

AMINO-CSOPORTOT TARTALMAZÓ VEGYÜLETEK
ENANTIOMERJEINEK ELVÁLASZTÁSA
KIRÁLIS FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS
MÓDSZEREKKEL

PhD értekezés tézisei

Sztojkov-Ivanov Anita



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerkémiai Intézet
2008

AMINO-CSOPORTOT TARTALMAZÓ VEGYÜLETEK
ENANTIOMERJEINEK ELVÁLASZTÁSA
KIRÁLIS FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS
MÓDSZEREKKEL

PhD értekezés tézisei

Sztojkov-Ivanov Anita

Témavezetők:

Prof. Dr. Fülöp Ferenc, tanszékvezető egyetemi tanár

Prof. Dr. Péter Antal, egyetemi tanár



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerkémiai Intézet
2008

BEVEZETÉS

A modern analitikai kémia egyik legfontosabb célja a királis vegyületek, különösen a biológiai és gyógyszerészeti jelentőséggel bíró analógok enantiomerjeinek elválasztása.

Az élő szervezetben molekuláris szinten a kiralitás az élethez szükséges építőelemek, mint például az aminosavak, cukrok, peptidek, fehérjék és poliszacharidok fontos jellemzője. Mivel a biológiai rendszerekben ezek a biomolekulák csak az egyik lehetséges enantiomerformájukban léteznek, ezért eltérően lépnek kölcsönhatásba a szervezetbe jutó királis gyógyszermolekulák, élelmiszer adalékanyagok, mezőgazdasági vegyszerek, illatanyagok, stb. egyes enantiomerjeivel. Emellett a sztereoszelektivitás az enzimatikus folyamatok, hírvivő-receptor kölcsönhatások és metabolikus folyamatok jellemző sajátossága is.

Érthető tehát, hogy a kiralitás gyógyszeripari vonatkozásban is kulcsfontosságú fogalom. Ha egy racém gyógyszermolekula a királisan szelektív élő szervezetbe kerül, annak enantiomerjei különbözhetnek a biológiai hasznosíthatóság, megoszlás, metabolizmus, kiürülés vagy a hatás típusában és mértékében. Gyakran csak az egyik enantiomer felelős az alkalmazott terápiás hatásért (eutomer), míg a másik izomer (disztomer) kevésbé aktív, inaktív, vagy akár toxikus illetve antagonist is lehet. Az eltérő biológiai tulajdonságok oka az, hogy különböző az egyes enantiomerek fehérjetranszportja és fehérjéhez való kötődése, a metabolizmusuk kinetikája és stabilitásuk.

A tiszta enantiomerek előállításának több lehetősége van, például (a) enantioszelektív szintézis eljárások alkalmazása, vagy (b) racém keverékek előállítása, majd az enantiomerek elválasztása. Az elválasztás történhet *indirekt* módon, kovalens diasztereomer párok képzésével. Ezek az eltérő fizikai és kémiai tulajdonságaik alapján kristályosítással, desztillációval vagy akirális kromatográfiás eljárásokkal szétválaszthatók. A *direkt* módszereknél a diasztereomer párok nem kovalens kötéssel alakulnak ki, hanem a racém elegy egy királis szelektorral lép kölcsönhatásba, ami lehet egy királis állófázis szelektormolekulája vagy a mozgófázishoz adott királis adalékanyag. Az enantiomerek elválasztása történhet még kinetikus rezolválási eljárásokkal, enantioszelektív membránok vagy enzimek segítségével, vagy szimultán mozgóréteges folyadékkromatográfiás módszerekkel is.

A kiindulási anyagok illetve a termékek enantiomer tisztaságának ellenőrzésére megbízható és pontos analitikai módszerekre van szükség. Az analitikai vizsgálatoknál az érzékenység és a szelektivitás egyaránt fontos követelmény mind az egyetemi, ipari és

gyógyszergyári kutatások területén. Az analitikai célokra kidolgozott elválasztási technikák közül az egyik legdinamikusabban fejlődő és legszélesebb körben alkalmazott módszer a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), amely megfelel a fent említett követelményeknek.

CÉLKITŰZÉS

Munkánk célja egyszerű, könnyen alkalmazható közvetlen királis kromatográfiai módszerek kifejlesztése volt, amelyek megfelelőek a racém aminonaftol és a β -aminosav enantiomerek elválasztására, szintézisük nyomon követésére és abszolút konfigurációjuk megállapítására.

Az 1-(aminobenzil)-2-naftol, 2-(aminobenzil)-1-naftol és 1-(aminoalkil)-2-naftol származékok enantiomerjeit királis katalizátorokként, királis segédanyagokként és szintetikus építőelemekként alkalmazzák a kémiában. Legjobb tudomásunk szerint eddig még nem jelent meg publikáció ezen racém aminonaftol analógok királis folyadékkromatográfiai elválasztásáról.

Célul tűztük ki különbözően szubsztituált α -aminobenzil- (1. ábra) és α -aminoalkil (2. ábra) 1- és 2-naftol analógok elválasztására alkalmas kromatográfiai módszerek kifejlesztését cellulóz *trisz*-3,5-dimetilfenil karbamát-alapú királis állófázisokon és egy β -ciklodextrin-alapú királis állófázison. Ezen túlmenően célunk volt az elválasztás hőmérsékletfüggésének tanulmányozása egy cellulóz 3,5-dimetilfenil karbamát-alapú királis állófázison, valamint a királis elválasztás termodinamikájának felderítése az α -aminobenzil- 1- és 2-naftol analógok kromatográfiai adataiból számolt termodinamikai paraméterek segítségével.

Az enantiomertiszta, konformációsán gátolt, β -aminosavak heterociklusok szintéziséhez, potenciális gyógyszerhatóanyagok előállításához használt vegyületek; valamint belőlük biológiailag aktív, ismert konformációjú peptidek hozhatók létre, amelyek segítségével lehetővé válik a receptorok finomszerkezetének tanulmányozása.

Vizsgálataink további tárgyát képezte különbözően szubsztituált β -aminosavak enantiomerjeinek elválasztása makrociklusos antibiotikum-alapú királis állófázisokon és egy újonnan kifejlesztett királis koronaéter-alapú állófázison.

Tanulmányoztuk a mozgófázis minőségének és összetételének, pH-jának, az alkalmazott puffer koncentrációjának és a vizsgált vegyületek szerkezetének elválasztásra gyakorolt hatását mind az aminonaftol, mind a β -aminosav analógok esetén.

ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

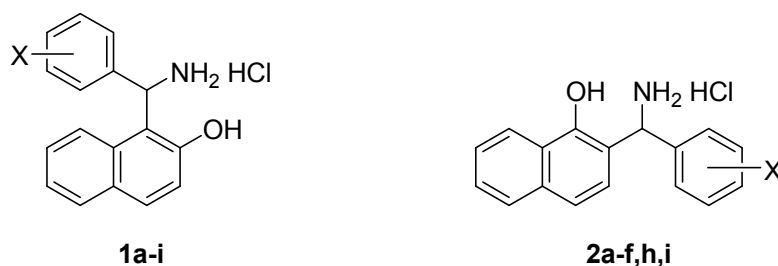
A közvetlen királis kromatográfias vizsgálatok során több típusú királis állófázist alkalmaztunk, ezek között volt cellulóz-alapú, β -ciklodextrin-alapú, makrociklusos antibiotikum-alapú és koronaéter-alapú állófázis.

Az alkalmazott készülékek a következők voltak:

I. rendszer: M-600 jelű alacsony nyomású gradiens pumpa, M-996 jelű fotodióda soros detektor, Millenium³² 2.1 jel- és adatfeldolgozó szoftver (Waters Chromatography, Milford, MA, USA).

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

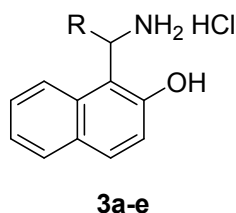
III. rendszer: MD-2089 PLUS jelű alacsony nyomású kvaterner pumpa, MD-2010 PLUS jelű fotodióda soros detektor, ChromPass 1.8 jel- és adatfeldolgozó szoftver (JASCO International Co., Tokyo, Japan).



X = **a**: H, **b**: *p*-Me, **c**: *p*-OMe, **d**: *p*-F, **e**: *p*-Cl, **f**: *p*-Br, **g**: *p*-NO₂, **h**: *m*-Br, **i**: *m*-NO₂

1. ábra

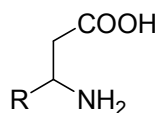
Az 1-(aminobenzil)-2-naftol és 2-(aminobenzil)-1-naftol analógok szerkezeti képletei



R = **a**: Me, **b**: Et, **c**: Pr, **d**: *i*Pr, **e**: *t*Bu

2. ábra

Az 1-(aminoalkil)-2-naftol származékok szerkezeti képletei



4a-r

X = **a**: Ph; **b**: *p*-Me-C₆H₄; **c**: *p*-CF₃-C₆H₄; **d**: *p*-OMe-C₆H₄; **e**: *m*-OMe-C₆H₄;
f: *o*-OMe-C₆H₄; **g**: *m,p*-diOMe-C₆H₃; **h**: *p*-F-C₆H₄; **i**: *p*-Cl-C₆H₄; **j**: *m*-Cl-C₆H₄;
k: *o*-Cl-C₆H₄; **l**: *m,p*-diCl-C₆H₃; **m**: *p*-Br-C₆H₄; **n**: *m*-Br-C₆H₄; **o**: 2-furil;
p: 2-tienil; **q**: 3-piridil; **r**: 1-naftil

3. ábra

A vizsgált β -szubsztituált- β -aminosavak szerkezeti képletei

Mindhárom rendszer tartalmaz egy-egy 7125 jelű manuális mintaadagolót is 20 μ l-es adagolóhurokkal (Rheodyne, Cotati, USA).

A mozgófázisok pH-ját egy Radelkis OP/20811 pH-mérővel állítottuk be (Budapest, Hungary).

Az állófázisok hőmérsékletét MK70 jelű hűtő-fűtő termosztáttal állítottuk be (Mechanik Prüfgeräte, Medlingen, Germany).

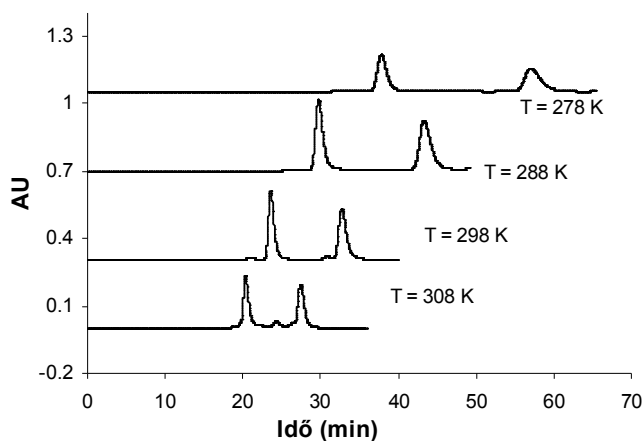
EREDMÉNYEK

I. AMINONAFTOLOK

1. Cellulóz *tris*-3,5-dimetilfenil karbamát-alapú királis állófázison (Chiralcel OD-H) izoterm körülmények között elválasztottuk az **1a-i** és **2a-f,h,i** vegyületek enantiomerjeit normál fázisú kromatográfiás módban. Megállapítottuk, hogy a mozgófázis 2-propanol tartalmának változtatása erősen befolyásolja az 1- és 2-naftol származékok kromatográfiás paramétereit (k' , α és R_S).

2. Azt tapasztaltuk, hogy retenciós faktorok (k') és a szelektivitás (α) függenek az 1- és 2-naftol analógok α -aminobenzil szubsztituensének helyzetétől. Azonos mozgófázis összetételnél a két vegyületcsoport k' értékei közti különbségből arra következtettünk, hogy a 2-(aminobenzil)-1-naftolok szterikus elrendeződése kedvezőbb a királis felismerési folyamat szempontjából. Az α -aminobenzil csoporton elhelyezkedő metil és halogén szubsztituensek kevésbé, míg a metoxi és nitro szubsztituensek erőteljesebben befolyásolták a retenciót és a szelektivitást.

3. Az **1a-i** és **2a-f,h,i** vegyületek kromatográfiás paramétereit négy hőmérsékleten számoltuk ki, a 278-308 K tartományban. A retenciós faktorok, a szelektivitás és a felbontás



4. ábra

A **2c** vegyület királis elválasztásának hőmérséklet-függése *n*-hexán/IPA/DEA=55/45/0,1 mozgófázis összetételnél

(aminobenzil)-2-naftol analógok negatívabb $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$ és $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékekkel rendelkeznek. Az eredményekből arra következtettünk, hogy az **1a-i** és **2a-f,h,i** analógok enantiomerjeinek elválasztása azonos, entalpia-vezérelt elválasztási mechanizmus szerint történik.

4. Az **1a-i** és **2a-f,h,i** vegyületek enantiomerjeit elválasztottuk egy 3,5-dimetilfenil karbamát β -ciklodextrin-alapú királis állófázison, normál fázisú módban. Az eluensösszetétel változtatásával és mozgófázis adalékanyagok hozzáadásával optimalizáltuk az elválasztásokat. Azt tapasztaltuk, hogy az α -aminobenzil szubsztituensének helyzetétől függően változnak a retenciós faktorok (k') és a szelektivitás (α). Az α -aminobenzil csoporton elhelyezkedő metil, metoxi és halogén szubsztituensek hatása csekély volt, a nitro szubsztituens viszont segítette a királis felismerési folyamatot.

5. Megvalósítottuk az 1-(aminoalkil)-2-naftol származékok (**3a-e**, 2. ábra) enantiomerjeinek elválasztását két cellulóz *trisz*-3,5-dimetilfenil karbamát-alapú királis állófázison (Chiralcel OD-H és Chiralcel OD-RH), normál és fordított fázisú módban.

6. Normál fázisú módban a kromatográfias paramétereket erősen befolyásolta a mozgófázis 2-propanol tartalma. A retenciós faktorok és a **3a-e** vegyületek alkil szubsztituenseinek térkitöltését jellemző Meyer-paraméter (V^M) között lineáris összefüggést találtunk: a nagyobb térkitöltésű alkil szubsztituensek gátolták a királis szelektorral való kölcsönhatást, ugyanakkor javították a szelektivitást és a felbontást. Fordított fázisú módban a mozgófázis pH-ja, az alkalmazott puffer koncentrációja és a szerves módosító mennyisége csak a retenciót befolyásolta szignifikánsan, a szelektivitás és a felbontás értékeiben csak

az összes vizsgált vegyület esetén csökkent a hőmérséklet emelésével (4. ábra). Az $R \ln \alpha$ vs $1/T$ van't Hoff függés segítségével kiszámítottuk a vizsgált rendszerben létrejövő enantiomer-eloszlásra jellemző termodinamikai paramétereket, vagyis a fellépő entalpia- ($\Delta(\Delta H^\circ)$), entrópia- ($\Delta(\Delta S^\circ)$) és szabadentalpia ($\Delta(\Delta G^\circ)$) változás különbségeit. Megállapítottuk, hogy ezek függenek a vizsgált vegyületek szerkezetétől: 1-

kismértékű változást tapasztaltunk. Megállapítottuk, hogy minél hosszabb és nagyobb térkitöltésű az 1-(aminoalkil)-2-naftol analógok alkil szubsztituense, annál nagyobb értékeket mutatnak a kromatográfiás paraméterek (k' , α és R_S).

II. β -AMINOSAVAK

7. Közvetlen királis kromatográfiás módszereket dolgoztunk ki a β -szubsztituált- β -aminosavak (**4a-r**, 3. ábra) enantiomerjeinek elválasztására. Az alkalmazott fordított fázisú és polár-ionos eluensrendszerek közül az utóbbi bizonyult eredményesebbnek.

8. A hat makrociklusos antibiotikum-alapú királis állófázis közül a teicoplanin szelekttal rendelkező, nemrégiben kifejlesztett Chirobiotic T2 nyújtott kiemelkedő szelektivitást. A kapott eredmények alapján rámutattunk arra, hogy a diasztereomer kötőhelyeik közötti finom különbségeknek köszönhetően a makrociklusos antibiotikum-alapú oszlopok egymás kiegészítői: egy másik Chirobiotic kolonnát használva ugyanolyan kromatográfiás körülmények között növekedhet a szelektivitás. Megállapítottuk, hogy a β -aminosavak aromás gyűrűjén elhelyezkedő szubsztituensek csak kismértékben befolyásolják a kromatográfiás paramétereket.

9. Az új (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav-alapú királis állófázis alkalmazása figyelemre méltó: rendkívül értékes eszköznek bizonyult a β -szubsztituált- β -aminosavak enantiomerjeinek elválasztásában. Az elválasztások optimalizálása céljából alkalmazott savas mozgófázis adalékanyagok közül a jégecet biztosította a legnagyobb szelektivitás és felbontás értékeket.

10. Megállapítottuk, hogy a retenció függ a β -aminosavak aromás gyűrűjén lévő szubsztituensek minőségétől és elhelyezkedésétől: a *meta*-szubsztituenssel rendelkező analógok visszatartása nagyobbak bizonyult, mint a *para*-szubsztituált vegyületeké, az *orto* helyzetű szubsztituensek pedig az elválasztás szempontjából kedvezőtlenek.

11. Azokban az esetekben, amikor az ismert konfigurációjú minták rendelkezésünkre álltak, meghatároztuk a vizsgált enantiomerek elúciós sorrendjét.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények:

- I. Anita Sztojkov-Ivanov**, István Szatmári, Antal Péter, Ferenc Fülöp
Structural and temperature effects in the high-performance liquid chromatographic enantioseparation of 1-(α -aminobenzyl)-2-naphthol and 2-(α -aminobenzyl)-1-naphthol analogs
Journal of Separation Science, **2005**, 28, 2505-2510. i.f.: 1,829
- II. Anita Sztojkov-Ivanov**, László Lázár, Ferenc Fülöp, Daniel W. Armstrong, Antal Péter
Comparison of separation efficiency of macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases for the LC enantioseparation of β -amino acids
Chromatographia, **2006**, 64, 89-94. i.f.: 1,171
- III. Róbert Berkecz**, **Anita Sztojkov-Ivanov**, István Ilisz, Enikő Forró, Ferenc Fülöp F, Myung Ho Hyun, Antal Péter
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -amino acid stereoisomers on a (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid-based chiral stationary phase
Journal of Chromatography A, **2006**, 1125, 136-143. i.f.: 3,554
- IV. Róbert Berkecz**, István Ilisz, **Anita Sztojkov-Ivanov**, István Szatmári, Ferenc Fülöp, Daniel W. Armstrong, Antal Péter
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of 1-(α -aminobenzyl)-2-naphthol and 2-(α -aminobenzyl)-1-naphthol analogs on a β -cyclodextrin-based chiral stationary phase
Chromatographia, **2007**, 65, 337-341. i.f.: 1,145
- V. Anita Sztojkov-Ivanov**, Diána Tóth, István Szatmári, Ferenc Fülöp, Antal Péter
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of 1-(aminoalkyl)-2-naphthol analogs on polysaccharide-based chiral stationary phases
Chirality, **2007**, 19, 374-379. i.f.: 2,436
- Összesített impakt faktor: 10,135

Egyéb közlemények:

- VI.** Ildikó Schuszter, **Anita Sztojkov-Ivanov**, László Lázár; Ferenc Fülöp
Synthesis of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-1-carboxylic acid derivatives via Ugi reactions
Letters in Organic Chemistry, **2007**, *4*, 102-108. i.f.: 0,981

POSZTER ELŐADÁSOK

- VII.** **Anita Sztojkov-Ivanov**, István Szatmári, Antal Péter, Ferenc Fülöp
Structural and temperature effects in the high-performance liquid chromatographic enantioseparation of 1-(α -aminobenzyl)-2-naphthol and 2-(α -aminobenzyl)-1-naphthol analogs
6th Balaton Symposium, Siófok, 2005. szeptember 7-9., Abstr.: P-62.
- VIII.** **Anita Sztojkov-Ivanov**, István Szatmári, Antal Péter, Ferenc Fülöp
Structural and temperature effects in the high-performance liquid chromatographic enantioseparation of 1-(α -aminobenzyl)-2-naphthol and 2-(α -aminobenzyl)-1-naphthol analogs
Pharmacy: Smart Molecules for Therapy, Budapest, 2005. október 12-14., Abstr.: P-90.