

Aminosav sztereoizomerek közvetett és közvetlen folyadékkromatográfiás elválasztása

Doktori (Ph.D.) értekezés

Vékes Erika

Témavezető: Dr. Péter Antal

Szegedi Tudományegyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
Szeged
2004

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	1. oldal
1.1	Célkitűzés	2. oldal
2.	Irodalmi összefoglaló	3. oldal
2.1.	Királis származékképző reagensek alkalmazása	3. oldal
2.1.1.	Királis származékképzők alkalmazása az aminosav analitikában	4. oldal
2.2.	Királis állófázisok alkalmazása	7. oldal
2.2.1.	A ligandumcserés állófázisok	8. oldal
2.2.2.	Töltésátmenetes királis állófázisok (Pirkle-típusú fázisok)	8. oldal
2.2.3.	Királis polimer állófázisok	9. oldal
2.2.4.	Fehérje alapú állófázisok	9. oldal
2.2.5.	Ciklodextrin alapú állófázisok	9. oldal
2.2.6.	Koronaéter alapú állófázisok	11. oldal
2.2.7.	Makrociklusos antibiotikum alapú állófázisok	12. oldal
2.3.	A hőmérséklet hatása a királis kromatográfiára	17. oldal
2.4.	A vizsgált aminosavak jelentősége	21. oldal
3.	Kísérleti rész	23. oldal
3.1.	Vizsgált vegyületek számozása, elnevezése és rövidítése	23. oldal
3.2.	Alkalmazott készülékek	25. oldal
3.3.	Az alkalmazott kromatográfiás oszlopok	26. oldal
3.4.	Vizsgált vegyületek és felhasznált vegyszerek	26. oldal
3.5.	Az alkalmazott királis származékképzők és a származékképzés leírása	27. oldal
4.	(S)-N-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil-észter [(S)-NIFE] királis származékképző reagens alkalmazása	31. oldal
4.1.	A származékképzési reakció optimalizálása	33. oldal
4.1.1.	A pH hatása a származékképzési reakcióra	33. oldal
4.1.2.	A reagensfelesleg és a reakcióidő hatása a származékképzési reakcióra	33. oldal
4.2.	A vizsgált aminosavak-(S)-NIFE származékainak folyadék-kromatográfiás elválasztása	34. oldal
4.2.1.	A fehérjealkotó aminosavak (S)-NIFE származékainak elválasztása	35. oldal
4.2.2.	A Gly és Ala és Phe analógok (S)-NIFE származékainak elválasztása	38. oldal
4.2.3.	β-alkil-szubsztituált Phe, Tic, Triptofán analógok (S)-NIFE származékainak kromatográfiás elválasztása	39. oldal
4.2.4.	A szekunder aminosav sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak elválasztása	44. oldal
4.2.5.	Pro analóg sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak kromatográfiás jellemzése	46. oldal
5.	(S)-NIFE származékképző reagens elválasztóképességének összehasonlítása más származékképző reagensekkel és közvetlen módszerekkel	49. oldal
5.1.	Az (S)-NIFE, GITC és FDAA származékképzők elválasztóképességének összehasonlítása Pro analóg sztereoizomerek elválasztása esetén	49. oldal
5.2.	Az (S)-NIFE, GITC és FDAA származékképzők elválasztóképességének összehasonlítása Gly, Ala, Phe analóg sztereoizomerek elválasztása esetén	51. oldal

5.3.	Közvetett és közvetlen kromatográfiás módszerek elválasztóképességének összehasonlítása	54. oldal
5.4.1.	Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek közvetlen kromatográfiás elválasztása	55. oldal
5.4.2.	A közvetett és közvetlen kromatográfiás módszerek elválasztóképességének összehasonlítása Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek elválasztása esetén	57. oldal
5.5.	A közvetett és közvetlen kromatográfiás módszerek elválasztóképességének összehasonlítása β -alkil-szubsztituált Trp analógok példáján	60. oldal
5.6.	Összefoglalás [(S)-NIFE]	65. oldal
6.	Makrociklusos antibiotikum alapú királis kolonnák kromatográfiás viselkedésének összehasonlítása	67. oldal
6.1.	Az alkalmazott mozgófázisok	67. oldal
6.2.	A kromatográfiás paraméterek elemzése	67. oldal
6.3.	Az Chirobiotic T, Chirobiotic Tag oszlopok enantioszelektivitása	70. oldal
6.4.	A szénhidrát részek szerepe az elválasztásban	73. oldal
6.5.	Összefoglalás	76. oldal
7.	A hőmérséklet hatása a királis kromatográfiára	77. oldal
7.1.	A kromatográfiás paraméterek vizsgálata a hőmérsékletváltozás függvényében	77. oldal
7.2.	Termodinamikai paraméterek elemzése fordított fázison	82. oldal
7.3.	Termodinamikai paraméterek elemzése polár-organikus fázisban	88. oldal
7.4.	Termodinamikai paraméterek elemzése normál fázisban	89. oldal
7.5.	Entalpia-entrópia kompenzáció	90. oldal
7.6.	Összefoglaló a retenció valószínű mechanizmusáról a ristocetin A antibiotikum tartalmú állófázison	92. oldal
8.	Összefoglalás	94. oldal
9.	Irodalomjegyzék	97. oldal
10.	Summary	103. oldal
11.	Köszönetnyilvánítás	108. oldal
	Függelék	109. oldal

1. Bevezetés

Királis vegyületek enantiomer elválasztása kromatográfias módszerekkel a modern analitika egyik leggyorsabban fejlődő területe. A kiralitáshoz kapcsolódó jelenségek kutatása a biológia, a gyógyszer-, az élelmiszer- és a színezékiparban végbemenő dinamikus fejlődésnek köszönhető. Az elmúlt húsz év során a királis elválasztási módszerek fejlesztése iránti igény legnagyobb mértékben a biológia és a gyógyszerkutatás területén jelentkezett.

Az elmúlt két évtized során megjelent kiralitással foglalkozó munkák száma jelentősen nőtt [1-24], amelyeket szívesen forgatnak az e területen dolgozó kutatók. Különösen a gyógyszerkutatásban nőtt meg az érdeklődés, mert a gyógyszerekben előforduló enantiomerek biológiai hatása általában eltérő [25]. A gyógyszerek hatásmechanizmusát vizsgálva megfigyelték, hogy a gyógyszer izomerek különbözőképpen lépnek kölcsönhatásba az emberi szervezetben jelenlévő receptorokkal. Így az egyik terápiásan aktív enantiomer mellett a másik nem inaktívan viselkedik, hanem többféle mellékhatást okozhat, vagy antagonistahatású. Az emberi szervezetben nemcsak a receptorok, hanem enzimek, plazmafehérjék is képesek az enantiomerek megkülönböztetésére. A peptidek igen flexibilis molekulák, melyek térben számos konformációt vehetnek fel és ezek oldatbeli szerkezete függ a környezettől is. A receptorokkal való kölcsönhatás során konformációjuk rögzített. A biológiailag aktív konformáció meghatározása nehéz feladat, és a kutatások fő irányát ez adja meg felhasználva az NMR- és röntgendiffrakciós vizsgálatokat is. A biológiailag aktív konformáció megismerésének egyik módszere a helyi konformációs gátak beépítése a peptidekbe, amellyel rögzíthető a konformáció [26]. Ilyen szerkezetű peptideket úgy állítanak elő legegyszerűbben, ha az építőköveket, az aminosavakat, konformációsán gátolt formában építik be a peptidekbe. A nemfehérjealkotó aminosav enantiomerek előállításának három lehetősége van:

1. racém keverékek elválasztása,
2. tiszta királis forrás alkalmazása,
3. enantioszelektív szintézisek.

A racém keverékek előállítása kevésbé költséges, így inkább a szintézist követő elválasztástechnika hatékonyságának kihasználásával igyekeznek tiszta izomerekhez jutni. Előszeretettel alkalmaznak e célra kromatográfias technikákat, köztük a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC). A HPLC-s elválasztások előnye, hogy könnyen kivitelezhetők, gyorsak és többnyire az optikai izomereket nagy tisztaságban nyerhetjük ki. Így lehetőség nyílik mindegyik izomer biológiai vizsgálatára külön-külön.

1.1. Célkitűzés

A célkitűzésünk volt természetes és nem természetes aminosav enantiomerek és sztereoizomerek kromatográfiás elválasztása közvetett királis kromatográfiás módszerek alkalmazásával. Ennek megvalósítására egy új aktív uretán típusú királis származékképző reagenst, az (S)-N-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil-észtert (későbbiekben (S)-NIFE) alkalmaztuk. Célunk volt a természetes aminosavakra a származékképző reagens származékképzési és a képződött diasztereomer termékek kromatográfiás elválasztási körülményeinek megismerése. Ezen eredmények alapján a természetes aminosav enantiomerek egy futtatáson belüli elválasztására törekedtünk, illetve arra, hogy a származékképző reagens használatát kiterjesszük sztérikusan erősen gátolt nem természetes aminosav analógokra is.

Feladatul tűztük ki az (S)-NIFE elválasztóképességének összehasonlítását más közvetett királis kromatográfiás módszerekkel, amelyekben a következő királis származékképzőket alkalmaztuk: 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glükopiranozil-izotiocianát (GITC), és az 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamid (FDAA), illetve közvetlen királis kromatográfiás módszerekkel (királis állófázisokkal).

A munkánk másik fő irányát makrociklusos antibiotikum alapú királis állófázisok elválasztási mechanizmusának felderítése jelentette tesztvegyületek, vagy vegyületcsoportok elválasztásának nyomkövetése segítségével.

Célul tűztük ki annak megvizsgálását, hogy a cukorrészek hogyan befolyásolják - a teicoplanin és teicoplanin aglikon molekulákat királis szelektorként tartalmazó - Chirobiotic T, és a Chirobiotic Tag oszlopok elválasztó képességét sztérikusan alig vagy erősen gátolt vegyületek esetén.

Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a Chirobiotic R (risztocetin A) oszlop lehetséges kölcsönhatásainak jellegét semleges, negatív, pozitív és ikerionos tesztvegyületekkel normál, fordított fázisban illetve polár-organikus módban végzett elválasztások során. Ehhez az egyes vegyületek királis elválasztásának hőmérsékletfüggését használtuk fel.

2. Irodalmi összefoglaló

Királis vegyületek sztereoizomerjeinek elválasztása nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiás módszerekkel három úton lehetséges:

- királis származékképzők alkalmazása,
- királis állófázisok alkalmazása,
- királis mozgófázis adalékok alkalmazása.

2.1. Királis származékképző reagens alkalmazása

Az oszlop előtti származékképzés királis reagenssel hagyományos HPLC-s elválasztást igényel, mivel a királisan tiszta reagenssel végzett reakció eredményeképpen kovalens kötésű diasztereomer termékek képződnek, amelyek különböző fizikai-kémiai tulajdonságokkal jellemezhetőek. 1975-ben Furukawa számolt be először aminosav enantiomer elválasztásról, (+)-10-kámfor-szulfonilklorid reagenst felhasználva választott el *p*-nitro-benzilésztereket [27, 28]. A királis származékképzés nem egyszerű feladat, számos előnnyel és hátránnyal rendelkezhet.

A racém elegy és a királis származékképző reagens reakciójával szemben támasztott követelmények:

- a két enantiomernek azonos mértékben kell átalakulnia (nincs kinetikai rezolúció),
- a királis reagensnek a lehető legtisztábbnak kell lennie, nem lehet benne enantiomer szennyeződés,
- nem mehet végbe racemizáció és epimerizáció a diasztereomerpár-képzés közben.

A módszer előnyei:

- könnyű reagens-beszerezhetőség,
- a legtöbb elválasztás gyors és egyszerű,
- jó származékképző reagens kiválasztása esetén a detektálás alsó határa csökkenthető,
- a kolonnaköltség kicsi,
- származékképzéssel előtisztítás végezhető el,
- az elúciós sorrend következtethető, illetve megfordítható,
- a módszerfejlesztés kevésbé időigényes.

A módszer hátrányai:

- nehéz az enantiomer visszanyerése,

- a képződött diasztereomerek moláris abszorbanciája különbözhet,
- a reagens feleslege és a melléktermékek zavaró csúcsként jelentkezhetnek,
- az előkészítés időigényes lehet.

A királis származékképzést alkalmazhatjuk minden olyan esetben, amikor a vizsgálandó vegyületünk származékképzésre alkalmas funkciós csoportot tartalmaz. A csoport ismeretében úgy választjuk ki a reagenst, hogy a közöttük lejátszódó reakció 100%-os legyen, miközben sem a mintakomponens, sem a reagens királis centrumai ne szenvedjenek racemizációt.

A kolonna előtti származékképzés sok kutató által alkalmazott módszer, főleg a nyomanalízisben és a nagy felbontást igénylő módszerekben. Ennek oka, hogy a királis reagensek többsége kromofór csoporttal rendelkezik, ami megkönnyíti a detektálást. Bár az enantiomerek ilyen módon való elválasztása jobban korlátozott és nem olyan látványos, mint a közvetlen módszerek, mégis gyakran alkalmazzák. E célból számos származékképző reagenst állítottak elő és vizsgáltak. A származékképzés például a peptidkémiaiban széles körben alkalmazott módszer: aminosav analízis, szekvenálás, metabolizmus vizsgálat, peptid-szintézis ellenőrzés, tisztaságellenőrzés, *N*-terminális meghatározás.

2.1.1. Királis származékképzők alkalmazása az aminosav analitikában

Számos királis származékképző reagens a hagyományos akirális reagensek továbbfejlesztett változata. Az aminosavak mindkét funkciós csoportjukon képesek származékképzésre, de ezek közül az aminocsoporton keresztüli származékképzés az elterjedtebb.

Az aktív karbonsavak, a savkloridok, diazok, szukcinimidil-észterek, karbonsav-anhidridek alkotják az egyik nagy csoportját az aminosavak aminocsoporton keresztüli származékképzésének. A danzil-L-prolin [29], *N*-[4-(6-metoxi-2-benzoxazolil)]benzoil-L-fenilalanin [30], (-)- α -metoxi- α -metil-1-naftilecetsav [31] a karbonsav típusú származékképzők sorába tartozik.

Az izocianát és izotiocianát [32-50] típusú reagensek enyhe reakciókörülmények között kvantitatíven, zavaró mellékreakciók nélkül reagálnak, és a képződő karbamid és tiokarbamid származékok 250 nm körül jól detektálhatók. Fluoreszcens származékaik [32-41, 50-56] a detektálás alsó határának jelentős csökkentését teszik lehetővé.

A peptidek szerkezetkutatásában két fontos szerepet látnak el az izotiocianát típusú származékképző reagensok. Egyrészt az aminosavanalízis, másrészt a mikroszekvenálás területén. Ilyen kettős hasznosítású származékképző reagens a fenil-izotiocianát (PITC) [57-59].

Nimura és munkatársai dolgozták ki az izotiocianát típusú származékképző reagensok közül a szénhidrát alapú 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil-izotiocianátot (GITC) [60-62], amely segítségével fehérjealkotó aminosav enantiomerek elválasztását oldották meg. Az általuk kidolgozott módszer nem teszi szükségessé a reakcióban részt vevő szabad karboxilcsoport védelmét, a származékképzés gyorsan lejátszódik szobahőmérsékleten, és a reakcióelegy közvetlenül adagolható a kolonnára. Albert és munkatársai [62] természetben is előforduló, szintetikus peptid analógokban gyakran használt *N*-metil-aminosavak enantiomerjeit ugyancsak GITC származék formájában választották el. Tian és munkatársai [63] néhány α -metil-aminosav enantiomer elválasztását valósította meg GITC-származék formájában. Lindner és munkatársai [64,65] egy új ciklusos alifás szénhidrogéneken alapuló izotiocianát típusú reagenst fejlesztettek ki. Fülöp és munkatársai állították elő a klóramfenikol gyártás melléktermékéből (1*S*,2*S*), illetve (1*R*,2*R*)-1,3-diacetoxi-1-(4-nitrofenil)-2-propil-izotiocianátot ((*S,S*)-DANI és (*R,R*)-DANI)). Péter és munkatársai a reagenst alkalmazták nemfehérje alkotó aminosav enantiomerek és β -alkil-szubsztituált aminosav enantiomerek elválasztására [66-68].

A 2,4-dinitro-fenil csoport előnyös tulajdonságait először Sanger mutatta be [69]. Marfey [70] vezette be az 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-*L*-alaninamidot (FDAA, Marfey-reagens), melyet Ala, Asp, Glu, Met és Phe enantiomerek elválasztására használt. Az aktivált haloidot tartalmazó reagens a Sanger-reagens királis [70-83] változata. A származékképzési reakció 40°C-on történik és a reagens hidrolízisterméke zavaró csúcsként jelenik meg a kromatogramon. Ez a hátrányos tulajdonság nem lett akadálya annak, hogy a királis származékképző reagensok közül az egyik legelterjedtebben használt reagenssé válják, (több mint, 150 közlemény foglalkozik a reagens alkalmazásával). Brückner Marfey-reagenssel képzett diasztereomerek elválasztásának mechanizmusát és az elúciós sorrendet vizsgálta [71, 84]. Számos új változatát dolgozta ki a reagensnek [74-76, 79]. Scaloni és munkatársai a módszer automatizálását oldották meg [83]. Szókán és munkatársai [73, 85] aminosav származékok és peptidek racemizációjának, illetve epimerizációjának mértékét tanulmányozták, képezve a vegyületek FDAA-származékait.

Az *orto*-ftálaldehid (OPA)+tiol reagenst, mint nemkirális származékképzőt, igen elterjedten alkalmazzák. A reakció során izoindol származékok képződnek, amelyeknek a detektálása fluoreszcenciásan könnyen megoldható. Ez a reagens csak primer aminosavakkal és aminokkal reagál, illetve hátrányaként róható fel az is, hogy a keletkezett termékek stabilitása kicsi. A származékképzési reakció körülményeit és a származékok tulajdonságait Simmons és Johnson [86-88] vizsgálta. Számos kutató alkalmazta teljes nem királis aminosav analízisre [89,90]. A fejlesztések eredményeként a fehérjealkotó aminosavak 10-15 perc alatt fentemol kimutatási határ mellett analizálhatók [91]. Királis elválasztásokban az OPA-t királis tiolokkal együtt alkalmazzák. White és munkatársai [92] fermentlevekben levő savas és poláris aminosavak meghatározására OPA + ciszteinsavat alkalmazott. Euerby és munkatársai [93] α -aminosavak kromatográfiás viselkedésének tanulmányozásához OPA mellett *N*-acetyl-L-CysF-t [94-104], *N*-acetyl-D-penicilamint [97,98], *N*-terc-butoxikarbonil-L-Cys-t [105,98,99] használtak. Az OPA-t királis tiocukrokkal [96,102,103] (1-tio- β -D-glülóz) együtt is alkalmazták.

Carpino [106] dolgozta ki a 9-fluorenil-metil-kloroformátot (FLEC) amino védőcsoport kiépítésére. A származékképző előnye, hogy a reakció során keletkezett termék stabilis. A reagens királis változata a (+/-)-1-(9-fluorenil-etil)-kloroformát [107-112]. Nagy előnye a diasztereomer termék jó stabilitása, és az eljárás szekunder aminokra is alkalmazható. Einarsson és munkatársai [107] optikailag aktív aminok elválasztását valósították meg az (+)-1-(9-fluorenil)-etil-kloroformát alkalmazásával. Ők írták le a módszer automatizálását is. A kloroformátok közül a (-)-mentil-kloroformátot [113-119], mind fordított, mind normál fázisú kromatográfiában széles körben alkalmazták.

Az aminosavak karboxilcsoporton keresztül történő származékképzése elenyésző az aminocsoporton keresztüli származékképzés mellett. A származékképzés karboxilcsoporton keresztül történhet alkoholokkal, aminokkal. A leggyakrabban alkalmazott alkohol a (+)-okán-2-ol [121], a (-)-mentol, és a (-)-bután-2-ol [19,22].

Görög és munkatársai az L,D-O-(4-nitrobenzil)-tirozin-metilésztert, az amin-származékok sorába tartozó reagenst használtak *N*-védett aminosavak királis tisztaság-ellenőrzésére [120]. Az elmúlt években előállított származékképző reagensek a detektálás alsó határának csökkentése érdekében a fluoreszcens detektálást lehetővé tevő funkciós csoportokat tartalmaznak, úgymint a (S)-(+)-5-(1-aminoetil)-2-(4-fluorofenil)benzoxazol [122], az (R) és (S)-4-(3-aminopirrolidin-1-il)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol [123], és a naproxén-amin [124].

2.2. Királis állófázisok alkalmazása

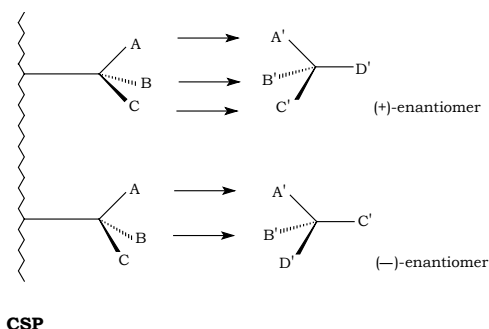
A királis kromatográfiában, főleg a gyógyszeriparban és a preparatív kromatográfia területén az elmúlt 10 év során a hangsúly a közvetlen módszerekre tevődött át. A módszernek számos előnye van:

- egyszerű mintaelőkészítés,
- a hőmérséklet változtatásával kedvezően lehet befolyásolni az elválasztást,
- az enantiomerek azonos moláris abszorbanciával rendelkeznek,
- funkciós csoporttal nem rendelkező racémátok is elválaszthatóak,
- a királis szelektor enantiomer tisztasága nem kritikus tényező az elválasztásban,
- a racemizáció fellépése az analízis során nem valószínű.

A módszer az előnyök mellett hátrányokkal is rendelkezik, amelyek mérlegelése után lehet dönteni az alkalmazásáról, vagy a közvetett módszerek használatáról:

- a deszorpciós kinetika lassú, ami kicsi elméleti tányérszám értéket eredményez,
- nincs általánosan használható kolonna,
- a királis kolonnák a használat és a tárolás körülményeire igen érzékenyek,
- a kolonna drága,
- az állófázis és a minta között a kölcsönhatások jellege nem tisztázott, az elválasztás tervezése ezáltal nehéz feladat.

Az elválasztandó vegyület és az állófázis közötti kapcsolat akkor a legstabilisabb, amikor az elválasztandó molekula három ponton tud kötődni az állófázishoz. (1. ábra). Ez az ún. hárompontos illeszkedés modellje [125], mely számos állófázis tervezésének alapja.



1. ábra
A hárompontos illeszkedés modellje

Királis állófázisokat szelektoruk alapján hét nagy csoportba lehet sorolni:

- ligandumcserés állófázisok,
- Pirkle-típusú fázisok,
- királis polimer fázisok,
- fehérje alapú állófázisok,
- ciklodextrin alapú fázisok,
- koronaéter alapú fázisok,
- makrociklusos antibiotikum alapú fázisok.

2.2.3. A ligandumcserés állófázisok

Az állófázis kifejlesztése Rogozin és Davankov [126] nevéhez fűződik. A módszernek kétféle változata lehetséges. Az egyik az állófázishoz kötött királis kelátképző ligandumok alkalmazását, a másik a mozgófázisba adagolt királis kelátképző használatát foglalja magában. Az első állófázisok királis kelátképző ligandumként aminosavat tartalmazó klórmetilézett sztírol-divinilbenzol kopolimerből készültek. Ezek azonban kis nyomásterhelhetőségük miatt HPLC-s körülmények között nem voltak használhatóak. Aminosav enantiomerek elválasztását a ligandum gyantára vitele után Cu(II)-, Zn(II)-, vagy Ni(II)-ionokat tartalmazó mozgófázissal sikerült megoldani. A vizsgált komponens a rendszerben jelenlevő fémionnal alkotott diasztereomer vegyes komplex része. A retenció, az enantioszelektivitás és az elúciós sorrend a létrejövő komplex stabilitásától és a fémiontól függ.

2.2.2. Töltésátmenetes királis állófázisok (Pirkle-típusú fázisok)

Az első ilyen típusú, kereskedelembe is kapható fázisokat Pirkle és Finn [127] fejlesztették ki. Ez γ -aminopropil szilikagélhez kovalensen, vagy ionosan kötött (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoil)-fenilglicint, vagy -leucint tartalmazott. Az elválasztás különböző kölcsönhatások kombinációjaként jöhet létre, úgymint: töltésátmenet, hidrogénhid-kötés, dipól-dipól kölcsönhatás. Az *N*-(3,5-dinitrobenzoil)-leucint tartalmazó állófázisok esetén a hárompontos kapcsolatot a hidrogénhid-kötés, a π - π donor-akceptor és a dipól-dipól kölcsönhatás hozza létre. Az állófázis dinitrobenzoil-csoportja π -akceptor, így az elválasztani kívánt sztereoizomerben π -donor csoportnak kell lennie. Ha az enantiomerek

kötődése kellően különböző energiájú, az elválasztás lehetséges. Ezt az állófázist sikeresen alkalmazták többek között aminosav származékok elválasztására [128,129]. Lévéen, hogy ezek a fázisok szintetikusak, bármelyik abszolút konfigurációban hozzáférhetőek.

2.2.3. Királis polimer fázisok

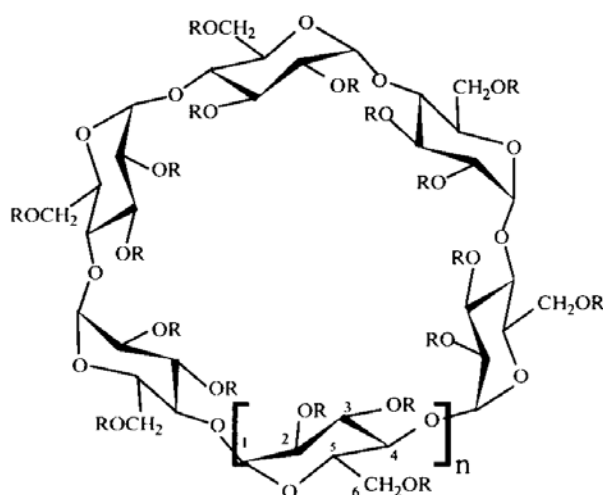
A spirális strukturájú polimerek képesek enantiomerek elválasztására, sztérikus kölcsönhatások alapján. A spirális polimer fázisok készülhetnek természetes cellulóz származékokból, vagy szintetikusan előállított polimerekből, mint a poli(*N*-akroil-*S*-fenilalanin)-etilészter alapú fázisok [130]. Blaschke [131] és munkatársai optikailag aktív poliamidokat és mikrokristályos cellulóz-triacetátot alkalmaztak állófázisként.

2.2.4. Fehérje alapú állófázisok

Számos szérum fehérje képes enantioszelektív kölcsönhatásba lépni biológiailag aktív anyagokkal. A klasszikus oszlopkromatográfiában agarózhoz kötött szarvasmarha szérum albumint (BSA) használtak [132]. Ma inkább Allenmark és munkatársai [133] munkássága nyomán az α -savanyú glikoprotein (AGP) fázis terjedt el. Mindkettő nagy enantioszelektivitással alkalmazható királis gyógyszerek elválasztására. Az elválasztás erősen függ olyan paramétereiktől, mint a pH, ionerősség és a hőmérséklet. A fenti szerzők nevéhez fűződik néhány DL-aminosav származék [134] és az *N*-akroil-DL-aminosavak [135] elválasztása szarvasmarha szérum albuminréteget tartalmazó szilikagél oszlopon. Yang és Hage [135] immobilizált emberi szérum albumin (HSA) oszlopon DL-Trp-t választottak el nagyhatékonyságú affinitás kromatográfiát alkalmazva.

2.2.5. Ciklodextrin alapú fázisok

A ciklodextrinek (CD-k) ciklikus oligoszacharidok, melyek székkonformációjú D-(+)-glükopiranozil egységekből épülnek fel és üreges, mindkét végén nyitott csonka kúp szerkezettel rendelkeznek. A glükózok primer és szekunder hidroxilcsoportjai kifelé mutatnak, az üreg viszonylag hidrofób. A CD-k vízben oldható és oldhatatlan vegyületekkel is képesek komplexképzésre [136-138]. A ciklodextrinek szerkezete a 2. ábrán látható.



α -CD: $n=6$

β -CD: $n=7$

γ -CD: $n=8$

2. ábra

A ciklodextrin molekula szerkezete

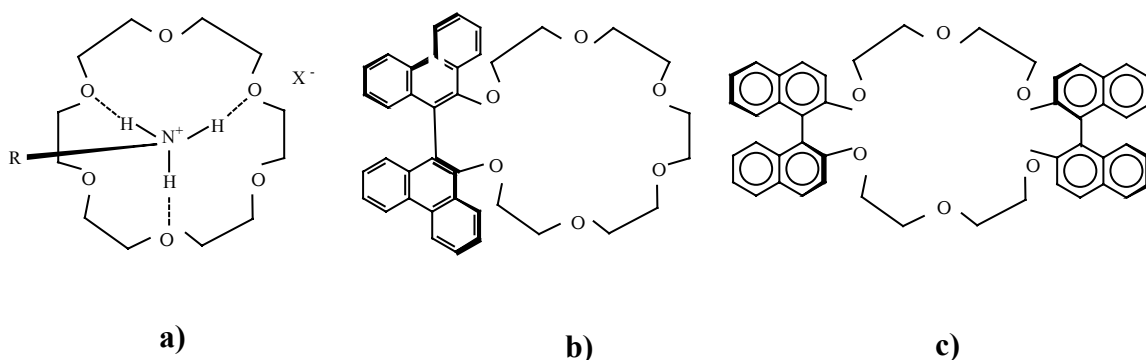
A glükóz egységek számától függően beszélünk α -, β -, γ - ciklodextrinekről. A kialakult üregek nagysága típusonként változó, így más-más molekulaméretű komponensek elválasztására alkalmasak. Ez a tény, valamint az, hogy ezek a vegyületek kivétel nélkül királisak, lehetővé teszik a királis vegyületekkel zárványkomplexek kialakulását. A kötődést meghatározó legfontosabb paraméterek között meg kell említeni a kötődő molekula relatív méretét és geometriáját a CD-hez képest. A hárompontos illeszkedés a CD-ben úgy valósul meg, hogy a molekula hidrofób része az üreg belsejéhez, hidrofíl részei a üreg szájánál lévő hidroxilcsoportokhoz kötődnek. A keletkezett komplex stabilitása az elválasztás fontos paramétere. Azt, hogy egy-, két- vagy hárompontos illeszkedés jön-e létre, valószínűleg szterikus feltételek határozzák meg, s ebből ered az enantioszelektivitás. Régebbi munkákban olvashatunk aminosavak [139, 140] oszlopkromatográfiás elválasztásáról α -, β - és γ -ciklodextrin polimer géleket alkalmazva. Ezek a polimer gélek azonban nem feleltek meg a HPLC-s követelményeknek. Próbálkoztak olyan fázisok előállításával, ahol a különböző ciklodextrineket etilén-diamino-kötéseken keresztül szilikagélhez kapcsolták [141-143]. Azonban ezek a töltetek számos előnytelen tulajdonsággal rendelkeztek: vízzel szemben nem voltak stabilisak, a ciklodextrin mennyisége kevés volt, a jelenlévő aminocsoportok befolyásolták a szelektivitást, a gyakran lassú szintézis során nitroxid-forma képződött.

Armstrong [144] kísérletezte ki azokat a fázisokat, amelyek nem nitrogén alapú kötéseket tartalmaztak. Ezek megfelelnek a folyadékkromatográfiás követelményeknek,

viszonylag stabilisak, a ciklodextrin módosított formái a vegyületek széles skálájára alkalmazhatók. Armstrong és munkatársai [145-149] számoltak be aminosavak, danzil-aminosavak, β -naftil-, valamint *N-terc*-butiloxikarbonil-aminosav származékok elválasztásáról ciklodextrin-kötött fázison.

2.2.6. Koronaéter alapú fázisok

A koronaéterek etilénhidas, oxigén atomokat tartalmazó gyűrűs vegyületek (3. ábra), komplexképző és katalitikus hatásuk közismert [150]. Az érdeklődés akkor nőtt meg irántuk igazán, amikor felfedezték Hg(II)- és Pb(II)-ionokkal való kölcsönhatásukat. Ígéretesnek tűntek ugyanis e mérgező nehézfémek élő szervezetekből történő eltávolítására a fiziológiásan fontos ionok érzékeny egyensúlyának megbontása nélkül.



3. ábra

a) Komplex a koronaéter és egy protonált primer aminocsoport között; **b)** és **c)** Királis koronéterek szerkezete

Sogah és Cram [151] makroretikuláris keresztkötésű polisztirol-*p*-divinilbenzol gyantához kovalensen kötöttek királis koronaétert (3. ábra) és így állítottak elő királis oszlopot. A molekulák kiralitása a naftil gyűrűk lépcsős helyzetéből adódik. Az elválasztási mechanizmus diasztereomer zárványkomplex képződésének tulajdonítható, mivel a koronaéter az egyik antipódot szorosabban köti a másikkal. Az ion-koronaéter komplex stabilitását elsősorban az határozza meg, hogy az ion mennyire illeszkedik a koronaéter gyűrűjébe. A primer aminocsoportból savas körülmények között képződő ammóniumionokkal különösen a [18]-korona-6 származékok képeznek stabilis komplexet a megfelelő méretek következtében. A poliéterek és a kapcsolódó ammóniumionok

közötti kölcsönhatási módokról több elmélet is született. A gyűrűs éter mind a 6 oxigén atomja dipólusként szolgál ionos és hidrogénhid-kötésekhez. Ezenkívül másodlagos kötőerők is kialakulhatnak a gyűrű és az R csoport között, nevezetesen sztérikus, hidrofób és/vagy töltésátviteli kölcsönhatások [17].

2.2.7. Makrociklusos antibiotikum alapú állófázisok

A makrociklusos glikopeptidek királis szelektorként való alkalmazásának koncepcióját 1994-ben Armstrong [152] és munkatársai dolgozták ki, amelyről a "Pittsburg" konferencián számoltak be. A makrociklusos elnevezés sok, eltérő szerkezettel rendelkező vegyületcsaládot foglal magában, pl: makrociklusos polién diolok, ansa-komponensek, makrociklusos glikopeptidek. A vankomicin, rifamicin B és a tiosztrepton molekulákat kovalensen kötötték szilikagél hordozóra. A vankomicint ugyanebben az időszakban vékonyréteg-kromatográfiás [153] és kapilláris elektroforézis (CE) mozgófázisbeli adalékként [154,155] is sikeresen alkalmazták. A három glikopeptid közül a vankomicin bizonyult a leghatásosabbnak. A további fejlesztésekben 1995-től a teicoplanin [156-158], a risztocetin A [159-161] valamint az α - és β -avoparcin [162] makrociklusos glikopeptideket királis szelektorként, mind a HPLC, mind a CE technikában alkalmazták. A fejlesztésekbe olasz kutatók, Gasparrini és munkatársai is bekapcsolódtak [163, 164].

Az első HPLC-s kolonnaként forgalomba kerülő állófázis a vankomicin volt. A vankomicin 18 királis centrumot tartalmaz, ezeket három makrociklusos gyűrű veszi körül. Az üreget öt aromás gyűrűs szerkezet hidalja át. A gyűrűs szerkezetek bezárására hidrogéndonor és -akceptor helyek állnak rendelkezésre.

A Chirobiotic T oszlop [158] királis szelektora, a teicoplanin volt a második az új antibiotikum alapú oszlopok (4.A. ábra) sorában. A teicoplanin molekula több, figyelemre méltó szerkezeti elemmel rendelkezik. Négy makrociklusos gyűrű összekapcsolásával egy többé-kevésbé merev kosárszerű képződmény jön létre. A makrociklusos gyűrűk hét aromás gyűrűt tartalmaznak, amelyek közül kettőn klór szubsztituens található, négy pedig fenolos jelleggel bír. Az aromás gyűrűk hat amid-, illetve három éterkötésen keresztül kapcsolódnak össze. A kosár két jelentős funkciós csoportja egy primer aminocsoport és egy karboxilcsoport. Ezek felelősek a molekula ikerionos szerkezetének kialakulásáért (pH=3,5-8,0 között). Ezenkívül három cukoregység, két D-glükózamin és egy D-mannóz is kapcsolódik valamint egy szubsztituált nonil lánc. Az eddig azonosított öt teicoplanin glikopeptid csak e lánc hosszában különbözik. A leggyakoribb teicoplanin, a

teicoplanin-A₂-2 néven ismert, melynek molekulatömege 1877. A Chirobiotic T oszlop jól használható nem derivatizált α -, β -, γ - vagy ciklusos aminosavak, *N*-védett (Fmoc-, Z-, Boc-) aminosav sztereoizomerek elválasztására, illetve ajánlják még hidroxikarbonsavak, kisméretű peptidek, aromás és alifás aminok elválasztására is.

A risztocetin A molekula a Chirobiotic R oszlop szelektora (4.C. Ábra). 38 kiralitáscentrummal és hét aromás gyűrűvel rendelkezik, melyek négy kosarat, vagy üreget alkotnak [158]. Ezeken kívül amino-oldallánc, 21 hidroxilcsoport, két primer amino-csoport, egy metilészter-csoport alkotja a molekulát, amihez egy tetraszacharid és két monoszacharid rész kapcsolódik. A cukrokat D-arabinóz, D-mannóz, D-ramnóz és D-glükóz képviseli. A protonált aminocsoportoknak elsőrendű szerepe van a királis szelektor és az elválasztandó sztereoizomer közti asszociációban. A molekula pI értéke 7,5. A fenolos hidroxilcsoportok pH 3-7 tartományban protonált állapotban vannak és valószínűleg hidrogénhid-kötésekben vesznek részt. Fontos eltérés a két makrociklusos glikopeptid között, hogy a risztocetin A nem rendelkezik hidrofób oldallánccal.

A fejlesztések új irányát a Chirobiotic Tag oszlop (4. B. ábra) képviseli. A királis szelektor lényege, hogy az előállítás során a három szénhidrát részt eltávolították a teicoplaninról és az így keletkezett aglikon formát a már említett módszerekkel kötötték szilikagélhez. Ez a szelektivitás igen jelentős változásához vezetett. A módosítás érintetlenül hagyta a megmaradó nyolc királis szénatomot és az ezeket körülvevő négy makrociklusos gyűrűt. A királis hidrogéndonor és -akceptor helyeket tartalmazó peptidlánc közel van a szomszédos aromás gyűrűkhöz, így alakulnak ki a makrociklusos gyűrűk, amelyek kötőhelyként szolgálnak. Az állófázis nagy szelektivitást mutatott aminosavak, peptidek, *N*-védett aminosavak, semleges molekulák (szulfidok és diazepinek) elválasztása során [165].

Az ansa-komponensek családjába tartozó rifamycin B és rifamycin SV alapú állófázisok semleges, vagy pozitív töltéssel rendelkező komponensek elválasztásában bizonyultak hatásosnak [166], míg a glikopeptid alapú vancomycin, risztocetin A, és teicoplanin alapú állófázisok semleges, vagy negatív töltéssel rendelkező komponensek elválasztásakor voltak sikeresen alkalmazhatók [155, 156]. E szelektorokkal készült oszlopok előnye, hogy mind fordított fázisú, mind normál fázisú, mind polár-organikus módban is alkalmazhatók [167-169]. Az állófázisok kitűnő szelektivitással rendelkeznek, ami fokozható azzal, hogy komplementer módon alkalmazhatóak egyes vegyületek elválasztásakor. Az állófázisok e két tulajdonsága variációs lehetőséget biztosít a legalkalmasabb módszer kiválasztásához.

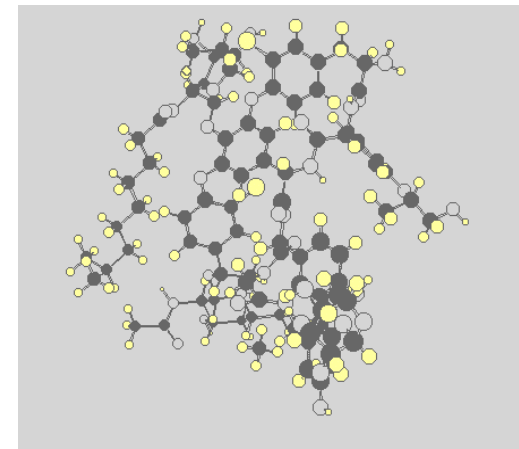
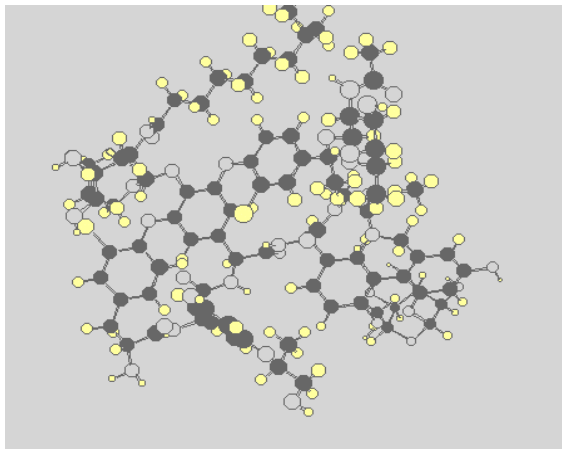
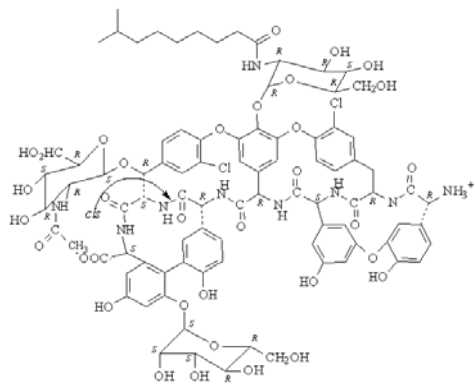
Mivel az állófázisok peptidet, szénhidrátot és más ionizálható csoportokat is tartalmaznak, nem meglepő, hogy az enantioszelektivitás a különböző módokban eltérő, ami az egyes módokban fellépő más-más jellegű kölcsönhatásokra vezethető vissza. Az egyes módokban a lehetséges kölcsönhatásokat és azok relatív erősségét az alábbiakban foglaljuk össze:

kölcsönhatás jellege	fordított fázis	normál fázis	polár- organikus fázis
ionos kölcsönhatás	nagyon erős	gyenge	gyenge
dipól kölcsönhatás	közepesen erős	közepesen erős	közepesen erős
π - π kölcsönhatás	gyenge	erős	erős
hidrogénhid kölcsönhatás	erős	erős	erős
hidrofób kölcsönhatás	erős	gyenge	gyenge
zárványkomplex képzés	gyenge	gyenge	gyenge
sztérikus kölcsönhatás	közepesen erős	közepesen erős	közepesen erős

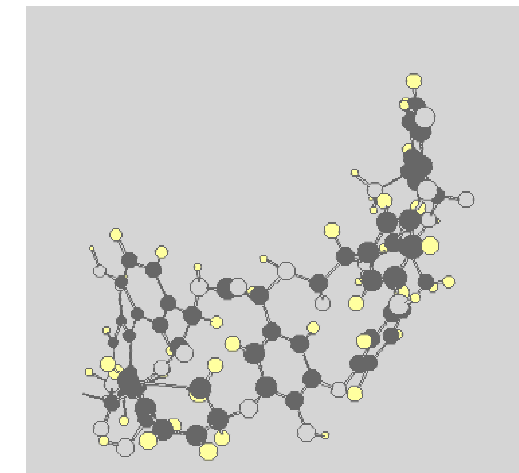
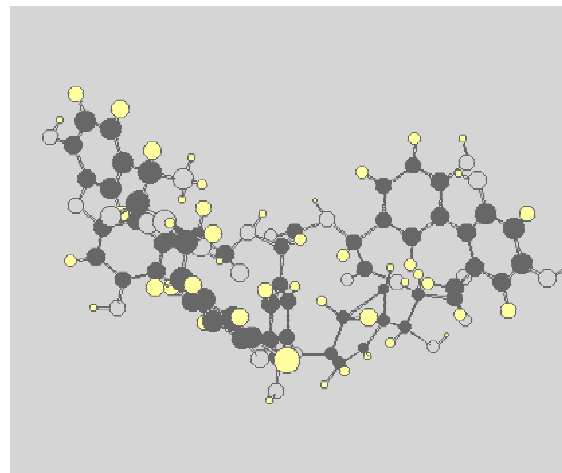
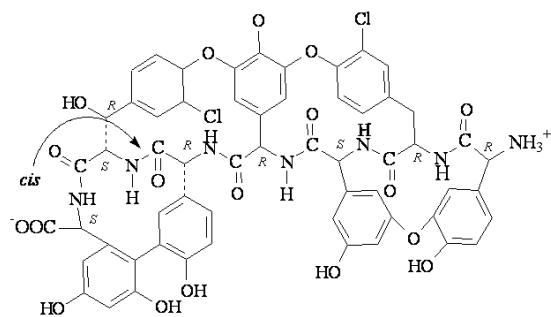
Normál fázisú módban a szelektor molekula és a minta között létrejövő legfontosabb kölcsönhatások hidrogénhid, dipól-dipól-, π - π - és sztérikus kölcsönhatás.

Fordított fázisú kromatográfiát alkalmazva az elválasztás során az ionos, hidrofób és hidrogénhid kölcsönhatások a döntőek, míg a π - π -kölcsönhatás inkább vízmentes környezetben jellemző.

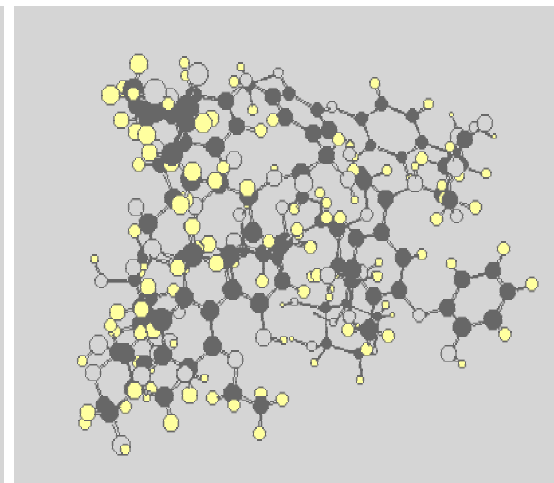
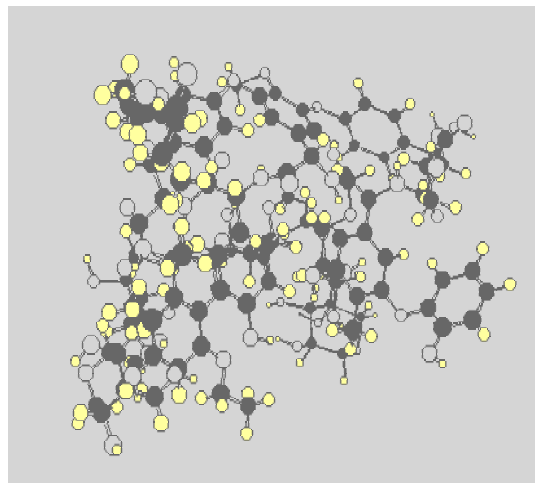
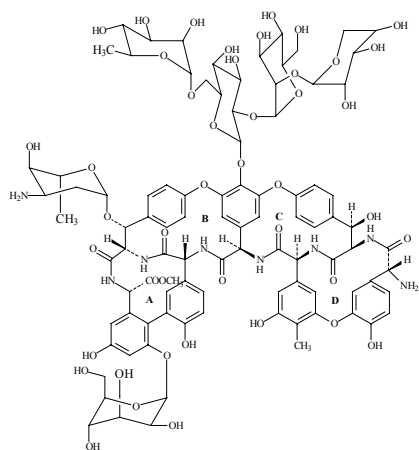
A legújabb mozgófázis típus, amit körülbelül 10 éve fejlesztettek ki, hasonlít a normál-fázisú kromatográfiára. Polár-organikus módban az eluens fő összetevői az acetonitril (MeCN) és/vagy metanol (MeOH), az ionerősséget pedig jégcet és trietilamin adagolásával állítjuk be. A két utóbbi módosító mennyisége a visszatartást, míg arányuk a szelektivitást befolyásolja. A főbb kölcsönhatások polár-organikus módban a hidrogénhid-kötés, a π - π és a sztérikus kölcsönhatás (néhány esetben előfordulhat elektrosztatikus kölcsönhatás is).



4.A. ábra A teicoplanin molekula sík és térbeli szerkezete



4.B. ábra A teicoplanin aglikon molekula sík és térbeli szerkezete



4.C. ábra A risztocetin A molekula sík és térbeli szerkezete

2.3. A hőmérséklet hatása a királis kromatográfiára

A pH, az áramlási sebesség és a hőmérséklet jelentős befolyással lehet a kromatográfiás rendszerben kialakuló visszatartásra és szelektivitásra. A nagyhatékonyságú elválasztási technikákban (a szokásos akirális HPLC-ben) általában kisebb jelentősége van a hőmérséklet változásának. A kevésbé hatásos királis elválasztásoknál nagy szerepe van a hőmérséklet csökkentésének, főleg a fordított fázisú kromatográfiában [169-181]. Néhány királis állófázisnál vizsgálták a hőmérséklet hatását az elválasztásra, pl: koronaéterek, ciklodextrinek, α -savanyú glikoproteinek vagy makrociklusos glikopeptidek [182-185]. Guiochon és munkatársai [186-188] széles koncentráció tartományban adszorpciós izotermák felvételével nem-enantioszelektív és enantioszelektív adszorpciós helyeket különböztettek meg, és az adszorpciót egy bővített Langmuir-egyenlettel írták le. Az első típusú helyek a nem-enantioszelektív retencióért voltak felelősek, pl: van der Waals, poláris kölcsönhatások stb, míg a második típusú helyeken kialakuló kölcsönhatások az enantioszelektív elválasztásért voltak felelősek.

Az eddigi tapasztalatok alapján legalább két igen fontos hatása van a kromatográfiás egyensúlyra a hőmérsékletnek. 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 eluens összetétel, vagy a hőmérséklet változtatásával. Chen és Horváth [174], valamint Zhou és munkatársai [175] szerint a hőmérséklet hatása a szelektivitási tényezőre nem teljesen tisztázott, mivel nem ismerjük, hogyan változik a komponens entalpiája a mozgófázisból az állóba történő átmenet során. Ezt a hatást *termodinamikai hatásnak* nevezzük.

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, és 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. Ezt *kinetikai hatásnak* nevezik az irodalomban.

A hőmérséklet befolyásolja még a műveleti nyomást is. Ha növeljük a hőmérsékletet az eluens viszkozitása csökken, ezért csökken a nyomás anélkül, hogy az áramlási sebesség változna.

A hőmérséklet retencióra gyakorolt hatását vizsgálva értékes információkat nyerhetünk a retenciós mechanizmusról. Általánosan az egyensúlyi állandó hőmérsékletfüggését a van't Hoff egyenlet írja le:

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

A szabadentalpia-változás és az egyensúlyi állandó - amely a kromatográfiás visszatartás esetén a megoszlási hányados - között a következő összefüggés áll fenn:

$$-\Delta G^\circ = RT \ln K$$

A standard szabadentalpia-változás a következő összefüggéssel írható le:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Ezt az előző egyenletbe helyettesítve a következő összefüggéshez jutunk:

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

Az egyensúlyi állandó és a retenciós faktor (k) között a fázisarány (Φ) teremti meg a kapcsolatot.

$$K = \frac{k}{\Phi}$$

A fázisarány az álló és a mozgófázis térfogathányadosa:

$$\Phi = \frac{V_s}{V_m}$$

Ha ezt az előző egyenletbe helyettesítjük, a kromatográfiában használt van't Hoff egyenletet is megkapjuk:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \Phi$$

Lineáris kromatográfiás körülmények között az $\ln k$ vs. $1/T$ függvény egyenest ad, melynek meredeksége $\Delta H^\circ/R$, tengelymetszete $\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$. A fázisarány (Φ) illetve az állófázis térfogatának (V_s) számítására a kolonnát jellemző fizikai-kémiai adatok birtokában Sentell [189], illetve ennek hiányában a geometriai méretek ismeretében Jandera [190] módszere alkalmazható.

Sentell-féle összefüggés:

$$V_s = \frac{(\%C)(M)(W_p)}{(100)(12,011)(n_c)(\rho)}$$

%C: elemanalízissal meghatározott szénmennyiség (g),

M: a kötött ligandum (megosztó folyadék) moláris tömege (g),

W_p: a kromatográfiás oszlop töltetének tömege (g),

n_C: C atomok száma a ligandumban,

ρ: kötött ligandum sűrűsége (g/mol).

A két enantiomerre jellemző entalpia- és entrópiaváltozás különbségeket a $\Delta(\Delta H^\circ)$ és $\Delta(\Delta S^\circ)$ -el jelöljük. Ezek a termodinamikai paraméterek úgy számíthatók, hogy a másodikként eluálódó csúcs fázisátmenetét kísérő standard entalpiaváltozás (standard entrópiaváltozás) értékéből kivonjuk az elsőként eluálódó csúcs megfelelő termodinamikai paraméterét: $\Delta H_2^\circ - \Delta H_1^\circ$ és $\Delta S_2^\circ - \Delta S_1^\circ$. A $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$ értékei a szelektivitási tényező segítségével is megadhatók a következő összefüggésekkel:

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

$$-\Delta(\Delta G^\circ) = -\Delta(\Delta H^\circ) + T\Delta(\Delta S^\circ)$$

$$\ln \alpha = -\Delta(\Delta H^\circ) / RT + \Delta(\Delta S^\circ) / R$$

Ha a vizsgált hőmérséklet tartomány nem túl nagy [188], a $\Delta(\Delta H^\circ)$ hőmérsékletfüggése elhanyagolható, akkor az $\ln \alpha$ vs. $1/T$ függvény meredeksége adja a $\Delta(\Delta H^\circ)$ és a tengelymetszet $\Delta(\Delta S^\circ)/R$ értékeket.

Ha a vizsgált komponensünk molekuláit intermolekuláris erők tartják az állófázisban, itt kisebb az entrópiájuk, mint a mozgófázisban, ahol ezek az erők jóval gyengébbek, tehát a molekulák mozgásszabadsága jóval nagyobb. Ebből következik, hogyha a mintamolekula a mozgóból az állófázisba kerül, csökken az entrópia, tehát az entrópiaváltozás negatív. Ha az entalpiaváltozás (ΔH°) nagy, ez azt jelenti, hogy a megoszlás túlnyomórészt intermolekuláris erők által irányított. Erős a kölcsönhatás a molekulák és az állófázis között, tehát a retenciós idő nagy. Mivel ebben az esetben a szabadentalpiában az entalpiát a meghatározó, így ezt a megoszlást entalpia-vezéreltnek nevezzük. Ha az entrópiaváltozás (ΔS°) nagy, hogy a mintamolekula mozgási szabadsága az állófázisban lényegesen korlátozottabb, mint a mozgófázisban. Tehát a minta kevésbé jut át az állófázisba, csökken a retenciós idő. Ez a megoszlás entrópia-vezérelt. Fizikai-kémiai szempontból a standard entalpiaváltozás különbség ($\Delta(\Delta H^\circ)$) felvilágosítást ad arról, hogy melyik a kedvezményezett folyamat, melyben a relatíve jobban kötődő enantiomer a

mozgófázisból átlépve az állófázishoz kötődik. A standard entrópiaváltozás különbség ($\Delta(\Delta S^\circ)$) a két enantiomer rendezettségének mértékében bekövetkező változást jellemzi az átmenet során. Negatívabb $\Delta(\Delta H^\circ)$ hatékonyabb exoterm átmenetre utal a jobban kötődő enantiomer esetén és/vagy az állófázissal való erősebb kölcsönhatásra. Negatív $\Delta(\Delta S^\circ)$ jellemzi a két enantiomer esetén fellépő különböző mértékű rendezettség növekedést/vagy a szabadsági fokok csökkenését az adszorpció vagy asszociáció során.

2.4. A vizsgált aminosavak jelentősége

Gutte összefoglaló [191] jellegű munkájában foglalkozott a peptidkutatás jelentős állomásaival, amelyek közül csak kettőt említenék meg. 1902-ben Fischer [191] és Hofmeizer ajánlotta, hogy α -aminosavakból a karboxil- és aminocsoportjukon keresztüli összekapcsolással fehérjéket állítsanak elő. Sanger határozta meg elsőként a szarvasmarha inzulin szekvenciáját, amelyért Nobel-díjat kapott [191]. A fejlődés azóta is töretlen, ma már olyan peptideket állítanak elő, amelyek képesek utánozni a kiindulási fehérjék hatásmechanizmusát.

Az elmúlt húsz évben a bioaktív peptidek széles körét vizsgálták. Ezek a peptidek funkciójuk szerint sokfélék lehetnek: hormonok, enzimek, enziminhibitorok, növekedést serkentők vagy gátlók, neurotranszmitterek. A peptidek flexibilis szerkezetük miatt sokféle konformációt vehetnek fel, amelyek közül a biológiailag aktív konformáció felismerése az akceptor molekula részéről előfeltétele a kölcsönhatás kialakításának. A biológiailag aktív konformációt peptidmimetikumok előállításával modellezhetjük úgy, hogy konformációsán gátolt aminosavakat építünk a peptidekbe. A kutatásaink középpontjában ilyen peptidmimetikumok előállításához használt aminosavak állnak, mint például: α -szubsztituált, β -metil (alkil)-szubsztituált aminosavak, Pro származékok, β -aminosavak, tetrahydroizokinolin-vázis analógok.

A két kiralitás centrumot tartalmazó β -metil (alkil)-szubsztituált aminosavak [192] jelentős szerepet játszottak a 90-es évek opioid peptidkémiaiájában. Az opioid receptor antagonistákat az alkohol és drogfüggő betegek gyógyításában használják. Az enkefalint a 70-es, a deltorfint a 80-as, az endomorfint a 90-es években fedezték fel. E peptidek konformációsán gátolt β -metil (alkil)-szubsztituált aminosavakkal létrehozott módosulata az eredetinél aktívabb és szelektívebb analógokhoz vezetett. A β -metil-aminosavak szintézise legegyszerűbben racém formában oldható meg, de a keletkezett *eritro*- és *treo*-diasztereomerek általában egymással szennyezettek. A tiszta *eritro* módosulat kristályosítással előállítható, de a *treo* módosulat kristályosítása hosszadalmas, és a termék általában *eritro* komponenssel szennyezett marad.

A Pro speciális helyet foglal el az aminosavak között, mert a peptidekben *cisz*-, *transz*-izomériát idézhet elő. A D-Pro-L-Pro egységek ismétlődésével β -kanyar szerkezetű peptid jön létre. α -helyzetben szubsztituált Pro-t más aminosavakkal kapcsolva, konformációsán erősen gátolt peptid állítható elő.

A β -aminosavak iránti érdeklődés az elmúlt 10 év folyamán nőtt meg. Ezek a vegyületek gyógyászatilag fontos komponensek és természetes anyagok köztermékei, mint például alkaloidok, β -laktám antibiotikumok. β -aminosavakból kialakulhatnak helikális, β -kanyar, γ -kanyar, parallel, és antiparallel rétegzett peptidek. β -aminosavak jól használhatók gyógyszeripari alapanyagként illetve katalizátorként. β -aminosav beépítésével nemcsak a másodlagos és harmadlagos szerkezete változhat meg a peptideknek, hanem receptor szelektivitása, agonista-antagonista sajátsága is.

A gyűrűs molekularészletek segítségével további konformációsán gátolt aminosavakat és azokból rögzített konformációval rendelkező peptideket lehet előállítani. Ilyenek például az aromás gyűrű beépítésével nyert glicin- és alaninanalógok, tetrahydroizokinolin származékok, vagy gyűrűs iminosavak. A tetrahydroizokinolin származékokat felhasználták opioid receptor antagonistaként [193, 194], illetve növekedést serkentő hormon előállításához [195].

Látható ebből a rövid irodalmi áttekintésből is, hogy az általunk vizsgált vegyületesaládok alapvető fontosságúak a humán gyógyítás és a betegségek megelőzésére irányuló kutatások területén. Biológiai hatásvizsgálatukat megelőzően a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia az egyik lehetséges módja az analízisüknek, amellyel mi is foglalkozunk munkák során.

3. Kísérleti rész

A vizsgált vegyületek szerkezeti képlete, számozása és rövidítése vegyületcsoportokként külön gyűjtve a Függelék 1. Táblázatában található (F/1. Táblázat). A vizsgált vegyületek számozása, elnevezése, és rövidítése az 1. Táblázatában található.

3.1. Vizsgált vegyületek számozása, elnevezése és rövidítése

1. Táblázat

Vizsgált vegyületek számozása, elnevezése és rövidítése

Szám	Elnevezés	Rövidítés
1	alanin	Ala
2	arginin	Arg
3	aszparagin	Asn
4	aszparaginsav	Asp
5	cisztein	Cys
6	glutamin	Glu
7	glutaminsav	Gln
8	hisztidin	Hys
9	izoleucin	Ile
10	leucin	Leu
11	lizin	Lys
12	metionin	Met
13	fenilalanin	Phe
14	prolin	Pro
15	szerin	Ser
16	treonin	Thr
17	triptofán	Trp
18	tirozin	Tyr
19	valin	Val
20	fenilglicin	PheGly
21	(4-hidroxifenil)glicin	(4-OHPh)Gly
22	(indán-2-il)glicin	Igl
23	2-tienilglicin	Thg
24	(2-metallil)glicin	Mag
25	1-naftilalanin	1-Nal
26	2-naftilalanin	2-Nal
27	fenilalanin	Phe
28	(2-fluorfenil)alanin	2-FPhe
29	(4-fluorfenil)alanin	4-FPhe
30	(2,3,4,5,6-pentafluorfenil)alanin	F5F
31	(2-metilfenil)alanin	2-MePhe
32	(4-metilfenil)alanin	4-MePhe
33	(2,4-dimetilfenil)alanin	2,4-diMePhe

34	(2,6-dimetilfenil)alanin	2,6-diMePhe
35	(2,4,6-trimetilfenil)alanin	2,4,6-triMePhe
36	(4-metoxifenil)alanin	4-MeOPhe
37	<i>eritro</i> - β -metilfenilalanin	<i>eritro</i> - β -MePhe
38	<i>treo</i> - β -metilfenilalanin	<i>treo</i> - β -MePhe
39	<i>eritro</i> - β -metiltirozin	<i>eritro</i> - β -MeTyr
40	<i>treo</i> - β -metiltirozin	<i>treo</i> - β -MeTyr
41	<i>eritro</i> -4-metil-1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-3-karbonsav	<i>eritro</i> - β -MeTic3
42	<i>treo</i> -4-metil-1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-3-karbonsav	<i>treo</i> - β -MeTic3
43	<i>eritro</i> - β -metiltriptofán	<i>eritro</i> - β -MeTrp
44	<i>treo</i> - β -metiltriptofán	<i>treo</i> - β -MeTrp
45	<i>eritro</i> - β -(propán-2-il)triptofán	<i>eritro</i> - β -2-PrTrp
46	<i>treo</i> - β -(propán-2-il)triptofán	<i>treo</i> - β -2-PrTrp
47	<i>eritro</i> - β -(pentán-3-il)triptofán	<i>eritro</i> - β -3-PentTrp
48	<i>treo</i> - β -(pentán-3-il)triptofán	<i>treo</i> - β -3-PentTrp
49	<i>eritro</i> - β -feniltriptofán	<i>eritro</i> - β -PhTrp
50	<i>treo</i> - β -feniltriptofán	<i>treo</i> - β -PhTrp
51	<i>eritro</i> - β -2,4-dimetoxi-feniltriptofán	<i>eritro</i> - β -2,4-diMeOPhTrp
52	<i>treo</i> - β -2,4-dimetoxi-feniltriptofán	<i>treo</i> - β -2,4-diMeOPhTrp
53	<i>N</i> -benziloxikarbonil-triptofán	Z-Trp
54	<i>N</i> -(3,5-dinitro-2-piridil)-triptofán	DNPyr-Trp
55	3-aminobutánsav	
56	3-aminopentánsav	
57	3-aminopenténsav	
58	3-aminopentinsav	
59	3-amino-4-metilpentánsav	
60	3-amino-4,4dimetilpentánsav	
61	3-amino-4-metilhexánsav	
62	3-amino-4-etilhexánsav	
63	3-amino-3-ciklohexilpropánsav	
64	3-amino-3(ciklohex-3-én-1-il)propánsav	
65	3-amino-3-fenilpropánsav	
66	<i>cisz</i> -4-hidroxiprolin	<i>c</i> -4-OHPro
67	α -metilprolin	α -MePro
68	1,2,3,6-tetrahidropiridin-2-karbonsav	baikain
69	piperidin-2-karbonsav	Pip
70	<i>cisz</i> -4-hidroxipiperidin-2-karbonsav	<i>c</i> -4-OHPip
71	<i>transz</i> -4-hidroxipiperidin-2-karbonsav	<i>t</i> -5-OHPip
72	piperazin-2-karbonsav	
73	5-metil-piperazin-2-karbonsav	
74	morfolin-3-karbonsav	
75	tiomorfolin-3-karbonsav	
76	1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-1-karbonsav	Tic1
77	1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-3-karbonsav	Tic3
78	3-metil-1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-3-karbonsav	α -MeTic3
79	5-metil-1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-3-karbonsav	5-MeTic3
80	6-hidroxi-1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-3-karbonsav	6-OHTic3
81	7-hidroxi-1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-3-karbonsav	7-OHTic3

82	1,2,3,4,5-pentahidro-2-benzazepin-3-karbonsav	Pac
83	1,2,3,4-tetrahidronorharmán-1-karbonsav	Nor
84	1,2,3,4-tetrahidro- β -karbolin-3-karbonsav	Tcc
85	1-[5-klór-2-(metilamino)fenil]-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin	CMP-Tic
86	α -propilprolin	
87	α -allilprolin	
88	α -benzilprolin	
89	α -(4-metilbenzil)prolin	
90	α -(4-fluorbenzil)prolin	
91	α -(2-klórbenzil)prolin	
92	α -(3-klórbenzil)prolin	
93	α -(2-brómbenzil)prolin	
94	α -(4-brómbenzil)prolin	
95	α -(1-naftilmetil)prolin	
96	5-fenil-tetrahidrofuran-2-on-butano-4-lakton	"butirolakton"

A vizsgált vegyületek elnevezése a magyar elnevezés és helyesírás szabályai szerint készültek, amelyben segítségünkre volt Nyitrai József és Nagy János "Útmutató a szerves vegyületek IUPAC-nevezéktanához" című könyve.

3.2. Alkalmazott készülékek

1. Az alkalmazott folyadékkromatográfiai rendszerek:

- Type M-600 pumpa, Type M-996 detektor, Millenium 2010 és 32 jel- és adatfeldolgozó rendszer (Waters, Milford, MA, USA),
- Type 1525 pumpa, Type 487 detektor, Type 717 automataadagoló, Breeze jel- és adatfeldolgozó rendszer (Waters, Milford, MA, USA),
- Type L-6000 pumpa (Merck Hitachi, Tokyo, Japán), Type SPD6AV detektor (Shimadzu, Tokyo, Japán), Type HP 3395 Integrátor (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany),
- Rheodyne 7125 20 μ l-es mintaadagoló (Cotati, CA, USA).

2. Termosztát:

- MK 70, Mechanik Prüfgerate (Medlingen, Németország).

3. Tömegspektrométer:

- Quattro II (Micromass UK, Altrincham, Anglia).

3.3.. Az alkalmazott kromatográfiás oszlopok

1. C₁₈ alapú kolonnák:

LiChrospher 100 RP18, 5 µm, (125x4,0 mm), Merck; Vydac 218TP54, 5 µm, (250x4,6 mm), The Separation Groups, Hesperia, CA, USA; NovaPak, 4 µm, (150x3,9 mm), Waters, Milford, USA; Discovery, 5 µm (250x4,6 mm), Supelco, Bellafonte, USA.

2. Királis kolonnák

Crownpak CR(+), 5 µm, (150x4,0 mm), Daicel, Tokyo, Japan; Chirobiotic T, 5 µm, (250x4,6 mm), Astec, Whippany, USA; Chirobiotic Tag, 5 µm, (250x4,6 mm), Astec, Whippany, USA; Chirobiotic R, 5 µm, (250x4,6 mm), Astec, Whippany, USA.

3.4. Vizsgált vegyületek és felhasznált vegyszerek

A fehérjealkotó aminosav enantiomerek Sigma (St. Louis, MO, USA) termékek voltak. A Gly, Ala, Phe, Tyr, Trp és Pro alapvázú nemfehérje alkotó aminosavakat együttműködő partnereink állították elő. A vegyületek szerkezete és elnevezése a Függelék 1. Táblázatában található. Előállításuk módja, illetve az erre való hivatkozások a megfelelő közleményekben találhatók. Az *N*-benziloxikarbonil-D,L-Trp, (*Z*-Trp) és a (*N*-3,5-dinitro-2-piridil)-D,L-Trp (DNPy-Trp) Sigmától (St. Luis, MO, USA) szereztük be. A D,L-1-[5-klór-2-metilamino)-fenil]-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin (CMP-Tic) és a D,L-5-fenil-tetrahidrofurán-2-on-butano-4-lakton ("butirolakton") Aldrich (Milwaukee, WI, USA) termékei voltak. Olyan aminosavak, amelyeknek csak a racém elegyük állt rendelkezésünkre D-enantiomerjét L-aminosav-oxidáz enzim felhasználásával állítottuk elő.

Merck gyártmányú HPLC-s tisztaságú metanolt (MeOH), acetonitrilt (MeCN), etanolt (EtOH) és hexánt (Hex), (Darmstadt, Németország), valamint HPLC-s tisztaságú vizet (Millipore, Milford, MA, USA) használtunk fel méréseink során. Analitikai tisztaságú trietil-amint (TEA), jégecetet (AcOH), trifluor-ecetsavat (TFA) és perklórsavat (HClO₄) alkalmaztunk. A trietil-ammónium-acetát puffer pH-ját úgy állítottuk be, hogy a megfelelő pH értékig titráltuk a 0,1 mólos TEA vizes oldatát jégecettel. A perklórsav pH-ját nátrium-hidroxiddal állítottuk be. A puffereket Milli-Q vízzel (Millipore, Milford, MA, USA) készítettük és 0,45 µm-es szűrőn szűrtük.

3.5. Az alkalmazott királis származékképzők és a származékképzés leírása

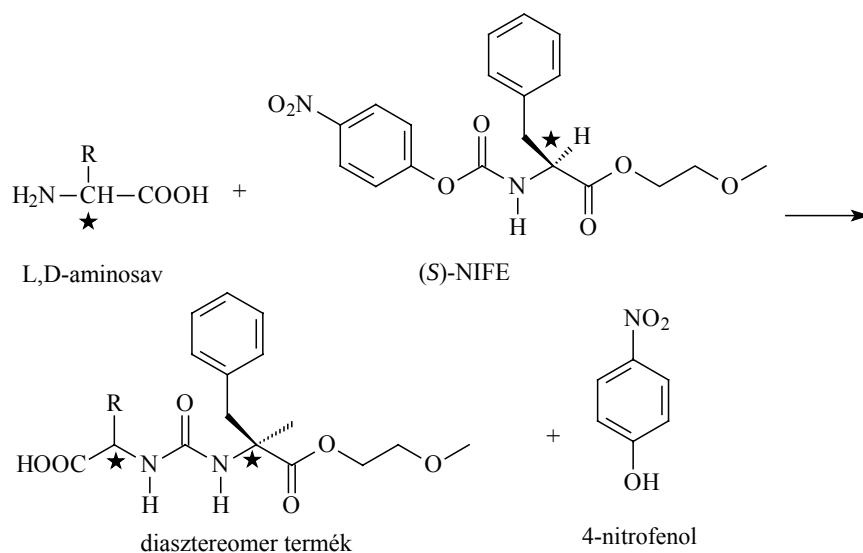
Az (S)-N-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil-észter (S)-NIFE Fluka (Buchs, Switzerland) gyártmányú volt. A 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glükopiranzil-izotiocianát (GITC) az Aldrich (Steinheim, Németország), illetve 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamid (FDAA) a Pierce Chemical (Rockford, IL, USA) termékei voltak.

1. Aminosav-(S)-NIFE-származék képzése

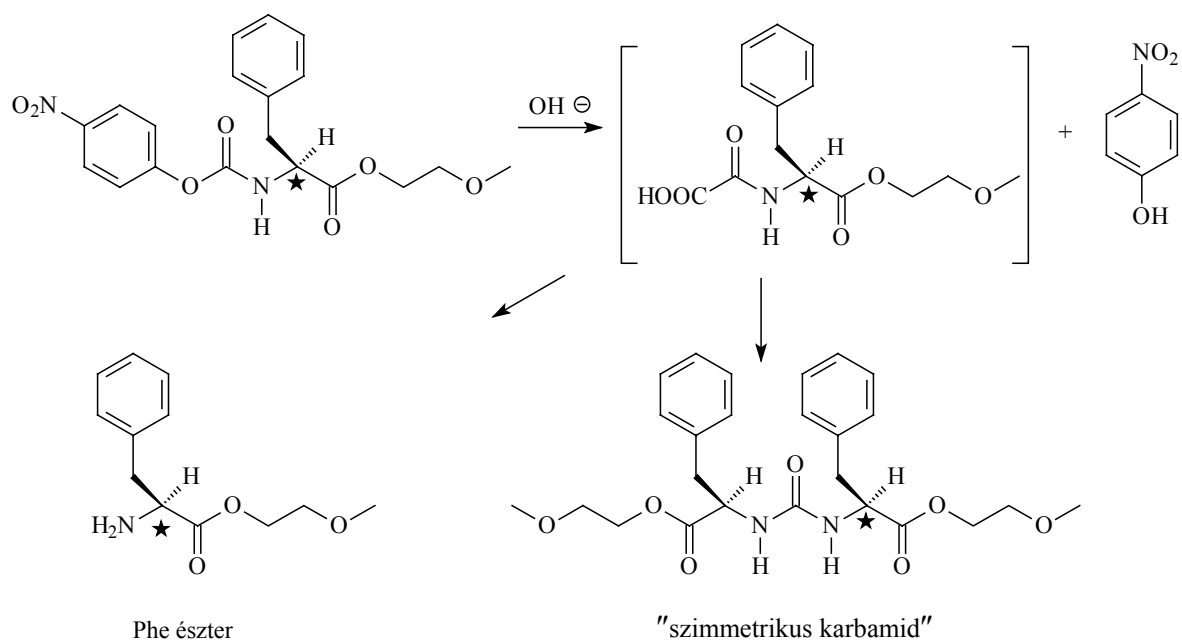
Oldatok:

- (S)-NIFE-reagens $0,090 \text{ mol dm}^{-3}$ koncentrációjú vízmentes dioxános oldata.
- Aminosavak $0,030 \text{ mol dm}^{-3}$ -es vizes oldata.

25 μl aminosav oldatot 0,5 μl tömény TEA oldattal lúgosítottuk, majd 30 μl (S)-NIFE oldatot adtunk hozzá, és fél órán át szobahőmérsékleten reagáltattuk. Az aminosav/származékképző reagens molarány: 1/3,5. A származékot vizes TFA oldattal ötszörösére hígítottuk. Az aminosav-(S)-NIFE diasztereomer termékek 205 nm-nél mutatnak maximális fényelnyelést; így ezen a hullámhosszon detektáltunk. A származékképzési reakciót az 5. ábra mutatja be.



Mellékreakció:

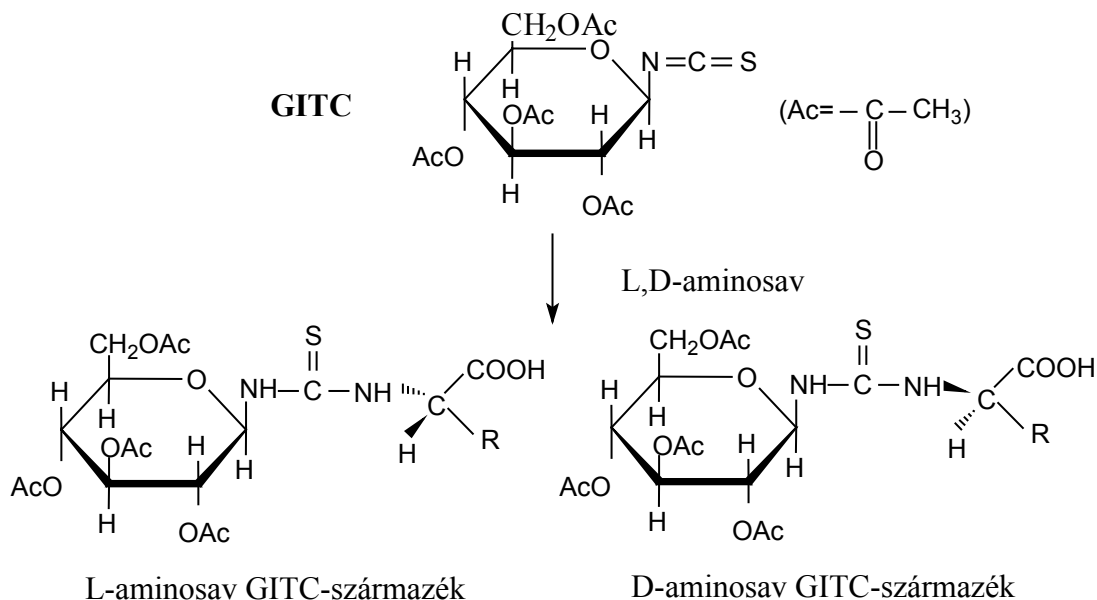


5. ábra

(S)-NIFE-vel történő származékképzés sémája

2. Aminosav-GITC-származék képzése

Nimura és munkatársai által 1980-ban közölt cikkben foglaltak alapján valósítottuk meg a származékképzési reakciót [196]. Az aminosav-GITC származék 250 nm-nél mutat maximális fényelnyelést. A származékképzési reakciót 6. ábra mutatja be.

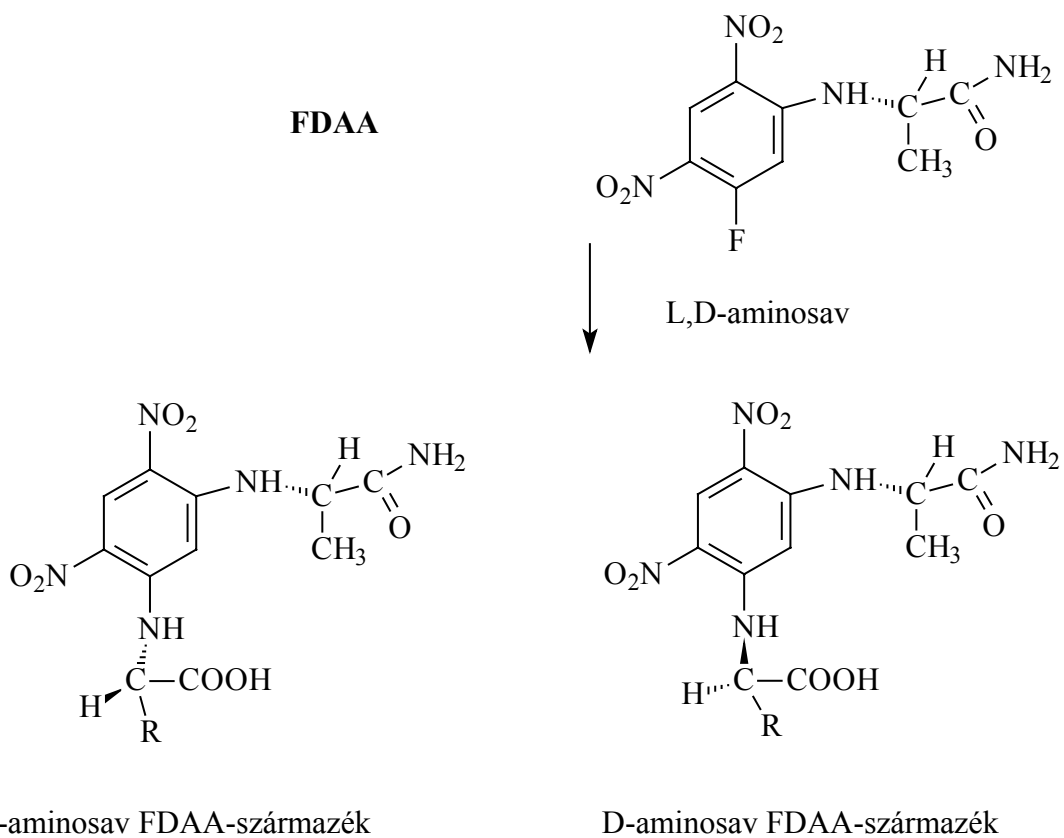


6. ábra

GITC-vel történő származékképzés sémája

3. Aminosav-FDAA-származék képzése

A származékképzést az [70] alábbi irodalomban megadott körülmények között végeztük. A képződött diasztereomer termék 340 nm-nél rendelkezik abszorpciós maximummal.



7. ábra

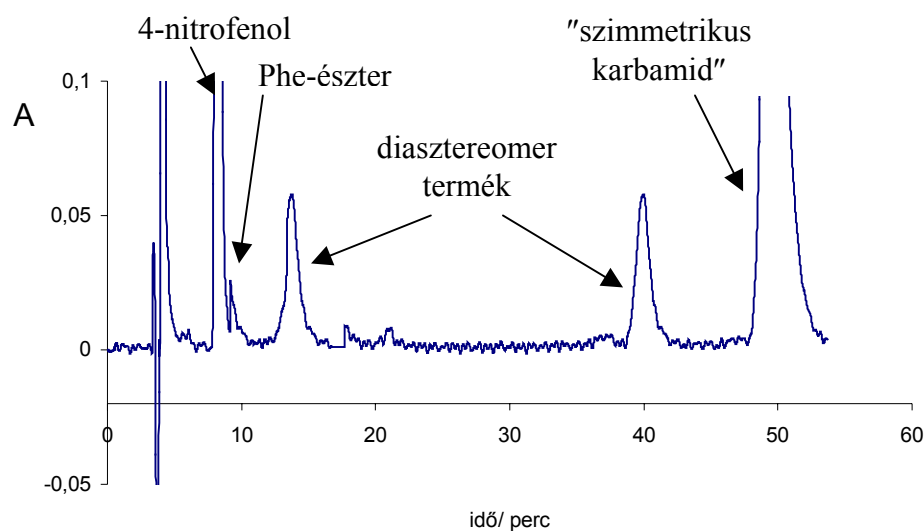
FDAA-val való származékképzés sémája

4. **(S)-N-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil-észter [(S)-NIFE] királis származékképző reagens alkalmazása**

Ezzel a munkával célunk volt, egy új közvetett kromatográfiás módszer kifejlesztése fehérjealkotó és nemfehérje alkotó aminosav sztereoizomerek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztására. Az (S)-NIFE reagenst a Solvay-Peptisyntha (Brüsszel) kutatói fejlesztették ki. Kutatócsoportunk feladata volt új kromatográfiás módszerek kidolgozása aminosav sztereoizomerek elválasztására a reagens felhasználásával. Az (S)-NIFE az "aktív uretán" típusú királis származékképzők családjába tartozik. A (S)-NIFE vízmentesen, szilárd állapotban stabilis, a származékképzési reakció során képződő aminosav-(S)-NIFE adduktumok több héten keresztül hűtőszekrényben tárolva eltarthatók. A királis származékképző reagensek enantiomer tisztaságára elvárható érték 99,90%, ez az (S)-NIFE esetén 99,80%-nak adódott. A meghatározáshoz >99,90% tisztaságú Phe-t alkalmaztunk.

Az (S)-NIFE az 5. ábrán látható séma szerint reagál aminosavakkal és aminokkal. A reakció során az (S)-NIFE-aminosav karbamid származék képződik és ezzel együtt jár ekvimoláris mennyiségű 4-nitrofenol keletkezése. A származékképzés során melléktermékek is keletkeznek, amelyeket HPLC-MS módszerrel azonosítottunk. (S)-NIFE önbomlásból lúgos körülmények között karbaminsav átmeneti termék képződése közben, egyrészt fenilalanin-metoxietil-észter (Phe-észter), másrészt - önmagával rekombinálódva - *N,N*-bisz-(3-fenilpropionsav-metoxietil-észter-2-il ("szimmetrikus karbamid")) képződik. A Phe-észter keletkezése igazolja, hogy a reakció karbaminsav átmeneti termék képződésén keresztül megy végbe. A származékképzési reakció melléktermékei minden esetben kimutathatók. A diasztereomer termékek, a 4-nitrofenol és a "szimmetrikus karbamid" között jönnek le az oszlopról. (S)-NIFE+(*S,R*)-2-MePhe származékképzési reakcióban képzett diasztereomer termékek analízisére példa a 8. ábrán látható.

Néhány aminosav esetében meghatároztuk a kimutatási határt MeOH tartalmú eluens esetén. Ez az érték 205 nm-nél 3/1 jelzaj viszony mellett 20 pmol-nak adódott.



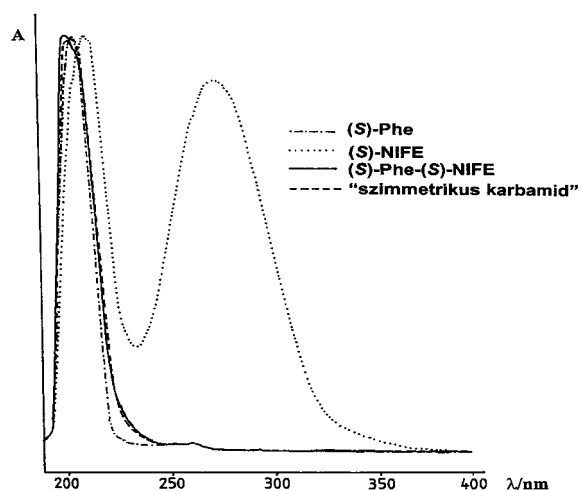
8. ábra

(S)-NIFE + (S,R)-2-MePhe származék kromatográfiás elválasztása

Kolonna: Vydac 218TP54; detektálás: 205 nm; eluens: H₂O/(0,1%TFA)/MeOH(0,1%TFA)

=45/55 (v/v); áramlási sebesség: 0,8 mlperc⁻¹

A származékképzés során keletkezett termék kimutatását az abszorpciós maximum helye szabja meg. A 9. ábrán az (S)-Phe példáján bemutatjuk az (S)-NIFE+(S)-Phe adduktum, az el nem reagált származékképző reagens és aminosav, illetve a "szimmetrikus karbamid" UV-spektruma. Méréseink során a keletkezett termékek detektálását a (S)-NIFE-aminosav adduktum elnyelési maximumában, 205 nm-en végeztük.



9. ábra

Az (S)-NIFE, (S)-Phe, (S)-Phe+(S)-NIFE származék és a "szimmetrikus karbamid" UV-spektruma

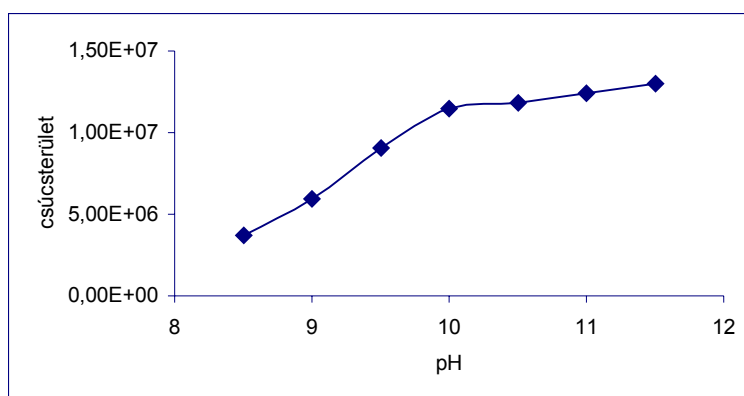
A reakció teljességét az elreagálatlan aminosavcsúcs kromatogramról való eltűnésével, vagy ninhidrin teszttel tudtuk igazolni. (S)-NIFE/(S)-Phe=5/1 molaránynál 20 perc reakcióidő után (S)-Phe csúcsa nem volt észlelhető a kromatogramon.

4.1. A származékképzési reakció optimalizálása

A származékképzési reakció hozama a kísérleti körülmények függvénye. Szisztematikus vizsgálatokban a pH, a reagensfelesleg és a reakcióidő hatását tanulmányoztuk a lehető legjobb hozam elérése céljából.

4.1.1. A pH hatása a származékképzési reakcióra

A pH szabályozását a TEA koncentráció változtatásával oldottuk meg. A (S)-NIFE reagens/aminosav molarányt 5/1 értéken tartva, 20 perc reakcióidőt alkalmazva a kapott csúcsterületek a pH növelésével telítési jellegű görbét eredményeztek (10. ábra). A grafikonon látható, hogy kezdetben a reakció hozama kicsi, teljessé pH=11 fölött válik.



10. ábra

Az (S)-Phe+(S)-NIFE származékképzési reakció pH függése.

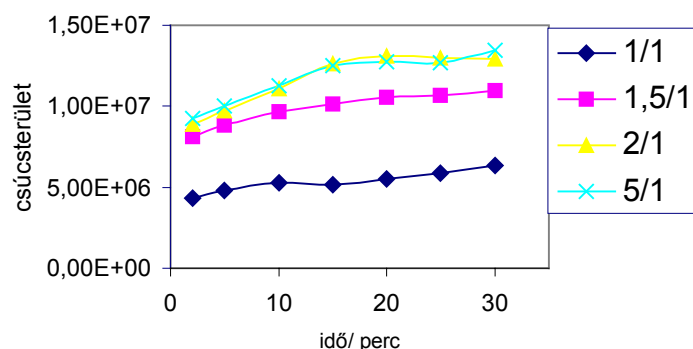
Származékképzés: hőmérséklet, 25°C; reakcióidő, 20 perc; származékképző reagens/aminosav molarány: 5/1

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 1,0 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; eluens, A: H₂O(0,1% TFA), B: MeCN (0,1% TFA); Gradiens elúció, 0 perc 5% B, 90 perc 90% B.

4.1.2. A reagensfelesleg és a reakcióidő hatása a származékképzési reakcióra.

A reagensfelesleg és a reakcióidő együttes hatását szemlélteti a 11. ábra. Az ábráról jól látható, hogy a termékhozam szempontjából az (S)-NIFE/aminosav molarány sokkal

nagyobb szerepet játszott, mint a reakcióidő. Az (S)-NIFE/(S)-Phe arányt 2/1 vagy 5/1 arányra emelve, a reakció 20 perc után teljesnek tekinthető.



11. ábra

A reagensfelesleg és reakcióidő hatása az (S)-NIFE + (S)-Phe származékképzési reakció hozamára

Származékképzés: hőmérséklet, 25°C; reakcióidő, 2-30 perc; pH, 11; származékképző reagens/aminosav molarány: 1/1; 1,5/1; 2/1; 5/1

Kromatográfiai körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 1,0 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; eluens, A: H₂O(0,1% TFA), B: MeCN (0,1% TFA); Gradiens elúció, 0 perc 5% B, 90 perc 90% B.

4.2. A vizsgált aminosavak-(S)-NIFE származékainak folyadékkromatográfiai elválasztása

A méréseinket fordított fázisú módban víz és MeOH, illetve MeCN, mint szerves módosító felhasználásával készült eluensben végeztük. A méréseket különböző C₁₈-as állófázisokon valósítottuk meg, amelyekre az adott vegyületcsoport kromatográfiai adatainak kiértékelése során térünk ki. Az amfoter tulajdonságú peptidek és aminosavak mérése során a mozgófázis pH-jának csökkentése visszaszorítja a karboxilcsoportok ionizációjának mértékét, és ez azt eredményezi, hogy az aminosav polaritása csökken, ami RP-HPLC-ben a retenciós idő növekedését vonja maga után. Mivel minden — a reakció során képződött — termék tartalmazott protonálható csoportot, így a mérések folyamán szükséges volt a pH állandó értéken tartására. A mozgófázis szerves és szerves alkotójához is egyaránt 0,1% TFA-t adagoltunk, így a pH-t állandó értéken tartva az addig savmentes eluensben felmerült problémákat, mint aszimmetrikus csúcsalak, vagy reprodukálhatóság hiánya, sikerült kiküszöbölnünk.

A mérési eredményeket tartalmazó táblázatokat, illetve az egyes módszerek összehasonlításának alapját képező összefoglaló jellegű táblázatokat a Függelékben

mutatjuk be. Az Értekezésben az összefoglaló táblázatok adataiból készült oszlopdiaagramok segítségével kívánjuk szemléltetni az egyes tendenciákat.

4.2.1. A fehérjealkotó aminosavak (S)-NIFE származékainak elválasztása

A méréseket MeCN és MeOH tartalmú eluensben is elvégeztük, kihasználva a két szerves módosító szelektivitásában rejlő különbségeket. A vizsgálatokhoz gradiens elúciót alkalmaztunk. Első közelítésben célunk volt az egyes aminosav enantiomerek elválasztása (S)-NIFE származék formájában, amelynek eredményei a Függelék 2. és 3. Táblázatában találhatók. E vizsgálatok képezték az alapját annak a mérésorozatnak, melyben a 19 fehérjealkotó aminosav sztereoizomereket egy futtatásban kíséreltük meg elválasztani. A vizsgált aminosav sztereoizomerek legalább az egyik szerves módosító esetén elválaszthatóak voltak. Az MeCN tartalmú eluensben az Asn (**3**) és a Ser (**15**) enantiomereket nem tudtuk elválasztani (F/2. Táblázat), míg MeOH tartalmú eluensben a megfelelő sztereoizomer-párok elváltak egymástól (F/3. Táblázat). A két szerves módosító hatékonyságának összehasonlításakor megállapíthatjuk, hogy MeOH esetén hasonló retenciós faktor értékekhez általában jobb felbontás tartozik, mint MeCN alkalmazásakor. A poláris komponensek elválasztásában a MeOH, mint szerves módosító eredményesebb volt.

Néhány esetben azonban a másodikként eluálódó sztereoizomer MeOH tartalmú eluensben csak részlegesen vált el a "szimmetrikus karbamid" csúcsától. Ezt a problémát úgy küszöböltük ki, hogy más meredekségű gradienst alkalmaztunk. A kisebb meredekségű gradiens a Ser (**15**) esetében javította a felbontást, de sajnos így is jelentősen elmaradt az elvárható értéktől.

A Tyr (**18**) az aromás gyűrűn lévő hidroxilcsoportján, a lizin (**11**) a másik aminosocsoportján, a Cys (**5**) pedig a SH-csoportján keresztül is reakcióba lépett a származékképző reagenssel. A képződött bisz-derivatizátumokat kromatográfiásan sikerült megkülönböztetni a mono-származékoktól.

A fehérjealkotó aminosavak elúciós sorrendjét az állófázissal létrejövő kölcsönhatásaik közül, úgy tűnik, döntően a hidrogénhíd-kötések befolyásolják. A savas aminosavak Asp (**4**), Glu (**6**) retenciós sorrendje (S)<(R). A bázikus aminosavak közül a kettős származékot képző Lys (**11**) elúciós sorrendje szintén (S)<(R), míg az Arg (**2**) és Hys (**8**), melynél további hidrogénhidas kölcsönhatásokban részt vevő amino-, iminocsoportok is vannak (R)<(S) sorrendben eluálódtak. A semleges aminosavak elúciós sorrendje is

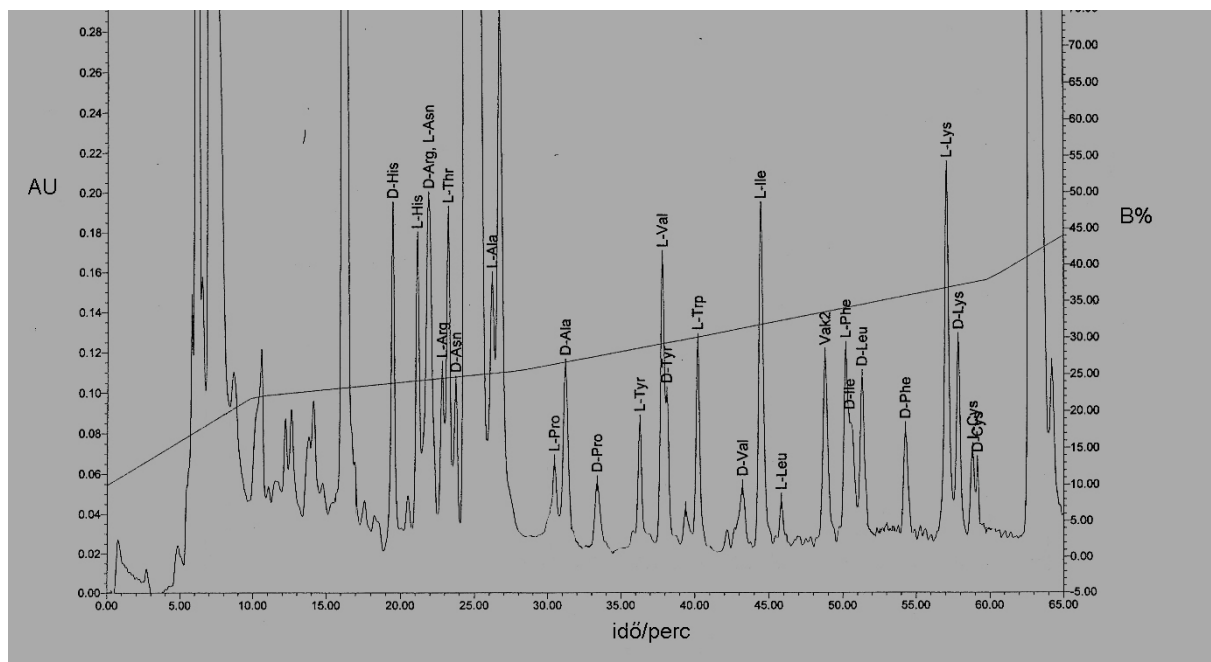
(S)<(R), kivéve a két további hidrogénhid-kötésre hajlamos semleges aminocsoportot tartalmazó Asn (3), és Gln (7). A Cys (5) (R)<(S) elúciós sorrendje megfelel az (S)<(R) sorrendnek, mivel a királis szénatom körüli elrendeződése az atomcsoportoknak ugyanaz.

A fehérjealkotó aminosav enantiomerek egy futtatás során történő elválasztásához az aminosav enantiomerek külön-külön megvalósított elválasztása során szerzett tapasztalatokból indultunk ki. A fehérjék hidrolízise során az Asn (3) illetve a Gln (7) karbonsavvá alakul, így ezeket nem vizsgáltuk. Az MeOH esetén viszont több esetben tapasztaltuk, hogy a "szimmetrikus karbamid" zavarja a második csúcs megjelenését, így szerves módosítóként MeCN-t választottunk. A további mérési eredményekből, amelyek a gradiens szakaszok meredekségére, illetve az optimális áramlási sebesség megállapítására irányultak, elkészítettünk egy gradiens programot, amelyet 2.Táblázatban foglaltunk össze. A 12. ábra szemlélteti, hogy a zavaró csúcsok futtatás elején a eluálódtak az oszlopról. 10-28 perc között 0,5 ml perc⁻¹értéken tartva az áramlási sebességet, kisebb meredekségű gradienst használtunk, hogy a poláris anyagok csúcsai elváljanak egymástól. A 4-nitrofenol csúcsától nem sikerült elválasztani a L, D-Glu (6), D-Thr (16) csúcsait. 29-70 perc között az áramlási sebességet 0,8 mlperc⁻¹ értékre emelve különböző meredekségű gradiens szakaszokkal tudtuk az egyes csúcsok elválasztását biztosítani.

2. Táblázat

Kromatográfiás körülmények a fehérjealkotó aminosav enantiomerek elválasztására (S)-NIFE származék formájában

Eluens: A: H ₂ O(0,1% TFA), B: MeCN (0,1% TFA);		
Idő/perc	B/%	Áramlási sebesség/ ml perc⁻¹
0	10,0	0,50
10	22,0	0,50
28	25,5	0,50
40	30,0	0,80
50	34,0	0,80
60	38,0	0,80
70	50,0	0,80



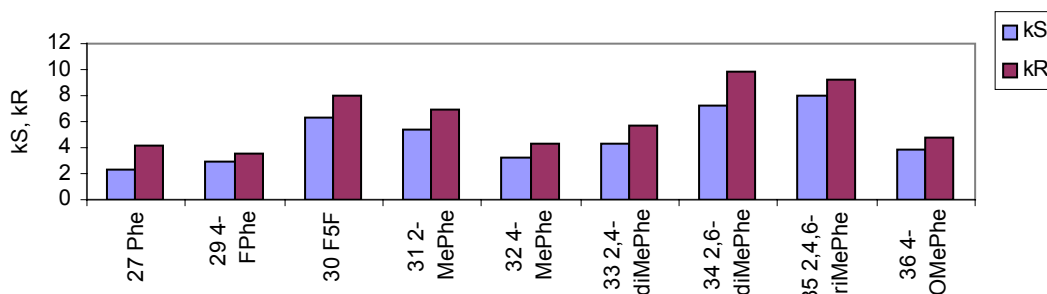
12. ábra

Fehérjealkotó aminosav enantiomerek elválasztása (S)-NIFE származék formájában

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; detektálás, 205 nm; eluens, A: H_2O (0,1% TFA), B: MeCN (0,1% TFA); Gradiens programot, és az áramlási sebesség adatokat a 2. Táblázat tartalmazza.

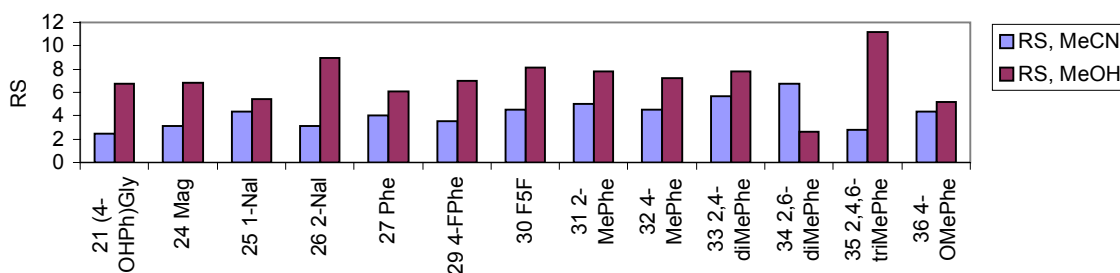
4.2.2. A Gly és Ala és Phe analógok (S)-NIFE származékainak elválasztása

A származékképzési reakció során képződött diasztereomer termékek elválasztását MeOH és MeCN tartalmú eluens rendszerben is megvalósítottuk. A mérési eredményeket az F/4.-5. Táblázatban foglaltuk össze, illetve a 13., 14. ábrán szemléltetjük. A MeOH tartalmú eluens esetén két eluensösszetételnél [H₂O(0,1%TFA)/MeOH(0,1%TFA)=45/55, illetve 35/65 (v/v)] is elvégeztük az analíziseket, hogy kiküszöböljük az első vagy a második csúcs részleges elválását 4-nitrofenoltól, illetve a "szimmetrikus karbamidtól". A 4-MePhe (**32**) esetén az eluens megváltoztatása nem eredményezett teljes elválást a 4-nitrofenoltól. A Phe homológok sorában (**27-36**) a visszatartás meghatározó tényezője a képződött diasztereomer termékek hidrofóbicitása. A (**28-30**) illetve a (**31-35**) aminosavak esetén a fluor- és metil-szubsztituensek számának növekedésével nő a vegyületek hidrofóbicitása a Phe-hez képest (**27**), ami fordított fázisú kromatográfiában a retenciós faktor növekedését eredményezi.



13. ábra

Phe analógok (S)-NIFE származékainak retenciós faktorai MeCN tartalmú eluensben
Eluens, H₂O(0,1%/TFA)/ MeCN(0,1%/TFA)= 65/35 (v/v)



14. ábra

Szerves módosítók hatékonyságának összehasonlítása Phe analógok (S)-NIFE származékainak példáján

Eluens, H₂O(0,1%/TFA)/MeCN(0,1%/TFA)=65/35 (v/v),

H₂O(0,1%/TFA)/MeCN(0,1%/TFA)=45/55 (v/v)

Ha a szerves módosítókat hasonlítjuk össze 2,6-diMePhe (**34**) kivételével a MeOH volt a hatékonyabb, nagyobb felbontás rövidebb idő alatt volt elérhető. Az elúciós sorrend minden esetben követte az általános szabályt, (S)<(R) sorrendet tapasztaltunk.

4.2.3. β -alkil-szubsztituált Phe, Tic, Tyr, Trp analógok (S)-NIFE származékainak kromatográfiás elválasztása

A β -metil(alkil)-aminosavak, mint az opioid peptidek fontos építő elemei, négy optikai izomer formában fordulnak elő. A peptidek szintézisnél általában tiszta D,L-*eritro*- vagy D,L-*treo*- formából indulunk ki. A β -metil(alkil)-aminosavak analízise során olyan módszer kifejlesztése a cél, mellyel mind a négy sztereoizomer elválasztása megoldható. A β -metil(alkil)-aminosav sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak elválasztása során három állófázis alkalmaztunk. Az állófázisok fizikai-kémiai jellemzőit a 3. Táblázatban foglaltuk össze, az adott fázisokon megvalósított elválasztások kromatográfiás paramétereit oszlopokra lebontva a Függelék 6. és 7. Táblázata tartalmazza. A kapott eredmények elemzését megkönnyítő oszlopdiaagramokat a 15-18. ábra tartalmazza szerves módosítók szerint osztályozva.

A méréseket mindhárom oszlopnál metanol és acetonitril tartalmú eluensben is elvégeztük. A méréseket Discovery C₁₈ oszlopon a MeOH tartalmú eluensnél gradiens elúciót alkalmazva valósítottuk meg. Az (S)-NIFE enantioszelektivitása közel azonos mind az *eritro*-, mind a *treo*-enantiomerekre. Mindkét szerves módosító esetén mindhárom oszlopra általános tapasztalatként levonható, hogy az *eritro*-D, *treo*-L sztereoizomerek jól elválaszthatóak egymástól. Az (S)-NIFE β -Me-Tyr-al (**39**, **40**) kettős származékot képez, mivel az aminosav két kiralitás centrummal rendelkezik 4 mono- és 4 bisz-származék képződik. A 8 csúcsot izokratikus körülmények között egy futtatásban a Vydac 218TP54 oszlopon sikerült elválasztani. Azonos eluensösszetételnél a Discovery C₁₈ oszlopon voltak általában a retenciós faktorok a legnagyobbak, aminek a Discovery C₁₈ oszlop nagy széntartalma és fajlagos felülete az oka, mivel erős hidrofób kölcsönhatás alakul ki az állófázis és a diaszteromer termékek között. Az enantiomerek elválasztását jellemző szelektivitás értékeket vizsgálva az egyes állófázisok esetén az MeCN tartalmú eluensben a α értékek alig térnek el, míg a MeOH tartalmú az eltérés jelentősebb. MeOH szerves módosítónál a Vydac 218TP54 és a Nova Pak oszlopokon a szelektivitás értékek jelentősen megnöttek. A Discovery C₁₈ oszlopnál a metanolos eluensben tapasztalt eredményeket nem használhatjuk fel összehasonlításra, mert a méréseket gradiens elúciót alkalmazva végeztük

el. A Vydac 218TP54 és Nova Pak oszlopokat összehasonlítva a vizsgált vegyületek elválasztása Nova Pak oszlopon közel azonos enantiomer szelektivitás mellett, hosszabb időt vett igénybe, és a felbontás értékek egyetlen esetben sem érték el a kívánt értéket. Ennek oka, hogy a Nova Pak oszlopnak kicsi a pórusmérete, amely lassú tömegáramot biztosít az állóból a mozgófázisba, így a kromatogramon széles, elnyúló csúcsokat kaptunk. A 300 Å pórusméretű Discovery C₁₈ és Vydac 218TP54 oszlopokon gyors tömegáram keskeny, éles csúcsokat eredményez. Az enantiomerek elválasztásában mindhárom oszlop hatékony, de a 4 sztereoizomer elválasztására a Discovery C₁₈ és a Vydac C₁₈ oszlopok alkalmasabbak MeOH tartalmú eluensben. A Discovery C₁₈ oszlopon MeCN tartalmú eluensben sok esetben tapasztaltunk viszonylag jó elválásokat, viszont ezeket tovább javítani az eluensösszetétel változtatásával nem tudtuk. A Vydac 218TP54 oszlopnál MeOH tartalmú eluensben sok esetben tapasztaltunk R_s 1,5 körüli felbontás értéket, amit a eluens változtatásával kedvezően tudunk befolyásolni.

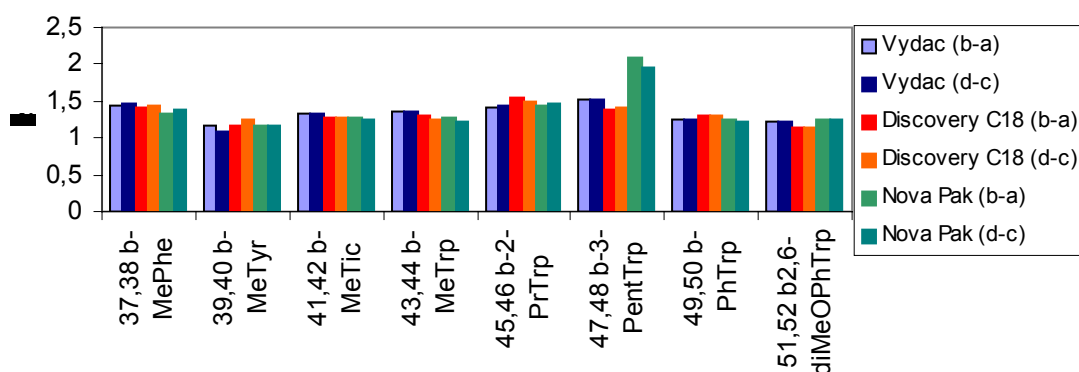
A négy sztereoizomer elválasztása, illetve az egyes sztereoizomerek azonosítása a királis kromatográfia nehezen megoldható feladata. Sok esetben az elúciós sorrend változik. (S)-NIFE-nél az enantiomerekre általánosan érvényes, hogy az elúciós sorrend $L < D$, $(2S,3S) < (2R,3R)$, illetve $(2S,3R) < (2R,3R)$. A szerves módosító és az állófázis változtatása együtt járhat a sztereoizomerek elúciós sorrendjének cseréjével. A vizsgált β -alkil-szubsztituált-Phe, Tic, Tyr, Trp analógok (S)-NIFE származékainál, kivéve β -MeTrp sztereoizomerjeit, fellépett az elúciós sorrendcsere jelensége.

β -MeTyr, β -MePhe, β -MeTic (S)-NIFE származékainak elválasztására 15. ábrán mutatunk be példát. A β -alkil-szubsztituált-Trp sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak elválasztására a közvetett és közvetlen módszerek elválasztóképességének összehasonlítása című fejezetben térünk vissza.

3. Táblázat

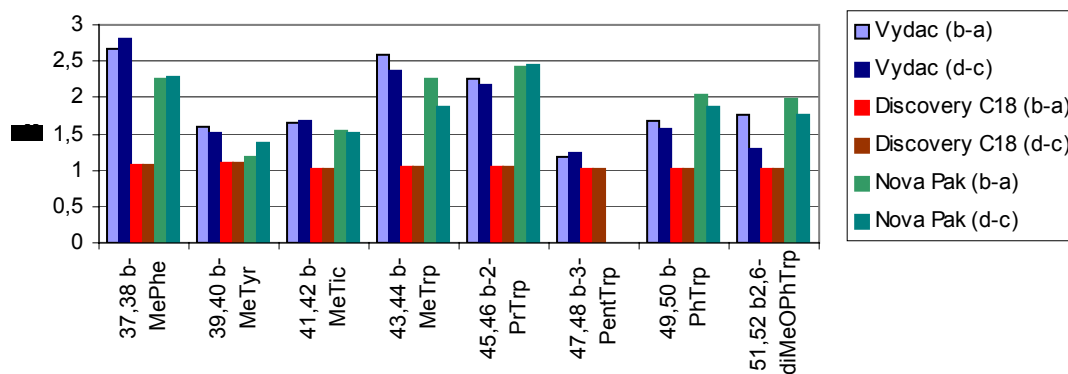
A Discovery C₁₈, Vydac 218TP54, Nova Pak oszlopok pórusméret, fajlagos felület, pórustérfogat, széntartalom adatai

Oszlop	Pórusméret Å	Fajlagos felület m ² g ⁻¹	Pórustérfogat cm ³ g ⁻¹	Széntartalom %
Discovery C ₁₈	180	200	1,00	12,5
Vydac TP218	300	75	0,45	8,5
Nova Pak	60	120	0,30	7,3



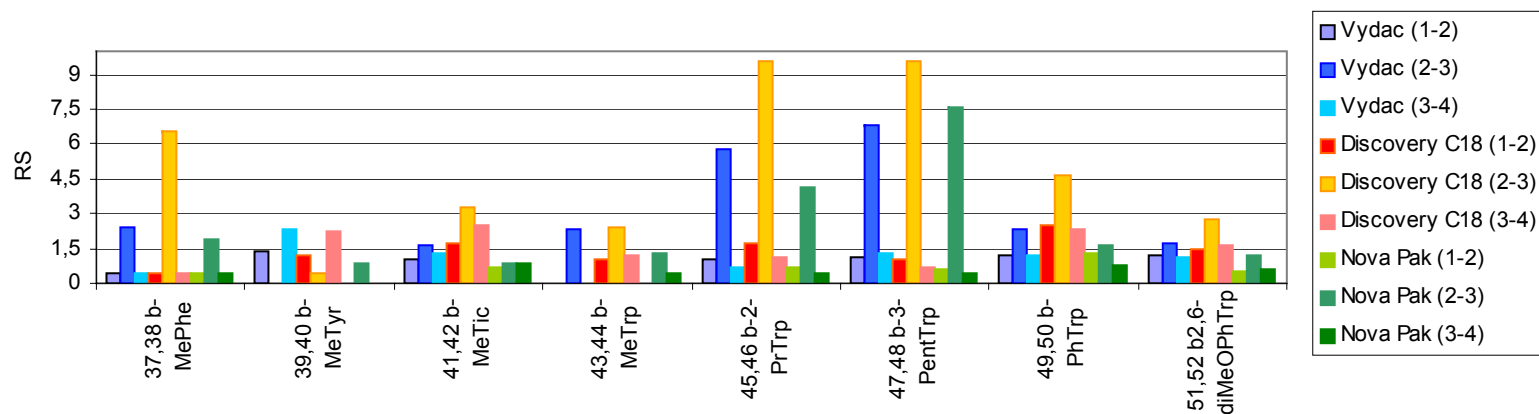
15. ábra

β-metil(alkil)-szubsztituált aminosavak (S)-NIFE származékai elválasztását jellemző szelektivitási értékek MeCN tartalmú eluensben Vydac 218TP54, Discovery C₁₈, Nova Pak oszlopok esetén



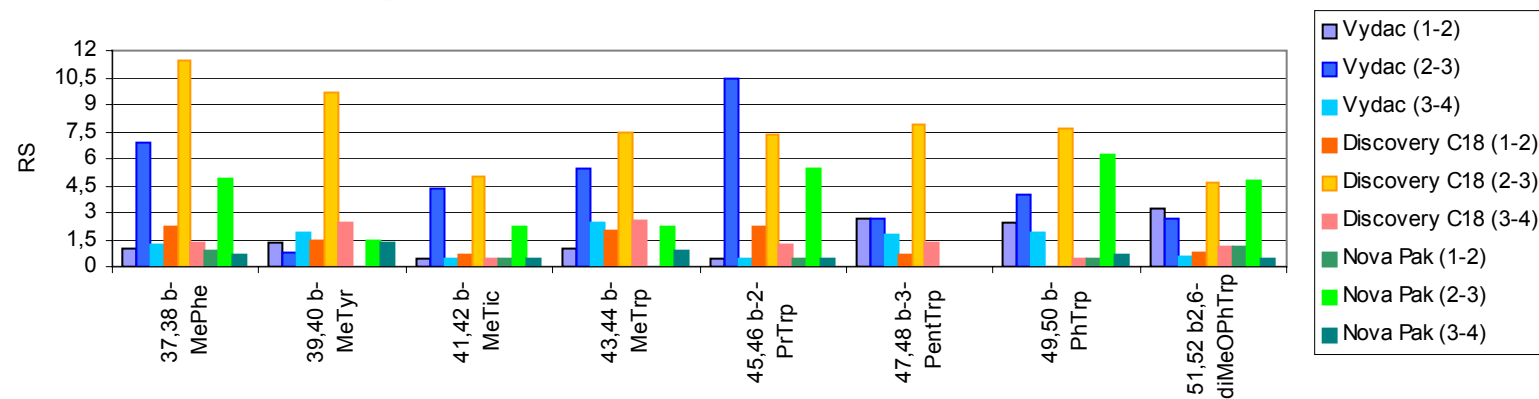
16. ábra

β-metil(alkil)-szubsztituált aminosavak (S)-NIFE származékai elválasztását jellemző szelektivitási értékek MeOH tartalmú eluensben Vydac 218TP54, Discovery C₁₈, Nova Pak oszlopok esetén



17. ábra

β -metil(alkil)-szubsztituált aminosavak (S)-NIFE származékai elválasztását jellemző felbontás értékek MeCN tartalmú eluensben Vydac 218TP54, Discovery C₁₈, Nova Pak oszlopok esetén



18. ábra

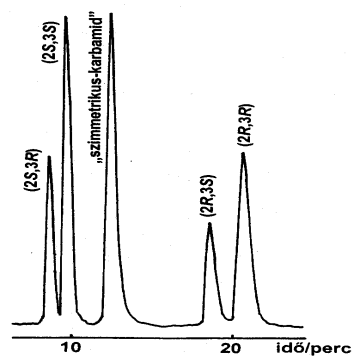
β -metil(alkil)-szubsztituált aminosavak (S)-NIFE származékai elválasztását jellemző felbontás értékek MeOH tartalmú eluensben Vydac 218TP54, Discovery C₁₈, Nova Pak oszlopok esetén

19. Ábra

A β -MePhe, β -MeTyr, β -MeTic (S)-NIFE származékainak elválasztása

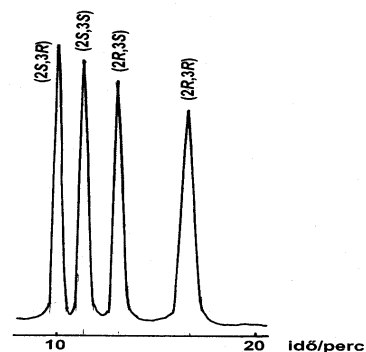
β -MePhe
(37, 38)

A



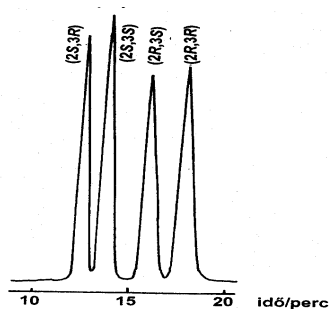
β -MeTyr
(39, 40)

B



β -MeTic
(41, 42)

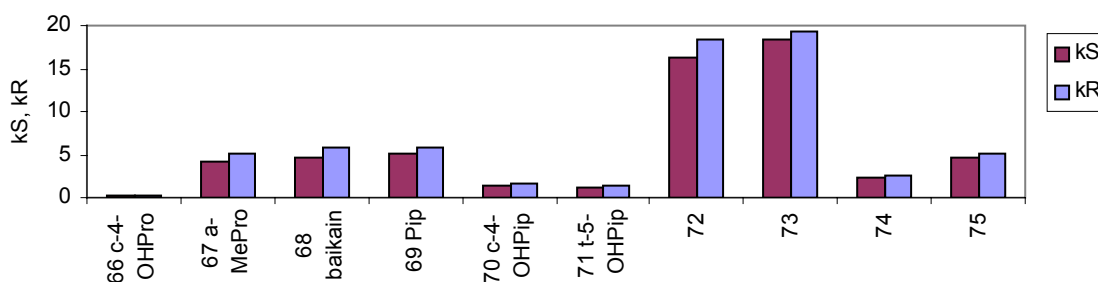
C



Kromatográfiás körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség: 1,0 ml perc⁻¹; eluens, **A**, H₂O (0,1%TFA)/MeOH(0,1% TFA)=47,5/52,5(v/v); **B**, H₂O (0,1%TFA)/MeOH(0,1% TFA)=40/60 (v/v); **C**, H₂O (0,1%TFA)/MeCN(0,1% TFA)=67,5/32,5 (v/v)

4.2.4. A szekunder aminosav sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak elválasztása

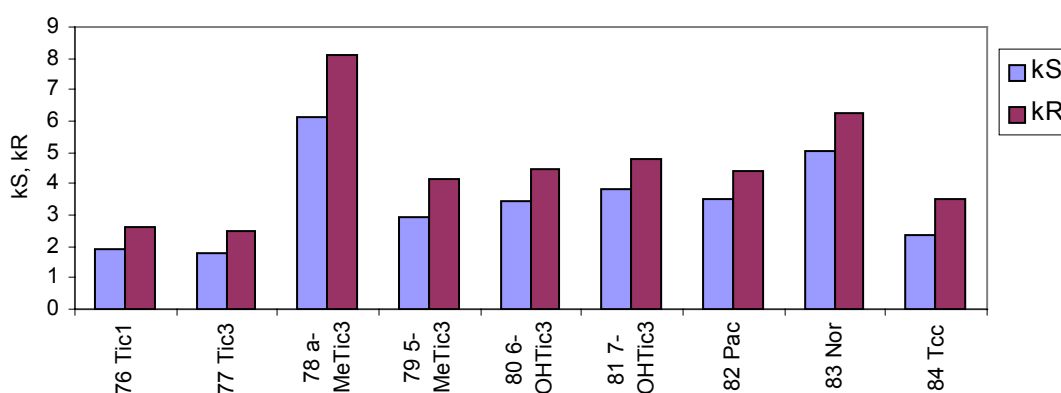
A F/8. és F/9. Táblázatban a szekunder aminosavak sorába tartozó prolin, pipekolinsav, piperazin-karbonsav analógok valamint a morfolin-, tiomorfolin-karbonsav sztereoizomerek elválasztásának kromatográfiás adatai általános következtetéseket engednek meg. Az eluensben az MeOH és az MeCN tartalom csökkenése a k , α és R_S növekedését idézte elő. Ez azt igazolja, hogy az elválasztásban döntő szerepe van a hidrofób kölcsönhatásoknak. A két Pro analóg közül (66) és (67), a hidrofílabb sztereoizomerek (66) elválasztása kisebb szerves módosító tartalmú eluenst igényel. A pipekolinsav analógok retenciós paramétereit a 20. ábrán levő oszlopdiaagram szemlélteti. A pipekolinsav analógok közül a telítetlen (68) és a hidroxilcsoportot tartalmazók (70, 71) hidrofílabb sajátosságúak. Ennek megfelelően hamarabb eluálódnak, mint az Pip (69). A *cisz*-4-OHPip (70) és az *transz*-5-OHPip (71) esetén kisebb szerves módosító tartalmú eluenst kellett alkalmaznunk a megfelelő felbontás eléréséhez. A piperazin vázas analógok közül, a (72) és metil-származéka (73) a Pip-hez (69) képest erősebb eluensben is később eluálódtak. Ez arra utal, hogy ezeknél a vegyületeknél mindkét iminocsoport részt vett a származékképzési reakcióban. A kettős származékot nagy mérete és hidrofóbicitása miatt a C_{18} -as fázis jobban visszatartotta. A kettős származék keletkezését HPLC-MS módszerrel is igazoltuk. A (72) és (73) összehasonlításában a kromatográfiás paraméterek alapján a metilcsoport hidrofóbicitást növelő hatása érvényesül. A morfolin- és a tiomorfolin-karbonsav sztereoizomerek (74) és (75) esetén a heteroatomok beépülése a gyűrűbe csökkentette a molekula hidrofóbicitását, ami azt eredményezte, hogy a Pip-hez (69) képest a retenciós faktor csökkent.



20. ábra

Prolin, pipekolinsav, piperazin-karbonsav analógok valamint a morfolin-, tiomorfolin-karbonsav sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak retenciós faktora Eluens, H_2O (0,1%/TFA)/ MeCN(0,1%/TFA)=70/30 (v/v)

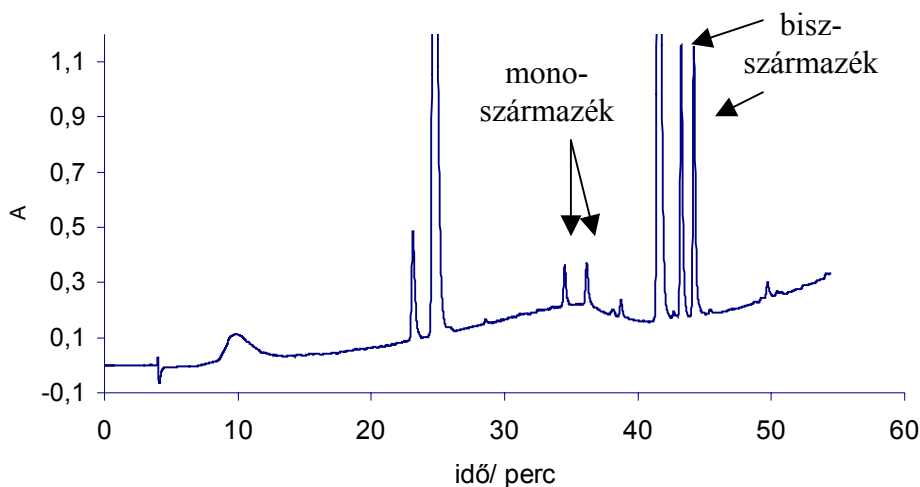
Az imino- és a fenolos hidroxilcsoportokkal ellentétben a telített vázhoz kapcsolódó alkoholos hidroxilcsoportok (**66**, **70**, **71**) nem léptek reakcióba a származékképző reagenssel. Más esetekben is megfigyelték az alkoholos hidroxilcsoportok kisebb reakciókészségét, az aromás hidroxilcsoportokhoz képest [197]. A többgyűrűs tetrahydroizokinolin vázas sztereoizomerek elválasztását erősebb eluensben végeztük, mint a Pip analógokét. Ennek oka, hogy nagyobb méretű molekulának nagyobb a hidrofóbicitása (21. ábra), és a megfelelő analízis idő biztosításához erősebb eluenst kellett alkalmaznunk. A Tic analógok sorában ugyanúgy megfigyelhető a metilcsoportok hidrofóbicitás növelő (**78**) és (**79**) és a hidroxilcsoportok hidrofóbicitást csökkentő (**80**) és (**81**) hatása az alapvegyülethez (**77**) képest.



21. ábra Tetrahydroizokinolin analógok (S)-NIFE származékainak kromatográfiai paraméterei
Eluens, H₂O(0,1%/TFA)/ MeOH(0,1%/TFA)=35/65 (v/v)

Külön meg kell említeni α -MeTic3-t (**78**), melynek merev szerkezete nem kedvezett az eddig alkalmazott származékképzési reakcióknak (GITC, FDAA), mivel az α -helyzetű metilcsoport szterikusan gátolta a származékképzési reakció lejátszódását. (S)-NIFE-vel a származékképzési reakció könnyen végrehajtható, és a keletkezett diasztereomerek hatékonyan választhatók el, főleg MeOH tartalmú eluensben.

Az (S)-NIFE-vel való származékképzés másik érdekessége, mint azt már a Tyr példáján bemutattuk, hogy a fenolos hidroxilcsoport is reagál a származékképző reagenssel. A kromatográfiai körülmények megfelelő megválasztásával a mono- és bisz-származékok egy futtatásban elválaszthatók. Erre látunk példát a 22. ábrán a 6-OHTic3 (**80**) esetén.



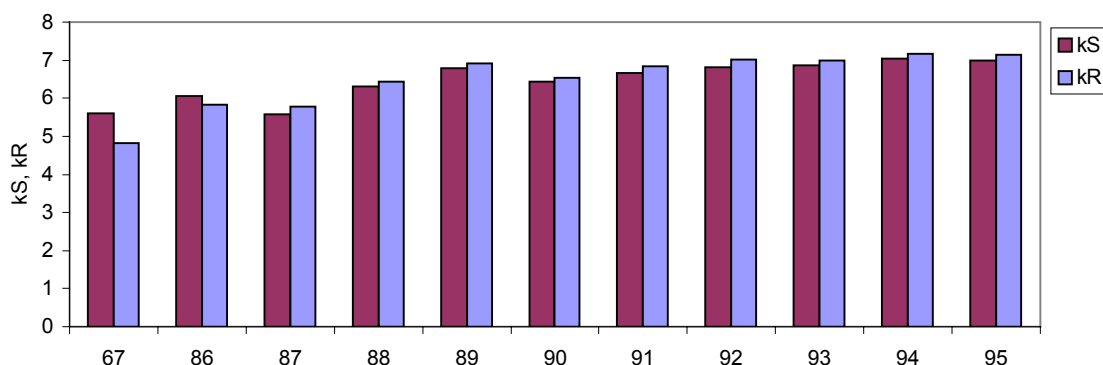
22. ábra

6-OHTic3+(S)-NIFE mono- és bisz- származékok elválasztása egy kromatogramon belül
 Kromatográfiás körülmények: oszlop, Lichrospher RP-18; áramlási sebesség, 0,80 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; eluens, A: H₂O(0,1% TFA), B: MeOH(0,1% TFA) ; Gradiens program: 0 perc 5% B, 45perc 80% B

4.2.5. Pro analóg sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak kromatográfiás jellemzése

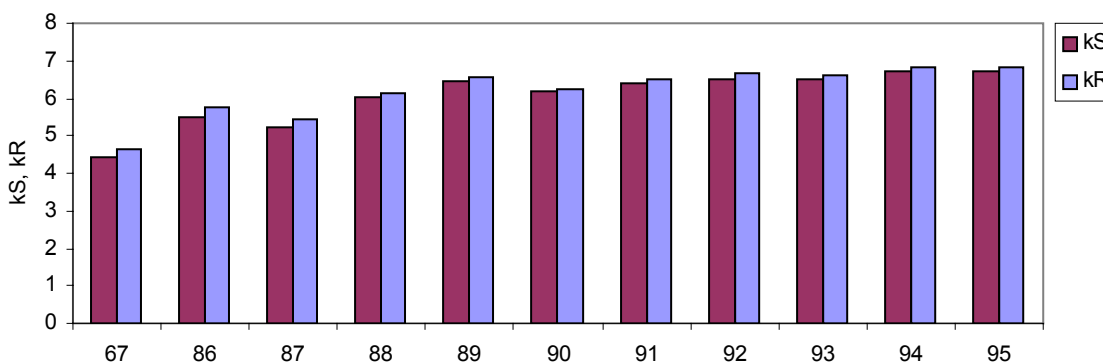
Az α -szubsztituált Pro analóg sztereoizomerek sztérikusan erősen gátolt szerkezetűek, ami reakciókészségüket kedvezőtlenül befolyásolja (lásd: 5.1. fejezet). Az (S)-NIFE-vel megvalósított származékképzési reakció szobahőmérsékleten 20 perc alatt végbement ha a reagens/aminosav molarányt 10/1 értéken tartottuk. A reagensfeleslegből adódó zavaró hatást, ami a kromatogramon nagy reagenscsúcs formájában jelentkezett, esetenként glicin hozzáadásával küszöböltük ki. A glicin-(S)-NIFE származék, mely jóval polárisabb, mint a megfelelő aminosav sztereoizomerek származéka, a kromatogram elején nem zavaró csúcsként jelent meg. A Pro analóg sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak elválasztását gradiens elúcióval, H₂O(0,1% TFA)/MeCN(0,1%TFA) (v/v) eluens rendszerben oldottuk meg. A hatékonyabb MeOH helyett MeCN használatát azért választottuk, mert néhány esetben a MeOH tartalmú eluensben az egyik diasztereomer együtt eluálódott a "szimmetrikus karbamiddal". Az elválasztásokat két kolonnán (Discovery C₁₈ és Vydac 218TP54) is végrehajtottuk és az eredményeket összehasonlítottuk a Függelék 10. Táblázatában. Az adatok grafikus ábrázolása a 23. és 24. ábrán látható. Azonos gradiens programot alkalmazva 20-25%-kal nagyobb retenciós faktorok mellett, hasonló enantioszelektivitással a Discovery C₁₈ oszlopon jobb felbontást

értünk el, mint a Vydac 218TP54 C₁₈ kolonnán. A két kolonna hatásosságában meglévő különbség a kolonnák fiziko-kémiai paramétereiben keresendő. A Discovery C₁₈ kolonna pórusátmérője kisebb (180Å), mint a Vydac 218TP54 C₁₈ kolonnáé (300Å). Ennek megfelelően fajlagos felülete és szén-borítottsága nagyobb. A nagyobb szén-borítottság kedvez a hidrofób-hidrofób kölcsönhatásoknak, ennek megfelelően a Discovery C₁₈ kolonnán mért retenciós faktorok nagyobbak, mint a Vydac 218TP54 kolonnán mérték.



23. ábra

Pro analóg sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak retenciós faktorai Discovery C₁₈ oszlopon



24. ábra

Pro analóg sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak retenciós faktorai Vydac 218TP54 oszlopon

Alifás szubsztitúció esetén az alkilánc hossza és telítettségének mértéke a retenció meghatározója. A (67) kisebb retenciós faktorra rendelkezik, mint a (86) és (87) illetve a (87) kisebb retenciós faktora a (86)-hoz viszonyítva telítettségének következménye. A α -halo-benzil-szubsztituált analógok F, Cl-, Br-szubsztituens sorrendben (90)-(94), illetve metilbenzil- (89), metilnaftil- (95), szubsztituált analógok a benzil-szubsztituált analóghoz képest (88) egyre növekvő retenciós faktorra rendelkeznek. Ez a növekvő hidrofóbicitás következménye. Meglepő módon a retenciós faktorok növekedését nem kíséri a felbontás

növekedése (kivétel a **(91)** és a **(95)** Discovery C₁₈ kolonnán és a **(90)**, **(91)** és **(92)** Vydac 218TP54 kolonnán). Ennek valószínű oka, hogy a szubsztituensek térkitöltésének növekedésével az elválasztás kinetikája lassul, a csúcsszélesedés egyre nagyobb mértékűvé válik. Az elúciós sorrend **(66)** és **(67)** vegyületek esetén (S)<(R), a többi szubsztrátum esetén (R)<(S), ami ellentmondásban van az általános tapasztalattal. Az ellentmondás csak látszólagos, mert az α -allil-, α -benzil-, és α -naftil- szubsztituált analógok konfigurációjának elnevezését a C.I.P. szabály alapján változtatták meg, az atomcsoportok elrendeződése a királis szénatom körül ugyanaz marad, mint α -metil-szubsztitúció esetén.

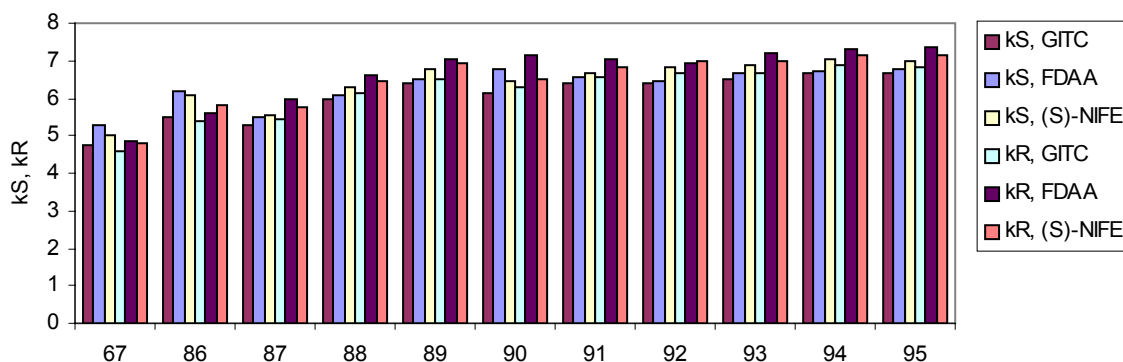
5. Az (S)-NIFE származékképző reagens elválasztóképességének összehasonlítása más származékképző reagensekkel és közvetlen módszerekkel

5.1. Az (S)-NIFE, GITC és FDAA származékképzők elválasztóképességének összehasonlítása Pro analóg sztereoizomerek elválasztása esetén

Az α -szubsztituált prolin analóg sztereoizomerek sztérikusan erősen gátolt szerkezetűek, ami reakciókészségüket kedvezőtlenül befolyásolja. Származékképzésük GITC-vel, 6 órát vesz igénybe szobahőmérséklet felett, 40 °C-on. Az FDAA-val való reakciót e vegyületek rendkívül erős sztérikusan gátolt jellege akadályozta. A reakció 50 °C-on 7 nap alatt is csak 10-15 %-os konverziót ért el, illetve fellépett a kinetikus rezolúció jelensége is. (S)-NIFE-vel a származékképzés szobahőmérsékleten tízszeres reagensfelesleg mellett 20 perc alatt lejátszódott és az (S)-NIFE felesleget, ha zavarta az kromatográfiás elválasztást Gly-nel távolítottuk el. A Gly-(S)-NIFE adduktum a kromatogram elején nem zavaró csúcsként jelent meg.

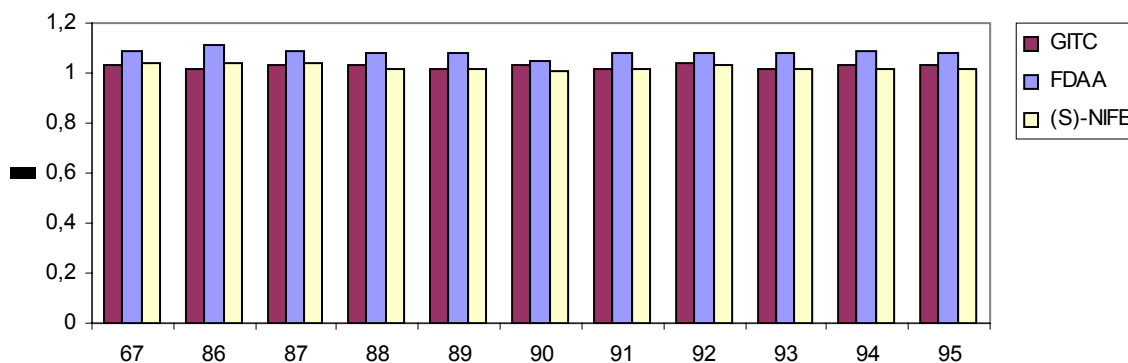
A származékképző reagensek reaktivitásában meglévő különbség magyarázza alkalmazhatóságukat. A Marfey-reagens (FDAA) csak minőségi célra (elúciós sorrend) alkalmazható a fellépő kinetikai rezolúció miatt. A GITC-vel való reakció hosszú és a reagens a származékképzés során elbomlik. A fellépő hátrányok ellenére megvizsgáltuk az egyes származékok kromatográfiás viselkedését, hogy a származékképzők hatékonyságát ebből a szempontból is összehasonlíthassuk. A diasztereomer termékeket azonos gradiens programot alkalmazva Discovery C₁₈ oszlopon választottuk el, az eredményeket F/11. Táblázatban és a 25. A.-C. ábrán foglaltuk össze. (S)-NIFE-Pro analóg diasztereomer termékeknél az alkalmazott gradiens elúciónál néhány esetben az elsőként eluálódó csúcs részlegesen vált el az el nem reagált reagenscsúcsból. Ezt a problémát glicin adagolásával könnyen ki tudtuk küszöbölni. A F/11. Táblázat és a 25. A. ábra adatai alapján az elválasztások minden esetben 4,5-7,5 *k* értékkel jellemezhetők, és az egyes származékképzőket tekintve a *k* értékek nem nagyon térnek el egymástól egy sztereoizomeren belül. Az esetek többségében az FDAA származékok eluálódtak legkésőbb az oszlopról. Ez az erős visszatartás azzal magyarázható, hogy a Discovery C₁₈ oszlop nagy széntartalma miatt a nagyobb hidrofóbicitású származékokat erősen visszatartja, mert a minta és az állófázis között erős hidrofób kölcsönhatás alakul ki.

Az (S)-NIFE és a GITC származékképző reagensek enantioszelektivitása a Pro származékokra közel azonos, míg FDAA esetén az α értéke körülbelül 5%-kal nagyobb (25.B. ábra). A felbontás értékeit tekintve (25.C. ábra) a GITC-vel való származékképzés utáni elválasztás jellemző felbontás (R_S) értékei hasonlóak az (S)-NIFE-re kapott értékekhez. Az (S)-NIFE-vel képzett származékok felbontása minden esetben meghaladja $R_S \geq 1,5$ értéket. A legjobb felbontási értékekkel az FDAA származékok rendelkeznek, de a származékképzési reakció lassúsága és a fellépő kinetikai rezolúció jelentősen csökkenti a származékképző alkalmazhatóságát. A F/11. Táblázat és a 25. A, B, C. ábrák adataiból és a származékképzési reakció körülményeiből együttesen az a következtetés vonható le, hogy a sztérikusan erősen gátolt Pro analóg sztereoiszomerek közvetett elválasztására az (S)-NIFE származékképző a legalkalmasabb.



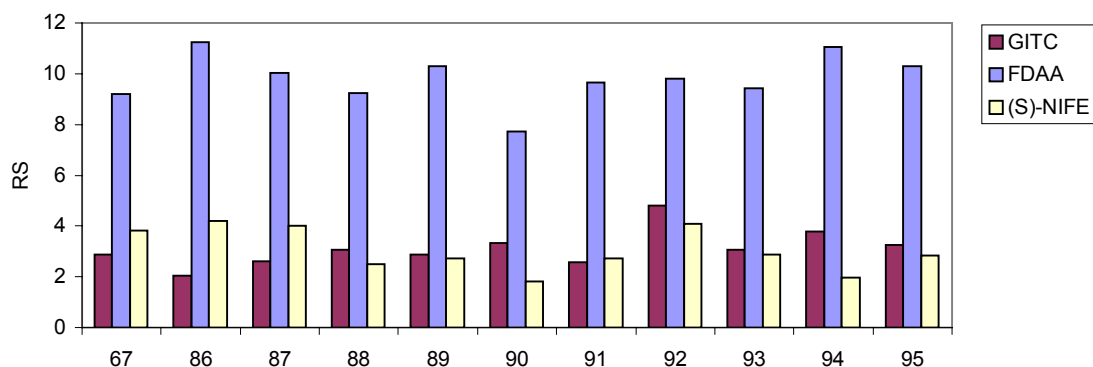
25. A. ábra

GITC, FDAA és (S)-NIFE származékképző alkalmazásával kapott retenciós faktorok Pro analóg sztereoiszomerek esetén



25. B. ábra

GITC, FDAA és (S)-NIFE származékképzők enantioszelektivitásának összehasonlítása Pro analóg sztereoiszomerek esetén



25. C. ábra GITC, FDAA és (S)-NIFE származékképző alkalmazásával kapott felbontás értékek Pro analóg sztereoizomerek esetén

Kromatográfiai körülmények: oszlop, Discovery C₁₈, áramlási sebesség, 1 ml perc⁻¹, Eluens, A: H₂O(0,1%TFA), B:MeOH(0,1%TFA), Gradiens elúció, 0 perc 3% B, 30 perc 80% B, 40 perc 80% B, 50 perc 3% B

5.2. Az (S)-NIFE, GITC és FDAA származékképzők elválasztóképességének összehasonlítása Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek elválasztása esetén

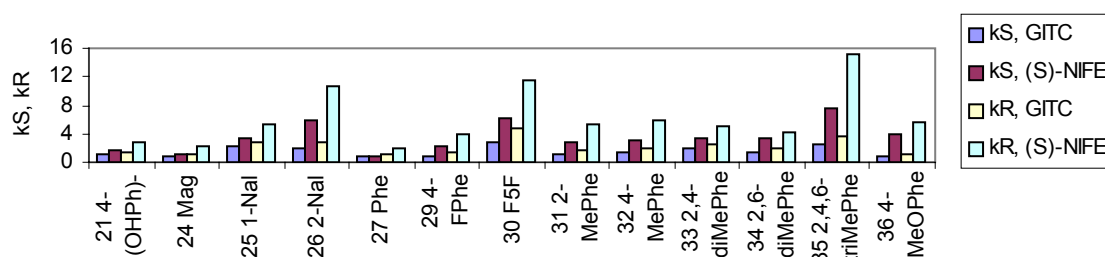
A mérési eredményeket az F/12. és az F/13. Táblázatban foglaltuk össze, a táblázatokból készült diagramok a 26-27. A.-C. ábrán láthatók.

A Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerekből (S)-NIFE, GITC és FDAA származékképzővel képzett származékokat Vydac 218TP54 oszlopon választottuk el. A GITC és az (S)-NIFE származékokat H₂O(0,1% TFA)/MeOH(0,1%TFA)= 45/55 (v/v) összetételű eluens rendszerben, míg az (S)-NIFE és FDAA származékokat H₂O(0,1% TFA)/MeOH(0,1%TFA)= 35/65 (v/v) összetételű eluens rendszerben kromatografálva hasonlítottuk össze. Az FDAA származékok 0,1% TFA-t tartalmazó H₂O/MeOH=45/55 (v/v) összetételű mozgófázisban nagy retenciós idővel rendelkeztek ezért a MeOH tartalom növelésével gyorsítottuk a sztereoizomerek eluálását. Az (S)-NIFE és GITC származékok összehasonlításánál megállapíthatjuk, hogy a Gly és az egyszerűbb Phe analóg sztereoizomerek elsőként eluálódó komponensei hasonló retenciós faktorral rendelkeznek, míg a másodikként eluálódó komponensek retenciós faktorai (S)-NIFE származékok esetén rendre nagyobbak. A többgyűrűs, sok szubsztituenszt tartalmazó analógok esetén (25), (26), (30)-(36) ez a különbség még kifejezettebb, ennek az eredményeként (S)-NIFE származékok esetén az elválasztási faktorok (α) és a felbontás (R_s) értékek is jelentősen nagyobbak (26.B. ábra).

Az (S)-NIFE származékok elválasztását jellemző enantioszelektivitás (α) értéke, a (34) és (36) komponenseket kivéve, körülbelül 10-20%-kal nagyobb, mint a GITC esetén

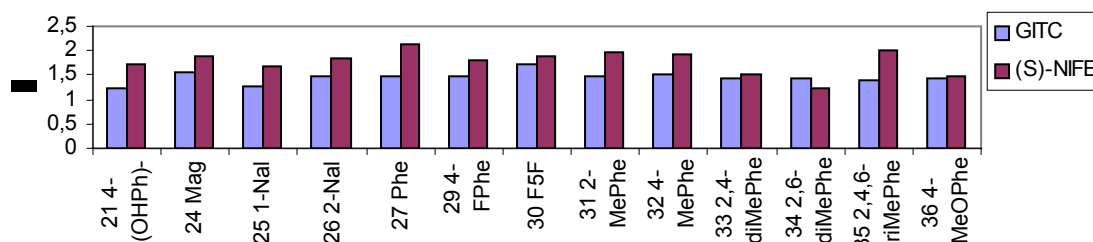
tapasztalt értékek. A felbontás is ennek megfelelően alakul, kivéve a **(30)**-t. A legjobb felbontás értékek a legnagyobb méretű, erősen hidrofób karakterű molekulák **(26)**, **(30)**-**(33)** és **(35)**, esetén adódtak.

Az (S)-NIFE és FDAA származékok elválasztásának kromatográfiás paramétereit összehasonlítva, jól látható, hogy az azonos eluens összetételnél [H_2O (0,1% TFA)/ MeOH (0,1%TFA)=35/65 (v/v)] az FDAA származékok később eluálódnak (kivéve **(30)** és **(36)**), (27. A. ábra). Ebben az eluensben az (S)-NIFE származékok rövidebb idő alatt alapvonalra elválaszthatók, mint az FDAA származékok, ami jelentős (körülbelül 50%) idő- és eluens-megtakarítást eredményez. Az elválasztást jellemző elválasztási faktor (α) értékek FDAA származékok esetén rendre nagyobbak adódtak, és ugyanez mondható el a felbontás (R_s) értékekről is. Bár az α és R_s értékek (S)-NIFE származékok esetén valamivel kisebbek, mint FDAA származékoknál, figyelembevéve a származékképzési reakció körülményeit (reakcióidő, hőmérséklet) a Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek közvetett elválasztásában az (S)-NIFE-vel való származékképzés legalább ugyanolyan hatékony, mint az FDAA-val való származékképzés. A GITC-vel való összehasonlításban (S)-NIFE-vel való származékképzés előnye még kifejezőbb.



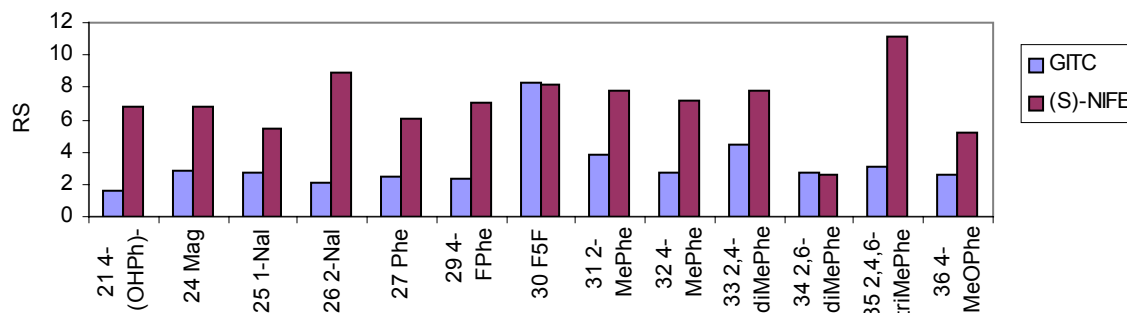
26. A. ábra

(S)-NIFE és GITC származékképzővel képzett diasztereomerek retenciós faktor (k) értékei



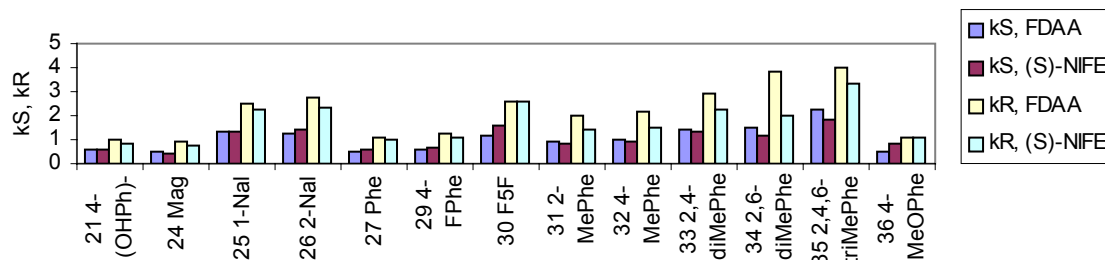
26. B. ábra

(S)-NIFE és GITC származékképzővel képzett diasztereomerek elválasztásának szelektivitási faktor (α) értékei



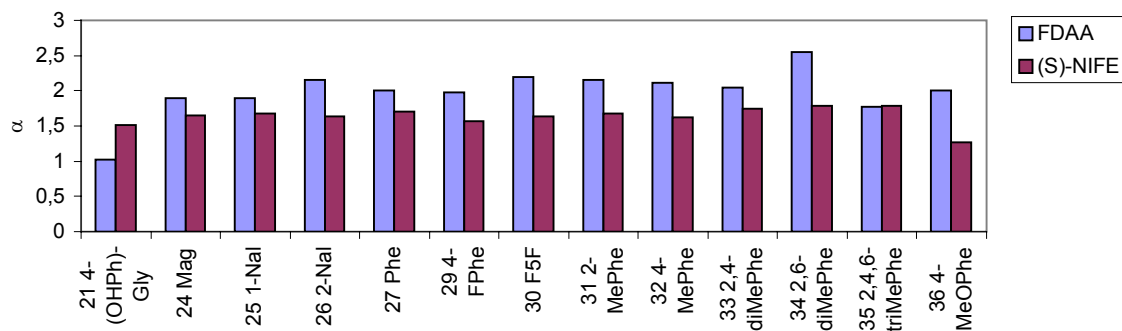
26. C. ábra

(S)-NIFE és GITC származékképzővel képzett diasztereomerek elválasztásának felbontás (R_S) értékei



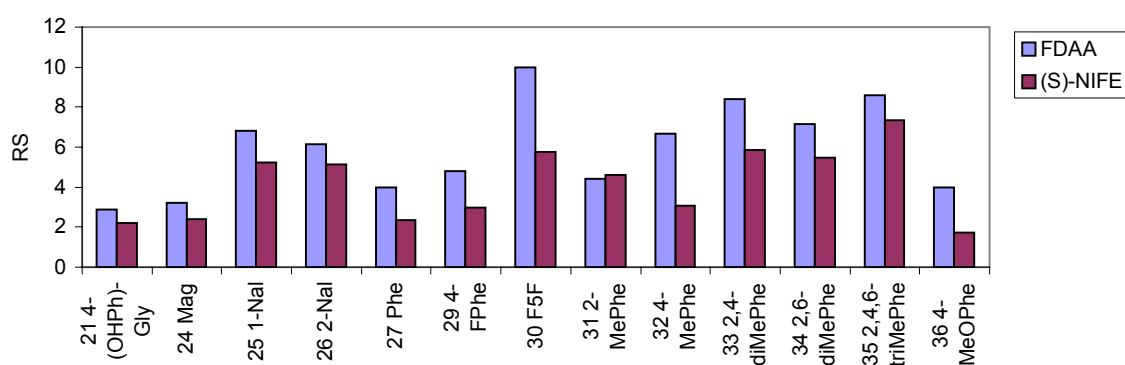
27. A. ábra

(S)-NIFE és FDAA származékképzővel képzett diasztereomerek retenciós faktor (k) értékei



27. B. ábra

(S)-NIFE és FDAA származékképzővel képzett diasztereomerek elválasztásának szelektivitási faktor (α)



27. C. ábra

(S)-NIFE és FDAA származékképzővel képzett diasztereomerek elválasztásának felbontás (R_S) értékei

Kromatográfiai körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 0,80 ml perc⁻¹; detektálás, (S)-NIFE származékok, 205 nm, GITC származékok, 250 nm, FDAA származékok, 340 nm; eluens (17. A.-C. ábra esetén), H₂O(0,1% TFA)/ MeOH(0,1% TFA) = 45/55 (v/v); eluens(18.A-C. ábra esetén), H₂O(0,1% TFA)/ MeOH(0,1% TFA) = 35/65 (v/v)

5.3. Közvetett és közvetlen kromatográfiai módszerek elválasztóképességének összehasonlítása

Az utóbbi két évtized kutatásai nyomán a közvetlen kromatográfiai módszerek mind nagyobb teret nyertek. Ezt elősegítette az a rendkívüli fejlődés, ami a királis kolonnák fejlesztése terén bekövetkezett, ma már több, mint kétszáz királis kolonna van kereskedelmi forgalomban. A kolonnák nagy száma ellenére a közvetlen módszerek alkalmazása mai napig korlátozott, mivel nehéz megjósolni, hogy az adott királis szelektor a célmolekulával megfelelő és elegendő kölcsönhatást hoz-e létre ahhoz, hogy a királis elválasztás megvalósuljon. Főleg ez az oka, hogy az olcsóbb megoldás, a királis származékképzők iránti igény nem csökkent, és a két módszer inkább kiegészíti, mint

kizárja egymást. Meg kell azonban jegyezni, hogy főleg a gyógyszeripar a közvetlen módszereket részesíti előnyben.

Mindezek figyelembevételével a vizsgált vegyületeink jelentős részét közvetlen módszerekkel is analizáltuk, és ehhez a legújabb fejlesztésű királis kolonnákat alkalmaztuk. Az adatok birtokában lehetőségünk volt az általunk alkalmazott közvetett és közvetlen módszerek elválasztóképességének összehasonlítására.

5.4.1. Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek közvetlen kromatográfiás elválasztása

A Gly, Ala és Phe analógok sztereoizomerek elválasztását elvégeztük, mind közvetett, mind közvetlen módszerek alkalmazásával. A F/14. Táblázat a Crownpak CR(+), Chirobiotic T, Chirobiotic Tag és Chirobiotic R oszlopokon közvetlen módszerekkel mért kromatográfiás adatokat tartalmazza. A kromatográfiás adatok elemzését segítő oszlopdiagramok a 28. A-B. ábra szemlélteti.

Crownpak CR(+) oszlopon PhGly (**20**), 4-OHGly (**21**) és a Thg (**23**) α és R_S értékei különösen kimagaslóak, míg a többgyűrűs rendszerek és nagy térkitöltésű szubsztituenszt tartalmazó sztereoizomerek (**22**), (**25**), (**26**), (**30**), (**33**), (**34**), (**35**) a nagy k értékek ellenére kevésbé hatásosan választhatók el. Ezekben az esetekben a pH és a hőmérséklet csökkentése sem vezetett jobb eredményhez. Az észlelt jelenségek valószínű magyarázata, hogy az aromás gyűrű (fenil, tienil) π - π -kölsönhatása a királis szelektorral elősegíti a királis szelekciót. Valószínű ez a magyarázata a telítetlen Mag (**24**) viszonylag jó elválasztásának is. A Crownpak CR(+) oszlopon Igl (**22**) esetén a ciklopentén gyűrű nagyobb hidrofóbicitása miatt erős kölcsönhatásba léphet a C_{18} hordozóval, így jelentős retenció növekedés következik be, az aromás gyűrű jelenléte viszont segítette a királis felismerést. A (**33**), (**34**), (**35**) sztereoizomerek esetén, a nagy hidrofóbicitás és a szelektorral való erős π - π -kölsönhatás mindkét enantiomer esetén olyan mértékben növeli a retenciót, ami a királis felismerés ellen dolgozik, a (**34**) és (**35**) sztereoizomerek alig vagy nem válnak el. A fluorozott Phe származékok (**28**), (**29**), (**30**) a Phe-hez (**27**) viszonyítva hidrofóbicitásuk növekedésével nagyobb k értékekkel rendelkeznek, amit nem kísért az α és az R_S növekedése, sőt az F5F (**30**) nagy térkitöltése miatt valószínűleg gátló hatással volt a királis felismerést elősegítő kölcsönhatásra, ami a sikertelen elválasztás oka. A molekula térkitöltésének növekedése a metil-szubsztituált-Phe analógok esetén sem kedvező az elválasztás szempontjából. A retenció ugyan a metilcsoportok számának növekedésével nő, de az α , R_S értéke csökken a Crownpak CR(+) oszlopon. A metil-

csoportok valószínűleg gátolják az aromás rendszerek π - π -kölsönhatását, ezáltal hátráltatják a királis felismerést.

A makrociklusos állófázisokon (Chirobiotic T, Tag és R) egy adott eluensösszetételnél a Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek elválasztása esetén a hidrofóbicitás tűnik az egyik meghatározó tényezőnek a retencióban. Azonos eluensösszetételnél a hidrofilabb sztereoizomerek k értéke általában kisebb és az erősebb hidrofób sajátságú komponensek (25), (26), (31-35) erősebb eluensösszetételnél is később eluálódtak. Itt kell megjegyezni a három kolonna eltérő viselkedését. A Chirobiotic T és Chirobiotic Tag kolonna jellegzetessége, hogy a szerves módosító koncentrációjának növekedésével a retenció növekszik, ami ellentmond egy fordított fázisú rendszer sajátosságainak. Ezért nagyobb k , α és R_s elérése érdekében nagyobb MeOH tartalmú eluenseket kell alkalmazni. Ez azzal magyarázható, hogy az aminosavak oldhatósága csökken a nagyobb MeOH tartalmú mozgófázisban. Ezt a viselkedést más antibiotikum alapú állófázisoknál is megfigyelték. α -aminosavak többségénél megfigyelték, hogy vízben gazdag eluensben a retenció újra növekszik (minimum jellegű görbe a MeOH tartalom függvényében; lásd: 7. fejezet). A víztartalom növelést kísérő retenciós faktor növekedés a vízben gazdag mozgófázisban lévő hidrofób kölcsönhatásoknak tulajdonítható. A Chirobiotic R oszlop valódi fordított fázisú oszlopként működik, azaz a szerves módosító koncentrációjának növekedésével k csökken. A Ala és Phe analógoknál a hidrofóbicitás és a retenció között nem mindig vonható le egyértelmű összefüggés. A fluoratomok, illetve a metilcsoportok fokozatos beépítése az analizálandó vegyületekbe, ami által a hidrofób jelleg megnő, nem egyértelműen változtatta meg a retenciós adatokat, mint ahogy ezt korábban Crownpak CR(+) oszlopon és a közvetett módszereknél láttuk. A F5F (30) sztereoizomerek hidrofilabb jellegűt mutat, mint a Phe (27) és a 2-FPhe (27) illetve a 4-FPhe (29). Az F5F (30) sztereoizomerek elválasztása az összehasonlításra alkalmazott eluensösszetételben sikertelen volt, ezért a F5F sztereoizomerek elválasztása gyengébb eluens igényel, ami a három kolonnánál a Chirobiotic T, Chirobiotic Tag és a Chirobiotic R oszlopoknál ellentétes irányú MeOH koncentráció-változást jelent.

A metilcsoportok fokozatos beépítésével a szubsztituált analóg sztereoizomerek (31)-(35) hidrofób jellege egyre nő, ami a k értékében kismértékű emelkedést okoz a Phe-hez (27) viszonyítva.

A Chirobiotic T és a Chirobiotic Tag oszlop a cukorrészekben és az apoláris oldalláncban különbözik egymástól. A analízisek eredményeit vizsgálva, azonos eluensösszetételnél a Chirobiotic Tag oszlop visszatartása nagyobb, így a megfelelő

sztereoizomerek később eluálódnak. Ez általában nagyobb enantioszelektivitást (α) és felbontást (R_S) eredményez [kivéve: 4-OHGly (**21**), 1-Nal (**25**), 4-MePhe (**32**) és a 2,4-diMePhe (**33**)]. A közvetlen elválasztások közül 2,4-MePhe (**33**) elválasztása Chirobiotic T oszlopon sikerült csak alapvonalra. A molekula aszimmetrikus szerkezete a két metilcsoport az aromás gyűrű azonos oldalán helyezkedik el, gátja az enantioszelektivitásért felelős kölcsönhatások kialakulásának az állófázissal és csak kivételes esetben jön létre ilyen kölcsönhatás. (A témára tövebben visszatérünk a 6. fejezetben.)

Összefoglalóan azt mondhatjuk el a Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek közvetlen kromatográfiás elválasztásáról, hogy a hidrofóbicitás csak az egyik tényező a retenció és szelektivitás meghatározásában más kölcsönhatások is jelentős szerepet játszanak.

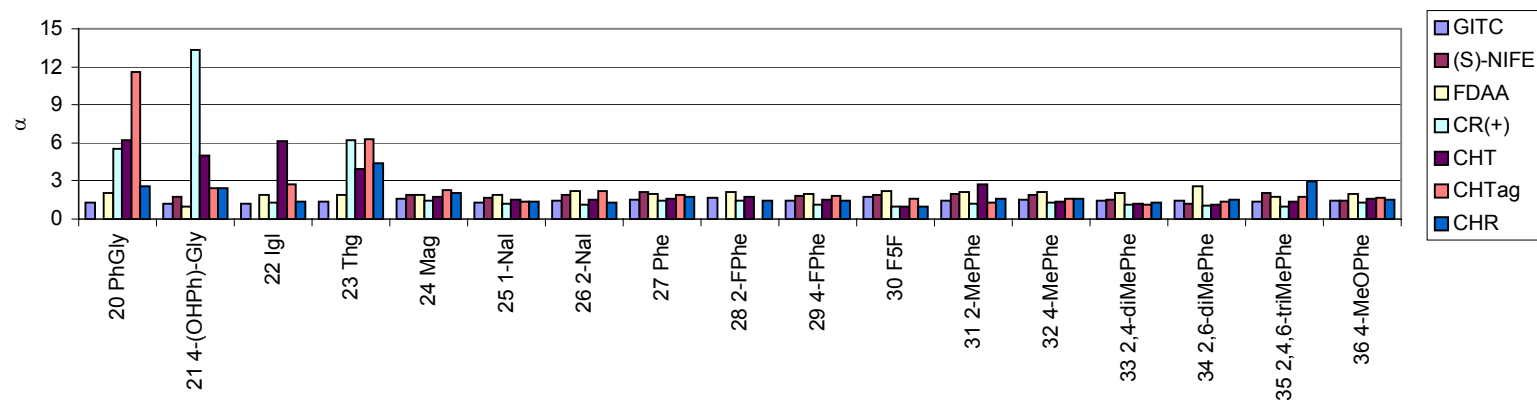
5.4.2. A közvetlen és közvetett módszerek elválasztóképességének összehasonlítása Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek elválasztása esetén

A közvetett kromatográfiás módszerek elválasztását 5.2. fejezetben bővebben kifejtettük, így itt csak a közvetett és közvetlen módszerek hatékonyságát hasonlítjuk össze. A 28. A. ábra a Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek közvetett és közvetlen analizisének elválasztási faktorait (α), míg a 28. B. ábra ugyanezen rendszerek felbontás (R_S) értékeit tünteti fel (az oszlopdiagrammok a F/12, 13, 14. Táblázat adatai alapján készültek.)

A 28. A. ábra adatait szemlélve csak néhány esetben találunk jelentős különbséget a szelektivitásban (α) a közvetett és közvetlen módszerek között. Kiugróan jó szelektivitást mutat a Crownpak CR(+) és a Chirobiotic T kolonna a PhGly (**20**), a 4-OHPhGly (**21**) és a Thg (**23**) sztereoizomerek elválasztásában, míg a Chirobiotic T és Tag kolonna az Igl (**22**) sztereoizomerek elválasztásában. A szelektivitás értékek a legtöbb esetben 1,5-2,5 között változnak, viszont azt figyelembe kell venni, hogy a közvetlen módszereknél a csúcsalak sok esetben kedvezőtlen. Az elválasztások széles, "tailinges" csúcsokkal jellemezhetők. Ez az oka, hogy a nagy α értékekhez egy-két kivételtől eltekintve kis felbontás értékek tartoznak. Az R_S értékeket tekintve (28. B. ábra) a közvetett módszerek nagy szelektivitás értékeihez nagy R_S értékek tartoznak mindhárom származékképzőnél, de főleg az (S)-NIFE és a GITC esetén.

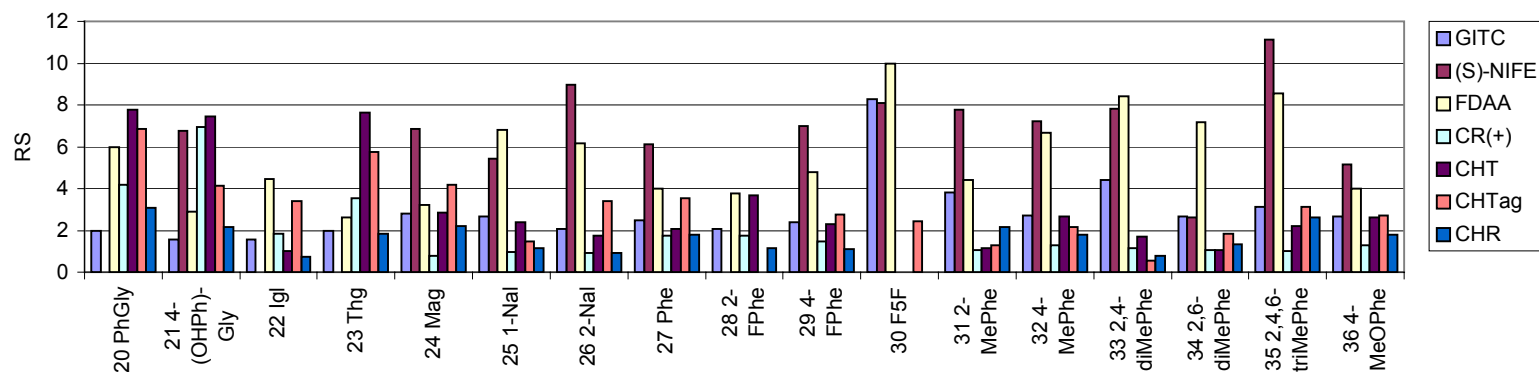
Összefoglalva: a közvetlen módszereknél az elválasztás kivitelezése egyszerűbb, de a fázisok drágábbak. A közvetett módszereknél a kromatográfiás elválasztást meg kell

előznie egy származékképzési eljárásnak, viszont a reagensek olcsóbbak. Az Gly analógok esetén bármelyik módszer jól alkalmazható. Az Ala és Phe analóg származékoknál viszont a hét módszer közül a Crownpak CR(+) oszlop kevésbé alkalmas ezen vegyületek sztereoizomerjeinek elválasztására, mint a három származékképzési módszer vagy a Chirobiotic kolonnák.



28.A. ábra

Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek közvetett és közvetlen elválasztásának elválasztási faktorai (α)



28.B. ábra

Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek közvetett és közvetlen elválasztásának felbontás (R_S) értékei

A kromatográfiás körülményeket lásd a Függelék 12., 13., 14. Táblázatában, (S)-NIFE esetén nincs adat PhGly (20), Igl (22), Thg (23) 2-FPhe (28) –re illetve CHTag esetén 2-FPhe(28) sztereoizomerekre; oszlop, CR(+), Crownpak CR(+), CHT, Chirobiotic T, CHTag, Chirobiotic Tag, CHR, Chirobiotic R

5.5. Közvetett és közvetlen kromatográfias módszerek elválasztóképességének összehasonlítása β -alkil-szubsztituált Trp analógok példáján

A β -alkil-Trp analógok analízisére olyan módszer fejlesztése volt a cél, mellyel mind a négy sztereoiszomer elválasztása megoldható. A közvetlen és közvetett módszerek kromatográfias adatait a Függelék 15. Táblázata foglalja össze vegyületekre lebontva. A közvetett és közvetlen módszerekkel végzett elválasztások felbontás értékeit külön-külön az egyes vegyületekre az 29. A-E. ábra tartalmazza. A 30. ábra válogatott, optimalizált elválasztásokat mutat be.

Az FDAA és GITC származékok elválasztása egy kivételtől eltekintve azonos eluensben történt: $\text{H}_2\text{O}(0,1\%\text{TFA})/\text{MeOH}=45/55$, $\text{H}_2\text{O}(0,1\%\text{TFA})/\text{MeCN}=65/35$. Az (S)-NIFE származékok elválasztásakor alkalmazott eluens abban különbözik az előbb említettektől, hogy a szerves módosító is tartalmazott 0,1%TFA-t. A királis állófázisoknál $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 100% MeOH, 100% HClO_4 , $\text{HClO}_4/\text{MeOH}$ eluenseket használtunk különböző áramlási sebességek mellett.

Az egyes vizsgált vegyületek sztereoiszomerjeit jellemző elválasztások elemzésekor a függelék 15. Táblázatában szereplő rövidítések alkalmaztuk, például a GITC/MeOH rövidítés jelentése az, hogy a felhasznált származékképző reagens a GITC volt, a keletkezett diasztereomer származékokat pedig MeOH tartalmú eluensben választottuk el.

A β -MeTrp (**43**, **44**) *eritro*- és *treo*- sztereoiszomerjeinek elválasztása Chirobiotic T oszlopon rövid idő alatt megvalósult, viszont az *eritro*-L, *treo*-L csúcsok elválasztása nem történt meg, illetve az *eritro*-D, *treo*-D csúcsoké is csak részlegesen. A Crownpack CR(+) oszlopon az elúciós sorrend $D < L$, ami megegyezik az irodalomban közölt adatokkal. A *treo*-izomerek elválasztása nem lehetséges valószínűleg szterikus okok miatt. A közvetett módszereknél az analízisek rövid időt vettek igénybe és sikeresnek bizonyultak ha az enantiomer elválasztásokat vizsgáljuk. A négy sztereoiszomer elválasztása FDAA/MeOH és (S)-NIFE/MeOH esetében közelítette meg az elvárt $R_S > 1,5$ értéket.

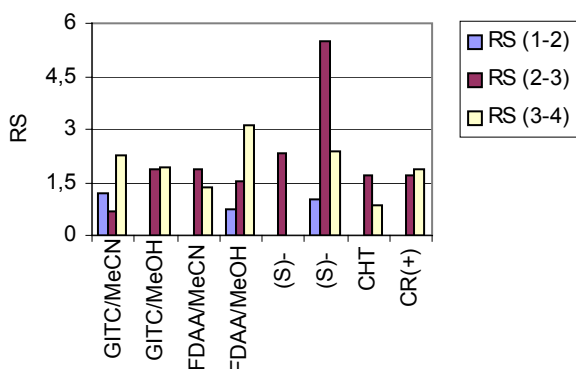
A β -2-PrTrp (**45**, **46**) esetén a metilcsoport helyett egy 2-propilcsoport beépítése a molekulába jelentősen megnövelte a retenciós faktort (k) MeCN tartalmú eluensben. A növekedés a GITC származékoknál volt a legjelentősebb, és kismértékű volt az FDAA származékoknál. A közvetlen módszerek közül a GITC/MeOH, FDAA/MeOH, FDAA/MeCN bizonyultak megfelelőnek a β -2-PrTrp sztereoiszomerjeinek elválasztásában. Az (S)-NIFE származékok elválasztása során az egyes enantiomerek felbontás értéke meghaladta $R_S > 1,5$, de az *eritro*-L, *treo*-L, illetve *eritro*-D, *treo*-D sztereoiszomerek közel

eluálódtak egymáshoz. A közvetlen módszerek ennél a vegyületnél nem voltak sikeresek, ennek az az oka, hogy a β -helyzetben lévő nagy térkitöltésű szubsztituens gátolja a kölcsönhatás kialakulását a királis állófázisok szelektoraival.

A β -3-pentTrp (**47, 48**) sztereoizomerek elválasztásánál a pentilcsoport tovább növelte a képződött diaszteromer termékek hidrofóbicitását, ami abban nyilvánult meg, hogy a retenciós idők növekedtek. Ami a legkifejezőbb a GITC származékok MeCN-os elválasztásában volt. A Chirobiotic T oszlopról együtt eluálódott a négy csúc, ami szintén azt mutatja, hogy a nagy térkitöltésű csoport gátolta a kölcsönhatás kialakulását az állófázissal. Crownpak CR(+) oszlopnál a *treo*-enantiomerek elválasztása sikertelen volt. Az *eritro*-enantiomerek a β -alkil lánc növelésével oly mértékben hidrofób jellegűvé váltak, hogy elúciójuk csak 10% MeOH jelenlétében volt megvalósítható és az eluens pH-ját a komplex stabilitásának csökkentése érdekében pH=4,0-re kellett emelni. Ilyen körülmények között az *eritro*-enantiomerek jól elválaszthatók voltak. A származékképzőkkel végzett sztereoizomer elválasztások felbontás eredményeit összehasonlítva - GITC/MeCN, (S)-NIFE/MeOH kivételével - ezen módszerek alkalmasnak bizonyultak a sztereoizomerek kromatográfias megkülönböztetésére.

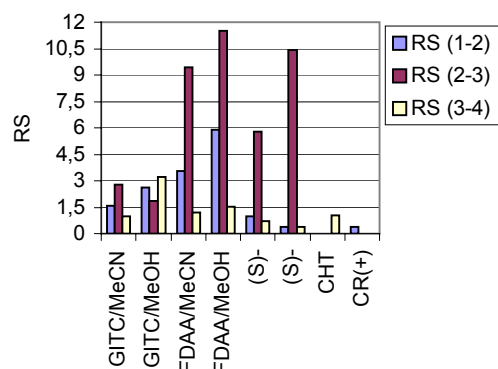
A β -PhTrp (**49, 50**) esetében a Crownpak CR(+) oszloppal végzett elválasztásoknál azt tapasztaltuk, hogy az *eritro*-enantiomerek részlegesen, a *treo*-izomerek pedig nem váltak el egymástól. A Chirobiotic T oszlopon az egyes enantiomerek elváltak egymástól, ami a fenilcsoport kölcsönhatás növelő hatásának tulajdonítható. Mind a közvetett módszereknél, mind a Chirobiotic T oszlopnál azt tapasztaltuk, hogy az egyes enantiomerek jól elválnak, viszont az *eritro*-L, *treo*-L, és *eritro*-D, *treo*-D sztereoizomerek elválasztása csak részleges volt. A közvetett módszerek közül a négy sztereoizomer FDAA és (S)-NIFE származékának elválasztása MeOH tartalmú eluensben jól megvalósítható. Mindhárom származékképzőnél az eluens szerves módosítójának változásával az elúciós sorrend is megváltozott.

A β -2,6-diMeOPhTrp-nál (**51,52**) a Crownpak CR(+) oszlopon hasonlókat tapasztaltunk, mint az előzőekben. A Chirobiotic T oszlop csak az enantiomerek elválasztásában volt eredményes. Ennek a vegyületnek az elválasztásában a származékképzők közül az elvárt $R_s \geq 1,5$ eredményt csak MeCN tartalmú eluensben tudtuk megvalósítani, illetve megközelíteni FDAA és (S)-NIFE származékképzők esetén.



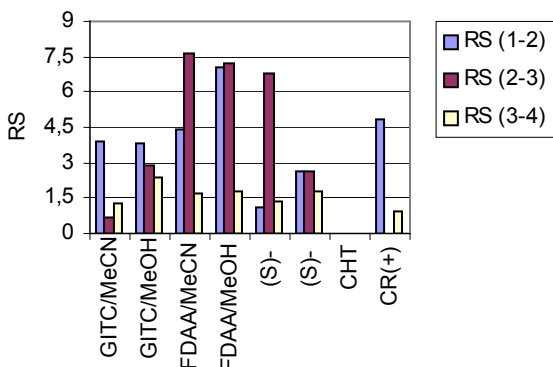
29. A. ábra

Az *eritro*-, *treo*-β-MeTrp sztereoizomerek közvetett és közvetlen elválasztásának felbontás értékei



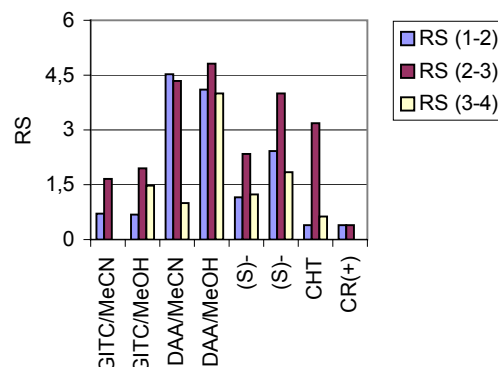
29. B. ábra

Az *eritro*-, *treo*-β-2-PrTrp sztereoizomerek közvetett és közvetlen elválasztásának felbontás értékei



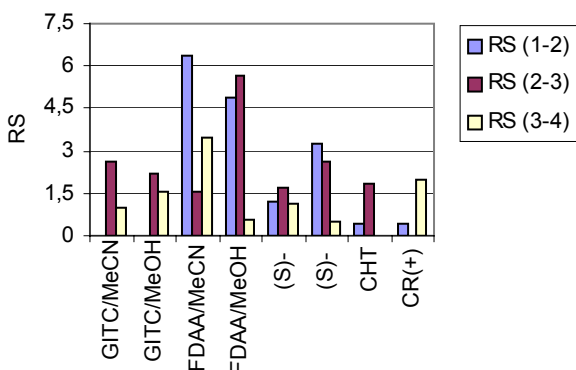
29. C. ábra

Az *eritro*-, *treo*-β-3-pentTrp sztereoizomerek közvetett és közvetlen elválasztásának felbontás értékei



29. D. ábra

Az *eritro*-, *treo*-β-PhTrp sztereoizomerek közvetett és közvetlen elválasztásának felbontás értékei

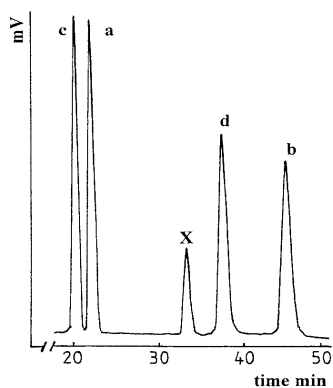


29. E. ábra

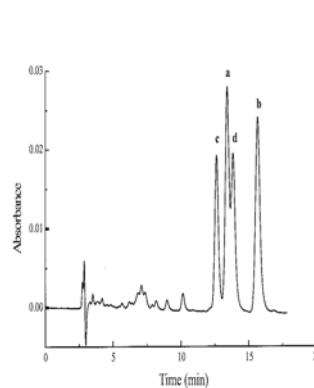
Az *eritro*-, *treo*-β-2,6-diMeOPhTrp sztereoizomerek közvetett és közvetlen elválasztásának felbontás értékei

A β -alkil-szubsztituált Trp sztereoizomerek elválasztása közvetlen módszerekkel nem oldható meg, a legjobb esetben is a négy sztereoizomer három csúcsban eluálódik. A közvetett módszerek F/15. Táblázatban szereplő eluens összetételeit lehet úgy módosítani, hogy legalább két módszerrel megoldható legyen az alapvonalra vagy közel alapvonalra történő elválasztás. (S)-NIFE-vel képzett diasztereomerek elválasztását a GITC vagy FDAA származékképzővel kapott összehasonlító a kromatogramokat a 30. ábra mutatja be. Az ábrán látható, hogy az (S)-NIFE a legtöbb esetben van olyan hatékony vagy hatékonyabb, mint a GITC vagy FDAA származékképző a β -alkil-szubsztituált Trp sztereoizomerek kromatográfiás elválasztásában.

β -metiltriptofán (43, 44)

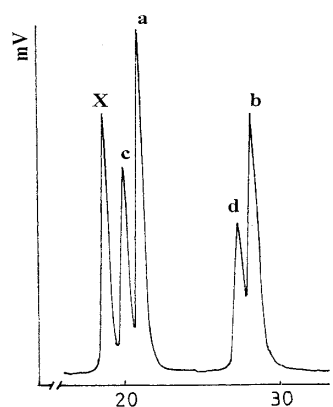


(S)-NIFE
oszlop: DiscoveryC₁₈
eluens: H₂O(0,1%TFA)/
MeOH(0,1%TFA)=50/50 (v/v)
detektálás: 205 nm

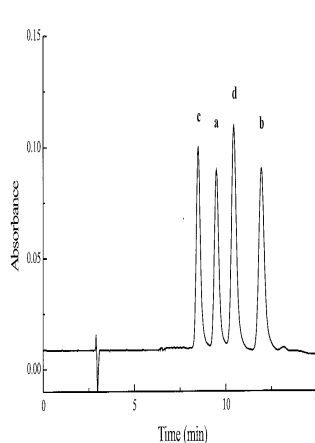


GITC
oszlop: Vydac 218TP54
eluens: H₂O(0,1%TFA)/
MeCN=65/35 (v/v)
detektálás: 250 nm

β -izopropiltriptofán (45, 46)

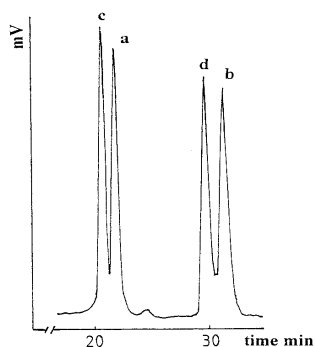


(S)-NIFE
oszlop: Vydac218TP54
eluens: H₂O(0,1%TFA)/
MeCN(0,1%TFA)=65/35
(v/v)
detektálás: 205 nm



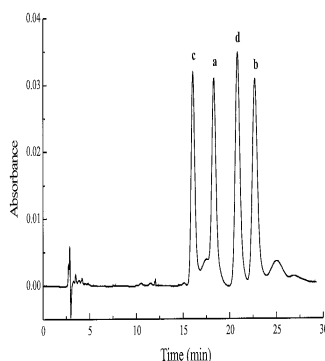
GITC
oszlop: Vydac218TP54
eluens: H₂O(0,1%TFA)/
MeCN=40/60 (v/v)
detektálás: 250 nm

β -izopentiltriptofán (47, 48)



(S)-NIFE

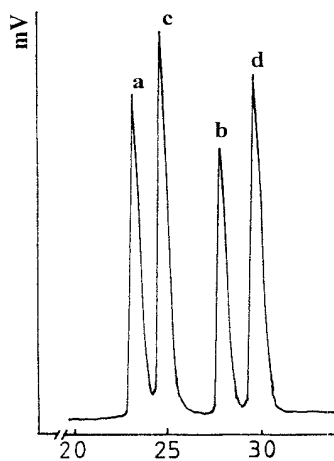
oszlop: Vydac218TP54
eluens: $\text{H}_2\text{O}(0,1\%\text{TFA})/\text{MeCN}(0,1\%\text{TFA})=60/40$
(v/v)
detektálás: 205 nm



GITC

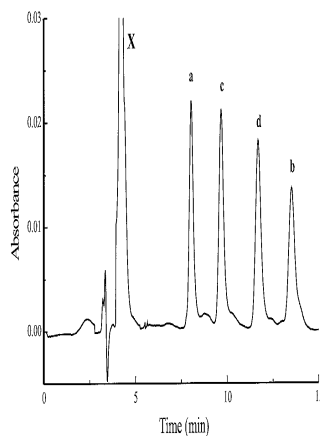
oszlop: Vydac218TP54
eluens: $\text{H}_2\text{O}(0,1\%\text{TFA})/\text{MeCN}=40/60$ (v/v)
detektálás: 250 nm

β -feniltriptofán (49, 50)



(S)-NIFE

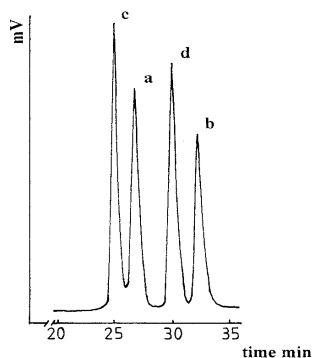
oszlop: Vydac218TP54
eluens: $\text{H}_2\text{O}(0,1\%\text{TFA})/\text{MeCN}(0,1\%\text{TFA})=65/35$
(v/v)
detektálás: 205 nm



FDAA

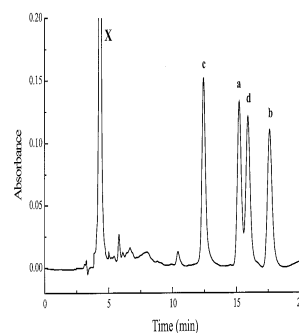
oszlop: Vydac218TP54
eluens: $\text{H}_2\text{O}(0,1\%\text{TFA})/\text{MeCN}=40/60$ (v/v)
detektálás: 340 nm

β -dimetoxi-feniltriptofán (51, 52)



(S)-NIFE

oszlop: Vydac218TP54
eluens: $\text{H}_2\text{O}(0,1\%\text{TFA})/\text{MeCN}(0,1\%\text{TFA})=65/35$
(v/v)
detektálás: 205 nm



FDAA

oszlop: Vydac218TP54
eluens: $\text{H}_2\text{O}(0,1\%\text{TFA})/\text{MeCN}=60/40$ (v/v)
detektálás: 340 nm

30. ábra

β -alkil-szubsztituált Trp analóg sztereoiszomerek kromatográfiás elválasztása (S)-NIFE illetve GITC vagy FDAA származékképzők alkalmazásával

5.6. Összefoglalás [(S)-NIFE]

Közvetett királis kromatográfias módszereket dolgoztunk ki az (S)-N-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil-észter alkalmazásával fehérjealkotó és nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek elválasztására. Az (S)-NIFE-t sikeresen alkalmaztuk többek között Gly, Ala, Phe, Pro analógok sztereoizomerek, β -Me(alkil)Trp sztereoizomerek, tetrahydroizokinolin vázas karbonsav sztereoizomerek, piperkolinsav származékok sztereoizomerjeinek elválasztására.

HPLC-MS módszerrel kimutattuk, hogy a származékképzési reakciót melléktermékek 4-nitrofenol, fenilalanin-metoxietil-észter (Phe észter), *N,N*-bisz-(3-fenilpropionsav-metoxietil-észter-2-il) ("szimmetrikus karbamid") keletkezése kíséri.

Rámutattunk, hogy a származékképzési reakció hozama függ a reakcióidőtől, pH-tól és a reagens/aminosav molaránytól. Az egyes aminosav családokra optimalizáltuk a származékképzési reakció körülményeit.

Sztérikusan erősen gátolt Pro analógok esetében kimutattuk, hogy a jelentős reagensfelesleg elősegíti a származékképzési reakció végbemenetelét, és az el nem reagált származékképző sikeresen eltávolítható a rendszerből Gly hozzáadásával.

HPLC-MS módszerrel igazoltuk, hogy a származékképző reagens nemcsak az aminosav primer aminocsoportjával, hanem szekunder aminocsoporttal és fenolos hidroxilcsoporttal is reakcióba lép. A képződött mono- és bisz-származékok elválasztására módszert dolgoztunk ki.

Megállapítottuk, hogy a szerves módosítóként MeOH-t tartalmazó eluens az (S)-NIFE-vel képzett diasztereomerek elválasztásában nagyobb szelektivitást mutatott. A MeOH tartalmú eluensben egyes esetekben, az egyik diasztereomer termék együtt eluálódott a "szimmetrikus karbamiddal". Ez az együttes elúció a MeOH tartalomú eluens összetételének módosításával vagy a gradiens meredekségének változtatásával kiküszöbölhető.

Megállapítottuk, hogy az (S)-NIFE származékok retencióját egy homológ soron belül elsősorban a hidrofób jelleg határozza meg.

A β -alkil-szubsztituált-Trp analóg sztereoizomerek elválasztásakor igazoltuk, hogy a négy izomer elválasztásában (S)-NIFE hatékonysága meghaladja a közvetlen módszereket és összemérhető a GITC, és az FDAA származékképzőkével.

A β -MePhe, β -MeTic, β -MeTyr, β -MeTrp, β -alkil-szubsztituált-Trp analóg sztereoizomerek esetén rávilágítottunk arra, hogy a sztereoizomerek elválasztásakor az

eluens szerves módosítójának cseréje, illetve a kolonna cseréje megváltoztathatja az egyes sztereoizomerek elúciós sorrendjét.

Az (S)-NIFE származékok elúciós sorrendje általában (S)<(R), kivéve azokat az aminosavakat, amelyek további hidrogénhidas kölcsönhatás kialakítására alkalmas funkciós csoporttal rendelkeznek, illetve azokat amelyeknek a Cahn-Ingold-Prelog szabály szerint komformációjuk ellentétes.

A közvetett és közvetlen kromatográfiás módszerek összehasonlítását végeztük el Pro, Gly, Ala, Phe és β -alkil-Trp sztereoizomerek elválasztására. Megállapítottuk, hogy: Pro analóg sztereoizomerek elválasztásában az (S)-NIFE a leghatékonyabb, a Gly analógok estében mind a közvetett mind a közvetlen módszerek jól alkalmazhatók. Ala, Phe analógok elválasztására az antibiotikum alapú kolonnák mellett a származékképző reagensok közül az (S)-NIFE, GITC, FDAA is alkalmasak. A β -alkil-Trp sztereoizomerek csak közvetlen módszerekkel (S)-NIFE, GITC, FDAA választhatók el. A királis származékképzők közül a leghatékonyabb az (S)-NIFE.

A származékképző reagenst 2002-ben a Fluka kereskedelmi forgalomba hozta.

6. Makrociklusos antibiotikum alapú királis kolonnák kromatográfiás viselkedésének összehasonlítása

Ebben a fejezetben a teicoplanin és a teicoplanin aglikon alapú királis állófázisok elválasztóképességét hasonlítjuk össze. Ezek a molekulák a Chirobiotic T és Chirobiotic Tag oszlopok szelektorai.

A kiválasztott vegyületek három csoportba sorolhatók: Gly, Ala és Phe analógok, "iminosavak" és β -aminosavak. A Gly, Ala és Phe analógok a rajtuk lévő szubsztituensek hidrofób jellegében és térkitöltésében különböznek egymástól. Ugyanez igaz az "iminosavak"-ra és a β -aminosavakra is, ahol a gyűrűben, illetve a gyűrűn lévő szubsztituensek minősége, térkitöltése, alifás, aromás jellege széles skálán mozog. A mérési eredményeket F/16-18. Táblázatokban foglaltuk össze, amelyek tartalmazzák a retenciós (k) és elválasztási faktorokat (α), a felbontást (R_s) és az enantioszelektív megkötődést jellemző standard szabadentalpia-változás különbségeket [$\Delta(\Delta G^\circ)$].

6.1. Az alkalmazott mozgófázisok

A vizsgált minták közül a Phe analóg sztereoizomerek elválasztására mind Chirobiotic T, mind Chirobiotic Tag oszlopon puffert tartalmazó eluent alkalmaztunk. A puffer 0,1% trietilammónium-acetát (pH=6,5) vizes oldata és az alkalmazott eluensösszetétel 0,1% TEAA (pH=6,5)/MeOH=20/80 (v/v) volt. Az "iminosavak"-nál mindkét állófázison az elválasztásokat 0,1% TEAA (pH=6,5)/MeOH=60/40 (v/v) tartalmú eluensben végeztük. A β -aminosavak elválasztására több eluens rendszert is kipróbáltunk, így többek között H₂O/MeOH, 0,1%TEAA (pH=4,1)/MeOH, 0,1%TEAA (pH=4,1)/MeCN és 100% MeOH eluens rendszereket alkalmaztunk. Optimalizálás céljából különböző áramlási sebességeket is kipróbáltunk. A polár-organikus módban a méréseket MeOH/HOAc/TEA=100/0,1/0,1 (v/v/v) összetételű eluenssel végeztük, mindkét állófázison.

6.2. A kromatográfiás adatok elemzése

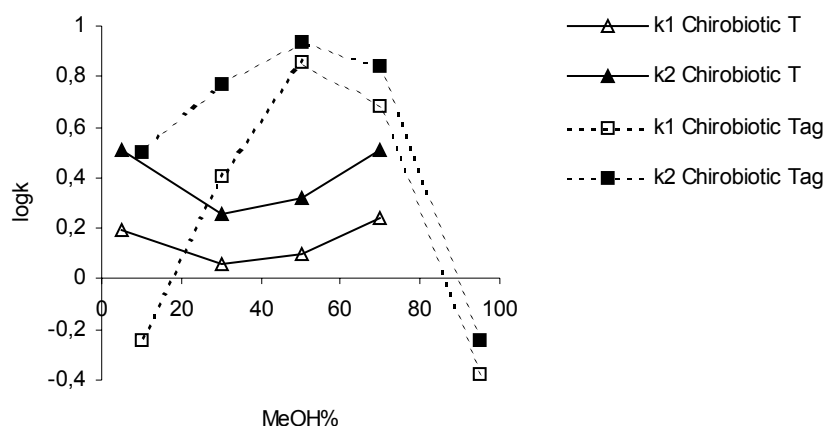
A Chirobiotic oszlopokon a szelektor antibiotikum molekula kilenc apoláris metilénsoporton és vagy egy ureido vagy egy karbamátsoporton keresztül kapcsolódik a szilikagélhez [198]. A szabad teicoplanin 14 poláris hidroxilsoporttal rendelkezik, ezek közül négy fenolos hidroxilsoport, ezenkívül van egy szabad aminocsoportja és egy

karboxilcsoportja. Az egyik cukorrészen lévő alkillánc kilenc metilénecsoportja és a molekula makrociklusos részében lévő hat amidkötés, valamint a hét benzolgyűrű apoláris jellegű csoportok. Az aglikon molekula csak hét poláris hidroxilcsoporttal rendelkezik, amelyek közül hat fenolos hidroxilcsoport. Erről a molekuláról hiányoznak a cukorrészek és az alkillánc. Itt is jelen van a primer aminocsoport, a hat apoláris amidkötés és a hét benzolgyűrű.

Berthold és munkatársai [199] megfigyelték, hogy ugyanolyan eluensösszetétnél a közepesen poláris vegyületek retenciós faktoraik körülbelül azonosak a két királis állófázison, vagy valamivel kisebbek az aglikon fázison. Viszont poláris komponensek esetén néha az aglikon fázison nagyobb retenciós faktorokat kaptak. D'Acquarica és munkatársai [164] egy A-40,926 glükopeptidet (abban tér el a teicoplanintól, hogy erről hiányzik a β -D-acetil-glükózamin) tartalmazó királis állófázist alkalmaztak. Megállapították, hogy az aliciklusos és ciklusos β -aminosavak retenciós faktoraik némileg nagyobbak a teicoplanin állófázison, mint az aglikon fázison. A két állófázis összehasonlítása a már említett modellvegyületek vizsgálatával történt.

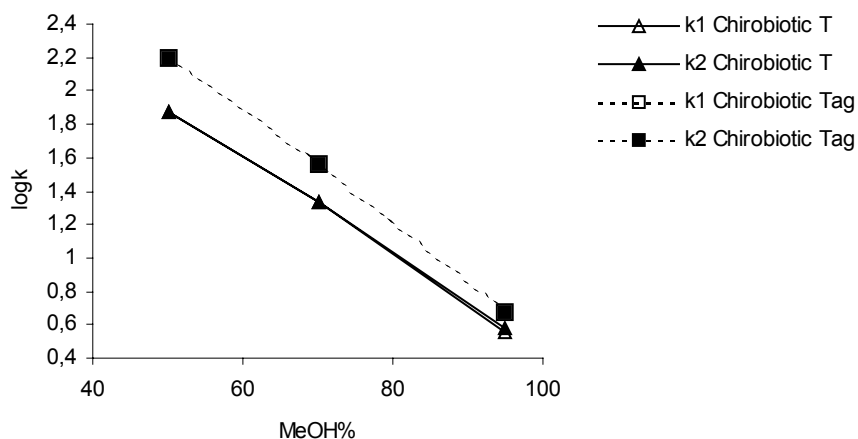
A három vegyületcsoportból egy-egy vegyületet kiválasztva meghatároztuk a retenciós faktor (k) eluensösszetétől való függését. A vegyületek retenciós faktoraikat a MeOH tartalom függvényében ábrázolva a két állófázison a 31.A. és 31.B. ábrákön szemléltettjük. A Phe analógok közül a 2-MePhe-t (**31**) Péter és munkatársai [200] egy korábbi munkájukban vizsgálták, és azt tapasztalták, hogy a mozgófázis MeOH tartalmának növelésével a retenciós faktor változása U-alakú görbét eredményez. Chirobiotic T oszlopon az "iminosavak" közül a Pip-et (**69**) vizsgáltuk és az α -aminosavakhoz hasonlóan U-alakú görbét kaptunk. Ennél a vegyületcsoportnál a Chirobiotic Tag oszlopon rendkívüli viselkedést tapasztaltunk, mert a retenciós faktor (k) maximum görbe szerint változik a MeOH tartalom növekedésével. A β -aminosavak közül az (**55**) sztereoizomert választva, a retenciós faktorok paraméterei a MeOH tartalom növekedésével csökkentek mindkét állófázison. Ez a viselkedés jellegzetes fordított fázisú elválasztásra utal. A retenciós faktor növekedése (k) vízben gazdag eluensben a víztartalom növekedésével egyre fokozódó hidrofób kölcsönhatásnak tulajdonítható. U-alakú görbék esetén a nagyobb MeOH koncentrációknál az MeOH növelésével a retenciós faktorok növekedtek. Ez annak köszönhető, hogy az aminosavak oldhatósága csökken a nagyobb MeOH-tartalmú eluensben. Ezt a viselkedést más antibiotikum alapú állófázisoknál is megfigyelték [201], és a következő fejezetben a retenciós faktorok elemzésénél mi is felhívjuk erre a figyelmet az *eritro*- β -MeTrp és a DNPy-Trp retenciós paramétereinek elemzése kapcsán. A

vizsgálatok eredményeképpen megállapítottuk, hogy az α -aminosavak, "iminosavak", β -aminosavak a k értékei eltérő módon változtak a MeOH tartalom változásával.



31.A. ábra

Pipekolinsav retenciós paramétereinek változása a MeOH tartalom függvényében Chirobiotic T és Chirobiotic Tag oszlopokon



32. B. ábra

Az **55** vegyület retenciós paramétereinek változása a MeOH tartalom függvényében Chirobiotic T és Chirobiotic Tag oszlopokon

A Gly, Ala, Phe analógok és az "iminosavak" esetén az először eluálódó enantiomer retenciós faktora ugyanolyan körülmények között a teicoplanin állófázison kisebbek, mint az aglikon fázison (F/16-18. Táblázat). A Gly, Ala, Phe analógok esetén a másodikként eluálódó enantiomer retenciós faktora általában 1,5-2-szer nagyobb Chirobiotic Tag-on, mint Chirobiotic T-n, kivétel a 4-OHPhGly (**21**). Az "iminosav" sztereoizomerek esetén ez az eltérés még látványosabb a két állófázison, kivétel a *cisz*-4-OHPro (**66**). A β -aminosavaknál fordított fázisú rendszerben 100% MeOH tartalmú eluensben mért eredményeket összehasonlítva, mindkét csúcs retenciós faktora a Chirobiotic Tag-on 1,5-3-

szorosa a Chirobiotic T-n mértnek. A polár-organikus módban mért k értékek néhány kivételtől eltekintve mindössze 10-30 %-kal alacsonyabbak a Chirobiotic T oszlopon, mint Chirobiotic Tag oszlopon. Kivételek az **(55)**, **(58)** sztereoizomerek.

Az elválasztás hatékonyságát jellemző felbontás (R_S) értékét vizsgálva Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek mindkét állófázison kevés kivétellel $R_S > 1$ értékkel voltak elválaszthatók [kivétel az F5F **(30)** a Chirobiotic T és a 2,4-diMePhe **(33)** a Chirobiotic Tag oszlopon.]. Az F5F **(30)** és a 2,4-diMePhe **(33)** sztereoizomerek rossz elválasztása valószínűleg szterikus okokra vezethető vissza, egyrészt a molekula mérete, másrészt a szubsztituensek aszimmetrikus elhelyezkedése miatt. A felbontás értékek többnyire $R_S = 2-3$ közöttiek, de nem ritka az $R_S = 3$ -t meghaladó érték. Az "iminosavak" esetén a Chirobiotic T oszlopon a baikain **(68)** és a *transz*-4-OHPip **(71)** sztereoizomerek nem választhatók el. A Chirobiotic Tag oszlopon az α -MePro **(67)** és a **(72)** sztereoizomerek csak részleges elválást mutattak. A többi sztereoizomerre megfelelően nagy R_S értékeket kaptunk. A Chirobiotic oszlopok a legrosszabb szelektivitást (α) a β -aminosavak esetén mutattak. Míg a Chirobiotic T oszlopon többnyire találtunk olyan eluensösszetételt, hogy $R_S > 1$ értéket kapjunk, addig a Chirobiotic Tag oszlopon az R_S értéke a legjobb esetben is alatta maradt az $R_S = 1$ értéknek, vagy sok esetben egyáltalán nem tapasztaltunk elválasztást.

6.3. A Chirobiotic T és a Chirobiotic Tag oszlopok enantioszelektivitása

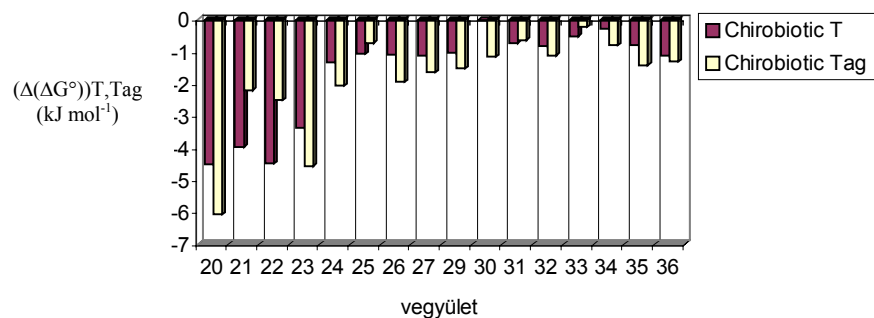
A Chirobiotic állófázisok az α -aminosavak esetén olyan szelektívek, hogy sok esetben az először eluálódó enantiomer csúcs után jó néhány perccel eluálódik a második enantiomer csúcsa. Az elválasztási tényező (α) a Phe és Ala analógok esetén Chirobiotic T oszlopon 1-1,8 között változik, és a Gly analógok közül a **(21)** és **(22)** sztereoizomerekre meglepően nagy α értékeket kaptunk. A Chirobiotic Tag oszlopon ez az érték a Phe és Ala analógokra 1,10-2,80 közötti. Az "iminosavak" esetén α értékek Chirobiotic T oszlopon $\alpha = 1,20-2,80$, illetve Chirobiotic Tag oszlopon $\alpha = 1,05-3,40$ között változtak. A β -aminosavakra az α egy-két kivételtől eltekintve $\alpha = 1,00-1,20$ között változik mindkét királis szelektoron.

Az elválasztási tényező (α) felhasználásával, a következő összefüggés alapján, az enantioszelektivitást jellemző standard szabadentalpia-változás különbségeihez jutunk:

$$\Delta(\Delta G^\circ) = -RT \ln \alpha \quad T = 298K$$

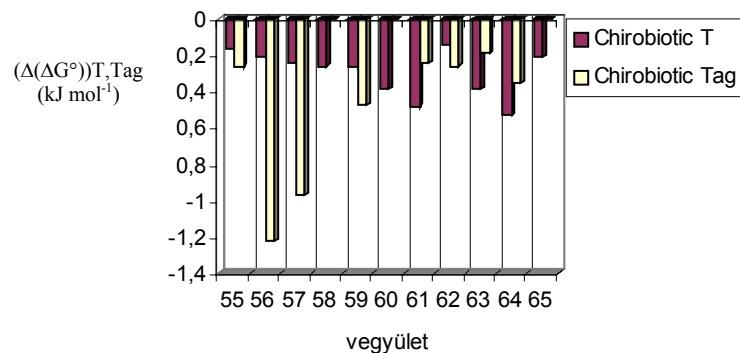
A fenti összefüggés alapján számított $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékeket a F/16-18. Táblázatokban és a 32. A.-D. ábrákon tüntettük fel. (a 32. C. ábrán a β -aminosavak fordított fázisú méréseinél, ha

több eredmény állt rendelkezésünkre, akkor a $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek átlagát ábrázoltuk. A $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek minden esetben negatívak (vagy 0). Az Ala és Phe analógok $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékei $-0,2$ és $-2,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ között változnak, a Gly analógok $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékei ennél valamivel nagyobb negatív értékek ($-1,3$ és $-4,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ tartományba esnek). Hasonló nagyságrendű $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékeket ($-0,1$ és $-3,0 \text{ kJ mol}^{-1}$) mértünk az "iminosav" sztereoizomerek elválasztása esetén. Mindkét vegyületcsoportra általánosan jellemző volt, hogy a Chirobiotic Tag oszlopon mért $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek negatívabbak. A β -aminosav sztereoizomerek esetén általában pozitívabb $\Delta(\Delta G^\circ)$ értéket (kisebb $-\Delta(\Delta G^\circ)$) mértünk és a Chirobiotic T oszlopon mért $\Delta(\Delta G^\circ)$ nagyobb negatív érték volt, mint a Chirobiotic Tag oszlopon mért érték.



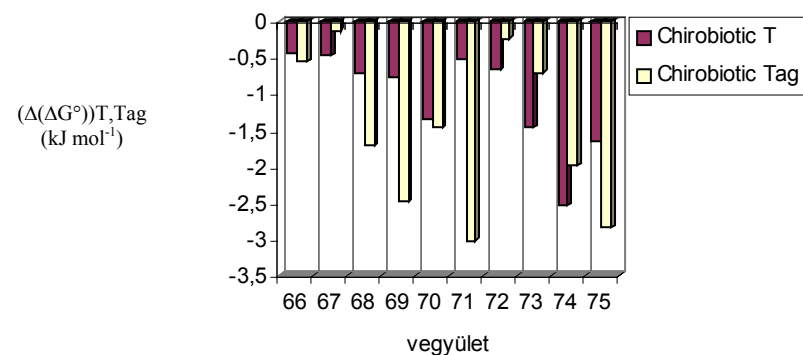
32. A. ábra

A Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek elválasztásának $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékei teicoplanin és teicoplanin aglikon szelektorokon



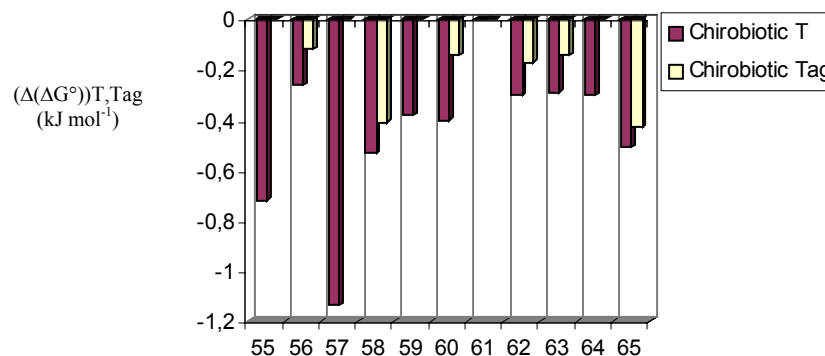
32. C. ábra

A β -aminosav sztereoizomerek elválasztásának $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékei teicoplanin és teicoplanin aglikon szelektoron polár-organikus módban



32. B. ábra

Az "iminosav" sztereoizomerek elválasztásának $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékei teicoplanin és teicoplanin aglikon szelektoron



32. D. ábra

A β -aminosav sztereoizomerek elválasztásának $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékei teicoplanin és teicoplanin aglikon szelektoron fordított fázisú módban

6.4. A szénhidrát részek szerepe az elválasztásban

A szénhidrát részek önmagukban is királisak, ezért segíthetik az enantiomer elválasztást. A két királis állófázison kapott eredmények összehasonlítása segítséget nyújthat abban, hogy megértsük, mi a szerepe a cukorrészeknek az elválasztásban. Ahhoz, hogy mennyiségileg is jellemezzük a cukorrészek hatását, meghatároztuk a két állófázison mért standard szabadentalpia-változás különbségét: $(\Delta(\Delta G^\circ))_{\text{Tag}} - (\Delta(\Delta G^\circ))_{\text{T}}$. Ezeket az adatokat a három vegyület csoportra a 33. ábrán foglaltuk össze, a β -aminosavak esetén azzal a megszorítással, hogy a polár-organikus és fordított fázisú módban külön-külön képeztük a különbséget és szemléltettük azt az ábrán. A negatív értékek az oszlopdiagrammon azt jelentik, hogy a sztereoizomerek jobban elváltak az aglikon állófázison, a pozitív értékek pedig azt, hogy az elválasztás eredményesebb volt az eredeti teicoplanin kolonnán, amely a szénhidrát részeket is tartalmazza. Az általunk vizsgált két királis állófázis közötti enantioszelektív szabadentalpia különbség elsősorban sztérikus gátlásnak tulajdonítható, (a cukorrészek elfedik a kosárrészt) de más lehetőségeket is figyelembe kell venni.

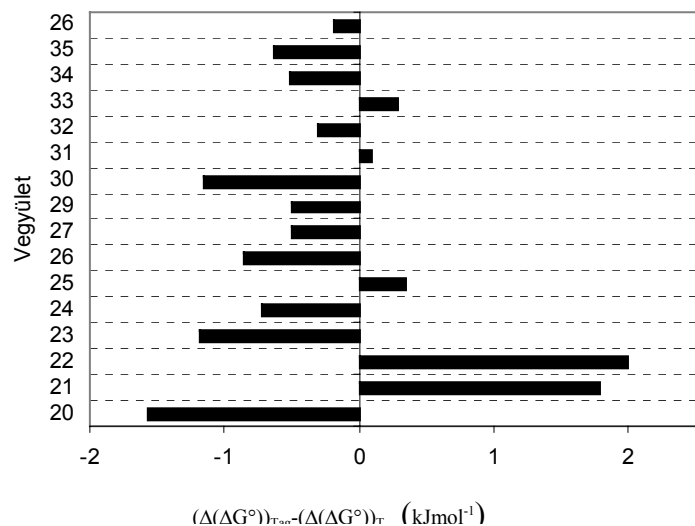
A glicin analógok közül a 4-OHPhGly (**21**) és az Igl (**22**) sztereoizomerek sokkal jobb enantioszelektivitást mutattak a teicoplanin állófázison, itt a cukorrészek segítették a királis felismerést. Érdekes eredményt hozott az 1-Nal (**25**) és 2-Nal (**26**) sztereoizomerek elválasztása. Az előbbi elválasztása a teicoplanin, míg az utóbbi a teicoplanin aglikon állófázison kedvezményezettebb. Ez valószínű sztérikus okokra vezethető vissza, a 2-Nal (**26**) elhelyezkedése a teicoplanin kosarában kedvezőbb. A Phe analóg sztereoizomerek, kevés kivételtől eltekintve [2-MePhe (**31**) és 2,4-diMePhe (**33**)], sokkal kedvezőbben választhatók el teicoplanin aglikon állófázison, mint a cukorrészt is tartalmazó teicoplaninen.

Megállapítható, hogy a teicoplaninen lévő cukorrészek nem feltétlen szükségesek az α -aminosav sztereoizomerek elválasztásához. Ezek a vegyületek valószínűleg az aglikon kosárrészébe kötődnek be, közel a primer amino funkciós csoporthoz, ezáltal az eredeti teicoplanin molekulához képest nagyobb enantioszelektivitással jellemezhető elválasztást biztosítanak. A sztérikus gátláson kívül az aglikonon felszabadult két fenolos és egy alkoholos hidroxilcsoport valószínűleg tovább növeli az α -aminosavakkal létrejövő kölcsönhatások valószínűségét.

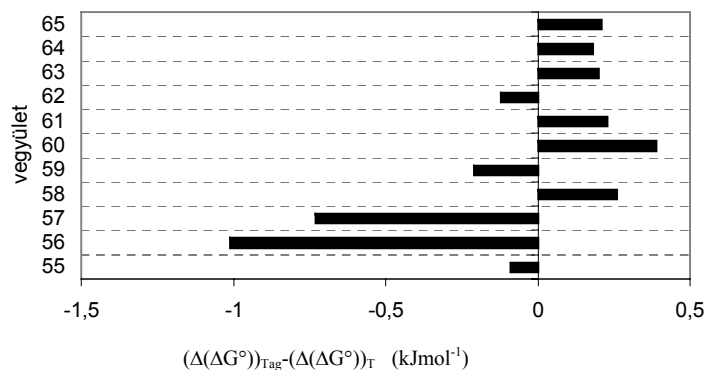
Az "iminosav" sztereoizomerek körül a sztérikusan erősen gátolt α -MePro (**74**) és a több heteroatomot tartalmazó gyűrűs vegyületek (**79**), (**80**) és (**81**) kedvezőbben

választhatók el teicoplanin állófázison (kivétel ebben a sorban a **(81)**). Ennek valószínű oka, hogy α -MePro (**74**) esetén a merev szerkezet nem biztosít elégséges kölcsönhatást a teicoplanin aglikon kötőhelyeivel, míg a **(79)**, **(80)** és **(81)** sztereoizomerek esetén a cukorrészekkel is járulékos kölcsönhatások alakulnak ki a heteroatomok révén.

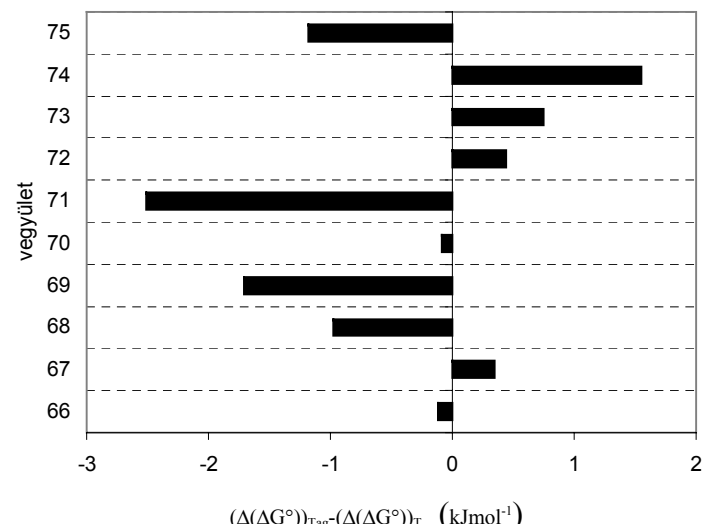
A β -aminosavak esetén a molekula sztérikus elrendeződése, valamint a karboxilcsoport és a királis szénatom közti nagyobb távolság további hatással van az enantioszelektivitásra. E vegyületcsoport nagyobb része a teicoplanin állófázison mutat jobb enantioszelektivitást fordított fázisú módban. Ennek valószínű oka, hogy a teicoplanin aglikon állófázison az elsődleges kölcsönhatást követően (az aglikon $-\text{NH}_3^+$ csoportja és az aminosav $-\text{COO}^-$ csoportja közti elektrosztatikus kölcsönhatás) kevésbé kedvezményezett a másodlagos kölcsönhatások létrejötte, mivel a királis szénatom egy szénatommal nagyobb távolságra van a karboxilcsoporttól, mint ahogy az, az α -aminosavak esetén volt. Másrésről a teicoplanin esetén a cukorrészben levő funkciós csoportok a β -aminosavaknál valószínűleg hozzájárulnak a másodlagos kölcsönhatások kialakulásához, ezért lesz ezen sztereoizomerek elválasztása a teicoplaninen általában kedvezményezett. Polár-organikus fázisban meghatározó jelentőségűek a π - π és a hidrogénhid kölcsönhatások, amelyek kismértékű elválasztást biztosítanak a β -aminosav sztereoizomereknek. Azok a vegyületek, amelyek kevésbé szimmetrikusak és további hidrofób vagy π - π kölcsönhatás kialakítására képesek, azok a Chirobiotic T oszlopon jobban elválnak.



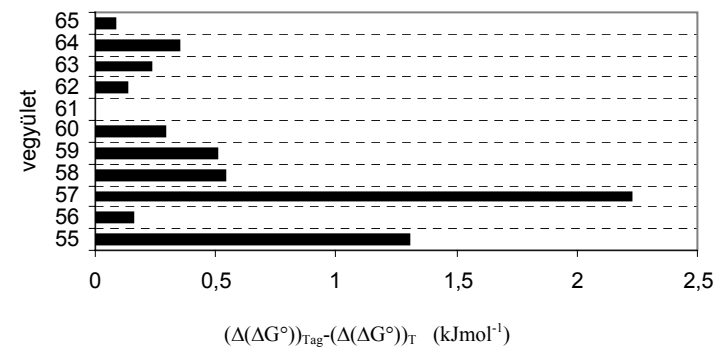
33.A. ábra
A Gly, Ala, és Phe analóg sztereoizomerek elválasztásának $[(\Delta(\Delta G^\circ))_{T_{\text{ag}}} - (\Delta(\Delta G^\circ))_T]$ értékei



33.C. ábra
A β -aminosav sztereoizomerek elválasztásának $[(\Delta(\Delta G^\circ))_{T_{\text{ag}}} - (\Delta(\Delta G^\circ))_T]$ értékei polár-organikus módban



33.B. ábra
Az "iminosav" sztereoizomerek elválasztásának $[(\Delta(\Delta G^\circ))_{T_{\text{ag}}} - (\Delta(\Delta G^\circ))_T]$ értékei



33.D. ábra
A β -aminosav sztereoizomerek elválasztásának $[(\Delta(\Delta G^\circ))_{T_{\text{ag}}} - (\Delta(\Delta G^\circ))_T]$ értékei fordított fázisú módban

6.5. Összefoglalás

A Gly, Ala, Phe analóg sztereoizomerek retenciós paraméterei a MeOH tartalom növekedésével U-alakú görbe szerint változtak mindkét királis állófázis esetén.

A β -aminosav sztereoizomerek retenciós paraméterei a MeOH tartalom függvényében a fordított fázisú kromatográfiának megfelelő módon változnak a Chirobiotic T és TAG oszlopokon, azaz a MeOH tartalom növekedésével a retenciós faktorok csökkennek.

Az "iminosav" enantiomerek retenciós paraméterei a MeOH tartalom függvényében a Chirobiotic T és TAG oszlopokon eltérően viselkednek. A Chirobiotic T oszlopon U-alakú görbe szerint, míg a Chirobiotic TAG oszlopnál fordított, maximum görbe szerint változnak a retenciós faktor értékek a MeOH tartalom függvényében.

A királis elválasztás szempontjából nézve a cukorrészek háromféleképpen befolyásolhatják az elválasztási folyamatot:

- A sztérikus gátlás során a cukorrészek elfoglalják a makrociklusos gyűrű belsejében lévő helyet, így gátolják más molekuláknak a kötőhelyhez való hozzáférhetőségét.
- A cukorrészek elfoglalják az aglikonon lévő lehetséges kötőhelyeket, mivel két cukoregység fenolos hidroxilcsoporton keresztül, egy pedig alkoholos hidroxilcsoporton át kapcsolódik a szelektorhoz.
- A három cukorrész maga is királis, hidroxil, éter, és amid funkciós csoportokat tartalmaz, ami kötőhelyként is szolgálhat.

Primer és szekunder α -aminosavak esetén a cukorrészek által biztosított királis centrumok és funkciós csoportok jelenléte nem szükséges a sikeres királis elválasztáshoz.

β -aminosavak esetében a cukorrészek és az apoláris oldallánc jelenléte elősegítette a királis felismerést.

7. A hőmérséklet hatása a királis kromatográfiára

7.1. A kromatográfiás paraméterek vizsgálata a hőmérsékletváltozás függvényében

Mint az "Irodalmi összefoglaló"-ban említettük, a hőmérsékletnek alig van szerepe a nagyhatékonyságú elválasztási technikákban (szokásos akirális HPLC). A kisebb hatékonyságú királis elválasztásoknál a hőmérséklet szerepe döntő lehet. E hatás tanulmányozásához királis szelektorként a risztocetin A molekulát választottuk, modellvegyületeink az adott kromatográfiás körülmények között vagy negatív töltéssel rendelkezők, vagy semleges, vagy "ikerionos" molekulák voltak.

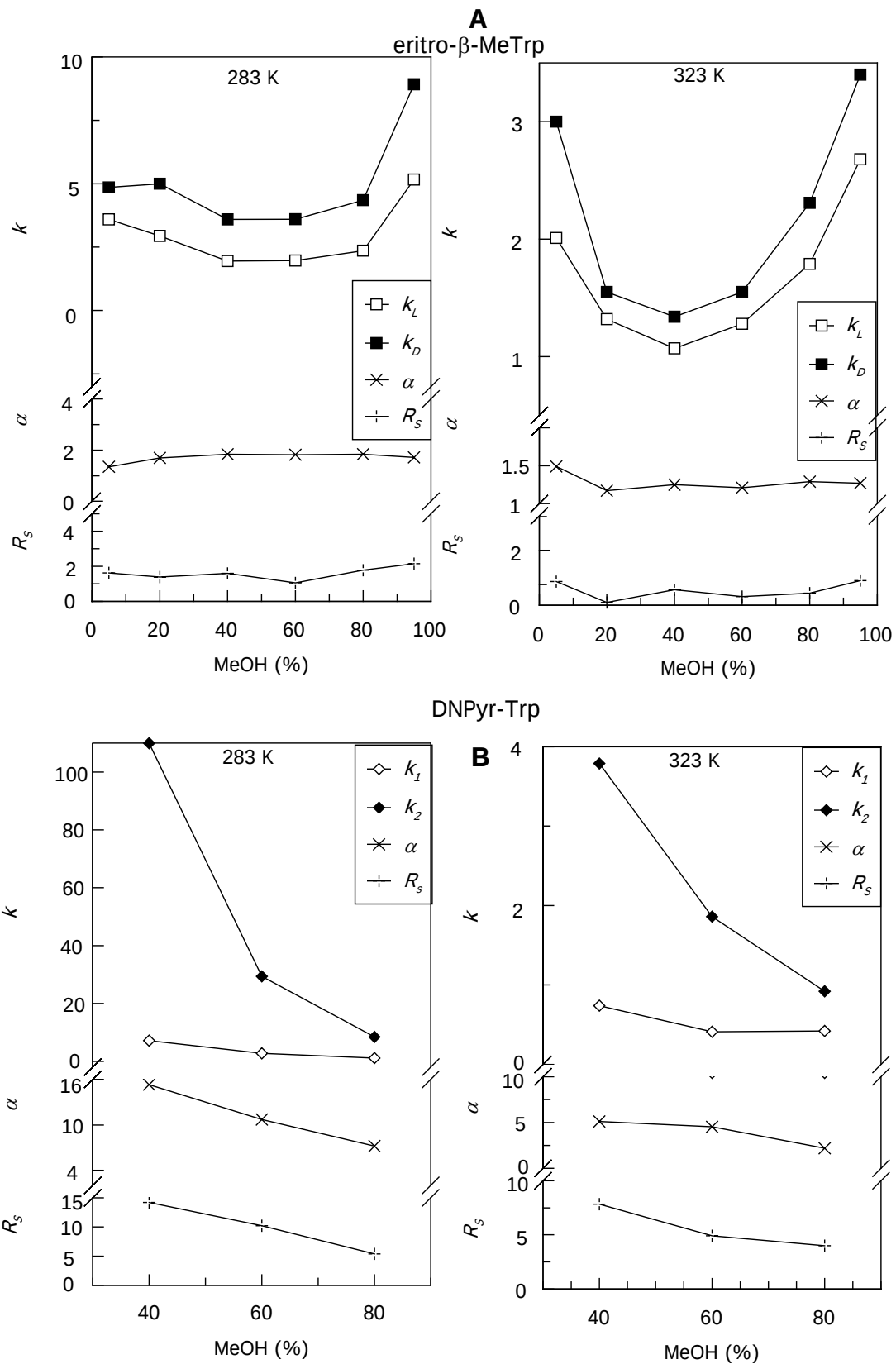
Vizsgálataink során, elsőként az eluensösszetétel és a hőmérsékletváltozás hatását tanulmányoztuk fordított, normál fázisú és polár-organikus módban. Az alkalmazott hőmérséklet tartomány 276-323 K volt. A hőmérséklet valamint a MeOH koncentráció hatását négy eluensösszetételnél tanulmányoztuk: 0,1% vizes trietil-ammónium-acetát puffer (pH=6,5)/MeOH=80/20, 60/40, 40/60, 20/80 (v/v). A választott vegyületek a vizsgált körülmények között vagy "ikerionos" szerkezetűek D,L-Trp (**17**), *eritro*-, *treo*-D,L- β -MeTrp (**43**, **44**), vagy negatív töltésűek *N*-benziloxikarbonil-D,L-Trp (*Z*-Trp) (**53**) és a *N*-(3,5-dinitro-2-piridil)-D,L-Trp (DNPy-Trp) (**54**) voltak. Pozitív töltésű volt az (*R,S*)-1-[5-klór-2-(metilamino)fenil]-1,2,3,4-tetrahydroizokinolin (CMP-Tic) (**85**) és semleges volt a (*R,S*)-5-fenil-tetrahydrofurán-2-on-butano-4-lakton ("butirolakton") (**98**). A vizsgált Trp analógok tartalmazznak ionozálható csoportokat és egymástól eltérő hidrofóbicitású és térkitöltésű szubsztituenseket. A Trp savas és bázikus csoportjainak pK értékei: $pK_1 \approx 2,3$ és $pK_2 \approx 9,4$. A Trp *N*-benziloxikarbonil szubsztituense sokkal inkább amidcsoportként jellemezhető, semmint ionizálható aminocsoportként. A DNPy-Trp szekunder aminocsoportjának pK-ját becsléssel lehet megállapítani, nitro- vagy halogén szubsztituált anilin felhasználásával [202]. Az anilin pK-ja ($pK=4,42$) csökken az elektronvonzó nitrocsoport hatására, így a szubsztituált származék pK-ja minden bizonnyal kisebb lesz 4,40-nél. Az alkalmazott eluensek pH-ján (0,1%TEAA, pH=6,5) tehát a Trp analógjai ikerionos szerkezetűek, vagy negatív töltésűek.

A CMP-Tic-nek két aminocsoportja van. Chatterjee [203] és munkatársai, valamint Sipos és munkatársai [202] alapján a tetrahydroizokinolin aminocsoportjának pK-ja meghaladja a 10,5-t. Az anilin analóggal való becslés alapján a második aminocsoport pK értéke körülbelül fele ekkora lehet [204]. Ezen értékeket figyelembe véve a CMP-Tic-nek a vizsgálati pH-n semleges, vagy pozitív töltésűnek kell lennie. Ennek bizonyítására

megvizsgáltuk a vegyület viselkedését elektroforetikus rendszerben. A pH=6,5 foszfátpuffer esetén a CMP-Tic a katód felé mozgott az elektroosmotikus áramlási sebesség kétszeresével, a vegyület az adott pH-n, tehát pozitív töltésű.

A "butirolakton" nem rendelkezik ionizálható csoporttal, így ez elektromosan semleges formában maradt vizsgálataink során.

A vegyületek sztereoizomerjeinek retenciófaktor (k), elválasztási tényező (α) és felbontás (R_s) értékeit változó eluensösszetételnél, azonos hőmérsékleten a F/19. Táblázat tartalmazza 293 K-en. Az F/20. Táblázatban a Trp (**17**) és a Z-Trp (**53**) példáján mutatjuk be a kromatográfiás paraméterek változását a hőmérséklet függvényében adott eluensösszetételeknél. Figyelembe véve az eluensösszetételtől és a hőmérséklettől való függés jellegét, a mért adatok alapján a kromatográfiás viselkedés két típusa különböztethető meg, amit a 34. A-B. ábrán szemléltetünk.



34. A-B. ábra

A kromatográfiás paraméterek változása a MeOH tartalom függvényében *eritro*- β -MeTrp és DNPy-Trp példáján

Az egyik típusú viselkedés a 34. A. ábrán látható, amelyet a Trp (**17**) és az *eritro*- és *treo*- β -MeTrp (**43**, **44**) esetén tapasztaltunk. 5% (v/v) MeOH koncentrációtól kiindulva, és a MeOH mennyiségét növelve az eluensben, k először csökkent, majd nagyobb MeOH koncentrációknál növekedni kezdett. Minden hőmérsékleten ilyen minimum jellegű viselkedést figyelhattunk meg. Nagy víztartalmú eluensben a k csökkenése a MeOH koncentrációt növelve arra utal, hogy csökken a hidrofób kölcsönhatás a mintamolekula és a királis állófázis között, ami a hidrofób kölcsönhatás domináns jellegét jelenti. A nagyobb MeOH koncentrációknál fellépő k növekedés az aminosavak MeOH-ban való kisebb oldhatóságának köszönhető. A szelektivitási tényező (α) csekély változást mutat a mozgófázis összetételét és a hőmérsékletet változtatva. Trp (**17**) esetén a felbontás 40 és 60% MeOH tartalomnál a legnagyobb, a 34. A. ábrán az *eritro*- β -MeTrp (**43**) esetén figyelhető meg a jellemző összetétel-függés. A *treo*- β -MeTrp (**44**) esetén a felbontás minimum jellegű görbét ír le, a minimum közel esik a 0,1% TEAA/MeOH=40/60 (v/v) eluensösszetételhez. Ebben a tartományban a két *treo* sztereoizomer nem választható el.

A hőmérséklet hatását vizsgálva (F/20. Táblázat) a Trp (**17**), az *eritro*- és *treo*- β -MeTrp esetén (**43**, **44**), a k , α és R_s értékei csökkennek a hőmérséklet emelésével. A MeOH koncentrációt növelve csökken a különbség a legalacsonyabb és a legmagasabb hőmérsékleten mért értékek között.

A Z-Trp (**53**), a DNPy-Trp (**54**), a CMP-Tic (**85**) és a "butirolakton" (**98**) esetén hagyományos retenciós viselkedést figyelhattunk meg (34. B. ábra). A Z-Trp és a DNPy-Trp esetén vízben gazdag eluenst és alacsony hőmérsékletet alkalmazva különösen nagy k értékeket mértünk. A hőmérsékletet és a MeOH tartalmat növelve, a másodjára eluálódó enantiomer esetén, drámaian csökkentek a k értékek. Ez a viselkedés nagyobb lipofilitásuknak és MeOH-ban való nagyobb oldhatóságuknak tulajdonítható. A szelektivitás értéke sokkal nagyobb a többi Trp analóghoz képest és csökken, növelve a MeOH tartalmat és a hőmérsékletet. A felbontás is a szelektivitáshoz hasonlóan változik, jóval nagyobb értékek mérhetőek, mint a Trp (**17**) és a β -MeTrp (**43**, **44**) diasztereomerek esetén.

A CMP-Tic (**85**) esetén mért k értékek nagyobbak a Trp analógoknál mért értékeknél, kivéve a legnagyobb MeOH koncentrációnál kapott értékeket. A mért retenciós faktorok nagyok, különösen kis MeOH koncentrációknál, annak ellenére, hogy nincs negatív töltésű csoportja a molekuláknak. Ez azt jelenti, hogy nem az elektrosztatikus kölcsönhatás a domináns lépés a CMP-Tic enantiomerek elválasztásában. Az α nem mutatott jelentős változást növelve a MeOH tartalmat, eközben azonban a felbontás jelentősen nőtt.

A hőmérsékletet növelve a CMP-Tic (**85**) esetén a k és az α értékek csökkennek, ugyanakkor nagy víztartalmú eluent és magas hőmérsékletet alkalmazva a felbontás növekedett.

A "butirolakton" (**98**) nem rendelkezik ionizálható csoporttal, így az elektromosan semleges marad. A vizsgált vegyületek közül a "butirolakton" rendelkezik a legkisebb retenciával. Növelve a MeOH tartalmat és a hőmérsékletet az α értékek enyhén csökkennek. A felbontásban fellépő enyhe változás, főleg a mozgófázis összetétel változásának köszönhető, a hőmérsékletváltozás a felbontást alig befolyásolja.

A kromatográfiás paraméterek hőmérsékletfüggését polár-organikus módban is mértük MeOH:AcOH:TEA=1000:1:1 (v/v/v) eluensösszetételt alkalmazva. A kapott értékeket a F/21. Táblázatban tüntettük fel. Ezen mozgófázis alkalmazása esetén minden vegyület sztereoizomerjeit sikeresen választottuk el, kivéve a "butirolakton" (**98**) sztereoizomereket. A Trp (**17**), az *eritro*-, és a *treo*- β -MeTrp (**43**, **44**) sztereoizomerek minden vizsgált hőmérsékleten, rövid időn belül elváltak. Polár-organikus módban a Trp (**17**), az *eritro*- és a *treo*- β -MeTrp (**43**, **44**) esetén az alacsonyabb és magasabb hőmérsékletekhez tartozó k értékek közötti eltérés nem volt nagyobb 30%-nál. A hőmérséklet növelése során kevésbé csökkentek a retenciós faktor értékei, mint fordított fázis alkalmazása esetén. A szelektivitási tényező (α) csak csekély mértékben változott a hőmérséklet változásának hatására. A felbontás (R_S) értékei teljesen eltérő módon változnak a fordított fázisban megfigyelthez képest: a felbontás növekedett a hőmérséklet emelésével.

A Z-Trp (**53**) és a DNPy-Trp (**54**) sztereoizomerek könnyen elválaszthatók polár-organikus módban, alacsonyabb hőmérsékleten nagyobb szelektivitással. Mivel a másodikként eluálódó sztereoizomerek retenciós faktorainak értékei alacsonyabb hőmérsékleten nem voltak olyan nagyok, mint az a fordított fázisban megfigyelhető volt, arra következtettünk, hogy ebben az esetben a hőmérséklet hatása az elválasztásra csekélyebb. Az R_S értékek mindkét vegyület esetén maximum jellegű hőmérsékletfüggést mutattak.

A CMP-Tic (**85**) sztereoizomerek elválasztása során rendkívül kis k értékeket mértünk, a szelektivitás mégis igen nagy volt minden vizsgált hőmérsékleten. A hőmérsékletet növelve R_S értékei jelentősen csökkentek.

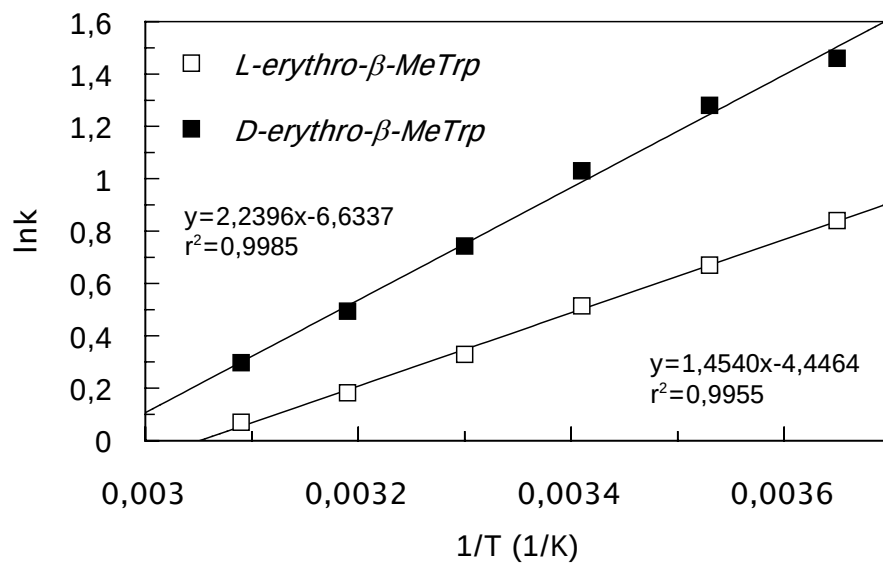
Az *eritro*- és *treo*- β -MeTrp (**43**, **44**), a DNPy-Trp (**54**), a Z-Trp (**53**) és a "butirolakton" (**98**) sztereoizomerek elválasztása megvalósítható normál fázisban is, hexán/etanol=80/20 (v/v) összetételű eluens alkalmazásával. Az F/22. Táblázat adatait tekintve az eredmények megerősítették a várakozásokat, miszerint a polár-organikus mód

és a normál fázisú kromatográfiás módszer nagyon hasonló. A β -MeTrp (**43,44**) sztereoizomerek elválasztására a hőmérséklet változása csekély hatást gyakorolt. A k és α értékek csak kevéssé csökkentek a hőmérséklet emelésével. A felbontás értékek (R_s) hasonlóan viselkedtek, mint ahogyan polár-organikus módban tapasztaltuk, a hőmérséklet emelése során növekedtek. A Z-Trp (**53**) és a DNPyr-Trp (**54**) sztereoizomerek elválasztása szintén hasonló normál fázisban, mint polár-organikus módban. Bár alacsony hőmérsékleten viszonylag erős visszatartással rendelkeznek, a kis és nagy hőmérsékletekhez tartozó k és α értékek ellenére R_s értékei kicsik, és csekély mértékben változtak a hőmérséklettel.

A "butirolakton" (**98**) sztereoizomerek részlegesen elválaszthatók, ha az eluens hexán tartalmát növeltük (hexán/etanol= 95/5 (v/v)). A hőmérséklet csökkenésével nőtt a retenció és kismértékben az elválasztási tényező és a felbontás is.

7.2. A termodinamikai paraméterek elemzése fordított fázison

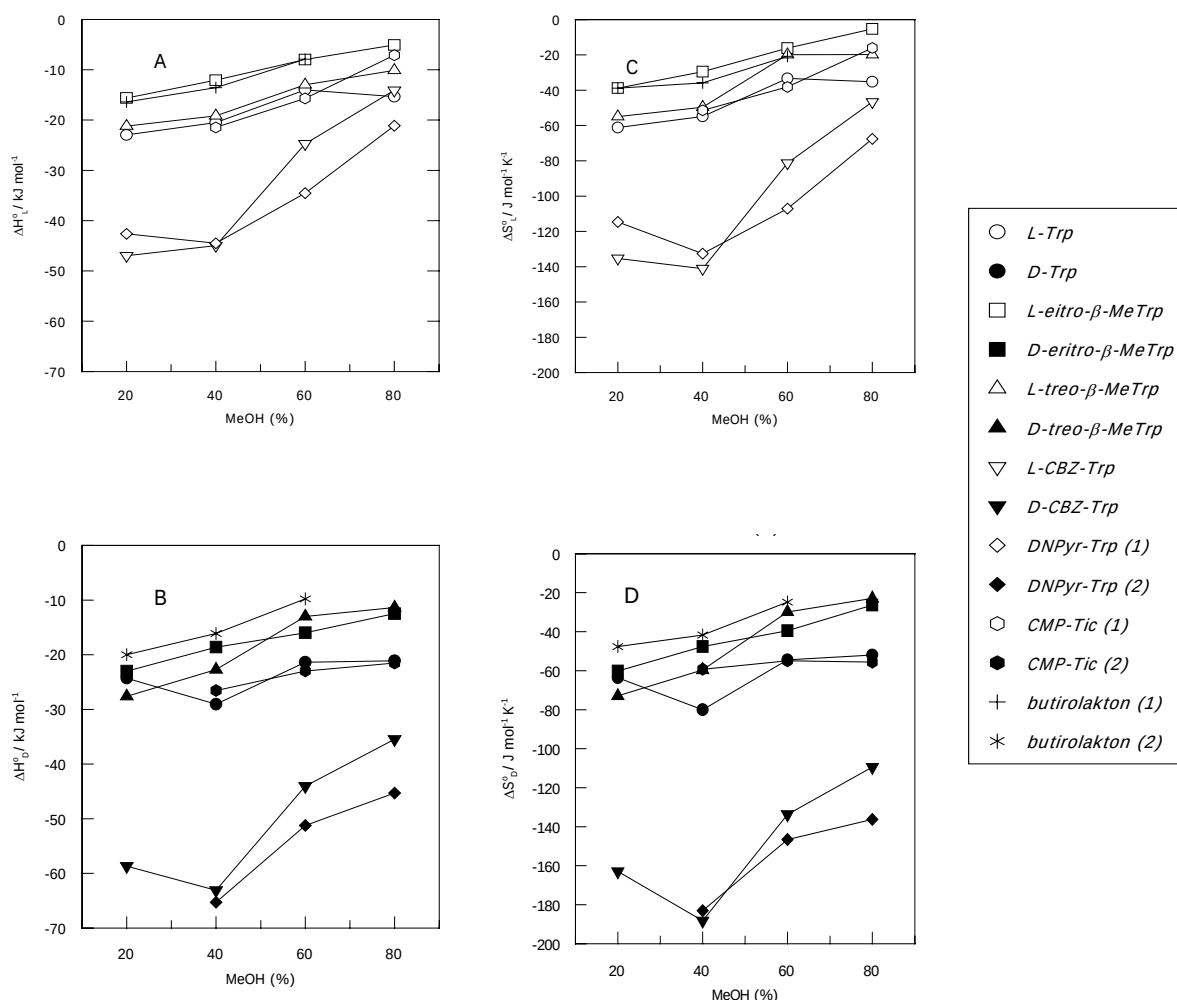
A termodinamikai mennyiségek és azok változásának ismerete segítséget nyújt a kromatográfiás retenció mechanizmusának tanulmányozásához. A mintavegyület megoszlása az eluens és az állófázis között meghatározza a megoszlást jellemző egyensúlyi állandó értékét, mely a van't Hoff egyenlet segítségével kapcsolatba hozható a folyamatot kísérő termodinamikai adatokkal. A 35. ábrán az *eritro*- β -MeTrp példáján a van't Hoff egyenlet ábrázolását mutatjuk be ($\ln k$ vs. $1/T$). Az "Irodalmi összefoglaló"-ban ismertetett összefüggés alapján a 35. ábrán látható egyenesek meredeksége a folyamatot kísérő entalpiaváltozást (ΔH°) adja, míg a tengelymetszet értékéből a folyamatot kísérő entrópiaváltozásra (ΔS°) következtethetünk, ha a Φ fázisarány ismert.



35. ábra

A van't Hoff egyenlet ábrázolása az *eritro*- β -MeTrp sztereoizomerek elválasztásának hőmérsékletfüggéséből nyert adatok alapján

A 36. A-D. ábrán láthatók az így kapott ΔH° és ΔS° értékek négy különböző eluensösszetétel esetén. A vizsgált eluensösszetételek: 0,1% TEAA/MeOH=80/20, 60/40, 40/60 és 20/80 (v/v).



36. A-D. ábra

A vizsgált sztereoizomerek elválasztását jellemző ΔH° és ΔS° értékek az eluens MeOH tartalmának függvényében fordított fázisú kromatográfia esetén

A ΔH° értékeket a van't Hoff egyenesek meredekségeiből számítottuk, ezek minden vegyület esetén negatívnak adódtak (36. A. és B. ábra). Ez azt jelzi, hogy a vegyületek mozgófázisból az állófázisba jutása az entalpiaváltozás szempontjából kedvezményezett. Mindegyik vizsgált vegyület esetén a másodikként eluálódott sztereoizomer entalpia változása negatívabb, mint az elsőként eluálódóé. Eszerint a másodikként eluálódott sztereoizomerek erősebben kötődnek az állófázishoz, mint az elsőként eluálódó sztereoizomerek. A másodikként eluálódott sztereoizomer a Trp, az *eritro*-, *treo*- β -MeTrp,

a Z-Trp esetén a D enantiomer [160], míg a DNPy-Trp, a CMP-Tic, és a "butirolakton" esetén az elúciós sorrend még nem tisztázott.

A ΔS° számításához szükséges a fázisarány (Φ) ismerete [189, 190]. Az oszlop technikai adatainak figyelembevételével [189] kiszámítottuk Φ -t, négy eluensösszetételnél 0,1% TEAA/MeOH=80/20, 60/40, 40/60 és 20/80 (v/v). A kapott adatok rendre: 0,378; 0,405; 0,462 és 0,519. A ΔS° értékeket ezen adatokból és a van't Hoff egyenesek tengelymetszeteiből számítottuk.

A 36. C. és D. ábrán látható entrópiaváltozás értékek minden esetben negatívak. Az először eluálódó izomer esetén minden enantiomerpárnál a ΔS° értékek pozitívabbak. Minden vegyületre igaz, hogy a másodikként eluálódó enantiomer megjelenését mindig negatívabb entalpia- és entrópiaváltozás kíséri. Egy enantiomerpár minden bizonnyal azonos módon szolvatálódik a mozgó fázisban, de az állófázissal történő kölcsönhatás során különböző mennyiségű szolvátmolekulát adhat le. Ez a hozzájárulás a ΔS° -hoz tehát nem biztos, hogy egyenlő mértékű. Mivel a másodikként eluálódott izomerek ΔS° értékei negatívabbak, ezért mozgási lehetőségeik korlátozottabbak az állófázison, vagy a megkötődés során kevesebb szolvátmolekulát adnak le.

Az 36. C és D. ábrán látható termodinamikai adatok alapján megkülönböztethető a vizsgált vegyületeknek két alcsoportja. A Trp (**17**), az *eritro*- és *treo*- β -MeTrp (**43**, **44**), a CMP-Tic (**85**) és a "butirolakton" (**98**) $-\Delta H^\circ$ és $-\Delta S^\circ$ értékei láthatóan kisebbek, a DNPy-Trp (**54**) és a Z-Trp (**53**) ezen értékeinél. Általánosságban megállapítható, hogy növelve a MeOH koncentrációt a $-\Delta H^\circ$ és $-\Delta S^\circ$ értékek csökkennek. A Trp (**17**), *eritro*- és *treo*- β -MeTrp (**43**, **44**) sztereoizomerek vizes közegben ikerionos szerkezetűek, tehát elektrosztatikus kölcsönhatást képesek kialakítani az állófázissal. 0,1% TEAA/MeOH=80/20 (v/v) eluensösszetételtől indulva és növelve a MeOH koncentrációt, a k és $-\Delta H^\circ$ értékek csökkennek. Ez magyarázható a hidrofób kölcsönhatások csökkenésével a molekulák és az állófázis között, mivel az eluens kevésbé lesz poláris.

Nagy MeOH tartalmú eluensösszetételből kiindulva és növelve a víz mennyiségét az eluensben a Z-Trp (**53**) és DNPy-Trp (**54**) sztereoizomerek nagy negatív entalpia- és entrópiaváltozása tovább növekszik. Ez a jelenség is a hidrofób kölcsönhatásra vezethető vissza. A nagy $-\Delta H^\circ$ és $-\Delta S^\circ$ értékek a Z-Trp (**53**) és DNPy-Trp (**54**) vegyületek molekulaszervezetének tulajdoníthatók. Mivel ezek a vegyületek pH=6,5 esetén negatív töltésűek, ezért erős elektrosztatikus kölcsönhatást alakíthatnak ki a pozitív töltésű állófázissal. A nagy $-\Delta H^\circ$, $-\Delta S^\circ$ értékeket magyarázhatják még a hidrofób és szterikus

kölcsönhatások, valamint a hidrogénhíd-kötések kialakulásának lehetőségei. A $-\Delta H^\circ$ és $-\Delta S^\circ$ mennyiségeknek nagyobb víztartalomnál (80%) bekövetkező csökkenése azzal magyarázható, hogy a rendszer igyekszik kompenzálni azt a molekuláris kölcsönhatást, amelyet a mintamolekula vízmolekulák közé való beékelődése okoz. Emiatt a vízmolekuláknak nagyobb fokú szervezettsége jön létre a mintamolekula körül (iceberg képződmény) [178]. Viszont a nagyobb MeOH tartalomnál (60-80%) létrejövő pozitívabb entrópia változás annak tulajdonítható, hogy a molekulák szolvatációja MeOH-ban nagyobb fokú rendezettséget eredményez, mint vízben. Következésképpen a vegyület átkerülése a MeOH dús eluensből az állófázisra pozitívabb entrópia változást eredményez feltéve, hogy mindkét eluensösszetétel esetén a minta ugyanakkora szabadsági fokkal rendelkezik az állófázison.

A pH=6,5 esetén a CMP-Tic (**85**) is és az állófázis is pozitív töltésű, ezért az elektrosztatikus kölcsönhatás nem kedvezményezett. A kromatográfiás visszatartás és királis felismerés a hidrofób és szterikus kölcsönhatásoknak tulajdoníthatók. A CMP-Tic (**85**) szterikus kölcsönhatása valószínűleg kedvezményezett a két nem planárisan elhelyezkedő aromás gyűrű miatt. Az elektrosztatikus vonzás kizárt a negatív csoport hiányából fakadóan, ez nagyobb fokú anyagtranszportot és adszorpciós—deszorpciós kinetikát eredményez. Emiatt a MeOH tartalom és hőmérséklet növelés felbontás növekedést eredményezett.

A semleges "butirolakton" (**98**) megoszlása okozza a legcsekélyebb entalpiaváltozást a vizsgált vegyületek közül. Ezt a változást a MeOH koncentráció függvényében vizsgálva a Trp (**17**), az *eritro*-, és *treo*- β -MeTrp (**43**, **44**) analógokéhoz hasonló megállapításokat tehetünk kivéve, hogy $-\Delta S^\circ$ kompenzálja $-\Delta H^\circ$ -t. Emiatt a MeOH tartalom növelésével k értékei folyamatosan csökkennek. A retenciót és a királis felismerést hidrofób kölcsönhatások és az oxigénatomokon keresztül létrejövő gyenge hidrogénhíd-kötések segítik.

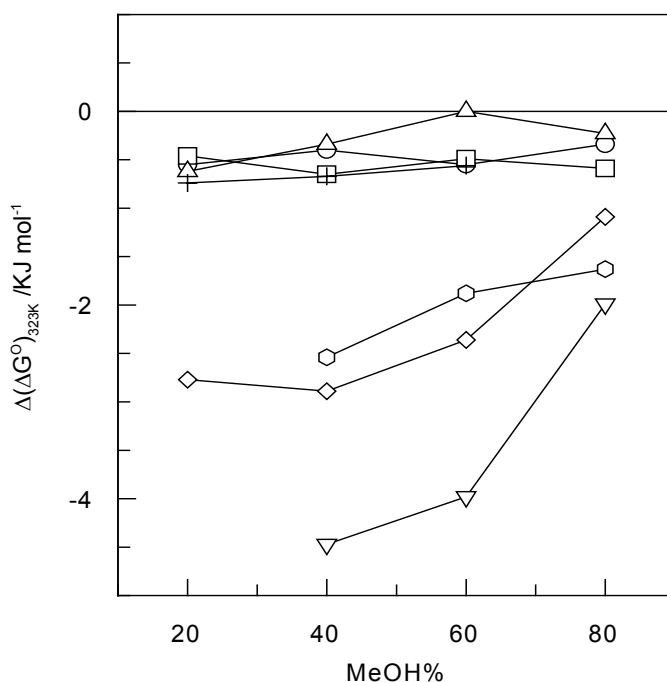
A $\Delta(\Delta H^\circ)$ és $\Delta(\Delta S^\circ)$ értékeket különbséggént kaphatjuk meg egy enantiomerpár esetén: $\Delta H^\circ_2 - \Delta H^\circ_1$, illetve $\Delta S^\circ_2 - \Delta S^\circ_1$. Ezen különbségek vizsgálatából következtethetünk az enantiomerek retenciós mechanizmusai közötti eltérésekre. A vizsgált vegyületek $\Delta(\Delta H^\circ)$ és $\Delta(\Delta S^\circ)$ értékei a F/23. Táblázatban találhatóak.

Nagy MeOH tartalom esetén a Z-Trp (**53**), DNPy-Trp (**54**) és a CMP-Tic (**85**) $-\Delta(\Delta H^\circ)$ és $-\Delta(\Delta S^\circ)$ értékei 2-3-szor nagyobbak a többi sztereoizomer esetén mért értékekhez képest. A Z-Trp (**53**), DNPy-Trp (**54**) és CMP-Tic (**85**) sztereoizomerek entrópiaváltozásának negatívabb különbségei, az enantiomerek állófázison lévő eltérő

mozgási szabadságával magyarázhatók. A DNPyr-Trp-on (**54**) és a Z-Trp-on (**53**) található *N*-benziloxikarbonil és *N*-(3,5-dinitro-2-piridil)-szubsztituensek a hidrofób jelleget növelik, amelyhez hozzájárul a hidrogénhid-kötés kialakításának fokozottabb képessége és egy nagyobb szterikus kölcsönhatás lehetősége. Ez a nagyobb szterikus kölcsönhatás a CMP-Tic (**85**) sztereoizomerek esetén fokozottan jelentkezhet.

Hilton és Armstrong [204] szerint egy enantiomer pár esetén nagy $-\Delta(\Delta H^\circ)$ értékeket okozhat, a hidrogénhid-kötés létrejötte α nagy hőmérsékletfüggése miatt. A DNPyr-Trp (**54**) és Z-Trp (**53**) vegyületek esetében ez is magyarázhatja a nagy $-\Delta(\Delta H^\circ)$ értékeket.

A királis elválasztás hajtóerejét jellemző $-\Delta(\Delta G^\circ)$ értékeket a MeOH tartalom függvényében ábrázolva a sztereoizomerek két alcsoportja jól megkülönböztethető (37. ábra).



37. ábra

$\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek a MeOH tartalom függvényében 323K-en, fordított fázison

Az első csoport (Trp, *eritro*-β-MeTrp, *treo*-β-MeTrp, "butirolakton") esetén a szabadentalpia-változások különbségei, amelyek a királis felismerés hajtóerejét jelentik, kicsik, ezért ennél a csoportnál kisebb enantioszelektivitás érhető el. A második alcsoportban található vegyületek esetén (Z-Trp, DNPyr-Trp, CMP-Tic) a $-\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek nagyobbak, így nagyobb α (és R_s) értékeket eredményeznek.

A vizsgált oszlop az általunk használt pH-tartományban (pH=6,5) pozitív töltésű, míg a kiválasztott vegyületek töltése negatív, pozitív vagy semleges. Korábbi vizsgálatok

kimutatták [160,161], hogy a risztocetin A aminocsoportja a legvalószínűbb helye a királis megkötődés indításának, és az anionos részt tartalmazó vegyületek enantioszelektív visszatartásának. Ehhez járulnak még a hidrogénhid-kötés, a hidrofób és sztérikus kölcsönhatások. Ezek létrejöttének bármilyen gátja akadályozhatja a királis felismerést. A risztocetin A állófázison a merevebb molekulaszervezet és a nagyobb térkitöltés fokozhatja az enantioszelektivitást.

Az alkalmazott pH-n a Trp (**17**) és a β -MeTrp (**43**, **44**) sztereoizomerek "ikerionos" formában voltak jelen. E vegyületeknél az elválasztás fő irányító erői az elektrosztatikus, a hidrofób és a sztérikus kölcsönhatások, valamint a hidrogénhid-kötések voltak. Az *N*-benziloxikarbonil és *N*-(3,5-dinitro-2-piridil)-szubsztituensek a Trp molekulát erőteljesen hidrofób jellegűvé, merevebb szerkezetűvé és nagyobb méretűvé teszik. A pH=6,5 tartományban ezek a vegyületek negatív töltésűek. Ezen okok miatt a kölcsönhatások jellege megváltozik, száma és erőssége megnövekszik, így nagyobb visszatartással rendelkeznek, mint a Trp (**17**) és β -MeTrp (**43**, **44**) izomerek.

A CMP-Tic (**85**) pozitív töltésű az adott pH-n, valamint két, különböző síkban elhelyezkedő gyűrűvel rendelkezik. Képes hidrogénhid-kötéseket kialakítani, amelyek nagy $-\Delta H^\circ$ és $-\Delta S^\circ$ értékeket eredményeznek. Lehetséges egyéb kölcsönhatások létrejötte is: hidrofób, sztérikus és π - π -kölcsönhatás.

A "butirolakton" (**98**) töltéssel nem rendelkezik, így az enantiomer elválasztás hajtóereje a hidrofób és sztérikus kölcsönhatás lehetnek.

7.3. A termodinamikai paraméterek elemzése polár-organikus fázisban

A polár-organikus módban mért eredményeket felhasználva ebben az esetben is kiszámítottuk a megfelelő termodinamikai paramétereket. A kapott eredményeket a F/24. Táblázatban tüntettük fel. A számított entalpia értékek minden esetben negatívnak adódtak, ez jelzi, hogy a minta mozgóból az állófázisba való kerülése az entalpiaváltozás szempontjából kedvezményezett. Az entrópiaváltozások, ΔS° , között találhatók negatív és pozitív értékek is. A pozitív entrópiaváltozás onnan adódhat, hogy az adszorbeálódó mintamolekulák nagy számú eluensmolekulát szorítanak ki az állófázisból, ami pozitív hozzájárulást okoz. Jellemző az összes mintavegyületre, hogy ΔH° és ΔS° értékei pozitívabbak, mint a fordított fázisban mért értékek. Polár-organikus módban minden vegyület entalpiaváltozás értéke negatív. Pozitív entrópiaváltozás értékeket a β -MeTrp (**43**, **44**) enantiomerjei esetén figyeltünk meg. Mivel itt a ΔH° és ΔS° értékek kompenzálják

egymást, így a ΔG° értékek hasonló nagyságrendbe esnek, mint fordított fázisban. Ennek eredménye a közel hasonló retenciós viselkedés a két fázisban.

A ΔH° és ΔS° értékek a Z-Trp (**53**), a DNPy-Trp (**54**) és a CMP-Tic (**85**) esetén negatívabbak voltak, mint a Trp (**17**), az *eritro*- és *treo*- β -MeTrp (**43**, **44**) esetén mért értékek, de kevésbé negatívak, mint a fordított fázisban kapottak. E jelenség lehetséges magyarázata lehet, a DNPy-Trp (**54**) és a Z-Trp (**53**) sztereoizomerekre vonatkozóan, hogy polár-organikus módban a hidrofób kölcsönhatások elhanyagolhatóak, míg fordított fázisban ezek az uralkodóak. A CMP-Tic fordított fázisban pozitív töltésű volt, így a retenciót a hidrogénhíd-kötés, a hidrofób és a szterikus kölcsönhatások segíthették. Polár-organikus módban a hidrogén-híd kötés, a dipól-dipól, a szterikus és a π - π kölcsönhatások a dominánsak.

A $\Delta(\Delta H^\circ)$ és $\Delta(\Delta S^\circ)$ értékek negatívabbnak adódtak a DNPy-Trp (**54**), Z-Trp (**53**), CMP-Tic (**85**) sztereoizomerek esetén, mint a Trp (**17**), az *eritro*- és *treo*- β -MeTrp (**43**, **44**) sztereoizomerek esetén. Ennek valószínű oka, hogy a Z-Trp (**53**), DNPy-Trp (**54**) és CMP-Tic (**85**) polár-organikus módban képesek járulékos π - π kölcsönhatások kialakítására, ami elősegíti a királis felismerést.

Az *N*-védett Trp analógok és a CMP-Tic termodinamikai paraméterei közül a $\Delta(\Delta G^\circ)$ nagy negatív értékek. A CMP-Tic (**85**) enantiomerek szelektivitása polár-organikus fázisban különösen nagyra adódott ($\alpha > 10$) minden hőmérsékleten.

Polár-organikus módban általában a felbontás növekedését tapasztaltuk a hőmérséklet növelése során, kivéve a CMP-Tic-et (**85**). Ennek valószínű oka, hogy a nem irányított, erős elektrosztatikus kölcsönhatás hiánya polár-organikus módban kedvezőbb adszorpciós-deszorpciós kinetikát és anyagtranszportot eredményez emiatt, a csúcsok keskenyé válnak, a felbontás nő.

7.4. A termodinamikai paraméterek elemzése normál fázisban

A számított termodinamikai paraméterek a F/25. Táblázatban láthatóak. A normál fázisban létrejövő főbb kölcsönhatások megegyeznek a polár-organikus módban létrejövőekkel. Ezek a hidrogénhíd-kötés, a π - π , a dipól-dipól és a szterikus kölcsönhatások.

A sztereoizomerek negatív entalpia- és entrópiaváltozással rendelkeznek. Enantiomer páronként az erősebb visszatartással rendelkező sztereoizomerre negatívabb ΔH° értékek adódtak, jelezve az erősebb kölcsönhatást az állófázissal. A nagyobb retenciával rendelkező enantiomer erősebb adduktumot alkothat az állófázissal annak köszönhetően,

hogy több ponton hoz létre kölcsönhatást a királis felszínen. Ez magyarázhatja a negatív ΔS° értékeket is.

A β -MeTrp (**43**, **44**) sztereoizomerek esetén a $-\Delta H^\circ$ értékek egy kissé nagyobbak, mint polár-organikus fázisban, míg a ΔS° értékek negatívnak adódtak normál fázisban,. A Z-Trp (**53**) és a DNPyr-Trp (**54**) vizsgálata során a ΔH° értékekre normál és polár-organikus fázisban hasonló eredményeket kaptunk, míg a ΔS° értékek pozitívabbnak adódtak normál fázisban. Ebben a két kromatográfiás rendszerben a ΔG° értékek, következésképpen a retenciós faktorok sem különböztek jelentősen.

A sztereoizomer és az állófázis között létrejövő enantioszelektív kölcsönhatások mértékére a $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek utalnak. Mindkét kromatográfiás módban a β -MeTrp (**43**, **44**) sztereoizomerek esetén a $\Delta(\Delta G^\circ)$ és a szelektivitás értékek is hasonlóak voltak. A Z-Trp (**53**) és a DNPyr-Trp (**54**) esetén a $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek normál fázisú kromatográfiás módban pozitívabbnak adódtak, ez pedig kisebb szelektivitást és gyengébb felbontást eredményezett normál fázisban.

A "butirolakton" (**98**), amely fordított fázisban a legkisebb $-\Delta H^\circ$ és $-\Delta S^\circ$ értékeket adta, viszonylag nagy $-\Delta H^\circ$ és $-\Delta S^\circ$ értékeket eredményezett normál fázisban. Normál fázisban az enantiomer elválasztás egyik hajtóereje lehet a π - π kölcsönhatás mellett az erősen hőmérsékletfüggő hidrogénhid-kötés. A hexán/etanol =20/80 (v/v) összetételű eluens a "butirolaktont" nem tartotta vissza, egyedül hexán/etanol=95/5 (v/v) eluens összetételénél figyelhattunk meg visszatartást és részleges elválást. Növelve az eluensben az etanol koncentrációt, csökkent a retenció. Ez bizonyára az állófázis és az etanolmolekulák közti hidrogénhid-kötés létrejöttének köszönhető, amely kompetitíven gyengíti a minta és az állófázis közti hidrogénhid-kötést. Nagy hexán tartalom esetén az etanol molekulák és az állófázis közti kölcsönhatás gyengébb. A két enantiomer állófázissal kialakított hidrogénkötései hasonló erősségűek, ezért a $\Delta(\Delta H^\circ)$ és $\Delta(\Delta S^\circ)$ értékek közel nullának adódtak, és ebből következnek a kisebb szelektivitás és felbontás értékek.

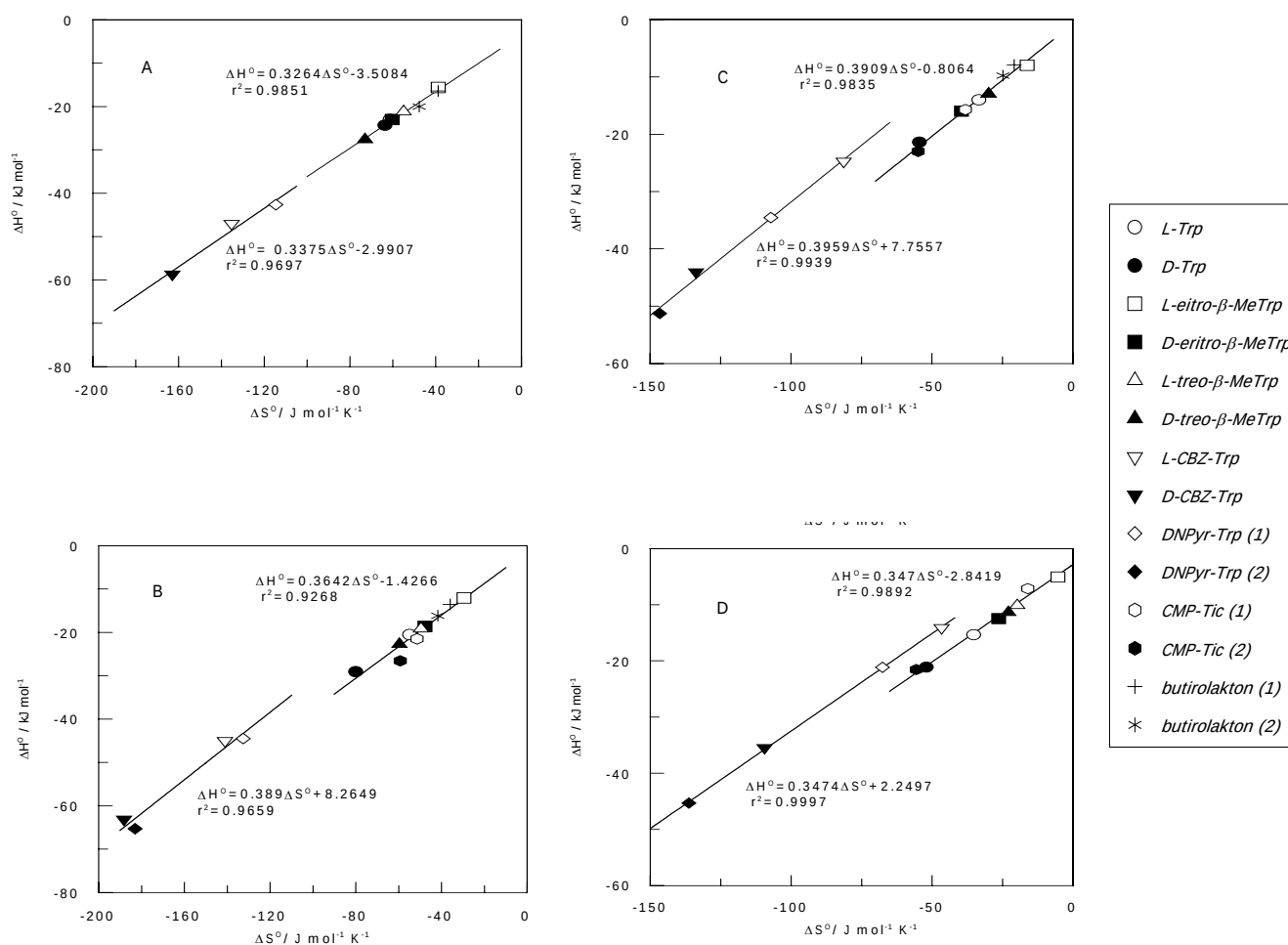
7.5. Entalpia-entrópia kompenzáció

A fizikai-kémiai adatok termodinamikai vizsgálatának egyik lehetséges útja az entalpia-entrópia kompenzáció [205]. Az entalpia-entrópia kompenzációt a fordított fázisú kromatográfiában Horváth [206] a hidrofób kölcsönhatás, Koppenhoefer és Bayer [207] a gázkromatográfiában az enantioszelektív retenció mechanizmusának tanulmányozására

alkalmazta. A különböző szerzők más-más formulát javasoltak a kompenzáció kifejezésére. Matematikailag az entalpia-entrópia kompenzáció kifejezhető a következő összefüggésekkel:

$\beta = \Delta H^\circ / \Delta S^\circ$ [208] vagy $\Delta H^\circ = \beta \Delta S^\circ + \Delta G_{\beta}^\circ$ [209, 210], ahol a β a kompenzációs hőmérséklet, ΔG_{β}° a fizikai-kémiai kölcsönhatás szabadentalpia-változása a β kompenzációs hőmérsékleten (β és ΔG° konstansok). Valamilyen kémiai átalakulásban (vagy például a kromatográfiás visszatartás folyamán) az entalpia-entrópia kompenzáció az anyagok egy csoportjára ha megfigyelhető, akkor minden komponens azonos, ΔG_{β}° szabadentalpiával rendelkezik a β kompenzációs hőmérsékleten. Vagyis, ha a kromatográfiában entalpia-entrópia kompenzáció figyelhető meg a komponensek egy csoportjára, ezek a komponensek ugyanazon retencióval rendelkeznek a β kompenzációs hőmérsékleten, de a hőmérsékletfüggésük különböző lehet. A kompenzációs hőmérséklet hasonlósága arra utal, hogy a molekulák hasonló mechanizmus szerint választódnak el az oszlopon. Ezért a kompenzáció tanulmányozása hasznos eszköz a mechanizmus kutatásában, azonban az eredményeket óvatosan kell kezelni az entalpiaváltozás meghatározásának bizonytalansága miatt [209, 210].

A mérési eredményeinket négy különböző eluensösszetételre a 24. A-D. ábra szemlélteti. Az egyes molekulacsoportokon belül, az L, D enantiomerek kompenzációs hőmérsékleti adatai jó egyezést mutattak, ami arra utal, hogy az enantiomerek elválasztása a szelektoron, fordított fázisú kromatográfia esetén hasonló mechanizmus szerint történik. Az ábráról jól látható, hogy a DNPyr-Trp és a Z-Trp azonos mechanizmus szerint kötődik a szelektorhoz és az különbözik a többi vizsgált vegyület sztereoizomerjeinek kötődési mechanizmusától. A mozgófázis összetételének változása valószínűleg befolyásolja ezt a mechanizmust.



38. A.-D. ábra

Entalpia-entrópia kompenzáció 4 különböző eluensösszetételénél (A: 0,1% TEAA/MeOH=80/20, B: 0,1%TEAA/MeOH= 60/40, C: 0,1%TEAA/MeOH=40/60, D: 0,1%TEAA/MeOH=20/80)

7.6. Összefoglaló a retenció valószínű mechanizmusáról a risztocetin A antibiotikum alapú állófázison

A vizsgált állófázis az általunk használt pH-tartományban (pH=6,5) pozitív töltésű, míg a kiválasztott vegyületek töltése negatív, pozitív vagy semleges. Korábbi vizsgálatok kimutatták [160,161], hogy a risztocetin A aminocsoportja a legvalószínűbb helye a királis megkötődés indításának, és az anionos részt tartalmazó vegyületek enantioszelektív visszatartásának. Ehhez járulnak még a hidrogénhid-kötés, a hidrofób és a szterikus kölcsönhatások. Ezek létrejöttének bármilyen gátja akadályozhatja a királis felismerést. A risztocetin A állófázison a merevebb molekulaszervezet és a nagyobb térkitöltés fokozhatja az enantioszelektivitást.

Fordított fázisban az alkalmazott pH-n a Trp (**17**) és a β -MeTrp (**43**, **44**) sztereoizomerek ikerionos formában voltak jelen. Ezen vegyületeknél az elválasztás fő irányító erői az elektrosztatikus, a hidrofób és a szterikus kölcsönhatások, valamint a hidrogénhid-kötések voltak. Az *N*-benziloxikarbonil és az *N*-(3,5-dinitro-2-piridil) szubsztituensek a Trp molekulát erőteljesebben hidrofób jellegűvé, merevebb szerkezetűvé és nagyobb méretűvé teszik, pH=6,5 esetén ezek a vegyületek negatív töltésűek. A lehetséges kölcsönhatások száma, jellege és erőssége megnövekszik, így nagyobb retencióval rendelkeznek, mint a Trp és β -MeTrp sztereoizomerek.

Polár-organikus és normál fázisban minden Trp analóg esetén a hidrofób és az elektrosztatikus kölcsönhatás hiánya kisebb retenciót, gyengébb elválasztást valamint kisebb $-\Delta H^\circ$ és $-\Delta S^\circ$ értékeket eredményezett.

A CMP-Tic pozitív töltésű az adott pH-n, valamint két, különböző síkban elhelyezkedő gyűrűvel rendelkezik. Képes hidrogénhid-kötéseket kialakítani, amelyek nagy $-\Delta H^\circ$ és $-\Delta S^\circ$ értékeket eredményeztek fordított fázisban és polár-organikus módban. Lehetséges egyéb kölcsönhatások létrejötte is: hidrofób, szterikus, π - π kölcsönhatás.

A "butirolakton" töltéssel nem rendelkezik, így csak hidrofób és egyéb másodlagos kölcsönhatások kialakítására képes. Fordított fázisban a termodinamikai adatok alapján a hidrofób és szterikus kölcsönhatások ítélték fontosnak, míg normál fázisban az erősebben hőmérsékletfüggő hidrogénhid-kötés és π - π kölcsönhatás lehet az elválasztás hajtóereje.

8. Összefoglalás

Az élő szervezet építőelemei királisak pl: proteinek, szénhidrátok, a DNS. A mesterséges eredetű gyógyszerek és növényvédőszer, amelyekkel szemben manapság alapvető követelmény, hogy királisan tiszta formában kerüljenek kereskedelmi forgalomba. Így szükséges az egyes enantiomerek azonosítására és mennyiségi meghatározására analitikai módszerek kidolgozása. Az enantiomerek elválasztása nemcsak az orvostudományban és a gyógyszerkutatásban, hanem a királis szintézisek területén, a biológiában és a biokémiában is fontosak.

A peptidek a receptorokkal való kölcsönhatás során meghatározott, rögzített formában vannak jelen. Ezen konformációs gátek szerkezete csak részben ismert. Megismerésük egyik lehetséges módja a helyi konformációs gátek beépítése az aminosavakba. Ezen aminosav enantiomerek kromatográfiás elválasztása nehezen megoldható feladat.

Az (S)-N-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil észter [(S)-NIFE] alkalmazásával közvetett királis kromatográfiás módszert dolgoztunk ki fehérjealkotó és nemfehérje alkotó aminosav sztereoizomerek elválasztására.

Munkánk során kidolgoztuk és optimalizáltuk a származékképzési reakció és az elválasztás körülményeit a vizsgált vegyületek - Gly, Ala, Phe, Pro analóg sztereoizomerek, β -Me(alkil)Trp sztereoizomerek, tetrahydroizokinolin vázas karbonsav és pipekolinsav sztereoizomerek - (S)-N-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil észterrel képzett diasztereomer termékeire.

Sikeresen megoldottuk sztérikusan erősen gátolt vegyületek (α -Me-Tic, α -alkilprolinok, β -Me(alkil)-aminosavak) származékképzését és a keletkezett diasztereomer termékek elválasztását.

Megállapítottuk, hogy az (S)-NIFE-aminosav származékok elnyelési maximuma 205 nm-en van, amelyen a kimutatási határ 3/1 jelzaj viszony mellett 20 pmol-nak adódott.

Rámutattunk, hogy a származékképzési reakció hozama függ a reakcióidőtől, pH-tól és a reagens/aminosav molaránytól.

HPLC-MS módszerrel kimutattuk, hogy a származékképzési reakciót melléktermékek (4-nitrofenol, fenilalanin-metoxietil-észter (Phe-észter), N,N-bisz-(3-fenolpropionsav-metoxietil-észter-2-il ("szimmetrikus karbamid")) keletkezése kíséri. Ezzel a módszerrel igazoltuk azt is, hogy a származékképző reagens nemcsak az aminosav primer aminocsoportjával, hanem az "imino"-csoporttal és fenolos hidroxilcsoporttal is reakcióba lép. (S)-NIFE nem lép reakcióba

az alkoholos hidroxilcsoportal. A képződött mono- és bisz- származékokat sikeresen elválasztottuk.

Az α -alkilprolinok esetén az alkalmazott reagensfelesleget glicin hozzáadásával sikeresen eltávolítottuk.

Egy futtatásban megoldottuk a fehérjealkotó aminosav enantiomerek elválasztását: Kivéve: Glu, Thr, Gln, Asn.

Elúciós sorrend: (S)<(R)

Kivételek: természetes aminosavak: Arg, His, Asn, Gln, Cys, Pro analógok: allil-, benzil-, naftil-szubsztituált analógok a Cahn-Ingold-Prelog szabály alapján.

β -alkil aminosavak esetén (2S,3S) < (2R,3R) az elúciós sorrend, amelyet a karboxilcsoportoz tartozó szénatom határoz meg.

A közvetett és közvetlen kromatográfias módszerek összehasonlítását végeztük el Pro, Gly, Ala, Phe és β -alkil-Trp sztereoizomerek elválasztására. Megállapítottuk, hogy:

- ❑ Pro analóg sztereoizomerek elválasztásában az (S)-NIFE a leghatékonyabb,
- ❑ a Gly analógok estében mind a közvetett mind a közvetlen módszerek jól alkalmazhatók,
- ❑ Ala, Phe analógok elválasztására az antibiotikum alapú kolonnák mellett a származékképző reagensek közül az (S)-NIFE, GITC, FDAA is alkalmasak,
- ❑ A β -alkil-Trp sztereoizomerek csak közvetlen módszerekkel (S)-NIFE, GITC, FDAA választhatók el. A királis származékképzők közül a leghatékonyabb az (S)-NIFE.

Az (S)-NIFE származékképző reagenst a Fluka 2002-ben kereskedelmi forgalomba hozta.

Makrociklusos antibiotikum alapú királis kolonnák kromatográfias viselkedésének összehasonlítása során a teicoplanin és a teicoplanin aglikon alapú királis állófázisok elválasztását jellemző standard szabadentalpia-változás különbségek vizsgálatával kívántunk következtetni az oszlopok elválasztóképességére.

Megállapítottuk, hogy a β -aminosav enantiomerek retenciós faktorai a metanol tartalom függvényében a fordított fázisú kromatográfiának megfelelő módon változnak a Chirobiotic T és TAG oszlopokon.

Az "iminosav" enantiomerek retenciós faktorai a metanol tartalom függvényében a Chirobiotic T és TAG oszlopokon eltérően viselkednek. A Chirobiotic T oszlopon U-alakú görbe szerint, míg a Chirobiotic TAG oszlopnál maximum görbe szerint változnak az enantiomerek retenciós faktorai a MeOH tartalom növekedésével.

Primer és szekunder α -aminosavak esetén nem szükségesek a cukorrészek által biztosított királis centrumok és funkciós csoportok jelenléte a sikeres királis elválasztáshoz.

β -aminosavak esetében a cukorrészek és az apoláris oldallánc jelenléte hozzájárult a királis felismeréshez.

Hőmérséklet hatása a királis kromatográfiára című fejezetben a Trp, *eritro*-, *treo*- β -MeTrp, *N*-benziloxikarbonil-triptofán (*Z*-Trp), *N*-(3,5-dinitro-2-piridil)-triptofán (DNPyr-Trp), 1-[5-klór-2-(metilamino)fenil]-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin (CMP-Tic), 5-fenil-tetrahidrofurán-2-on-butano-4-lakton ("butirolakton") a sztereoizomerek elválasztásának hőmérsékletfüggését tanulmányoztuk. Ezzel az, volt a célunk, hogy következtetéseket vonjunk le a kölcsönhatás jellegére, ami létrejön a különböző típusú modellvegyületek és a risztocetin A molekula (Chirobiotic R oszlop királis szelektora) között.

Megállapítottuk, hogy fordított fázisú módban az "ikerionos" és a negatív töltésű vegyületek kölcsönhatása kedvezőbb az állófázissal, mert az elektrosztatikus kölcsönhatás kialakítására alkalmas funkciós csoporttal rendelkeznek.

A térszerkezet merevítése és a funkciós csoportok által kialakított kölcsönhatások elősegítették a királis felismerést.

A királis felismeréshez nem szükséges az elsődleges kölcsönhatás kialakítására képes csoport jelenléte. Az erős másodlagos kölcsönhatások elősegítik a királis elválasztást.

Normál és polár-organikus módban más jellegű kölcsönhatások a meghatározóak a királis elválasztás során (H-híd, π - π - és szterikus kölcsönhatás).

Az entalpia-entrópia kompenzáció vizsgálatával arra a következtetésre jutottunk, hogy a Chirobiotic R oszlopon az egyes enantiomerek elválasztási mechanizmusa hasonló.

Az entalpia-entrópia kompenzációból megállapítottuk, hogy a vizsgált vegyületek és az állófázis között kétfajta kölcsönhatás alakul ki, az egyik csoportba tartoznak a *Z*-Trp, DNPyr-Trp, a másikba pedig a CMP-Tic, "butirolakton", Trp, *eritro*-, *treo*- β -MeTrp sztereoizomerek. Egy csoporton belül a kölcsönhatás jellege hasonló.

9. Irodalomjegyzék

1. R.W. Souter, *Chromatographic Separation of Stereoisomers*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1985.
2. W. Lindner, C. Petterson, in I.M. Wainer (Ed), *Chromatography in Pharmaceutical Development*, Aster Springfield, Oregon, 1985, pp. 63.
3. M. Zief, L.J. Crane (Eds), *Chromatographic Chiral Separations*, Marcel Dekker, New York, NY, USA, 1988.
4. V.A. Davankov, in A.M. Krstulovic (Ed), *Chiral Separation: Applications to Pharmaceutical Compounds*, Ellis Horwood, Chichester, England, 1989.
5. T. Stevenson, I.D. Wilson, *Chiral Separation*, Plenum Press, New York, 1989
6. M. Ahnhoff, S Einarsson in W.J. Lough (Ed), *Chiral Liquid Chromatography*, Blackie, Glasgow, 1989, p.39.
7. T. Shibata, K. Mori, Y. Okamoto in A.M. Krstulovic (Ed.), *Chiral separations by HPLC: Application to Pharmaceutical Compounds*, Ellis Horwood, Chichester, England, 1989, p. 336.
8. S. Görög in H. Lingeman, W.J.M. Underberg (Eds), *Detection-Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 1990, p. 193.
9. S.G. Allenmark, *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*, Ellis Horwood, 2nd ed., New York, USA, 1991.
10. J. Gal in I.W. Wainer (Ed), *Drug Stereochemistry. Analytical Methods and Pharmacology*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, NY, 1993, p. 65.
11. M.W. Skidmore in K. Blau, J. Halket (Eds), *Handbook of Derivatives for Chromatography*, J. Wiley and Sons, Chichester, 2nd ed., 1994, p. 215.
12. G.A. Subramanian, *Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, 1994.
13. H.Y. Aboul-Einen, I.W. Wainer, *The Impact of Stereochemistry on Drugs Development and Use*, Chemical Analysis Series, Vol. 142, Wiley, New York, USA, 1997.
14. K. Hatada, T. Kitayama, O. Vogl (Eds), *Macromolecular Design of Polymeric Materials*, Marcel Dekker, New York, USA, 1997.
15. S. Ahuja (Ed), *Chiral Separations, Application and Technology*, American Chemical Society, Washington DC, 1997.
16. K. Jinno, *Chromatographic Separations Based on Molecular Recognition*, Wiley-VCH, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1997.
17. T.E. Beesley, R.P.W. Scott, *Chiral Chromatography*, Wiley, Chichester, 1998.
G. Lunn, L.C. Hellwig, *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC*, Wiley and Sons Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1998.
18. T. Toyo'oka, *Modern Derivatization Methods for Separation Sciences*, Wiley and Sons, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1999.
19. I.D. Wilson, E.R. Adlard, M. Cooke, C.F. Poole (Eds), *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, New York, 2000, p. 2310.
20. C. Petterson, *Trends. Anal. Chem.*, **7** (1988) 209.
21. D.W. Armstrong, S.M. Han, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **19** (1988) 175.
22. S. Görög, M. Gazdag, *J. Chromatogr. B*, **659** (1994) 51.
23. B. Chankvetadze (Ed.), *J. Chromatogr. A*, **906** (1-2) kötet (2001).
24. B. Chankvetadze, K. Krommen (Eds.), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **27** kötet (2002).
25. E.J. Ariëns, *Med. Res. Rev.*, **6** (1986) 451.
26. V.J. Hruby, *Life Sci.*, **31** (1982) 189.

27. H. Furukawa, E. Sakahibara, K. Ito, Chem. Pharm. Bull. **23**, 1625 (1975)
28. H. Furukawa, Y. Mori, Y. Takkeucki, K. Ito, J. Chromatogr. **136**, 428 (1977)
29. K. Gamoh, H. Sawamoto, Anal. Chim. Acta., **243** (1991) 251.
30. J. Kondo, T. Inaoka, N. Suzuki, T. Kawasaki, A. Nakanishi, Y. Kawahara, Anal. Sci., **10** (1994) 697.
31. J. Goto, M. Hasegawa, S. Nakamura, K. Shimada, T. Nambara, J. Chromatogr., **152** (1978) 413.
32. W.H. Pirkle, M.S. Hoekstra, J. Org. Chem., **39** (1974) 3904.
33. A. Darmon, J.P. Thenot, J. Chromatogr., **374** (1986) 321.
34. Y. Gietl, H. Spahn, E. Mutschler, J. Chromatogr., **426** (1988) 305.
35. M. Piquette-Miller, R.T. Foster, F.M. Pasutto, F. Jamali, J. Chromatogr., **526** (1990) 129.
36. D.S. Dunlop, A. Neidle, Anal. Biochem., **615** (1987) 38.
37. F.J. Belas, M.A. Phillips, N.R. Srinivas, R.H. Barbhaiya, I.A. Blair, Biomed. Chromatogr., **9** (1995) 140.
38. M. Hoshino, K. Yajima, Y. Suzuki, A. Okahira, J. Chromatogr. B, **661** (1994) 281.
39. A.L. Peyton, R. Carpenter, K. Rutkowski, Pharm. Res., **8** (1991) 1528.
40. M. Piquette-Miller, F. Jamali, Pharm. Res., **10** (1993) 294.
41. R. Mehvar, J. Chromatogr., **527** (1990) 79.
42. G. Pflugmann, H. Spahn, E. Mutschler, J. Chromatogr., **421** (1987) 161.
43. S. Laganière, E. Kwong, D.D. Shen, J. Chromatogr., **488** (1989) 407.
44. A.A. Gulaid, G.W. Houghton, A.R. Boobis, J. Chromatogr., **318** (1985) 393.
45. S.K. Chin, A.C. Hui, K.M. Giacomini, J. Chromatogr., **489** (1989) 438.
46. H.G. Schaefer, H. Spahn, L.M. Lopez, H. Derendorf, J. Chromatogr., **527** (1990) 351.
47. J. Maibaum, J. Chromatogr., **436** (1988) 269.
48. L. Olsen, K. Brønnum-Hansen, P. Helboe, G.H. Jørgensen, S. Kryger, J. Chromatogr., **636** (1993) 231.
49. Y. Zhou, Z. Sun, Yaouxue Xuebao, **26** (1991) 701.
50. E. Martin, K. Quinke, H. Spahn, E. Mutschler, Chirality, **1** (1989) 223.
51. T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, Analyst, **120** (1995) 385.
52. T. Toyo'oka, T. Suzuki, T. Watanabe, Y.-M. Liu, Anal. Sci., **12** (1996) 779.
53. T. Suzuki, T. Watanabe, T. Toyo'oka, Anal. Chim. Acta, **352** (1997) 357.
54. Y.-M. Liu, J.-R. Miao, T. Toyo'oka, Anal. Chim. Acta, **314** (1995) 169.
55. T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, J. Chromatogr. A, **689** (1995) 23.
56. Y.-M. Liu, T. Toyo'oka, Chromatographia, **40** (1995) 645.
57. R. L. Heinrikson, S. C. Meredith, Anal Biochem, **65** (1984) 136.
58. D. Fürst, L. Pollack, T. A. Graser, H. Godel, P. Stenle, J. Chromatogr, **499** (1990) 9.
59. J. Gal, D.M. Desai, S. Meyer-Lehnert, Chirality, **2** (1990) 43.
60. T. Kinoshita, Y. Kasahara, N. Nimura, J. Chromatogr., **210** (1981) 77.
61. N. Nimura, A. Toyama, T. Kinoshita, J. Chromatogr., **316** (1984) 547.
62. R. F. Albert, F. Cardinaux, 11 th Am. Pept. Symp., p.437
63. Z. Tian, T. Hrinyo-Pavlina, R. W. Roeske, J. Chromatogr., 541, (1991), 297.
64. O.P. Kleidernigg, K. Posch, W. Lindner, J. Chromatogr. A, **729** (1996) 33.
65. O.P. Kleidernigg, W. Lindner, Chromatographia, **44** (1997) 465.
66. M. Péter, A. Péter, F. Fülöp, J. Chromatogr. **871** (2000) 115.
67. A. Péter, M. Péter, F. Fülöp, G. Török, G. Tóth, D. Tourwé, J. Sápi, Chromatographia, **51** (2000) S-148.

68. Péter M., Fülöp F., Péter A. Magyar Kémiai Folyóirat **108** (2002) 173.
69. F. Sanger, Biochem. J. **39**, (1945) 507.
70. P. Marfey, Carlsberg Res. Commun., **49** (1984) 591.
71. H. Brückner, C. Gah, J. Chromatogr., **555** (1991) 81.
72. Gy. Szókán, G. Mező, F. Hudecz, J. Chromatogr., **444** (1988) 115.
73. Gy. Szókán, G. Mező, F. Hudecz, Zs. Majer, I. Schön, O. Nyéki, T. Szirtes, R. Dölling, J. Liq. Chromatogr., **12** (1989) 2855.
74. H. Brückner, B. Strecker, J. Chromatogr., **627** (1992) 97.
75. H. Brückner, S. Zivny, Amino Acids, **4** (1993) 157.
76. H. Brückner, C. Keller-Hochl, Chromatographia, **30** (1990) 81.
77. Gy. Szókán, S. Hadfi, K. Krizsán, A. Limbeck, I. Krecz, M. Almás, Cs. Somlai, J. Liq. Chromatogr., **17** (1994) 2759.
78. Gy. Szókán, Zs. Majer, E. Kollát, M. Kajtár, M. Hollósi, M. Peredy-Kajtár, J. Liq. Chromatogr., **18** (1995) 941.
79. H. Brückner, M. Leitenberger, Chromatographia, **42** (1996) 683.
80. K. Fujii, Y. Ikai, T. Mayumi, H. Oka, M. Suzuki, K.-i. Harada, Anal. Chem. **69** (1997) 3346.
81. K. Fujii, Y. Ikai, T. Mayumi, H. Oka, M. Suzuki, K.-i. Harada, Anal. Chem. **69** (1997) 5146.
82. K.-i. Harada, A. Matsui, Y. Shimizu, R. Ikemoto, K. Fujii, J. Chromatogr., **921** (2001) 187.
83. A. Scaloni, M. Simmaco, F. Bossa, Amino Acids, **8** (1995) 305.
84. H. Brückner, C. Keller-Hochl, Chromatographia, **30** (1990) 621.
85. Gy. Szókán, G. Mező, Zs. Majer, I. Schön, O. Nyéki, R. Dölling, in Peptides 1990, eds. E. Giral, D. Amdreu, Escom Sci. Publ. B. V. p. 339 (1991)
86. S., S. Simmons, D., F. Johnson, Anal. Biochem., **82** (1977) 250.
87. S., S. Simmons, D., F. Johnson, J. Chem. Soc. Chem. Commun, **11** (1977) 374.
88. S., S. Simmons, D., F. Johnson, J. Org. Chem., **43** (1978) 2886.
89. P. Lindroth, K. Mopper, Anal. Chem. **51**, (1979) 1667.
90. W. S. Gardner, W. H. Miller, Anal. Biochem. **101** (1980) 61.
91. B. N. Jones, S. Paabo, S. Stein, J. Liq. Chromatogr. **4** (1981) 565.
92. R., L. White, A., C. Demarco, K., C. Smith, J. Chromatogr. **483**, (1989) 437.
93. M. R. Euerby, L. L. Partridge, W. A. Gibbons, J. Chromatogr. **483** (1989) 239.
94. A. Duchateau, M. Crombach, J. Kamphuis, W.J.H. Boesten, H.E. Schoemaker, E.M. Meijer, J. Chromatogr., **471** (1989) 263.
95. H. Brückner, R. Wittner, H. Godel, J. Chromatogr., **476** (1989) 73.
96. D.M. Desai, J. Gal, J. Chromatogr., **629** (1993) 215.
97. M.R. Euerby, L.Z. Partridge, P. Rajani, J. Chromatogr., **447** (1988) 392.
98. M.R. Euerby, P.B. Nunn, L.Z. Partridge, J. Chromatogr., **466** (1989) 407.
99. R.H. Buck, K. Krummen, J. Chromatogr., **315** (1984) 279.
100. H. Brückner, P. Jack, M. Langer, H. Godel, Amino Acids, **2** (1992) 271.
101. H. Brückner, R. Wittner, H. Godel, Chromatographia, **32** (1991) 383.
102. A. Jegorov, V. Matha, T. Trnka, M. Cerny, J. High Resolut. Chromatogr., **13** (1990) 718.
103. A. Jegorov, J. Triska, T. Trnka, M. Cerny, J. Chromatogr., **434** (1988) 417.
104. S. Einarsson, S. Folestad, B. Josefsson, J. Liq. Chromatogr., **10** (1987) 1589.
105. H. Brückner, S. Zivny, Amino Acids, **4** (1993) 157.
106. A. Carpino, G. Y. Han, J. Org. Chem. **37** (1982) 3404.
107. S. Einarsson, B. Josefsson, P. Möller, D. Sanchez, Anal. Chem., **59** (1987) 1589.
108. A. Roux, G. Blanchot, A. Baglin, B. Flouvat, J. Chromatogr., **570** (1991) 453.

109. M.T. Rossel, A.M. Vermeulen, F.M. Belpaire, *J. Chromatogr.*, **568** (1991) 239.
110. D.T. Witte, M. Ahnoff, K.-E. Karlsson, J.-P. Franke, R.A. de Zeeuw, *J. Chromatogr.*, **641** (1993) 39.
111. E. Okuma, H. Abe, *J. Chromatogr. B*, **660** (1994) 243.
112. C. Boursier-Neyret, A. Baune, P. Klippert, I. Castagne, C. Sauveur, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11** (1993) 1161.
113. L. Rees, C.J. Suckling, H.C.S. Wood, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1987, 470.
114. C. Prakash, H.K. Jajoo, I.A. Blair, R.F. Mayol, *J. Chromatogr.*, **493** (1989) 325.
115. R. Mehvar, *J. Pharm. Sci.*, **78** (1989) 1035.
116. F. Li, S.F. Cooper, M. Cote, *J. Chromatogr. B*, **668** (1995) 67.
117. M. Ahnoff, S. Chen, A. Green, I. Grundevik, *J. Chromatogr.*, **506** (1990) 593.
118. R. Büshges, R. Devant, E. Mutschler, H. Spahn-Langguth, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15** (1996) 201.
119. R. Büshges, H. Linde, E. Mutschler, H. Spahn-Langguth, *J. Chromatogr. A*, **725** (1996) 323.
120. D.M. Jonsson, A. Reuter, J.M. Collins, G.F. Thompson, *J. Pharm. Sci.*, **68** (1979) 112.
121. S. Görög, B. Herényi, M. Löw, *J. Chromatogr.*, **353** (1986) 417.
122. S. Mayer, E. Mutschler, H. Spahn-Langguth, *Chirality*, **3** (1991) 35.
123. T. Toyo'oka, M. Ishibashi, T. Terao, *Anal. Chim. Acta.*, **278** (1993) 71.
124. B. Liebmann, S. Mayer, E. Mutschler, H. Spahn-Langguth, *Drug Res.*, **42** (1992) 1354.
125. C. E. Dalglisch, *J. Chem. Soc.* **137** (1952) 3940.
126. S. V. Rogozin, V. A. Davankov, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **192** (1970) 1288.
127. W. H. Pirkle, A. Tsipouras, T. J. Sowin, *J. Chromatogr.*, **319** (1985) 392.
128. W. H. Pirkle, T. C. Pochapsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **108** (1986) 352.
129. W. H. Pirkle, M. H. Hyun, *J. Chromatogr.*, **322**, (1985) 309.
130. T. Hargitai, P. Reinholdsson, B. Tönnell, *J. Chromatogr.*, **540** (1991) 145-155.
131. G. Blascke, *J. Liq. Chromatogr.* **9**, (1986) 341.
132. S. Allenmark, B. Bomgren, H. Boren, *J. Chromatogr.*, **237**, (1982) 473.
133. S. Allenmark, B. Bomgren, H. Boren, *J. Chromatogr.*, **264**, (1983) 63.
134. B. Bomgren, S. Allenmark, *J. Liq. Chromatogr.* **9**, (1986) 667.
135. J. Yang, D. S. Hage, *J. Chromatogr.* **645**, (1993) 241.
136. M. L. Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin*, Springer-Verlag, Berlin (1978).
137. J. Szejtli, *Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982.
138. W. L. Hinze, *Application of Cyclodextrins in Chromatographic separations and purification methods in Separation and Purification Methods*, Vol. 10, Oss, C. J., Ed., Marcel Dekker, New York, 159 (1981).
139. B. Zsádon, M. Szilasi, K. Otta, F. Tüdös, E. Fenyvesi, J. Szejtli, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **100**, (1979) 265.
140. B. Zsádon, M. Szilasi, F. Tüdös, E. Fenyvesi, J. Szajtli, J. Stark, **31**, (1979) 11.
141. K. Fujimura, T. Ueda, T. Ando, *Anal. Chem.*, **55**, (1983) 446.
142. Y. Kawaguchi, M. Tanaka, M. Nakae, K. Funazo, T. Shono, *Anal. Chem.*, **55**, (1983) 1852.
143. M. Tanaka, Y. Kawaguchi, T. Shono, M. Uebori, Y. Kuge, *J. Chromatogr.*, **301**, (1984) 345.
144. D. W. Armstrong, *U.S. Patent* 4, **539**, (1985) 399.
145. W. L. Hinze, T. E. Riehl, D. W. Armstrong, W. Demond, A. Alak, T. Ward, *Anal. Chem.*, **57** (1985) 237.

146. D. W. Armstrong, W.Demond, J. Chromatogr. Sci., **22** (1984) 411.
147. D. W. Armstrong, X. Yang, S. Han, M. R. A. Menges, Anal. Chem., **59**, (1987) 2594.
148. S. Ch. Chang, L. R. Wang, D. W. Armstrong, J. Liq. Chromatogr., **15**(9), (1992) 1411.
149. D. W. Armstrong, T. J. Ward, R. D. Armstrong, T. E. Beesley, Science, **232**, (1986) 1132.
150. G. Gokel, H. D. Durst, Aldrichimia Acta, **9**, (1976) 3.
151. G.D.Y. Sogah, D.J. Cram, J. Am. Chem. Soc., **101**, (1979) 3035.
152. D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, J.R. Chen, Anal. Chem., **66** (1994) 1473.
153. D.W. Armstrong, Y. Zhou, J. Liquid Chromatography, **17** (1994) 1695.
154. D.W. Armstrong, K.L Rundlett, J. Liquid Chromatography, **18** (1998) 3659.
155. U.B. Nair, S.S.C. Chang, D.W. Armstrong, Y.Y. Rawjee, D.S. Eggleston, J.V. McArdle, Chirality, **8** (1996) 590.
156. D.W. Armstrong, Y. Liu, K.H. Ekborg-Ott, Chirality, **7** (1995) 474.
157. A. Berthod, Y. Liu, C. Bagwill, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A, **731** (1996) 123.
158. M.P. Gasper, A. Berthod, U.B. Nair, D.W. Armstrong, Anal. Chem., **68** (1996) 2501.
159. D.W. Armstrong, M.P. Gasper, K.L. Rundlett, J. Chromatogr. A, **689** (1995) 285.
160. K.H. Ekborg-Ott, Y. Lin, D.W. Armstrong, Chirality, **10** (1998) 434.
161. K.H. Ekborg-Ott, X. Wang, D.W. Armstrong, Microchem. J., **62** (1999) 26.
162. K.H. Ekborg-Ott, J.P. Kullman, X. Wang, K. Gahn, L. He, D.W. Armstrong, Chirality, **10** (1998) 627.
163. A. Berthod, X. Chen, J.P. Kullman, D.W. Armstrong, F. Gasparrini, I. D'Acquarica, C. Villani, Anal. Chem., **72** (2000) 1767.
164. I. D'Acquarica, F. Gasparrini, D. Misiti, G. Zappia, C. Cimorelli, G. Palmieri, A. Carotti, S. Cellamare, C. Villani, Tetrahedron: Asymmetry, **11** (2000) 2375.
165. Chirobiotic Handbook, Advanced Separation Technologies Inc; (2002)
166. T. J. Ward, C. Dann, A. Blaylock, J. Chromatogr. **715**, (1995) 337.
167. D.W. Armstrong, S. Chen, C.D. Chang, S.C. Chang, J. Liquid. Chromatogr., **15** (1992) 545.
168. S.C. Chang, G.L. Reid III, S. Chen, C.D. Chang, D.W Armstrong, Trends Anal. Chem., **12** (1993) 144.
169. M. Pawlowska, S. Chen, D.W. Armstrong, J. Chromatogr, **641** (1993) 257.
170. A. Tchaplal, S. Heron, H. Colin, G. Guiochon, Anal. Chem., **60** (1988) 1443.
171. L.A. Cole, J.G. Dorsey, Anal. Chem., **64** (1992) 1317.
172. L.A. Cole, J.G. Dorsey, K.A. Dill, Anal. Chem., **64** (1992) 1324.
173. H.K. Lee, N.E. Hoffmann, J. Chromatogr. Sci., **32** (1994) 97.
174. H. Chen, Cs. Horvath, J. Chromatogr. A, **705** (1995) 3.
175. P.L. Zhu, J.W. Dolan, L.R. Snyder, N.M. Djordjevic, D.W. Hill, J.T. Lin, L.C. Sander, L.V. Heukelem, J. Chromatogr. A, **756** (1996) 63.
176. J. Li, P.W. Carr, Anal. Chem., **69** (1997) 3884.
177. J. Li, Anal. Chim. Acta, **369** (1998) 21.
178. C.S. Lee, W.J. Cheong, J. Chromatogr. A, **848** (1999) 9.
179. J.W. Dolan, L.R. Snyder, T. Blanc, L. Van Heukelem, J. Chromatogr. A, **897** (2000) 37.
180. J.W. Dolan, L.R. Snyder, T. Blanc, J. Chromatogr. A, **897** (2000) 51.
181. D.V. McCalley, J. Chromatogr. A, **902** (2000) 311.

182. J. Zukowski, M. Pawlowska, M. Pietraszkiewicz, *Chromatographia*, **32** (1991) 82.
183. M. Hilton, D.W. Armstrong, *J. Liquid Chromatogr.*, **14** (1991) 9.
184. M. Hilton, D.W. Armstrong, *J. Liquid Chromatogr.*, **14** (1991) 3673.
185. M. Schlauch, A.W. Frahm, *J. Chromatogr. A*, **868** (2000) 197.
186. T. Fornstedt, P. Sajonz, G. Guiochon, *J. Amer. Chem. Soc.*, **119** (1997) 1254.
187. T. Fornstedt, G. Götmár, M. Andersson, G. Guiochon, *J. Amer. Chem. Soc.*, **121** (1999) 1664.
188. G. Götmár, T. Fornstedt, G. Guiochon, *Chirality*, **12** (2000) 558.
189. K.B. Sentell, J.G. Dorsey, *J. Liquid Chromatogr.*, **11** (1988) 1875.
190. P. Jandera, H. Colin, G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, **248** (1982) 325.
191. *Peptides, Synthesis, Structures and Application*, Ed. Gutte, B. Academic Press, London, 1995.
192. E. Susan, T. Gibson, G. Nathalie and J. T. Matthew, *Tetrahedron*, **55** (1999) 585.
193. P. W. Schiller, T. M.-D. Nguyen, G. Weltrowska, B. C. Marsden, B. J. Lemieux, C. Chung, N.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** (1992) 11871.
194. W. M. Kazmierski, H. I. Yamamura, V. J. Hruby, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991) 2275.
195. K. Tóth, M. Kovács, M. Zarándi, G. Halmos, K. Groot, A. Nagy, Z. Kele, Schally, A.V. *J. Peptide Res.* **51** (1998) 134.
196. N. Nimura, H. Ogura, T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, **202** (1980) 375.
197. G. Török, A. Péter, E. Forró, F. Fülöp, *J. Chromatogr. Sci.* **39** (2001) 188.
198. I. D'Acquarica, F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani, A. Carotti, S. Cellamare, S. Muck, *J. Chromatogr.* **857** (1999) 145.
199. A. Berthold, T. L. Xiao, L. Liu, W. S. Jenks, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, **955** (2002) 53.
200. A. Péter, A. Árki, D. Tourwé, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* (2003)
201. D. W. Armstrong, *LC-GC.*, **5** (1997) S20
202. P. Sipos, G. Peintler, G. Tóth, *Peptide Protein Res.*, **39** (1998) 207
203. K. Chatterjee, S. Laha, *Can. J. Chem.*, **62**, (1984) 1369
204. M. Hilton, D. W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.*, **14** (1991) 3673
205. J. Leffler, E. Grunwald, *Rates, Equilibria in Organic Reactions*. Wiley, New York, 1963.
206. W. Melander, D.E. Campbell, C. Horvath, *J. Chromatogr.*, **158** (1978) 215.
207. B. Koppenhoefer, E. Bayer, *Chromatographia*, **19** (1984) 123.
208. H.M.J. Boots, P.K. de Bokx, *J. Phys. Chem.*, **93** (1989) 8240.
209. R.R. Krug, W.G. Hunter, R.A. Gieger, *J. Phys. Chem.*, **80** (1976) 2335.
210. R.R. Krug, W.G. Hunter, R.A. Gieger, *J. Phys. Chem.*, **80** (1976) 2341.

10. Summary

Optically active compounds are a very important part of our everyday life, for example vitamins, aroma compounds, drugs and plant-protecting agents. The building materials of the human organism too are chiral, including the proteins, carbohydrates, hormones and DNA. Determination of the biologically active conformations of peptide hormones is an important goal in modern biology, since most peptide hormones are highly flexible molecules with numerous possible conformations under physiological conditions of conformational constraints. When the side-chain functional groups of natural amino acids are incorporated into peptides, such stereochemically and/or enantiomerically impure components furnish mixtures of compounds with different biological properties. It is therefore very important to have available enantiomerically pure and defined substances and analytical methods for the separation and identification of the different stereoisomers.

Successful high-performance liquid chromatographic (HPLC) methods for the resolution of amino acids include indirect and direct methods.

The aim of the present work was to develop new indirect chiral chromatographic methods for the separation of the stereoisomers of natural and unnatural amino acid analogues. (*S*)-*N*-(4-nitrophenoxycarbonyl)phenylalanine methoxyethyl ester was applied for the separation of the stereoisomers of glycine, proline, alanine, phenylalanine, β -alkyl-substituted amino acids and "imino" acids. The effects of different parameters on the derivatizing reaction were studied, such as the reaction time, the pH, molar ratio of the chiral derivatizing agent to the amino acid.

Another aim of the present work was to examine the mechanism of separation of macrocyclic antibiotic-type stationary phases: Chirobiotic T, Chirobiotic Tag and Chirobiotic R. The effects of temperature on chromatographic separations were investigated for Chirobiotic R. A comparison of the enantioselective free energy difference of Chirobiotic T and Chirobiotic Tag was used to establish the separation capabilities of the two columns.

The separation of stereoisomers of natural and unnatural amino acids was carried out with an indirect chiral chromatographic method. (*S*)-*N*-(4-nitrophenoxycarbonyl)phenylalanine methoxyethyl ester (*S*)-NIFE was used for the measurements.

The stereoisomers of several types of unnatural amino acid analogues, such as Gly, Ala, Pro, β -substituted-Phe, Tic, Tyr, Trp, pipecolic acid and tetrahydroisoquinoline analogues, were separated successfully with (*S*)-NIFE.

It was proved that the yields of derivatization depend on the reaction time, the pH, and the ratio of amino acid to the derivatizing agent. The optimum conditions were found for different types of amino acids.

The side-products were identified by means of HPLC-MS: phenylalanine methoxyethyl ester (Phe ester), and *N,N'*-bis(3-phenylpropionic acid-methoxyethyl ester-2-yl)urea ("urea dimer").

Not only the "imino" group was derivatized, but the hydroxy group coupled to the aromatic ring. The mono and bis products were identified by HPLC-MS and were separated.

The limit of detection for (*S*)-Phe at 205 nm at a signal to noise ratio of 2:1 was found to be about 20 pmol.

The stereoisomers of strongly sterically-hindered compounds (α -MeTic, α -substituted-Pro and β -alkyl-substituted amino acids) were reacted with the chiral derivatizing agent and the (*S*)-NIFE derivatives were separated by HPLC.

Slight differences in selectivity were observed between the investigated organic modifiers. In general, a higher resolution was achieved with smaller retention factors (*k*) with MeOH as organic modifier than with MeCN, but this advantage was sometimes counter-balanced by co-elution of one of the diastereomers with "urea dimer". This problem could easily be solved by a change of the gradient or the content of MeOH.

The retention of the diastereomer product with (*S*)-NIFE increased with increase of the hydrophobicity.

The enantiomers of natural amino acids were separated in one chromatographic run. Exceptions were Glu, Thr, Gln, Asn.

A change in the sequence of elution of the stereoisomers of β -alkyl-substituted-Trp, Phe, Tic and Tyr was observed on change of the stationary phase on the use of different organic modifiers.

The elution sequence was determined to be (*S*)<(*R*). Exceptions were the natural amino acids: Arg, His, Asn, Gln, Cys and allyl, benzyl and naphthyl-substituted proline analogues (Cahn-Ingold-Prelog rule).

As concerns sequence of elution of the stereoisomers of β -alkyl amino acids, the *erythro* (2*S*, 3*S*) and *threo* (2*S*, 3*R*) isomers always eluted first. The carbon atom connected to the carboxylic group has an effect on the sequence of elution.

The direct and indirect methods were compared as regards the separation of the stereoisomers of Pro, Gly, Ala, Phe and β -alkyl-Trp analogues. It was proved that (*S*)-NIFE is

the most efficient for separation of the stereoisomers of Pro analogues. The direct and indirect chiral chromatographic methods are successful for analysis of the stereoisomers of Gly. The macrocyclic antibiotic-type stationary phases and chiral derivatizing agents (S)-NIFE, GITC and FDAA are suitable for the separation of the stereoisomers of Ala and Phe analogues. The stereoisomers of β -alkyl-substituted Trp were separated only with the indirect methods ((S)-NIFE, GITC and FDAA). (S)-NIFE is the most efficient of the derivatizing agents.

Fluka began marketing (S)-NIFE in 2002.

Two macrocyclic antibiotic-type chiral stationary phases (CSPs), based on native teicoplanin and teicoplanin aglycone, Chirobiotic T and Chirobiotic TAG, respectively, were used for the HPLC separation of the enantiomers of sixteen unnatural primary α -amino acids, Gly, Ala, and Phe analogues, ten secondary α -amino acids ("imino acids") and eleven β -3-homo-amino acids. The enantioselective free energy difference was calculated from the separation factor. The separation efficiencies of the two columns were established in systematic investigations and compared on the basis of the determination of the enantioselective free energy difference for the two columns.

For the enantiomers of β -amino acids, there was a decrease in the retention factor with increasing MeOH content on Chirobiotic T and Chirobiotic Tag phases, i.e. typical reverse-phase behaviour was observed.

For the "imino" acids, when the MeOH content of the mobile phase was increased, a U-shaped curve was observed on the Chirobiotic T column, while the Chirobiotic Tag column exhibited exceptional behaviour: after an increase, the retention factor decreased with increasing MeOH content.

The enantiorecognition of primary and secondary α -amino acids is successful without the chiral centres of the carbohydrate units and the functional groups.

The carbohydrate units and apolar side-chain contributed to the chiral recognition of the stereoisomers of β -amino acids, which was a condition of successful separation. The probable cause of this is that the chiral carbon atom is one carbon atom farther from the carboxyl group than in the amino acids.

The aim of our measurements was to investigate the effects of the temperature and the mobile phase composition on enantioselective separations with a ristocetin A-containing CSP, the Chirobiotic R column. The chromatographic separations were carried out in all three chromatographic modes, i.e. the RP, PO and NP modes. The investigated model compounds were in the zwitterionic form, or negatively or positively charged, or neutral. In order to

calculate the thermodynamic parameters and to acquire information of value for an understanding of enantiomeric retention, selectivity and the mechanism on this CSP, van't Hoff plots were constructed. A plot of $\ln k$ versus $1/T$ has a slope of $-\Delta H^\circ/R$ and an intercept of $\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$ if ΔH° is invariant with temperature. This proved a convenient way of calculating the thermodynamic constants ΔH° and ΔS° for a chromatographic system if the phase ratio is known or can be calculated. The corresponding $\Delta(\Delta H^\circ)$ and $\Delta(\Delta S^\circ)$ values can be estimated from the selectivity factor (α), which is related to the difference in Gibbs free energy of association $\Delta(\Delta G^\circ)$ for an enantiomeric pair. A further thermodynamic approach to the analysis of physicochemical data is enthalpy - entropy compensation. The enthalpy -entropy compensation method was used to study the separation mechanisms in RP-HPLC.

The retention factors of the stereoisomers of Trp, *erythro* and *threo*- β -MeTrp exhibited a on U-shaped curve on Chirobiotic R column when the MeOH content of the mobile phase was increased. This became more marked with increase of the temperature.

We found that the retention factors of the stereoisomers of Z-Trp, DNPy-Trp, CMP-Tic, "butyrolactone" typical reserved-phases behavior observed on Chirobiotic R column.

The difference in Gibbs free energy, $-\Delta(\Delta G^\circ)$, versus the MeOH concentration in the mobile phase shows the existence of two subgroups of solutes: Trp, *erythro*- and *threo*- β -MeTrp and "butyrolactone" had smaller $-\Delta(\Delta G^\circ)$ values, while DNPy-Trp, Z-Trp and CMP-Tic had larger $-\Delta(\Delta G^\circ)$ values. The Gibbs free energy difference, which drives chiral recognition, was small for the first subgroup and resulted in poorer enantioselectivity, while the second subgroup with higher $-\Delta(\Delta G^\circ)$ resulted in very high α factors.

The interactions of analytes in the zwitterionic form or anionic form with ristocetin A (Chirobiotic R) are more favourable in reverse-phase mode, because of the charge-charge interaction between the carboxyl group of the investigated compounds and the primary amino group of ristocetin A.

The secondary interactions are important for chiral recognition in normal and polar-organic mode, e.g. steric, π - π , hydrogen bonding and dipolar interactions.

The bulk and rigidity of the molecule can influence the interactions necessary for chiral recognition. In most cases, increases in rigidity and bulk improve the enantioselectivity on the ristocetin A CSP.

Chiral recognition does not require that the compound has functional groups for primary interaction. Strong secondary interactions promote the chiral recognition.

The enthalpy vs. entropy compensation data (plots) for the L and D enantiomers are not significantly different from one another. This indicates that the two enantiomers are retained via similar retention mechanisms.

It can be seen from the enthalpy vs. entropy compensation data that the analytes in the study can be divided into two subgroups: the stereoisomers of Trp, β -MeTrp, CMP-Tic and "butyrolactone" belong in one group, and those of the more bulky and more hydrophobic Z-Trp and DNPy-Trp belong in the other group. The interactions of the investigated compounds with CSP are similar in one subgroup.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy a tanszéken készíthettem Ph.D. értekezésemet.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Péter Antal egyetemi docensnek a munkám szakmai irányításáért és a dolgozat megírásában nyújtott segítségéért.

Köszönet illeti kutatócsoportunk volt és jelenlegi munkatársait: Dr. Török Gabriellát, Ördögné Olajos Editet, Árki Anitát és Török Roland Sándort.

Külön köszönettel tartozom Halasiné Varga Ilonának, hogy kellemes légkörben végezhettem a kísérleti munkámat.

Tisztelettel köszönöm meg Prof. Dr. Dirk Tourwének kutatócsoportunk anyagi támogatását. Hálás köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Daniel W. Armstrongnak, hogy rendelkezésünkre bocsátott különböző királis állófázisokat.

Köszönetet szeretnék mondani a Solvay-Peptisyntha munkatársainak, akikkel kooperációban végeztük az (S)-NIFE származékképző reagens fejlesztését.

Hálás köszönettel tartozom mindazoknak a magyar és külföldi partnereinknek, akik a kutatásaink során alkalmazott aminosavakat szinjetizálták: Dr. Tóth Géza, Dr. Gera Lajos, Dr. Sági János, Prof. Dr. Fülöp Ferenc, J. Van Betstbrugge.

Szeretném köszönetemet kifejezni a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék minden dolgozójának.

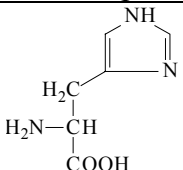
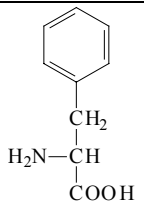
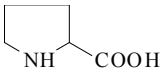
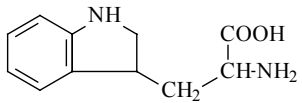
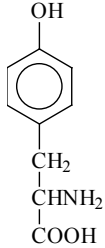
Örökös hálával tartozom családomnak és férjemnek, hogy tanulmányaim során mindig mellettem álltak. Szeretetükkel biztosították számomra azt a nyugodt háttérrel, amelyben végezhettem a munkámat.

Függelék

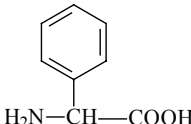
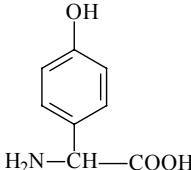
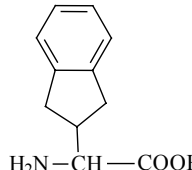
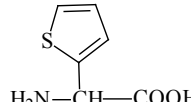
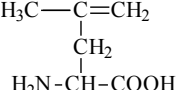
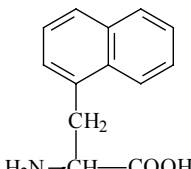
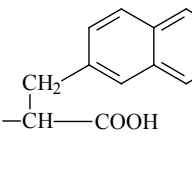
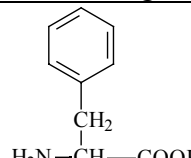
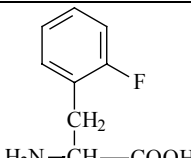
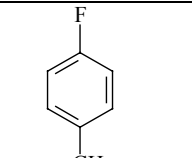
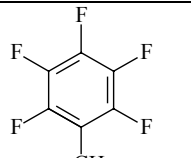
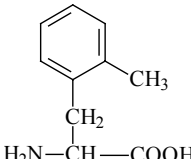
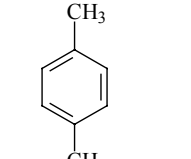
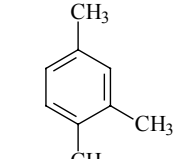
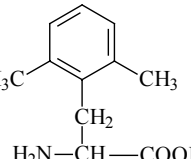
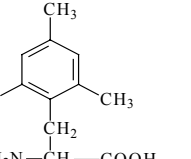
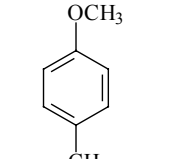
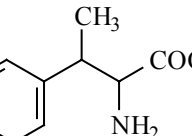
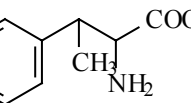
F/1. Táblázat

Vizsgált vegyületek szerkezeti képlete, számozása és rövidítése vegyületcsoportonként

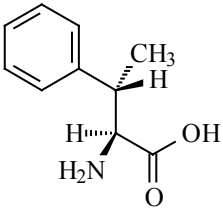
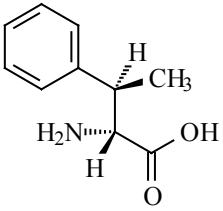
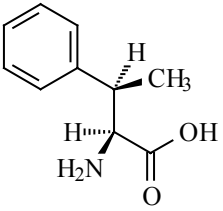
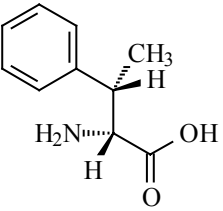
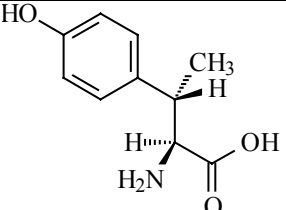
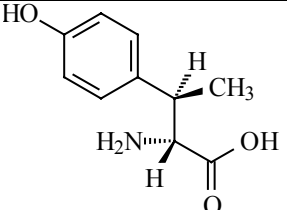
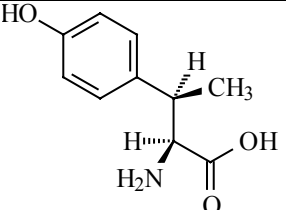
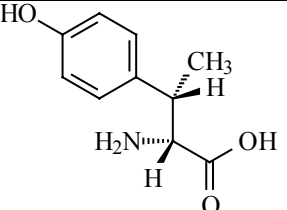
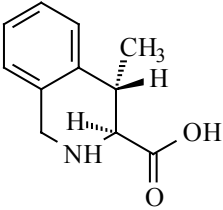
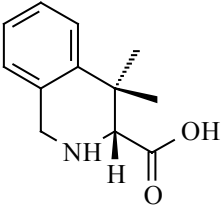
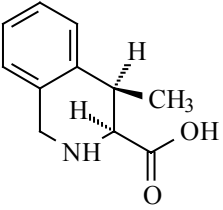
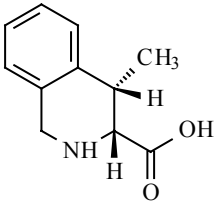
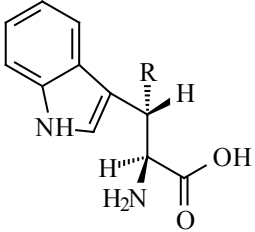
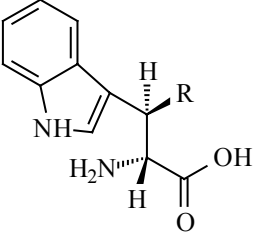
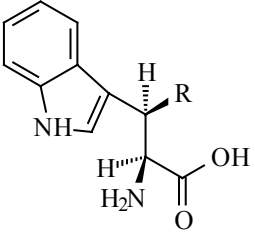
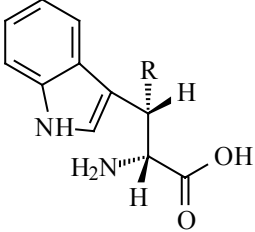
Fehérjealkotó aminosavak

$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{HN} \quad \text{NH}_2 \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CONH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
1 Ala	2 Arg	3 Asn	4 Asp
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{SH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CONH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	
5 Cys	6 Glu	7 Gln	8 His
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagdown \quad / \\ \text{CH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad / \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{SCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
9 Ile	10 Leu	11 Lys	12 Met
		$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
13 Phe	14 Pro	15 Ser	16 Thr
		$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad / \\ \text{CH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	
17 Trp	18 Tyr	19 Val	

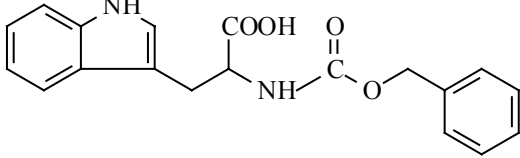
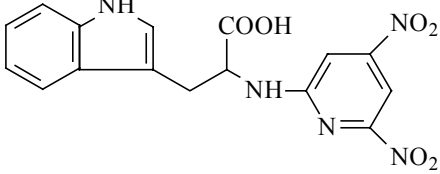
Gly, Ala és Phe analógok

			
20 PhGly	21 (4-OHPh)Gly	22 Igl	23 Thg
			
24 Mag	25 1-Nal	26 2-Nal	
			
27 Phe	28 2-FPhe	29 4-FPhe	30 F5F
			
31 2-MePhe	32 4-MePhe	33 2,4-diMePhe	34 2,6-diMePhe
			
35 2,4,6-triMePhe	36 4-OMePhe	37 <i>eritro</i> -β-MePhe	38 <i>threo</i> -β-MePhe

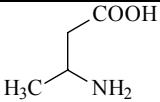
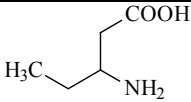
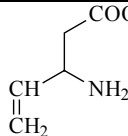
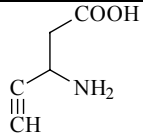
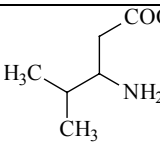
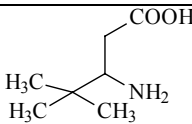
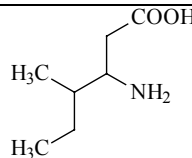
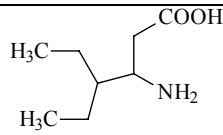
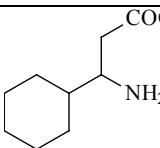
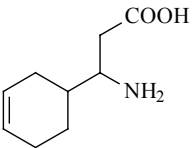
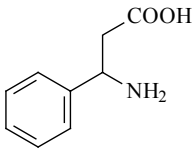
β-alkil-aminosavak

			
(2S,3S), L-eritro	(2R,3R), D-eritro	(2S,3R), L-treo	(2R,3S), D-treo
37 eritro-β-MePhe		38 treo-β-MePhe	
			
(2S,3S), L-eritro	(2R,3R), D-eritro	(2S,3R), L-treo	(2R,3S), D-treo
39 eritro-β-MeTyr		40 treo-β-MeTyr	
			
(2S,3S), L-eritro	(2R,3R), D-eritro	(2S,3R), L-treo	(2R,3S), D-treo
41 eritro-β-MeTic		42 treo-β-MeTic	
			
(2S,3S), L-eritro	(2R,3R), D-eritro	(2S,3R), L-treo	(2R,3S), D-treo
szám eritro	szám treo	-R	név
43	44	—CH ₃	<i>e,t</i> -β-MeTrp
45	46	—CH(CH ₃) ₂	<i>e,t</i> -β-2-PrTrp
47	48	—CH(CH ₂ CH ₃) ₂	<i>e,t</i> -β-3-PentTrp
49	50	—C ₆ H ₅	<i>e,t</i> -β-PhTrp
51	52	—C ₆ H ₃ (OMe) ₂	<i>e,t</i> -β-2,6-diMeOPhTrp

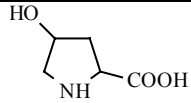
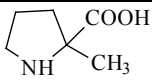
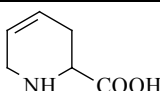
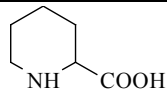
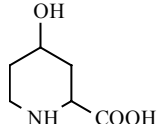
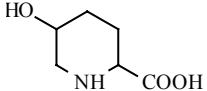
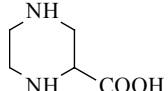
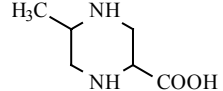
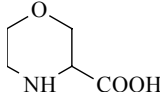
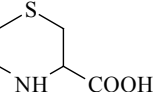
Egyéb Trp származékok

	
53 Z-Trp	54 DNPyrr-Trp

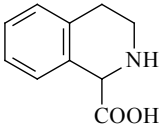
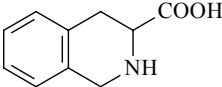
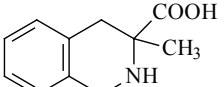
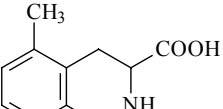
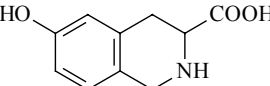
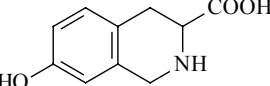
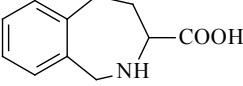
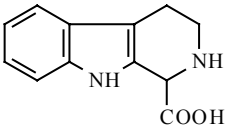
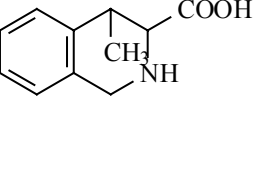
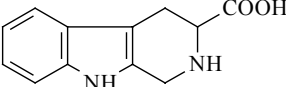
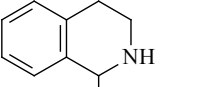
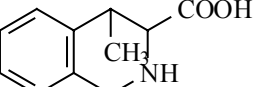
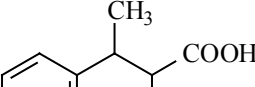
β-aminosavak

			
55	56	57	58
			
59	60	61	62
			
63	64	65	

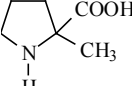
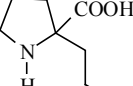
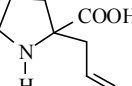
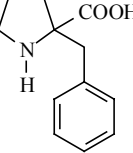
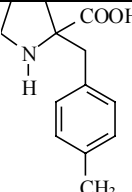
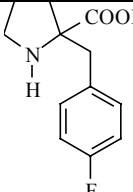
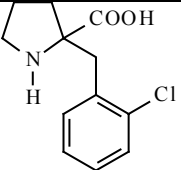
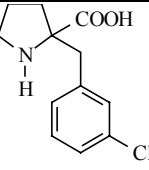
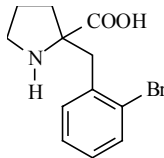
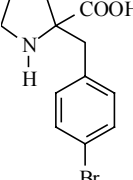
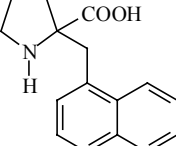
Szekunder aminosavak ("iminosavak")

			
66 c-4-OHPro	67 α-MePro	68 baïkain	69 Pip
			
70 c-4-OHPip	71 t-5-OHPip	72	73
			
74	75		

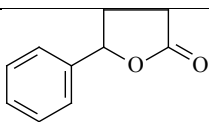
1,2,3,4-tetrahydroizokinolin (Tic) analógok

			
76 Tic1	77 Tic3	78 α-MeTic3	79 5-MeTic3
			
80 6-OHTic3	81 7-OHTic3		83 Nor
		84 Tcc	85 CMP-Tic
		86 <i>eritro</i> -β-MeTic3	87 <i>treo</i> -β-MeTic3

Prolin analógok

			
66 <i>c</i> -Me-Pro	88	89	90
			
91	92	93	94
			
95	96	97	

Egyéb vizsgált vegyületek



98 "butirolakton"

F/2. Táblázat

Fehérjealkotó aminosavak (S)-NIFE származékainak kromatográfiás paraméterei MeCN szerves módosító tartalmú eluens rendszerben

Vegyület		Eluens	k_S	k_R	α	R_S	Elúciós sorrend
1	Ala	a	8,09	8,77	1,08	5,50	$S < R$
2	Arg	a	7,62	7,03	1,08	5,56	$R < S$
3	Asn	a	7,05	7,05	1,00	0,00	$R = S$
4	Asp	a	7,70	7,97	1,03	1,89	$S < R$
5	Cys ^b	a	13,99	13,87	1,01	1,15	$R < S$
6	Glu	a	7,97	8,15	1,02	1,55	$S < R$
7	Gln	a	7,16	7,06	1,01	1,10	$R < S$
8	Hys	a	7,29	7,29	1,00	0,00	$R = S$
		b	8,59	7,99	1,07	3,33	$R < S$
9	Ile	a	11,44	12,50	1,09	6,72	$S < R$
10	Leu	a	11,70	12,66	1,08	5,34	$S < R$
11	Lys ^b	a	13,83	13,92	1,01	0,64	$S < R$
		b	16,93	17,10	1,01	1,26	$S < R$
12	Met	a	10,34	11,13	1,07	6,06	$S < R$
13	Phe	a	12,43	13,09	1,05	4,79	$S < R$
14	Pro	a	9,08	9,46	1,04	2,59	$S < R$
15	Ser	a	7,32	7,32	1,00	0,00	$S = R$
16	Thr	a	7,62	8,11	1,06	3,18	$S < R$
17	Trp	a	12,86	13,27	1,03	3,22	$S < R$
18	Tyr	a	10,03	10,38	1,03	3,36	$S < R$
	Tyr ^b	a	15,98	16,09	1,01	0,88	$S < R$
19	Val	a	10,13	11,21	1,10	7,55	$S < R$

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 1,0 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; eluens, A: H₂O(0,1% TFA), B: MeCN (0,1% TFA); Gradiens elúció, a, 0 perc 5% B, 90 perc 90% B, b, 0 perc 5% B, 120 perc 90% B, ^bbisz származék

F/3. Táblázat

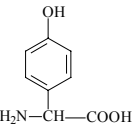
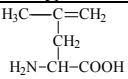
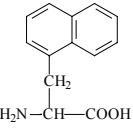
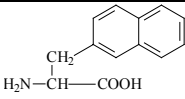
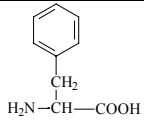
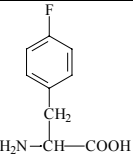
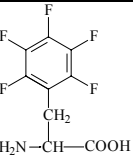
Fehérjealkotó aminosavak (S)-NIFE származékainak kromatográfiás paraméterei MeOH szerves módosító tartalmú eluens rendszerben

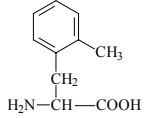
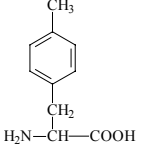
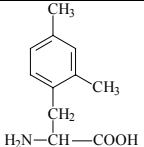
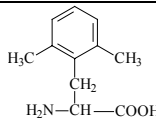
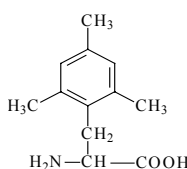
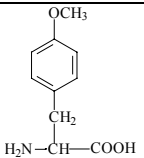
Vegyület		Eluens	k_S	k_R	α	R_S	Elúciós sorrend
1	Ala	d	9,33	10,37	1,11	7,31	$S < R$
2	Arg	d	8,20	7,52	1,09	4,97	$R < S$
3	Asn	d	7,69	7,54	1,01	0,95	$R < S$
		g	4,84	4,63	1,08	1,10	$R < S$
4	Asp	d	8,93	9,35	1,04	3,74	$S < R$
5	Cys ^b	d	14,86	14,45	1,03	2,93	$R < S$
		e	20,30	19,20	1,06	5,34	$R < S$
6	Glu	d	8,60	9,07	1,05	3,65	$S < R$
7	Gln	d	7,97	7,90	1,01	< 0,40	$R < S$
		g	5,32	5,14	1,03	0,73	$R < S$
8	Hys	d	7,91	7,24	1,09	4,74	$R < S$
9	Ile	d	11,95	13,96 ^c	1,17	9,75	$S < R$
		c	9,34	10,31	1,10	8,61	$S < R$
10	Leu	d	12,22	13,80 ^c	1,13	12,33	$S < R$
		c	9,34	10,34	1,10	9,29	$S < R$
11	Lys ^b	d	13,90	14,40	1,03	3,79	$S < R$
12	Met	d	10,53	11,84	1,12	9,34	$S < R$
13	Phe	d	12,71	13,99 ^c	1,10	6,42	$S < R$
		c	9,61	10,50 ^c	1,09	5,24	$S < R$
		f	22,08	24,63	1,11	8,51	$S < R$
14	Pro	d	9,46	9,96	1,05	3,33	$S < R$
15	Ser	d	7,93	7,93	1,00	0,00	$S = R$
		f	12,76	12,90	1,01	0,50	$S < R$
16	Thr	d	8,32	9,22	1,19	6,25	$S < R$
17	Trp	d	12,43	13,59	1,09	8,18	$S < R$
18	Tyr	d	10,16	11,11	1,09	7,89	$S < R$
	Tyr ^b	d	15,30	15,83	1,03	4,85	$S < R$
19	Val	d	10,71	12,45	1,16	12,07	$S < R$

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 1,0 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; eluens, A: H₂O(0,1% TFA)/B: MeOH (0,1% TFA)=90/10; B: H₂O(0,1% TFA)/B: MeOH (0,1% TFA)=10/90; Gradiens elúció, c, 0 perc 0% B, 40 perc 100% B, d, 0 perc 0% B, 60 perc 100% B, e, 0 perc 0% B, 90 perc 100% B, f, 0 perc 0% B, 120 perc 100% B, g, 0 perc 20% B, 30 perc 32% B, 50 perc 100% B; ^bbisz származék; ^crészleges elválás a "szimmetrikus karbamid" -tól

F/4. Táblázat

Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak kromatográfiás paraméterei MeOH tartalmú eluens rendszerben

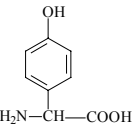
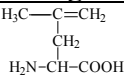
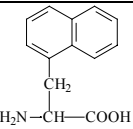
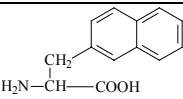
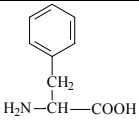
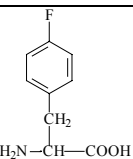
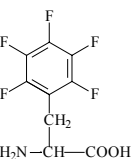
Vegyület	Eluens	k_S	k_R	α	R_S	Elúciós sorrend
21 (4-OHPh)Gly						
	45/55	1,66	2,86	1,72	6,75	
	35/65	0,55	0,84 ^d	1,52	2,23	S<R
24 Mag						
	45/55	1,14	2,16	1,89	6,83	S<R
	35/65	0,43	0,71	1,65	2,42	S<R
25 1-Nal						
	45/55	3,25 ^c	5,41	1,66	5,44	S<R
	35/65	1,35	2,27	1,68	5,22	S<R
26 2-Nal						
	45/55	5,78	10,77	1,86	8,96	S<R
	35/65	1,42	2,34	1,64	5,16	S<R
27 Phe						
	45/55	0,86	1,84	2,14	6,12	S<R
	35/65	0,58	0,99	1,70	2,36	S<R
29 4-FPhe						
	45/55	2,26	4,07	1,80	7,00	S<R
	35/65	0,70	1,10 ^d	1,57	3,00	S<R
30 F5F						
	45/55	6,06	11,38	1,87	8,11	S<R
	35/65	1,59	2,62	1,64	5,76	S<R

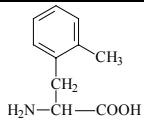
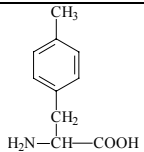
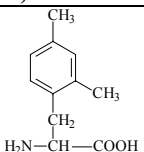
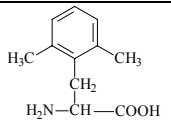
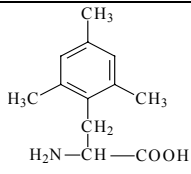
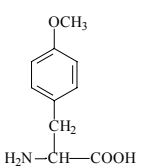
Vegyület	Eluens	k_S	k_R	α	R_S	Elúciós sorrend
31 2-MePhe						
	45/55	2,78	5,45	1,96	7,77	S<R
	35/65	0,83 ^c	1,40	1,68	4,60	S<R
32 4-MePhe						
	45/55	3,11 ^c	6,01	1,93	7,22	S<R
	35/65	0,95 ^c	1,54	1,62	3,03	S<R
33 2,4-diMePhe						
	45/55	3,29 ^c	4,95	1,50	7,81	S<R
	35/65	1,31	2,28	1,74	5,86	S<R
34 2,6-diMePhe						
	45/55	3,27	4,09	1,25	2,61	S<R
	35/65	1,14	2,03	1,78	5,46	S<R
35 2,4,6-triMePhe						
	45/55	7,57	15,27	2,01	11,14	S<R
	35/65	1,87	3,35	1,79	7,33	S<R
36 4-MeOPhe						
	45/55	3,79	5,56	1,46	5,17	S<R
	35/65	0,84	1,07	1,27	1,71	S<R

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 0,80 mlperc⁻¹; t_M: 3,55 perc; detektálás, 205 nm; eluens, H₂O (0,1%TFA)/MeOH(0,1% TFA)= 45/55 (v/v), H₂O (0,1%TFA)/MeOH(0,1% TFA)=35/65 (v/v); ^crészleges elválás a 4-nitrofenol-tól ^drészleges elválás a "szimmetrikus karbamid"-tól.

F/5. Táblázat

Gly, Ala, és Phe analóg sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak kromatográfiás paraméterei MeCN tartalmú eluens rendszerben

Vegyület	Eluens	k_S	k_R	α	R_S	Elúciós sorrend
21 (4-OHPh)Gly						
	65/35	2,23	2,65	1,18	2,43	S<R
24 Mag						
	65/35	1,35	1,76	1,30	3,09	S<R
25 1-Nal						
	65/35	5,91 ^c	7,55	1,28	4,36	S<R
26 2-Nal						
	65/35	6,46	8,00	1,24	3,14	S<R
27 Phe						
	65/35	2,34	4,14	1,35	4,02	S<R
29 4-FPhe						
	65/35	2,93	3,58	1,22	3,57	S<R
30 F5F						
	65/35	6,35	8,00	1,26	4,52	S<R

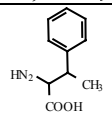
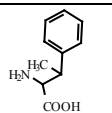
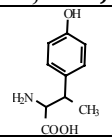
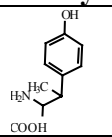
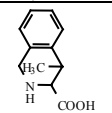
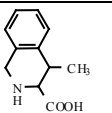
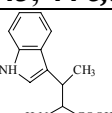
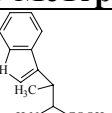
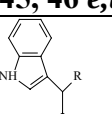
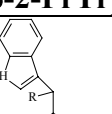
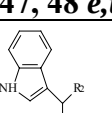
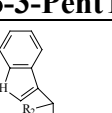
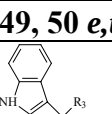
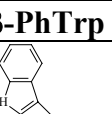
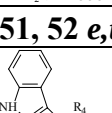
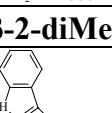
Vegyület	Eluens	k_S	k_R	α	R_S	Elúciós sorrend
31 2-MePhe						
	65/35	5,41	6,97	1,28	5,04	S<R
32 4-MePhe						
	65/35	3,29	4,24	1,28	4,50	S<R
33 2,4-diMePhe						
	65/35	4,32	5,68 ^d	1,31	5,70	S<R
34 2,6-diMePhe						
	65/35	7,27	9,80	1,35	6,72	S<R
35 2,4,6-triMePhe						
	65/35	8,00	9,19	1,15	2,80	S<R
36 4-MeOPhe						
	65/35	3,82	4,80	1,25	4,32	S<R

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 0,80 ml perc⁻¹; t_M: 3,55 perc; detektálás, 205 nm; eluens, H₂O (0,1%TFA)/MeCN(0,1% TFA)=35/65; ^crészleges elválás a 4-nitrofenol-tól; ^drészleges elválás a "szimmetrikus karbamid" -tól.

F/6. Táblázat

β -alkil-szubsztituált Phe, Tic és Trp analógok (S)-NIFE származékainak különböző kolonnákon mért kromatográfiás paraméterei MeCN tartalmú eluens rendszerben

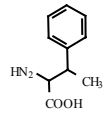
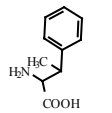
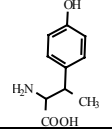
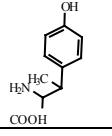
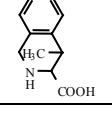
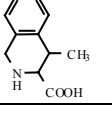
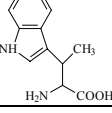
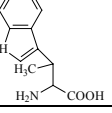
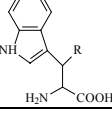
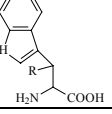
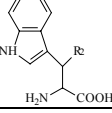
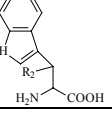
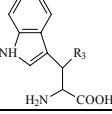
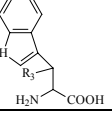
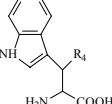
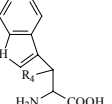
Vydac 218TP54

Vegyület	<i>k</i>				<i>α</i>		<i>R_S</i>					
	<i>eritro</i>		<i>treo</i>		<i>α_{b-a}</i>	<i>α_{d-c}</i>						
	a	b	c	d								
37, 38 <i>e,t</i>-β-MePhe							<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-b}</i>	<i>R_{S,b-d}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>	
		1,79	2,60	1,70	2,51	1,45	1,48	<0,40	2,45	<0,40	3,60	2,57
39, 40 <i>e,t</i>-β-MeTyr							<i>R_{S,c-a}</i>	<i>R_{S,a-d}</i>	<i>R_{S,d-b}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>	
		10,99 ^a	12,94 ^a	9,96 ^a	10,99 ^a	1,18	1,10	1,41	0,00	2,32	2,32	1,41
41, 42 <i>e,t</i>-β-MeTic							<i>R_{S,c-a}</i>	<i>R_{S,a-d}</i>	<i>R_{S,d-b}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>	
		2,49	3,29	2,24	2,95	1,32	1,32	1,00	1,67	1,33	3,00	2,67
43, 44 <i>e,t</i>-β-MeTrp							<i>R_{S,c-a}</i>	<i>R_{S,a-d}</i>	<i>R_{S,d-b}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>	
		1,55	2,12	1,55	2,12	1,37	1,37	0,00	2,33	0,00	2,33	2,33
45, 46 <i>e,t</i>-β-2-PrTrp							<i>R_{S,c-a}</i>	<i>R_{S,a-d}</i>	<i>R_{S,d-b}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>	
		6,55	9,24	6,18 ⁺	8,89	1,41	1,44	1,00	5,78	0,73	6,00	6,67
47, 48 <i>e,t</i>-β-3-PentTrp							<i>R_{S,c-a}</i>	<i>R_{S,a-d}</i>	<i>R_{S,d-b}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>	
		18,12	27,75	16,87	25,75	1,53	1,53	1,09	6,77	1,33	7,71	8,33
49, 50 <i>e,t</i>-β-PhTrp							<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-b}</i>	<i>R_{S,b-d}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>	
		7,28	9,08	7,87	9,80	1,25	1,25	1,17	2,33	1,23	3,33	3,39
51, 52 <i>e,t</i>-β-2-diMeOPhTrp							<i>R_{S,c-a}</i>	<i>R_{S,a-d}</i>	<i>R_{S,d-b}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>	
		7,97	9,76	8,58	10,56	1,22	1,23	1,17	1,73	1,13	3,08	2,93

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 1,00 ml perc⁻¹; *t_M*: 2,80 perc; detektálás, 205 nm; eluens, H₂O (0,1%TFA)/MeCN(0,1% TFA)=65/35 (v/v); ^abisz származék; ⁺részleges elválás a "szimmetrikus karbamid"-tól; α_{b-a} , α_{d-c} , *R_{S,a-b}*, *R_{S,c-d}* *eritro*, *treo* sztereoizomerek kromatográfiás paraméterei; *R_{S,c-a}*, *R_{S,a-d}*, *R_{S,d-b}*, egymást követő sztereoizomerek felbontása; R, 2-propil csoport, R₂, 3-pentilcsoport, R₃, fenilcsoport, R₄, 2,6-dimetoxifenilcsoport

Discovery C₁₈

Discovery 31

Vegyület	k				α		R _S					
	eritro		treo		α _{b-a}	α _{d-c}						
	a	b	c	d								
37, 38 <i>e,t</i>-β-MePhe							R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}	
		5,06	7,06	4,80	6,86	1,40	1,43	<0,40	6,57	<0,40	7,14	10,40
39, 40 <i>e,t</i>-β-MeTyr							R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}	
		1,75 ^b	2,06 ^b	1,99 ^b	2,50 ^b	1,18	1,26	1,20	<0,40	2,27	1,60	2,80
41, 42 <i>e,t</i>-β-MeTic							R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}	
		6,30	8,10	5,69	7,22	1,29	1,27	1,75	3,25	2,50	5,75	5,00
43, 44 <i>e,t</i>-β-MeTrp							R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}	
		4,81	6,30	4,49	5,57	1,31	1,24	1,05	2,40	1,25	5,43	3,25
45, 46 <i>e,t</i>-β-2-PrTrp							R _{S,a-c}	R _{S,c-b}	R _{S,b-d}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}	
		11,56	17,85	12,39	18,54	1,54	1,50	1,73	9,56	1,10	11,65	10,78
47, 48 <i>e,t</i>-β-3-PentTrp^c							R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}	
		6,05	8,41	5,83	8,23	1,39	1,41	1,00	9,56	0,73	9,40	10,44
49, 50 <i>e,t</i>-β-PhTrp							R _{S,a-c}	R _{S,c-b}	R _{S,b-d}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}	
		13,05	17,05	14,33	18,60	1,31	1,30	2,46	4,67	2,35	7,29	6,88
51, 52 <i>e,t</i>-β-2-diMeOPhTrp^d							R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}	
		10,57	11,94	10,99	12,52	1,13	1,14	1,43	2,80	1,63	4,13	4,53

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Discovery C₁₈; áramlási sebesség, 1,00 ml perc⁻¹; t_M: 3,20 perc; detektálás, 205 nm; eluens, H₂O (0,1%TFA)/MeCN(0,1% TFA)=65/35 (v/v); ^cH₂O (0,1%TFA)/MeCN(0,1% TFA)=55/45 (v/v); ^dH₂O (0,1%TFA)/MeCN(0,1% TFA)=60/40 (v/v); ^bmono származék; α_{b-a} , α_{d-c} , *R_{S,a-b}*, *R_{S,c-d}* *eritro*, *treo* enantiomerek kromatográfiás paraméterei; *R_{S,c-a}*, *R_{S,a-d}*, *R_{S,d-b}*, egymást követő sztereoizomerek felbontása; R, 2-propilcsoport, R₂, 3-pentilcsoport, R₃, fenilcsoport, R₄, 2,6-dimetoxi-fenilcsoport,

Nova Pak

Vegyület		k				α		R _S				
		eritro		treo		α _{b-a}	α _{d-c}					
		a	b	c	d							
37, 38 <i>e,t</i> -β-MePhe								R _{S,a-c}	R _{S,c-b}	R _{S,b-d}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		4,21					1,38	<0,40	1,90	<0,40	2,00	2,25
39, 40 <i>e,t</i> -β-MeTyr								R _{S,a-c}	R _{S,c-b}	R _{S,b-d}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		1,29 ^a	1,52 ^a	1,29 ^a	1,52 ^a	1,18	1,18	0,00	0,84	0,00	0,84	0,84
41, 42 <i>e,t</i> -β-MeTic								R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		5,34	6,16	4,93	6,21	1,27	1,26	0,67	0,89	0,89	1,78	1,56
43, 44 <i>e,t</i> -β-MeTrp								R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		3,80	4,92	3,80	4,60	1,29	1,21	0,00	1,33	<0,40	1,50	1,33
45, 46 <i>e,t</i> -β-2-PrTrp								R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		11,59	16,61	10,97	16,19	1,43	1,48	0,67	4,17	<0,40	4,73	4,31
47, 48 <i>e,t</i> -β-3-PentTrp								R _{S,a-c}	R _{S,c-b}	R _{S,b-d}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		9,00 ⁺	18,75	9,76	19,25	2,08	1,97	0,60	7,60	<0,40	8,00	7,85
49, 50 <i>e,t</i> -β-PhTrp								R _{S,a-c}	R _{S,c-b}	R _{S,b-d}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		12,94	16,16	14,21	17,21	1,25	1,21	1,27	1,61	0,75	2,83	2,43
51, 52 <i>e,t</i> -β-2-diMeOPhTrp								R _{S,a-c}	R _{S,c-b}	R _{S,b-d}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		14,14	17,84	13,11	16,58	1,26	1,26	0,56	1,24	0,64	1,82	1,73

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Nova Pak; áramlási sebesség, 1,00 ml perc⁻¹; t_M: 1,34 perc; detektálás, 205 nm; eluens, H₂O (0,1%TFA)/MeCN(0,1% TFA)=65/35 (v/v); ^bmono származék ^abisz származék; ⁺részleges elválás a "szimmetrikus karbamid"-tól; α_{b-a} , α_{d-c} , *R_{S,a-b}*, *R_{S,c-d}* *eritro*, *treo* enantiomerek kromatográfiás paraméterei; *R_{S,c-a}*, *R_{S,a-d}*, *R_{S,d-b}*, egymást követő sztereoizomerek felbontása; R, 2-propilcsoport, R₂, 3-pentilcsoport, R₃, fenilcsoport, R₄, 2,6-dimetoxi-fenilcsoport,

F/7. Táblázat

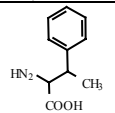
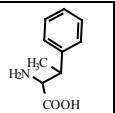
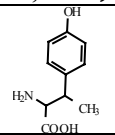
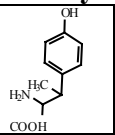
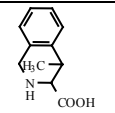
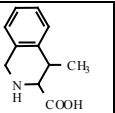
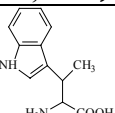
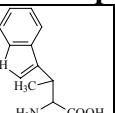
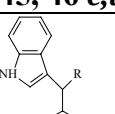
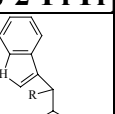
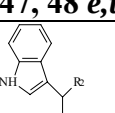
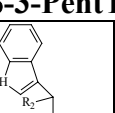
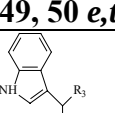
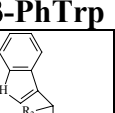
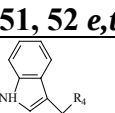
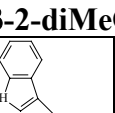
β-alkil-szubsztituált Phe, Tyr, Tic és Trp analógok (S)-NIFE származékainak különböző
kolonnákon mért kromatográfiás paraméterei MeOH tartalmú eluens rendszerben

Vydac 218TP54

Vegyület		<i>k</i>				<i>α</i>		<i>R_S</i>				
		<i>eritro</i>		<i>treo</i>		<i>α_{b-a}</i>	<i>α_{d-c}</i>					
		a	b	c	d							
37, 38 <i>e,t</i>-β-MePhe								<i>R_{S,a-c}</i>	<i>R_{S,c-b}</i>	<i>R_{S,b-d}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>
		1,66	4,42	1,29	3,63	2,66	2,81	1,00	6,85	1,25	8,28	7,71
39, 40 <i>e,t</i>-β-MeTyr								<i>R_{S,c-a}</i>	<i>R_{S,a-d}</i>	<i>R_{S,d-b}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>
		0,74 ^b	1,18 ^b	1,03 ^b	1,56 ^b	1,59	1,51	1,28	0,74	1,92	2,00	2,40
41, 42 <i>e,t</i>-β-MeTic								<i>R_{S,c-a}</i>	<i>R_{S,a-d}</i>	<i>R_{S,d-b}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>
		1,98 ⁺	3,29	1,89	3,15	1,66	1,67	<0,40	4,33	<0,40	5,00	4,67
43, 44 <i>e,t</i>-β-MeTrp								<i>R_{S,c-a}</i>	<i>R_{S,a-d}</i>	<i>R_{S,d-b}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>
		0,94	2,43 ⁺	0,80	1,90 ⁺	2,58	2,38	1,00	5,50	2,40	6,80	6,50
45, 46 <i>e,t</i>-β-2-PrTrp								<i>R_{S,c-a}</i>	<i>R_{S,a-d}</i>	<i>R_{S,d-b}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>
		4,53	10,18	4,72	10,30	2,25	2,18	<0,40	10,40	<0,40	10,50	10,50
47, 48 <i>e,t</i>-β-3-PentTrp								<i>R_{S,c-a}</i>	<i>R_{S,a-d}</i>	<i>R_{S,d-b}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>
		19,12	22,82	17,25	21,26	1,19	1,23	2,62	2,65	1,75	6,87	7,50
49, 50 <i>e,t</i>-β-PhTrp								<i>R_{S,a-c}</i>	<i>R_{S,c-b}</i>	<i>R_{S,b-d}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>
		4,14	7,00	5,14	8,04	1,69	1,56	2,42	4,00	1,85	6,50	5,28
51, 52 <i>e,t</i>-β-2-diMeOPhTrp								<i>R_{S,c-a}</i>	<i>R_{S,a-d}</i>	<i>R_{S,d-b}</i>	<i>R_{S,a-b}</i>	<i>R_{S,c-d}</i>
		3,78	6,68	5,38	6,86	1,77	1,29	3,26	2,63	0,51	6,60	2,772 1

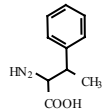
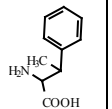
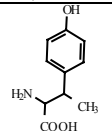
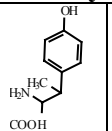
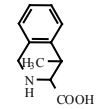
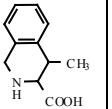
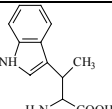
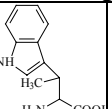
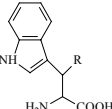
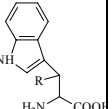
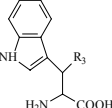
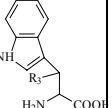
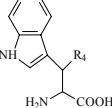
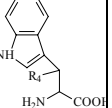
Kromatográfiás körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 1,00 ml perc⁻¹; *t_M*: 2,80 perc; detektálás, 205 nm; eluens, H₂O (0,1%TFA)/MeOH(0,1% TFA)=45/55 (v/v); ^b mono származék; ⁺ részleges elválás a "szimmetrikus karbamid"-tól; *α_{b-a}*, *α_{d-c}*, *R_{S,a-b}*, *R_{S,c-d}* *eritro*, *treo* enantiomerek kromatográfiás paraméterei; *R_{S,c-a}*, *R_{S,a-d}*, *R_{S,d-b}*, egymást követő sztereoizomerek felbontása, R₁, 2-propil csoport, R₂, 3-pentil csoport, R₃, fenil csoport, R₄, 2,6-dimetoxifenilcsoport

Discovery C₁₈

Vegyület	k				α		R_S					
	eritro		treo		α_{b-a}	α_{d-c}						
	a	b	c	d								
37, 38 <i>e,t</i>-β-MePhe							$R_{S,c-a}$	$R_{S,a-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		21,00	21,96	20,57	21,74	1,05	1,06	2,25	11,50	1,35	11,31	13,50
39, 40 <i>e,t</i>-β-MeTyr							$R_{S,c-a}$	$R_{S,a-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		18,47 ^b	20,02 ^b	18,31 ^b	19,90 ^b	1,08	1,09	1,43	9,71	2,46	12,77	9,88
41, 42 <i>e,t</i>-β-MeTic							$R_{S,c-a}$	$R_{S,a-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		21,11 ⁺	21,72	21,03 ⁺	21,60	1,03	1,03	0,62	5,00	<0,40	5,81	5,71
43, 44 <i>e,t</i>-β-MeTrp							$R_{S,c-a}$	$R_{S,a-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		20,41	21,45	20,26	21,19	1,05	1,05	2,00	7,40	2,60	10,42	8,00
45, 46 <i>e,t</i>-β-2-PrTrp							$R_{S,a-c}$	$R_{S,c-b}$	$R_{S,b-d}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		21,59	22,55	21,83	22,66	1,04	1,04	2,20	7,33	1,25	8,71	8,33
47, 48 <i>e,t</i>-β-3-PentTrp							$R_{S,c-a}$	$R_{S,a-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		22,81	23,63	22,79	23,40	1,04	1,03	0,63	7,85	1,33	9,14	9,00
49, 50 <i>e,t</i>-β-PhTrp							$R_{S,a-c}$	$R_{S,c-b}$	$R_{S,b-d}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		21,75	22,43	21,75	23,38	1,03	1,03	0,00	7,71	<0,40	8,34	7,71
51, 52 <i>e,t</i>-β-2-diMeOPhTrp							$R_{S,c-a}$	$R_{S,a-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		21,59	22,20	21,70	22,35	1,03	1,03	0,78	4,67	1,06	7,00	6,91

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Discovery C₁₈; áramlási sebesség, 1,00 ml perc⁻¹; t_M: 3,20 perc; detektálás, 205 nm; eluens, A: H₂O (0,1%TFA); B: MeOH (0,1%TFA); Gradiens elúció, 0 perc 5% B, 35 perc 40% B, 50 perc 40%B, 80 perc 95% B; ^b mono származék; ⁺ részleges elválás a "szimmetrikus karbamid"-tól; α_{b-a} , α_{d-c} , *R_{S,a-b}*, *R_{S,c-d}* *eritro*, *treo* sztereoizomerek kromatográfiás paraméterei; *R_{S,c-a}*, *R_{S,a-d}*, *R_{S,d-b}*, egymást követő sztereoizomerek felbontása, R₁, 2-propilcsoport, R₂, 3-pentilcsoport, R₃, fenilcsoport, R₄, 2,6-dimetoxi-fenilcsoport

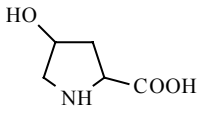
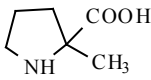
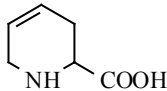
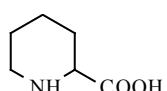
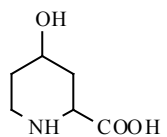
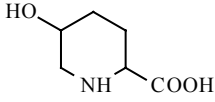
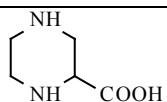
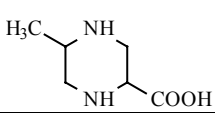
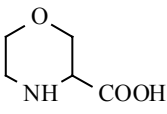
NovaPak

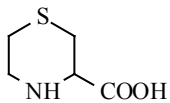
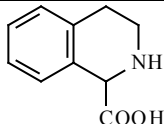
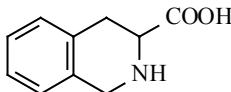
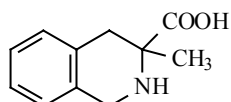
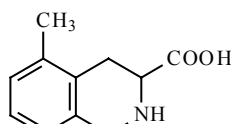
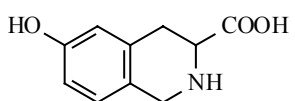
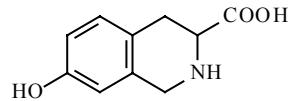
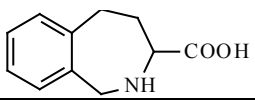
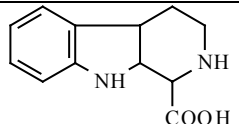
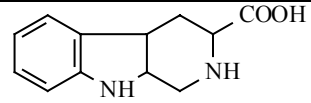
Vegyület	k				α		R_S					
	eritro		treo		α_{b-a}	α_{d-c}						
	a	b	c	d								
37, 38 <i>e,t</i> - β -MePhe							$R_{S,a-c}$	$R_{S,c-b}$	$R_{S,b-d}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		33,82	8,67	3,51	8,05	2,27	2,29	0,86	4,89	0,67	5,20	4,80
39, 40 <i>e,t</i> - β -MeTyr ^c							$R_{S,a-c}$	$R_{S,c-b}$	$R_{S,b-d}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		9,84 ^b	11,63 ^b	9,84	13,54 ^b	1,18	1,38	0,00	1,43	1,36	1,43	2,86
41, 42 <i>e,t</i> - β -MeTic							$R_{S,c-a}$	$R_{S,a-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		4,80 ⁺	7,38	5,02 ⁺	7,59	1,54	1,51	<0,40	2,18	<0,40	2,55	2,33
43, 44 <i>e,t</i> - β -MeTrp							$R_{S,c-a}$	$R_{S,a-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		2,66	5,98 ⁺	2,66	4,95 ⁺	2,25	1,86	0,00	2,18	0,92	2,83	2,18
45, 46 <i>e,t</i> - β -2-PrTrp							$R_{S,c-a}$	$R_{S,a-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		8,16	19,86	8,36	20,36	2,43	2,44	<0,40	5,40	<0,40	5,56	5,56
49, 50 <i>e,t</i> - β -PhTrp							$R_{S,a-c}$	$R_{S,c-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,a-b}$		
		7,82	15,96	8,07	15,02	2,04	1,86	<0,40	6,17	0,67	8,00	
51, 52 <i>e,t</i> - β -2-diMeOPhTrp							$R_{S,a-c}$	$R_{S,c-b}$	$R_{S,b-d}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		7,52	14,98	8,73	15,48	1,99	1,77	1,08	4,77	<0,40	5,71	5,29

Kromatográfiai körülmények: oszlop, Nova Pak; áramlási sebesség, 1,00 ml perc⁻¹; t_M: 1,34 perc; detektálás, 205 nm; eluens, H₂O (0,1%TFA)/MeOH(0,1% TFA)=45/55 (v/v); ^cH₂O (0,1%TFA)/MeOH(0,1% TFA)=55/45 (v/v); ^bmono származék ⁺részleges elválás a "szimmetrikus karbamid"-tól; α_{b-a} , α_{d-c} , *R_{S,a-b}*, *R_{S,c-d}* *eritro*, *treo* enantiomerek kromatográfiai paraméterei; *R_{S,c-a}*, *R_{S,a-d}*, *R_{S,d-b}*, egymást követő sztereoizomerek felbontása; R₁, 2-propilcsoport, R₂, 3-pentilcsoport, R₃, fenilcsoport, R₄, 2,6-dimetoxi-fenilcsoport

F/8. Táblázat

Szekunder aminosav sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak kromatográfiás paramétereit MeCN tartalmú eluens rendszerben

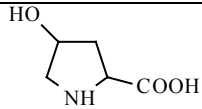
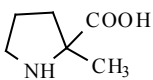
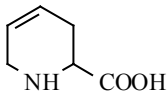
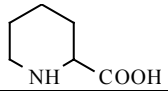
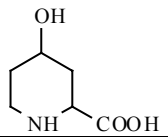
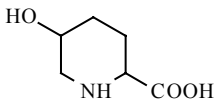
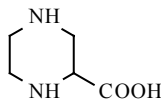
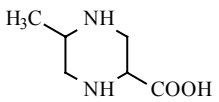
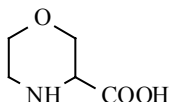
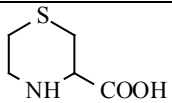
Vegyület	Eluens	k_S	k_R	α	R_S	Elúciós sorrend
66 c-4-OHPro						
	70/30	0,26	0,30	1,15	<0,40	
	75/25	2,20	2,44	1,14	0,88	S<R
	80/20	4,74	5,46	1,14	1,83	S<R
67 α-MePro						
	70/30	4,16	5,11	1,23	3,22	S<R
68 baikain						
	70/30	4,68	5,77	1,23	1,92	S<R
69 Pip						
	70/30	5,19	5,87	1,23	2,97	S<R
70 c-4-OHPip						
	70/30	1,49	1,65	1,11	0,86	S<R
	75/25	3,44	3,86	1,15	1,45	S<R
	80/20	7,28	8,85	1,21	3,81	S<R
71 t-5-OHPip						
	70/30	1,23	1,36	1,10	0,88	S<R
	75/25	2,41	2,80	1,16	1,88	S<R
	80/20	5,15	6,23	1,21	2,98	S<R
72						
	60/40	2,84	3,06	1,08	0,82	S<R
	65/35	6,81	7,47	1,20	1,48	S<R
	70/30	16,29	18,32	1,16	2,31	S<R
73						
	60/40	4,82	4,98	1,03	0,57	S<R
	65/35	9,43	9,85	1,04	0,86	S<R
	70/30	18,46	19,26	1,05	0,95	S<R
74						
	70/30	2,33	2,46	1,06	0,32	S<R
	75/25	6,51	7,05	1,08	1,46	S<R

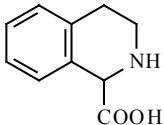
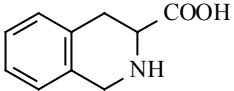
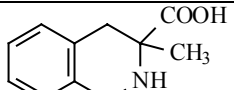
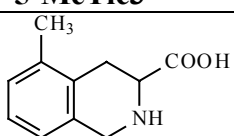
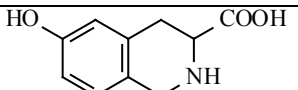
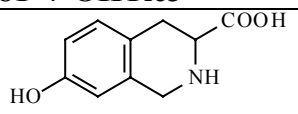
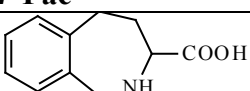
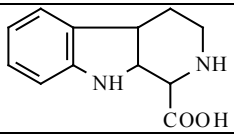
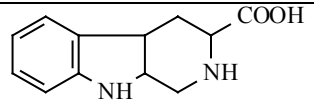
Vegyület	Eluens	k_S	k_R	α	R_S	Elúciós sorrend
75						
	70/30	4,64	5,12	1,10	1,50	$S < R$
76 Tic1						
	60/40	3,85	4,41	1,14	1,86	$S < R$
77 Tic3						
	65/35	9,04	11,22	1,24	4,10	$S < R$
	60/40	3,92	4,58	1,17	2,23	$S < R$
78 α-MeTic3						
	60/40	6,33	6,86	1,08	0,71	$S < R$
	70/30	8,59	10,94	1,27	2,72	$S < R$
79 5-MeTic3						
	60/40	4,83	5,66	1,17	2,55	$S < R$
80 6-OHTic3						
	65/35	2,98	3,36	1,12	1,48	$S < R$
	60/40 ^b	11,42	12,82	1,12	1,90	$S < R$
81 7-OHTic3						
	65/35	2,88	3,44	1,19	2,15	$S < R$
	60/40 ^b	9,36	10,19	1,08	1,18	$S < R$
82 Pac						
	60/40	5,33	5,74	1,07	1,20	$S < R$
	70/30	8,63	16,45	1,89	4,38	$S < R$
83 Nor						
	60/40	5,54	6,22	1,12	1,65	$S < R$
84 Tcc						
	60/40	4,28	4,83	1,13	1,80	$S < R$

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Lichrospher RP-18; áramlási sebesség, 0,80 ml perc⁻¹; t_M : 1,47 perc; detektálás, 205 nm; eluens, H₂O(0,1% TFA)/ MeCN(0,1% TFA)= 80/20, 75/25, 70/30, 65/35, 60/40 (v/v); ^bbisz származék

F/9. Táblázat

Szekunder aminosav sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak kromatográfiás paramétereit MeOH tartalmú eluens rendszerben

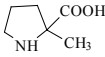
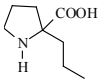
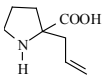
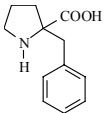
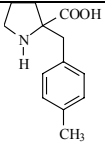
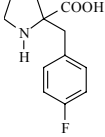
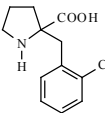
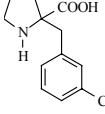
Vegyület	Eluens	k_S	k_R	α	R_S	Elúciós sorrend
66 c-4-OHPro						
	60/40	3,70 ^c	4,34	1,17	1,38	$S \triangleleft R$
	70/30	10,09	12,39	1,22	3,03	$S \triangleleft R$
67 α-MePro						
	40/60	1,47	1,97	1,34	2,37	$S \triangleleft R$
	50/50	3,80	5,34	1,40	4,84	$S \triangleleft R$
68 baikain						
	50/50	3,88	5,55	1,43	4,45	$S \triangleleft R$
69 Pip						
	50/50	5,09	6,43	1,26	3,63	$S \triangleleft R$
70 c-4-OHPip						
	50/50	2,15	2,30 ^d	1,07	0,56	$S \triangleleft R$
	55/45	3,27	3,52	1,07	0,73	$S \triangleleft R$
	60/40	5,56	6,55	1,18	2,53	$S \triangleleft R$
71 t-5-OHPip						
	50/50	2,73	2,98	1,08	0,68	$S \triangleleft R$
	55/45	3,73	4,09	1,10	1,18	$S \triangleleft R$
	60/40	4,72	5,27	1,12	1,85	$S \triangleleft R$
72						
	35/65	1,69	1,96	1,16	1,05	$S \triangleleft R$
	40/60	2,69	3,06	1,13	1,45	$S \triangleleft R$
73						
	35/65	2,16	2,30	1,07	<0,40	$S \triangleleft R$
	40/60	4,67	5,04	1,08	1,02	$S \triangleleft R$
	50/50	22,21	24,62	1,11	1,78	$S \triangleleft R$
74						
	50/50	2,12 ^c	2,40	1,13	1,26	$S \triangleleft R$
	55/45	3,38	3,90	1,15	1,52	$S \triangleleft R$
75						
	50/50	3,87	5,55	1,43	4,13	$S \triangleleft R$

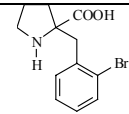
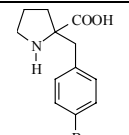
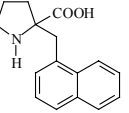
Vegyület	Eluens	k_S	k_R	α	R_S	Elúciós sorrend
76 Tic1						
	35/65	1,94	2,94	1,52	2,51	$S < R$
77 Tic3						
	35/65	1,80	2,52 ^d	1,40	2,30	$S < R$
	40/60	4,72	6,89	1,46	3,95	$S < R$
78 α-MeTic3						
	35/65	6,12	8,09	1,32	4,92	$S < R$
79 5-MeTic3						
	35/65	2,93 ^c	4,16	1,40	4,26	$S < R$
	40/60	6,07	8,64	1,42	4,80	$S < R$
80 6-OHTic3						
	40/60	1,13	1,53	1,35	1,95	$S < R$
	50/50	3,73	5,35	1,43	4,43	$S < R$
	35/65 ^b	3,47	4,46	1,28	2,63	$S < R$
81 7-OHTic3						
	40/60	0,92 ^c	1,22	1,32	1,39	$S < R$
	50/50	4,05	6,69	1,65	6,33	$S < R$
	35/65 ^b	3,84	4,80	1,25	2,42	$S < R$
82 Pac						
	35/65	3,54	4,38	1,24	2,56	$S < R$
83 Nor						
	35/65	5,05	6,26	1,24	3,05	$S < R$
84 Tcc						
	35/65	2,35	3,48	1,48	4,17	$S < R$

Kromatográfiai körülmények: oszlop, Lichrospher RP-18; áramlási sebesség, 0,80 ml perc⁻¹; t_M = 1,47 perc; detektálás, 205 nm; eluens, H₂O(0,1% TFA)/ MeOH(0,1% TFA) = 35/65, 40/60, 50/50, 55/45, 60/40, ^bbisz származék; ^crészleges elválás a 4-nitrofenoltól; ^drészleges elválás a "szimmetrikus karbamid"-tól

F/10. Táblázat

Pro analóg sztereoizomerek (S)-NIFE származékainak Discovery C₁₈ és Vydac 218TP54 kolonnákon mért kromatográfiás paraméterei MeCN tartalmú eluens rendszerben

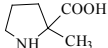
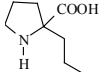
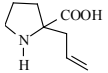
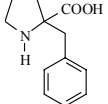
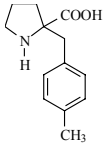
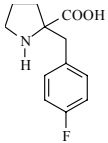
Vegyület	Eluens	k_S	k_R	α	R_S	Elúciós sorrend
67 α-MePro						
	a	5,60	4,81	1,04	8,84	
	b	4,42	4,63	1,05	3,84	
88						
	a	6,06	5,82	1,04	4,20	
	b	5,51	5,74	1,04	3,33	
89						
	a	5,57	5,78	1,04	4,00	$R < S$
	b	5,25	5,46	1,04	2,87	$R < S$
90						
	a	6,31 ^d	6,44	1,02	2,50	$R < S$
	b	6,04 ^d	6,16	1,02	1,47	$R < S$
91						
	a	6,78	6,91	1,02	2,73	$R < S$
	b	6,44	6,55	1,04	1,47	$R < S$
92						
	a	6,44	6,53	1,01	1,83	$R < S$
	b	6,19	6,26	1,01	1,18	$R < S$
93						
	a	6,67	6,83	1,02	2,72	$R < S$
	b	6,42	6,53	1,02	1,73	$R < S$
94						
	a	6,81	7,01	1,03	4,09	$R < S$
	b	6,50	6,66	1,02	2,34	$R < S$

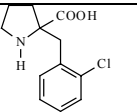
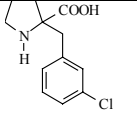
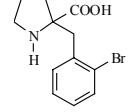
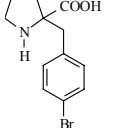
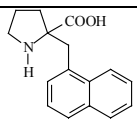
Vegyület	Eluens	k_S	k_R	α	R_S	Elúciós sorrend
95						
	a	6,86	7,00	1,02	2,84	$R < S$
	b	6,52	6,64	1,02	1,59	$R < S$
96						
	a	7,03	7,16	1,02	1,95	$R < S$
	b	6,74	6,83	1,01	1,40	$R < S$
97						
	a	6,99	7,15	1,02	2,83	$R < S$
	b	6,73	6,83	1,01	1,43	$R < S$

Kromatográfiás körülmények: oszlop, **a**: Discovery C₁₈, **b**: Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 1,00 ml per⁻¹; detektálás, 205 nm, eluens, **A**: H₂O (0,1% TFA), **B**: MeOH (0,1% TFA), Gradiens program: 0 perc 3% B, 30 perc 80% B, 40 perc 80% B, 50 perc 3% B; ^drészleges elválás a "szimmetrikus karbamid"-tól

F/11. Táblázat

(S)-NIFE, GITC és FDAA királis származékképzők elválasztóképességének összehasonlítása Pro analóg sztereoizomerek elválasztása esetén

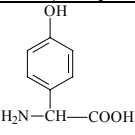
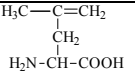
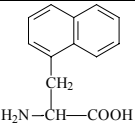
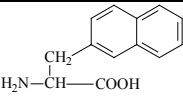
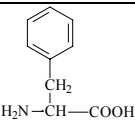
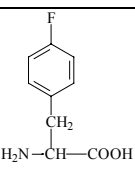
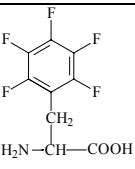
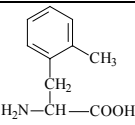
Vegyület		(S)-NIFE				GITC				FDAA			
		k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S
67		5,00	4,81	1,04	3,84	4,74	4,59	1,03	2,86	5,28	4,83	1,09	9,19
88		6,06	5,82	1,04	4,20	5,52	5,41	1,02	2,06	6,17	5,58	1,11	11,24
89		5,57	5,78	1,04	4,00	5,29	5,42	1,03	2,63	5,49	6,00	1,09	10,05
90		6,31 ^d	6,44	1,02	2,50	5,99	6,15	1,03	3,08	6,09	6,60	1,08	9,24
91		6,78 ^c	6,91	1,02	2,73	6,38	6,53	1,02	2,88	6,49	7,04	1,08	10,30
92		6,44	6,53	1,01	1,83	6,13	6,30	1,03	3,32	6,79	7,16	1,05	7,72

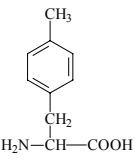
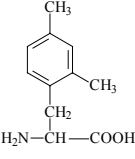
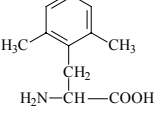
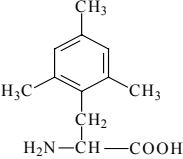
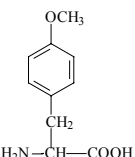
Vegyület		(S)-NIFE				GITC				FDAA			
		k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S
93		6,67 ^c	6,83	1,02	2,72	6,41	6,55	1,02	2,58	6,55	7,06	1,08	9,65
94		6,81 ^c	7,01	1,03	4,09	6,42	6,67	1,04	4,79	6,44	6,95	1,08	9,79
95		6,86 ^c	7,00	1,02	2,87	6,50	6,66	1,02	3,06	6,66	7,18	1,08	9,43
96		7,03	7,16	1,02	1,95	6,66	6,87	1,03	3,80	6,71	7,29	1,09	11,05
97		6,99	7,15	1,02	2,83	6,68	6,85	1,03	3,24	6,80	7,35	1,08	10,28

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Discovery C₁₈; áramlási sebesség, 1,0 ml perc⁻¹; detektálás, (S)-NIFE származékok, 205 nm, GITC származékok, 250 nm, FDAA származékok, 340 nm; eluens, **A**: H₂O(0,1% TFA), **B**: MeOH(0,1% TFA), Gradiens elúció: 0 perc 3% B, 30 perc 80% B, 40 perc 80% B, 50 perc 3% B; ^c részleges elválás az elreagálatlan származékképző reagenstől; ^d részleges elválás a "szimmetrikus karbamid"-tól

F/12. Táblázat

(S)-NIFE és GITC származékképzők elválasztóképességének összehasonlítása Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek elválasztása esetén

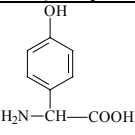
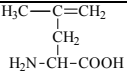
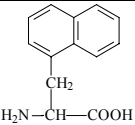
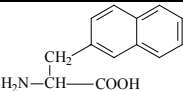
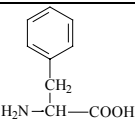
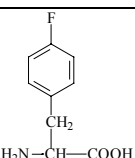
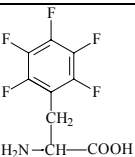
Vegyület	(S)-NIFE				GITC			
	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S
21 (4-OHPh)Gly								
	1,66	2,86	1,72	6,75	1,16	1,43	1,23	1,58
24 Mag								
	1,14	2,16	1,89	6,83	0,72	1,12	1,56	2,80
25 1-Nal								
	3,25 ^c	5,41	1,66	5,44	2,20	2,77	1,26	2,67
26 2-Nal								
	5,78	10,77	1,86	8,96	1,92	2,81	1,46	2,05
27 Phe								
	0,86	1,84	2,14	6,12	0,77	1,15	1,49	2,50
29 4-FPhe								
	2,29	4,07	1,80	7,00	1,36	1,98	1,46	2,40
30 F5F								
	6,06	11,38	1,87	8,11	2,75	4,77	1,73	8,29
31 2-MePhe								
	2,78	5,45	1,96	7,77	1,14	1,66	1,46	3,80

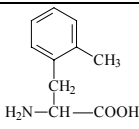
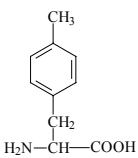
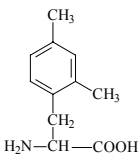
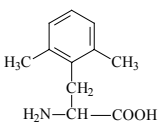
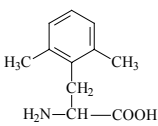
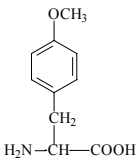
Vegyület	(S)-NIFE				GITC			
	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S
32 4-MePhe								
	3,11 ^c	6,01	1,93	7,22	1,28	1,95	1,52	2,72
33 2,4-diMePhe								
	3,29 ^c	4,95	1,50	7,81	1,83	2,63	1,44	4,40
34 2,6-diMePhe								
	3,27	4,09	1,25	2,61	1,40	2,00	1,43	2,66
35 2,4,6-triMePhe								
	7,57	15,27	2,01	11,14	2,61	3,51	1,38	3,11
36 4-OMePhe								
	3,79	5,56	1,46	5,17	0,75	1,09	1,45	2,65

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 0,80 ml perc⁻¹; detektálás, (S)-NIFE származékok, 205 nm, GITC származékok, 250 nm; eluens, H₂O(0,1% TFA)/ MeOH(0,1% TFA) = 45/55 (v/v); ^c részleges elválás a 4-nitrofenoltól

F/13. Táblázat

(S)-NIFE és FDAA származékképzők elválasztóképességének összehasonlítása Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek elválasztása esetén

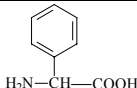
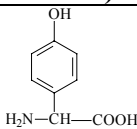
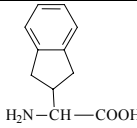
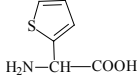
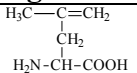
Vegyület	(S)-NIFE				FDAA			
	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S
21 (4-OHPh)Gly								
	0,55	0,84 ^d	1,52	2,23	0,56	1,02	1,82	2,89
24 Mag								
	0,43	0,71	1,65	2,42	0,47	0,89	0,89	3,20
25 1-Nal								
	1,35	2,27	1,68	5,22	1,32	2,49	1,89	6,80
26 2-Nal								
	1,42	2,34	1,64	5,16	1,28	2,77	2,16	6,15
27 Phe								
	0,58	0,99	1,70	2,36	0,57	1,08	2,00	4,00
29 4-FPhe								
	0,70	1,10 ^d	1,57	3,00	0,62	1,23	1,98	4,80
30 F5F								
	1,59	2,62	1,64	5,76	1,18	2,56	2,19	10,00

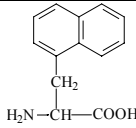
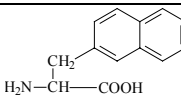
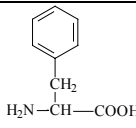
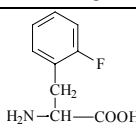
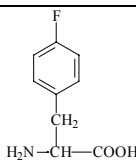
Vegyület	(S)-NIFE				FDAA			
	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S
31 2-MePhe								
	0,83 ^c	1,40	1,68	4,60	0,91	1,96	2,15	4,43
32 4-MePhe								
	0,95 ^c	1,54	1,62	3,03	1,02	2,17	2,12	6,67
33 2,4-diMePhe								
	1,31	2,28	1,74	5,86	1,41	2,88	2,04	8,40
34 2,6-diMePhe								
	1,14	2,03	1,78	5,46	1,51	3,85	2,55	7,15
35 2,4,6-triMePhe								
	1,87	3,35	1,79	7,33	2,26	3,99	1,77	8,57
36 4-MeOPhe								
	0,84	1,07 ^d	1,27	1,71	0,54	1,08	2,00	4,00

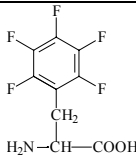
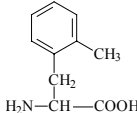
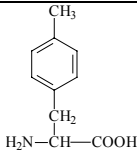
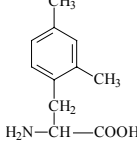
Kromatográfiás körülmények: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 0,80 ml perc⁻¹; detektálás, (S)-NIFE származékok, 205 nm, FDAA származékok, 340 nm; eluens, H₂O(0,1% TFA)/ MeOH(0,1% TFA)= 35/65 (v/v); ^c részleges elválás a 4-nitrofenoltól; ^d részleges elválás a "szimmetrikus karbamid"-tól

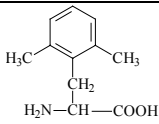
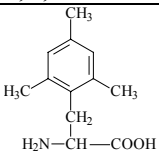
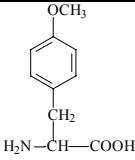
F/14. Táblázat

Gly, Ala és Phe analóg sztereoizomerek közvetlen kromatográfiás elválasztásának adatai

Vegyület	Crownpak CR(+)				CHIROBIOTIC T				CHIROBIOTIC TAG				CHIROBIOTIC R			
	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S
20 PhGly																
	0,75	4,14	5,52	4,18	1,45	8,98	6,19	7,75	2,24	26,19	11,69	6,83	0,34	0,88	2,58	3,07
21 (4-OHPh)Gly																
	0,29	3,56	13,31	6,92	1,32	6,57	4,98	7,43	1,83	4,45	2,43	4,12	0,31	0,75	2,42	2,14
22 Igl																
	13,15	24,50	1,28	1,84	0,06	0,37	6,17	1,00	2,28	6,30	2,76	3,30	0,71	0,96	1,35	0,72
23 Thg																
	0,20	1,24	6,20	3,56	1,47	5,76	3,92	7,64	2,04	12,40	6,32	5,76	0,17	0,75	4,41	1,85
24 Mag																
	0,37 ^d	0,53	1,43	0,80	1,43	2,46	1,72	2,86	1,86	4,28	2,30	4,20	0,31	0,63	2,03	2,19

Vegyület	Crownpak CR(+)				CHIROBIOTIC T				CHIROBIOTIC TAG				CHIROBIOTIC R			
	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S
25 1-Nal																
	67,62	80,36	1,19	0,98	2,13	3,28	1,54	2,40	4,03	5,41	1,34	1,46	2,41	3,21	1,33	1,16
26 2-Nal																
	89,22	99,65	1,12	0,92	2,14	3,31	1,55	1,76	3,30	7,45	2,19	3,42	2,35	3,04	1,30	0,93
27 Phe																
	3,38	4,55	1,35	1,75	1,68	2,65	1,58	2,08	2,31	4,46	1,93	3,56	0,68	1,17	1,72	1,79
28 2-FPhe																
	3,38	4,55	1,45	1,75	1,39	2,42	1,74	3,66	n.a.				0,72	1,05	1,46	1,15
29 4-FPhe																
	4,00	4,73	1,15	1,46	1,56	2,35	1,51	2,29	2,07	3,83	1,85	2,74	0,62	0,91	1,46	1,09

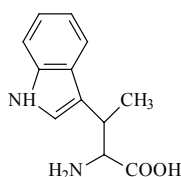
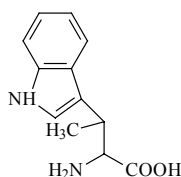
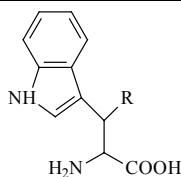
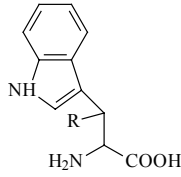
Vegyület	Crownpak CR(+)				CHIROBIOTIC T				CHIROBIOTIC TAG				CHIROBIOTIC R			
	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S
30 F5F																
	5,66	5,66	1,00	0,00	0,42	0,42	1,00	0,00	1,11	1,77	1,59	2,42	0,48	0,48	1,00	0,00
31 2-MePhe																
	7,68	9,14	1,19	1,05	0,08	0,22	2,75	1,16	3,05	3,96	1,29	1,28	0,97	1,56	1,61	2,15
32 4-MePhe																
	9,02	11,55	1,28	1,08	1,92	2,68	1,39	2,67	2,71	4,27	1,57	2,16	1,05	1,68	1,60	1,80
33 2,4-diMePhe																
	26,33	30,52	1,16	0,98	2,14	2,64	1,23	1,71	3,79	4,17	1,10	0,53	1,38	1,74	1,26	0,80

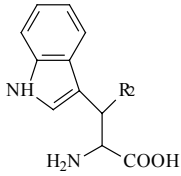
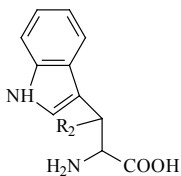
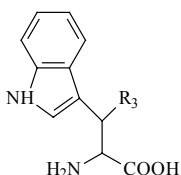
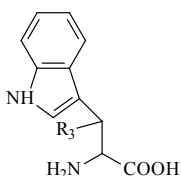
Vegyület	Crownpak CR(+)				CHIROBIOTIC T				CHIROBIOTIC TAG				CHIROBIOTIC R			
	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S	k_S	k_R	α	R_S
34 2,6-diMePhe																
	17,00	17,68	1,04	<0,40	2,28	2,56	1,12	1,05	2,56	3,54	1,38	1,82	0,97	1,50	1,54	1,32
35 2,4,6-triMePhe																
	58,63	60,57	1,01	0,00	2,13	2,92	1,37	2,22	2,65	4,69	1,77	3,11	1,11	3,28	2,95	2,63
36 4-OMePhe																
	6,99	8,93	1,27	1,27	1,84	2,88	1,57	2,63	2,84	4,82	1,69	2,70	0,94	1,45	1,54	1,81

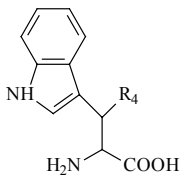
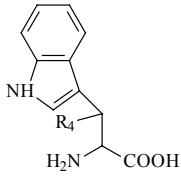
Kromatográfiás körülmények: oszlop, **Crownpak CR(+)**; áramlási sebesség, 0,80 ml perc⁻¹; eluens, pH=2,0 perklórsav (HClO₄); ^dáramlási sebesség, 0,50 ml perc⁻¹; oszlop, **Chirobiotic T**; áramlási sebesség, 0,80 ml perc⁻¹; eluens, H₂O (0,1% TEAA(pH=4,1))/MeOH= 20/80 (v/v) oszlop; **Chirobiotic Tag**; áramlási sebesség, 0,80 ml perc⁻¹; eluens, H₂O (0,1% TEAA(pH=4,1))/MeOH= 20/80 (v/v); oszlop, **Chirobiotic R**; áramlási sebesség, 1,00 ml perc⁻¹; eluens, H₂O (0,1% TEAA(pH=4,1))/MeOH= 70/30 (v/v); detektálás, 205 nm; n.a., nincs adat

F/15. Táblázat

β -alkil-szubsztituált Trp analóg sztereoizomerek közvetett és közvetlen királis kromatográfiás elválasztásának adatai

Vegyület	Módszer	Eluens	k				α		R _S				
			eritro		treo		α _{b-a}	α _{d-c}					
			a	b	c	d							
43, 44 β-MeTrp									R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
 	GITC						1,21	1,13	1,20	0,70	2,27	2,87	1,92
		MeOH ^b	1,55	2,28	1,55	1,93	1,47	1,25	0,00	1,87	1,93	3,56	1,87
	FDAA								R _{S,a-c}	R _{S,c-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	
		MeCN ^a	1,32	1,85	1,32	1,62	1,40	1,23	0,00	1,89	1,37	3,26	
		MeOH ^b	1,53	3,30	1,72	2,15	2,16	1,25	0,71	1,53	3,14	5,28	
	(S)-NIFE								R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		MeCN ^c	1,55	2,12	1,55	2,12	1,37	1,37	0,00	2,33	0,00	2,33	2,33
		MeOH ^d	0,94	2,43 ⁺	0,80	1,90	2,58	2,38	1,00	5,50	2,40	6,80	6,50
	CHT								R _{S,a-c}	R _{S,c-b}	R _{S,b-d}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		H ₂ O/MeOH ^{e,*}	2,43	3,43	2,43	3,91	1,41	1,61	0,00	1,71	0,85	1,71	2,43
CR(+)								R _{S,d-c}	R _{S,c-b}	R _{S,b-a}			
		HClO ₄ ^{f,**}	14,54	12,11	10,43	10,43	1,20	1,00	0,00	1,69	1,87		
45, 46 β-2-PrTrp									R _{S,a-c}	R _{S,c-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
 	GITC	MeCN ^a	10,11	12,30	9,29	11,69	1,22	1,26	1,56	2,76	1,00	3,61	4,36
		MeOH ^b	5,14	7,44	4,18	5,93	1,45	1,42	2,64	1,88	3,22	5,18	4,47
	FDAA	MeCN ^a	7,10	12,10	5,75	11,48	1,70	2,00	3,52	9,44	1,22	10,80	12,92
		MeOH ^b	5,65	11,86	3,44	11,01	2,10	3,20	5,88	11,52	1,54	12,26	17,10
	(S)-NIFE								R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		MeCN ^c	6,55	9,24	6,18 ⁺	8,89	1,41	1,44	1,00	5,78	0,73	6,00	6,67
		MeOH ^d	4,53	10,18	4,72	10,30	2,25	2,18	<0,40	10,40	<0,40	10,50	10,50
	CHT								R _{S,c-a}	R _{S,a-b}	R _{S,b-d}	R _{S,c-d}	
		H ₂ O/MeOH ^{e,*}	2,12	2,12	2,12	2,62	1,00	1,24	0,00	0,00	0,00	1,04	1,04
	CR(+)								R _{S,a-c}	R _{S,c-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		HClO ₄ /MeOH ^g	14,28	14,28	14,28	13,40	1,00	1,06	<0,40	0,00	0,00		

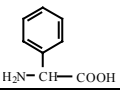
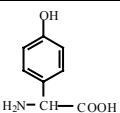
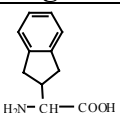
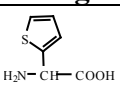
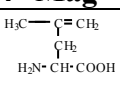
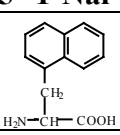
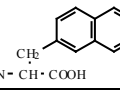
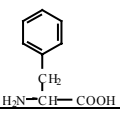
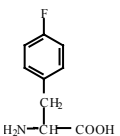
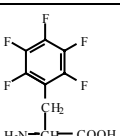
Vegyület	Módszer	Eluens	k				α		R _S				
			eritro		treo		α _{b-a}	α _{d-c}					
			a	b	c	d							
47,48 β-3-PentTrp									R _{S,c-a}	R _{S,a-b}	R _{S,d-b}	R _{S,c-d}	
 	GITC				27,29	1,03	1,43	3,89	0,69	1,25	2,86		
									R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
	FDAA	MeOH ^b	13,60	18,11	1,11	15,86	1,33	1,43	3,83	2,86	2,35	5,33	6,22
		MeCN ^h	7,28	11,97	5,54	10,99	1,64	1,98	4,44	7,64	1,69	8,83	12,40
	(S)-NIFE	MeOH ^b	17,90	35,34	9,17	30,27	1,97	3,30	7,05	7,21	1,81	13,75	22,22
		MeCN ^c	18,12	27,75	16,87	25,25	1,53	1,53	1,09	6,77	1,33	7,71	8,33
		MeOH ^d	19,12	22,82	17,25	21,26	1,19	1,23	2,62	2,65	1,75	6,87	7,50
									R _{S,a-b}	R _{S,b-c}	R _{S,d-b}		
	CHT	H ₂ O/MeOH ^{e,*}	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00		
								R _{S,b-d}	R _{S,d-c}	R _{S,c-a}	R _{S,b-a}		
CR(+)	HClO ₄ /MeOH ^g	87,96	36,91	79,45	79,45	2,38	1,00	4,80	0,00	0,96	5,27		
49,50 β-PhTrp													
 	GITC	MeCN ^a	9,31	10,65	9,67	10,65	1,14	1,10	0,71	1,65	0,00	2,24	
										R _{S,c-a}	R _{S,a-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}
	FDAA	MeOH ^b	3,05	3,92	2,89	3,53	1,29	1,22	0,69	1,94	1,47	3,50	2,54
		MeCN ^a	7,14	11,01	9,09	11,51	1,54	1,27	4,52	4,33	1,00	8,32	5,42
									R _{S,a-c}	R _{S,c-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	
		MeOH ^b	3,90	8,77	5,24	7,05	2,25	1,35	4,11	4,82	4,00	12,91	
									R _{S,a-c}	R _{S,c-d}	R _{S,b-d}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
	(S)-NIFE	MeCN ^c	7,28	9,08	7,87	9,80	1,25	1,25	1,17	2,33	1,23	3,33	3,39
									R _{S,a-c}	R _{S,c-b}	R _{S,b-d}	R _{S,a-b}	R _{S,c-d}
		MeOH ^d	4,14	7,00	5,14	8,04	1,69	1,56	2,42	4,00	1,85	6,50	5,28
									R _{S,a-c}	R _{S,c-d}	R _{S,d-b}	R _{S,a-b}	
	CHT	H ₂ O/MeOH ^{e,*}	2,47	6,19	2,60	5,44	2,51	2,09	0,40	3,18	0,62	3,33	
CR(+)	HClO ₄ /MeOH ^g	36,60	35,29	38,42	38,42	1,04	1,00	<0,40	<0,40	0,00			

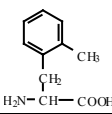
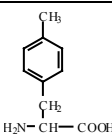
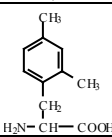
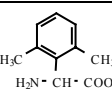
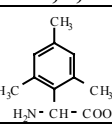
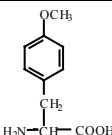
Vegyület	Módszer	Eluens	<i>k</i>				α		R_S					
			<i>eritro</i>		<i>treo</i>		α_{b-a}	α_{d-c}	$R_{S,c-a}$	$R_{S,a-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
			a	b	c	d								
51,52 β -diMeOPhTrp														
	GITC	MeCN ^a	9,39	11,04	9,39	10,59	1,18	1,13	0,00	2,61	0,96	3,42	2,61	
		MeOH ^b	2,59	3,34	2,59	3,01	1,29	1,16	0,00	2,17	1,55	3,39	2,17	
	FDAA								$R_{S,a-c}$	$R_{S,c-b}$	$R_{S,b-d}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
		MeCN ^a	7,87	11,60	10,85	13,54	1,47	1,25	6,40	1,55	3,50	8,10	4,92	
									$R_{S,a-c}$	$R_{S,c-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,a-b}$		
		MeOH ^b	4,35	8,83	6,19	9,15	2,03	1,48	4,91	5,63	0,60	11,12		
									$R_{S,c-a}$	$R_{S,a-d}$	$R_{S,d-b}$	$R_{S,c-d}$	$R_{S,a-b}$	
	(S)-NIFE	MeCN ^c	7,97	9,76	8,58	10,56	1,22	1,23	1,17	1,73	1,13	3,08	2,93	
		MeOH ^d	3,78	6,68	5,38	6,68	1,77	1,29	3,26	2,63	0,51	6,60	2,77	
									$R_{S,a-c}$	$R_{S,c-b}$	$R_{S,b-d}$	$R_{S,a-b}$	$R_{S,c-d}$	
CHT		H ₂ O/MeOH ^{e,*}	2,37	5,03	2,76	5,03	2,12	1,82	<0,40	1,83	0,00	3,44	1,83	
							$R_{S,d-c}$	$R_{S,c-b}$	$R_{S,b-a}$					
	CR(+)	HClO ₄ /MeOH ^g	64,04	40,83	42,67	35,74	1,57	1,19	<0,40	0,00	1,96			

Kromatográfias körülmények: közvetett módszer: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 1,00 ml perc⁻¹; detektálás, (S)-NIFE származék, 205 nm, GITC származék, 250 nm; FDAA származék 340 nm; ^arészleges elválás a "szimmetrikus karbamidtól"; közvetlen módszer: oszlop, CHT, Chirobiotic T; CR(+), Crownpak CR(+); áramlási sebesség, * 0,80 ml perc⁻¹, ** 0,75 ml perc⁻¹, detektálás, 220 nm; eluens, ^aH₂O(0,1%TFA)/MeCN=65/35 (v/v); ^bH₂O(0,1%TFA)/MeOH=45/55 (v/v); ^cH₂O(0,1%TFA)/MeCN(0,1%TFA)=65/35 (v/v); ^dH₂O(0,1%TFA)/ MeOH(0,1%TFA)=45/55 (v/v), ^eH₂O/ MeOH=90/10 (v/v), ^f100%HClO₄(pH=4,0), ^gHClO₄(pH=4,0)/MeOH=90/10 (v/v), ^hH₂O(0,1%TFA)/ MeCN=60/40 (v/v); R, 2-propilcsoport, R₂, 3-pentilcsoport, R₃, fenil csoport, R₄, 2,6-dimetoxi-fenilcsoport;

F/16. Táblázat

Gly, Ala, Phe analógok kromatográfiás adatai és az enantiomerek elválasztását kísérő standard szabadentalpia változás különbségek Chirobiotic T, Chirobiotic Tag oszlopokon

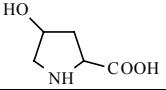
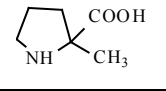
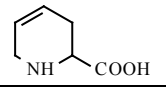
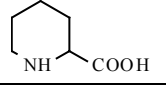
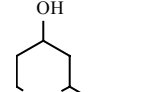
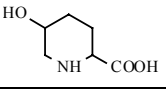
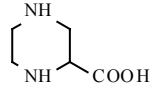
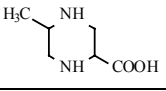
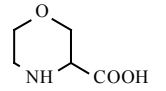
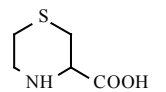
Vegyületek	Oszlop	k_1	k_2	α	R_s	$-\Delta(\Delta G^\circ)$ kJ mol^{-1}
20 PhGly						
	T	1,45	8,98	6,19	7,75	4,52
	TAG	2,24	26,19	11,69	6,83	6,09
21 (4-OHPh)Gly						
	T	1,32	6,57	4,98	7,43	3,97
	TAG	1,83	4,45	2,43	4,12	2,19
22 Igl						
	T	0,06	0,37	6,17	1,00	4,50
	TAG	2,28	6,30	2,76	2,40	2,51
23* Thg						
	T	1,47	5,76	3,92	7,64	3,38
	TAG	2,04	12,40	6,32	5,76	4,57
24* Mag						
	T	1,43	2,46	1,72	2,84	1,34
	TAG	1,86	4,28	2,30	4,20	2,06
25* 1-Nal						
	T	2,13	3,28	1,54	2,40	1,07
	TAG	4,03	5,41	1,04	1,46	0,72
26* 2-Nal						
	T	2,14	3,31	1,55	1,76	1,08
	TAG	3,39	7,45	2,19	3,42	1,94
27 Phe						
	T	1,68	2,65	1,58	2,08	1,13
	TAG	2,37	4,46	1,93	3,56	1,63
29 4-FPhe						
	T	1,56	2,05	1,51	2,29	1,02
	TAG	2,07	3,83	1,85	2,94	1,52
30 F5F						
	T	0,42	0,42	1,00	0,00	0,00
	TAG	1,11	1,77	1,59	2,42	1,15

Vegyületek	Oszlop	k_1	k_2	α	R_s	$-\Delta(\Delta G^\circ)$ kJ mol^{-1}
31 2-MePhe						
	T	2,20	2,96	1,34	2,16	0,72
	TAG	3,05	3,96	1,29	1,28	0,63
32 4-MePhe						
	T	1,92	2,68	1,39	2,67	0,81
	TAG	2,71	4,27	1,57	2,16	1,11
33* 2,4-diMePhe						
	T	2,14	2,64	1,23	1,71	0,51
	TAG	3,79	4,17	1,10	0,53	0,23
34 2,6-diMePhe						
	T	2,28	2,56	1,12	1,05	0,28
	TAG	2,56	3,54	1,38	1,82	0,79
35* 2,4,6-triMePhe						
	T	2,13	2,92	1,37	2,22	0,78
	TAG	2,65	4,69	1,77	3,11	1,41
36* 4-MeOPhe						
	T	1,84	2,88	1,57	2,63	1,11
	TAG	2,84	4,82	1,69	2,70	1,30

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Chirobiotic T, Chirobiotic Tag; áramlási sebesség, 0,8 ml perc⁻¹, detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C; eluens, H₂O(0,1% TEAA (pH 4,1))/MeOH = 20/80 (v/v); *elúciós sorrend nem meghatározott

F/17. Táblázat

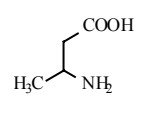
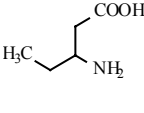
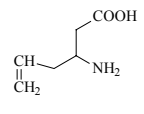
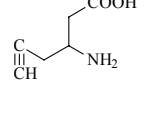
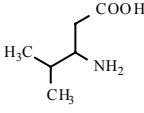
"Iminosav" analógok kromatográfiás adatai és az enantiomerek elválasztását kísérő standard szabadentalpia változás különbségek Chirobiotic T és Chirobiotic Tag oszlopokon

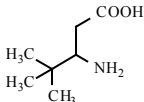
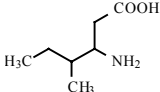
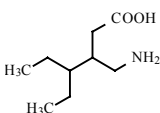
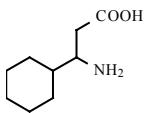
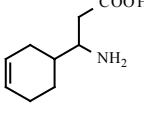
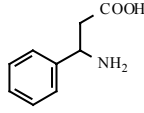
Vegyületek	Oszlop	k_1	k_2	α	R_s	$-\Delta(\Delta G^\circ)$ kJ mol^{-1}
66 c-4-OHPro						
	T	0,90	1,07	1,19	0,91	0,43
	TAG	1,11	1,39	1,25	1,19	0,55
67* α-MePro						
	T	1,12	1,36	1,21	1,43	0,47
	TAG	2,09	2,21	1,05	0,60	0,12
68 baïkain						
	T	0,44	0,59	1,34	0,86	0,72
	TAG	2,21	4,41	1,99	2,38	1,70
69 Pip						
	T	2,30	3,15	1,37	1,89	0,78
	TAG	2,73	7,47	2,73	2,75	2,49
70 c-4-OHPip						
	T	0,15	0,26	1,73	1,11	1,36
	TAG	1,07	1,93	1,80	2,00	1,45
71 t-5-OHPip						
	T	0,43	0,53	1,23	0,63	0,51
	TAG	2,37	8,05	3,39	2,88	3,02
72*						
	T	0,55	0,72	1,31	1,43	0,67
	TAG	11,02	12,19	1,10	0,80	0,23
73*						
	T	0,59	1,06	1,80	2,72	1,45
	TAG	10,09	13,43	1,33	1,44	0,70
74						
	T	0,21	0,58	2,79	2,56	2,54
	TAG	1,86	4,17	2,24	2,80	1,99
75						
	T	0,45	0,88	1,95	2,24	1,65
	TAG	2,80	8,79	3,14	3,26	2,83

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Chirobiotic T, Chirobiotic Tag; áramlási sebesség, 1,0 ml perc⁻¹, detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C; eluens: H₂O(0.1% TEAA (pH 6,5))/MeOH = 20/80 (v/v); *elúciós sorrend nem meghatározott

F/18. Táblázat

β -aminosav analógok kromatográfiás adatai és az enantiomerek elválasztását kísérő standard szabadentalpia változás különbségek Chirobiotic T és Chirobiotic Tag oszlopokon

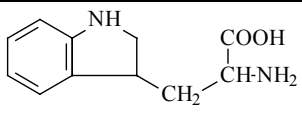
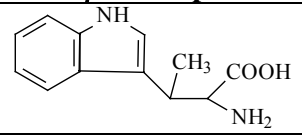
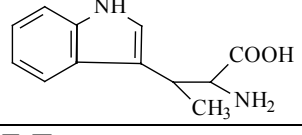
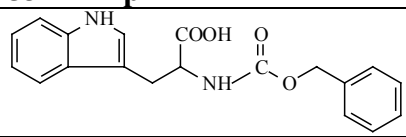
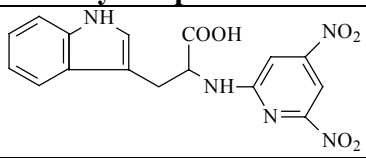
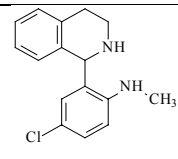
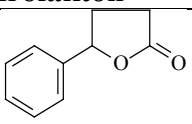
Vegyületek	Oszlop	Eluens	k_1	k_2	α	R_s	$-\Delta(\Delta G)^\circ$ kJ mol^{-1}
55							
	T	0/100 a	4,45	4,71	1,06	0,46	0,14
	TAG	0/100 a	8,13	8,43	1,00	0,00	0,00
	T	20/80 b	3,38	5,71	1,69	2,62	1,30
	T	c	2,77	2,96	1,07	0,97	0,17
	TAG	c	4,01	4,45	1,11	0,48	0,26
56*							
	T	0/100 a	3,64	1,02	1,10	0,44	0,24
	TAG	0/100 a	10,46	10,97	1,05	0,44	0,12
	T	10/90 a	2,10	2,36	1,12	1,03	0,28
	T	c	2,87	3,12	1,09	0,66	0,21
	TAG	c	2,06	3,38	1,64	1,26	1,22
57							
	T	0/100 a	5,27	5,57	1,06	0,40	0,05
	TAG	0/100 a	7,11	7,11	1,00	0,00	0,00
	T	5/95 a	2,29	5,46	2,46	3,95	2,23
	T	c	2,34	2,58	1,10	0,55	0,24
	TAG	c	2,99	4,43	1,48	0,40	0,97
58							
	T	0/100 a	6,27	6,61	1,05	0,50	0,12
	TAG	0/100 a	8,29	9,77	1,18	1,28	0,41
	T	30/70 a	2,86	4,21	1,47	2,14	0,95
	T	c	2,73	3,02	1,11	1,24	0,26
	TAG	c	4,56	4,56	1,00	0,00	0,00
59*							
	T	0/100 a	2,97	3,31	1,11	0,52	0,26
	TAG	0/100 a	7,70	7,70	1,00	0,00	0,00
	T	10/90 a	1,91	2,35	1,23	1,55	0,51
	T	c	2,37	2,63	1,11	0,78	0,26
	TAG	c	1,97	2,39	1,21	0,75	0,47

Vegyületek	Oszlop	Eluens	k_1	k_2	α	R_s	$-\Delta(\Delta G^\circ)$ kJ mol^{-1}
60*							
	T	0/100 a	2,36	2,73	1,16	0,58	0,37
	TAG	0/100 a	5,77	6,17	1,06	0,40	0,14
	T	10/90 a	1,44	1,72	1,19	1,47	0,43
	T	c	1,91	2,24	1,17	0,65	0,39
	TAG	c	2,07	2,01	1,00	0,00	0,00
61*							
	T	0/100 a	4,46	4,46	1,00	0,00	0,00
	TAG	0/100 a	7,15	7,15	1,00	0,00	0,00
	T	c	2,27	2,75	1,21	0,93	0,47
	TAG	c	2,06	2,27	1,10	0,47	0,24
62*							
	T	0/100 a	3,26	3,68	1,13	1,35	0,30
	TAG	0/100 a	6,12	6,54	1,07	0,40	0,17
	T	c	2,11	2,23	1,06	0,44	0,14
	TAG	c	1,90	2,11	1,11	0,71	0,26
63							
	T	0/100 a	4,42	4,82	1,09	0,67	0,21
	TAG	0/100 a	6,61	7,03	1,06	0,40	0,14
	T	10/90 a	4,12	1,77	1,16	1,45	0,37
	T	c	2,22	2,60	1,17	0,98	0,39
	TAG	c	2,11	2,27	1,08	0,50	0,19
64*							
	T	0/100 a	5,09	5,67	1,11	0,41	0,26
	TAG	0/100 a	8,33	8,33	1,00	0,00	0,00
	T	10/90 a	2,24	2,58	1,15	0,70	0,35
	T	c	2,66	3,29	1,24	0,97	0,53
	TAG	c	3,39	3,90	1,15	0,40	0,35
65							
	T	0/100 a	18,08	22,28	1,23	1,52	0,51
	TAG	0/100 a	26,74	31,71	1,19	0,40	0,43
	T	c	6,29	6,86	1,09	1,00	0,21
	TAG	c	5,39	5,39	1,00	0,00	0,00

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Chirobiotic T, Chirobiotic Tag; áramlási sebesség, 0,4 ml per⁻¹, detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C; eluens, **a**, H₂O/MeOH (v/v), **b**, H₂O(0.1% TEAA (pH 4.1))/MeCN (v/v), **c**, MeOH/AcOH/TEA=1000/1/1 (v/v/v); *elúciós sorrend nem meghatározott

F/19. Táblázat

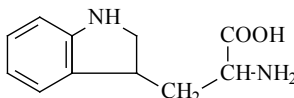
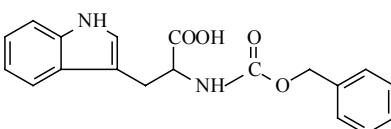
A vegyületek sztereoizomerjeinek retenciós faktor, elválasztási tényező és felbontás értékei változó eluensösszetételnél, 293 K hőmérsékleten

Vegyület	Kromatográfiás adatok	Eluens összetétel			
		H ₂ O(0,1%TEAA(pH=6,5))/MeOH (v/v)			
		80/20	60/40	40/60	20/80
17 Trp					
	k_L	3,06	2,48	2,56	4,33
	α	1,43	1,60	1,66	1,36
	R_S	1,40	2,87	2,62	2,00
43 eritro-β-MeTrp					
	k_L	2,29	1,67	1,74	2,18
	α	1,57	1,60	1,62	1,60
	R_S	1,28	2,87	0,93	1,69
44 treo-β-MeTrp					
	k_L	2,97	2,58	2,65	3,00
	α	1,68	1,29	1,00	1,13
	R_S	2,11	1,31	0,00	0,50
53 Z-Trp					
	k_I	7,38	1,67	0,65	0,60
	α	4,31	5,79	4,80	3,45
	R_S	5,12	5,95	5,22	3,57
54 DNPyr-Trp					
	k_I	-	4,26	1,58	0,88
	α	-	11,50	8,52	5,11
	R_S	-	11,36	7,89	6,10
85 CMP-Tic					
	k_I	-	5,58	2,83	1,40
	α	-	2,99	2,66	3,20
	R_S	-	5,90	6,76	10,17
98 butirolakton					
	k_I	2,94	1,36	0,95	-
	α	1,52	1,41	1,32	-
	R_S	1,67	2,52	1,65	-

Oszlop, Chirobiotic R; áramlási sebesség, 1,0 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; eluens, H₂O (0,1% TEAA (pH=6,5))/ MeOH= 80/20, 60/40, 40/60, 20/80 (v/v); hőmérséklet, 293K

F/20. Táblázat

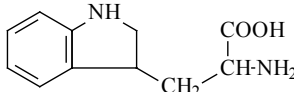
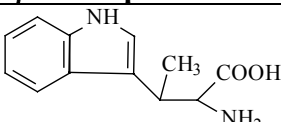
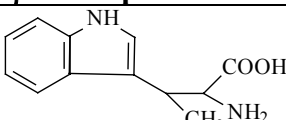
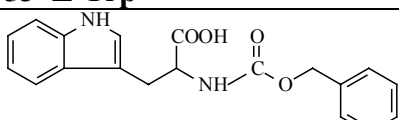
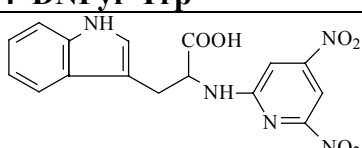
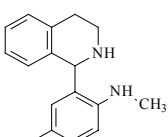
A Trp és CBZ-Trp kromatográfiás paramétereinek változása a hőmérséklet függvényében adott eluensösszetételeknél

Vegyület	kromatográfiás adatok	Hőmérséklet/ K					
		276	283	293	303	313	323
17 Trp							
	H2O(0,1%TEAA(pH=6,5))/MeOH=80/20 (v/v)						
	<i>k_L</i>	5,50	4,50	3,06	2,07	1,72	1,36
	<i>α</i>	1,69	1,54	1,43	1,39	1,32	1,17
	<i>R_S</i>	2,11	2,22	1,40	1,11	0,72	0,56
	H2O(0,1%TEAA(pH=6,5))/MeOH=60/40 (v/v)						
	<i>k_L</i>	4,13	3,48	2,48	1,87	1,47	1,13
	<i>α</i>	2,03	1,74	1,60	1,46	1,25	1,17
	<i>R_S</i>	3,57	3,33	2,87	2,28	1,23	0,76
	H2O(0,1%TEAA(pH=6,5))/MeOH=40/60 (v/v)						
	<i>k_L</i>	3,70	3,32	2,56	2,15	1,78	1,56
	<i>α</i>	2,03	1,71	1,66	1,47	1,35	1,22
	<i>R_S</i>	2,92	2,70	2,62	2,00	1,37	1,20
	H2O(0,1%TEAA(pH=6,5))/MeOH=20/80 (v/v)						
	<i>k_L</i>	5,64	5,00	4,33	3,23	2,69	2,28
	<i>α</i>	1,68	1,48	1,36	1,36	1,21	1,12
	<i>R_S</i>	2,31	2,21	2,00	1,57	1,26	1,12
53 Z-Trp							
	H2O (0,1%TEAA(pH=6,5))/MeOH=80/20 (v/v)						
	<i>k_I</i>	-	15,36	7,38	4,05	2,13	1,28
	<i>α</i>	-	5,17	4,31	3,88	3,20	2,75
	<i>R_S</i>	-	7,33	5,12	4,83	4,74	4,12
	H2O (0,1%TEAA(pH=6,5))/MeOH=60/40 (v/v)						
	<i>k_I</i>	-	3,56	1,67	1,00	0,50	0,33
	<i>α</i>	-	7,60	5,79	4,52	3,84	2,82
	<i>R_S</i>	-	6,54	5,95	5,88	5,41	2,77
	H2O(0,1%TEAA(pH=6,5))/MeOH=40/60 (v/v)						
	<i>k_I</i>	1,12	1,15	0,65	0,40	0,34	0,27
	<i>α</i>	8,55	5,87	4,80	4,42	3,20	2,14
	<i>R_S</i>	5,41	5,28	5,22	4,37	3,26	2,40
	H2O(0,1%TEAA(pH=6,5))/MeOH=20/80 (v/v)						
	<i>k_I</i>	0,89	0,76	0,60	0,50	0,46	0,35
	<i>α</i>	5,80	4,59	3,45	2,56	1,78	1,54
	<i>R_S</i>	2,70	3,05	3,57	2,50	2,14	1,43

Oszlop, Chirobiotic R; áramlási sebesség, 1,0 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; eluens, H₂O (0,1% TEAA (pH=6,5))/ MeOH= 80/20, 60/40, 40/60, 20/80 (v/v); hőmérséklet, 276K, 283K, 293K, 303K, 313K, 323K

F/21. Táblázat

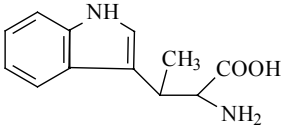
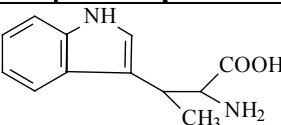
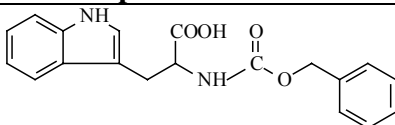
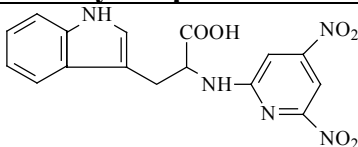
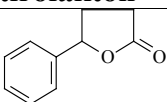
Kromatográfiás paraméterek különböző hőmérsékleten polár-organikus módban

Vegyület	kromatográfiás adatok	Hőmérséklet / K					
		278	283	293	303	313	323
17 Trp							
	k_L	1,97	1,97	1,80	1,72	1,58	1,41
	α	1,76	1,60	1,65	1,55	1,50	1,44
	R_S	2,08	2,18	2,60	2,66	2,55	2,48
43 e-β-MeTrp							
	k_L	0,88	0,85	0,87	0,86	0,83	0,81
	α	2,28	2,31	2,18	2,12	2,03	1,90
	R_S	2,85	2,93	3,39	3,63	3,41	3,45
44 t-β-MeTrp							
	k_L	1,29	1,30	1,26	1,24	1,17	1,11
	α	1,55	1,46	1,46	1,48	1,48	1,47
	R_S	1,28	1,36	1,70	1,96	2,03	2,14
53 Z-Trp							
	k_l	0,55	0,47	0,38	0,32	0,25	0,20
	α	5,90	5,57	4,58	3,84	3,24	2,85
	R_S	2,68	3,17	3,39	4,00	3,82	3,61
54 DNPy-Trp							
	k_l	0,72	0,65	0,52	0,42	0,35	0,29
	α	4,20	3,78	3,78	3,24	3,08	2,76
	R_S	4,17	4,71	4,83	4,16	4,61	3,87
85 CMP-Tic							
	k_l	0,05	0,05	0,04	0,03	0,02	0,02
	α	16,70	15,10	14,50	14,66	12,71	10,56
	R_S	7,28	3,17	3,62	3,15	2,42	1,70

Oszlop, Chirobiotic R; áramlási sebesség, 1,0 mlperc⁻¹; detektálás, 205 nm; eluens, MeOH/AcOH/TEA= 1000/1/1 (v/v/v); hőmérséklet, 278K, 283K, 293K, 303K, 313K, 323K

F/22. Táblázat

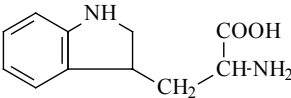
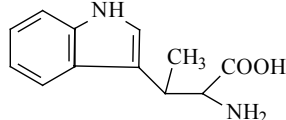
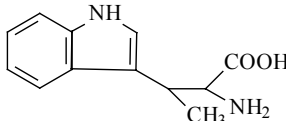
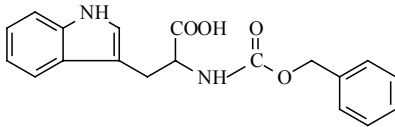
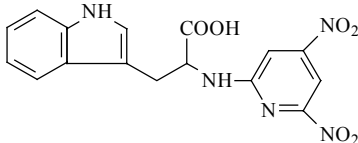
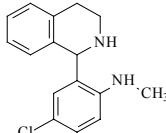
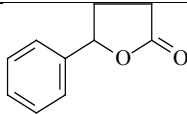
Kromatográfias paraméterek különböző hőmérsékleten normál-fázisban

Vegyület	kromatográfias adatok	Hőmérséklet/ K					
		278	283	293	303	313	323
hexán/etanol=20/80 (v/v)							
43 <i>eritro</i> -β-MeTrp							
	k_L	0,77	0,75	0,69	0,65	0,60	0,55
	α	1,95	1,90	1,84	1,77	1,73	0,69
	R_S	1,55	1,93	1,76	1,82	2,58	2,35
44 <i>treo</i> -β-MeTrp							
	k_L	0,76	0,75	0,68	0,64	0,60	0,56
	α	1,96	1,88	1,85	1,79	1,76	1,73
	R_S	1,80	1,70	2,00	2,15	2,20	2,29
53 <i>Z</i> -Trp							
	k_I	1,79	1,77	1,43	1,27	1,07	0,95
	α	2,15	1,94	1,68	1,41	1,23	1,15
	R_S	0,71	0,96	0,91	0,77	0,56	0,60
54 DNPyrr-Trp							
	k_I	3,59	3,42	2,64	2,12	1,88	1,63
	α	2,02	1,98	1,78	1,74	1,56	1,40
	R_S	1,07	1,08	1,08	1,06	1,07	1,43
hexán/etanol=95/5 (v/v)							
98 "butirolakton"							
	k_I	11,00	9,93	8,17	6,82	5,75	4,94
	α	1,07	1,08	1,06	1,04	1,04	1,02
	R_S	0,58	0,61	0,65	0,62	0,58	0,46

Oszlop, Chirobiotic R; áramlási sebesség, 1,0 ml perc^{-1} ; detektálás, 205 nm; eluens, hexán/etanol=20/80, illetve 95/5 (v/v).

F/23. Táblázat

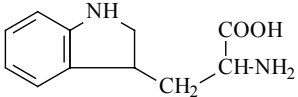
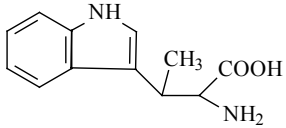
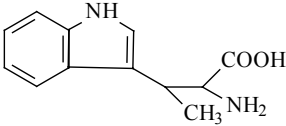
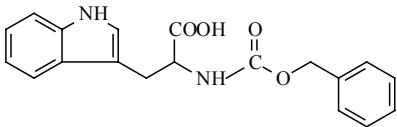
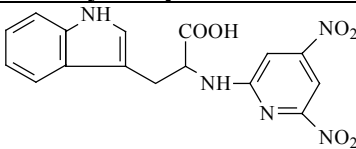
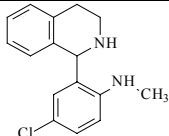
A vizsgált vegyületek $\Delta(\Delta H^\circ)$ és $\Delta(\Delta S^\circ)$ és a van't Hoff egyenlet egyenes illesztésének korrelációs koeficiens értékei az eluens összetétel függvényében fordított fázison

Vegyület	Termodinamikai adatok és korrelációs koeficiensek $\Delta(\Delta H^\circ)/\text{kJ mol}^{-1}$ $\Delta(\Delta S^\circ)/\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$	Eluensösszetétel			
		H ₂ O(0,1%TEAA (pH=6,5))/MeOH (v/v)			
		80/20	60/40	40/60	20/80
17 Trp					
	$\Delta(\Delta H^\circ)$	-6,10	-8,50	-7,40	-5,80
	$\Delta(\Delta S^\circ)$	-17,10	-25,20	-21,10	-16,80
	r_L^2	0,9788	0,9990	0,9958	0,9931
	r_D^2	0,9612	0,9998	0,9991	0,9962
43 eritro-β-MeTrp					
	$\Delta(\Delta H^\circ)$	-7,40	-6,50	-8,00	-7,40
	$\Delta(\Delta S^\circ)$	-21,40	-18,20	-23,30	-21,10
	r_L^2	0,9981	0,9955	0,9985	0,9946
	r_D^2	0,9961	0,9985	0,9985	0,9915
44 treo-β-MeTrp					
	$\Delta(\Delta H^\circ)$	-6,40	-3,60	0,00	-1,30
	$\Delta(\Delta S^\circ)$	-18,00	-10,00	0,00	-3,50
	r_L^2	0,9976	0,9974	0,9986	0,9912
	r_D^2	0,9993	0,9971	0,9986	0,9918
53 Z-Trp					
	$\Delta(\Delta H^\circ)$	-11,70	-18,70	-19,30	-21,40
	$\Delta(\Delta S^\circ)$	-27,60	-47,20	-52,40	-62,80
	r_1^2	0,9990	0,9957	0,9593	0,9876
	r_2^2	0,9994	0,9990	0,9975	0,9999
54 DNPyrr-Trp					
	$\Delta(\Delta H^\circ)$	-	-20,80	-16,70	-24,20
	$\Delta(\Delta S^\circ)$	-	-50,50	-39,40	-68,70
	r_1^2	-	0,9988	0,9957	0,9843
	r_2^2	-	0,9933	0,9996	0,9990
85 CMP-Tic					
	$\Delta(\Delta H^\circ)$	-	-5,10	-7,30	-14,40
	$\Delta(\Delta S^\circ)$	-	-7,90	-16,70	-39,60
	r_1^2	-	0,9995	0,9979	0,9828
	r_2^2	-	0,9891	0,9966	0,9905
98 "burirolakton"					
	$\Delta(\Delta H^\circ)$	-3,60	-2,60	-1,90	-
	$\Delta(\Delta S^\circ)$	-8,80	-5,90	-4,0	-
	r_1^2	0,9996	0,9958	0,9931	-
	r_2^2	0,9996	0,9984	0,9932	-

Oszlop, Chirobiotic R; áramlási sebesség, 1,0 mlper⁻¹; detektálás, 205 nm; eluens, H₂O(0,1%TEAA (pH=6,5))/MeOH= 80/20, 60/40, 40/60, 20/80 (v/v)

F/24. Táblázat

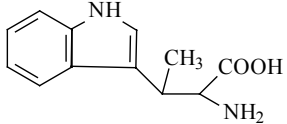
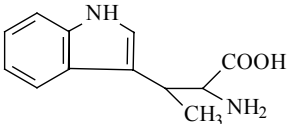
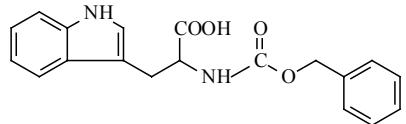
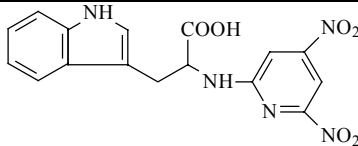
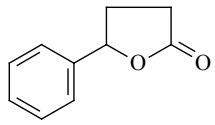
A vizsgált vegyületek $\Delta(\Delta H^\circ)$ és $\Delta(\Delta S^\circ)$ és a van't Hoff egyenlet egyenes illesztésének korrelációs koeficiens értékei az eluens összetétel függvényében polár-organikus módban

Vegyület	Sztereo-izomer	ΔH°	ΔS°	ΔG°	$\Delta(\Delta H^\circ)$	$\Delta(\Delta S^\circ)$	$\Delta(\Delta G^\circ)$	Korre-lációs koeffi-ciens
17 Trp								
	L	-5,47	-2,38	-4,71	-2,66	-5,14	-1,00	0,961
	D	-8,14	-7,52	-5,71				0,976
43 eritro-β-MeTrp								
	L	-1,10	6,44	-3,18	-2,97	-3,68	-1,78	0,988
	D	-4,07	2,76	-4,96				0,960
44 treo-β-MeTrp								
	L	-2,47	4,85	-4,04	-0,61	1,21	-1,00	0,920
	D	-3,08	6,06	-5,04				0,919
53 Z-Trp								
	1	-16,33	-52,14	0,51	-12,45	-29,97	-2,77	0,998
	2	-28,78	-82,12	-2,26				0,999
54 DNPyrr-Trp								
	1	-15,16	-45,68	-0,41	-6,66	-12,14	-2,77	0,999
	2	-21,82	-57,82	-3,15				0,995
85 CMP-Tic								
	1	-12,86	-59,09	6,22	-6,67	-0,75	-6,43	0,995
	2	-19,54	-59,85	-0,21				0,998

Oszlop, Chirobiotic R; áramlási sebesség, 1,0 mlper⁻¹; detektálás, 205 nm; eluens, MeOH/AcOH/TEA= 1000/1/1 (v/v/v)

F/25. Táblázat

A vizsgált vegyületek $\Delta(\Delta H^\circ)$ és $\Delta(\Delta S^\circ)$ és a van't Hoff egyenlet egyenes illesztésének korrelációs koefficiens értékei az eluens összetétel függvényében normál fázisú kromatográfia esetén

Vegyület	Sztereo-izomer	ΔH°	ΔS°	ΔG°	$\Delta(\Delta H^\circ)$	$\Delta(\Delta S^\circ)$	$\Delta(\Delta G^\circ)$	Korre-lációs koeffi-ciens
43 <i>eritro</i>-β-MeTrp								
	L	-5,60	-11,91	-1,75	-2,36	-2,96	-1,40	0,995
	D	-7,96	-14,88	-3,15				0,999
44 <i>treo</i>-β-MeTrp								
	L	-5,43	-11,29	-1,78	-1,64	-0,57	-1,46	0,997
	D	-7,08	-11,86	-3,25				0,997
53 <i>Z</i>-Trp								
	1	-11,22	-28,09	-3,14	-9,70	-28,96	-0,34	0,992
	2	-21,92	-57,06	-3,49				0,996
54 DNPyr-Trp								
	1	-13,89	-28,88	-4,56	-7,22	-19,42	-0,95	0,988
	2	-21,11	-48,30	-5,51				0,991
98 "butirolakton"								
	1	-13,18	-17,16	-7,64	-1,20	-3,62	-0,03	0,997
	2	-14,38	-20,79	-7,67				0,999

Oszlop, Chirobiotic R; áramlási sebesség, 1,0 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; eluens, hexán/etanol=20/80, illetve 95/5 (v/v).