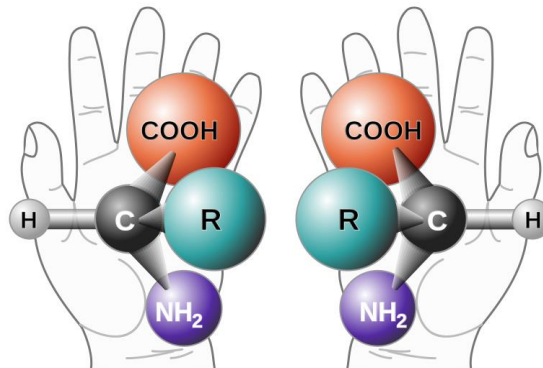


Metody chromatograficzne w chemii i biotechnologii, **wykład 9**

Zastosowanie chromatografii w chemii organicznej z uwzględnieniem analizy/rozdziłu związków chiralnych

Enancjomery

- ▶ W środowisku achiralnym enancjomery są identyczne pod względem właściwości fizykochemicznych (inne właściwości chiralooptyczne)
- ▶ Różnice te natomiast uwidaczniają się w środowisku chiralnym
- ▶ Odmienna aktywność biologiczna
- ▶ Diastereoizomery posiadają inne właściwości fizykochemiczne i są odróżnialne w achiralnym środowisku – w chromatografii mają różne czasy retencji



Enancjomery – otrzymywanie, analiza

▶ Otrzymywanie:

- ▶ Synteza asymetryczna
- ▶ Biotransformacje
- ▶ **Metody chromatograficzne: głównie wysokosprawna chromatografia ciekową (HPLC)**

▶ Analiza:

▶ techniki chromatograficzne:

- ▶ **wykosprawna chromatografia ciekową (HPLC)**
- ▶ **chromatografia gazowa (GC)**
- ▶ chromatografia cienkowarstwowa (TLC)
- ▶ **elektroforeza kapilarna (CE)**
- ▶ Spektroskopia Jądrowego Rezonansu Magnetycznego (NMR)



Rozdział enancjomerów – metody chromatograficzne

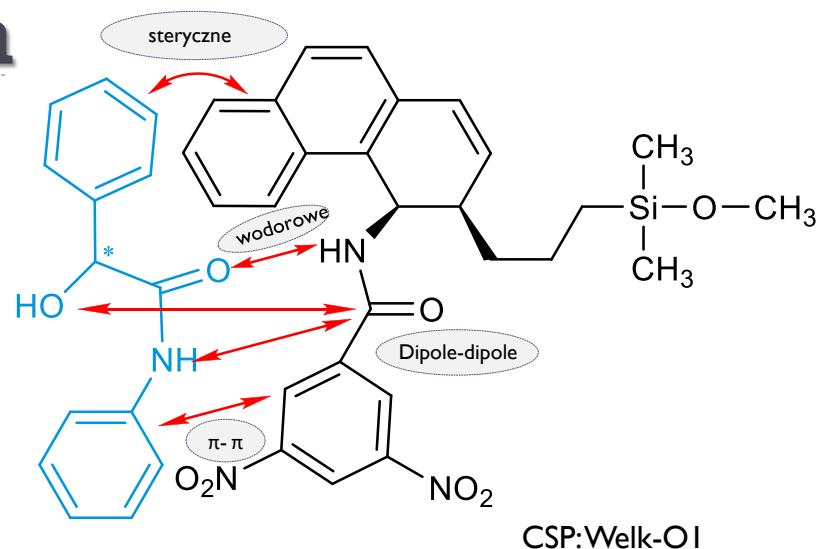
- ▶ Metoda pośrednia:
 - ▶ Przeprowadzenie enancjomerów w pochodne diastereoizomeryczne przed analizą - reakcja z optycznie czystym reagentem
- ▶ Metoda bezpośrednia:
 - ▶ oddziaływania stereospecyficzne z chiralnym selektorem mają miejsce podczas analizy – powstają „przejściowe” diastereomeryczne kompleksy – oddziaływania niekonwalencyjne
 - ▶ **Chiralna faza stacjonarna (HPLC, GC, TLC)**
 - ▶ Chiralna faza ruchoma (musi być łatwo usuwalny z eluatu, problemy z detekcją, wysoki koszt)



Oddziaływania z chiralnym selektorem

► Typy oddziaływań:

- wiązania wodorowe
- oddziaływania typu dipol-dipol
- oddziaływania π -elektronowe
- oddziaływania hydrofobowe, van der Waalsa oraz przyciąganie lub odpychanie steryczne.



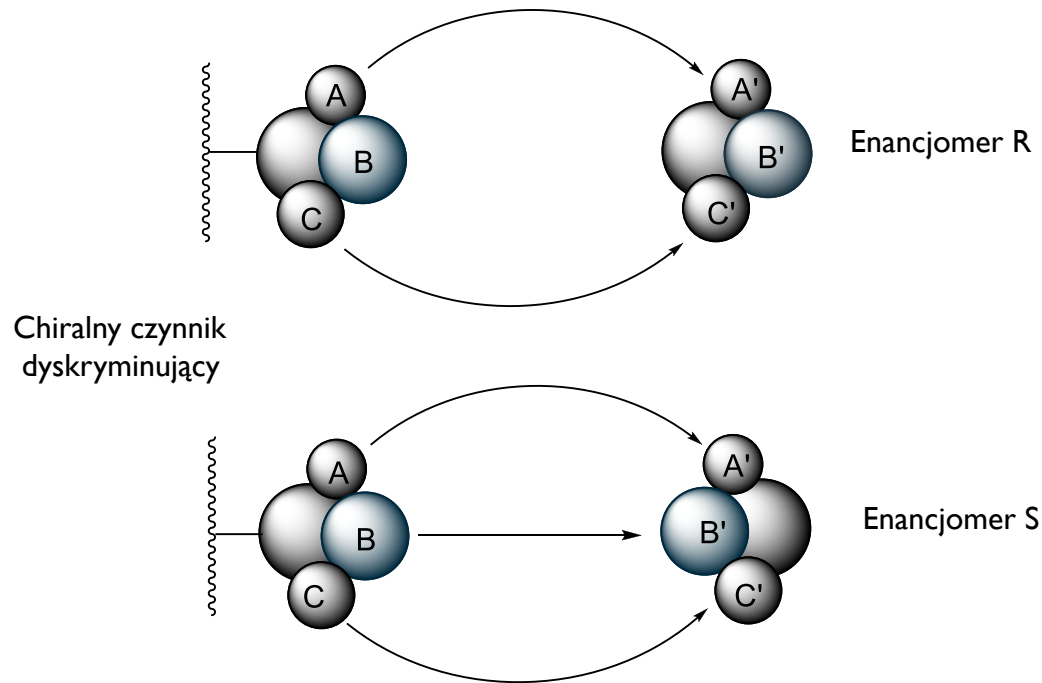
- Oddziaływania te mogą być **jednocentrowe** lub **wielocentrowe** (przyleganie dipoli czy pierścieni aromatycznych).

- Obecność interakcji pomiędzy cząsteczkami nie gwarantuje, że zapewnią one chiralne rozpoznawanie jednej cząsteczki przez drugą



Mechanizm chiralnego różnicowania- reguła trzech punktów

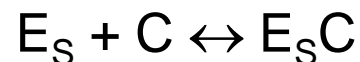
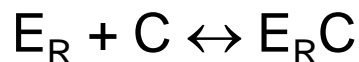
- ▶ Chiralne rozpoznawanie wymaga co najmniej trzech jednoczesnych, punktowych oddziaływań pomiędzy czynnikiem dyskryminującym a enancjomerem, z których co najmniej jedno jest stereochemicznie zależne



- ▶ Warunkiem stereospecyficzności jest niewspółliniowość punktów oddziaływań, przy zachowanej konformacji enancjomerów!

Teoria – dlaczego **enancjomery** dzielą się na **chiralnym** złożu

- ▶ Powstanie kompleksów jest koniecznym, ale niewystarczającym warunkiem dla zaobserwowania rozdziału.



$$K_R = [E_R C]/[E_R][C]$$

$$K_S = [E_S C]/[E_S][C]$$

- ▶ Warunek:

$$K_R \neq K_S$$

- ▶ Procesem rządzi termodynamika:

$$-\Delta_{R,S}(\Delta G) = RT \ln K_R / K_S = RT \ln \alpha$$



Ważne równania

- ▶ Współczynnik retencji

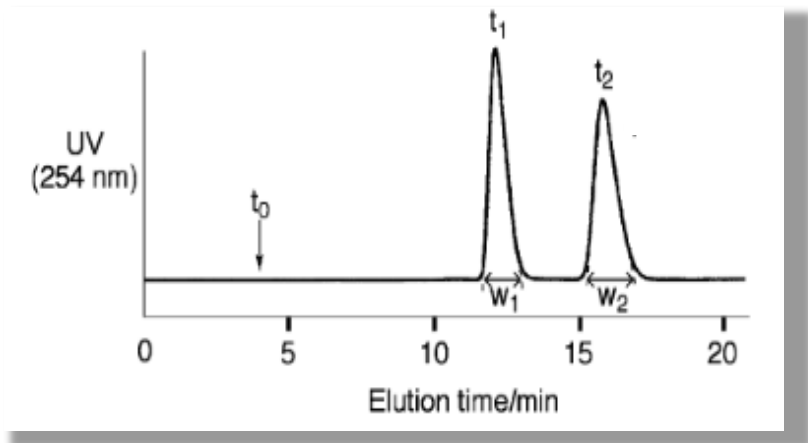
$$k_1 = (t_1 - t_0)/t_0 \quad k_2 = (t_2 - t_0)/t_0$$

- ▶ Współczynnik separacji (rozdziału)

$$\alpha = \frac{(t_2 - t_0)}{(t_1 - t_0)} = \frac{k_2}{k_1}$$

- ▶ Rozdzielczość

$$R_s = 2 \frac{(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)}$$



Nadmiar enancjomeryczny

- ▶ Miarą wydajności rozdziału enancjomerów jest wartość nadmiaru enancjomerycznego (ee)

$$ee\% = ([E_R] - [E_S] / [E_R] + [E_S]) \times 100$$

[E_R] oznacza stężenie enancjomeru dominującego (w tym przypadku R)
[E_S] stężenie drugiego enancjomeru S obecnego w mniejszej ilości w mieszaninie.



Chiralne fazy stacjonarne HPLC

- ▶ Fazy typu Brush-type:
 - ▶ Fazy ligandowymienne
 - ▶ Etery koronowe
 - ▶ Cyklodekstryny
 - ▶ Fazy donorowo-akceptorowe (złoża Pirkla)
 - ▶ Glikopeptydy (wankomycyna, teikoplanina, ristocetyna A, aglikon teikoplaniny)
 - ▶ Wymieniacze jonowe (chinina i jej pochodne)

- ▶ Syntetyczne polimery:
 - ▶ Poliakrylamidy
 - ▶ Polimetakrylany
 - ▶ Poliamidy

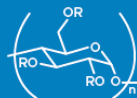
- ▶ Naturalne polimery
 - ▶ Fazy proteinowe
 - ▶ **Polisacharydy**



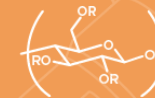
Chiralne złoża stacjonarne w HPLC

► Złoża polisacharydowe: ponad 90% analiz

AMYLOSE DERIVATIVES



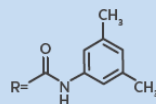
CELLULOSE DERIVATIVES



IMMOBILIZED POLYSACCHARIDE SELECTORS

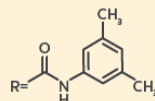
PRIMARY SCREENING SET

CHIRALPAK IA



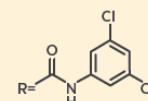
tris (3,5-dimethylphenylcarbamate)

CHIRALPAK IB



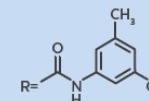
tris (3,5-dimethylphenylcarbamate)

CHIRALPAK IC



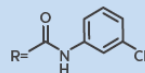
tris (3,5-dichlorophenylcarbamate)

CHIRALPAK IG



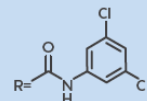
tris (3-chloro-5-methylphenylcarbamate)

CHIRALPAK ID



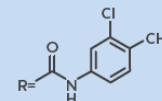
tris (3-chlorophenylcarbamate)

CHIRALPAK IE



tris (3,5-dichlorophenylcarbamate)

CHIRALPAK IF



tris (3-chloro-4-methylphenylcarbamate)

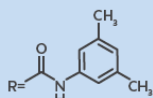
Przypuszczalny mechanizm działania faz polimerowych: inkluzja cząsteczek związków rozdzielanych do chiralnych wnęk sieci krystalicznej polimeru; oddziaływania typu π - π , dipol-dipol, wiązania wodorowe.

Różny stopień dopasowania i siła oddziaływań powoduje różne retencje enancjomerów.

Chiralne złoza stacjonarne w HPLC

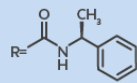
COATED POLYSACCHARIDE SELECTORS

CHIRALPAK AD



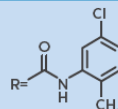
tris (3,5-dimethylphenylcarbamate)

CHIRALPAK AS



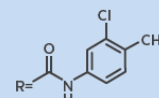
tris (S)- α -methylbenzylcarbamate

CHIRALPAK AY



tris (5-chloro-2-methylphenylcarbamate)

CHIRALPAK AZ



tris (3-chloro-4-methylphenylcarbamate)

CHIRALCEL OA



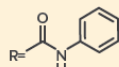
Triacetate

CHIRALCEL OB



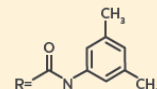
Tribenzoate

CHIRALCEL OC



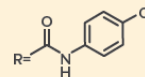
tris (phenylcarbamate)

CHIRALCEL OD



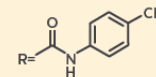
tris (3,5-dimethylphenylcarbamate)

CHIRALCEL OF



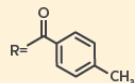
tris (4-chlorophenylcarbamate)

CHIRALCEL OG



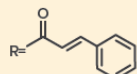
tris (4-methylphenylcarbamate)

CHIRALCEL OJ



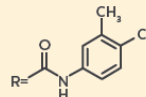
tris (4-methylbenzoate)

CHIRALCEL OK



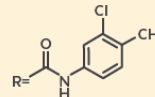
Tricinamate

CHIRALCEL OX



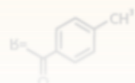
tris (4-chloro-3-methylphenylcarbamate)

CHIRALCEL OZ

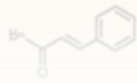


tris (3-chloro-4-methylphenylcarbamate)

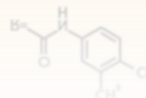
tris (4-methylbenzoate)



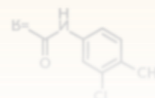
Tricinamate



tris (4-chloro-3-methylphenylcarbamate)



tris (3-chloro-4-methylphenylcarbamate)



Chiralne złoża stacjonarne w HPLC

PROTEIN-BASED SELECTORS

CHIRALPAK AGP

α_1 -acid glycoprotein

CHIRALPAK CBH

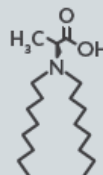
cellobiohydrolase (stable enzyme)

CHIRALPAK HSA

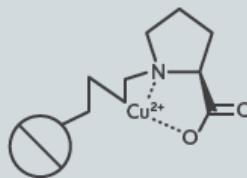
human serum albumin

LIGAND EXCHANGER

CHIRALPAK MA(+)



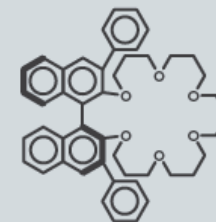
CHIRALPAK WH



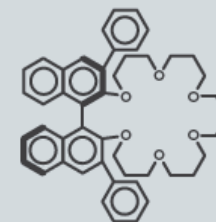
Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} lub Cd^{2+} ,

CROWN ETHER AND IMMOBILIZED CROWN ETHER

CROWNPAK CR(+)|CROWNPAK CR-I(+)



CROWNPAK CR(-)|CROWNPAK CR-I(-)



Przykłady zastosowania:

Pochodne aminokwasów

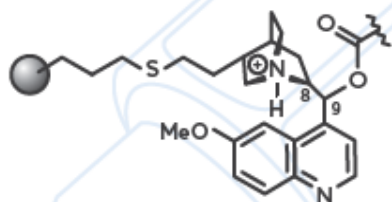
Aminokwasy i ich pochodne,
aminoalkohole, hydroksykwasy

Związki chiralne zawierając
I rzędowe grupy aminowe

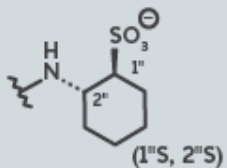
Chiralne złoża stacjonarne w HPLC

SELECTORS FOR SPECIAL APPLICATIONS

ZWITTERION EXCHANGER

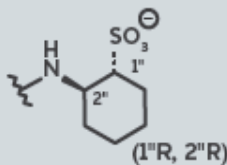


CHIRALPAK ZWIX(+)



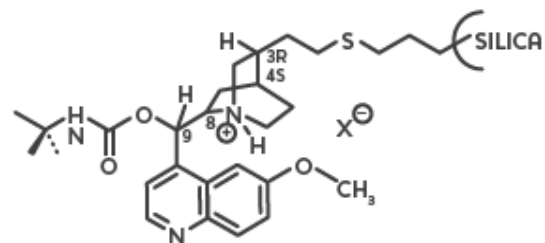
Quinine-derived (8S, 9R)

CHIRALPAK ZWIX(-)



Quinidine-derived (8R, 9S)

ANION EXCHANGER



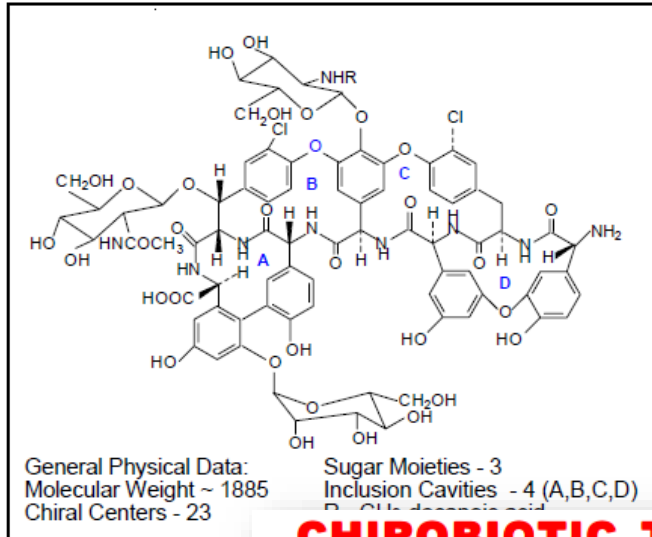
CHIRALPAK QN-AX

O-9-(*tert*-butylcarbamoyl) quinine

CHIRALPAK QD-AX

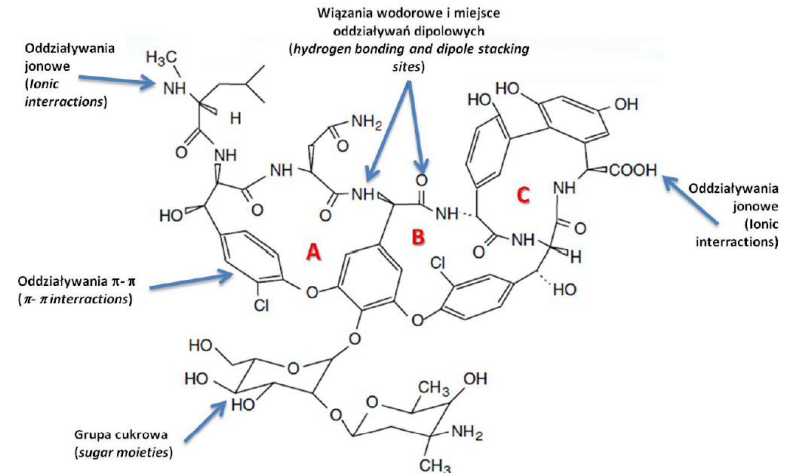
O-9-(*tert*-butylcarbamoyl) quinidine

Preparatywne HPLC na chiralnych fazach stacjonarnych



CHIROBIOTIC T and T2 (Teicoplanin)

- ✓ Complex chiral environment
- ✓ π - π interactions
- ✓ Chiral hydrogen bonding sites
- ✓ Peptide binding site
- ✓ Inclusion complexation
- ✓ Multi-modal possibilities
- ✓ Excellent alternative to crown ether and ligand exchange for amino acids and hydroxy acids
- ✓ Can resolve α , β , γ or cyclic amino acids and peptides
- ✓ Complementary to CHIROBIOTIC V and CHIROBIOTIC R



CHIROBIOTIC V and V2 (Vancomycin)

- ✓ Complex chiral environment
- ✓ π - π interactions
- ✓ Chiral hydrogen bonding sites
- ✓ Peptide binding site
- ✓ Carbohydrate binding site
- ✓ Inclusion complexation
- ✓ Multi-modal possibilities
- ✓ Advantages of protein phases with higher capacity and greater stability
- ✓ Advantages of cellulose and amylose phases with greater solvent versatility and higher throughputs
- ✓ Complementary to CHIROBIOTIC T and CHIROBIOTIC R

Chiralne fazy stacjonarne GC

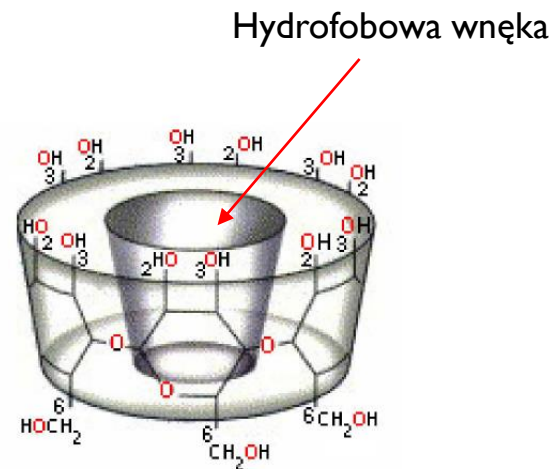
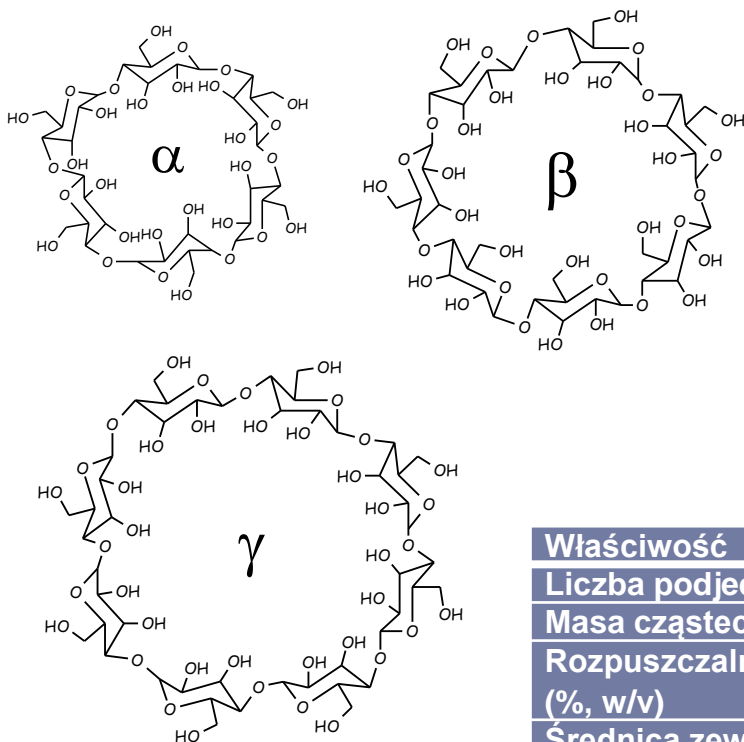
- ▶ Fazy stacjonarne chiralne w GC bazują na polisiloksanach (Chiralsil type)
- ▶ Kolumny kapilarne (open tubular)
- ▶ Typy faz stacjonarnych chiralnych oraz główne oddziaływania selektor - analit:
 - ▶ Pochodne cyklodekstryn – inkluzja (Chiralsil-Dex)
 - ▶ Pochodne aminokwasów – wiązania wodorowe (Chiralsil-Val)
 - ▶ Chiralne kompleksy metali – wiązania koordynacyjne (Chirasil-Metal)
 - ▶ Chiralne ciecze jonowe, polisacharysy, cyklopeptydy, cyklofruktany i inne – niekomercyjne, do specjalistycznych zastosowań.



GC na chiralnych fazach stacjonarnych

Cyklodekstryny

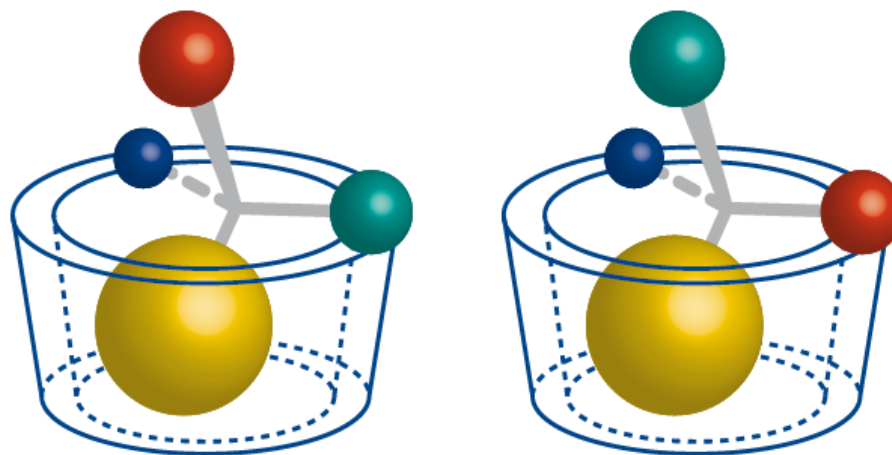
► Cyklodekstryny – polimery D-glukozy



Właściwość	α -CD	β -CD	γ -CD
Liczba podjednostek	6	7	8
Masa cząsteczkowa (g/mol)	972	1135	1297
Rozpuszczalność w wodzie, w temp. 25°C (%, w/v)	14,5	1,85	23,2
Średnica zewnętrzna (Å)	14,6	15,4	17,5
Średnica wewnętrzna (wnęki) (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Wysokość toroidu	7,9	7,9	7,9
Objętość wnętrza (Å ³)	174	262	427

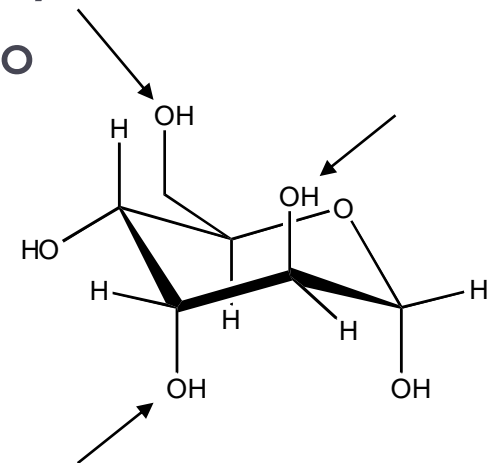
GC na chiralnych fazach stacjonarnych (**inkluzja**)

- ▶ Oddziaływania typu gość - gospodarz
 - ▶ Inkluzja (dopasowanie kształtem i rozmiarem)
 - ▶ Dipolowe (grupy funkcyjne)
 - ▶ Hydrofobowe
 - ▶ Wodorowe
 - ▶ Steryczne

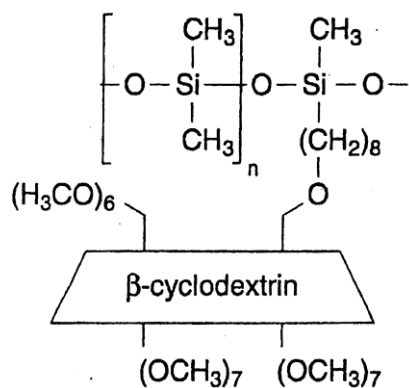


Pochodne cyklodekstryn

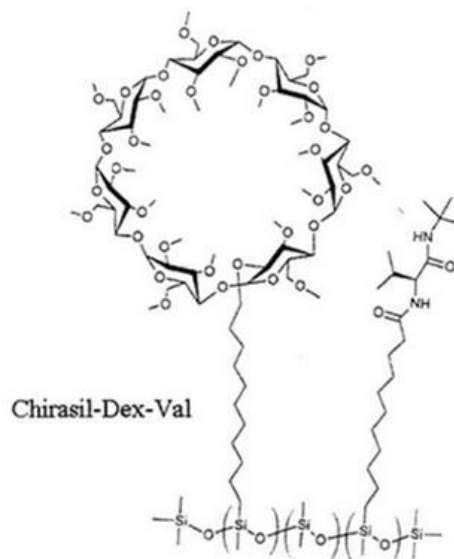
- ▶ Natywne cyklodekstryny nie są użyteczne w GC: zbyt duża polarność
- ▶ Modyfikacja właściwości fizykochemicznych cyklodekstryn
 - ▶ Poprawa stabilności termicznej
 - ▶ Wpływ na hydrofobowość
 - ▶ Zmiana kształtu oraz średnicy wnęki
 - ▶ Inne możliwości tworzenia sieci wiązań wodorowych
 - ▶ Zmiana właściwości selektywnego i specyficznego kompleksowania cząsteczek gości



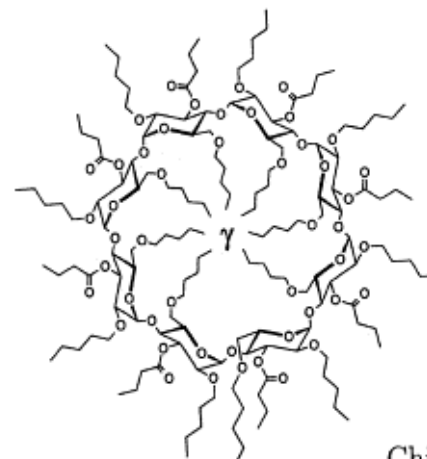
GC na chiralnych fazach stacjonarnych



Chirasil-β-Dex



Chirasil-Dex-Val



Chirasil-γ-Dex

Najczęstsze modyfikacje: alkilowanie, acylowanie



GC na chiralnych fazach stacjonarnych


Table 1. Enantiomeric Separations Achieved with DEX Columns

DEX Column	Probability of Achieving Separation	Compounds Separated
α -DEX 120	40-50%	alcohols, diols, epoxides, ethers, halohydrocarbons, ketones, positional isomers
β -DEX 110 β -DEX 120	80-90%	acids, amines, alcohols, diols, esters, ethers, halohydrocarbons, hydrocarbons, ketones, positional isomers, silanes, terpenes, terpeneols
γ -DEX 120	40-50%	acids, amines, esters, halohydrocarbons, ketones, positional isomers



GC na chiralnych fazach stacjonarnych

Table 4. Enantioselectivity (α) and Chiral Resolution (R_s) as Functions of Column ID*

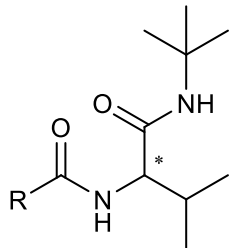
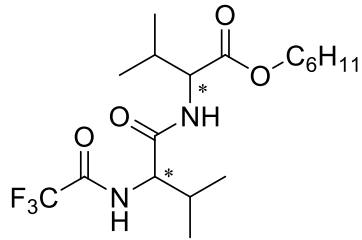
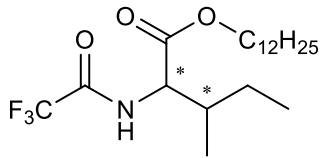


Column ID	Test Compound					
	(+/-)-3,3-Dimethyl-2-butanol		(+/-)- α -Pinene		(+/-)-3-Methyl-2-heptanone	
	α	R_s	α	R_s	α	R_s
0.10mm	1.037	1.89	1.031	2.28	1.021	1.84
0.20mm	1.037	1.35	1.031	1.70	1.021	1.47
0.32mm	1.036	0.98	1.030	1.10	1.021	1.01
0.53mm	1.037	0.70	1.033	0.84	1.023	0.80

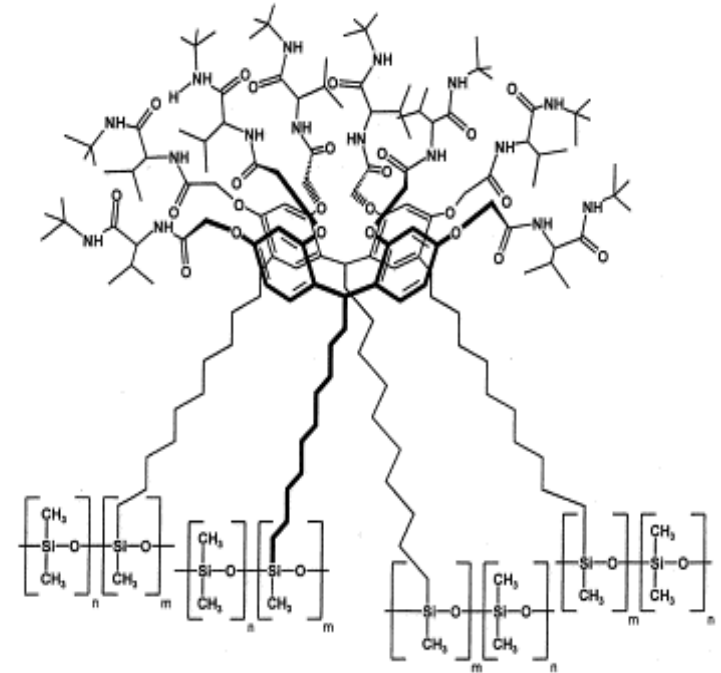
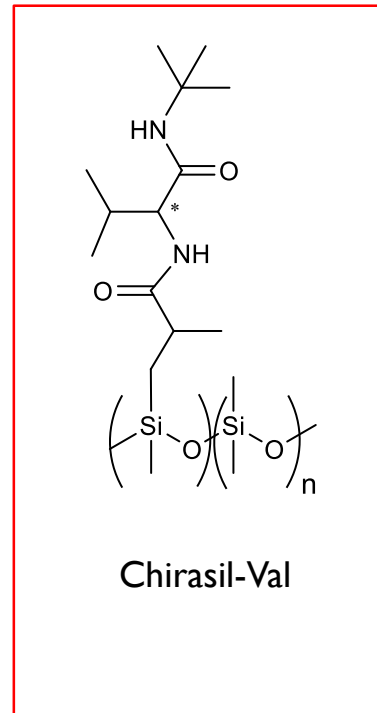
* β -DEX 110 columns (phase ratio = 250); 75°C; helium carrier.

GC na chiralnych fazach stacjonarnych (wiązania wodorowe)

► Analiza aminokwasów i ich pochodnych



$R = C_{11}H_{23}, C_{21}H_{43}$

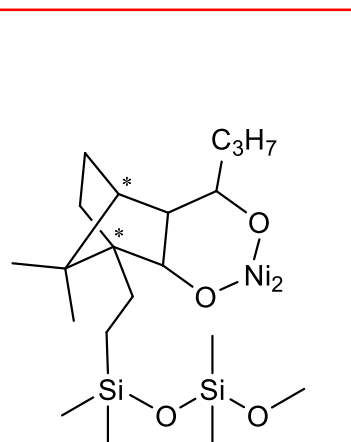
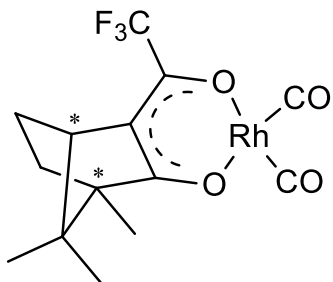


Chirasil-Calix

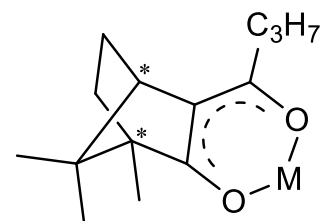


GC na chiralnych fazach stacjonarnych (wiązania koordynacyjne)

- ▶ Analiza chiralnych związków, które nie tworzą wiązań wodorowych, zawierających w cząsteczce atomy tlenu, azotu, siarki
- ▶ Niewielka trwałość kompleksów



Chiralsil-Nickel(II)



M = Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺

Od syntezy do analizy - zastosowanie różnych technik chromatograficznych

- ▶ Najczęściej stosowane techniki chromatograficzne w laboratorium chemii organicznej:
 - ▶ TLC (analityczne i preparatywne)
 - ▶ GC (GC-MS)
 - ▶ GC (kolumny ze złożem chiralnym)
 - ▶ LC
 - ▶ HPLC (analityczne i preparatywne)
 - ▶ HPLC (kolumny ze złożem chiralnym)



Cel: analiza składu enancjomerycznego produktu reakcji katalizowanej chiralnym selektorem

I. Otrzymanie mieszaniny racemicznej badanej próbki - wzorca do chiralnej chromatografii:

- ▶ Synteza – kontrola reakcji TLC
- ▶ Wydzielenie produktu – LC
- ▶ Analiza frakcji – TLC

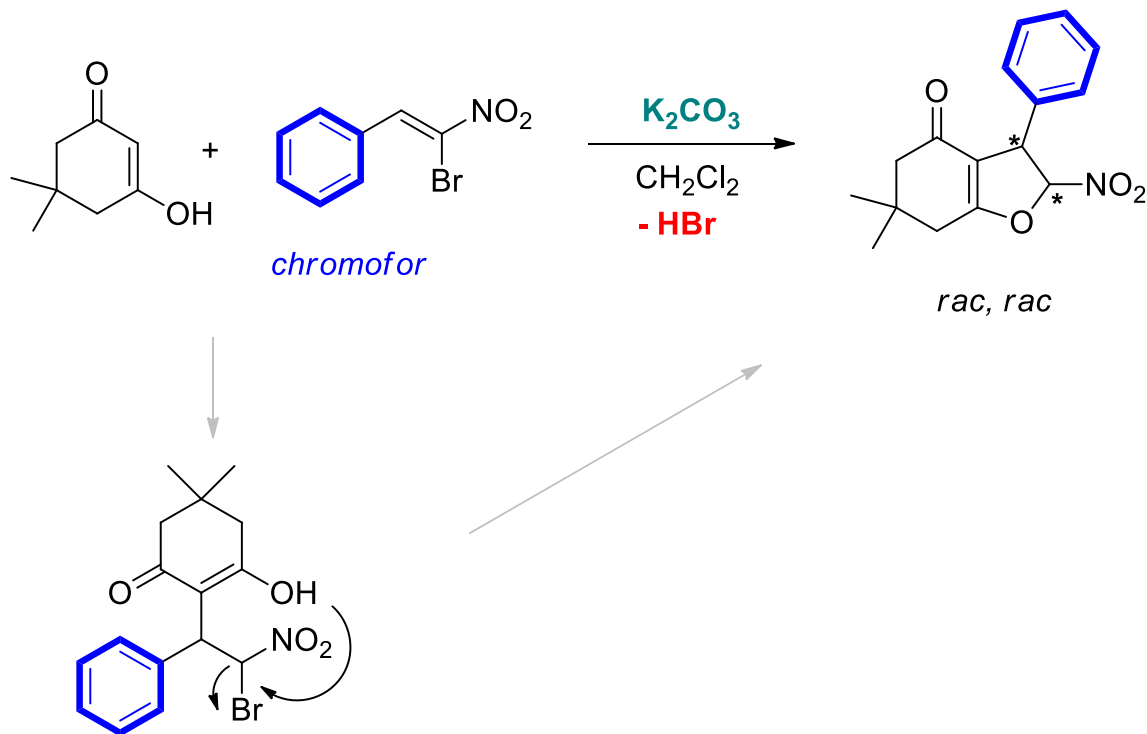
2. Opracowanie warunków analizy chiralnej - HPLC (kolumna ze złożem chiralnym)

3. Analiza składu enancjomerycznego próbki otrzymanej z użyciem chiralnego katalizatora – HPLC

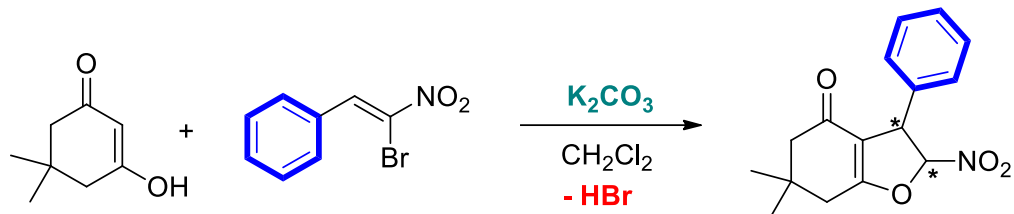


Kontrola przebiegu reakcji

- ▶ TLC (silica gel, heksan/AcOEt, 3:1, v/v)
- ▶ Reakcja:



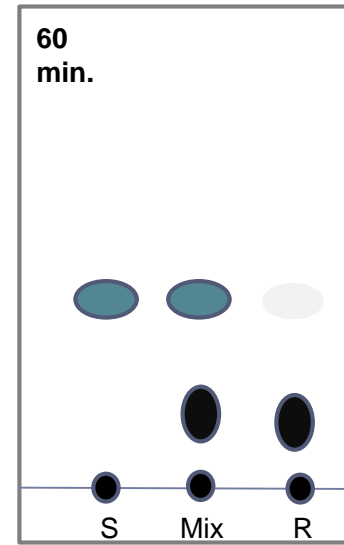
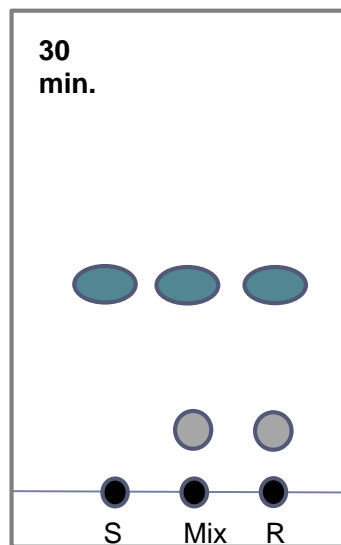
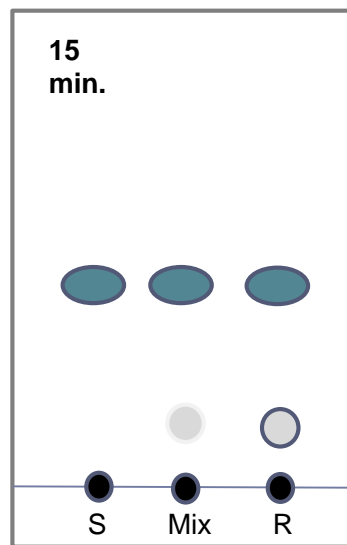
Kontrola przebiegu reakcji



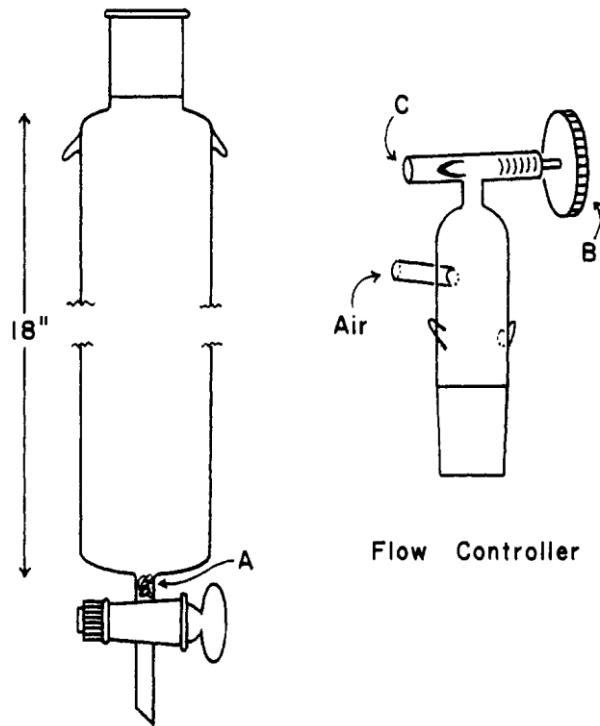
Substrat

Reakcja (produkt+substrat+?)

Mix = S + R



Wydzielanie produktu (LC lub LC *flash*)



Dobór żelu

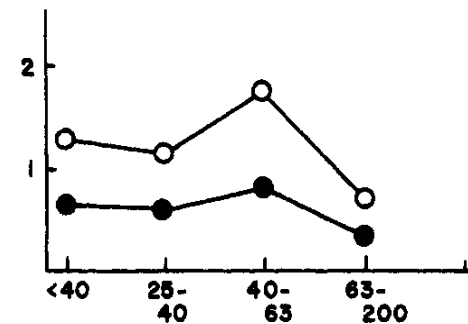


Figure 2. Silica gel particle size⁶ (μm): (●) r/w ; (○) $r/(w/2)$.

W zależności od ilości substancji rozdzielanej dobiera się parametry kolumny i ilości żelu

Wydzielanie produktu (LC lub LC flash)

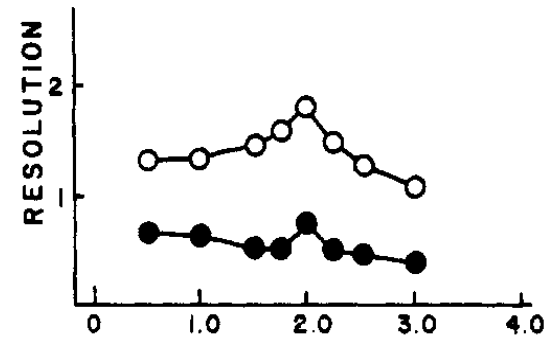
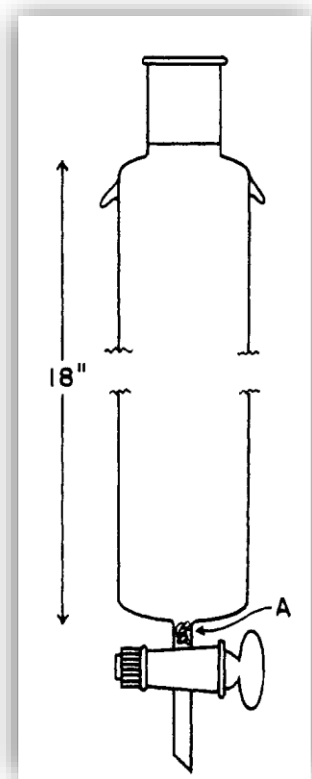


Figure 3. Eluant flow rate (in./min).

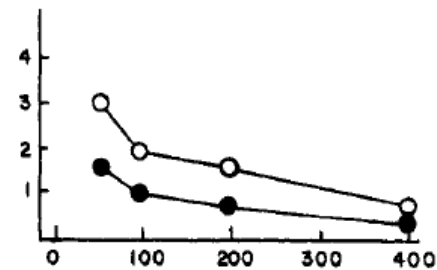



Figure 4. Sample size (mg).

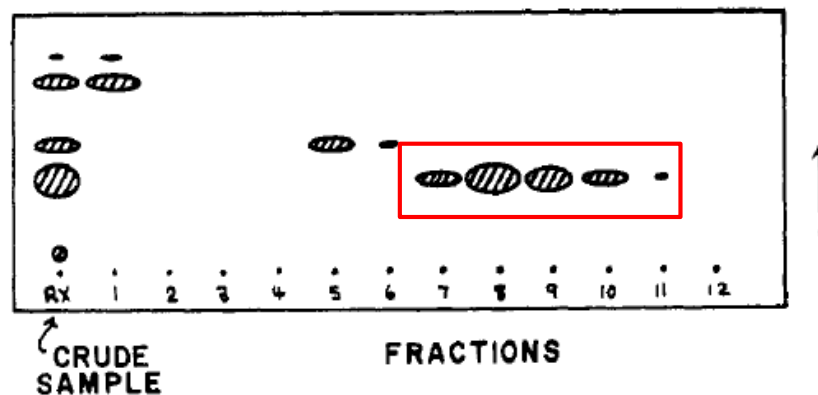


Wydzielanie produktu (LC lub LC *flash*)

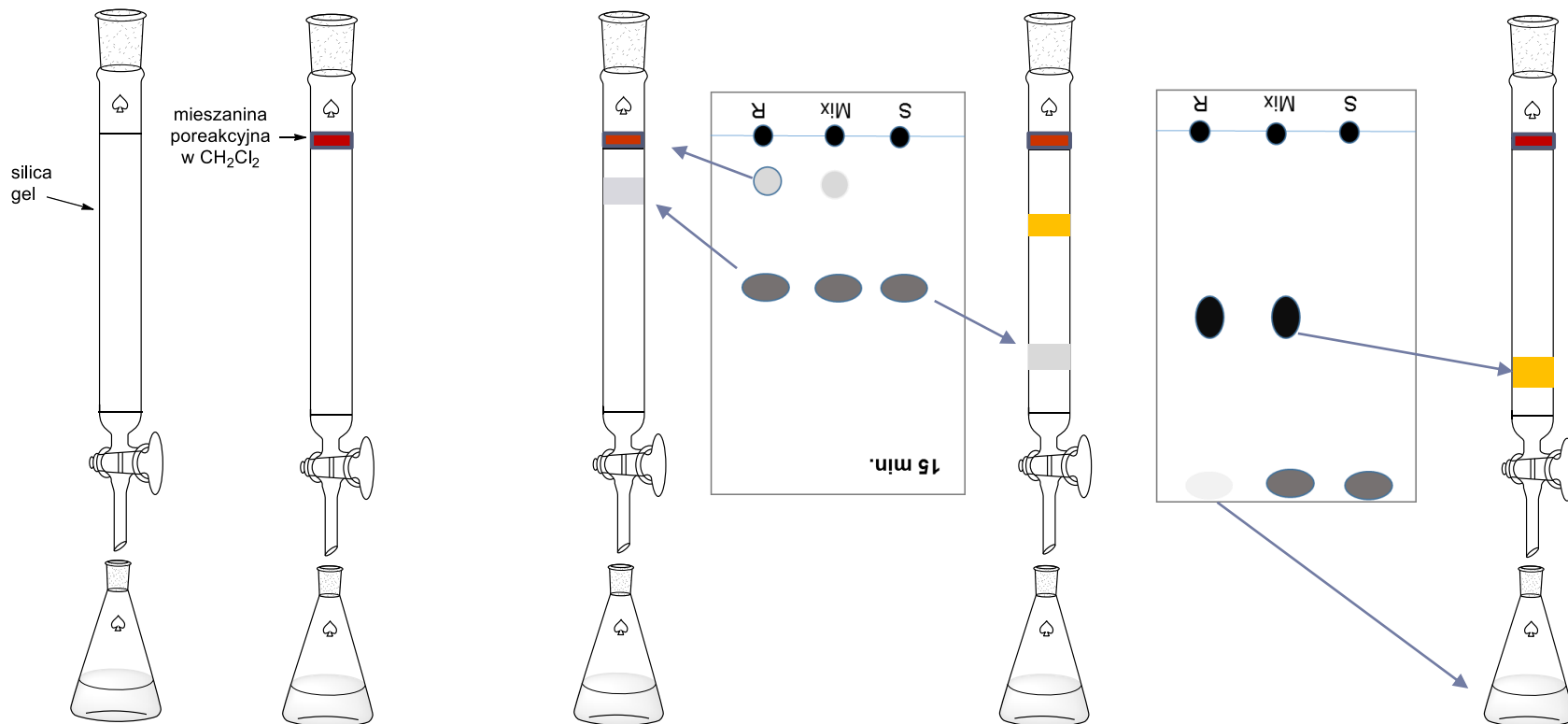
Table I

column diameter, mm	vol of eluant, ^a mL	sample: typical loading (mg)		typical fraction size, mL
		$\Delta R_f \geq 0.2$	$\Delta R_f \geq 0.1$	
10	100	100	40	5
20	200	400	160	10
30	400	900	360	20
40	600	1600	600	30
50	1000	2500	1000	50

^a Typical volume of eluant required for packing and elution.

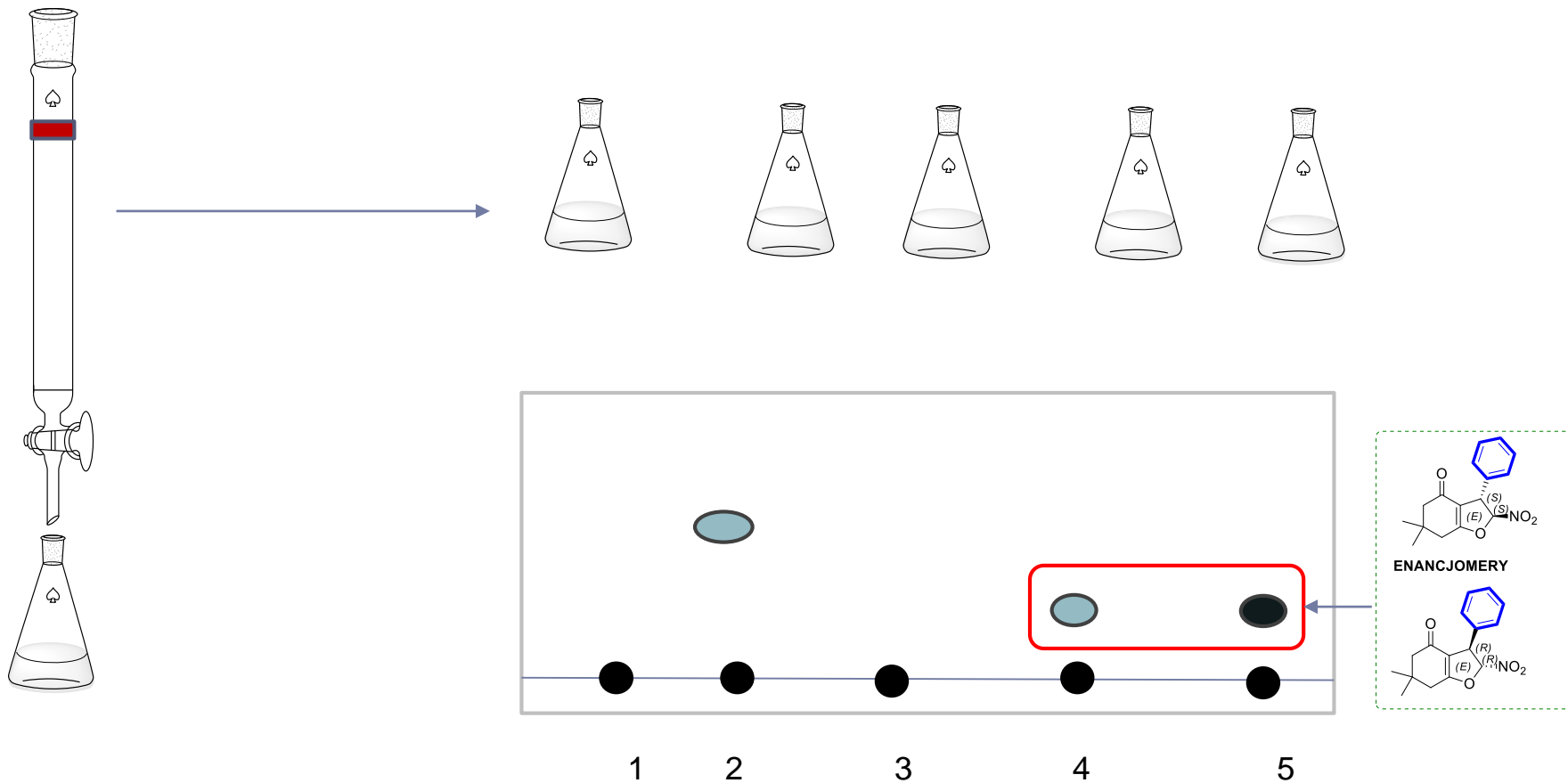


Wydzielanie produktu (LC lub LC flash)



Eluent: heksan:octan etylu, 5:1

Wydzielanie produktu (LC lub LC flash)



Analiza produktu (HPLC lub GC)

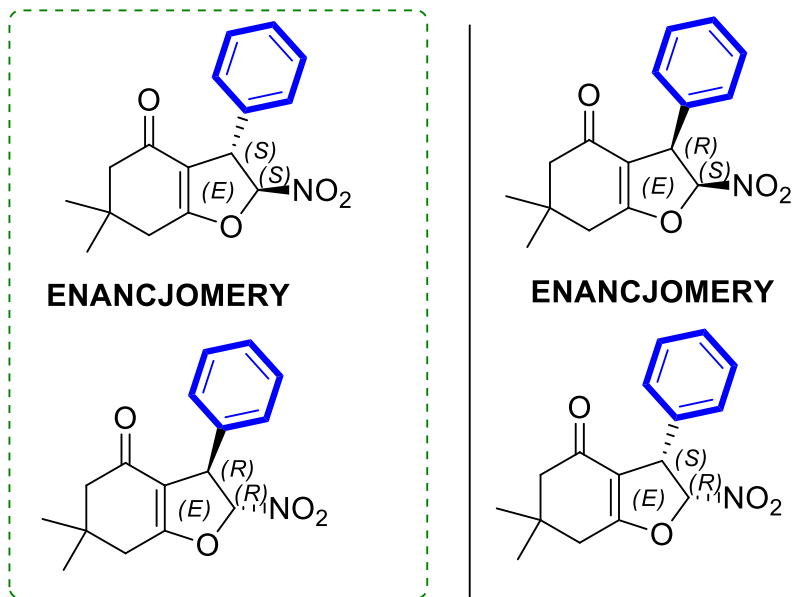
Produkt jest związkiem chiralnym i może występować w postaci pary diastereomerów.

Każda z par składa się z enancjomerów

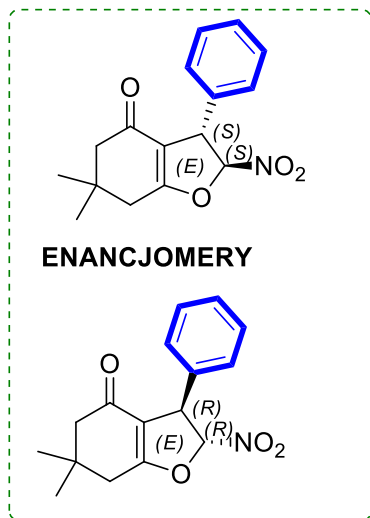
Na podstawie spektroskopii NMR



DIASTEREOMERY



Analiza produktu (HPLC złoża chiralne)



Można rozdzielić na chiralnych złożach stacjonarnych



Ze względu na polarność rozdział z użyciem HPLC



Wybór złoza chiralnego w HPLC

Column description

"Coated" Amylose-Based chiral phases 5µm silica-gel support	"Coated" Cellulose-Based chiral phases 5µm silica-gel support
CHIRALPAK® AD-H Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)	CHIRALCEL® OD-H Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)
CHIRALPAK® AS-H Amylose tris[(S)-α-methylbenzylcarbamate]	CHIRALCEL® OJ-H Cellulose tris(4-methylbenzoate)
CHIRALPAK® AY-H Amylose tris(5-chloro-2-methylphenylcarbamate)	CHIRALCEL® OZ-H Cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)
CHIRALPAK® AZ-H Amylose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)	CHIRALCEL® OX-H Cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate)

Shipping solvent:

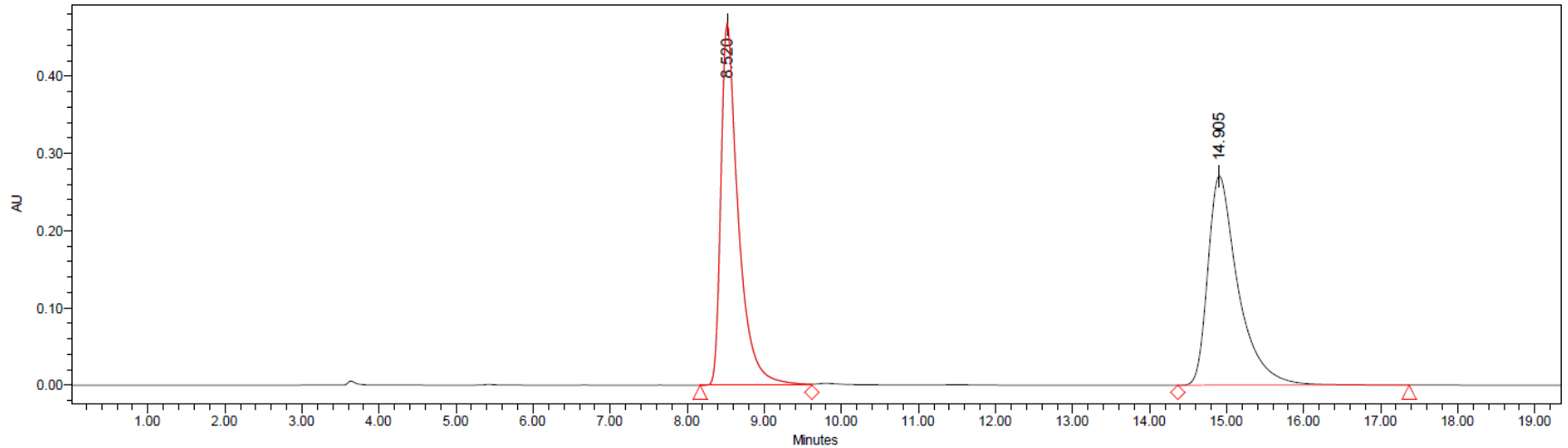
1. Hexane / alcohol 90:10 for analytical columns 4.6mm ID; 150 & 250mL
2. 100%Methanol for analytical columns 4.6mm ID; 100mL
3. 100%Methanol for semi-prep. columns 10-20 and 30mm ID; 250mL

Wybór kolumny chiralnej w HPLC

	100 x 4.6 mm ID 150 x 4.6 mm ID 250 x 4.6 mm ID Analytical columns	250 x 10 mm ID Semi-prep. columns	250 x 20 mm ID Semi-prep. columns	250 x 30 mm ID Semi-prep. columns
Flow rate direction	As indicated on the column label			
Typical Flow rate in SFC	~ 1 - 5 ml/min	~ 15 ml/min	~ 60 ml/min	~ 120 ml/min
Pressure limitation	Should be maintained < 300 Bar (4350 psi) for maximum column life Adapt flow rates to column size.			
Temperature	0 to 40°C			



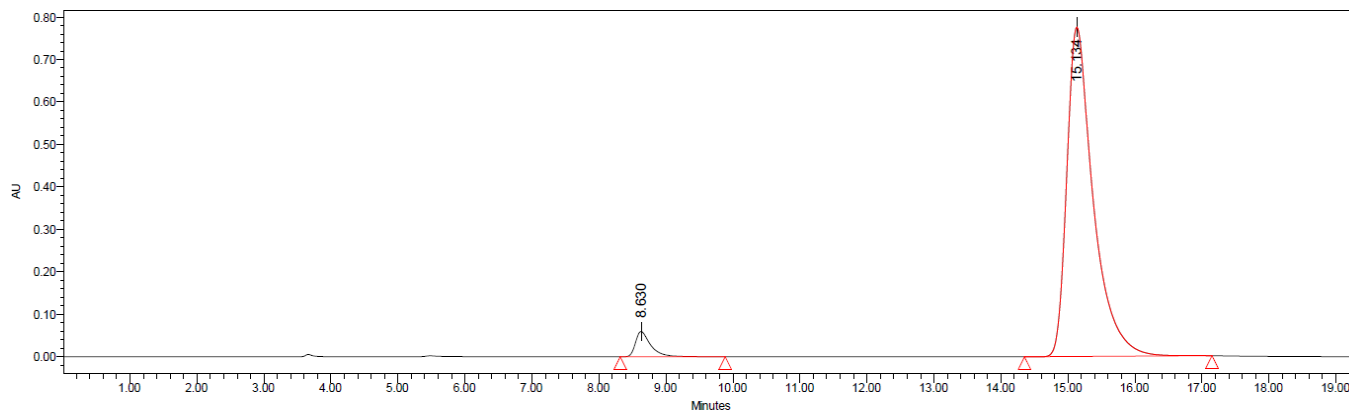
Analiza (racemat)



	Retention Time	% Area
1	8.520	49.85
2	14.905	50.15

HPLC AD-H (heksan/2-propanol, 90/10, 1.0 mL/min, $\lambda = 254$ nm)

Analiza (mieszanina otrzymana z użyciem chiralnego katalizatora)



	Retention Time	% Area
1	8.630	4.22
2	15.134	95.78

e.r. = 4:96

ale

$$ee = (95.78 - 4.22)/100$$

$$ee = 91.56 \approx 92 \%$$

HPLC AD-H (heksan/2-propanol, 90/10, 1.0 mL/min, $\lambda = 254$ nm)

Źródła

- Feng, J., Lin, L., Yu, K., Liu, X. and Feng, X. „Asymmetric Synthesis of Dihydrofurans via Organocatalytic Domino Michael–Alkylation Reaction”, *Advanced Synthesis and Catalysis*, **2015**, 357, 1305–1310 (SI). (doi:10.1002/adsc.201401198)
- Shuring, V. „Separation of enantiomers by gas chromatography”, *Journal of Chromatography A*, **2001**, 906, 275–299.
- Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A., „Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution”, *Journal of Organic Chemistry*, **1978**, 43, 2923–2925.
- Materiały promocyjne producentów chiralnych faz stacjonarnych
- Okamoto, Y., Ikai, T. „Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers”, *Chemical Society Reviews*, **2008**, 37, 2593–2608.

