá separace – chirální derivatizační činidla (problém racemizace)*

*Přímá separace – a) CHS v mobilní fázi – dominantně elektromigrační m.*

*b) CHS ve stacionární fázi – dominantně chromatografické m.*

# Chirální separační principy I

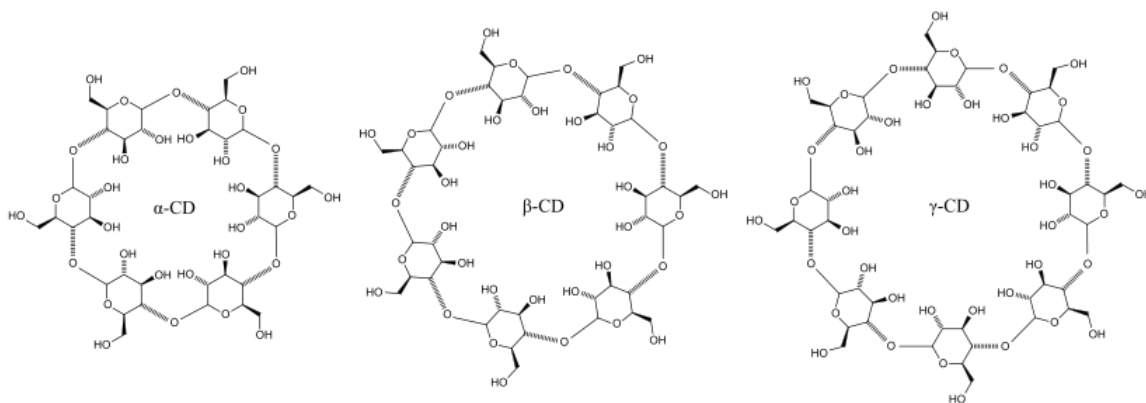
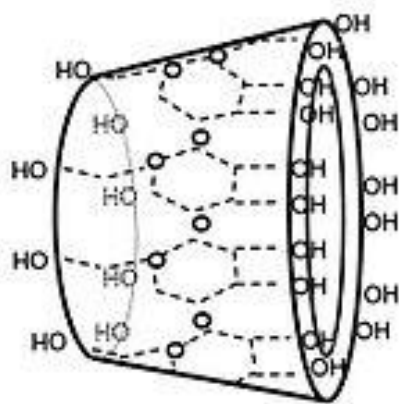
## Vazebné principy chirálních selektorů:

- *tvorba mnohonásobných vodíkových vazeb:*
  - GC: N-trifluoroacetyl-L-aminokyseliny (estery)*  
*vanilin diamid na PDMS (Chirasil-Val)*
  - HPLC: aminokyseliny, hydroxykyseliny, aminoalkoholy*
- *chirální  $\pi$ -donor a  $\pi$ -akceptor fáze*
  - např.: (R)-N-(3,5dinitrobenzoyl)fenylglycin -  $\pi$ -akceptorová*  
*stacionární fáze pro separaci sloučenin s  $\pi$ -donorovými skupinami*
- *iontové interakce: samostatně nedostatečné, nutno kombinovat s dalšími*  
*mechanismy; např.: chinin – separace bázických a kyselých farmaceutik*
- *chirální surfaktanty: žlučové soli, saponiny, deriváty dipeptidů, polymerní*  
*aminokyseliny, N-alkylované L-aminokyseliny, alkylované glykosidy*

# Chirální separační principy II

## Vazebné principy chirálních selektorů:

- *chirální metalické komplexy (výměna ligandů): rozdílná stabilita směsného komplexu analyt/kov/selektor pro dané enantiomery (Cu, Mn, Co, Ni, Rh v komplexy s cheláty, deriváty kofeinu)*
- *cyklodextriny: dominantní aplikace – cyklické oligosacharidy složené ze 6 ( $\alpha$ -CD), 7 ( $\beta$ -CD) a 8 ( $\gamma$ -CD) glukopyranosových jednotek, tvoří strukturu tvaru komolého kužele s hydrofobní konickou dutinou a hydrofilním povrchem*

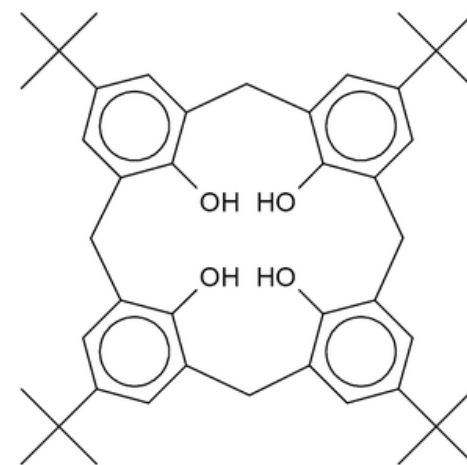
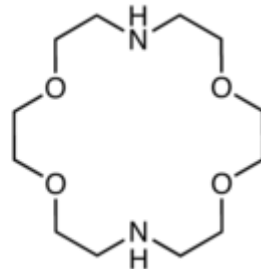
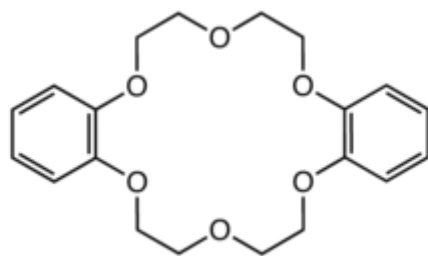
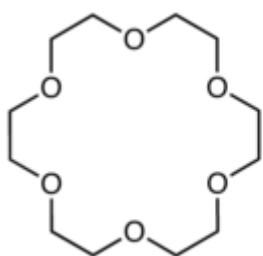




## Chirální separační principy III

### Vazebné principy chirálních selektorů:

- **polysacharidy: nutná modifikace - např. estery celulózy, amyulózy maltodextriny, dextransy - CHS v elektromigračních m.**
- **makrocyclická antibiotika: ansamyciny - rifamycin B (bázické sl.) a rifamycin SB (kyselé sl.), glykopeptidy (kyselé sl.) - vancomycin, ristocetin, teicoplanin a avoparcin**
- **chirální korunové ethery: makrocyclické polyethery - tvoří spřažené komplexy s  $M^+$ ,  $M^{++}$  a  $NH_4^+$ ; separace např. AMK**

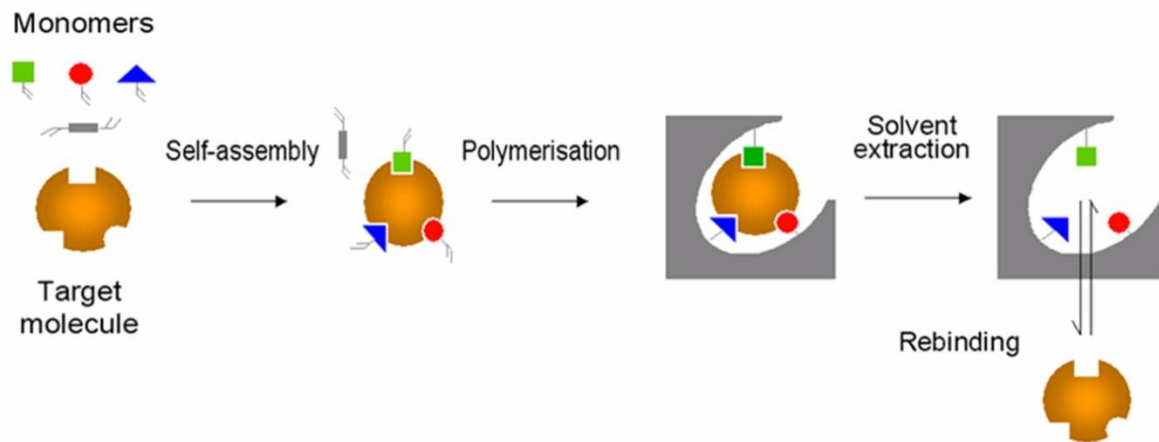


- **kalixareny: GC, CE a CEC - aminokyseliny, aminoalkoholy, aminy**

## Chirální separační principy IV

### Vazebné principy chirálních selektorů:

- *chirální syntetické polymery: např. polyakrylamidy vázané na silikagel*
- *molekulární imprintované polymery: tvorba stereoselektivních dutin pomocí vhodných templátů - po jejich vymytí získáme chirální fázi*



- *bílkoviny: stereoselektivní vazba farmak – např. BSA, HSA, ovomukoid, avidin, pepsin*
- *bezvodá rozpouštědla - modifikátory prostředí; snížení sorpce a vlivu interferentů*

## Chirální optické metody (chiroptické metody)

# *Polarimetrie*

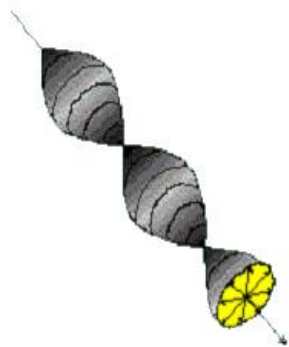
Metoda založená na měření úhlu otočení roviny lineárně polarizovaného světla opticky aktivními látkami a jejich roztoky

- *opticky aktivní látky* - stáčí rovinu polarizovaného světla  
**vpravo** (po směru hod. ručiček) – ***pravotočivé (+)***  
**vlevo** (proti směru hod. ručiček) – ***levotočivé (-)***

# POLARIZACE SVĚTLA

## Normální světelné vlnění (nepolarizované světlo)

→ vektory elektrického pole a k němu kolmého magnetického pole ve všech rovinách protínajících se ve směru šíření



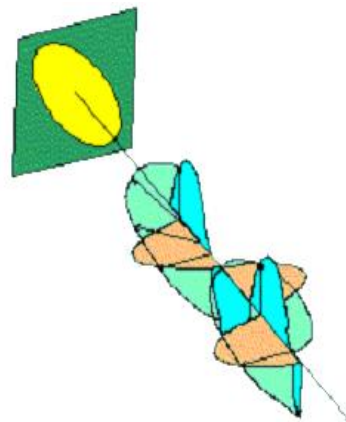
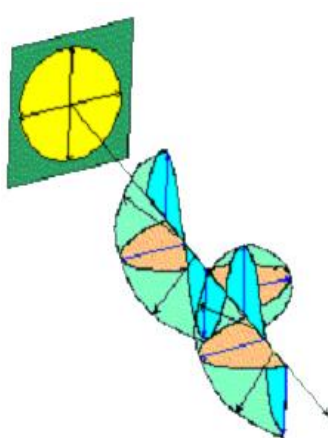
## Lineárně (rovinně) polarizované světlo

→ kmitá v jedné rovině proložené paprskem (elektrická složka v jedné rovině, magnetická složka v druhé, na ni kolmé rovině)

## Kruhově (cirkulárně) polarizované světlo

→ kmitá tak, že elektrický a magnetický vektor koná rotační pohyb ve směru paprsku.

*(stejné amplitudy, 90° posun fází)*



## Elipticky polarizované světlo

→ kmitá tak, že elektrický a magnetický vektor koná rotační pohyb ve směru paprsku.

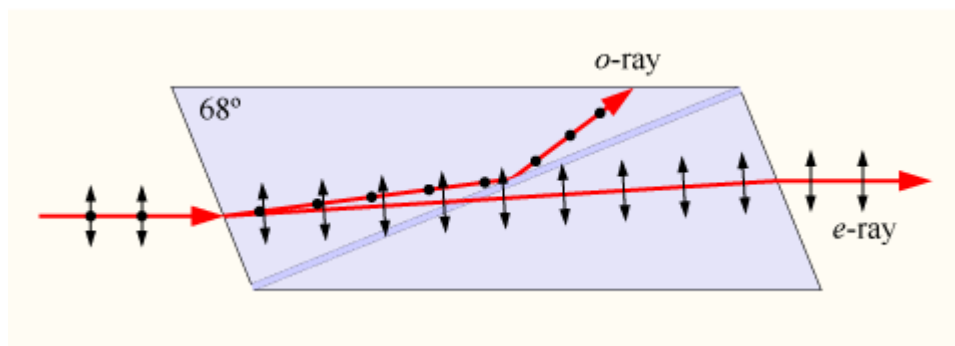
*(rozdílné amplitudy, nebo jiný než 90° posun fází)*

## Praktická realizace polarizace světla pro měření

Normální světelné vlnění (nepolarizované světlo) se po průchodu **NICOLovým HRANOLEM** (*Islandský dvojlomný vápenec*) rozdělí na **2 polarizované paprsky**:

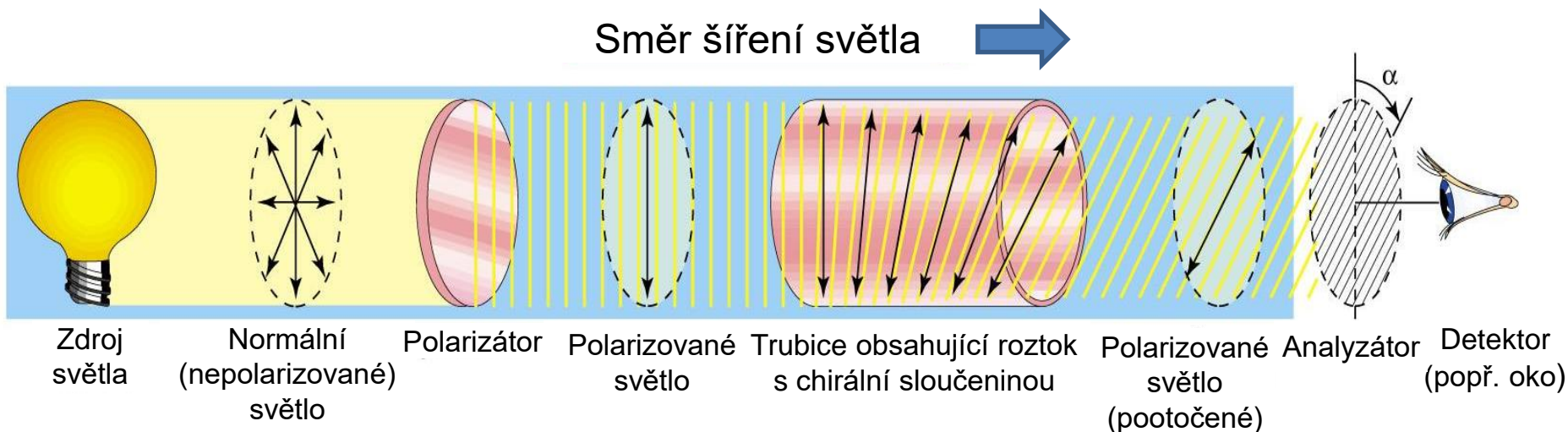
**řádný: kolmý** k polarizační rovině (odfiltruje se začerněným obalem hranolu)

**mimořádný: rovnoběžný** s polarizační rovinou (používá se k měření)



tj. získá se **paprsek světla stejné vlnové délky, ale polarizovaný v jedné rovině**

# PRINCIP POLARIMETRU I



- **Otočí-li opticky aktivní látka v kyvetě rovinu polarizovaného světla o určitý úhel, na detektor začne dopadat světlo.**
- **Pokud otočíme o stejný úhel analyzátozem, opět bude intenzita světla prošlého k detektoru nulová.**
- **Signál z detektoru je vyhodnocován a servomotor otáčí analyzátozem, dokud není nalezeno minimum intenzity**

## PRINCIP POLARIMETRU II

Část polarizovaného světla, která projde analyzátozem, je určena úhlem, který svírá polarizační rovina **analyzátoru** s polarizační rovinou **polarizátoru**

- **rovnoběžné**—svírají úhel  $0^\circ$ ,  $180^\circ$ ,  $360^\circ$  - světlo projde analyzátozem v plné intenzitě
- **kolmé**—svírají úhel  $90^\circ$ ,  $270^\circ$  - analyzátor nepropouští žádné světlo
- **úhel  $< 90^\circ$** —analyzátor propouští část světla z polarizátoru

## Stupnice polarimetru

- kruhové stupně ( $^{\circ}\triangleleft$ )
- sacharimetrické stupně ( $^{\circ}\text{S}$ )
- stupně Ventzkeho ( $^{\circ}\text{V}$ )

$$1 (^{\circ}\triangleleft) = 2,8885 ^{\circ}\text{S} = 2,8854 ^{\circ}\text{V}$$

$$1 ^{\circ}\text{V} = 0,3466 (^{\circ}\triangleleft) = 1,001 ^{\circ}\text{S}$$

$$1 ^{\circ}\text{S} = 0,3462 (^{\circ}\triangleleft) = 0,999 ^{\circ}\text{V}$$



## Optická otáčivost – parametry měření

### Faktory ovlivňující optickou otáčivost:

- asymetrie struktury molekuly ↑
- vlnová délka světla ↓
- teplota (roztoku) ↓
- počet molekul s nimiž polarizované světlo vstupuje do interakce ↑
  - koncentrace roztoku
  - tloušťka vrstvy (délka kyvety)
- chemická povaha rozpouštědla
- pH a čas (změny)

## Zajištění potřebné optické kvality vzorku – eliminace rušivých látek

### ČIŘENÍ A ODBARVOVÁNÍ (CUKERNÝCH EXTRAKTŮ)

**Zákal roztoků zvyšuje chyby a zabarvení roztoku zcela znemožňuje měření**

#### **Neutrální octan olovnatý**

- čiření neutrálních roztoků
- odstranění opticky aktivních organických kyselin (odstranění bílkovin není dokonalé)

#### **Zásaditý octan olovnatý**

- čiření neutrálních a mírně alkalických roztoků
- odstranění opticky aktivních organických kyselin a bílkovin

#### **Čiření podle Carreze**

- síran zinečnatý a kyanoželeznatan draselný
- čiření v kyselém prostředí
- odstranění bílkovin, méně slizových látek

# POLARIMETRIE

## Úhel stočení

- vyjadřuje optickou otáčivost roztoku opticky aktivní látky

$$\alpha = [\alpha]_{\lambda}^t \cdot l \cdot c_w \quad [^{\circ}\Delta]$$

## Měrná otáčivost (specifická rotace)

- úhel stočení pro  $l = 1 \text{ dm}$ ,  $c_w = 1 \text{ g.mL}^{-1}$ ,  $t = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\lambda =$  vlnová délka dubletu spektrálních čar sodíku (D: 589,0 a 589,6 nm)

$$\alpha = [\alpha]_D^{20} \cdot l \cdot c_w \quad [^{\circ}\Delta]$$

# POLARIMETRIE

## Pravidlo o aditivitě

- roztok dvou opticky aktivních látek  $A$  a  $B$  o hmotnostní koncentraci  $c_{wA}$  a  $c_{wB}$  vykazuje otáčivost, která je dána součtem příspěvků obou opticky aktivních složek

$$\alpha = \ell \cdot \left( [\alpha]_{D(A)}^{20} \cdot c_{wA} + [\alpha]_{D(B)}^{20} \cdot c_{wB} \right)$$

- *využití*: stanovení sacharózy vedle jiné opticky aktivní látky dvojím měřením (před a po hydrolýze sacharózy, která je doprovázena změnou optické otáčivosti – inverzí)

# POLARIMETRIE

## Specifická rotace vybraných sacharidů ( $^{\circ}$ $\triangleleft$ )

Látka	$[\alpha]_D^{20}$	Látka	$[\alpha]_D^{20}$
dextrin	+ 194,8	maltóza	-137,5
D-fruktóza	-93,78	rafinóza	+ 123,01
D-galaktóza	+ 80,47	sacharóza	+ 66,53
D-glukóza	+ 52,74	škrob	+ 196,4
invertní cukr	-20,59	xylóza	+ 196,4
laktóza	+ 55,3		

1 g/ml FRU - 93,78

1 g/ml GLU + 52,74

2 g/ml - 41,04 : 2 (1 g/ml) = - 20,52 INVERT

# APLIKACE POLARIMETRIE

## Stanovení koncentrace jedné opticky aktivní látky

- jediným měřením optické otáčivosti roztoku lze určit koncentraci

$$c_w = \frac{\alpha}{l \cdot [\alpha]_D^{20}}$$

$c_w \dots \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

$l \dots \text{dm}$

$\alpha \dots ^\circ \Delta$

$[\alpha]_D^{20} \dots ^\circ \Delta$

## Chirální optické metody - aplikace

# *Cirkulární dichroismus - CD*

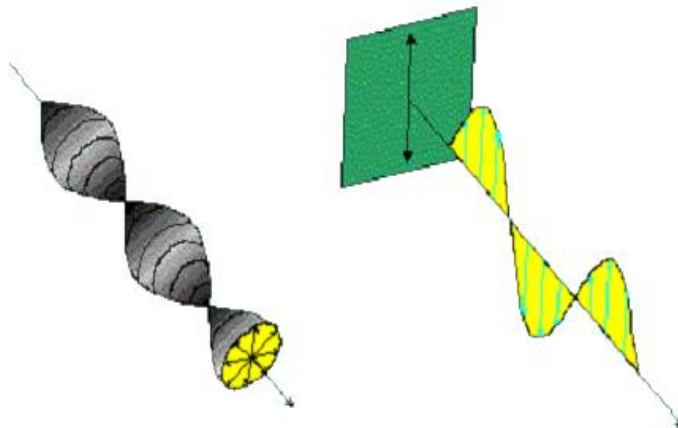
Metoda založená na měření rozdílu absorbancí  
(příp. rozdílu extinkčních koeficientů nebo elipticity)  
pro levotočivou a pravotočivou složku kruhově polarizovaného světla  
(tyto dvě složky tvoří společně rovinně polarizované světlo)

Levotočivá složka kruhově polarizovaného světla je absorbována  
rozdílně od pravotočivé složky, čímž následně dochází ke změně  
kruhově polarizovaného světla na elipticky polarizované

# POLARIZACE SVĚTLA

## Normální světelné vlnění (nepolarizované světlo)

→ vektory elektrického pole a k němu kolmého magnetického pole ve všech rovinách protínajících se ve směru šíření



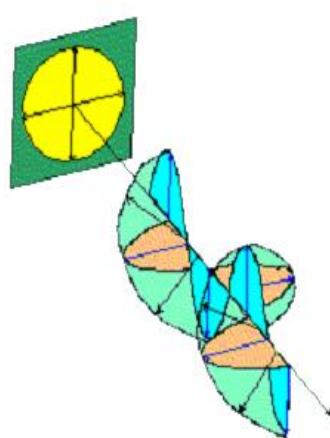
## Lineárně (rovinně) polarizované světlo

→ kmitá v jedné rovině proložené paprskem (elektrická složka v jedné rovině, magnetická složka v druhé, na ni kolmé rovině)

## Kruhově (cirkulárně) polarizované světlo

→ kmitá tak, že elektrický a magnetický vektor koná rotační pohyb ve směru paprsku.

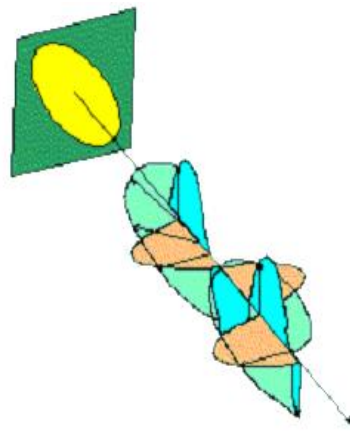
(stejné amplitudy,  $90^\circ$  posun fází)



## Elipticky polarizované světlo

→ kmitá tak, že elektrický a magnetický vektor koná rotační pohyb ve směru paprsku.

(rozdílné amplitudy, nebo jiný než  $90^\circ$  posun fází)





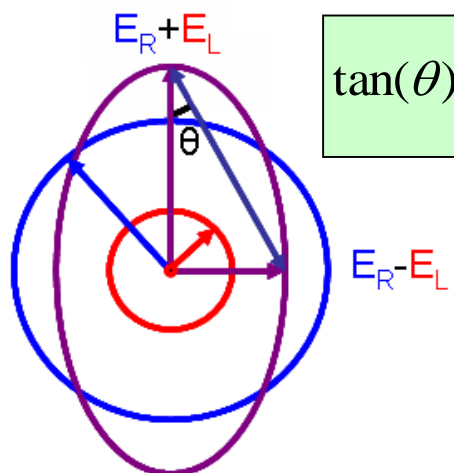
## Způsob vyjadřování CD:

$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ ;  $A$  je bezrozměrná  $\Rightarrow \varepsilon [l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$

CD jako  $\Delta A = A_L - A_p \Rightarrow$  cirkulární dichroismus

CD jako  $\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_p \Rightarrow$  molární cirkulární dichroismus

CD jako  $\theta$  (elipticita) – charakterizuje míru změny kruhově polarizovaného světla na elipticky polarizované



$$\tan(\theta) = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L}$$

**Pro  $\Delta A \ll 1$**

$$\theta(^{\circ}) = \Delta A \left( \frac{\ln 10}{4} \right) \left( \frac{180}{\pi} \right)$$

$$\theta_{molar} = \frac{\theta(^{\circ})}{cl}$$

$$\theta_{molar} = 100 \Delta \varepsilon \left( \frac{\ln 10}{4} \right) \left( \frac{180}{\pi} \right) = 3298,2 \Delta \varepsilon$$

$\theta = 0^{\circ}$  pro rovinně polarizované světlo

$\theta = 45^{\circ}$  pro kruhově polarizované světlo

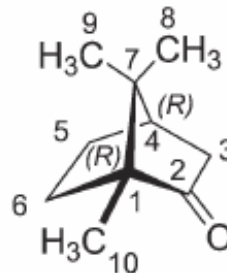
## Využití CD podle spektrální oblasti:

Vlnová délka (nm)	← 190 – 380 – 780	780 – 10 000 →
Vlnočet ( $\text{cm}^{-1}$ )	$5 \cdot 10^4 \leftrightarrow 1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4 \leftrightarrow 1 \cdot 10^3$
Oblast el. mag. záření	UV – VID	IČ
Typ energetických přechodů	Elektronové	Vibrační
Metoda CD	ECD Elektronový cirkulární dichroismus	VCD Vibrační cirkulární dichroismus
Oblast aplikace	UV-VID chromofory	universální
Praktické využití	Rutinní metody	Vědecké metody

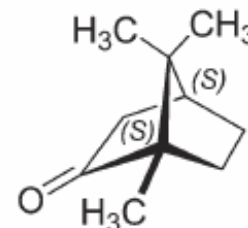
**Detekce a kontrola čistoty enantiomerů, strukturní analýza, sledování změn konformace v závislosti na fyzikálně chemických podmínkách**

# Příklad využití VCD - kafr

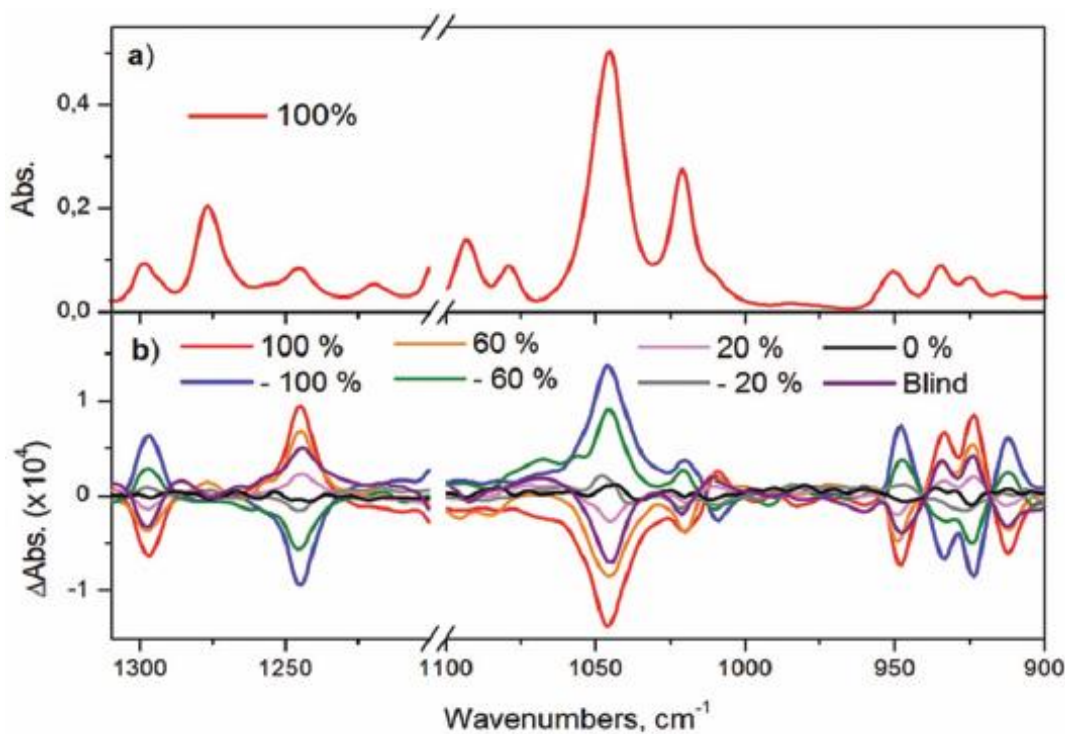
$$\% ee(A) = \frac{N_A - N_B}{N_A + N_B} \times 100$$



(1R,4R)-(+)-camphor,  
natural or D-camphor



(1S,4S)-(-)-camphor,  
L-camphor



a) Experimentální IČ spektrum

R-(+)-kafr (červená)

- roztoky v CCl<sub>4</sub>

b) Experimentální korig. CD spektra

Čisté enantiomery (modrá, červená)

Směsi: 60 % ee (oranžová)

- 60 % ee (zelená)

±20 % ee (růžová a šedá)

Racemická směs (černá)

Verifikační vzorek (nachová)

María Mar Quesada-Moreno et al., *Analyst*, 2018, 143, 1406-16