

**Doktori (Ph.D.) értekezés
tézisei**

**POLISZACHARID ÉS CIKLOFRUKTÁN TÍPUSÚ
KIRÁLIS ÁLLÓFÁZISOK ALKALMAZÁSA
ENANTIOMEREK ELVÁLASZTÁSÁRA**

Készítette:

Aranyi Anita

Témavezetők:

Péter Antal
egyetemi tanár

Ilisz István
egyetemi docens

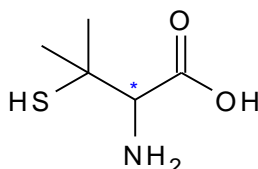
Kémia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

2014

1. BEVEZETÉS

A természettudományok, valamint a szerves kémiai ipar rohamosan fejlődő világával lépést kell tartanunk analitikai szinten is. Az analitikai kémiai technikák változásának követése nem kis mutatvány a mai világban. Mindaz, ami tíz évvel ezelőtt még haladó módszernek számított, ma ugyan még működik, de már sokkal olcsóbban, egyszerűbben és gyorsabban is meghatározható egy-egy analitikai érték. A gyógyszergyártásban általában három markánsan elkülöníthető anyagcsoport vizsgálata hárul a minőségellenőrző laboratóriumokra: a beérkező kiindulási anyagok vagy alapanyagok, a gyártás közben képződő gyártásközi minták, valamint a végtermékek analízise. A gyógyszerkönyvek és azok irányelvei viszonylag mereven szabályozzák egy-egy gyógyszerhatóanyag, vagyis a végtermék vizsgálatát, de a kiindulási vagy alapanyagok tekintetében csak a kereteket adják meg. Ezek alapján egyértelmű, hogy az alapanyag vizsgálatok analitikájában kell keresnünk azokat a területeket, ahol újabb, költségtakarékosabb módszereket tudunk bevezetni, kiváltva a régi, még működő, de ráfordítás tekintetében nem éppen olcsó megoldásokat.

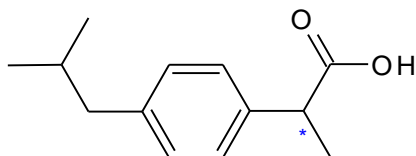
A mai modern analitikai kémia egyik legfontosabb feladata a királis vegyületek, különösen a biológiai és gyógyszerészeti jelentőséggel bíró anyagok enantiomerjeinek elválasztása. Az élőlényeket felépítő szerves molekulák nagyrésze királis vegyület, melyek a biológiai rendszerekben csak az egyik lehetséges enantiomerformájukban léteznek, így eltérően lépnek kölcsönhatásba a szervezetbe jutó királis gyógyszermolekulák, élelmiszer-adalékanyagok, mezőgazdasági vegyszerek, illatanyagok, stb. egyes enantiomerjeivel. 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. Ilyen például a penicillinamin (*S*) enantiomer formája, mely kiváló ízületi gyulladáscsökkentő hatóanyag, míg (*R*) enantiomer párja toxikus. Hasonlóképpen a Parkinson-kór kezelésénél alkalmazott Levodopa csak az (*S*) enantiomert tartalmazza, hiszen a másik enantiomer a vérben a granulociták számának csökkenését okozza.



1. ábra. Penicillinamin

Ugyan ritka, de találunk példát olyan esetre is, ahol a 2 enantiomer hatása megegyezik. Ilyen

például az ibuprofen, melynek mindkét enantiomerje gyulladáscsökkentő hatású.



2. ábra. Ibuprofen

Érthető tehát, hogy a királis vegyületek analitikája a gyógyszerbiztonság szempontjából kiemelkedően fontossá vált. Sztereoizomer keveréket gyógyszerhatóanyagként már hosszabb idő óta csak indokolt esetben lehet forgalomba hozni [Gross 1989], napjainkra pedig a szabályozás olyannyira szigorodott, hogy a racemát hatóanyag bevezetését megelőzően, mindkét enantiomerre és a racemátra is el kell végezni az összes klinikai és toxikológiai vizsgálatot. Így egyértelmű, hogy a racemát forgalomba hozatala többletkiadással jár, tehát a fejlesztések mára már kizárólag az enantiomertiszta vegyületek irányába folynak.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során célul tűztük ki folyadékkromatográfias módszerek fejlesztését különböző biológiai és gyógyszeripari szempontból fontos vegyületek sztereoizomerjeinek elválasztására, valamint új fejlesztésű királis kolonnák elválasztóképességének tanulmányozását modell vegyületeinkkel.

Vizsgálni kívántuk:

- ✚ két kiralitáscentrummal rendelkező aminonaftol enantiomerek elválasztását módosított poliszacharid alapú állófázisokon,
- ✚ egy kiralitáscentrummal rendelkező amino-1- és 2-naftol analógok retenciós mechanizmusát módosított poliszacharid oszlopokon,
- ✚ egy kiralitáscentrummal rendelkező amino-1- és 2-naftol analógok enantiomerjeinek elválasztását ciklofruktán állófázison,
- ✚ savamidok, diaminok valamint amino-alkoholok enantiomerjeinek elválasztását ciklofruktán királis szelektort tartalmazó kolonnákon.

A modellvegyületek kromatográfias paramétereinek meghatározásán keresztül vizsgálni kívántuk az eluensösszetétel és a poláris módosító (alkohol) minőségének és mennyiségének

hatását az elválasztásra. A különböző szubsztituensekkel rendelkező vegyületek által következtetéseket kívántunk levonni a szerkezet királis felismerésre gyakorolt hatására.

Tanulmányozni kívántuk a hőmérséklet kromatográfiás paraméterekre gyakorolt hatását és ennek segítségével megfejteni az elválasztás lehetséges mechanizmusát.

3. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

3.1. Folyadékkromatográfiás módszerek

A közvetlen királis folyadékkromatográfiás vizsgálatok során poliszacharid és ciklofruktán típusú királis állófázisokat alkalmaztunk.

A vizsgálatokat két különböző HPLC rendszeren végeztük:

Az I. rendszer Waters 1525 bináris HPLC pumpát, Waters kolonna termosztátot, Waters 2487 kétsatornás UV-VIS detektort, és Waters „Breeze Data Manager” adatfeldolgozó szoftvert tartalmazott (Waters, Milford, MA, USA).

A II. rendszer összetevői: Waters M-600 gradiens HPLC pumpa, Waters M-2996 fotodiódasoros detektor, Waters „Millenium 32 Chromatography Manager” adatfeldolgozó rendszer (Waters) és SparkMistral kolonna termosztát (Spark Holland, Emmen, Netherlands) voltak. Mindkét kromatográfiás rendszer Rheodyne 7125 20 µl-es mintaadagolóval volt ellátva (Cotati, CA, USA).

Egyéb kiegészítők közé tartozik a Rotring SonicCleaner ultrahangos fürdő (Rotring GmbH, Hamburg, Germany).

3.2. Vizsgált anyagok

- ✚ két kiralitáscentrummal rendelkező aminonaftol analógok
- ✚ egy kiralitáscentrummal rendelkező amino-1- és 2-naftol analógok
- ✚ savamidok
- ✚ diaminok
- ✚ amino-alkoholok

4. EREDMÉNYEK

Munkánk során különböző biológiai és gyógyszeripari szempontból fontos egy- vagy két kiralitáscentrummal rendelkező aminonaftolok, amino-alkoholok valamint diaminok

sztereoizomerjeinek elválasztását tanulmányoztuk. A közvetlen folyadékkromatográfiai módszereket új fejlesztésű ciklofruktán illetve poliszacharid típusú kolonnákon dolgoztuk ki.

Poliszacharid típusú királis kolonnákon történő elválasztások

1. Az egy és két kiralitáscentrummal rendelkező aminonaftol enantiomerek elválasztását különböző poliszacharid típusú kolonnákon valósítottuk meg. A folyadékkromatográfiai vizsgálatokhoz normál fázisú módszert választottunk, ahol az eluens apoláris komponense 98-70% heptán volt, amely 2-30%-ban tartalmazott poláris módosítót. Míg a 2-naftol analógok első csoportjára **(1-5)** három, addig az 1- és 2-naftol **(6-15)** analógokra öt különböző poliszacharid alapú oszloppal végeztünk kísérleteket. A mérések során a 3,5-dimetilfenilkarbamát szelektorral rendelkező Cellulose-1 bizonyult a leghatékonyabbnak, a megfelelő körülmények megválasztásával az összes anyagot sikerült elválasztanunk.

2. Vizsgáltuk az eluens összetételének mennyiségi, valamint a poláris módosító (alkohol) minőségi hatását az elválasztásra. A mozgófázisban lévő alkohol koncentrációjának növelésével a visszatartás mindegyik esetben csökkent, tehát tipikus normál fázisú viselkedést tapasztaltunk. A poláris módosítók minősége nagyban befolyásolta mind a retenciós faktor, szelektivitás illetve felbontás értékeit, melyet az alkoholok különböző polaritásának, valamint eltérő szolvatáló képességének tulajdonítottunk.

3. A hőmérséklet hatását viszonylag széles 5 °C és 50 °C közötti tartományban vizsgáltuk. A retenciós adatok a hőmérséklet emelkedésének hatására a legtöbb esetben csökkentek. A kromatográfiában használatos van't Hoff-egyenlet segítségével számoltuk az elválasztást kísérő entalpia és entrópia változásokat. Az esetek többségében entalpiavezérelt elválasztásokat kaptunk, de néhány analóg példáján keresztül az entrópia vezérelt királis megkülönböztetést is megfigyelhettük. Ennek sajátága, hogy rövidebb analízis idő alatt, hatékonyabb elválasztást kapunk. A **2c-d** analóg esetében -5 °C - 40 °C hőmérséklet tartományban megfigyelhettünk egy, a hőmérséklet hatására bekövetkező elúciós sorrend változást.

4. A szerkezet-kromatográfiai viselkedés közti kapcsolatot tanulmányozva egyértelműen láthattuk, hogy a szubsztituensek minősége és helyzete befolyásolja a minták polaritását, térbeli szerkezetét és ezzel kromatográfiai viselkedését. Azonban nem szabad figyelmen kívül hagynunk a királis szelektoron lévő funkciós csoportokat, illetve a poliszacharid szerkezetét, mely hatással van a minta és szelektor közötti kölcsönhatásokra, ezáltal az elválasztásra. Megállapítottuk, hogy a naftilcsoport jelenléte a molekulán erősebb π - π kölcsönhatást eredményezett, így a retenció növekedett. Az amilóz alapú kolonnán általánosan nagyobb

visszatartást tapasztaltunk, melyet főként a szelektor merev, helikális szerkezete eredményezett. Vizsgálataink azt is mutatták, hogy ha az aromás gyűrűben a heteroatom (nitrogén) különböző – *orto*, *meta*, vagy *para* – helyzetben van, eltérő eredményeket kaphatunk. Az alkilszubsztituens hatásának tanulmányozása érdekében vizsgáltuk a Meyer-paraméterek értékeit a retenciós faktorok függvényében. Egyértelmű korrelációt állapítottunk meg a kromatográfiás adatok és az alkilcsoport térkitöltését jellemző Meyer-paraméterek között.

Ciklofruktán típusú királis állófázisokon történő elválasztások

5. Ciklofruktán alapú királis kolonnákat alkalmazva az egy kiralitáscentrummal rendelkező 1- és 2-naftol enantiomerek elválasztását CF6-IP, míg a diaminok, savamidok, amino-alkoholok elválasztását CF6-IP, CF6-RN és CF6-DMP királis oszlopokon valósítottuk meg. Normál fázisú körülmények között, az eluens apoláris komponense 40-80% heptán volt, míg poláris módosítóként 60-20% alkoholt használtunk a 0,1% TFA additív mellett. Az alkohol koncentrációjának csökkentésével a retenciós faktorok értéke növekedett ugyan, de ez a legtöbb esetben kis mértékű hatással volt a szelektivitásra. A felbontás tekintetében az eredmények különbözőek. A naftol illetve savamid analógoknál a felbontás általában nőtt az eluens alkohol tartalmának csökkentésével, míg az amino-alkoholoknál épp a retenciós faktorról ellenkezőleg csökkent, a diaminok esetében pedig nem tapasztaltunk lényeges változást. Az eluens poláris komponensének minőségi változtatása révén megfigyelhettük, hogy a naftol analógoknál az elágazó-láncú alkoholok szolvatációs készsége előnyösebb lehet, így a szelektivitás és felbontás tekintetében jobb eredményeket kaptunk.

6. A mozgófázishoz adagolt sav (TFA) koncentrációjának növelésével a retenciós faktorok értékei kismértékben ugyan, de csökkentek, melyet a megnövekedett ionos kölcsönhatásoknak tulajdonítottunk a minta és mozgófázis között. A vizsgált analógok mindegyikére a 0,1% TFA alkalmazása bizonyult a leghatékonyabbnak. A savamidok, diaminok és amino-alkohol analógokra 6, különböző savas módosítót is alkalmaztunk. A TFA mellett azonban csak a kénsav és perklórsav esetén sikerült elválasztást elérni, elfogadható retenciós idővel. A jégecet alkalmazásakor nagy retenciós faktor értékeket tapasztaltunk, melyek nem párosultak a szelektivitás és felbontás növekedésével. Ezt a nem enantioszelektív kölcsönhatások számának növekedésével magyarázhatjuk.

7. A hőmérséklet hatását 5 °C – 40 °C közötti tartományban vizsgálva, a hőmérséklet emelkedésével a kromatográfiás adatok értékei minden esetben csökkentek. A van't Hoff-egyenlet által meghatározott termodinamikai paraméterek minden esetben negatívak voltak,

amely az entalpiavezérelt elválasztásokra utal.

8. A szerkezet-kromatográfiás viselkedés közötti összefüggést vizsgálva megállapítottuk, hogy a fenilgyűrűn különböző halogéneket – fluor, klór, bróm – tartalmazó naftol analógok esetén a kromatográfiás adatok értékei növekedtek – kivéve **23, 38** minták – összehasonlítva a nem szubsztituált analógokkal. A szubsztituens helyzete, szterikus okokra visszavezethetően további különbségeket eredményezett. Megfigyeltük, hogy a nitrocsoport jelenléte nagyobb retenciót eredményezett ugyan, de a szelektivitás és felbontás értékeiben nem mutatkozott jelentős különbség. Ezáltal valószínűsítjük, hogy a nitrocsoport jelenléte a nem enantioszelektív kölcsönhatások arányát növeli meg. A különböző alkil-szubsztituenseket tartalmazó 2-naftol analógok retenciója nagyobb volt, mint azoké, amelyek szubsztituált-fenilgyűrűt tartalmaznak. Az alkil-szubsztituensek különbözőképpen befolyásolják a szelektivitást és a felbontást. A Meyer-paraméterek alapján megállapítottuk, hogy a nagyobb méretű szubsztituensek akadályozzák a minta kölcsönhatását a szelektorrall, kisebb kromatográfiás paramétereket eredményezve.

9. A diaminok, savamidok, amino-alkoholok vizsgálata esetén láthattuk, hogy a π - π illetve poláris kölcsönhatások mellett, a H-híd kötés is fontos szerepet kap a királis felismerési folyamatokban. A karbonil-csoporttal rendelkező analógokra jobb elválasztást kaptunk összehasonlítva azokkal a mintákkal, amelyek nem rendelkeztek ezen szubsztituenssel. Az amino-alkoholok esetében mindkét kolonnán jobb elválasztást kaptunk, mely szintén az OH-csoport hidrogén-kötésre való hajlamával hozható összefüggésbe.

5. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

5.1. Az értekezésben feldolgozott közlemények

1, A. Aranyi, I. Ilisz, Z. Pataj, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of 1-(phenylethylamino)- or 1-(naphthylethylamino)methyl-2-naphtholanalogs and a temperature-induced inversion of the elution sequence on polysaccharide-based chiral stationary phases

Journal of Chromatography A, 1218, 4869-4876, 2011.

Impakt faktor: **4,582**

2, A. Aranyi, I. Ilisz, I., Z. Pataj, I. Szatmári, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of Betti base analogs on a newly developed isopropyl carbamate-cyclofructan6-based (IP-CF6) chiral stationary phase

Chirality, 23, 549-556, 2011.

Impakt faktor: **2,350**

3, A. Aranyi, Á. Bagi, I. Ilisz, Z. Pataj, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of amino compounds on a newly developed isopropyl carbamate-cyclofructan6-based (IP-CF6) chiral stationary phase

Journal of Separation Science, 35, 617-624, 2012.

Impakt faktor: **2,733**

4, A. Aranyi, I. Ilisz, N. Grecsó, R. Csütörtöki, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter

Development of the high-performance liquid chromatographic method for the enantioseparation of unusual glycine ester analogs on polysaccharide-based chiral stationary phases.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 76, 183-191, 2013.

Impakt faktor: **2,967**

Összesített impakt faktor: **12,632**

5.2. Az értekezés témájához kapcsolódó fel nem használt közlemények

5, Z. Pataj, I. Ilisz, A. Aranyi, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter

LC Separation of γ -Amino Acid Enantiomers

Chromatographia, 71, 13-19, 2010.

Impakt faktor: **1,075**

6, I. Ilisz, Z. Pataj, A. Aranyi, A. Péter

Chiral HPLC separation of amino acid enantiomers and epimers of small, biologically important peptides

Mini Reviews in Medicina IChemistry, 10, 287-298, 2010.

Impakt faktor: **2,622**

7, I. Ilisz, A. Aranyi, Z. Pataj, A. Péter

Enantioseparations by High-Performance Liquid Chromatography Using Macrocyclic Glycopeptide-Based Chiral Stationary Phases

Chiral Separations-Methods and Protocols

Szerkesztő: G. Scriba, Humana Press, Totowa, NJ, USA, Könyvfejezet 2011.

8, I. Ilisz, Z. Pataj, **A. Aranyi**, A. Péter

Macrocyclic antibiotic selectors indirect HPLC enantioseparations

Separation and Purification Reviews, 41, 207-249, 2012.

Impakt faktor: **2,429**

9, I. Ilisz, **A. Aranyi**, Z. Pataj, A. Péter

Recent advances in the enantioseparation of aminoacids and related compounds: A review

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 69, 28-41, 2012.

Impakt faktor: **2,967**

10, I. Ilisz, **A. Aranyi**, Z. Pataj, A Péter

Enantiomeric separation of nonproteinogenic aminoacids by high-performance liquid chromatography

Journal of Chromatography A, 1269, 94-121, 2012.

Impakt faktor: **4,612**

11, L. Sipos, I. Ilisz, **A. Aranyi**, Zs. Gecse, M. Nonn, F. Fülöp, M.H. Hyun, A. Péter

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of unusual isoxazoline-fused 2-aminocyclopentane carboxylic acids on (+)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid-based chiral stationary phases

Chirality, 24, 817-824, 2012.

Impakt faktor: **2,350**

12, I. Ilisz, **A. Aranyi**, A. Péter

Chiral derivatizations applied for the separation of unusual aminoacid enantiomers by liquid chromatography and related techniques

Journal of Chromatography A, 1296, 119-139, 2012.

Impakt faktor: **4,582**

13, I. Ilisz, N. Grecsó, **A. Aranyi**, P. Suchotin, D. Tymecka, B. Wilenska, A. Misicka, F. Fülöp, W. Lindner, A. Péter

Enantioseparation of β^2 -amino acids on cinchona alkaloid-based zwitterionic chiral stationary phases. Structural and temperature effects.

Journal of Chromatography A, 133, 44–54, 2014.

Impakt faktor: **4,582**

14, A. Aranyi, I. Ilisz, A. Péter; F. Fülöp, G. K. E. Scriba

Cyclodextrin-mediated enantioseparation of phenylalanineamide derivatives and aminoalcohols by capillary electrophoresis—Role of complexation constants and complex mobilities

Electrophoresis – accepted manuscript – DOI 10.1002/elps.201400142, 2014.

Impakt faktor: **3,261**

Összesített impakt faktor: **41,112**

5.3. Poszterek

Aranyi A., Ilisz I., Pataj Z., Szatmári I., Fülöp F., Péter A.

Aminonaftol sztereoizomerek nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiás elválasztása poliszacharid alapú királis kolonnákon

Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2010, Tapolca, 2010. november 10-12.

A. Péter, **A. Aranyi**, I. Ilisz, Z. Pataj, I. Szatmári, F. Fülöp

High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparation of Aminonaphthol Analogs on Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases

ISC 28th International Symposium on Chromatography,

Valencia, 2010. szeptember 12-16.

A. Aranyi, I. Ilisz, Z. Pataj, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter

HPLC Enantioseparation and a Temperature-Induced Inversion of the Elution Sequence of 1-(Phenylethylamino)- or 1-(Naphthylethylamino)methyl-2-Naphthol Analogs

36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Budapest, 2011. június 19-23.

A. Aranyi, I. Ilisz, Z. Pataj, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter

HPLC Enantioseparation and a Temperature-Induced Inversion of the Elution Sequence of Aminonaphthol Analogs

17th International Symposium on Separation Sciences, Kolozsvár, 2011. szeptember 5-9.

A. Aranyi, I. Ilisz, Z. Pataj, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter

HPLC Enantioseparation of Aminonaphthol Analogs on Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases

ISC 29th International Symposium on Chromatography, Torun, 2012.szeptember 9-13.

A. Aranyi, I. Ilisz, N. Grecsó, A. Misicka, D. Tymecka, S. Wernisch, W. Lindner, A. Péter

β -aminosavak folyadékkromatográfiás elválasztása, új zwitterion típusú állófázison

Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2013. Június 23-25.

A. Aranyi, I. Ilisz, A. Péter; F. Fülöp, G. K. E. Scriba

Determination of binding constants and the influence of the cyclodextrin cavity size for the EMO on the separation of amino compounds by capillary electrophoresis

MicroBioseparation Conference, Pécs, 2014. április 27- május 1

5.4. Előadások

Aminonaftol enantiomerek királis folyadékkromatográfiás elválasztása

Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány Előadóülése, Szeged, 2010.

Betti-bázisok királis folyadékkromatográfiás elválasztása

XXXII. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2010.

Aminonaftol enantiomerek királis folyadékkromatográfiás elválasztása

Műszaki TDK, Temesvár, 2011.

Aminonaftol enantiomerek királis folyadékkromatográfiás elválasztása

XXX. OTDK, Kémiai és Vegyipari Szekció, Analitikai Kémia szekció, Pécs, 2011.

Betti-bázis analógok királis kromatográfiája poliszacharid-típusú állófázisokon

Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány Előadóülése, Szeged, 2011.

β^2 -aminosavak elválasztása új, zwitterion cserélő királis állófázisokon

MTA Peptidkémiai Munkabizottság Tudományos Ülése, Balatonszemes, 2013.