

Gyógyszerhatóanyagok és sztérikusan gátolt aminosavak királis folyadékkromatográfiás elválasztása

Egyetemi Doktori (Ph.D.) Értekezés

Török Roland Sándor

Témavezető:
Dr. Péter Antal
Egyetemi Tanár



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

2006

Tartalomjegyzék

Az értekezésben használt gyakori rövidítések	4.
1. Bevezetés	5.
1.1. A kiralitás és a királis elválasztások jelentősége	5.
1.2. Célkitűzéseink	6.
2. Irodalmi áttekintés	7.
2.1. A királis folyadékkromatográfia alapvető módszerei	7.
2.2. Az általunk alkalmazott királis származékképző reagensek	8.
2.3. Az általunk használt királis állófázisok áttekintése	10.
3. Kísérleti rész	15.
3.1. Az alkalmazott készülékek	15.
3.2. Kromatográfiás oszlopok	16.
3.3. Felhasznált vegyszerek	16.
3.4. Mintaelőkészítési és származékképzési eljárások	17.
3.5. Vizsgált vegyületek	18.
4. Kísérleti eredmények és értékelésük	19.
4.1. A bicalutamid és származékai királis kromatográfiás vizsgálata	19.
4.1.1. Irodalmi áttekintés	19.
4.1.2. A kromatográfiás eredmények kiértékelése	21.
4.1.3. Elválasztások cellulóz-alapú állófázisokon	22.
4.1.4. Elválasztások makrociklusos antibiotikum-alapú állófázisokon	23.
4.1.5. Elválasztások ciklodextrin- és kinin-karbamát-alapú állófázisokon	24.
4.1.6. A vizsgált vegyületek enantiomerjeinek elválasztása egy kromatogramon belül	25.
4.1.7. Elúciós sorrendek	26.
4.1.8. Összefoglalás	27.
4.2. Szabadgyökkel rendelkező β-aminosavak enantiomerjeinek folyadékkromatográfiás vizsgálata	27.
4.2.1. Irodalmi áttekintés	27.
4.2.2. A szabadgyökös aminosavak enantiomerjeinek közvetlen elválasztása	29.
4.2.3. Királis származékképző szerek alkalmazása, a származékképzési reakció körülményeinek vizsgálata	31.

4.2.4. A szabadgyökös aminosavak KSR-el képzett diasztereomerjeinek elválasztása	33.
4.2.5. Összefoglalás	35.
4.3. Nem fehérjealkotó szekunder aminosavak enantiomerjeinek elválasztása két hasonló szerkezetű királis állófázison, az állófázisok hatékonyságának összehasonlítása	35.
4.3.1. Irodalmi áttekintés	35.
4.3.2. A vizsgált iminosavak sztereoizomerjeinek elválasztása	36.
4.3.3. Az állófázisok enantioszelektivitása és a cukorrészek szerepe a királis felismerésben	39.
4.3.4. Az elválasztások optimalizálása és az elúciós sorrend	41.
4.3.5. Összefoglalás	41.
4.4. A hőmérséklet hatása a királis kromatográfiás viselkedésre egy anioncserélő típusú állófázison	41.
4.4.1. Irodalmi áttekintés. A hőmérséklet hatása a különböző rendszerekben kialakuló egyensúlyokra	41.
4.4.2. A van't Hoff egyenlet alkalmazása a kromatográfiában	42.
4.4.3. A hőmérséklet hatása a kromatográfiás retencióra	44.
4.4.4. A királis felismerést létrehozó kölcsönhatások vizsgálatának lehetőségei	45.
4.4.5. A szerkezeti tényezők és a hőmérséklet hatása a kromatográfiás paraméterekre	47.
4.4.6. A számított termodinamikai paraméterek elemzése	52.
4.4.7. Összefoglalás	55.
5. Összefoglalás	56.
Summary	60.
Köszönetnyilvánítás	64.
Irodalomjegyzék	65.
Közlemények listája	70.
Függelék	72.

Az értekezésben használt gyakori rövidítések

AcOH: ecetsav

Bz: benzoil-védőcsoport

CD: ciklodextrin

CE: kapilláris elektroforézis

DEA: dietil-amin

DNB: 3,5-dinitro-benzoil-védőcsoport

DNZ: 3,5-dinitro-benziloxi-karbonil-védőcsoport

EtOH: etanol

FDAA: *N*- α -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alanin-amid

GC: gázkromatográfia

GITC: 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil-izotiocianát

Gly: glicin

Hex: hexán

IPA: 2-propanol

HPLC: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

KÁF: királis állófázis

KSR: királis származékképző reagens

KMFA: királis mozgófázis adalék

MeCN: acetonitril

MeOH: metanol

NH₄OAc: ammónium-acetát

NIFE: *N*-(4-nitrofenoxi-karbonil)-L-fenilalanin-2-metoxietil-észter

Phe: fenilalanin

TEA: trietil-amin

TEAA: trietil-ammónium-acetát

TFA: trifluor-ecetsav

Z: benziloxi-karbonil-védőcsoport

1. Bevezetés

1.1. A kiralitás és a királis elválasztások jelentősége

A természetben különösen fontos szerepet játszik a szimmetria és aszimmetria illetve a hozzájuk kapcsolódó és az általuk meghatározott fizikai, biológiai és kémiai tulajdonságok. Molekuláris szinten meghatározó a kiralitás szerepe, az élő szervezeteket felépítő szerves anyagok nagy része királis, könnyen érthető tehát hogy a szervezetbe jutó királis anyagok enantiomerjei eltérően lépnek kölcsönhatásba a szervezetben található királis vegyületekkel, ezért a biológiai rendszerek sztereospecifikusan felismerik a kiralitáscentrumot tartalmazó molekulákat. Ezekből következően biológiai rendszerekben a gyógyszerek különböző sztereoisomerjei eltérő hatást fejtenek ki, illetve metabolizmusuk is eltérhet.

Ariëns és mtsai. kimutatták, hogy gyógyszerek esetén az eltérő hatásmechanizmus különböző hatásokat eredményezhet [1]. Amellett, hogy az egyik enantiomer hatásos (agonista), a másik lehet hatástalan, ellentétes hatású (antagonista) vagy toxikus is. Az utóbbira szomorú példa a Talidomid (ConterganTM) nevű szer jól ismert esete. Ez egy, a várandós nők reggeli rosszulleteit csillapítani hivatott, királis gyógyszerhatóanyag volt, amely racém formában került piacra. Egyik enantiomerje jótékony hatású volt, azonban a másik enantiomer káros mutációkat hozott létre a magzatokban.

A fent említett okok miatt az utóbbi néhány évtizedben megnőtt az igény a királis gyógyszeralapanyagok enantiomer tisztaságú formában történő előállítására és forgalmazására. Stinson 2000-ben megjelent közleménye szerint 1999-ben a világszerte forgalomba hozott enantiomer tisztaságú készítmények forgalma elérte a 115 milliárd amerikai dollárt. Ez a teljes gyógyszerforgalom 32%-át teszi ki, és becslések szerint tovább növekszik [2].

A gyógyászati alapkutatások egyik fő területe a receptorkutatás, ismernünk kell ugyanis a receptorok szerkezetét, ha specifikus gyógyszereket akarunk készíteni. Ennek megismerésének egyik módja, ha specifikus térszerkezetű vegyületekkel visszük őket kölcsönhatásba, így a vegyület térszerkezetéből következtethetünk a receptor térszerkezetére. Az általunk legtöbbet vizsgált vegyületek a peptidok általában flexibilis molekulák, melyeknek térszerkezetét nagyban befolyásolja környezetük, így előfordulhat hogy a peptid térszerkezete eltérő a receptor közelében és távollétében. A peptidok térszerkezete azonban merevíthető ún. szterikusán gátolt aminosavak beépítésével. A természetben is megtalálható egy ilyen különleges aminosav, a prolin. A változatosabb konformációk létrehozásához más, hasonló tulajdonságú aminosavakra is szükség van, így a szintetikus szerves kémia egyik

fontos ága lett az ilyen aminosavak előállítása és peptidekbe építése. A pontos konformációk létrehozásához elengedhetetlen a királisan tiszta aminosavak használata.

Az enantiomerek előállításának több lehetősége van, például az enantioszelektív szintéziseljárások alkalmazása (egyre nagyobb teret nyer az enantioszelektív katalizátorok alkalmazása is), vagy racém keverékek előállítása, majd az enantiomerek elválasztása. Az elválasztás történhet hagyományosan rezolválással, vagy preparatív királis kromatográfiás eljárásokkal. A királis kromatográfiának a hasonló termékek minőségbiztosításában is fontos szerep jut. A kromatográfiás eljárások ugyanis általában gyorsak, reprodukálhatóak, könnyen kivitelezhetőek és automatizálhatóak.

Enantiomerek kromatográfiás elválasztását először Gil-Av és mtsai. hajtották végre gázkromatográfiával (GC) [3]. Később Blaschke és munkatársai valósították meg a fent említett Talidomid sztereoiszomerjeinek elválasztását [4]. Mostanára számos vegyületcsoport enantiomerjeinek elválasztását megoldották nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) alkalmazásával. Ez annak köszönhető, hogy az elmúlt évtizedben számos királis származékképző reagens (KSR) és királis állófázis (KÁF) fejlesztése és kereskedelmi bevezetése történt meg. Egre nagyobb teret nyernek a sztereoiszomerek analitikájában a kapilláris elektroforetikus (CE) elválasztások is.

1.2. Célkitűzéseink

- Céljaink közt szerepelt egy királis, antitumor hatású gyógyszerhatóanyag és ennek kiindulási és köztitermékeinek királis kromatográfiás elválasztása. Munkatársaink egy új enantioszelektív szintéziseljárást dolgoztak ki a prosztatadaganatok kezelésére használt bicalutamid előállítására [5]. Olyan közvetlen folyadékkromatográfiás eljárásokat dolgoztunk ki, amelyekkel a szintézishez szükséges királis alapanyagok, a királis melléktermékek valamint a bicalutamid királis tisztasága is nyomonkövethető.

- Céljaink közé tartozott néhány nem természetes, sztérikusan gátolt aminosav enantiomerjeinek elválasztása. Ezek között találhatóak gyűrűs, szabadgyököt tartalmazó aminosavak és különböző, speciálisan szubsztituált glicin és alanin származékok. Ezen aminosavaknak fontos szerep jut a peptidomimetikában és a peptid alapú receptorkutatásban [6, 7].

- Célul tűztük ki egy kinin-alapú anioncserélő típusú KÁF retenciós tulajdonságainak vizsgálatát valamint a lehetséges retenciós mechanizmus elemzését. E célból

különböző glicin és alanin analóg aminosavak acilezett származékainak retenciós adatait mértük különböző hőmérséklet és mozgófázisösszetétel alkalmazása során.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A királis folyadékkromatográfia alapvető módszerei

Egy vegyület enantiomerjei fizikailag nehezen különböztethetők meg egymástól, hiszen csak egyetlen fizikai tulajdonságukban, az optikai forgatóképességük irányában térnek el. Ebből az is következik, hogy hagyományos kromatográfias módszerekkel az enantiomerek nem választhatóak el egymástól. Feltétlenül szükséges királis környezet létrehozása az enantiomerek megkülönböztetéséhez. A folyadékkromatográfias módszerek ebből a szempontból két nagy csoportra oszthatók: a közvetlen és a közvetett módszerekre.

A közvetett módszer lényege abban áll, hogy a kromatográfias analízis előtt egy királis, de enantiomer tisztaságú, a vizsgálni kívánt vegyületünkkel reakcióra képes anyaggal (királis származékképző reagens, KSR) reagáltatjuk a mintát. Így a racém keverékünkben egy diasztereomer keveréket hozunk létre, akárcsak a jól ismert rezolválás esetén. Tudva lévő, hogy a diasztereomerek több fizikai tulajdonságukban is eltérnek egymástól (pl. oldhatóság) ellentétben az enantiomerekkel, így hagyományos akirális kromatográfias módszerekkel is elválaszthatóak.

A közvetlen módszerek további két részre oszthatóak, de elméleti hátterük hasonló. Ebben az esetben nincs szükség az analízist megelőző előkészítésre (oszlop előtti származékképzés) ellentétben a közvetett módszerrel. A közvetlen módszerek alkalmazása során a királis környezetet az állófázis, vagy a mozgófázisba kevert királis adalék biztosítja. Közvetlen analízis során tehát a diasztereomer párokat nem kémiai kötással hozzuk létre, hanem másodlagos kötőerők alakítanak ki intermolekuláris diasztereomereket.

Királis mozgófázis adalék (KMFA) alkalmazásakor elegendő a hagyományos akirális oszlopok használata, hisz a már létrejött diasztereomerek elméletileg akirális környezetben is elválaszthatóak. Ez a módszer az utóbbi években veszített jelentőségéből, felhasználását korlátozza a nagy adalékanyag igény, illetve az adalékanyag oldhatósága a különböző eluens rendszerekben. A kapilláris elektroforetikus módszerekben azonban a módszer jelentősége változatlan.

A királis állófázis alkalmazása megköveteli speciális kromatográfias oszlopok alkalmazását, azonban ebben az esetben szükségtelen bármiféle speciális előkészítés vagy

királis adalékanyag alkalmazása. Ebben az esetben a mintamolekulák a megosztófázis királis molekuláival alakítanak ki eltérő stabilitású diasztereomer párokat. Amelyik enantiomer stabilabb adduktumot képez az állófázissal, az később fog eluálódni az oszlopról.

Mind a közvetlen, mind a közvetett módszereknek megvannak az előnyei és a hátrányai. A közvetett módszerek előnyei közé tartozik olcsóságuk, a szükséges feltételek egyszerű megteremthetősége, az elúciós sorrend megváltoztathatósága, illetve ha szükséges a detektálás alsó határa csökkenthető kromofór csoportot tartalmazó származékképző alkalmazásával. Hátrányaik közt említhető, hogy a képződött diasztereomerek moláris abszorpciós együtthatója különbözhet, racemizáció léphet fel a származékképzési reakció során, esetleg kinetikai rezolúciót tapasztalhatunk. A kromatogram bonyolultabbá válhat a reagensfeleslegből származó csúcsok miatt, a származékképzési reakció időigényes lehet, illetve az enantiomerek visszanyerése további műveleteket igényel.

A közvetlen módszerek előnye, hogy a királis szelektor királis tisztasága nem kritikus, az enantiomerek azonos moláris abszorbanciával rendelkeznek, reakcióképes funkciós csoporttal nem rendelkező vegyületek enantiomerjei is elválaszthatóak, preparatív célra is hasznosítható, illetve a racemizáció lehetősége gyakorlatilag kizárható az analízis során. Hátránya hogy drága, nincsen univerzálisan használható KÁF, az analízis általában hosszadalmas, általában kicsi az elméleti tényérszám.

Összevetve a két módszer előnyeit és hátrányait talán kevésbé érthető, hogy a közvetett módszer miért szorult háttérbe az utóbbi néhány évben. Igazság szerint a két módszer inkább egymás kiegészítőjének tekinthető, nem pedig konkurensének. Az utóbbi évtizedben azonban a királis kromatográfiás oszlopok és állófázisok fejlesztése óriási lendülettel folyt és folyik, így egyre inkább leküzdik a közvetlen módszerek gyengéit. Ennek köszönhetően a gyógyszerkönyvi előírások is előnyben részesítik manapság a közvetlen módszerek alkalmazását.

2.2. Az általunk alkalmazott királis származékképző reagensek

A különböző funkciós csoporttal rendelkező királis vegyületek sztereioizomerjeinek elválasztására különböző típusú KSR-t fejlesztettek ki, így a piacon számos vegyülettípus királis elválasztására alkalmas származékképzőszer található. A forgalomban lévő KSR-ek nagy száma miatt most szeretnénk kizárólag az aminosav analitikában használt származékképzők tárgyalására szorítkozni, különös tekintettel az általunk alkalmazott KSR típusokra.

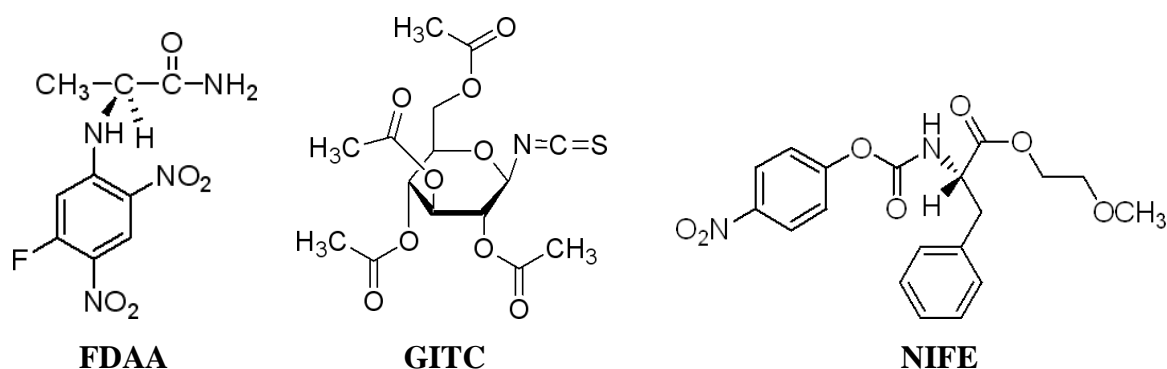
Az aminosavaknak legalább két reagáltatható funkciós csoportjuk van, az amino- és a karboxilcsoport. Ezek közül kétség kívül az aminocsoporton történő származékképzés a jelentősebb. Erre több lehetőség nyílik, többek közt savhalogenidek, izocianátok, tioizocianátok, aktív észterek, másik királisan tiszta aminosav, vagy *ortho*-ftálaldehid (OPA) és valamilyen királis tiol alkalmazásával.

Munkánk során három, különböző típusú KSR-t alkalmaztunk az aminosavak aminocsoportjának származékképzésére. Ezek mindegyike jól ismert és széleskörűen alkalmazott a királis aminosav analitikában.

A három KSR közül talán a legközismertebb az úgynevezett Marfey reagens, *N*- α -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alanin-amid (FDAA), ez egy aktív fluoridot tartalmazó reagens, mely közismert nevét fejlesztőjéről kapta (2.2.1. ábra). Széles körben alkalmazták régebben

2.2.1. ábra

Az alkalmazott királis származékképző reagensek szerkezetei



aminosavak abszolút konfigurációjának meghatározására is. Az 1990-es évek közepéig ugyanis tartotta magát az a nézet, hogy az FDAA származékok elúciós sorrendje kizárólag (*S*)<(*R*) lehet. Ezt azzal magyarázták, hogy az (*R*)-enantiomerek FDAA származékai esetén egy erősebb intramolekuláris hidrogén kötés létrejöttét tételezték fel, mint az (*S*)-enantiomerek esetén, mely kevésbé hidrofób molekulát eredményezett [8]. 1995-ben Péter és mtsai. először írtak le a fent említettől eltérő elúciós sorrendet, majd a későbbiekben több rendellenesen viselkedő aminosavat is leírtak [9-12]. Népszerűsége ellenére a Marfey reagens számos hátrányos tulajdonsággal rendelkezik. Rendkívül hosszú lehet például a reakcióidő, szterikusan gátolt aminosavak esetén egy hetes reakcióidővel sem lehet 100%-os konverziót elérni. Kiemelkedően előnyös sajátossága azonban, hogy származékai a látható tartományban,

360 nm-es hullámhosszon detektálhatóak. Ez jelentősen csökkenti a módszer kimutatási határát és szelektivitását.

A következő reagens, melyet vizsgálataink során használtunk a 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil-izotiocianát (GITC) (2.2.1. ábra), az izotiocianát típusú származékképzők csoportjába tartozik. Ez a szintén széles körben alkalmazott KSR számos kedvező tulajdonsággal rendelkezik. Ezek közé tartozik a rövid reakcióidő (2-3 óra), az enyhe reakciókörülmények (pH 8-9, szobahőmérséklet), és a jó detektálhatóság (250 nm). További előnyös tulajdonsága, hogy sztérikusan gátolt aminosavakkal szemben a Marfey reagensnél nagyobb reakciókészséget mutat [12].

Az úgynevezett NIFE-t, azaz *N*-(4-nitrofenoxi-karbonil)-*L*-fenilalanin-2-metoxietil-észtert, kifejezetten sztérikusan gátolt aminosavak származékképzésére és királis elválasztására fejlesztették ki (2.2.1. ábra) [13-16]. Nagy előnye a fent említett KSR-vel szemben a nagy reakciókészség és a rövid reakcióidő (30 perc). Hátránya, hogy oldatban viszonylag instabil, viszont szilárd állapotban, száraz helyen hosszú ideig tárolható. További hátrányai közé tartozik, hogy csak alacsony hullámhossz tartományban detektálható (205 nm), illetve hogy viszonylag sok melléktermék keletkezik a reakció során (általában három járulékos csúcsra kell számítani). A melléktermékek hidrofóbicitási tulajdonságai azonban általában kedvezőek a képződő diasztereomerekhez képest, ugyanis a melléktermékek a kromatogram elején és végén eluálódnak. Ha mégis zavarják a diasztereomerek detektálását, glicin hozzáadásával a zavaró reakciók mértéke csökkenthető [13,14]. A fent említett nagy reakciókészségéből következik, hogy olyan aminosavak is reagáltathatóak és mérhetőek vele, amelyek vizsgálatára más származékképzők alkalmatlanok.

2.3. Az általunk használt királis állófázisok áttekintése

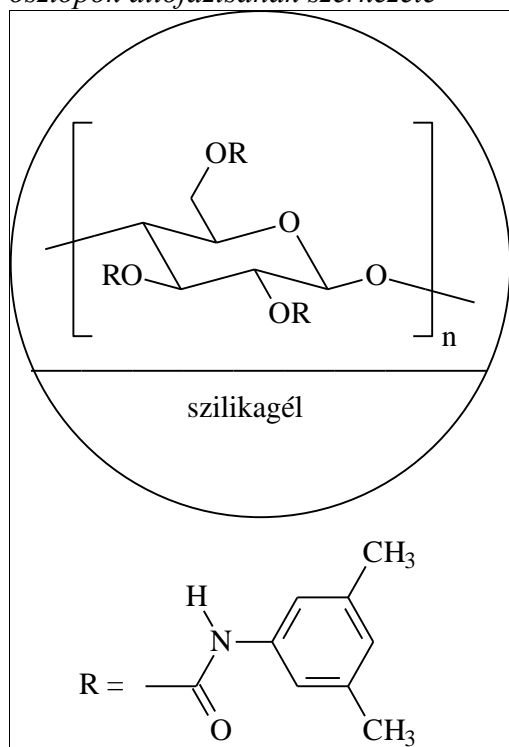
A királis állófázisok fejlesztése az 1970-es évek végén kezdődött, néhány kutató úttörő munkássága alapján [17-20]. Később ez a kutatási terület komoly teret hódított, és mára a királis analitika egyik vezető ágazatává nőtte ki magát. Napjainkban a fejlődés rohamosan folytatódik, ezt az e témában megjelent publikációk nagy száma is bizonyítja, melyek közül most csak néhányat említünk [21-24].

Az első fejlesztések közé tartozó KÁF-ok koronaéter-, valamint peptid-alapú és ligandumcserés állófázisok voltak [17-20]. Mára számos királis vegyületcsoportot kipróbáltak és rögzítettek királis állófázisként, ezek közül sokat már sikerrel forgalmaznak évek óta. A királis állófázisok főbb típusai a következők: peptid-, koronaéter-, cellulóz-, amid-,

ciklodextrin- és makrociklusos antibiotikum-alapú, valamint ligandum- és ioncserélő alapú állófázisok. Ezek közül részletesebben csak az általunk használt típusokat fogjuk tárgyalni.

2.3.1. ábra

A Chiralcel™ OD-H és OD-RH oszlopok állófázisának szerkezete



Elsőként a cellulóz alapú oszlopok főbb jellemzőit szeretnénk ismertetni. Okamoto és munkatársai 1984-ben fejlesztették ki az első cellulóz alapú állófázisokat [25,26]. Mostanra széles körben alkalmazzák a cellulóz különböző származékait királis állófázisként. Rendelkezésünkre állt két azonos szelektorral rendelkező, cellulóz alapú oszlop (Chiralcel™ OD-H és OD-RH). A különbség a két kolonna között az hogy az egyikük normál, míg a másik fordított fázisban használható. Mindkét oszlop állófázisa szilikagélen kötött cellulóz-*tris*-(3,5-dimetil-fenil-karbamát) (2.3.1. ábra). A két állófázis elsősorban π -savas minták elválasztására alkalmas

a π -bázikus dimetil-fenil-csoport jelenléte miatt. Jelentősek lehetnek normál fázisban még az aromás gyűrűk közötti π - π mágneses kölcsönhatások is.

Szintén szénhidrát alapú állófázisok a ciklodextrin (CD) származék KÁF-ok. A ciklodextrinek glükopiranoz monomerekből α -(1,4) kötésekkel felépülő oligoszacharid molekulák. Három alapvető típusukat különböztetjük meg aszerint, hogy hány monomer egységből állnak. Az α -CD hat, a β -CD hét, míg a γ -CD nyolc glükóz egységből épül fel. A monomer egységek egy csonka gúla alakú, alul és felül nyitott szerkezetet alkotnak. 0,47-0,53 nm, 0,60-0,65 nm és 0,75-0,83 nm a belső üregek átmérője rendre az α -, β - és γ -CD esetén [27]. Röntgendiffrakciós vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy a szekunder hidroxilcsoportok a kúp palástján kívülre, míg a primer hidroxilcsoport (így a metilencsoport szintén) az üreg belsejében helyezkedik el csakúgy, mint az éter-szerű kötésben lévő oxigén. Ily módon a ciklodextrin csonka gúla palástjának külseje hidrofíllá, míg az üreg hidrofóbbá válik [28]. Azok a molekulák képesek visszatartást szenvedni a ciklodextrin állófázisokon, melyek illeszkednek az adott CD üregébe, így képesek zárványkomplexet kialakítani. A

mintamolekulák a natív ciklodextrin üregében hidrofób-hidrofób, dipólus-dipólus vagy gyenge diszperziós kölcsönhatások, illetve hidrogénkötések kialakítására képesek.

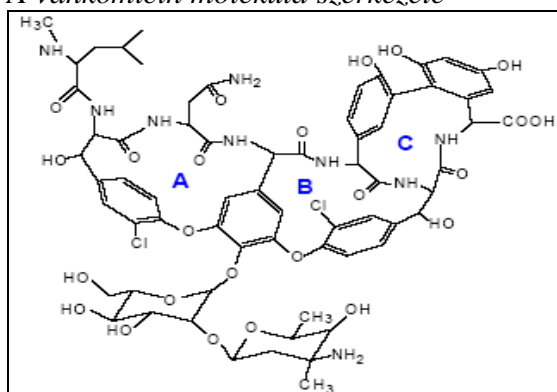
Munkánk során α - és β -ciklodextrin alapú állófázisokat használtunk, melyek normál, fordított, poláris-szerves és poláris-ionos módban is használhatóak. A poláris-szerves és poláris-ionos módszereket az utóbbi években fejlesztették ki. Poláris-szerves mód során mozgófázisként valamilyen poláris, szerves oldószert alkalmazunk, általában metanol vagy acetonitrilt. A poláris-ionos módszer alkalmazása során, pedig a metanolhoz vagy acetonitrilhez jégecetet vagy trietil-amint adagolunk, ezzel beállítva az eluens ionerősségét. Ezek között található olyan kolonna, melynek állófázisa natív ciklodextrin, de vannak olyanok is, melyek különböző módosító, járulékos kölcsönhatásokat erősítő funkciós csoportokat tartalmaznak. A Cyclobond™ I 2000 típusú oszlop királis szelektora natív β -CD. A Cyclobond™ I 2000 RSP és SN típusjelű oszlopok állófázisa hasonló az imént említetthez, azonban ezen kolonnák esetében már módosított β -CD-t kötöttek a szilikagélhez. Az RSP oszlop előállításánál (R,S) -2-hidroxi-propiléter-, míg az SN oszlop előállításánál (S) -naftil-etil-karbamát módosító csoportot kötöttek a ciklodextrinhez. A Cyclobond™ III típusú oszlop királis szelektora natív α -ciklodextrin [29].

A vizsgálatainkhoz használt királis szelektorok következő típusa a makrociklusos glikopeptid alapú állófázisok. Armstrong és mtsai. 1994-ben alkalmaztak először makrociklusos antibiotikumokat királis állófázisként [30]. Elsőként vankomicin, rifamicin B és tiosztrepton molekulákat rögzítettek kovalensen szilikagélhez, ezek közül a vankomicin bizonyult a leghatékonyabbnak. Később más antibiotikum molekulákat is bevontak a fejlesztésekbe, például a teicoplanint, a risztocetin A-t, illetve az α - és β -avoparcint [31-33]. Vizsgálataink során a vankomicin tartalmú Chirobiotic™ V, a vankomicin aglikon tartalmú Chirobiotic™ VAG, a teicoplanin illetve teicoplanin aglikon tartalmú Chirobiotic™ T és TAG valamint a risztocetin A tartalmú Chirobiotic™ R oszlopokat alkalmaztuk. Mindegyik kolonna multimodális, azaz normál, fordított, poláris-szerves és poláris-ionos módban is használható.

A vankomicin három makrociklusos gyűrűből álló glikopeptid molekula, mely két cukoregységet, öt aromás gyűrűt, számos hidroxil- és metilcsoportot, egy karboxil- és egy primer aminocsoportot tartalmaz. A makromolekulán 18 kiralitáscentrum található (2.3.2. ábra) [34]. Ezek a tulajdonságok képessé teszik ezt a KÁF-t a királis vegyületek széles skálájának analizálására. A molekula makrociklusai kosárszerű szerkezetet alkotnak, mely hidrofób-hidrofób kölcsönhatások kialakítására ad lehetőséget. A számos funkciós csoport

2.3.2. ábra

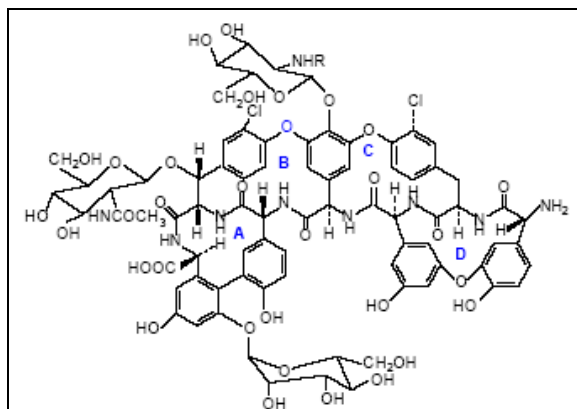
A vankomicin molekula szerkezete



A teicoplanin molekulát négy makrociklusos gyűrű alkotja, melyekben hét aromás gyűrű található peptid kötésekkel összekapcsolva. A molekulához három cukoregység kapcsolódik, melyek közül az egyikben egy alifás lánc is található. Ez a szelektor is rendelkezik számos hidroxilcsoporttal, illetve egy karboxil- és egy primer aminocsoporttal is. A molekulán 23 kiralitáscentrum található. A szelektoron található funkciós csoportok változatossága és nagy száma miatt ez a molekula is számos vegyületcsoport királis elválasztására alkalmas (2.3.3. ábra) [34]. Berthod és mtsai. kimutatták, hogy nem védett aminosavak, vagy egyéb deprotonálható csoportot tartalmazó vegyületek esetén az elsődleges kölcsönhatás a KÁF primer aminocsoportja és a mintamolekula deprotonált csoportja között jön létre. Ezt bizonyítandó Cu^{2+} -ionokat tartalmazó mozgófázist használtak olyan vegyületek analizésére, melyek enantiomerejeinek elválasztását már előzőleg sikeresen megoldották.

2.3.3. ábra

A teicoplanin molekula szerkezete



kölcsönhatások, illetve normál fázisban az aromás gyűrűk között létrejövő π - π mágneses kölcsönhatások.

közreműködésével létrejöhetnek ionos, dipólus-dipólus, sztérikus kölcsönhatások illetve hidrogén-kötések.

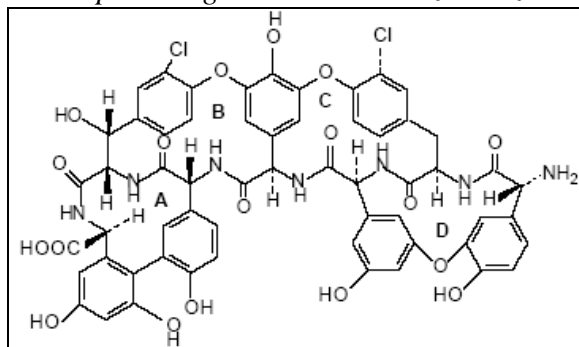
A vankomicin aglikon molekula a vankomicin módosított származéka. Mindössze annyiban tér el a vankomicintól, hogy a cukorrészeket eltávolították a molekuláról.

Megfigyelték, hogy réz tartalmú eluens alkalmazása során az enantioszelektivitás jelentősen csökkent vagy megszűnt. Ez minden bizonnyal a teicoplanin primer aminocsoportja és a rézionok között létrejött komplex képződése miatt következett be [35]. Számos járulékos kölcsönhatás létrejött is kedvezményezett, például a hidrogén-kötések, hidrofób-hidrofób-, dipólus-dipólus- és sztérikus

A Chirobiotic™ TAG oszlop királis szelektora a teicoplanin aglikon molekula. Ez gyakorlatilag egy cukorrészeitől megfosztott teicoplanin molekula, mely számos esetben hatékonyabbnak bizonyult a teicoplaninnál (2.3.4. ábra). Ez azzal magyarázható, hogy a

2.3.4. ábra

A teicoplanin aglikon molekula szerkezete

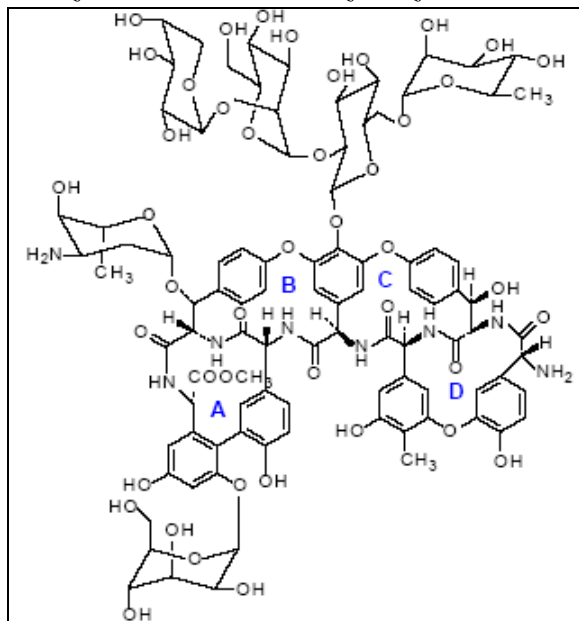


Az aglikon molekuláról ezeket a gátló részeket eltávolították így ott a királis felismerésben jelentős részt vállaló hidrofób molekularészletek könnyebben hozzáférhetőek [36].

makrociklusos gyűrűk a teicoplanin esetén is hidrofób üregeket alkotnak, amelyekben létrejövő kölcsönhatások jelentősen segítik a vegyületek visszatartását és elválasztását. Ezeket az üregeket a szénhidrát egységek lefedik, így szterikusan gátolják az ott fellépő kölcsönhatások létrejöttét.

2.3.5. ábra

A risztocetin A molekula szerkezete



A két molekula hasonló felépítése miatt a kölcsönhatások mibenléte is hasonló, kivéve azt hogy a karboxilcsoport hiánya miatt a pozitív töltésű mintamolekulák elválasztása nem kedvezményezett.

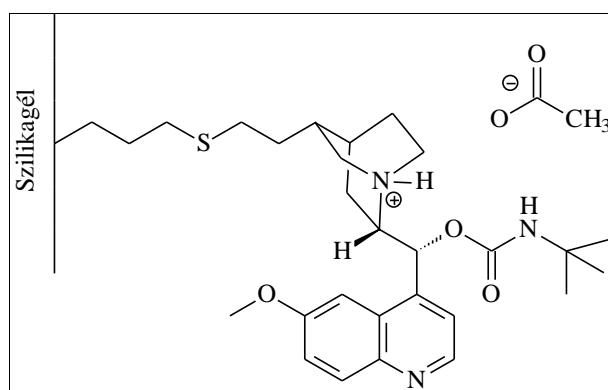
A risztocetin A molekula (2.3.5. ábra) alapváza hasonló a teicoplanin alapvázához, szintén négy makrociklusos gyűrű alkotja, mely hét aromás gyűrűt tartalmaz. A makrociklusokhoz azonban nem három, hanem hat cukoregység kapcsolódik, így a kiralitáscentrumok száma is 38-ra növekszik. Jelentős különbség még, hogy a molekula a karboxilcsoport helyett egy metil-észtercsoportot tartalmaz. A molekulán található primer aminocsoportnak hasonlóan fontos szerep jut, mint a teicoplanin esetében.

A kínafa alkaloidjait királis savak rezolválására és sztereoselektív szintézisek katalizátoraként is használják [37-39]. Királis szelektorként elsőként Petterson és mtsai.

alkalmaztak kinint és kinidint, először királis mozgófázis adalékként [40], majd szilikagélhez kötött királis állófázisként [41]. A legutóbbi fejlesztések során Lindner és mtsai. a kinin és kinidin különböző karbamát származékait alkalmazták HPLC-ben, kapilláris kromatográfiában és kapilláris elektroforézisben. Az általunk alkalmazott királis oszlop

2.3.6. ábra

A *Prontosil-tBuCQN* királis szelektorának szerkezete



(*Prontosil*[™] 120-5 *tBuCQN*) szelektora kinin molekula, melyhez hidroxil-csoportján keresztül egy *tert*-butil-karbamát csoportot kötöttek (2.3.6. ábra). Ezen típusú molekulák rendelkeznek egy terciér aminocsoporttal, mely a megfelelő pH-n pozitív töltésű és gyenge anioncserélő tulajdonsággal rendelkezik. Ebből következően kizárólag anionos vegyületek elválasztására alkalmas,

ezek analízise viszont nagy hatékonysággal elvégezhető [42-44]. Kiválóan alkalmas még *N*-védett aminosavak enantiomerjeinek elválasztására is. A fent említetten kívül egyéb kölcsönhatások kialakulására is lehetőség nyílik, például a kinolin gyűrű π -bázikus sajátosságának köszönhetően π -sav π -bázis kölcsönhatások alakulhatnak ki a KÁF és a mintamolekulák között. Létrejöhetnek még azonban dipólus-dipólus kölcsönhatások és hidrogén-kötések is.

3. Kísérleti rész

3.1. Az alkalmazott készülékek

Folyadékkromatográfiás készülékek:

I. rendszer: M-600 jelű alacsony nyomású gradiens pumpa, M-996 jelű fotodiódasoros detektor, Millennium 32 jel- és adatfeldolgozó szoftver (Waters, Milford, USA).

II. rendszer: 1525 jelű nagynyomású bináris pumpa, 487 jelű kétcsatornás detektor, 717 jelű automata mintaadagoló, in-line gáztalanító rendszer, Breeze jel- és adatfeldolgozó szoftver (Waters, Milford, USA).

Mindkét rendszer tartalmaz egy-egy 7125 jelű 20 μ l térfogatú manuális adagolót is (Rheodyne, Cotati, USA).

Termosztát:

MK-70 jelű, hűtő-fűtő termosztát (Mechanik Prüfgeräte, Medlingen, Németország)

pH mérő:

420 A típusú precíziós digitális pH-méter (Orion, Beverly, USA)

3.2. Kromatográfias oszlopok

C₁₈ alapú oszlop:

Vydac 218TP™ Series 5 µm, 250 mm × 4,6 mm I.D. (Grace Vydac, Hesperia, USA).

Királis kolonnák:

Cellulóz-alapú oszlopok: Chiralcel™ OD-H és OD-RH, mindkettő állófázisa cellulóz-*tris*-(3,5-dimetilfenil-karbamát) 5 µm, 150 mm × 4 mm I.D. (Daicel, Tokió, Japán).

Ciklodextrin-alapú oszlopok: Cyclobond™ I 2000, állófázisa szilika gélen kötött β-CD, Cyclobond™ I 2000 RSP, állófázisa (*R,S*)-2-hidroxi-propil-éterrel módosított β-CD, Cyclobond™ I 2000 SN, állófázisa (*S*)-naftil-etil-karbamáttal módosított β-CD, Cyclobond™ III, állófázisa α-CD, az oszlopok dimenziói és gyártója megegyezik, 5 µm, 250 mm × 4,6 mm I.D. (Astec, Whippany, USA).

Makrociklusos antibiotikum-alapú oszlopok: Chirobiotic™ V, állófázisa vankomicin, Chirobiotic™ VAG, állófázisa vankomicin aglikon, Chirobiotic™ T, állófázisa teicoplanin, Chirobiotic™ TAG, állófázisa teicoplanin aglikon, Chirobiotic™ R, állófázisa risztocetin A, az oszlopok dimenziói és gyártója megegyezik, 5 µm, 250 mm × 4,6 mm I.D. (Astec, Whippany, USA).

Kinin-alapú, anioncserélő típusú állófázis: Prontosil™ 120-5 tBuCQN, állófázisa kinin *terc*-butil-karbamát származék, 5 µm, 150 mm × 3 mm I.D. (Bischoff Chromatography, Leonberg, Németország)

3.3. Felhasznált vegyszerek

A mozgófázis készítéshez használt HPLC-s tisztaságú szerves oldószerek, metanol (MeOH), acetonitril (MeCN), etanol (EtOH), 2-propanol (IPA), és hexán (Hex) Merck gyártmányúak voltak (Darmstadt, Németország). A fordított fázisú eluensek készítéséhez úgynevezett Milli-Q vizet használtunk, melyet felhasználás előtt 0,45 µm-es pórusátmérőjű HV típusú szűrőn szűrtünk (Millipore, Milford, USA). A különböző mozgófázis adalékok közül a trietil-amin (TEA), a dietil-amin (DEA), a jégecet (gl. AcOH), a trifluor-ecetsav

(TFA), az ammónium-acetát (NH₄OAc) és a foszforsav Merck (Darmstadt, Németország), míg a kálium-hexafluoro-foszfát (KPF₆) pedig Aldrich (Steinheim, Németország) gyártmányú, illetve valamennyi analitikai tisztaságú volt.

Az aminosavak acilezésére használt reagensek közül az *N*-benziloxikarboniloxi-szukcinimidet (Z-OSu), az *N*-3,5-dinitro-benziloxikarboniloxi-szukcinimidet (DNZ-OSu), és a 3,5-dinitro-benzoil-kloridot (DNB-Cl) a Flukától (Buchs, Svájc), míg az *N*-benziloxi-szukcinimidet (Bz-OSu) (Függelék 6. ábra) a Bachemtől (Bubendorf, Svájc) szereztük be. A királis származékképző reagensek közül az *N*- α -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alanin-amidot (FDAA) és a 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil-izotiocianátot (GITC) a Sigma (St. Louis, USA), míg az *N*-(4-nitrofenoxi-karbonil)-L-fenilalanin-2-metoxietil-észtert a Solvay-Peptisyntha (Brüsszel, Belgium) állította elő.

Az eluenseket a komponensek jelzett térfogatának keverésével állítottuk elő, majd ha szükséges volt a pH-t titrálással a megfelelő értékre állítottuk. Ezt követően 0,45 μ m-es pórusátmérőjű, HV típusú szűrőn szűrtük, majd ultrahangos fürdőben eltávolítottuk az oldott gázokat. A mérések alatti gáztalanításra He átbuborékolatást vagy in-line gáztalanítót használtunk. Az ismert pH-jú és koncentrációjú TEAA puffert a megfelelő koncentrációjú TEA oldat jégecetes titrálásával nyertük.

3.4. Mintaelőkészítési és származékképzési eljárások

A mintavegyületekből 1 mg/ml koncentrációjú oldatokat készítettünk, eluensben oldva azokat. Ha szükséges volt, a mintákat eluenssel tovább hígítottuk az optimális mérési tartomány eléréséhez.

Az acilezési és származékképzési reakciókat jól megalapozott és általánosan alkalmazott eljárások alapján végeztük [8, 13, 45, 46], melyeket néhány esetben ha szükségesnek bizonyult, módosítottunk (lásd később).

Az oszlopok holt idejét 0,001 M-os kálium-bromid oldat injektálásával határoztuk meg a C₁₈-as, a ciklodextrin alapú és a makrociklusos antibiotikum alapú állófázisuk esetén, a kinin alapú oszlop esetén 0,01 M-os tio-karbamid oldatot alkalmaztuk, míg a cellulóz alapú oszlopok holt idejének meghatározásához eltérő összetételű eluenst fecskendeztünk a mozgófázis áramába.

3.5. Vizsgált vegyületek

A vizsgált vegyületek öt csoportra oszthatóak, a vegyületek pontos elnevezését és a beszerzési forrásukat illetve az előállításukra vonatkozó hivatkozásokat itt, míg szerkezetüket a „Függelék”-ben tüntetjük fel.

Az első csoportba sorolhatóak a bicalutamid és gyártásának közti- illetve melléktermékei. A vegyületek elnevezése és számozása: (\pm) és (-)-bicalutamid (**1**), (\pm) és (-)-3-klór-*N*-(4-ciano-3-trifluorometil-fenil)-2-hidroxi-2-metil-propánsavamid (**2**), (\pm) és (-)-*N*-(4-ciano-3-trifluorometil-fenil)-2-metil-oxirán-karboxamid (**3**), (\pm) és (-)-4-fluor-fenil-szulfonil-2-hidroxi-2-metil-propionsav (**4**), (\pm) és (-)-3-hidroxi-*N*-(4-ciano-3-trifluorometil-fenil)-2-hidroxi-2-metil-propánsavamid (**5**) [73-75] (Függelék 1. ábra). A vegyületeket munkatársaink állították elő a jelzett szabadalmak alapján.

A második csoportba a pirrolidin és piperidin gyűrűt és egy szabad gyököt tartalmazó β -aminosavakat soroltuk: (*3R,4R*)- és (*3S,4S*)-*transz*-3-amino-1-oxil-2,2,5,5-tetrametil-pirrolidin-4-karbonsav (**6**), (*3R,4R*)- és (*3S,4S*)-*transz*-3-*N*-(fluorenil-metiloxikarbonil)-amino-1-oxil-2,2,5,5-tetrametil-pirrolidin-4-karbonsav (**7**) (POAC), (*3R,4R*)- és (*3S,4S*)-*cisz*-4-amino-1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piridin-3-karbonsav (**8**), (*3R,4R*)- és (*3S,4S*)-*cisz*-4-amino-1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piridin-3-metilészter (**9**), (*3R,4R*)- és (*3S,4S*)-*cisz*-4-*N*-(fluorenil-metiloxikarbonil)-amino-1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piridin-3-karbonsav (**10**) (β -TOAC) [47, 48] (Függelék 2. ábra). A vegyületeket munkatársaink állították elő a jelzett publikációk alapján.

A harmadik csoportba a szekunder α -aminosavak, az úgynevezett iminosavak kerültek: a (*2R,4R*)- és (*2S,4S*)-4-hidroxi-pirrolidin-2-karbonsavat (**11**) és a racém piperazin-2-karbonsavat (**17**) az Aldrichtól (Steinheim, Németország) szereztük be. A racém α -metil-prolint (**12**) [49], az (*S*)-1,2,3,6-tetrahidropiridin-2-karbonsavat (**13**) [50] (a racém keverék előállítását az (*S*)-izomer 2 M-os NaOH oldatban történő refluxáltatásával hajtottuk végre), az (*R*)- és (*S*)-piperidin-2-karbonsavat (**14**) [51], a racém és (*2S,4R*)-4-hidroxi-piperidin-2-karbonsavat (**15**) [50, 52], a racém és (*2S,5R*)-5-hidroxi-piperidin-2-karbonsavat (**16**) [50, 53], a racém 5-metil-piperazin-2-karbonsavat (**18**) [54], a racém és (*S*)-morfolin-3-karbonsavat (**19**) [51, 55] és a racém és (*S*)-tiomorfolin-3-karbonsavat (**20**) [56, 57] munkatársaink állították elő a jelzett hivatkozások alapján (Függelék 3. ábra).

A glicin analóg aminosavakat a negyedik csoportba soroltuk. A racém és az (*S*)-fenil-glicint (**21**), az (*R*)- és (*S*)-hidroxi-fenil-glicint (**22**), a racém tienil-glicint (**24**) és az (*R*)- és (*S*)-leucint (**26**) az Aldrich cégtől szereztük be (Steinheim, Németország). Az (*R*)- és (*S*)-

indanil-glicint (**23**) [58] és a racém metallil-glicint (**25**) [59] munkatársaink állították elő a jelzett publikációk alapján (Függelék 4. ábra).

Az ötödik csoportba a fenilalanin és analógjai kerültek, melyek közül az (*R*)- és (*S*)-fenilalanint (**27**) a Sigmától (St. Louis, USA), a racém és (*S*)-4'-fluor-fenilalanint (**34**) és a racém 3'-fluor-fenilalanint (**35**) az Aldrichtől vásároltuk. A többi aminosavat munkatársaink készítették az alább jelzett közlemények alapján: (*R*)- és (*S*)-4'-metil-fenilalanin (**28**) [60], (*R*)- és (*S*)-2'-metil-fenilalanin (**29**) [61], racém 2',4'-dimetil-fenilalanin (**30**) [62], racém 2',4',6'-trimetil-fenilalanin (**31**) [63], racém *eritro*- (**32**) és *treo*-3- β -metil-fenilalanin (**33**) [64], (*R*)- és (*S*)-2',3',4',5',6'-pentafluor-fenilalanin (**36**) [65] valamint racém 1-naftilalanint (**37**) [66] (Függelék 5. ábra).

4. Kísérleti eredmények és értékelésük

4.1. A bikalutamid és származékai királis kromatográfiás vizsgálata

4.1.1. Irodalmi áttekintés

A prosztatarák az egyik legelterjedtebb rák típus. Magyarországon ez a harmadik leggyakoribb daganatos betegség a tüdő- és a bőrrák után [67]. A prosztatarák azonban egy viszonylag jól kontrollálható és kezelhető betegség. Huggins és mtsai. 1941-ben figyelték meg és bizonyították, hogy az androgének (férfi nemi hormonok) elvonása gátolja a prosztata daganat fejlődését [68]. Munkásságuk folyamán kimutatták, hogy a tesztoszteron termelő mirigy (here) eltávolítása 70-80%-kal javította az előrehaladott prosztatarákos beteg életkilátásait. Kutatásaik elismeréseként 1966-ban Nobel-díjat kaptak.

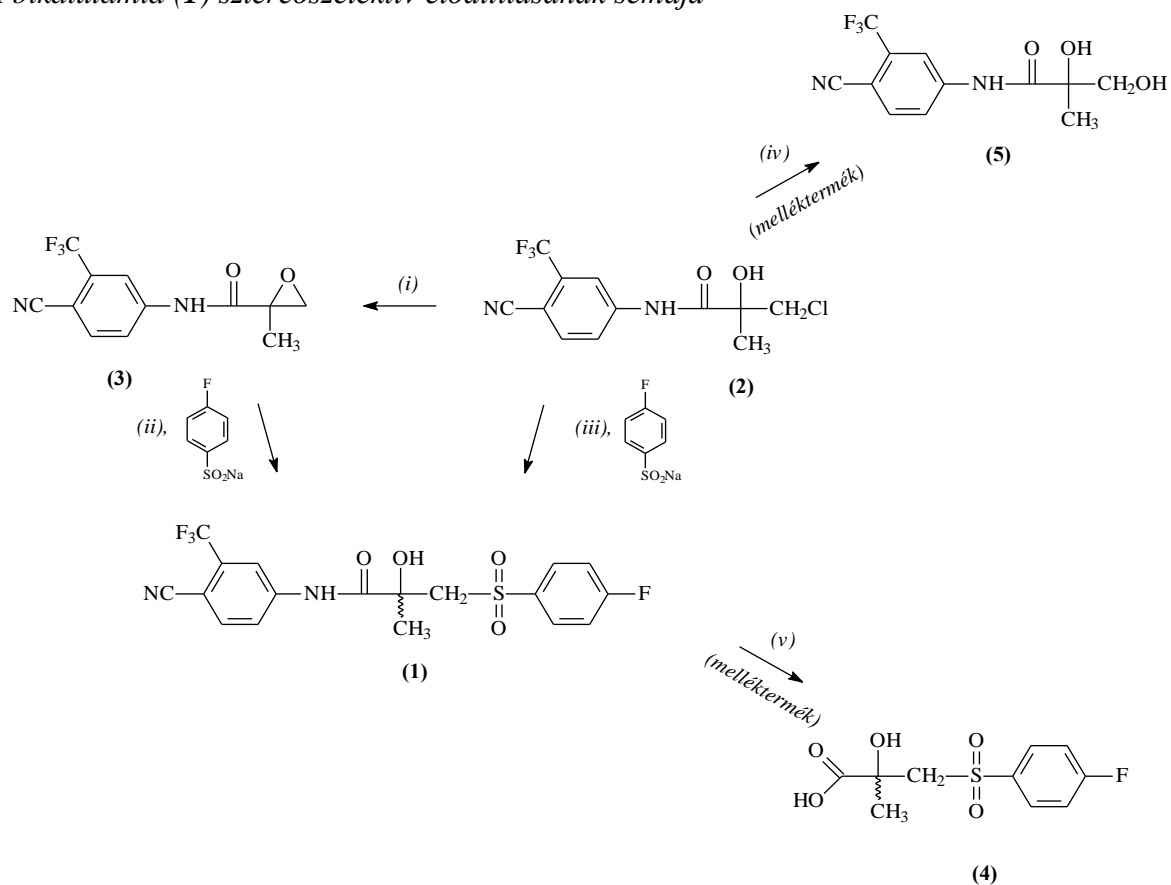
A prosztatarák kezelésére több lehetőség kínálkozik. A betegség korai stádiumában a daganat még eltávolítható, vagy sugárterápiával eredményesen kezelhető. A betegség előrehaladott stádiumában sebészeti vagy kémiai kasztrációt alkalmaznak. A kémiai kasztráció azt jelenti, hogy megszüntetik a szervezetben az androgének termelését, így azok prosztatára gyakorolt hatását. Ebből a célból ún. LHRH (luteinizáló hormon-releasing hormone) agonistát juttatnak a szervezetbe, mely csökkenti, majd megszünteti az agyalapi mirigy (hipotalamusz) által termelt luteinizáló hormon (sárgatest serkentő hormon) herékre gyakorolt hatását, így azokban a tesztoszteron termelése megszűnik. A kémiai kasztráció számos előnnyel bír a műtéti kasztrációval szemben, ezek közül a legfontosabbak, hogy ez a módszer reverzibilis és a páciensek számára pszichikailag kevésbé megterhelő. A kezelés során azonban szükség van a prosztatán az androgén kötőhelyek blokkolására, mivel a mellékvesekéreg szintén termel androgént, így csak ekkor küszöbölhető ki teljesen az

androgének daganatra gyakorolt hatása, ezt az eljárást kombinált androgén blokádnak nevezik [69].

Az androgén érzékeny kötőhelyek blokkolására manapság nem-szteroid-alapú antiandrogén vegyületeket használnak, ezek közül a legjelentősebbek a flutamid, a nilutamid és a bicalutamid (Casodex®) (1). Mindhárom vegyületet a kombinált androgén blokád kezelése során használják, azonban a bicalutamid (1) monoterápiás alkalmazásával kapcsolatban kedvező és ígéretes klinikai kísérletek zajlottak le [70]. Az antiandrogének monoterápiás alkalmazásának legfőbb előnye a kasztrációval szemben, hogy a páciensek megőrizhetik szexuális potenciájukat a kezelés során. A flutamid és nilutamid monoterápiás alkalmazása ellenjavallt, ezek ugyanis nemcsak specifikusan a prosztata szövetein, hanem az agyalapi mirigy androgén érzékeny szövetein is kötődnek, ezáltal egy öngerjesztő tesztoszterontermelő folyamatot generálva. A flutamid és a nilutamid ezek szerint csak a kombinált androgén blokád kezelésben alkalmazható [71].

4.1.1. ábra

A bicalutamid (1) sztereoszelektív előállításának sémája



Körülmények: (i) 68% (m/m)-os NaOH acetonban, (ii) 43% (v/v)-os AcOH metanolban, (iii) 62% (m/m)-os tetrabutyl-ammonium-bromid metanolban, (iv) és (v) kromatográfias elválasztás a reakcióelegytől [73-75].

A bikalutamid az előző két vegyület hatásával szemben csak kismértékben kötődik a prosztatán kívüli androgén érzékeny szövetekhez, így elkerülhető a nem kívánt agonista hatás. A bikalutamid királis vegyület, melynek csak *R*-(-) enantiomerje rendelkezik kedvező biológiai hatással, az *S*-(+) enantiomer biológiailag inaktív. Mindkét enantiomer metabolizmusa a májban játszódik le, a vegyület lebontása komoly terhet ró a májra, különösen májelégtelenségben szenvedő páciensek esetén [72]. A monoterápiás kezelés során nagy dózisú hatóanyagot juttatnak a szervezetbe (150 mg naponta) [70], így célszerű a máj kímélése érdekében csak a hatékony sztereoizomert alkalmazni.

Munkatársaink egy új sztereoselektív szintézis eljárást dolgoztak ki az (-)-bikalutamid előállítására. Az **1** vegyületet 3-klór-*N*-(4-ciano-3-trifluorometil-fenil)-2-hidroxi-2-metil-propánamid (**2**) és nátrium-4-fluor-fenil-szulfínát reakciójával állítják elő fázistranszfer körülmények között (4.1.1. ábra) [73-75]. A reakció során az *N*-(4-ciano-3-trifluorometil-fenil)-2-metil-oxirán-karboxamid (**3**) köztiterméként, a 4-fluor-fenil-szulfonil-2-hidroxi-2-metil-propionsav (**4**) és a 3-hidroxi-*N*-(4-ciano-3-trifluorometil-fenil)-2-hidroxi-2-metil-propánamid (**5**) mellékterméként detektálható a reakcióelegyben. A feladatunk az volt, hogy módszereket dolgozzunk ki a szintézis kiindulási anyagának, a köztiterméknek, a melléktermékeknek és a termék királis tisztaságának ellenőrzésére.

A szakirodalomban csupán néhány hivatkozást találtunk a bikalutamid (**1**) enantiomerjeinek HPLC-s elválasztására. Bargman-Leyder és mtsai. különböző modellvegyületek, ezek között a racém bikalutamid, felhasználásával hasonlították össze szisztematikusan a folyadékkromatográfiás és a szuperkritikus folyadékkromatográfiás módszereket. Két királis oszlopot használtak, az egyik a cellulóz származék Chiralcel™ OD, míg a másik az amilóz származék Chiralpak™ AD volt [76]. James és mtsai. szintén elválasztották az **1** vegyület enantiomerjeit egy cellulóz származék Chiralcel™ OJ-H oszlopon, de egyéb kromatográfiás körülményeket nem közöltek [72]. Tucker és Chesterson az **1** vegyület redukált, tioéter származékának enantiomerjeit választották el egy (*R*)-*N*-benzoil-fenil-glicinnel adalékolt Spherisorb-NH₂ oszlopon [77].

4.1.2. A kromatográfiás eredmények kiértékelése

A vizsgálatokat több különböző KÁF-on, valamint normál és fordított fázisban és poláris-ionos kromatográfiás módban végeztük. A dolgozat egyszerűsítése végett a táblázatokban csak az optimális felbontás értékeket mutató eredményeket közöljük minden egyes kromatográfiás oszlop esetén.

4.1.3. Elválasztások cellulóz-alapú állófázisokon

Fentebb említettük, hogy az **1** vegyület enantiomerjeit korábban sikerrel választották el két különböző cellulóz alapú oszlopon is, tehát kézenfekvő volt, hogy először hasonló állófázisokon próbálkozzunk az elválasztással. Két azonos állófázissal rendelkező cellulóz-alapú oszlop állt rendelkezésünkre, az egyik normál (Chiralcel™ OD-H), míg a másik fordított fázisban (Chiralcel™ OD-RH) használható. A fordított fázisú elválasztásokra tett kísérleteink nem jártak sikerrel, így azokat nem is ismertetjük, a normál fázisú mérések során azonban az **1**, **3** és **5** vegyületek enantiomerjeit is részben vagy teljesen sikerült elválasztanunk (4.1.1. Táblázat).

4.1.1. Táblázat

A bicalutamid és szintézisének közti- és melléktermékei racém elegyének optimalizált kromatográfiás paraméterei és elúciós sorrendje cellulóz alapú állófázison

Vegyület	KÁF	Eluensösszetétel (v/v)	k_1'	k_2'	α	R_s	Elúciós sorrend
1	OD-H	90/10, a	16,84	17,92	1,06	0,86	(-)<(+)
1	OD-H	95/5/0.1, b	34,99	36,56	1,04	0,85	(-)<(+)
1	OD-H	90/10, c	6,64	7,36	1,11	1,20	(-)<(+)
3	OD-H	60/40, a	0,39	0,63	1,61	2,11	(-)<(+)
5	OD-H	90/10, a	2,73	2,92	1,07	0,86	(-)<(+)
5	OD-H	95/5, a	10,48	11,20	1,07	0,92	(-)<(+)
5	OD-H	96/4/0.2, b	12,25	23,26	1,08	0,90	(-)<(+)
5	OD-H	98/2/0.1, b	36,44	40,10	1,10	1,12	(-)<(+)

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Chiralcel™ OD-H; eluensösszetétel, a, Hex/IPA (v/v); b, Hex/IPA/DEA (v/v); c Hex/EtOH (v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml/perc; detektálás hullámhossza, 254 nm; hőmérséklet, 25 °C; holt idő, 3,90 perc.

A kromatográfiás rendszer tipikus normál fázisú rendszerként működött, azaz csökkentve a mozgófázis alkoholtartalmát, nőtt a visszatartás. A DEA eluenshez adagolásának, mely általában élesebb csúcsalakhhoz és jobb felbontáshoz vezet, ebben az esetben nem volt jelentős hatása az elválasztás hatékonyságára. Az **1** vegyület sztereoizomerjeinek elválasztásában a Hex/EtOH rendszer alkalmazása előnyösebbnek bizonyult, ezzel szemben az **5** vegyület enantiomerjeinek elválasztása során jobb eredményeket produkált a Hex/IPA rendszer. A **3** vegyület, mely az **1** vegyület gyártásának egyik köztiterméke, sztereoizomerjei kiválóan elválaszthatóak a Chiralcel™ OD-H oszlopon

(Függelék 7. ábra). Ez különösen hasznos, mivel ezen vegyület analízise problémákba ütközik aminocsoportot tartalmazó állófázisokon, ugyanis a vegyület reaktív epoxid csoportja könnyen reagál aminocsoportokkal.

Fordított fázisú mérések során, a Chiralcel™ OD-RH oszlopon, különböző mozgófázisösszetételeket és puffereket használtunk (víz/MeCN, 0,1 M NaH₂PO₄ (aq)/MeCN, 0,05 M KPF₆/MeCN), de nem sikerült részleges elválasztást sem elérnünk. Az alkalmazott cellulóz alapú állófázisok hatástalannak bizonyultak a **2** és **4** vegyületek enantiomerjeinek elválasztásában.

4.1.4. Elválasztások makrociklusos antibiotikum-alapú állófázisokon

A makrociklusos glikopeptid-alapú állófázisokon sikerrel választottuk el az **1**, **4** és **5** vegyületek enantiomerjeit egy vagy több kromatográfias módban (4.1.2. Táblázat). Sajnos ezeken az állófázisokon nem volt lehetséges a **2** és **3** vegyületek analízise, hiszen ezek reaktív klór- és epoxidcsoportjai könnyen reakcióba léphettek volna a szelektor aminocsoportjaival. Egyetlen próbálkozásunk is a királis oszlopok komoly károsodását idézhette volna elő.

Chirobiotic™ T oszlopon, normál fázisban, Hex/IPA eluens rendszerben az **1** és **5** vegyületek sztereoizomerjeit kitűnő felbontással sikerült elválasztanunk (Függelék 7. és 8. ábra). Ez az oszlop kevésbé volt hatékony fordított fázisban, viszont poláris-ionos módban részleges enantiomer elválasztást sikerült elérnünk a **4** vegyület vizsgálata során.

A teicoplanin aglikon-alapú (Chirobiotic™ TAG) állófázison kiváló hatékonysággal sikerült elválasztanunk az **1** és **4** vegyületek enantiomerjeit fordított fázisban és poláris-ionos módban. Az **1** vegyület felbontását 0,1% TEAA (aq)/MeOH eluens rendszerben a mozgófázis MeOH tartalmát és a puffer pH-ját (pH 4,1-6,5) változtatva optimalizáltuk.

A vankomicin-alapú Chirobiotic™ V és VAG oszlopok kis szelektivitást mutattak az **1** vegyület enantiomerjei iránt, ezen állófázisok alkalmazása során kisebb felbontást tapasztaltunk, mint korábban a teicoplanin-alapú állófázisok használata során. A tapasztalt felbontás értékek hasonlóak voltak a Chiralcel™ OD-H oszlopon megfigyelt értékekhez, azonban ezek a felbontás értékek jóval kisebb visszatartással párosultak.

A makrociklusos antibiotikum-alapú oszlopok közül a Chirobiotic™ R oszlop rendelkezett a legnagyobb szelektivitással a **4** vegyület sztereoizomerjeivel szemben. A **4** vegyület, mely karboxilcsoportot tartalmaz, enantiomerjei jó felbontással elválaszthatók voltak

4.1.2. Táblázat

A bikalutamid és szintézisének közti- és melléktermékei racém elegyének optimalizált kromatográfiás paramétereit és elúciós sorrendje makrociklusos glikopeptid-alapú állófázisokon

Vegyület	KÁF	Eluensösszetétel (v/v)	k_1'	k_2'	α	R_s	Elúciós sorrend
1	T	10/90, a	2,12	2,97	1,40	2,25	(+)<(-)
4	T	100/0.1/0.1, b	0,90	1,06	1,18	1,05	(-)<(+))
5	T	10/90, a	1,67	2,29	1,37	2,44	(+)<(-)
1	TAG	10/90, a	3,96	5,07	1,28	0,80	(+)<(-)
1	TAG	30/70, c	0,22	0,37	1,68	1,20	(+)<(-)
1	TAG	40/60, c	0,67	0,93	1,38	1,33	(+)<(-)
1	TAG	50/50, c	2,23	2,92	1,31	1,62	(+)<(-)
4	TAG	100/0,1/0,1, b	0,68	1,02	1,50	1,52	(-)<(+))
1	V	10/90, a	2,69	3,11	1,16	0,90	(-)<(+))
1	V	40/60, a	5,73	6,71	1,17	1,01	(-)<(+))
1	VAG	10/90, a	2,13	2,40	1,15	1,00	(-)<(+))
4	R	100/0,1/0,1, b	0,61	1,01	1,66	2,76	(-)<(+))

Kromatográfiás körülmények: oszlop, T, Chirobiotic™ T; TAG, Chirobiotic™ TAG; V, Chirobiotic™ V; VAG, Chirobiotic™ VAG; R, Chirobiotic™ R; QN, Prontosil™ 120-5 tBuCQN; eluensösszetétel, a, Hex/IPA (v/v); b, MeOH/AcOH/TEA (v/v/v); c, 0,1% TEAA (aq) (pH 4,1)/MeOH (v/v); d, 0,2 M NH₄OAc (aq) /MeOH (pH 6,0) (v/v); áramlási sebesség, 1 ml/perc; detektálási hullámhossz, 254 nm; hőmérséklet, 25 °C; holt idő, Chirobiotic™ T, t_0 = 2,50 perc, Chirobiotic™ TAG, t_0 = 2,77 perc, Chirobiotic™ V, t_0 = 3,28 perc, Chirobiotic™ VAG, t_0 = 3,25 perc n, Chirobiotic™ R, t_0 = 4,21 perc, and Prontosil™, t_0 = 1,80 perc.

azokon a Chirobiotic™ oszlopokon, melyek primer aminocsoportja a makrociklusos gyűrűk egyikén, tehát központi helyen található (a vankomicin primer aminocsoportja az egyik cukoregységen helyezkedik el) (Függelék 8. ábra). Ez a tény rávilágít arra, hogy a KÁF protonált aminocsoportja és a mintavegyület deprotonált karboxilcsoportja közti ionos kölcsönhatás kulcsfontosságú a királis felismerésben, azzal a megkötéssel, hogy a királis szelektivitás létrejöttében az aminocsoport pozíciója is meghatározó.

4.1.5. Elválasztások ciklodextrin- és kinin-karbamát-alapú állófázisokon

Munkánk során több ciklodextrin-alapú KÁF-on is kísérletet tettünk az enantiomerek elválasztására. Ezek között volt az α -CD-alapú Cyclobond™ III és a β -ciklodextrin-alapú Cyclobond™ I, Cyclobond™ I 2000 SN és Cyclobond™ I 2000 RSP oszlopok, melyek

természetes és származékképzett ciklodextrint tartalmaznak királis szelektorként. A fent említett oszlopok közül egyedül a Cyclobond™ I 2000 SN bizonyult alkalmasnak királis elválasztásra a vizsgálataink során (4.1.3 Táblázat). Az **1** vegyület enantiomerjeit tökéletesen sikerült elválasztanunk gradiens elúcióval. Ez volt az egyetlen oszlop, melyen sikerült a reaktív **2** vegyület sztereoizomerjeit elválasztanunk Hex/EtOH eluens rendszerben a (Hex/IPA rendszer kevésbé bizonyult hatékonynak) (Függelék 7. ábra). A másik reaktív közttermék, az epoxid gyűrűt tartalmazó **3** vegyület sztereoizomerjeinek felbontását egyik eluensrendszerben sem sikerült 1-nél nagyobb értékre javítanunk.

4.1.3. Táblázat

A bicalutamid szintézise során keletkező közti- és melléktermékek racém elegyének optimalizált kromatográfiai paraméterei és elúciós sorrendje ciklodextrin és kinin-karbamát-alapú állófázisokon

Vegyület	KÁF	Eluens- összetétel (v/v)	k_1'	k_2'	α	R_s	Elúciós sorrend
2	2000 SN	80/20, a	4,62	4,96	1,07	0,70	(+)<(-)
2	2000 SN	90/10, b	5,67	6,10	1,08	1,25	(+)<(-)
2	2000 SN	92.5/7.5, b	9,44	10,19	1,08	1,30	(+)<(-)
3	2000 SN	90/10, a	11,58	11,95	1,03	0,80	(-)<(+))
3	2000 SN	90/10, b	4,45	4,60	1,03	0,70	(-)<(+))
4	QN	10/90, c	6,99	8,16	1,17	1,63	(+)<(-)

Kromatográfiai körülmények: oszlop, **2000 SN**, Cyclobond™ I 2000 SN; **QN**, Prontosil™ 120-5 tBuCQN; eluens-összetétel, **a**, Hex/IPA (v/v); **b**, Hex/EtOH (v/v); **c**, 0,2 M NH₄OAc (aq)/MeOH (pH 6,0) (v/v); áramlási sebesség, **2000 SN**, 0,8 ml/perc, **QN**, 0,5 ml/perc; detektálási hullámhossz, 254 nm; hőmérséklet, 25 °C; holt idő, Cyclobond I 2000 SN, $t_0 = 4,40$ perc és Prontosil, $t_0 = 1,80$ perc.

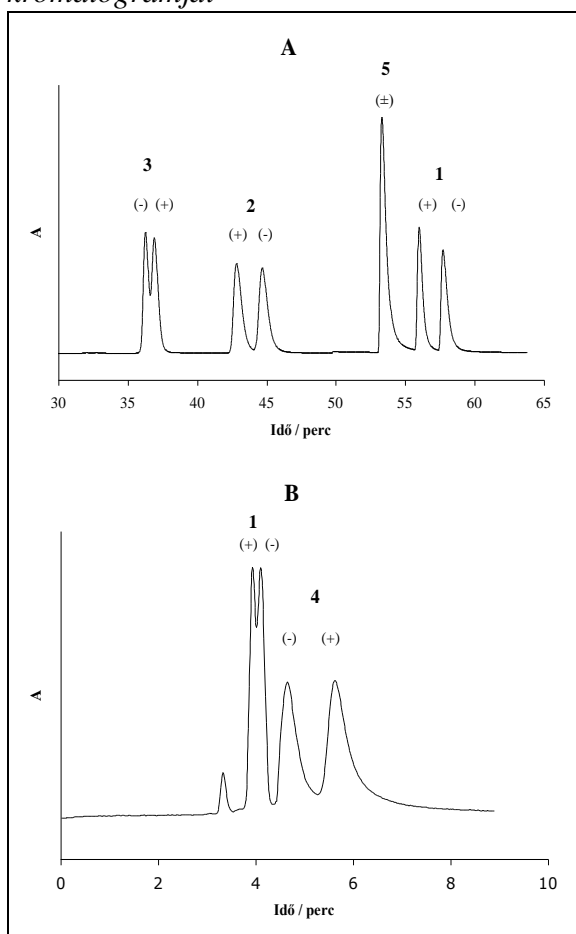
A **4** vegyület enantiomerjeit kiválóan sikerült elválasztanunk a *terc*-butil-kinin-karbamát állófázisú Prontosil™ 120-5 t-BuCQN oszlopon. Ezt a szelektort sikerrel alkalmazták korábban, *N*-acilezett aminosavak sztereoizomerjeinek elválasztására [42-44].

4.1.6. A vizsgált vegyületek enantiomerjeinek elválasztása egy kromatogramon belül

Megkíséreltük kivitelezni az összes vizsgált vegyület enantiomerjeinek elválasztását egyetlen kromatogramon belül. Több, már említett oszlopon próbáltuk meg elválasztani a különböző komponensek enantiomerjeit. A vizsgálatok során erre a feladatra a Cyclobond™ I

4.1.2. ábra

Az **1-5** vegyületek keverékének kromatogramjai



Kromatográfiai körülmények: oszlop, (A) Cyclobond™ I 2000 SN, (B) Chirobiotic TAG™; mozgó fázis, (A) (a) Hex, (b) EtOH, gradiens elúció, 0 perc (b) 5%, 20 perc (b) 5%, 21 perc (b) 10%, 45 perc (b) 10%, 65 perc (b) 30 % 66 perc (b) 5%, (B) MeOH/AcOH/TEA = 100/0,1/0,1 (v/v/v); áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; hőmérséklet, 25 °C detektálási hullámhossz, 254 nm.

valamint gyártásának közti- és melléktermékeinek királis analízise egyetlen kromatogramon belül nem oldható meg, ehhez legalább három kromatográfiai felvétel szükséges.

4.1.7. Elúciós sorrendek

Vizsgálataink során megállapítottuk az enantiomerek elúciós sorrendjét. A Chiralcel™ OD-H oszlopon mindegyik elválasztott sztereoizomer pár esetén a (-) konfigurációjú a (+) előtt eluálódott. Korábban hasonló sorrendet állapítottak meg Chiralcel™ OJ-H oszlopon történt vizsgálatok során [72]. Ilyen elúciós sorrendet figyelhettünk meg a Chirobiotic™ T és

2000 SN oszlop bizonyult a legalkalmasabbnak, egy lépcsős gradiens program segítségével. Ezen a szelektoron az öt komponensből négyet sikerült elválasztanunk, ezek közül az **1** (termék) és a **2** (közttermék) vegyület sztereoizomerjeit alapvonalig, a **3** (közttermék) vegyület enantiomerjeit részlegesen sikerült elválasztanunk. Az **5** vegyület (melléktermék) sajnos egyetlen csúcsot adott a gradiens program változtatása ellenére is. Várakozásaink szerint, a **4** vegyület (melléktermék) a fent említett gradiens elúció során nem tudtuk vizsgálni oldhatósági problémái miatt (a **4** vegyület szabad karboxilcsoportot tartalmaz, enantiomer-jeinek elválasztását csak poláris-ionos módban, vagy fordított fázisban tudtuk megvalósítani). Megpróbáltuk azonban, egy másik KÁF-on, poláris ionos módban a **4** vegyületet elválasztani legalább a terméktől, ezt sikerült kiviteleznünk a Chirobiotic™ TAG oszlopon (4.1.2. ábra). A bikalutamid (**1**)

TAG oszlopokon a **4** vegyület vizsgálata során, azonban az **1** és **5** vegyületek enantiomerjei fordított sorrendben eluálódtak ezekről az oszlopokról, azaz a sorrend (+) a (-) előtt. A Chirobiotic™ R, V és VAG oszlopok alkalmazása során a (-) enantiomer elúcióját figyeltük meg a (+) előtt. A β -CD-alapú állófázison a **2** és **3** vegyület vizsgálata során különböző elúciós sorrendeket tapasztaltunk. A **4** vegyület (+) enantiomerje eluálódott elsőként a kinin-karbamát-alapú KÁF alkalmazása során.

Könnyebben és pontosabban meghatározható a kis mennyiségben jelen lévő enantiomer szennyező mennyisége, ha az elsőként eluálódik. Ezért a kapott eredmények, azaz a különböző oszlopokon tapasztalt eltérő elúciós sorrendek rávilágítanak az elúciós sorrend megállapításának, és a megfelelő kromatográfiás oszlop kiválasztásának jelentőségére.

4.1.8. Összefoglalás

Megoldottuk a (\pm)-bicalutamid (**1**), valamint ennek gyártása során keletkező közti- és melléktermékeinek királis elválasztását különböző cellulóz-, makrociklusos glikopeptid-, α - és β -ciklodextrin- illetve kinin-karbamát-alapú állófázisokon. A vizsgált oszlopok közül a teicoplanin és a teicoplanin aglikon királis szelektort tartalmazó Chirobiotic™ T és TAG bizonyult a leghatékonyabbnak az **1**, **4** és **5** vegyület enantiomerjeinek elválasztásában. A **2** és **3** vegyület sztereoizomerjeit megfelelően sikerült elválasztanunk Cyclobond™ I 2000 SN illetve Chiralcel™ OD-H oszlopon. Az említett oszlopok, valamint a megfelelő mozgófázisösszetétel helyes megválasztásával alapvonalra történő királis elválasztások érhetőek el. Leírtuk a különböző módszerek elválasztási képességei közti különbségeket, illetve meghatároztuk az enantiomerek elúciós sorrendjét a különböző királis oszlopokon.

4.2. Szabadgyökkel rendelkező β -aminosavak enantiomerjeinek folyadékkromatográfiás vizsgálata

4.2.1. Irodalmi áttekintés

Az utóbbi években a β -aminosavak előállítása nagy érdeklődésre tart számot, különösen miután kimutatták, hogy oligomerjeik stabil helikális szerkezetbe képesek rendeződni [78, 79]. Az aliciklusos β -aminosavak fontos szerepet játszanak a biológiában és a

kémiában egyránt. A *cisz*-(1*R*,2*S*)-amino-ciklohexán-karbonsav egy gombaellenes antibiotikum [80]. Alkalmazzák az aliciklusos β -aminosavakat heterociklusok szintézisében, potenciális gyógyszerhatóanyagok készítéséhez, illetve a biciklo[2.2.2]heptán vázú aminosavak sokoldalú építőelemek számos természetben előforduló anyag, például prosztanoidok, alkaloidok és nukleozidok szintézisében [81]. A β -aminosavak nemcsak gyógyszerészetileg fontosak, hanem biológiailag aktív, módosított peptidek előállításához is használják őket. A beépített konformációsán gátolt aminosavak segítségével egy stabil és ismert konformációjú szerkezet hozható létre, ezáltal használhatóvá válik a receptorok szerkezetének kutatásában [82].

Folyamatos az érdeklődés a stabil nitroxid-gyököt tartalmazó vegyületek iránt, a biológiai rendszerek szerkezeti mobilitás és konformációs vizsgálatáról szóló tanulmányokban. Alkalmazzák őket más szabadgyökök spin-csapdájaként, oxidálószerként [83, 84], továbbá az optikailag aktív nitroxidokat használják enantioszelektív oxidálószerként, illetve akirális gyökök királis kapcsolószerként [85, 86]. A 4-amino-1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiridin-4-karbonsavat (TOAC) széles körben használják peptidek terminális és internális pozícióiba építve ESR-rel történő biológiai és konformációs vizsgálatihoz [87-89]. A szerves nitroxidok kémiájának kutatásában kétség kívül jelentős szerepet töltenek be Hideg Kálmán professzor és munkatársai alapvető fontosságú kutatásai [90-93].

Ha a konformációsán gátolt aminosavakat peptidekbe építik, akkor rendkívül fontos az aminosavak királis tisztasága, hiszen a peptidek epimerjei eltérő konformációt alakítanak ki és biológiai hatásuk is eltérhet. Munkatársaink két új, nitroxid szabadgyököt tartalmazó β -aminosav (**6**, **8**) sztereoszelektív szintézisét fejlesztették ki [94, 95]. Feladatunk volt a szintetizált enantiomerek királis elválasztása, ezáltal lehetővé tenni a sztereoizomerek optikai tisztaságának ellenőrzését. A két aminosavat *N*-Fmoc védett változatban (**7**, **10**) és egyiküket annak metil-észter formájában (**9**) is vizsgálhattuk.

Csupán néhány példát találtunk az irodalomban az optikailag aktív nitroxid szabadgyököt tartalmazó vegyületek enantiomerjeinek elválasztására. Benfaremo és mtsai. részleges elválasztást értek el a 2,5-dimetil-2,5-difenil-pirrolidin-1-oxil sztereoizomerjeinek (*S,S*)-WhelkTM-01 oszlopon történő elválasztása során [96]. Einhorn és mtsai. ChiralcelTM OD-H oszlopon választották el a *transz*-2,6,-dimetil-2,6-difenil-piperidin-1-oxil vegyület enantiomerjeit [97]. Mindkét esetben normál fázisban dolgoztak és Hex/IPA eluens rendszert alkalmaztak.

4.2.2. A szabadgyökös aminosavak enantiomerjeinek közvetlen elválasztása

A vizsgált vegyületek nitroxidcsoportjai érzékenyek a savas pH-ra, így ennek megfelelően kellett minden esetben megválasztanunk a kísérleti körülményeket.

A 4.2.1. Táblázat tartalmazza a szabad és Fmoc-kal *N*-védett gyökös β -aminosavak kromatográfiás adatait Chiralcel™ OD-RH oszlop alkalmazása esetén. Ezen az

4.2.1. Táblázat

A vizsgált szabadgyökös β -aminosavak királis elválasztásának optimalizált kromatográfiás paramétereit Chiralcel™ OD-RH oszlopon

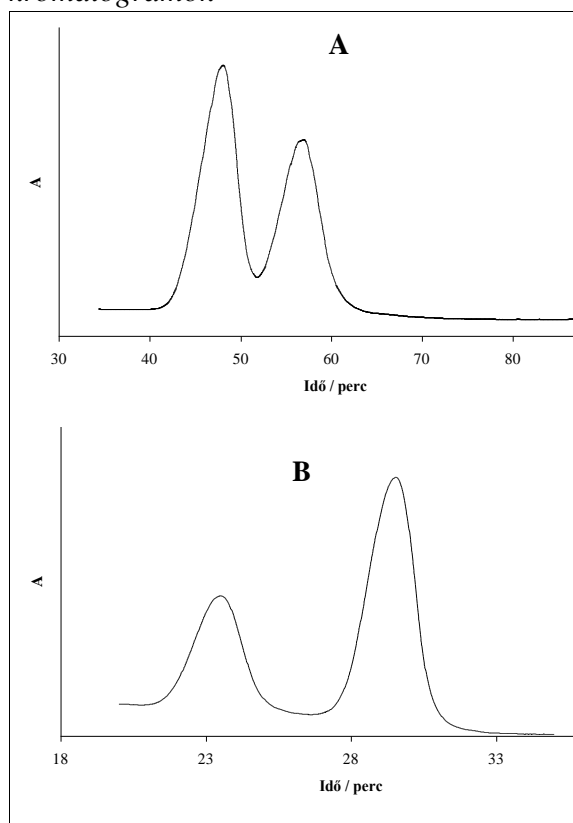
Vegyület	Mozgó fázis		k_1'	k_2'	α	R_s	Elúciós sorrend
	H ₂ O/MeCN ^a	KPF ₆ /MeCN ^{b,c,d}					
	(v/v)						
6	90/10 ^a		0,17	0,26	1,50	<0,40	(+)<(-) ⁱ
	98/2 ^{b,e,g}		0,40	0,42	1,05	<0,40	(+)<(-) ⁱ
	98/2 ^{b,f,h}		0,41	0,47	1,15	0,66	(+)<(-) ⁱ
7	70/30 ^a		13,12	18,00	1,38	0,60	(+)<(-) ⁱ
	75/25 ^b		5,75	7,17	1,22	0,42	(+)<(-) ⁱ
	75/25 ^c		4,54	5,60	1,26	0,75	(+)<(-) ⁱ
	80/20 ^d		14,09	16,88	1,20	1,11	(+)<(-) ⁱ
9	80/20 ^a		1,30	1,85	1,43	0,50	(-)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)< <(+)-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)
	90/10 ^d		2,53	2,95	1,17	0,55	(-)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)< <(+)-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)
10	70/30 ^{d,e}		10,09	12,92	1,28	1,04	(-)-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)< <(+)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)
	70/30 ^d		6,38	8,28	1,30	1,78	(-)-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)< <(+)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Chiralcel™ OD-RH; eluensösszetétel, ^avíz/MeCN, ^b0,01 M KPF₆/MeCN, ^c0,05 M KPF₆/MeCN, ^d0,1 M KPF₆/MeCN; kolonna hőmérséklet, 30 °C, ^e20 °C, ^f8 °C; áramlási sebesség, 0,5 ml/perc, ^g0,2 ml/perc, ^h0,1 ml/perc; detektálási hullámhossz, 205 és 254 nm; ⁱaz abszolút konfiguráció nem tisztázott.

állófázison a szabad aminosavak (**6**, **8**) és az aminoészter (**9**) enantiomerjei csak részleges elválást mutattak. Valódi, fordított fázisra jellemző viselkedést észleltünk ebben a rendszerben, vagyis növelve az eluensben a szerves módosító mennyiségét a retenciós

4.2.1. ábra

A **7** és **10** vegyületek enantiomerjeinek Chiralcel™ OD-RH oszlopon végzett közvetlen elválasztása során nyert kromatogramok



Kromatográfiai körülmények: oszlop, Chiralcel™ OD-RH; eluensösszetétel, (A) 0,1 M $KPF_6(aq)/MeCN = 80/20$ (v/v), (B) 0,1 M $KPF_6(aq)/MeCN = 70/30$ (v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml/perc; detektálási hullámhossz, 254 nm; hőmérséklet, 30 °C; a minták a (+) és (-) enantiomerek mesterséges keverékei.

faktorok csökkentek. Víz helyett kálium-hexafluoro-foszfát vizes oldatát alkalmazva a mozgófázisban javult az elválasztás. Ha növeltük az eluensben a só koncentrációját csökkentek ugyan a retenciós faktorok, de a csúcsok jóval élesebbé váltak, így jelentős felbontás-növekedést tapasztaltunk. Csekély hatást gyakorolt az áramlási sebesség és az oszlop hőmérsékletének csökkentése a felbontásra a **6**, **8** és **9** vegyületek vizsgálata során ezen változtatások nem javították az elválasztást. Jelentős javulást tapasztaltunk az elválasztásban, amint az Fmoc-kal *N*-védett aminosavak elválasztását vizsgáltuk. Ez a tény rámutat azon kölcsönhatás fontosságára a királis felismerés létrejöttében, amely a minta molekulák fluorenil-metiloxi-karbonil védőcsoportja (Fmoc) és az állófázis királis szelektorának 3,5-dimetil-fenil-karbamát csoportja között jön létre. Ez a megerősödött kölcsönhatás az állófázis és a mintamolekulák között majdnem

alapon elválasztást eredményez a **7** és a **10** vegyületek vizsgálata során (4.2.1. ábra).

Az enantiomerek elúciós sorrendje változó volt. A POAC analógok esetén először a (+) enantiomer eluálódott, míg a β -TOAC analógok analízise során a (-) enantiomer volt az elsőként eluálódó sztereoizomer. A β -TOAC optikai izomereknek abszolút konfigurációjuk is ismert [94] (4.2.1. Táblázat).

Vizsgálataink során más királis oszlopokon is megpróbáltuk megvalósítani a vegyületek enantiomerjeinek elválasztását. A Chiralcel™ OD-RH oszlop normál fázisban használható változata a Chiralcel™ OD-H. Ennek királis szelektora megegyezik az OD-RH-éval, azonban az állófázist normál fázisú mérések kivitelezéséhez impregnálták. Ezen hexán-IPA és hexán-etanol eluens rendszereket alkalmaztunk, de nem sikerült elválasztást megvalósítanunk. A Cyclobond SN 2000 oszlop megosztó fázisa szilikagélen kötött β -ciklodextrinhez kapcsolt naftil-etil-karbamát. Ennél a szelektornál lehetőség nyílik zárványkomplexek kialakulására, miközben a mintamolekula a ciklodextrin üregekbe ékelődik. Annak ellenére, hogy ebben az esetben más kölcsönhatások létrejöttére is lehetőség nyílik, sem normál, sem fordított, sem poláris-szerves, sem poláris-ionos fázisban nem tudtuk elválasztást megvalósítani.

4.2.3. Királis származékképző szerek alkalmazása, a származékképzési reakció körülményeinek vizsgálata

Az (S)-NIFE-vel történő származékképzési reakció enyhe körülmények közt és belátható időn belül végrehajtható [13]. Négyszeres reagensfelesleget alkalmazva, szobahőmérsékleten, 2 órás reakció után a kitermelés a **6** vegyület (+) enantiomerjére 98,2

4.2.2. Táblázat

A **8** vegyület (+) és (–) (zárójelben) enantiomerjei GITC-vel történő származékképzésének konverziója (%) illetve a reakció során fellépő racemizáció mértéke (%) a reagensfelesleg és a reakcióidő függvényében

GITC/aminosav, mólarány: 1,5				
Reakcióidő (perc)	20	60	90	>240
Származékképzés konverziója (%)	79,4 (4,3)	89,2 (6,1)	90,4 (8,2)	98,1 (96,3*)
A racemizáció mértéke (%)	1,5 (<1,0)	2,0 (3,2)	2,8 (3,4)	8,9 (16,7*)
Reakcióidő: 90 perc				
GITC/aminosav, mólarány	1,5	2,0	5,0	10,0
Származékképzés konverziója (%)	90,4 (8,2)	94,5 (24,0)	99,5 (40,7)	99,3 (98,9)
A racemizáció mértéke (%)	2,9 (3,4)	2,8 (5,1)	6,1 (5,3)	5,8 (6,2)

*reakció idő: >24 óra

%-nak, míg (–) enantiomerjére 98,9 %-nak adódott. Ugyanilyen körülmények között vizsgálva a **8** vegyület (+) és (–) sztereoizomerjeit, rendre 99,6 és 99,3 %-os kitermelést kaptunk. Ezek szerint tehát a kitermelés minden esetben 98 % fölöttinek adódott, valamint

ezek között a körülmények között nem figyeltünk meg racemizációt a származékképzési reakció során.

A GITC reagens alkalmazása során szükség volt néhány változtatásra az eredeti eljáráshoz [98] képest, azonban ennek ellenére is kétségeket ébresztő eredményeket kaptunk. A **6** vegyület (+) és (-) optikai izomerjeinek GITC-vel történő reakciója során nagy kitermelés értékeket, rendre 99,5 % és 99,7 %, illetve alacsony (maximum 0,1 %-os) racemizációt figyeltünk meg 4 óra reakcióidő és kétszeres reagensfelesleg alkalmazása során. A **8** vegyület enantiomerjeinek GITC-s származékképzése során nem kaptunk ennyire egyértelmű eredményeket (4.2.2. Táblázat). A **8** vegyület (+) enantiomerjét vizsgálva, állandó 1,5-szeres reagensfelesleget alkalmazva, a származékképzési reakció kitermelésének értéke 4 órás reakció után érte el maximumát (>98 %), azonban a racemizáció mértéke 1,5 %-ról 8,9 %-ra növekedett a reakcióidő növelése során. Állandó, 90 perces reakcióidő biztosítása mellett, a reagensfelesleget 1,5-szeresről 10-szeresre emelve, a származékképzési reakció kitermelése 9 %-kal nőtt, ezzel párhuzamosan jelentősen nőtt azonban a racemizáció mértéke is. Optimalizált körülmények között, 4 órás reakcióidő és 2-szeres reagensfelesleg alkalmazásával a racemizáció mértéke 3 % alatt tartható és elérhető a 98 %-os kitermelés.

A **8** vegyület (-) enantiomerjének vizsgálata során csekély konverziót tapasztaltunk 1,5-szeres GITC felesleget alkalmazva. 24 órás reakció után a konverzió megfelelőnek bizonyult (96,3 %), azonban a racemizáció mértéke 16,7 %-ra emelkedett. Állandó reakcióidő mellett növelve a reagensfelesleget drasztikusan növekedett a reakció kitermelése, ezzel párhuzamosan azonban a racemizáció mértéke is nőtt. Nem találtunk olyan reakció körülményeket, melyek alkalmazása során egyaránt elfogadható mértékű konverziót (>98 %) és elfogadhatóan alacsony mértékű racemizációt (<5 %) figyelhattunk volna meg. Nem találtuk az okát a **6** és **8** vegyületek GITC-vel szemben mutatott eltérő viselkedésének sem.

Megkíséreltük végrehajtani a **6**, **8** és **9** vegyületek enantiomerjeinek elválasztását FDAA királis származékképző reagens segítségével is. Az eredeti reakciókörülmények [8] alkalmazása során – 2-szeres reagensfelesleg, 4 óra reakcióidő és 40 °C-os hőmérséklet – nem tapasztaltunk termékképződést. Növelve a hőmérsékletet illetve a reakcióidőt a termékképződés nem indult meg, a reagens bomlása azonban felgyorsult. A reagensfelesleg 5-szörösére emelésével csekély termékképződést (<5 %) figyelhattunk meg. Összességében azt mondhatjuk hogy ezen sztérikusan gátolt aminosavak enantiomereinek vizsgálatára, viszonylag kis reaktivitása miatt az FDAA nem alkalmas.

4.2.4. A szabadgyökös aminosavak KSR-el képzett diasztereomerjeinek elválasztása

A **6**, **8** és **9** vegyületek (*S*)-NIFE-vel és GITC-vel képzett diasztereomerjeit Vydac 218TP™ sorozatú C₁₈-as oszlopon választottuk el, ezek közül néhány eredményt a 4.2.3. Táblázatban tüntettünk fel. Mivel a nitroxid szabadgyököt tartalmazó aminosavak

4.2.3. Táblázat

A vizsgált szabadgyököt tartalmazó β-aminosavak (S)-NIFE-vel és GITC-vel képzett diasztereomer származékainak elválasztása során mért kromatográfiás paraméterek

Vegyület	Mozgó fázis TEAA/MeOH ^{a,b}	k_1'	k_2'	α	R_s	Elúciós sorrend
(S)-NIFE						
6	a	6,07	7,07	1,17	7,20	(+)<(-) ^c
8	a	7,10	7,89	1,10	2,90	(+)-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)< <(-)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)
9	a	10,35	10,41	1,01	<0,40	(+)-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)< <(-)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)
GITC						
6	a	6,38	7,05	1,10	2,80	(+)<(-) ^c
8	b	7,70	8,85	1,15	6,03	(+)-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)< <(-)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)
9	a	12,86	12,86	1,00	0,00	–

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Vydac 218TP™; eluens, 0,1 M TEAA (aq) (pH = 6,5)/MeOH (v/v), gradiens elúció; detektálási hullámhossz, (*S*)-NIFE – 205 nm, GITC – 254 nm; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; hőmérséklet, 25 °C.

^a Lineáris gradiens: 0 perc, 0,1 M TEAA (aq) (pH = 6,5)/MeOH = 90/10 (v/v), 60 perc, 0,1 M TEAA (aq) (pH = 6,5)/MeOH = 10/90 (v/v).

^b Lineáris gradiens: 0 perc, 0,1 M TEAA (aq) (pH = 6,5)/MeOH = 90/10 (v/v), 60 perc, 0,1 M TEAA (aq) (pH = 6,5)/MeOH = 30/70 (v/v).

^c Az abszolút konfiguráció még nem tisztázott.

érzékenyek a savas körülményekre, a mozgófázis helyes megválasztása sarkalatos pontja a vizsgálatnak. Az alkalmazott eluens szerves része TEAA 0,1 M-os, pH = 6,5-re beállított vizes oldata volt, míg szerves módosítónak MeOH-t használtunk. Ilyen körülményeket alkalmazva nem észleltük bomlástermékek keletkezését a vizsgálatok során. A kromatogramokon (Függelék 9. ábra) látható járulékos csúcsok a KSR bomlásából származnak és vak minták kromatogramjain is láthatóak. Az elválasztásokat izokratikus és gradiens módban is végrehajtottuk, de jobb csúcsalakokat és felbontás értékeket kaptunk

gradiens módban. Mind az (*S*)-NIFE, mind a GITC alkalmazása hatékony elválasztásokat eredményezett. A GITC-vel képzett diasztereomerek elválasztásának eredményeit azonban a fentebb említett racemizációs problémák miatt különös körültekintéssel kell kezelni. Összességében a három vizsgált KSR közül a nitroxid szabadgyököt tartalmazó β -aminosavak királis elválasztására az (*S*)-NIFE bizonyult a legalkalmasabbnak.

4.2.4. Táblázat

A vizsgált szabadgyököt tartalmazó β -aminosavak enantiomerjeinek királis szennyezése

Vegyület	Királis szennyezés (%)			Elúciós sorrend
	Közvetlen	Módszer		
		Közvetett		
		(<i>S</i>)-NIFE	GITC	
(+)- 7 ^{a,c}	0,15	–	–	(+)<(–) ^c
(–)- 7 ^{b,c}	0,40	–	–	(+)<(–) ^c
(+)- 10 ^a	0,17	–	–	(–)-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)<(+)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)
(–)- 10 ^b	0,21	–	–	(–)-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)<(+)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)
(+)- 6 ^{a,c}	–	0,42	0,10	(+)<(–) ^c
(–)- 6 ^{b,c}	–	0,52	0,69	(+)<(–) ^c
(+)- 8 ^a	–	0,13	>3,0	(+)-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)<(–)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)
(–)- 8 ^b	–	0,12	>5,0	(+)-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)<(–)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)

^a (–) enantiomer szennyezés a (+) enantiomerben.

^b (+) enantiomer szennyezés a (–) enantiomerben.

^c Az abszolút konfiguráció még nem tisztázott.

A kifejlesztett eljárások alapján meghatároztuk a kapott sztereoizomerek királis tisztaságát, a kapott eredményeket a 4.2.4. Táblázatban tüntettük fel. A közvetett módszerek közül az (*S*)-NIFE felhasználásával kapott enantiomer szennyezés értékek összemérhetőnek mutatkoztak a Chiralcel[™] OD-RH oszlopon mért közvetlen mérések eredményeivel (a **7** és **10** vegyületek a **6** és **8** aminosavak Fmoc-védett analógjai). A **8** vegyület GITC-vel képzett diasztereomer származékainak szennyezés értéke, a már említett racemizáció miatt bizonyult nagyoknak. A relatív standard szórások értéke a közvetlen és az (*S*)-NIFE-vel végzett közvetett mérések során az 5-15 %-os tartományba esett. A nagyobb szórás értékeket abban az esetben kaptuk, amikor a kis mennyiségű komponens a főkomponens után eluálódott.

4.2.5. Összefoglalás

Közvetlen és közvetett folyadékkromatográfiás eljárásokat dolgoztunk ki ciklusos, nitroxid szabadgyököt tartalmazó β -aminosavak sztereoizomerjeinek elválasztására. A közvetlen elválasztásokat egy Chiralcel™ OD-RH oszlop alkalmazásával, míg a közvetett elválasztásokat (*S*)-NIFE és GITC királis származékképző reagensek felhasználásával valósítottuk meg. A Marfey-reagens viszonylag kis reaktivitása miatt alkalmatlannak bizonyult a vizsgált aminosavak enantiomerjeinek közvetett elválasztására. Leírtuk a leghatékonyabb elválasztásokhoz tartozó kísérleti körülményeket, valamint a kifejlesztett módszerek elválasztási képességei közti különbségeket. Összehasonlítottuk a kidolgozott eljárásokat és javaslatot tettünk a királis tisztaság ellenőrzésére leginkább alkalmas módszer alkalmazására. A különböző eljárások alkalmazása során meghatároztuk az elúciós sorrendeket, valamint a **8**, **9** és **10** vegyületek esetén megadtuk a csúcshoz tartozó abszolút konfigurációt.

4.3. Nem fehérjealkotó szekunder aminosavak enantiomerjeinek elválasztása két hasonló szerkezetű királis állófázison, az állófázisok hatékonyságának összehasonlítása

4.3.1. Irodalmi áttekintés

Az előző fejezetben kifejtettük a β -aminosavak jelentős szerepét a peptidalapú receptor kutatásban. Hasonló szerepet töltenek be a receptor kutatásban és a peptidomimetikában a prolinhoz hasonló szerkezetű, szekunder α -aminosavak (iminosavak), ahol az amin-nitrogén a gyűrűs aminosav oldallánc tagja. A β -aminosavaktól eltérő peptid szerkezetek kialakítására képesek, hiszen a gyűrűben lévő nitrogén atom hidrogénkötések kialakítására képtelenné válik, ha az iminosav internális vagy C-terminális pozícióban van. A peptidláncba épített prolin, vagy más iminosav gyűrűs szerkezete lehetővé teszi a Φ torziós szög állandó értéken tartását. Ez teljesen sík alkatú gyűrűt feltételezve 120° lenne, a prolin esetén valójában 103° . Az iminosavak gyűrűtagszámának és szubsztitunseinek változtatásával a Φ torziós szög értéke tehát változtatható, a gyűrűs szerkezetből következően pedig ezen az értéken tartható [99]. Az iminosavak fontos eszközök a protein folding, és a receptor szerkezetek kutatásában, mivel a peptidláncba történő beépítésükkel specifikus és merev másodlagos szerkezetet érhetünk el.

Az általunk vizsgált iminosavak közül néhány jelentős szerepet tölt be a gyógyászatban és a gyógyszerkutatásban egyaránt. A pipekolinsav (**14**) megtalálható például a természetben előforduló szandramicin nevű antibiotikumban és a rapamicin nevű immunosuppresszánsként használt vegyületben is. Természetesen ezen hatóanyagok mesterséges előállításához is felhasználják a pipekolinsavat [100, 101]. Az utóbbi években megfigyelték, hogy a piridoxinnal kezelhető epilepsziás betegek vérplazmájában megemelkedik a pipekolinsav szintje [102]. A vizsgálatok kísérleti stádiumban vannak, de feltételezik, hogy a vérplazma pipekolinsav szintjének követése segíthet a betegség pontos diagnosztizálásában, illetve a betegség mindeddig ismeretlen biokémiai mechanizmusának feltérképezésében [103].

A fentiek alapján egyértelmű, hogy rendkívül fontos mind a peptidomimetikában és receptor kutatásban, mind pedig a gyógyszerkutatásban és a gyógyászatban enantiomer tisztaságú iminosavak alkalmazása, emiatt sztereoselektív előállítása és királis tisztaságának ellenőrzése is. Az optikai tisztaság ellenőrzésének egyik legelterjedtebb módszere a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias módszerek alkalmazása. Laboratóriumunkban korábban már megoldották az általunk vizsgált iminosavak közvetett HPLC-s elválasztását [104], ezen munkában közvetlen kromatográfias eljárásokat dolgoztunk ki a vegyületek enantiomerjeinek elválasztására. Vizsgálataink során összehasonlítottuk a teicoplanin és teicolplanin aglikon KÁF-okon történő elválasztások hatékonyságát, illetve tanulmányoztuk a teicoplanin állófázison található cukorrészek hatását az elválasztásra.

4.3.2. A vizsgált iminosavak sztereoizomerjeinek elválasztása

A vizsgálataink során kapott retenciós faktor, szelektivitási tényező és felbontás értékeket a Függelék 1. Táblázatában foglaltuk össze. A táblázat összehasonlítási alapként tartalmazza az 0,1 % TEAA (aq) (pH = 6,5)/MeOH = 60/40 (v/v) eluensösszetételhez tartozó kromatográfias paramétereket, de természetesen feltüntettük az optimalizált, esetleg ettől eltérő körülményekhez tartozó paramétereket is.

A teicoplanin molekulát jellemző szerkezeti sajátosságai alkalmassá teszik aminosavak elválasztására. Fordított fázisú kromatográfias mérések során a retenció és a szelektivitás természetesen változtatható a mozgófázis szerves módosító tartalmának mennyiségi és minőségi változtatásával. A retenciós faktorok eluensösszetétel-függését vizsgálva különböző lefutású görbék kaphatók. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy α -aminosavak enantiomerjeinek Chirobiotic™ T oszlopon történő elválasztása során, a retenciós faktorokat a

mozgófázisösszetétel-függvényében ábrázolva jellemzően U-alakú görbék kaptak [31, 105]. Hasonló jelenséget figyeltünk meg a vizsgált iminosavak eluensösszetétel-függését tanulmányozva. A **12**, **17** és **18** vegyületek kivételével mindegyik vegyület retenciós faktorainak mozgófázisösszetétel-függése U-alakú görbét ír le, természetesen a görbék meredeksége és a görbe minimumának helye minden vegyület esetén eltér. A kis szerves módosító tartalomnál jelentkező nagy retenció létrejötté a hidrofób kölcsönhatások jelenlétére utal az elválasztás mechanizmusában. Az iminosavak szerves oldószerekben való viszonylag rossz oldhatóságának tulajdonítjuk a kis víztartalmú eluens használata során kapott nagy retenciós faktor értékeket.

A Chirobiotic™ TAG oszlopon vizsgálva az iminosavak retenciójának eluensösszetétel-függését, a **12** vegyület kivételével, az imént ismerttetett viselkedéstől valamelyest eltérő eredményeket kaptunk. Növelve ugyanis az eluens MeOH tartalmát a retenció folyamatosan nőtt. Ez arra utal, hogy az aglikon állófázison ezen vegyületek retenciójának létrejöttében kisebb szerep jut a hidrofób kölcsönhatások kialakulásának. A **12** vegyület retenciós faktorának mozgófázisösszetétel-függését vizsgálva, mindkét állófázis alkalmazása során a hagyományos fordított fázisú elválasztásokra jellemző viselkedést figyelhettük meg, azaz a szerves módosító mennyiségét növelve csökkent a visszatartás mértéke. Ilyen típusú viselkedést tapasztaltunk a **17** és **18** vegyületek teicoplanin állófázison történt vizsgálata során is.

Megvizsgáltuk a vegyületek szerkezetének hatását kromatográfias tulajdonságaikra azonos kromatográfias körülmények között. Ha összehasonlítjuk a két vizsgált prolin analóg vegyület (**11** és **12**) kromatográfias tulajdonságait, látható hogy az α -Me szubsztituált, ezért nagyobb apolaritású **12** vegyület visszatartása erősebb, ez a nagyobb retenció azonban nem jár együtt a szelektivitás és a felbontás növekedésével (Függelék 1. Táblázat). Összevetve a pipekolinsav analóg molekulák (**13-16**) szerkezeti és kromatográfias tulajdonságait megfigyeltük, hogy a **13**, **15** és **16** vegyületek retenciós faktor értékei kisebbnek adódtak, mint a **14** vegyület megfelelő értékei. Megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van a metilénecsoport helyett kén- vagy oxigénatom beépítése a gyűrű 4-es pozíciójába (**14** vegyület a **19** és **20** vegyületekkel szemben). A **19** és **20** vegyületek vizsgálata során kisebb visszatartást tapasztaltunk, mint a **14** vegyület esetén, kivéve a **20** vegyület aglikon állófázison történő vizsgálatát.

Egy második szekunder aminocsoport beépítése a gyűrű 4-es pozíciójába (**17** és **18** vegyület) növeli a vegyületek retencióját mindkét állófázison, annak ellenére, hogy a beépített aminocsoport csökkenti a vegyületek apolaritását. A bevezetőben említettük, hogy a retenció

létrejöttében igen fontos szerepet játszik a teicoplanin molekula ionizált primer aminocsoportja, így az ezen az állófázison történő fordított fázisú elválasztások során kulcsszerep hárul a mozgófázis pH-jának helyes megválasztására. Nem szabad figyelmen kívül hagynunk az állófázison elhelyezkedő, szintén ionizálható karboxilcsoporton keresztül kialakuló kölcsönhatások hozzájárulását sem a királis felismeréshez, illetve a mintavegyületek ioneqyensúlyi tulajdonságai is befolyásolják a kromatográfiás paraméterek értékeit.

Összehasonlítottuk a **14**, a **17** és a **18** vegyületek kromatográfiás tulajdonságait az eluens pH-jának változtatása során (Függelék 10. ábra). Korábbi vizsgálatok során a szelektor molekulák pK értékeit meghatározták, melyeket a primer aminocsoportra vonatkozóan 9,2-nek, míg a karboxilcsoportra vonatkozóan 2,5-nek találtak [106]. Irodalmi adatok alapján a **14** vegyületre vonatkozó pK értékeket 9,2-nek és 2,5-nek [107], míg a **17** vegyület aminocsoportjaira vonatkozóan 9,53-nak és 5,41-nek, míg ugyanezen vegyület karboxilcsoportjára vonatkozóan 1,5-nek találtuk [108]. Sajnos nem találtunk a **18** vegyület pK értékeire vonatkozó adatokat az irodalomban, de feltételeztük hogy azok hasonlóak lehetnek a **17** vegyület pK értékeihez. A vizsgálatokat a 4,0-6,5 pH tartományban végeztük, ez a leggyakrabban alkalmazott és ajánlott pH tartomány a makrociklusos glikopeptid alapú állófázisok használata során. A fent ismertetett pK értékekből következik, hogy az állófázis ebben a pH tartományban ikerionos szerkezetű, azaz a karboxilcsoport deprotonált, míg az aminocsoport protonált állapotban van. Ugyanezt mondhatjuk el a pipekolinsavról (**14**) is, ez a megállapítás tükröződik a kísérleti eredményekben is, hiszen a diagramról látható (Függelék 10. ábra), hogy a **14** vegyület kromatográfiás paraméterei gyakorlatilag nem változnak a mozgófázis pH-ját változtatva. Megvizsgálva a **17** vegyület pK értékeit látható, hogy egyik aminocsoportjának pK-ja 5,41. Ez pontosan az általunk vizsgált pH tartományba eső érték. Szemügyre véve a **17** vegyület pH függésének diagramjait (Függelék 10. ábra) láthatjuk, hogy az eluens pH-jának változtatása jelentősen befolyásolja a retenciós faktorok értékeit. Megállapíthatjuk továbbá, hogy a retenciós faktorok görbéinek inflexiós pontja van abban a pH tartományban, ahová a **17** egyik aminocsoportjának pK-ja esik (5,41). Ez azt jelenti, hogy amint az illető aminocsoport deprotonálódik, a vegyület sztereoizomerjeinek visszatartása jelentősen csökken. Ez az állófázison található ionizált karboxilcsoport fontos szerepére utal a retenciós létrejöttében. Hasonló lefutású görbét kaptunk a **18** vegyület retencióját vizsgálva a mozgófázis pH-jának függvényében. Ez alátámasztja azt a feltevésünket, hogy a **18** vegyületre vonatkozó pK értékek hasonlóak lehetnek a **17** vegyület pK értékeihez.

4.3.3. Az állófázisok enantioszelektivitása és a cukorrészek szerepe a királis felismerésben

A Függelék 1. Táblázata tartalmazza a vizsgált vegyületek enantiomerjeinek elválasztására vonatkozó szelektivitási tényező (α), felbontás (R_s) és szabadentalpia változás különbségek ($\Delta(\Delta G^\circ)$) értékeit. A **16** vegyület kivételével mindegyik esetben sikerült megfelelő mértékű felbontást elérnünk. A szelektivitási tényezők értékei a teicoplanin állófázis alkalmazása során a **19** és **20** vegyület esetén mutatkoztak a legnagyobbak, míg az aglikon szelektort alkalmazva a legnagyobb α értékeket a **14** és **20** vegyület sztereoizomerjeinek elválasztása során kaptuk.

Kiszámítottuk a vegyületek sztereoizomerjeinek álló- és mozgófázis közötti megoszlása során fellépő szabadentalpia változások különbségeit egy adott hőmérsékleten:

$$\Delta(\Delta G^\circ) = -RT \ln \alpha. \quad (1)$$

Ezek a különbségek utalnak arra, hogy az adott komponenseket az állófázis mennyire hatékonyan tudja elválasztani.

A Függelék 1. Táblázatában található $-\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek észrevehetően különböznek egymástól. A legnagyobb szabadentalpia változás különbségeket a **14**, **19** és **20** vegyületek enantiomerjeinek elválasztása során kaptuk. Ha összehasonlítjuk a két szelektoron mért szabadentalpia változás különbségeket minden egyes vizsgált vegyület esetén, az hozzájárulhat ahhoz hogy jobban megértsük, miként befolyásolják a teicoplaninen található cukorrészek a királis felismerést.

Korábbi kutatások rámutattak arra, hogy a cukorrészek retencióban betöltött szerepe összetett. Egyrésztől gátolhatják a királis felismerést, mert elfedhetik a makrociklusok által kialakított hidrofób üregeket, illetve az elektrosztatikus kölcsönhatások kialakítására képes amino- és karboxilcsoportokat. Másrésztől azonban segíthetik a királis felismerést, hiszen a cukorrészekben számos kiralitáscentrum és hidrogénkötések kialakítására képes hidroxilcsoport található [24].

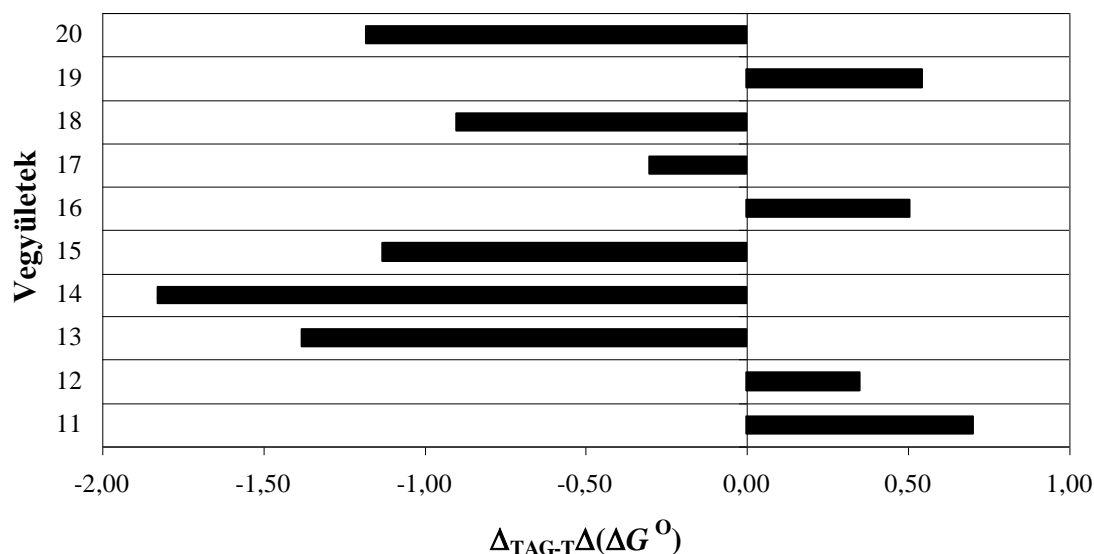
A két szelektoron kapott elválasztások hatékonyságának szemléltetésére, a 4.3.1. ábra értéktengelyén egy különbséget ábrázoltunk:

$$\Delta_{TAG-T} \Delta(\Delta G^\circ) = \Delta(\Delta G^\circ)_{aglikon} - \Delta(\Delta G^\circ)_{teicoplanin}. \quad (2)$$

Ha ez a különbség negatívnak adódik, az azt jelenti, hogy az adott vegyület sztereoizomerjei jobban elválaszthatóak az aglikon szelektoron. Ha a számított különbség egy vegyület esetén pozitív, akkor ezen vegyület optikai izomerjeinek elválasztására a természetes teicoplanin az alkalmasabb.

4.3.1. ábra

A teicoplanin és teicoplanin aglikon állófázisok enantioszelektivitása közti különbségek



Kromatográfiai körülmények: oszlop, Chirobiotic™ T és TAG; áramlási sebesség, 1,0 ml/perc; detektálási hullámhossz, 205 nm; hőmérséklet 25 °C; eluensösszetétel, 0,1 % TEAA (pH = 6,5)/MeOH = 60/40 (v/v).

A 4.3.1. ábráról látható, hogy a **11**, **12**, **16** és **19** vegyület sztereoizomerjeinek elválasztására a natív teicoplanin, míg a többi vizsgált vegyület enantiomerjeinek elválasztására az aglikon szelektor bizonyult alkalmasabbnak. Irodalmi adatokból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy α -aminosavak királis elválasztására többnyire az aglikon állófázis a megfelelőbb, a merevebb szerkezetű β -aminosavak vizsgálata során azonban nem ennyire egyértelmű a helyzet. Ebben az esetben ugyanis a natív teicoplanin alkalmazása sokszor eredményesebbnek bizonyult [109, 110].

Az általunk vizsgált iminosavak az α -aminosavak közé tartoznak ugyan, viszont nagymértékben sztérikusan gátoltak, így ebből a szempontból a β -aminosavakra hasonlítanak. Vizsgálatuk során is hasonló jelenségre lettünk figyelmesek, mint korábban a β -aminosavak vizsgálata során. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy az iminosavak merevebb, sztérikusan erősebben gátolt molekulái sokszor nem illeszkednek az aglikon molekula hidrofób üregeibe, illetve kevésbé képesek elektrosztatikus kölcsönhatások kialakítására sztérikus gátló hatások miatt, különösen igaz ez a **12** vegyület enantiomerjeire. Kisebb szerep jut tehát a királis

felismerésben a hidrofób-hidrofób, illetve az elektrosztatikus kölcsönhatások kialakulásának, előtérbe kerül tehát a hidrogénkötések és szterikus kölcsönhatások kialakításának képessége.

4.3.4. Az elválasztások optimalizálása és az elúciós sorrend

Az általunk mindegyik vegyület esetén használt 0,1 % TEAA (pH = 6,5)/MeOH = 60/40 (v/v) eluensösszetétel nem vezetett mindig megfelelő elválasztáshoz, így szükséges volt az eljárások optimalizálása. A mozgófázisösszetétel és a pH változtatásával kíséreltük meg az elválasztásokat javítani (Függelék 1. Táblázat). A **16** vegyület királis elválasztása során sajnos nem találtunk olyan eluensösszetételt vagy pH-t, amely biztosította volna a megfelelő felbontású elválasztást. Néhány kiválasztott kromatogram látható a Függelék 11. ábráján.

A legtöbb esetben meghatároztuk az enantiomerek elúciós sorrendjét, melyet ezekben az esetekben mindkét állófázison rendre (*S*)<(*R*)-nek találtunk.

4.3.5. Összefoglalás

Megvalósítottuk a vizsgált iminosavak sztereoizomerjeinek fordított fázisú HPLC-s elválasztását egy teicoplanin- és egy teicoplanin aglikon-alapú királis állófázison. Tanulmányoztuk a vegyületek retenciós viselkedését a kromatográfias körülmények változtatása során. Megvizsgáltuk a natív teicoplanin szelektoron található cukorrészek hatását a királis felismerésre. A legtöbb esetben az aglikon állófázis alkalmazása eredményesebbnek bizonyult, de szemben az eddigi tapasztalatokkal a tíz aminosav közül négy esetén a natív teicoplanin alkalmazása bizonyult előnyösebbnek. Amennyiben lehetőségünk nyílt, meghatároztuk az iminosavak enantiomerjeinek elúciós sorrendjét.

4.4. A hőmérséklet hatása a királis kromatográfias viselkedésre egy anioncserélő típusú állófázison

4.4.1. Irodalmi áttekintés. A hőmérséklet hatása a különböző rendszerekben kialakuló egyensúlyokra

Adott rendszerben kialakuló egyensúly függ a rendszer hőmérsékletétől és nyomásától. A hőmérséklet hatása kvantitatíven figyelembe vehető a van't Hoff egyenlet segítségével.

Egy $A \rightleftharpoons B$ kémiai folyamat szabadentalpia változása:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln Q, \quad (3)$$

ahol ΔG° a standard szabadentalpia változás, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, Q pedig az (n_B/n_A) reakcióhányados. Egyensúly esetén nincsen szabadentalpia változás, Q pedig egyenlő az egyensúlyi állandóval:

$$RT \ln K = -\Delta G^\circ, \quad (4)$$

ebből $\ln K$ -t kifejezve kapjuk az (5) egyenletet,

$$\ln K = -\frac{\Delta G^\circ}{RT}. \quad (5)$$

Az egyensúlyi állandó természetes alapú logaritmusának hőmérsékletfüggését annak hőmérséklet szerinti differenciálja adja meg:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{1}{R} \frac{d}{dT} \left(\frac{\Delta G^\circ}{T} \right). \quad (6)$$

A (6) egyenlet két oldalán szereplő mindkét differenciál teljes differenciál, mivel K és ΔG° csak a hőmérséklettől függ, a nyomástól nem. A (6) egyenletbe helyettesítve a (7) Gibbs-Helmholz egyenletet,

$$\frac{d}{dT} \left(\frac{\Delta G^\circ}{T} \right) = \frac{-\Delta H^\circ}{T^2}, \quad (7)$$

eljutunk a van't Hoff egyenlethez:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2}. \quad (8)$$

Ha figyelembe vesszük, hogy $\frac{d}{dT} \left(\frac{1}{T} \right) = -\frac{1}{T^2}$ és átrendezzük: $\frac{dT}{T^2} = -d \left(\frac{1}{T} \right)$, majd ezt a kifejezést a van't Hoff egyenletbe helyettesítjük, akkor az egyenlet egy másik alakját kapjuk:

$$\frac{d \ln K}{d \left(\frac{1}{T} \right)} = \frac{-\Delta H^\circ}{R}, \quad (9)$$

melyből látható, hogyha $-\ln K$ -t $1/T$ függvényében ábrázoljuk, a kapott egyenes meredeksége $\Delta H^\circ/R$ lesz, innen ΔH° számítható. Ez az entalpiaváltozás meghatározásának nem kalorimetriás módja [111].

4.4.2. A van't Hoff egyenlet alkalmazása a kromatográfiában

A kromatográfiai vizsgálatok során széles körben elterjedt gyakorlat a retenció és a kromatográfiai paraméterek hőmérsékletfüggésének vizsgálata. Ennek segítségével egyrészt egy eszköz kerül a kezünkbe az elválasztások optimalizálásához, másrészt a van't Hoff

egyenlet kromatográfiában alkalmazott alakjának segítségével a minta megoszlása során létrejövő entalpia-, entrópia- és szabadentalpia változás megbecsülhető.

Miként az előző alfejezetben is leírtuk, a van't Hoff egyenlet egyensúlyi rendszerekre érvényes. Az áramló kromatográfiás rendszerekben nem alakulhat ki egyensúly, kialakulhat viszont egy egyensúlyszerű stacionárius állapot. A van't Hoff egyenlet tehát nem alkalmas a kromatográfiás megoszlások során fellépő termodinamikai változások pontos kiszámítására, viszont segítségével megfelelő becslést kaphatunk a termodinamikai paraméterek értékeiről. Urakami és mtsai. [112] ftalátok egy homológ sorának elválasztása során hasonlították össze az áramlásos mikrokalorimetrián és a van't Hoff egyenlet felhasználásával kapott termodinamikai paramétereket. Tapasztalataik szerint a van't Hoff egyenletből számított termodinamikai változások megfelelő becslést adnak a kalorimetrián mért értékekre.

Egyensúlyi folyamatok során fellépő szabadentalpia változás kiszámítható az egyensúlyi állandó segítségével:

$$RT \ln K = -\Delta G^\circ. \quad (4)$$

Ismert még a standard szabadentalpia változás definíciója is,

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ, \quad (10)$$

ahol, ΔH° a standard entalpiaváltozás és ΔS° a standard entrópiaváltozás. A (10) egyenletet a (4) egyenletbe helyettesítve a következő összefüggést kapjuk:

$$\ln K = -\left(\frac{\Delta H^\circ}{RT} - \frac{\Delta S^\circ}{R}\right) = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}. \quad (11)$$

A (11) egyenletet a hőmérséklet szerint differenciálva a (8) van't Hoff egyenlethez jutunk.

Az egyensúlyi állandó egyenlő a retenciós faktor (k') és a fázisarány (ϕ) hányadosával

$$K = \frac{k'}{\phi}. \quad (12)$$

Ha ezt a (11) egyenletbe helyettesítjük, megkapjuk a kromatográfiában használt van't Hoff egyenletet [113]:

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi. \quad (13)$$

Ezen egyenlet szerint $\ln k'$ -t $1/T$ függvényében ábrázolva egyenest kapunk, melynek meredeksége $-\Delta H^\circ/R$, tengelymetszete pedig $\Delta S^\circ/R + \ln \phi$. Ez megfelelő módszer a termodinamikai állandók meghatározására egy kromatográfiás rendszerben, ha a fázisarány ismert vagy számítható.

Figyelembe véve a szelektivitási tényező (α) definícióját, a (4) és (13) egyenletből könnyen levezethető a következő két egyenlet:

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta(\Delta H^\circ)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S^\circ)}{R}, \quad (14)$$

illetve

$$\Delta(\Delta G^\circ) = -RT \ln \alpha, \quad (15)$$

ahol $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$ és $\Delta(\Delta G^\circ)$ jelentik a másodikként eluálódó sztereoizomer megoszlásából származó entalpia-, entrópia- és szabadentalpia változás, illetve az elsőként eluálódó enantiomer megoszlásából származó entalpia-, entrópia- és szabadentalpia változás különbségét.

4.4.3. A hőmérséklet hatása a kromatográfiás retencióra

Az egyensúlyi folyamatokhoz hasonlóan, a kromatográfiás megoszlás is függ a hőmérséklettől. A nagyobb hatékonyságú elválasztási technikáknál (a szokásos akirális HPLC-ben) általában kisebb jelentősége van a hőmérséklet változásának, mint a viszonylag kis hatékonyságú királis elválasztások során. A retenció faktor szoros összefüggésben áll a megoszlási hányadossal, ez lehetővé teszi, hogy a kromatogramból termodinamikai információkat olvassunk ki, majd ezekből következtethessünk a retenciót kialakító kölcsönhatások minőségére.

Az eddigi vizsgálatok azt mutatják, hogy a hőmérsékletnek legalább két igen fontos hatása van a kromatográfiás egyensúlyra.

Az egyik hatás a szelektivitási tényező (α) változásában figyelhető meg. A szelektivitási tényező általában csökken a hőmérséklet emelésével. Ez azért következik be, mert változtatva a hőmérsékletet a megoszlási hányados is változik, ami maga után vonja a szabadentalpia változását, miközben a megoszlás létrejön a két fázis között. Ionosan disszociáló mozgófázis vagy minta esetén a disszociáló vegyület pK-ja befolyásolható az eluensösszetétel vagy a hőmérséklet változtatásával. A hőmérséklet szelektivitási tényezőre gyakorolt hatása nem teljesen tisztázott, mivel nem ismerjük hogyan változik a komponens entalpiája a mozgó fázisból az állóba történő átmenet során.

A másik hőmérsékleti effektus a viszkozitási tényezőt és a diffúziós együtthatót befolyásolja. A hőmérséklet emelése növeli a minta diffúziós együtthatóját mind a mozgó-, mind az állófázisban, miközben a fázisok viszkozitását is csökkenti, növelve a bennük lejátszódó anyagtranszportot. Ez ugyan csökkenti az elúciós időt, de növelheti a felbontást, mivel a csúcsok keskenyebbek lesznek, távolságuk azonban csökken.

A hőmérséklet befolyásolja az oszlopon fellépő nyomásesést is. Ha növeljük a hőmérsékletet az eluens viszkozitása csökken, ezért csökken a nyomás anélkül, hogy az áramlási sebesség változna.

4.4.4. A királis felismerést létrehozó kölcsönhatások vizsgálatának lehetőségei

Az utóbbi 15-20 év királis kromatográfiás kutatásaiban egyre nagyobb teret nyernek a királis felismerés megértését célzó kutatások. Nagy számban jelennek meg olyan tudományos közlemények, melyeknek célja feltérképezni a királis retenciót és elválasztást létrehozni képes kölcsönhatások mibenlétét, felderíteni ezek hatását a királis elválasztásra, illetve ezek segítségével megfelelően modellezni a királis felismerés folyamatát. Ezek a kutatások hozzájárulnak a királis szelektorok tudatos tervezéséhez és szintéziséhez.

A királis retenciós mechanizmus kutatásának több lehetséges és általánosan elfogadott módszere van. Ezek közé tartozik a kromatográfiás paraméterek hőmérsékletfüggésének vizsgálata, valamint az így kapott adatokból, a fent levezetett van't Hoff egyenlet segítségével számított termodinamikai paraméterek elemzése. A számított termodinamikai paraméterek értékeinek, a szelektor kémiai szerkezetének illetve a vizsgált vegyületek kémiai szerkezetének és fizikai tulajdonságainak összevetésével következtetéseket vonhatunk le a fellépő kölcsönhatások minőségéről, és a királis felismerésben betöltött szerepük jelentőségéről. Ezt a módszert elsőként alkalmazta William H. Pirkle 1991-ben megjelent tanulmányában [115].

Guiochon és mtsai. ezzel párhuzamosan elméletet dolgoztak ki a retenciót kialakító kölcsönhatások modellezéséről [116]. Elméletük szerint a királis vegyületek sztereoizomerjeinek retenciós faktorai felírhatók két különböző retenciós faktor összegeként:

$$k'_{\text{kísérleti}} = k'_{\text{nem-szelektív}} + k'_{\text{szelektív}} \quad (16)$$

Az összeadás első tagjaként szereplő nem szelektív retenciós faktor azokból a kölcsönhatásokból származik, melyek a racém keverék mindkét enantiomerjére egyenlő mértékben hatnak, ezek a kölcsönhatások tehát nem okozhatnak elválasztást, azaz királis felismerést. A második tagban szereplő szelektív kölcsönhatásokból származó retenciós faktor reprezentálja mindazon kölcsönhatásokat, melyek eltérő mértékben hatnak az elválasztandó vegyület sztereoizomerjeire, tehát királis elválasztást hozhatnak létre.

A szemléletesség és a kvantitatív modellezés érdekében az adszorpciós kutatásokból kölcsönöztek egy modellt. A királis szelektorral borított hordozó felszínét heterogén felszínként képzelik el, ahol két különböző típusú kötőhely található. Az első típusú kötőhely felelős a nem szelektív kölcsönhatások kialakításáért, míg a második típusú a szelektív

kölcsönhatások kialakításáért. Feltételezésük szerint a felület jóval nagyobb mennyiségben tartalmaz első típusú kötőhelyeket. A kvantitatív modellezéshez a Langmuir-izoterma egy átalakított változatát hívták segítségül. Minden enantiomer esetén két Langmuir-izoterma számítható, az egyik a szelektív, míg a másik a nem szelektív kötőhelyekre jellemző. Ezek segítségével meg tudják becsülni a szelektív és nem szelektív kölcsönhatások részvételének arányát a kísérletileg kapott retencióra. Emiatt hívják ezt a modellt bi-Langmuir-izoterma modellnek.

Egyéb műszeres eljárásokat is kidolgoztak a királis szelektor és a mintamolekula adduktumokban kialakuló intermolekuláris kölcsönhatások feltérképezésére. Ezek között vannak különböző NMR [117, 118], illetve tömegspektrometriás eljárások is [119, 120]. Ezen vizsgálatok során a nem rögzített szelektort hozzák kölcsönhatásba a vizsgálni kívánt mintával. Az így felvett több dimenziós NMR spektrumok adataiból következtethetünk a kialakuló kölcsönhatások erősségére és minőségére. Az ütközés indukált bomlásos tömegspektrometriás (CID-MS-MS) vizsgálatok esetén a különböző energiájú ütközések hatására keletkező fragmentumokból következtethetünk a szelektor és a minta közötti kölcsönhatások erősségére és minőségére.

Természetesen hasznos segítséget jelentenek a retenció mechanizmusának kutatásában a molekuladinamikai számítások is.

A fent leírt módszerek egyikének segítségével sem kaphatunk teljesen pontos képet a királis felismerés és retenció folyamatáról. A molekuladinamikai számítások értékes segítséget adnak a kísérleti eredményekhez, azonban nem született még olyan matematikai algoritmus, amely egy ennyire bonyolult rendszert képes lenne pontosan leírni, ezért nem bízhatunk meg feltétel nélkül ezekben az eredményekben. További probléma, hogy ilyen bonyolult rendszereken történő számításokhoz rendkívüli számítási kapacitás szükséges és a számítások gyakran nagyon időigényesek.

Közös problémája az NMR és tömegspektrometriai vizsgálatoknak, hogy ezek a szabad szelektor molekulák kölcsönhatásait képesek vizsgálni, míg a valós kromatográfiás folyamatban ezek a molekulák valamilyen hordozón kovalensen kötöttek tehát térszerkezetük megváltozik és a hordozóhoz kötött funkciós csoportjaik nem, vagy korlátozottan képesek kölcsönhatások kialakítására a mintamolekulákkal. Ezen hátrányuk ellenére meg kell hogy jegyezzük, hogy ezek talán a legmodernebb és legárnyaltabb képet adó módszerek a fentebb leírtak közül.

A bi-Langmuir-izoterma modell segítségével meg tudjuk különböztetni egyes elválasztásoknál a szelektív és nem szelektív kölcsönhatások hozzájárulását a retenció létrejöttéhez, ezáltal finomíthatjuk és optimalizálhatjuk az egyes királis elválasztásokat. A

modell segítségével matematikailag jó közelítéssel leírhatóak a kísérletileg kapott csúcsalakok. Nem kapunk képet azonban a kölcsönhatások minőségéről és az egyes kölcsönhatások elválasztásra gyakorolt hatásáról.

A kromatográfiás paraméterek hőmérsékletfüggésének vizsgálatából, illetve az eredményekből számított termodinamikai paraméterek elemzéséből következtethetünk a retenciót és a szelektivitást létrehozó kölcsönhatások minőségére és erősségére. Természetesen ez a módszer sem ad egzakt eredményeket, hiszen közelítésen alapszik. Összevetve azonban a számított termodinamikai paramétereket és a vizsgált vegyületek szerkezeti sajátosságait megbecsülhetjük a kölcsönhatások királis felismerésben betöltött szerepét.

Összességében azt mondhatjuk, hogy önállóan egyik módszer sem állja meg a helyét a retenciós mechanizmus pontos feltérképezésében, azonban egymást kiegészítve árnyalt képet adnak az egy adott KÁF-on kialakuló retenciós mechanizmusról.

4.4.5. A szerkezeti tényezők és a hőmérséklet hatása a kromatográfiás paraméterekre

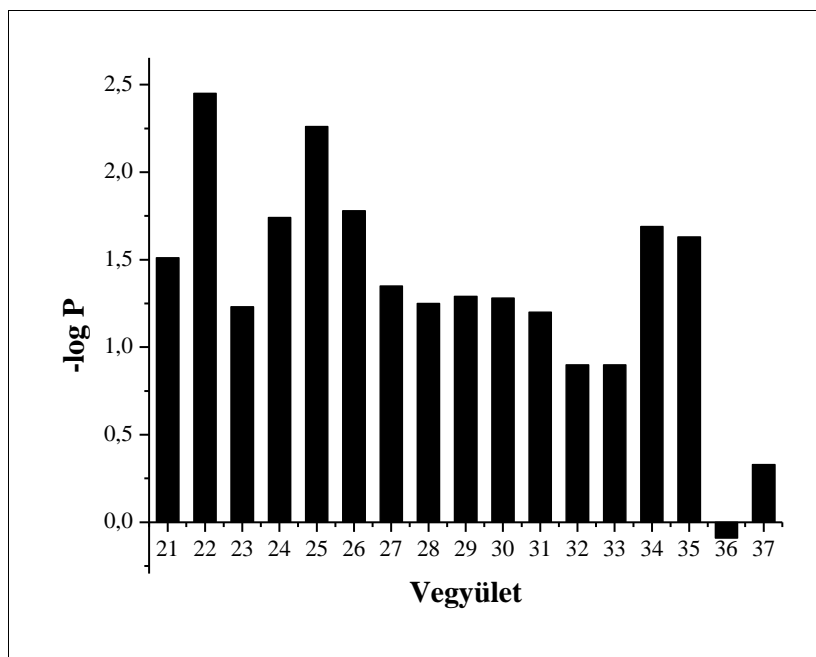
A vizsgált Gly és Phe analóg aminosavak (Függelék 4. és 5. ábra) enantiomerjeit azoknak acil- illetve karbamoil származékaiként (Függelék 6. ábra) választottuk el. Az alkalmazott *N*-védőcsoportok különböznek egymástól szterikus elrendezésükben, térkitöltésükben, polaritásukban és Lewis-féle sav-bázis sajátosságukban.

Méréseinket a 278-343 K-es hőmérséklettartományban, nyolc különböző hőmérsékleten végeztük. A Függelék 2. Táblázatában a legalacsonyabb és a legmagasabb hőmérsékleten mért kromatográfiás paramétereket tüntettük fel. A DNB származék aminosavak esetén a legalacsonyabb kísérleti hőmérséklet 293 K volt, mivel alacsonyabb hőmérsékleten irreálisan magas retenciót tapasztaltunk.

Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk a szokásos fordított fázisú rendszerekben főszerepet játszó hidrofób-hidrofób kölcsönhatások jelentőségét a retenció kialakulásában, egy „Alogps 2.1” elnevezésű szoftver [121, 122] segítségével kiszámítottuk a vegyületek 1-oktanol/víz elegyben kialakuló megoszlási hányadosainak 10-es alapú logaritmusát ($\log P$). A számított értékek természetesen nem tükrözik feltétlenül a megoszlási hányados pontos értékét, viszont megfelelő összehasonlító skálát adnak a vizsgált vegyületek hidrofóbicitásának összevetésére. A számított értékeket a 4.4.1. ábrán tüntettük fel. Az ábrán látható nagyobb $-\log P$ érték kisebb hidrofóbicitásra utal. A legnagyobb hidrofóbicitású vegyület ezek szerint a 2',3',4',5',6'-pentafluor-fenilalanin (**36**), a legkisebb hidrofóbicitású pedig a 4'-hidroxifenil-glicin (**22**).

4.4.1. ábra

A vizsgált Gly és Phe analógok $-\log P$ értékei



Alkalmazott szoftver: Alogps 2.1 [121, 122].

A Függelék 2. Táblázatában tüntettük fel a tizenhat vizsgált vegyület, négy acilező szerrel képzett származékainak vizsgálata során nyert kromatográfias paramétereket. Általánosságban megjegyezhetjük, hogy a hőmérséklet növelésével minden vizsgált vegyület esetén, a retenciós faktorok (k') és a szelektivitási tényezők (α) értéke csökkent.

Megfigyelhetjük továbbá, hogy egy adott aminosav vizsgálata során jelentősen eltérő eredményeket kaptunk az alkalmazott acil-csoport minőségétől függően. Rendkívül nagy retenciót tapasztaltunk a 3,5-dinitro-benzoil- (DNB) származékok vizsgálata során. Szintén nagy, de az előzőnél kisebb retenciós faktorokat kaptunk a 3,5-dinitro-benziloxi-karbonil- (DNZ) származékokat vizsgálva (A Függelék 2. Táblázatában szereplő alacsony hőmérsékletre tartozó k_1' értékek kisebbek ugyan a DNB származékok esetén, mint más acilcsoportok alkalmazása során, de ez a különbség a magasabb hőmérséklet alkalmazásából fakad. A k_2' értékek annak ellenére is nagyobbak adódnak a DNB származékok vizsgálata során, hogy ekkor a legalacsonyabb alkalmazott hőmérséklet 298 K volt, a többi esetben alkalmazott 278 K-nel szemben.). A legkisebb visszatartással a benziloxi-karbonil-csoporttal (Z) védett aminosavak rendelkeztek, ezeknél valamelyest később eluálódtak a benzoil-csoporttal (Bz) védett aminosavak enantiomerjei. A dinitro-szubsztituált csoportokkal védett aminosavak nagy visszatartása minden bizonnyal ezen csoportok π -savas jellegének tulajdonítható. Ez azt jelenti, hogy ezek az aromás gyűrűk az erősen elektronszívó nitrocsoportok hatására gyenge elektron akceptorokká, azaz gyenge Lewis-savakká válnak.

Az állófázis kinolin-gyűrűjének π -elektronrendszere enyhén elektron donor, azaz π -bázikus hatású, tehát a mintamolekulák π -savas gyűrűi kölcsönhatás kialakítására képesek a KÁF kinolin-gyűrűjével. Az, hogy azok az aminosav származékok amelyek π -savas szubsztituenssel rendelkeznek nagyobb retencióval eluálódnak, mint π -bázikus szubsztituenssel rendelkező analógaik arra utal, hogy a retenció létrejöttében fontos szerepet játszik a π -savas szubsztituensek és a kinolin-gyűrű között fellépő kölcsönhatás. Hasonló jelenséget figyelhetünk meg, ha a szelektivitási tényezők (α) értékeit vizsgáljuk, azaz jóval nagyobb szelektivitást értünk el a DNB és DNZ szubsztituensek alkalmazásával, mint a Bz illetve Z védőcsoportokat alkalmazva. Arra következtethetünk tehát, hogy ezek a kölcsönhatások nem csak a retenció létrejöttét segítik, hanem javítják a királis felismerést is, azaz szelektívek.

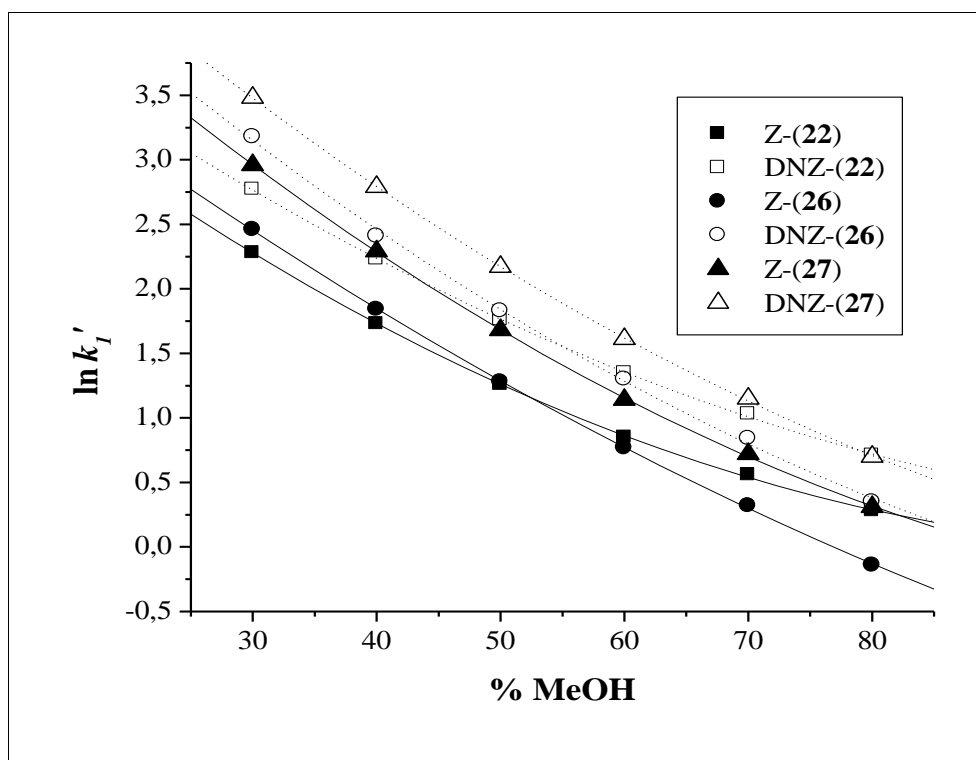
További érdekesség, hogy összevetve a benzoil- (Bz és DNB) illetve a benziloxi-karbonil-csoportokkal (Z és DNZ) védett aminosavak szelektivitási tényezőinek (α) értékeit, megfigyelhetjük, hogy a Bz és DNB védett aminosavak sztereoizomerjei nagyobb szelektivitással választhatóak el. Ennek eredménye, hogy az elsőként eluáló enantiomerek retenciója kisebb a Bz és DNB származék vegyületek esetén, a nagy α értéknek köszönhetően azonban a k_2' értékek nagyobbak adódnak, mint a Z és DNZ származék vegyületek esetén. Ezt a jelenséget sztérikus okokkal magyarázhatjuk. A benziloxi-karbonil-csoportok aromás gyűrűje ugyanis két atomnyi távolsággal messzebb található a kiralitás centrumtól, mint a benzoil-csoportok esetén. Ez a benziloxi-karbonil-származék vegyületek molekuláinak esetén nagyobb fokú flexibilitást eredményez, amely kedvezőtlenül befolyásolja a királis felismerést.

Azért, hogy tanulmányozhassuk az akirális fordított fázisú HPLC-ben főszerepet játszó, hidrofób-hidrofób kölcsönhatások retencióra gyakorolt hatását megvizsgáltuk, hogy az eluens szerves módosító tartalmának változtatása hogyan befolyásolja a **22**, **26** és a **27** vegyületek Z- illetve DNZ-védett származékainak kromatográfiás paramétereit (4.4.2. ábra). A vizsgálatokat állandó ionerősség és állandó pH mellett végeztük el. Az ábráról látható, hogy az összes vizsgált esetben a retenciós faktorok értékei csökkentek, miközben növeltük a mozgófázis MeOH tartalmát. Ez szokásos viselkedés a fordított fázisú elválasztások során, a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások retencióra gyakorolt szerepére utal.

Árnyaltabb képet kaphatunk azonban, ha azonos kromatográfiás körülmények közt összevetjük a különböző oldalláncú aminosavak kromatográfiás viselkedését. Figyeljük meg a négy legnagyobb hidrofóbicitású aminosav (**32**, **33**, **36**, **37**) kromatográfiás viselkedését

4.4.2. ábra

A mozgófázis metanol tartalmának hatása három vizsgált aminosav-származék retenciójára



Kromatográfiai körülmények: oszlop, ProntoSil™ 120-5 tBuCQN; eluens, NH₄OAc (aq)/MeOH = 70/30-20/80 (v/v) pH_a = 6,0; ionerősség = 0,1M; áramlási sebesség, 0,5 ml/perc; detektálási hullámhossz, 230 nm.

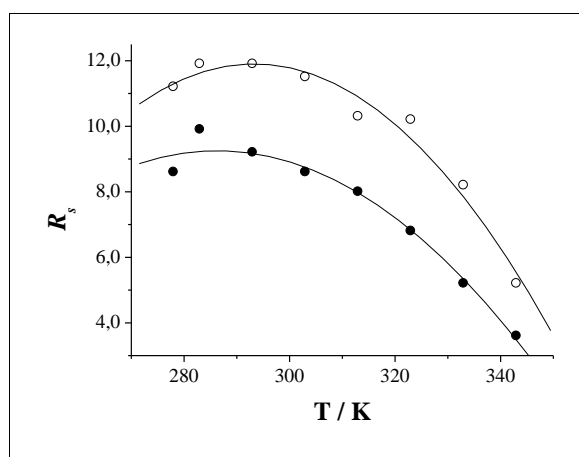
(Függelék 2. Táblázat). Kiugróan nagy retenciót a naftil-alanin (**37**) vizsgálata során figyeltünk meg. A **37** vegyületet vizsgálva látható, hogy a nagy k_I' értékhez átlagosnak mondható szelektivitás társul. Ezt a viselkedést tulajdoníthatnánk a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások retenciós mechanizmusban betöltött kulcsszerepének is, vizsgáljuk meg azonban a másik három, nagy hidrofóbicitású aminosav viselkedését is. A *treo*- β -metil-fenilalanin (**33**) és a 3',4',5',6'-pentafluor-fenilalanin (**36**) a többi, kisebb hidrofóbicitású Phe analóg aminosavhoz hasonló kromatográfiai viselkedést mutat. Ezekről nagyon eltérően viselkedik azonban az *eritro*- β -metil-fenilalanin (**32**). A Függelék 2. Táblázatából látható, hogy a **32** vegyület elsőként eluálódó enantiomerje hasonló visszatartással eluálódik az oszlopról, mint a *treo* izomer megfelelő enantiomerje. Az állófázis azonban az *eritro* izomer (**32**) enantiomerjeit jóval kisebb szelektivitással képes csak elválasztani. Ez arra enged következtetni, hogy a szterikus hatások is jelentősen befolyásolják a királis felismerést.

Szintén érdekes megfigyeléseket tehetünk, ha megvizsgáljuk a hat legkisebb hidrofóbicitású aminosav (**22**, **24**, **25**, **26**, **34**, **35**) kromatográfiai paramétereit. A szokásos akirális kromatográfiában megfigyelt tapasztalatok alapján, a kis hidrofóbicitású vegyületek kis retencióval eluálódnak. Ez a megállapítás igaz a metallil-glicin (**25**) és a leucin (**26**) retenciós paramétereire. A vizsgált vegyületek közül ezen két aminosav k_I' értékei

bizonyultak a legkisebbnek, a szelektivitási tényezők (α) értékei esetükben átlagosnak, vagy annál kissé nagyobbak mondhatóak. A két fluor szubsztituált Phe (**34**, **35**) analóg kromatográfiás paraméterei nem mutatnak jelentős eltérést a Phe és a metil szubsztituált Phe analógokétól annak ellenére, hogy a számított hidrofóbicitásukban jelentős különbséget észlelhetünk. A leginkább hidrofíl aminosav a 4'-hidroxi-fenil-glicin (**22**) és a fluor szubsztituált aminosavakkal körülbelül egyező hidrofóbicitást mutató tienil-glicin (**24**) retenciós faktorainak értékei azonban rendkívül nagyok bizonyultak. Náluk csak a nagy hidrofóbicitású és nagy térkitöltésű aromás oldallánccal rendelkező naftil-alanin (**37**) enantiomerjeinek visszatartása volt erősebb. Ezt az oldalláncon található, kölcsönhatások kialakítására képes, hidroxil- és tioétercsoportok jelenlétével magyarázhatjuk. Ezek a

4.4.3. ábra

A DNZ-fenil-glicin (**21**) és a DNZ-leucin (**26**) enantiomerek elválasztása során mért felbontások hőmérsékletfüggése



Kromatográfiás körülmények: oszlop, ProntoSil™ 120-5 tBuCQN; eluens, 0,2 M NH₄OAc (aq)/MeOH = 10/90, pH_a = 6,0; áramlási sebesség, 0,5 ml/perc; detektálási hullámhossz, 230 nm. (●), DNZ-fenil-glicin (**21**), (○), DNZ-leucin (**26**)

π -sav π -bázis- és szterikus kölcsönhatások, valamint hidrogénkötések.

A fejezet elején említettük, hogy a hőmérséklet emelése során a k' és α értékek is csökkentek. Szándékosan nem említettük ekkor a hőmérséklet felbontásra gyakorolt hatását, ez ugyanis összetettebb jelenség. A 4.4.3. ábrán a **21** és **26** aminosav enantiomerek DNZ származékainak felbontását ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében. Az ábráról látható, hogy a felbontások értékei maximum jellegű görbét írnak le, a maximum pedig 283 K környékén található. A magasabb hőmérsékleten mutató felbontás csökkenés a csökkenő szelektivitási tényezőknek tulajdonítható. Alacsony hőmérsékleten lassul

funkciós csoportok ugyanis képesek hidrogénkötések kialakítására, amelyek elősegíthetik a retenció létrejöttét. Ebben a két esetben a nagy retenció nem párosul nagyobb szelektivitással.

Összességében azt mondhatjuk, hogy az alapvetően fontos elektrosztatikus és a fordított fázisú kromatográfiában természetes hidrofób-hidrofób kölcsönhatások kialakulásán kívül más kölcsönhatások is létrejönnek az állófázis és a mintamolekulák között, amelyek alapvetően befolyásolják a retenció mértékét és a királis felismerés létrejöttét.

Ezek a járulékos kölcsönhatások lehetnek

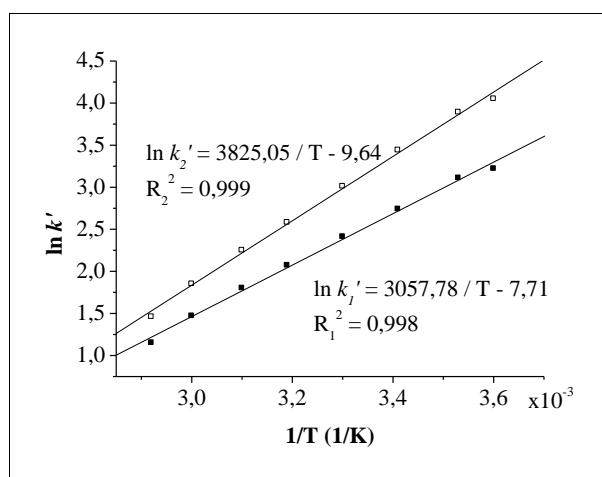
az anyagátadási kinetika, ez pedig az oszlop tényárszámának csökkenéséhez, végeredményben a hatékonyság romlásához vezet, amely kisebb felbontás értékekben mutatkozik meg.

4.4.6. A számított termodinamikai paraméterek elemzése

Munkánk során a (13) egyenlet felhasználásával kiszámítottuk a vizsgált aminosavak enantiomerjeinek kromatográfiás megoszlása során fellépő entalpia- és entrópiaváltozásokat (4.4.4. ábra). Az állófázis több fizikai paraméterének és így a fázisarány ismeretének hiányában (ΔS°) helyett az adott enantiomer megoszlása során fellépő entrópiaváltozás és a fázisarány egyetemes gázállandóval ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) alkotott szorzatának összegét ($\Delta S^{\circ\#} = \Delta S^\circ + R \ln \phi$) adjuk meg. A kapott értékeket a Függelék 3. és 4. Táblázatában tüntettük fel.

4.4.4. ábra

Az *N*-DNZ-4-hidroxi-fenil-glicin (22) enantiomerjeinek van't Hoff egyenesei



Kromatográfiás körülmények: oszlop, Prontosil™ 120-5 tBuCQN; eluens, 0,2 M NH₄OAc (aq)/MeOH = 10/90, pH_a = 6,0; áramlási sebesség, 0,5 ml/perc; detektálási hullámhossz, 230 nm.

Általánosan megállapíthatjuk, hogy az elsőként eluálódó enantiomerek entalpia- és entrópiaváltozásának értéke kevésbé negatív, mint a másodjára eluálódó sztereoizomereké. Mivel a másodjára eluálódó enantiomerek entrópiája nagyobb mértékben csökken, miközben átkerülnek a mozgófázisból az állófázisra arra következtethetünk, hogy kevesebb szabadsági fokkal rendelkeznek a KÁF-on, azaz kevesebb lehetőségük nyílik a rotációra valamint egyéb mozgásokra, mint az elsőként eluálódó enantiomereknek. A nagy abszolút értékű

azzal is magyarázható, hogy az adott enantiomer több szolvátmolekulát szorít ki az állófázisról. A másodjára eluálódó sztereoizomerek esetén tapasztalt nagyobb entalpiaváltozásból arra következtethetünk, hogy ezek erősebb kölcsönhatások kialakítására képesek az állófázison, mint az elsőként eluálódó társaik.

Szintén megfigyelhetjük, hogy a Z és Bz védőcsoporttal ellátott aminosavak optikai izomerjeinek megoszlása során kisebb abszolút értékű ΔH_1° , ΔH_2° , illetve $\Delta S_1^{\circ\#}$ és $\Delta S_2^{\circ\#}$ változás jön létre, mint az aromás gyűrűjükön két-két nitrocsoportot tartalmazó DNZ és DNB védőcsoporttal ellátott aminosav enantiomerek esetén. A nitrocsoportok erős elektronszívó

hatásának köszönhetően ugyanis a DNZ- és DNB-csoportok aromás gyűrűi elektron akceptor tulajdonságúvá, azaz gyenge Lewis-savakká válnak. Ezek képesek kölcsönhatást kialakítani a szelektoron található elektron donor hatású kinolin gyűrűvel. Már korábban is említettük, hogy ez a kölcsönhatás jelentősen hozzájárul a retenció és a királis felismerés folyamatának létrejöttéhez. Egy másik jellegzetes tendenciát is észrevehetünk a ΔH° és $\Delta S^{\circ\#}$ értékeit vizsgálva. A benzoil-csoportokkal (Bz és DNB) védett aminosavak enantiomerjeinek megoszlása ugyanis nagyobb változást okoz mind az entalpia-, mind az entrópiaváltozás értékeiben, mint a benziloxi-karbonil-csoporttal (Z és DNZ) védett aminosavak sztereoizomerjei. A Z- és DNZ-csoportok aromás gyűrűi 2 atomnyi távolsággal távolabb helyezkednek el az optikai centrumtól, mint a Bz és DNB csoportok gyűrűi, ezáltal a Z és DNZ védett aminosavak flexibilisebb szerkezetűek, ami csökkentheti a kialakuló kölcsönhatások erősségét.

Ha megvizsgáljuk a különböző aminosavak oldalláncának hatását az entalpia- és entrópiaváltozásra, akkor megfigyelhetjük, hogy a különböző szerkezetű aminosav oldalláncok jóval kisebb mértékben befolyásolják a termodinamikai paraméterek értékét, mint az aminosavakhoz kapcsolt védőcsoportok. Ennek ellenére néhány jelentősebb eltérést tapasztalhatunk, különösen a másodjára eluálódó enantiomerek esetén. A Gly analógok (**21-26**) termodinamikai paramétereit tekintve látható, kivéve a **22**, illetve a **25** és **26** aminosavak enantiomerjeinek ΔH° és $\Delta S^{\circ\#}$ értékeit, hogy az adatok nagy mértékű egyezést mutatnak. A **22** vegyület többitől eltérő viselkedéséből arra következtethetünk, hogy az aminosav oldalláncán található hidroxilcsoporton keresztül hidrogénkötés kialakítására képes, ez pedig hozzájárul a retenció létrejöttéhez. A **25** és **26** aminosavak megoszlása által okozott kis mértékű ΔH° és $\Delta S^{\circ\#}$ változás azzal magyarázható, hogy oldalláncain nem található semmilyen kölcsönhatás kialakítására képes funkciós csoport, emellett az oldallánc térkitöltése is viszonylag kicsi. E két aminosav számított hidrofóbicitása a második és harmadik legkisebb a vizsgált aminosavak közül (4.4.1. ábra).

Összevetve a Phe analóg aminosavak (**27-37**) termodinamikai adatait hasonló megfigyeléseket tehetünk, mint az imént tárgyalt Gly analógok esetén, azaz a különböző oldalláncú aminosavak ΔH° és $\Delta S^{\circ\#}$ értékeit szinte nem befolyásolja az aminosav oldalláncok minősége. Két kivételt találtunk, egyik az *eritro*- β -metil-fenilalanin (**32**), a másik pedig a naftil-alanin (**37**). A **32** aminosav esetén, a másodjára eluálódó enantiomer megoszlása során fellépő entalpia- és entrópiaváltozás jelentősen kisebbnek bizonyult, mint bármely másik Phe analóg aminosav ΔH_2° és $\Delta S_2^{\circ\#}$ értéke, beleértve a *treo*- β -metil-fenilalanin (**33**) enantiomerjeit is. Ez a viselkedés mindenképpen a szterikus kölcsönhatások királis felismerésre gyakorolt jelentős hatására utal. Az összes vizsgált vegyület közül a **37** aminosav

enantiomerjeinek kromatográfiás megoszlása okozta a legnagyobb mértékű entalpia- és entrópiaváltozást. Ezt a jelenséget a nagy térkitöltésű, merev és rendkívül hidrofób oldallánc jelenlétével magyarázhatjuk, az így létrejövő kölcsönhatások azonban inkább a retenció létrejöttét segítik, mintsem a királis felismerést és elválasztást.

Összehasonlítva a fenil-glicin (**21**) és fenilalanin (**27**) termodinamikai paramétereit megfigyelhetjük, hogy kis mértékben de észrevehetően a **21** aminosav ΔH° és ΔS° értékei nagyobbak adódtak. Ez valószínűleg az optikai centrumhoz közelebb található és így kevésbé flexibilisen rögzített aromás gyűrűnek köszönhető.

Azért hogy megvizsgáljuk, hogy a fellépő kölcsönhatások mekkora mértékben és milyen irányban befolyásolják a királis felismerést, kiszámítottuk az enantiomerek megoszlása során fellépő entalpia-, entrópia- és szabadentalpia változások különbségeit ($\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$ és $\Delta(\Delta G^\circ)$), minden egyes vizsgált vegyület esetén, a (14) és (15) egyenlet segítségével. Szintén kiszámítottunk egy aránypárt (Q), amely arra utal, hogy az enantiomer elválasztás jóságát valójában jellemző $\Delta(\Delta G^\circ)$ értéket mennyire befolyásolja az entalpia-, illetve entrópiaváltozások különbsége ($\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$) (Függelék 5. és 6. Táblázat).

Szemügyre véve a Függelék 5. és 6. Táblázatának adatait megfigyelhetjük, hogy a DNB védőcsoporttal ellátott aminosavak vizsgálata során kaptuk a legnagyobb $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$ és $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékeket. Jelentősen csökkennek a termodinamikai paraméterek különbségei a DNZ illetve a Bz védett aminosavak esetén. A legkisebb különbségeket a Z-csoporttal védett aminosavak enantiomerjeinek elválasztása során figyeltük meg. Az adatokból az következik, hogy a nitro-szubsztituált aromás gyűrűk és a KÁF kinolin gyűrűje közti π -sav π -bázis kölcsönhatások, illetve a merevebb, kevésbé flexibilis molekulaszervezet nemcsak a retenció létrejöttét segíti elő, hanem a királis felismerés folyamatát is.

Összehasonlítva a Gly analógok termodinamikai paramétereinek különbségeit megfigyelhetjük, hogy az egyébként nagy visszatartással rendelkező és megoszlása során nagy entalpia- és entrópiaváltozást okozó 4'-hidroxi-fenil-glicin (**22**) $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$ és $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékei kevésbé bizonyultak nagyobbak, mint a jóval kisebb visszatartással rendelkező fenil-glicin (**21**) megfelelő különbség értékei. Ez arra utal, hogy a korábban említett, a **22** aminosav hidroxil-csoportján keresztül létrejövő hidrogénkötés ugyan nagyrészen hozzájárul a retenció létrejöttéhez, de szelektívnek csak kis mértékben bizonyul. Hasonló megfigyeléseket tehetünk a **24** aminosav retenció tulajdonságait és $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$ és $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékeit összevetve (Függelék 2. 5. és 6. Táblázat). A **25** és **26** aminosavak enantiomerjeinek elválasztása során figyeltük meg a legnagyobb $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$ és $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékeket (kivéve Z-védett származékaikat). Ezen aminosavak sztereoizomerjei

kromatográfiás megoszlásuk során meglehetősen csekély entalpia- és entrópiaváltozást okoztak. Ez arra utal, hogy az esetükben fellépő viszonylag gyenge kölcsönhatások nagymértékben szelektívnek bizonyultak.

A Phe analóg aminosavak vizsgálata során a $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$ és $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek nem térnek el jelentősen egymástól, egy pozitív és egy negatív irányú kivételtől eltekintve. A két kivétel a β -metil-fenilalanin két diasztereomerje (**32** és **33**). Az *eritro*- β -metil-fenilalanin (**32**) esetén ugyanis a termodinamikai paraméterek különbségei számottevően kisebbnek, míg a *treo* sztereoisomer (**33**) esetén valamivel nagyobbak adódtak a többi Phe analóg aminosav átlagosnak mondható értékeihez képest. Ez alapján tehát a szterikus kölcsönhatások a molekulák térállása szerint kedvezően és kedvezőtlenül is befolyásolhatják a királis felismerést.

A Függelék 5. és 6. Táblázatában feltüntettünk minden egyes vegyület esetén egy arányszámot (Q), amely arra utal, hogy a királis elválasztás létrejöttében az entalpia- vagy entrópia változás játszik-e nagyobb szerepet. Az 1-nél nagyobb arányszám az entalpia-, míg az 1-nél kisebb érték az entrópiaváltozás nagyobb szerepét jelzi. A Táblázatból látható, hogy a Q értéke minden esetben nagyobb 1-nél, azaz az elválasztások ezen a királis állófázison inkább entalpia mintsem entrópia vezéreltek.

4.4.7. Összefoglalás

Megvizsgáltuk tizenhat glicin és fenilalanin analóg aminosav négy különböző acilezett származékának kromatográfiás viselkedését egy anioncserélő típusú, kinin-származék KÁF-on. A méréseket a 278-343 K-es hőmérséklettartományban, 8 különböző hőmérsékleten végeztük. Vizsgálataink során összehasonlítottuk a különböző szerkezeti jellemzőkkel rendelkező aminosavak kromatográfiás viselkedését, kiszámítottuk a vegyületek enantiomerjeinek megoszlása során fellépő termodinamikai változásokat, valamint a sztereoizomerekre vonatkozó változások különbségét. A mért és számított adatok segítségével következtethettünk a vizsgált vegyületek és a királis állófázis közötti kölcsönhatások minőségére, valamint a retencióban és a királis felismerésben betöltött szerepére.

Vizsgálataink során arra következtettünk, hogy a retenció kialakulásában fontos szerepet játszanak a fordított fázisban általában jelentős hidrofób-hidrofób kölcsönhatásokon és az állófázis anioncserélő tulajdonságából fakadó elektrosztatikus kölcsönhatáson kívül más, járulékos kölcsönhatások is. A visszatartás kialakulásában rendkívül fontosnak és szelektívnek bizonyultak a védőcsoportok nitrált aromás gyűrűi és az állófázis kinolin gyűrűje közötti π -sav π -bázis kölcsönhatások. Szintén nagymértékben elősegítik a retenció

kialakulását az aminosav oldalláncok alkalmas funkciós csoportjain keresztül kialakuló hidrogénkötések is, ezek a kölcsönhatások azonban csekély mértékben járulnak hozzá a királis felismerés folyamatához. A sztérikus kölcsönhatások retenciós mechanizmusra gyakorolt hatása igen összetett. Egyrésztől ugyanis elősegíthetik a retenció kialakulását, de alig rendelkeznek sztereoszelektív hatással (lásd. **37** vegyület), másrésztől a β -metil-fenilalanin diasztereomerek (**32** és **33**) vizsgálta során azt tapasztaltuk, hogy a molekulák térszerkezetétől függően segíthetik vagy gátolhatják az enantiomerek elválasztásának folyamatát. Általában igaznak bizonyult, hogy a merevebb molekulaszervezet kedvez a retenció kialakulásának és elősegíti a királis felismerést.

5. Összefoglalás

Az élő szervezetet felépítő vegyületek túlnyomó többsége királis. Az optikailag aktív vegyületek enantiomerjei eltérően reagálnak királis környezetben, ezért mind szigorúbb követelménnyé válik a gyógyszer- és az élelmiszeiparban az enantiomer tisztaságú hatóanyagok alkalmazása. Szükségessé vált tehát sztereoszelektív szintéziseljárások fejlesztése és a minőségbiztosítás végrehajtására alkalmas analitikai eljárások kidolgozása. A királis analitika legdinamikusabban fejlődő és leginkább elterjedt ágazata a királis folyadékromatográfia.

A bikalutamid (**1**) egy nem sztereoid szerkezetű antiandrogén, melyet sikerrel alkalmaznak a prosztaták kezelésében. Munkatársaink alternatív sztereoszelektív szintéziseljárást dolgoztak ki a bikalutamid (**1**) előállítására. Feladatunk volt a gyártási alapanyagok, illetve a közti és melléktermékek királis tisztaságának ellenőrzésére alkalmas HPLC-s eljárásokat kifejleszteni. Méréseket végeztünk normál és fordított fázisú, valamint poláris ionos körülmények között.

- Egy cellulóz-alapú Chiralcel™ OD-H oszlopon megoldottuk a bikalutamid (**1**), valamint egy gyártásközi, illetve egy gyártási melléktermékének királis elválasztását, leírtuk az elválasztáshoz szükséges optimális körülményeket.
- Több, kipróbált makrociklusos glikopeptid-alapú állófázissal rendelkező királis oszlop közül, a Chirobiotic™ T, illetve a Chirobiotic™ TAG bizonyult a legeredményesebbnek a bikalutamid és alapanyagai valamint melléktermékei vizsgálata során. A Chirobiotic™ T normál fázisban, míg a Chirobiotic™ TAG fordított fázisban és poláris-ionos módban nyújtott kiemelkedő szelektivitást.
- Megoldottuk a reaktív, és ennél fogva nehezen analizálható köztitermékek királis elválasztását egy β -ciklodextrin alapú, Cyclobond™ I 2000 SN oszlop alkalmazásával.

- Megkíséreltük az öt vizsgált vegyület analízisét egyetlen kromatográfiás futtatással végrehajtani, azonban arra a következtetésre jutottunk, hogy ez oldhatósági problémák miatt lehetetlen. Az összes vegyület királis HPLC-s analíziséhez legalább két kromatográfiás felvétel szükséges.
- Megállapítottuk a vizsgált vegyületek enantiomerjeinek elúciós sorrendjét az alkalmazott királis állófázisokon, valamint meghatároztuk az enantiomer tisztaságú anyagok királis szennyezésének mértékét, amely a vizsgált esetekben maximum 1%-nak adódott.

Az utóbbi évtizedekben nagy érdeklődésre tart számot a konformációsán gátolt aminosavak szintézise. Ilyen szerkezetű aminosavakat peptidekbe építve ugyanis ismert, és viszonylag stabil konformációjú peptidek hozhatók létre. Az így kialakított peptidek alkalmasak lehetnek a sejtek receptorainak szerkezeti feltérképezésére és vizsgálatára. Az ilyen konformációsán gátolt aminosavak családjába tartoznak a β -aminosavak, az α -szubsztituált aminosavak és az amin nitrogénjüket gyűrűben hordozó ciklikus iminosavak.

Munkánk során lehetőségünk nyílt nitroxid szabadgyököt tartalmazó β -aminosavak királis kromatográfiás vizsgálatára. A stabil nitroxid szabadgyököt tartalmazó vegyületeket felhasználják biológiai tanulmányokban más gyökök spin-csapdájaként, az optikailag aktív típusaikat pedig királis oxidálószerként, valamint akirális gyökök királis származékképző szereként. A szabadgyökös β -aminosavak bizonyos típusait peptidekbe építve alkalmazzák biológiai és konformációs ESR vizsgálatokhoz.

- Megoldottuk a szabadgyököt tartalmazó Fmoc-védett aminosavak fordított fázisú közvetlen királis elválasztását, egy cellulóz-alapú Chiralcel™ OD-RH oszlopon. Az eluensösszetétel és az oszloptér hőmérséklet változtatásával optimalizáltuk az elválasztást.
- Közvetett királis kromatográfiás eljárásokat fejlesztettünk ki a nem védett aminosavak enantiomerjeinek elválasztására. Az FDAA, a GITC és az (S)-NIFE királis származékképző reagens alkalmasságát teszteltük. Vizsgáltuk, hogy a reakciókörülmények változtatása milyen hatással van a képződő diasztereomer származékok konverziójára és az aminosavak racemizációjára.
 - Azt tapasztaltuk, hogy az FDAA viszonylag kis reaktivitása miatt nem alkalmas ilyen típusú aminosavak származékképzésére és elválasztására.
 - A GITC alkalmazása során a megfelelő mértékű termékképződés mellett nagy mértékű racemizációt figyeltünk meg. Amikor megkíséreltük a racemizációt

visszaszorítani (enyhébb reakció körülmények alkalmazásával) a kitermelés is csökkent.

- A vizsgált KSR-ek közül egyedül az (*S*)-NIFE bizonyult kellőképpen reaktívnek és szelektívnek a gyűrűs, szabadgyökös aminosavak királis elválasztásához.
- Meghatároztuk a vizsgált enantiomerek elúciós sorrendjét minden kifejlesztett módszer alkalmazása során.
- Meghatároztuk az enantiomer tisztaságú anyagok királis szennyezésének mértékét közvetlen és közvetett módszerekkel egyaránt. Az (*S*)-NIFE felhasználásával nyert szennyezés értékek összevethetőek a közvetlen módszerrel kapott értékekkel.

A konformációsán gátolt aminosavak másik típusa a szekunder α -aminosavak (iminosavak) csoportja. Vizsgálataink során iminosavak enantiomerjeit választottuk el két, rokon szerkezetű makrociklusos glikopeptid-alapú állófázison.

- Közvetlen királis kromatográfias eljárásokat dolgoztunk ki a vizsgált iminosavak enantiomerjeinek elválasztására.
- Megvizsgáltuk a mozgófázis összetételének és az eluens pH-jának hatását az elválasztásra. Az eluens pH-jának retencióra gyakorolt hatását vizsgálva bizonyítékot találtunk az állófázison található karboxilcsoporton keresztül létrejövő elektrosztatikus kölcsönhatások retenciós folyamatban betöltött szerepére.
- Összehasonlítottuk a két rokon szerkezetű királis szelektor, a teicoplanin és a teicoplanin aglikon elválasztóképességét a vizsgált iminosavakkal szemben. Hasonló megállapításokat tehettünk, mint amit az irodalomban a β -aminosavakra vonatkozóan találtunk, azaz a teicoplanin szelektor gyakran hatékonyabbnak bizonyul a teicoplanin aglikonnál. Ez azzal magyaráztuk, hogy a merev szerkezetű és sztérikusan gátolt β -aminosavak illetve az iminosavak kevésbé illeszkednek a szelektor hidrofób üregeibe, illetve gyengébb elektrosztatikus kölcsönhatásokat képesek létrehozni. Emiatt előtérbe kerül a hidrogén kötések és a sztérikus kölcsönhatások kialakításának képessége.

Az utóbbi évtizedekben a királis kromatográfia területén dolgozó kutatók egyre több erőfeszítést tesznek a királis felismerést létrehozó kölcsönhatások megismerésére. E célból számos módszert fejlesztettek ki, melyek közül mi az egyik legelterjedtebben alkalmazott eljárást választottuk egy kinin-karbamát-alapú királis szelektor vizsgálatára. Vizsgálataink során fordított fázisú körülmények között választottuk el tizenhat glicin és fenilalanin analóg aminosav 4-féle acilezett származékának enantiomerjeit. Munkánk során tanulmányoztuk a hőmérséklet, a mozgófázis összetétel és a vegyületek szerkezetének hatását az elválasztásra.

- Előállítottuk a vizsgált aminosavak Z-, DNZ-, Bz-, illetve DNB-származékait. Általánosságban elmondhatjuk, hogy a képződött származékok retenciója Z, Bz, DNZ, DNB sorrendben növekedett.
- 278 és 343 K közötti hőmérséklettartományban nyolc hőmérsékleten felvettük a vizsgált anyagok kromatogramját. A hőmérséklet emelése során a retenciós faktorok (k') és a szelektivitási tényezők (α) értékei csökkentek, a felbontás (R_s) viszont maximum jellegű hőmérsékletfüggést írt le.
- Annak érdekében, hogy vizsgálhassuk a fordított fázisú rendszerekben kulcsfontosságú hidrofób-hidrofób kölcsönhatások szerepét az általunk vizsgált rendszerben, egy számítógépes szoftver segítségével kiszámítottuk a vegyületek 1-oktanol/víz elegyben kialakuló megoszlási hányadosának 10-es alapú logaritmusát ($\log P$), és összevetettük az eltérő oldalláncú aminosavak kromatográfiás viselkedésével. Ebből a célból továbbá megvizsgáltuk az eluensösszetétel változtatásának hatását a **22**, **26** és a **27** vegyületek Z- és DNZ-származékainak kromatográfiás paramétereire. Vizsgálatainkból arra következtettünk, hogy a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások meghatározó szerepet játszanak ugyan a visszatartás létrejöttében, de szelektivitásuk kicsi. Más, nagyobb szelektivitású kölcsönhatások létrejöttével is számolnunk kell, különös tekintettel az elektrosztatikus és a Lewis-féle sav-bázis kölcsönhatásokra valamint a hidrogén kötések kialakulására.
- A különböző hőmérsékleten mért kromatográfiás paramétereiből kiszámítottuk a vizsgált rendszerben létrejövő enantiomermegoszlásra jellemző termodinamikai paramétereket, vagyis a fellépő entalpia- és entrópiaváltozásokat, valamint az egyes enantiomerekre jellemző entalpia-, entrópia- és szabadentalpia változások különbségeit.
 - A szelektoron található π -bázikus kinolin gyűrű és a DNZ- és DNB-védett aminosavak π -savas nitro-szubsztituált aromás gyűrűi közt fellépő Lewis-féle sav-bázis kölcsönhatások jelentősen hozzájárulnak mind a visszatartás, mind pedig a szelektivitás létrejöttéhez.
 - A merevebb molekulaszervezet elősegíti a királis elválasztást.
 - A hidrogén kötések kialakulása nagyban hozzájárul a retenció létrejöttéhez, de a királis felismerésben kisebb szerepet játszik.
 - A sztérikus kölcsönhatások jelentősen befolyásolják az elválasztást, de hatásuk lehet kedvező és kedvezőtlen is.

Summary

Most of natural compounds are chiral. The enantiomers of optically active compounds interact differently in chiral environment. Accordingly, the application of enantiopure substances has become a very strict requirement in the pharmaceutical and food industry. Therefore, development of stereoselective synthetic procedures and appropriate analytical processes for the quality control has become necessary. Nowadays the chiral high-performance liquid chromatography (HPLC) is the most dynamically developing and widely applied branch of the chiral analytics.

The bicalutamide (**1**) is a nonsteroidal antiandrogen active pharmaceutical ingredient and it is successfully applied in the therapy of prostate cancer. A new alternative synthetic procedure for the preparation of bicalutamide (**1**) was developed by our co-workers. Our task was to develop chiral HPLC methods in order to control the enantiopurity of the starting materials, the intermediates and the side products of the synthesis of bicalutamide (**1**). Normal-, reversed phase and polar-ionic HPLC modes were applied.

- Enantioseparation of bicalutamide and one of its intermediates and a side product was carried out on a Chiralcel™ OD-RH column. The optimized chromatographic parameters were described.
- The usefulness of various macrocyclic glycopeptide-based stationary phases during the enantioseparation of bicalutamide and its starting materials, intermediates and side products was investigated. Among the applied columns the Chirobiotic™ T and Chirobiotic™ TAG exhibited the best efficiency. The Chirobiotic™ T demonstrated outstanding selectivity in case of normal-phase analyses. In the reversed-phase investigations the Chirobiotic™ TAG showed similarly excellent enantioselectivity.
- The enantioseparation of reactive, therefore hardly analyzable intermediates was carried out on a β -cyclodextrin-based Cyclobond™ I 2000 SN column.
- Enantioseparation of the stereoisomers of the five investigated compounds in one chromatographic run was attempted, but due to solvation problems it failed. At least two injections were needed to separate the stereoisomers of all compounds.
- The elution sequence of the enantiomers of all compounds on all of the investigated stationary phases was determined. The chiral contaminations in the enantiopure samples were found to be less than 1%.

In the past decades there has been a growing interest in the synthesis of sterically hindered amino acids. Structurally known and relatively stable peptides can be prepared using

these amino acids. These peptides are useable for the investigation and exploration of cell receptors. The family of these amino acids included β -amino acids, α -substituted amino acids and secondary α -amino acids (“imino acids”).

Stable nitroxide free radicals are applied as spin traps of other radicals in biological studies. The optically active ones are used as chiral oxidizing agents and chiral derivatizing agents of achiral radicals. Some types of spin-labeled amino acids are often built in peptides for biological and conformational EPR studies.

- The direct chiral separation of Fmoc-protected spin-labeled β -amino acids was carried out on a Chiralcel™ OD-RH column in reversed-phase mode. The separation was optimized by changing the mobile phase composition and column temperature.
- Indirect chiral chromatographic processes were developed for the separation of isomers of unprotected amino acids. The effectiveness of three chiral derivatizing agents (CDAs) – FDAA, GITC and (*S*)-NIFE – was tested. The influence of changing reaction conditions for the conversion of diastereomeric derivatives and for the racemization of amino acids was investigated.
 - The FDAA seemed to be the least applicable for the derivatization and enantioseparation of spin-labeled β -amino acids, because of its mild reactivity.
 - When using GITC, acceptable yield of conversion but high degree of racemization was observed. To avoid racemization, milder reaction conditions were applied and the yield decreased.
 - Among the investigated CDAs, the (*S*)-NIFE was the only one, which exhibited reactivity and selectivity for the separation of enantiomers of cyclic, spin-labeled β -amino acids.
- The elution sequences of the stereoisomers were determined in each method.
- The enantiopurity was determined for both the direct and indirect methods and comparable results were obtained.

Other type of conformationally constrained amino acids is the group of secondary α -amino acids (“imino acids”). The enantioseparation of some of these amino acids were accomplished on two, structurally similar macrocyclic glycopeptide-based stationary phases.

- Direct chromatographic processes were developed for the separation of enantiomers of these types of amino acids.
- The influence of the mobile phase composition and the pH of the mobile phase on the chromatographic parameters were investigated. The change of pH revealed that

electrostatic interactions forming, via the carboxylic group of the stationary phase, exhibited an important role in the retention process.

- The separation ability of the two similar glycopeptide-based stationary phases was compared for the separation of imino acid enantiomers. Our observations were similar to those described in the literature for the β -amino acids. Accordingly, the native teicoplanin selector was often proved higher selectivity than the teicoplanin aglycon. We explained this behavior by the hard fitting of the rigid and sterically hindered β -amino and imino acids in the hydrophobic cavities of the chiral stationary phases (CSPs). In the case of teicoplanin, despite the covered hydrophobic cavities (by sugar moieties), the CSP exhibited higher efficiency, due to hydrogen bond formation or increased steric interactions.

In the past decades more and more efforts have been made to explore those interactions, which are involved in chiral recognition. For this purpose numerous processes have been developed. In our work on a quinine-carbamate based CSP, the influence of the column temperature, the mobile phase composition and structure of the sample molecules on the chiral recognition process were investigated.

- For these purposes four kinds of acylated derivatives of sixteen glycine and phenylalanine analogues [benzyloxy-carbonyl (Z), the 3,5-dinitro-benzyloxy-carbonyl (DNZ), the benzoyl (Bz) and the 3,5-dinitro-benzoyl (DNB) derivatives] were prepared.
- Generally the retention of enantiomers increased in the sequence $Z < Bz < DNZ < DNB$.
- The chromatograms of the investigated compounds were recorded at eight temperatures in the range of 278-343 K. With increasing temperature the values of the retention factors (k') and selectivity factors (α) were decreased however the resolution (R_s) showed a maximum curve.
- In order to investigate the role of hydrophobic interactions in our chromatographic system the 10-based logarithm of distribution-ratio of the investigated amino acids in 1-octanol/water mixture ($\log P$) were calculated. The calculated $\log P$ values were compared with retention factors for Z and DNZ derivatives of **22**, **26** and **27** in different mobile phase systems. Our conclusion was that hydrophobic interactions play important role in the retention process, but they have small selectivity. Other interactions should be considered, which have larger selectivity, especially electrostatic, π -acid π -basic interactions and hydrogen bonds.

- The enthalpy (ΔH°) and entropy change (ΔS°) as well as the difference of change in enthalpy [$\Delta(\Delta H^\circ)$], entropy [$\Delta(\Delta S^\circ)$], and Gibbs free energy [$\Delta(\Delta G^\circ)$], with respect to each pair of enantiomers were calculated from chromatographic parameters measured at different temperatures.
 - The π -acidic π -basic interactions existing between the π -basic quinoline rings of the selector and the π -acidic nitro-substituted aromatic rings of DNZ and DNB derivatized analytes greatly contribute to the increase of both the retention and the selectivity.
 - The higher rigidity of molecular structure generally accounts for the chiral recognition but the influence of sterical interactions can be favorable and unfavorable, too.
 - The formation of hydrogen bonds generally contributes to the retention but it has less importance in the chiral recognition.

Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek, Péter Antal professzornak, akitől minden segítséget megkaptam kísérleti és elméleti munkám során.

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni Halasiné Varga Ilona vegyésztechnikusnak, amiért mindig számíthattam segítségére.

Hálás vagyok egykori munkatársaimnak, Dr. Vékes Erikának, Árki Anitának, Dr. Ilisz Istvánnak és Berkecz Róbertnek a munkámban való szakmai és emberi segítségért.

Köszönettel gondolok a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék minden munkatársára, amiért munkámat kellemes, családi hangulatban végezhettem.

Mindenek előtt azonban örök hálával tartozom családomnak és barátnőmnek, amiért tanulmányaim során támogattak, valamint szeretetükkel és gondoskodásukkal biztosították munkám végzéséhez a nyugodt hátteret.

Irodalomjegyzék

1. E. J. Ariëns, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **26**, 663 (1984)
2. S. C. Stinson, *Chem. & Eng. News*, **78**, 55 (2000)
3. E. Gil-Av, B. Feibush, R. Charles-Siegler, *Tetrahedron Lett.*, 1009 (1966)
4. G. Blaschke, H. P. Kraft, K. Fickentscher, F. Köhler, *Arzneim.-Forsch.*, 29 (1979)
5. R. Török, Á. Bor, Gy. Orosz, F. Lukács, D. W. Armstrong, A. Péter, *J. Chromatogr. A*, **1098**, 75 (2005)
6. F. Fülöp, *Chem. Rev.*, **101**, 2181 (2001)
7. O. Langer, H. Kahlig, K. Zierler-Gould, J. W. Bats, J. Mulzer, *J. Org. Chem.*, **67**, 6878 (2002)
8. P. Marfey, *Carlsberg Res. Commun.* **49**, 591, (1984)
9. A. Péter, Cs. Somlai, B. Penke, *J. Chromatogr. A*, **710**, 297 (1995)
10. A. Péter, G. Török, G. Tóth, W. Van Den Nest, G. Laus, D. Tourwé, *J. Chromatogr. A*, **797**, 165 (1998)
11. A. Péter, G. Török, G. Tóth, W. Van Den Nest, G. Laus, D. Tourwé, D. W. Armstrong, *Chromatographia*, **48**, 53 (1998)
12. A. Péter, E. Olajos, R. Casimir, D. Tourwé, Q. B. Broxterman, B. Kaptein, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, **871**, 105 (2000)
13. A. Péter, E. Vékes, G. Török, *Chromatographia*, **52**, 821 (2000)
14. E. Olajos, A. Péter, R. Casimir, D. Tourwé, *Chromatographia*, **54**, 77 (2001)
15. A. Péter, E. Vékes, G. Tóth, D. Tourwé, F. Borremans, *J. Chromatogr. A*, **948**, 283 (2002)
16. A. Péter, E. Vékes, D. W. Armstrong, D. Tourwé, *Chromatographia*, **56**, S-41 (2002)
17. L. R. Sousa, G. D. Y. Sogah, D. H. Hoffmann, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 4569 (1978)
18. G. D. Y. Sogah, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3035 (1979)
19. W. H. Pirkle, D. W. House, *J. Org. Chem.*, **44**, 1957 (1979)
20. W. H. Pirkle, J. M. Finn, J. L. Schreiner, B. C. Hamper, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3964 (1981)
21. C. Czerwenka, P. Polasova, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, **1093**, 81 (2005)
22. M. E. Koscho, P. E. Spence, W. H. Pirkle, *Tetrahedron-Asymm.*, **16**, 3147 (2005)
23. L. Asnin, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **1091**, 11 (2005)
24. J. Lokajova, E. Tesarova, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, **1088**, 57 (2005)
25. Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Yamamoto, K. Hatada, *Chem. Lett.*, **5**, 739 (1984)
26. Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 5357 (1984)

27. E. M. M. Del Valle, *Proc. Biochem.*, **39**, 1033 (2004)
28. J. Szejtli, *Tr. Biotech.*, **7**, 170 (1989)
29. Cyclobond™ Handbook, Advanced Separation Technologies, Whippany, USA (1999)
30. D. W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagvill, J. R. Chen, *Anal. Chem.*, **66**, 1473 (1994)
31. D. W. Armstrong, Y. Liu, K. H. Ekborg-Ott, *Chirality*, **7**, 474 (1995)
32. D. W. Armstrong, M. P. Gasper, K. L. Rundlett, *J. Chromatogr. A*, **689**, 285 (1995)
33. K. H. Ekborg-Ott, J. P. Kullman, X. Wang, K. Gahn, L. He, D. W. Armstrong, *Chirality*, **10**, 627 (1998)
34. Chirobiotic™ Handbook, 5th Edition, Advanced Separation Technologies, Whippany, USA (2004)
35. A. Berthod, A. Valleix, V. Tizon, E. Leonce, C. Caussignac, D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, **73**, 5499 (2001)
36. A. Berthod, X. H. Chen, J. P. Kullman, D. W. Armstrong, F. Gasparrini, I. D'Acquarica, C. Villani, A. Carotti, *Anal. Chem.*, **72**, 1767 (2000)
37. H. C. Kolb, P. G. Andersson, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1287 (1994)
38. K. Kacprzak, J. Gawronski, *Synthesis*, 961 (2001)
39. M. Bartók, K. Felföldi, B. Török, T. Bartók, *Chem. Comm.*, 2605 (1998)
40. C. Petterson, *J. Chromatogr.*, **316**, 553 (1984)
41. C. Petterson, C. Gioeli, *J. Chromatogr.*, **398**, 247 (1987)
42. A. Péter, *J. Chromatogr. A*, **955**, 141 (2002)
43. K. Gyimesi-Forrás, J. Kökösi, Gy. Szász, A. Gergely, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, **1047** 59 (2004)
44. C. Czerwenka, N. M. Maier, W. Lindner, *Anal. and Bioanal. Chem.*, **379**, 1039 (2004)
45. A. Péter, G. Török, G. Tóth, W. Lindner, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **23**, 628 (2000)
46. N. Nimura, H. Ogura, T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, **202**, 375 (1980)
47. K. Wright, M. Crisma, C. Toniolo, R. Török, A. Péter, M. Wakselman, J-P. Mazaleyrat, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 3381 (2003)
48. K. Wright, F. Formaggio, C. Toniolo, R. Török, A. Péter, M. Wakselman, J-P. Mazaleyrat, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 4183 (2003)
49. J. J. Ellington, I. L. Honigberg, *J. Org. Chem.*, **39**, 104 (1974)
50. R. Callens, M. Anteunis, F. Reyners, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **91**, 713 (1982)
51. L. Baláspiri, B. Penke, J. Petres, K. Kovács, *Monats. Chem.*, **101**, 1177 (1970)
52. G. Jolles, G. Poiget, J. Robert, B. Terlain, J. P. Thomas, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2252 (1965)

53. T. Shibasaki, W. Sakurai, A. Hasegawa, Y. Uosaki, H. Mori, M. Yoshida, A. Ozaki, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 5227 (1999)
54. M. Anteunis, N. Hosten, F. Borremans, D. Tavernier, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **92**, 999 (1983)
55. V. Asher, C. Bécu, M. Antenuis, R. Callens, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 141 (1980)
56. J. F. Carson, F. F. Wong, *J. Org. Chem.*, **29**, 2203 (1964)
57. R. Callens, Ph.D. Thesis, Univ. Ghent, Belgium (1979)
58. R. S. McDowell, D. R. Artis, *Ann. Rep. Med. Chem.*, **30**, 265 (1995)
59. J. Rizo, L. M. Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.*, **61**, 387 (1992)
60. J. Porter, J. Dykert, J. Rivier, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **30**, 13 (1987)
61. P. Majer, I. Slaninova, M. Lebl, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **43**, 62 (1993)
62. R. R. Herr, T. Enkoji, J. P. Dailey, *J. Chem. Soc.*, **79**, 4229 (1957)
63. J. J. Jr. Nestor, T. L. Ho, R. A. Simpson, B. L. Horner, G. H. Jones, G. I. McRae, B. H. Vickery, *J. Med. Chem.*, **25**, 795 (1982)
64. A. Péter, G. Tóth, *Anal. Chim. Acta*, **352**, 335 (1997)
65. R. Filler, N. R. Ayyangar, W. Gustowski, H. H. Kang, *J. Org. Chem.*, **34**, 534 (1969)
66. H. Erlenmeyer, W. Grubenmann, *Helv. Chim. Acta*, **30**, 297 (1974)
67. Gy. Soós, I. Tsakiris, J. Szántó, Cs. Turzo, P. G. Haas, B. Dezso, *Eur. Urol.*, **48**, 739 (2005)
68. C. Huggins, R. E. Stevens, C. V. Hodges, *Arch. Surg.*, **43**, 209, (1941)
69. B. Hellerstedt, *Urology*, **62**, 79 (2003)
70. G. J. C. M. Kolvenbag, P. Iversen, D. W. W. Newling, *Urology*, **58**, 16 (2001)
71. B. J. A. Furr, H. Tucker, *Urology*, **47**, 14 (1996)
72. K. D. James, N. N. Ekwuribe, *Tetrahedron*, **58**, 5905 (2002)
73. Á. Bor, Gy. Orosz, F. Lukács, G. Schneider, DE 10222104
74. Á. Bor, Gy. Orosz, F. Lukács, G. Schneider, WO 0397590
75. Á. Bor, Gy. Orosz, F. Lukács, G. Schneider, US 2005/0033082
76. N. Bargmann-Leyder, A. Tambuté, M. Caude, *Chirality*, **7**, 311 (1995)
77. H. Tucker, G. J. Chesterson, *J. Med. Chem.*, **31**, 885 (1988)
78. R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.*, **101**, 3219 (2001)
79. H. Gademann, A. Häne, M. Rueping, B. Jaun, D. Seebach, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 1534 (2003)
80. M. Konishi, M. Nishio, K. Saitoh, T. Migaki, T. Oki, H. Kawaguchi, *J. Antibiot.*, **42**, 1749 (1989)
81. F. Fülöp, G. Bernáth, K. Pihlaja, *Adv. Heterocyclic Chem.*, **69**, 349 (1997)

82. T. L. Raguse, E. A. Porter, B. Weisblum, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12774 (2002)
83. L. J. Berliner, V. Khramtsov, H. Fujii, T. L. Clanton, *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 489 (2001)
84. W. Adam, C. R. Saha-Müller, P. A. Ganeshpure, *Chem. Rev.*, **101**, 3499 (2001)
85. C. R. Nakaie, G. Goissis, S. Schreier, A. C. M. Paiva, *J. Med. Biol. Res.*, **14**, 173 (1981)
86. R. Seidemann, L. Dulog, *Macromol. Chem.*, **187**, 2545 (1986)
87. R. Marchetto, S. Schreier, C. R. Nakaie, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11042 (1993)
88. C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, *Biopolymers*, **47**, 153 (1998)
89. L. Martin, A. Ivancich, C. Vita, F. Formaggio, C. Toniolo, *J. Pept. Res.*, **58**, 424 (2001)
90. T. Kálai, C. P. Sár, J. Jekő, K. Hideg, *Tetrahedron Lett.*, **43**, 8125 (2002)
91. M. Balog, T. Kálai, J. Jekő, Z. Berente, H. J. Steinhoff, M. Engelhardt, K. Hideg, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 9213 (2003)
92. T. Kálai, J. Jekő, K. Hideg, *Tetrahedron Lett.*, **45**, 8395 (2004)
93. T. Kálai, G. Muges, G. Roy, H. Sies, Z. Berente, K. Hideg, *Org. And Biomol. Chem.*, **3**, 3564 (2005)
94. K. Wright, M. Crisma, C. Toniolo, R. Török, A. Péter, M. Wakselman, J.-P. Mazaleyrat, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 3381 (2003)
95. K. Wright, M. Crisma, C. Toniolo, R. Török, A. Péter, M. Wakselman, J.-P. Mazaleyrat, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 3381 (2003)
96. N. Benfaremo, M. Steenbock, M. Klapper, K. Müllen, V. Enkelmann, K. Cabrera, *Liebigs Ann.*, 81413 (1996)
97. J. Einhorn, C. Einhorn, F. Ratajczak, A. Durif, M.-T. Averbuch, J.-L. Pierre, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 2565 (1998)
98. N. Nimura, H. Ogura, T. Konishita, *J. Chromatogr.*, **202**, 375 (1980)
99. Á. Furka, Szerves Kémia, *Nemzeti Tankönyvkiadó*, 852 (1998)
100. D. L. Boger, J.-H. Chen, K. W. Saionz, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1629 (1996)
101. G. J. Gatto Jr., S. M. McLoughlin, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *Biochem.*, **44**, 5993 (2005)
102. B. Plecko, S. Stockler-Ipsiroglu, E. Paschke, W. Erwa, E.A. Struys, C. Jakobs, *Ann. Neurol.*, **48**, 121 (2000)
103. B. Plecko, C. Hikel, G. C. Korenke, B. Schmitt, M. Baumgartner, F. Baumaister, C. Jakobs, E. Struys, W. Erwa, S. Stockler-Ipsiroglu, *Neuropediatrics*, **36**, 200 (2005)
104. A. Péter, E. Vékes, G. Tóth, D. Tourwé, F. Borremans, *J. Chromatogr. A*, **948**, 283 (2002)

105. A. Péter, A. Árki, D. Tourwé, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, **1031**, 159 (2004)
106. A. Berthod, Y. Liu, C. Bagwill, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, **731**, 123 (1996)
107. P. Herman, K. Lemke, *Z. Physiol. Chem.*, **349**, 390 (1968)
108. A. Rescigno, *Ann. Chim. (Italy)*, **50**, 365 (1960)
109. A. Péter, A. Árki, D. Tourwé, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, **1031**, 159 (2004)
110. A. Árki, D. Tourwé, M. Solymár, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter, *Chromatographia*, **60**, 43 (2004)
111. P. W. Atkins, Fizikai Kémia, Egyensúly, *Nemzeti Tankönyvkiadó Rt.*, Budapest (1998)
112. K. Urakami, K. Hosoya, A. E. Beezer, *Thermochimica Acta*, **424**, 157 (2004)
113. T. E. Beesley, R. P. W. Scott, Chiral Chromatography, *John Wiley & Sons*, New York (1998)
114. K. B. Sentell, J. G. Dorsey, *J. Liq. Chromatogr.*, **11**, 1875 (1988)
115. W. H. Pirkle, *J. Chromatogr.*, **558**, 1 (1991)
116. G. Guiochon, S. G. Shirazi, A. M. Katti, Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography, *Academic Press*, Boston (1994)
117. C. Czerwenka, M. M. Zhang, H. Kählig, N. M. Maier, K. B. Lipkowitz, W. Lindner, *J. Org. Chem.*, **68**, 8315 (2003)
118. C. Hellrieger, U. Skogsberg, K. Albert, M. Lämmerhofer, N. M. Maier, W. Lindner, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3809 (2004)
119. C. Czerwenka, W. Lindner, *Anal. and Bioanal. Chem.*, **382**, 599 (2005)
120. K. A. Schug, W. Lindner, *Chem. Rev.*, **105**, 67 (2005)
121. I. V. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, V. A. Palyulin, E. V. Radchenko, N. S. Zefirov, A. S. Makarenko, V. Y. Tanchuk, V. V. Prokopenko, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **19**, 453 (2005)
122. VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org> (2005)

Közlemények listája

Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények:

1. K. Wright, M. Crisma, C. Toniolo, **R. Török**, A. Péter, M. Wakselman, J.-P. Mazaleyrat
4-Amino-1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-3-carboxylic acid (β -TOAC), the first spin-labelled, cyclic, chiral β -amino acid resolved in an enantiomerically pure state
Tetrahedron Letters, **44**, 3381-3384, 2003 IF: 2,326
 2. K. Wright, F. Formaggio, C. Toniolo, **R. Török**, A. Péter, M. Wakselman, J.-P. Mazaleyrat
First access to the spin-labelled β -amino acid POAC in an enantiopure state by resolution through its binaphthyl esters
Tetrahedron Letters, **44**, 4183-4186, 2003 IF: 2,326
 3. A. Péter, **R. Török**, K. Wright, M. Wakselman, J.-P. Mazaleyrat
Liquid chromatographic enantioseparation of spin-labelled β -amino acids
Journal of Chromatography A, **1021**, 1-10, 2003 IF: 2,922
 4. A. Péter, **R. Török**, D. W. Armstrong
Direct high-performance liquid chromatographic separation of unusual secondary amino acids and a comparison of the performances of Chirobiotic T and TAG columns
Journal of Chromatography A, **1057**, 229-235, 2004 IF: 3,359
 5. **R. Török**, Á. Bor, Gy. Orosz, F. Lukács, D. W. Armstrong, A. Péter
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of bicalutamide and its related compounds
Journal of Chromatography A, **1098**, 75-81, 2005 IF: 3,096
 6. **R. Török**, R. Berkecz, A. Péter
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of α -substituted glycine analogs on a quinine-based anion-exchanger chiral stationary phase under variable temperature conditions
Journal of Chromatography A, **1120**, 61-68, 2006 IF: 3,096
 7. **R. Török**, R. Berkecz, A. Péter
Enantioseparation of phenylalanine analogs on a quinine-based anion-exchanger chiral stationary phase. Structure and temperature effects
Journal of Separation Science, Közlésre elfogadva IF: 1,829
- Összesített impakt faktor: 18,954

Egyéb közlemények:

1. R. Berkecz, **R. Török**, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -lactam and β -amino acid stereoisomers and a comparison of the performances of macrocyclic glycopeptide-based columns
Chromatographia, **63**, S37-S43, 2006 IF: 0,959

Konferencia előadások és poszterek:

1. **Török R.**, Péter A.

Új folyadékkromatográfiás eljárások kidolgozása szabadgyökös β -aminosav enantiomerek elválasztására

XXVI. Kémiai Előadói Napok (KEN)

Szeged (2003. október 27-29.) Magyarország

Előadás

2. A. Felinger, E. Vékes, **R. Török**, A. Péter

Temperature effects on the heterogenous adsorption in chiral separation

HPLC-2004: 28th International Symposium and Exhibition on High performance Liquid Phase Separation and Related Techniques

Philadelphia (2004. június 12-18.) USA

Poszter

3. K. Wright, A. de la Croix de Castries, M. Sarciaux, M. Vakselman, J.-P. Mazaleyrat, **R. Török**, A. Péter, M. Crisma, F. Formaggio, C. Toniolo

Enantiomerically pure, cyclic, spin-labelled β -amino acids; trans-POAC and cis/trans- β -TOAC

3rd International and 28th European Peptide Symposium

Prága (2004. szeptember 5-10.) Csehország

Poszter

4. **R. Török**, N. Maier, W. Lindner, A. Péter

Effects of molecular structure and temperature on retention of acylated glycine and alanine analogs on a quinine-based anion-exchanger chiral stationary phase

HPLC-2005: 29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques

Stokholm (2005. június 26-30.) Svédország

Poszter

5. **R. Török**, R. Berkecz, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -lactam and β -amino acid stereoisomers and a comparison of the performances of macrocyclic glycopeptide-based columns

6th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods

Siófok (2005. szeptember 7-9.) Magyarország

Poszter

6. A. Péter, **R. Török**, Á. Bor, G. Orosz, F. Lukács, D. W. Armstrong

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of bicalutamide and its related compounds

17th International Symposium on Chiral Discrimination

Párma (2005. szeptember 11-14.) Olaszország

Poszter

7. **Török R.**, Péter A.

Királis folyadékkromatográfiás elválasztások makrociklusos antibiotikum alapú állófázisokon

VI. Elválasztástudományi Ankét

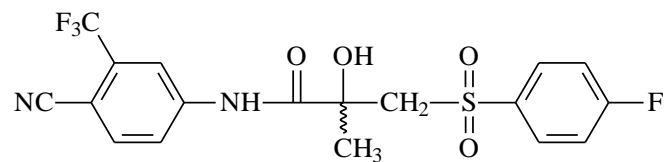
Budapest (2006. február 23.) Magyarország

Előadás

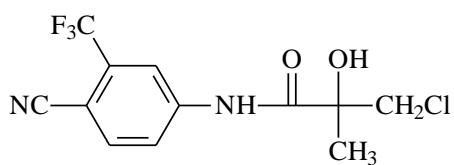
Függelék

F. 1. ábra

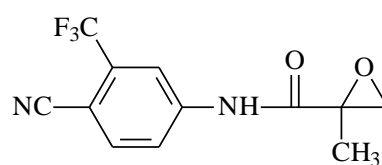
1. csoport: A bicalutamid (1) és gyártásközi- illetve melléktermékeinek szerkezete



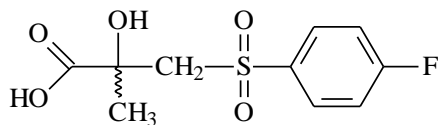
1



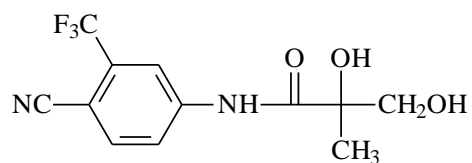
2



3



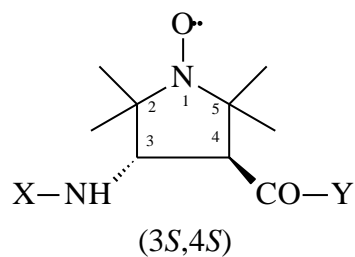
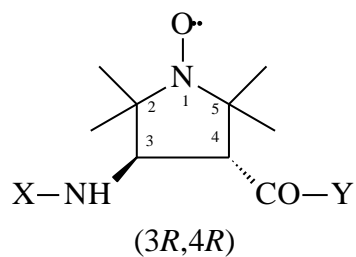
4



5

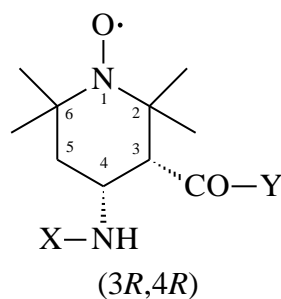
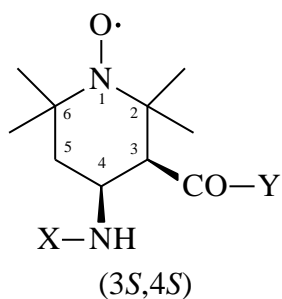
F. 2. ábra

2. csoport: A *transz*-3-amino-1-oxil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidin-4-karbonsav (POAC) és a *cisz*-4-amino-1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-3-karbonsav (β -TOAC) szerkezeti képletei



	X	Y
6	H-	-OH
7	Fmoc-	-OH

H-*transz*-POAC-OH
Fmoc-*transz*-POAC-OH

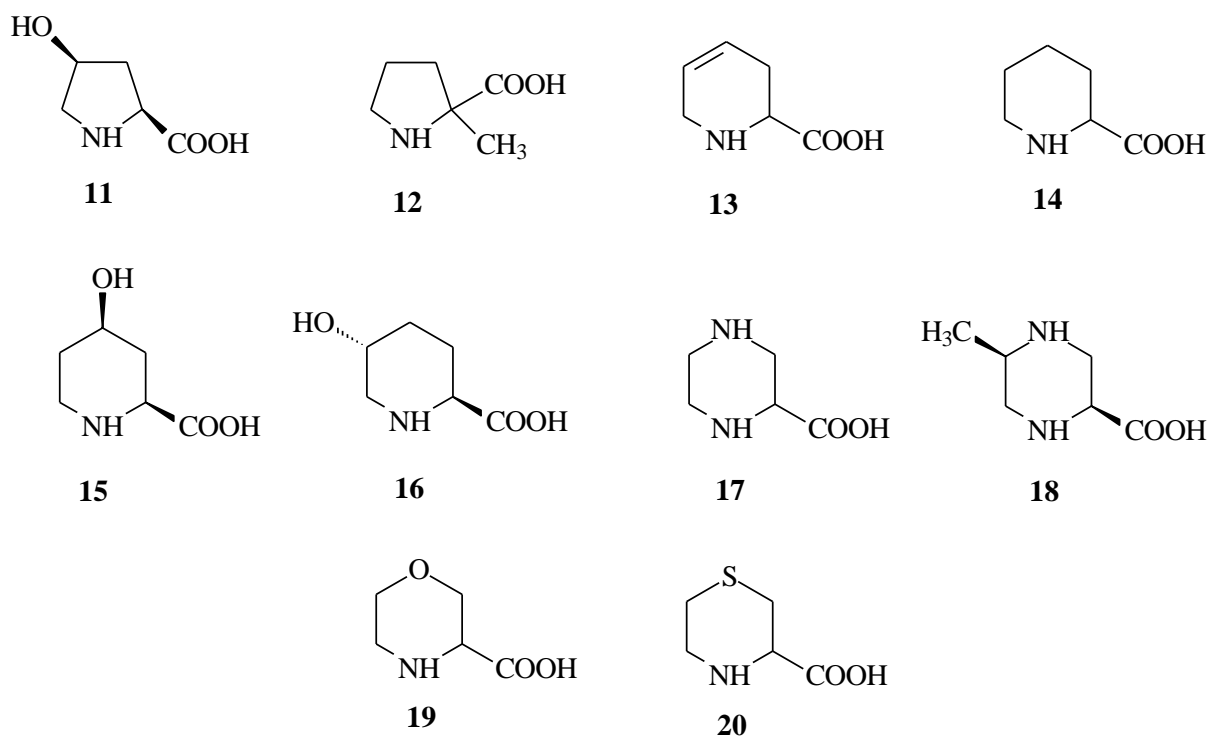


	X	Y
8	H-	-OH
9	H-	-OCH ₃
10	Fmoc-	-OH

H-*cisz*- β -TOAC-OH
H-*cisz*- β -TOAC-OMe
Fmoc-*cisz*- β -TOAC-OH

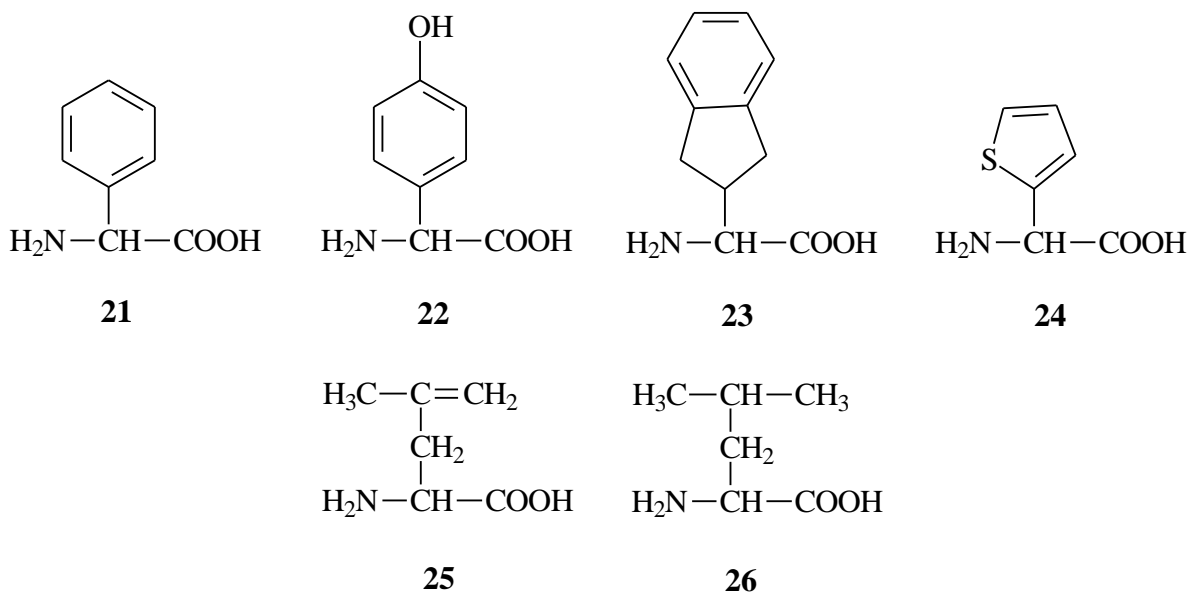
F. 3. ábra

3. csoport: A vizsgált szekunder α -aminosavak (iminosavak) szerkezete



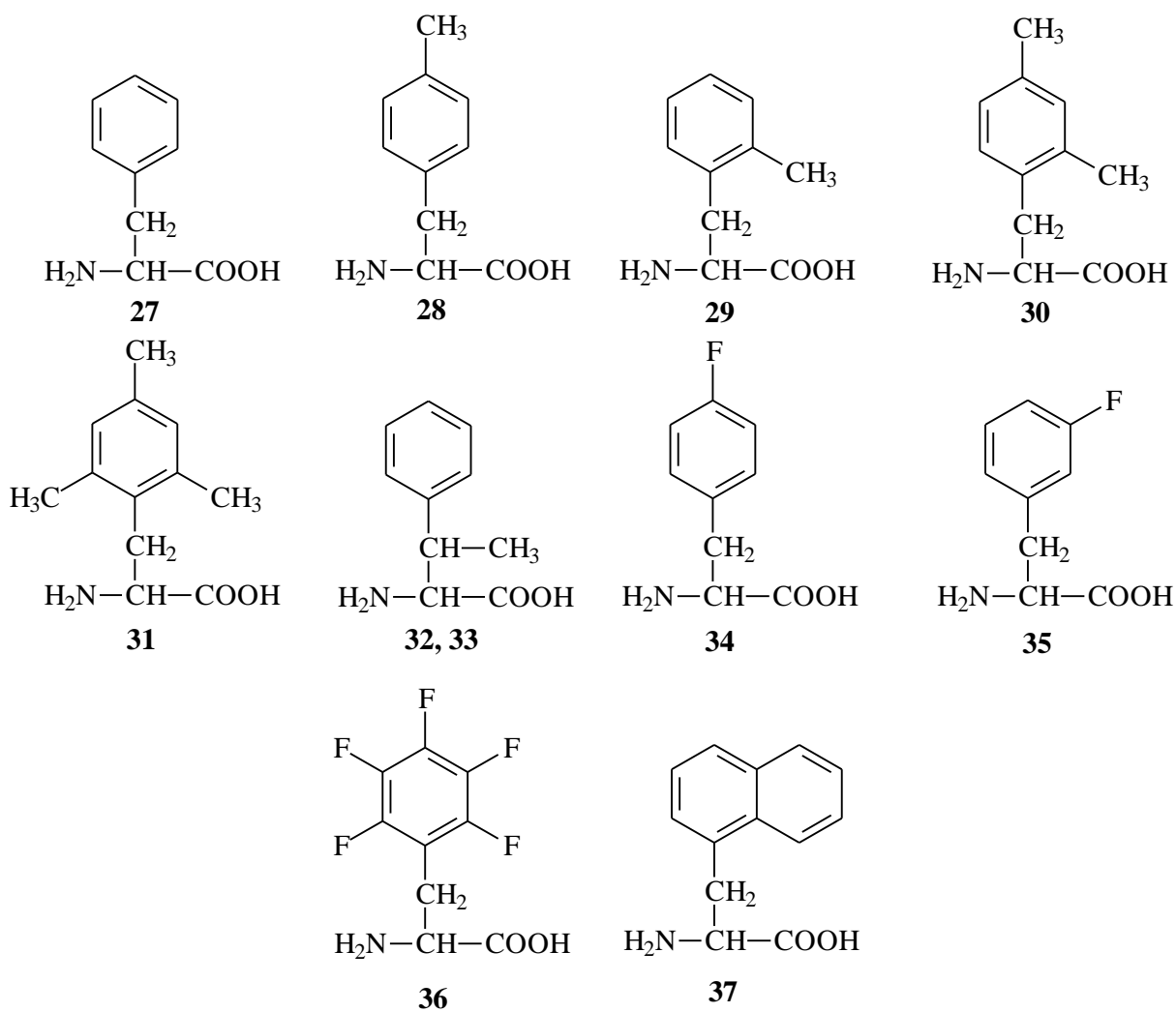
F. 4. ábra

4. csoport: A vizsgált glicin analógok szerkezeti képletei



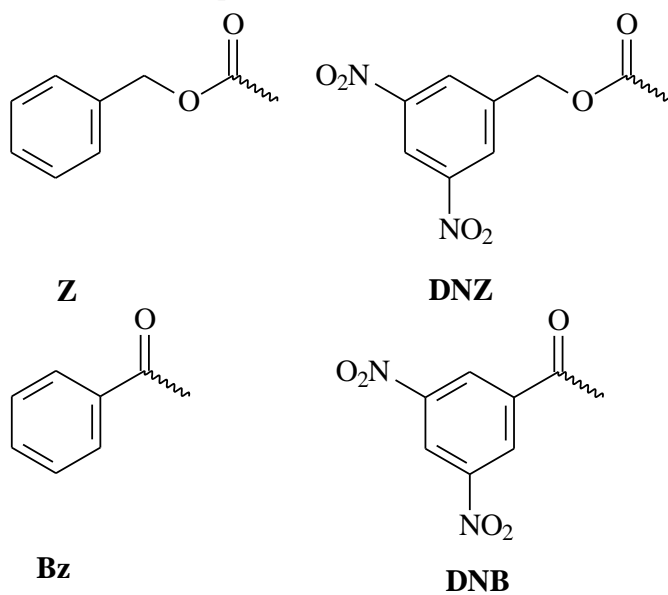
F. 5. ábra

5. csoport: A vizsgált fenilalanin analógok kémia szerkezete



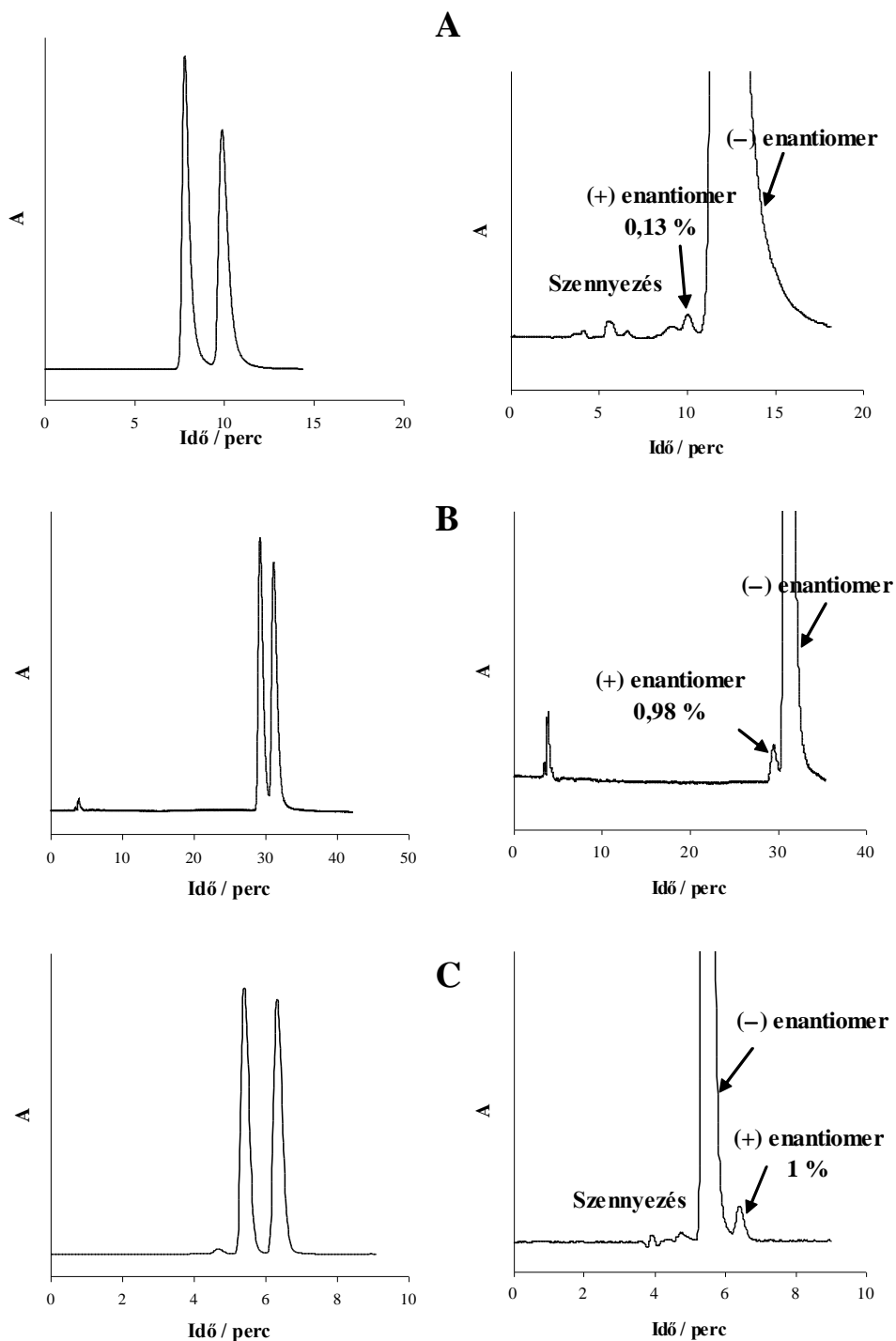
F. 6. ábra

Az alkalmazott karbamoil- és acil-csoportok kémiai szerkezete



F. 7. ábra

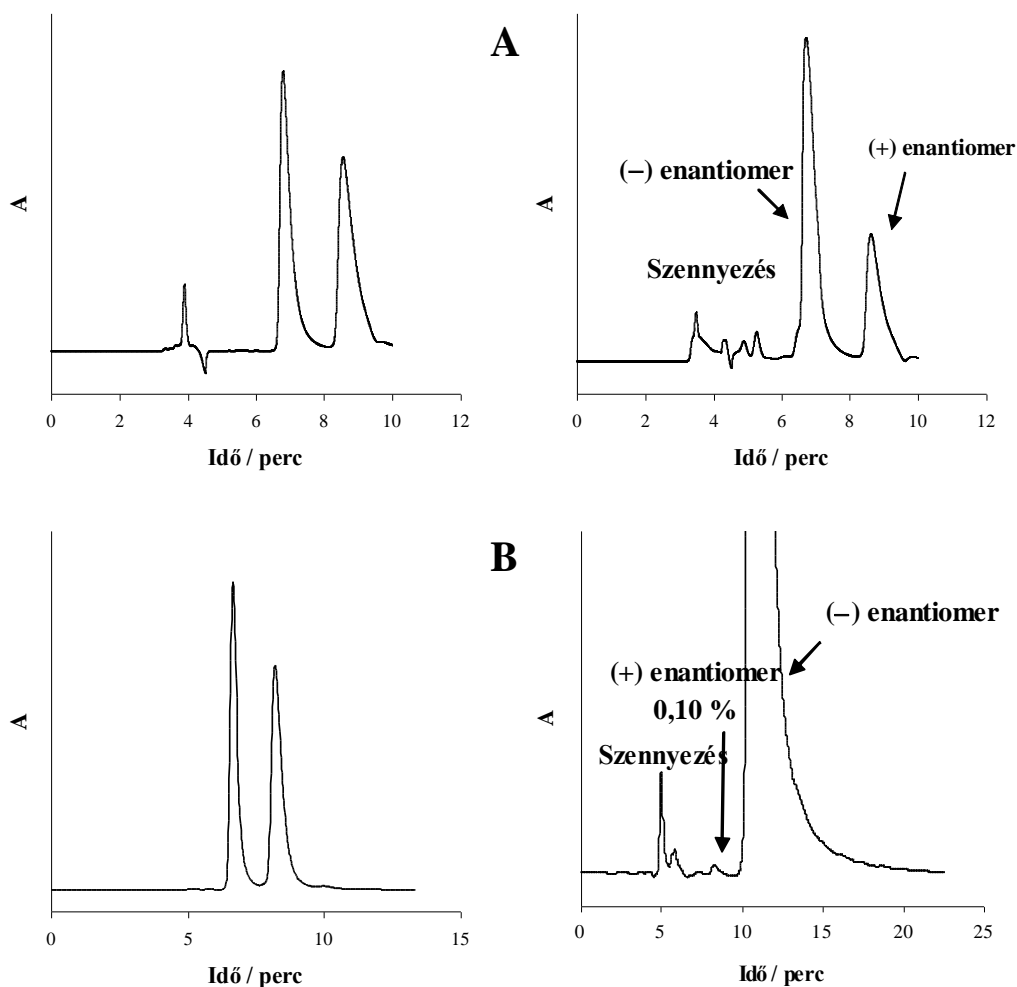
Az (*R,S*)-bicalutamid és szintézis kiindulási és köztitermékének néhány kiválasztott kromatogramja: (A) (*R,S*)- és (-)-bicalutamid (1), (B) (±)- és (-)-3-klór-*N*-(4-ciano-3-trifluormetil-fenil)-2-hidroxi-2-metil-propánamid (2), (C) (±)- és (-)-*N*-(4-ciano-3-trifluormetil-fenil)-2-metil-oxirán-karboxamid (3)



Kromatográfiai körülmények: oszlop, (A) Chirobiotic™ T, (B) Cyclobond™ I 2000 SN, (C) Chiralcel™ OD-H; eluensösszetétel, (A) Hex/IPA = 10/90 (v/v), (B) Hex/EtOH = 92,5/7,5 (v/v), (C) Hex/IPA = 60/40 (v/v); áramlási sebesség, 0,8 ml/perc, a (C) kromatogramok esetén 0,5 ml/perc; kolonnatér hőmérséklet, 25 °C; detektálási hullámhossz, 254 nm.

F. 8. ábra

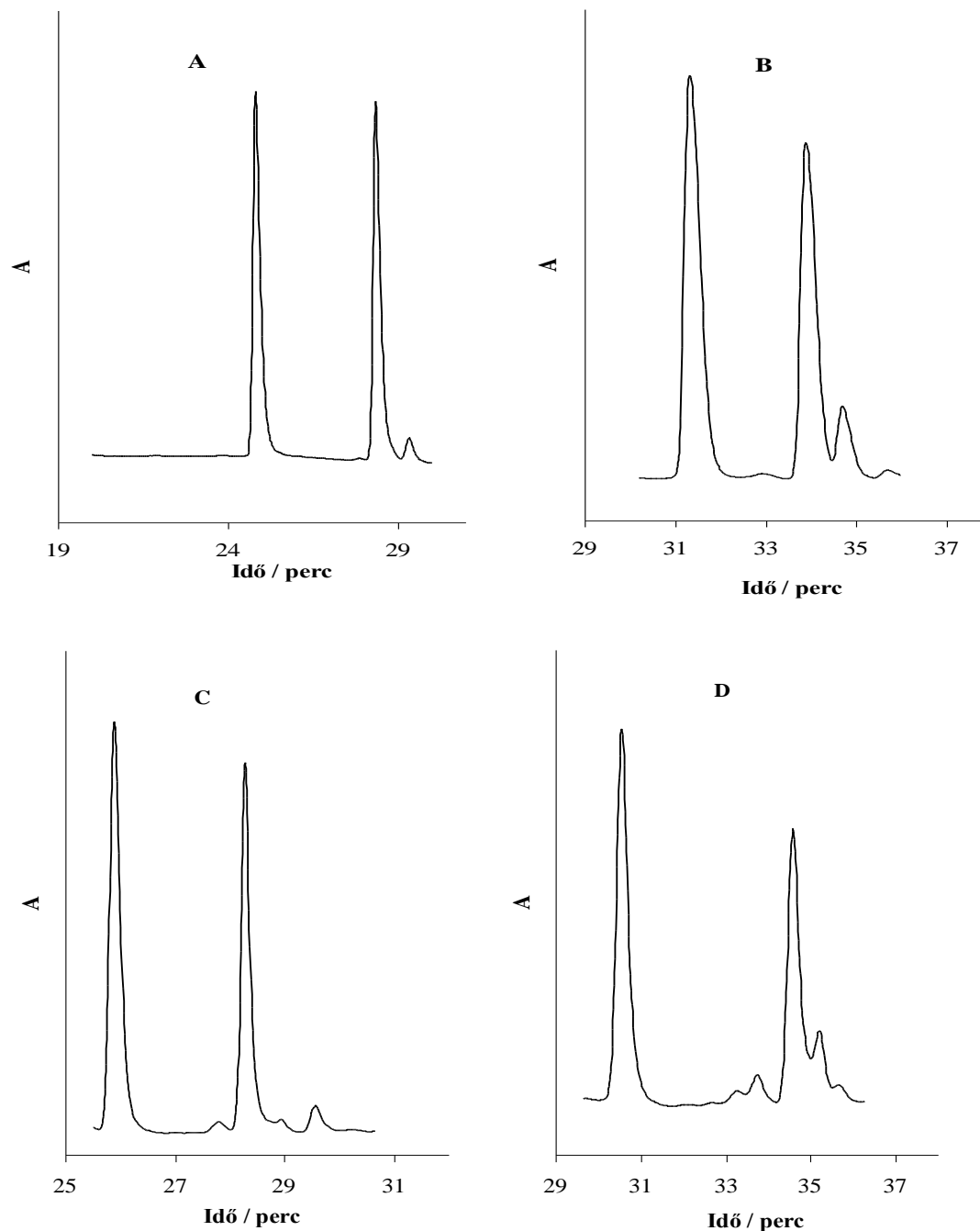
Az (±)-bikalutamid szintézis melléktermékeinek néhány kiválasztott kromatogramja: **(A)** (±)-4-fluor-fenil-szulfonil-2-hidroxi-2-metil-propionsav (**4**), **(B)** (±)- és (-)-3-hidroxi-*N*-(4-ciano-3-trifluormetil-fenil)-2-hidroxi-2-metil-propionsavamid (**5**)



Kromatográfiai körülmények: oszlop, **(A)** Chirobiotic™ R, **(B)** Chirobiotic™ T; eluensösszetétel, **(A)** MeOH/AcOH/TEA = 100/0,1/0,1 (v/v/v), **(B)** Hex/IPA = 10/90 (v/v); áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; kolonnatér hőmérséklet, 25 °C; detektálási hullámhossz, 254 nm; a 4 vegyület elúciós sorrendjét (-) enantiomerben dúsított racém keverékkel határoztuk meg.

F. 9. ábra

A *transz*-3-amino-1-oxil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidin-4-karbonsav (POAC) (**6**) és a *cisz*-4-amino-1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-3-karbonsav (β -TOAC) (**8**) (*S*)-NIFE-vel (**A** és **B**) illetve GITC-vel (**C** és **D**) képzett diasztereomer származékainak elválasztása



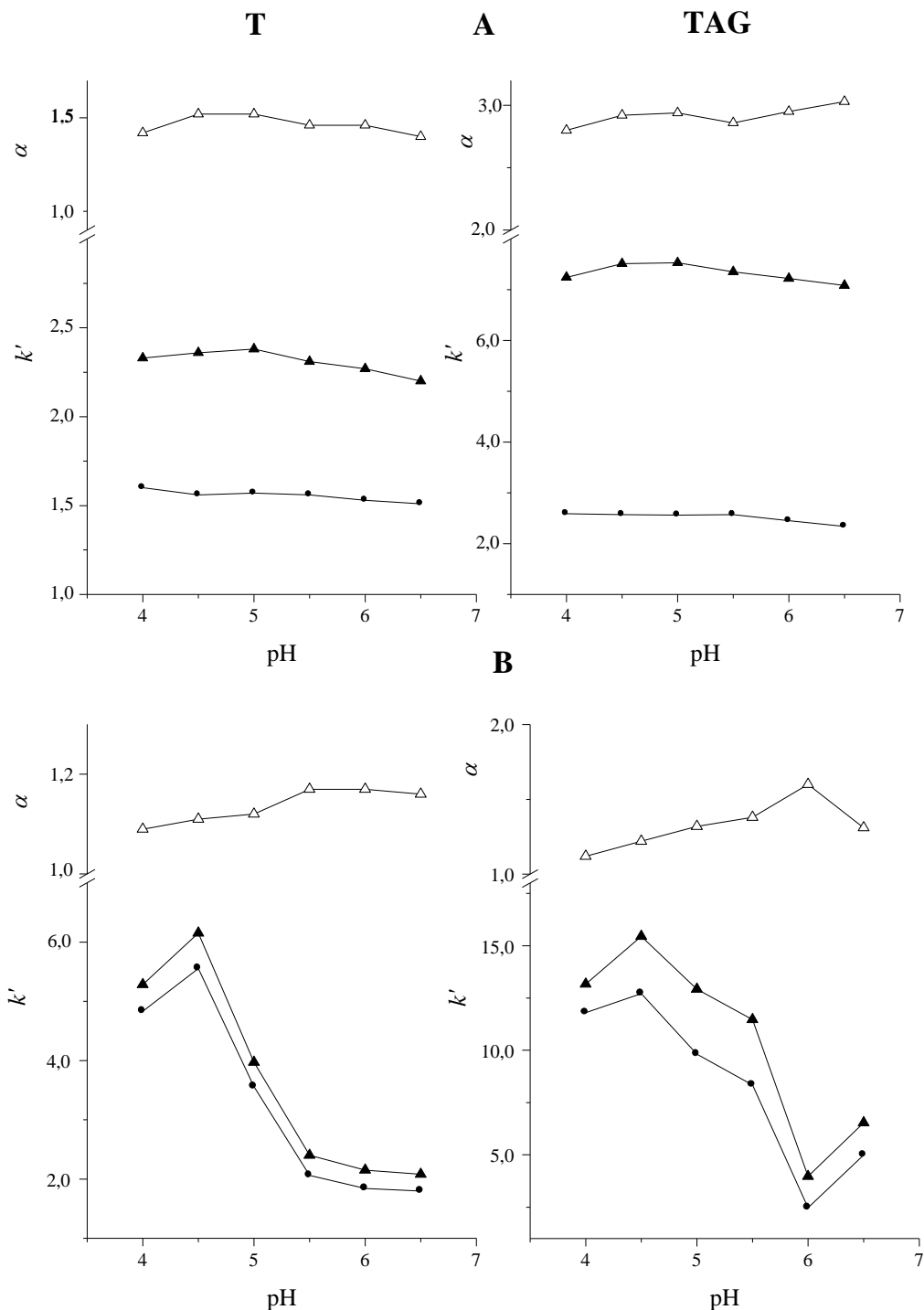
Kromatográfiai körülmények: oszlop, Vydac 218TP™ Series; eluens, 0,1 M TEAA (aq) (pH = 6,5)/MeOH (v/v), gradiens elúció; detektálási hullámhossz, (*S*)-NIFE – 205 nm, GITC – 254 nm; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; hőmérséklet, 25 °C, a minták a (+) és (–) enantiomerek mesterséges keverékei.

A és **B**: Lineáris gradiens: 0 perc, 0,1 M TEAA (aq) (pH = 6,5)/MeOH = 90/10 (v/v), 60 perc, 0,1 M TEAA (aq) (pH = 6,5)/MeOH = 10/90 (v/v).

C és **D**: Lineáris gradiens: 0 perc, 0,1 M TEAA (aq) (pH = 6,5)/MeOH = 90/10 (v/v), 60 perc, 0,1 M TEAA (aq) (pH = 6,5)/MeOH = 30/70 (v/v).

F. 10. ábra

A Chirobiotic™ T és TAG oszlopon mért retenciós faktor (k') és szelektivitási tényezők (α) a mozgófázis pH-jának függvényében, (A) (*R,S*)-pipekolinsav (**14**), (B) (*R,S*)-piperazin-2-karbonsav (**17**)

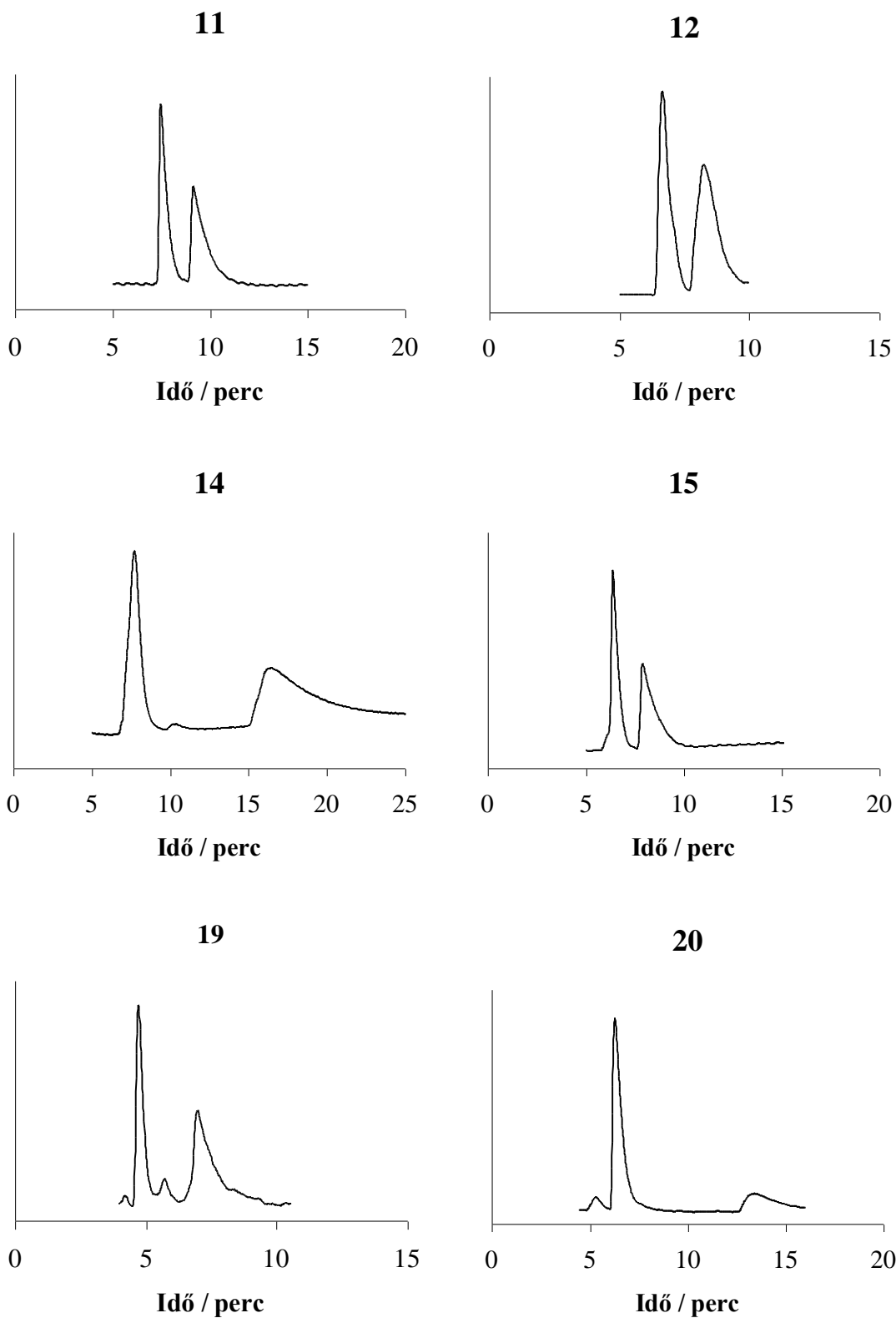


Kromatográfiai körülmények: oszlop, Chirobiotic™ T és TAG; áramlási sebesség, 1,0 ml/perc; detektálási hullámhossz, 205 nm; hőmérséklet 25 °C; eluensösszetétel, 0,1 % TEAA (pH = 6,5)/MeOH = 60/40 (v/v).

Jelmagyarázat: (●) az elsőként eluálódó enantiomer retenciós faktora, k_1' ; (▲) a másodjára eluálódó enantiomer retenciós faktora, k_2' ; (Δ) szelektivitási tényező, α .

F. 11. ábra

Az iminosavak elválasztása során kapott néhány kiválasztott kromatogram



Kromatográfiai körülmények: oszlop, Chirobiotic™ T (**11** és **15** vegyületek esetén), Chirobiotic™ TAG oszlop (**12**, **14**, **19** és **20** vegyületek esetén); mozgófázis, 0,1 % TEAA (aq) (pH = 6,5)/MeOH, a **11** és **15** vegyületek esetén 20/80 (v/v), a **14** vegyület esetén 60/40 (v/v), a **12** vegyület esetén 70/30 (v/v), és a **19** és **20** vegyületek esetén 90/10 (v/v); áramlási sebesség, 1,0 ml/perc; kolonnatér hőmérséklet, 25 °C detektálási hullámhossz 205 nm.

F. 1. Táblázat

A Chirobiotic™ T és TAG oszlopon vizsgált iminosavak elválasztása során kapott kromatográfiás eredmények

Vegyület	Oszlop	Eluens- összetétel (v/v)	k_1'	k_2'	α	R_s	$-\Delta(\Delta G^\circ)$ kJ mol ⁻¹
11	T	60/40	0,16	0,26	1,63	1,21	1,21
		20/80	2,77	3,62	1,31	1,87	0,67
	TAG	60/40	1,11	1,39	1,25	1,19	0,55
		40/60	1,96	2,51	1,28	1,55	0,61
12 ^a	T	60/40	1,12	1,36	1,21	1,43	0,47
	TAG	60/40	2,09	2,21	1,05	0,60	0,12
		70/30	2,36	3,18	1,35	1,55	0,74
13	T	60/40	1,51	1,72	1,14	<0,40	0,32
		20/80	3,29	4,22	1,28	1,52	0,61
	TAG	60/40	2,21	4,41	1,99	2,38	1,70
14	T	60/40	1,51	2,20	1,45	2,00	0,92
	TAG	60/40	2,34	7,08	3,03	2,90	2,75
15	T	60/40	1,03	1,17	1,14	0,80	0,32
		20/80	2,23	2,99	1,34	1,81	0,73
	TAG	60/40	1,07	1,93	1,80	2,00	1,45
16	T	60/40	0,27	0,34	1,26	0,65	0,57
		20/80	0,75	1,01	1,35	1,42	0,74
	TAG	60/40	1,85	2,03	1,10	0,70	0,24
		40/60	2,78	3,13	1,13	1,00	0,30
		20/80	5,63	6,12	1,09	0,90	0,21
17 ^a	T	60/40	1,80	2,08	1,16	1,10	0,37
		20/80	6,96	9,21	1,32	1,70	0,69
	TAG	60/40	4,99	6,53	1,31	1,30	0,67
		30/70	6,63	11,14	1,68	2,40	1,29
18	T	60/40	2,33	3,25	1,39	1,70	0,82
	TAG	60/40	2,54	5,07	2,00	2,30	1,72
19	T	60/40	0,21	0,58	2,76	2,56	2,52
	TAG	60/40	1,86	4,17	2,24	2,80	2,00
20	T	60/40	0,45	0,88	1,96	2,24	1,67
	TAG	60/40	2,80	8,79	3,14	3,26	2,83

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Chirobiotic™ T és TAG; áramlási sebesség, 1,0 ml/perc; detektálási hullámhossz, 205 nm; hőmérséklet 25 °C; eluensösszetétel, 0,1 % TEAA (pH = 6,5)/MeOH (v/v)

^a Elúciós sorrend nem tisztázott

F. 2. Táblázat

Az *N*-acilezett Gly és Phe analóg aminosavak kromatográfiás paramétereit 278 illetve 343 K hőmérsékleten

Amino- sav	Hőmérsék- let (K)	Z			DNZ			Bz			DNB ^a		
		<i>k</i> _I '	α	<i>R</i> _s	<i>k</i> _I '	α	<i>R</i> _s	<i>k</i> _I '	α	<i>R</i> _s	<i>k</i> _I '	α	<i>R</i> _s
21	278	11,26	1,26	2,0	20,34	2,19	8,6	9,43	1,89	5,9	11,07	7,46	17,0
	343	2,40	1,09	1,2	3,20	1,34	3,6	2,09	1,32	3,9	2,68	3,02	14,9
22	278	13,10	1,28	2,6	25,05	2,29	8,6	15,10	1,57	3,7	12,08	8,58	28,8
	343	2,21	1,11	1,2	3,17	1,36	3,7	2,66	1,21	2,6	2,96	2,91	15
23	278	10,16	1,47	3,4	20,67	3,31	11,0	8,45	2,64	6,5	11,97	10,04	24,5
	343	2,24	1,17	1,8	3,33	1,59	6,3	2,27	1,41	4,0	2,99	3,55	12,2
24	278	14,39	1,26	3,6	26,5	2,27	9,6	11,63	1,78	6,5	11,90	8,03	18,8
	343	2,64	1,10	1,4	3,61	1,35	4,0	2,30	1,29	3,5	3,00	3,00	12,1
25	278	5,11	1,17	1,9	10,90	2,70	9,4	3,96	2,95	9,6	6,24	15,39	18,9
	343	1,51	1,13	1,0	2,10	1,45	4,2	1,33	1,47	2,9	1,85	4,84	16,4
26	278	3,88	1,34	2,7	8,50	3,58	11,2	3,20	3,18	5,5	5,79	16,69	19,5
	343	1,21	1,16	1,0	1,83	1,61	5,2	1,07	1,70	4,3	1,84	5,23	16,7
27	278	8,79	1,29	2,7	16,38	2,39	6,9	6,55	2,36	7,1	8,46	12,11	20,8
	343	2,10	1,09	1,3	2,82	1,37	4,1	2,04	1,24	3,1	2,30	3,79	14,3
28	278	9,33	1,36	3,4	17,01	2,43	7,1	7,02	2,44	7,0	8,89	12,62	18,5
	343	2,08	1,14	1,9	2,90	1,40	4,3	1,97	1,33	4,2	2,45	3,74	15,5
29	278	8,30	1,27	1,8	15,06	2,49	8,2	5,98	2,65	8,2	8,68	13,47	16,3
	343	2,03	1,09	1,1	2,80	1,38	3,8	1,98	1,29	3,1	2,40	4,18	15,1
30	278	8,81	1,28	2,4	16,08	2,46	7,8	6,27	2,69	7,4	9,35	14,00	18,8
	343	2,03	1,10	1,3	2,89	1,38	4,1	1,98	1,32	3,7	2,46	4,20	14,9
31	278	7,70	1,35	2,5	14,40	2,43	7,4	6,41	2,87	9,3	9,09	13,65	17,2
	343	2,01	1,07	1,0	2,84	1,33	3,9	2,03	1,58	5,2	2,53	3,88	14,8
32	278	8,03	1,27	2,2	15,32	1,77	5,8	5,80	1,77	5,6	7,89	5,31	14,4
	343	1,99	1,08	1,1	2,80	1,25	3,1	1,85	1,17	2,0	2,23	2,37	9,4
33	278	6,77	1,93	4,9	13,69	4,06	11,0	5,95	3,51	10,9	7,83	14,11	17,7
	343	1,91	1,21	2,3	2,64	1,70	6,7	1,90	1,47	5,4	2,27	4,40	17,1
34	278	7,70	1,36	3,0	14,70	2,39	7,8	5,88	2,33	8,0	7,78	11,01	19,2
	343	1,94	1,12	1,5	2,63	1,40	3,9	1,93	1,24	2,5	2,34	3,59	15,0
35	278	8,83	1,25	2,1	16,09	2,33	8,3	6,39	2,42	7,1	8,19	11,76	18,4
	343	2,06	1,09	1,0	2,80	1,37	4,2	1,93	1,27	3,2	2,28	3,69	14,9
36	278	7,95	1,29	2,5	15,65	2,33	8,6	6,06	2,79	4,2	8,24	14,23	21,6
	343	1,96	1,09	0,9	2,71	1,38	4,4	1,96	1,26	2,8	2,13	4,51	14,9
37	278	17,31	1,25	2,1	27,20	2,21	7,4	13,24	2,28	7,3	14,24	11,94	18,9
	343	3,07	1,15	1,6	4,02	1,39	4,5	2,79	1,40	4,8	3,34	3,77	13,7

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Prontosil™ 120-5 tBuCQN; mozgófázisösszetétel, 0,2 M NH₄OAc/MeOH = 10/90 (v/v) pH_a = 6,0; áramlási sebesség, 0,5 ml/perc (a DNB származékok esetén 0,8 ml/perc); detektálási hullámhossz, 230 nm. ^a A legalacsonyabb hőmérséklet 293 K.

F. 3. Táblázat

A vizsgált *N*-acilezett aminosav enantiomerek (21-28) kromatográfiás megoszlásának entalpia- és entrópiaváltozása

Amino-sav	<i>N</i> -acil-csoport	ΔH_1° (kJ/mol)	ΔH_2° (kJ/mol)	$\Delta S_1^{\circ\#}$ (J/mol/K)	$\Delta S_2^{\circ\#}$ (J/mol/K)	Korrelációs együttható, R_1^2	Korrelációs együttható, R_2^2
21	Z	-18,5	-20,2	-46,1	-50,6	0,997	0,997
	DNZ	-22,7	-28,8	-56,1	-71,3	0,995	0,997
	Bz	-18,6	-23,0	-47,8	-58,2	0,994	0,994
	DNB	-23,7	-38,8	-60,8	-95,7	0,999	1,000
22	Z	-21,0	-22,9	-53,8	-58,6	0,994	0,996
	DNZ	-25,3	-31,7	-63,8	-79,7	0,997	0,998
	Bz	-23,7	-28,4	-63,3	-74,4	0,995	0,998
	DNB	-23,8	-41,5	-60,5	-103,1	0,999	1,000
23	Z	-18,0	-21,0	-44,9	-52,5	0,993	0,996
	DNZ	-22,3	-31,2	-54,5	-76,7	0,996	0,998
	Bz	-16,0	-23,6	-39,5	-58,6	0,993	0,997
	DNB	-23,6	-40,4	-59,9	-98,1	0,999	1,000
24	Z	-20,4	-22,1	-51,1	-55,0	0,997	0,997
	DNZ	-24,4	-30,7	-60,1	-75,9	0,996	0,998
	Bz	-19,9	-23,8	-50,8	-59,9	0,996	0,997
	DNB	-23,2	-39,0	-58,4	-95,4	0,998	0,998
25	Z	-14,7	-15,3	-39,0	-39,6	0,993	0,986
	DNZ	-19,9	-27,4	-51,2	-70,2	0,996	0,998
	Bz	-13,5	-21,8	-36,7	-57,7	0,986	0,998
	DNB	-20,3	-39,7	-54,1	-97,4	0,999	1,000
26	Z	-13,9	-15,6	-38,6	-42,3	0,992	0,994
	DNZ	-18,6	-28,3	-48,6	-73,0	0,994	0,998
	Bz	-13,0	-20,7	-36,6	-55,0	0,981	0,997
	DNB	-19,5	-38,8	-51,9	-94,3	0,997	0,999
27	Z	-17,6	-19,6	-44,9	-50,0	0,993	0,994
	DNZ	-21,4	-28,3	-53,3	-70,8	0,998	0,999
	Bz	-14,6	-22,5	-36,6	-57,7	0,991	0,997
	DNB	-21,9	-41,2	-56,8	-102,2	0,999	1,000
28	Z	-18,2	-20,4	-46,6	-51,8	0,992	0,994
	DNZ	-21,7	-28,5	-53,9	-71,1	0,997	0,999
	Bz	-15,7	-23,2	-39,7	-59,5	0,991	0,997
	DNB	-21,7	-41,9	-55,7	-103,9	0,999	1,000

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Prontosil™ 120-5 tBuCQN; mozgófázisösszetétel, 0,2 M NH₄OAc/MeOH = 10/90 (v/v) pH_a = 6,0; áramlási sebesség, 0,5 ml/perc (a DNB származékok esetén 0,8 ml/perc); detektálási hullámhossz, 230 nm; hőmérséklet, 278-343 K (DNB származékok esetén 293-343 K). $\Delta S^{\circ\#} = \Delta S^\circ + R \ln \phi$

F. 4. Táblázat

A vizsgált *N*-acilezett aminosav enantiomerek (29-37) kromatográfias megoszlásának entalpia- és entrópiaváltozása

Amino-sav	<i>N</i> -acil-csoport	ΔH_1° (kJ/mol)	ΔH_2° (kJ/mol)	$\Delta S_1^{\circ\#}$ (J/mol/K)	$\Delta S_2^{\circ\#}$ (J/mol/K)	Korrelációs együttható, R_1^2	Korrelációs együttható, R_2^2
29	Z	-17,4	-19,3	-44,4	-49,3	0,993	0,994
	DNZ	-20,4	-27,7	-50,5	-69,3	0,997	0,999
	Bz	-13,8	-22,7	-50,8	-58,2	0,985	0,996
	DNB	-21,6	-41,2	-55,8	-101,2	0,999	1,000
30	Z	-17,9	-19,8	-46,0	-50,7	0,993	0,994
	DNZ	-20,8	-28,0	-51,5	-70,0	0,997	0,999
	Bz	-14,5	-23,3	-36,3	-59,7	0,984	0,996
	DNB	-22,8	-42,9	-58,9	-105,8	0,997	0,992
31	Z	-16,3	-19,2	-41,3	-49,2	0,993	0,996
	DNZ	-19,9	-27,4	-48,9	-68,6	0,996	0,999
	Bz	-14,5	-21,7	-35,9	-53,4	0,987	0,998
	DNB	-21,6	-42,6	-55,4	-105,2	0,999	1,000
32	Z	-17,2	-19,3	-43,9	-49,5	0,992	0,994
	DNZ	-20,6	-24,9	-51,1	-61,7	0,996	0,996
	Bz	-14,3	-19,3	-36,1	-49,6	0,987	0,995
	DNB	-21,6	-35,2	-56,3	-89,0	0,995	0,996
33	Z	-15,5	-21,3	-39,4	-54,8	0,991	0,997
	DNZ	-19,6	-30,9	-48,6	-77,4	0,994	0,999
	Bz	-14,2	-24,8	-35,6	-63,4	0,987	0,998
	DNB	-21,1	-40,5	-54,8	-99,1	0,996	0,999
34	Z	-17,0	-19,3	-43,6	-49,5	0,994	0,995
	DNZ	-21,0	-27,6	-52,7	-69,2	0,997	0,999
	Bz	-13,4	-21,5	-33,2	-55,3	0,990	0,998
	DNB	-20,8	-39,6	-53,7	-98,1	0,995	0,998
35	Z	-17,6	-19,3	-45,0	-49,1	0,995	0,995
	DNZ	-21,2	-27,9	-53,0	-69,7	0,998	0,999
	Bz	-14,9	-22,6	-37,8	-58,3	0,993	0,999
	DNB	-21,8	-41,1	-56,6	-102,1	0,996	0,999
36	Z	-17,0	-19,1	-43,5	-49,1	0,993	0,995
	DNZ	-21,3	-27,8	-53,3	-69,7	0,997	0,999
	Bz	-14,2	-23,8	-35,5	-61,7	0,994	0,999
	DNB	-22,7	-41,5	-59,8	-102,0	0,998	0,996
37	Z	-20,9	-22,0	-51,3	-53,1	0,996	0,995
	DNZ	-23,5	-29,5	-56,8	-71,5	0,997	0,998
	Bz	-19,0	-25,2	-71,4	-61,7	0,994	0,998
	DNB	-24,4	-43,6	-61,2	-106,2	0,999	1,000

Kromatográfias körülmények: oszlop, ProntoSil™ 120-5 tBuCQN; mozgófázisösszetétel, 0,2 M NH₄OAc/MeOH = 10/90 (v/v) pH_a = 6,0; áramlási sebesség, 0,5 ml/perc (a DNB származékok esetén 0,8 ml/perc); detektálási hullámhossz, 230 nm; hőmérséklet, 278-343 K (DNB származékok esetén 293-343 K). $\Delta S^{\circ\#} = \Delta S^\circ + R \ln \phi$

F. 5. Táblázat

A vizsgált *N*-acilezett aminosav enantiomerek (21-28) kromatográfias megoszlásának entalpia- és entrópia- és szabadentalpia változásának különbségei

Amino-sav	<i>N</i> -acil-csoport	$\Delta(\Delta H^\circ)$ (kJ/mol)	$\Delta(\Delta S^\circ)$ (J/mol/K)	Korrelációs együttható, R^2	$\Delta(\Delta G^\circ)_{293K}$ (kJ/mol)	Q_{293K}
21	Z	-1,8	-4,4	0,995	-0,5	1,4
	DNZ	-6,1	-15,3	0,998	-1,6	1,4
	Bz	-4,3	-10,3	0,998	-1,3	1,4
	DNB	-15,1	-34,9	1,000	-4,9	1,5
22	Z	-1,9	-4,8	0,988	-0,5	1,4
	DNZ	-6,4	-16,0	0,999	-1,7	1,4
	Bz	-2,8	-6,1	0,922	-1,0	1,6
	DNB	-17,7	-42,5	0,997	-5,2	1,4
23	Z	-3,0	-7,4	0,985	-0,8	1,4
	DNZ	-9,0	-22,3	0,999	-2,4	1,4
	Bz	-7,6	-19,1	0,999	-1,9	1,3
	DNB	-16,8	-38,2	0,995	-5,6	1,5
24	Z	-1,6	-4,0	0,999	-0,5	1,4
	DNZ	-6,3	-15,8	0,997	-1,6	1,4
	Bz	-3,9	-9,3	0,999	-1,2	1,4
	DNB	-17,2	-41,4	0,989	-5,1	1,4
25	Z	-1,3	-2,6	0,967	-0,5	1,7
	DNZ	-7,6	-19,0	0,999	-2,0	1,4
	Bz	-8,3	-21,0	0,988	-2,2	1,4
	DNB	-19,3	-43,3	1,000	-6,7	1,5
26	Z	-1,7	-3,7	0,998	-0,6	1,6
	DNZ	-9,7	-24,4	1,000	-2,6	1,4
	Bz	-7,7	-18,4	0,991	-2,4	1,4
	DNB	-19,0	-41,5	0,998	-6,8	1,6
27	Z	-2,0	-5,2	0,996	-0,5	1,3
	DNZ	-6,9	-17,6	0,995	-1,7	1,3
	Bz	-7,9	-21,2	0,998	-1,6	1,3
	DNB	-19,3	-45,4	0,998	-6,1	1,5
28	Z	-2,1	-5,1	0,999	-0,6	1,4
	DNZ	-6,9	-17,2	0,997	-1,8	1,4
	Bz	-7,5	-19,8	0,997	-1,8	1,3
	DNB	-20,2	-48,2	0,998	-6,2	1,4

Kromatográfias körülmények: oszlop, ProntoSil™ 120-5 tBuCQN; mozgófázisösszetétel, 0,2 M NH₄OAc/MeOH = 10/90 (v/v) pH_a = 6,0; áramlási sebesség, 0,5 ml/perc (a DNB származékok esetén 0,8 ml/perc); detektálási hullámhossz, 230 nm; hőmérséklet, 278-343 K (DNB származékok esetén 293-343 K).

$Q = \Delta(\Delta H^\circ) / [\Delta(\Delta S^\circ) \times 293 \text{ K}]$.

F. 6. Táblázat

A vizsgált *N*-acilezett aminosav enantiomerek (29-37) kromatográfiás megoszlásának entalpia- és entrópia- és szabadentalpia változásának különbségei

Amino-sav	<i>N</i> -acil-csoport	$\Delta(\Delta H^\circ)$ (kJ/mol)	$\Delta(\Delta S^\circ)$ (J/mol/K)	Korrelációs együttható, R^2	$\Delta(\Delta G^\circ)_{293K}$ (kJ/mol)	Q_{293K}
29	Z	-1,9	-4,9	0,998	-0,5	1,3
	DNZ	-7,3	-18,6	0,998	-1,8	1,3
	Bz	-8,9	-24,0	0,997	-1,9	1,3
	DNB	-19,6	-45,4	0,999	-6,3	1,5
30	Z	-1,9	-4,7	0,996	-0,5	1,4
	DNZ	-7,2	-18,4	0,997	-1,8	1,3
	Bz	-8,7	-23,3	0,996	-1,9	1,3
	DNB	-20,1	-46,9	0,998	-6,4	1,5
31	Z	-2,9	-8,0	0,996	-0,6	1,2
	DNZ	-6,8	-16,2	0,984	-1,7	1,4
	Bz	-7,5	-19,7	0,994	-2,1	1,3
	DNB	-20,9	-49,8	0,998	-6,4	1,4
32	Z	-2,1	-5,6	0,989	-0,5	1,3
	DNZ	-4,3	-10,6	0,998	-1,2	1,4
	Bz	-5,0	-13,4	0,994	-1,1	1,3
	DNB	-13,5	-32,1	0,999	-4,1	1,4
33	Z	-5,7	-15,3	0,995	-1,2	1,3
	DNZ	-11,3	-28,8	0,994	-2,9	1,3
	Bz	-10,6	-28,0	0,998	-2,4	1,3
	DNB	-19,4	-44,3	0,999	-6,5	1,5
34	Z	-2,3	-5,8	0,983	-0,6	1,4
	DNZ	-6,6	-16,5	0,998	-1,8	1,4
	Bz	-8,1	-22,1	0,985	-1,6	1,3
	DNB	-18,8	-44,4	0,999	-5,8	1,4
35	Z	-1,7	-4,2	0,998	-0,5	1,4
	DNZ	-6,7	-17,0	0,987	-1,7	1,3
	Bz	-7,8	-20,7	0,997	-1,7	1,3
	DNB	-19,3	-45,5	0,999	-6,0	1,4
36	Z	-2,2	-5,7	0,994	-0,5	1,3
	DNZ	-6,5	-16,4	0,996	-1,7	1,4
	Bz	-9,6	-26,1	0,999	-1,9	1,3
	DNB	-17,8	-42,7	0,983	-6,5	1,4
37	Z	-1,0	-1,8	0,986	-0,5	1,9
	DNZ	-5,9	-14,6	0,997	-1,7	1,4
	Bz	-6,1	-15,1	0,997	-1,7	1,4
	DNB	-19,2	-45,0	0,999	-6,0	1,5

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Prontosil™ 120-5 tBuCQN; mozgófázisösszetétel, 0,2 M NH₄OAc/MeOH = 10/90 (v/v) pH_a = 6,0; áramlási sebesség, 0,5 ml/perc (a DNB származékok esetén 0,8 ml/perc); detektálási hullámhossz, 230 nm; hőmérséklet, 278-343 K (DNB származékok esetén 293-343 K).

$$Q = \Delta(\Delta H^\circ) / [\Delta(\Delta S^\circ) \times 293 \text{ K}]$$