

Enantiomerelválasztás ciklodextrin alapú királis szelektorokkal

Ph.D. értekezés

Készítette:

Fodor Gábor

Témavezetők:

Dr. Péter Antal
egyetemi tanár

Dr. Ilisz István
habil. egyetemi adjunktus



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
Kémia Doktori Iskola
2013

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	6
1.1. A királis elválasztás jelentősége.....	6
2. Célkitűzés.....	8
3. Irodalmi áttekintés.....	9
3.1. A kiralitás és a királis elválasztás.....	9
1. ábra A királis aminosav-molekulák két enantiomerje csak annyiban tér el egymástól, mint a bal kéz a jobb kéztől.....	9
3.2. Ciklodextrinek elválasztástechnikai alkalmazása a királis analízisben.....	11
3.2.1. Ciklodextrinek szerkezete és fizikai-kémiai sajátosságai.....	12
3.2.2. Ciklodextrinek alkalmazása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) eljárások során.....	13
3.2.3. Ciklodextrinek alkalmazása kapilláris zónaelektroforézis (CZE vagy CE) során.....	20
3.3. Vizsgált anyagaink biológiai és kémiai jelentősége.....	26
3.3.1. β -Laktámok.....	26
3.3.2. β -Aminosav származékok.....	26
4. Kísérleti rész.....	27
4.1. Vizsgált anyagok.....	27
4.2. Felhasznált anyagok.....	32
4.3. Alkalmazott berendezések.....	32
4.4. Alkalmazott ciklodextrinek.....	32
4.5. Alkalmazott oszlopok.....	33
4.5.1. Quest 1, 2 és 3 oszlopok töltetének előállítása.....	33
5. Kísérleti eredmények és értékelésük.....	34
5.1. β -metil-szubsztituált aminosav enantiomerek elválasztása CE módszerrel.....	34
5.1.1. Az alkalmazott feszültség hatása.....	35
5.1.2. A puffer koncentrációja változtatásának hatása az elválasztásra.....	35

5.1.3.	<i>A CD koncentráció változtatásának hatása az elválasztásra</i>	35
5.1.4.	<i>Az elektrolit pH-jának hatása az elválasztásra</i>	36
5.1.5.	<i>Eritro- és treo-β-Me-aminosavak elválasztása SP2-α-CD királis szelektor jelenlétében</i> 40	
5.1.6.	<i>Eritro- és treo-β-Me-aminosavak elválasztása SP2-β-CD királis szelektor jelenlétében</i> 40	
5.1.7.	<i>Eritro- és treo-β-Me-aminosavak elválasztása SP4-β-CD királis szelektor jelenlétében</i> 41	
5.1.8.	<i>Több kiralitás centrummal rendelkező eritro- és treo-β-Me-aminosavak elválasztásának optimalizálása</i>	41
5.2.	β -szubsztituált triptofán analóg enantiomerek elválasztása módosított CD jelenlétében CE módszerrel	42
5.2.1.	<i>Eritro- és treo-β-szubsztituált Trp analógok királis elválasztása SP2-α-CD királis szelektort alkalmazva</i>	43
5.2.2.	<i>Eritro- és treo-β-szubsztituált Trp analógok királis elválasztása SP2-β-CD és SP4-β-CD királis szelektort alkalmazva</i>	44
5.2.3.	<i>A négy enantiomerrel rendelkező eritro- és treo-β-szubsztituált Trp analógok királis elválasztása</i>	44
5.2.4.	<i>A β-Me-aminosavak enantiomerjeinek azonosítása</i>	46
5.3.	β -laktám enantiomerek folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztása fordított fázisú körülmények között, „újszerű” ciklodextrin alapú állófázisokon	47
5.4.	Szerkezetiileg különböző molekulák folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztása „újszerű” ciklodextrin alapú állófázisokon	52
6.	Összefoglalás	58
7.	Summary	63
8.	Hivatkozások	68
9.	Közlemények listája	73
9.1.	Az értekezés alapját képező közlemények	73
9.2.	Poszterek	74
10.	Köszönetnyilvánítás	75
11.	Elektroferogramok és kromatogramok	76

11.1.	Több kiralitás centrummal rendelkező β -Me-szubsztituált aminosavak elektroferogramjai	76
11.2.	Több kiralitás centrummal rendelkező β -szubsztituált Trp analógok elektroferogramjai .	77
11.3.	A β -laktám enantiomerek elválasztását jellemző kromatogramok.....	78
11.4.	A szerkezetileg különböző molekulák kromatogramjai	79

Az értekezésben használt gyakori rövidítések

Kromatográfiai kifejezések

CE: Kapilláris elektroforézis

CZE: Kapilláris zónaelektroforézis

LC: Folyadékkromatográfia

HPLC: Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

GC: Gázkromatográfia

EOF: Elektroosmotikus áramlás

Oldószerek, vegyszerek

DIME- β : Dimetilezett- β -ciklodextrin

TRIME- β : Trimetilezett- β -ciklodextrin

CD: Ciklodextrin

TEA: Trietilamin

TEAA: Trietil-ammónium-acetát

TEAP: Trietil-ammónium-foszfát

MeOH: Metanol

MeCN: Acetonitril

AcOH: Ecetsav

TFA: Trifluor-ecetsav

DMSO: Dimetil-szulfoxid

TRIS: Trisz(hidroximetil)-aminometán

DMF: Dimetil-formamid

Királis oszlopok

BCD: Természetes β -ciklodextrin

HPBCD: Hidroxipropil- β -ciklodextrin

PMBCD: Permetil- β -ciklodextrin

1. Bevezetés

1.1. A királis elválasztás jelentősége

A királis hatóanyagok iránt az 1980-as években nőtt meg számottevően az érdeklődés. Ez a nagy érdeklődés az izomerek eltérő élettani hatásának tudható be, amit később számos gyógyszerkészítménynél bizonyítottak. Az ötvenes évek végén Nyugat-Németországban jelent meg a modern idők egyik legnagyobb orvosi tragédiáját okozó **Contergan** (Thalidomid), mint recept nélkül kapható nyugtató. Ezt a gyógyszert 1957-1961 között az *N*-ftalilglutaminsav imid racém keverékeként forgalmazták. 1958-tól hirtelen megnőtt a végtagnélküli illetve fejletlen végtaggal született újszülöttek száma (phocomelia). Az áldozatok számát manapság 10,000–20,000 főre becsülik. A gyógyszert 1961-ben vonták ki a forgalomból, az okozott súlyos fejlődési és idegrendszeri károsodás miatt. Az 1980-as években kiderült, hogy a racém formában gyártott szernek csak az egyik enantiomerje okoz rendellenességet. Míg a gyógyszer jótékony hatásáért kizárólagosan az *R*-(+)-izomer a felelős, addig az *S*-(+)-izomer magzatkárosító hatással bír. Az eset után az amerikai élelmiszereket és gyógyszereket felügyelő hatóság, az FDA kötelezte 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 [1].

Az emberi szervezetben lejátszódó fizikai és kémiai folyamatok során a bejuttatott gyógyszermolekula aszimmetrikus biológiai makromolekulákkal (fehérjék, polinukleotidok, glikopeptidek) kerül kölcsönhatásba. Ez a királis környezet képes megkülönböztetni az enantiomereket is.

Ezeket a gyógyszermolekulákat a biológiai rendszerek sztereospecifikusan ismerik fel, azaz a sztereoizomerek különféle élettani hatással rendelkez(het)nek. Ilyen lehet pl:

- azonos farmakológiai hatás, de nagyobb toxicitás,
- más farmakológiai hatás vagy
- antagonizmus.

Ennek következményeként a gyógyszerhatóanyag enantiomerek megkülönböztetése és elválasztása elengedhetetlen feladat, melyre napjainkban a folyadékkromatográfia mellett a kapilláris elektroforézis az egyik leggyakrabban alkalmazott analitikai módszer.

2. Célkitűzés

Munkám során célul tűztük ki kapilláris elektroforézis és új fejlesztésű királis kolonnákon folyadékkromatográfias módszerek fejlesztését különböző biológiai és gyógyszeripari szempontból fontos vegyületek elválasztására.

Vizsgálni kívántuk:

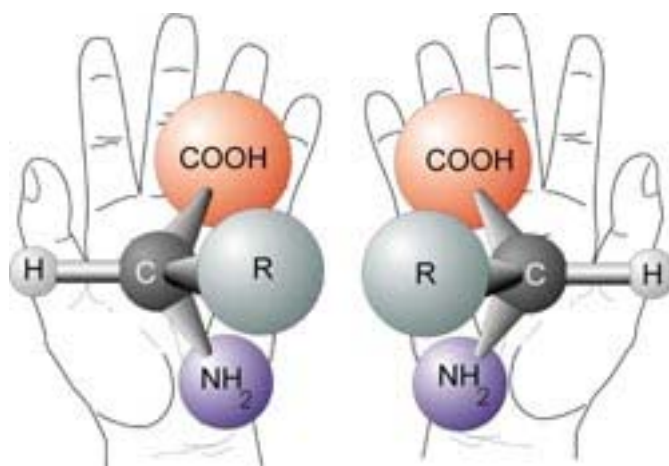
- a) β -metil-szubsztituált aminosav enantiomerek elválasztását kapilláris elektroforézises technikával (különböző ciklodextrin alapú királis szelektorok alkalmazásával),
- b) β -szubsztituált triptofán analóg enantiomerek elválasztását kapilláris elektroforézises technikával (különböző ciklodextrin alapú királis szelektorok alkalmazásával),
- c) β -laktám enantiomerek elválasztását fordított fázisú körülmények között, újonnan fejlesztett ciklodextrin alapú állófázisokon, valamint
- d) szerkezetileg különböző molekulák elválasztását újonnan fejlesztett ciklodextrin alapú állófázisokon.

További célunk volt, hogy közvetlen királis folyadékkromatográfias és kapilláris zónaelektroforézisen alapuló elválasztások során, a vizsgált vegyületek és a királis szelektorok szerkezetének ismeretében az elválasztási körülmények változtatásának hatását feltérképezzük. A nyert adatokból kiindulva 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 és a királis elválasztás

Léteznek olyan vegyületek, amelyeknek a természetben két olyan változata, izomere fordul elő, amelyek egymás tükörképei. Optikailag aktívak (általában) az olyan vegyületek, amelyek molekulái nem hozhatók fedésbe a tükörképükkel; úgy viszonyulnak egymáshoz, mint a jobb kéz a bal kézhez (**1. ábra**). Az ilyen aszimmetrikus molekulákat királis vegyületeknek nevezzük.



1. ábra A királis aminosav-molekulák két enantiomerje csak annyiban tér el egymástól, mint a bal kéz a jobb kéztől

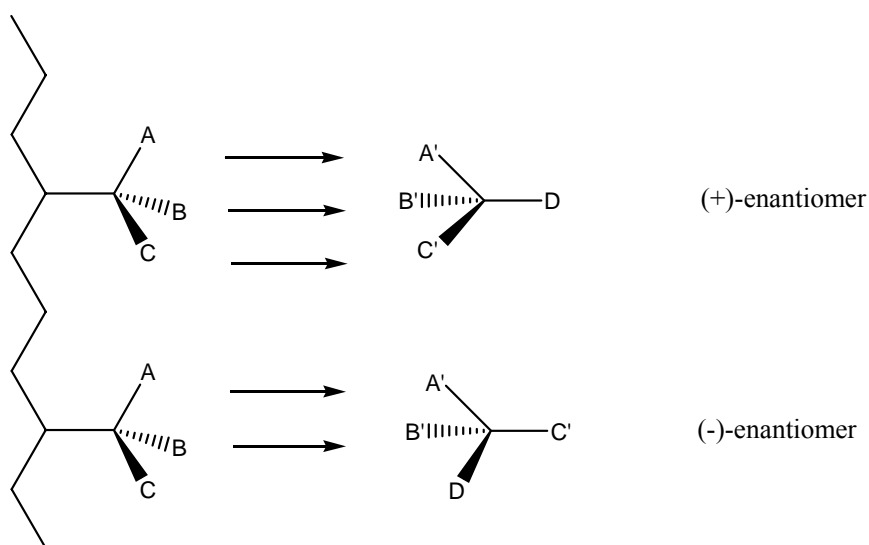
Először Louis Pasteur vizsgálta a szerves vegyületek szerkezete és optikai aktivitása közti összefüggést. Az optikai aktivitást nem mutató, optikailag inaktív borkósavat (régiben szőlősav) vizsgálva észrevette, hogy a kristályos borkósavban kétféle kristály található és ezek a kristályok különböző alakúak. A különböző alakú kristályokat szétválogatta és rájött arra, hogy ezek a kristályok egymás tükörképei, egymástól csak annyiban különböznek, mint a jobb kéz a bal kéztől. A kristályok, illetve oldataik optikailag aktívak voltak, és fajlagos forgatóképességük azonos nagyságú, de ellenkező előjelű volt. A két kristály illetve oldatuk egyéb fizikai és kémiai tulajdonságaiban nem volt különbség. A kétféle kristály feloldása után is megőrizte optikai aktivitását, ebből következett, hogy az optikai aktivitást nem a molekulák elrendeződése okozza a kristályrácsban, hanem ez a molekulák tulajdonsága. Pasteur arra a

következtetésre jutott, hogy a kristályokban található molekulák éppúgy egymás tükörképei, mint maguk a kristályok.

A királis vegyületek 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.

Enantiomer párok kromatográfias vagy elektroforetikus elválasztása a fizikai és kémiai tulajdonságbeli azonosságuk miatt csak olyan sztereospecifikus kémiai kölcsönhatással lehetséges, amelynek során a sztereoizomerek eltérő módon viselkednek. A királis elválasztások két nagy csoportba sorolhatók: *közvetett* és *közvetlen* meghatározásokra. A *közvetett* módszerek királis reagens alkalmazásával történő származékképzésen alapulnak, az így képződött diasztereomerek már akirális körülmények között is elválaszthatók lesznek. A *közvetlen* módszerek királis oszlop (állófázis), illetve királis eluens (mozgófázis) vagy királis adalék felhasználására épülnek.

A királis állófázis alkalmazása a leghatékonyabb módszer az enantiomerek kromatográfias elválasztására, és kiváló választás analitikai és preparatív célokra egyaránt. A mozgófázis akirális, tehát bármiféle királis anyagtól mentes. Az állófázis és az elválasztandó vegyület között enantioszelektív kölcsönhatás kialakulására akkor lehet számítani, amikor az elválasztandó molekula legalább három ponton tud kapcsolódni az állófázishoz. Ez az úgynevezett hárompontos illeszkedés modellje (**2. ábra**), ami számos állófázis tervezésének alapja.



2. ábra Hárompontos illeszkedés modellje

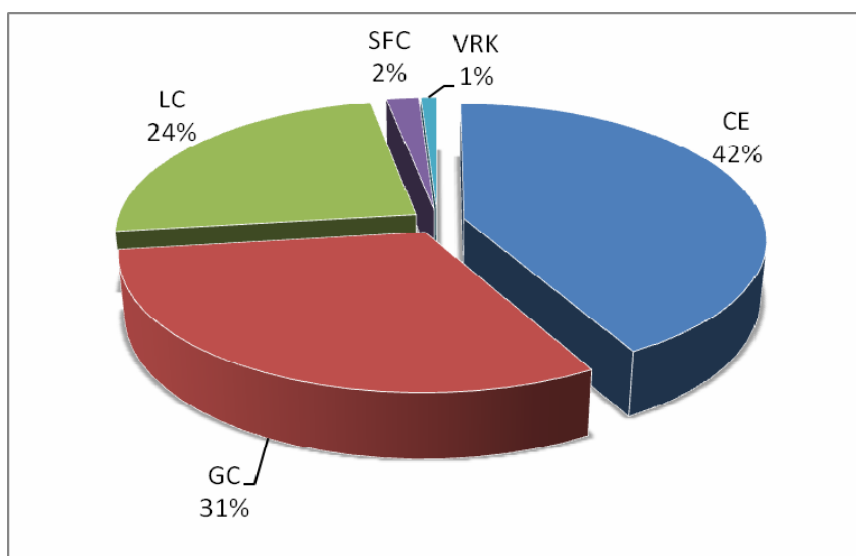
Napjainkban a leggyakrabban alkalmazott állófázisok típusai a következők:

- ciklodextrin alapú fázisok,
- Pirkle-féle fázisok (π -sav- π -bázis kölcsönhatások),
- királis polimer fázisok,
- ligandumcserélő fázisok,
- makrociklusos antibiotikum fázisok,
- koronaéter fázisok,
- fehérje alapú fázisok és
- molekulalenyomat alapú fázisok.

A közvetlen módszerek másik típusánál az állófázis akirális (lehet nomál illetve fordított fázis) és az eluens a királis szelektort adalékként tartalmazza.

3.2. Ciklodextrinek elválasztástechnikai alkalmazása a királis analízisben

A **3. ábrán** látható az 1981-2000 között közölt ciklodextrin alapú királis elválasztások száma a közlemények százalékos eloszlása szerint [2]. Láthatjuk, hogy ebben az időszakban a legtöbb közlemény a kapilláris elektroforézises (CE) technikában született, 1981 és 1989 között még a folyadékkromatográfia dominált (LC), majd 1989-1994 között a gázkromatográfia (GC) és csak 1994-től nőtt meg a kapilláris elektroforézisen (CE) alapuló közlemények száma.



3. ábra Ciklodextrin alapú királis elválasztások közleményeinek eloszlása 1989 és 2000 között

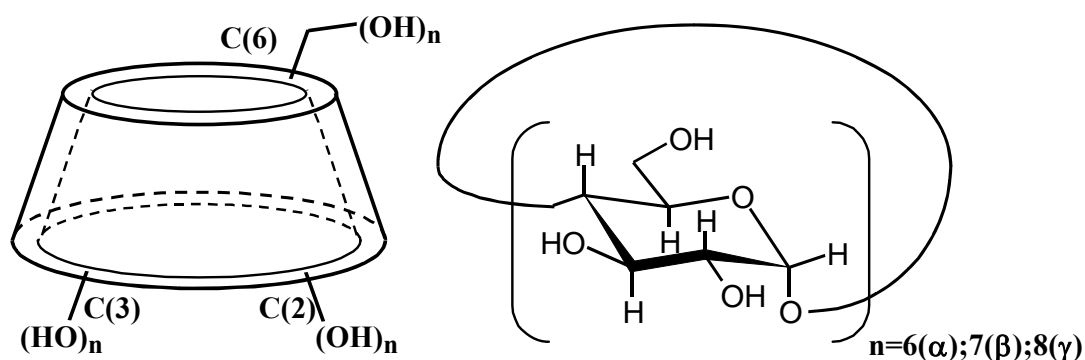
3.2.1. Ciklodextrinek szerkezete és fizikai-kémiai sajátosságai

A ciklodextrinek hat, hét vagy nyolc α -D-glükopiranoz-egységből álló ciklikus, nem redukáló oligoszacharidok. Az egyes ciklodextrineket az alkotó glükóz egységek száma alapján nevezzük el, így megkülönböztetünk 6, 7 ill. 8 egységből felépülő α -, β -, ill. γ -ciklodextrineket. A ciklodextrinek fontosabb tulajdonságait az 1. Táblázatban foglaltam össze.

1. Táblázat Az α -, β - és γ -ciklodextrinek fontosabb fizikai-kémiai jellemzői

	α	β	γ
Glükopiranoz egységek száma	6	7	8
Molekulatömeg (g)	972	1135	1297
Oldékonyság (g/100 ml vízben szobahőmérsékleten)	14,5	1,85	23,2
Törésmutató (25 °C)	150±0,5	162,5±0,5	177,4±0,5
Üregátmérő (nm)	0,47–0,53	0,6–0,65	0,75–0,83
Henger magassága (nm)	0,79±0,1	0,79±0,1	0,79±0,1
Molekula külső átmérője (nm)	1,46±0,4	1,54±0,4	1,75±0,4
Közelítő térfogat (nm ³)	0,174	0,262	0,427

A ciklodextrineket alkotó glükopiranoz egységek egy csonkakúp-palást felületén helyezkednek el, egy üreget körülhatárolva. Az üreg átmérője a ciklodextrint felépítő glükopiranoz egységek számával nő, így a ciklodextrin helyes megválasztásával elérhető, hogy bizonyos molekulák beférnek az apoláris üregbe (ott ezáltal különböző erősségű kölcsönhatások kialakulására nyílik lehetőség, ún. „gazda-vendég” kölcsönhatás), míg más molekulák méretük miatt nem jutnak be az üregbe, vagy nem illeszkednek elég szorosan benne. A királis felismerés létrejöttében olyan intermolekuláris kölcsönhatások játszanak szerepet, mint például a hidrofób-hidrofób, elektrosztatikus (dipol-dipol), van der Waals kölcsönhatás, hidrogénkötés vagy pedig különböző szterikus kölcsönhatások. A hidrogénkötés csak igen kis távolságon belül tud kialakulni, így különösen fontos, hogy a molekula jól illeszkedjen a ciklodextrin üregébe. Fontos megemlíteni azt is, hogy a ciklodextrin belseje (ürege) a hidrogénatomok és glikozidos oxigén-hidak révén enyhén apoláris tulajdonságú. A csonkakúp keskenyebb nyílását a primer, míg a szélesebbet a szekunder hidroxilcsoportok határolják (4. ábra). A molekula két peremének poláris jellege miatt – a β -ciklodextrin kivételével – a ciklodextrinek jól oldódnak vízben (1. Táblázat).



4. ábra A ciklodextrinek szerkezeti sémája

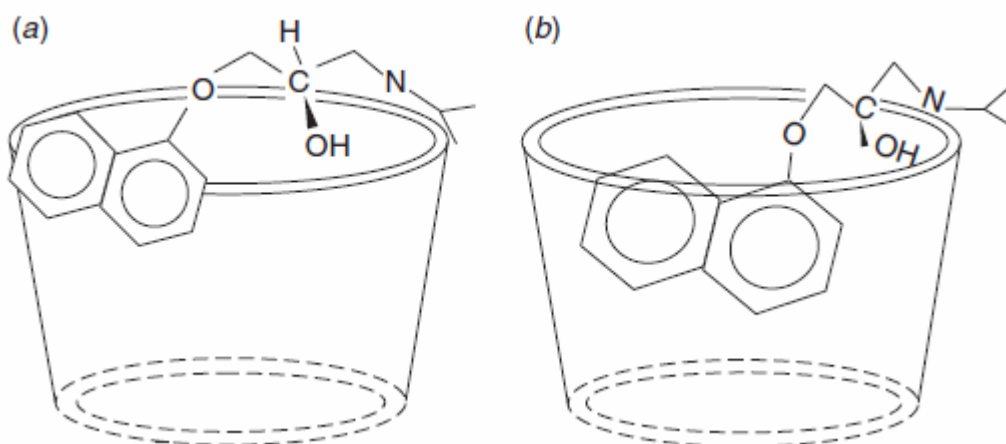
3.2.2. Ciklodextrinek alkalmazása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai (HPLC) eljárások során

A ciklodextrint tartalmazó állófázisokat eredetileg geometriai és szerkezeti izomerek elválasztására szánták. Az első, nagy borítottságú, stabil ciklodextrint tartalmazó állófázist Armstrong és Demond fejlesztette [3], amit 1983-ban már forgalomba is hoztak. Az új állófázissal való kezdeti kísérletek királis aromás vegyületek, aromásan derivatizált aminosavak, szerkezeti izomerek és diasztereomerek elválasztására irányultak [3-7]. A ciklodextrin alapú királis állófázisok „multi-modálisak” [8,9], egyaránt lehet őket használni normál fázisú, fordított fázisú és poláris-szerves módban. Leggyakrabban fordított fázisban használják, ahol az eluens vizes vagy szerves–vizes fázis. A zárványkomplex kialakulása két lépésben történik [10]. Először a molekula hidrofób részével bejut a ciklodextrin üregébe, megszabadul a hidrátburkától, majd ezt követően egy komplex stabilizálódási folyamat megy végbe hidrofób kölcsönhatásokon keresztül. A komplex stabilizálódását még további hidrofíl kölcsönhatások is segítik (hidrogénkötés, dipol-dipol kölcsönhatás, stb.) a ciklodextrin peremén elhelyezkedő hidroxilcsoportokon keresztül.

A zárványkomplex kialakulása alapvetően a ciklodextrin üregének méretétől függ (5. ábra). Minél jobban illeszkedik a ciklodextrin üregébe a mintamolekula, annál inkább nőhet az enantioszelektivitás. Szubsztituált fenil-, naftil- és heteroaromás gyűrűt tartalmazó minták könnyedén illeszkednek a β -ciklodextrin üregébe, míg a nagyobb méretű molekulák, például a szteroidok a γ -ciklodextrinre részesítik előnyben, a kisebb molekulák pedig az α -ciklodextrint tartalmazó állófázison alakítanak ki erősebb kölcsönhatásokat.

Poláris-szerves módban (savat, bázist vagy mindkettőt tartalmazó acetonitril-metanol elegye) a ciklodextrin hidrofób üregét lezárják az oldószer molekulái, és így zárványkomplex

kialakulása termodinamikailag kedvezőtlené válik. A mintamolekula csak a hidrofíl részével tud kötődni a ciklodextrin poláris felületéhez [11]. A ciklodextrin peremén elhelyezkedő poláris hidroxilcsoportok jelentik a mintamolekula számára a királis környezetet, és az itt kialakuló poláris kölcsönhatások (hidrogénkötés, dipol-dipol kölcsönhatás, diszperziós kölcsönhatás, stb.) erősségén alapszik az enantiomerek elválasztása.



5. ábra Mintamolekula felismerés a ciklodextrin üregében (a) poláris-szerves és normál fázisú módban, (b) fordított fázisú módban

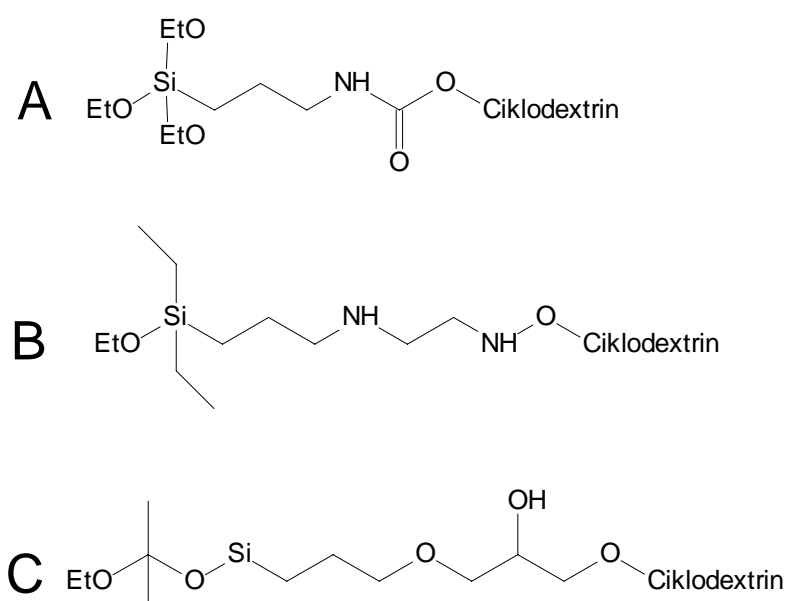
Poláris-szerves módban a több poláris funkciós csoporttal rendelkező molekuláknál általában az a funkciós csoport felelős a királis elválasztásért, amelyik a legközelebb helyezkedik el az aszimmetria centrumhoz. Mivel számos királis gyógyszer poláris, így a poláris-szerves mód használata lenne a legcélszerűbb, amennyiben a normál és fordított fázisú módszerek nem váltak be [12]. Ezekben az esetekben általában 0-15% metanolt használnak acetonitril mellett, és adalékként 0,001-1,2% (v/v) jégecetet vagy trietilamint adnak a mozgófázishoz [13].

Normál fázisú módban (tipikusan hexán vagy heptán különféle alkoholokkal alkotott elegye) a komplex kialakulása szintén gátolt a ciklodextrin üregében. Normál fázisú módban csak az aromásan szubsztituált ((*R*)- vagy (*S*)-1-(1-naftil)-etil-karbamát) ciklodextrinek bizonyultak hatékonynak az enantiomerek elválasztásában. Ebben az esetben a hidrogénkötés és a dipol-dipol kölcsönhatás mellett a π - π kölcsönhatás is fellép, ami döntő szerepet játszik a királis elválasztásban.

A ciklodextrin molekulákat számos módon próbálták megkötni a szilikagél felületére (6. ábra). Az első próbálkozások „amin” kötésen keresztül történtek [14,15] poliakrilamid vagy szilika géltre. Miután ezek az „amin” kötések gyengének bizonyultak, a kutatások új

kötési módok kidolgozására irányultak. Az első stabil állófázist „epoxid” kötéssel keresztül oldotta meg Armstrong [3]. Az epoxid kötés nitrogén atom mentes volt, és minimális számban tartalmazott hidrogénkötésre alkalmas helyeket is. A legtöbb kereskedelemben is kapható ciklodextrint tartalmazó oszlopon ilyen technikával kötik meg a ciklodextrineket. A ciklodextrin alapú állófázisok számos fajtája fellelhető a piacon, a legtöbbször alkalmazott változatokat 3 csoportba tudjuk sorolni:

1. természetes ciklodextrinek,
2. módosított ciklodextrinek és
3. aromás csoporttal módosított ciklodextrinek.



6. ábra Ciklodextrin kötési módok: (A) Izocianát-karbamát kötés, (B) Etilén-diamin kötés, (C) Epoxid-éter kötés.

A természetes ciklodextrint tartalmazó állófázisoknál a β -ciklodextrint alkalmazzák leggyakrabban, mivel ez a módosulat bizonyult a leghatékonyabbnak számos enantiomer elválasztásánál [3,5,6,16-38]. Az α -ciklodextrint tartalmazó állófázisokat aromás aminosavak és szubsztituált analógjaik királis elválasztására használták [39]. Különös ennél a módosulatnál, hogy például a monoterpéneket eddig csak ezzel a módosulattal sikerült elválasztani (α -, β -pinén) [40]. A γ -ciklodextrint tartalmazó királis állófázisokat helyzeti izomerek [41], policiklikus aromás molekulák [42].

Mindegyik természetes ciklodextrin használható poláris-szerves módban [37]. Az egyes ciklodextrinek között retenciós, szelektivitási és felbontásbeli különbségek adódhatnak, ami a ciklodextrinek méretéből, a mintamolekula illeszkedéséből és a ciklodextrineken elhelyezkedő hidroxilcsoportok geometriájától is függ.

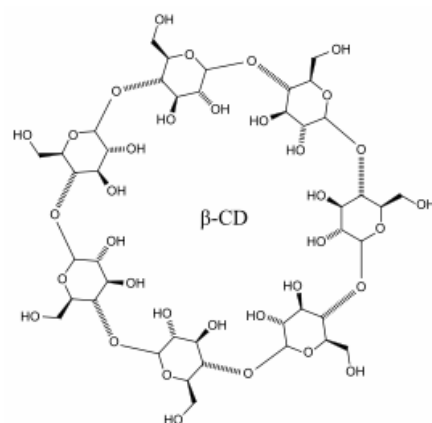
Amennyiben zárványkomplexek kialakulására lehetőség nyílik, a királis felismerés elsődlegesen azon múlik, hogy a mintamolekula belefér-e a ciklodextrin “üregébe” illetve hogy a H-hidas kölcsönhatások a másodlagos hidroxilcsoportokon kialakulhatnak-e. Ezek alapján a különböző méretű ciklodextrinek különböző mintamolekulákkal tudnak kölcsönhatásba lépni [37].

A *módosított ciklodextrinek* növelhetik a királis felismerést azzal, hogy további kölcsönhatást biztosítanak a minta számára, vagy azzal, hogy megváltoztatják a ciklodextrin üregének méretét és ezzel a mintamolekula illeszkedését, ezáltal természetes formájuktól jelentősen eltérő viselkedést mutathatnak.

A *módosított ciklodextrinek* többnyire sokkal hatékonyabb királis szelektorok, mint a természetes ciklodextrinek, de előfordul néhány közöttük, ami általánosan kevésbé hatékony királis szelektor, de speciális esetekben bizonyos molekula csoportoknál igen eredményes is tud lenni. A kereskedelmi forgalomban kapható fontosabb módosított ciklodextrineket a **7. ábra** mutatja be.

Az acetilezett ciklodextrin alapú állófázis olyan ciklodextrin molekulákat tartalmaz, ahol a 2. és 3. pozícióban lévő szekunder hidroxilcsoportok és az összes 6. pozícióban lévő primer hidroxilcsoport acetilezett. Ezek a helyzetek alkalmasak hidrogénkötés kialakítására olyan molekulákkal, melyek hidroxil- vagy aminocsoportokat tartalmaznak. Az acetilcsoport π -elektron rendszerként is működhet, és gyűrűszélesítő hatással is bír, ami lehetővé teszi a nagyobb molekulák befogadását is. Ez nem okoz nagymértékű szélesedést, de azoknál a molekuláknál megoldást jelenthet, amelyek épphogy nem férnek be a ciklodextrin üregébe. Ez a fajta állófázis jól alkalmazható poláris-szerves módban azoknál a molekuláknál, ahol legalább kettő, hidrogénkötés kialakítására alkalmas csoport található a kiralitás centrum közelében [43]. Továbbá hatékonyak bizonyult alkaloidok (szkopolamin, homoatropin) és peszticidok (trihexilphenidil, rulene) rezolválásánál is [43,44].

A dimetilezett ciklodextrint tartalmazó állófázisnál a szekunder hidroxilcsoportok metilezettek 2. és 3. helyzetben a gyűrű külső peremén. Ez csökkenti a hidrogénkötés kialakítás lehetőségét a mintamolekulákkal. A szekunder hidroxilcsoportok hiánya eleve kizárja az állófázis alkalmazását poláris-szerves módban [45].



Szubsztituens	Elnevezés	Kolonna
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---CHCH}_3 \end{array}$	acetilezett	Cyclobond I AC
---CH_3	dimetilezett	Cyclobond I DM
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{---CH}_2\text{CHCH}_3 \end{array}$	hidroxipropil	Cyclobond I RSP
	naftil-etil-karbamát	Cyclobond I RN és SN
	dimetil-fenil-karbamát	Cyclobond I DMP

7. ábra Kereskedelmi forgalomban kapható, módosított β -ciklodextrin-alapú királis állófázisok

Az állófázis igen hatékonyan bizonyult néhány molekulacsoportnál fordított fázisban, mint például a diaril és alifás királis szulfoxidok [46], szubsztituált kumarinok [47] elválasztásánál. Ennél az állófázisnál igen fontos a szterikus kölcsönhatás a királis felismerésben. Összehasonlítva a 2,3-dimetil- β -ciklodextrint és a természetes β -ciklodextrint tartalmazó állófázisok elválasztó képességét, a dimetil- β -ciklodextrin alapú állófázis nagyobb

szelektivitást mutat a több aromás gyűrűt tartalmazó semleges molekulák esetén, mint a természetes β -ciklodextrin alapú állófázis [48]. Armstrong és mtsai. szerint [48] ez a hidrogénkötés és a szterikus kölcsönhatás megnövekedett szerepére utal a királis felismerésben.

A *módosított ciklodextrinek* közül az egyik legszélesebb körben alkalmazott királis állófázis szelektora a hidroxipropil- β -ciklodextrin (Astec, Cyclobond I RSP). Átlagosan 7 hidroxilcsoport derivatizált hidroxipropil-csoporttal, és még kiralitás centrummal is rendelkezik. Ezek a királis állófázisok elérhetőek racém (Astec, Cyclobond I RSP) vagy (*S*)-propilén oxiddal (Astec, Cyclobond I-SP) módosított formában. Néhány esetben a Cyclobond I RSP hasonló szelektivitást mutat, mint a Cyclobond I-SP. A ciklodextrin üregméretét tekintve nagyobb lesz a hidroxipropil-csoportok miatt, és a maradék hidroxilcsoport alkalmas lesz hidrogénkötések kialakítására. A ciklodextrinen „lógó” hidroxipropil-csoportok kölcsönhatásba tudnak lépni a nagyobb molekulák azon részével, melyek kiszorultak a ciklodextrin üregéből a zárványkomplex kialakulása során. Ez a fajta állófázis alkalmasnak bizonyult nem aromás racémátok, például az *N-t*-butoxikarbonil (*t*-Boc)-derivatizált aminosavak elválasztására [49]. A hidroxipropil módosítót tartalmazó állófázis egyaránt alkalmazható fordított fázisban és poláris-szerves módban is, de fordított fázisban sokkal hatékonyabb.

A leghatékonyabb ciklodextrin alapú királis állófázisok másik csoportját az *aromás csoportokkal módosított ciklodextrinek* képviselik [50-52], melyek mind normál, mind fordított fázisban és poláris-szerves módban is használatosak [51,53,54]. Ezeket az aromás csoportokat legtöbbször karbamát kötésen keresztül kötik a ciklodextrin szekunder hidroxilcsoportjaihoz. Két típusuk terjedt el, a dimetil-fenil-karbamát- β -ciklodextrin és a naftil-etil-karbamát- β -ciklodextrin alapú állófázis (**7. ábra**). Az utóbbinál az etilcsoport aszimmetria centrummal is rendelkezik. A kolonnák (*R*)- és (*S*)-konfigurációval egyaránt kaphatók kereskedelmi forgalomban. Általában 4-6 aromás csoportot tartalmaznak ciklodextrin molekulánként.

Fordított fázisban ezeknek a kolonnáknak a visszatartási készségük a hidrofób kölcsönhatások révén nagyobb mértékű, mint a többi ciklodextrin alapú királis állófázisnak. Általánosságban elmondható, hogy ugyanazt a retenciós időt kaphatjuk a mintamolekulára, ha 15-20 %-al több szerves fázist alkalmazunk, mint a nem aromásan módosított vagy a természetes alapú ciklodextrin szelektorok esetén. A legszélesebb körben az (*R*)- és (*S*)-naftil-etil-karbamát tartalmú β -ciklodextrin királis állófázist használják a *módosított ciklodextrin* állófázisok közül. Ezek az állófázisok képesek számos molekulacsoport enantiomerjeinek

elválasztására, beleértve a peszticideket [53,55], a farmakológiailag aktív komponenseket (tropikamid, indapamid, altiazid és tolperizon) [53], a nem-szteroid gyulladáscsökkentőket (ibuprofen, flurbiprofen) [51], többféle benzodiazepineket (lorazepam, oxazepam, temazepam) [51] és néhány derivatizált aminosavat [56].

A ciklodextrin alapú királis állófázisok közül ezek azok az állófázisok, melyek igazán hatékonyak normál fázisban. A naftil-etil-karbamát és a dimetil-fenil-karbamát is egyaránt π -elektron donor (π -bázis), tehát azok az ideális mintamolekulák az elválasztásra, amelyek π -elektron akceptor (π -sav) sajátságokkal bírnak. Ha egy mintamolekula π -savvá alakítható származékképzéssel (pl. 3,5-dinitrobenzilamin vagy 3,5-dinitrobenzoil származékképzőkkel), akkor elvileg sikeres enantiomer elválasztást tudunk elérni ezeken az állófázisokon [52,57].

3.2.2.1. Királis felismerés és a kromatográfiás mód kapcsolata ciklodextrint tartalmazó állófázisokon

A ciklodextrin alapú királis állófázisoknál ugyanúgy kell teljesülniük az általános szabályoknak a királis felismeréshez, mint a többi királis állófázis esetében. Létre kell jönnie a hárompontos illeszkedésnek (kölsönhatásnak), és különbségnek kell mutatkoznia a két enantiomer megoszlásában az álló- és a mozgófázis között [58]. Nem minden egyes kölcsönhatás vezet királis felismeréshez, ami fellép a mintamolekula és az állófázis között, néhány kölcsönhatás egyáltalán nincs hatással az enantiomerek elválasztására, de visszatartást okoz. Az állófázis különböző részei, például a királis szelektor nem enantioszelektív része vagy a szilikagél felülete is hatással van a visszatartásra, de ennek ellenére nem biztos, hogy az elválasztás hatékonysága nő azzal, hogy a mintánk több időt tölt az állófázison. Előfordulhat, hogy a két különböző kölcsönhatás épp kioltja egymást, ezzel pedig rontják az elválasztást. Ha egy ciklodextrin alapú állófázist csak az egyik enantiomerrel módosítjuk, akkor az hatékonyabb lehet, mintha a racém vegyületet használtuk volna a ciklodextrin módosítására [48].

A ciklodextrin alapú királis állófázisok mindhárom módban (normál, fordított fázisú és poláris-szerves) hatékonyan alkalmazhatóak, és mindegyik módban némileg különböző mechanizmus szerint játszódnak le a királis felismerések.

Fordított fázisban a királis elválasztáshoz szükség van a zárványkomplex kialakulásához. A komplex képződése során a mintamolekula megközelíti a ciklodextrin molekulát valamilyen irányból, kölcsönhatásba lép vele (hidrogénkötés, dipol-dipol, hidrofób kölcsönhatás, stb.), ezután a hidrofób részével elfoglalja a ciklodextrin üregének apoláris

részét és zárványkomplexet alakít ki. A folyamat során bármikor leszakadhat a mintamolekula a ciklodextrinről, és távozhat a mozgófázisba. Ha egy mintamolekula zárványkomplexet képez a ciklodextrinnel, és a mintamolekula és a természetes vagy szubsztituált ciklodextrin között további kölcsönhatás jön létre, akkor biztosítva van a hárompontos illeszkedés, ami által létrejön a királis felismerés.

A ciklodextrin hidrofób ürege iránti affinitás növelheti a retenciót, de nem biztos, hogy a zárványkomplexnek szelektivitás növelő hatása van. A ciklodextrin ürege egy közepesen erős π -bázis, így a π -savaknak nagyobb az affinitásuk az üreg felé. Azok a molekulák viselkednek általában π -savként, amelyek nitro-, szulfonát-, foszfát- vagy halogén-csoporttal rendelkeznek, és ezáltal erősebb komplex kialakítására képesek a ciklodextrinnel [7,59,60].

Fordított fázisban a királis elválasztáshoz nélkülözhetetlen a hidrofób csoport jelenléte a mintamolekulán (például egy aromás gyűrű) a zárványkomplex kialakulásához [3,5,6,16,17], továbbá az aromás csoportnak megfelelően illeszkednie kell a ciklodextrin üregében. Ha nagyobb, akkor nem fér bele a ciklodextrinbe, ha kisebb, akkor pedig túl „laza” lehet a komplex. A komplex kialakulásán túl az is fontos, hogy a természetes ciklodextrineknél a szekunder hidroxilcsoportokhoz az üreg peremén közel legyen a mintamolekula aszimmetria centruma vagy egy, az aszimmetria centrumon lévő szubsztituens. A módosított ciklodextrineknél a szekunder hidroxilcsoportokat más aktív csoportokkal helyettesítve további kölcsönhatás kialakítására nyílik lehetőség (hidrogénkötés, dipol-dipol kölcsönhatás, π - π komplexálás, szterikus hatás, stb.), ami erősíti a királis felismerést. Összegezve, fordított fázisban a következő szerkezeti tényezők előnyösek a királis elválasztásban:

- aromás rendszer jelenléte,
- legalább egy hidrogénkötésre alkalmas csoport jelenléte a kiralitás centrum közelében és egy másik π -delokalizált rendszer a molekula más részén [24].

Normál fázisú és poláris-szerves módban a ciklodextrin ürege zárt a mintamolekula előtt, hidrofób kölcsönhatások kialakítására nincs lehetőség. Ebben az esetben a π - π komplex képződés, a hidrogénkötés, a dipol-dipol és a szterikus kölcsönhatások kombinációja vezet a királis felismeréshez.

3.2.3. Ciklodextrinek alkalmazása kapilláris zónaelektroforézis (CZE vagy CE) során

A CZE nagy felbontóképessége, kis minta- és oldószerigénye miatt kiválóan használható királis elválasztásokra. Alkalmazása sok esetben egyszerűbb és gazdaságosabb a

folyadék és gázkromatográfiás módszerekhez képest [61-64]. A napjainkban a kapilláris elektroforézisben használatos királis szelektorok közül említést érdemelnek a ciklodextrinek, koronaéterek, rézkomplexek, makrociklusos glikopeptidek, de ezek közül a ciklodextrinek a CZE-ben leggyakrabban alkalmazott királis szelektorok.

A királis CZE kezdetén elsősorban a természetes ciklodextrinokkal és az olcsó semleges származékok alkalmazásával próbálkoztak a kutatók, napjainkban azonban a természetes ciklodextrinek kicsiny saját mozgékonyaságuk miatt inkább csak referenciaként, ill. szelektor-kombináció alkotórészeként játszanak szerepet az elektroforetikus elválasztásokban. A glükóz egységenként 1 primer és 2 szekunder hidroxilcsoport kiváló lehetőséget biztosít a ciklodextrinek módosítására, amint azt korábban már említettem. Az utóbbi másfél évtizedben a ciklodextrinek legkülönbözőbb származékait sikerült előállítani és kipróbálni a királis CZE területén. A ciklodextrin származékok esetén az egész molekulára vonatkozó ún. szubsztitúciós fok mutatja, hogy hány hidroxilcsoporton történt a helyettesítés. Mára a ciklodextrin származékok száma megközelíti az ezret. Az utóbbi években –a HPLC technikához hasonlóan– a királis CE elválasztások során is módosított ciklodextrinokat alkalmaznak leggyakrabban.

Smolkova-Keulemansova [65] és kutatócsoportja valósította meg az első királis elválasztást módosított ciklodextrinnel kapilláris elektroforézis technikát használva. Az elválasztás során izotachoforézis módszert alkalmaztak azzal a kiegészítéssel, hogy dimetilezett (DIME- β) vagy trimetilezett (TRIME- β) β -ciklodextrint használtak vezető elektrolitként. A DIME- β és a TRIME- β esetén a ciklodextrin gyűrűn elhelyezkedő hidroxilcsoportokat (DIME- β esetén csak részben) metoxycsoportokra cserélték. Egy másik módosítás részét képezi hidroxipropilezett ciklodextrin (HP- α -CD, HP- β -CD vagy HP- γ -CD) [66], amelynél a különféle hidroxilcsoportokat (-O-C₃H₇OH)-csoportokkal helyettesítették. A fent említett módosítás a természetes ciklodextrinektől eltérő sztereoselektivitásához és jobb oldékonyaságához vezetett (a természetes β -ciklodextrinek vízben való oldhatósága nem haladja meg a 16 mM-t, míg például a DIME- β oldhatósága 200 mM).

Yoshinaga és Tanaka [67] különböző, metilezett β -ciklodextrin származékokat használtak *danzil(Dns)*-aminosavak elválasztásának tanulmányozására. A 6. helyzetben lévő hidroxilcsoport metilezése nem volt hatással a sztereoselektivitásra, de ha a metilezés a 2. helyzetű hidroxilcsoporton ment végbe, akkor szinte teljesen eltűnt a sztereoselektivitás. A 2,3-dimetil- β -ciklodextrin alkalmazásával javítottak az elválasztáson és még a vándorlási sorrend is megcserélődött.

Szulfatált β -ciklodextrin királis szelektor alkalmazása esetén Bergholdt és mtsai. [68] ormeloxifén sztereoizomerek elválasztására dolgoztak ki ún. „short-end” illetve „long-end” (hagyományos) injektálási módszert. A „short-end” injektálásnál a kapilláris azon végénél történik az injektálás, amelyik a CE készülék detektorához közelebb esik. Mások is szívesen alkalmaztak szulfatált β -ciklodextrint királis szelektorként [69-74], főleg mikor hasonló bázikus, negatív töltéssel bíró molekulának a királis elválasztását dolgozták ki, mint az előbb említett ormeloxifén és analógjai esetében. Mazzeo és Krull [75] hasonló („short-end”) technikán alapuló módszert dolgoztak ki proteinek elválasztására. Altria és mtsai. [76] szintén „short-end” technikát alkalmaztak gyógyszermolekulák és más enantiomerek gyors elválasztására.

Vescina és mtsai. [77] 26 különböző ciklodextrin hatékonyságát tanulmányozták 35 bázikus gyógyszermolekula elválasztása esetén. Az alkalmazott ciklodextrinek különböző funkciós csoporttal és szubsztitúciós fokkal rendelkeztek. Az összehasonlítást azonos körülményeket alkalmazva végezték el [25 mM foszfátpuffer (pH 2,5)], melynek során a vizsgált molekuláknak több mint 90%-a legalább $R_s=0,5$ értékkel elválasztható volt.

Wang és Ren [78] purin és pirimidin bázisokat választottak el β -ciklodextrint alkalmazva. Munkájuk során sikeresen elválasztották mind az 5 vizsgált molekula sztereoizomerjeit (adenin, guanin, timin, citozin és uracil). Purin és pirimidin bázisok elválasztására az irodalomban további számos közlemény található [79-82].

A ciklodextrineket többek között sikerrel alkalmazták királis gyógyszervegyületek, illetve különféle aminosavak elválasztására is. Altria és mtsai. [83] 0,1% L-triptofán tartalmat tudtak meghatározni D-triptofán mellett. Az optimális puffer (trietilammónium-foszfát) koncentráció 75 mM, a pH 2,5, a hőmérséklet 30 °C volt, míg királis szelektorként 25 mM-os α -CD szolgált. Klenbuterol analízisének validálásán keresztül Altria és mtsa. [84] bizonyították a CZE kiváló alkalmazhatóságát. Pufferként dinátrium-tetraborátot (50 mM, pH 2,2), míg királis szelektorként 2-hidroxi-propil- β -CD-t (30 mM) alkalmaztak.

Fillet és mtsai. [85] hét különböző bázikus gyógyszermolekula enantioszelektív elválasztására három különböző β -ciklodextrin származékot (karboximetil, dimetil és 2-hidroxi-propil) próbáltak ki királis szelektorként. Pufferként 100 mM foszforsav oldatot használtak, amit trietilamminnal pH 3,0 értékre állítottak be. Az alkalmazott hőmérséklet 15 °C volt. A legjobb eredményt a karboximetil- β -ciklodextrin esetén kapták, amivel sikerült mind a 7 gyógyszermolekula enantiomerjeit elválasztani.

Garm és Stalcup [86] szulfatált ciklodextrinokkal érték el szép eredményeket katecholaminok és rokon vegyületeik elválasztásában. A királis elválasztás fordított polaritású

módban történt, pufferként 10 mM nátrium-foszfát oldatát foszforsavval állították pH 3,2-re, 2 % (v/v) királis szelektort hozzáadva a rendszerhez.

Ahhoz, hogy az elektroforézis során királis elválasztás létrejöhessen, egy olyan királis szelektor szükséges, amely sztereoszelektíven ismeri fel az enantiomereket, azaz az egyes enantiomerekkel eltérő stabilitású komplexet képez. A két enantiomerból képződött komplex elektroforetikus mozgékonyasága megegyezik, hiszen méretük és töltésük ugyanaz. Ennek megfelelően elválasztás akkor jön létre, ha az előbb említett feltétel mellett a szabad és a kötött minta eltérő mozgékonyasággal rendelkezik. (Természetesen a szabad és a kötött forma között igen gyors cserének kell lejátszódnia). Figyelembe véve a CZE-ben alkalmazott szelektor koncentrációkat (5-100 mM) és a komplex állandók nagyságrendjét (50-500 M⁻¹) kiszámítható, hogy az enantiomerek a teljes tartózkodási idő 20-90%-át töltik komplex formában. Cramer és Hettler [87] a következő lépéseket javasolta a zárványkomplexképződés mechanizmusának leírására:

1. a minta megközelíti a ciklodextrin-molekulát,
2. a ciklodextrin üregében levő vízmolekulák alkotta szerkezet felbomlik, vízmolekulák szorulnak ki az üregből,
3. a mintát körülvevő vízmolekulák szerkezete felbomlik, a vízmolekulák távoznak a tömbfázisba,
4. kölcsönhatások alakulnak ki a minta funkciós csoportjai és a ciklodextrin között,
5. hidrogénkötés épül ki (ha van rá lehetőség),
6. helyreáll a molekulát körülvevő víz szerkezete.

Ugyan a királis felismeréshez szükséges az eltérő stabilitású komplexek kialakulása, a nagyobb mértékű komplex képződés nem jelent feltétlenül hatékonyabb királis elválasztást. A királis felismerést sokkal inkább az enantiomerek komplexképződési állandóinak hányadosa jellemzi („komplexálási szelektivitás”).

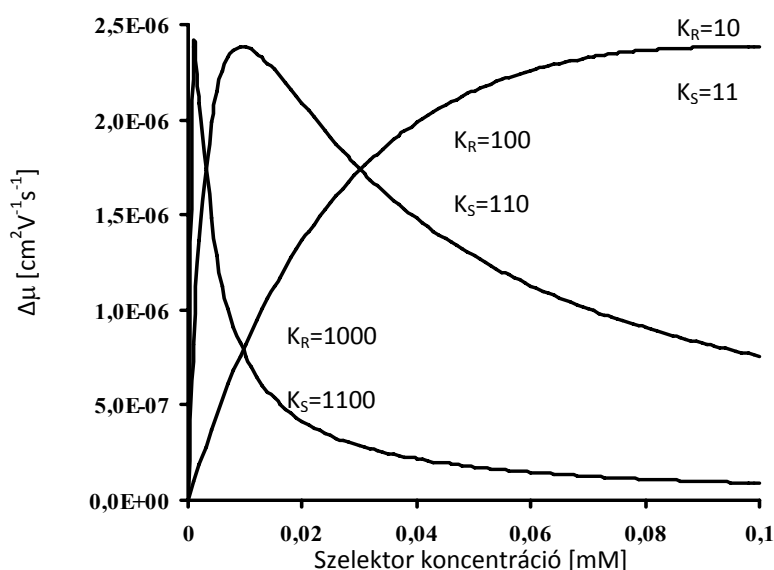
$$\alpha_{komplex} = \frac{K_2}{K_1} \quad (1)$$

ahol K_1 és K_2 az elsőként és a másodikként vándorló enantiomer látszólagos komplexstabilitási állandója.

Az elméleti optimális szelektor koncentráció a következőképpen adható meg [88]:

$$c_{opt} = \frac{1}{\sqrt{K_1 K_2}} \quad (2)$$

Ha a szelektorról eltérő stabilitási állandójú komplexet képző enantiomerek mobilitásának különbségét ($\Delta\mu$) ábrázoljuk a szelektor koncentrációjának függvényében, akkor a **8. ábrán** bemutatotthoz hasonló görbéket kapunk.



8. ábra Az enantiomerek mobilitás-különbsége a szelektor koncentrációjának függvényében eltérő komplexstabilitási állandók és azonos szelektivitás mellett [88]

Mint a **2. egyenletből**, és a **8. ábrából** kitűnik kicsiny stabilitási állandók esetén a szelektort viszonylag nagy koncentrációban szükséges alkalmazni az eredményes elválasztáshoz. Fontos körülmény, hogy nagyobb stabilitási állandók esetén igen kicsi az a koncentráció-tartomány, ahol a szelektor maximális felbontást biztosít. Ebben az esetben a szelektor koncentrációjának már kismértékű változtatása is jelentősen csökkenti az enantioszelektivitást (egy-két kísérlet elvégzése után arra a téves következtetésre juthatunk, hogy a vizsgált szelektor nem alkalmas a kérdéses enantiomerek elválasztására, miközben csak nem megfelelő koncentrációban alkalmaztuk). Adott esetben a túl nagy látszólagos komplex stabilitási állandó egyszerűen csökkenthető a pufferhez adott szerves oldószerekkel

(metanol, 2-propanol vagy acetonitril), így az optimális elválasztási tartomány a nagyobb szelektor koncentráció árán kellőképpen szélesíthető.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a kapilláris elektroforézis technika királis elválasztásra igen széleskörben alkalmazható. Királis szelektorként ciklodextrineket, koronaétereket, rézkomplexeket, makrociklusos glikopeptideket alkalmaznak leggyakrabban. Az előzőekben felsorolt példák, úgymint aminosavak [67,83], purin és pirimidin bázisok [78-82], gyógyszermolekulák [76,77,85], proteinek [75] és más számos ionos vegyület elválasztása a kapilláris elektroforézisben rejlő lehetőségek egy kis részletét mutatják, az alkalmazási lehetőségek a kapilláris elektroforézisben ma még messze nem kiaknázottak.

A manapság rendelkezésre álló nagyszámú és eltérő tulajdonságú módosított ciklodextrin, megfelelő kiválasztással potenciális lehetőséget biztosít sok-sok sikeres királis analízishez.

3.3. Vizsgált anyagaink biológiai és kémiai jelentősége

3.3.1. β -Laktámok

Az elmúlt években sokat foglalkoztak a β -laktámokkal, mivel ezen vegyületek jelentik az egyik legszélesebb körben használt antibiotikum családot. A β -laktám antibiotikumok közös hatócsoportja a β -laktám gyűrű, az ehhez kapcsolódó oldalláncok határozzák meg a származék antibakteriális spektrumát, farmakokinetikáját és a vegyület stabilitását a baktériumok által termelt β -laktamáz enzimekkel szemben. Az ilyen szerkezetű antibiotikumok a bakteriális sejtfal *peptidoglikán* vázának felépítésében szerepet játszó penicillin-kötő fehérjéhez kapcsolódnak, és gátolják annak működését. Baktericid hatásúak, egyaránt hatnak Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokra, az intracelluláris kórokozókkal szemben azonban hatástalanok, mivel nem jutnak be az állati/emberi sejtekbe. A β -laktámok hatása időfüggő, felezési idejük rövid, ezért a napi dózist 3-6 részre osztva kell alkalmazni. A szervezetből többnyire a vizelettel ürülnek ki. Bakteriális rezisztencia gyakran figyelhető meg: a baktérium termelhet β -laktamáz enzimet, amely lebontja a gyógyszert; megváltozhat a penicillin-kötő fehérje szerkezete, s így az antibiotikum nem tud hozzá kötődni; megváltozhat a sejtfal szerkezete, s így a β -laktám nem tud rajta áthatolni. A β -laktámokat használják még intermedierként β -aminosavak [68], rövid peptid szegmensek [90] és alkaloidok szintézisének [91]. Következésképpen számos közvetlen és közvetett enzimátikus [93,93] és enantioszelektív [94] módszert közöltek a β -laktámok szintézisééről.

3.3.2. β -Aminosav származékok

A β -aminosavak ritkán fordulnak elő a természetben, de az élettanilag jelentős peptidekben [95] (depszipeptidek, peptidantibiotikumok, stb.) viszonylag gyakoriak. A β -aminosavak peptidekbe, főként ciklopeptidekbe történő beépítésével a peptidgerinc flexibilisebb lesz (a konformációs szabadsági fok megnő), a peptidgerincre nézve a különféle szubsztitúciók (pl. nagy térigényű csoportok) kedvezőbbek. Ugyanakkor tisztán kell látnunk a β -aminosavak másodlagos szerkezetre gyakorolt hatását is. Az irodalomban főleg a β -alanin [96], valamint a β -aminosavak oligomerjeinek széleskörű vizsgálata található, mely szerint ezen oligopeptidek olyan peptidszármazékok, ahol reprodukálható, szabályszerű (periodikus) másodlagos szerkezet alakul ki (mint pl. helikális szerkezet).

4. Kísérleti rész

4.1. Vizsgált anyagok

A vizsgált vegyületek a legtöbb esetben szintetikus anyagok voltak, melyek együttműködő 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 három csoportra osztottuk azokat.

4.1. Táblázat β -Metil-szubsztituált aminosavak szerkezete

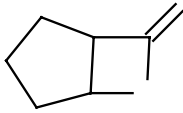
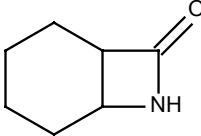
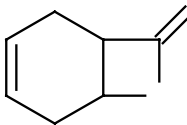
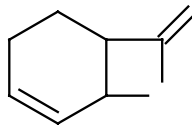
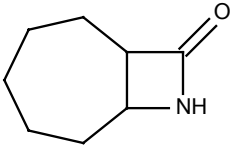
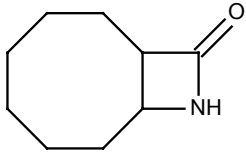
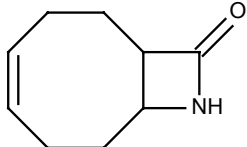
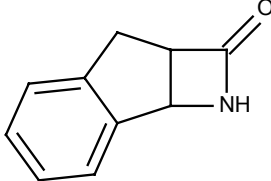
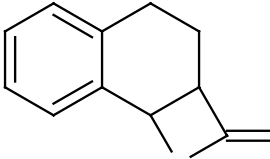
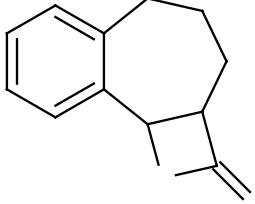
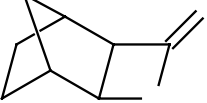
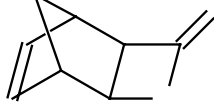
<i>eritro</i> - β -MePhe		<i>threo</i> - β -MePhe	
(X=H) (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)	(X=H) (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)	(X=H) (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)	(X=H) (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)
1a	1b	1c	1d
<i>eritro</i> - β -MeTyr		<i>threo</i> - β -MeTyr	
(X=OH) (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)	(X=OH) (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)	(X=OH) (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)	(X=OH) (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)
2a	2b	2c	2d
<i>eritro</i> - β -MeTic		<i>threo</i> - β -MeTic	
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)
3a	3b	3c	3d

4.1. Táblázat (folytatás) β -Metil-szubsztituált aminosavak szerkezete

<i>eritro</i> - β -szubsztituált Trp analóg (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)		<i>treo</i> - β -szubsztituált Trp analóg (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)	
a		b	
a		c	
a		d	
Csoport száma	R		Elnevezés
4a, 4b	-H		(<i>S</i>)- és (<i>R</i>)-Trp
5a, 5b, 5c, 5d	-CH ₃		<i>eritro</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> és 2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)- és <i>treo</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> és 2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)- β -MeTrp (<i>eritro</i> - és <i>treo</i> - β -MeTrp)
6a, 6b, 6c, 6d	-CH(CH ₃) ₂		<i>eritro</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> és 2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)- és <i>treo</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> és 2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)- β -2-PrTrp (<i>eritro</i> - és <i>treo</i> - β -2-PrTrp)
7a, 7b, 7c, 7d	-CH(CH ₂ CH ₃) ₂		<i>eritro</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> és 2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)- és <i>treo</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> és 2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)- β -3-PentTrp (<i>eritro</i> - és <i>treo</i> - β -3-PentTrp)
8a, 8b, 8c, 8d			<i>eritro</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> és 2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)- és <i>treo</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> és 2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)- β -PhTrp (<i>eritro</i> - és <i>treo</i> - β -PhTrp)
9a, 9b, 9c, 9d*			<i>eritro</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> és 2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)- és <i>treo</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> és 2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)- β -diMeOPhTrp (<i>eritro</i> - és <i>treo</i> - β -diMeOPhTrp)

*A Cahn-Ingold-Prelog szabály alapján az -O- jelenléte a -OCH₃ csoportban megváltoztatja a prioritási sorrendet a C-3 aszimmetria centrum körül, ezért változik az abszolút konfiguráció a többi Trp származékhoz képest.

4.2. Táblázat β -Laktámok szerkezete

			
<i>cisz-6-azabicyclo[3,2,0]heptán-7-on</i>	<i>cisz-7-azabicyclo[4,2,0]oktán-8-on</i>	<i>cisz-7-azabicyclo[4,2,0]okt-3-én-8-on</i>	<i>cisz-7-azabicyclo[4,2,0]okt-4-én-8-on</i>
10	11	12	13
			
<i>cisz-8-azabicyclo[5,2,0]nonán-9-on</i>	<i>cisz-9-azabicyclo[6,2,0]dekán-10-on</i>	<i>cisz-9-azabicyclo[6,2,0]dek-4-én-10-on</i>	O
14	15	16	
			NH
<i>cisz-3,4-benzo-6-azabicyclo[3,2,0]heptán-7-on</i>	<i>cisz-4,5-benzo-7-azabicyclo[4,2,0]oktán-8-on</i>	<i>cisz-5,6-benzo-8-azabicyclo[5,2,0]nonán-9-on</i>	
17	18	19	
			
<i>exo-3-azatricyclo[4,2,1,0^{2.5}]nonán-4-on</i>	<i>exo-3-azatricyclo[4,2,1,0^{2.5}]non-7-én-4-on</i>		
20	21		

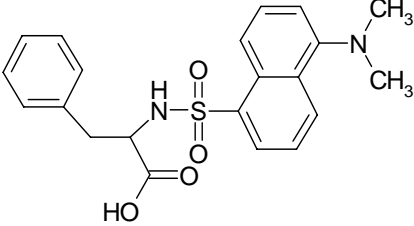
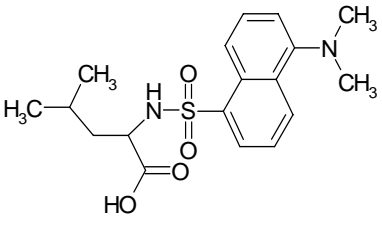
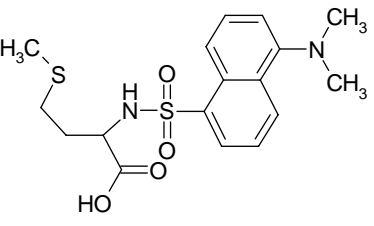
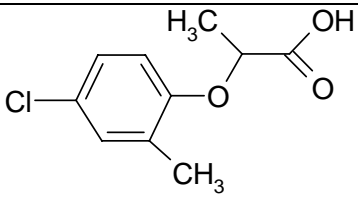
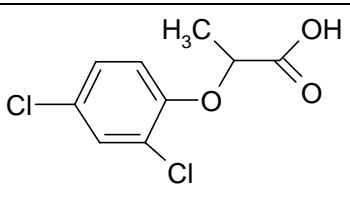
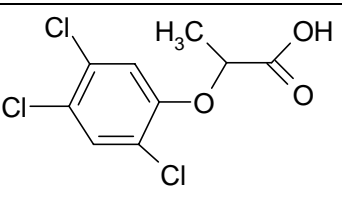
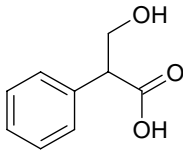
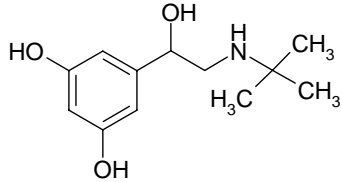
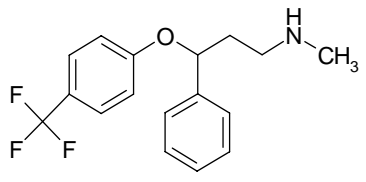
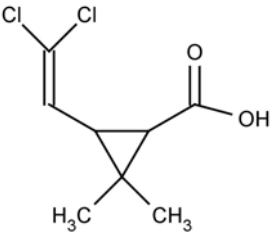
4.2. Táblázat (folytatás) β -Laktámok szerkezete

4-fenilazetidin-2-on	4-(4-metilfenil)azetidin-2-on	4-(2-klórfenil)azetidin-2-on	4-(3-klórfenil)azetidin-2-on
22	23	24	25
4-(4-klórfenil)azetidin-2-on	4-(4-fluorfenil)azetidin-2-on	4-(4-brómfenil)azetidin-2-on	○
26	27	28	

4.3. Táblázat Egyéb vizsgált molekulák szerkezete

NH		
acenokumarol	fenprokumon	warfarin
29	30	31

4.3. Táblázat (folytatás) Egyéb vizsgált molekulák szerkezete

		
danzil-fenilalanin	danzil-leucin	danzil-metionin
32	33	34
		
mekopropionsav	2,4-dikloropropionsav	fenopropionsav
35	36	37
		
tropán sav	Terbutalin	fluoxetin
38	39	40
		
	<i>cisz-, transz-permetrinsav</i>	
	41a, 41b	

4.2. Felhasznált anyagok

A mérések során a következő HPLC tisztaságú vegyszereket alkalmaztuk: trietil-amin (TEA), metanol (MeOH), acetonitril (MeCN), ecetsav (AcOH), trifluor-ecetsav (TFA), bórsav, foszforsav (Merck, Darmstadt, Németország); tris-(hidroximetil)metilamin (TRIS) (Aldrich, Steinheim, Németország); dimetil-szulfoxid (DMSO), dimetil-formamid (DMF) és L-aminosav-oxidáz I-es típusú (Sigma St. Louis, MO, USA).

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

4.3. Alkalmazott berendezések

A pH mérése Thermo Orion 420 pH mérő (Orion, USA) készüléken történt.

A kapilláris elektroforézises méréseket HP³CE készüléken végeztük (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), a detektáláshoz diódasoros detektort, az adat feldolgozáshoz pedig Chemstation szoftver használtunk.

A folyadékkromatográfias mérésekhez 2 fajta rendszert használtunk:

1. DIONEX Ultimate 3000 és
2. Agilent 1100-as típusú folyadékkromatográfias rendszer.

(Mindkét rendszerrel kvaterner pumpát, automata mintaadagolót és diódasoros detektort alkalmaztunk).

4.4. Alkalmazott ciklodextrinek

A CE mérések során az alkalmazott ciklodextrinek (CD-k) a következők voltak: természetes- α -CD, szulfopropil- α -CD (SP2- α -CD: szubsztitúciós fok=2), β -CD-szulfát, szulfopropil- β -CD (SP2- β -CD: szubsztitúciós fok=2 és SP4- β -CD: szubsztitúciós fok=4), valamint szulfopropil- γ -CD (SP2- γ -CD: szubsztitúciós fok=2) (Cyclolab R&D Ltd. Budapest, Magyarország).

4.5. Alkalmazott oszlopok

Az alkalmazott királis állófázisok a következők voltak: **PMBCD** (permetil- β -CD, **Quest 1**), **HPBCD** (hidroxipropil- β -CD, **Quest 2**), **BCD** (β -CD, **Quest 3**) 250x4,0 mm, 5 μ m szemcseátmérő (Chiroquest, Budapest, Magyarország).

4.5.1. Quest 1, 2 és 3 oszlopok töltetének előállítása

A **BCD** (**Quest 3**) és a **HPBCD** (**Quest 2**) oszlopok kötésének kémiája azonos a **PMBCD** (**Quest 1**) oszlopéval. A reaktív trietoxiszilil propil-karbamid csoportot 3-izocianátpropiltriethoxiszilán és a ciklodextrin-származék hatos helyzetű primer aminocsoportjának reakciójával alakítottuk ki, **Quest 3** és **Quest 2** esetében vízmentes dimetil-formamidban, **Quest 1** esetén toluolban. Az eltérés oka az, hogy a 6-monoamino-**PMBCD** szabad bázis jól oldódik apoláris oldószerekben, míg a 6-monoamino-**BCD** és 6-monoamino-**HPBCD** bázisok gyakorlatilag oldhatatlanok. A reakció szobahőmérsékleten, 10 perc után kvantitatív. A toluolos reakcióelegy feldolgozás nélkül használható a szilikagél származékképzésére, a DMF-os reakcióelegyekből diizopropil-éterrel történő kicsapással nyert termékeket használtuk a szililezési reakcióban, szintén DMF-ben.

6,6 g szilikagélt szuszpendáltunk 50 ml toluolban ultrahangos fürdő segítségével, majd élénk kevertetés mellett cseppenként hozzáadtuk a már kihűlt szuszpenzióhoz a szililezőszer piridines oldatát (1g szililezőszer / 5,0 ml piridin). Az így elkészült keveréket 105 °C-on 20 órán át kevertettük. A származékolt szilikagélt szűrtük, majd mostuk toluollal, acetonnal és metanollal, ebben a sorrendben. Az így kapott száraz töltet felületi borítottsága (7,06 g) 0,3 μ mol/m² lett. Mivel a ciklodextrin molekula nagy mérete miatt a szilikagél felületén sok szabad szilanolcsoport marad, ezeket a csoportokat hexametildiszilazánnal (0,7 ml, 0,54 g, 3,3 mmol) tetrahidrofuránban (50 ml) trimetilsziloxán-csoportokká alakítottuk át (50 °C, 1 óra a töltet kromatográfiás hatékonyságának növelése érdekében („end-capping”). Az így kezelt szilikagélt szűrtük, majd mostuk acetonnal, 25 %-os metanollal és újra acetonnal, az ammónium-klorid eltávolítása végett. A 80 °C-on szárított anyagot használtuk a HPLC oszlopok töltésére.

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

Az eredmények bemutatása négy részre tagolódik a célkitűzéseinkben tárgyaltak alapján. A jobb és egyszerűbb áttekinthetőség érdekében, a kísérleti részben bevezetett rövidítéseket és a vizsgált vegyületek számozási rendszerét használok, illetve csak a magyarázatok értelmezéséhez szükséges adatok közlésére szorítok. Az összes mérési eredmény a feldolgozott közleményekben található.

5.1. *β -metil-szubsztituált aminosav enantiomerek elválasztása CE módszerrel*

A kapilláris elektroforézises technikáknál a legszélesebb körben alkalmazott királis szelektorok az anionos CD származékok [97-100]. Normál polaritású módban a CE esetén katód irányú elektroosmotikus áramlás (EOF) jön létre, így a szintén katód felé mozgó kationok nagyobb sebességgel (komigráció) mozognak, míg az anionok értelemszerűen ellentétes irányba haladnak (kontramigráció). Az utóbbiak ennek megfelelően csak akkor detektálhatók, ha az abszolút értelemben vett mozgékonyáguk kisebb, mint az EOF. A semleges aminosavak ezáltal eltérő eloszlást mutatnak a két ellenáram között a mozgófázisban, ami különböző mozgékonyágához vezet. Azok a szintetikus aminosavak, amelyek 2 ionizálható csoporttal rendelkeznek (pK_a 3-10), ikerionos formában lesznek jelen ebben a pH tartományban. A megfelelő pH alkalmazásával ezeknél az aminosavaknál is hasonló királis elválasztást érhetünk el, mint a semleges vegyületeknél.

A vizsgált mintamolekulák mindegyike rendelkezik aromás csoporttal, két aszimmetria centrummal, és ebből kifolyólag két enantiomer párral (**4.1. Táblázat**). Amint korábban említettem az aromás gyűrű jól illeszkedik a természetes α -CD üregébe, ami elvileg kiváló lehetőséget biztosít a királis elválasztáshoz. Sajnálatos módon természetes α -CD használata esetén nem sikerült királis felismerést elérnünk, mert oldódási problémák merültek fel, és akárhogy változtattuk a körülményeket (CD koncentráció, pH, alkalmazott feszültség) nem jártunk sikerrel. A töltés nélküli α -CD sikertelen alkalmazása után a lényegesen jobban oldódó, szubsztituált CD-származékot, a szulfopropil- α -CD-t vizsgáltam, így a továbbiakban ezeket az eredményeket tárgyalom.

5.1.1. Az alkalmazott feszültség hatása

10-30 kV-os tartományban, 75 mM-os borátpuffert (pH=9,0) alkalmazva *eritro*- és *treo*- β -MeTrp enantiomerek elválasztásán keresztül vizsgáltuk a feszültség hatását az EOF-re, a vándorlási időre és az elválasztásra. 20 kV feszültség alkalmazása bizonyult a legjobbnak. A feszültség további emelésével kismértékben csökkent az elválasztás hatékonysága, ami a megnövekedett Joule-hő képződés csúcshővesztéshez vezető hatásának tudható be. A továbbiakban bemutatott eredményeket 20 kV feszültség alkalmazásával kaptam.

5.1.2. A puffer koncentrációja változtatásának hatása az elválasztásra

A CE technikában alapvető a puffer használata. A puffer koncentrációjának növelésével csökken az EOF, nő az áramerősség, és a Joule-hő. Ebből kifolyólag az alkalmazni kívánt ionerősség korlátozott a puffer elektromos vezetőképessége miatt. Az *eritro*- és *treo*- β -MeTrp enantiomerek elválasztásának vizsgálatán keresztül a 10-100 mM koncentráció tartományban tanulmányoztuk az alkalmazott pufferek (acetát, foszfát, borát) hatását. A puffer koncentrációjának növelése kismértékben befolyásolta a vándorlási időket, jelentősebb mértékben a felbontást. Borátpuffer (pH 9,0) esetén a 75 mM, acetát- (pH 4,75) és foszfátpufferek (pH 7,2) esetében 15 mM koncentrációt találtuk optimálisnak.

5.1.3. A CD koncentráció változtatásának hatása az elválasztásra

A szelektor koncentrációjának természetesen fontos hatása van a királis elválasztásoknál. Az irodalomban számos példa található a CD koncentráció változtatásának hatásáról [101-103]. Ennek megfelelően 10-100 mM tartományban vizsgáltuk a szelektor koncentrációjának hatását az *eritro*- és *treo*- β -MeTrp elválasztására. A szelektor koncentrációjának növelésével a migrációs idők folyamatosan növekedtek. Az SP2- α -CD koncentrációjának változtatása során a felbontás maximum értéket ért el, tovább növelve a CD koncentrációját a felbontás csökkent (**5.1 Táblázat**). Hasonló jelenséget figyeltünk meg a többi CD esetén is. Az optimális szelektorkoncentráció az enantiomer és a királis szelektor között kialakult komplex erősségének függvénye. Ezen tapasztalatok alapján az SP2- α -CD és az SP2- β -CD 50 mM míg az SP4- β -CD 25 mM koncentrációt alkalmazva mutatta a legjobb elválasztást (az SP4- β -CD kétszer nagyobb töltéssel rendelkezik, mint az SP2- β -CD, ezért fele akkora koncentrációban alkalmaztuk, hogy hasonló szinten tartsuk az áramerősséget, mint az SP2- β -CD esetén).

5.1. Táblázat Az SP2- α -CD koncentráció változtatásának hatása az elválasztásra

CD koncentráció (mM)	<i>eritro-β-MeTrp</i>			
	<i>t₁</i> (perc)	<i>t₂</i> (perc)	<i>α</i>	<i>R_s</i>
10	7,2	7,8	1,06	1,10
25	10,2	10,5	1,08	1,65
50	12,3	12,8	1,15	4,15
100	38,3	40,5	1,08	1,00
	<i>treo-β-MeTrp</i>			
	<i>t₁</i> (perc)	<i>t₂</i> (perc)	<i>α</i>	<i>R_s</i>
10	7,4	7,5	1,04	0,65
25	9,8	9,9	1,16	1,25
50	12,1	12,4	1,10	2,55
100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Háttérelktrolit: 75 mM borátpuffer (pH=9,0); n.d.: nem detektálható

5.1.4. Az elektrolit pH-jának hatása az elválasztásra

A pH hatását 4,75-9,0 pH tartományban vizsgáltuk három puffer rendszert alkalmazva: 15 mM acetát (pH 4,75), 15 mM foszfát (pH 7,2) és 75 mM borát (pH 9,0). Az SP2- α -CD királis szelektor alkalmazásával kapott eredményeket az **5.2 Táblázatban** foglaltuk össze. A vándorlási idő pH függése minimum görbével írható le, azaz a pH növelésével eleinte csökken a vándorlási idő, majd további növeléssel nő, ellenben a szelektivitás és a felbontás folytonosan csökken a pH növelésével (kivéve a *treo- β -MeTyr* és *treo- β -MeTic* a borátpuffer használata esetén). Ez azzal magyarázható, hogy a protonálódás és komplex képződés is pH függő. Az SP2- α -CD pK értéke 2 körüli, így az általunk alkalmazott pH tartományban (4,75-9,0) az SP2- α -CD deprotonálódik, azaz negatív töltésű lesz.

5.2. Táblázat A pH változtatás hatása az elválasztásra SP2- α -CD jelenlétében

Minta	t_1^* (perc)	t_2^* (perc)	α	R_s	Háttélelektrolit
<i>eritro</i> - β -MePhe	1,7	1,8	1,06	0,70	A
	0,8	0,9	1,13	0,65	B
	3,3	3,4	1,03	0,65	C
<i>eritro</i> - β -MeTyr	1,8	2,1	1,17	1,55	A
	0,7	0,8	1,14	1,35	B
	2,7	2,8	1,04	0,80	C
<i>eritro</i> - β -MeTic	9,2	9,2	1,00	0,00	A
	1,7	1,7	1,00	0,00	B
	3,4	4,0	1,00	0,00	C
<i>treo</i> - β -MePhe	2,0	2,4	1,20	2,20	A
	1,1	1,2	1,15	1,80	B
	3,5	3,6	1,02	0,75	C
<i>treo</i> - β -MeTyr	2,8	2,6	1,00	0,00	A
	1,0	1,0	1,00	0,00	B
	2,9	23,0	1,03	1,00	C
<i>treo</i> - β -MeTic	8,9	8,9	1,00	0,00	A
	1,5	1,5	1,00	0,00	B
	3,5	3,6	1,01	0,20	C

$t_1^* = t_1 - t_{EOF}$, $t_2^* = t_2 - t_{EOF}$; Háttélelektrolit: A, 15,0 mM acetátpuffer (pH=4,75), B, 15,0 mM foszfátpuffer (pH=7,2), C, 75,0 mM borátpuffer (pH=9,0)

Az általunk vizsgált aminosavak pH=4,75 esetén pozitív töltéssel bírnak, és ezek az aminosavak erős komplexet alkotnak a negatív töltésű SP2- α -CD-vel, ellentétes irányban mozognak az EOF-hez képest, ami nagyobb visszatartást és jobb elválasztást eredményez. Semleges pH körül az aminosavak ikerionos formában vannak jelen, így a komplex stabilitása az anionos szelektorról kisebb lesz, a visszatartás is és a felbontás is csökken az előzőhöz képest.

5.3. Táblázat A pH változtatás hatása az elválasztásra SP2- β -CD jelenlétében

Minta	t_1^* (perc)	t_2^* (perc)	α	R_s	Háttélelektrolit
<i>eritro</i> - β -MePhe	1,6	1,7	1,06	0,65	A
	1,0	1,0	1,00	0,00	B
	4,8	4,8	1,00	0,00	C
<i>eritro</i> - β -MeTyr	4,0	4,0	1,00	0,00	A
	1,2	1,2	1,00	0,00	B
	5,5	5,6	1,00	0,00	C
<i>eritro</i> - β -MeTic	8,0	8,0	1,00	0,00	A
	1,6	1,6	1,00	0,00	B
	5,2	5,4	1,05	1,50	C
<i>treo</i> - β -MePhe	2,0	2,2	1,05	0,95	A
	1,1	1,4	1,09	0,70	B
	4,2	4,2	1,00	0,00	C
<i>treo</i> - β -MeTyr	4,0	4,0	1,04	0,80	A
	1,4	1,5	1,03	0,90	B
	4,9	4,9	1,00	0,00	C
<i>treo</i> - β -MeTic	6,1	7,7	1,30	2,75	A
	1,8	2,2	1,19	2,50	B
	5,6	5,9	1,05	1,70	C

$t_1^* = t_1 - t_{EOF}$, $t_2^* = t_2 - t_{EOF}$; Háttélelektrolit: A, 15,0 mM acetátpuffer (pH=4,75), B, 15,0 mM foszfátpuffer (pH=7,2), C, 75,0 mM borátpuffer (pH=9,0)

Nagyobb pH-n az aminosavak is és az anionos CD is negatív töltéssel bír, így ellentétes irányban mozognak az EOF-fel, a vándorlási idő nő, a stabilitás és a komplexek stabilitásának különbsége a negatív töltésű aminosavak és a negatív töltésű szelektormolekulák között csökken, így a felbontás is csökken. A felvázolt modellt árnyalja az a tény, hogy a szubsztituált CD molekulák nem teljes mértékben tiszták, 1-10%-ban tartalmaznak természetes CD-t is. A természetes α -CD együtt mozog az EOF-el és ebből a két hatásból ered a tapasztalt vándorlási jelenség. Hasonló hatás figyelhető meg az SP2- β -CD és az SP4- β -CD esetén is (5.3. és 5.4. Táblázat).

5.4. Táblázat A pH változtatás hatása az elválasztásra **SP4- β -CD** jelenlétében

Minta	t_1^* (perc)	t_2^* (perc)	α	R_s	Háttélelektrolit
<i>eritro-β-MePhe</i>	3,8	4,2	1,11	0,95	A
	1,2	1,4	1,13	0,45	B
	6,1	6,1	1,00	0,00	C
<i>eritro-β-MeTyr</i>	6,7	9,1	1,05	1,55	A
	1,9	1,9	1,00	0,00	B
	5,3	5,3	1,00	0,00	C
<i>eritro-β-MeTic</i>	7,0	7,0	1,00	0,00	A
	1,7	1,7	1,00	0,00	B
	7,4	7,7	1,05	1,90	C
<i>treo-β-MePhe</i>	5,1	6,5	1,07	1,15	A
	1,5	1,6	1,07	0,50	B
	5,4	5,4	1,00	0,00	C
<i>treo-β-MeTyr</i>	12,0	12,6	1,05	1,80	A
	2,3	2,4	1,04	0,60	B
	6,4	6,6	1,03	0,65	C
<i>treo-β-MeTic</i>	6,4	8,2	1,10	5,55	A
	1,8	2,2	1,22	3,05	B
	6,9	7,7	1,12	4,00	C

$t_1^* = t_1 - t_{EOF}$, $t_2^* = t_2 - t_{EOF}$; Háttélelektrolit: A, 15,0 mM acetátpuffer (pH=4,75), B, 15,0 mM foszfátpuffer (pH=7,2), C, 75,0 mM borátpuffer (pH=9,0)

5.1.5. *Eritro-* és *treo-β*-Me-aminosavak elválasztása SP2- α -CD királis szelektor jelenlétében

Az SP2- α -CD alkalmazásával elért eredményeket különböző pH esetén az **5.2. Táblázatban** foglaltuk össze. A háttéreltrolit pH-ja mellett az elválasztás erősen függ a mintamolekula szerkezetétől. A két gyűrűvel rendelkező molekulák visszatartása sokkal nagyobb, mint az egy gyűrűt tartalmazóké (**5.2. Táblázat**). A zárványkomplex kialakulása során vagy a molekula egésze vagy a molekula hidrofób része illeszkedik a CD üregébe, és így módon nagyon fontos szerepet játszik a CD típusa az elválasztásban. A hidrofób kölcsönhatások önmagukban nem elegendőek az enantiomerek elválasztásához: a gyenge kötések az aszimmetria centrumon elhelyezkedő szubsztituensek és a primer/szekunder természetes vagy szubsztituált hidroxilcsoportok között lehetnek a felelősek a királis felismerésért. A királis elválasztáshoz vizes közegben a zárványkomplex kialakulása szükséges, de nem elégséges feltétel. További kölcsönhatások alakulhatnak ki a molekula hidrofób részei és a CD külső felülete között. Az **5.2. Táblázatban** láthatjuk, hogy a β -MeTic vándorlási ideje nagyobb, mint a β -MePhe és a β -MeTyr vándorlási ideje. A két gyűrűvel rendelkező molekulák jobban illeszkednek az SP2- α -CD üregébe, de a hosszabb migrációs idő ellenére az α és R_s értéke a β -MeTic esetén jóval kisebb volt, mint a β -MePhe, β -MeTyr vagy β -MeTrp esetén. Az *eritro-* és a *treo-β*-MeTic konformációja gátolt, a két enantiomerrel képzett komplex stabilitása valószínűleg hasonló, így az elválasztás igen gyenge vagy nem is jön létre.

5.1.6. *Eritro-* és *treo-β*-Me-aminosavak elválasztása SP2- β -CD királis szelektor jelenlétében

A természetes β -CD valamivel nagyobb belső átmérővel (nagyobb üreggel) rendelkezik, mint a természetes α -CD (0,78 és 0,57 nm). Az **5.2. és 5.3. Táblázat** azt mutatja, hogy a két szelektort összehasonlítva a vándorlási idők csak kismértékben térnek el a β -MePhe analógok esetében. Nagyobb vándorlási idők figyelhetők meg az SP2- β -CD-t alkalmazva mindhárom puffer rendszerben a β -MeTyr esetén, valamint a borátpuffer rendszerben a β -MeTic esetén, miközben a vándorlási idő β -MeTic analógok esetén kisebb acetátpuffer rendszerben. Az SP2- β -CD (azonos szubsztitúciós fokkal, mint az SP2- α -CD) üregének belső átmérője nagyobb, ezért az aminosavak várhatóan lazábban fognak illeszkedni. Ennek ellenére, a legtöbb esetben a vándorlási idő nem változott jelentősen, illetve nőtt, amikor az SP2- β -CD

szelektort alkalmaztuk. Az elválasztás hatékonysága és a felbontás rosszabbnak adódott SP2- β -CD szelektor esetében, kiváltképp az *eritro*- β -MeTyr enantiomereknél. A β -MeTic enantiomerjeit SP2- α -CD szelektor jelenlétében nem sikerült elválasztanunk, de SP2- β -CD jelenlétében már igen. Alapvonal elválasztást értünk el *eritro*- β -MeTic esetében borátpuffer rendszerben, és mindhárom puffer rendszerben a *treo*- β -MeTic esetén.

5.1.7. *Eritro*- és *treo*- β -Me-aminosavak elválasztása SP4- β -CD királis szelektor jelenlétében

Az SP4- β -CD szubsztitúciós foka 4, így az elektroforetikus áramlás növekszik a kétszeresen szubsztituált CD analóghoz képest. Az aminosavak komplexált formája szintén gyorsabban mozog az anód irányába, így nagyobb vándorlási időket, felbontást és hatékonyabb elválasztást várunk. Az **5.4. Táblázatban** megfigyelhető, hogy a legtöbb esetben a várakozásoknak megfelelően a vándorlási idők nőttek SP4- β -CD szelektor jelenlétében (kivéve *eritro*- β -MeTyr és *eritro*- β -MeTrp borátpufferben, az *eritro*- β -MeTic acetátpufferben és *treo*- β -MeTrp acetát- és foszfátpufferben). Összehasonlítva az SP2- β -CD szelektorral a legtöbb esetben megnőtt az α és R_s értéke, különösképpen a β -MeTic analógoknál. Habár az SP4- β -CD alkalmazásával a legtöbb esetben jobb elválasztást értünk el, mégsem volt annyira hatékony, mint az SP2- α -CD, ami azt jelzi, hogy a vizsgált minták valószínűleg jobban illeszkedtek az SP2- α -CD üregébe (kivéve a *treo*- β -MeTyr és az *eritro*- és *treo*- β -MeTic enantiomereket). A sztérikus hatások fontosságát a királis felismerésben mi sem mutatja jobban, mint a konformációs erősen gátolt β -MeTic analógok különleges viseelkedése.

5.1.8. Több kiralitás centrummal rendelkező *eritro*- és *treo*- β -Me-aminosavak elválasztásának optimalizálása

A peptid szintézis során két aszimmetria centrummal rendelkező aminosavak epimerizációja léphet fel, pl. a (2*R*,3*R*)-*eritro* izomer alakulhat (2*S*,3*R*)-*treo* izomerré. Epimerizáció azonban a peptid hidrolízis során is felléphet. Ha a peptid szintézis során a kiindulásnál racém *eritro*- és *treo*-sztereoizomereket használnak, akkor mind a négy izomer jelen lehet a peptidben. A peptid diasztereomerjeinek elválasztása után egy hidrolízist követően az aminosav tartalom meghatározhatóvá válik. Ezekben az esetekben alapvető feladat, hogy ne csak az enantiomereket válasszuk el, hanem a diasztereoizomerek elválasztására is legyen módszerünk.

A **11.1. Fejezetben** láthatjuk a β -Me-szubsztituált aminosak négy sztereoizomerjének elválasztását ábrázoló elektroferogramokat (**1-4**). Az *eritro*- és *treo*- β -MePhe, β -MeTyr és β -MeTrp esetében SP4- β -CD alkalmazásával sikeresen alapvonalra elválasztottuk a négy sztereoizomert acetát- vagy borátpuffer rendszert használva, míg az *eritro*- és *treo*- β -MeTic aminosav enantiomerjeit acetátpuffer jelenlétében sikerült elválasztani.

5.2. β -szubsztituált triptofán analóg enantiomerek elválasztása módosított CD jelenlétében CE módszerrel

Az általunk vizsgált Trp analógok mindegyike tartalmaz aromás gyűrűt és két aszimmetria centrumot, és így két enantiomer párral rendelkeznek (**4.1. Táblázat**). Az *eritro* és *treo*-Trp analógok enantiomer párjainak elválasztása természetes α -CD-t alkalmazva oldhatósági problémák miatt nem vezetett eredményre, így áttértünk a jobban oldódó szulfopropil- α - illetve β -CD használatára.

5.5. Táblázat A pH és a puffer minőségének hatása β -szubsztituált Trp sztereoizomerek elválasztására SP2- α -CD királis szelektort alkalmazva

Komponens	Paraméterek	Háttérelktrolitok		
		1. Acetát	2. Foszfát	3. Borát
<i>eritro</i> - β -MeTrp	t_1^* (perc)	3,1	4,6	3,6
	t_2^* (perc)	4,4	6,4	4,0
	α	1,41	1,40	1,12
	R_s	8,65	8,10	3,20
<i>treo</i> - β -MeTrp	t_1^* (perc)	3,4	3,9	3,0
	t_2^* (perc)	4,2	4,8	3,3
	α	1,23	1,22	1,09
	R_s	5,10	4,50	2,60
<i>eritro</i> - β -2-PrTrp	t_1^* (perc)	4,7	3,2	3,2
	t_2^* (perc)	7,4	4,7	4,0
	α	1,55	1,47	1,25
	R_s	13,40	10,60	8,00
<i>treo</i> - β -2-PrTrp	t_1^* (perc)	2,2	1,9	3,7
	t_2^* (perc)	2,9	2,5	4,2
	α	1,35	1,32	1,12
	R_s	5,40	6,65	3,35

5.5. Táblázat (folytatás) A pH és a puffer minőségének hatása β -szubsztituált Trp sztereoizomerek elválasztására SP2- α -CD királis szelektort alkalmazva

Komponens	Paraméterek	Háttérelktrolitok		
		1. Acetát	2. Foszfát	3. Borát
<i>eritro</i> - β -3-PentTrp	t_1^* (perc)	4,8	4,8	4,3
	t_2^* (perc)	4,8	4,8	4,5
	α	1,00	1,00	1,04
	R_s	0,00	0,00	1,55
<i>treo</i> - β -3-PentTrp	t_1^* (perc)	6,1	5,9	5,8
	t_2^* (perc)	6,1	5,9	6,0
	α	1,00	1,00	1,04
	R_s	0,00	0,00	1,30
<i>eritro</i> - β -PhTrp	t_1^* (perc)	7,3	3,5	6,4
	t_2^* (perc)	8,0	3,7	6,5
	α	1,08	1,07	1,02
	R_s	3,40	2,30	0,65
<i>treo</i> - β -PhTrp	t_1^* (perc)	5,6	2,8	4,6
	t_2^* (perc)	6,2	3,0	4,6
	α	1,10	1,08	1,00
	R_s	3,50	2,10	0,00
<i>eritro</i> - β -diMeOPhTrp	t_1^* (perc)	7,5	4,0	4,63,8
	t_2^* (perc)	9,1	4,3	4,1
	α	1,21	1,08	1,10
	R_s	7,70	5,20	3,30
<i>treo</i> - β -diMeOPhTrp	t_1^* (perc)	10,1	4,0	3,8
	t_2^* (perc)	11,8	4,1	4,1
	α	1,17	1,04	1,09
	R_s	7,50	1,80	3,50

$t_1^* = t_1 - t_{EOF}$, $t_2^* = t_2 - t_{EOF}$; Háttérelktrolit: **1**, 50,0 mM SP2- α -CD 15,0 mM acetátpuffer (pH=4,75), **2**, 50,0 mM SP2- α -CD 15,0 mM foszfátpuffer (pH=7,2), **3**, 50,0 mM SP2- α -CD 75,0 mM borátpuffer (pH=9,0)

5.2.1. Eritro- és treo- β -szubsztituált Trp analógok királis elválasztása SP2- α -CD királis szelektort alkalmazva

A β -szubsztituált Trp analógokra az SP2- α -CD királis szelektorttal kapott redukált vándorlási idők (t_1^* és t_2^*), szelektivitás (α) és felbontás (R_s) értékeket az **5.5. Táblázatban** foglaltuk össze. Az elválasztást a háttérelktrolit pH-ja és a mintamolekula szerkezete erősen befolyásolta. A β -pozícióban aromás oldallánccal rendelkező aminosavak visszatartása nagyobb mértékű, mint az alifás oldallánccal. A zárványkomplex kialakulásában fontos szerepet játszik a molekula illeszkedése a CD üregében, ezáltal a CD típusa és a molekula hidrofób részei meghatározók az elválasztás szempontjából. A hidrofób kölcsönhatás a CD üregével nem elégséges feltétel az elválasztáshoz; a királis felismerésért a minta aszimmetria

centrumán elhelyezkedő szubsztituensek és az elsődleges/másodlagos hidroxilcsoportok között fellépő kölcsönhatások is felelősek. Az **5.5. Táblázat** azt mutatja, hogy az aromás oldallánccal rendelkező β -szubsztituált Trp analógok esetén nagyobb a vándorlási idő (kivéve a *treo*- β -2-PrTrp), mint az alifás oldalláncúaknál. Az alifás oldalláncúaknál a szénatomszám emelkedésével nő a vándorlási idő, az *eritro*- és *treo*-diasztereomereknél pedig a mintamolekula természetétől és a háttérelktrolit pH-jától függően változik. Egyes esetekben a nagyobb vándorlási idő ellenére kisebb szelektivitást és felbontást tapasztaltunk (β -3-PentTrp, β -MeTrp).

5.2.2. *Eritro- és treo- β -szubsztituált Trp analógok királis elválasztása SP2- β -CD és SP4- β -CD királis szelektort alkalmazva*

Az SP2- β -CD (azonos szubsztitúciós fokú, mint az SP2- α -CD) valamivel nagyobb belső átmérővel (0,78 nm) rendelkezik, mint az SP2- α -CD (0,57 nm), és így lazább illeszkedést várunk a mintamolekuláktól. Ennek ellenére a legtöbb esetben a vándorlási idők növekedtek (kivéve foszfátpuffert alkalmazva, **5.6. Táblázat**). Az elválasztás hatékonyságával kapcsolatban elmondható, hogy a szelektivitás és a felbontás sokkal kisebb az SP2- β -CD szelektor esetében mindhárom puffer rendszerben, mint SP2- α -CD-t alkalmazva. Valószínűleg a szorosabb illeszkedésnek köszönhetően a zárványkomplex stabilitása az SP2- α -CD üregében nagyobb, ami kedvezőbb királis felismeréshez vezet.

Azáltal, hogy az SP4- β -CD szubsztitúciós foka 4, és a negatív töltéseinek száma kétszerese, mint az SP2- β -CD-nek, így az elektroforetikus mozgékonyosság az anód irányába megnő. Az aminosavakkal komplexált forma is mozgékonyabb lesz az anód irányába, ami szélesebb elválasztási ablakot („separation window”) és nagyobb vándorlási időt eredményez.

5.2.3. *A négy enantiomerrel rendelkező eritro- és treo- β -szubsztituált Trp analógok királis elválasztása*

Ahogy azt már az **5.1.8. Fejezetben** említettük, a két aszimmetria centrummal rendelkező aminosavak esetében mind a peptidszintézis mind a peptidhidrolízis során epimerizáció léphet fel, így alapvető feladat, hogy ne csak az enantiomereket válasszuk el, hanem az *eritro*- és *treo*- sztereoizomerek elválasztására is legyen módszerünk.

5.6.Táblázat A pH és a puffer minőségének hatása β -MeTrp sztereoizomerek elválasztására SP2- α -CD, SP2- β -CD és az SP4- β -CD királis szelektort alkalmazva

Komponens	Paraméterek	Háttélektrolitok		
		1. Acetát	2. Foszfát	3. Borát
SP2-α-CD, 50 mM				
<i>eritro</i> - β -MeTrp	t_1^* (perc)	3,1	4,6	3,6
	t_2^* (perc)	4,4	6,4	4,0
	α	1,41	1,40	1,12
	R_s	8,65	8,10	3,20
<i>treo</i> - β -MeTrp	t_1^* (perc)	3,4	3,9	3,0
	t_2^* (perc)	4,2	4,8	3,3
	α	1,23	1,22	1,09
	R_s	5,10	4,50	2,60
SP2-β-CD, 50 mM				
<i>eritro</i> - β -MeTrp	t_1^* (perc)	6,1	2,4	5,3
	t_2^* (perc)	6,6	2,6	5,3
	α	1,08	1,08	1,00
	R_s	1,45	1,05	0,00
<i>treo</i> - β -MeTrp	t_1^* (perc)	7,8	3,4	2,9
	t_2^* (perc)	8,8	3,6	3,2
	α	1,12	1,06	1,10
	R_s	1,95	1,55	1,15
SP4-β-CD, 25 mM				
<i>eritro</i> - β -MeTrp	t_1^* (perc)	6,6	1,9	5,3
	t_2^* (perc)	7,4	1,9	5,5
	α	1,12	1,00	1,04
	R_s	2,35	0,00	1,07
<i>treo</i> - β -MeTrp	t_1^* (perc)	6,0	2,1	3,4
	t_2^* (perc)	6,9	2,3	3,7
	α	1,15	1,09	1,09
	R_s	2,50	0,85	2,03

$t_1^* = t_1 - t_{EOF}$, $t_2^* = t_2 - t_{EOF}$; Háttélektrolit: **1**, 50,0 mM SP2- α -CD 15,0 mM acetátpuffer (pH=4,75), **2**, 50,0 mM SP2- α -CD 15,0 mM foszfátpuffer (pH=7,2), **3**, 50,0 mM SP2- α -CD 75,0 mM borátpuffer (pH=9,0)

A **11.2. Fejezetben** láthatjuk a β -szubsztituált Trp analógok négy sztereoizomerjének elválasztását ábrázoló kromatogramokat (5-9). Az *eritro*- és *treo*- β -2-PrTrp, β -3-PentTrp, β -PhTrp és a β -diOMePhTrp analógoknál sikeres alapvonal elválasztást értünk el acetát- és borátpuffer rendszerben SP2- α -CD királis szelektort alkalmazva, míg a β -Me-Trp analógok enantiomerjeit borátpuffer rendszerben SP4- β -CD királis szelektort alkalmazva tudtuk sikeresen elválasztani.

5.2.4. A β -Me-aminosavak enantiomerjeinek azonosítása

Az enantiomerek vándorlási sorrendjét tiszta vagy dúsított enantiomerek racemáthoz való adagolásával határoztuk meg, amihez az egyes enantiomereket enzimátikus emésztés útján nyertük. A vándorlási sorrendet vizsgálva azt találtuk, hogy az *eritro*- és *treo*-diasztereomerek különböző sorrendben vándorolnak a különböző háttérelktrolitokban. A legtöbb aminosavnál a háttérelktrolit változtatása a diasztereomerek vándorlási sorrendjének változását eredményezte, míg az enantiomerek vándorlási sorrendjére nem volt hatással. Összegzésként megállapítottuk, hogy semmilyen szabály nem állítható fel a vándorlási sorrendre, ezért minden esetben szükség van a csúcsok minőségi azonosítására.

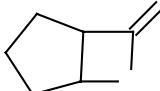
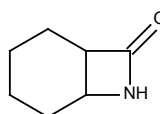
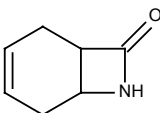
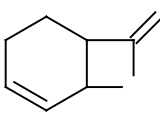
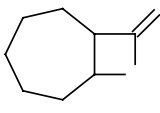
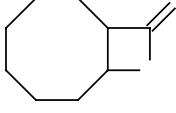
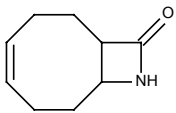
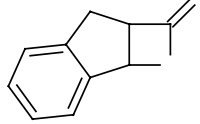
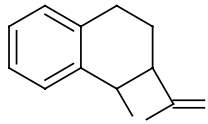
Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy új közvetlen kapilláris elektroforetikus módszert dolgoztunk ki az általunk vizsgált β -szubsztituált aminosav enantiomerek elválasztására (**4.1. Táblázat**). A szulfatált ciklodextrinek, SP2- β -CD és SP4- β -CD a legtöbb esetben sikeresen alkalmazható volt a β -MePhe, β -MeTyr és β -MeTrp enantiomerek elválasztására, míg a β -MeTic esetében a természetes β -CD-szulfát bizonyult hatásosnak. A β -2-PrTrp, β -3-PentTrp, β -PhTrp és a β -diOMePhTrp analógoknál az SP2- α -CD volt a leghatékonyabb az elválasztás szempontjából, míg a β -MeTrp esetében az SP4- β -CD mutatkozott a legmegfelelőbbnek. A vándorlási időt, szelektivitást és a felbontást vizsgálva optimalizáltuk az elválasztást a háttérelktrolit, a pH és az alkalmazott feszültség változtatásával. A vándorlási sorrendeket meghatároztuk és megállapítottuk, hogy általános érvényű szabály nem adható meg.

5.3. β -laktám enantiomerek folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztása fordított fázisú körülmények között, „újszerű” ciklodextrin alapú állófázisokon

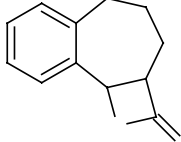
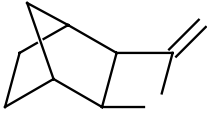
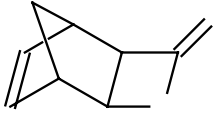
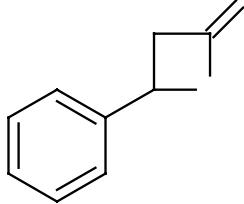
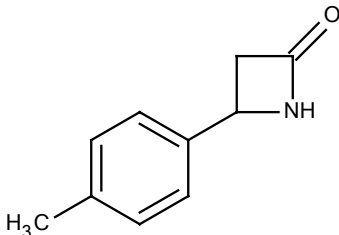
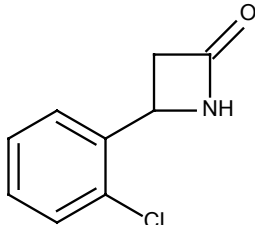
Három különböző, „újszerű” (új kötési technikával készült) természetes β -CD (**BCD – Quest 3**), hidroxipropil- β -CD (**HPBCD - Quest 2**) és permetil- β -CD (**PMBCD - Quest 1**) állófázison vizsgáltuk a **4.2. Táblázatban** bemutatott β -laktámokat. Az elválasztást a **PMBCD** oszlopon kezdtük, ahol először az eluens minőségi és mennyiségi összetételét optimalizáltuk. Az eluens vizes fázisaként 0,1% trietilamónium-acetátot (TEAA) választottunk, melynek pH-ját jégeccettel állítottuk be. A pH-t 3-6 tartományban változtatva a pH=5 vizes fázis bizonyult a legalkalmasabbnak, mind a 28 vegyületre nézve. A mozgófázis szerves komponenseként acetonitrilt (MeCN) alkalmaztunk, melynek mennyiségét 5-30% tartományban változtattuk. A β -laktám enantiomerek tipikus fordított fázisú viselkedést mutattak, azaz a szerves fázis mennyiségének növelésével mind a k , α és R_s értéke csökkent. 18 β -laktám vegyületre nézve az optimális k , α és R_s értékeket 10% (v/v) MeCN alkalmazásával kaptuk. Az összehasonlítások könnyítése végett a másik két oszlopon (**BCD** és **HPBCD**) ugyanezt az eluens összetételt [0,1% TEAA (pH 5,0)/MeCN=90/10 (v/v)] alkalmaztuk. Az **5.7. Táblázatban** a három különböző királis állófázissal elért eredményeinket foglaltuk össze. A három állófázis közül a **PMBCD** bizonyult a legjobbnak, 11 komponens esetén (**13,15-22,24,25**) alapvonal elválasztást ($R_s \geq 1,5$), 4 vegyület esetében (**10,11,13,26**) 0,89-1,41 közötti felbontásokat értünk el. A **10**, **23**, **26** és a **28** komponenseket nem sikerült elválasztanunk a **PMBCD** oszlopon. A **PMBCD** oszloppal elért eredmények α és R_s tekintetében jobbnak bizonyultak, mint amelyeket már hasonló állófázison korábban Sun és mtsai. [104] elértek.

Ugyanezt az eluens összetételt felhasználva **HPBCD** oszlopon három komponens (**23,26,28**) sikerült elválasztanunk abból a négyből (**10,23,26,28**), amelyeket a **PMBCD** oszlopon nem. Két molekula esetén (**26,28**) alapvonal elválasztás történt, a harmadik esetén (**23**) pedig a felbontás $R_s=1,00$ lett. A **BCD** oszlop kevésbé volt sikeres, hiszen csak egy komponens (**17**) sikerült alapvonalra és ötöt (**12,18,23,26,28**) részlegesen elválasztani.

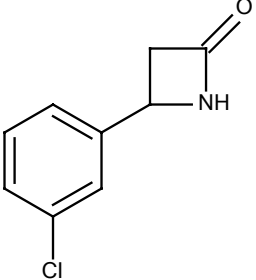
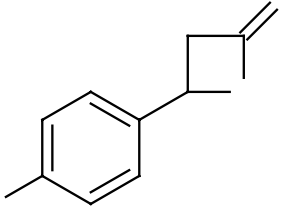
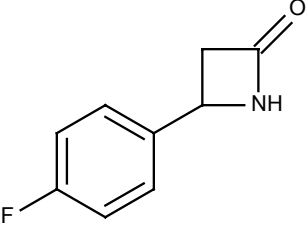
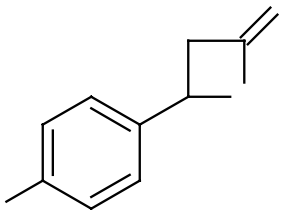
5.7 Táblázat β -Laktámok kromatográfias adatai PMBCD, BCD és HPBCD állófázisokon

Minta száma	Minta neve	Állófázis	k_1	k_2	α	R_s
10		PMBCD	0,99	1,03	1,05	0,12
		BCD	3,04	3,04	1,00	0,00
		HPBCD	3,13	3,13	1,00	0,00
11		PMBCD	1,47	1,58	1,07	0,89
		BCD	7,69	7,69	1,00	0,00
		HPBCD	7,27	7,27	1,00	0,00
12		PMBCD	1,05	1,15	1,09	1,05
		BCD	3,83	3,88	1,01	0,10
		HPBCD	3,56	3,56	1,00	0,00
13		PMBCD	1,15	1,32	1,15	1,75
		BCD	4,13	4,13	1,00	0,00
		HPBCD	3,95	3,95	1,00	0,00
14		PMBCD	2,48	2,70	1,09	1,38
		BCD	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
		HPBCD	1,69	1,69	1,00	1,00
15		PMBCD	4,44	4,86	1,09	1,65
		BCD	6,26	6,26	1,00	0,00
		HPBCD	1,64	1,64	1,00	0,00
16		PMBCD	3,15	3,61	1,14	2,43
		BCD	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
		HPBCD	2,64	2,64	1,00	0,00
17		PMBCD	2,13	2,61	1,23	3,36
		BCD	2,89	3,12	1,08	1,66
		HPBCD	3,53	3,53	1,00	0,00
18		PMBCD	3,91	4,27	1,04	1,65
		BCD	5,04	5,26	1,04	0,93
		HPBCD	5,96	5,96	1,00	0,00

5.7 Táblázat (folytatás) β -Laktámok kromatográfiás adatai PMBCD, BCD és HPBCD állófázisokon

Minta száma	Minta neve	Állófázis	k_1	k_2	α	R_s
19		PMBCD	3,57	4,97	1,39	5,98
		BCD	2,82	2,82	1,00	0,00
		HPBCD	5,89	5,89	1,00	0,00
20		PMBCD	1,93	2,15	1,11	1,62
		BCD	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
		HPBCD	2,17	2,17	1,00	0,00
21		PMBCD	1,48	1,68	1,14	1,87
		BCD	8,27	8,27	1,00	0,00
		HPBCD	8,75	6,75	1,00	0,00
22		PMBCD	1,76	2,18	1,24	3,34
		BCD	2,25	2,25	1,00	0,00
		HPBCD	2,91	2,91	1,00	0,00
23		PMBCD	2,76	2,80	1,02	0,16
		BCD	4,22	4,38	1,04	0,56
		HPBCD	5,52	5,77	1,05	1,00
24		PMBCD	3,01	3,71	1,23	3,71
		BCD	2,81	2,81	1,00	0,00
		HPBCD	3,76	3,76	1,00	0,00

5.7 Táblázat (folytatás) β -Laktámok kromatográfias adatai **PMBCD**, **BCD** és **HPBCD** állófázisokon

Minta száma	Minta neve	Állófázis	k_1	k_2	α	R_s
25		PMBCD	3,37	4,63	1,38	5,81
		BCD	3,64	3,64	1,00	0,00
		HPBCD	4,91	4,91	1,00	0,00
26		PMBCD	4,54	4,54	1,00	0,00
		BCD	4,28	4,48	1,05	1,02
		HPBCD	5,65	6,06	1,07	1,64
27		PMBCD	1,94	2,12	1,09	1,41
		BCD	1,83	1,83	1,00	0,00
		HPBCD	2,33	2,33	1,00	0,00
28		PMBCD	6,72	6,72	1,00	0,00
		BCD	6,87	7,30	1,06	1,01
		HPBCD	9,04	9,82	1,09	2,08

Kolonna: **PMBCD**, permetil- β -ciklodextrin, **BCD**, β -ciklodextrin és **HPBCD**, hidroxipropil- β -ciklodextrin alapú királis állófázisok; eluens:0,1% TEAA (pH 5,0)/MeCN = 90/10 (v/v); áramlási sebesség: 0,7 mL perc⁻¹; Detektálási hullámhossz: 205 nm; Hőmérséklet: 25 °C; n.d.: nem detektálható

Az elválasztásokat elemezve a **PMBCD** oszlopon valószínűleg a zárványkomplex kialakulása és a diszperziós kölcsönhatás a felelős elsősorban a visszatartásért. Az azetidín gyűrű egyaránt tartalmaz H-donor (-NH-) és akceptor (=O) csoportokat, de a ciklodextrinen elhelyezkedő metilezett hidroxilcsoportok csak H-akceptorként funkcionálnak. A természetes **BCD** és a **HPBCD** állófázisoknál a hidroxilcsoportok H-akceptorként is és H-donorként is működhetnek. A **HPBCD** állófázison jelentkeztek a legnagyobb retenciós idők (kivéve **14-16** komponensek). Ugyanakkor a nagyarányú sikertelen elválasztás (16 komponens a 19-ből) a **HPBCD** állófázison elhelyezkedő hidroxipropil-csoportok nagyfokú rugalmasságával magyarázható, azaz a hidroxipropil-csoportok kölcsönhatásba lépnek mindkét enantiomerrel, mely visszatartást ugyan eredményez, azonban ez a kölcsönhatás nem enantioszelektív, elválasztás nem történik.

Tanulmányoztuk a β -laktámok szerkezetének hatását az elválasztásra. A **PMBCD** állófázison a szubsztituált gyűrű méretének növekedésével nő a β -laktámok (**10,11,14,15**) visszatartása és javul az enantioszelektivitás is, míg a **BCD** és **HPBCD** állófázisok kevésbé bizonyultak hatékonyak.

A **PMBCD** állófázison a kettőskötés jelenléte a kondenzált gyűrűs szerkezetű komponenseknél minden esetben javítja a felbontást és csökkenti a visszatartást. A kondenzált gyűrű a **10,11,14,15** és **20** komponenseknél telített, míg a **12,13,16** és **21** komponensek tartalmazzák a kettőskötést (a **12** és a **13** komponenseknél különböző a kettőskötés helyzete). A kettőskötés jótékony hatása azonban nem jelentkezik a **HPBCD** és a **BCD** állófázisokon.

Ha a **PMBCD** állófázison a fenilgyűrű metil- (**23**) vagy halogén-csoporttal (**26-28**) „*para*” helyzetben volt szubsztituálva, akkor az az elválasztásra kedvezőtlenül hat (kivétel a **27** komponens), míg szubsztituens hiányában (**22**) kiváló elválasztás ($R_s=3,34$) érhető el. Ugyanakkor a **23,26** és a **28** komponenseket **HPBCD** és **BCD** oszlopokon alapvonalra vagy részlegesen sikerült elválasztanunk (**5.7. Táblázat**), vagyis a permetilezett (**PMBCD**) és hidroxipropil szubsztituált (**HPBCD**) β -ciklodextrin alapú állófázis eltérő kölcsönhatást mutat a „*para*” helyzetben szubsztituált molekulákkal szemben, azonban ez a kölcsönhatás a szubsztituens méretétől is függ.

A „*para*” helyzetben halogén atommal szubsztituált komponenseknél (**26-28**) megfigyelhető, hogy a retenciós idő a F, Cl, Br sorrendben növekszik mindhárom állófázison (**5.7. Táblázat**). A F, Cl, Br sorban a molekula mérete növekszik, a polaritása csökken, egyre apolárisabbá válik. Valószínűleg a zárványkomplex stabilitása a méret és az apoláris jelleg

miatt a F, Cl, Br sorban növekszik, mely a visszatartás növekedését eredményezi. Connors [105] ezzel nagyon megegyező eredményt kapott, amikor stabilitási állandókat határozott meg F, Cl és Br szubsztituált benzol analógok esetén (ezek rendre 70, 160, 310 M⁻¹ értéknek adódtak) természetes **BCD**-t alkalmazva vizes rendszerben.

A klórral szubsztituált (**24-26**) komponenseknél a komplex kialakulását és stabilitását jelentősen befolyásolja a halogén atom helyzete az aromás gyűrűn. A legjobb elválasztást a (**25**) analóg esetén érték el ($R_s=5,81$) **PMBCD** oszlopon, amikor a halogén atom „meta” helyzetben volt szubsztituálva (**5.8. Táblázat**). Semmilyen szelektivitást nem mutattak **BCD** és **HPBCD** állófázisokon az „orto”, és a „meta” helyzetben szubsztituált (**24, 25**) analógok, míg a „para” helyzetben szubsztituált molekulák esetében a **PMBCD, BCD, HPBCD** sorrendben növekedett az α és R_s értéke (kivételem a **27** analóg).

A kondenzált gyűrűs szerkezetű komponensek esetén (**17,18,19**) a β -laktám H-kötésre alkalmas csoportjainak a térbeli elhelyezkedését befolyásolja a középső gyűrű mérete. A **HPBCD** állófázison a három kondenzált gyűrűs β -laktám enantiomer (**17,18,19**) elválasztása sikertelen volt, azonban a **PMBCD** és a **BCD** állófázisok bizonyos szelektivitást mutattak. Kitűnő ($R_s=5,98$) elválasztást érték el **PMBCD** állófázison a **19** komponens esetén, ami a legnagyobb középső gyűrűvel rendelkezik, viszont **HPBCD** és **BCD** állófázisokon ez a vegyület semmilyen szelektivitást sem mutatott. A **11.3 Fejezetben** a β -laktámok elválasztására jellemző kromatogramokat mutatjuk be.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a 19 β -laktám komponensből 17-et sikeresen választottunk el a három „újszerű” β -CD alapú királis állófázison. A három állófázis közül a **PMBCD** alapú bizonyult a leghatékonyabbnak. Megállapítottuk, hogy a β -laktám molekulák szerkezete a β -laktám gyűrűhöz kapcsolt alifás és aromás részek mérete, a kettőskötés jelenléte és helyzete valamint az aromás gyűrűn lévő szubsztituensek minősége (polaritása) és helyzete mind hatással van a zárványkomplex kialakulására, és ezáltal jelentősen befolyásolja a királis felismerést.

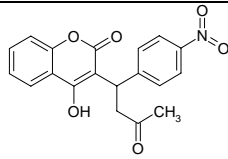
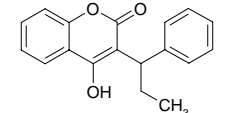
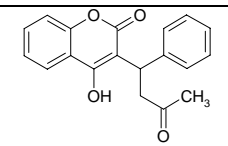
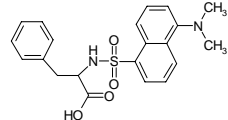
5.4. Szerkezetileg különböző molekulák folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztása „újszerű” ciklodextrin alapú állófázisokon

A szerkezetileg különböző molekulák elválasztásához az előző fejezetben említett három ciklodextrin alapú királis állófázist alkalmaztuk. Az oszlopok hatékonyságának újabb

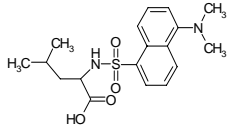
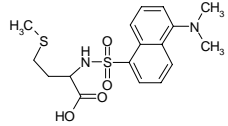
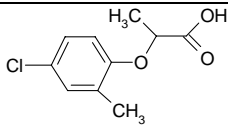
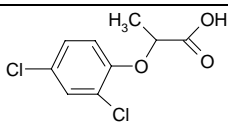
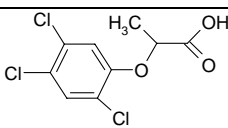
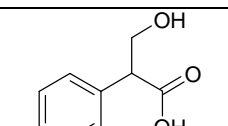
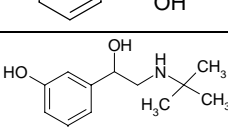
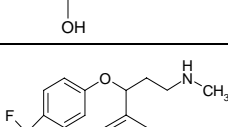
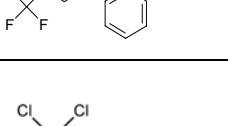
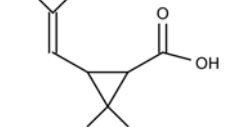
összehasonlításához a **4.3. Táblázatban** foglalt molekulákat használtuk fel. A szerkezetileg igen eltérő 14 molekula jó viszonyítási alapot nyújtott az oszlopok hatékonyságának jellemzésére.

A 14 molekula szerkezetét tekintve méretben, polarításban, hidrofobicitásban jelentősen különbözik egymástól. A vizsgálatokhoz az előzetes kísérletek alapján új mozgófázist választottunk. Az eluens vizes fázisaként 0,1% (v/v) trietilammónium-foszfátot (TEAP) alkalmaztunk, melynek pH-ját foszforsavval pH=3,5-re állítottunk be. Ez a pH bizonyult a legalkamasabbnak a 14 különböző szerkezetű molekula analízisére. A mozgófázis szerves módosítójaként a metanol (MeOH) alkalmasabbnak bizonyult a csúcsalakot, retenciós faktort, szelektivitást és felbontást tekintve, mint az MeCN. A MeOH tartalmat 10-50%-os tartományban változtattuk. Összehasonlítás végett molekulánként igyekeztünk mindhárom oszlopon ugyanazt az eluens összetételt alkalmazni, azonban néhány esetben (**35, 36, 37, 41a** és **41b**) eltérő eluens összetételt is feltüntettünk az **5.8 Táblázatban**, bemutatva az eredményesebb elválasztás lehetőségét is.

5.8. Táblázat Szerkezetileg eltérő molekulák királis elválasztása három különböző ciklodextrin alapú állófázison (**BCD, HPBCD, PMBCD**)

Komponens	Állófázis	Eluens (v/v)	k_1	α	R_s
29 	BCD	66/34	5,10	1,05	0,75
	HPBCD	66/34	5,95	1,06	0,83
	PMBCD	66/34	6,12	1,14	2,15
30 	BCD	66/34	8,47	1,07	1,13
	HPBCD	66/34	12,57	1,07	1,04
	PMBCD	66/34	2,87	1,05	0,78
31 	BCD	66/34	3,27	1,02	0,46
	HPBCD	66/34	3,97	1,08	1,47
	PMBCD	66/34	1,30	1,22	2,94
32 	BCD	74/26	5,53	1,08	1,21
	HPBCD	74/26	4,91	1,00	0,00
	PMBCD	74/26	2,36	1,42	3,23

5.8. Táblázat (folytatás) Szerkezetileg eltérő molekulák királis elválasztása három különböző ciklodextrin alapú állófázison (**BCD**, **HPBCD**, **PMBCD**)

Komponens	Állófázis	Eluens (v/v)	Eluens (v/v)	k_1	α	R_S
33		BCD	74/26	4,73	1,16	2,59
		HPBCD	74/26	5,37	1,06	0,83
		PMBCD	74/26	1,50	1,03	0,47
34		BCD	74/26	2,69	1,04	0,65
		HPBCD	74/26	2,64	1,00	0,00
		PMBCD	74/26	1,15	1,05	0,62
35		BCD	74/26	3,03	1,08	1,09
		HPBCD	74/26	4,13	1,03	0,48
		PMBCD	77/23	1,39	1,10	1,40
36		BCD	74/26	2,63	1,06	0,87
		HPBCD	82/18	3,57	1,04	0,63
		PMBCD	77/23	1,12	1,02	0,50
37		BCD	66/34	4,13	1,00	0,00
		HPBCD	66/34	2,77	1,00	0,00
		PMBCD	77/23	1,92	1,17	2,37
38		BCD	74/26	2,17	0,61	0,61
		HPBCD	74/26	2,73	4,18	4,18
		PMBCD	74/26	0,33	2,06	2,06
39		BCD	66/34	0,93	1,78	1,78
		HPBCD	66/34	0,93	2,54	2,54
		PMBCD	66/34	0,00	0,00	0,00
40		BCD	90/10	8,20	1,39	1,39
		HPBCD	90/10	11,40	1,80	1,80
		PMBCD	90/10	1,57	2,33	2,33
41a		BCD	58/42	3,93	1,00	0,00
		HPBCD	82/18	3,90	1,06	1,21
		PMBCD	67/33	1,71	1,15	2,33
41b		BCD	58/42	5,60	1,06	1,21
		HPBCD	58/42	5,63	1,03	0,76
		PMBCD	67/33	2,44	1,30	4,66

Kolonna: **PMBCD**, permetil- β -ciklodextrin, **BCD**, β -ciklodextrin és **HPBCD**, hidroxipropil- β -ciklodextrin alapú királis állófázis; eluens:0,1% TEAP (pH 3,5)/MeOH (v/v); áramlási sebesség: 0,8 mL perc⁻¹; Detektálási hullámhossz: 210 nm; Hőmérséklet: szobahőmérséklet; n.d.: nem detektálható

A 14 vizsgált komponensből **BCD** oszlopon kettő, **HPBCD** oszlopon négy és **PMBCD** oszlopon kilenc esetben sikerült alapvonal elválasztást elérnünk. A visszatartás a legtöbb esetben a **BCD** és a **HPBCD** oszlopon volt a legnagyobb.

A kumarin analógok (**29-31**) enantiomerjeinek elválasztásához 0,1% TEAP (pH=3,5)/MeOH=66/34 (v/v) arányú mozgófázist alkalmaztunk. Két esetben a **BCD** és **HPBCD** oszlopon volt a legnagyobb a retenciós faktor (k) értéke (kivétel **29 PMBCD** oszlopon), míg a legjobb szelektivitást és felbontást a (**29**) és a (**31**) komponensekre a **PMBCD** oszlopon értük el, a (**30**) komponens pedig a **BCD** és **HPBCD** oszlopon mutatott legjobb elválasztást. Valószínűleg a (**30**) analóg jobban illeszkedik a természetes **BCD** vagy a **HPBCD** üregébe, mint **PMBCD** esetén, azonban a másik két, méretüket tekintve valamivel nagyobb kumarin analóg (**29,31**) jobban illeszkedhet a nagyobb méretű **PMBCD** belsejében. A legnagyobb felbontás, amit a három kumarin esetén elértünk 2,94 volt a (**31**) analóg esetén **PMBCD** oszlopon. Ha megnézzük az **5.8. Táblázatban** a három kumarin analógnál feltüntetett retenciós faktor (k) és szelektivitás (α) értékeket, akkor nem találunk egyértelmű kapcsolatot közöttük. A (**31**) komponens esetén a legkisebb retenciónál kaptuk a legnagyobb felbontást, míg a (**29**) analóg esetén a legnagyobb retenciós faktornál adódott a legnagyobb felbontás. Ez is azt mutatja, hogy az enantiomerek elválasztása CD alapú állófázisokon igen összetett. Stabil zárványkomplex létrejötte nem mindig elégséges feltétele az enantioszelektivitásnak [106].

A *danzil(Dns)*-aminosavak esetén (**32-34**) az aromás *Dns* rész lehet a felelős elsődlegesen a visszatartásért. Hasonló retenciót kaptunk a (**32**) és a (**33**) komponensekre mindhárom oszlopon, míg a polárisabb (**34**) komponensre valamivel kisebb retenciós faktor adódott. A három állófázis közül *Dns*-aminosavakra a **HPBCD** oszlop szelektivitása volt a legrosszabb, csak a (**33**) komponens esetén mutatott szelektívást. A legjobb felbontást **PMBCD** oszlopon értük el a *Dns*-Phe esetén (**32**), a *Dns*-Leu (**33**) a **BCD** oszlopon igen jó felbontással volt elválasztható, míg a *Dns*-Met (**34**) csak részleges elválasztást mutatott a **BCD** és a **PMBCD** oszlopokon.

A propionsav analógoknál (**35-37**) a fenilgyűrűn elhelyezkedő szubsztituens hatását figyelhetjük meg (**5.8. Táblázat**). A retenciós faktor mindhárom molekula esetén a **BCD** és **HPBCD** oszlopokon volt a legnagyobb annak ellenére, hogy a **PMBCD** szelektor rendelkezik a legnagyobb üregmérettel. A nagy visszatartás ellenére a királis megkülönböztetés azonban kevésbé hatásos a **BCD** és **HPBCD** szelektorokon. A mono-szubsztituált klór-propionsav esetén (**35**) részleges vagy majdnem alapvonal elválasztást értünk el mindhárom királis

állófázison. A diklór-szubsztituált analógnál (36) hasonlóan, mint a mono-szubsztituált (35) formánál részleges elválasztást értünk el mindhárom oszlopon. Ha összehasonlítjuk a (35) és a (36) analógok elválasztását, akkor azt találjuk, hogy **PMBCD** oszlopon a (35) komponens k_I , α és R_s értéke nagyobb. Ennek valószínű oka, hogy a (35) molekula metilcsoportja a királis állófázis metilezett peremével hidrofób kölcsönhatást alakíthat ki.

A trikloro-szubsztituált analóg (37) k_I értékei nagyobbak a **BCD** és a **PMBCD** oszloponokon, mint a mono- és diszubsztituált analógok k_I értékei (35,36), de ennek ellenére csak a **PMBCD** oszlopon volt sikeres az enantiomer elválasztása ($R_s=2,37$). A három propionsav analóg közül (35-37) valószínűleg a trikloro-szubsztituált analóg (37) illeszkedik legjobban a **PMBCD** (a legnagyobb méretű CD) királis szelektor üregébe, stabilis komplexet létrehozva, míg a **BCD** és a **HPBCD** szelektorok esetén a nagy retenciós faktor ellenére sem értünk el jó elválasztást.

A tropánsav (38) és a terbutalin (39) alifás illetve aromás hidroxilcsoporttal rendelkezik. A hidroxilcsoport mindkét molekulán (38,39) H-hidas kölcsönhatást indukálhat a CD peremén elhelyezkedő szabad hidroxilcsoportokkal. A kromatográfiai körülmények optimalizálásával a **HPBCD** oszlop bizonyult a leghatékonyabbnak, valószínűleg a CD peremén lévő hidroxilcsoportok H-hidas kölcsönhatása révén. A természetes **BCD** oszlopon hasonló mechanizmus játszódhat le, ami részleges (38) és teljes (39) elválasztáshoz vezet. A terbutalin enantiomerjei nem váltak el a **PMBCD** oszloponon. Ennek valószínűleg a H-hidas kölcsönhatás kialakulásának a hiánya az oka, hiszen a β -CD peremén nincsenek szabad hidroxilcsoportok. A terbutalin volt az egyetlen vizsgált molekula, melynek az enantiomerjeit **PMBCD** oszloponon nem sikerült még csak részlegesen sem elválasztanunk. A fluoxetine (40) molekula enantiomerjeit mindhárom királis állófázison sikeresen elválasztottuk, a jelenlévő funkciós csoportok mindhárom oszloponon elegendő erősségű kölcsönhatást biztosítottak a királis felismeréshez.

Érdekes összehasonlítást tehetünk a két fluorozott vegyület (27 és 40) kromatográfiai viselkedése között. Míg a (27) molekula csak a **PMBCD** állófázison mutatott szelektivitást, addig a (40) molekula enantiomerjei mindhárom állófázison jól elkülönültek. Valószínűleg a nagyobb méretű (40) molekula jobban illeszkedik a β -CD üregébe, amihez még hozzájárulhat a **BCD** és **HPBCD** állófázison a H-híd kölcsönhatás a molekula NH-csoportján keresztül, illetve a **PMBCD** állófázison az apoláris kölcsönhatás metilcsoportok révén.

A perimetrinsav (41a, 41b) enantiomerek aromás gyűrű hiányában vélhetően más mechanizmus szerint válnak el β -CD-alapú királis állófázisokon. A ciklopropil gyűrű túl kicsi ahhoz, hogy szorosan illeszkedjen a CD üregébe, ennek ellenére **PMBCD** oszlopon

viszonylag nagy R_s értéket kaptunk mind a *cisz*- és mind a *transz*-permetrinsavra. Ez az eredmény alátámasztja azt a felvetést, amit már korábban említettünk a propionsavak esetében (35)–(37): a királis elválasztásban fontos szerepet játszanak a CD peremén elhelyezkedő szubsztituensek, amelyek kölcsönhatásba lépnek az enantiomerekkel. Amíg **BCD** állófázison a *cisz*-izomer, addig a **HPBCD** állófázison a *transz*-izomer válik el jobban. A **PMBCD** állófázis igen hatékonyan bizonyult mindkét izomer esetén az enantioszelektivitás és a diasztereoszelektivitás szempontjából egyaránt. Egyetlen kromatográfiás futtatás alatt sikerült megoldanunk a négy sztereoiszomer elválasztását. A **11.4. ábra** mutatja be a szerkezetileg eltérő molekulák elválasztására jellemző kromatogramokat, és az előbb említett négy sztereoiszomer elválasztására jellemző kromatogramot is.

Kísérleteink során néhány esetben megállapítottuk az elúciós sorrendet. A fenopropionsav (37), acenokumarol (29), fenprokumon (30) és a fluoxetin (40) elúciós sorrendje a **PMBCD** oszlopon megfordul a **BCD** és a **HPBCD** oszlophoz képest.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az új szintézis útján (4.5.1. Fejezet) fejlesztett királis állófázisok (**BCD**, **HPBCD**, **PMBCD**) jól alkalmazhatóak a 14 szerkezetileg különböző mintamolekula enantiomerjeinek elválasztására. Megállapítottuk, hogy a molekula és az állófázis kémiai szerkezete megszabja a lehetséges kölcsönhatások milyenségét és mértékét, így a molekulaszervezet ismeretében javaslatot tehetünk a megfelelő állófázis kiválasztására. Az általunk vizsgált három különböző királis állófázis jól kiegészíti egymást. Ha az egyik állófázison legalább részleges elválasztást sikerült elérni, minden valószínűség szerint a másik két állófázis valamelyikével az elválasztás sikeresnek bizonyulhat. A három állófázison az elválasztás mechanizmusa feltételezhetően különbözik, amit az eltérő elúciós sorrendek is alátámasztanak.

6. Összefoglalás

Munkánk során kapilláris elektroforézises és új módszerrel szintetizált királis kolonnákon folyadékkromatográfias módszereket fejlesztettünk különböző biológiai és gyógyszeripari szempontból fontos vegyületek elválasztására. Közvetlen királis folyadékkromatográfias és kapilláris zónaelektroforézisen alapuló elválasztások során az különféle paraméterek változtatásának hatását térképeztük fel, és a nyert adatokból kiindulva értelmeztük az eluens, illetve a háttélektrolit minőségének és összetételének, a hőmérsékletnek és a vizsgált vegyületek szerkezetének hatását a királis megkülönböztetési folyamatokra.

1. β -metil-szubsztituált aminosavak enantiomerjeinek elválasztására CE módszert dolgoztunk ki. Királis adalékként α -CD, SP2- α -CD, SP2- β -CD, SP4- β -CD és β -CD-szulfát szelektorokat használtunk.

Az SP2- α -CD alkalmazásával elért eredmények pH függése azt mutatta, hogy a vándorlási idő a pH növelésével eleinte csökken, majd további növeléssel nő, ellenben a szelektivitás és a felbontás folytonosan csökken a pH növelésével (kivéve a *treo*- β -MeTyr és *treo*- β -MeTic borátpufferben). Ez azzal magyarázható, hogy a protonálódás és a komplexképződés is pH függő. A háttélektrolit pH-ja mellett az elválasztás erősen függ a mintamolekula szerkezetétől. A két gyűrűvel rendelkező molekulák visszatartása sokkal nagyobb, mint az egy gyűrűt tartalmazóké. A két gyűrűvel rendelkező molekulák jobban illeszkedtek az SP2- α -CD üregébe, de a hosszabb migrációs idő ellenére az α és R_s értéke a β -MeTic esetén jóval kisebb volt, mint a β -MePhe, β -MeTyr vagy β -MeTrp esetén. Az *eritro*- és a *treo*- β -MeTic konformációsan erősen gátolt, szerkezete rögzített, a két enantiomerrel képzett komplex stabilitása valószínűleg hasonló, így a királis megkülönböztetés vagy csak kicsiny mértékben vagy nem is jött létre.

SP2- β -CD és SP4- β -CD szelektor jelenlétében végzett méréseknél megfigyelhető, hogy a legtöbb esetben a várakozásoknak megfelelően a vándorlási idők nőttek SP4- β -CD jelenlétében (kivéve *eritro*- β -MeTyr és *eritro*- β -MeTrp borátpufferben, az *eritro*- β -MeTic acetátpufferben és *treo*- β -MeTrp acetát- és foszfátpufferben). Összehasonlítva az SP2- β -CD szelektorral a legtöbb esetben megnőtt az α és R_s értéke, különösképpen a β -MeTic analógoknál. Habár az SP4- β -CD alkalmazásával a legtöbb esetben jobb elválasztást értünk el, mégsem volt annyira hatékony, mint az SP2- α -CD, ami azt jelzi, hogy a vizsgált minták

valószínűleg jobban illeszkedtek az SP2- α -CD üregében (kivéve a *treo*- β -MeTyr és az *eritro*- és *treo*- β -MeTic enantiomereket). A sztérikus hatások fontosságát a királis felismerésben a konformációsán erősen gátolt β -MeTic analógok különleges viselkedése mutatta. Az *eritro*- és *treo*- β -MePhe, β -MeTyr és β -MeTrp esetében SP4- β -CD alkalmazásával sikeresen elválasztható a négy sztereoizomer acetát- vagy borátpuffer rendszert használva, míg az *eritro*- és *treo*- β -MeTic enantiomerjeit acetátpuffer jelenlétében sikerült elválasztani.

2. Új, közvetlen kapilláris elektroforetikus módszert dolgoztunk ki a β -alkil és aril-szubsztituált Trp analóg enantiomerek elválasztására. Összehasonlítva a β -Me-szubsztituált aminosavakkal ahol a szulfatált β -ciklodextrinek, SP2- β -CD és SP4- β -CD a legtöbb esetben sikeresen alkalmazhatók voltak a β -MePhe, β -MeTyr és β -MeTrp enantiomerek elválasztására, míg a β -MeTic esetében a β -CD-szulfát bizonyult hatásosnak addig a β -alkil és aril-szubsztituált Trp analógokra (β -2-PrTrp, β -3-PentTrp, β -PhTrp és a β -diOMePhTrp) az SP2- α -CD volt a leghatékonyabb szelektor. A vándorlást, szelektivitást és a felbontást vizsgálva optimalizáltuk az elválasztást a háttérelktrolit, a pH és az alkalmazott feszültség változtatásával.

A β -szubsztituált Trp analógokra az SP2- α -CD királis szelektorral kapott redukált vándorlási idők, szelektivitás és felbontás értékeket a háttérelktrolit pH-ja és a mintamolekula szerkezete erősen befolyásolta. Azon β -szubsztituált Trp analógok esetén, melyek β -pozícióban aromás oldallánccal rendelkeznek, nagyobb a vándorlási idő (kivéve a *treo*- β -2-PrTrp), mint az alifás oldalláncúaknál. Ugyanakkor az alifás oldalláncúaknál a szénatomszám növekedésével nő a vándorlási idő, az *eritro*- és *treo*-diasztereomereknél pedig a mintamolekula természetétől és a háttérelktrolit pH-jától függően változik. Egyes esetekben a nagyobb vándorlási idő ellenére kisebb szelektivitást és felbontást értünk el (β -3-PentTrp, β -MeTrp).

Az elválasztás hatékonyságával kapcsolatban elmondható, hogy a szelektivitás és a felbontás sokkal kisebb az SP2- β -CD szelektor esetében mindhárom puffer rendszerben, mint SP2- α -CD-t alkalmazva, ami a rosszabb illeszkedésnek és a zárványkomplex kisebb stabilitásának tudható be. Az enantiomerek vándorlási sorrendjét tiszta vagy dúsított enantiomerek racemáthoz való adagolásával határoztuk meg, amihez az egyes enantiomereket enzimatis emésztés útján nyertük. A vándorlási sorrendet vizsgálva azt találtuk, hogy az *eritro*- és *treo*-diasztereomerek különböző sorrendben vándorolnak a különböző háttérelktrolitokban. A legtöbb aminosavnál a háttérelktrolit változtatása a diasztereomerek vándorlási sorrendjének változását eredményezte, míg az enantiomerek vándorlási sorrendjére

nem volt hatással. Megállapítottuk, hogy a vándorlási sorrendre semmilyen általános érvényű szabály nem adható meg.

3. Három különböző, „újszerű” (új kötési technikával készült) természetes β -CD (**BCD**), hidroxipropil- β -CD (**HPBCD**) és permetil- β -CD (**PMBCD**) állófázison β -laktám enantiomerek elválasztására dolgoztunk ki HPLC-s módszereket. Megállapítottuk, hogy a β -laktám molekulák szerkezete, a β -laktám gyűrűhöz kapcsolt alifás és aromás részek mérete, a kettőskötés jelenléte és helyzete valamint az aromás gyűrűn lévő szubsztituensek minősége (polaritása) és helyzete mind hatással van a zárványkomplex kialakulására, és ezáltal jelentősen befolyásolja a királis felismerést.

Az elválasztást **PMBCD** oszlopon vizsgálva, először az eluens minőségi és mennyiségi összetételét optimalizáltuk. A β -laktámok szerkezetének hatását tanulmányozva az elválasztásra a **PMBCD** szelektoron a szubsztituált gyűrű méretének növekedésével nő a β -laktámok visszatartása és javul az enantioszelektivitás is, míg **BCD** és **HPBCD** állófázisok kevésbé bizonyultak hatékonyak. A **PMBCD** állófázison a kettőskötés jelenléte a kondenzált gyűrűs szerkezetű komponenseknél minden esetben javítja a felbontást és csökkenti a visszatartást. A kettőskötés jótékony hatása azonban nem jelentkezik a **HPBCD** és a **BCD** állófázisokon.

PMBCD állófázison, ha a fenilgyűrű metil- vagy halogén-csoporttal *para*-helyzetben volt szubsztituálva, akkor az az elválasztásra kedvezőtlenül hat (kivétel a **27** komponens), míg szubsztituens hiányában kiváló elválasztás érhető el. Ugyanakkor **HPBCD** és **BCD** oszlopok a *para*-helyzetben szubsztituált analógokra viszonylag jó szelektivitást mutattak (kivétel a **27** komponens), vagyis a **PMBCD** illetve **HPBCD** és natív **BCD** alapú állófázis eltérő kölcsönhatást mutat a *para*-helyzetben szubsztituált molekulákra, ez a kölcsönhatás azonban a szubsztituens méretétől is függ. A *para*-helyzetben halogénatommal szubsztituált komponenseknél megfigyelhető, hogy a retenciós idő a F, Cl, Br sorrendben növekszik mindhárom állófázison. A F, Cl, Br sorban a molekula mérete növekszik, a polaritása csökken, egyre apolárisabbá válik.

A 19 β -laktám komponensből 17-et sikeresen választottunk el a három „újszerű” β -CD alapú királis állófázison. A három állófázis közül a **PMBCD** alapú bizonyult a leghatékonyabbnak.

4. Szerkezetileg igen különböző molekulák enantiomerjeinek elválasztását a fent említett három különböző **BCD**, **HPBCD** és **PMBCD** állófázison vizsgáltuk. A szerkezetileg

igen eltérő 14 molekula jó viszonyítási alapot nyújtott az oszlopok hatékonyságának jellemzésére.

A három kumarin analógnál a retenciós faktor, a szelektivitás és a felbontás értékeket vizsgálva nem találtunk egyértelmű kapcsolatot közöttük. A **(31)** komponens esetén a legkisebb retenciónál kaptuk a legnagyobb felbontást, míg a **(29)** analóg esetén a legnagyobb retenciós faktornál adódott a legnagyobb felbontás. Ez is azt mutatja, hogy az enantiomerek elválasztása CD alapú állófázisokon igen összetett. Stabil zárványkomplex létrejötte nem mindig elégséges feltétele az enantioszelektivitásnak.

A *Dns*-aminosavak esetén az aromás *Dns* rész lehet a felelős elsődlegesen a visszatartásért. A legjobb felbontást **PMBCD** oszlopon értük el a *Dns*-Phe esetén, a *Dns*-Leu a **BCD** oszlopon igen jó felbontással volt elválasztható, míg a *Dns*-Met csak részleges elválasztást mutatott a **BCD** és a **PMBCD** oszlopokon.

A propionsav analógoknál a fenilgyűrűn elhelyezkedő szubsztituens hatását figyelhettük meg. A retenciós faktor mindhárom molekula esetén a **BCD** és **HPBCD** oszlopokon volt a legnagyobb annak ellenére, hogy a **PMBCD** szelektor rendelkezik a legnagyobb üregmérettel. A nagy visszatartás ellenére a királis megkülönböztetés azonban kevésbé hatásos a **BCD** és **HPBCD** szelektorokon. Valószínűsítettük, hogy a metil szubsztituált analóg metilcsoportja a **PMBCD** királis állófázis metilezett peremével hidrofób kölcsönhatást alakíthat ki javítva a szelektivitást. A három propionsav analóg közül valószínűleg a trikloro-szubsztituált analóg illeszkedik legjobban a **PMBCD** királis szelektor üregébe, stabilis komplexet és nagy R_S értéket eredményezve, míg a **BCD** és a **HPBCD** szelektorok esetén a nagy retenciós faktor ellenére sem értünk el jó elválasztást.

A tropánsav és a terbutalin alifás illetve aromás hidroxilcsoporttal rendelkezik, amelyen keresztül H-hidas kölcsönhatást indukál a CD peremén elhelyezkedő szabad hidroxilcsoportokkal. A kromatográfias körülmények optimalizálásával a **HPBCD** oszlop bizonyult a leghatékonyabbnak valószínűleg a CD peremén és a tropánsav illetve terbutalin molekulákon lévő hidroxilcsoportok H-hidas kölcsönhatása révén.

A perimetrinsav enantiomerek aromás gyűrű hiányában más mechanizmus szerint válhatnak el β -CD-alapú királis állófázisokon. A ciklopropil gyűrű túl kicsi ahhoz, hogy szorosan illeszkedjen a CD üregébe, ennek ellenére **PMBCD** oszlopon viszonylag nagy R_S értéket kaptunk mind a *cisz*- és mind a *transz*-perimetrinsavra. Ez az eredmény alátámasztja azt a felvetést, amit már korábban említettünk a propionsavak esetében: a királis elválasztásban fontos szerepet játszanak a CD peremén elhelyezkedő szubsztituensek, amelyek kölcsönhatásba lépnek az enantiomerekkel.

A 14 vizsgált komponensből **BCD** oszlopon kettő, **HPBCD** oszlopon négy és **PMBCD** oszlopon kilenc esetben sikerült alapvonal elválasztást elérnünk. A visszatartás, a legtöbb esetben a **BCD** és a **HPBCD** oszlopon volt a legnagyobb.

Megállapítottuk, hogy a molekula és az állófázis kémiai szerkezete megszabja a lehetséges kölcsönhatások milyenségét és mértékét, így a molekulaszervezet ismeretében javaslatot tehetünk a megfelelő állófázis kiválasztására. Az általunk vizsgált három különböző királis állófázis jól kiegészíti egymást. Ha az egyik állófázison legalább részleges elválasztást sikerült elérni, minden valószínűség szerint a másik két állófázis valamelyikével az elválasztás sikeresnek bizonyulhat. A három állófázison az elválasztás mechanizmusa is eltérhet, amit az eltérő elúciós sorrendek alátámasztanak.

7. Summary

New chiral capillary electrophoretic and liquid chromatographic methods were developed for the separation of different biologically and pharmaceutically important molecules. During the capillary zone electrophoresis and direct chiral HPLC enantioseparations the effect of different separation conditions such as the pH, nature and concentration of chiral additives in CE, nature and concentration of mobile phase compositions, structure of analytes, temperature, *etc.* were examined on the chiral discrimination processes.

1. β -Methyl-substituted amino acid enantiomers were separated with CE technique. α -CD, SP2- α -CD, SP2- β -CD, SP4- β -CD and β -CD-sulfate were used as chiral selectors. The pH dependence of enantioseparation with application of SP2- α -CD showed that the migration time first was decreased with increasing pH than it was increased. However, the selectivity and resolution continuously decreased with increasing pH (exceptions were *threo*- β -MeTyr and *threo*- β -MeTic in borate buffer). This can be explained that the protonation of amino acids and complexation strongly depend on the pH. Besides the pH of background electrolyte (BGE) the separations strongly depend on the structure of analytes. The retention of molecules possessing two ring systems was much greater than the molecules having one ring system. Molecules possessing two rings had probably fit better in the cavity of SP2- α -CD, however, despite the higher migration time the α and R_s values of the β -MeTic were much lower than the β -MePhe, β -MeTyr or β -MeTrp. The structure of enantiomers of both *erythro*- and *threo*- β -MeTic are very constrained conformationally; the complex stabilities of the two enantiomers of *threo*- β -MeTic may be very similar, resulting in no or very poor separation.

In the case of measurements carried out in the presence of SP2- β -CD and SP4- β -CD it can be seen that the migration times in most cases increased when SP4- β -CD was applied (exceptions were *erythro*- β -MeTyr and *erythro*- β -MeTrp in borate buffer, *erythro*- β -MeTic in acetate buffer, and *threo*- β -MeTrp in acetate and phosphate buffers). Comparing the data with the SP2- β -CD and SP4- β -CD selectors, the α and R_s values in most cases were larger on SP4- β -CD, and especially high resolutions were obtained for the β -MeTic analogs. However, these higher resolutions did not reach the R_s values obtained with the SP2- α -CD selector, indicating the better fit of these amino acids in the SP2- α -CD cavity (exceptions were the *threo*- β -MeTyr and *erythro*- and *threo*- β -MeTic enantiomers). The special behavior of conformationally very

constrained β -MeTic enantiomers during the CE separation with the application of CDs indicates the importance of steric effects in chiral discrimination. In the case of a mixture of *erythro*- and *threo*- β -MePhe, β -MeTyr and β -MeTrp, all four stereoisomers were baseline resolved on the application of SP4- β -CD in acetate or borate buffers, while the *erythro*- and *threo*- β -MeTic enantiomers could be separated by the application of β -CD-sulfate in the presence of acetate buffer.

2. New CE methods were developed for the direct enantioseparation of various β -alkyl or aryl-substituted Trp analogues. Comparing with β -Me-substituted Trp analogues where sulfated β -CDs such as SP2- β -CD és SP4- β -CD were the most useful selectors for the enantioseparation of β -MePhe, β -MeTyr and β -MeTrp while for β -MeTic the β -CD-sulfate seemed to be most applicable, however for β -alkyl or aryl-substituted Trp analogues (β -2-PrTrp, β -3-PentTrp, β -PhTrp and β -diMeOPhTrp) the SP2- α -CD was the most useful. For optimization of migration time, selectivity and resolution the nature of BGE, pH and applied voltage were varied.

Separation data, such as migration times, selectivity and resolution of the enantiomers of β -substituted Trp analogues applying SP2- α -CD as chiral selector strongly depend on the pH value of BGE and the structures of the analytes. Amino acids with aromatic side-chain in β -position usually are retained more strongly than those with aliphatic side-chain (except *threo*- β -2-PrTrp). It was also observed that migration times increase for the amino acids with the aliphatic side chains possessing higher carbon number and migration times of *erythro*- and *threo*-diastereomers depend on the nature of analyte and the pH of BGE. However, in spite of the higher migration times, in some cases lower selectivity and resolution were observed (β -3-PentTrp, β -MeTrp).

As concerns the separation efficiency, separation factor and resolution in all three buffer systems were much lower applying SP2- β -CD selector than for SP2- α -CD. Probably this was due to the worse fitting and the lower stability of the complex applying SP2- β -CD selector. The migration order of β -substituted Trp analogues was checked by spiking with authentic enantiomers obtained from enzymatic digestion. It is interesting to note that the sequence of elution of the *erythro*- and *threo*-diastereomers depends on the nature of amino acids and background electrolytes. The change of BGE in most cases resulted in the change of the order of migration of the diastereomers, while the migration order of the enantiomers remained the same. For the elution sequence no general rule could be established.

3. New HPLC methods were developed for the separation of β -lactam enantiomers on three different „novel” columns (prepared by new bonding technique) such as **BCD**, **HPBCD** and **PMBCD**. It was established that the structure of β -lactam molecules, the size of the aliphatic and aromatic groups attached to the β -lactam ring, the presence and position of double bonds in the attached rings and the nature (polarity) and position of substituents on the attached aromatic rings all influenced the formation of inclusion complex with substituted β -CDs thereby significantly affect the chiral recognition.

On the three CSPs the effect of structure of β -lactams showed that an increase in size of the attached ring resulted in longer retention times and enhanced enantioselectivity on the **PMBCD** CSP, while **BCD** and **HPBCD** CSPs proved to be less effective. On the **PMBCD** column the presence of a double bond in the attached ring resulted in all cases in lower retention time and in higher resolution. The beneficial effect of the double bond on the **BCD** and the **HPBCD** CSPs was not detected.

On the **PMBCD**-bonded column excellent chiral separation was obtained for the unsubstituted phenylazetidinone (**22**), while the enantiomers of analytes containing methyl or halogen substituent in „*para*” position on aromatic ring were not separated [only *p*-fluorophenylazetidinone (**27**) was partially resolved on this CSP]. The unresolved compounds (**23**, **26** and **28**) however, were at least partially separated on the **HPBCD** and on the **BCD** CSPs. The **PMBCD** column showed different interaction for „*para*” substituted molecules than the **HPBCD** and **BCD** CSPs, however this interaction depends on the size of the substituent. For the halogen-substituted analogs possessing halogen atoms in „*para*” position the retention times increased in the sequence F, Cl, Br on each of the tested cyclodextrin-bonded CSPs. In the sequence of F, Cl, Br the size of the molecule is increasing, the polarity is decreasing and the analyte containing F, Cl and Br atoms are getting more and more apolar.

Enantioseparation was achieved for 17 of the 19 β -lactams on three novel cyclodextrin-based CSPs. The **PMBCD** selector proved to be the most effective among the three CSPs. In summary, it can be stated that the investigated three novel stationary phases have complementary capabilities to separate β -lactam enantiomers.

4. Methods were developed for the enantioseparation of structurally very divergent analytes on three different „novel” columns (mentioned above) such as on native **BCD**, **HPBCD** and **PMBCD**. The 14 structurally different molecules provide a good benchmark for the characterization of the efficiency of the three different CSPs.

In the case of three coumarin analogs no obvious relationships were found between retention (k), selectivity (α) and resolution (R_S). For example, in case of component (**31**) the best separation was achieved at the shortest retention time on **PMBCD** column, while in case of component (**29**) the largest resolution was obtained when k was the largest. This phenomenon shows the complexity of the enantiomeric separation on CD-bonded stationary phases, *i.e.* strong inclusion interaction is not always sufficient for the desired enantioselectivity.

For *Dns*-amino acids it seems that the *Dns*-core of analytes determines the separation. The best resolutions were achieved on the **PMBCD** CSP for *Dns*-Phe and on the **BCD** CSP for *Dns*-Leu while *Dns*-Met exhibited partial resolution only on **BCD** and **PMBCD** CSPs.

The effect of the nature of the substituent on the phenyl ring of the propionic acid analogs was observed. The retention factors of all three propionic acid analogs were largest on **BCD** and **HPBCD** columns in spite of the fact that **PMBCD** possess the largest cavity for inclusion complexation. Despite of the large retentions observed on the on **BCD** and **HPBCD** columns the chiral recognition was less effective on these selectors. It was observed that methyl group of the methyl-substituted propionic acid analog may interact with the methyl group of permethylated- β -CD hereby improving the selectivity. The large R_S value obtained for the three-chloro substituted analog probably was due to the better fit of the molecule in the cavity of permethylated- β -CD.

Tropic acid and terbutaline possess an extra aliphatic or aromatic hydroxyl groups which may induce H-bond interaction between the analyte and the free hydroxyl group on the rim of the β -CD. At optimized chromatographic conditions for both analytes **HPBCD** CSP proved to be the best due to the possible H-bond interaction between the hydroxyl groups of the rim and analytes.

The lack of the aromatic ring in permethrine acid shed light to the different separation mechanism on β -CD-based CSPs. The cyclopropyl-ring is too small to fit inside the cavity of β -CD, however large R_S values for *cis* and *trans* enantiomers of permethrine acid on **PMBCD** was achieved. These results support the importance of interactions on the rim of substituted β -CD with the groups of chiral analytes, as it was stated in the case of separation of propionic acid analogs.

Of the 14 tested components on **BCD** column two, on **HPBCD** column four and on **PMBCD** column in nine cases we managed to reach the baseline separation. In most cases the retention was largest on **BCD** and on **HPBCD** column.

We found that the molecular and chemical structure of the stationary phase and analytes determined the main possible interactions hereby helping the choice of the suitable selector. The three different chiral stationary phases were complement to each other, *e.g.* if one of the stationary phase ensured at least partial separation, it is likely that the separation on one of the two other stationary phases may be successful. On consequence the separation mechanism on the three-stationary phases probably are different, which was supported by the different elution sequences determined for some analytes.

8. Hivatkozások

- [1] FDA policy statements for the development of new stereoisomeric drugs, Rockville, MD, FDA, (1992).
- [2] CDNEWS, Cyclolab Ltd, H-1525, Budapest, P.O.B. 435, Budapest, Hungary
- [3] D. W. Armstrong, W. DeMond, *J. Chromatogr. Sci.*, 22 (1984) 411.
- [4] D. W. Armstrong, A. Alak, W. DeMond, W. L. Hinze, T. E. Riehl, *J. Liq. Chromatogr.*, 8 (1985) 261.
- [5] D. W. Armstrong, W. DeMond, B. P. Czech, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 481.
- [6] D. W. Armstrong, T. J. Ward, R. D. Armstrong, T. E. Beesley, *Science*, 232 (1986) 1132.
- [7] C. A. Chang, Q. Wu, *Anal. Chem. Acta*, 189 (1986) 293.
- [8] F. Bressolle, M. Audran, T.N. Pham, J.J. Vallon, *J. Chromatogr. B*, 687 (1996) 303.
- [9] C. R. Mitchell, D. W. Armstrong, *Chiral Separations*, szerk. G. Gurbitz, M. G. Schmid, Vol. 243, Humana Press, Totowa, NJ, 2004, p. 61.
- [10] M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.*, 98 (1998) 1875.
- [11] D. W. Armstrong, L. W. Chang, S. C. Chang, X. Wang, H. Ibrahim, G. R. Reid, T. Beesley, *J. Liq. Chromatogr.*, 20 (1997) 3279.
- [12] S. C. Chang, G. L. Reid, III, S. Chen, C. D. Chang, D. W. Armstrong, *Trends Anal. Chem.*, 12 (1993) 144.
- [13] D. W. Armstrong, S. Chen, C. Chang, S. Chang, *J. Liq. Chromatogr.*, 15 (1992) 545.
- [14] K. Fujimura, T. Veda, T. Ando, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 446.
- [15] Y. Kawaguchi, M. Tanaka, M. Nakae, K. Funazo, T. Shono, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1852.
- [16] W. L. Hinze, T. E. Riehl, D. W. Armstrong, W. DeMond, A. Alak, T. J. Ward, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 237.
- [17] D. W. Armstrong, W. DeMond, A. Alak, W. L. Hinze, T. E. Riehl, K. Bui, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 234.
- [18] J. S. Mc Clanahan, J. H. Maguire, *J. Chromatogr.*, 381 (1986) 438.
- [19] S. L. Abidi, *J. Chromatogr.*, 404 (1987) 133.
- [20] R. D. Armstrong, T. J. Ward, N. Pattabiraman, C. Benz, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr.*, 414 (1987) 192.
- [21] J. Florance, A. Galdes, Z. Kontreatis, Z. Kosarych, K. Langer, C. Martucci, *J. Chromatogr.*, 414 (1987) 313.

- [22] P. MaCaudiere, M. Caude, R. Rosset, A. Tambute, *J. Chromatogr.*, 405 (1987) 135.
- [23] J. H. Maguire, *J. Chromatogr.*, 387 (1987) 453.
- [24] D. W. Armstrong, S. M. Han, Y. I. Han, *Anal. Chem. Acta*, 208 (1988) 275.
- [25] S. M. Han, Y. I. Han, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr.*, 441 (1988) 376.
- [26] A. M. Krstulovic, J. M. Gianviti, J. T. Burke, B. Mompon, *J. Chromatogr.*, 426 (1988) 417.
- [27] I. M. Merino, E. B. Gonzalez, A. Sanz-Medel, *Anal. Chem. Acta*, 234 (1988) 127.
- [28] J. I. Seeman, H. V. Secor, D. W. Armstrong, K. D. Timmons, T. J. Ward, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 2120.
- [29] F. C. Marziani, W. R. Sisco, *J. Chromatogr.*, 465 (1989) 422.
- [30] C. Bertucci, E. Domenici, G. Uccello-Barretta, P. Salvadori, *J. Chromatogr.*, 506 (1990) 617.
- [31] A. Italia, M. Schiavi, P. Ventura, *J. Chromatogr.*, 503 (1990) 266.
- [32] J. Florance, Z. Kontetis, *J. Chromatogr.*, 543 (1991) 299.
- [33] M. Krause, R. Galensa, *J. Chromatogr.*, 588 (1991) 41.
- [34] S. Li, W. C. Purdy, *J. Chromatogr.*, 543 (1991) 105.
- [35] D. W. Armstrong, S. Chen, C. Chang, S. Chang, *J. Liq. Chromatogr.*, 15 (1992) 545.
- [36] P. H. Kuijpers, T. K. Gerding, G. J. deJong, *J. Chromatogr.*, 625 (1992) 223.
- [37] J. Zukowski, M. Pawlowska, M. Nagatkina, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr.*, 629 (1993) 169.
- [38] D. S. Risley, M. A. Strege, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1736.
- [39] D. W. Armstrong, X. Yang, S. M. Han, R. A. Menges, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2594.
- [40] D. W. Armstrong, J. Zukowski, *J. Chromatogr. A*, 666 (1994) 445.
- [41] C. A. Chang, Q. Wu, *J. Liq. Chromatogr.*, 10 (1987) 1359.
- [42] A. M. Stalcup, H. L. Jin, D. W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.*, 13 (1990) 473.
- [43] S. C. Change, G. L. Reid, S. Chen, C. C. Chang, D. W. Armstrong, *Trends Anal. Chem.*, 12 (1993) 144.
- [44] A. M. Stalcup, J. R. Faulkner, Y. Tang, D. W. Armstrong, L. W. Levy, E. Regalado, *Biomed. Chromatogr.*, 5 (1991) 3.
- [45] D. W. Armstrong, L. W. Chang, S. C. Chang, X. Wang, H. Ibrahim, G. R. Reid, III & T. E. Beesley, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 20 (1997) 3279.
- [46] C. R. Mitchell, M. Desai, R. McCulla, W. Jenks, D. W. Armstrong, *Chromatographia*, 56 (2002) 127.

- [47] C. R. Mitchell, D. S. Schumacher, R. V. Rozhkov, R. C. Larock, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr. A.*, 1011 (2003) 37.
- [48] D. W. Armstrong, X. Wang, L. W. Chang, H. Ibrahim, C. R. Reid, T. E. Beesley, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 20 (1997) 3297.
- [49] S. C. Chang, L. R. Wang, D. W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.*, 15 (1992) 1411.
- [50] D. W. Armstrong, A. M. Stalcup, M. L. Hilton, J. D. Duncan, J. R. Faulkner, S. C. Chang, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 1610.
- [51] D. W. Armstrong, M. Hilton, L. Coffin, *LC GC*, 9 (1991) 646.
- [52] A. M. Stalcup, S. C. Chang, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr.*, 540 (1991) 113.
- [53] D. W. Armstrong, C. D. Chang, S. H. Lee, *J. Chromatogr.*, 539 (1991) 83.
- [54] D. S. Richards, S. M. Davidson, R. M. Holt, *J. Chromatogr. A*, 746 (1996) 9.
- [55] D. W. Armstrong, G. L. Reid, III., M. L. Hilton, C. D. Chang, *Environ. Pollution*, 79 (1993) 51.
- [56] M. Pawlowska, S. Chen, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr.*, 641 (1993) 257.
- [57] A. Berthod, S. C. Chang, D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 395.
- [58] R. E. Boehm, D. E. Martire, D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 522.
- [59] W. L. Hinze, *Separation Purification Methods*, 10 (1981) 159.
- [60] G. L. Bertrand, J. R. Faulkner, S. M. Han, D. W. Armstrong, *J. Phys. Chem.*, 93 (1989) 6863.
- [61] Q. Yang, K. Hidajat, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr. Sci.*, 35 (1997) 358.
- [62] K.D. Altria, *J. Chromatogr. A*, 856 (1999) 443.
- [63] J.S. Fritz, *J. Chromatogr. A*, 884 (2000) 261.
- [64] S.N. Krylov, N.J. Dovichi, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 111R.
- [65] J. Snopek, I. Jelinek, E. Smolkova-Keulemansova, *J. Chromatogr.*, 438 (1988) 211.
- [66] B. Chankvetadze, G. Endresz, G. Blaschke, *J. Chromatogr. A*, 700 (1995) 43.
- [67] M. Yoshinaga, M. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 679 (1994) 359.
- [68] A. B. Bergholdt, K. W. Jørgensen, L. Wendel, S. V. Lehmann, *J. Chromatography A*, 875 (2000) 403.
- [69] A.M. Stalcup, K.H. Gahm, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1360.
- [70] K.H. Gahm, A.M. Stalcup, *Chirality*, 8 (1996) 316.
- [71] M. Fillet, I. Bechet, G. Schomburg, P. Hubert, J. Crommen, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 19 (1996) 669.
- [72] M. Fillet, P. Hubert, J. Crommen, *Electrophoresis*, 18 (1997) 1013.
- [73] K. Verleysen, S. Sabah, G. Scriba, A. Chen, P. Sandra, *J. Chromatogr. A*, 824 (1998) 91.

- [74] K. Verleysen, P. Sandra, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 22 (1999) 33.
- [75] J.R. Mazzeo, I.S. Krull, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 2852.
- [76] K.D. Altria, M.A. Kelly, B.J. Clark, *Chromatographia*, 43 (1996) 153.
- [77] M. C. Vescina, A. M. Fermier, Y. Guo, *J. Chromatogr. A*, 973 (2002) 187.
- [78] P. Wang, J. Ren, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34 (2004) 277.
- [79] S.S. Zhang, H.X. Liu, Y. Chen, Z.B. Yuan, *Biomed. Chromatogr.*, 10 (1996) 256.
- [80] S.E. Geldart, P.R. Brown, *J. Chromatogr. A*, 831 (1999) 123.
- [81] T. Wessel, C. Lanvers, S. Freund, G. Hempel, *J. Chromatogr. A*, 894 (2000) 157.
- [82] M.K. Grob, K. O'Brien, J.J. Chu, D.D.Y. Chen, *J. Chromatogr. B*, 788 (2003) 103.
- [83] K. D. Altria, P. Harkin, M. G. Hindson, *J. Chromatogr. B*, 686 (1996) 103.
- [84] K. D. Altria, R. C. Harden, M. Hart, J. Hevizi, P. A. Hailey, J. V. Makwana, M. J. Portsmouth, *J. Chromatogr.*, 641 (1993) 147.
- [85] M. Fillet, I. Bechet, P. Hubert, J. Crommen, *J. Chromatogr. Biomed. Anal.*, 14 (1996) 1107.
- [86] K-H. Garm, A. M. Stalcup, *Chirality S*, (1996) 316.
- [87] F. Cramer, H. Hettler, *Naturwissenschaften*, 54 (1967) 625.
- [88] S. A. C. Wren, R. C. Rowe, R. S. Payne, *Electrophoresis*, 15 (1994) 774.
- [89] C. Palomo, J.M. Aizpurua, I. Ganboa, M. Oiarbide, *Synlett*, 12 (2001) 1813.
- [90] C. Palomo, I. Ganboa, M. Oiarbide, G.T. Sciano, J.L. Miranda, *Arkivoc*, 5 (2002) 8.
- [91] H.H. Wasserman, H. Matsuyama, R.P. Robinson, *Tetrahedron*, 58 (2002) 7177.
- [92] R.N. Patel, J. Howell, R. Chidambaram, S. Benoit, J. Kant, *Tetrahedron Asymmetry*, 14 (2003) 3673.
- [93] E. Forro, F. Fulop, *Mini Rev Org Chem*, (2004) 93.
- [94] F. Fulop, *Chem Rev*, 101 (2001) 2181.
- [95] C.M. Drey, *szerk. B. Weinstein*, 1977, 241.
- [96] A. Lombardi, M. Saviano, F. Nastri, O. Maglio, M. Mazzeo, C. Isernia, L. Paolillo, V. Pavone, *Biopolymers*, 38 (1996), 693.
- [97] S. Gratz, A. M. Stalcup, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 5166.
- [98] S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 875 (2000) 89.
- [99] M.D. Egger, Y. Liu, J. Sevcik, E. Tesarova, R. Rozhkov, R.C. Larock, D.W. Armstrong, *Electrophoresis*, 25 (2003) 2650.
- [100] A. Lantz, R. V. Rozhkov, R. C. Larock, D. W. Armstrong, *Electrophoresis*, 25 (2004) 2727.
- [101] S. Birnbaum, S. Nilsson, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2872.

- [102] S. Terabe, Y. Miyashita, Y. Ishihama, O. Shibata, *J. Chromatogr.*, 636 (1993) 47.
- [103] S. Fanali, *J. Chromatogr.*, 545 (1991) 437.
- [104] P. Sun, C. Wang, A. Peter, E. Forro, D. W. Armstrong, *J Liq Chromatogr Rel Technol*, 29 (2006) 1847.
- [105] A. K. Connors, *J Pharm Sci*, 84 (1995) 843.
- [106] S. A. C. Wren, R. C. Rowe, *J. Chromatogr.*, 603 (1992) 235.

9. Közlemények listája

9.1. Az értekezés alapját képező közlemények

1. István Ilisz, **Gábor Fodor**, Róbert Iványi, Lajos Sente, Géza Tóth, Antal Péter
Enantioseparation of β -methyl substituted amino acids with cyclodextrins by capillary zone electrophoresis
J. Chromatogr. B, 875 (2008) 273-279. **Impakt faktor: 2,500**
 2. István Ilisz, **Gábor Fodor**, Róbert Berkecz, Róbert Iványi, Lajos Sente, Antal Péter;
Enantioseparation of β -substituted tryptophan analogues with modified cyclodextrins by capillary zone electrophoresis
J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 3360-3365. **Impakt faktor: 4,101**
 3. **Gábor Fodor**, István Ilisz, Júlianna Szemán, Róbert Iványi, Lajos Sente, Gábor Varga, E. Forró, Ferenc Fülöp, Antal Péter
HPLC Enantioseparation of β -Lactam Stereoisomers Using β -Cyclodextrin-Based Chiral Stationary Phases
Chromatographia 71 (2010) S29-S34. **Impakt faktor: 1,075**
 4. Gábor Varga, **Gábor Fodor**, István Ilisz, Júlianna Szemán, Júlia Visy, Lajos Sente, Antal Péter,
Comparison of Separation Performances of Novel β -Cyclodextrin-Based Chiral Stationary Phases in High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparation
J. Pharm. Biomed. Anal. 70 (2012) 71-76. **Impakt faktor: 2,976**
- Összes impakt faktor: 10,652**

9.2. *Poszterek*

- 2007 István Ilisz, **Gábor Fodor**, Róbert Iványi, Géza Tóth, Antal Péter
Enantioseparation of β -methyl substituted amino acids with cyclodextrins by capillary zone electrophoresis
31st International Symposium on High Performance Liquid Phase separations and related techniques, june 17-21, Gent, Belgium, 2007
- 2009 **Gábor Fodor**, István Ilisz, Júlianna Szemán, Róbert Iványi, Lajos Szente, Gábor Varga, Enikő Forró, Ferenc Fülöp, Antal. Péter
HPLC Enantioseparation of β -Lactam Stereoisomers Using Cyclodextrins-Based Chiral Stationary Phase
8th Balaton Symposium on High Performance Separation Methods, 2-4. September, Siófok, Hungary, 2009
- 2011 István Ilisz, **Gábor Fodor**, Zoltán Pataj, István Szatmári, Ferenc Fülöp, Lajos Szente, Antal Péter
Capillary Electrophoretic Enantioseparation of Aminonaphthol Analogs
36th International Symposium on High performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 19-23 June, Budapest, Hungary, 2011
- 2011 Julianna Szemán, Júlia Visy, Éva Jámbor, **Gábor Fodor**, Róbert Ohmacht, Gábor Varga
Cyclodextrin Based Cation-Exchanger Chiral Columns
36th International Symposium on High performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 19-23 June, Budapest, Hungary, 2011

10. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm Péter Antal egyetemi tanárnak, hogy mind szakmailag mind emberileg segítette és irányította munkámat. Köszönöm, hogy bármikor fordulhattam hozzá segítségért és fáradságot nem ismerve mindig rendelkezésemre állt.

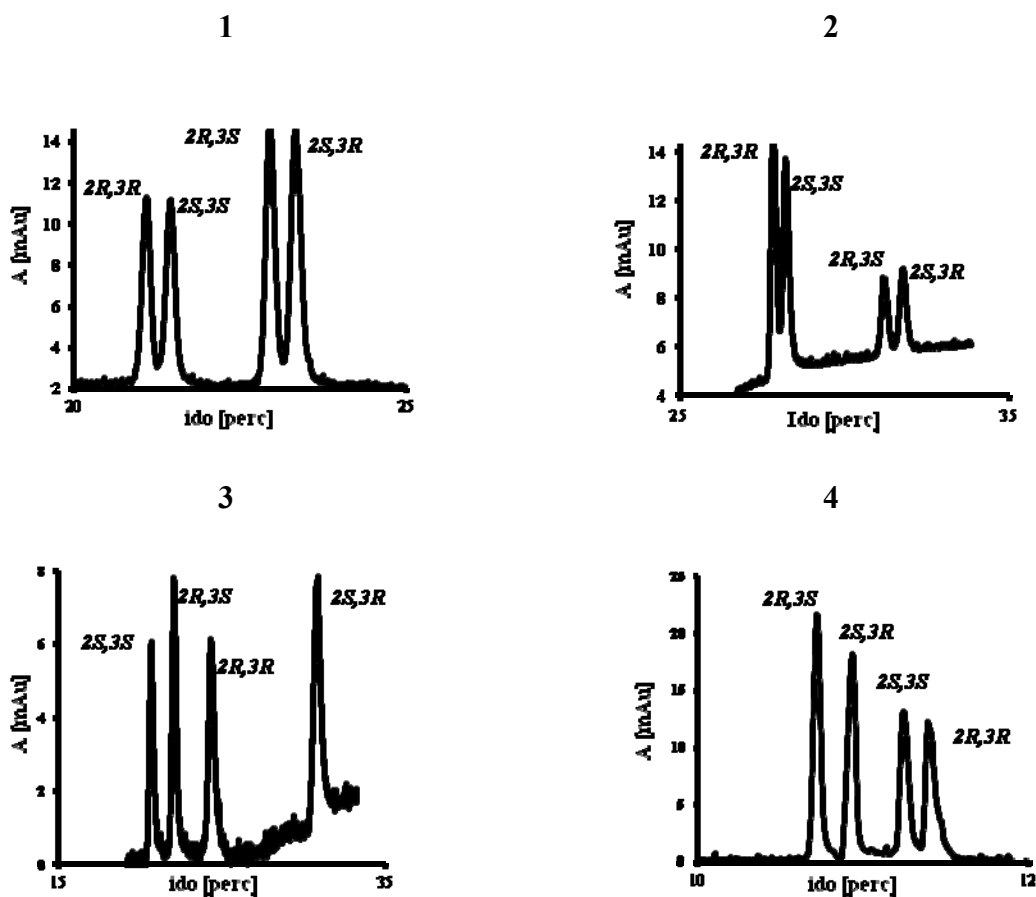
Ezúton szeretném megköszönni Dr. Ilisz Istvánnak a munkámhoz nyújtott szakmai és baráti segítségét.

Köszönettel tartozom Prof. Fülöp Ferenc akadémikusnak, hogy szakmai támogatásával segítette a doktori munkámat.

Legvégül, de nem utolsó sorban édesanyámnak, édesapámnak és nővéremnek szeretném kifejezeni hálámat és csodálatomat, hogy erejük felett segítettek és támogattak, hogy ez a dolgozat elkészüljön. Köszönöm.

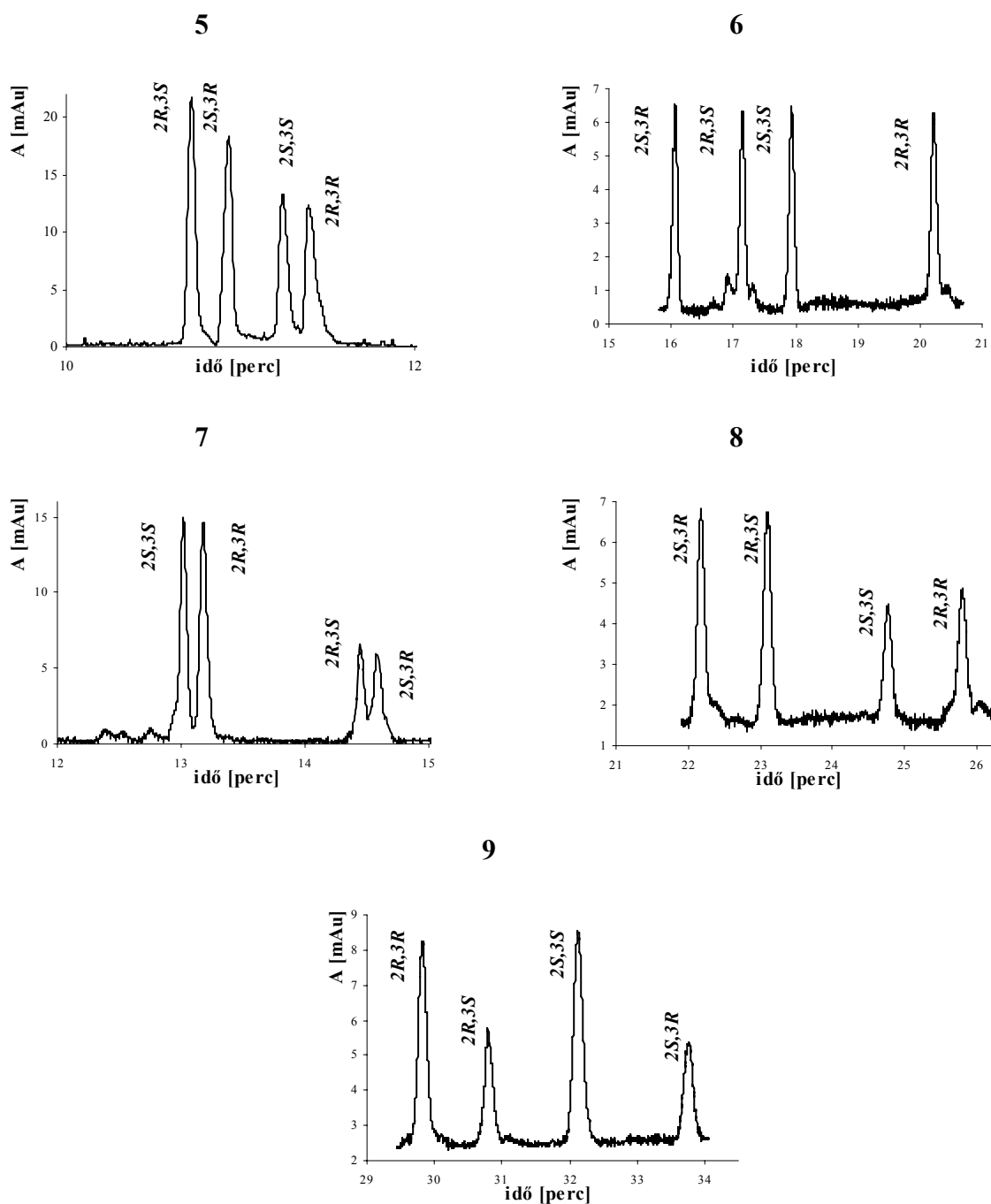
11. Elektroferogramok és kromatogramok

11.1. Több kiralitás centrummal rendelkező β -Me-szubsztituált aminosavak elektroferogramjai



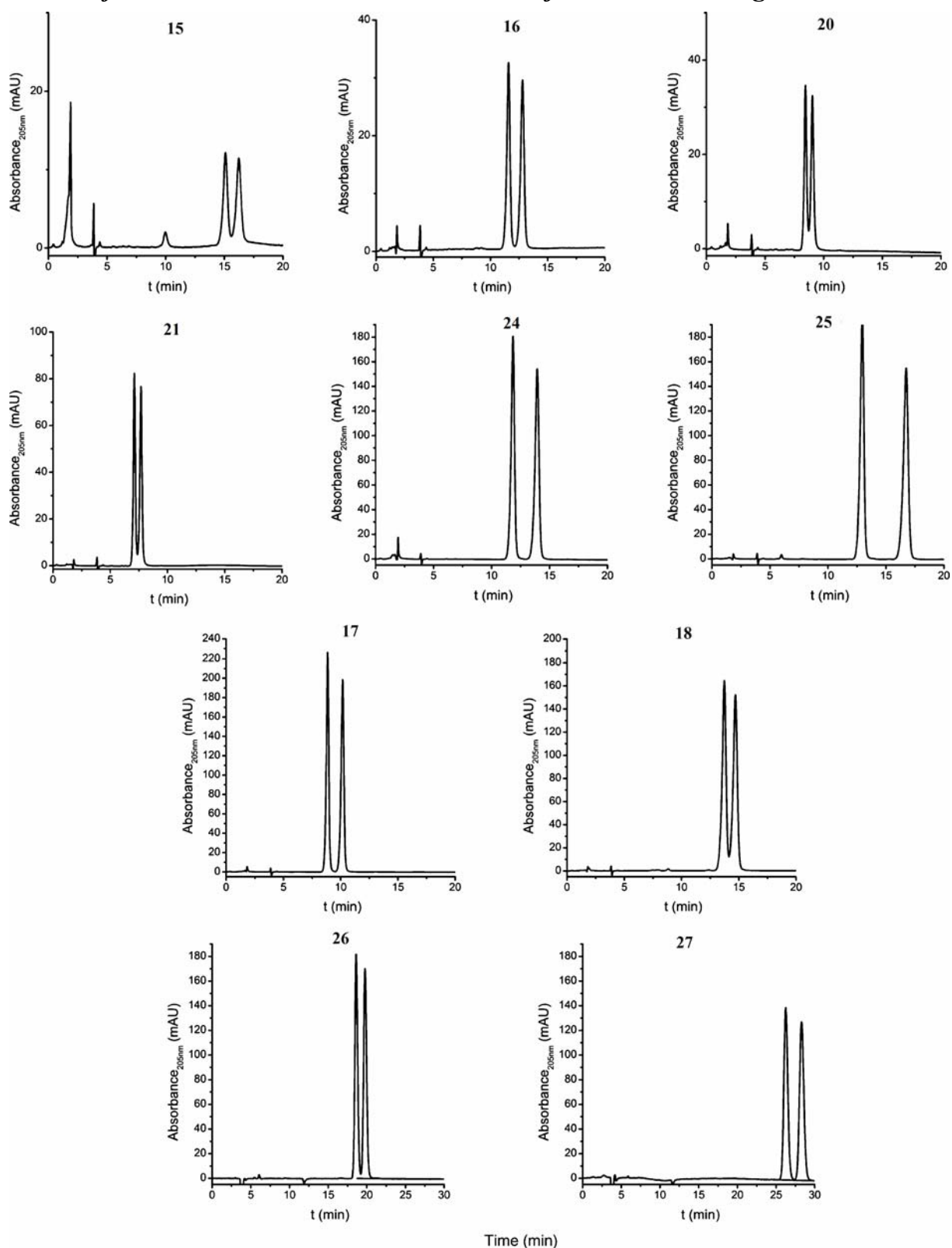
Háttéreléktrólit: (1, 2 és 3) 15 mM acetátpuffer (pH 4,75), (4) 75 mM borátpuffer (pH 9,0); alkalmazott feszültség 20 kV; detektálási hullámhossz 210 nm.

11.2. Több kiralitás centrummal rendelkező β -szubsztituált Trp analógok elektroferogramjai



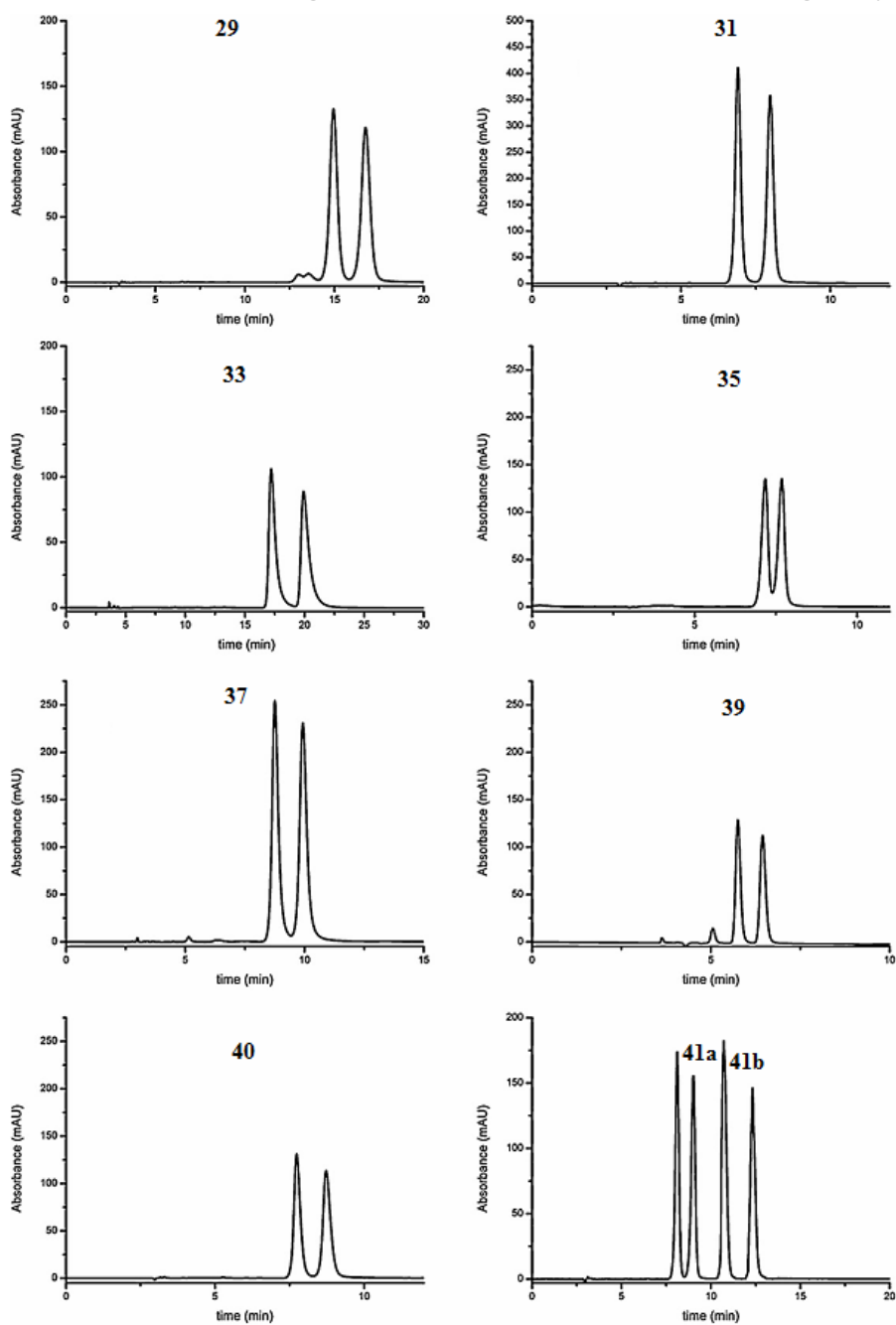
Királis szelektor, (5) 25 mM SP4- β -CD, (6–9) 50 mM SP2- α -CD; Háttélektrolit, (5 és 7) 75 mM borátpuffer (pH 9,00), (6, 8 és 9) 15 mM acetátpuffer (pH 4,75); alkalmazott feszültség, 20 kV; detektálási hullámhossz 210 nm.

11.3. A β -laktám enantiomerek elválasztását jellemző kromatogramok



Oszlop, PMBCD, **15**, **16**, **20**, **21**, **24**, **25**, BCD, **17**, **18** és HPBCD, **26**, **27**; eluens, 0,1% TEAA (pH 5,0)/MeCN = 90/10 (v/v); áramlási sebesség: 0,7 mL perc⁻¹; detektálási hullámhossz: 205 nm; Hőmérséklet, 25 °C

11.4. A szerkezetileg különböző molekulák kromatogramjai



Oszlop, PMBCD, **29, 31, 35, 37, 40, 41a, 41b**; BCD, **33**; HPBCD, **39**; eluens, 0,1% TEAF (pH 3,5)/MeOH = 66/34 (v/v) **29, 31, 39**, 0,1% TEAF (pH 3,5)/MeOH = 77/23 (v/v), **35, 37**, 0,1% TEAF (pH 3,5)/MeOH = 74/26 (v/v) **33**, 0,1% TEAF (pH 3,5)/MeOH = 90/10 (v/v) **40**, 0,1% TEAF (pH 3,5)/MeOH = 67/33 (v/v) **41a, 41b**; detektálási hullámhossz, 210 nm; áramlási sebesség, 0,8 mL perc⁻¹; hőmérséklet, szobahőmérséklet