

PhD értekezés tézisei

***N*-Fmoc védett α -aminosavak elválasztása folyadék és
szuperkritikus fluid kromatográfiás úton Cinchona alkaloid alapú
királis állófázisokon**

Lajkó Gyula

Témavezetők:

Prof. Dr. Fülöp Ferenc

Prof. Dr. Péter Antal

Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszerkémiai Intézet

2020

**Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

Gyógyszerkémia, Gyógyszerkutatás PhD program

Programvezető: Prof. Dr. Fülöp Ferenc

Prof. Dr. Péter Antal

Lajkó Gyula

**Liquid and supercritical fluid chromatographic enantioseparation of N^α -
Fmoc proteinogenic amino acids on *Cinchona* alkaloid-based chiral
stationary phases**

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Dombi György

Tagok: Prof. Dr. Janáky Tamás

Prof. Dr. Tóth Géza

Bíráló Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Báthori Mária

Opponensek: Prof. Dr. Péter Mária

Prof. Dr. Hunyadi Attila

Tagok: Dr. Lázár László

Dr. Sztojkov-Ivanov Anita

Bevezetés

Széles körben elfogadott tény, hogy a kiralitás univerzális és hogy a molekuláris szintű kiralitás alapvető szerepet játszik a biológiai rendszerekben. Ezzel összefüggésben a proteinek, peptidek, esszenciális aminosavak (kivéve a glicin), szacharidok, enzimek és számos metabolit királis formában van jelen az élő szervezetben. Királis körülmények között (pl. az élő szervezetben) az enantiomerek különböző módon viselkedhetnek, eltérhetnek jellegükben, biológiai hatásukban, felhasználásukban, eloszlásukban, metabolizmusukban, stb. Jól ismert, hogy a farmakológiai hatás többnyire csak az egyik enantiomerre (eutomer) korlátozódik. Az inaktív enantiomer (disztomer) számos esetben valamilyen nem kívánt mellékhatást, sőt toxikus hatást is kiválthat. Még ha a mellékhatások nem is drasztikusak, az inaktív enantiomert metabolizálnia kell a szervezetnek, ami felesleges terhelést jelent. Erre egy példa a talidomid, melyet nyugtató és fájdalomcsillapítónak vezettek be az 1950-es években. Egy másik példa az amfetamin, ahol az *S*-(+)-izomer hatásosabb a központi idegrendszer stimulációjában, mint az *R*-(-)-amfetamin, amely hatékonyabb a környéki idegrendszer, például a kardiovaszkuláris rendszer befolyásolásában. Ezért a tiszta, farmakológiailag aktív enantiomerek megléte rendkívül fontos. Manapság az európai (EMA), az USA (FDA) és Japán (PMDA) gyógyszerfelügyeleti hatóságok szigorúan szabályozzák a királis gyógyszerhatóanyagok kereskedelmét. Enantioszelektív azonosítást és mennyiségi meghatározási módszereket kell kidolgozni minden egyes királis tulajdonsággal rendelkező hatóanyagra. Ezen kívül a farmakokinetikai és toxikológiai vizsgálatokat mindkét enantiomer és a racém keverékre is el kell végezni. Ezen megfontolások alapján kiemelkedő figyelmet kell fordítani a kiralitáshoz kapcsolódó jelenségekre, például a biológiailag aktív királis gyógyszerkészítmények fejlesztésekor. Az enantiomerek kromatográfiás úton történő elválasztása nagy kihívás, és a hagyományos akirális elválasztási stratégiák az enantiomerekre alkalmazva nem hatékonyak. A kromatográfiás módszerek közül legnépszerűbbek a gázkromatográfia (GC), a vékonyréteg-kromatográfiát (TLC), a kapilláris elektroforézis (CE), a kapilláris elektro-kromatográfia (CEC), a szuperkritikus folyadékkromatográfia (SFC) és a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC). A 70-es évek közepétől a királis technológiák szerepe megnőtt, ideértve a sztereokontrollált szintézist és az enantioszelektív elválasztási módszereket. Manapság pedig az SFC vált a HPLC alternatívájává a rutin elválasztási módszereket terén, mivel számos előnyt kínál a HPLC-hez képest, ideértve a jobb felbontást, a gyorsabb elválasztást és a nagyobb áteresztőképességet. Ezek az előnyök a szuperkritikus állapotban lévő folyadéknak tulajdonítható, amelyet „zöld” mozgó fázisnak tekinthető az alacsony környezeti

hatása, kis előállítási költsége, valamint csökkenti a toxikus oldószerek és adalékok mennyiségét. A szerves oldószerek felhasználásának csökkenése pedig költség-, egészség- és biztonsági előnyöket jelent, valamint a minták gyorsabb és tisztább visszanyerését eredményezi az eljárás során. Ezen kívül az SFC alkalmas nem poláros gyógyszerkészítmények vizsgálatára is.

Célkitűzés

Munkám során célul tűztem ki 19 *N*-Fmoc-védett α -aminosav enantiomereinek elválasztását királis kromatográfias módszerek segítségével *Cinkóna* alkaloid alapú ikerionos, és anioncserélő királis állófázisokon (CSPs). Az elválasztáshoz két különböző kromatográfias technikát alkalmaztam. Az egyik a közismert nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias (HPLC) módszer, amely egyszerű és hatékony, széles körben alkalmazott módszer. A másik elválasztási módszer, ami mozgó fázis fő komponenseként szuperkritikus állapotú folyadékot használ a szupekritikus fluidkromatográfia (SFC). A mozgó fázis anyagi minőségének, összetételének és víztartalmának hatásán, az eluenshez adagolt sav és bázismódosítók minőségének és koncentrációjának hatásán valamint a hőmérséklet kromatográfias paraméterekre gyakorolt hatásán keresztül vizsgáltuk az elválasztást *Cinkóna* alkaloid alapú királis állófázisokon.

Kísérleti rész

Alkalmazott műszerek

A vizsgálatokat két különböző HPLC rendszeren és egy SFC rendszeren végeztük.

I. Rendszer: Waters 1525 bináris HPLC pumpát, Waters 2487 kétcsatornás UV-VIS detektort, 717 plus automata mintaadagolót és Empower 2 adatfeldolgozó szoftvert tartalmazott (Waters, Milford, MA, USA).

II. Rendszer: 1100 Agilent Technologies (Waldbronn, Németország) HPLC rendszer, mely tartalmazott gázmentesítőt, pumpát, automata mintaadagolót, kolonna termosztátot, többszatornás UV-Vis detektort és ESA Biosciences Inc. koronakisülési detektort (Chelmsford, MA, USA). Az adatok gyűjtéséhez és kiértékeléséhez ChemStation adatfeldolgozó szoftvert használtunk.

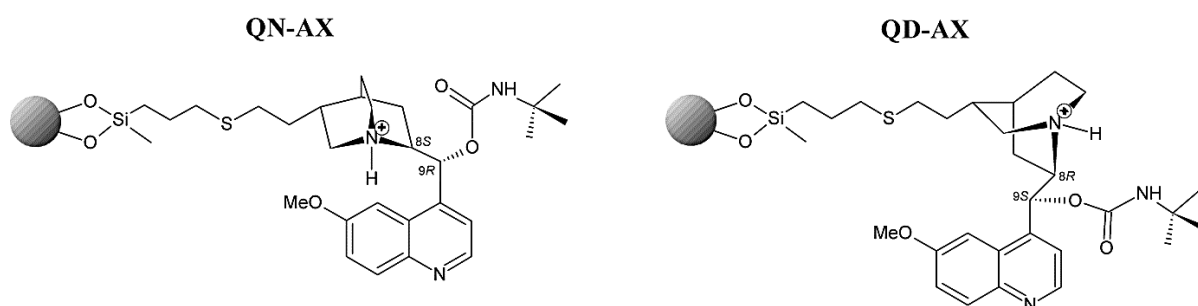
Mindkét kromatográfias rendszer Rheodyne 7125 20 μ l-es mintaadagolóval volt ellátva (Cotati, CA, USA). A kolonnák termosztálása egy Spark Mistral (Spark Holland, Emmen, Hollandia)

és egy Lauda Alpha RA8 (Lauda Dr. R. Wobser GmbH, Lauda-Königshofen, Németország) oszloptermosztátot használtunk. A hőmérséklet beállításának pontossága ± 0.1 °C volt.

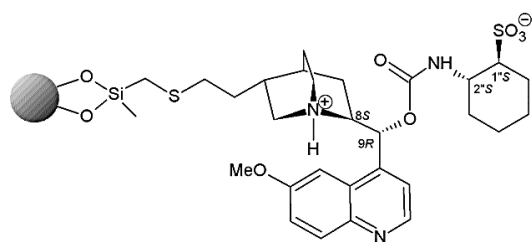
III. Rendszer: A Waters Acquity Ultra Performance Convergence Chromatography™ (UPC², Waters, Milford, MA, USA) készülék, ami egy bináris pumpával, mintaadagolóval, ellennyomás szabályozóval, oszloptermosztáttal és fotodiódasoros detektorral volt felszerelve. A mérőberendezés irányítása és az adatok kiértékelése az Empower 2 adatfeldolgozó és kiértékelő szoftver (Waters Chromatography) segítségével végeztem el. A mérések során mozgó fázisként folyékony CO₂/MeOH különböző arányú elegyét használtuk különféle módosítókkal. Minden esetben izokratikus elúciót alkalmaztunk, 0.6 mL/perc áramlást LC és 2.0 mL/perc áramlást SFC rendszerénél UV detektálással. Az oszlopok holtidejének (t₀) meghatározására acetone metanolos oldatát használtuk.

Alkalmazott kolonnák

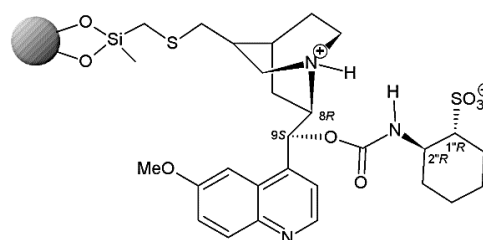
Méréseinkhez 4 *Cinkóna* alkaloid alapú ZWIX(+)TM, ZWIX(-)TM, QN-AX és QD-AX oszlopokat alkalmaztunk, melyeket a Chiral Technologies Europe (Illkirch, Franciaország) gyártott. Az összes oszlopo 3 μ m szemcsemérettel és 150 mm x 3.0 mm I.D. mérettel rendelkezett.



1. *ábra* A Chiralpak QN-AX és QD-AX CSP anioncserélő királis állófázisok szerkezete



ZWIX(+)TM
(8*S*,9*R*)
1''*S*,2''*S*)



ZWIX(-)TM
(8*R*,9*S*)
1''*R*,2''*R*)

2. ábra A Chiralpak ZWIX(+)TM és ZWIX(-)TM ikerionos királis állófázisok szerkezete

EREDMÉNYEK

Munkánk során kromatográfias módszereket fejlesztettünk ki *Cinkóna* alkaloid alapú ikerionos és anioncserélő típusú királis állófázisokon *N*-Fmoc-védett protein aminosav enantiomereinek elválasztására LC és SFC módszerrel. A módszer optimalizálása során számos mozgófázis összetétel, körülmény és különböző hőmérsékletek mellett vizsgáltunk a kromatográfias paraméterek változását.

1) Mozgófázis összetétel hatása az elválasztásra

Vizsgálataink során különböző összetételű eluenseket alkalmaztunk, MeOH és MeCN keverékét LC módszer, valamint CO₂ és MeOH keverékét SFC módszer esetén állandó ionerősség (a sav-bázis arányt állandó 2:1értéken tartottuk) mellett. A poláris szerves oldószer jelenléte nagymértékben befolyásolta a retenciós faktor, a szelektivitás és a felbontás értékeket, a MeCN vagy CO₂ növekvő MeOH tartalma jelentős mértékben csökkentette a kromatográfias paramétereket. A MeOH térfogatarányának növekedésével a mozgó fázis polaritása nő elősegítve a mozgó fázis és a minta közötti kölcsönhatások kialakulását, ezért a retenció minden esetben csökken. Fontos megjegyezni, hogy az alkalmazott kromatográfias körülmények között a szelektor és a minta közötti ionos kölcsönhatás megtévesztő szerepet játszik a visszatartás szempontjából. Az enantioszelektivitást az ionos kölcsönhatás mellett a hidrogénhidás, π - π és van der Waals kölcsönhatások befolyásolják.

2) A mozgófázis víz tartalmának hatása az elválasztásra

Vizsgáltuk a mozgófázishoz víztartalma által kifejtett hatást a retenciós szelektivitái és felbontási értékekre. Az eluensben kis százalékban jelen lévő víz előnyös lehet a csúcs alakja, a felbontás, az analízis idő és a minta oldhatósága szempontjából. A kis mennyiségű víz hozzáadása a poláris-ionos (PI) eluensrendszert eltolja a PI módból a hidro-organikus (HO) mód felé. Néhány százalékos víztartalom esetén a szelektor és a minta szolvatácicója nő, csökkentve a ionos kölcsönhatások erősségét. LC módszernél a legtöbb esetben 1.0 – 2.0 % H₂O tartalom volt előnyös, szebb csúcsalakot és nagyobb felbontást eredményezett. SFC módszernél a víztartalom növelésével a retenciós idő kissé csökkent, ami részben azzal magyarázható, hogy a CO₂ és víz reakciója során keletkező szén-sav hidrogénkarbonátra és protonra disszociálva növelte ellenionok koncentrációját. A hidrogénkarbonát és proton kiegészítő ellenionként működik az anionos kromatográfiás rendszerben. A retenciós faktorhoz hasonlóan a szelektivitás és felbontás értékek szintén csökkentek a víztartalom növekedésével.

3) Sav és bázis módosítók minőségének hatása az elválasztásra

A módosítóként alkalmazott savak és bázisok hatásának feltárása érdekében méréseink során állandó eluensösszetételt és savfelesleget biztosítottuk, hogy a bázis protonált „ammónium-ion” formában legyen. Vizsgálataink során savas módosítóként hangyasavat (FA) és ecetsavat (AcOH), bázikus módosítóként pedig etil-amint (EA), dietil-amint (DEA), trietil-amint (TEA), propil-amint (PA) és butil-amint (BA) adagoltunk az eluenshez. A bázikus módosítók a N atom alkilsubstitúciós fokában és térkitöltésében, míg az FA és AcOH savak erősségükben térnek el egymástól. A mozgófázisban levő különböző sav és bázis adalékok befolyásolhatják a kromatográfiás elválasztást és fontos szerepet játszanak a *Cinkóna* alkaloid-alapú állófázisok enantioszeparációjának optimalizálásában.

4) Az ellenionok koncentrációjának hatása

A kromatográfiás paramétereket nem csak az alkalmazott ellenion minősége, hanem a mennyisége is befolyásolhatja. Ez azt jelenti, hogy a visszatartást nagymértékben befolyásolhatja a mozgófázisban jelen lévő kísérő ionok és ellenionok mennyisége. A sztöchiometrikus helyettesítési modell szerint a növekvő ellenion koncentráció csökkenő retenciót eredményez. E modell szerint lineáris kapcsolat áll fent az elsőként eluálódó enantiomer retenciós tényezőjének tízes alapú logaritmus (log k_1) és az ellenion koncentrációjának tízes alapú logaritmus (log $c_{ellenion}$) között. Az anioncserélő QN-AX és QD-AX állófázisok esetében „egyionos” ioncserélő mechanizmus feltételezhető.

5) Hőmérsékletfüggés és termodinamikai adatok

A hőmérsékletváltozás hatásának jellemzéséhez a kromatográfiában használatos van't Hoff egyenletet használtuk. A hőmérséklet tartományt LC módszernél 5 - 40 °C között, SFC módszernél 20 - 50 °C között változtattuk. Az $\ln\alpha$ -t $1/T$ függvényében ábrázolva egyenest kapunk, melynek meredeksége $\Delta(\Delta H^\circ)$, tengelymetszete pedig $\Delta(\Delta S^\circ)$, így az elválasztást kísérő standard entalpia és entrópia változás különbségei meghatározhatók. Megállapítottuk, hogy a szelektivitás minden esetben csökkent a hőmérséklet növelésével, a $\Delta(\Delta H^\circ)$ és $\Delta(\Delta S^\circ)$ minden esetben negatív értékeket mutatott, azaz az elválasztás entalpiavezérelt volt. Az entrópiatag és az entalpiatag tényleges hozzájárulása az adszorpciós szabad energiához felírható az entalpia/entrópia arányon keresztül a Q [$Q = \Delta(\Delta H^\circ) / [298 \times \Delta(\Delta S^\circ)]$] egyenlettel. Az egyes analitok Q értékeinek összehasonlítása az enantiomerek elválasztása entalpiavezérelt ($Q > 1.0$) volt minden esetben, és a legnagyobb értékeket a QN-AX állófázison kaptuk.

6) Az elúciós sorrend meghatározása

Bár a *kinin* és a *kinidin* diasztereomer viszonyban állnak egymással, mégis gyakran enantiomerként viselkednek. Ezért pszeudoenantiomereknek nevezzük őket. Ez a specifikus tulajdonságuk nagyon előnyös, mivel a kinin- és kinidin-alapú állófázisokon ellentétes elúciós sorrendet kapunk. Az elúciós sorrendet az összes vegyület esetén meghatároztuk, és egy általános szabály figyeltünk meg. A *Kinin* alapú állófázisok esetén (ZWIX(+)TM and QN-AX) a *D* enantiomer eluálódott hamarabb LC és SFC módszernél egyaránt, míg a *kinidin* alapú állófázisok esetében az *L* enantiomer eluálódott hamarabb mindkét kromatográfiai módszernél.

7) *N*-Fmoc-védett protein aminosav enantiomereinek tisztaságvizsgálata

A peptidszintézis során fontos szempont a kiindulás szabad és *N*-védett aminosavak enantiomerfeleslegének (ee) meghatározása. Az enantiomerfelesleg a kémiában az enantiomerkeverékek összetételének jellemzésére használt mennyiség, az anyag tisztaságának mértéke. Munkánk során gyors és érzékeny kromatográfiai módszert fejlesztettünk ki *N*-Fmoc-védett protein aminosavak enantiomer szennyeződéseinek azonosítására és mennyiségi meghatározására Cinchona alkaloid *QN*- és *QD*-alapú ikerionos állófázisokon. Az enantiomer szennyeződések mennyiségének meghatározása során 5 kiválasztott analitra végeztünk kísérleteket.

Közlemények listája

Az értekezés anyagát képező közlemények

- I. Lajkó G.,** Ilisz I., Tóth G., Fülöp F., Lindner W., Péter A.
Application of *Cinchona* alkaloid-based zwitterionic chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of N^α -protected proteinogenic amino acids, In: Journal of Chromatography A, 1415 (2015) 134-145.
if:3.981
- II. Lajkó G.,** Grecsó N., Tóth G., Fülöp F., Lindner W., Péter A., Ilisz I.
A comparative study of enantioseparations of N^α -Fmoc proteinogenic amino acids on Quinine-based zwitterionic and anion exchanger-type chiral stationary phases under hydro-organic liquid and subcritical fluid chromatographic conditions, In: Molecules, 21 (11) (2016) 1579.
if:2.861
- III. Lajkó G.,** Grecsó N., Tóth G., Fülöp F., Lindner W., Péter A., Ilisz I.
Liquid and subcritical fluid chromatographic enantioseparation of N^α -Fmoc proteinogenic amino acids on quinidine-based zwitterionic and anion-exchanger type chiral stationary phases. A comparative study, In: Chirality, 29 (2017) 225-238.
if:1.956
Sum of impact factors: 8.798

Az értekezés témájához kapcsolódó, de fel nem használt közlemények:

- IV. Ilisz I.,** Gecse Z., **Lajkó G.,** Nomm M., Fülöp F., Lindner W., Péter A.
Investigation of the structure-selectivity relationships and van't Hoff analysis of chromatographic stereoisomer separations of unusual isoxazoline-fused 2-aminocyclopentanecarboxylic acids on *Cinchona* alkaloid-based chiral stationary phases. In: Journal of Chromatography A, 1384 (2015) 67-75.
if: 3.981
- V. Ilisz I.,** Gecse Z., **Lajkó G.,** Forró E., Fülöp Z., Lindner W., Péter A.
High-Performance liquid chromatographic enantioseparation of cyclic β -amino acids applying zwitterionic chiral stationary phases based on *Cinchona* alkaloids, In: Chirality, 27 (2015) 563-570.
if:1.956
- VI. Lajkó G.,** Orosz T., Kiss L., Forró E., Fülöp F., Péter A., Ilisz I.
High-Performance liquid chromatographic enantioseparation of fluorinated cyclic β^3 -amino acid analogs on polysaccharide-based chiral stationary phases. Comparison with nonfluorinated counterparts, In: Biomedical Chromatography, 30 (2016) 1441-1448.
if:1.613
- VII. Lajkó G.,** Orosz T., Grecsó N., Fekete B., Palkó M., Fülöp F., Lindner W., Péter A., Ilisz I.
High-Performance liquid chromatographic enantioseparation of cyclic β -aminohydroxamic acids on zwitterionic chiral stationary phases based on *Cinchona* alkaloids, In: Analytica Chimica Acta, 921 (2016) 84-94.
if:4.950

- VIII. Lajkó G.,** Grecsó N., Megyesi R., Forró E., Fülöp F., Wolrab D., Lindner W., Péter A., Ilisz, I.
Enantioseparation of β -carboline derivatives on polysaccharide- and strong cation exchanger-based chiral stationary phases. A comparative study, In: Journal of Chromatography A, 1467 (2016) 188-198.
if: 3.981
- IX. Orosz T.,** Grecsó N., **Lajkó G.,** Szakonyi Z., Fülöp F., Armstrong DW., Péter A., Ilisz I.
Liquid chromatographic enantioseparation of carbocyclic β -amino acids possessing limonene skeleton on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases. In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 145 (2017) 119-126.
if: 3.255
- X. Lajkó G.,** Orosz T., Ugrai I., Szakonyi Zs., Fülöp F., Lindner W., Péter A., Ilisz I.
Liquid chromatographic enantioseparation of limonene-based carbocyclic β -amino acids on zwitterionic *Cinchona* alkaloid-based chiral stationary phases. In: Journal of Separation Science, 40 (2017) 3196-3204.
- XI. Bajtai A., Lajkó G.,** Szatmári I., Fülöp F., Lindner W., Péter A., Ilisz I.
Dedicated comparisons of diverse polysaccharide- and zwitterionic *Cinchona* alkaloid-based chiral stationary phases probed with basic and ampholytic indole analogs in liquid and subcritical fluid chromatography mode. In: Journal of Chromatography A, 1563 (2018) 180-190.
if: 2.557

Sum of impact factors: 22.293

Total impact factor: 31.091

Az értekezéssel kapcsolatos előadások

- I. Lajkó G.,**
N-védett természetes aminosavak enantiomerjeinek szuperkritikus folyadékkromatográfias elválasztása kinaalkaloid alapú ikerionos állófázisokon, Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány 14. Tudományos Előadóülése, Április 29 (2015). (orális előadás)
- II. Lajkó G.,** Ilisz I., Tóth G., Fülöp F., Lindner W., Péter A.
Enantioseparation of $N\alpha$ -protected proteinogenic amino acids by supercritical fluid chromatography on *Cinchona* alkaloid-based zwitterionic chiral stationary phases, 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, Szeptember 2-4 (2015). (poszter)

Egyéb előadások

- III.** Ilisz I., Grecsó N., **Lajkó G.**, Fülöp F., Lindner W., Péter A.,
Kationos 1,2,3,4-tetrahydroizokinolin analógok királis nagyhatékonyságú
folyadékkromatográfiás vizsgálata ikerionos állófázisokon, Elválasztástudományi
Vándorgyűlés, Egerszalók, November 12-14. (2014) (poszter)
- IV.** Grecsó N., **Lajkó G.**, Ilisz I., Forró E., Fülöp F., Armstrong DW., Péter A.,
Enantioseparation of Amino Alcohol Analogs Possessing 1,2,3,4-
Tetrahydroisoquinoline Skeleton and its Derivatives Using Polysaccharide-based Chiral
Stationary Phases, Proceedings of the 21st International Symposium on Analytical and
Environmental Problems, Szeged, Szeptember 28 (2015). (poszter)
- V.** **Lajkó G.**, Orosz T., Grecsó N., Palkó M., Fülöp F., Lindner W., Péter A. Ilisz I.,
Enantioseparation of cyclic β -aminohydroxamic acids by high-performance liquid
chromatography on zwitterionic chiral stationary phases based on Cinchona alkaloids,
Olomouc, Június 6-9 (2016). (poszter)
- VI.** Orosz T., **Lajkó G.**, Grecsó N., Kiss L., Forró E., Fülöp F., Péter A., Ilisz I.
High-performance liquid chromatographic study on the enantioseparation of fluorine
containing cyclic amino acid derivatives, Proceedings of the 22nd International
Symposium on Analytical and Environmental Problems, Szeged, Október 10 (2016).
(poszter)
- VII.** **Lajkó G.**, Orosz T., Grecsó N., Palkó M., Fülöp F., Lindner W., Ilisz I., Péter A.
Ciklikus β -aminohidroxámsavak enantiomerjeinek nagyhatékonyságú
folyadékkromatográfiás elválasztása kinaalkaloid alapú ikerionos állófázisokon,
Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Kecskemét, November 9-11 (2016) (poszter)