

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Kémia Doktori Iskola

Ph.D. értekezés

Enantiomer elválasztás és felismerés nagyhatékonyságú
folyadékkromatográfiás rendszerekben

Készítette:

Pataj Zoltán

Témavezetők:

Dr. Péter Antal
egyetemi tanár

Dr. habil Ilisz István
egyetemi adjunktus

Szeged
2011

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2. oldal
Rövidítések jegyzéke	4. oldal
1. Bevezetés	5. oldal
2. Célkitűzés	8. oldal
3. Irodalmi áttekintés	9. oldal
3.1. A kiralitás, a sztereospecifikus kölcsönhatások és jelentőségük	9. oldal
3.2. A királis kromatográfia	10. oldal
3.2.1. <i>Királis oszlop</i>	11. oldal
3.3. Királis állófázisok	11. oldal
3.3.1. <i>Makrociklusos antibiotikumok</i>	13. oldal
3.3.1.1. <i>Teikoplanin</i>	14. oldal
3.3.1.2. <i>Teikoplanin aglikon</i>	16. oldal
3.3.1.3. <i>Risztocetin A</i>	17. oldal
3.3.1.4. <i>Vankomicin</i>	18. oldal
3.3.2. <i>Koronaéterek</i>	19. oldal
3.3.2.1. <i>(+)-(18-Korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektor</i>	21. oldal
3.3.3. <i>Módosított poliszacharidok</i>	22. oldal
3.4. Termodinamika és kromatográfia	25. oldal
3.4.1. <i>Termodinamikai alapfogalmak</i>	25. oldal
3.4.2. <i>A van 't Hoff egyenlet és alkalmazása a kromatográfiában</i>	27. oldal
3.5. Vizsgált vegyületek jelentősége	29. oldal
3.5.1. <i>β-Aminosavak</i>	29. oldal
3.5.2. <i>γ-Aminosavak</i>	29. oldal
3.5.3. <i>β-Laktámok</i>	30. oldal
3.5.4. <i>Aminonaftolok</i>	30. oldal
4. Kísérleti rész	32. oldal
4.1. A vizsgált anyagok	32. oldal
4.2. A felhasznált vegyszerek	37. oldal
4.3. Alkalmazott berendezések	38. oldal
4.4. Alkalmazott kolonnák	38. oldal
5. Eredmények és értékelésük	39. oldal
5.1. Nem természetes β – és γ -aminosav enantiomerek elválasztása makrociklusos glikopeptid alapú királis állófázisokon	39. oldal
5.1.1. <i>Eluensösszetétel-változás hatása az elválasztásra</i>	39. oldal
5.1.2. <i>Molekulaszerkezet és kromatográfiás viselkedés közti összefüggések</i>	42. oldal
5.1.3. <i>A szelektív és nem-szelektív kölcsönhatások becslése</i>	47. oldal
5.1.4. <i>A természetes teikoplanin molekulán lévő cukorrészek szerepe a királis felismerésben</i>	50. oldal
5.1.5. <i>Hőmérsékletfüggés és termodinamikai adatok</i>	51. oldal
5.2. Nem természetes β -aminosav enantiomerek elválasztása koronaéter alapú királis állófázisokon	59. oldal
5.2.1. <i>A mozgófázisbeli sav minőségének és mennyiségének hatása az elválasztásra</i>	59. oldal
5.2.2. <i>A mozgófázisbeli apoláris módosító (alkohol) minőségének és mennyiségének hatása az elválasztásra</i>	60. oldal
5.2.3. <i>A szerkezet-visszatartás kapcsolata β-aminosav enantiomerek elválasztása esetén</i>	62. oldal

5.2.4. <i>Hőmérséklet hatás és termodinamikai adatok</i>	64. oldal
5.3. β -Laktám enantiomerek elválasztása módosított poliszacharid alapú királis állófázisokon	68. oldal
5.3.1. <i>A mozgófázisbeli alkohol minőségének hatása a β-laktám enantiomerek elválasztására</i>	69. oldal
5.3.2. <i>A mozgófázisbeli alkohol mennyiségének hatása a β-laktám enantiomerek elválasztására</i>	71. oldal
5.3.3. <i>Molekulaszerkezet-visszatartás összefüggések vizsgálata a β-laktám enantiomerek elválasztására</i>	72. oldal
5.4. Egy kiralitáscentrumot tartalmazó aminonaftol enantiomerek (Betti-bázisok) elválasztása, módosított poliszacharid alapú királis állófázisokon	73. oldal
5.4.1. <i>A mozgófázisbeli alkohol minőségének hatása Betti-bázis enantiomerek elválasztására</i>	74. oldal
5.4.2. <i>A mozgófázisbeli alkohol mennyiségének hatása Betti-bázis enantiomerek elválasztására</i>	75. oldal
5.4.3. <i>A CelluCoat és Chiralcel OD-H oszlopok elválasztóképességének összehasonlítása Betti-bázis enantiomerek elválasztása során</i>	76. oldal
5.4.4. <i>Molekulaszerkezet-kromatográfiás viselkedés összefüggése Betti-bázis enantiomerek elválasztása során</i>	78. oldal
5.5. Két kiralitáscentrumot tartalmazó aminonaftol sztereoizomerek elválasztása módosított poliszacharid alapú királis állófázisokon	80. oldal
5.5.1. <i>A mozgófázisbeli alkohol minőségének és mennyiségének hatása aminonaftol analógok királis elválasztására</i>	81. oldal
5.5.2. <i>Az AmyCoat és CelluCoat állófázisok elválasztóképességének összehasonlítása aminonaftol analógok királis elválasztása során</i>	84. oldal
5.5.3. <i>Molekulaszerkezet-kromatográfiás viselkedés összefüggése aminonaftol analógok királis elválasztása során</i>	85. oldal
6. Összefoglalás	87. oldal
7. Summary	92. oldal
8. Irodalomjegyzék	96. oldal
9. Közlemények listája	101. oldal
9.1. Az értekezésben feldolgozott közlemények	101. oldal
9.2. Az értekezés témájához kapcsolódó fel nem dolgozott közlemények	102. oldal
9.3. Posztterek	104. oldal
9.4. Előadások	107. oldal
10. Köszönetnyilvánítás	109. oldal
11. Függelék	110. oldal
11.1. Nem természetes aminosavak kromatogramjai	110. oldal
11.2. β -Laktámok kromatogramjai	112. oldal
11.3. Betti-bázisok kromatogramjai	114. oldal

Rövidítések jegyzéke

Kromatográfiás kifejezések:

HPLC: Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

KÁF: Királis állófázis

NPM: Normál fázisú mód

PIM: Poláris-ionos mód

POM: Poláris-szerves mód

RPM: Fordított fázisú mód

Oldószerek, vegyszerek:

ACN: Acetonitril

AcOH: Ecetsav

BuOH: Butanol

***t*-BuOH:** 2-Metil-propán-2-ol

DEA: Dietilamin

EtOH: Etanol

IPA: Propán-2-ol

MeOH: Metanol

PrOH: Propanol

TEA: Trietilamin

TEAA: Trietilammónium-acetát

TFA: Trifluorecetsav

Királis oszlopok:

R: Risztoctetin A oszlop (ChirobioticTM R)

T: Teikoplanin oszlop (ChirobioticTM T)

TAG: Teikoplanin aglikon oszlop (ChirobioticTM TAG)

V: Vankomicin oszlop (ChirobioticTM V)

VAG: Vankomicin aglikon oszlop (ChirobioticTM VAG)

1. Bevezetés

Az élő szervezetekben a királis molekulák kiemelkedő jelentőséggel bírnak. A fehérjék, a fehérjéket alkotó aminosavak, a cukrok, az enzimek mind királis vegyületek. A pontos magyarázat még ma sem ismeretes, de e molekulák kép-tükörkép párosából az esetek döntő többségében csak az egyik forma fordul elő.

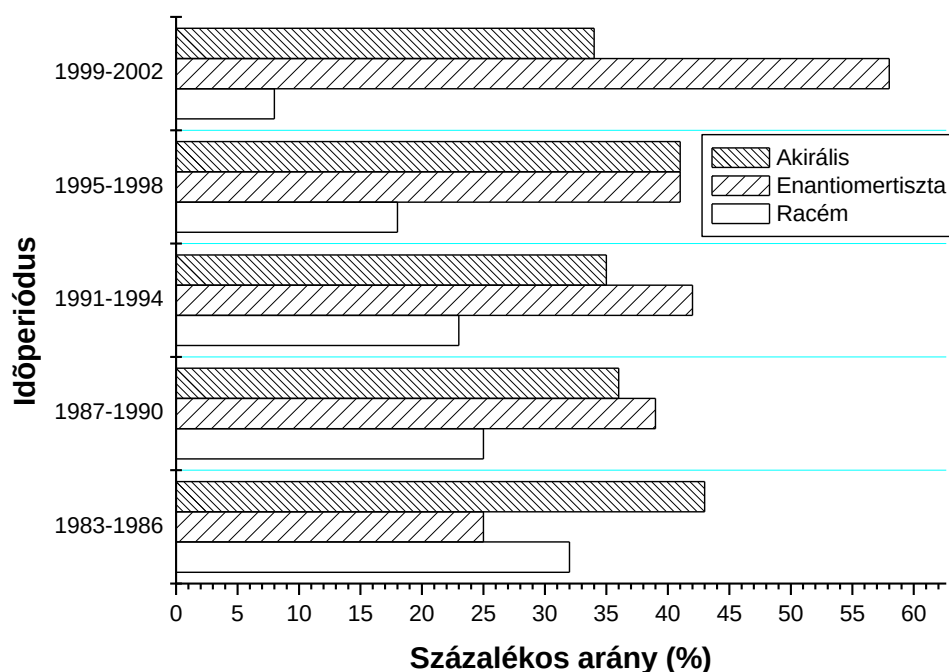
A királis molekulák világában az enantiomerek biológiai hatása nagymértékben különbözhet egymástól (1. Táblázat), attól függetlenül, hogy fizikai-kémiai tulajdonságaikat tekintve azonosak, kivéve hogy a poláris fényt milyen irányban forgatják [1]. Ez azzal magyarázható, hogy a királisan aszimmetrikus molekulák a biológiai rendszerekben ugyancsak aszimmetrikus molekulák egy adott konfigurációjával találkoznak, melyek képesek megkülönböztetni az enantiomereket.

1. Táblázat Néhány vegyület enantiomerjeinek eltérő hatásai

Ízek	
(L)-(-)-aszparagin	íztelen
D-(+)-aszparagin	édes
(L,L)-aszpartil-fenilalanin-metilészter (aszpartám)	édes
(D,D), (L,D), (D,L)-aszpartil-fenilalanin-metilészter	nem édes
Illatok	
(S)-(+)-karvon	köményillatú
(R)-(-)-karvon	mentolillatú
(1R,2S,5R)-(-)-mentol	mentolillatú és „ízű”
(1S,2R,5S)-(+)-mentol	nincs mentolillat
(R)-(+)-limonén	narancsillatú
(S)-(-)-limonén	citromillatú
Biológiai hatás	
(R)-nikotin (nem természetes)	kevésbé toxikus
(S)-nikotin (természetes)	toxikus
(S)-a-(2-brómfenoxi)-propionsav	növényi növekedési hormon (auxin)
(R)-a-(2-brómfenoxi)-propionsav	növekedés-gátló

A különböző viselkedés megállapításának a királis gyógyszermolekulák esetében óriási jelentősége van, hiszen amíg az enantiomer molekula párok egyik tagja pozitív hatást fejt ki az emberi szervezetben, addig a másik hatástalan, rosszabb esetben akár mérgező is lehet, hisz farmakológiai tulajdonságaik-úgy mint farmakodinamikai, farmakokinetikai, lebomlási, fehérjékhez kötődési és mérgezési hatásuk-gyakran eltérőek [2]. Ezért bír igazán nagy fontossággal a tiszta sztereoizomer molekulák szintézise és az enantiomerek elválasztása [3].

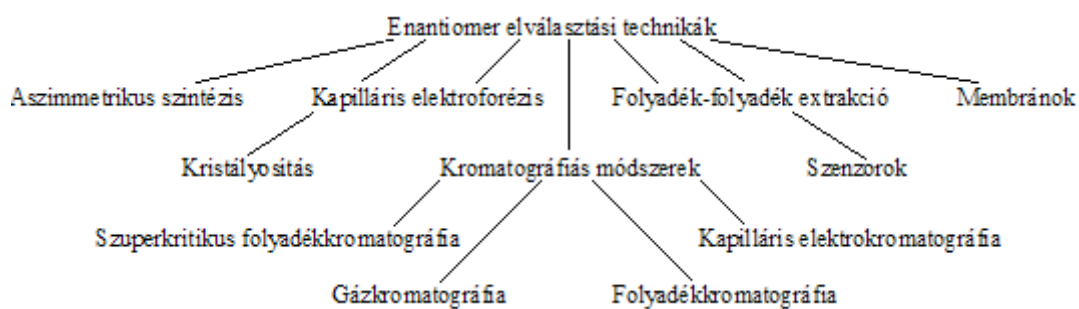
Egy 2004-es tanulmány az engedélyezett királis gyógyszerek százalékos megoszlását vizsgálta 1983-2002 között. Az eltelt 10 év alatt a racém hatóanyaggal rendelkező, újonnan engedélyezett gyógyszerek száma jelentősen lecsökkent és a tiszta enantiomer formában való előállítás került előtérbe. A tiszta enantiomert tartalmazó gyógyszerek piaci részesedése becslések szerint az 1996 évi 27 %-ról (74,4 milliárd USA \$) 2002-ben 39 %-ra nőtt elérve a 151,9 milliárd USA dollárt [4].



1. ábra Gyógyszerhatóanyagok királis és akirális megoszlása 1983 és 2002 között

Királis molekulák előállításának gazdaságos útja lehet a közvetlen királis katalitikus vagy enzimatisz szintézis, illetve racém vegyületek szintézise és az azt követő valamilyen elválasztási technika alkalmazása. Ezek az aszimmetrikus szintézismódszerek is csak korlátozottan szolgáltatnak 100%-os enantiomer tisztaságot, így a kristályosítással történő rezolválás (diasztereomerpár képzés), a kromatográfiai módszerek, folyadék-folyadék extrakció, szenzorok és membránok felhasználása, desztilláció, stb. jöhet szóba enantiomertiszta vegyületek előállítására.

Bármilyen úton is történik a királis molekula előállítása, elengedhetetlen a szintézist követő valamilyen elválasztási módszer alkalmazása a királis tisztaság ellenőrzésére.



2. ábra Enantiomer elválasztási technikák

2. Célkitűzés

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

Vizsgálni kívántuk:

- a) alifás és aromás β -2- és β -3-homoaminosav enantiomerek elválasztását **makrociklusos glikopeptid** alapú állófázisokon,
- b) tanulmányoztuk ciklusos γ -aminosav enantiomerek retenciójának mechanizmusát **makrociklusos glikopeptid** oszlopokon,
- c) alifás és aromás β -2-homoaminosav enantiomerek elválasztását **módosított koronaéter** állófázison,
- d) β -laktám enantiomerek elválasztását **módosított poliszacharid** királis szelektort tartalmazó kolonnákon,
- e) aminonaftol analógok enantiomerjeinek elválasztását **módosított poliszacharid** alapú állófázisokon.

Célul tűztük ki, hogy közvetlen királis folyadékkromatográfiás elválasztások során, a vizsgált vegyületek és a királis szelektorok szerkezetének ismeretében a kromatográfiás körülmények változtatásával befolyásoljuk az elválasztást. Ezzel párhuzamosan a kromatográfiás paraméterek változásának nyomon követésével értelmezni kívántuk az eluens minőségének és összetételének, a hőmérsékletnek és a vizsgált vegyületek szerkezetének hatását a királis megkülönböztetési folyamatokra.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A kiralitás, a sztereospecifikus kölcsönhatások és jelentőségük

A természetben a legtöbb vegyületnek különböző megjelenési formái léteznek, mely formákat izomereknek nevezünk. Vannak, amelyek egymáshoz viszonyított szerkezete rendkívül különböző, csak az őket felépítő atomok minőségében és mennyiségében egyeznek meg. Más izomerek viszont ugyanazzal az alapszerkezettel rendelkeznek, csak az atomok, atomcsoportok térbeli elhelyezkedése különböző. Az ilyen típusú kapcsolatot sztereoizomériának nevezzük.

Egy molekula sztereoizomer formái a legtöbb esetben eltérő kémiai tulajdonságokkal bírnak, mely a már említett okból, a felépítő molekularészek térállásának különbözőségéből adódik. Van viszont a sztereoizomereknek egy speciális csoportja, amelyek esetén az izomerek tárgytükröképi viszonyban állnak egymással. Az ilyen típusú vegyületek az enantiomerek, melyek már megegyező fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, kizárólag a királis kölcsönhatás során tanúsított viselkedésükben különböznek, illetve a síkban poláris fény rezgési síkját azonos mértékben, de ellenkező irányban forgatják el. Az ilyen típusú vegyületek a királis vegyületek.

A királis vegyületeket vagy másképpen az enantiomerek konfigurációit a latinból vett jobb *rectus* (*R*) és bal *sinister* (*S*) kezdőbetűivel, más esetben „+” és „-” jellel, esetleg *D* és *L* betűvel is jelölhetjük. Az olyan keveréket, amelyben a két forma aránya megegyezik, azaz 50-50%-ban van jelen a két konfiguráció, racemátnak hívjuk. Az ilyen vegyületek optikailag inaktívak, vagyis a polarizált fényt nem forgatják el.

A makroszkópikus világ nagy affinitást mutat a szimmetria iránt, viszont a molekulák szintjén már az aszimmetria dominál. A biológiai molekulák kölcsönhatásai közül a legfigyelemre méltóbbak a sztereospecifikus kölcsönhatások. A királis megkülönböztetés, amely sok terület mellett a gyógyszerek világában bír jelentőséggel, a komplementaritáson alapszik. Az enzim-receptor kapcsolódása során megismert kulcs-zár illeszkedés modellje nagyban segítheti ezen kölcsönhatások megértését [5]. Pasteur, van't Hoff és Le Bell voltak azok, akikben először fogalmazódott meg a sztereokémia és a sztereoselektivitás gondolata [6]. Äriens áttörő eredményeket ért el ezen a területen, amelyeket a “Stereoselectivity of bioactive xenobiotics” című munkájában ismertetett [5].

Ezen sztereospecifikus kölcsönhatások felelősek az enantiomerek által kiváltott különböző hatásokért. Az első olyan gyógyszer, amely kapcsán sztereoselektív kölcsönhatással magyarázták a humán szérum albuminhoz (HSA) való kötődést, az oxazepám szukcinát volt. Müller és Wollert azt találta, hogy ezen vegyület (*S*)-enantiomerjének 35-ször nagyobb a kötési affinitása a HSA-hoz, mint az (*R*)-enantiomernek [7]. Az azóta végzett vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a

3. helyzetben, különböző módon szubsztituált 1,4-benzodiazepám vegyületek esetén is az (S)-enantiomer kötése a kedvezményezett a HSA molekulához [8-10].

Számos példa alapján, a sztereoszelektív kölcsönhatásokkal azon esetekben kell a leginkább számolnunk, amikor az enantiomerek enzimekkel, illetve fehérjékkel lépnek kémiai jellegű kapcsolatba. Ilyen esetekben eltérő biológiai hatással számolhatunk, hisz az eltérő komplementaritás miatt a különböző enantiomerek más-más receptorhoz kapcsolódhatnak [11]. Emellett a legtöbb esetben a lebomlásuk útjában és/vagy mértékében is lehet különbség [12]. Ennek alapján a biológiailag aktív racémátokat tekinthetjük úgy is, mint hatóanyagokat, melyek 50% szennyezővel rendelkeznek [2].

Az amerikai élelmiszereket és gyógyszereket felügyelő hatóság, az FDA, valamint más országok gyógyszerhatóságai kötelezik a gyógyszergyártókat, hogy állítsák elő és vizsgálják meg a farmakológiai hatását bármely királis anyag mindkét enantiomerjének, mielőtt az a gyógyszerpiacra kerülne. Ugyanakkor az FDA azt is ajánlotta, hogy ne legyen tiltva a racém gyógyszerek forgalmazása, de a végső engedélyeztetés egy komplex információhalmazon alapuljon, amely tartalmazza mindkét enantiomer, illetve a keverékük farmakokinetikai és farmakodinamikai jellemzőit, valamint a meghatározásukra szolgáló analitikai módszereket is [13]. Ennek következtében a biológiailag aktív anyagok előállítása területén az elsődleges cél olyan szintézisutak kidolgozása, amelyek biztosítják a hatóanyag királisan tiszta formában való kinyerését.

3.2. A királis kromatográfia

Enantiomerpárok elválasztása a fent említett fizikai és kémiai tulajdonságbeli hasonlóságuk miatt csak olyan sztereospecifikus kémiai kölcsönhatással lehetséges, amelynek során a sztereoizomerek eltérő módon reagálnak. Éppen ezért a kromatográfiás elválasztás alapja a diasztereomerpár-képzés a vizsgált vegyület és az állófázis vagy a mozgófázis optikailag aktív komponense (anizotróp közeg) között.

A királis elválasztások két nagy csoportba sorolhatók:

Közvetlen módszerek:

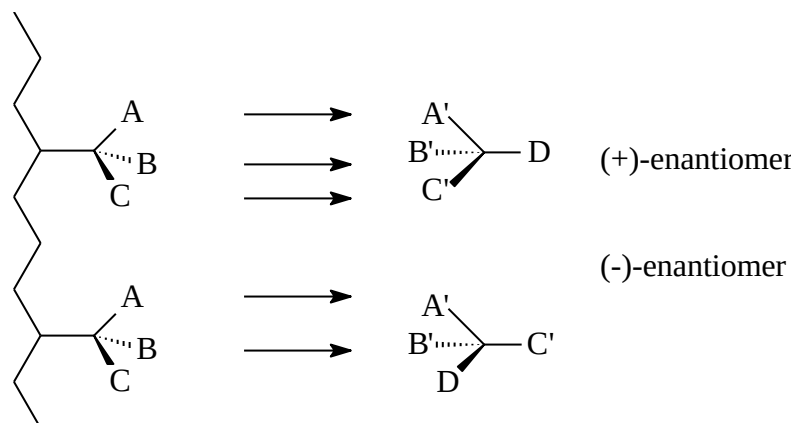
- királis oszlop (állófázis) alkalmazása
- királis eluens (mozgófázis) vagy királis adalék felhasználása

Közvetett módszerek:

- oszlop előtti származékképzés királis reagens segítségével

3.2.1. Királis oszlop

Királis oszlop alkalmazása esetén az elválasztás mértékét az enantiomerek állófázissal kialakított eltérő kölcsönhatása határozza meg. Az enantiomer aktív centrumához kapcsolódó csoportok hárompontos kölcsönhatás (ezek lehetnek: szterikus gátlás, π - π -, dipól-dipól-, ionos kölcsönhatás, komplexképzés, stb.) kialakítására képesek, így a királis állófázist ennek megfelelően kell megválasztani [14, 15].



3. ábra A hárompontos illeszkedés modellje

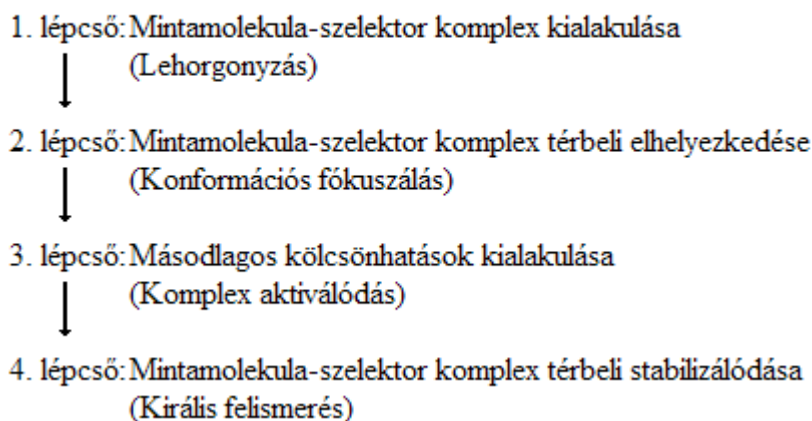
A módszer nagy előnye, hogy nem igényel hosszadalmas és bonyolult mintelőkészítést, valamint az analízis után a vegyületek eredeti formájukban állnak rendelkezésünkre. A királis oszlopok alkalmasak analitikai mérések kivitelezésére minőségi és mennyiségi meghatározás céljából, valamint fél-preparatív, illetve preparatív méretben enantiomerek tisztításra is.

3.3. Királis állófázisok

A királis HPLC oszlopok létrehozása bizonyos szerves vegyületek kiválasztott enantiomerjének állófázishoz való kötésével történik. Az elválasztás hatékonysága az így kialakított királis felületen képződő diasztereomer párok eltérő kötéseiről függ. A stabilabb diasztereomert kialakító vegyület visszatartása nagyobb, így a kevésbé stabil diasztereomer eluálódik először. Az enantiomerek elválasztásához minimum hárompontos kölcsönhatásra van szükség az állófázis és a minta molekulái között, melyek közül legalább egynek sztereospecifikusnak kell lennie [15]. Az enantiomer-megkülönböztető képesség (enantioszelektivitás) azon alapszik, hogy egy királis molekula egyik enantiomerje eltérő kölcsönhatásba lép egy másik királis molekula két enantiomerjével, melynek folyamata a 4. ábrán

látható. Ez az eltérés megnyilvánulhat a gazdamolekula és a vendégmolekula között létrejött komplexek stabilitásában (termodinamikai kontroll), a komplexképződés sebességében, illetve a már kialakult komplexek disszociációjának sebességében (kinetikus kontroll).

KIRÁLIS FELISMERÉS FOLYAMATA:



4. ábra A királis felismerés folyamata [16]

A királis állófázisokat különböző szempontok szerint lehet csoportosítani. Eredetük szerint három nagy csoportot különböztetnek meg: természetes alapúak, fél-szintetikus és szintetikus állófázisok. Manapság a leggyakrabban alkalmazott felosztás (a teljesség igénye nélkül): fehérje alapú, ligandumcserés, polimer alapú, donor-akceptor típusú (Pirkle-féle vagy az ún. brush-típusú), zárvány komplexképzők, makrociklusos antibiotikumok és molekulalenyomat-alapú állófázisok [17] (2. Táblázat).

2. Táblázat Királis állófázisok felosztása

	Állófázis típusa	Szelektor	Főbb kölcsönhatások
I.	Fehérje	természetes fehérje	ionos és hidrofób
II.	Ligandum cserés	aminosav-fém komplex	komplexképződés
III.	Polimer	módosított cellulóz és amilóz	poláris és diszperziós
IV.	Donor-akceptor (Pirkle-típusú)	π -savas, π -bázisos csoportok	π - π és dipol
V.	Zárványkomplex	ciklodextrin, módosított ciklodextrin királis koronaéter	szterikus és komplex- képződés
VI.	Makrociklusos antibiotikum	makrociklusos glikopeptid	H-híd, poláris és hid- rofób
VII.	Molekulalenyomat	szelektív szorbens (pl.: szerves molekula, makromolekula, sejt)	szterikus

3.3.1. Makrociklusos antibiotikumok

Armstrong és munkatársai alkalmazták először a makrociklusos antibiotikumok egyik családját, a makrociklusos glikopeptideket királis szelektorként [18]. A ciklodextrinek és poliszacharidok mellett a királis kromatográfiában manapság a makrociklusos antibiotikum alapú fázisok a legkeresettebbek, amit a megjelenő közlemények egyre növekvő száma is bizonyít [19-30].

A makrociklusos antibiotikumok családjába több száz vegyület tartozik, mely vegyületek szerkezetüket tekintve rendkívül széles skálán mozognak. A királis szelektorként is alkalmazható molekulák, a makrociklusos antibiotikumokon belül négy fő csoportba sorolhatók: ansamicinek, glikopeptidok, polipeptidok és aminoglikozidok (5. ábra). Sztereoszelektivitás szempontjából a leghatékonyabbnak a glikopeptidok (teikoplanin, teikoplanin aglikon, risztocetin A, vankomicin és vankomicin aglikon) bizonyultak, de érték el eredményeket tiosztrepton, rifamicin, fradiomicin, sztreptomycin, kanamicin és avoparcin királis szelektorként való alkalmazásával is [29]. A leggyakoribb szelektorok főbb fizika-kémiai tulajdonságait a **3. Táblázat** tartalmazza [31].

Makrociklusos antibiotikumok

Ansamicinek	Glikopeptidok	Polipeptidok	Aminoglikozidok
-rifamicin	-avoparcin -teikoplanin -teikoplanin aglikon -risztocetin A -vankomicin -vankomicin aglikon	-tiosztrepton	-fradiomicin -sztreptomycin -kanamicin

5. ábra A makrociklusos antibiotikumok csoportosítása

Egyedi szerkezetüknek és a funkciós csoportok széles tárházának köszönhetően a makromolekulák ionos, hidrogénhidas, hidrofób, dipól-dipól, diszperziós, szterikus, π - π , stb. kölcsönhatás kialakítására képesek [32-34]. Hatékonyan használhatóak különböző kromatográfiás módokban, úgymint normál és fordított fázisban (NPM és RPM), nemvizes poláris szerves oldószert tartalmazó rendszerben (MeOH, ACN) (POM), valamint savas, illetve bázisos karakterű módosítót tartalmazó nemvizes poláris szerves fázisban (PIM), (MeOH/AcOH/TEA) [35].

3. Táblázat Makrociklusos glikopeptidek fizikai-kémiai tulajdonságai

Tulajdonságok	Teikoplanin A ₂ -2	Teikoplanin A-40,926	Teikoplanin aglikon	Risztocetin A	Vankomicin	Norvankomicin	Vankomicin aglikon*
Molekulatömeg	1877	B ₀ =1732 B ₁ =1718	1197	2066	1449	1435	1128
Hidrofób lánc	1	1	0	0	0	0	0
Vegyületeken található...	aszimmetria centrum	B ₀ =19 B ₁ =18	8	38	18	18	8
	makrociklus	4	4	4	3	3	3
	aromás gyűrű	7	7	7	5	5	5
	cukor- csoport	3	2	0	6	2	0
	hidroxil- csoport	14	11	7	21	9	6
	primer amin	1	0	1	2	1	1
	szekunder amin	0	1	0	0	1	1
	amid- csoport	8	7	6	6	7	7
	karboxil- csoport	1	2	1	0	1	1
	metoxi- csoport	0	0	0	0	0	0
	metilészter	0	0	0	1	0	0
Előállítás	<i>Actinoplanes teichomycetius</i>	<i>Nonomuraea ATCC 39727</i>	Szintetikus úton	<i>Nocardia lurida</i>	<i>Streptomyce sorientalis</i>	<i>Streptomyces orientalis</i>	Szintetikus úton

* Saját számítás

3.3.1.1. Teikoplanin

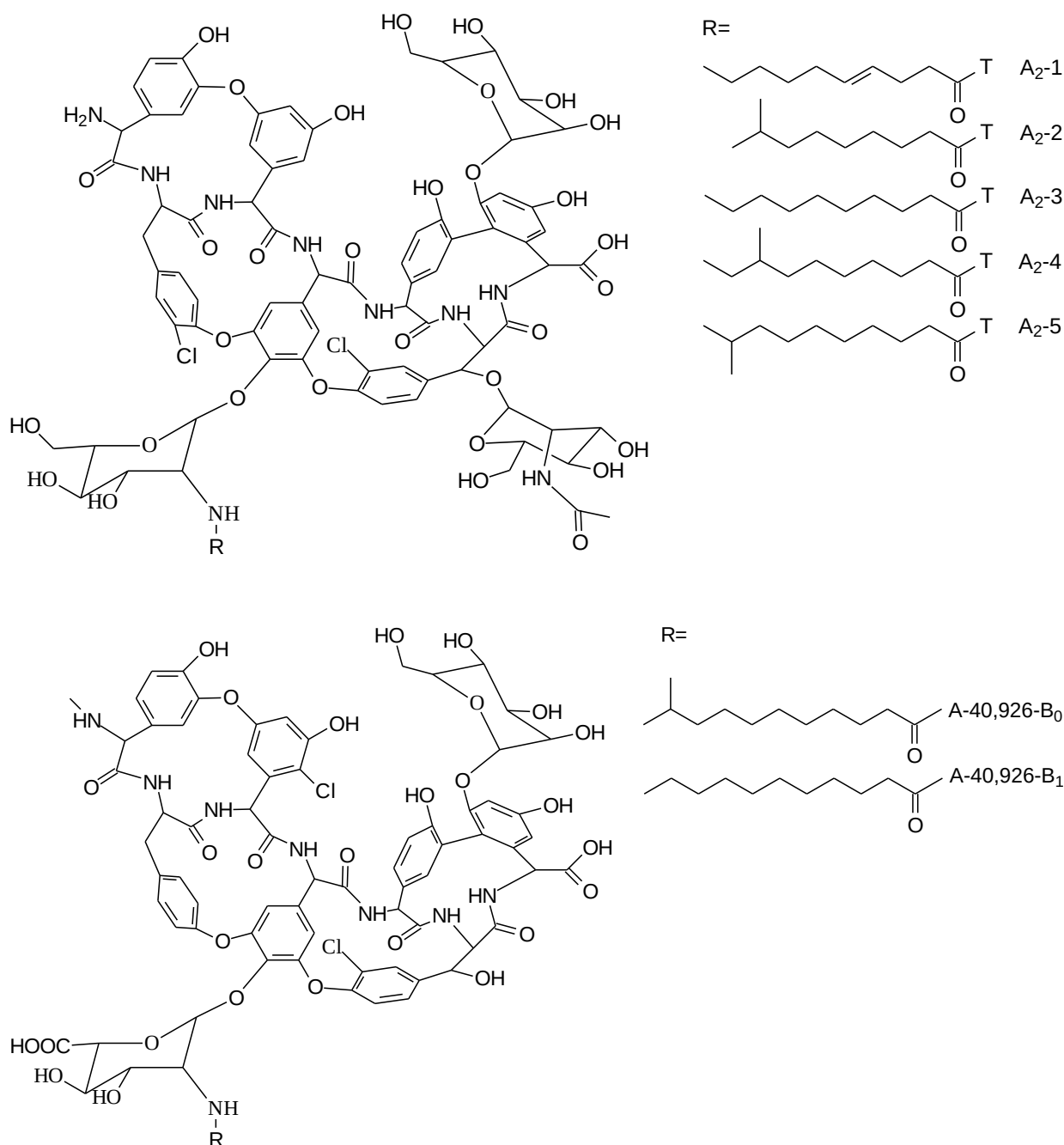
A teikoplanin (5. ábra) a makrociklusos antibiotikumok közül a glikopeptidek csoportjába és azon belül a vankomicinek osztályába tartozik és az *Actinoplanes teichomyceticus* baktérium-törzs termeli. Szerkezete és hatásmechanizmusa nagymértékben hasonlít az ugyancsak ebbe a csoportba tartozó vankomicinére. A legtöbb Gram-pozitív sejtfalú baktériummal szemben baktericid tulajdonságokat mutat a sejtfal bioszintézisének megakadályozásával úgy, hogy a peptidoglikán prekursor D-alanil-D-alanin terminális részéhez kötődve gátolja a falépítő folyamatokat [36]. A teikoplanin rendkívül hatékony alternatívája a β -laktám antibiotikumoknak az olyan Gram-pozitív, multirezisztens fajokkal szemben, mint a *Streptococcus pneumoniae* [37].

A molekulának többféle módosulata létezik, melyek közül az öt fontosabb a teikoplanin A₂-1 - A₂-5 (6. ábra), emellett a kisebb jelentőséggel bíró R_S-1 - R_S-4 vegyületek [38]. A természetben létező teikoplanin antibiotikum valójában ezen nagyon hasonló vegyületek keveréke [39]. Szer-

kezetét tekintve a teikoplanin négy kondenzált makrociklusos gyűrűből áll, így kialakítva a vegyületre oly jellemző félmerev kosárszerkezetet. Az A₂ elnevezésű variánsok esetén ehhez a szerkezethez kapcsolódik a három szénhidrát rész, nevezetesen egy *N*-acetyl-glükózamin és egy α -D-mannóz. A harmadik cukorcsoport az *N*-acetyl-glükózaminból származtatható, de a metilcsoport helyett hosszabb szénláncú alifás, főleg telített szubsztituensekkel rendelkezik.

Az *N*-acetylcsoporthoz fontos tulajdonságok rendelhetők:

- jelentős mértékben nő a molekula felületi aktivitása,
- elősegíti az antibiotikumnak a Gram-pozitív sejtfalú baktériumhoz való kötődését [40],
- az oldószer pH értékétől és polaritásától függően aggregálódhat a teikoplanin [41].



6. ábra Fontosabb teikoplanin módosulatok szerkezeti képletei

Kromatográfiás szelektorként a teikoplanin A-40,926-B₀ és B₁ is használatos. Az A-40,926 vegyületek csak két szénhidrát részt tartalmaznak, egy glükózamin hiányzik, ami befolyásolja a királis felismerést.

A teikoplanin A₂ ionos jellegéért egy karboxil- (pK~2,5), illetve primer aminocsoport (pK~9,2) a felelős. A fordított fázisú kromatográfiás mérések ideális pH tartományában pH=3,5-7,0 között a molekula ikerionos állapotban van.

3.3.1.2. Teikoplanin aglikon

A teikoplanin szelektorok a királis kromatográfia területén rendkívül sikeresnek bizonyultak főképpen az aminosav enantiomerek, valamint a di-, tri- és oligopeptidok elválasztásában. Rége óta ismert, hogy a királis szelektor szerkezetének kismértékű változása nagymértékű eltérést okozhat az enantioszelektivitásban.

A cukorrész elválasztásban betöltött szerepének tisztázásához a teikoplanin és a baktérium sejtfal közti kölcsönhatás már ismert mechanizmusát használták fel. A cukorrész lehetséges hozzájárulását a királis felismerési folyamathoz három pontban lehet összefoglalni:

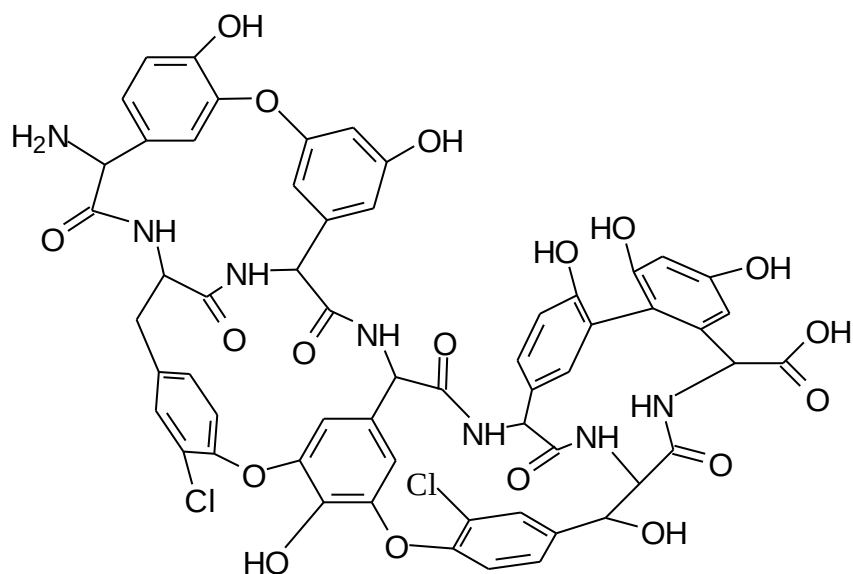
- sztérikusan gátolhatja a kosár belsejéhez való hozzájutást,
- megakadályozza a lehetséges kölcsönhatás kialakítását az aglikon két fenolos és egy alkoholos hidroxilcsoportjával, amelyeken keresztül a három cukorrész kapcsolódik a természetes teikoplanin esetén,
- a cukorrészen lévő alkoholos hidroxil-, éter- és amidcsoportok, valamint a nonillánc további kölcsönhatási lehetőséget biztosítanak a minta molekulákkal [42].

Ebből a felsorolásból kiderül, hogy a cukorrész nem minden esetben segíti a királis megkülönböztetést.

A teikoplanin aglikon szerkezetének kialakítását a cukorcsoportok eltávolításával, azok hidrolizisével érték el. A szénhidrát csoportok hiánya miatt az aglikon rendelkezik a legkisebb 1197 g/mol molekulatömeggel és az öt felépítő 130-as atomszámmal (**3. Táblázat**). Polaritása a szabaddá vált hidroxilcsoportoknak köszönhetően jelentősebb a teikoplanin vegyületeknél. Az aszimmetriacentrumok kisebb száma nem okoz hatékonyságcsökkenést az elválasztóképességben, az ilyen szelektorral ellátott királis kolonnák hatékonynak bizonyultak aminosavak, ciklusos és semleges vegyületek több csoportjánál is.

A kémiai módosítás eredményeként az aglikon polaritása megnövekedett, ezért a semleges vegyületek sztereoizomerjeinek elválasztása tiszta, szerves oldószert tartalmazó mozgófázisok esetén lehetséges, azaz különböző alkoholok és ACN elegyítésével, POM módban [42]. Savas karakterű vegyületek enantimerjeinek elválasztására a hidroxilcsoportok metilezésével próbálták

specifikusabbá tenni a teikoplanin aglikont [43].



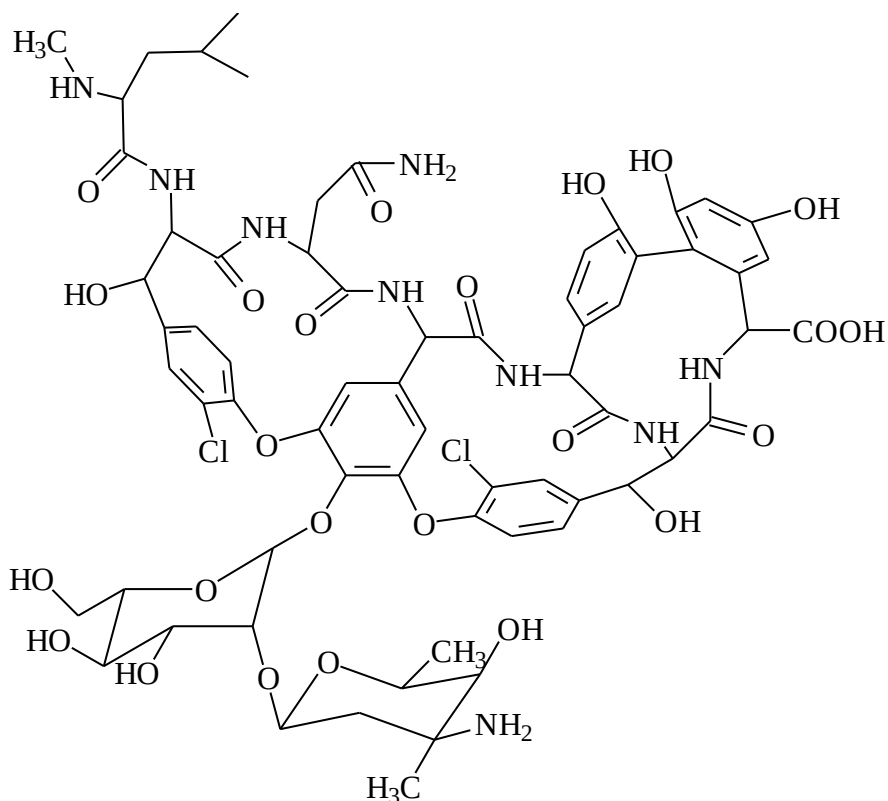
7. ábra A teikoplanin aglikon szerkezeti képlete

3.3.1.3. Risztocetin A

A makrociklusos glikopeptid antibiotikumok csoportjába tartozó risztocetint és a rokon vegyület risztomicint *Nocardia lurida* és *Proactinomyces fructiferi* baktérium törzsek termelik [44]. Mindkét vegyületnek két biológiailag aktív komponense létezik, az A és a B módosulat, melyek közül az előbbi az elterjedtebb.

A risztocetin A molekula a vankomicin családjába tartozik és a teikoplaninhoz hasonlóan Gram-pozitív sejtfalú baktériumok ellen mutat aktivitást, mégpedig úgy, hogy szelektíven kötődik a D-Ala-D-Ala szekvenciához és ezáltal gátolja a sejtfal szintézist. A klinikai alkalmazásból viszont kizorult, miután egy vizsgálat kimutatta, hogy azoknál a betegeknel, akik von Willebrand's betegségben szenvednek vérlemezke-aggregációt okozhat, viszont éppen ezért ennek a betegségnek a diagnosztikájára alkalmas [45, 46].

A vegyület 38 aszimmetria-centrumot, hét aromás gyűrűt és hat darab cukorcsoportot tartalmaz (**3. Táblázat**), melyek közül kettő D-mannóz, valamint tartalmaz még egy-egy D-glükózt, D-arabinozt, L-ramnozt és L-riztozaminot [47]. Az előző makrociklusos glikopeptidekhez hasonlóan itt is megtalálható az aglikon rész kosárszerkezete, amelyet négy makrociklus hoz létre [48]. A risztocetin A két darab szabad aminosóportot tartalmaz, melyből az egyik az L-riztozaminon található. Jelentős különbség, hogy szabad karboxilcsoport helyett metilésztercsoport található, ami a kationos jellegű vegyületekkel gyengébb kölcsönhatást eredményezhet.

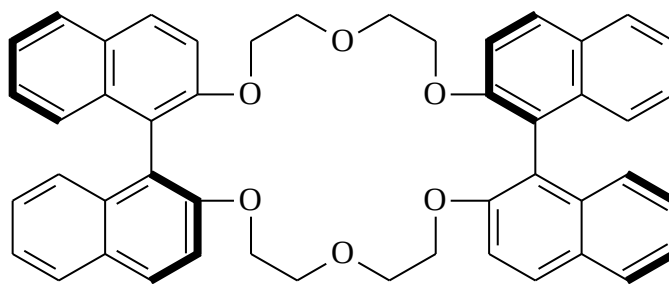


9. ábra A vankomicin szerkezeti képlete

A természetes vankomicin összesen tizennyolc aszimmetriacentrumot tartalmaz, található rajta kilenc hidroxilcsoport, egy primer- és egy szekunder amin, hét amidcsoport valamint két klór szubsztituens, amelyek aromás gyűrűhöz kapcsolódnak [35].

3.3.2. Koronaéterek

Cram és munkatársai négy évtizeddel ezelőtt számoltak be az első szintetikus királis makrociklus, az (S,S)-bisz(binaftil)-22-korona-6 éter előállításáról [51]. A „korona” jelző Pedersen nevéhez fűződik, az általa leírtak szerint a kationok reverzibilisen „megkoronázhatók”, ezek a vegyületek már ismeretesek voltak komplexképző tulajdonságaikról [52]. Néhány évvel később a Cram által előállított vegyület (R)-, illetve (S)-fenilglicin-metilészter hidrogén-hexafluorofoszfáttal képzett diasztereomer komplexeinek stabilitási viszonyait vizsgálták. Megállapították, hogy eltérő stabilitású komplexek képződtek, azaz a királis megkülönböztetés jelenségét igazolták ezen molekulák esetén [53].

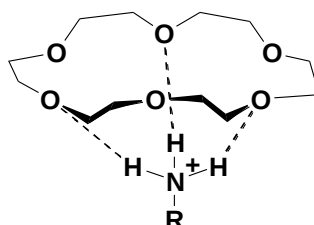


10. ábra (S,S)-bisz(binaftil)-22-korona-6 éter szerkezeti képlete

Az azóta eltelt években nagyszámú királis koronaétert állítottak elő és intenzíven tanulmányozták azok enantioszelektív komplexképzését protonált primer aminok enantiomerjeivel. A következő szerkezeti egységeket tartalmazó királis koronaéterek terén értek el figyelemre méltó eredményeket [54-58]:

- binaftil egységet tartalmazó koronaéterek,
- borkósavból és származékaiból levezethető koronaéterek,
- aminosavakból, aminokból és származékaiból levezethető koronaéterek,
- szénhidrát alapú koronaéterek,
- fenol származékokat tartalmazó koronaéterek,
- heterociklus egységet hordozó koronaéterek.

A felsorolt koronaéterek jelentős részét szilikagélhez kötve állófázisként alkalmazták folyadékkromatográfiás vizsgálatokban, különböző szerves primer és szekunder aminok enantiomerjeinek elválasztására [54-58]. A fenti vegyülettípusok esetén közös, hogy mindegyik tartalmaz primer (ill. szekunder) aminocsoportot. Feltételezés szerint az ammóniumion három hidrogén hiddal kötődik a nagy elektronsűrűségű poliéteres gyűrűben. A 18-korona-6 poliéter gyűrű üregmérete 260-320 pm tartományban van, melybe az ammóniumion 286 pm ionátmérőjével beleillik [59].



11. ábra A 18-korona-6 koronaéter szubsztituált ammóniumionnal képzett komplexe

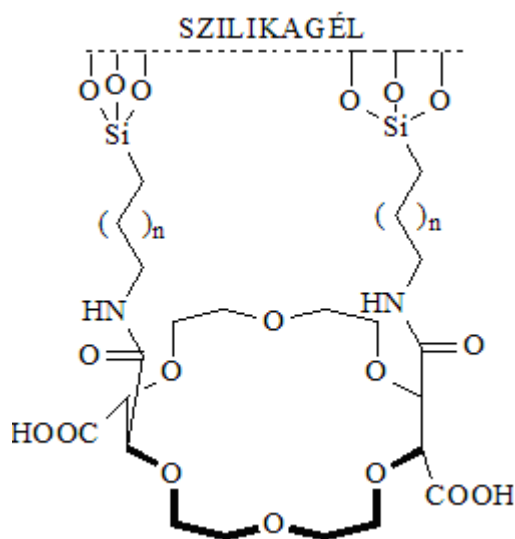
A hárompontos illeszkedési modellből kiindulva a koronaéter szelektorokról általánosan elmondható, hogy ez az akirális kölcsönhatás szükséges, de nem elégséges feltétele a királis megkülönböztetésnek [60]. Ezért a különféle funkciócsoportok jelenléte a szelektoron, illetve a „ka-

ron” („spacer”, a szelektort a szilikagéllel összekötő láncon) szükséges, hogy további kölcsönhatások alakuljanak ki az elválasztandó molekulával, meggátolva azok szabad rotációját és egyéb mozgásukat, így létrehozva a kvázi-diasztereomer komplexeket.

3.3.2.1. (+)-(18-Korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektor

Still és *mtsai*. [61] mutattak rá a makrociklusos szelektor flexibilitásának fontosságára a királis megkülönböztetésben. Ha a komplex szerkezete kellően rugalmas, akkor mind a két enantiomer találhat egy olyan konformációt, ami a sztérikus hatás eliminálásával a szelektivitás csökkenését, illetve megszűnését eredményezheti [62]. Elmondható, hogy a merev makrociklusos szerkezet, illetve a többpontos kötés kialakítása a diasztereomer komplex konformációját csökkenti, így segítve az elválasztást.

Ennek az elvárásnak és a királis szelektorokkal szemben általánosan támasztott egyéb követelménynek is jól megfelel a (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav molekula. Szelektorként való alkalmazása sikeresnek bizonyult kapilláris elektroforetikus elválasztásokban [63]. *Hyun* és *mtsai*, a figyelemre méltó eredmények alapján, a (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav dianhidridjét aminopropil-szilikagéllel kezelve királis állófázist állítottak elő, melyen racém primer és szekunder aminok egyaránt elválaszthatók voltak [55].

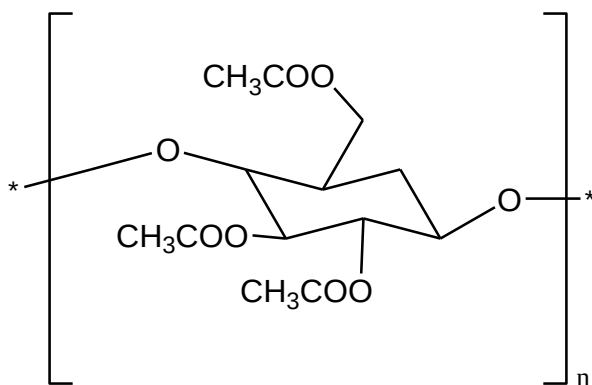


12. ábra A (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav állófázis

Ahogy a 12. ábra szemlélteti, a szelektort a szilikagélhez kötő kar hossza változtatható a kart felépítő szénlánc tagszámával. A hosszabb, összesen 11 szénatomból álló kar esetén a szelektor még inkább hidrofób jellegűvé válik, valamint megnő a mozgékonyasága is, mely hozzájárul az apoláris, alifás oldallánccal rendelkező aminosav enantiomerek királis felismeréséhez [54].

3.3.3. Módosított poliszacharidok

A poliszacharidok, mint például a cellulóz és az amilóz, az optikailag aktív biopolimerek közé tartoznak és jól meghatározható szerkezettel bírnak. Ezen előnyös tulajdonságaiknak köszönhetően jutottak szerephez a királis kromatográfiában. Az első ilyen alkalmazás Hesse és Hegel nevéhez fűződik, akik 1973-ban közzétették eredményeiket [64]. Munkájuk során mikrokristályos cellulóztriacetátot (13. ábra) használtak az úgynevezett *Tröger bázis* optikai izomerjeinek elválasztásához. Ez a szelektor egyéb irányt az egyik legtöbbet tanulmányozott vegyület és szerkezete még manapság is alapot nyújt a királis állófázisok tervezésében [65].



13. ábra A cellulóztriacetát polimer szerkezeti képlete

A királis vegyületek elválasztásában hatékony szacharid típusú molekulák több csoportba sorolhatók, úgymint kondroitin-szulfátok, dextránok, dextrinek, poliszacharidok és aminoglikozidok. Az itt felsorolt vegyületek többségét kapilláris elektroforetikus elválasztások során használják adalékként, de a dextrinekkel és a módosított poliszacharidokkal királis állófázisokként is találkozhatunk [66].

A poliszacharid vegyületek több képviselője is használatos KÁF-ként. Ezek a vegyületek: cellulóz, amilóz, kitozán, xilán, kurdlán, dextrán és inulin, melyek közül a legjobb eredményeket az amilózzal és cellulózzal érték el. Hatékonyságuk mellett elterjedésüket széleskörű alkalmazhatóságuk is elősegítette, ugyanis mind nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás, szub- és szuperkritikus folyadékkromatográfiás, kapilláris elektrochromatográfiás, vékonyréteg-kromatográfiás és kapilláris elektroforetikus rendszerekben is alkalmazást nyertek.

A cellulóz polimer β -D-glükóz alegységekből épül fel, melyek β -1,4 glikozidos kötással kapcsolódnak egymáshoz. Konformációjukat tekintve szék konformációjúak, a 2. és 3. szénatomon lévő OH-csoport, valamint az 5. szénatomon elhelyezkedő CH₂-OH szubsztituens is ekvatoriális pozícióban található. A cukoregységek ilyen szerkezeti felépítése eredményezi azt, hogy a cellulóz poliszacharid lineáris elrendeződésű. A természetben fellelhető poliszacharidok döntő többsége királis vegyület, köszönhetően aszimmetrikus szerkezetüknek. Ez az aszimmetria több

szinten is megnyilvánul (lásd: később). A polimert felépítő cukor egységek száma 200 és 14000 egység közé tehető. Ezt a tág intervallumot 200-300 egységre szűkíthetjük mikrokristályos cellulóz esetén [67, 68]. A cellulóznak több megjelenési formája is van, de szelektorként leggyakrabban a natív cellulózt használják, illetve ennek derivatizált változatait.

A cellulózhoz hasonlóan az amilózt is β -D-glükóz molekulák építik fel (500-20000 egység), viszont a cukorrészek α -1,4 kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Az amilóz is szék konformációjú, és itt is igaz, hogy a gyűrűs szerkezethez kapcsolódó csoportok ekvatoriális térállásúak. Az enantioszelektivitás növelésének érdekében, mindkét polimer esetén, a vegyületen található hidroxilcsoportokat észteresítik vagy karbamátcsoporttal módosítják.

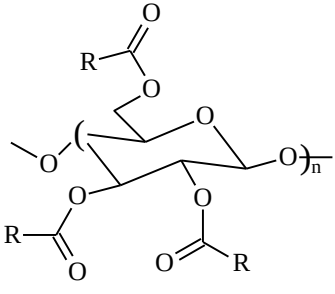
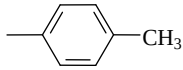
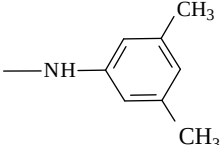
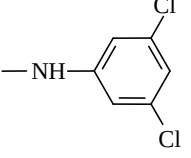
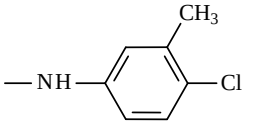
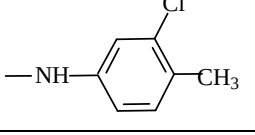
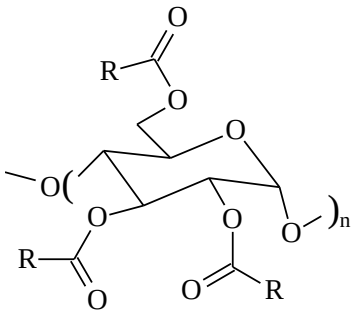
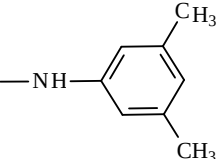
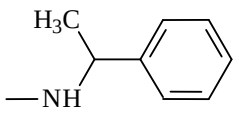
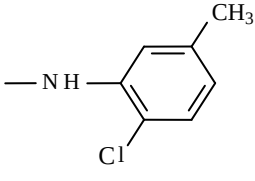
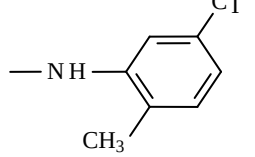
Az első királis elválasztás, részlegesen acetilezett cellulózzal, *Luttringham* és *Peters* nevéhez fűződik [69], míg cellulóz triacetátot a már említett *Hesse* és *Hegel* alkalmazta először [64]. *Okamoto* és munkatársai cellulóz tribenzoátot szintetizáltak, melyet alkil- és halogéncsoporttal módosítottak [70, 71]. A királis elválasztás mechanizmusa tekintetében a legtöbbet vizsgált poliszacharid módosulat a cellulóz trifenil-karbamát. Az enantioszelektivitás növelése érdekében az aromás gyűrűt különféle szubsztituensekkel módosították [72, 73]. Az amilóz alapú szelektorkok fejlődése a cellulóz szelektorkéval párhuzamosan haladt, de mindig kicsit megkésve [74, 75].

Napjainkban makropórusos szilikagélre felvitt poliszacharid származékokat használnak, amelynek jó a mechanikai stabilitása. A **4. Táblázatban** látható, hogy a glükóz egységek három OH-csoportját módosítva, különböző kölcsönhatásra alkalmas észter- és karbamátcsoportokat építettek be a molekulába. Az ilyen állófázisokat *Okamoto* munkássága alapján a Daicel (Tokió, Japán) cég tervezte és hozta először forgalomba, de az utóbbi években számos új cég jelentkezett hasonló típusú kolonnákkal. Ezek a fázisok a hordozó szilikagél minőségében, az amilóz és cellulóz lánc polimerizációs fokában, az állófázishoz való rögzítés módjában jelentősen különbözhetnek egymástól, ezért szelektivitásukban is jelentős különbségek mutatkoznak.

Ha a polimerek csak fizikailag kötöttek az állófázis felületén, akkor a hordozóról való lemosás lehetősége miatt nem alkalmazható minden oldószer. Tilos azon oldószerek használata, amelyek a polimert oldják vagy duzzasztják. A poláris polimert a hexán, heptán nem oldja, így mint kis elúciós erősségű alapoldószer a normál fázisú kromatográfiában használatos, a visszatartás optimalizálására alkalmazott alkoholok (EtOH, IPA, stb.) mellett.

Jelentős előrehaladást jelentett a kémiailag kötött poliszacharid fázisok bevezetése. A szilikagélhez való kémiai kötés lehetővé teszi a mozgófázisként szóba jöhető oldószerek minőségének kiterjesztését az úgynevezett nem-standard oldószerekre, mint például a diklórmétán, kloroform, tetrahidrofurán, dioxán, stb. Érdemes azt is megemlíteni, hogy ezek a fázisok fordított fázisú rendszerben is alkalmazhatók.

4. Táblázat Amilóz és cellulóz alapú kolonnák szerkezete

Polimer lánc	Szelektor szerkezete	Szelektor elnevezése	Kereskedelmi név
		cellulóz <i>trisz</i> -(4-metilbenzol)	a
		cellulóz <i>trisz</i> -(3,5-dimetilfenilkarbamát)	b
		cellulóz <i>trisz</i> -(3,5-diklorofenilkarbamát)	c
		cellulóz <i>trisz</i> -(4-kloro-3-metilfenilkarbamát)	d
		cellulóz <i>trisz</i> -(3-kloro-4-metilfenilkarbamát)	e
		amilóz <i>trisz</i> -(3,5-dimetilfenilkarbamát)	f
		amilóz <i>trisz</i> -(metilbenzilkarbamát)	g
		amilóz <i>trisz</i> -(2-kloro-5-metilfenilkarbamát)	h
		amilóz <i>trisz</i> -(5-kloro-2-metilfenilkarbamát)	i

a, Chiralcel OJ; **b**, Chiralcel OD, Kromasil CelluCoat, Lux Cellulose-1, RegisCell, Nucleocel Delta, Eurocel 01; **c**, Chiralpak IC; **d**, Chiralcel OZ; **e**, Lux Cellulose-2; **f**, Chiralpak AD, Kromasil AmyCoat, RegisPack, Nucleocel Alpha, Europak 01, Chiralpak IA., **g**, Chiralpak AS; **h**, Chiralpak AY; **i**, Lux Amylose-2; A Chiralcel és Chiralpak a Daicel (Chiral Technologies), a Kromasil az EKA Nobel, a RegisCell és RegisPack a Regis Technologies, a Lux a Phenomenex kereskedelmi neve.

A poliszacharid alapú királis állófázisok optikai szelektivitása három fő szerkezeti tulajdonságból adódik. Ezek egy hierarhikusan rendezett kiralitást mutatnak:

- molekuláris kiralitás, amely a glükózcsoportokon jelen lévő kiralitáscentrumoknak tulajdonítható,
- konformációs kiralitás, amely a szénhidrátlánc merev lineáris (cellulóz alapú), vagy helikális (amilóz alapú) szerkezetének tulajdonítható, és
- szupramolekuláris kiralitás, amely a szomszédos polimerláncok királis rendezettségéből adódik.

A poliszacharid állófázisok az elválasztandó izomerekkel elsősorban π - π , dipol-dipol és hidrogénhidás kölcsönhatásokat alakítanak ki. Mindemellett fontos szerepet játszhat a különböző kölcsönhatások kialakulásában az aromás oldalláncok szterikus hatása is.

A poláris H-kötés mélyen „elrejtett” a szénlánc mentén, a rideg, nagy terjedelmű felületen elhelyezkedő aromás szubsztituensek jelentősen gátolják a kötési oldal hozzáférhetőségét.

A π - π kölcsönhatás számos királis állófázisnál játszik döntő szerepet. Ha az aromás részen elektronküldő, vagy elektron hiányos csoport van szubsztituensként, akkor a két aromás gyűrű között kölcsönhatás alakulhat ki. Az állófázist, amelynél elektronhiány van, nevezhetjük az általános sav-bázis elmélet értelmében Lewis savnak, amelynél az elektronsűrűség megnövekszik Lewis bázisnak. A vizsgálandó vegyületeknél általában az aromás gyűrű vagy elektronhiányos vagy elektron többlete van, ez az alapja, hogy egy elektronhiányos aromás rész és egy elektron többlettel rendelkező enantiomer között $\pi_{\text{sav}}-\pi_{\text{bázis}}$ kölcsönhatás alakul ki.

A karbamát és észter funkcióscsoportok stabilizálják a molekula-szelektor komplexet, illetve maximalizálják a π - π kölcsönhatást az aromás rész flexibilis konformációja által. A poliszacharid állófázisoknak ezt az általános kötésmechanizmusát alapvetően IR és NMR mérések támasztották alá [76].

3.4. Termodinamika és kromatográfia

3.4.1. Termodinamikai alapfogalmak

Az állandó nyomáson bekövetkező hőcsere a rendszer egy termodinamikai sajátosságával, az entalpiával (H) egyezik meg.

$$H = U + pV \quad (1)$$

ahol: U = rendszer belső energiája,
 p = nyomás,
 V = térfogat.

Standardentalpia-változásnak (ΔH°) nevezzük egy olyan folyamat entalpiaváltozását, amelyben a kiindulási anyagok és végtermékek egyaránt standarállapotban vannak.

Az entrópia a rendszer rendezetlenségi fokának mértéke, mely entrópia a spontán lejátszódó folyamatok során növekszik, ha a rendszer izolált. Statisztikus definíciója:

$$S = k \ln W \quad (2)$$

ahol: k = Boltzmann állandó,
 W = azon módozatok száma, melyben a rendszer energiája megvalósulhat.

Termodinamikai definíciója:

$$\Delta S = \frac{q'}{T'} \quad (3)$$

ahol: q' = a rendszerrel közölt hő,
 T' = az a hőmérséklet, amelyen a hőátmenet végbemegy.

A standard reakcióentrópia (ΔS°) a tiszta, különálló termékek és a kiindulási anyagok entrópiái közötti különbség, miközben valamennyi anyag standarállapotban van a megadott hőmérsékleten.

Helmholtz-függvény:

$$A = U - TS \quad (4)$$

ahol: A = szabadenergia,
 U = belső energia,
 T = abszolút hőmérséklet,
 S = entrópia.

Gibbs-függvény:

$$G = H - TS \quad (5)$$

ahol: G = szabadentalpia,
 H = entalpia,
 T = abszolút hőmérséklet,
 S = entrópia.

3.4.2. A van't Hoff egyenlet és alkalmazása a kromatográfiában

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

Egy $A \leftrightarrow B$ kémiai egyensúlyi folyamat szabadentalpia változása:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln Q \quad (6)$$

ahol: ΔG° = standard szabadentalpia változás,

R = egyetemes gázállandó,

T = abszolút hőmérséklet,

$$Q = \frac{n_B}{n_A} = \text{reakcióhányados} \quad (n_B = \text{állófázissal kölcsönhatásban lévő anyag-}$$

menyiség, n_A = mozgófázisban lévő anyagmenyiség).

Egyensúly esetén nincs szabadentalpia változás, Q pedig egyenlő az egyensúlyi állandóval:

$$RT \ln K = -\Delta G^\circ \quad (7)$$

$$\ln K = -\frac{\Delta G^\circ}{RT} \quad (8)$$

$$\ln K \text{ hőmérsékletfüggése: } \frac{d \ln K}{dT} = \frac{1}{R} \frac{d}{dT} \left(\frac{\Delta G^\circ}{T} \right) \quad (9)$$

$$A \frac{d}{dT} \left(\frac{\Delta G^\circ}{T} \right) = -\frac{\Delta H^\circ}{T^2} \text{ Gibbs-Helmoltz egyenletet behelyettesítve jutunk} \quad (10)$$

a van't Hoff egyenlethez:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} \quad (11)$$

Egyszerűsítve és átrendezve kapunk egy célszerűbben használható egyenletet:

$$\frac{d \ln K}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \quad (12)$$

Ha $\ln K$ -t $1/T$ függvényében ábrázoljuk, a kapott egyenes meredeksége $\Delta H^\circ/R$ lesz, innen ΔH° számítható.

A klasszikus termodinamika leírja a szabadentalpia-változást, amikor is az adott komponens, az egyensúlyi állandó által (ez a kromatográfiás elválasztásoknál a megoszlási hányados) meghatározott mértékben az egyik fázisból a másikba megy át, melyet a (9)-es számú egyenlet ír le pontosan.

A Gibbs-függvény segítségével a standard szabadentalpiát meghatározhatjuk a következő egyenlet segítségével.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (13)$$

ahol: ΔH° = standard entalpiaváltozás,

ΔS° = standard entrópiaváltozás.

A (9) és (13) egyenletek összevonásával jutunk a következő azonossághoz:

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

(Ezt az egyenletet a hőmérséklet szerint differenciálva, az előző fejezetben levezetett differenciális alakhoz jutunk).

A retenciós faktor (k') egyenlő az egyensúlyi állandó (K) és a fázisarány (β) reciprokanak szorzatával.

$$k' = K \frac{V_s}{V_m} \quad (15)$$

A fázisarány:

$$\beta = \frac{V_m}{V_s} = \frac{1}{\Phi} \quad (16)$$

ahol: V_m = mozgófázis térfogata,

V_s = állófázis térfogata.

A kromatográfiában használt van't Hoff egyenletet megkaphatjuk, ha a (14) egyenletet behelyettesítjük a (7) egyenletbe.

$$\ln k' = - \frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \Phi \quad (17)$$

Ezen egyenlet szerint $\ln k'$ -t $1/T$ függvényében ábrázolva egyenest kapunk, melynek a meredeksége $-\Delta H^\circ$, tengelymetszete, pedig $\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$ (ha nem ismert az $\ln \Phi$ értéke, akkor a tengelymetszet R -rel szorzott értékét ΔS^* -gal jelölik a kromatográfiában) [77].

Fontos következtetések vonhatóak le a két enantiomer szabadentalpia változásának különbségéből:

$$\Delta G^\circ_2 - \Delta G^\circ_1 = \Delta \Delta G^\circ \quad (18)$$

A (15) egyenlet felhasználásával:

$$- \Delta \Delta G^\circ = RT \ln(k_2'/k_1') \quad (19)$$

Illetve a szelektivitással kifejezve a fenti összefüggést:

$$- \Delta \Delta G^\circ = RT \ln \alpha \quad (20)$$

A fentiekben már megismert van't Hoff egyenlet (12) felhasználásával $\ln \alpha$ az egyszerűsítések után kifejezhető a következő egyenlettel:

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (21)$$

Az egyenlet szerint $\ln \alpha$ -t $1/T$ függvényében ábrázolva egyenest kapunk, melynek meredeksége $-\Delta H^\circ/R$, tengelymetszete, pedig $\Delta S^\circ/R$ [77, 78].

3.5. Vizsgált vegyületek jelentősége

3.5.1. β -Aminosavak

A β -aminosavak az α -aminosavakhoz képest ugyan kisebb jelentőségűek, de különleges élettani hatásuknak köszönhetően a β -aminosavak kutatása az utóbbi tizenöt évben fellendült. Rendkívül sok biológiailag aktív vegyület építőköve, úgymint gyógyszerhatóanyagok, peptidek, peptidomimetikumok. Igazolt idegrendszeri aktivitással, receptor antagonistá és antitumor hatással rendelkeznek.

Hashimoto és Konishi, valamint munkatársai voltak azok, akik először, egymástól függetlenül izolálták a *Bacillus cereus*, illetve *Streptomyces setonii* fajok sejtplazmájából a gombaellenes tulajdonsággal rendelkező β -aminosavat, a ciszpentacint. Terápiás hatékonyságát is bizonyították egereken végzett kísérletek segítségével a halálos kimenetelű *Candida albicans* fertőzéssel szemben [79, 80].

Némely β -aminosav metil észterei nagy affinitást mutatnak a dopamin átvivő molekulákhoz, ezzel nagymértékben befolyásolva a dopaminerg neuronok szignáltranszdukcióját [81].

Az aliciklusos β -aminosavak kiindulási anyagai heterociklusos gyógyszerhatóanyagoknak, peptidkémiai jelentőségük, hogy konformációsán gátolt β -aminosavak beépítésével merevebb szerkezetű peptidek hozhatók létre, lehetővé téve receptorokhoz való kötődésük tanulmányozását [82].

Természetesen a biológiai aktivitásuk felismerése magára vonta a szintetikus és analitikus kémikusok figyelmét.

3.5.2. γ -Aminosavak

A γ -aminosavak, hasonlóan a β -aminosavakhoz, fontos szerepet játszanak fehérjék, gyógyszerhatóanyagok, szintetikus vegyületek felépítésében, ezen kívül számos biológiailag aktív vegyület fontos komponensei is egyben.

A legismertebb és talán a legfontosabb képviselőjük a γ -amino-vajsav, ismertebb nevén a GABA, mely egy gátló hatású neurotranszmitter számos különböző emlős fajban. A humán központi idegrendszerben és a retinában ez az egyik fő gátló neurotranszmitter. Emellett a GABA a normális izomtónus kialakításáért is felelős [83, 84].

A másíkfontos képviselője ezen vegyületcsaládnak a vigabatrín. Ez a vegyület a GABA egy szerkezeti analógja, melyet az epilepsziás betegség kezelésére használnak [85].

3.5.3. β -Laktámok

A β -laktámok fontos kémiai (β -aminosav szintézis) és élettani (antibakteriális) tulajdonságuknak köszönhetően számos kutatás alapját képezik. A β -laktám antibiotikumok hatócsopórtja a β -laktám gyűrű, az ehhez kapcsolódó oldalláncok (gyűrűk) határozzák meg a származék antibakteriális jellegét, farmakokinetikáját és a vegyület stabilitását a baktériumok által termelt β -laktamáz enzimekkel szemben.

Hatásmechanizmusok során a β -laktám szerkezetű antibiotikumok a bakteriális sejtfal peptidoglikán vázának felépítésében szerepet játszó penicillinkötő fehérjéhez kapcsolódnak, és gátolják annak működését. Baktericid hatásúak, egyaránt hatnak Gram-pozitív és -negatív baktériumokra, az intracelluláris kórokozókkal szemben azonban hatástalanok, mivel nem jutnak be az állati/emberi sejtekbe. Bakteriális rezisztencia gyakran figyelhető meg: a baktérium termelhet β -laktamáz enzimet, amely lebontja a gyógyszert; megváltozhat a penicillinkötő fehérje szerkezete, s így az antibiotikum nem tud hozzá kötődni; valamint megváltozhat a sejtfal szerkezete, s így a β -laktám nem tud rajta áthatolni [86]. Biológiai aktivitásuk jelentősen függ sztereokémiai tulajdonságuktól, így királis azonosításuk, illetve elválasztásuk nagy jelentőséggel bír.

3.5.4. Aminonaftolok

A múlt század elején írta le *Betti* az 1-(α -aminobenzil)-2-naftol szintézisét, amelyet benzaldehidből, 2-naftolból és ammóniából állított elő [87], és azóta az ilyen típusú vegyületeket *Betti*-bázisként említik.

A királis aminonaftolok jelentőségét az adja, hogy sztereospecifikus reakciókban hatékony katalizátorok. *Cardellicchio* és munkatársai [88] királis ligandumként alkalmazták, dietil-cink és aldehid enantioszelektív addíciós reakcióiban. *Wang* és munkatársai [89] aminofoszfinokat vizsgáltak Pd-katalizált, 1,3-difenil-prop-2-én-1-acetil és dimetil-malonát szubsztitúciós reakciójában. A kapott termék mindkét esetben 99%-ban tartalmazta az egyik enantiomert.

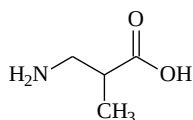
Az aminonaftolok biológiai szerepe antibakteriális aktivitásukban rejlik. *Desai* és munkatársai [90] *in vitro* antituberkulózis hatását észlelték *Escherichia coli* és *Staphylococcus aureus* ellenében. Emellett a Betti-bázis, az amino- és fenolos hidroxilcsoport tartalma miatt sok vegyület szintézisében játszik kiemelt szerepet.

4. Kísérleti rész

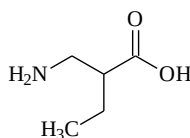
4.1. A vizsgált anyagok

A vizsgált vegyületek a legtöbb esetben szintetikus anyagok voltak, melyek partnereink laboratóriumaiban készültek. Előállításukra a dolgozatban nem térek ki a leírások terjedelme miatt, a leírások rövidített változata eredeti közleményeinkben megtalálható. A vizsgált vegyületek nagy számára való tekintettel a könnyebb átláthatóság érdekében hat csoportra osztottuk azokat.

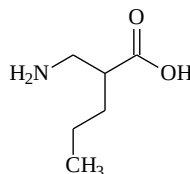
β -2-aminosavak:



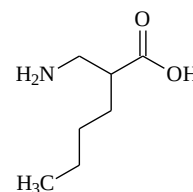
[1] β -2-1



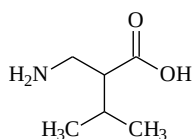
[2] β -2-2



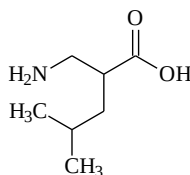
[3] β -2-3



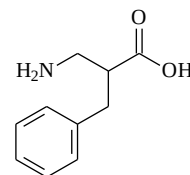
[4] β -2-4



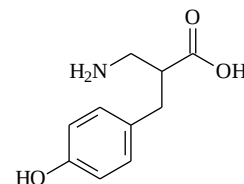
[5] β -2-5



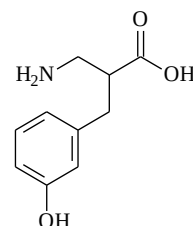
[6] β -2-6



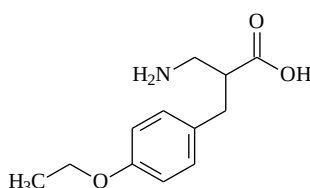
[7] β -2-7



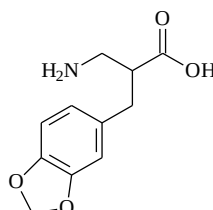
[8] β -2-8



[9] β -2-9



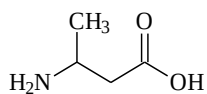
[10] β -2-10



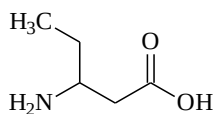
[11] β -2-11

[1] 3-amino-2-metilpropánsav; **[2]** 2-(aminometil)butánsav; **[3]** 2-(aminometil)pentánsav; **[4]** 2-aminometilhexánsav; **[5]** 2-(aminometil)-3-metilbutánsav; **[6]** 2-(aminometil)-4-metilpentánsav; **[7]** 2-(aminometil)-3-fenilpropánsav; **[8]** 2-(aminometil)-3-(4-hidroxifenil)propánsav; **[9]** 2-(aminometil)-3-(3-hidroxifenil)propánsav; **[10]** 2-(aminometil)-3-(4-etoxifenil)propánsav; **[11]** 2-aminometil-benzo(1,3)dioxolán-5-íl propánsav

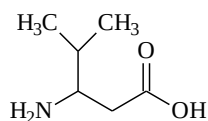
β -3-aminosavak:



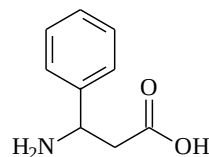
[12] β -3-1



[13] β -3-2



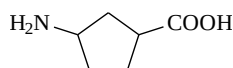
[14] β -3-5



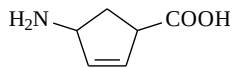
[15] β -3-7

[12] 3-amino-butánsav; **[13]** 3-amino-pentánsav; **[14]** 3-amino-4-metil-pentánsav; **[15]** 3-amino-3-fenil-propánsav

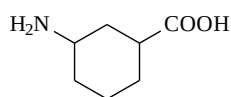
γ -aminosavak:



[16] γ -1



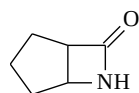
[17] γ -2



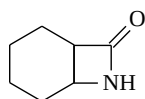
[18] γ -3

[16] 3-aminociklopentán-1-karbonsav; **[17]** 4-aminociklopent-2-én-1-karbonsav; **[18]** 3-aminociklohexán-1-karbonsav

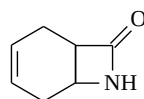
β -laktámok:



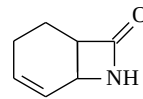
[19] β -L-1



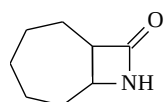
[20] β -L-2



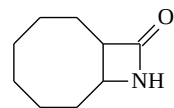
[21] β -L-3



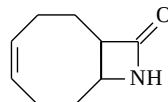
[22] β -L-4



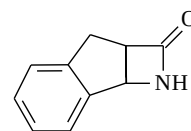
[23] β -L-5



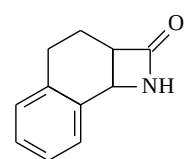
[24] β -L-6



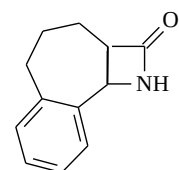
[25] β -L-7



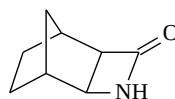
[26] β -L-8



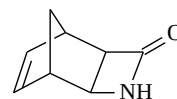
[27] β -L-9



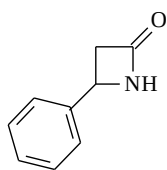
[28] β -L-10



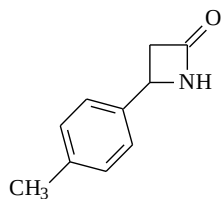
[29] β -L-11



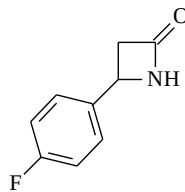
[30] β -L-12



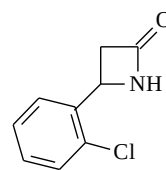
[31] β -L-13



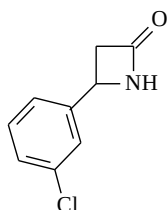
[32] β -L-14



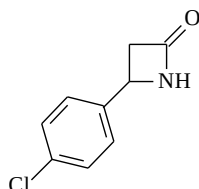
[33] β -L-15



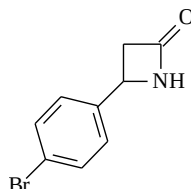
[34] β -L-16



[35] β -L-17



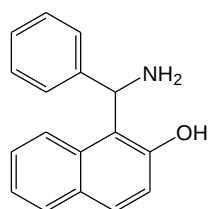
[36] β -L-18



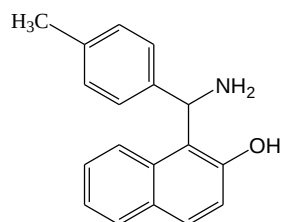
[37] β -L-19

[19] *cisz*-6-azabicyklo[3.2.0]heptán-7-on; [20] *cisz*-7-azabicyklo[4.2.0]oktán-8-on; [21] *cisz*-7-azabicyklo[4.2.0]okt-3-én-8-on; [22] *cisz*-7-azabicyklo[4.2.0]okt-4-én-8-on; [23] *cisz*-8-azabicyklo[5.2.0]nonán-9-on; [24] *cisz*-9-azabicyklo[6.2.0]dekán-10-on; [25] *cis*-9-azabicyklo[6.2.0]-dek-4-én-10-on; [26] *cisz*-3,4-benzo-6-azabicyklo[3.2.0]heptán-7-on; [27] *cisz*-4,5-benzo-7-azabicyklo[4.2.0]oktán-8-on; [28] *cisz*-5,6-benzo-8-azabicyklo[5.2.0]nonán-9-on; [29] *exo*-3-azatriciklo[4.2.1.0^{2,5}]nonán-4-on; [30] *exo*-3-azatriciklo[4.2.1.0^{2,5}]non-7-én-4-on; [31] 4-fenil-2-azetidinon; [32] 4-(*p*-tolil)-2-azetidinon; [33] 4-(*p*-fluorfenil)-2-azetidinon [34] 4-(*o*-klórfenil)-2-azetidinon; [35] 4-(*m*-klórfenil)-2-azetidinon; [36] 4-(*p*-klórfenil)-2-azetidinon; [37] 4-(*p*-brómfenil)-2-azetidinon

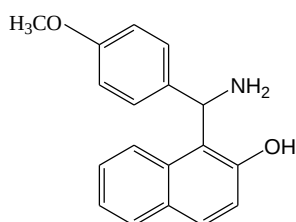
Betti-bázisok:



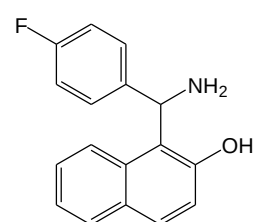
[38] B-1A



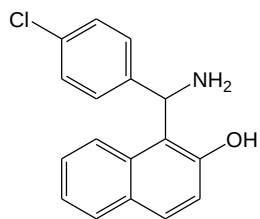
[39] B-1B



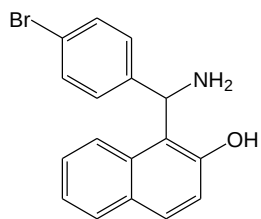
[40] B-1C



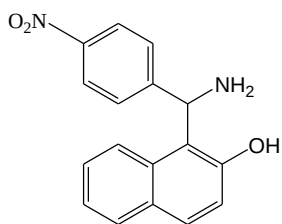
[41] B-1D



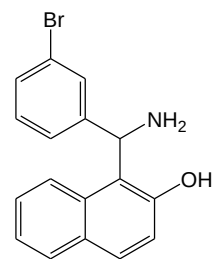
[42] B-1E



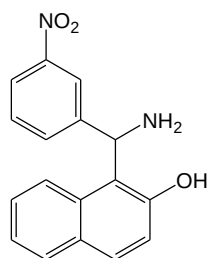
[43] B-1F



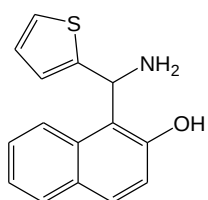
[44] B-1G



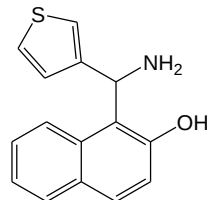
[45] B-1H



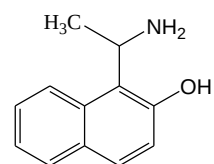
[46] B-1I



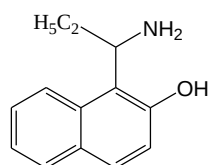
[47] B-1J



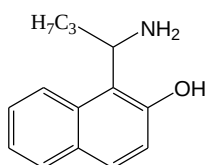
[48] B-1K



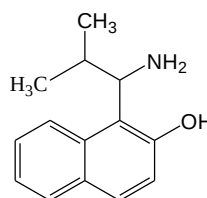
[49] B-1L



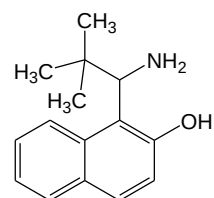
[50] B-1M



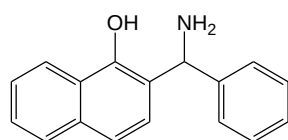
[51] B-1N



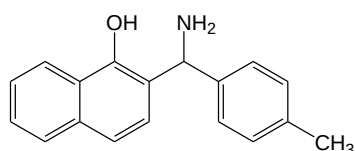
[52] B-1O



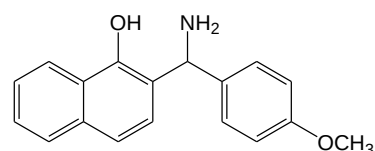
[53] B-1P



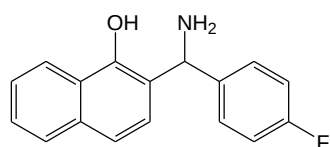
[54] B-2A



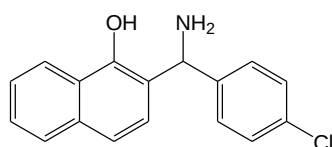
[55] B-2B



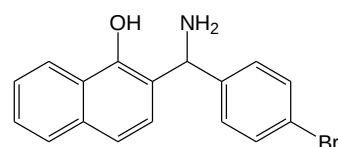
[56] B-2C



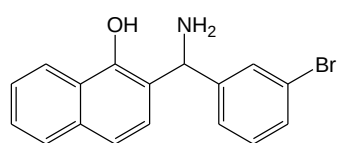
[57] B-2D



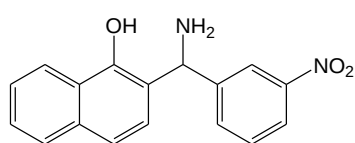
[58] B-2E



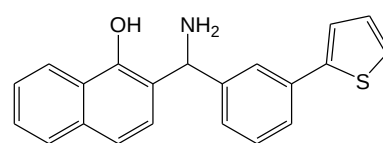
[59] B-2F



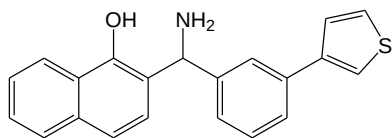
[60] B-2H



[61] B-2I



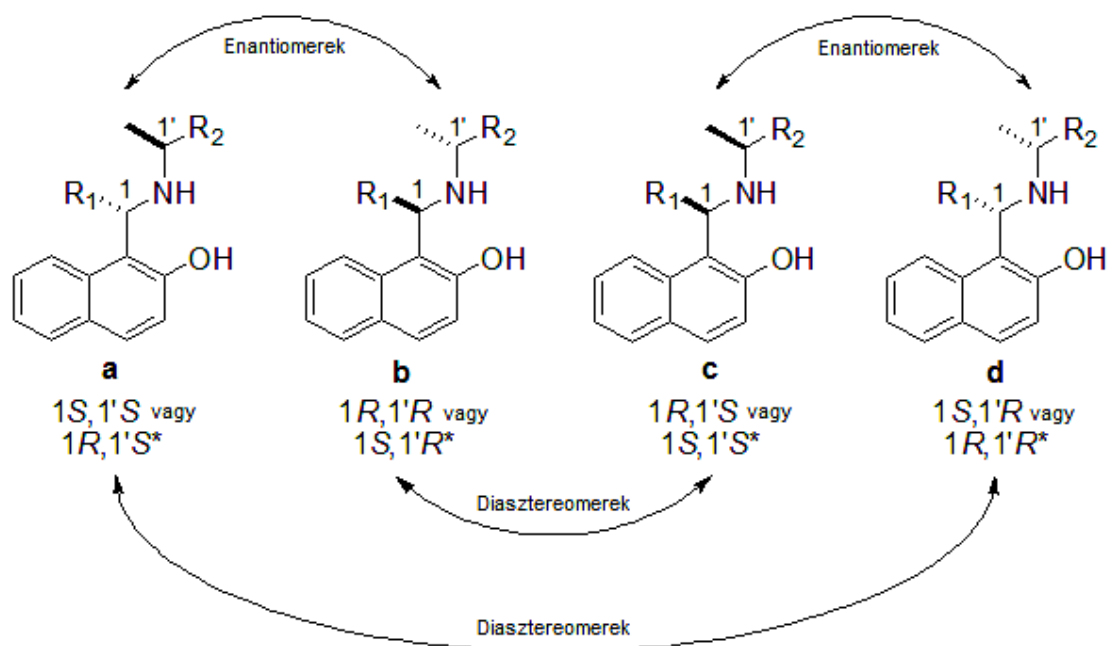
[62] B-2J



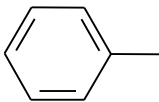
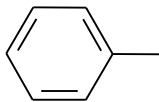
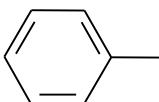
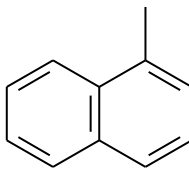
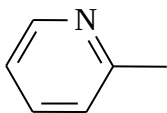
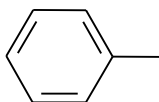
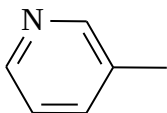
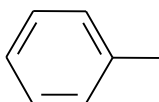
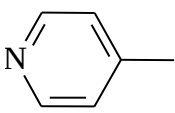
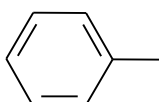
[63] B-2K

[38] 1-(1-fenil-aminometil)-2-naftol; [39] 1-[amino(4-metilfenil)metil]-2-naftol; [40] 1-[amino(4-metoxifenil)metil]-2-naftol; [41] 1-[amino(4-fluorfenil)metil]-2-naftol; [42] 1-[amino(4-klórfenil)metil]-2-naftol; [43] 1-[amino(4-brómfenil)metil]-2-naftol; [44] 1-[amino(4-nitrofenil)metil]-2-naftol; [45] 1-[amino(3-brómfenil)metil]-2-naftol; [46] 1-[amino(3-nitrofenil)metil]-2-naftol; [47] 1-[amino(2-tienil)metil]-2-naftol; [48] 1-[amino(3-tienil)metil]-2-naftol; [49] 1-(1-aminoetil)-2-naftol; [50] 1-(1-aminopropil)-2-naftol; [51] 1-(1-aminobutil)-2-naftol; [52] 1-(1-amino-2-metilpropil)-2-naftol; [53] 1-(1-amino-2,2-dimetilpropil)-2-naftol; [54] 2-(α -aminobenzil)-1-naftol; [55] 2-[amino(4-metilfenil)metil]-1-naftol; [56] 2-[amino(4-metoxifenil)metil]-1-naftol; [57] 2-[amino(4-fluorfenil)metil]-1-naftol; [58] 2-[amino(4-klórfenil)metil]-1-naftol; [59] 2-[amino(4-brómfenil)metil]-1-naftol; [60] 2-[amino(3-brómfenil)metil]-1-naftol; [61] 2-[amino(3-nitrofenil)metil]-1-naftol; [62] 2-[amino(2-tienil)metil]-1-naftol; [63] 2-[amino(3-tienil)metil]-1-naftol

Aminonaftolok:



* Változó konfiguráció a Cahn-Ingold-Prelog konvenció értelmében

Anyag	R ₁	R ₂
[64] A-1a-d		
[65] A-2a-d		
[66] A-3a-d*		
[67] A-4a-d		
[68] A-5a-d		

[64] 1-{N-(1-fenilmetil)[1-fenil(aminometil)]}-naftalin-2-ol; **[65]** 1-{N-(1-naftilmetil)[1-fenil(aminometil)]}-naftalin-2-ol; **[66]** 1-{N-(1-piridin-2-ilmetil)[1-fenil(aminometil)]}-naftalin-2-ol; **[67]** 1-{N-(1-piridin-3-ilmetil)[1-fenil(aminometil)]}-naftalin-2-ol; **[68]** 1-{N-(1-piridin-4-ilmetil)[1-fenil(aminometil)]}-naftalin-2-ol

4.2. A felhasznált vegyszerek

Az alkalmazott HPLC tisztaságú oldószerek, metanol (MeOH), etanol (EtOH), propanol (PrOH), propán-2-ol (IPA), butanol (BuOH), 2-metil-propán-2-ol (*t*-BuOH), acetonitril (ACN) Merck (Darmstadt, Németország), a HPLC tisztaságú ecetsav (AcOH) Scharlau Chemie S. A., (Barcelona, Spanyolország) gyártmányúak voltak.

Az analitikai tisztaságú perklórsav (HClO₄), trifluorecetsav (CF₃COOH, TFA), foszforsav (H₃PO₄), kénsav (H₂SO₄), sósav (HCl), trietil-amin (TEA) és NaOH Merck gyártmányú volt.

A puffereket Milli Q vízzel készítettük és 0,45 µm-es szűrőn szűrtük (Millipore, Molsheim, Franciaország).

4.3. Alkalmazott berendezések

Méréseink során két különböző HPLC rendszert alkalmaztunk

I. rendszer:

- Waters 1525 bináris HPLC pumpa, Waters pumpához integrált kolonna termosztát, Waters 2487 kétcsatornás UV-VIS detektor, Waters „Breeze data manager” adatfeldolgozó rendszer (Waters, Milford, MA, USA)
- Rheodyne 7125 20 µl-es mintaadagoló (Cotati, CA, USA)
- MK 70 termosztát (Mechanik Prüfgerate Medlingen, Németország)

II. rendszer:

- Waters M-600 gradiens HPLC pumpa, Waters M-2996 fotódiódasoros detektor, Waters „Millenium 32 Chromatography Manager” adatfeldolgozó rendszer (Waters, Milford, MA, USA)
- Spark Mistral kolonna termosztát (Spark Holland, Emmen, Netherlands)
- Rheodyne 7125 20 µl-es mintaadagoló (Cotati, CA, USA)

Kiegészítők:

- Rotring Sonic Cleaner ultrahangos gáztalanító (Rotring GmbH, Hamburg, Germany)
- Thermo Orion 420 pH mérő (Orion, USA)

4.4. Alkalmazott kolonnák

Makrociklusos glikopeptid alapú oszlopok: Chirobiotic™ T és Chirobiotic™ T₂, királis szelektora teikoplanin, Chirobiotic™ TAG királis szelektora teikoplanin aglikon, Chirobiotic™ R, királis szelektora risztocetin A. A Chirobiotic T₂ abban különbözik a Chirobiotic T oszloptól, hogy a „kar” („spacer”) mintegy kétszerese a Chirobiotic T-n lévőnek, valamint, hogy a hordozóként alkalmazott szilikagél a Chirobiotic T esetén 120 Å pórusátmérőjű, míg a Chirobiotic T₂ esetén a pórusátmérő 200 Å. Az oszlopok méretei és gyártói megegyeznek, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm szemcseátmérő (Astec, Whippany, NJ, USA).

Koronaéter alapú királis oszlopok: (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav királis szelektort tartalmazó oszlopot használtunk. Az oszlop mérete és gyártója: 150 mm × 4,0 mm, 5 µm szemcseátmérő (Myung Ho Hyun, Pusan National University, Busan, Dél-Korea).

Módosított poliszacharid alapú oszlopok: Kromasil CelluCoat™ és Chiralcel OD-H királis szelektora egyaránt cellulóz-*trisz*-3,5-dimetilfenil karbamát, míg a Kromasil AmyCoat™ szelektora amilóz-*trisz*-3,5-dimetilfenil karbamát. A Kromasil oszlopok gyártója az Eka Chemicals AB (Bohus, Svédország), míg a Chiralcel oszlopé Daicel (Tokió, Japán). Az itt felsorolt oszlopokra egyaránt jellemző fizikai paraméterek: 150 mm × 4,6 mm, 5 µm szemcseátmérő.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Nem természetes β - és γ - aminosav enantiomerek elválasztása makrociklusos glikopeptid alapú királis állófázisokon

A királis elválasztásokhoz alkalmazott makrociklusos antibiotikum alapú (teikoplanin, risztocetin A) királis állófázison az elválasztás alapja a molekula azon sajátja, hogy miként tud illeszkedni a királis szelektor kosarába. Ezt a folyamatot nagyban befolyásolja az általunk gyakran alkalmazott két szelektor, a teikoplanin és a teikoplanin aglikon között fennálló lényeges különbség, nevezetesen a szénhidrátcsoporthoz tartozó, illetve azok hiánya (6. és 7. ábra). Fontos eltérés még, hogy a teikoplaninon lévő glükózamin tartalmaz egy *N*-acilezett C_9 szénhidrogén láncot, mely még inkább hidrofób jelleget kölcsönöz a szelektornak. Mind a teikoplanin, mind pedig a teikoplanin aglikon szerkezetére jellemző egy primer amino-, valamint egy karboxilcsoport jelenléte, így az alkalmazott pH tartományban (pH 3,0-7,5) az aminosavakra jellemzően ikerionos szerkezet alakul ki (a risztocetin A molekulán a karboxilcsoport metilészter formában van). Összességében várható, hogy az enantiomerek elválasztása különböző kölcsönhatásokon keresztül valósulhat meg, nevezetesen: a hidrofób zsebbe való illeszkedés, poláris (π - π) kölcsönhatás, dipol-dipol kölcsönhatás, hidrogénkötés, elektrosztatikus kölcsönhatás, gyenge másodlagos Van der Waals kötések, szterikus gátlás és ezek kombinációja.

A vizsgált anyagok két csoportba oszthatók: β - és γ -aminosavak, mely elnevezés a funkcionális csoportok egymáshoz viszonyított elhelyezkedésére utal. A β -aminosavak csoportján belül megkülönböztetünk β -2- és β -3-aminosavakat. A β -2-aminosavak annyiban különböznek a β -3-aminosavaktól, hogy az előző vegyületcsoport esetén a karboxilcsoportot tartalmazó szénatomon található a molekula aszimmetriacentruma, míg az utóbbinál ez az aminocsoportot tartalmazó szénatomra igaz. A β -aminosavak alifás és aromás oldallánccal rendelkeztek, míg a γ -aminosavak ciklusos szerkezetűek voltak.

5.1.1. Eluensösszetétel-változás hatása az elválasztásra

Az aminosav enantiomerek elválasztásához fordított fázisú rendszert alkalmaztunk, mely mozgófázisként 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH (v/v) különböző arányú elegyét tartalmazta. Modell vegyületként különböző helyzetekben lévő alifás, elágazó alifás és aromás oldalláncot, valamint egy oxocsoportot tartalmazó β -aminosavat választva (β -2-1, β -3-1, β -2-5, β -3-5, β -2-7, β -3-7 és a β -2-11) tanulmányoztuk az eluens MeOH tartalmának hatását a kromatográfiás viselke-

désre Chirobiotic T, T₂ és TAG kolonnákon. A γ -aminosav mintáknál a Chirobiotic R kolonnán végeztük a méréseket. Hat különböző eluens összetételt alkalmaztunk minden vegyületcsalád esetében, TEAA (pH=4,1)/MeOH = 10/90 és 90/10 (v/v) összetétel tartományban.

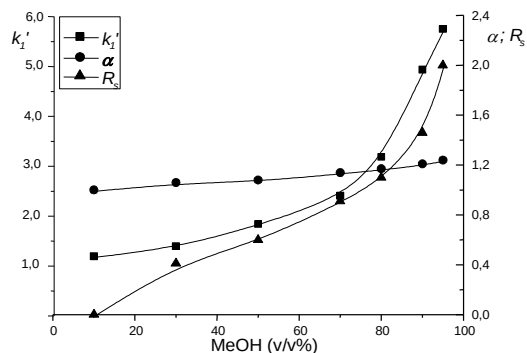
Az alkil oldallánccal rendelkező β -2-1 és β -3-1 aminosav esetén a MeOH térfogatarányának növekedésével párhuzamosan nagymértékben növekedett a retenciós faktor (14. ábra). Ennek magyarázata vélhetően a szolvatációs viszonyokban rejlik, melyet újabban HILIC (hydrophilic interaction) hatásként emleget az irodalom [91]. A poláris jellegű, vízben jól oldódó aminosavak a szerves fázis (MeOH) térfogatarányának növelésével kisebb mértékben szolvatáltak, ezáltal jobban kötődnek az állófázishoz, növelve ezzel a visszatartást. Másként megfogalmazva, az apolárisabbá váló eluens egyre nagyobb teret enged a hidrofil-hidrofil kölcsönhatások kibontakozásának, megnövelve ezzel a molekula állófázison való tartózkodásának idejét (HILIC hatás) [92]. Ez a viselkedés mindhárom kolonnán megfigyelhető volt. Hasonló jelenségeket tapasztaltunk az elágazó és alifás oldallánccal rendelkező aminosavak esetén is.

Az aromás szubsztituenst tartalmazó aminosavak esetén (β -2-7, β -3-7 és β -2-11) a k' értékei minimum jellegű görbét írtak le (14. ábra). A minimum pont utáni növekedés a k' értékekben a MeOH térfogatarányának növekedésével, hasonlóan magyarázható, mint az alifás oldalláncú vegyületeknél. A minimum pont előtti csökkenő szakasz abból adódik, hogy az aromás gyűrű az amúgy poláris aminosavaknak apoláris jelleget kölcsönöz. A vízben gazdagabb eluens esetén így előtérbe kerülnek a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások, melyek nagyobb víztartalom mellett nagyobb visszatartást eredményeznek. A hidrofób-hidrofób, illetve a HILIC hatások eredője eredményezi a görbék változó alakját, a görbe minimumának helyét, valamint a minimumpont előtti csökkenés, illetve az utána lévő emelkedés meredekségét, amely mintánként és kolonnánként változó volt [93].

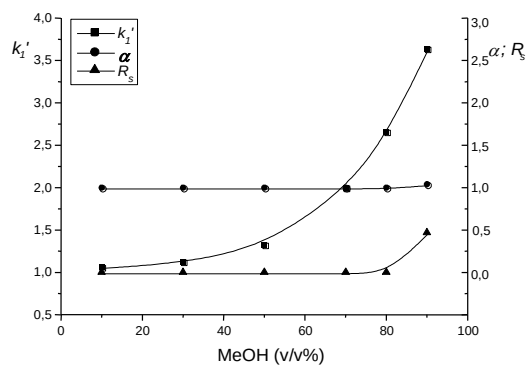
A vizsgált γ -aminosav minták viselkedése a szerves módosító térfogatarányának változásával hasonló jellegű volt, mint az alifás oldalláncú β -aminosavak esetén, azaz a MeOH mennyiségének növekedésével a k' értékében határozott növekedés volt tapasztalható. Ez arra enged következtetni, hogy az elválasztás az említett HILIC kölcsönhatás által vezérelt.

Chirobiotic T

β -2-1

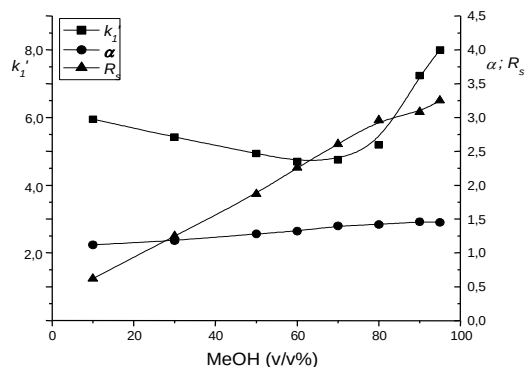


β -3-1

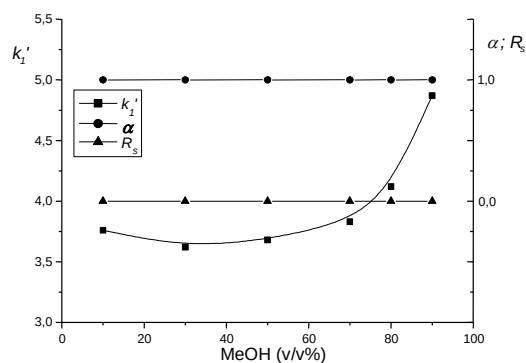


Chirobiotic TAG

β -2-7

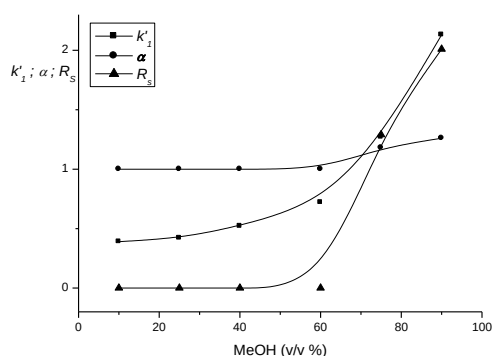


β -3-7

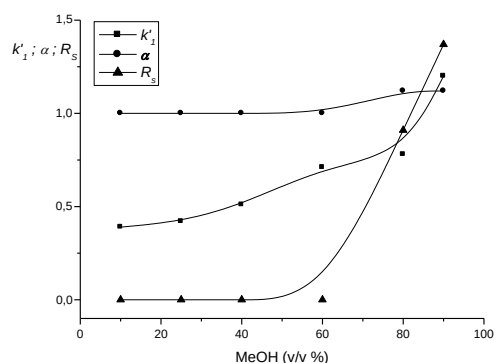


Chirobiotic R

γ -1



γ -3



14. ábra Kromatográfias jellemzők (k_1' , α , R_s) változása az eluens összetétellel

Kolonna, Chirobiotic T, Chirobiotic TAG, Chirobiotic R; mozgófázis, 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH (v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

A mintamolekulákon lévő funkciós csoportok helyzetétől, illetve az oldallánc helyzetétől és jellegétől függetlenül, az α és R_s értékekre általánosan igaz volt, hogy a MeOH-ban gazdagabb

mozgófázis esetén nagyobbak adódtak (kivételt képeznek azok a vegyületek, amelyek esetén nem sikerült az elválasztást megvalósítanunk). A β -2-aminosavaknál a MeOH-gazdag mozgófázisokban az α értékek kissé, az R_S értékek sokkal határozottabban emelkedtek. Ez a sajátosság mindhárom kolonnán megfigyelhető volt, az egyetlen kivétel ez alól a β -2-1 viselkedése a Chirobiotic T₂ kolonnán. Az R_S adatokra jellemző még, hogy a β -2-7 és β -2-11 vegyületek esetén telítési jelet mutattak az MeOH térfogatarányának növelésével mindhárom kolonnán. Ennek valószínű oka a sávszélesedés mértékének növekedése nagyobb retenciós időknél (nagyobb k'), mely az R_S értékek állandósulását okozta.

A γ -aminosav sztereoizomerek esetén a szelektivitás kismértékű növekedésével a felbontás értékei határozottabban növekedtek, mely növekedés 60% térfogatarányú MeOH tartalom felett volt a legjellemzőbb (14. ábra).

5.1.2. Molekulaszerkezet és kromatográfiás viselkedés közti összefüggések

Állandó eluensösszetétel mellett [0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 30/70 (v/v), illetve 40/60 (v/v)] végzett vizsgálatok eredményeit az 5., 6. és 7. Táblázat tartalmazza [94-96].

Az 5., 6. és 7. Táblázat adatai alapján az elsőként eluálódott enantiomerekhez tartozó retenciós faktor értékek rendre kisebbek voltak a Chirobiotic T és T₂ oszlop esetén, mint a Chirobiotic TAG oszlopon. Berthod szerint az α -aminosavak eltérhetnek ettől a viselkedéstől [42], viszont D'Acquarica és munkatársai valamint Péter és munkatársai hasonló eredményeket kaptak különböző, főleg β -aminosavak vizsgálata során [97, 98]. A γ -aminosavak esetén a legkisebb visszatartás a Chirobiotic R oszlopon adódott. Ennek valószínű oka az, hogy a szelektor karboxilcsoportja metil-észter formában van jelen (8. ábra), mely gátolja az elektrosztatikus kölcsönhatás kialakulását a vizsgálandó vegyület protonált aminocsoportjával. Ha az összes aminosav elválasztása során meghatározott retenciós faktor adatokat összehasonlítjuk az azonos királis szelektorral rendelkező Chirobiotic T és T₂ kolonnákon, látható, hogy ezek az értékek Chirobiotic T esetén nagyobbak voltak (kivétel: γ -3), ez a különbség azonban nem jelentős.

A β -aminosavak esetén ugyanazon a kolonnán a retenciós faktorok értéke csak kissé különbözött egymástól, függetlenül az oldallánc minőségétől (5. Táblázat). A jelenség lehetséges magyarázata az enantioszelektív felismerés olyan mechanizmusa, melyben az első enantiomer retenciós faktorának kialakításában a nemszelektív kölcsönhatások a jellemzőek, aminek köszönhetően a retenciós idők hasonlóak. A fennálló csekély eltérések a szerkezeti különbségekből adódhatnak.

A γ -aminosavak esetén már nagyobb eltérések fedezhetőek fel a visszatartás mértékében. A

retenciós faktorok rendre kisebbek voltak a különböző oszlopokon a telítetlen kötést tartalmazó γ -2 vegyület esetén, míg a ciklohexán alapvázú γ -3 molekulánál tapasztalhattuk a legnagyobb visszatartást, azaz egy további CH₂ csoport jelenléte a gyűrűben valószínűleg jobb illeszkedést biztosít az aglikon kosarában.

A β -2-1, β -3-1, β -2-2, és β -3-2 vegyületek rendelkeznek a legrövidebb telített oldallánccal és ezek azok az aminosavak, melyek a legkisebb α és R_S értékeket adták, bár a k_I ' viszonylag nagy (5. és 6. Táblázat). Ez valószínűleg abból adódik, hogy a rövid apoláris oldallánc és a királis szelektoron található zseb hidrofób részei között kicsi a kölcsönhatás mértéke, ami csekély királis felismerést eredményez. A β -2-3 - β -2-6 és β -3-5 enantiomerek már hosszabb alkilcsoporttal rendelkeznek, mely egy kedvezőbb térállást és kölcsönhatást eredményezhet az aglikon kosarán belül. A β -2-5 és β -3-5 aminosav esetében azonban a csoport szerkezete, nevezetesen egy elágazó 2-propil lánc, kedvezőtlenül hat a molekula-királis állófázis komplex kialakulására, ami kisebb retenciós faktort eredményez, ugyanakkor α (és R_S) kissé nagyobb volt összehasonlítva β -2-1 és β -3-1 adataival. Különösen szembetűnik az elágazó alkilcsoport negatív hatása, ha ezeket az adatokat összevetjük a β -2-3, β -2-4 és a β -2-6 aminosavakkal. Az analóg oldallánccal rendelkező β -3-5 vegyület esetén az egyik legnagyobb szelektivitás és felbontás értéket tapasztaltuk a β -3-aminosavak közül, de ez az érték messze elmarad a β -2-aminosavaknál tapasztaltaktól. A viszonylagosan nagyobb szelektivitás és felbontás valószínűleg szterikus okokra vezethető vissza, a β -3-5 molekula elhelyezkedése kedvezőbb az aglikon kosarában, mint a β -3-1 és β -3-2 molekuláé. A β -2-6 molekulában a β -2-5 molekulához képest jelen lévő további CH₂ csoport már flexibilisebbé teszi a molekulát, és optimálisabb körülményeket teremt a másodikként eluálódó enantiomer illeszkedéshez az aglikon kosarában, ennek megfelelően mindhárom kolonnán nagyobb α és R_S értékeket kaptunk

5. Táblázat Kromatográfiás adatok, retenciósfaktor (k'), szelektivitás (α) és a felbontás (R_S) értékei β -2-aminosavak enantiomerjeinek közvetlen elválasztása során, makrociklusos glikopeptid állófázisokon, állandó mozgófázis összetétel mellett

Vegyület	Kolonna	k_1'	k_2'	α	R_S
β -2-1	T	2,58	2,97	1,15	1,40
	T₂	2,26	2,51	1,11	0,65
	TAG	4,66	4,97	1,07	0,70
β -2-2	T	2,34	2,68	1,15	1,20
	T₂	2,00	2,16	1,08	0,70
	TAG	3,71	4,31	1,16	1,65
β -2-3	T	2,33	2,99	1,28	2,90
	T₂	2,04	2,45	1,20	2,05
	TAG	4,32	5,68	1,31	2,75
β -2-4	T	2,33	2,94	1,26	1,90
	T₂	2,09	2,44	1,17	1,30
	TAG	4,36	5,59	1,28	1,40
β -2-5	T	2,10	2,40	1,14	1,15
	T₂	1,63	1,87	1,15	0,95
	TAG	3,36	4,10	1,22	1,30
β -2-6	T	2,20	2,90	1,32	2,10
	T₂	1,89	2,40	1,27	2,20
	TAG	3,87	5,41	1,40	2,95
β -2-7	T	2,35	3,08	1,31	2,50
	T₂	1,95	2,36	1,21	1,65
	TAG	4,64	6,40	1,38	3,10
β -2-8	T	2,22	2,78	1,25	2,95
	T₂	2,14	2,44	1,14	1,45
	TAG	3,94	4,92	1,25	1,25
β -2-9	T	2,07	2,70	1,30	3,00
	T₂	1,94	2,41	1,24	2,15
	TAG	3,66	6,44	1,76	3,20
β -2-10	T	2,58	3,23	1,25	2,85
	T₂	2,40	2,85	1,19	1,75
	TAG	5,24	6,56	1,25	1,85
β -2-11	T	2,60	3,29	1,27	3,20
	T₂	2,53	3,13	1,24	1,95
	TAG	5,40	7,79	1,44	3,35

Kolonna, **T**, Chirobiotic T, **T₂**, Chirobiotic T₂, **TAG**, Chirobiotic TAG; mozgófázis, 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 30/70 (v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

6. Táblázat Kromatográfiás adatok, retenciós faktor (k'), szelektivitás (α) és a felbontás (R_S) értékei β -3-aminosavak enantiomerjeinek közvetlen elválasztása során, makrociklusos glikopeptid állófázisokon, állandó mozgófázis összetétel mellett

Vegyület	Kolonna	k_1'	k_2'	α	R_S
β -3-1	T	2,00	2,00	1,00	0,00
	T₂	1,52	1,52	1,00	0,00
	TAG	3,30	3,30	1,00	0,00
β -3-2	T	2,50	2,60	1,04	0,50
	T₂	1,44	1,53	1,06	0,60
	TAG	3,32	3,32	1,00	0,00
β -3-5	T	1,97	2,11	1,07	0,90
	T₂	1,29	1,37	1,06	0,55
	TAG	3,23	3,23	1,00	0,00
β -3-7	T	2,10	2,10	1,00	0,00
	T₂	1,66	1,77	1,07	0,45
	TAG	3,83	3,83	1,00	0,00

Kolonna, **T**, Chirobiotic T, **T₂**, Chirobiotic T₂, **TAG**, Chirobiotic TAG; mozgófázis, 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 30/70 (v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

7. Táblázat Kromatográfiás adatok, retenciós faktor (k'), szelektivitás (α) és a felbontás (R_S) értékei γ -aminosavak enantiomerjeinek közvetlen elválasztása során, makrociklusos glikopeptid állófázisokon, állandó mozgófázis összetétel mellett

Vegyület	Kolonna	k_1'	k_2'	α	R_S
γ -1	T	2,91	2,91	1,00	0,00
	T₂	2,48	2,48	1,00	0,00
	TAG	6,30	6,50	1,03	0,20
	R	0,72	0,72	1,00	0,00
	R*	2,13	2,69	1,26	2,00
γ -2	T	2,00	2,61	1,31	2,95
	T₂	1,65	2,62	1,59	3,80
	TAG	3,31	5,71	1,73	5,50
	R	0,54	0,84	1,56	2,95
γ -3	T	3,71	4,10	1,11	1,40
	T₂	3,85	4,81	1,25	1,90
	TAG	9,63	11,30	1,17	1,40
	R	0,84	0,87	1,04	0,20
	R*	1,20	1,34	1,12	1,45

Kolonna, **T**, Chirobiotic T, **T₂**, Chirobiotic T₂, **TAG**, Chirobiotic TAG, **R**, Chirobiotic R; mozgófázis, 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 40/60 (v/v); *0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 10/90 (v/v) áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

A β -2-7 - β -2-11 és β -3-7 aminosavak mindegyike egy aromás gyűrűvel rendelkezik, mely nagymértékben változtatja meg a vegyületek fizikai és kémiai tulajdonságát. Fontos, hogy az elválasztásuk során már számolhatunk a poláris (π - π) kölcsönhatások jelenlétével is, mely a molekulák és a királis állófázis aromás gyűrűi közt jön létre. β -2-Alifás aminosavak esetén, a k_1' értékek ugyanazon kolonnán csak kismértékben térnek el egymástól, függetlenül az oldallánc szerkezetétől. Ez a megállapítás az aromás oldalláncot tartalmazó vegyületekre is igaz, ami azt jelenti, hogy az elsőként eluálódó enantiomerek visszatartásában fontos szerep jut a nemszelektív kötőerőknek. Az aromás β -2- és β -3-aminosavakhoz tartozó α és R_S értékek rendre nagyobbak voltak, mint az alkil láncot tartalmazók esetén (β -3-7 aminosavnál ez a szelektivitásra volt igaz). Ennek lehetséges magyarázata, hogy a másodikként eluálódó enantiomer visszatartásában nagyobb szerep jut a szelektív kölcsönhatásoknak, azon belül is nagy valószínűséggel a poláris kölcsönhatások járulnak hozzá leginkább a királis felismeréshez. A β -2-8 és a β -2-9 minta esetén a β -2-7 molekulához képest kapott kisebb k_1' értékek valószínűleg az -OH csoport, mint szterikus gát jelenlétének voltak köszönhetők a csoport helyzetétől függetlenül. Ugyanakkor a β -2-10 és β -2-11 aminosavak esetében kapott nagyobb retenciós faktorok az újabb -O- csoportok H-kötésben való részvételére vagy inkább szterikus okokra volt visszavezethető, ugyanis a H-kötések kialakulásának a β -2-8 és a β -2-9 minták esetén is van esélye.

A β -2-aminosavak esetén az α és R_S értékek rendre nagyobbak adódtak, mint a β -3-aminosavaknál. Ha az oszlopok tekintetében vizsgáljuk a különböző aminosavakat, akkor a legnagyobb szelektivitást a β -2-aminosavak esetén a teikoplanin aglikont tartalmazó Chirobiotic TAG kolonnán tapasztaltuk (kivétel a β -2-1 vegyület). Az α és R_S értékek a β -3-aminosavaknál az egyaránt teikoplanin A₂-2 szelektort tartalmazó T vagy T₂ oszlopon voltak a legnagyobbak (kivétel a β -3-1, az adott eluens összetétel mellett ezen vegyület enantiomerjeinek elválasztása egyik oszlopon sem valósult meg).

γ -Aminosavakat vizsgálva a legnagyobb k' értékek mind a négy kolonnán a γ -3 vegyület esetén figyelhetők meg (7. Táblázat). A 6-tagú gyűrű valószínűleg jobban illeszkedik az aglikon kosarában, mint az 5-tagú gyűrű. Az α és R_S értékeket tekintve viszont a telítetlen 5-tagú gyűrűt tartalmazó γ -2 aminosav enantiomerek elválasztása volt a leghatékonyabb, jelezve a poláris és diszperziós kölcsönhatások szerepét a királis felismerésben.

A γ -aminosav enantiomerek esetén az **R** kolonnán a viszonylagos rövid tartózkodás ellenére igen eredményes volt az elválasztás, melyből arra lehet következtetni, hogy ez esetben az enantioszelektív kölcsönhatások aránya a nem enantioszelektív kölcsönhatásokhoz képest sokkal kedvezőbbek (γ -1 és γ -3 aminosavak 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH=10/90 (v/v) eluensösszetétel

mellett alapvonalra elválaszthatók [92]). A risztocetin A molekula több kiralitáscentrummal és cukor résszel rendelkezik, melyek hozzájárulhatnak a jobb királis felimeréshez. A γ -1 molekula esetén a kisebb retenciós faktor értékek kisebb szelektivitással is jártak, vagyis γ -3 esetén a megnövekedett retenció a γ -1-hez képest az elválasztás hatékonyságának növekedésével párosult.

Összefoglalva, a β - és γ -aminosavakon lévő oldalláncok szerkezete és azok elhelyezkedése illetve a gyűrű mérete nagymértékben kihat a szelektorokon lévő zsebek és a molekulák között kialakuló kölcsönhatás erősségére.

5.1.3. A szelektív és nem-szelektív kölcsönhatások becslése

Királis vegyületek elválasztása során az enantiomerek mért k' értékei ($(k_{app})'_1$ és $(k_{app})'_2$) az enantioszelektív (k_s'), valamint a nem enantioszelektív (k_{ns}') kölcsönhatásokból származó visszatartás összegeként adhatók meg:

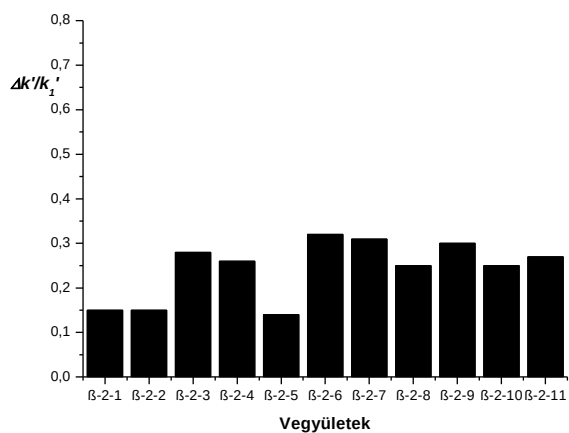
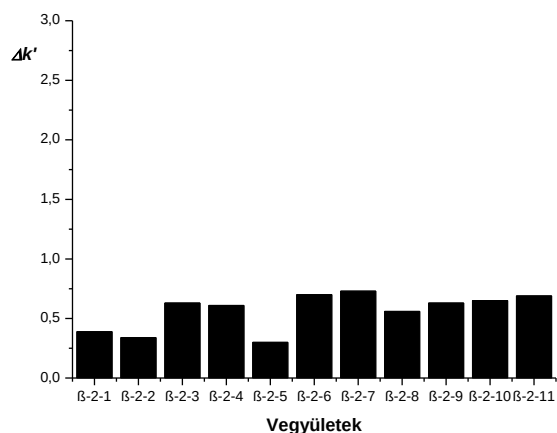
$$(k_{app})'_1 = (k_s' + k_{ns}')_1 \text{ és} \quad (22)$$

$$(k_{app})'_2 = (k_s' + k_{ns}')_2 \quad (23)$$

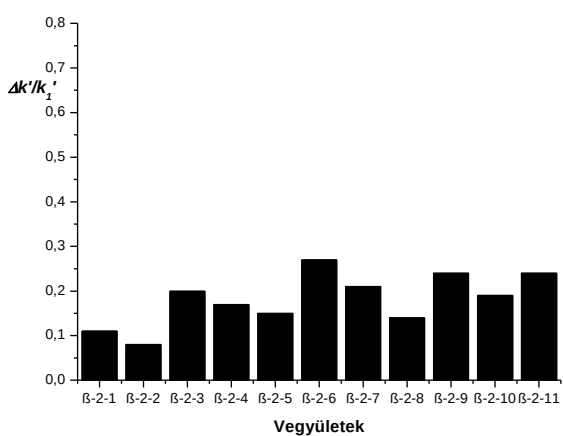
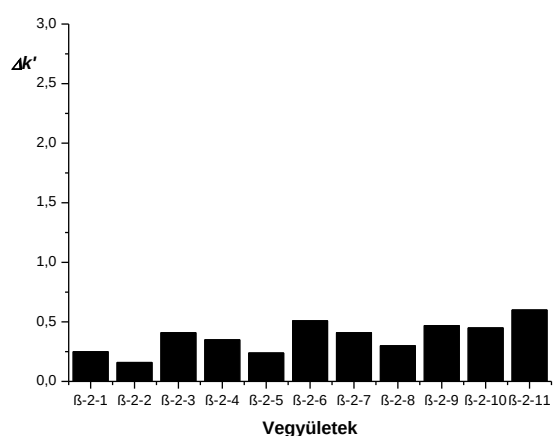
Az elválasztás hatékonyságának jellemzésére hasznos információkat szolgáltathat számunkra az enantiomerek k' értékeinek különbsége [99].

$$\Delta k' = (k_{app})'_2 - (k_{app})'_1 = (k_{ns}' + k_s')_2 - (k_{ns}' + k_s')_1 \quad (24)$$

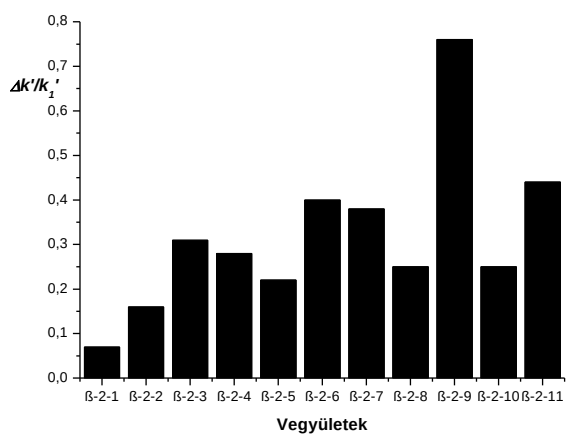
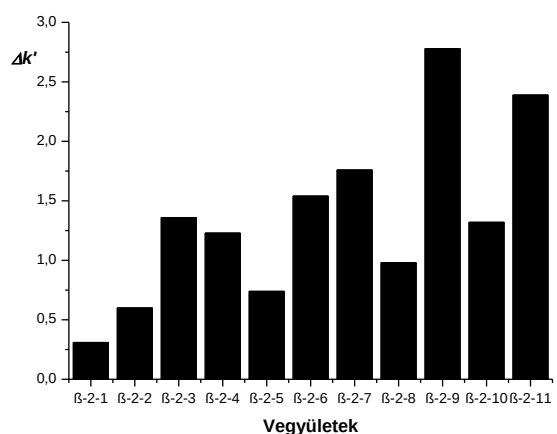
Ha a nem enantioszelektív hozzájárulás a két enantiomerre nézve közel azonos, akkor a $\Delta k'$ értéke a két enantiomerre vonatkozó szelektív hozzájárulások különbségeként fogható fel. Az 5. Táblázat adatai alapján a k'_1 értékei az egyes kolonnákon a különböző mintamolekulák esetén alig különböznek egymástól, ami arra utal, hogy a nem-enantioszelektív kölcsönhatások az egyes molekulákra nézve hasonló erősségűek. Ennek szemléltetésére a β -2-aminosavak esetén ábrázoltuk a $\Delta k'$ értékeket különböző kolonnákon, állandó eluensösszetétel [0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH=30/70 (v/v)] mellett (15. ábra). A Chirobiotic T oszlopon a β -2-1, β -2-2 és a β -2-5 esetében kicsi $\Delta k'$ értékek adódtak (0,30–0,39), míg a β -2-3, β -2-4 és a β -2-6 - β -2-11 a $\Delta k'$ értéke 0,56–0,73 között volt.



Chirobiotic T₂



Chirobiotic TAG



15. ábra Az aminosavak $\Delta k'$ és $\Delta k'/k_1'$ hányados értékei különböző kolonnákon

Kolonna, Chirobiotic T, Chirobiotic T₂, Chirobiotic TAG; mozgófázis, 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 30/70 (v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

A nagyobb $\Delta k'$ értékekkel rendelkező vegyületek esetében a (24) egyenlet által meghatároz-

ható, úgynevezett „valós enantioszelektivitás” nagyobb volt, melyet hűen tükröznek az itt található nagyobb α értékek is (5. Táblázat). Ezekhez az eredményekhez hasonlóak figyelhetők meg a Chirobiotic T₂ kolonnán is, bár itt valamivel kisebbek voltak a $\Delta k'$ értékek. A két kolonna ugyanazt a szelektort tartalmazza, amiből a hasonló értékek adódhatnak. Sokkal nagyobb $\Delta k'$ értékek voltak megfigyelhetők a Chirobiotic TAG oszlopon, és ezek egymáshoz képest sokkal jobban változtak molekulánként. Ennél a kolonnánál szintén a β -2-1, β -2-2 és a β -2-5 esetében adódtak a legkisebb $\Delta k'$ értékek (0,31-0,74), de ezek láthatóan nagyobbak, mint a Chirobiotic T és T₂ esetében. Az igazán nagy $\Delta k'$ értékek a β -2-3, β -2-4 és a β -2-6 - β -2-11 vegyületeknél tapasztalhatók (0,98-2,78). Ezzel párhuzamosan az α értékei is ezen az oszlopon voltak a nagyobbak, kivétel egyedül a β -2-1 molekula volt.

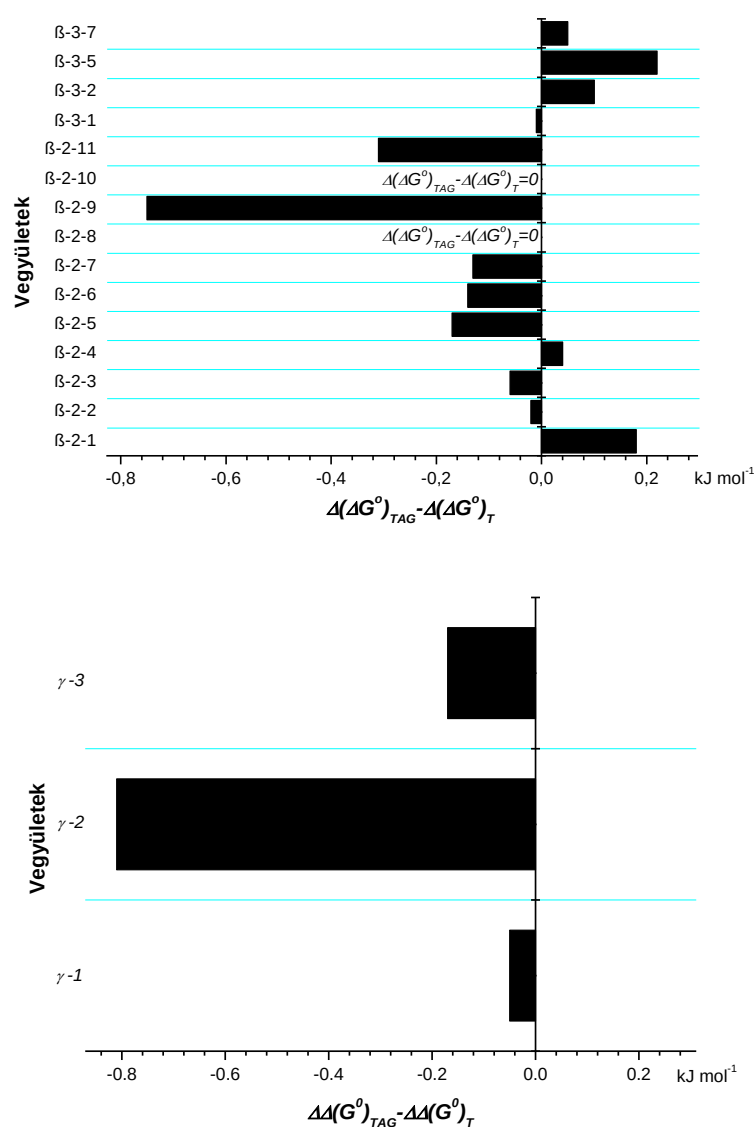
Az enantioszelektív – nem enantioszelektív kölcsönhatások hozzájárulását a retencióhoz a $\Delta k'/k_1'$ hányadoson keresztül is vizsgálhatjuk (15. ábra). A β -2-aminosavak esetén mindhárom kolonnán a β -2-1, β -2-2 és β -2-5 molekulák mutatták a legkisebb $\Delta k'/k_1'$ értéket, vagyis ezen molekuláknál a nem enantioszelektív kölcsönhatásra jutó enantioszelektív hozzájárulás viszonylag kicsi, míg a β -2-3, β -2-4 és β -2-6 – β -2-11 vegyületek által kialakított kölcsönhatások között nagyobb szerepet kapnak az enantioszelektív kölcsönhatások, melyek az α értékeiben is megmutakoztak. Az azonos királis szelektorról rendelkező Chirobiotic T és T₂ oszlopokon a $\Delta k'/k_1'$ értékek hasonlóak voltak, bár a Chirobiotic T esetén kicsit nagyobbak. A Chirobiotic TAG oszlopon ez a hányados már jelentősen nagyobb volt és emellett a $\Delta k'/k_1'$ értékek is nagyobb mértékben változtak az egyes molekulákra nézve. Ennél a kolonnánál is igaz az a megállapítás, hogy a β -2-1, β -2-2 és β -2-5 esetén volt a legkisebb a „valós enantioszelektivitás” mértéke.

A különböző $\Delta k'$ és α értékek, melyek a β -2-7, β -2-8 és β -2-9 esetében tapasztaltunk, különösen a Chirobiotic TAG oszlopon, valószínűleg szterikus okokkal magyarázhatóak. A β -2-8 és β -2-9 molekulán lévő -OH csoport szterikusan akadályozza vagy éppenséggel elősegíti a molekula és a szelektor között kialakuló H-híd kölcsönhatást, és ezáltal csökkenti vagy növeli a királis felismerést. Mindhárom kolonnán a legnagyobb retenciós faktor különbségeket azok a vegyületek adták, melyek egy aromás gyűrűvel és egy további -OH, C₂H₅-O- vagy -O- csoporttal rendelkeznek, így képesek voltak poláris (π - π), H-kötés, dipól-dipól illetve hidrofób kölcsönhatás kialakítására is az állófázissal.

Fontos megjegyezni, hogy a retenciós faktorokhoz való hozzájárulás szelektív és nem szelektív kölcsönhatásának aránya pontosan nem adható meg a retenciós adatok alapján, csak becsülhető. Az adszorpciós izotermák ismerete e probléma megoldásához is közelebb vihet [100, 101].

5.1.4. A természetes teikoplanin molekulán lévő cukorrészek szerepe a királis

A szénhidrát egységek hatásának jellemzésére a teikoplanin aglikonon, illetve teikoplanin A₂-2 szelektoron mért, két enantiomerre jellemző szabadentalpia változás különbségeket vontuk ki egymásból [$\Delta(\Delta G^\circ)_{TAG} - \Delta(\Delta G^\circ)_T$]. A negatív [$\Delta(\Delta G^\circ)_{TAG} - \Delta(\Delta G^\circ)_T$] érték azt jelenti, hogy az adott sztereoizomer elválasztása kedvezőbb a teikoplanin aglikon szelektort tartalmazó állófázison. Ezzel ellentétben a pozitív érték a természetes teikoplanin állófázison való hatékonyabb elválasztást példázza. A 16. ábrán látható, hogy a tizenegy β -2-aminosav közül hét esetben, míg a β -3-aminosavak esetén a **β -3-1** aminosavnál az elválasztás az aglikon állófázison kedvezményezett.



16. ábra A $\Delta(\Delta G^\circ)_{TAG} - \Delta(\Delta G^\circ)_T$ különbségek β - és γ -aminosavak esetén

A γ -aminosavak esetén egyértelműen kijelenthető, hogy az ilyen típusú molekulák

enantiomerjei hatékonyabban választhatóak el a **TAG** kolonnán. Szembetűnő a γ -2 minta kiugróan magas értéke. Ez ismételten csak a már tárgyalt megállapítást támasztja alá, nevezetesen a telítetlen kötések elősegítik a királis felismerést (emellett pozitív hatása még, hogy lecsökkenti a detektálhatóság alsó határát UV detektor használata esetén).

Általánosan kijelenthető, hogy a β -2-aminosav enantiomerek leg többjének és a γ -aminosav enantiomerek elválasztásában a teikoplaninon lévő szénhidrátcsoporthoz szterikus gátat jelentenek, csökkentve ezáltal az elválasztás hatékonyságát. Ez a szterikus gátló hatás a teikoplanin aglikon esetében nem érvényesül, emellett a két fenolos és az egy alkoholos hidroxilcsoport jelenléte növelheti az aminosavakkal kialakított kölcsönhatások számát, illetve erősségét. Hasonló következtetésre jutottak Péter és mtsai az α -aminosavak, a ciklikus β -aminosavak valamint a szekunder aminosavak vizsgálata esetében is [98].

A β -3-aminosavak esetén (kivéve a β -3-1), feltételezhetően az oldallánc eltérő helyzetéből adódóan, a királis szénhidrát-egységekkel való kölcsönhatás elősegíti a királis felismerést, így ezen vegyületeknél a teikoplanin A₂-2 királis szelektort tartalmazó Chirobiotic T illetve T₂ oszlop volt hatékonyabb az aminosavakon lévő oldallánc minőségétől függetlenül.

A racém aminosavak mellett a β -2-1, β -2-2, β -2-5, β -2-6 és β -3-1 illetve γ -1 és γ -2 vegyületek esetében tiszta enantiomer is a rendelkezésünkre állt, így ezen molekuláknál lehetőségünk nyílt az elúciós sorrend meghatározására. Mindhárom kolonnán, a fent említett β -aminosavak enantiomerjeinél (R)<(S) elúciós sorrend volt megfigyelhető. Ez éppen ellentétes az α -aminosavaknál korábban tapasztaltakkal, míg a β -3-aminosavaknál az (S)<(R), illetve az (R)<(S) elúciós sorrendre is akad példa [98]. A γ -aminosavaknál a molekulákon két darab aszimmetriacentrum volt található, de a mintánk a négy lehetséges sztereoizomer közül csak az egyik enantiomer párt (cisz) tartalmazta. Az először eluálódott enantiomer γ -1 esetén (1S,3R), míg γ -2 esetén (2R,4S) konfigurációjú volt.

Az általunk elválasztott aminosav enantiomerek néhány, különböző körülmények között felvett kromatogramjait a **Függelékben** mutatjuk be.

5.1.5. Hőmérsékletfüggés és termodinamikai adatok

A hőmérsékletváltozás kromatográfiás adatokra gyakorolt hatását a β -2-1, β -2-5, β -2-7, β -3-1, β -3-5, β -3-7, γ -1, γ -2 és γ -3 vegyületek esetén 280 és 318 K tartományban vizsgáltuk, 10 K léptékben emelve a hőmérsékletet. Eredményeink egy részét a **8. Táblázat** tartalmazza.

Az eredmények értékelése során általánosságként megfogalmazható, hogy nagyobb hőmérsékleteken a retenciós faktor és ezzel párhuzamosan a szelektivitás is egyre kisebb volt. Nagyobb

hőmérsékleten a rendszer belső energiája nagyobb, a vegyületek hőmozgása gyorsabb, nagyobb mozgási energiával rendelkeznek, és ezáltal könnyebben legyőzik az állófázissal kialakított másodlagos kölcsönhatásokat. A felbontás hőmérsékletfüggése ennél összetettebb. A **8. Táblázat** adatai alapján látható, hogy egyes vegyületeknél, mint például a β -2-5 (és a legtöbb β - és γ -aminosavnál), a felbontás csökkent mindhárom kolonnán a hőmérséklet emelkedésével, míg a β -2-1 aminosav felbontás értéke egy maximummal jellemezhető görbét írt le. Az oszlop minőségétől függően (**TAG**), γ -2 vegyület esetén növekvő felbontás értékekkel is találkozhattunk a hőmérséklet emelkedésével.

Tapasztalatunk, hogy ez a kétféle viselkedés a felbontás tekintetében független az oldallánc helyzetétől és jellegétől. A maximum pont utáni csökkenés, illetve a folyamatos csökkenés magyarázata, hogy a szelektivitással párhuzamosan csökken a felbontás is a hőmérséklet emelkedésével. A maximum előtti emelkedés oka pedig az lehet, hogy kis hőmérsékleteken csökken az elméleti tányérszám értéke, a csúcsok talpszélessége nő és ebből adódik a kisebb felbontás. A γ -2 molekula esetén, **TAG** kolonnán, nagyobb hőmérsékleten jelentkező növekvő felbontás értékek magyarázata az lehet, hogy a szelektivitás csökkenéséből adódó felbontás csökkenést az elméleti tányérszám növekedése meghaladja.

8. Táblázat Az elsőnek eluálódó enantiomer retenciós faktora (k_1'), elválasztási tényező (α) és felbontás (R_S) értékei nem természetes aminosavak esetén, különböző hőmérsékleteken

Vegyület k_1', α, R_S	Kolonna	Hőmérséklet (K)				
		280	288	298	308	318
β -2-1						
k_1'	T	3,26	2,95	2,58	2,36	2,15
α		1,22	1,19	1,15	1,12	1,09
R_S		1,15	1,80	1,40	1,30	1,05
k_1'	T₂	2,90	2,66	2,26	1,90	1,67
α		1,21	1,16	1,11	1,07	1,03
R_S		0,40	0,60	0,65	0,40	0,12
k_1'	TAG	6,30	5,36	4,66	3,96	3,46
α		1,10	1,09	1,07	1,05	1,05
R_S		0,80	0,85	0,70	0,60	0,55
β -2-5						
k_1'	T	4,07	3,72	3,28	2,92	2,64
α		1,14	1,11	1,09	1,07	1,06
R_S		1,16	1,32	1,10	0,90	0,70
k_1'	T₂	2,79	2,39	2,05	1,82	1,63
α		1,12	1,11	1,10	1,08	1,07
R_S		1,05	1,15	1,00	0,85	0,75
k_1'	TAG	6,36	5,74	4,82	4,26	3,64
α		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
R_S		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Vegyület k_1', α, R_S	Kolonna	Hőmérséklet (K)				
		283	288	293	303	313
γ -2						
k_1'	T	2,59	2,43	2,30	2,07	1,90
α		1,39	1,35	1,32	1,26	1,21
R_S		3,15	3,10	2,85	2,55	2,20
k_1'	TAG	4,53	4,27	3,95	3,47	3,14
α		1,85	1,83	1,74	1,59	1,48
R_S		3,45	4,65	5,00	5,30	6,00
k_1'	R	0,74	0,69	0,65	0,57	0,51
α		1,75	1,65	1,59	1,48	1,39
R_S		3,75	2,95	2,75	2,35	2,20

Kolonna, **T**, Chirobiotic T, **T₂**, Chirobiotic T₂, **TAG**, Chirobiotic TAG; **R**, Chirobiotic R; mozgófázis, **β -2-1** és **β -2-5**: 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 30/70 (v/v) és **γ -2**: 40/60 (v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm

Az elválasztás hőmérsékletfüggéséből a van't Hoff egyenlet segítségével számítottuk az elválasztást kísérő entalpia, entrópia és szabadentalpia változás értékeit. Ezeket az adatokat a (17) egyenlet segítségével grafikus úton határoztuk meg, ahol a ΔH° az egyenes meredekségével, míg a ΔS° a tengelymetszettel jellemezhető. A hőmérsékletfüggésből számolt termodinamikai adatokat a **9., 10. és 11. Táblázatokban** foglaltuk össze.

A ΔH° és ΔS° értékek minden esetben negatívnak adódtak. Ez azt jelenti, hogy a kialakuló kölcsönhatások entalpiaváltozás szempontjából kedvezményezettek, de az entrópiaváltozás szempontjából nem. A negatív entrópia érték a rendezettség növekedésére utal, viszont ezt az entalpiaváltozás mértéke meghaladta, így a szabadentalpia-változás is negatívnak adódott. Ez alapján kijelenthető, hogy a kialakuló kölcsönhatások az aminosavak és a királis állófázis között exotermek. Az először eluálódott enantiomer esetében kevésbé voltak a ΔH° és ΔS° értékek negatívak, mint a másodikként eluálódó enantiomer esetén. A nagyobb $-\Delta S^\circ$ érték alapján kijelenthető, hogy a másodjára eluálódott enantiomer kisebb szabadsági fokkal rendelkezik az állófázison, ami adódhat abból, hogy több ponton kapcsolódik hozzá, esetleg kevesebb lehetősége van a mozgásra, illetve forgásra. Megfigyelhető, hogy a ΔH_1° és ΔH_2° , valamint ezzel párhuzamosan ΔS_1° és ΔS_2° értékek, néhány kivételtől eltekintve, a Chirobiotic TAG oszlopon adódtak a legnegatívabbnak az összes aminosav összehasonlításában.

A β -aminosav vegyületek esetében szemlélve az adatokat látható, hogy a legkisebb negatív értékeket a β -2-5, míg a legnagyobb negatív értékeket a β -2-7 aminosav esetén kaptuk. Valószínű magyarázat, hogy a β -2-5 molekulán lévő elágazó oldallánc gátló hatást fejt ki az aglikon kosarában történő illeszkedésre, a β -2-7 molekula esetén pedig az aromás oldallánc lehetőséget teremt újabb kölcsönhatások kialakítására a királis állófázissal.

γ -Aminosavaknál a γ -3 molekulára adódtak a legkisebb $-\Delta H^\circ$ és $-\Delta S^\circ$ értékek. Ez látszólagos ellentmondásban van azzal, hogy az elválasztás nem ennél a vegyületnél volt a legrosszabb, noha a termodinamikai adatokból az következik, hogy az enantiomer-királis állófázis között kialakuló kölcsönhatások átlagos energiája kicsi. Ez az ellentmondás feloldható, ha figyelembe vesszük, hogy az elválasztást a két enantiomerre jellemző $(\Delta H_2^\circ - \Delta H_1^\circ)$ és $(\Delta S_2^\circ - \Delta S_1^\circ)$ különbsége és az ebből eredő $\Delta(\Delta G^\circ)$ szabja meg.

A $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$ és $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek az elválasztás során a sztereoizomer pároknál fellépő kölcsönhatások különbségéből adódnak. A $\Delta(\Delta H^\circ)$, és $\Delta(\Delta S^\circ)$ értékeket a (21) egyenlet alapján határoztuk meg az $\ln \alpha - 1/T$ függvények adatainak (meredekség, tengelymetszet) felhasználásával. A $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékeket a (18, 20) egyenletek alapján számoltuk.

Megállapítható, hogy a $\Delta(\Delta H^\circ)$ értékek mindhárom oszlopon negatívabbnak adódtak β -2-

aminosavak esetén, mint β -3-aminosavaknál (kivétel a β -3-5 volt a Chirobiotic T₂ oszlopon). Az eredmények alapján, β -3-aminosavakra elmondható, hogy az enantiomer felismerés entalpia-változás szempontjából kevésbé kedvezményezett a vizsgált oszlopokon. A legnegatívabb $\Delta(\Delta H^\circ)$ értékek β -2-7 esetén voltak megfigyelhetők a Chirobiotic T₂ és TAG kolonnákon. Ez ismételten csak az aromás gyűrű fontosságára enged következtetni.

Hasonló következtetésre jutottunk a γ -aminosavak vizsgálata során is, a legnegatívabb $\Delta(\Delta H^\circ)$ és $\Delta(\Delta G^\circ)$ a telítetlen gyűrűs szerkezettel rendelkező γ -2 aminosavra adódott. Az enantiomerek által kialakított kölcsönhatások különbsége szempontjából a legkedvezőtlenebb termodinamikai értékek a γ -1 molekulára határoztuk meg, annak ellenére, hogy a már tárgyaltak szerint nem a legkisebb ΔH° és ΔS° értékek voltak rendelkezésre állók ehhez a vegyülethez. A $\Delta(\Delta H^\circ)$ -hoz hasonló irányok állapíthatók meg a $\Delta(\Delta S^\circ)$ értékek vizsgálatakor.

Figyelembe véve a szabadentalpia változás különbségére [$\Delta(\Delta G^\circ)$] kapott értékeket kijelenthető, hogy az intermolekuláris kölcsönhatások kialakulása az állófázis és a mintavegyületek között energia-felszabadulással jár, azaz ezek a kölcsönhatások az összes kolonnán exotermek és a megfelelő entrópiaváltozások is negatívak. Továbbá megállapítható, hogy az elágazó alkil-, illetve arilcsoportot tartalmazó β -2-aminosavak esetén a Chirobiotic TAG oszlopon adódik a legnegatívabb $\Delta(\Delta G^\circ)$ érték, tehát a β -2-aminosavak elválasztására, a vizsgált oszlopok közül, a Chirobiotic TAG a legalkalmasabb. Az nyílt-láncú alkilcsoportot tartalmazó β -2-aminosav, valamint a β -3-aminosav molekulák elválasztása pedig a Chirobiotic T oszlopon tűnik előnyösebbnek.

A γ -aminosavakra kapott $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek alapján a legjobb elválasztás a Chirobiotic TAG kolonnán adódott, de a rövidebb retenciós idők miatt a Chirobiotic R kolonna használata ajánlott ezen vegyületcsoport enantiomerjeinek elválasztására.

9. Táblázat Termodinamikai adatok, ΔH° , ΔS° , ΔG° , $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$, $\Delta(\Delta G^\circ)$ és korrelációs együttható (R^2) értékei Chirobiotic T és T₂ oszlopokban

Vegyület		$-\Delta H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta S^\circ$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	Korrelációs együttható, R^2	$-\Delta G^\circ_{298K}$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta(\Delta H^\circ)$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta(\Delta S^\circ)$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$-\Delta(\Delta G^\circ)$ (kJ mol ⁻¹)
Sztereoizomer								
Chirobiotic T								
β -2-1	1	8,2	19,4	0,9977	2,4	2,2	6,3	0,35
	2	10,4	25,7	0,9974	2,7			
β -3-1	1	8,7	17,6	0,9988	3,5	0,9	2,6	0,11
	2	9,6	20,2	0,9988	3,6			
β -2-5	1	5,7	13,0	0,9963	1,8	1,6	4,3	0,32
	2	7,3	17,3	0,9971	2,2			
β -3-5	1	8,5	18,7	0,9992	2,9	1,5	4,3	0,22
	2	10,0	23,0	0,9993	3,2			
β -2-7	1	9,0	23,2	0,9988	2,1	4,2	12,0	0,67
	2	13,2	35,1	0,9993	2,8			
β -3-7	1	10,3	25,2	0,9943	2,8	0,9	2,8	0,05
	2	11,2	28,2	0,9989	2,8			
Chirobiotic T ₂								
β -2-1	1	11,2	30,8	0,9931	2,0	3,1	9,4	0,26
	2	14,2	40,2	0,9973	2,3			
β -3-1	1	11,6	29,4	0,9977	2,9	0,8	2,1	0,16
	2	12,4	31,5	0,9980	3,0			
β -2-5	1	8,6	25,0	0,9940	1,2	0,6	0,7	0,35
	2	9,2	25,7	0,9964	1,5			
β -3-5	1	10,4	28,7	0,9944	1,8	1,0	2,5	0,23
	2	11,4	31,2	0,9960	2,1			
β -2-7	1	12,9	37,8	0,9989	1,7	1,4	3,2	0,47
	2	14,4	40,9	0,9991	2,2			
β -3-7	1	10,8	28,5	0,9994	2,3	1,4	3,8	0,24
	2	12,1	32,2	0,9995	2,5			

Kolonna, Chirobiotic T és T₂; mozgófázis, 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 30/70 (v/v); $\Delta S^\circ = \Delta S^\circ + \ln \Phi$, ahol Φ a fázisarány reciproka;
 $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$; R^2 , korrelációs együttható a van't Hoff egyenlet, $\ln k' - 1/T$ ábrázolásánál

10. Táblázat Termodinamikai adatok, ΔH° , ΔS° , ΔG° , $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$, $\Delta(\Delta G^\circ)$ és korrelációs koeficiens (R^2) értékei Chirobiotic TAG kolonnán

Vegyület		$-\Delta H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta S^\circ$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	Korrelációs koeficiens, R^2	$-\Delta G^\circ_{298K}$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta(\Delta H^\circ)$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta(\Delta S^\circ)$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$-\Delta(\Delta G^\circ)$ (kJ mol ⁻¹)
	Sztereoizomer							
β -2-1	1	11,5	25,7	0,9980	3,8	1,1	3,3	0,17
	2	12,6	29,0	0,9982	4,0			
β -3-1	1	10,9	20,8	0,9953	4,7	0,7	2,0	0,12
	2	12,4	25,6	0,9919	4,8			
β -2-5	1	7,7	15,9	0,9969	3,0	1,9	4,6	0,49
	2	9,6	20,5	0,9979	3,5			
β -3-5	1	10,9	23,5	0,9966	3,9	0,0	0,0	0,00
	2	10,9	23,5	0,9966	3,9			
β -2-7	1	13,0	30,9	0,9933	3,8	4,5	12,5	0,80
	2	17,5	43,3	0,9949	4,6			
β -3-7	1	10,1	20,7	0,9954	4,0	0,0	0,0	0,00
	2	10,1	20,7	0,9954	4,0			

Kolonna, Chirobiotic TAG; mozgófázis, 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 30/70 (v/v); $\Delta S^\circ = \Delta S^\circ + \ln \Phi$, ahol Φ a fázisarány reciproka;
 $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$; R^2 , korrelációs koeficiens a van't Hoff egyenlet, $\ln k' - 1/T$ ábrázolásánál

11. Táblázat Termodinamikai adatok, ΔH° , ΔS° , ΔG° , $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$, $\Delta(\Delta G^\circ)$ és korrelációs koefficiens (R^2) értékei Chirobiotic T, TAG és R kolonnákon

Vegyület	Kolonna	Sztereoizomer	$-\Delta H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta S^\circ$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	Korrelációs koefficiens, R^2	$-\Delta(\Delta H^\circ)$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta(\Delta S^\circ)$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$-\Delta(\Delta G^\circ)_{298K}$ (kJ mol ⁻¹)
γ -1	T	1	6,56	13,01	0,9914	0,00	0,00	0,00
		2	6,56	13,01	0,9914			
	TAG	1	7,86	15,09	0,9933	0,74	2,35	0,05
		2	8,60	17,44	0,9933			
	R	1	7,44	27,80	0,9995	1,77	5,04	0,29
		2	9,21	32,84	0,9997			
γ -2	T	1	7,79	19,58	0,9953	3,39	9,23	0,68
		2	11,17	28,81	0,9955			
	TAG	1	11,19	31,30	0,9942	5,99	15,35	1,49
		2	17,18	46,65	0,9974			
	R	1	9,28	35,22	0,9974	5,56	15,06	1,15
		2	14,84	50,29	0,9968			
γ -3	T	1	3,83	1,87	0,9924	1,71	4,92	0,27
		2	5,54	6,79	0,9934			
	TAG	2	5,80	4,44	0,9959	1,68	4,23	0,44
		1	7,48	8,67	0,9957			
	R	1	4,56	16,82	0,9909	1,74	5,53	0,12
		2	6,30	22,35	0,9912			

Kolonna, **T**, Chirobiotic T, **TAG**, Chirobiotic TAG; **R**, Chirobiotic R; mozgófázis, 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 40/60 (v/v); $\Delta S^\circ = \Delta S^\circ + \ln \Phi$, ahol Φ a fázisarány reciproka; $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$; R^2 , korrelációs koefficiens a van't Hoff egyenlet, $\ln k' - 1/T$ ábrázolásánál

5.2. Nem természetes β -aminosav enantiomerek elválasztása koronaéter alapú királis állófázisokon

Az irodalmi áttekintésben említett elfogadott nézet, miszerint a királis koronaéter állófázisok esetén a legfontosabb kölcsönhatás a gazda-vendég típusú koordináció a protonált primer aminocsoport, valamint a koronaéter gyűrűjét alkotó oxigén atomok között. Lee és munkatársai arra a megállapításra jutottak, hogy a (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav esetén, α -aminosavaknál az enantioszelektivitás a szelektor karboxilcsoportja, valamint a vegyületek karbonilcsoportjának oxigénjén keresztül valósul meg [102]. A β -2-aminosavak a meglévő funkciócsoportjaiknak köszönhetően, az elválasztáshoz szükséges másodlagos kölcsönhatások kialakítására képesek.

5.2.1. A mozgófázisbeli sav minőségének és mennyiségének hatása az elválasztásra

A királis koronaéter és az aminosav közti elsődleges kölcsönhatás kialakításához az aminosav primer aminocsoportjának protonálnak kell lennie. Abból a célból, hogy megvizsgálhassuk az alkalmazott sav hatását az elválasztás hatékonyságára, az alifás oldallánccal rendelkező β -2-4, valamint az aromás oldalláncot tartalmazó β -2-7 molekulákat választottuk modellként. Az eluenseket úgy készítettük, hogy vizes oldatban a MeOH tartalom 20 térfogatszázalék volt, míg a különböző savak koncentrációja minden esetben 10 mM. Az előbb említett vegyületek esetén a legnagyobb retenciós faktor értéket HCOOH és AcOH alkalmazása esetén tapasztaltuk, míg TFA, HClO₄ és H₂SO₄ esetén ezek az értékek kisebbnek adódtak. A szelektivitás és felbontás értékek számottevően nem változtak a sav minőségének változásával (**12. Táblázat**). A savak különböző savelőssége miatt (pK_{sav} eltérő), az azonos koncentrációban való alkalmazás eltérő pH-t eredményez a mozgófázisban. Ezért az elválasztásokat elvégeztük úgy is, hogy a pH-t állandó értéken tartottuk a H₂O/MeOH rendszerben. A szerves fázis jelenléte miatt ezek a mért adatok korrekcióra szorultak, melyeket Subirats és munkatársai munkája alapján számoltunk [103]. Az eredményeket vizsgálva megállapítható, hogy az állandó pH-n mért retenciós faktorok közötti eltérés kisebbnek bizonyult, valamint a legnagyobb értékek ez esetben a HClO₄-hez voltak rendelhetők.

12. Táblázat Kromatográfiás adatok, retenciós faktor (k'), szelektivitás (α) és a felbontás (R_S) értékei β -2-4 és β -2-7 vegyületek enantiomerjeinek közvetlen elválasztása során, koronaéter állófázison, változó mozgófázis összetételénél

Mozgófázis	Vegyület							
	β -2-4				β -2-7			
	k_1'	k_2'	α	R_S	k_1'	k_2'	α	R_S
20% MeOH+ 10 mM HCOOH (pH 3,03)	2,23	3,63	1,63	0,95	4,03	5,83	1,45	1,40
20% MeOH+ 10 mM AcOH (pH 3,54)	2,07	3,07	1,48	1,60	2,71	3,96	1,46	1,40
20% MeOH+ 10 mM TFA (pH 2,11)	1,00	1,61	1,61	1,85	1,91	2,47	1,29	1,25
20% MeOH+ 10 mM HClO ₄ (pH 2,10)	0,78	1,27	1,63	1,92	1,41	1,96	1,39	1,29
20% MeOH+ 10 mM H ₂ SO ₄ (pH 1,91)	0,86	1,38	1,60	2,00	1,60	2,15	1,34	1,60
20% MeOH+HCOOH (pH 3,99)	2,06	3,50	1,70	1,60	4,05	5,71	1,41	1,25
20% MeOH+AcOH (pH 3,98)	1,78	3,05	1,71	2,30	4,03	5,84	1,45	1,40
20% MeOH+ TFA (pH 3,96)	1,58	2,63	1,66	2,10	3,80	5,43	1,43	1,65
20% MeOH+ HClO ₄ (pH 3,95)	2,13	3,68	1,72	2,35	4,51	6,29	1,39	1,95
20% MeOH+H ₂ SO ₄ (pH 3,97)	2,09	3,33	1,60	1,80	3,65	5,73	1,47	2,95

Kolonna, (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav hosszú szénláncú karral; mozgófázis, H₂O/MeOH = 80/20 (v/v) + sav; áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

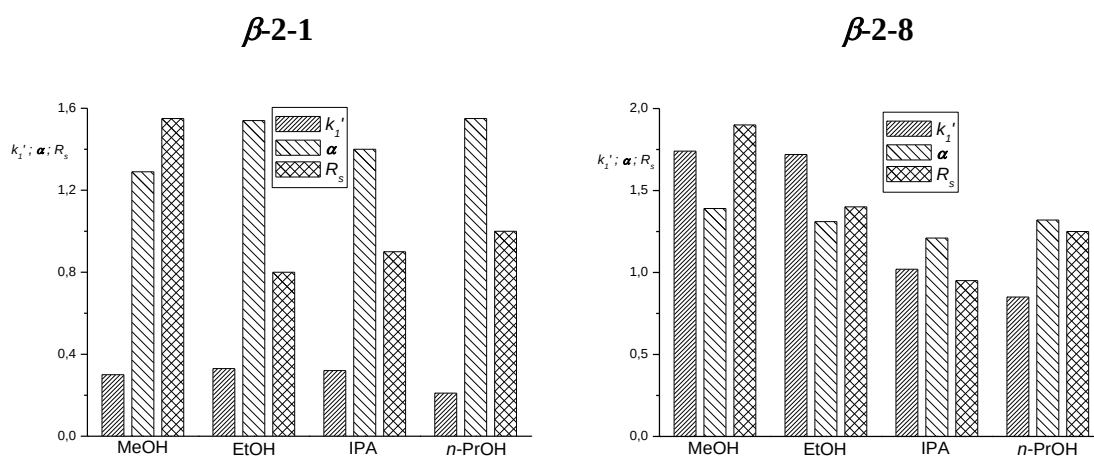
A kromatográfiás adatok változását a pH függvényében 50% (v/v) MeOH-t tartalmazó eluensben vizsgáltuk úgy, hogy jégecet segítségével különböző pH értékeket állítottunk be. A vizsgált vegyületek sora itt már szélesebb volt: β -2-1, β -2-4, β -2-6, β -2-7, β -2-8 és β -2-10. A pH-t 5,22-ről 3,65-re csökkentve azt tapasztaltuk, hogy a retenciós faktor értékek 70-80%-kal csökkentek. Az oszlopon való tartózkodási idő legnagyobb mértékben az alifás oldalláncot (β -2-1, β -2-4 és β -2-6) tartalmazó vegyületeknél csökkent. A savas módosító mennyiségének növelésével nőtt a mozgófázis ionerőssége, mellyel párhuzamosan csökkent a pH. Ezáltal erősödtek a hidrofíl kölcsönhatások az ionos vegyületek és mozgófázis között, mely végső soron a retenciós idők csökkenésben és a szelektivitási, valamint felbontás értékek kisebb mértékű változásában nyilvánult meg. A felbontás értékek csökkenése körülbelül 10-15%-ra volt tehető. Ez a megfigyelés éppen ellentétes a kutatócsoport egy korábbi koronaéter szelektoron végzett eredményével, ahol α és R_S növekedett a pH csökkenésével [104].

5.2.2. A mozgófázisbeli apoláris módosító (alkohol) minőségének és mennyiségének hatása az elválasztásra

A mozgófázisban lévő alkohol minőségének hatását olyan eluenssel vizsgáltuk, melyben az apoláris módosító MeOH, EtOH, *n*-PrOH és IPA volt. Ezekben a mozgófázisokban az egyes alkoholokra nézve a koncentrációt állandó értéken tartottuk (4,93 M), emellett a mozgófázis 10

mM AcOH-t is tartalmazott. A vizsgált vegyületek β -2-1, β -2-4, β -2-6, β -2-7, β -2-8, és β -2-10 voltak, melyek közül két minta eredményei kerültek szemléltetésre a 17. ábrán. Szabályszerűsége a retenciós faktor változása és az alkohol szénatomszáma között nem lehetett megállítani, a legnagyobb elúciós idő minden esetben a metanolhoz vagy etanolhoz volt köthető. Az alkoholok apoláris karaktere a MeOH<EtOH<PrOH<IPA sorrendben nő, ezáltal csökken a mozgófázis és a vegyület között kialakuló, poláris kölcsönhatás, mely végső soron a visszatartás növekedését kellene, hogy eredményezze. A „hosszú karral” rendelkező kolonnán ez a szabályszerűség nem volt megfigyelhető, de rövidebb „rögzítő karral” rendelkező kolonnán igen [57]. Ennek valószínű magyarázata az, hogy a nagyobb C-atomszámú alkoholok (PrOH, IPA) jobban szolvatálják a hosszú szénlánccal rendelkező állófázist, gátolva az aminosav-szelektor közti kölcsönhatást.

A különböző alkoholok nemcsak a visszatartást, hanem az enantioszelektivitást is nagymértékben befolyásolják. A szelektivitás változását befolyásolta a mintamolekula oldalláncának minősége is. Alifás oldalláncú vegyületek esetén általában a MeOH-hoz tartozott a legkisebb α . Az aromás oldalláncú vegyületek esetén minimum volt megfigyelhető ezen érték tekintetében, mely minimum a PrOH-hoz volt rendelhető. A felbontás értékek a szelektivitás értékeinek változását nem minden esetben követték. Az R_s értékek változásában szabályszerűség nem volt megállapítható.



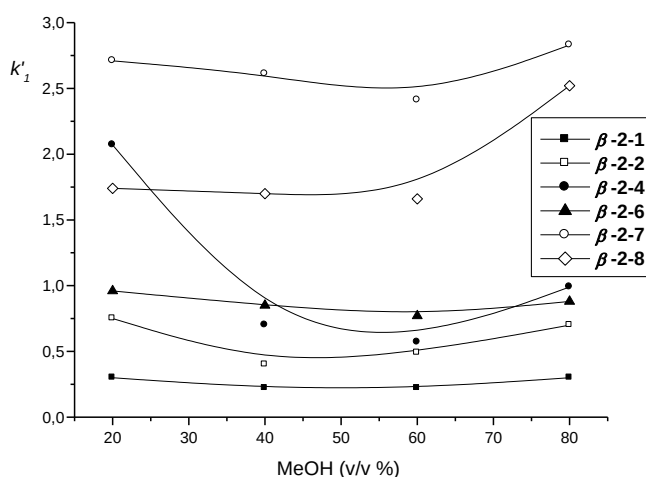
17. ábra Kromatográfias jellemzők (k_1' , α , R_s) változása az alkohol minőségétől függően

Kolonna, (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav hosszú szénláncú karral; mozgófázis, H₂O/apoláris módosító (alkohol; c=4,93 M)+ 10 mM AcOH; áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

A mozgófázis alkoholtartalmának hatását a kromatográfias adatokra, az alifás oldalláncúval rendelkező β -2-1, β -2-2, β -2-4 és β -2-6, valamint az aromás csoportot tartalmazó β -2-7 és β -2-8 molekulák esetén vizsgáltuk, különböző H₂O/MeOH (v/v) + 10 mM AcOH összetételű eluenseknél (18. ábra). Minden vizsgált molekula esetében a retenciós faktor változása a MeOH

tartalom függvényében minimumgörbe jellegű volt. A vizes fázisban gazdagabb eluens esetén, a vizes fázis mennyiségének növekedésével a retenciós faktor is növekedett a hidrofób kölcsönhatások hangsúlyosabbá válásával, mely jelleg a β -2-4 molekulánál volt a legmeghatározóbb. Ez a vegyület hosszú, lipofil jellegű alkilcsoporttal rendelkezik, mely viszonylag erős kölcsönhatásba léphet a szelektort rögzítő 11 metilén-csoportot tartalmazó karral, nagy víztartalmú eluensek esetén. A növekvő alkoholtartalom hatására a mozgófázis kevésbé poláris, egyre hidrofób jellegűvé válik. Ennek következtében a hidrofil kölcsönhatások, melyek a mozgófázis és a vegyület poláris funkciós csoportjai közt léptek fel, háttérbe szorultak, mely maga után vonta a retenciós faktor növekedését. Ebben az esetben is, mint ahogy a makrociklusos antibiotikum szelektorral rendelkező oszlopok esetén történt elválasztásoknál, a minimumgörbe inflexiós pontja, valamint a növekedés, illetve csökkenés meredeksége molekulánként változott [94, 95].

A szelektivitás és a felbontás változása eltérő volt az alifás és az aromás oldallánccal rendelkező vegyületek esetén. A telített alkilcsoportot tartalmazó mintáknál az α és R_S értékek kis mértékben növekedtek a MeOH mennyiségének növekedésével párhuzamosan, ellentétben az aromás molekulákkal, ahol kis mértékű csökkenés volt megfigyelhető.



18. ábra Retenciós faktor (k') változása az eluens összetétellel

Kolonna, (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav hosszú szénláncú karral; mozgófázis, $H_2O/MeOH$ (v/v) + 10 mM AcOH; áramlási sebesség, 0,5 ml $perc^{-1}$; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

5.2.3. A szerkezet-visszatartás kapcsolata β -aminosav enantiomerek elválasztása esetén

A kromatográfiás elválasztások során egy dinamikus egyensúly alakul ki, ahol időben az állófázissal kapcsolatot létesítő, a mozgófázist elhagyó és az oda visszatérő molekulák mennyisége állandó. Ez az egyensúly rendkívül érzékeny a különböző körülményekre, így természetesen a

vegyületek szerkezetére is.

H₂O/MeOH=80/20 (v/v) + 10 mM AcOH összetételű mozgófázisban vizsgáltuk a β -2-aminosavak kromatográfiás viselkedését (13. Táblázat). A β -2-1 - β -2-4 sorban az oldallánc szénatomszáma nő, mely által egyre jobban hidrofób jellegűvé válik a molekula. Ez elősegíti a hidrofób/sztérikus kölcsönhatások kialakulását a minta és a szelektor között, ami a retenciós faktor növekedésében nyilvánul meg. A viszonylag hosszú rögzítő kar a szelektor flexibilitását is növeli és az állófázis részéről is több lehetőséget teremt az apoláris kölcsönhatások kialakítására. A β -2-5 és β -2-6 esetén a nagyobb szénatomszám és hidrofóbicitás nem párosult nagyobb k' értékkel, melynek magyarázata az elágazó oldalláncra vezethető vissza. Ez a szerkezet, valószínűleg sztérikus okok miatt, csökkentette a kialakuló molekula-állófázis komplex stabilitását. A β -2-5 és β -2-6 összehasonlításánál a már korábban említett, β -2-6-ra jellemző nagyobb rugalmasság, hidrofóbicitás növeli az állófázissal való kölcsönhatást, így a β -2-6 molekulához nagyobb k' értékek voltak rendelhetőek.

13. Táblázat Kromatográfiás adatok, retenciós faktor (k'), szelektivitás (α) és a felbontás (R_s) értékei β -2-aminosavak enantiomerjeinek közvetlen elválasztása során

Vegyület	Kromatográfiás adatok		
	k'	α	R_s
β -2-1	0,30	1,29	1,55
β -2-2	0,75	1,60	1,40
β -2-3	1,30	1,70	1,65
β -2-4	2,07	1,27	1,55
β -2-5	0,84	1,45	1,50
β -2-6	0,94	1,28	1,55
β -2-7	2,71	1,46	1,40
β -2-8	1,74	1,39	1,90
β -2-9	2,00	1,41	1,60
β -2-10	7,10	1,53	1,74
β -2-11	6,20	1,55	1,60

Kolonna, (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav hosszú szénláncú karral; mozgófázis, H₂O/MeOH = 80/20 (v/v) + 10 mM AcOH; áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

Az aromás oldallánccal rendelkező β -2-7 - β -2-11 vegyületeket összehasonlítva a telített szénhidrogén láncot tartalmazókkal azt lehetett megállapítani, hogy ugyanolyan körülmények között tovább tartózkodtak az oszlopon. A vegyületek π karaktere a szelektor poláris csoportjaival kialakított, diszperziós, π - π , poláris kölcsönhatáson keresztül hozzájárult a retencióhoz, melyet a β -2-8 - β -2-11 minták esetében még a H-híd kialakításának lehetősége is elősegített. A nagy k' értékek a β -2-10 és β -2-11 vegyületek esetén az új apoláris molekularészletek jelenlété-

vel, ezáltal az apoláris kölcsönhatások kialakulásának lehetőségével magyarázhatók.

Az elúciós sorrend a β -2-1, β -2-2, β -2-5 és β -2-6 molekulák esetén ismert konfigurációjú enantiomertiszta minta injektálásával került meghatározásra. A megállapított elúciós sorrend: az (S)-enantiomer korábban eluálódott, mint az (R).

5.2.4. Hőmérséklet hatás és termodinamikai adatok

A hőmérséklet kromatográfiás adatokra kifejtett hatásának vizsgálatához, két állandó eluensösszetétel mellett, 7 °C és 40 °C hőmérsékleti tartományban végeztünk méréseket. A két mozgófázis $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = 80/20$ (v/v) + 10 mM AcOH és $\text{H}_2\text{O}/\text{IPA} = 62/38$ (v/v) + 10 mM AcOH volt, ami azt jelentette, hogy az eluensekben az alkohol koncentrációja 4,93 M.

A vizsgált hőmérséklettartományban, a hőmérséklet emelkedésével a k' és α értékek csökkentek, míg R_s értékek minden vegyületnél maximum görbe szerint változtak mindkét eluensben, ahol a maximum helye és a változás meredeksége mintánként eltérő volt (ezen eredmények nem kerülnek bemutatásra). Az eredmények magyarázata az 5.1.4. fejezetben részletes kifejtésre került.

A lejátszódó folyamatok jobb megértése érdekében a van't Hoff egyenletek (17, 21) segítségével termodinamikai adatokat határoztunk meg, előző irodalmi adatokra támaszkodva [105-107]. Az így meghatározott ΔH° és ΔS° értékek negatívak és ez elsőként eluálódott enantiomerhez az abszolút értékben kisebb adatsorok tartoztak (**14., 15. Táblázat**). Az alifás oldalláncú vegyületek (β -2-1 - β -2-4) esetén a $-\Delta H^\circ$ és $-\Delta S^\circ$ nőtt mindkét mozgófázis rendszerben az oldalláncok hosszúságával. Emellett megállapítottuk, hogy a MeOH tartalmú rendszerben ezek az adatok abszolút értékben kisebbnek adódtak egy vegyület esetén, mint az IPA-t tartalmazó eluensben. Valószínű, hogy a mintamolekula és a szelektor solvatációs viszonyai kedvezőbbek IPA tartalmú mozgófázisban az állófázissal kialakítandó kölcsönhatások szempontjából.

Az aromás csoportot tartalmazó minták esetén a termodinamikai jellemzők kissé negatívabban adódtak, mint az alkilcsoporttal rendelkező molekuláknál, ugyanakkor nagy különbség a két különböző mozgófázisnál nem volt megfigyelhető.

A $\Delta(\Delta H^\circ)$ és $\Delta(\Delta S^\circ)$ értékek az alifás oldalláncú vegyületek közül a β -2-4 molekula esetén voltak a legnegatívabbak, mindkét mozgófázisban. E szerint a kölcsönhatás a hosszú oldalláncot tartalmazó vegyület és a hosszú szénláncú karral rögzített koronaéter között nem csak a visszatartásra, hanem az enantioszelektivitásra is pozitívan hatott.

14. Táblázat Termodinamikai adatok, ΔH° , ΔS° , $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$, $\Delta(\Delta G^\circ)$ és korrelációs koefficiens (R^2) értékei (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav kolonnán

Vegyület	Sztereoizomer	$-\Delta H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta S^\circ$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	Korrelációs koefficiens, R^2	$-\Delta(\Delta H^\circ)$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta(\Delta S^\circ)$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$-\Delta(\Delta G^\circ)_{293K}$ (kJ mol ⁻¹)
<i>β-2-1</i>	1	11,8	42,4	0,9986	2,4	6,2	0,56
	2	14,2	48,6	0,9977			
<i>β-2-4</i>	1	16,4	47,7	0,9944	3,2	8,8	0,59
	2	19,6	56,5	0,9963			
<i>β-2-6</i>	1	19,9	56,4	0,9959	1,3	2,5	0,59
	2	21,2	58,9	0,9972			
<i>β-2-7</i>	1	20,0	60,8	0,9910	2,3	4,6	0,92
	2	22,3	65,4	0,9933			
<i>β-2-8</i>	1	7,5	51,7	0,9975	5,6	16,2	0,81
	2	13,1	67,9	0,9963			
<i>β-2-10</i>	1	26,2	79,0	0,9928	2,2	4,0	1,31
	2	28,4	83,0	0,9920			

Kolonna, (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav, „hosszú szénláncú karral”; mozgófázis, H₂O/MeOH = 80/20 (v/v) + 10 mM AcOH; áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; $\Delta S^\circ = \Delta S^\circ + \ln \Phi$, ahol Φ a fázisarány reciproka; $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$; R^2 , korrelációs koefficiens a van't Hoff egyenlet, $\ln k' - 1/T$ ábrázolásánál

15. Táblázat Termodinamikai adatok, ΔH° , ΔS° , $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$, $\Delta(\Delta G^\circ)$ és korrelációs koefficiens (R^2) értékei (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav kolonnán

Vegyület	Sztereoizomer	$-\Delta H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta S^\circ$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	Korrelációs koefficiens, R^2	$-\Delta(\Delta H^\circ)$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta(\Delta S^\circ)$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$-\Delta(\Delta G^\circ)_{293K}$ (kJ mol ⁻¹)
β-2-1	1	10,3	48,1	0,9969	3,0	6,5	1,07
	2	13,3	54,6	0,9985			
β-2-2	1	12,1	45,4	0,9985	2,1	3,2	1,17
	2	14,3	48,7	0,9988			
β-2-3	1	13,1	47,4	0,9927	4,6	10,2	1,60
	2	17,7	57,6	0,9974			
β-2-4	1	15,1	51,5	0,9983	5,3	12,0	1,80
	2	20,4	63,5	0,9995			
β-2-5	1	16,4	58,3	0,9985	2,2	3,1	1,27
	2	18,5	61,4	0,9989			
β-2-6	1	22,9	78,3	0,9986	2,9	3,7	1,82
	2	25,8	82,0	0,9990			
β-2-7	1	24,2	79,2	0,9973	3,3	7,5	1,09
	2	27,5	86,7	0,9977			
β-2-8	1	23,1	80,3	0,9957	1,3	2,1	0,68
	2	24,4	82,4	0,9966			
β-2-10	1	21,7	69,7	0,9995	6,7	19,0	1,14
	2	28,4	88,6	0,9995			

Kolonna, (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav, „hosszú szénláncú karral”; mozgófázis, H₂O/IPA = 62/38 (v/v) + 10 mM AcOH; áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; $\Delta S^\circ = \Delta S^\circ + \ln \Phi$, ahol Φ a fázisarány reciproka; $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$; R^2 , korrelációs koefficiens a van't Hoff egyenlet, $\ln k' - 1/T$ ábrázolásánál

A $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek alapján a telített szénhidrogén molekularészletet tartalmazó vegyületek esetén a $\text{H}_2\text{O}/\text{IPA} = 62/38$ (v/v) + 10 mM AcOH rendszer kedvezőbb az enantiomerek megkülönböztetése szempontjából, mint a MeOH tartalmú. A legnegatívabb $\Delta(\Delta G^\circ)$ adatok a **β -2-4** és a **β -2-6** molekulákhoz voltak rendelhetők, ami azt jelenti, hogy az apoláris és a szterikus kölcsönhatások jelentősen hozzájárulnak a királis felismeréshez.

Az aromás oldallánc esetén a $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = 80/20$ (v/v) + 10 mM AcOH eluens bizonyult hatásosabbnak a $\Delta(\Delta G^\circ)$ adatok alapján.

Összegezve, a vegyület-állófázis komplex kialakulását elősegítő intermolekuláris kölcsönhatások rendszerint exotermek és a hozzájuk tartozó enatrópiaváltozások is negatívak. A negatív $\Delta(\Delta G^\circ)$ érték a negatív $\Delta(\Delta H^\circ)$ értékből ered, mely alapján kijelenthető, hogy a vizsgált vegyületek elválasztása entalpiavezérelt volt [54].

5.3. β -Laktám enantiomerek elválasztása módosított poliszacharid alapú királis állófázisokon

Az eddigiekben tárgyalt elválasztások mind fordított fázisú (RP) körülmények közt valósultak meg. A β -laktám sztereoizomereket, apoláris oldószert tartalmazó, normál fázisú (NP) rendszerben sikerült elválasztani, amilóz *trisz*-(3,5-dimetilfenilkarbamát) alapú AmyCoat™ és cellulóz *trisz*-(3,5-dimetilfenilkarbamát) alapú AmyCoat™ oszlopokon.

A kísérletek során meghatározott kromatográfiás jellemzők egy részét a **16. Táblázat** tartalmazza, azon körülmények között, melyek a legeredményesebbek voltak az adott vegyületre nézve (összehasonlítás céljából néhány sikertelen elválasztás adatai is bekerültek a Táblázatba).

16. Táblázat Kromatográfiás adatok, retenciós faktor (k'), szelektivitás (α) és a felbontás (R_S) értékei β -laktám enantiomerek közvetlen elválasztása során

Vegyület	Mozgófázis	Kolonna	k'	α	R_S	Elúciós sorrend*
β -L-1	95/5	AmyCoat™	2,81	1,34	3,50	1R,5S
β -L-2	98/2	AmyCoat™	9,82	1,06	0,85	1R,6S
β -L-3	90/10	CelluCoat™	2,11	1,09	1,15	1S,6R
β -L-4	90/10	AmyCoat™	1,74	1,13	1,50	1S,6R
β -L-5	90/10	AmyCoat™	1,81	1,14	1,45	1S,7R
β -L-5	90/10	CelluCoat™	1,63	1,00	0,00	-
β -L-6	90/10	AmyCoat™	1,49	1,40	3,75	1S,8R
β -L-7	90/10	AmyCoat™	1,66	1,25	2,70	1S,6R
β -L-8	90/10	AmyCoat™	2,46	1,98	11,3	1S,5S
β -L-9	90/10	AmyCoat™	2,39	1,30	3,80	1S,6S
β -L-10	90/10	AmyCoat™	3,79	1,56	8,65	1S,7S
β -L-11	90/10	AmyCoat™	2,00	1,02	<0,20	-
β -L-11	90/10	CelluCoat™	1,24	1,15	1,55	1S,2R,5S,6R
β -L-12	90/10	AmyCoat™	1,95	1,07	0,80	1S,2S,5R,6R
β -L-12	90/10	CelluCoat™	1,47	1,13	1,50	1R,2R,5S,6S
β -L-13	95/5	CelluCoat™	5,72	1,05	1,30	R
β -L-14	90/10	CelluCoat™	2,55	1,20	2,80	R
β -L-15	90/10	AmyCoat™	2,01	1,21	2,75	S
β -L-16	90/10	AmyCoat™	2,33	1,00	0,00	-
β -L-16	90/10	CelluCoat™	3,33	1,12	1,85	S
β -L-17	90/10	AmyCoat™	2,55	1,13	1,80	R
β -L-17	90/10	CelluCoat™	3,64	1,00	0,00	-
β -L-18	90/10	AmyCoat™	2,43	1,09	1,25	R
β -L-18	90/10	CelluCoat™	3,67	1,06	1,15	R
β -L-18	95/5	CelluCoat™	6,74	1,09	1,60	R
β -L-19	90/10	AmyCoat™	2,60	1,15	2,15	R

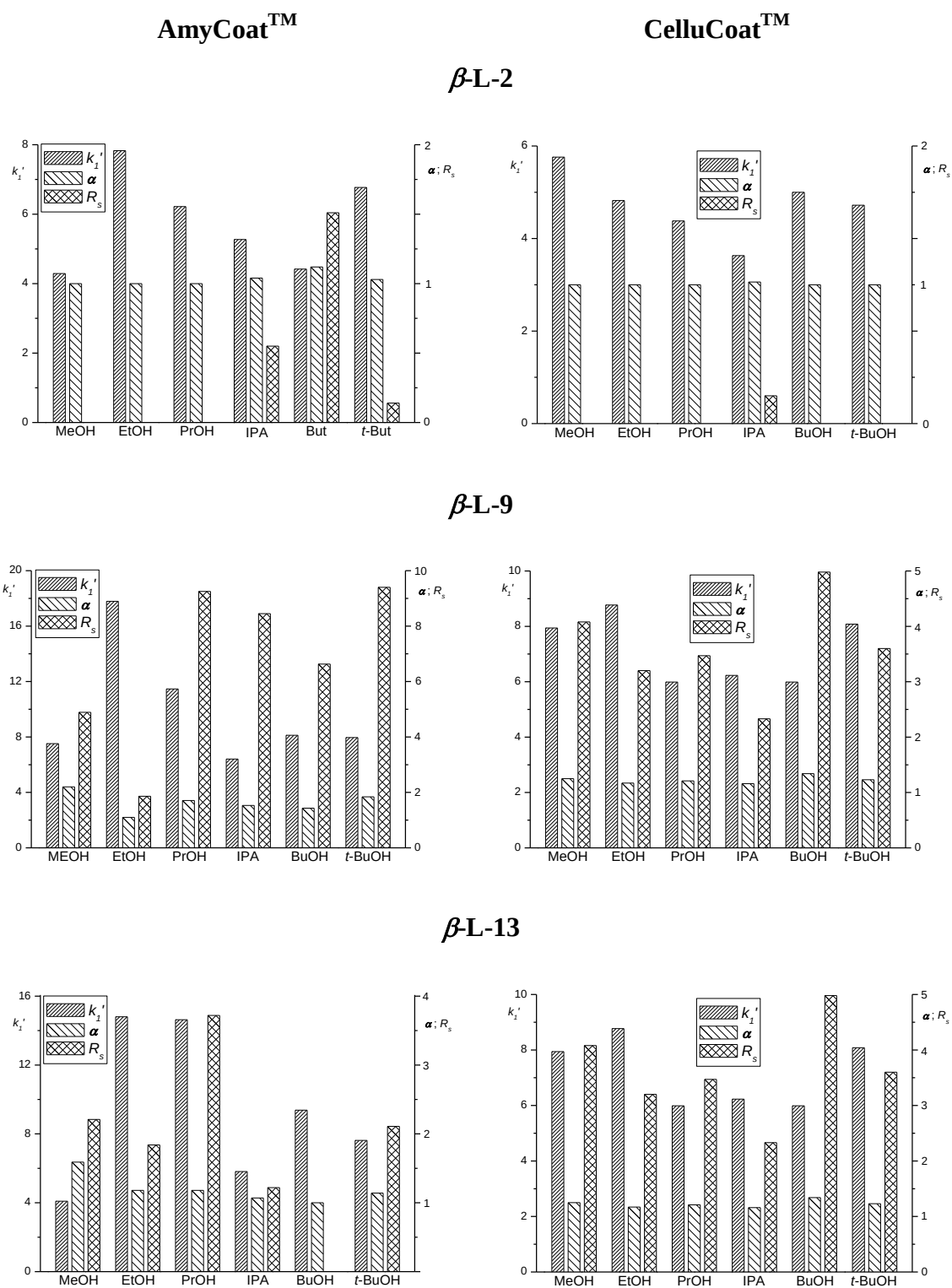
Kolonna, Kromasil AmyCoat™, Kromasil CelluCoat™; mozgófázis, *n*-heptán/IPA (v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 225 nm; * elsőként eluálódott enantiomer konfigurációja; hőmérséklet 25 °C

Az adatok alapján kijelenthető, hogy a módosított poliszacharid alapú kolonnák igen hatékonyan választják el egymástól a β -laktám enantiomereket, az amilóz és cellulóz oszlopok azonban nem voltak egyformán eredményesek. A CelluCoat kolonnán a β -L-1, β -L-2, β -L-4 - β -L-7, β -L-13 és β -L-1 minták elválasztása kevésbé volt sikeres, míg AmyCoat oszlop alkalmazása β -L-2, β -L-11, β -L-13, β -L-14 és β -L-16 molekulák esetén eredményezett rosszabb elválasztást. A körülmények helyes megválasztásával (eluensösszetétel, kolonna) a felsorolt vegyületek döntő többségénél ugyancsak sikerült az alapvonalra történő elválasztást megvalósítani.

Az eluensben alkalmazott alkohol nagymértékben befolyásolta a kromatográfiás viselkedést. Vizsgálataink kiterjedtek mind az alkohol minőségi mind mennyiségi változásának hatására is.

5.3.1. A mozgófázisbeli alkohol minőségének hatása a β -laktám enantiomerek elválasztására

Az eluensben alkalmazott alkohol minőségének hatását a *n*-hexán/alkohol összetételű elegyben vizsgáltuk úgy, hogy az alkohol koncentrációja minden esetben 0,39 M volt (19. ábra). A kromatográfiás adatokat tekintve semmilyen összefüggés nem volt megállapítható az eluenst alkotó alkohol szénatomszáma és a retenciós faktorok között. A két különböző állófázis esetén, MeOH jelenlétében lényegesen kisebb retenciós faktorok adódtak az amilóz alapú állófázison a cellulózhoz képest. A többi poláris módosító alkalmazása ilyen mértékű különbséget nem eredményezett az összes vizsgált vegyület adatait figyelembe véve. Az enantioszelektivitás (α), a különböző alkoholok használata esetén nem változott jelentősebb mértékben ($\alpha=1,0-1,3$). A fennálló csekély különbség Wang és Wenslow szerint abban rejlik, hogy a különböző alkoholok eltérő mértékben szolvatálják a királis szelektort (és a vegyületet is), mely befolyásolja azok fizikai és kémiai tulajdonságait [108]. A felbontást érzékenyen érinti a poláris módosító változtatása, de ezen változásban általános szabályszerűség nem volt megállapítható (19. ábra). Talán annyi, hogy azokban az esetekben, amikor a szelektor hatékony volt a sztereoizomerek elválasztásában, akkor általában a hosszabb szénláncú és elágazást tartalmazó (PrOH, BuOH és IPA, *t*-BuOH) alkoholok esetén nagyobb R_s értékeket kaptunk, amellet, hogy az α ugyanakkora vagy kisebb volt.

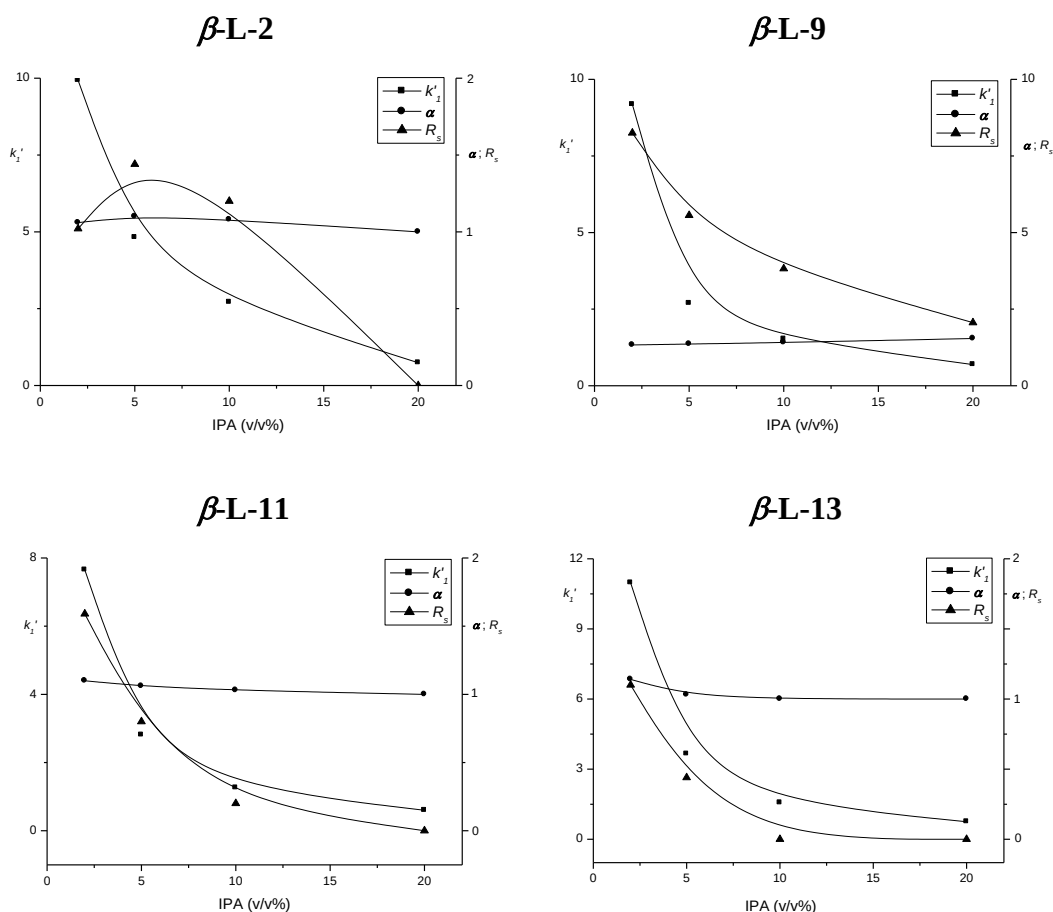


19. ábra Kromatográfias adatok az alkohol minőség függvényében

Kolonna, Kromasil AmyCoat™, Kromasil CelluCoat™; mozgófázis, *n*-heptán/poláris módosító (alkohol; $c=0,39$ M); áramlási sebesség, $0,5$ ml perc^{-1} ; detektálás, 225 nm; hőmérséklet, 25 °C

5.3.2. A mozgófázisbeli alkohol mennyiségének hatása a β -laktám enantiomerek elválasztására

A mozgófázisban lévő alkohol mennyiségének hatását AmyCoat oszlopon vizsgáltuk a *n*-heptán/IPA összetételű rendszerben (20. ábra). Az alkohol arányának növekedésével párhuzamosan a retenciós faktor nagymértékben csökkent, miközben a szelektivitás és felbontás értékei különféleképpen alakultak. Az α értékek viszonylagos állandóságot mutattak, értéküket az IPA mennyisége csak kis mértékben befolyásolta. Az R_s értékek a legtöbb esetben az oszlopon való tartózkodás idejével párhuzamosan változtak. Igaz, voltak ettől eltérő viselkedések is (pl.: a β -L-2 mintához tartozó felbontás értékek maximum görbe jelleggel változtak az alkohol mennyiségének növekedésével).



20. ábra Kromatográfias adatok változása az eluens összetétellel

Kolonna, Kromasil AmyCoatTM; mozgófázis, *n*-heptán/ IPA (v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 225 nm; hőmérséklet, 25 °C

Az oszlopon való tartózkodás ideje két összetevőből áll, ahogy már esett róla szó. Egyrészt az ún. nem enantioszelektív kölcsönhatásokból, melyek csak az enantiomerek retenciós idejét

növelik, de a szelektivitást nem, és az enantioszelektív kölcsönhatásokból, melyek eredményeként létrejön az enantiomerek elválasztása. Látható a 20. ábrán, hogy a szelektivitás csak kismértékben változott a különböző összetételű elegyek esetén, azaz az alkohol mennyisége döntően nem befolyásolja az enantioszelektivitást. Az általában csökkenő felbontás értékek az egyre szélesedő csúcsalakok rovására voltak írhatók.

5.3.3. Molekulaszerkezet-visszatartás összefüggések vizsgálata a β -laktám enantiomerek elválasztására

Néhány kiválasztott vegyület esetén vizsgáltuk a molekulaszerkezet-visszatartás kapcsolatát is. A tapasztalat az volt, hogy egy adott kolonnán egy adott eluens összetételénél a β -laktám gyűrűhöz kapcsolt telített/telítetlen gyűrű szénatomszámának növekedtével a retenciós faktor is rendszerint növekedett (**16. Táblázat**) [109]. Az AmyCoat királis oszlopon a β -L-11 és β -L-12 mintákhoz rendelhető k' értékek kissé nagyobbak, míg a CelluCoat oszlopon kisebbnek adódtak a β -L-5 molekulához képest, mely szintén héttagú kondenzált gyűrűt tartalmazott. Ez a viselkedés a szénhidrátlánc merev lináris (cellulóz alapú), vagy helikális (amilóz alapú) szerkezetének, valamint a szomszédos polimerláncok királis rendezettségében fennálló különbözőségnek (szupramolekuláris kiralitás) tulajdonítható [110]. A háromgyűrűs szerkezettel rendelkező β -L-11 és β -L-12 vegyületek sztérikusan jobban illeszkednek az amilóz üregeibe, mint a cellulózéba, ezáltal erősebb kölcsönhatás alakul ki az AmyCoat oszlopon, mely kölcsönhatás valószínűleg akirális, azaz a szelektivitást nem növeli (**16. Táblázat**).

A 3,5-dimetilfenilkarbamáttal módosított poliszacharid szelektorokra igaz, hogy a polimerlánc belsejében helyezkednek el a hidrofíl jellegű karbamátcsoportok, amíg a hidrofób aromás gyűrűk a külső részen. Az enantiomerek ezáltal H-kötéseket képesek létesíteni az $-NH$ - és a $-CO=$ csoportokkal, sőt ez utóbbival dipol-dipol kölcsönhatások is kialakíthatóak. A királis kromatográfiában hangsúlyos π - π kölcsönhatások lehetőségét a módosított fenilcsoportok teremtik meg.

A különböző vegyületekhez tartozó kromatográfiás adatokat vizsgálva kijelenthető, hogy azon vegyületek esetén, melyek kettős kötéssel vagy aromás rendszerrel rendelkeztek, azaz képesek voltak a π - π kölcsönhatások kialakítására, nagyobb visszatartást és a legtöbb esetben nagyobb szelektivitást és felbontást kaptunk. Ez az állítás az aromás gyűrűt tartalmazó mintákra méginkább jellemző volt.

Vizsgáltuk a halogén szubsztituensek szerepét is az elválasztás szempontjából. A fluor-klór-bróm halogén atomot tartalmazó β -L-15, β -L-18 és β -L-19 minták retenciós adatait vizsgálva

megállapítható, hogy a halogén méretének növekedésével párhuzamosan nőtt a visszatartás is, ellenben a legjobb felbontás értékek, mindkét szelektor esetén a fluor szubsztituenssel rendelkező vegyülethez voltak rendelhetők. Egy másik érdekes összehasonlítás tárgyát képezték a β -L-16, β -L-17 és β -L-18 minták, ahol a különbséget a klór atom helyzete jelenteti. A szerkezet befolyását a királis felismerésre jól jelzi, hogy a *para* helyzetben szubsztituált vegyületnél nem volt lényeges különbség a szelektivitásban és felbontásban a két szelektort vizsgálva, míg az *orto* helyzetű szubsztitúció esetén a CelluCoat oszlop, a *meta* helyzetű szubsztitúció esetén pedig az AmyCoat oszlop bizonyult hatékonyabbnak.

Minden esetben meghatároztuk az elúciós sorrendet is, szabályszerűség azonban nem volt megállapítható. Érdekeség, hogy a β -L-5, β -L-6, β -L-9, β -L-10 és β -L-12 minták esetén elúciósorrend-változás volt megfigyelhető az amilóz- illetve cellulóz-alapú kolonnákon.

Az itt tárgyalt megállapításokhoz tartozó adatok egy része csak közleményünkben található meg [109].

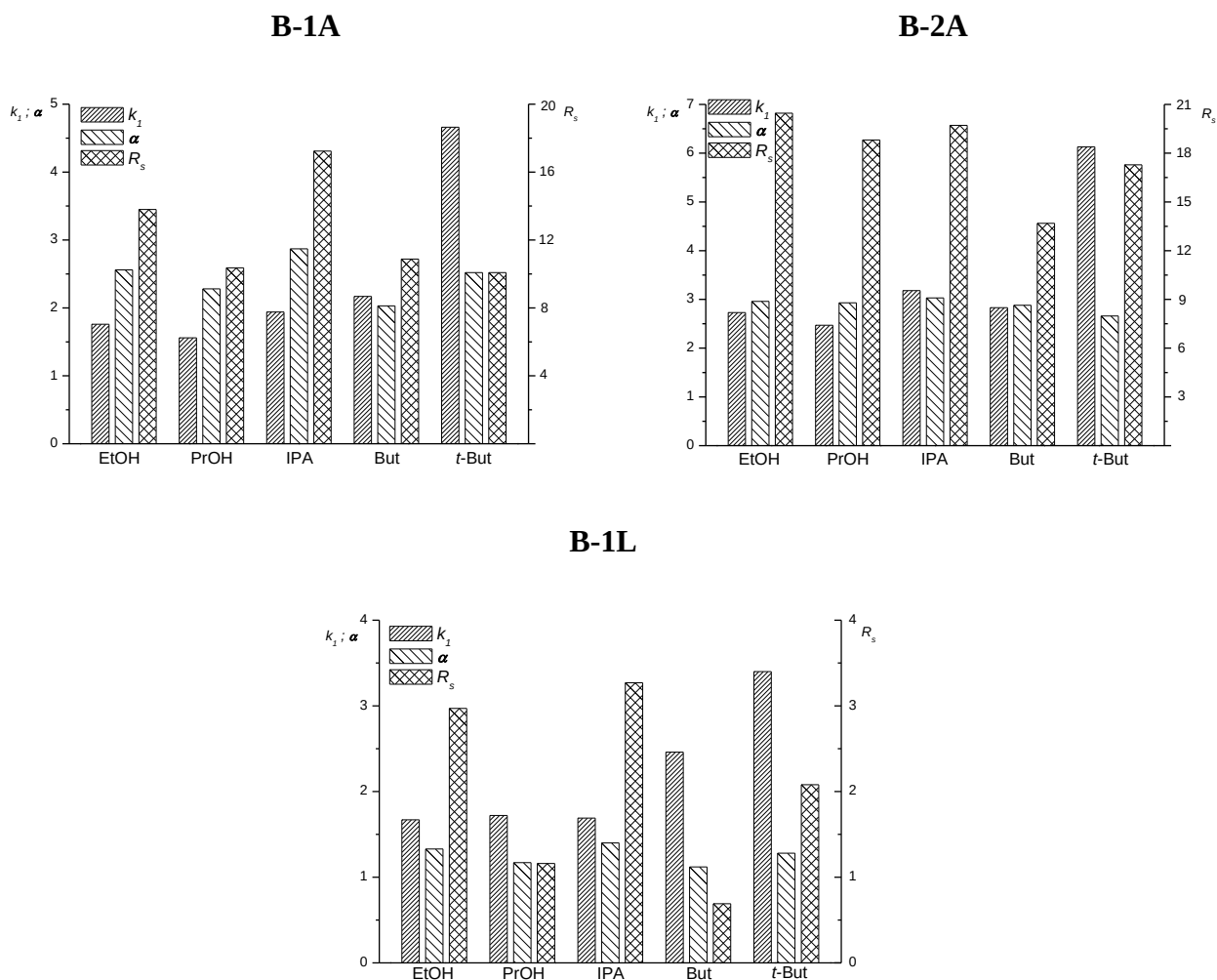
5.4. Egy királiscentrumot tartalmazó aminonaftol enantiomerek (Betti-bázisok) elválasztása módosított poliszacharid alapú királis állófázisokon

Célkitűzésünk ezen vegyületcsoport vizsgálata esetén is hasonló volt: a modell vegyületek enantiomerjeinek elválasztása, a kísérleti körülmények változásának hatása, az elválasztás lehetséges mechanizmusainak feltérképezése. Emellett össze kívántuk hasonlítani az azonos királis szelektorral- cellulóz *trisz*-(3,5-dimetilfenilkarbamát)-tal rendelkező, de más gyártótól származó Kromasil CelluCoat és Daicel Chiralcel OD-H oszlopok elválasztóképességét [111].

A vizsgált vegyületeinket (Betti-bázisok) két csoportba oszthatjuk az alapján, hogy a naftalin gyűrű mely szénatomja szubsztituált az –OH csoporttal. Ennek alapján megkülönböztetünk 2-naftol analógokat, melyek az 1-es csoportba kaptak besorolást és 1-naftol analógokat, melyek a 2-es csoportot képezik (**4.1. fejezet**). A Betti bázis enantiomerek elválasztását a már említett két kolonnán, normál fázisú körülmények között *n*-heptánt vagy *n*-hexánt valamint poláris módosítót (MeOH, EtOH, PrOH, IPA, BuOH vagy *t*-BuOH) tartalmazó mozgófázissal vizsgáltuk, mely kis mennyiségben DEA-t is tartalmazott a csúcsalak szimmetrikusabbá tétele érdekében.

5.4.1. A mozgófázisbeli alkohol minőségének hatása Betti-bázis enantiomerek elválasztására

Az elválasztás optimalizálása érdekében vizsgáltuk a mozgófázisbeli alkohol minőségének és mennyiségének hatását. A mozgófázisbeli alkohol minőségének hatása az elválasztásra, a 21. ábrán kerül szemléltetésre. A vizsgálat során úgy jártunk el, hogy a poláris módosító (alkohol) koncentrációját állandó értéken (2,6 M) tartottuk a *n*-hexán/alkohol/DEA mozgófázis rendszerben. Az elsőként eluálódó enantiomerhez rendelhető k_1 értékek a **B-1A**, **B-2A** és **B-1L** vegyületek esetén nőttek az alkohol szénatomszámának növekedtével, különösen abban az esetben amikor az alkohol elágazó láncot tartalmazott. A legnagyobb retenciót az IPA, BuOH és *t*-BuOH alkalmazása esetén kaptuk.



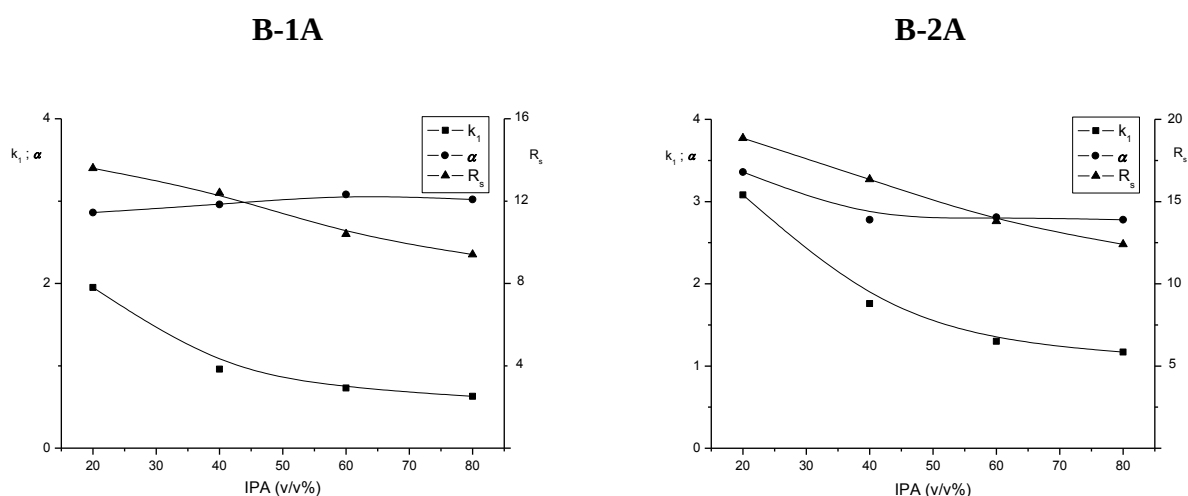
21. ábra Kromatográfias adatok **B-1A**, **B-2A** és **B-1L** Betti-bázis enantiomerek elválasztása esetén különböző alkoholok jelenlétében

Kolonna, Kromasil CelluCoat™; mozgófázis, *n*-heptán/poláris módosító (alkohol; $c=2,6$ M)/DEA (v/v); áramlási sebesség, $0,5 \text{ ml perc}^{-1}$; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25°C

Ennek valószínű magyarázata, hogy az alkoholok apoláris jellege az EtOH<PrOH<IPA<BuOH<*t*-BuOH sorban nő és ez előnytelen a minta és a mozgófázis között kialakuló poláris kölcsönhatásokra szempontjából. Ezáltal a minta „szívesebben” tartózkodik az állófázison, mely a retenciós idő növekedésével jár. Ezt a jelenséget az alkohol elágazó szerkezete (IPA, *t*-BuOH) szterikus okokra visszavezethetően hangsúlyosabbá tette. A poláris módosító természetesen a királis és nem királis kölcsönhatások arányát is befolyásolhatja, hatást gyakorolva a szelektivitásra és felbontásra is. A legtöbb esetben az IPA bizonyult a leghatékonyabbnak az elválasztás szempontjából, ezért a továbbiakban kísérleteinkhez IPA-t választottunk poláris módosítónaként.

5.4.2. A mozgófázisbeli alkohol mennyiségének hatása Betti-bázis enantiomerek elválasztására

Az alkohol mennyiségének változása a *n*-hexán/IPA/DEA mozgófázis rendszerben nagymértékben befolyásolta a kromatográfiás viselkedést (22. ábra). A példaként bemutatott **B-1A** és **B-2A** molekulák esetén a CelluCoat kolonnán a k' értéke csökkent a növekvő alkohol tartalom hatására (jellegzetes normál fázisú viselkedés), miközben a szelektivitás és felbontás változása eltérő volt. Meg kell jegyezni, hogy mindkét királis állófázis (CelluCoat és Chiralcel OD-H) szokatlanul hatékony volt ezen családba tartozó vegyületek elválasztására (nagy α és R_s értékek) (17., 18. Táblázat). A reteniós idő csökkentése (tehát az alkohol mennyiségének növelése az eluensben) lehetőséget adott rövidebb, gazdaságosabb, környezetkímélőbb analízisek kidolgozására.



22. ábra Kromatográfiás adatok változása az eluensösszetétellel

Kolonna, Kromasil CelluCoatTM; mozgófázis, *n*-heptán/IPA/DEA (v/v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

5.4.3. A CelluCoat és Chiralcel OD-H oszlopok elválasztóképességének összehasonlítása Betti-bázis enantiomerek elválasztása során

A CelluCoat és Chiralcel OD-H oszlopok összehasonlításához azonos eluensösszetétel mellett [(n-heptán/IPA/DEA 40/60/0,1) (v/v/v)] hajtottunk végre kísérleteket, melynek eredményeit a **17., 18. Táblázat** tartalmazza.

Az elsőként eluálódó enantiomer retenciós faktora (k_1') azonos eluensösszetételnél kisebb volt a CelluCoat kolonnán, mindkét vegyületcsoport esetén (**17., 18. Táblázat**). Ez a megállapítás a másodikként eluálódó enantiomer esetében (k_2') már módosult. A 2-naftoloknál kisebb, míg az 1-naftoloknál nagyobb volt az oszlopon való tartózkodási idő CelluCoat esetén a Chiralcel OD-H-hoz viszonyítva (kivétel: **B-2H**, **B-2J** és **B-2K**). A szelektivitás ennek megfelelően a 2-naftolok esetén a Chiralcel OD-H-n, míg az 1-naftoloknál a CelluCoat oszlopon adódott nagyobbak (kivétel: **B-2K**). A szimmetrikusabb csúcsalaknak köszönhetően a felbontás minden esetben a CelluCoat kolonnán bizonyult nagyobbak.

17. Táblázat Kromatográfiás jellemzők, retenciós faktorok (k'), szelektivitás (α) és a felbontás (R_S) értékei Betti-bázis enantiomerek közvetlen elválasztása során

Vegyület	Kolonna	k_1'	k_2'	α	R_S
B-1A	CelluCoat	0,74	2,22	2,97	11,2
	OD-H	0,75	2,51	3,35	4,15
B-1B	CelluCoat	0,70	1,96	2,80	9,30
	OD-H	0,71	2,25	3,17	8,10
B-1C	CelluCoat	0,98	2,39	2,43	8,90
	OD-H	0,98	2,73	2,79	8,00
B-1D	CelluCoat	0,67	2,01	3,00	10,9
	OD-H	0,68	2,33	3,43	9,00
B-1E	CelluCoat	0,73	2,11	2,87	9,30
	OD-H	0,75	2,43	3,24	8,45
B-1F	CelluCoat	0,79	2,21	2,80	9,90
	OD-H	0,81	2,55	3,15	8,60
B-1G	CelluCoat	1,11	2,57	2,31	9,25
	OD-H	1,17	2,98	2,55	6,65
B-1H	CelluCoat	0,80	2,03	2,53	9,25
	OD-H	0,81	2,29	2,83	7,90
B-1I	CelluCoat	1,07	2,13	1,97	6,70
	OD-H	1,07	2,32	2,17	5,35
B-1J	CelluCoat	0,84	2,09	2,49	9,25
	OD-H	0,89	2,55	2,87	8,50
B-1K	CelluCoat	0,85	2,14	2,52	8,60
	OD-H	0,90	2,49	2,77	7,70
B-1L	CelluCoat	0,71	1,00	1,41	2,05
	OD-H	0,72	1,07	1,49	1,95
B-1M	CelluCoat	0,65	0,99	1,53	3,00
	OD-H	0,67	1,07	1,59	2,40
B-1N	CelluCoat	0,63	1,01	1,60	3,15
	OD-H	0,65	1,08	1,67	3,00
B-1O	CelluCoat	0,60	1,01	1,68	2,95
	OD-H	0,62	1,09	1,76	2,90
B-1P	CelluCoat	0,55	1,00	1,82	4,30
	OD-H	0,57	1,06	1,86	3,70

Kolonna, Kromasil CelluCoat™, Daicel Chiralcel OD-H mozgófázis, *n*-heptán/IPA/DEA 40/60/0,1 (v/v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

18. Táblázat Kromatográfiás jellemzők, retenciós faktorok (k'), szelektivitás (α) és a felbontás (R_s) értékei Betti-bázis enantiomerek közvetlen elválasztása során

Vegyület	Kolonna	k_1'	k_2'	α	R_s
B-2A	CelluCoat	1,39	4,00	2,87	13,40
	OD-H	1,43	3,96	2,77	9,95
B-2B	CelluCoat	1,39	3,14	2,25	8,70
	OD-H	1,45	3,12	2,15	7,45
B-2C	CelluCoat	1,95	3,31	1,70	7,10
	OD-H	1,98	3,19	1,61	5,10
B-2D	CelluCoat	1,07	2,36	2,20	8,45
	OD-H	1,09	2,26	2,07	6,45
B-2E	CelluCoat	1,32	2,62	1,98	8,00
	OD-H	1,39	2,59	1,86	5,75
B-2F	CelluCoat	1,44	2,88	2,00	8,55
	OD-H	1,52	2,86	1,88	5,40
B-2H	CelluCoat	1,39	3,81	2,74	13,4
	OD-H	1,44	3,91	2,72	9,95
B-2I	CelluCoat	1,63	2,71	1,66	5,30
	OD-H	1,67	2,69	1,61	4,30
B-2J	CelluCoat	1,28	2,77	2,16	8,30
	OD-H	1,40	2,96	2,11	6,35
B-2K	CelluCoat	1,37	2,66	1,94	8,40
	OD-H	1,57	3,13	1,99	7,15

Kolonna, Kromasil CelluCoat™, Daicel Chiralcel OD-H mozgófázis, *n*-heptán/IPA/DEA 40/60/0,1 (v/v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

5.4.4. Molekulaszerkezet-kromatográfiás viselkedés összefüggése Betti-bázis enantiomerek elválasztása során

A vegyületek szerkezetének hatását a kromatográfiás elválasztásra röviden az alábbiakban foglalhatjuk össze. A **17. és 18. Táblázat** adatai alapján az 1-naftol analógok esetén nagyobb retenciós faktor értékek kisebb szelektivitással párosultak, az ugyanazzal a szubsztituenssel rendelkező 2-naftol analógokhoz viszonyítva. Ennek valószínű oka, hogy a szelektor-mintamolekula komplex kialakulása abban az esetben, amikor a hidroxilcsoport a naftil gyűrűn a 1-es helyzetben található inkább akirális kölcsönhatások révén valósul meg, mely eredményeként nagyobb

visszatartást tapasztalunk, kisebb szelektivitással.

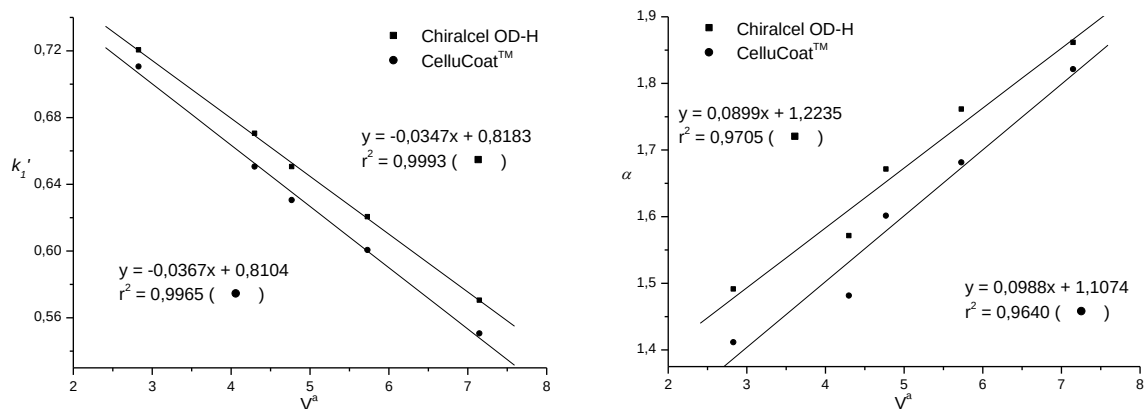
Az aromás gyűrűn lévő metil- és metoxi-szubsztituensek (**B-1B**, **B-1C**, **B-2B** és **B-2C**) hatása a kromatográfiás adatokra az alapvegyületekhez (**B-1A** és **B-2A**) képest csekély volt. A metil- és metoxicsoporthok is csak kis mértékben növelték az oszlopon való tartózkodás idejét. Valószínűsíthető, hogy ezek a funkciós csoportok csak kis mértékben vesznek részt a kölcsönhatások kialakításában.

A halogén szubsztituensek már érzékelhetőbb változást idéztek elő. A fluor, klór, bróm sorban nőtt a k' értéke, valószínűleg egyrészt szterikus okak miatt, hiszen ebben a sorban nagymértékben nő a szubsztituens térkitöltése, másrészt a molekula polarizálhatósága is növekszik. Az erős elektronvonzó nitrocsoporth π -savas karaktert kölcsönöz a molekulának, mely ezáltal erősebb kölcsönhatás kialakítására képes π -bázis jellegű szelektorral. Ennek eredményeként a **B-1I** és **B-2I** vegyületek retenciós faktora a legnagyobb a vizsgált analógok között, ami viszont nem párosult a szelektivitás és a felbontás növekedésével.

A kén atomot tartalmazó heteroaromás gyűrű a molekulában (**J** és **K** analógok) kismértékben befolyásolta a kromatográfiás paramétereket. A k_1' értéke itt is nagyobb volt az 1-naftol analógoknál, míg kisebb a 2-naftol analógok esetén, viszont az alapvegyületekhez képest (**B-1A** és **B-2A**) a 2-naftol analógok visszatartása volt nagyobb. A kén atom helyzete az aromás gyűrűben csekély hatással volt a retencióra és szelektivitásra.

A különböző alkilcsoportok jelenléte a **B-1L** – **B-1P** analógokban (**4.1. fejezet**) ugyancsak módosították az alapvegyülethez képest a kromatográfiás adatokat. A retenciós faktor értékei hasonló tartományban mozogtak, mint az aromás oldallánccal rendelkező minták esetén, ellenben a szelektivitás és felbontás értékek látványosan kisebbek voltak azonos eluensösszetétel mellett. Ez ismételten csak a π - π kölcsönhatások fontosságát hangsúlyozza a normál fázisú királis kromatográfiában.

Annak megállapítására, hogy az alkilcsoportok térkitöltése, szterikus jellemzője milyen befolyással bír az elválasztásra és az elválasztást jellemző adatokra, a k_1' és α értékeket a Meyer (V^a) paraméter függvényében ábrázoltuk, mely paraméter egy, az alkilcsoport méretével arányos faktor [112]. Mindkét kolonnán azonos, *n*-heptán/IPA/DEA = 40/60/0,1 (v/v/v), eluensösszetétel mellett jó illesztéssel egyeneseket kaptunk (23. ábra). Ezen eredmények alapján kijelenthető, hogy a szelektivitás, de főleg a retenciós faktor értéke függ az alkilcsoport térkitöltésétől. A nagyobb szubsztituens gátolja a komplex kialakulását, ezáltal csökkenti a visszatartást.



23. ábra Retenciós faktor és szelektivitás ábrázolása a Meyer paraméter függvényében

Kolonna, Kromasil CelluCoat™, Daicel Chiralcel OD-H mozgófázis, *n*-heptán/IPA/DEA 40/60/0,1 (v/v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

A **B-1A** és **B-10** vegyületek esetén meghatároztuk az elúciós sorrendet is és mindkét esetben (S)<(R) volt. Valószínűsíthető, hogy ugyanazon kísérleti körülmények között a többi Betti-bázis minta enantiomerjeinek elúciós sorrendje is ez.

5.5. Két kiralitáscentrumot tartalmazó aminonaftol sztereoisomerek elválasztása módosított poliszacharid alapú királis állófázisokon

A két aszimmetria-centrummal rendelkező aminonaftolokat potenciális gyógyszerhatóanyagként tartják számon, mint ahogy arról az Irodalmi áttekintés című fejezetben esett szó. Centrálisan királis vegyületek esetén a sztereoisomerek száma 2^n , ahol az *n* az aszimmetriacentrumok számát jelenti. Ebből adódóan az általunk vizsgált aminonaftolok négy lehetséges sztereoisomert tartalmaznak, melyek közül 2-2 enantiomer viszonyban áll egymással. Ezek a párosítások: *R,R* – *S,S* és *R,S* – *S,R*. A többi összehasonlításban a különböző konfigurációk egymás diasztereomerjei. Ezen diasztereomerek fizikai és kémiai tulajdonságai különbözőek, azaz akirális oszlopon is elválaszthatóak egymástól. A fent említett enantiomerpárok elválasztásához viszont királis környezet szükséges.

A két kiralitáscentrummal rendelkező aminonaftolok elválasztásához- a már meglévő tapasztalatunk alapján- módosított poliszacharid királis szelektorral rendelkező állófázisokat (Kromasil CelluCoat, AmyCoat) és *n*-heptán/alkohol (MeOH, EtOH, PrOH, IPA, BuOH és *t*-BuOH)/DEA mozgófázist alkalmaztunk. Eredményeinket a **19. Táblázatban** foglaltuk össze. Az egyszerűség kedvéért a táblázat nem tartalmazza az összes mérési adatot, csak azokat, amelyeknél alapvonal-

ra történő vagy legalább részleges elválasztás volt tapasztalható, illetve összehasonlítás céljából néhány olyan körülményt, ahol nem volt sikeres az elválasztás [113].

5.5.1. A mozgófázisbeli alkohol minőségének és mennyiségének hatása aminonaftol analógok királis elválasztására

A mozgófázisbeli alkohol minőségének hatását a CelluCoat oszlopon vizsgálatuk, 2 térfogat% alkoholt (MeOH, EtOH és IPA) tartalmazó mozgófázisok használatával (**19. Táblázat**). A MeOH-t, EtOH-t és IPA-t tartalmazó eluensek esetén a legnagyobb k_1' értékeket általában IPA tartalmú eluensekben mértük, kivételek ez alól az **A-2a-d** analógok voltak, melyek MeOH tartalmú eluensben mutatták a legnagyobb visszatartást. EtOH-t tartalmazó rendszerben a k_1' értékek általában nagyobbak voltak, mint a MeOH-t tartalmazó eluensekben, kivételt képeztek **A-1c-d**, **A-2a-d** és **A-3a-b** analógok. Mindemellett a szelektivitási faktor a legtöbb esetben az IPA-t tartalmazó eluens alkalmazása esetén volt a legnagyobb. A kisebb szénatomszámú alkoholok kevésbé segítik elő a királis kölcsönhatásokat, a BuOH és *t*-BuOH pedig nagyobb viszkozitása miatt kevésbé előnyös. Azokban az esetekben, amikor legalább részleges elválasztás volt tapasztalható, a nagyobb szénatomszámú és elágazó oldalláncú alkoholok nagyobb R_s értéket eredményeztek.

Az alkohol mennyiségének növelésével tipikus normál fázisú viselkedés volt tapasztalható, azaz az eluens erősségének növekedésével csökkent a sztereoizomerek oszlopon való tartózkodásának ideje. Az **A-1a-d** és **A-2a-b** minták kivételével a retenciósfaktor csökkenése az α és R_s értékek csökkenésével párosult az IPA mennyiségének 2%-ról 20%-ra való növelése esetén. A *n*-heptán/IPA/DEA = 98/2/0,1 (v/v/v) eluensösszetétel a legtöbb esetben hatékonynak bizonyult, míg ugyanezen összetételnél az **A-1a-b** és **A-3a-d** mintáknál csak részleges elválasztást tapasztaltunk.

19. Táblázat Kromatográfiás jellemzők, retenciós faktor (k'), szelektivitás (α) és a felbontás (R_s) értékei aminonaftol analógok sztereoisomerjeinek közvetlen elválasztása során

Vegyület	Kolonna	Mozgófázis				Elúciós	
		(v/v/v)	k_1'	k_2'	α	R_s	sorrend
A-1a-b	CelluCoat	80/20/0,1, a	0,52	0,58	1,12	0,40	a<b
	CelluCoat	95/5/0,1, b	0,87	0,94	1,08	0,50	a<b
	CelluCoat	98/2/0,1, c	1,26	1,33	1,06	0,60	a<b
	CelluCoat	98/2/0,1, d	1,06	1,17	1,10	0,55	a<b
	CelluCoat	98/2/0,1, e	0,98	1,08	1,10	1,05	a<b
	AmyCoat	95/5/0,1, b	1,02	1,14	1,12	1,15	a<b
A-1c-d	CelluCoat	80/20/0,1, a	0,61	0,74	1,21	0,70	d<c
	CelluCoat	95/5/0,1, b	1,00	1,18	1,18	0,85	d<c
	CelluCoat	98/2/0,1, c	1,49	1,76	1,18	2,10	d<c
	CelluCoat	98/2/0,1, d	0,91	0,91	1,00	0,00	d=c
	CelluCoat	98/2/0,1, e	1,19	1,33	1,18	1,60	d<c
	AmyCoat	95/5/0,1, b	1,49	2,74	1,84	8,75	d<c
A-2a-b	CelluCoat	80/20/0,1, a	0,94	1,74	1,85	3,55	a<b
	CelluCoat	95/5/0,1, b	1,68	2,89	1,72	5,40	a<b
	CelluCoat	98/2/0,1, c	2,74	4,63	1,69	5,50	a<b
	CelluCoat	98/2/0,1, d	2,02	3,44	1,70	6,85	a<b
	CelluCoat	98/2/0,1, e	5,89	7,26	1,23	5,70	a<b
	AmyCoat	95/5/0,1, b	0,95	1,19	1,25	2,60	b<a
	AmyCoat	99/1/0,1, c	2,27	2,95	1,30	4,25	b<a
A-2c-d	CelluCoat	80/20/0,1, a	0,94	1,17	1,24	1,10	nd
	CelluCoat	95/5/0,1, b	1,81	2,50	1,38	3,75	nd
	CelluCoat	98/2/0,1, c	2,97	4,16	1,40	3,79	nd
	CelluCoat	98/2/0,1, d	2,33	2,91	1,25	3,30	nd
	CelluCoat	98/2/0,1, e	6,10	7,03	1,15	3,85	nd
	AmyCoat	95/5/0,1, b	1,26	1,93	1,53	4,10	nd
	AmyCoat	99/1/0,1, b	3,29	5,17	1,57	8,00	nd

Kromatográfiás körülmények: mozgófázis, **a**, *n*-heptán/IPA/DEA = 80/20/0,1 (v/v/v), **b**, *n*-heptán/IPA/DEA = 95/5/0,1 (v/v/v), **c**, *n*-heptán/IPA/DEA = 98/2/0,1 (v/v/v), **d**, *n*-heptán/EtOH/DEA = 98/2/0,1 (v/v/v), **e**, *n*-heptán/MeOH/DEA = 98/2/0,1 (v/v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; nd, nem meghatározott; hőmérséklet 25 °C

19. Táblázat (folytatás) Kromatográfiás jellemzők, retenciós faktor (k'), szelektivitás (α) és a felbontás (R_s) értékei aminonaftol analógok sztereoizomerjeinek közvetlen elválasztása során

Vegyület	Kolonna	Mozgófázis				Elúciós	
		(v/v/v)	k_1'	k_2'	α	R_s	sorrend
A-3a-b	CelluCoat	80/20/0,1, a	0,42	0,45	1,07	0,20	a<b
	CelluCoat	95/5/0,1, b	0,59	0,66	1,12	0,70	a<b
	CelluCoat	98/2/0,1, c	1,72	1,86	1,08	0,90	a<b
	CelluCoat	98/2/0,1, d	0,71	0,78	1,10	0,50	a<b
	CelluCoat	98/2/0,1, e	1,46	1,51	1,03	0,25	b<a
	AmyCoat	95/5/0,1, b	1,39	1,61	1,16	1,75	b<a
A-3c-d	CelluCoat	80/20/0,1, a	0,83	0,83	1,00	0,00	c=d
	CelluCoat	95/5/0,1, b	0,97	1,03	1,06	0,45	c<d
	CelluCoat	98/2/0,1, c	1,00	1,11	1,11	1,00	c<d
	CelluCoat	98/2/0,1, d	1,13	1,18	1,04	0,25	d<c
	CelluCoat	98/2/0,1, e	0,91	1,00	1,10	0,90	d<c
	AmyCoat	95/5/0,1, b	0,81	0,93	1,15	1,10	c<d
A-4a-b	CelluCoat	80/20/0,1, a	1,10	1,81	1,64	4,30	b<a
	CelluCoat	95/5/0,1, b	3,61	6,67	1,85	10,0	b<a
	CelluCoat	98/2/0,1, c	5,76	11,97	2,08	10,65	b<a
	CelluCoat	98/2/0,1, d	4,92	7,86	1,60	8,50	b<a
	CelluCoat	98/2/0,1, e	4,04	4,98	1,23	3,90	b<a
	AmyCoat	95/5/0,1, b	3,07	3,28	1,07	0,80	a<b
A-4c-d	CelluCoat	80/20/0,1, a	1,50	1,81	1,21	1,90	c<d
	CelluCoat	95/5/0,1, b	5,64	7,56	1,34	5,50	c<d
	CelluCoat	98/2/0,1, c	9,42	13,81	1,47	5,95	c<d
	CelluCoat	98/2/0,1, d	8,32	10,26	1,23	3,90	c<d
	CelluCoat	98/2/0,1, e	5,97	6,81	1,14	2,90	c<d
	AmyCoat	95/5/0,1, b	3,62	4,30	1,19	1,45	c<d

Kromatográfiás körülmények: mozgófázis, **a**, *n*-heptán/IPA/DEA = 80/20/0,1 (v/v/v), **b**, *n*-heptán/IPA/DEA = 95/5/0,1 (v/v/v), **c**, *n*-heptán/IPA/DEA = 98/2/0,1 (v/v/v), **d**, *n*-heptán/EtOH/DEA = 98/2/0,1 (v/v/v), **e**, *n*-heptán/MeOH/DEA = 98/2/0,1 (v/v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; nd, nem meghatározott; hőmérséklet 25 °C

19. Táblázat (folytatás) Kromatográfiás jellemzők, retenciós faktor (k'), szelektivitás (α) és a felbontás (R_s) értékei aminonaftol analógok sztereoizomerjeinek közvetlen elválasztása során

Vegyület	Kolonna	Mozgófázis				Elúciós	
		(v/v/v)	k_1'	k_2'	α	R_s	sorrend
A-5a-b	CelluCoat	80/20/0,1, a	3,12	3,12	1,00	0,00	c=d
	CelluCoat	95/5/0,1, b	8,27	10,66	1,29	5,00	c<d
	CelluCoat	98/2/0,1, c	10,14	13,98	1,38	5,90	c<d
	CelluCoat	98/2/0,1, d	7,92	7,92	1,00	0,00	c<d
	CelluCoat	98/2/0,1, e	7,69	8,91	1,16	3,05	c<d
	AmyCoat	95/5/0,1, b	1,78	3,88	2,18	9,55	c<d
A-5c-d	CelluCoat	80/20/0,1, a	4,72	4,72	1,00	0,00	a=b
	CelluCoat	95/5/0,1, b	9,79	15,49	1,58	9,70	a<b
	CelluCoat	98/2/0,1, c	12,47	19,84	1,59	8,70	a<b
	CelluCoat	98/2/0,1, d	9,69	11,57	1,19	3,50	a<b
	CelluCoat	98/2/0,1, e	12,19	14,80	1,21	4,00	b<a
	AmyCoat	95/5/0,1, b	2,82	9,35	3,32	16,05	b<a

Kromatográfiás körülmények: mozgófázis, **a**, *n*-heptán/IPA/DEA = 80/20/0,1 (v/v/v), **b**, *n*-heptán/IPA/DEA = 95/5/0,1 (v/v/v), **c**, *n*-heptán/IPA/DEA = 98/2/0,1 (v/v/v), **d**, *n*-heptán/EtOH/DEA = 98/2/0,1 (v/v/v), **e**, *n*-heptán/MeOH/DEA = 98/2/0,1 (v/v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; nd, nem meghatározott; hőmérséklet 25 °C

5.5.2. Az AmyCoat és CelluCoat állófázisok elválasztóképességének összehasonlítása aminonaftol analógok királis elválasztása során

Az összehasonlítást *n*-heptán/IPA/DEA = 95/5/0,1 (v/v/v) eluensösszetételű mozgófázisban végeztük. Abban az esetben, amikor viszonylag kisebb térkitöltésű szubsztituenst tartalmazott az alapvegyület (**A-1a-d**), vagy a kiralitáscentrumhoz közel helyezkedett el a *N*-atom az aromás gyűrűben, kisebb k_1' érték adódott a cellulóz alapú szelektor használatakor. Ezek a molekulák valószínűleg könnyebben illeszkedtek az amilóz lánc királis üregeibe, ezáltal erősebb kölcsönhatás alakult ki az állózással, mely a retenciós faktor nagyobb értéke mellett nagyobb felbontással is párosult. A többi analóg esetén a CelluCoat oszlophoz rendelhető a nagyobb visszatartás, szelektivitás és felbontás is. Kivételként lehet említeni az **A-5a-d** analógot, melynek enantiomerjei a kisebb retenciós idő ellenére hatékonyabban voltak elválaszthatóak amilóz alapú AmyCoat kolonnán.

5.5.3. Molekulaszerkezet-kromatográfiás viselkedés összefüggése aminonaftol analógok királis elválasztása során

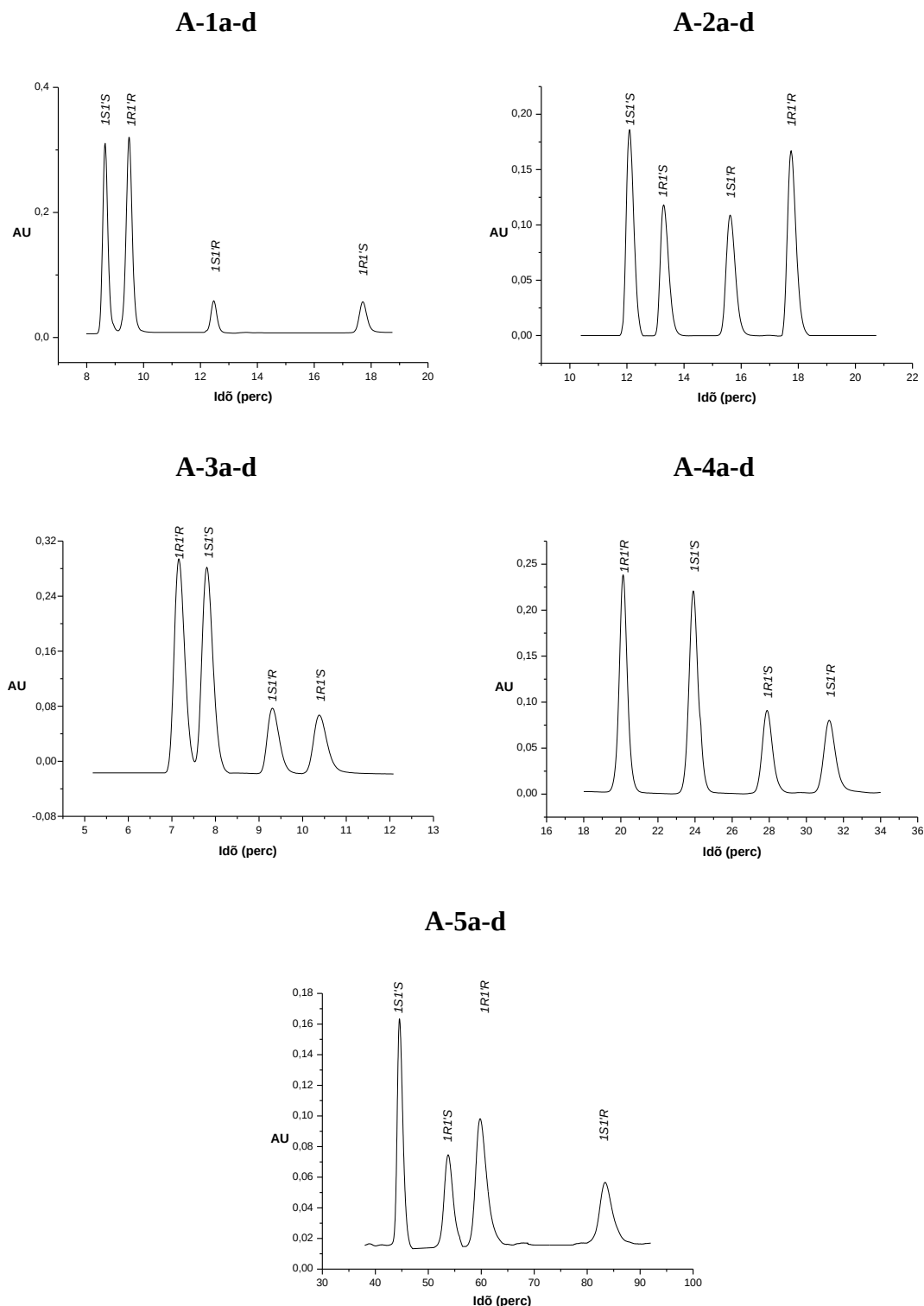
Annak érdekében, hogy következtetéseket tudjunk levonni a szerkezet-kromatográfiás viselkedés kapcsolatára, mindkét kolonnán vizsgáltuk az elválasztást egy adott, n -heptán/IPA/DEA = 95/5/0,1 (v/v/v) eluensösszetétel mellett. Az **A-1a-d** és **A-2a-d** mintáknál, ahol a vegyület fenil- vagy naftilcsoportot tartalmazott, nagyobb retenció volt megfigyelhető, különösen az AmyCoat oszlopon. Ennek valószínűsíthető oka a királis állófázis szupramolekuláris szintjén keresendő. Az amilóz helikális szerkezete üregeket tartalmaz, melyek belsejében aszimmetriacentrumok találhatóak és ezek jelenléte megnövelte a potenciális kölcsönhatások számát [110, 114]. A nagyobb kromatográfiás adatok (k' , α , R_s), melyek a naftilcsoportot tartalmazó **A-2a-d** sztereoizomerekhez rendelhetők a fenilcsoportot tartalmazó **A-1a-d** analóghoz képest, valószínűleg sztérikus okokra vezethető vissza. A fenil- és naftilcsoportok hasonló kölcsönhatások kialakítására képesek, viszont térkitöltésük különböző. A nagyobb térkitöltés elősegítheti a szerkezet merevítését, a stabilabb illeszkedést.

A sztérikus, π - π és poláris kölcsönhatások fontosságára utal az **A-1a-d**, **A-3a-d**, **A-4a-d** és **A-5a-d** analógok kromatográfiás viselkedése. Ezek a vegyületek csak az aromás gyűrűben a N -atom meglétében (**A-3a-d**, **A-4a-d** és **A-5a-d**), illetve nem létében (**A-1a-d**) és annak helyzetében különböznek. Az **A-1a-d** és **A-3a-d** sztereoizomereknél az α és R_s értékeket összehasonlítva, látható, hogy az **A-3a-b** enantiomerpár esetén kicsit nagyobb értékeket kaptunk, különösen igaz ez az AmyCoat kolonnára. Az **A-3c-d** analóg esetén viszont jelentősen kisebbek voltak ezek az értékek. Ha a fenilcsoportot tartalmazó mintát (**A-1a-d**) hasonlítjuk azon heteroaromás gyűrűt tartalmazó sztereoizomerekhez, ahol a N -atom a 3. vagy 4. helyzetben található (**A-4a-d** és **A-5a-d**), akkor mindkét kolonnán jelentősen nagyobb α és R_s értékekkel találkozhatunk ez utóbbi vegyületek esetén (az egyetlen kivétel: **A-4a-d**, az AmyCoat oszlopon). Ezekből az eredményekből az a következtetés vonható le, hogy ha a N -atom közel helyezkedik el (2. pozíció) a kiralitáscentrumhoz, akkor az előnytelen a királis elválasztás hatékonysága szempontjából, viszont a 3. de különösen a 4. helyzetben lévő N -atom pozitív hatást fejt ki a királis felismerésre.

Az elúciós sorrendet minden esetben meghatároztuk, de szabályszerűséget nem tudtunk megállapítani. Érdekességgként említhető, hogy az **A-2a-b**, **A-2c-d**, **A-3a-b**, **A-4a-b** és **A-5a-b** enantiomerpárok esetén elúciósorrend változást okozott az amilóz-cellulóz alapú kolonnacsere.

Mivel a katalitikus és biológiai aktivitásuk ezen vegyületeknek nagymértékben függ a konfigurációjuktól, éppen ezért fontos, hogy ne csak az enantiomerek, hanem a sztereoizomerek elválasztása is megvalósítható legyen. A környezet- és költségkímélés szempontjából az a legoptimá-

lisabb, ha a jelen esetben négy sztereoizomert egy kromatográfiás futás során sikerül elválasztani. A **19. Táblázat** adataira támaszkodva optimalizáltuk az elválasztást, melyek eredményét a 24. ábrán mutatjuk.



24. ábra Aminonaftol sztereoizomerek optimalizált elválasztását bemutató kromatogramok

Oszlop: AmyCoat (**A-1a-d**, **A-3a-d**), CelluCoat (**A-2a-d**, **A-4a-d**, **A-5a-d**); **eluens összetétel:** *n*-heptán/IPA/DEA = 95/5/0,1 (v/v/v) (**A-3a-d**), 98/2/0,1 (v/v/v) (**A-1a-d**, **A-4a-d**), *n*-heptán/EtOH/DEA = 98/2/0,1 (v/v/v) (**A-2a-d**), *n*-heptán/BuOH/DEA = 98/2/0,1 (v/v/v) (**A-5a-d**); **áramlási sebesség:** 0,5 ml/perc; **detektálási hullámhossz:** 230 nm; **hőmérséklet:** 25 °C

6. Összefoglalás

Célkitűzésünknek megfelelően β -2-, β -3- és γ -aminosav enantiomerek, valamint β -laktám, Betti-bázis és aminonaftol sztereoizomerek királis folyadékkromatográfiás elválasztására dolgoztunk ki módszereket, illetve tanulmányoztuk az elválasztás folyamatát, a körülmények hatását.

Nem természetes aminosav enantiomerek elválasztása makrociklusos glikopeptid szelektort tartalmazó állófázisokon

Fordított fázisú körülmények között vizsgáltuk β -2-, β -3-, és γ -aminosav enantiomerek elválasztását makrociklusos glikopeptid szelektorral rendelkező állófázisokon. A glikopeptid-alapú kolonnák a Chirobiotic T, T₂, TAG és R voltak. A mozgófázis általában különböző összetételű 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH rendszer volt.

a) Az alkil oldallánccal rendelkező β -aminosavak esetén a MeOH térfogatarányának növekedésével párhuzamosan nagymértékben növekedett a retenciós faktor. A vizsgált γ -aminosav min-ták viselkedése a szerves módosító térfogatarányának változásával hasonló jellegű volt. A retenciós faktor ilyen jellegű változását a HILIC hatással magyaráztuk.

Az aromás oldalláncot tartalmazó β -aminosavak esetén a k' értékei minimum jellegű görbét írtak le a MeOH térfogatarányának növekedésével. A minimum pont utáni növekedés a k' értékekben hasonlóan a HILIC hatással magyarázható, mint az alifás oldalláncú vegyületeknél. A minimum előtti csökkenés tipikus fordított fázisú viselkedés, azaz nagyobb víztartalmú eluensben a hidrofób kölcsönhatások előtérbe kerülnek.

A β -aminosavakon lévő funkciós csoportok helyzetétől, illetve az oldallánc helyzetétől és jellegétől függetlenül, az α és R_S értékekre általánosan igaz volt, hogy a MeOH-ban gazdagabb mozgófázis esetén ezek az értékek nagyobbak. A γ -aminosav sztereoizomerek esetén a szelektivitás kismértékű növekedésével a felbontás értékei határozottabb növekedést mutattak az eluens MeOH tartalmának növekedésével.

b) A molekulaszerkezet és kromatográfiás viselkedés közti összefüggést vizsgálva a β - és γ -aminosavakon lévő oldalláncok szerkezete és azok elhelyezkedése illetve a gyűrű mérete nagymértékben kihat a szelektorokon lévő zsebek és a molekulák között kialakuló kölcsönhatás erősségére.

c) A szelektív és nemszelektív kölcsönhatások megkülönböztetése valamint a teikoplaninon lévő cukorrészek szerepének tisztázása a királis elválasztás jobb megértéséhez járult hozzá.

d) Az elválasztásokat különböző hőmérsékleteken végezve, a van't Hoff egyenlet kromatográfiában használt alakja segítségével termodinamikai jellemzőket határoztunk meg az elválasztás-

tás mechanizmusának mélyebb megértése érdekében. A termodinamikai adatok nagyban függtek a vegyületek és a királis állófázis szerkezetétől.

e) Néhány esetben meghatároztuk az elúciós sorrendet is, mely a β -aminosavaknál $(R)<(S)$ volt, míg γ -1 esetén az $(1S,3R)$ és γ -3 esetén a $(2R,4S)$ konfigurációjú enantiomer eluálódott először.

β -Aminosav enantiomerek elválasztása koronaéter szelektort tartalmazó állófázisokon

A β -2-aminosav enantiomerek elválasztását koronaéter alapú állófázison is vizsgáltuk. Kísérleteink során arra a megállapításra jutottunk, hogy a szilikagélhez hosszú szénlánccal rögzített koronaéter szelektor megfelelő ilyen típusú vegyületek királis kromatográfiájához. A kromatográfiás viselkedés, értve ezalatt a retenciót, szelektivitást és felbontást, nagymértékben függött az eluensben lévő sav és alkohol minőségétől és mennyiségétől a H_2O /alkohol (v/v)+ sav általános összetételű elegyben.

a) A legnagyobb retenciós faktor értéket $HCOOH$ és $AcOH$ alkalmazása esetén tapasztaltuk, míg TFA , $HClO_4$ és H_2SO_4 esetén a k' értékek kisebbnek adódtak. A szelektivitás és felbontás értékek számottevően nem változtak a sav minőségének változásával. A pH csökkenésével a k' értékek jelentősen csökkentek.

b) Az alkohol minőségének hatását vizsgálva szabályszerűséget a k' változása és az alkohol szénatomszáma között nem lehetett megállítani, a legnagyobb elúciós idő minden esetben a $MeOH$ -hoz vagy $EtOH$ -hoz volt köthető. A szelektivitás változását vizsgálva az alifás oldalláncú vegyületek esetén általában a $MeOH$ -t tartalmazó eluenshez tartozott a legkisebb α . Az aromás oldallánccal rendelkező aminosavak esetén egy minimum volt megfigyelhető, mely minimum a $PrOH$ -hoz volt rendelhető. Az R_S értékek változásában szabályszerűség nem volt megállapítható.

c) Az alkohol ($MeOH$) tartalom függvényében a retenciós faktor változása minimumgörbe jellegű volt. A vizes fázisban gazdagabb eluens esetén, a vizes fázis mennyiségének növekedésével a retenciós faktor is növekedett a hidrofób kölcsönhatások hangsúlyosabbá válásával. A szelektivitás és felbontás változása eltérő volt az alifás és az aromás oldallánccal rendelkező vegyületek esetén.

d) A vegyületek szerkezete (alifás vagy aromás oldallánc jelenléte) befolyással volt mind a k' , α és R_S értékekre.

e) Hasonló módon az antibiotikum állófázisokhoz, termodinamikai adatok alapján azt találtuk, hogy az elválasztás entalpiavezérelt, azaz az alacsony hőmérsékletű elválasztás a kedvező. Az elúciós sorrend, hasonlóan az α -aminosavakra vonatkozó korábbi irodalmi adatokhoz, ezen a kolonnán $(S)<(R)$ volt.

β -Laktám enantiomerek elválasztása módosított poliszacharid szelektort tartalmazó állófázisokon

Kromatográfiás módszert fejlesztettünk β -laktám enantiomerek közvetlen elválasztására, normál fázisú körülmények között. Az alkalmazott mozgófázis *n*-heptán/alkohol változó összetételű elegye volt. A királis analízist AmyCoat és CelluCoat oszlopokon valósítottuk meg, melyek szelektora amilóz-*trisz*-(3,5-dimetilfenilkarbamát) és cellulóz-*trisz*-(3,5-dimetilfenilkarbamát) volt.

a) A mozgófázisban lévő alkohol minőségének és mennyiségének változtatásával optimalizáltuk a sztereoizomerek elválasztását, melynek eredményeként minden esetben alapvonalra történő elválasztást sikerült elérni. A kromatográfiás adatokat tekintve semmilyen összefüggés nem volt megállapítható az eluent alkotó alkohol szénatomszáma és a retenciós faktorok között. A két különböző állófázis esetén, MeOH jelenlétében lényegesen kisebb k' értékek adódtak az amilóz alapú állófázison a cellulózhoz képest. Az enantioszelektivitás (α), a különböző alkoholok használata esetén nem változott jelentősebb mértékben ($\alpha = 1,0-1,3$). A felbontást érzékenyen érinti a poláris módosító változtatása, de ezen változásban általános szabályszerűség nem volt megállapítható.

b) Az alkohol arányának növekedésével párhuzamosan a retenciós faktor nagymértékben csökkent, miközben a szelektivitás és felbontás értékeinek változása különböző volt. Az α értékek viszonylagos állandóságot mutattak, értéküket az IPA mennyisége csak kis mértékben befolyásolta. Az R_s értékek a legtöbb esetben az oszlopon való tartózkodás idejével párhuzamosan változtak.

c) A molekulaszervezet és kromatográfiás viselkedés közti kapcsolatot állapítottunk meg. Azon vegyületek esetén, melyek kettős kötéssel vagy aromás rendszerrel rendelkeztek, azaz képesek voltak a π - π kölcsönhatások kialakítására, nagyobb visszatartást és a legtöbb esetben nagyobb szelektivitást és felbontást kaptunk. A szerkezet befolyását a királis felismerésre jól jelzi, hogy a *para* helyzetben szubsztituált vegyületnél nem volt lényeges különbség a szelektivitásban és felbontásban a kétféle szelektort tartalmazó állófázison, míg az *orto* helyzetű szubsztitúció esetén a CelluCoat oszlop, a *meta* helyzetű szubsztitúció esetén pedig az AmyCoat oszlop bizonyult hatékonyabbnak.

d) Az elúciós sorrendet minden esetben meghatároztuk, de általános szabályszerűséget nem tudtunk megállapítani. Ezek a kolonnák az elválasztó képesség szempontjából rendkívül jól kiegészítették egymást.

Egy- (Betti-bázis) illetve két aszimmetriacentrummal rendelkező aminonaftol enantiomerek elválasztása módosított poliszacharid szelektort tartalmazó állófázisokon

Normál fázisú körülmények között egy- és két aszimmetriacentrummal rendelkező aminonaftol analógok sztereoizomerjeinek elválasztására fejlesztettünk módszereket, módosított poliszacharid alapú állófázisok segítségével. Az általános mozgófázis összetétel mindkét vegyületcsoport esetén *n*-heptán/alkohol/DEA volt. Az egy kiralitáscentrummal rendelkező vegyületek (Betti-bázisok) enantiomerjeit 3,5-dimetilfenilkarbamáttal módosított cellulóz alapú oszlopokon (Kromasil CelluCoat, Chiralcel OD-H) választottuk el. A két kiralitáscentrumot tartalmazó aminonaftol analógok enantiomerjeit és diasztereomerjeit ugyancsak 3,5-dimetilfenilkarbamáttal módosított cellulóz valamint amilóz alapú (Kromasil CelluCoat és AmyCoat) kolonnákon sikerült elkülöníteni.

a) Az eluensösszetétel, az alkohol minőségének és mennyiségének változtatásával optimalizáltuk az elválasztást. Az elsőként eluálódó enantiomerhez rendelhető k_1' értékek nőttek az alkohol szénatomszámának növekedtével, különösen abban az esetben, amikor az alkohol elágazó láncot tartalmazott. A legnagyobb retenciót az IPA, BuOH és *t*-BuOH alkalmazása esetén kaptuk. A poláris módosító természetesen a királis és nem királis kölcsönhatások arányát is befolyásolhatja, hatást gyakorolva a szelektivitásra és felbontásra is. Az alkohol mennyiségének növelésével tipikus normál fázisú viselkedés volt tapasztalható, azaz az eluens erősségének növekedésével csökkent a sztereoizomerek oszlopon való tartózkodásának ideje, miközben a szelektivitás és felbontás változása a CelluCoat és Chiralcel OD-H oszlopon eltérő volt.

b) CelluCoat és Chiralcel OD-H elválasztóképességét összehasonlítva Betti-bázisok esetén az elsőként eluálódó enantiomer retenciós faktora (k_1') azonos eluensösszetételnél kisebb volt a CelluCoat kolonnán. Ez a megállapítás a másodikként eluálódó enantiomer esetében (k_2') már módosult. A 2-naftoloknál kisebb, míg az 1-naftoloknál nagyobb volt az oszlopon való tartózkodási idő CelluCoat esetén a Chiralcel OD-H-hoz viszonyítva. A szelektivitás ennek megfelelően a 2-naftolok esetén a Chiralcel OD-H-n adódott nagyobbak, míg az 1-naftolok a CelluCoat oszlopon mutattak nagyobb szelektivitást

c) A molekulaszervezet, a vegyületek szubsztituenseinek minősége, helyzete jelentősen befolyásolta a kromatográfiás viselkedést. Megállapítottuk, hogy Betti-bázisok esetén a szelektivitás, de főleg a retenciós faktor értéke függ az alkil-csoport térkitöltésétől. A k_1' és α értékeket a Meyer (V^a) paraméter függvényében ábrázolva összefüggést állapítottunk meg az alkil-csoport mérete és a k_1' illetve az α között. A nagyobb szubsztituens gátolja a komplex kialakulását, ezáltal csökkenti a visszatartást.

Két aszimmetriacentrumot tartalmazó aminonaftol analógok esetén az aromás gyűrű mérete

(fenil, naftil) és a *N*-heteroatom helyzete jelentős hatással volt a kromatográfiás viselkedésre.

d) Betti-bázisoknál néhány, míg két aszimmetriacentrumú aminonaftol analógok esetén minden esetben meghatároztuk az elúciós sorrendet, de szabályszerűséget nem tudtunk megállapítani.

7. Summary

We developed methods for separation of the enantiomers of β -2-, β -3- and γ -amino acids, β -lactams and aminonaphthols by using chiral liquid chromatography.

Enantioseparation of unnatural amino acids on macrocyclic glycopeptide-based columns

The enantiomers of β -2-, β -3- and γ -amino acid analogs were separated on macrocyclic glycopeptide-based CSPs, i.e. Chirobiotic T, T₂, TAG and R. Separation could be accomplished in reversed-phase mode by using 0.1% Triethylammonium acetate (TEAA) buffer (pH 4.1)/MeOH mobile-phases with different compositions and at different temperatures.

a) For analytes with an alkyl side-chain, the retention factor progressively increased as the MeOH content of the mobile-phase was increased; this was probably due to the HILIC (hydrophilic interaction) effect. Similar behavior was found for γ -amino acid analogs. For analytes with an aromatic side-chain, a U-shaped curve was observed. At higher water content, the retention factor increased again with increasing water content, which was probably due to enhanced hydrophobic interactions in the water-rich mobile-phase.

All α values increased slightly with increasing MeOH content for all investigated unnatural amino acids (higher increases were observed for β -2-amino acids with aromatic side-chains). The R_S values progressively increased with increasing MeOH content on all CSPs.

b) The values of the chromatographic parameters depended on the structures of the compounds and on the CSPs applied. The possible interactions depend strictly on how the enantiomers fit into the aglycone cavity, which is determined by the structures of the analytes and CSPs and also by the mobile-phase composition.

c) Investigation of the selective and non-selective interactions and the role of the sugar moieties were important for an understanding of the chiral separation mechanism.

d) Linear van't Hoff plots were observed in the studied temperature range 7–45 °C, and the apparent changes in enthalpy (ΔH°), entropy (ΔS°) and free energy (ΔG°) were calculated. The values of the thermodynamic parameters depended on the structures of the compounds and on the CSPs applied.

e) The elution sequence was determined in some cases, and was found to be (*R*) < (*S*) for β -amino acids. For γ -amino acids it emerged that the first-eluting enantiomer for analyte γ -1 was 1(*S*),3(*R*) and that for analyte γ -3 was 2(*R*),4(*S*) on all CSPs.

Enantioseparation of β -2-amino acids on crown ether-based columns

This research work demonstrated that the long-tethered crown ether CSP is quite successful for direct enantioseparation of the investigated β -2-amino acids. The chromatographic behavior (k' , α and R_S) proved to be dependent on the natures and concentrations of the acidic and alcoholic modifiers in the H₂O/alcohol/acidic modifier mobile-phase system.

a) The application of HCOOH, AcOH, Trifluoroacetic acid (TFA), HClO₄ or H₂SO₄ at the same concentration (10 mM) resulted in different levels of pH. A decrease of the pH in the mobile-phase system decreased the retention factors by 70–80%. The largest k' values were in most cases obtained on the application of HCOOH or AcOH, while HClO₄ and H₂SO₄ resulted in the lowest k' values. The change of the pH exerted only slight effect on the α and R_S values.

b) The nature of the alcohol influenced the retention and resolution, but the change in k' did not appear to correlate with the carbon numbers of the alcohols. It was found that MeOH and EtOH in most cases gave larger k' values than those for PrOH or IPA. The nature of the alcohol caused slight changes in α and significant effects on the resolution, but no general rule could be established. In most cases, the smallest resolution was observed on the application of PrOH, whereas the application of MeOH or IPA resulted in the largest R_S values.

c) The effects of the MeOH content of the mobile-phase on the retention, selectivity and resolution were investigated. For all analytes, a U-shaped curve was observed. At higher water content, the retention factor increased with increasing water content due to the enhanced hydrophobic interactions in the water-rich mobile-phase. As the content of MeOH in the aqueous mobile-phase was increased, k' increased again.

d) The chromatographic retention and resolution were found to be dependent on the structures of the analytes and the nature of the substituents in the β position.

e) The thermodynamic parameters revealed the separation was enthalpically favored, in contrast with that on the macrocyclic glycopeptide-based CSPs. The elution sequence was found to be (S) < (R).

Enantioseparation of β -lactams on polysaccharide-based columns

HPLC methods were developed for the separation of the enantiomers of 19 β -lactams. The direct separations were performed on CSPs containing either amylose-tris-3,5-dimethylphenyl carbamate (AmyCoatTM column) or cellulose-tris-3,5-dimethylphenyl carbamate (CelluCoatTM column) as chiral selector in the normal-phase mode.

a) By variation of the nature and the content of the alcoholic modifier, the separation of the

stereoisomers was optimized; as a result, baseline resolution was achieved for the β -lactams in at least one chromatographic system. The change in k' did not appear to correlate with the carbon number of the alcohols. It emerged that MeOH gave a smaller k' on the AmyCoatTM CSP and a higher k' on the CelluCoatTM CSP. The enantioselectivity did not change dramatically when different alcohols were applied in the same molar concentration.

b) The alcohol content of the mobile-phase influenced the chromatographic behavior considerably. The retention factor decreased strongly with increasing alcohol content, whereas the changes in α and R_S differed. For the β -lactam analogs, slight changes in α were registered with increasing IPA content, whereas R_S changed in parallel with k' , i.e. R_S in most cases decreased with decreasing k' .

c) For most of the analytes investigated, a structure-retention relationship was observed on both CSPs. With increasing number of carbon atoms attached to the β -lactam ring, k' usually increased. Besides polar interactions, π - π interactions between the phenyl groups of the CSP and an aromatic group of the solute may play some role in chiral recognition. At constant mobile-phase composition, the *para*-substituted analog was separated with similar enantioselectivity on both CSPs, whereas for the *ortho*-substituted analog CelluCoatTM CSP and for the *meta*-substituted analog the AmyCoatTM CSP proved to be much more efficient.

d) The elution sequence was determined in all cases, but no general rule could be established. The AmyCoatTM and CelluCoatTM columns appeared to be highly complementary.

Enantioseparation of aminonaphthol analogs with one or two asymmetric center(s) on polysaccharide-based columns

This work demonstrated that the developed methods are quite successful for the direct enantioseparation of new aminonaphthol analogs possessing one or two chiral centers. The direct separations were performed on CSPs containing either amylose-tris-3,5-dimethylphenyl carbamate (AmyCoatTM column) or cellulose-tris-3,5-dimethylphenyl carbamate (CelluCoatTM and Chiralcel OD-H columns) with various *n*-heptane/alcohol/DEA mobile-phase systems.

a) By variation of the nature and the content of the alcoholic modifier, the separation of the enantiomers was optimized. The alcohol content of the mobile-phase strongly influenced the chromatographic behaviour. In the *n*-heptane/IPA/DEA mobile-phase system, the retention factors decreased with increasing alcohol content, while the changes in separation factor and resolution varied. The nature of the alcoholic modifier exerted considerable effects on the retention, selectivity and resolution. At constant alcohol concentration, the retention factors of the first-eluting enantiomers increased with increasing alcohol chain length, especially for those with

branched and bulky side-chains, such as IPA, BuOH and *t*-BuOH. Increasing carbon number was disadvantageous for polar interactions between the mobile-phase and the analyte; the overall resultant was that the retention factor increased with increasing alcohol chain length.

b) At the eluent composition *n*-heptane/IPA/DEA = 40/60/0.1 (v/v/v), similar or lower retention factors of the first-eluting enantiomers were observed on CelluCoat than on Chiralcel OD-H for all of the Betti base analogs. For the second-eluting enantiomers, different behavior was found on the two cellulose-based columns. The separation factors were higher for the 2-naphthol analogs on Chiralcel OD-H than for the 1-naphthol analogs on CelluCoat. As far as resolution was concerned, R_S was in all cases higher on the CelluCoat CSP than on Chiralcel OD-H.

For the aminonaphthol analogs the two polysaccharide-based CSPs appeared to be highly complementary.

c) It was reported by Meyer that the steric effect of a substituent on the reaction rate is characterized by the size-descriptor V^a . The results revealed that the chromatographic parameters k' and α correlated with V^a . The retention factors depended strongly on the volumes of the substituents: bulkier substituents inhibited the interaction with the selector, and the retention decreased.

For aminonaphthol analogs with two chiral center, the presence of an *N*-atom in the *ortho* position, close to the chiral center, in most cases hindered the interaction with the CSP, resulting in smaller k' , α and R_S values, while the presence of an *N*-atom in the *meta* or especially the *para* position was favorable for chiral recognition. The size of the aromatic ring system (phenyl or naphthyl) also influenced the chromatographic behavior.

d) The elution sequence was determined in some cases for Betti base analogues and in all cases for aminonaphthol analogs with two chiral centers. No general rule could be established.

8. Irodalomjegyzék

- [1] M. Hollósi, Barangolások a kiralitás birodalmában, MTA Székfoglaló előadás (2004)
- [2] E.J. Äriens, *Eur. J. Clin. Pharm.* **26** (1984) 663.
- [3] M.R. Islam, J.G. Mahdi, I.D. Bowen, *Drug Safety* **3** (1997) 149.
- [4] Y.K. Agrawal, H.G Bhatt, H.G. Raval, P.M. Oza, P.J. Gogoi, *Mini-Rev. Med. Chem.* **7** (2007) 451.
- [5] E.J. Äriens, E.W. Wuis, E.J. Veringa, *Biochem. Pharm.* **37** (1988) 9.
- [6] L. Pasteur, in *Memoirs by Pasteur, van't Hoff, Le Bell and Wishcensus* (G. M.Richardson, Ed.), *American Book Company*, New York (1901).
- [7] W.E. Müller, U. Wollert, *Mol. Pharm.* **11** (1975) 52.
- [8] T. Alebic-Kolbah, F. Kajfez, S. Rendic, V. Sunjic, A. Konowal, G. Snatzke, *Biochem. Pharm.* **28** (1979) 2457.
- [9] I. Fitos, M. Simonyi, Zs. Tegyei, L. Ötvös, J. Kajtár, M. Kajtár, *J. Chromatogr.* **259** (1983) 494.
- [10] I. Fitos, Zs. Tegyei, M. Simonyi, I. Sjöholm, I. Larson, C. Langercrantz, *Biochem. Pharm.* **35** (1986) 263.
- [11] T. Walle, U.K. Walle, *Trends Pharm. Sci.* **7** (1986) 155.
- [12] J. Martens, R. Bhushan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8** (1990) 259.
- [13] FDA policy statements for the development of new stereoisomeric drugs, Rockville, MD, FDA, (1992).
- [14] E.H. Easson, E. Stedman, *Biochem. J.* **27** (1933) 1257.
- [15] A.G. Ogston, *Nature* **4129** (1948) 963.
- [16] T.D. Booth, D. Wahnon, I.W. Wainer, *Chirality* **9** (1997) 96.
- [17] Y. Zhao, Z. Guo, Y. Zhang, X. Xue, Q. Xu, X. Li, X. Liang, Y. Zhang, *Talanta* **78** (2009) 916.
- [18] D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, J.-R. Chen, *Anal. Chem.* **66** (1994) 1473.
- [19] D.W. Armstrong, K.L. Rundlett, G.L. Reid III, *Anal. Chem.* **66** (1994) 1690.
- [20] D.W. Armstrong, M.P. Gasper, K.L. Rundlett, *J. Chromatogr. A* **689** (1995) 285.
- [21] K.H. Ekborg-Ott, J.P. Kullman, X. Wang, K. Gahm, L. He, D.W. Armstrong, *Chirality* **10** (1998) 627.
- [22] F. Fanali, M. Crucianelli, F. De Angelis, C. Presutti, *Electrophoresis* **23** (2002) 3035.
- [23] N. Grobuschek, M.G. Schmid, J. Koidl, G. Gübitz, *J. Sep. Sci.* **25** (2002) 1297.
- [24] A. Péter, M. Péter, I. Ilisz, F. Fülöp, *Biomed. Chromatogr.* **19** (2005) 459.

- [25] R. Berkecz, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, A. Péter, *Chromatographia* **63** (2006) 29.
- [26] A. Ghassempour, H.Y. Aboul-Enein, *J. Chromatogr. A* **1191** (2008) 182.
- [27] A.F. Prokhorova, E.N. Shapovalova, A.V. Shpak, S.M. Staroverov, O.A. Shpigun, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 3674.
- [28] C. Jiang, C. Wang, D.W. Armstrong, *J. Sep. Sci.* **31** (2008) 1980.
- [29] T.L. Xiao, D.W. Armstrong *Chiral separations. Methods and protocols-Eds.: G. Gübitz, M.G. Schmid* (2004) Humana press, Totowa, 113.
- [30] X. Zhang, Y. Bao, K.L. Barnett-Rundlett, D.W. Armstrong, *Electrophoresis* **22** (2010) 495.
- [31] I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter, *J. Sep. Sci.* **29** (2006) 1305.
- [32] M.P. Gasper, A. Berthod, U.B. Nair, D.W. Armstrong, *Anal. Chem.* **68** (1996) 2501.
- [33] D.W. Armstrong, *LC-GC* **15** (1997) 20.
- [34] D.W. Armstrong, U.B. Nair, *Electrophoresis* **18** (1997) 2331.
- [35] Chirobiotic Handbook, *Advanced Separation Technologies Inc. 4th Edition*, Whyppany (2002)
- [36] P.E. Reynolds, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8** (1989) 943.
- [37] A. Malabarba, T.I. Nicas, R. Ciabattil, *Eur. J. Med. Chem.* **32** (1997) 459.
- [38] A. Bernareggi, A. Borghi, M. Borgonovi, L. Cavenaghi, P. Ferrari, K. Vékey, M. Zanol, L. Zerilli, *Antimicrob. Agents Chemotherapy.* **36** (1992) 1744.
- [39] J.C.J. Barna, D.H. Williams, D.J.M. Stone, T.W.C. Leung, D.M. Dodrell, *J. Amer. Chem. Soc.* **106** (1984) 4895.
- [40] D.A. Beauregard, D.H. Williams, M.N. Gwynn, D.J.C. Knowles, *Antimicrob. Agents Chemotherapy.* **39** (1995) 781.
- [41] M. Brzezowska, M. Kucharczyk-Klaminska, F. Bernardi, D. Valensin, N. Gaggelli, E. Gaggelli, G. Valensin, M. Jezowska-Bojczuk, *J. Inorg. Biochem.* **104** (2010) 193.
- [42] A. Berthod, X. Chen, J.P. Kullman, D.W. Armstrong, F. Gasparrini, I. D'Acquarica, C. Villani, *Anal. Chem.* **72** (2000) 1767.
- [43] T.L. Xiao, E. Tesarova, J.L. Anderson, M. Egger, D.W. Armstrong, *J. Sep. Sci.* **29** (2006) 429.
- [44] F. Sztaricskai, C.M. Harris, A. Neszmelyi, T.M. Harris, *J. Amer. Chem. Soc.*, **102** (1980) 7093.
- [45] J.E. Philip, J.R. Schenck, M.P. Hargie, *Antibiot. Ann.* **1956-1957** (1956) 699.
- [46] M.A. Howard, B.G. Firkin, *Throm. Diath. Haemorrh.* **26** (1971) 362.
- [47] R. Bognár, F. Sztaricskai, M.E. Munk, J. Tamás, *J. Org. Chem.* **39** (1974) 2971.
- [48] I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 1845.
- [49] H.C. Neu, *Science* **257** (1992) 1064.

- [50] I.Ali, K. Kumerer, H.Y. Aboul-Enein, *Chromatographia* **63** (2006) 295.
- [51] E.P. Kyba, L.R. Koga, L.R. Sousa, H.G. Siegel, D.J. Cram, *J. Amer. Chem. Soc.* **95** (1973) 2692.
- [52] C.J. Pedersen, *J. Amer. Chem. Soc.* **89** (1967) 7017.
- [53] E.P. Kyba, J.M. Timko, L.J. Kaplan, F. de Jong, G.W. Gokel, D.J. Cram, *J. Amer. Chem. Soc.* **100** (1978) 4555.
- [54] I. Ilisz, Z. Pataj, R. Berkecz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, H.J. Choi, M.H. Hyun, A. Péter, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 1075.
- [55] M.H. Hyun, *J. Sep. Sci.* **26** (2003) 242.
- [56] M.H. Hyun, G. Tan, Y.J. Cho, *Biomed. Chrom.* **19** (2005) 208.
- [57] R. Berkecz, I. Ilisz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, H.J. Choi, M.H. Hyun, A. Péter, *J. Sep. Sci.* **32** (2009) 981.
- [58] I. Ilisz, R. Iványi, Z. Pataj, J. Kupai, P. Huszthy, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter, *Chromatographia* **71** (2010) 115.
- [59] H.K. Frensdorff, *J. Amer. Chem. Soc.* **93** (1971) 600.
- [60] R. Kuhn, C. Steinmetz, T. Bereuter, P. Haas, F. Erni, *J. Chromatogr. A* **666** (1994) 367.
- [61] W.C. Still, J.D. Kilburn, P.E.J. Sanderson, R. Liu, M.R. Wiley, F.P. Hollinger, R.C. Hawley, M. Nakajima, A. Bernardi, J.-I. Hong, S.K. Namgoong, *Isr. J. Chem.* **32** (1992) 41.
- [62] X.X. Zhang, J.S. Bradshaw, R.M. Izatt, *Chem. Rev.* **97** (1997) 3313.
- [63] R. Kuhn, F. Erni, T. Bereuter, J. Heusler, *Anal. Chem.* **64** (1992) 2815.
- [64] G. Hesse, R. Hagel, *Chromatographia* **6** (1973) 277.
- [65] P. Franco, A. Senso, L. Oliveros, C. Minguillón, *J. Chromatogr. A* **906** (2001) 155.
- [66] R.M.C. Sutton, K.L. Sutton, A.M. Stalcup, *Electrophoresis* **18** (1997) 2297.
- [67] N. Gralen, *Nature* **152** (1943) 625.
- [68] E. Doelker, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **19** (1993) 2399.
- [69] A. Luttringhaus, K. Peters, *Angew. Chem.* **78** (1966) 603.
- [70] A. Ichida, T. Shibata, I. Okamoto, Y. Yuki, H. Namikoshi, Y. Toda, *Chromatographia* **19** (1984) 280.
- [71] Y. Okamoto, R. Aburatani, K. Hatada, *J. Chromatogr.* **389** (1987) 95.
- [72] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *J. Chromatogr.* **363** (1986) 173.
- [73] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A* **670** (1994) 39.
- [74] Y. Okamoto, T. Ohashi, Y. Kaida, E. Yashima, *Chirality* **5** (1993) 616.
- [75] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A* **694** (1995) 101.
- [76] V. Piette, M. Lammerhofer, W. Lindner, J. Crommen, *J. Chromatogr. A* **987** (2003) 421.
- [77] T.E. Beesley ; R.P.W. Scott, *Chiral Chromatography John Wiley & Sons, Chichester-New*

York (1998)

- [78] A. Péter, E. Vékes, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* **958** (2002) 89.
- [79] S. Hashimoto, T. Iwamoto, E. Tsujii, M. Ezaki, A. Fujie, M. Okuhara, M. Kohsaka, H. Imanaka, K. Kawabata, *J. Antibiot.* **43** (1990) 1.
- [80] M. Konishi, M. Nishio, K. Saitoh, T. Miyaki, T. Oki, H. Kawaguchi, *J. Antibiot.* **42** (1989) 1749.
- [81] A. Kuhl, M. G. Hahn, M. Dumić, J. Mittendorf, *Amino Acids* **29** (2005) 89.
- [82] F. Tureček, *Mass Spectrom. Rev.* **26** (2007) 563.
- [83] C. Buddhala, C.C. Hsu, J.Y. Wu, *Neurochem. Int.* **55** (2009) 9.
- [84] S. Fallon, E. Shearman, H. Seršen, A. Lajtha, *Neurochem. Res.* **32** (2007) 535.
- [85] J. Jedrzejczak, K. Owczarek, P. Zwolinski, *Epilepsia* **40** (1999) 287.
- [86] J. Zorica, C. Snežana, *Acta. Fac. Med. Naiss.* **20** (2003) 115.
- [87] M. Betti, *Org. Synt.* **1** (1941) 381.
- [88] C. Cardellicchio, G. Ciccarella, F. Naso, F. Perna, P. Tortorella, *Tetrahedron* **55** (1999) 14685.
- [89] Y. Wang, X. Li, K. Ding, *Tetrahedron: Asymmetry* **13** (2002) 1291.
- [90] N.C. Desai, H.K. Shukla, N.A. Langalia, K.A. Thaker, *J. Indian Chem. Soc.* **61** (1984) 711.
- [91] Y. Guo, S. Gaiki, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 5920.
- [92] Z. Pataj, I. Ilisz, A. Aranyi, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter, *Chromatographia* **71** (2010) 13.
- [93] A. Péter, A. Árki, D. Tourwe, E. Forró, F. Fülöp, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* **1031** (2004) 159.
- [94] Z. Pataj, I. Ilisz, R. Berkecz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter, *J. Sep. Sci.* **31** (2008) 3688.
- [95] Z. Pataj, R. Berkecz, I. Ilisz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter, *Chirality* **21** (2009) 787.
- [96] Z. Pataj, I. Ilisz, A. Aranyi, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter, *Chromatographia* **71** (2010) 13.
- [97] I. D'Acquarica, F. Gasparrini, D. Misiti, G. Zappia, C. Cimarrelli, G. Palmieri, A. Carotti, S. Cellamare, C. Villani, *Tetrahedron-Asymmetry* **11** (2000) 2375.
- [98] A. Péter, A. Árki, D. Tourwe, E. Forró, F. Fülöp, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* **1031** (2004) 159.
- [99] R. Török, R. Berkecz, A. Péter, *J. Sep. Sci.* **29** (2006) 2523.
- [100] R. Charles, U. Beitler, B. Feibush, E. Gilav, *J. Chromatogr.* **112** (1975) 121.
- [101] T. Fornstedt, P. Sajonz, G. Guiochon, *Chirality* **10** (1998) 375.

- [102] W. Lee, J.Y. Jin, C.S. Back, *Microchem. J.* **80** (2005) 213.
- [103] X. Subirats, M. Roses, E. Bosch, *Sep. Pur. Reviews* **36** (2007) 231.
- [104] R. Berkecz, I. Ilisz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, H.J. Choi, M.H. Hyun, A. Péter, *J. Sep. Sci.* **32** (2009) 981.
- [105] V. Schurig, J. Ossig, R. Link, *Angew. Chem.* **101** (1989) 197.
- [106] E. Peyrin, Y.C. Guillaume, C. Guinchard, *Anal. Chem.* **69** (1997) 4979.
- [107] T. Fornstedt, G. Götmár, M. Anderson, G. Guichon, *J. Amer. Chem. Soc.* **121** (1999) 1664.
- [108] T. Wang, R.M. Wenslow, *J. Chromatogr. A* **1015** (2003) 99.
- [109] Z. Pataj, I. Ilisz, R. Berkecz, E. Forró, F. Fülöp, A. Péter, *Chirality* **22** (2010) 120.
- [110] T. O'Brien, L. Crocker, R. Thompson, K. Thompson, P.H. Toma, D.A. Conlon, B. Feibush, C. Moeder, G. Bicker, N. Grinberg, *Anal. Chem.* **69** (1997) 1999.
- [110] I. Ilisz, Z. Pataj, R. Berkecz, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter, *Chromatographia* **70** (2009) 723.
- [112] A.Z. Meyer, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1986) 1567.
- [113] I. Ilisz, Z. Pataj, R. Berkecz, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 2980.
- [114] B. Chankvetadze, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A* **922** (2001) 127.

9. Közlemények listája

9.1. Az értekezésben feldolgozott közlemények

2008:

Z. Pataj, I. Ilisz, R. Berkecz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter
Comparison of performance of Chirobiotic T, T2 and TAG columns in the separation of β^2 - and β^3 -homoamino acids

Journal of Separation Science, 31, 3688-3697

Impakt faktor: **2,746**

2009:

Z. Pataj, R. Berkecz, I. Ilisz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter
High-Performance Liquid Chromatographic Chiral Separation of β^2 -Homoamino Acids

Chirality, 21, 787-798

Impakt faktor: **2,680**

2009:

I. Ilisz, **Z. Pataj**, R. Berkecz, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter
Comparsion of Separation Performances of Cellulose-Based Chiral Stationary Phases in High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparation of Aminonaphthol Analogues

Chromatographia, 70, 723-729

Impakt faktor: **1,098**

2010:

Z. Pataj, I. Ilisz, R. Berkecz, E. Forró, F. Fülöp, A. Péter
Comparison of Separation Performances of Amylose- and Cellulose-based Stationary Phases in the High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparation of Stereoisomers of β -Lactams

Chirality, 22, 120-128

Impakt faktor: **2,892**

2010:

I. Ilisz, **Z. Pataj**, R. Berkecz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, H. J. Choi, M. H. Hyun, A. Péter

High performance liquid chromatographic enantioseparation of β^2 -amino acids using a long tethered (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid-based chiral stationary

Journal of Chromatography A, 1217, 1075-1082

Impakt faktor: **4,194**

2010:

Z. Pataj, I. Ilisz, R. Berkecz, E. Forró, F. Fülöp, A. Péter

Comparsion of separation performances of amylose- and cellulose-based stationary phases in the high-performance liquid chromatographic enantioseparation of stereoisomers of β -lactams

Procedia Chemistry, 2, 116-119

Impakt faktor: **0,000**

2010:

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

LC Separation of γ -Amino Acid Enantiomers

Chromatographia, 71, 13-19

Impakt faktor: **1,075**

2010:

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

High performance liquid chromatographic enantioseparation of aminonaphtol analogs on poly-saccharide-based chiral stationary phases

Journal of Chromatography A, 1217, 2980-2985

Impakt faktor: **4,194**

Összes impakt faktor: 18,879

9.2. Az értekezés témájához kapcsolódó fel nem használt közlemények

2008:

R. Berkecz, I. Ilisz, **Z. Pataj**, F. Fülöp, H.J. Choi, M. Ho Hyun, A. Péter

LC Enantioseparation of β -Amino Acids on a Crown Ether-Based Stationary Phase

Chromatographia, 68, 13-18

Impakt faktor: **1,312**

2008:

R. Berkecz, I. Ilisz, F. Fülöp, **Z. Pataj**, M. Ho Hyun, A. Péter

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -3-homo-amino acid stereoisomers on a (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid-based chiral stationary phase

Journal of Chromatography A, 1189, 285-291

Impakt faktor: **3,756**

2010:

I. Ilisz, **Z. Pataj**, A. Péter

Macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases in high performance liquid chromatographic analysis of amino acid enantiomers and related analogs

Macrocyclic Chemistry (könyvfejezet); Editors, Daniel W. Fitzpatrick, Henry J. Ulrich; Nova Science Publishing, 2010

2010:

I. Ilisz, R. Iványi, **Z. Pataj**, J. Kupai, P. Huszthy, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter

Capillary Electrophoretic Enantioseparation of Betti Bases with Cyclodextrins and a Crown Ether as Chiral Selectors

Chromatographia, 71, 115-119

Impakt faktor: **1,075**

2010:

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

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

Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 10, 287-298

Impakt faktor: **2,622**

2010:

L. Sipos, I. Ilisz, **Z. Pataj**, Zs. Szakonyi, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of monoterpene-based 2-amino carboxylic acids on macrocyclic glycopeptide-based phases

Journal of Chromatography A, 1217, 6956-6963

Impakt faktor: **4,194**

2011:

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

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

Journal of Chromatography A, 1218, 4869-4876

Impakt faktor₂₀₁₀: **4,194**

2011:

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

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

Chirality, 23, 549-556

Impakt faktor₂₀₁₀: **2,892**

2011:

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

Macrocyclic antibiotic selectors in direct HPLC enantioseparations

Separation and Purification Reviews, közlésre elfogadva

Impakt faktor₂₀₁₀: **2,429**

Összes közlemény impakt faktora: **41,353**

9.3. Poszterek

2007:

I. Ilisz, R. Iványi, G. Tóth, **Z. Pataj**, A. Péter

Capillary electrophoretic enantioseparation of substituted amino acids with cyclodextrins

7th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, 2007. szeptember 5-7.

2007:

A. Péter, R. Berkecz, I. Ilisz, **Z. Pataj**, F. Fülöp, M. Ho Hyun

HPLC enantioseparation of β -amino acids on chiral crown ether and β -cyclodextrin-based stationary phases

7th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, 2007. szeptember 5-7.

2008:

A. Péter, **Z. Pataj**, R. Berkecz, I. Ilisz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, D.W. Armstrong
High-Performance Liquid Chromatographic Chiral Separation of β -2-Homo Amino Acids
20th International Symposium on Chirality, Genf, 2008. július 5-7.

2009:

A. Péter, **Z. Pataj**, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp
HPLC enantioseparation of β -lactams on Amycoat and Cellucoat chiral stationary phases
5th Symposium on Separations and Related Techniques by Nordic Society of Separation Science, Tallin, 2009. augusztus 26-29.

2009:

Z. Pataj, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Peter
High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparation of γ -Amino Acid Stereoisomers on Macrocyclic Glycopeptide-Based Columns
8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Sciences, Siófok, 2008. szeptember 2-4.

2009:

A. Peter, **Z. Pataj**, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp
HPLC enantioseparation of β -lactams
8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Sciences, Siófok, 2008. szeptember 2-4.

2009:

I. Ilisz, J. Kupai, P. Huszthy, R. Iványi, **Z. Pataj**, I. Szatmáry, F. Fülöp, A. Péter
Capillary Electrophoretic Enantioseparation of Betti Bases with Cyclodextrins and a Crown Ether as Chiral Selectors
8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Sciences, Siófok, 2008. szeptember 2-4.

2010:

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

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

ISC 28th International Symposium on Chromatography, Valencia, 2010. szeptember 12-16.

2010:

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

Betti-bázis analógok enantiomerjeinek folyadék-kromatográfiás elválasztása új, izopropilkarbamát-ciklofruktán6 (IP-CF6) állófázison

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

2010:

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

Aminonafthol sztereoizomerek nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiás elválasztása poliszacharid alapú királis kolonnákon

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

2010:

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

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia és a kapilláris elektroforézis hatékonyságának összehasonlítása királis analízisekben

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

2010:

Sipos L., Ilisz I., **Pataj Z.**, Szakonyi Zs., Fülöp F., Armstrong D.W., Péter A.

Monoterpen alapvázú 2-amino karbonsavak enantiomerjeinek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztása makrociklusos glikopeptid-vázú állófázisokon

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

2011:

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

The application of a newly developed isopropyl carbamate-cyclofructane6-based (IP-CF6) chiral stationary phase for HPLC enantioseparation of Betti base analogs

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

2011:

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

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

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

2011:

I. Ilisz, G. Fodor, **Z. Pataj**, I. Szatmári, F. Fülöp, L. Sente, A. Péter

Capillary Electrophoretic Enantioseparation of Aminonaphthol Analogs

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

9.4. Előadások

2008:

Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány Előadóülése, Szeged

β -2-Homoaminosavak királis elválasztása

2008:

Helyi TDK, Szeged

β -aminosavak nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztása

2008:

XXXI. Kémiai Előadói Napok, Szeged

β -2 és β -3-homoaminosav enantiomerek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztása

2009:

XXIX. OTDK, Kémiai és Vegyipari Szekció, Analitikai Kémia I. Tagozat, Debrecen

β -2 és β -3-homoaminosav enantiomerek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztása

2009:

Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány Előadóülése, Szeged

β -laktám és aminonaftol enantiomerek királis kromatográfiája poliszacharid-típusú állófázison

2009:

XXXII. Kémiai Előadói Napok, Szeged

Aminonaftol vegyületek királis kromatográfiája

2010:

MTA Peptidkémiai Munkabizottság Tudományos Ülése, Balatonszemes

γ -Aminosavak királis analízise

2010:

XXXIII. Kémiai Előadói Napok, Szeged

Betti-bázis analógok enantiomerjeinek HPLC-s elválasztása új, izopropilkarbamát-ciklofruktán6 (IP-CF6) állófázison

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Péter Antal egyetemi tanárnak, aki szakmai tanácsokkal segítette és irányította munkámat, valamint Értekezésem írását. Köszönöm a kromatográfiás tudást, melyet kiváló pedagógiai képességgel adott át nekem. Köszönöm mindazt, amit emberileg kaptam tőle.

Köszönet illeti Dr. habil Ilisz István egyetemi adjunktust a felmerülő kérdések megválaszolásában és a problémák megoldásában való közreműködéséért. Köszönöm, hogy mindig rendelkezésemre állt, ha szakmailag, ha barátilag volt rá szükségem.

Köszönöm Dr. Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak a lehetőséget, hogy a Tanszéken, kiváló kutatók között dolgozhattam és írhattam meg Értekezésemet.

Köszönettel tartozom Fülöp Ferenc akadémikusnak és munkatársainak, hogy kiváló munkájuk eredményeivel az én kutatásaimat is segítették.

Szeretném megköszönni Dr. Berkecz Róbertnek a munkámhoz nyújtott segítségét, szakmai támogatását.

Köszönöm Halasiné Varga Ilona technikusnak a segítségét, amelyet kísérleti munkámhoz adott.

Köszönöm a szakmai közreműködését munkatársaimnak, Aranyi Anita és Sipos László PhD hallgatóknak, valamint a szakdolgozóknak és a projektmunkásoknak, akikkel együtt dolgozhattam.

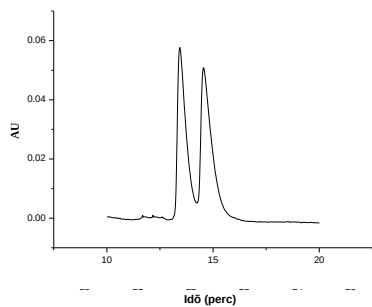
Köszönöm barátnőmnek, Leszkó Hajnalkának, hogy türelemmel kísért végig ezen az úton és mindig számíthattam, támaszkodhattam rá.

Végezetül köszönöm szüleimnek, testvéreimnek az erkölcsi és anyagi támogatást, mellyel segítették tanulmányaimat.

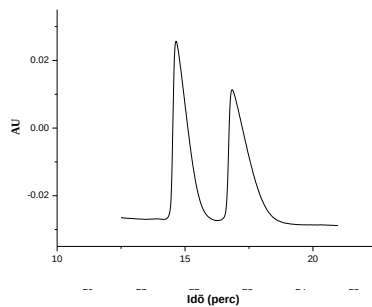
11. Függelék

11.1. Nem természetes aminosavak kromatogramjai

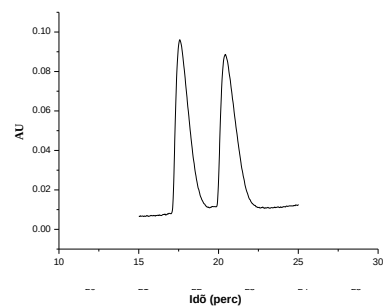
β -2-1



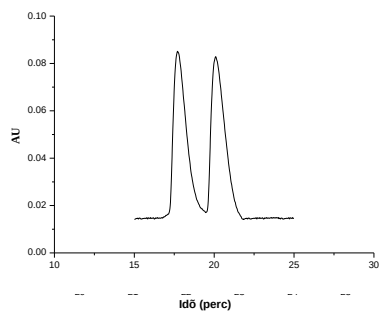
β -2-2



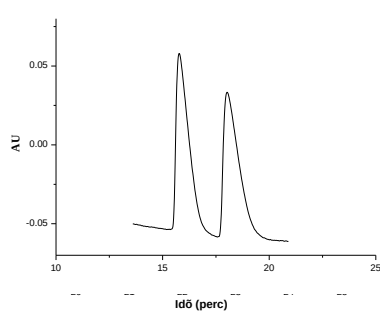
β -2-3



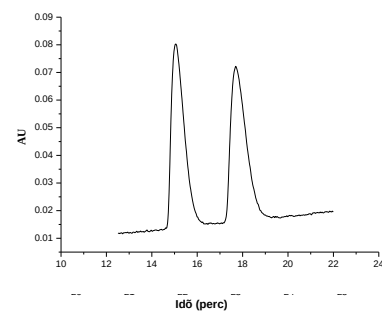
β -2-4



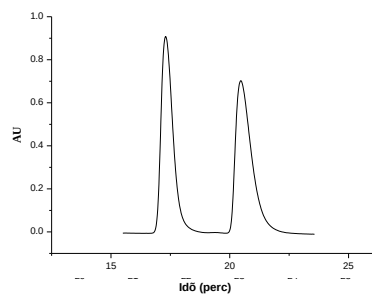
β -2-5



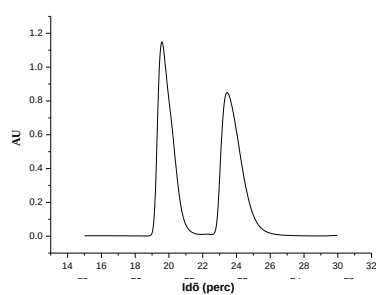
β -2-6



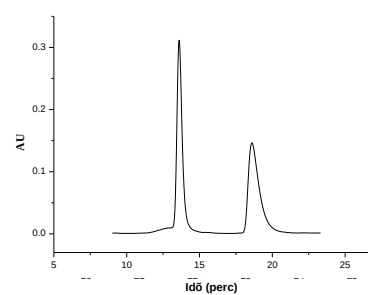
β -2-7



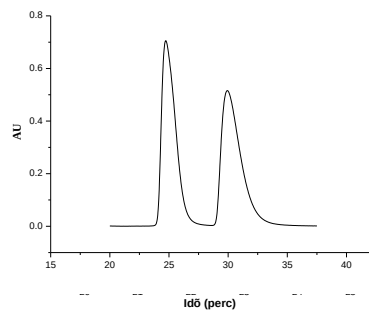
β -2-8



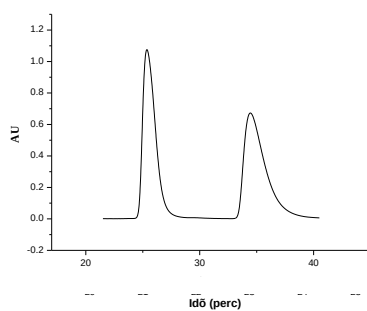
β -2-9



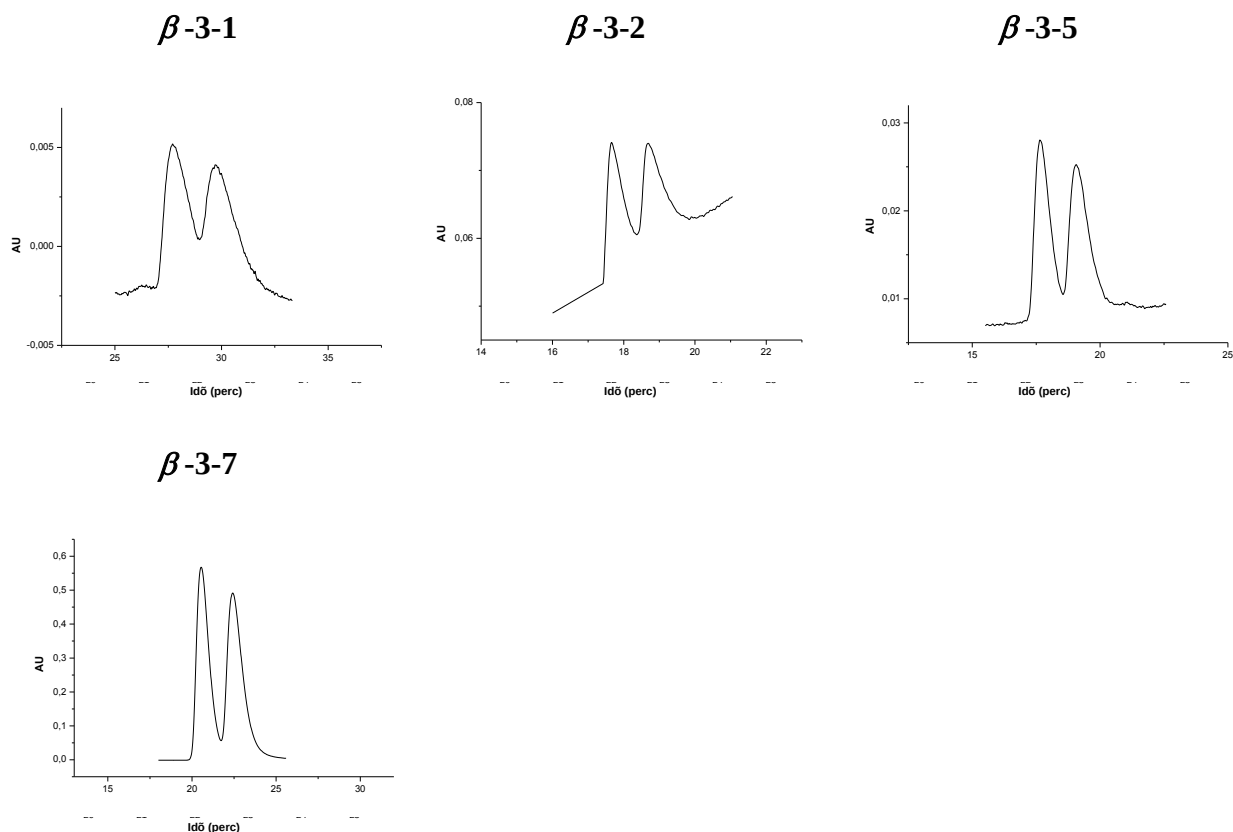
β -2-10



β -2-11

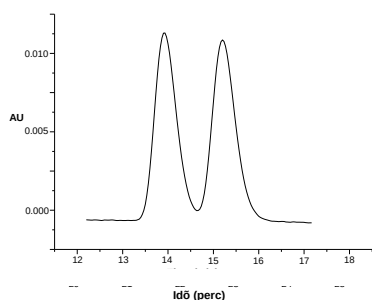


Oszlop: Chirobiotic T (β -2-1; β -2-2), Chirobiotic T₂ (β -2-3; β -2-4; β -2-6), Chirobiotic TAG (β -2-5; β -2-7; β -2-8; β -2-9; β -2-10; β -2-11) eluens összetétel: 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 20/80 (v/v) (β -2-2; β -2-3; β -2-4), 30/70 (v/v) (β -2-1; β -2-5; β -2-6; β -2-7; β -2-8; β -2-10; β -2-11), 40/60 (v/v) (β -2-9); áramlási sebesség: 0,5 ml/perc; detektálási hullámhossz: 205 nm; hőmérséklet: 25 °C (β -2-2; β -2-3; β -2-4; β -2-6; β -2-8; β -2-10; β -2-11), 35 °C (β -2-1; β -2-5), 45 °C (β -2-7; β -2-9)

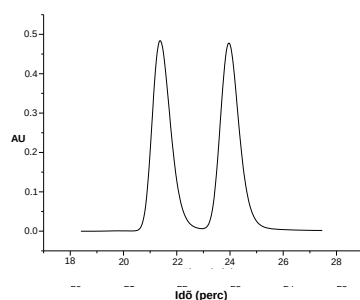


Oszlop: Chirobiotic T (β -3-2), Chirobiotic T₂ (β -3-1; β -3-5; β -3-7); eluens összetétel: 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 10/90 (v/v) (β -3-1; β -3-2; β -3-5; β -2-7); áramlási sebesség: 0,5 ml/perc; detektálási hullámhossz: 205 nm; hőmérséklet: 8 °C (β -3-1), 15 °C (β -3-5; β -3-7), 25 °C (β -3-2)

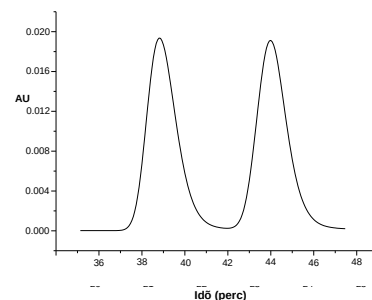
γ -1



γ -2



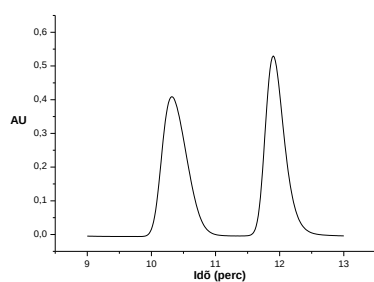
γ -3



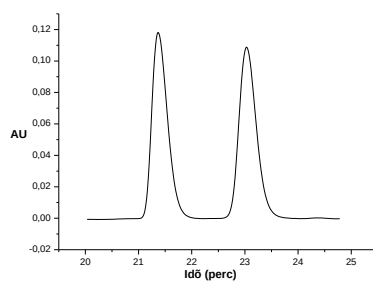
Oszlop: Chirobiotic R (γ -1), Chirobiotic TAG (γ -2; γ -3); **eluens összetétel:** 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 20/80 (v/v) (γ -1), 60/40 (v/v) (γ -3) és 90/10 (v/v) (γ -2); **áramlási sebesség:** 0,5 ml/perc; **detektálási hullámhossz:** 205 nm; **hőmérséklet:** 25 °C (γ -1; γ -2), 35 °C (γ -1)

11.2. β -Laktámok kromatogramjai

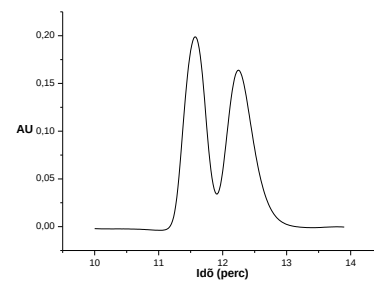
β -L-1



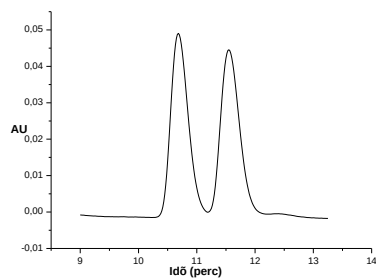
β -L-2



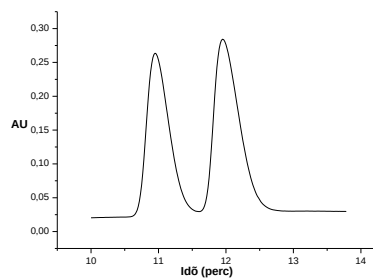
β -L-3



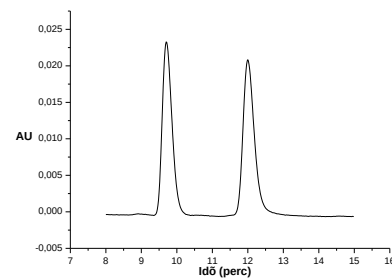
β -L-4



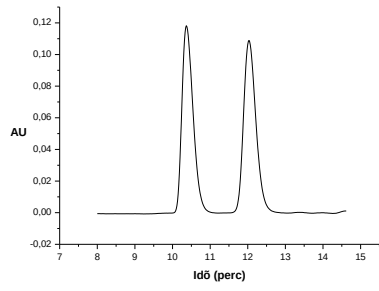
β -L-5



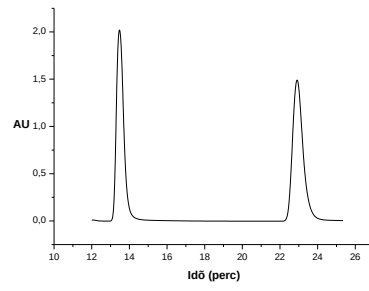
β -L-6



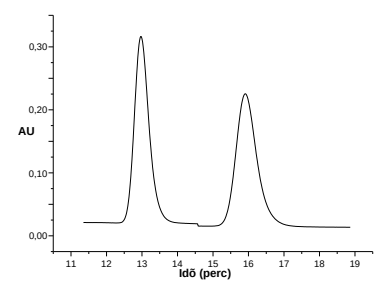
β -L-7



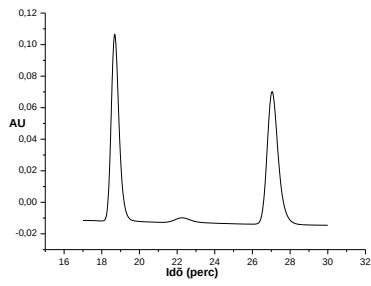
β -L-8



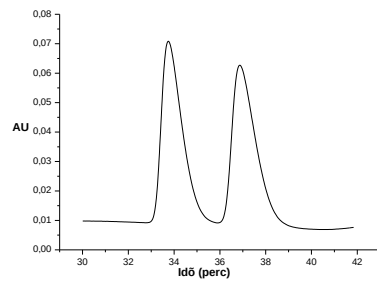
β -L-9



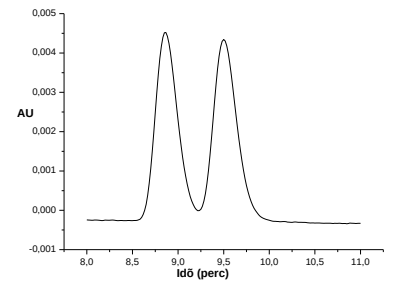
β -L-10



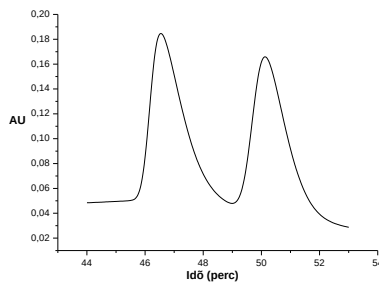
β -L-11



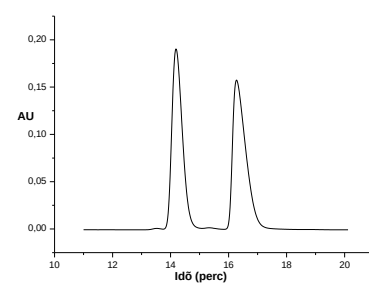
β -L-12



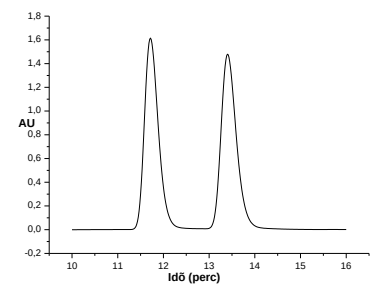
β -L-13



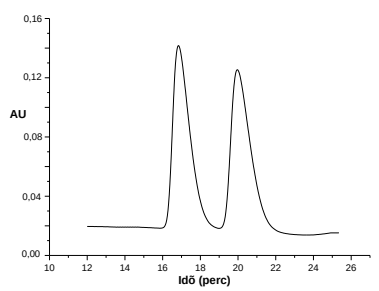
β -L-14



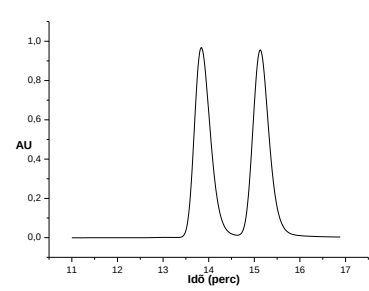
β -L-15



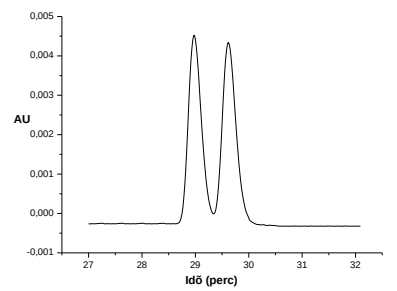
β -L-16



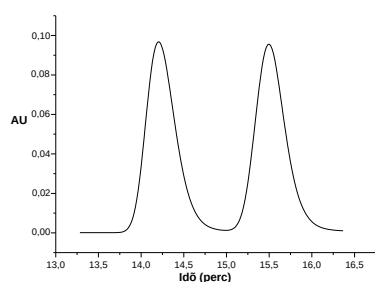
β -L-17



β -L-18



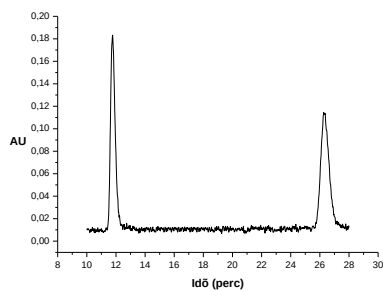
β -L-19



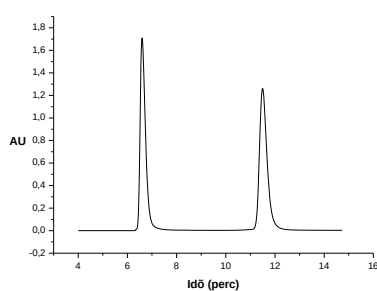
Oszlop: AmyCoat (β -L-1; β -L-2; β -L-4; β -L-5; β -L-6; β -L-7; β -L-8; β -L-9; β -L-10; β -L-11; β -L-15; β -L-17; β -L-19), CelluCoat (β -L-3; β -L-12; β -L-13; β -L-14; β -L-16; β -L-18); eluens összetétel: *n*-heptán/IPA = 90/10 (v/v) (β -L-1; β -L-3; β -L-4; β -L-5; β -L-6; β -L-7; β -L-8; β -L-9; β -L-10; β -L-12; β -L-14; β -L-15; β -L-17; β -L-19), *n*-heptán/IPA = 95/5 (v/v) (β -L-16; β -L-18), *n*-heptán/IPA = 98/2 (v/v) (β -L-11), *n*-heptán/*t*-BuOH = 97/3 (v/v) (β -L-2; β -L-13); áramlási sebesség: 0,5 ml/perc; detektálási hullámhossz: 205 nm; hőmérséklet: 25 °C

11.3. Betti-bázisok kromatogramjai

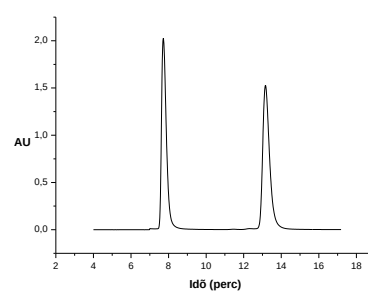
B-1A



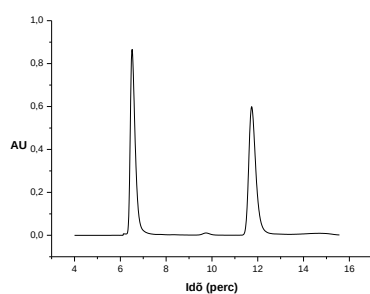
B-1B



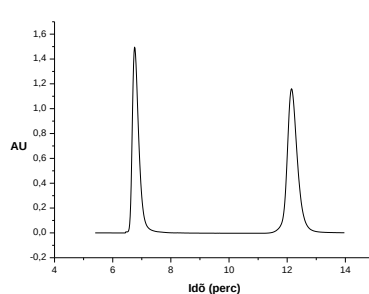
B-1C



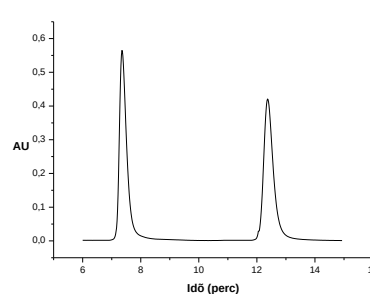
B-1D

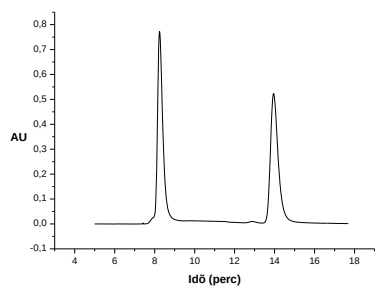
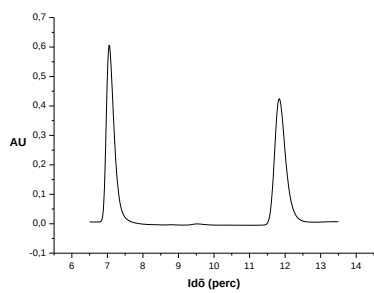
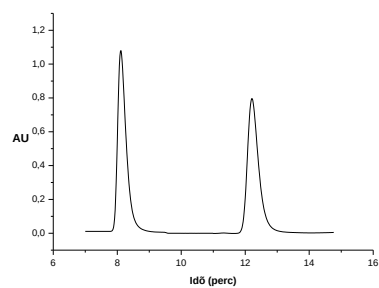
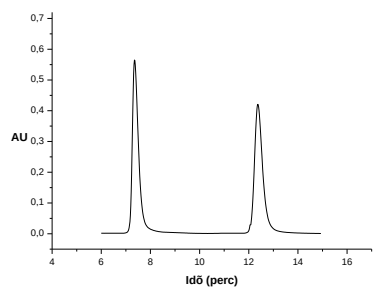
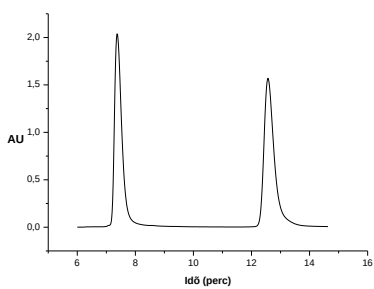
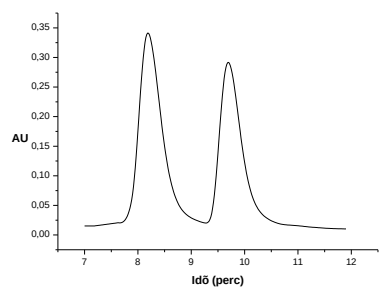
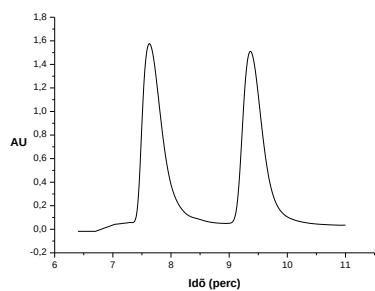
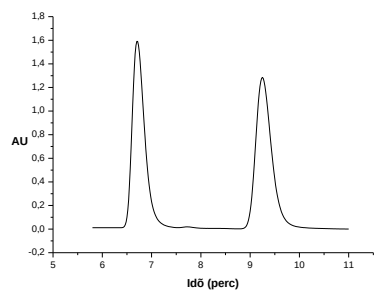
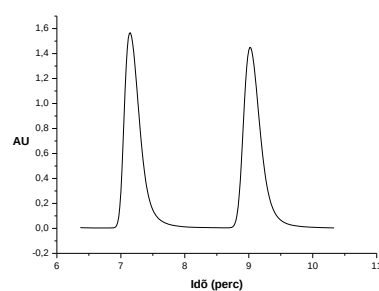
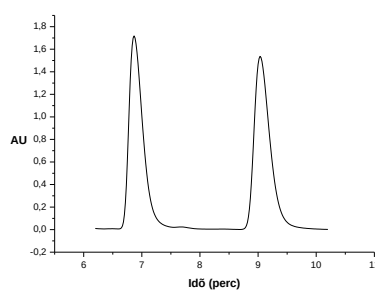
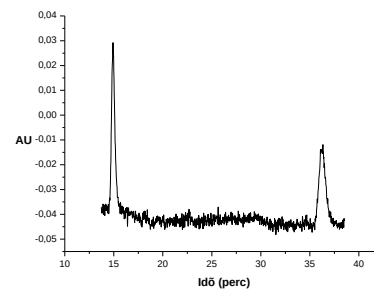
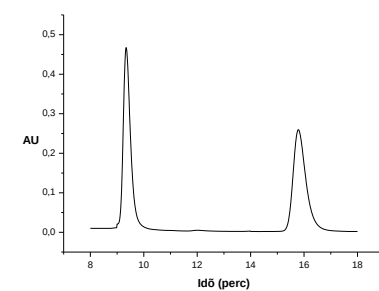


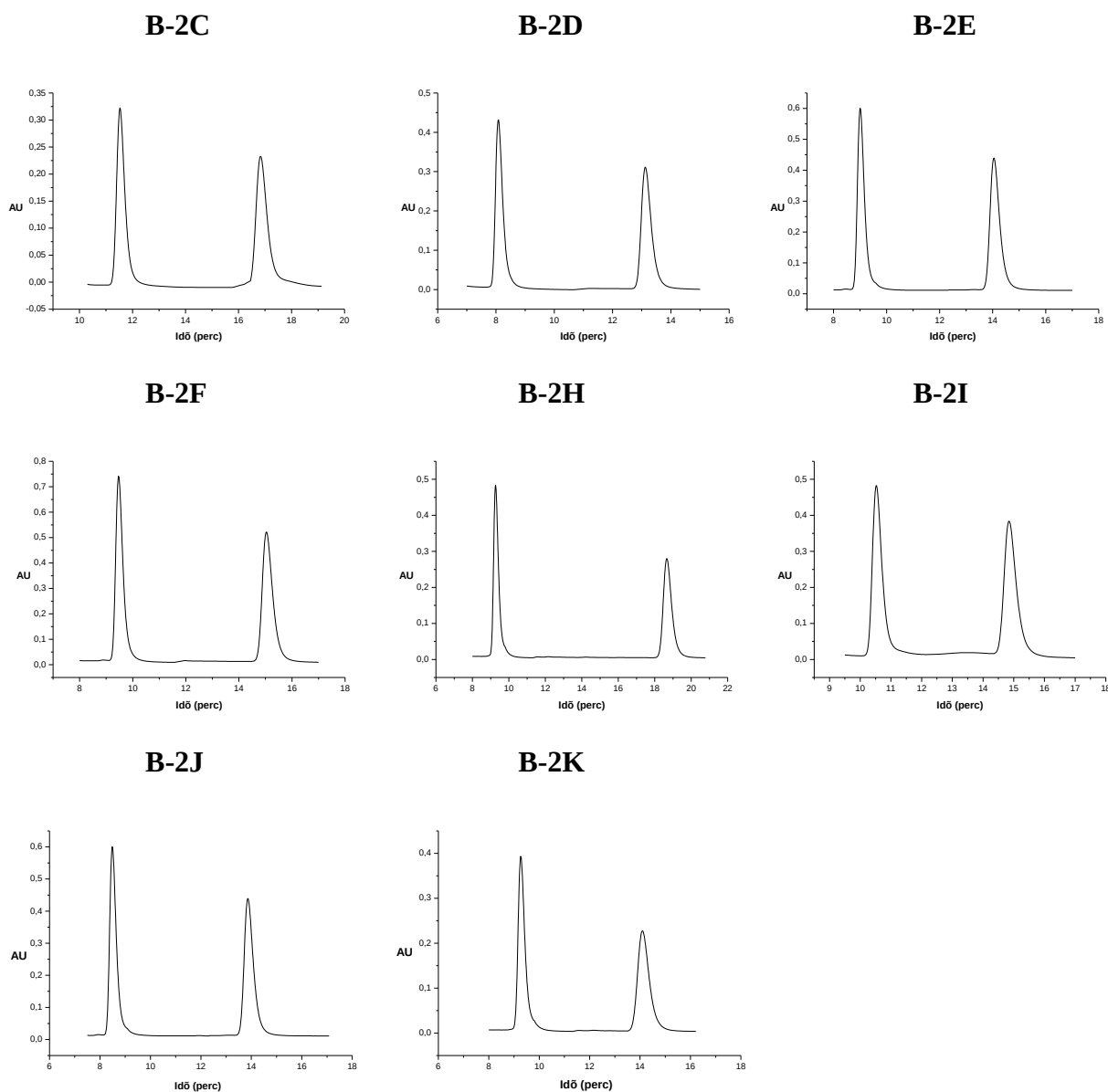
B-1E



B-1F



B-1G**B-1H****B-1I****B-1J****B-1K****B-1L****B-1M****B-1N****B-1O****B-1P****B-2A****B-2B**



Oszlop: AmyCoat(B-2F), CelluCoat (B-1A; B-1B; B-1C; B-1D; B-1E; B-1F; B-1G; B-1H; B-1I; B-1J; B-1K; B-1L; B-1M; B-1N; B-1O; B-1P; B-2A; B-2B; B-2C; B-2D; B-2E; B-2H; B-2I; B-2J; B-2K); **eluens összetétel:** *n*-hexán/IPA/DEA = 80/20/0,1 (v/v/v) (B-2F), *n*-hexán/IPA/DEA = 80/20/0,1 (v/v/v) (B-1A), *n*-hexán/IPA/DEA = 60/40/0,1 (v/v/v) (B-1K; B-1L; B-1M; B-1N; B-1O; B-1P), *n*-hexán/IPA/DEA = 40/60/0,1 (v/v/v) (B-1B; B-1C; B-1D; B-1E; B-1F; B-1G; B-1H; B-1I; B-1J; B-2B; B-2C; B-2D; B-2E; B-2H; B-2I; B-2J; B-2K), *n*-hexán/EtOH/DEA = 84,8/15,2/0,1 (v/v/v) (B-2A), *n*-heptán/*t*-BuOH = 97/3 (v/v) (β -L-2; β -L-13); **áramlási sebesség:** 0,5 ml/perc; **detektálási hullámhossz:** 230 nm; **hőmérséklet:** 25 °C