

CHIRÁLNY SELEKTOR AKO NÁSTROJ NA STANOVENIE ENANTIOMÉRNEHO POMERU V ZMESIACH MOLEKULOVOU SPEKTROSKOPIOU S VIACROZMERNOU KALIBRÁCIOU

ROMAN POLÁČEK a PAVEL MÁJEK

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
roman.polacek@stuba.sk

Došlo 3.11.14, prepracované 25.3.15, prijaté 23.4.15.

Kľúčové slová: chirálna analýza, chirálny selektor, spektroskopia, viacrozmerná kalibrácia

Obsah

1. Úvod
2. Analýza opticky aktívnych látok
3. Chirálny selektor
 - 3.1. Biologicky aktívne molekuly
 - 3.2. Iónové kvapaliny
 - 3.3. Makrocyclické zlúčeniny
 - 3.4. Fluorescenčné chirálne molekulové micely
 - 3.5. Cyklodextríny
 - 3.6. Sacharóza
4. Záver

1. Úvod

V biologických systémoch má optická aktivita významnú úlohu. Väčšina biologických molekúl, ako napr. DNA, proteíny, enzýmy, aminokyseliny a uhľovodíky, je chirálna. Enantioméry môžu rôzne pôsobiť na človeka, vplývať na fyziologickú aktivitu, chuť a čuch. Pretože ľudské čuchové a chuťové bunky obsahujú chirálne senzory, človek dokáže rozoznať, napr. že *R*-limonén vonia ako citrón a *S*-limonén ako pomaranč, alebo že *D*-asparagín má sladkú chuť a *L*-asparagín horkú¹. V mnohých prípadoch majú chirálne lieky zásadný vplyv na ľudské zdravie. Jeden enantiomér môže byť farmakologicky aktívny a druhý enantiomér farmakologicky neaktívny, respektíve toxický. Napríklad *S*-ibuprofén je efektívny ako protizápalové liečivo, jeho *R*-enantiomér je farmakologicky neaktívny².

Najvýraznejšie sa význam chiralít prejavil pri talidomidovej tragédii na konci 60. rokov 20. storočia. Po dvoch desaťročiach užívania tohto lieku tehotnými ženami sa dokázal jeho škodlivý vplyv na plod dieťaťa^{3,4}. Po tejto tragédii sa začali vedci zaoberať vývojom syntéz a skúmaním vplyvu jednotlivých enantiomérov látok. Približne 56 % všetkých registrovaných liečiv sa užíva ako chirálne zlúčeniny a 88 % z nich sa podáva pacientom ako chirálna zmes⁵. Veľké množstvo chirálnych látok, kde sa

musí sledovať kvalita produktov, zvyšuje tlak na vývoj chirálnych analýz. V dnešnej dobe sa zisťuje účinok oboch enantiomérov na človeka a výrobcovia sú povinní stanoviť a uvádzať enantioméru čistotu chirálnych liečiv na obale výrobkov⁵.

Vývoj analytických metód na chirálnu analýzu sa prevažne sústreďuje na separačné a chirooptické metódy, ktoré v porovnaní s metódami molekulovej spektroskopie, najmä UV/VIS, fluorescenčnej alebo infračervenej spektroskopie, v kombinácii s viacrozmernými štatistickými nástrojmi majú buď dlhý čas analýz, alebo sú málo citlivé. Na stanovenie enantioméru pomeru molekulovou spektroskopiou sa používa chirálny selektor. Ten interaguje s jednotlivými enantiomérmi za vzniku diastereomérnych komplexov, ktoré sú charakteristické odlišnou spektrálnou odozvou. Pomocou viacerých typov chirálnych selektorov sa stanovili rozličné opticky aktívne látky v čistej forme, vo farmaceutickom produkte, alebo v biologických tekutinách. V porovnaní s ostatnými metódami je stanovenie relatívne lacné, rýchle a dostatočne citlivé.

V príspevku je uvedený prehľad chirálnych selektorov a možnosti ich využitia v chirálnych analýzach metódami molekulovej spektroskopie s viacrozmernou kalibráciou.

2. Analýza opticky aktívnych látok

Metódy analýzy chirálnych molekúl sa rozdeľujú do dvoch základných kategórií:

- a) chirooptické metódy – meranie spektrálnej odozvy po interakcii chirálnych molekúl s polarizovaným svetlom,
- b) nechirooptické metódy – je potrebné vytvorenie diastereomérnych komplexov enantiomérov s chirálnym selektorom pomocou kovalentnej derivatizácie alebo nekovalentným spôsobom (tvorba špecifického komplexu, medzimolekulová interakcia).

Medzi chirooptické metódy analýzy opticky aktívnych látok patria: polarimetria, optická rotačná disperzia, cirkulárny dichroizmus, vibračný cirkulárny dichroizmus a Ramanova optická aktivita^{6–13}.

Medzi nechirooptické metódy patria chromatografické metódy, NMR (cit.¹⁴) a MS (cit.^{15,16}). V poslednom desaťročí sa začínajú čoraz častejšie objavovať práce, ktoré využívajú na stanovenie enantiomérov spektrálne metódy ako sú UV-VIS spektroskopia, fluorescenčná spektroskopia (FL) a infračervená spektroskopia (IR).

Na analýzu zmesí opticky aktívnych látok sa prevažne používajú chromatografické metódy, a to GC (cit.^{17,18}), HPLC (cit.^{19,20}), micelárna elektrokinetická chromatografia²¹ a kapilárna elektroforéza^{22,23}.

Aj keď sú tieto metódy účinné, majú svoje obmedzenia. Polarimetria má nízku citlivosť a vyžaduje vysokú čistotu látok. Nie je vhodná pre stanovenie enantioméneho pomeru v zmesiach blízkom racemickému zloženiu a stanovenie môže byť ovplyvnené použitým rozpúšťadlom. Optická rotačná disperzia meria v rozsahu viacerých vlnových dĺžok, avšak analýza je limitovaná nedostatočnou špecifikáciou chirálnych látok a veľkou neistotou pri definovaní základnej línie. Metóda cirkulárneho dichroizmu je náročná na drahé prístrojové vybavenie a stanovované látky musia obsahovať chromofór. Všetky chromatografické metódy majú relatívne dlhý čas analýzy, GC analýza je vhodná pre prchavé látky, HPLC vyžaduje veľké objemy činidiel aj analytov. Na druhej strane, MS je deštruktívna metóda, NMR vyžaduje drahé chirálne činidlá a je málo citlivá.

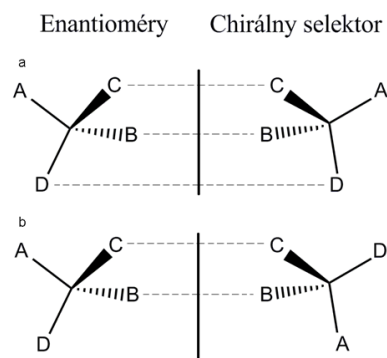
Spektrálne metódy s viacrozmernou kalibráciou ponúkajú lacnejšiu a rýchlejšiu alternatívu k tradičným chromatografickým metódam, pričom citlivosť spektrálnych metód je porovnateľná, v niektorých prípadoch aj lepšia. Avšak na chirálnu analýzu spektrálnymi metódami je potrebná interakcia enantioméru s chirálnym selektorom.

V posledných rokoch boli patentované chirálne analýzy^{24–26}, kde sa metódami viacrozmernej štatistickej analýzy vyhodnocovali spektrálne dáta a tieto analýzy boli začlenené do Amerického liekopisu (United States Pharmacopoeia, USP) ako uznávané pracovné postupy.

3. Chirálny selektor

Chirálnym selektorom je látka, ktorá po selektívnej interakcii s párom enantiomérov (stanovovaná látka) vytvorí diastereométny komplex. Diastereométry, na rozdiel od enantiomérov, nie sú zrkadlové obrazy a majú rozdielne chemické a fyzikálne vlastnosti. Vznik tohto komplexu najlepšie opisuje model trojbodovej interakcie, kde na chirálnu analýzu je potrebná interakcia aspoň v troch bodoch medzi jedným enantiomérom a chirálnym selektorom^{27,28} (obr. 1a). V prípade, ak enantiomér vďaka svojmu zrkadlovému usporiadaniu molekuly môže interagovať iba s jedným, prípadne dvomi miestami selektora, nedochádza k vzniku diastereométného komplexu (obr. 1b).

K chirálnej diskriminácii nedochádza v achirálnom prostredí, preto sa na rozpoznanie enantiomérov v molekulovej spektroskopii používajú chirálne selektory. Medzi tieto selektory možno zaradiť biologicky aktívne molekuly (bázy DNA, hovädzí sérový albumín (BSA)), iónové kvapaliny, makrocyclické látky (kalixarény), fluorescenčné micely, cyklodextríny (CD) a sacharózu. Pretože zmeny v spektrálnych vlastnostiach diastereométnych komplexov jednotlivých enantiomérov sú významné, ale zväčša málo postrehnuteľné, namerané údaje sa vyhodnocujú viacrozmernými štatistickými metódami.



Obr. 1. Model trojbodovej interakcie

3.1. Biologicky aktívne molekuly

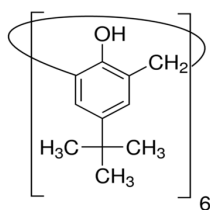
Na stanovenie enantiomérov dansyl-fenylalanínu (DP) fluorescenčnou spektroskopiou s chemometrickým vyhodnotením dát sa v práci²⁹ ako chirálny selektor použila α -glykoproteínová kyselina (AGP) v prostredí zmesi etanolu a vody. DP v nechirálnom prostredí vykazoval prirodzenú fluorescenciu pri $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 200/544$ nm, po pridaní AGP sa zaznamenal posun fluorescenčných maxim na $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 220/497$ nm. Na základe rozdielnej intenzity fluorescencie sa zistila sila interakcie medzi DDP-AGP a DLP-AGP, ktorá je väčšia pre DDP-AGP.

BSA vytvára stereoselektívne šterické interakcie, hydrofóbne interakcie a interakcie vodíkových väzieb medzi ligandom a receptorom. Porovnaním elektrónových (UV/VIS) spektier sa zistilo³⁰, že BSA vytvára silnejšie hydrofóbne interakcie a interakcie vodíkových väzieb s tryptofánom, DOPA a propranololom v porovnaní s tyrozinom, fenylalanínom, cysteínom a alanínom. BSA sa tiež použil vo fluorescenčnej spektroskopii na stanovenie enantiométnej čistoty tryptofánu. Práve vďaka prítomnosti BSA sa dosiahla nízka medza detekcie a to 2,50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ tryptofánu v roztoku³¹.

V prípade guanínu ako chirálneho selektora v IR spektroskopii sa dosiahla pre stanovenie enantiométného pomeru ibuprofenu nízka chyba priemernej predikcie na úrovni 3,6 %, ak sa model PLS (Partial Least Square method – metóda čiastočne najmenších štvorcov) vytvoril z dát po transformácii vlnových dĺžok. Autori zistili, že nízkofrekvenčné spektrálne údaje obsahujú najviac informáciu, zatiaľ čo vysokofrekvenčné údaje reprezentujú predovšetkým chybu v nameraných dátach³².

3.2. Iónové kvapaliny

Iónové kvapaliny (IL) sú látky, ktoré obsahujú kation a anión a aspoň jedna zložka je z triedy organických zlúčenín. IL sú prevažne organické soli, ktoré sú kvapalné pri izbovej teplote do 100 °C. Majú veľa výhod, napr. sú recyklovateľné, na vzduchu stabilné, majú vysokú rozpustnosť a chirálne IL umožňujú silné diastereométné interakcie s oboma enantiométnymi formami rôznych molekúl.

Obr. 2. *tert*-Butylkalix[6]arén (TBCA)

Vďaka týmto vlastnostiam môžu slúžiť v zelenej chémii ako náhrada za prchavé organické rozpúšťadlá, ktoré sa tradične využívajú v priemysle. IL sa úspešne použili v mnohých aplikáciách, kde nahradili organické rozpúšťadlá v organických syntézach, extrakciách, elektrochemických reakciách, alebo sa využívajú ako stacionárne fázy v chirálnych chromatografických kolónach. Nové druhy chirálnych IL, akou je aj S-[CHTA]⁺[Tf₂N]⁻ (S-[(3-chlór-2-hydroxypropyl)trimetylamónium] [bis((trifluorometyl)sulfonyl)amid, s relatívne silnou schopnosťou rozpoznávania enantiomérov³³. S-[CHTA]⁺[Tf₂N]⁻ vykazuje slabú absorpciu v UV oblasti a takmer žiadnu vo

Tabuľka I

Príklady využitia rôznych chirálnych selektorov v molekulovej spektroskopii

Chirálny selektor ^a	Analyt ^b (racemická zmes)	Spektrálna metóda	Vyhodnotenie ^c	RMSE ^d	Prostredie ^e	Lit.
AGP	dansyl fenylalanín	FL	PCR	5,0	etanol: voda	29
BSA	fenylalanín, tyrozín, alanín, cysteín, DOPA, propranolol, tryptofán	UV/VIS	PLS1	fen: 14,0; tyr: 12,0; ala: 36,0; cys: 25,0; DOPA: 1,9; prop: 3,1; tryp: 4,1	fosfátový tlmivý roztok (pH 10)	30
BSA	tryptofán	FL	PCR	neuvedené	neuvedené	31
guanín	ibuprofén,	IR	PLS1	1,4	neuvedené	32
IL	propranolol, naproxén, warfarín	FL	PLS1	nap: 1,5; war: 3,1	IL	33
IL	atenolol, propranolol, ibuprofén, alanín, fenylalanín	IR	PLS1	ate: 2,2; ostatné: neuvedené	IL	34
TBRM	lyzín, alanín, aginín, asparagín, aspartín, glutamín, glutamát, leucín, metionín, prolín, serín, treonín, valín	FL	PLS1	lys: 5,8; ostatné: neuvedené	voda: metanol (10:90)	37
TBCA	warfarín	UV/VIS	PLS1	1.0	chloroform	38
poly-L-SULV	BOH, BNA, TFA	FL	PLS1	BOH: 1,9; BNA: 1,9; TFA: 2,8	boritanový tlmivý roztok (pH 10)	39
poly-L-SUW	glukóza, kyselina vínna, serín	FL	PLS1	glu: 2,1; KV: 3,5; ser: 3,6	voda	40
poly-L-SUY	α-pinén	FL	PLS1	neuvedené	voda	
poly-L-SUF	α-pinén	FL	PLS1	neuvedené	voda	
poly-L-SUF	BNA, AFE, propranolol, CMME naproxén, limonén, kyselina vínna, kyselina citraková	FL	PLS1	BNA: 2,3; AFE: 3,0; prop: 3,2; CMME:2,5; nap: 3,2; lim: 4,4; KV: 4,4; KC: 3,8	fosfátový tlmivý roztok (pH 7)	41

^a IL – S-[CHTA]⁺[Tf₂N]⁻, ^b AFE – 1-(9-antracyl)-2,2,2-trifluoroetanol, CMME – chlorometyl metyléter, ^c PCR – regresia hlavných komponentov, PLS1 – regresia čiastočne najmenších štvorcov, ^d KV – kyselina vínna, KC – kyselina citraková, ^e IL – S-[CHTA]⁺[Tf₂N]⁻

viditeľnej oblasti spektra. Taktiež nebola pozorovaná žiadna fluorescenčná intenzita ak IL bola excitovaná³³. Tran a spol. ukázali, že táto nová IL je vhodná na stanovenie enantiomérmeho pomeru širokej škály zlúčenín metódami fluorescenčnej³³ aj infračervenej spektroskopie³⁴. Vytvorením diastereoizomérmeho komplexu medzi IL a skúmanými látkami sa získalo rozlíšenie s vysokou presnosťou medzi jednotlivými enantiómami propranololu, naproxénu a warfarínu, kde sa určil enantiomérmny prebytok 0,3 % (cit.³³), v prípade atenololu, propranololu, ibuprofenu, alanínu a fenylalanínu bol enantiomérmny prebytok 0,6 % (cit.³⁴).

3.3. Makrocyclické zlúčeniny

Na chirálnu analýzu v molekulovej spektroskopii sa využívajú z makrocyclických zlúčenín prevažne kalixarény. Môžu byť odvodené od monomérmnych jednotiek fenolu alebo resorcinolu pospájaných tak, aby vytvárali hydrofóbnu dutinu. Táto dutina umožňuje interakcie s enantiómom, čím sa dosiahne rozlíšenie jednotlivých foriem v chirálnej zmesi. Medzi kalixarény sa radia *tert*-butylkalix[6]arény (TBCA), ktoré sú tvorené 6 fenolovými jednotkami derivatizovanými butylovou skupinou³⁵ (obr. 2). Taktiež do tejto skupiny patrí tetraarylbóratový kalixresorcarén (TBRM). TBRM sa pripravuje reakciou štyroch monomérmov resorcinolu alebo jeho derivátov s alifatickými alebo aromatickými aldehydmi, čím vzniká makromolekula zo štyrmi chirálnymi centrami v dutine³⁶.

Na základe fluorescenčnej intenzity môžeme usudzovať, že dochádza k silnejšej interakcii TBRM s L-formou študovaných aminokyselín (tab. I) ako s ich D-formou. TBRM tiež možno použiť ako senzor pre lyzín, pretože spolu vytvárajú jedinečný komplex. Tento komplex vykazuje fluorescenciu pri $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 350/420$ nm a nebol zaznamenaný pri interakcii s inou aminokyselinou³⁷.

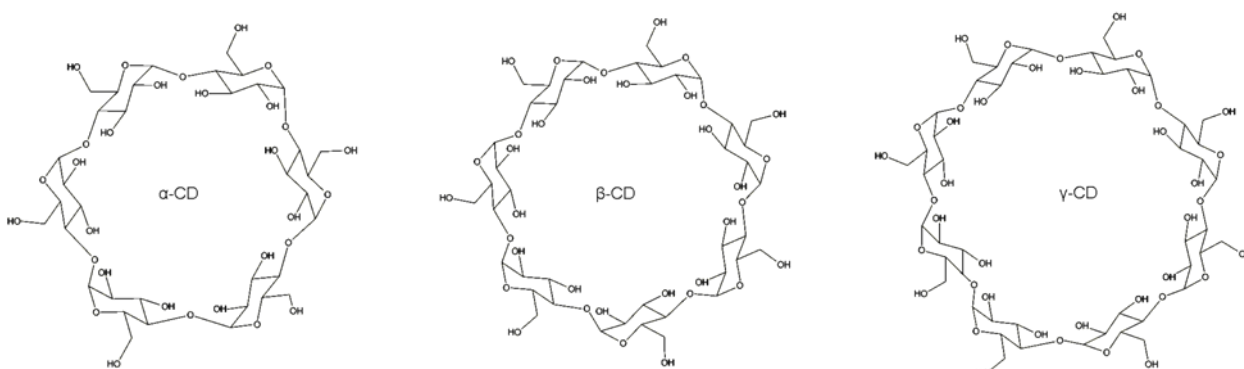
Pri stanovení enantiomérmeho pomeru warfarínu v tablekách Bodoki a spol.³⁸ použili TBCA ako chirálny selektor a ich výsledky boli porovnateľné s výsledkami z chirálnej HPLC.

3.4. Fluorescenčné chirálne molekulové micely

Fluorescenčné chirálne molekulové micely (FCMM) obsahujú polárne funkčné skupiny orientované do stredu micely a nepolárne uhl'ovodíky s dlhým reťazcom, ktoré tvoria tzv. chvosty. Na rozdiel od monomérmnych povrchovo aktívnych látok sú FCMM stabilnejšie, majú voliteľnú veľkosť dutiny a nemajú kritickú micelárnu koncentráciu. V porovnaní s inými chirálnymi selektormi, ako sú CD, korunové étery a proteínové antibiotiká, sú FCMM relatívne dobre rozpustné vo vode aj v organických rozpúšťadlách. Navyše polarita skupín ako aj počet stereogenných centier sa môže ľahko modifikovať. Pri tvorbe diastereoizomérmeho komplexu medzi FCMM a chirálnym analytom sa pozorujú rozdiely v emisných fluorescenčných spektrách, ktoré sa môžu odlišovať v závislosti od veľkosti interakcii v komplexe³⁹. Medzi FCMM patria poly-L-SULV (poly(*N*-undekanoyl-L-leucylvalínan sodný)), poly-L-SUF (poly(*N*-undekanoyl-L-fenylalanínan sodný)), poly-L-SUY poly(*N*-undekanoyl-L-tyrozínan sodný) a poly-L-SUW (poly(*N*-undekanoyl-L-tryptofánan sodný)).

Poly-L-SULV je záporne nabitý dipeptid lucicínu s vanilínom, s dvoma chirálnymi centrami, ktorý je vo vode dobre rozpustný. Má dobrú chirálnu diskriminačnú schopnosť, čo vyplýva z nízkych hodnôt RMSE (root mean square error – stredná kvadratická chyba) pre kalibračné modely analýzy zmesi enantiomérmov 1,1'-bi-2-naftolu (BOH), 1,1'-binaftyl-2,2'-diamínu (BNA) a 2,2,2-trifluoroantracyletanolu (TFA)³⁹.

Williams a spol. syntetizovali FCMM s jedným chirálnym centrom a použili ich na stanovenie chirálnych látok, ktoré môžu, ale aj nemusia, obsahovať fluorofór. Pri použití poly-L-SUW zaznamenali výraznejšie spektrálne rozdiely vo fluorescenčnom emisnom spektre medzi jednotlivými diasteroisomérmymi komplexmi s glukózou, kyselinou vínou a serínom v porovnaní s poly-L-SUY a poly-L-SUF. V prípade hydrofóbnej molekuly α -pinénu sa dosiahla lepšia chirálna diskriminácia práve týmito dvoma FCMM. To naznačuje, že poly-L-SUY a poly-L-SUF vytvárajú silnejšie diasteroisomérmne interakcie s hydrofóbnymi analytmi ako s hydrofilnými⁴⁰. Toto tvrdenie bolo potvrde-



Obr. 3. Štruktúra prirodzených cyklodextrínov

né aj v práci⁴¹, kde použili poly-L-SUF na enantioméne stanovenie analytov s rôznymi funkčnými skupinami, rôznou rozpustnosťou, veľkosťou a hydrofóbnosťou (tab. I).

3.5. Cyklodextríny

CD sú cyklické oligosacharidy vytvorené spojením 6 až 8 glukózových jednotiek do prstenca s lipofilnou kavitou a vonkajším hydrofilným povrchom. Na základe počtu

glukózových jednotiek sa označujú α - (6), β - (7) a γ - (8) CD (cit.⁴²), (obr. 3).

Najviac používaným chirálnym selektorom je β -CD, ktorý poskytol najlepšie výsledky a hodnoty RMSE pri porovnávaní jednotlivých prirodzených CD (tab. II). Avšak sú publikované práce využívajúce γ -CD, kde sa podarilo dosiahnuť blízke alebo nižšie hodnoty RMSE ako pri použití β -CD (cit.⁴⁸). Busch a spol.⁴⁸ skúmali interakcie α -, β - a γ -CD s ibuprofénom a norefedrinom. Porovnaním

Tabuľka II

Príklady využitia cyklodextrínov a sacharózy ako chirálnych selektorov

Chirálny selektor ^a	Analyt ^b (racemická zmes)	Spektrálna metóda	Vyhodnotenie ^c	RMSE	Prostredie	Lit.
β -CD	fenylalanín	FL	PLS1	3,0	voda	43
β -CD	fenylalanín, norefedrin	UV/VIS	PLS1	fen: 5,2; nor:8,0	voda	44
β -CD	propranolol	UV/VIS	PLS1	2,7	tlmivý roztok (pH 3)	45
β -CD	CLOR	UV/VIS	PLS1	neuvedené	voda	46
β -CD	α -fenylglycín	UV/VIS	ANN	0,6	tlmivý roztok (pH 12)	47
γ -CD	ibuprofén, norefedrin	UV/VIS	PLS1	ibu: 0,7; nor: 3,3	fosfátový tlmivý roztok (pH 11)	48
Me- β -CD	prolín, efedrin, propranolol, tryptofán	UV/VIS	PLS1	pro: 7,8; efe: 6,9; prop: 9,7; tryp:8,0	boritanový tlmivý roztok (pH 10)	49
Me- β -CD	BMBS	UV/VIS	PLS1	6,1	voda: etanol (3:2) + SDS	50
HP- β -CD	TME HCl	UV/VIS	PLS1	5,7	voda: etanol (3:2) + SDS	
Me- β -CD	norefedrin-L-bivínan	UV/VIS	PLS1	3,2	voda	51
CM- γ -CD	norefedrin	UV/VIS	PLS1	4,1	voda	
CM- β -CD	efedrin	UV/VIS	PLS1	4,1	voda	
CM- α -CD	TME HCl	UV/VIS	PLS1	6,7	voda	
ODAS- γ -CD	M3	ATR-IR	MLR	neuvedené	voda	52
β -CD	ibuprofén	FL	PARAFAC	3,7	voda	53
β -CD	propranolol	FL	BLLS	3,5	voda	54
β -CD	propranolol	FL	PARAFAC	6,0	voda	55
β -CD	naproxen	FL	PARAFAC	7,5	voda	56
sacharóza	metalaxyl	UV/VIS	PLS1	28,2	voda	57
sacharóza	fenylalanín	UV/VIS	PLS1	neuvedené	voda	58
α -; β -; γ -CD; sacharóza	alanín, valín, leucín, izoleucín, cysteín, fenylalanín, tryptofán	NIR	PLS1	neuvedené	voda	59
α -; β -; γ -CD; sacharóza	propranolol, atenolol, ibuprofén	NIR	PLS1	neuvedené	voda	60

^a Me- β -CD – metyl- β -cyklodextrin, HP- β -CD – hydroxypropyl- β -cyclodextrin, CM- α -CD – carboxymetyl- α -cyklodextrin, CM- β -CD – carboxymetyl- β -cyklodextrin, CM- γ -CD – carboxymetyl- γ -cyklodextrin, ODAS- γ -CD – oktakis(2,3-diacetyl-6-sulfo)- γ -cyklodextrin; ^b CLOR – maleát chlorfenylaminu, BMBS – *N,N*-bis(α -metylbenzyl)sulfamid, TME HCL – tryptofán metylester hydrochlorid, M3 – 2(*R,S*)-*N*-[1-(6-aminopyridin-2-ylmetyl)piperidín-4-yl]-2-[(1*R,S*)-3,3-difluorocyklopentyl]-2-hydroxy-2-fenylacetamid, ^c PLS1 – regresia čiastočne najmenších štvorcov, ANN – umelé neuronové siete, MLR – viacnásobná lineárna regresia, PARAFAC – paralelná faktorová analýza, BLLS – metóda bilineárne najmenších štvorcov

výsledkov sa zistilo, že veľkosť kavity α -CD je malá, a preto sa nedosiahla dostatočná interakcia s analytom. Toto tvrdenie je podložené aj hodnotami RMSE vypočítaných z PLS kalibračných modelov, ktoré sú v prípade ibuprofenu 2,7 %; 0,8 % a 0,7 % a norefedrínu 5,9 %; 3,4 % a 3,3 % pre α -, β - a γ -CD. Taktiež pri interakcii β -CD s fenylalanínom sa dosiahla nižšia RMSE ako pri použití γ -CD (cit.⁴³).

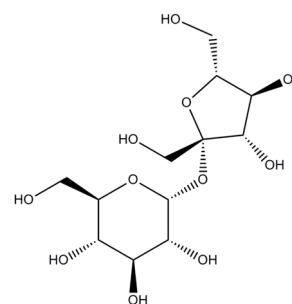
Z porovnania výsledkov získaných použitím prirodzených a modifikovaných CD vyplýva, že modifikované CD poskytujú horšie výsledky pre enantioméry, ktorých diastereomér sa tvorí v kavite CD a nie na jeho povrchu. V tab. II je uvedené využitie jednotlivých CD, kde najvhodnejšie chirálne selektory umožňujú stanovenie s najnižšou chybou RMSE.

Derivatizácia CD znižuje veľkosť kavity, čo neumožňuje úplné zasunutie enantiomérov do kavity, ale môže zlepšiť hydrofóbne alebo hydrofilné interakcie s enantioméromi na základe vlastností substituentov. Príkladom využitia týchto typov interakcii sú enantioméry prolínu, propranololu, tryptofánu a efedrínu, kde Me- β -CD majú lepšiu rozpoznávaciu schopnosť ako β -CD (cit.⁴⁹). Fakayode a spol.⁵⁰ študovali rozpoznávaciu schopnosť prirodzených a modifikovaných CD, ich rôzne kombinácie v zmesi a prítomnosť achirálnych povrchovo aktívnej látky (dodecylsulfát sodný, SDS) v roztoku zmesi enantiomérov a CD. Zistili, že v prítomnosti SDS dochádza k rozdeleniu enantiomérov medzi SDS a kavitu CD, čo v konečnom dôsledku môže vplyvať na presnosť výsledkov. Prítomnosť SDS vo väčšine prípadov má buď malý alebo negatívny vplyv na prediktívnu schopnosť PLS modelu pri určovaní enantiomérového pomeru. Navyše ukázali, že kombinovaním CD, v prítomnosti alebo bez SDS, sa znížila predikčná schopnosť regresných modelov v porovnaní s výsledkami získanými použitím jednotlivých CD.

Vyhodnotením exitačno-emisných dátových matíc enantiomérov s β -CD viacrozmernými metódami druhého poriadku, PARAFAC (PARAllel FACTor Analysis – paralelná faktorová analýza) a BLLS (Bilinear Least Square method – metóda bilineárnych najmenších štvorcov), stanovili účinné látky ibuprofén⁵³, propranolol^{54,55} a naproxén⁵⁶ v komplikovaných maticiacich biologických tekutín (moč a ľudská plazma) a vo farmaceutických produktoch.

3.6. Sacharóza

Sacharóza (obr. 4) ako pomerne lacný chirálny selektor vytvára diastereomérne interakcie s *R*- aj *S*-enantioméromi metalaxylu⁵⁷ a fenylalanínu⁵⁸. Výsledky stanovenia enantiomérov metalaxylu ukazujú, že ak sa použila sacharóza ako chirálny selektor v UV/VIS metóde s PLS1 vyhodnotením spektrálnych dát, tak sa dosiahli nižšie hodnoty RSD (0,59 % a 0,95 %, pre *S*- a *R*-formu) ako sú uvádzané v literatúre pri použití chirálnej HPLC (2,6 %) ⁵⁷. V prípade fenylalanínu⁵⁸ sacharóza vytvárala silnejší diastereoméerný komplex s *D*-formou fenylalanínu, čo umožnilo stanovenie enantiomérového pomeru v zmesiach.



Obr. 4. Štruktúrny vzorec sacharózy

Porovnaním výsledkov využitia sacharózy so všetkými tromi typmi prirodzených CD ako selektorov pre alanín⁵⁹, propranolol a atenolol⁶⁰ sa nezistili žiadne rozdiely pri predikcii enantiomérového pomeru v modelovej chirálnej zmesi. Tento fakt naznačuje, že na vytvorenie diastereomérovnej interakcie nevyplýva prítomnosť, či veľkosť kavity CD, no postačujúce sú len interakcie s uhlíkovým skeletom CD (cit.^{59,60}).

4. Záver

Moderné trendy v analytickej chémii si vyžadujú metódy, ktoré umožňujú priamu a rýchlu analýzu. Tieto požiadavky sa vzťahujú aj na chirálne analýzy, ktorých počet výrazne stúpa s vývojom nových chirálnych liečiv. Farmaceutické firmy predávajú liečivá ako čisté enantioméry, alebo ako chirálne zmesi. Ich čistotu, či enantiomérový pomer sú výrobcovia povinní kontrolovať a uverejňovať na obaloch a príbalových letáčkoch.

Klasické chirálne metódy sú finančne a časovo náročné, poprípade málo citlivé. Mnohé práce potvrdzujú, že použitie chirálnych selektorov v molekulovej spektroskopii s viacrozmernou kalibráciou je efektívne pre stanovenie rôznych analytov v jednoduchých aj zložitých maticiacich. Výhodou tohto prístupu je jednoduchá, rýchla a cenovo dostupná chirálna analýza.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0797-11.

LITERATÚRA

- Jacques J.: *The Molecule and its Double*, McGraw-Hill, New York 1993.
- Jamali F., Mehva, R., Pasutto F. M.: *J. Pharm. Sci.* 78, 695 (1989).
- Crossley R.: *Chirality and the Biological Activity of Drug*, CRC Press, New York 1995.
- Lenz W.: *Teratology* 38, 203 (1988).
- FDA'S policy statement for the development of new stereoisomeric drugs, *Chirality* 4, 338 (1992).
- Gergely A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 4, 553 (2000).

7. Busch K. W., Busch M.: *Chiral Analysis*, Elsevier, Berlin 2006.
8. Horvát P., Gergely A., Noszál B.: *Talanta* 44, 1479 (1997).
9. Vanthuyn N., Roussel Ch., Naubron J. V., Jagorovic N., Lázaro P. M., Alkora I., Elguero J.: *Tetrahedron: Asymmetry* 22, 1120 (2011).
10. Konno K., Shinna I., Yui H.: *J. Mol. Struct.* 1035, 260 (2013).
11. Shen J., Yang J., Heyse W., Schweitzer H., Nagel N., Andert D., Zhu Ch., Morrison V., Nemeth G. A., Chen T. M., Zhao Z. Ayers T., Choi Y. M.: *J. Pharm. Anal.* 4, 197 (2014).
12. Sanmitra B. E., Anslyn V.: *Tetrahedron* 70, 1357 (2014).
13. Lindon J., Tranter G. E., Koppenaal D.: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 2. vyd., Elsevier, Berlin 2010.
14. Blajet M. Z., Boratynski P. J., Palus J., Skatzevski J.: *Tetrahedron* 69, 10223 (2013).
15. Wu L., Vogt F. G.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69, 133 (2012).
16. Wang L., Chai Y., Ni Z., Wang L., Ruilin H., Pan Y., Sun C.: *Anal. Chim. Acta* 809, 104 (2014).
17. Mohr S., Weiss J. A., Spreitz J., Schmid M. G.: *J. Chromatogr. A* 1269, 352 (2012).
18. Barba C., Toledano R. M., Santa-María G., Herraiz M., Martínez R. M.: *Talanta* 106, 97 (2013).
19. Nguyen N. V. T., Lee K. R., Lee Y. J., Choi S., Kang J. S., Mar W., Kim K. H.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 82, 151 (2013).
20. Douša M., Lehnert P., Adamusová H., Bosáková Z.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 74, 111 (2013).
21. Nishi H., Terabe S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11, 1277 (1993).
22. Neumajer G., Sohajda T., Darcsi, A., Tóth G., Szente L., Noszál B., Béne S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 62, 42 (2012).
23. Suliman F. O., Elbashir A. A.: *J. Mol. Struct.* 1019, 43 (2012).
24. Busch K. W., Swamidoss I. M., Fakayode S. O., Busch M. A. (Baylor university): *PCT Int. Appl. WO2005057191A1* (2007).
25. Busch K. W., Rabbe D. (Baylor university): *PCT Int. Appl. WO2006039648A1* (2006).
26. Busch K. W., Calleja-Amador C., Rabbe D., Busch M. A. (Baylor university): *PCT Int. Appl. WO2007044486A1* (2007).
27. Bingcheng L., Yibing J., Yuding C., Epperlein U., Koppenhoefer B.: *Chromatographia* 42, 106 (1996).
28. Koppenhoefer B., Jakob A., Zhu X., Lin B.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 23, 413 (2000).
29. Yan Y., Myrick M. L.: *Anal. Chem.* 71, 1958 (1999).
30. Yunxia W., Fang Z., Jing L., Hua L., Jilie K.: *Spectrochim. Acta, Part A* 68, 279 (2007).
31. Long J., Qiang D., Yunxia W., Hua L.: *Anal. Lett.* 46, 214 (2013).
32. Chen X., Zhu X., Jiang J.: *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 5, 731 (2011).
33. Tran C. D., Oliveira D.: *Anal. Biochem.* 356, 51 (2006).
34. Tran C. D., Oliveira D., Yu S.: *Anal. Chem.* 78, 1349 (2006).
35. Sassine A., Martins-Júnior H. A., Lebre D. T., Valli F., Pires M. A., Vega O., Felinto M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 385 (2008).
36. Waldemar I., Wzorek A.: *Mini-Rev. Org. Chem.* 6, 398 (2009).
37. Richard G. I., Marwani H. M., Jiang S., Fakayode S. O., Lowry M., Strongin R. M., Warner I. M.: *Appl. Spectrosc.* 62, 476 (2008).
38. Bodoki E., Tiuca I., Bogdan-Cezar I., Hosu O., Oprean R.: *Farmacia* 60, 62 (2012).
39. Fakayode S. O., Williams A. A., Busch M. A., Busch K. W., Warner I. M.: *J. Fluoresc.* 16, 659 (2006).
40. Williams A. A., Fakayode S. O., Alptürk O., Jones Ch. M., Lowry M., Strongin R. M., Warner I. M.: *J. Fluoresc.* 18, 285 (2008).
41. Williams A. A., Fakayode S. O., Lowry M., Warner I. M.: *Chirality* 21, 305 (2009).
42. Nitalikar M. M., Sakarkar D. M., Parag V.: *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 10, 01 (2012).
43. Fakayode S. O., Busch M. A., Bellert D. J., Busch K. W.: *Analyst* 130, 233 (2005).
44. Ingle J. R., Busch K. W., Busch M. A.: *Talanta* 75, 572 (2008).
45. Bogdan-Cezar I., Tiuca I., Bodoki E., Oprean R.: *Farmacia* 61, 56 (2013).
46. Valderrama P., Romero A. L., Imamura P. M., Magalhães I. R. S., Bonato P. S., Poppi R. J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 379, 181 (2010).
47. Afkhami A., Abbasi-Tarighat A., Bahram M.: *Talanta* 75, 91 (2008).
48. Busch K. W., Swamidoss I. M., Fakayode S. O., Busch M. A.: *Anal. Chim. Acta* 525, 53 (2004).
49. Fakayode S. O., Brady P. M., Pollard D. A., Mohammed A. K., Warner I. M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1645 (2009).
50. Fakayode S. O., Busch M. A., Busch K. W.: *Talanta* 68, 1574 (2006).
51. Fakayode S. O., Swamidoss I. M., Busch M. A., Busch K. W.: *Talanta* 65, 838 (2005).
52. Zhou L., Lin L., Welch Ch. J., Zhihong G., Ellison D.: *Chirality* 18, 306 (2006).
53. Valderrama P., Poppi R. J.: *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 106, 160 (2011).
54. Valderrama P., Poppi R. J.: *Anal. Chim. Acta* 623, 38 (2008).
55. Valderrama P., Poppi R. J.: *Anal. Chim. Acta* 651, 31 (2009).
56. Zhang X.-H., Wu H.-L., Yin X.-L., Li L.-H., Wang J.-Y., Chen Y., Kanga Ch., Yua R.-Q.: *Anal. Methods* 3, 710 (2013).
57. Qianqian L., Yue H., Jia D., Lijun W., Guo T., Yewei Z., Shungeng M.: *Spectrochim. Acta, Part A* 101, 349 (2013).

58. Qianqian L., Jia D. L., Jun W., Yue H., Guo T., Shungeng M.: *Chin. Chem. Lett.* 23, 1055 (2012).
59. Tran Ch. D., Grishko V. I., Oliveira D.: *Anal. Chem.* 75, 6455 (2003).
60. Tran Ch. D., Oliveira D., Grishko V. I.: *Anal. Biochem.* 325, 206 (2004).

R. Poláček and P. Májek (*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*): **Chiral Selector as a Tool for Determination of Enantiomeric Ratio in Mixture by Molecular Spectroscopy with Multivariate Calibration**

This review provides brief information on using the chiral selector in a new approach to chiral analysis, that is, a combination of molecular spectroscopy with multivariate calibration. This new approach provides a more rapid, more sensitive and cheaper chiral analysis of many compounds, as compared to the traditional chiral methods. The interaction between the chiral selector and the enantiomers forms a diastereomeric complex, which causes the occurrence of the spectral shifts. These shifts are small and they must be evaluated by multivariate calibration.