دانشگاه محقق اردبیلی

دانشکده علوم

عنوان طرح:

جداسازی ایزومرهای نوری آتنولول با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) از طریق یک روش جدید بر پایه تکنیک تعویض لیگاند کایرال

مجري:

طاهر علیزاده

خرداد 92

چکیده

در این کار یک روش کروماتوگرافی برای جداسازی انانتیومرهای آتنولول بر پایه روش تعویض لیگاند کایرال توسعه یافت. عمل جداسازی بر روی ستون C_8 انجام گرفت. S-آلانین و Cu^{2+} به ترتیب به عنوان عامل کایرال گزین و یون کمپلکس کننده انتخاب شدند. مشاهده شد که نوع نمک مس تاثیر بسیار تعیین کننده ای در جداسازی کایرال مد نظر دارد. همچنین مشاهد شد که فرایند جداسازی در روی ستون C_8 بسیار موثر تر از جداسازی در ستون C_{18} می باشد. تاثیر پارامتر های مختلف بر فرایند جداسازی مانند pH فاز حامل، اصلاح کننده آلی موجود در فاز حامل، نسبت مولی لیگاند کایرال به یون مس و غلظت $Cu((S)\text{-alanine})_2$ مورد بررسی قرار گرفته و مقادیر بهینه برای آنها تعیین گردیدند. محلولی از آب-متانول (با نسبت 70:30) شامل یون مس و S-آلانین (با نسبت2:1) به عنوان یک ترکیب بهینه برای جداسازی ایزومر های نوری آتنولول شناخته شد. غلظت کمپلکس $Cu((S)\text{-alanine})_2$ در فاز حامل کارایی جداسازی و همچنین حساسیت آشکارسازی آتنولول را تحت تاثیر قرار می داد. روش جداسازی توسعه یافته برای آنالیز ایزومر های نوی آتنولول در چندین نمونه سنتزی مورد استفاده قرار گرفته و کارایی روش مورد تایید قرار گرفت.

بخش اول

مقدمه

1-مقدمه

تاکنون گزارش های متعددی در رابطه با تفاوت قابل ملاحظه در اثرات دارویی ایزومر های نوری بسیاری از داروها ارائه شده است. برای بسیاری از داروهای در دسترس فقط یکی از ایزومر های نوری آن خواص دارویی مد نظر را دارا بوده و ایزومر دیگر یا اثر دارویی نداشته و یا مسئول اثرات جانبی داروی مد نظر می باشد.این یافته ها اهمیت جداسازی ایزومرهای نوری داروها را نشان می دهد[7-1].

آتنولول متعلق به گروه شناخته شده ای از داروه های بسیار معروف به نام بتا-بلوکرها یا سد کننده های بتا (β-blockers)می باشد که برای کنترل بیماری های فشار خون و بیماری های قلبی و غیره مورد استفاده قرار می گیرد. در گیرنده های بتا مانند آتنولول ایزومر S- بیشترین توانایی برای اتصال به گیرنده های بتا را داشته و در مقابل ایزومر R- فاقد چنین توانایی می باشد. این به این معنی است که خواص دارویی این ترکیب مربوط به ایزومر نوع S- بوده و ایزومر R فاقد خاصت دارویی آتنولول می باشد. این موارد ذکر شده اهمیت جداسازی ایزومر های نوری آتنولول را مشخص تر می کند[8,9].

جداسازی HPLC ایزومرهای نوری آتنولول معمولا از طریق ستون ها کایرال مانند کایروبیوتیک (chirobiotic V)[10] و کایروبیوتیک T (Chirobiotic T) [11,12] انجام می گیرد. لیکن باید توجه داشت که ستون های کایرال معمولا گران قیمت بوده و برای انجام آنالیز با آنها نیاز به استفاده از حجم بالایی از حلال های گران قیمت می باشد. از طرف دیگر جداسازی ایزومر های نوری آتنولول با استفاده از روش غیر مستقیم (مشتق سازی دیاستریومری)واز طریق HPLC فاز معکوس نیازمنداجرای یک واکنش مشتق سازی است که معمولا کار وقت گیری بوده و نیازمند کنترل دقیق شرایط واکنش می باشد[19-12].

از کروماتوگرافی لایه نازک TLC نیز برای جداسازی ایزومر های نوری آتنولول استفاده شده است[20,21].

کروماتوگرافی کایرال گزین تعویض لیگاند که برای اولین بار توسط داوانکوو و همکاران ایشان پیشنهاد گردید [22] یک روش کروماتوگرافی مایع می باشد که توانسته امکان جداسازی کامل و ساده ی استروایزومرهای بسیاری از کلاس ترکیبات سنتزی و طبیعی مانند آمینو الکل ها، هیدروکسی اسید ها و برخی دیگر را فراهم آورد[23]. این روش معمولا در سه حالت کلی قابل اجرا می باشد. در روش اول گزینشگر کایرال مستقیما از طریق پیوند کوالانسی به فاز ساکن متصل می شود[24,25]. در روش دوم ستون های تعویض لیگاند کایرال به راحتی از ستون های فاز معکوس تجاری مرسوم تهیه می شوند. در این روش یک عامل گزینشگر کایرال هیدروفوب به طور دینامیکی در سطح فاز ساکن پوشش داده می شود[26,27]. در روش سوم گزینشگر کایرال مورد نظر در فاز حامل حفظ می شود. در این حالت ترکیب کمپلکس حاوی گزینشگر کایرال به طور پیوسته در داخل ستون مورد نظر و در نتیجه بر روی فاز ساکن روان می شود. در این متد آنالیت های مورد نظر در چنین فاز حامل کایرالی کمپلکس هایی با مشارکت عامل کایرال گزین ایجاد می کنند که دیاستریومر همدیگر می باشند. چنین کمپلکس هایی که دیاستریومر همدیگر می باشند برهمکنش های متفاوتی که با فاز ساکن در ستون برقرار می کنند و در نتیجه به طور متفاوت بازداری می شوند[28,29]. برتری مشخص این روش آن است که تعداد زیادی عامل کایرال گزین برای آنالیت های مورد نظر می توانند مورد آزمایش قرار گیرند. همچنین مقدار بسیار اندکی از عامل کایرال گزین برای استفاده در این روش به منظور افزودن در فاز حامل مورد نیاز است [30].

مکانیسم جداسازی در این روش بستگی به آن دارد که عامل کایرال گزین یا لیگاند کایرال مستقیما به فاز ساکن متصل شده باشد یا اینکه به فاز حامل به عنوان دوپ کنند اضافه شده باشد. زمانی که لیگاند کایرال مستقیما به فاز ساکن متصل می شود می تواند با آنانتیومر های مختلف از یک ترکیب کمپلکس هایی با پایداری های متفاوت برقرار کند که این پدیده موجب جداسازی راسماتها می شود. لیکن وقتی که لیگاند کایرال گزین به فاز حامل اضافه می شود مکانیسم جداسازی بسیار پیچیده می گردد. در این حالت تعداد زیادی از تعادل های تشکیل کمپلکس که همزمان در فاز ساکن و فاز حامل رخ می دهند در فرایند جداسازی مداخله می کنندد. همچنین تعادل های توزیع گونه های دیاستریومری متفاوت بین فاز ساکن و فاز حامل نیز نقش فعالی در جداسازی خواهد داشت [29]. در مورد کاتیون های دو دندانه نقش توزیع متفاوت دیاستریومرهای مورد نظر از آنالیت در فاز ساکن نسبت به تاثیر تعادل های تشکیل کمپلکس در فاز حامل از اهمیت بیشتری برخوردار است. در مورد لیگاندها یا گزینشگر های کایرال سه دندانه مکانیسم های دیگری پیشنهاد گردیده است [31,32,29]. در مقالات مختلف بر این نکته تاکید شده است که جداسازی مستقیم آمینو الکل هایی مانند آتنولول با روش تعویض لیگاند کایرال از طریق کروماتوگرافی مایع در عمل مشکل می باشد زیرا pH بهینه برای ایجاد کمپلکس بین آمینوالکل، یون مس و لیگاند های کایرال گزین در منطقه قلیایی قرار دارد که در این شرایط معمولا ساپرت های سیلیکای فازهای ساکن مرسوم تخریب می گردد. به همین دلیل برای جداسازی انانتیومری ترکیبی مانند آتنولول از روش هایی مانند الکتروفورز کاپیلاری با تعویض لیگاند کایرال یا روش کروماتوگرافی الکتروکاینتیک مایسلی استفاده شده است [33,34].

تا آنجایی که ما می دانیم این اولین گزارش در رابطه با جداسازی ایزومر های نوری آتنولول از طریق روش کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال با استفاده از عامل کایرال گزین S-آلانین به

عنوان عامه دوپه کننده می باشد. در این کار S-آلانین به عنوان یک گزینشگر کایرال ارزانی که به سادگی در دسترس قرار داشته و نیازی به مشتق سازی ندارد مورد استفاده قرار گرفت. مشاهده گردید که به کارگیری فاز ساکن C_8 برای جداسازی مناسب انانتیومرهای آتنولول ضروری می باشد. همچنین در نتیجه این کار اهمیت نوع نمک مورد استفاده از یون مس در جداسازی انانتیومرهای آتنولول مشخص گردید

بخش دوم

تجربی

2- مواد شیمیایی و دستگاهها

آتنولول راسمیک، S-آتنولول و R-آتنولول از شرکت شیمیایی سیگما-آلدریچ (Sigma-Aldrich) تهیه شد. S-آلانین، استات مس ($Cu(CH3COO)_2.H_2O$)،نیترات مس ($Cu(NO_3)_2.3H_2O$)، سولفات مس ($Cu(SO_4)_2.5H_2O$)، کلرید مس ($Cu(Cl)_2.2H_2O$) و متانول از شرکت شیمیایی مرک (Merck) خریداری شد. جداسازی های کروماتوگرافی با استفاده از دستگاه HPLC سیسیل (Cecil) مدل 1100 مجهز به ستون های با مشخصات : (250mm × 4.6mm I.D., particle size 10 µm, HiCHROM) پر شده با LiChrosorb RP8 و LiChrosorb RP18 انجام گرفت. آشکارسازی گونه های خارج شده از ستون با دتکتور UV انجام گرفت. فاز حامل استفاده شده مخلوطی از متانول-آب شامل نمک های مس و S-آلانین (pH= 4.5) بود. حجم تزریق برابر با 15 میکرولیتر برای آنالیز های کروماتوگرافی مورد استفاده قرار گرفت.

بخش سوم

نتایج و بحث

3- نتایج و بحث

3-1 مکانیسم تعویض لیگاند کایرال و جداسازی انانتیومری

اساس کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال بر مبنای تشکیل کمپلکس های فلزی سه تایی دیاستریومری بین لیگاند گزینشگر کایرال و آنالیت مورد نظر می باشد. یک پیش نیاز برای جداسازی انانتیومری موفق وجود گروه های عاملی مشخصی مانند آمینو، هیدروکسی یا کربوکسی در ساختار شیمیایی گزینشگر و آنالیت می باشد[30]. در مورد آتنولول حداقل دو گروه عاملی شامل هیدروکسی و آمینو در ساختار شیمیایی مولکول حضور دارند که قادرند با یک یون فلزی مناسب برهمکنش کئوردینانسی برقرار نمایند. از طرف دیگر S -آلانین به عنوان یک گزینشگر کایرال که در این کار انتخاب شده بود، دارای گروه های کربوکسیلیک و آمینو می باشد که آنها نیز قادر به برقراری پیوند کئوردینانسی با یون فلزی مورد نظر می باشند. معادلات شماره (1) و (2) واکنش های شیمیایی مد نظر را که منجر به ایجاد کمپلکس های سه تایی دیاستریومری می شود به نمایش می گذارند.

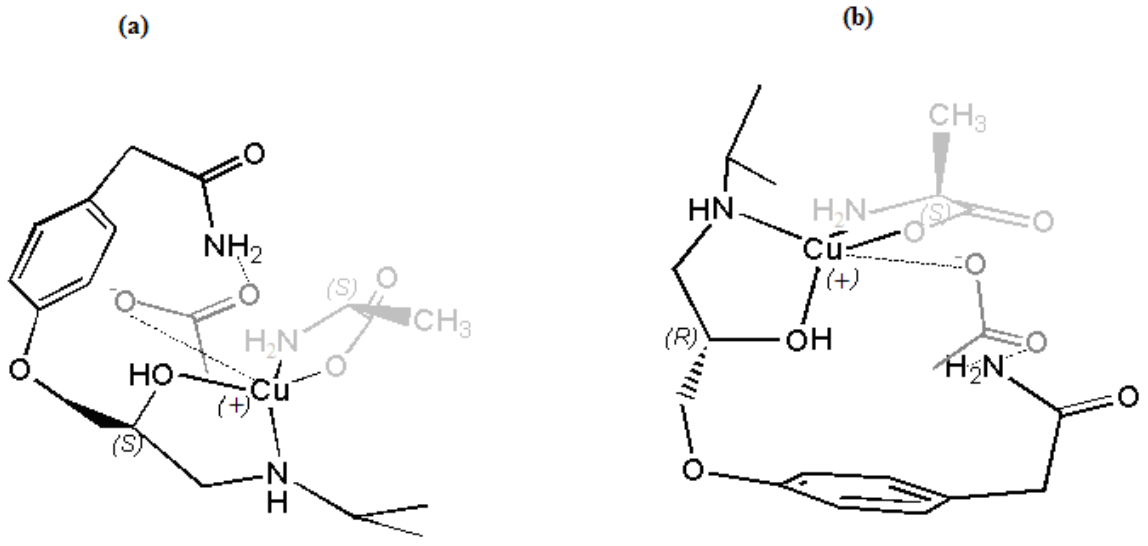
$$\text{Cu((S)-alanine)2} + \text{(S)-ATN} \rightleftharpoons \text{[Cu((S)-alanine)((S)-ATN)]} + \text{(S)-alanine} \qquad (1)$$

$$\text{Cu((S)-alanine)2} + \text{(R)-ATN} \rightleftharpoons \text{[Cu((S)-alanine)((R)-ATN)]} + \text{(S)-alanine} \qquad (2)$$

ما در این کار متوجه شدیم که شستشوی آتنولول از میان یک ستون فاز معکوس مانند C_8 با استفاده از فاز حامل شامل متانول-آب (85:15) که دارای S-آلانین و یون مس می باشد، منجر به

ظهور دو پیک کروماتوگرافی می شود.ارزیابی های بیشتر نشان داد که که پیک های ملاحظه شده به ترتیب مربوط به S-آتنولول و R-آتنولول می باشند. انانتیومر گزینی در فرایند تشکیل کمپلکس سه تایی مانند تفاوت در پایداری های ترمودینامیکی دو ساختار دیاستریومری شامل انانتیومر های S-آتنولول و R-آتنولول به عنوان یک پارامتر مهم در جداسازی انانتیومری شناخته شده است [23,30]. به هر حال، زمانی که گزینشگر کایرال به طور پیوسته در داخل فاز حامل وارد می شود (شبیه روش به کار رفته در این کار)، فاکتور مهم موثر در مکانیسم فرایند جداسازی را به تفاوت در تمایل کمپلکس های دیاستریومری سه تایی نسبت به فاز ساکن می باشد که در این تمایل برهمکنش چربی دوستی گزینشگر کایرال نقش اساسی دارد[35]. دراین مطالعه آنانتیومر R-آتنولول قبل از انانتیومر S-آتنولول شسته شده و از ستون خارج گردید. ماهیت پیک های خارج شده با تزریق انانتیومر های خالص از S-آتنولول و R-آتنولول به دستگاه کروماتوگرافی و دنبال کردن زمان خروج پیک های کروماتوگرافی مربوطه، مشخص گردید. کمپلکس های دیاستریومری بسته به ساختار فضایی کمپلکس سه تایی مربوطه، دارای توانایی برهمکنش های هیدروفوبیک متفاوت می باشند. اشکال شماتیک از کمپلکس های دیاستریومریک تشکیل یافته بین آنانتیومرهای آتنولول و لیگاند کایرال گزین S-آلانین با یون مس در شکل (1) آورده شده است. همانگونه که مشاهده می شود زنجیره های جانبی S-آتنولول و S-آلانین در مورد کمپلکس شبه-هموکایرال (pseudo-homochiral) در فضا در جهت یکسان قرار می گیرند. این در حالی است که در کمپلکس موسوم به شبه-هتروکایرال (pseudo-heterochiral) زنجیره های جانبی R-آتنولول و S-آلانین درفضا در دو جهت مختلف قرار می گیرند. این پدیده باعث می شود که برهمکنش های هیدروفوبیک قویتری بین کمپلکس شبه-هموکایرال و فاز ساکن غیر قطبی مانند C_8 or C_{18} بوجود آید. این عمل به نوبه خود موجب می شود که زمان بازداری S-آتنولول در

ستون های یاد شده نسبت به R-آتنولول بیشتر شده و در نتیجه پیک کروماتوگرافی ایزومر S-آتنولول دیرتراز ستون خارج شود.



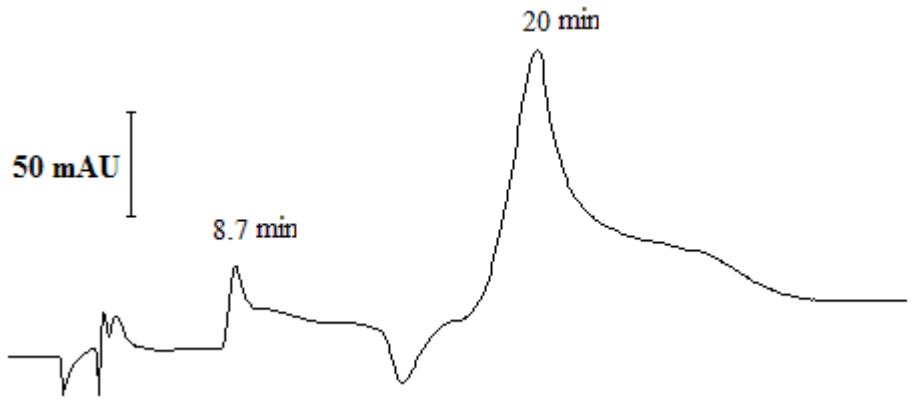
شکل (1) اشکال شماتیک مربوط به کمپلکس های دیاستریومریک تشکیل یافته بین آنانتیومرهای آتنولول و لیگاند کایرال گزین S-آلانین با یون مس

3-2 تاثیر نوع نمک مس (II) در کارایی جداسازی کایرال ایزومرهای نوری آتنولول

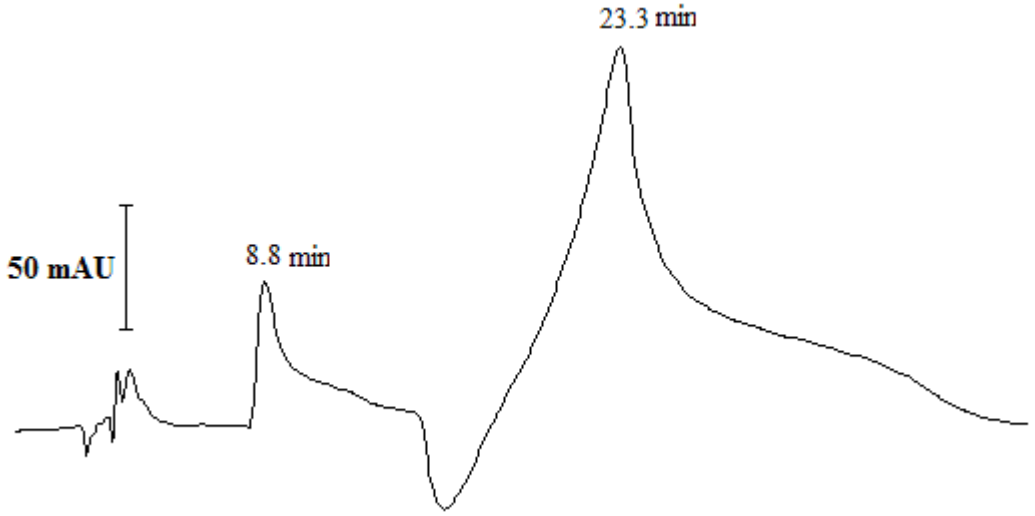
در این کار ملاحظه شد که نوع نمک مس مورد استفاده در فاز حامل به شدت بر روی کارایی جداسازی انانتیومری آتنولولول با روش تعویض لیگاند کایرال تاثیر دارد. این پدیده در مورد جداسازی انانتیومری آمینو اسیدها با روش کروماتوگرافی تعویض لیگاند نیز قبلا گزارش گردیده

بود[36-38]. مشاهد شد که تنها در صورت استفاده از استات مس به عنوان نمک مس امکان جداسازی انانتیومری برای آتنولول وجود دارد و زمانی که از نمک های دیگر مس مانند نیترات، کلرید و سولفات استفاده شد جداسازی ایزومرهای نوری آتنولول با روش کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال حاصل نگردید. در شکل (2)، (3) و (4) کروماتوگرام های بدست آمده از جداسازی انانتیومری آتنولول از طریق تکنیک کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال با استفاده از سه نوع نمک سولفات مس، نیترات مس و استات مس نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می شود تنها استفاده از نمک استات مس منجر به جداسازی انانتیومری آتنولول شده است و در دو مورد دیگر یعنی استفاده از سولفات مس و نیترات مس جداسازی مناسب اتفاق نیفتاده است.

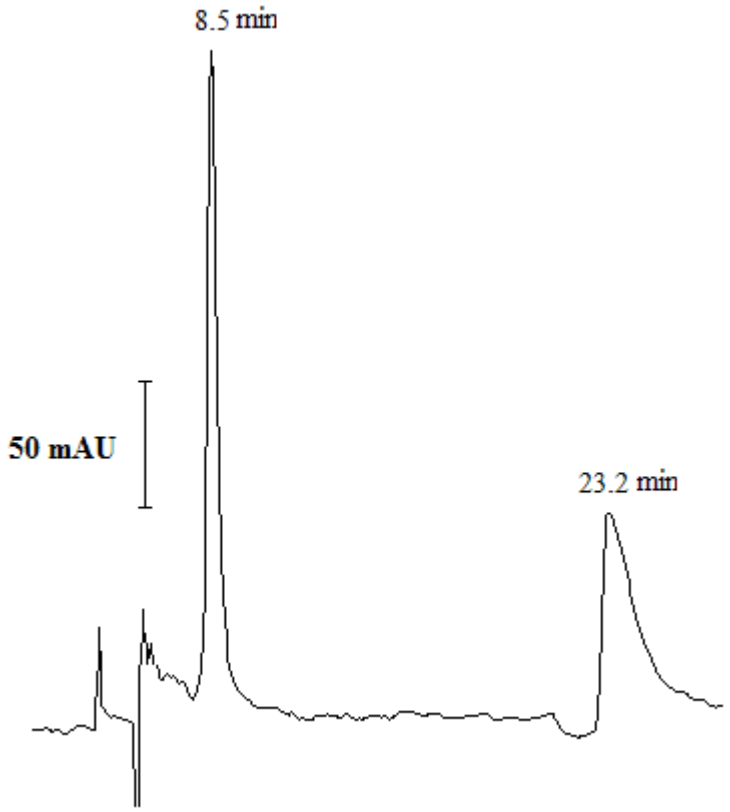
از دیدگاه سینتیکی، جداسازی انانتیومری دو ایزومر نوری با روش کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال وابسته به سرعت حصول تعادل ایجاد کمپلکس های دیاستریومری مد نظر از دو ایزومر نوری در بین دو فاز کروماتوگرافی می باشد. از طرف دیگر نوع آنیون همراه یون فلزی در سرعت انتقال جرم تاثیر دارد بنابراین حدس زده می شود که نوع آنیون همراه یون مس در فرایند تشکیل کمپلکس های دیاستریومری شامل انانتیومرهای آتنولول و S-آلانین دخالت دارد. این بدان معنی است که آنیون همراه یون مس به عنوان یک رقیب برای آنالیت در پروسه تشکیل کمپلکس عمل کرده و در نتیجه بر جداسازی کروماتوگرافی آنالیت در ستون کروماتوگرافی موثر است [37]. همچنین ثابت شده ست که شدت رقابت اشاره شده به خواص فیریکو-شیمیایی آنالیت مد نظر وابسته است.



شکل (2) جداسازی ایزومرهای نوری آتنولول از طریق روش کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال با استفاده از نمک سولفات مس به عنوان یون مرکزی کمپلکس دهنده



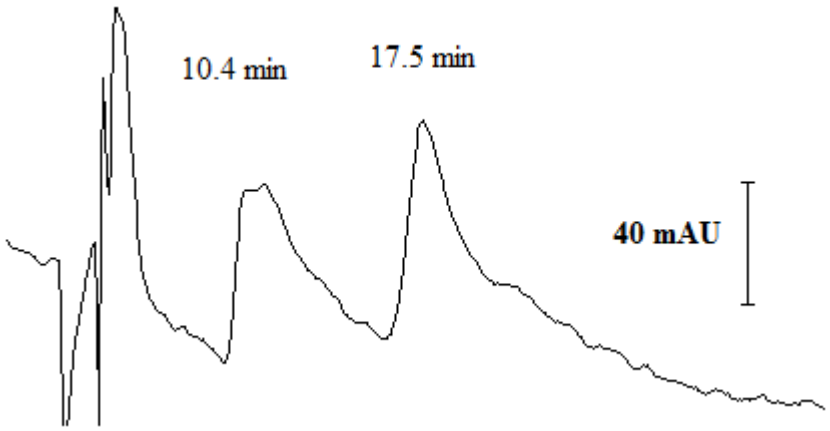
شکل (3) جداسازی ایزومرهای نوری آتنولول از طریق روش کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال با استفاده از نمک نیترات مس به عنوان یون مرکزی کمپلکس دهنده



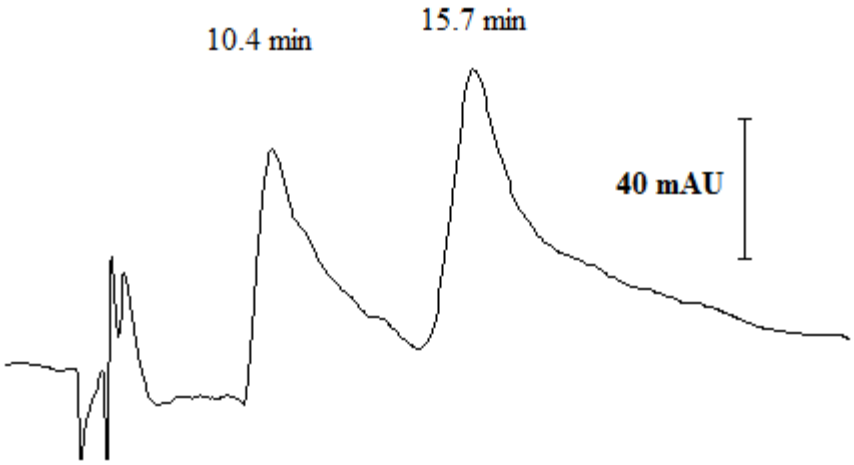
شکل (4) جداسازی ایزومرهای نوری آتنولول از طریق روش کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال با استفاده از نمک استات مس به عنوان یون مرکزی کمپلکس دهنده

به عنوان یک شاهد و تایید برای این اظهار نظر در مورد پروپرانولول به عنوان یکی دیگر از اعضای سد کننده های بتا(B-blockers) مشاهده شد که استفاده از استات مس منجر به حصول جداسازی ایزومر های نوری نمی شود. این در حالی است که در این مورد استفاده از نیترات مس و سولفات مس برعکس آتنولول، منجر به جداسازی انانتیومری پروپرانولول می شود. شکل (5)، (6) و (7) نتایج مربوط به جداسازی پروپرانولول از طریق سه نوع نمک مس شامل سولفات،

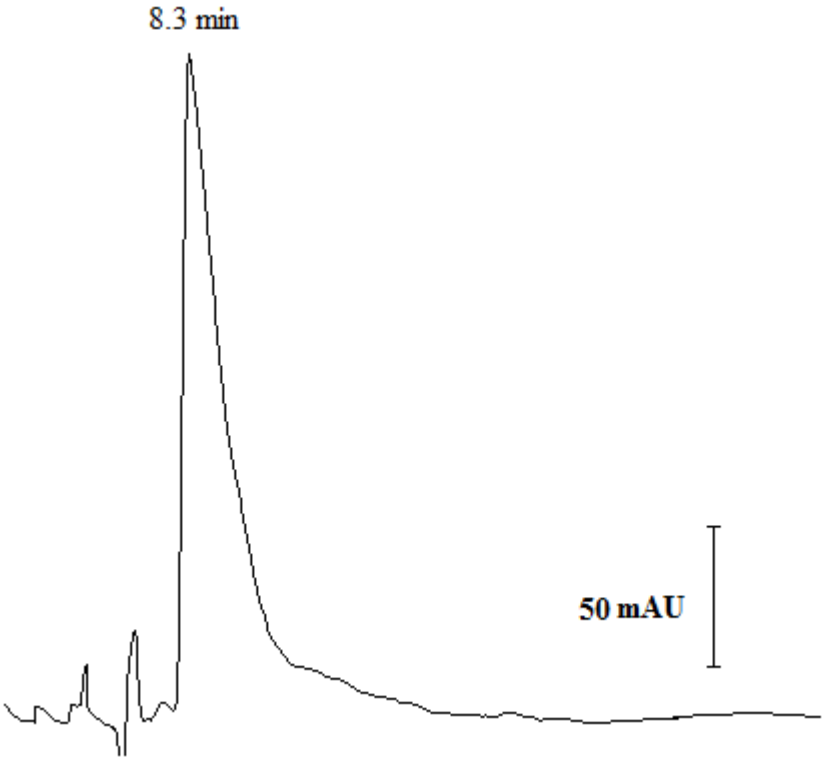
نیترات و استات را نشان می دهد. همانگونه که مشاهده می شود در مورد استات مس جداسازی انانتیومری مشاهده نمی شود. درصورتی که در مورد نمک های نیترات مس و سولفات مس جداسازی انانتیومری برای پروپرانولول اتفاق می افتد.



شکل (5) جداسازی ایزومرهای نوریپروپرانولول از طریق روش کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال با استفاده از نمک سولفات مس به عنوان یون مرکزی کمپلکس دهنده



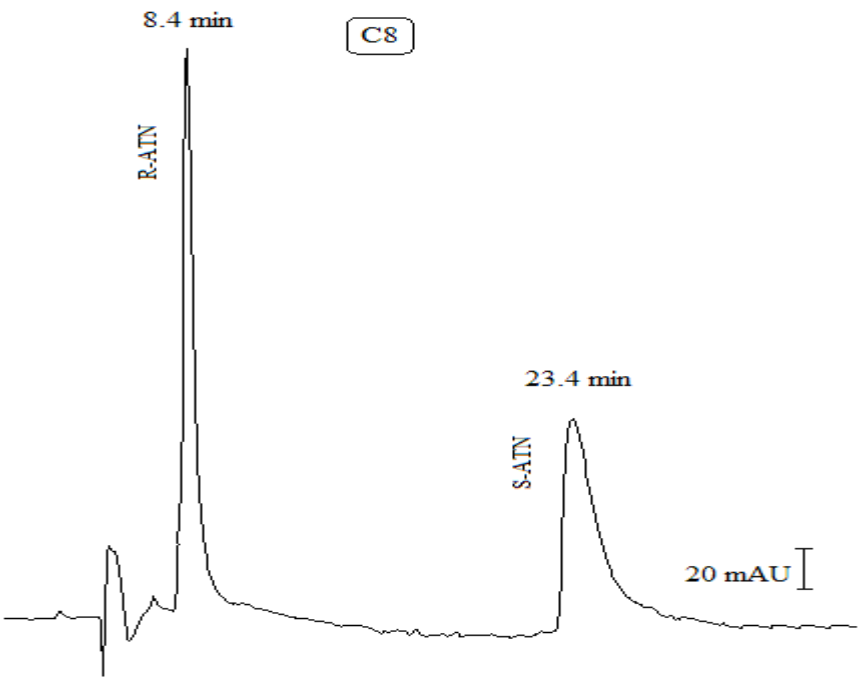
شکل (6) جداسازی ایزومرهای نوری پروپرانولول از طریق روش کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال با استفاده از نمک نیترات مس به عنوان یون مرکزی کمپلکس دهنده



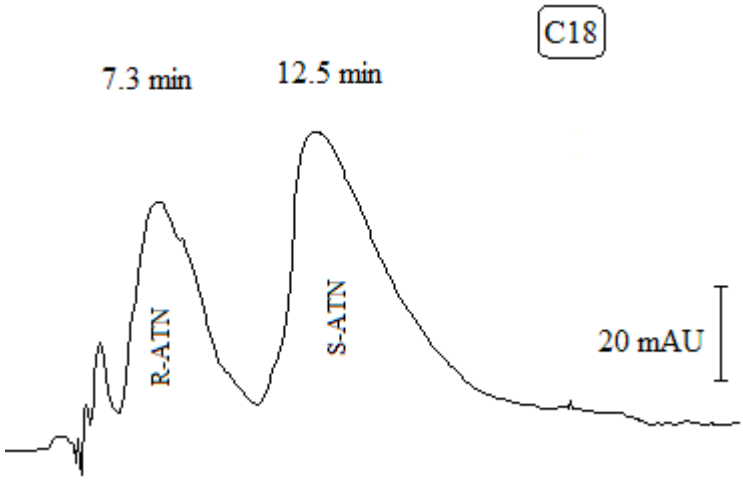
شکل (7) جداسازی ایزومرهای نوری پروپرانولول از طریق روش کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال با استفاده از نمک استات مس به عنوان یون مرکزی کمپلکس دهنده

3-3 تاثیر نوع ستون بر جداسازی ایزومرهای نوری آتنولول

تاثیر نوع فاز ساکن در کارایی جداسازی انانتیومری آتنولول در شکل (8) و شکل (9) به نمایش گذاشته شده است. همانگونه که ملاحظه می شود نوع فاز ساکن کاملا در جداسازی انانتیومری آتنولول با روش تعویض لیگاند کایرال موثر است. می توان مشاهده نمود که جداسازی ایزومرهای نوری آتنولول در ستون C_8 از کارایی بهتری نسبت به ستون C_{18} برخوردار است. این نکته از این نظر قابل تامل است که نوع برهمکنش های حاکم در هر دونوع فاز ساکن مذکور دارای ماهیت یکسان هیدروفوبیک و غیر قطبی می باشند. دلیل این پدیده را می توان به حضور با شدت زیاد برهمکنش های غیر قطبی با ماهیت غیر گزینش پذیر در ستون C_{18} با آتنولول آزاد نسبت داد که نتیجه نهایی آن کاهش قابل ملاحظه در کارایی جداسازی انانتیومری آتنولول در ستون C_{18} نسبت به ستون C_8 می باشد.



شکل (8) جداسازی انانتیومری آتنولول با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال با استفاده از فاز ساکن C_8



شکل (9) جداسازی انانتیومری آتنولول با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض لیگاند کایرال با استفاده از فاز ساکن C_{18}

3-4 تاثیر اصلاح کننده آلی مورد استفاده (متانول) و pH فاز حامل بر کارایی جداسازی انانتیومری آتنولول

مشاهده گردید که حضور حلال آلی در ترکیب فاز حامل به طور قابل توجهی برای موفقیت آمیز بودن کارایی جداسازی در زمان قابل قبول مهم می باشد. بدون حضور اصلاح کننده آلی در ترکیب فاز حامل امکان جداسازی ایزومرهای نوری آتنولول باز هم موجود بود ولی در این حالت جداسازی ایزومرهای نوری در زمان های بسیار طولانی امکان پذیر بود. بعلاوه در صورت عدم استفاده از حلال آلی در ترکیب فاز حامل پیک های کروماتوگرافی بدست آمده به طور قابل توجهی پهن می گردید که برای جداسازی های کروماتوگرافی مناسب نیست. مشاهده شد که با استفاده از استونیتریل و تتراهیدروفوران جداسازی انانتیومری آتنولول به طور موثر بدست نیامد. به هر حال با اضافه کردن متانول به عنوان اصلاحگر آلی در فاز حامل مورد استفاده، جداسازی انانتیومری مناسبی حاصل شد. همچنین افزایش مقدار اصلاحگر آلی در فاز حامل موجب کاهش زمان بازداری دو نوع ایزومر نوری آتنولول گردید. لیکن تاثیر ذکر شده بر زمان بازداری پیک کروماتوگرافی S-آتنولول بسیار بیشتر از تاثیر آن بر زمان بازداری پیک کروماتوگرافی R-آتنولول بود. این به معنی افزایش ضریب گزینش پذیری کروماتوگرافی با افزایش مقدار متانول در ترکیب فاز حامل می باشد. این پدیده ی مشاهده شده منطقی به نظر می رسد. چون برهمکنش کمپلکس سه تایی مس-S-آلانین-S-آتنولول با فاز ساکن بیشتر از کمپلکس دیاستریومری رقیب دیگر یعنی کمپلکس سه تایی مس-S-آلانین-R-آتنولول می باشد. زمانی که مقدار متانول موجود در فاز حامل در حدود 13% تنظیم گردید زمان بازداری مشاهده شده برای S-آتنولول بیشتر از 60 دقیقه شد که زمان بسیار طولانی می باشد. از طرف دیگر باافزایش مقدار متانول تا حدود 50

Abstract

A new chromatographic procedure was developed for the separation of atenolol (ATN) enantiomers based upon chiral ligand-exchange principal. The separation was carried out on a C_8 column. (S)-alanine and Cu^{2+} were applied as chiral selector and central bivalent complexing ion, respectively. It was found that the kind of copper salt had vital effect on the enantioseparation. The separation on the C_8 stationary phase was more efficient than that on the C_{18} column. Different parameters such as mobile phase pH, organic modifier percent in the mobile phase, the mole ratio of chiral ligand to bivalent ion mole and Cu((S)-alanine)$_2$ concentration in the mobile phase was found to be important in enantiomers resolution efficiency. Water/methanol (70:30) mixture containing (S)-alanine-Cu^{2+} (2:1) was found to be the best mobile phase condition for ATN enantioseparation. The concentration of Cu((S)-alanine)$_2$ complex in the mobile phase influenced either enantiomers resolution efficiency or the detection sensitivity. All effective parameters were optimized in order to satisfy both detection sensitivity of the method and it's separation efficiency. The optimized HPLC method was utilized in some synthetic samples, prepared with ATN enantiomers with different ratios.