

NEM TERMÉSZETES  $\beta$ -AMINOSAV ENANTIOMEREK  
NAGYHATÉKONYSÁGÚ  
FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS ELVÁLASZTÁSA  
KIRÁLIS ÁLLÓFÁZISOKON

PhD értekezés tézisei

Sipos László

Témavezetők:

Prof. Dr. Fülöp Ferenc, tanszékvezető egyetemi tanár

Prof. Dr. Péter Antal, egyetemi tanár



Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerkémiai Intézet  
2013

**Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

**Gyógyszerkémia, Gyógyszerkutatás Ph.D program**

**Programvezető: Prof. Dr. Fülöp Ferenc**

**Gyógyszerkémiai Intézet**

**Témavezetők: Prof. Dr. Fülöp Ferenc**

**Prof. Dr. Péter Antal**

**Sipos László**

**Nem természetes  $\beta$ -aminosav enantiomerek nagyhatékonyságú  
folyadékromatográfiás elválasztása királis állófázisokon**

**Szigorlati Bizottság:**

Elnök: Prof. Dr. Dombi György

Tagok: Dr. Martinek Tamás

Dr. Szabó Pál

**Bírálati bizottság:**

Elnök: Prof. Dr. Dombi György

Bírálatok: Prof. Dr. Báthori Mária

Prof. Dr. Molnár Péter

Tagok: Dr. Fülöp Livia

Dr. Sztojkov-Ivanov Anita

## BEVEZETÉS

A kiralitás jelentősége a gyógyszer-, élelmiszer-, növényvédőszer-iparban évről-évre növekszik. A szintézis-módszerek fejlődésével az enantiomer-molekulák előállítása egyre jelentősebb, új szintézisutak kidolgozásával napjainkban elérhető közelségbe került a királis gyógyszer-molekulák enantiomertiszta formában történő előállítása és az ellenőrzéshez szükséges analitikai módszerek fejlesztése. Következésképpen a kiralitás ma a gyógyszeripar egyik legfontosabb területe mind a kutatás mind a gyártás szempontjából.

A létfontosságú molekulák többsége az élő szervezetben királis, mint az aminosavak, cukrok, fehérjék és nukleinsavak. Ezen királis biomolekulák érdekessége, hogy általában a két lehetséges enantiomer közül, csak az egyik fordul elő a természetben.

Az enantiomerek fizikai és kémiai tulajdonságai megegyeznek, ezért a megkülönböztetésük a múltban nem volt könnyű. Az enantiomerek megkülönböztetéséhez királis környezetre van szükség. A királis elválasztást két módszerrel valósíthatjuk meg a kromatográfiában; az közvetett és a közvetlen módszerekkel. Ezen munka során a közvetlen módszert alkalmaztuk, amelyet királis állófázisok (KÁF) használatával értünk el.

A  $\beta$ -aminosavak összetettebb szerkezetükből adódóan sokkal változatosabb molekulák, mint az  $\alpha$ -aminosavak, ezért kutatásukra nagyobb figyelmet fordítottak az utóbbi években. Egyedülálló biológiai, neurológiai és farmakológiai aktivitásuk miatt a nem természetes aminosavak felhasználhatók molekuláris építőelemként, konformációs gátolt szerkezetek alkotórészeiként,  $\beta$ -kanyar és  $\beta$ -rétegek alkotórészeként, vagy farmakológiailag aktív termékeként. A  $\beta$ -aminosavak kulcsfontosságú elemei számos biológiailag aktív molekulának, mint a peptideknek, alkaloidoknak vagy  $\beta$ -laktám antibiotikumoknak.

A HPLC (és más kromatográfiai technikák is) egy sokoldalú, kémiai anyagok – vagy a királis kémiában enantiomerek – elválasztására, valamint *pl.* gyógyszerhatóanyagok szennyeződésektől való megtisztítására alkalmas technika.

## CÉLOK

Munkánk során célul tűztük ki két típusú  $\beta$ -aminosav-származék királis elválasztásának vizsgálatát. Méréseinket, két különböző királis kolonna-családra terveztük, úgymint a makrociklusos glikopeptid- és koronaéter-szelektort tartalmazó oszlopokra. Célunk volt:

1 Módszerfejlesztés monoterpén-vázás  $\beta$ -aminosav enantiomerek elválasztására makrociklusos antibiotikum-alapú királis állófázisokon, főként teikoplanin-, risztocetin A- és vankomicin-alapú állófázisokon. Terveztük a pH, a hőmérséklet, a molekulák szerkezete, a szilikagélhez rögzítő “kar” minősége és a szelektor cukoregységeinek a királis felismerésre gyakorolt hatásának vizsgálatát.

2 Új analitikai módszerek kidolgozását terveztük izoxazolin-gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán-karbonsav enantiomerek elválasztására a már említett makrociklusos glikopeptid-alapú kolonnákon. Célunk volt a mérési körülmények változtatása (pH, eluens-összetétel, molekulák és a szelektorok szerkezete, hőmérséklet, stb.) elválasztásra gyakorolt hatásának tanulmányozása.

3 Terveztük új módszerek kidolgozását izoxazolin-gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán-karbonsav enantiomerek elválasztására új típusú koronaéter-alapú állófázisokon. A kromatográfiai körülmények változtatásával nyert adatok alapján célunk volt a királis elválasztás fő hajtóerejének valószínűsítése. A szilikagélhez rögzítő “kar” minősége hatásának tanulmányozása szintén céljaink között szerepelt.

4 Össze kívántuk hasonlítani a két típusú kolonna (makrociklusos glikopeptid- és koronaéter-alapú) elválasztó-képességének hatékonyságát az izoxazolin-gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán-karbonsav enantiomerek elválasztására.

Minden esetben meghatároztuk a kromatográfiai paramétereket (retenciós faktor, szelektivitás faktor és felbontás) valamint a hőmérsékletfüggés tanulmányozásával termodinamikai adatokat gyűjtöttünk, amelyeket a királis elválasztás jellemzésére használtunk fel.

## **ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK**

### *Alkalmazott készülékek*

Méréseinket a következő három HPLC rendszeren végeztük:

I. rendszer: M-600 típusú alacsony nyomású gradiens pumpa, M-2996 típusú fotodiódasoros detektor, Millenium<sup>32</sup> 2.1 adatfeldolgozó szoftver (Waters Chromatography, Milford, MA, USA).

II. rendszer: 1525 típusú bináris pumpa, 2487 típusú kétsatornás UV detektor, 717 Plus automata mintaadagoló, Empower 2 adatfeldolgozó szoftver (Waters Chromatography, Milford, MA, USA).

III. rendszer: L-6000 típusú pumpa (Hitachi Ltd., Tokio, Japan), SPD-6AV típusú UV-VIS detektor (Shimadzu Corporation, Japan), Borwin adatfeldolgozó szoftver (Merck, Darmstadt, Germany).

Mindegyik rendszert 7125 típusú 20 µl-es adagolóhurokkal ellátott kézi adagolóval szerelték fel (Rheodyne, Cotati, CA, USA).

Az adott pH-értékek beállítására Thermo Orion 420 pH-mérőt használtunk.

A kolonnák hőmérsékletét vízfürdőben és hűtő-fűtő kolonna termosztátban stabilizáltuk. A hőmérséklet pontossága  $\pm 0.1$  °C.

A rendszert illetve a kolonnát mindaddig mosattuk az adott eluenssel, amíg stabilizált alapvonalat és reprodukálható retenciókat nem kaptunk. Ezt minden alkalommal megismételtük, ha az eluensösszetélt vagy a hőmérsékletet változtattunk.

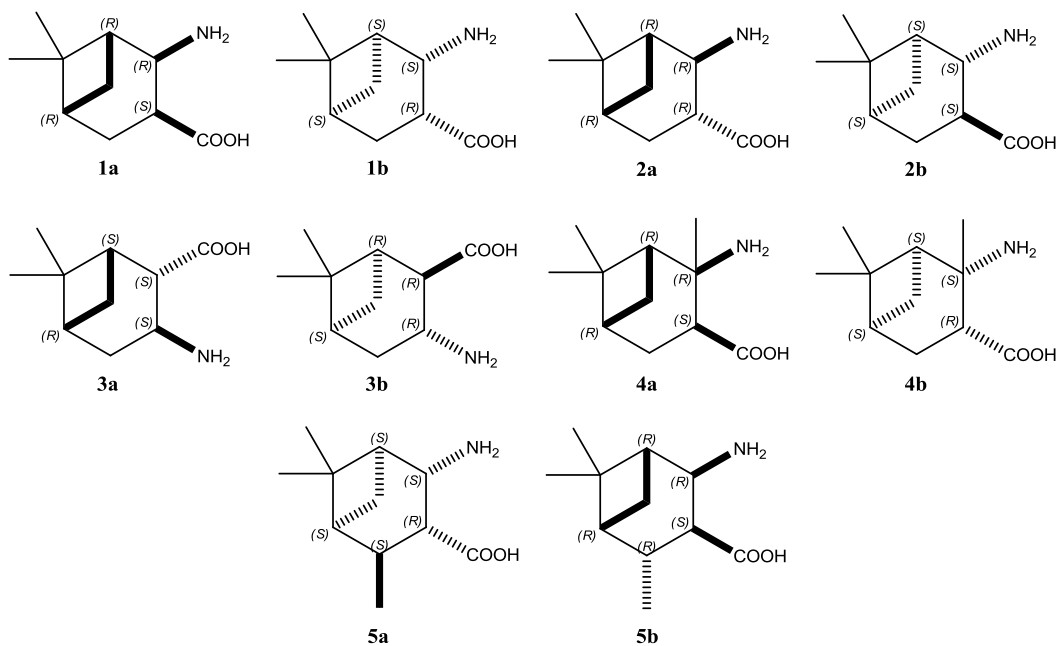
### ***Alkalmazott kolonnák***

Koronaéter-alapú királis állófázisok: mindhárom kolonna szelektora: módosított (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav, 150×4.6 mm belső átmérő, 5 µm részecskeméret.

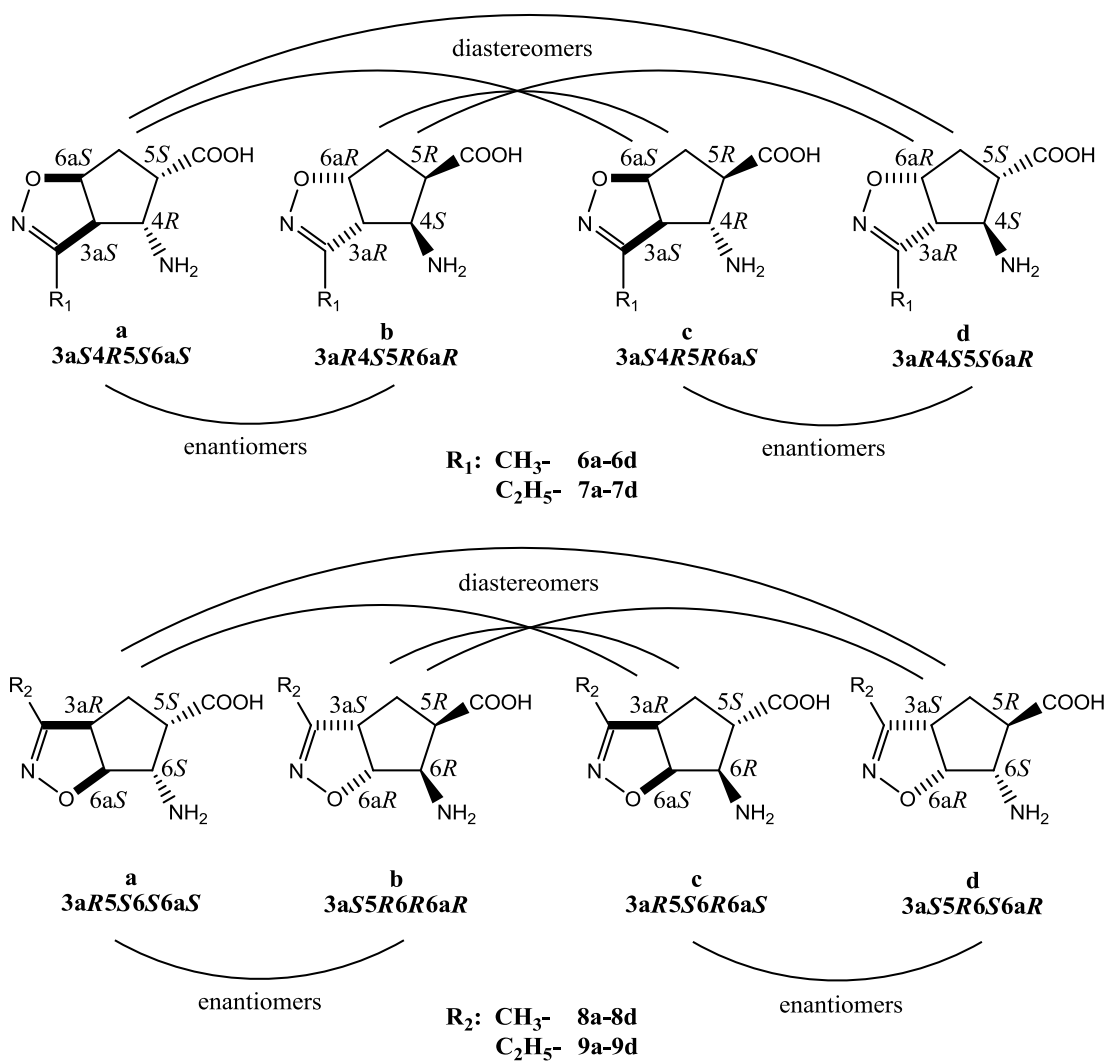
Makrociklusos glikopeptid-alapú királis állófázisok: Chirobiotic T és T2, szelektora teikoplanin; Chirobiotic TAG, szelektora teikoplanin-aglikon; Chirobiotic V, szelektora vankomicin; Chirobiotic VAG, szelektora vankomicin-aglikon; Chirobiotic R, szelektora risztocetin A; 250 × 4.6 mm belső átmérő, 5 µm részecskeméret.

### ***Vizsgált anyagok***

A vizsgált anyagok monoterpén-alapvázú 2-aminociklopentán-karbonsavak (**1. ábra**) és izoxazolin-gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán-karbonsavak (**2. ábra**) voltak. Minden anyagot a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézetében állítottak elő, amiért ezúttal is hálás köszönetem fejezem ki.



1. ábra A monoterpen-alapvázú  $\beta$ -aminosavak szerkezete



2. ábra Az izoxazolin-gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán-karbonsavak szerkezete

## EREDMÉNYEK

### *Monoterpén-alapvázú 2-aminociklopentán-karbonsav enantiomerek elválasztása makrociklusos antibiotikum-alapú királis állófázisokon*

A mérések során fordított fázisú, poláris szerves és poláris ionos módszereket alkalmaztunk. A felhasznált királis állófázisok teikoplanin-alapú Chirobiotic T, T2, TAG, risztocetin A-alapú Chrobiotic R- és vankomicin-alapú Chrobiotic V és VAG kolonnák voltak.

Vizsgáltuk a mozgó fázis pH-jának az elválasztásra gyakorolt hatását. A Chirobiotic T oszlopon a pH növelése csökkentette a visszatartási tényező értékét, míg a szelektivitás csekély, a felbontás számottevő mértékben növekedett.

A mozgófázis szerves (alkohol) komponensének hatását vizsgálva 0.1% TEAA (pH=4.1)/MeOH eluens-rendszerben Chirobiotic T, T2, TAG kolonnákon megállapítottuk, hogy az alkoholtartalom növelése a retenciót U-alakú görbe szerint változtatta minden minta esetén (kivéve a 3-as minta T és T2 oszlopokon). Ennek magyarázata, hogy a vízben gazdag eluens a hidrofób kölcsönhatásoknak kedvez, amelyek növelik  $k'$  értékét. Az alkoholtartalmat növelve, nagyobb alkohol koncentrációnál a mozgófázis polaritása csökken, a poláris aminosav szívesen tartózkodik az állófázison (HILIC kölcsönhatás), amely a retenció-növekedésnek kedvez. A 3-as anyag eltérő viselkedése valószínűleg az amino- és karboxil-csoportok eltérő helyzetének tulajdonítható. Általánosságban elmondható, hogy a szelektivitas- és felbontás-értékek vagy U-alakú görbét írtak le, vagy növekedtek az alkoholtartalom növelésével. A Chirobiotic R, V és VAG kolonnákon az elválasztás kevésbé volt hatékony, a legjobb felbontás ezeken a kolonnákon  $R_S=1.00$  értéknek adódott.

Az elúciós sorrend a mérések során nem változott, kivéve a 2-es minta esetén, ahol a fordított fázisból poláris ionos módba való csere megfordította az elúciós sorrendet.

A hőmérséklet hatását is tanulmányoztuk a T és TAG kolonnákon 10 és 40°C hőmérséklet-tartományban és minden anyagra meghatároztuk a termodinamikai paramétereket. A legtöbb esetben az enantiomer-elválasztás entalpia-vezérelt folyamat volt, egyetlen kivétel a 3-as molekula volt, amely a ritkán megfigyelhető entrópia-kontrollált elválasztást mutatta.

Összefoglalóan mondhatjuk, hogy az újonnan fejlesztett módszerünk minden minta esetén alapvonalra történő elválasztást biztosított.

## ***Izoxazolin-gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán-karbonsavak enantiomerjeinek elválasztása***

Az izoxazolinok gyógyszeripari jelentősége adta az indokot ezen vegyületek vizsgálatára. A méréseket két különböző királis kolonna-családon végeztük.

### ***Vizsgálat makrociklusos antibiotikum-alapú királis állófázisokon***

A mozgófázis szerves (alkohol) komponensének hatását vizsgálva 0.1% TEAA (pH=4.1)/MeOH eluens rendszerben Chirobiotic T, T2, TAG kolonnákon megállapítottuk, hogy az alkoholtartalom növelésével a retenció U-alakú görbe szerint változott a legtöbb esetben. Azonban, a **6a,6b** minta esetén a T, T2 és TAG kolonnákon, valamint a **7a,7b** anyag esetén a T és T2 kolonnákon  $k'$  folyamatos növekedése volt megfigyelhető a MeOH-tartalom növelésével. Az U-alakú görbék a hidrofób és HILIC kölcsönhatásokkal értelmezhetők, míg a folytonos  $k'$ -növekedés a HILIC kölcsönhatásra utal.

Az elválasztás szempontjából minden minta esetén a Chirobiotic TAG oszlop bizonyult a legalkalmasabbnak, itt értük el a legjobb felbontást. A **8a,8b** és **9a,9b** analógok enantiomerjének elválasztására a vankomicin-alapú V és VAG oszlopok is alkalmasnak bizonyultak. Az elúciós sorrend csak *transz*-analógok esetén TAG állófázison változott meg.

Az elválasztás hőmérsékletfüggését 5-45°C hőmérséklet-tartományban (10°C-os lépésekben) végeztük a Chirobiotic T és TAG oszlopokon. A termodinamikai paraméterek értelmezése során az elválasztás folyamata entalpia-vezéreltnek adódott, míg a **8a,8b** molekulák Chirobiotic TAG oszlopon entrópia-vezérelt elválasztást mutattak. A Chirobiotic T oszlopon a **6c,6d** és **7c,7d** anyagokra a  $T_{iso}$  értéke (az a hőmérséklet, ahol a szelektivitás megszűnik,  $\alpha=1,0$ ) 37°C volt. Az elúciós sorrend megfordulását a 37°C alatti és feletti hőmérsékleteken sikerült megfigyelni.

Mivel ezen anyagok két diasztereomerpárt tartalmaznak, megkíséreltük elválasztásukat egy kromatográfiás futtatáson belül. A **7a-7d** és **8a-8d** molekulák esetén sikerült mind a négy enantiomert elválasztanunk egy mérésen belül, de a **6a-6d** és a **9a-9d** anyagok esetén ehhez két-két mérést kellett végeznünk.

### ***Vizsgálat koronaéter-tartalmú királis állófázisokon***

Koronaéter-alapú királis állófázisokon a meghatározó elsődleges kölcsönhatás az aminosav protonált amino-csoportja és a koronaéter között kialakuló zárvány-komplex



képződése. Ehhez további kölcsönhatások járulnak, hogy teljesüljön a hárompontos illeszkedés modellje.

Az eluens alkoholtartalmának (MeOH, EtOH, IPA) hatását tanulmányozva arra a megállapításra jutottunk, hogy az alkoholtartalom növelése növeli  $k'$  értékét. Ez összhangban áll a makrociklusos glikopeptid-állófázison tapasztaltakkal, hogy a retenciós viselkedést a hidrofil kölcsönhatású kromatográfia (HILIC) irányítja növekvő alkoholtartalomnál. Azonban néhány molekula esetén MeOH-tartalmú eluensben a **Korona 1** és minden mintánál a **Korona 3** kolonnán U-alakú retenciós görbe volt megfigyelhető a MeOH-tartalom függvényében. Nagyobb víz-koncentrációnál a visszatartás növekedett a víztartalom növelésével, ami valószínűleg a minta és a szelektor között kialakuló hidrofób kölcsönhatásoknak volt köszönhető a vízben gazdagabb mozgófázisban, míg nagyobb alkoholtartalom esetén a hidrofil kölcsönhatású kromatográfia játszott szerepet.

A három kolonna retenciós viselkedését összehasonlítva elmondható, hogy  $k_I'$  nagyobbak adódtak a **Korona 3** kolonnán kisebb alkohol-koncentrációnál és **Korona 1 oszlopon** nagyobb alkoholtartalomnál. Első esetben, az apolárisabb **Korona 3** szerkezete kedvez a vízben gazdag mozgó fázisban a hidrofób kölcsönhatásoknak, nagyobb  $k_I'$ -értékeket eredményezve. A második esetben pedig, a polárisabb jellegű **Korona 1** oszlopon alkoholban gazdag eluensben a hidrofil kölcsönhatású kromatográfia a kedvezményezett, amelynek eredménye szintén a nagyobb retenció.

A zárvány-komplex kialakulásához koronaéter-alapú állófázisokon elsődlegesen az szükséges, hogy az aminosav primer amino-csoportja protonált legyen, amelyet sav adagolásával biztosítunk. A mozgófázisához adagolt sav minőségének hatását a kromatográfiai adatokra HCOOH, CH<sub>3</sub>COOH, CF<sub>3</sub>COOH, HClO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> és H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> adagolásával vizsgáltuk. Az eredményekből kiderül, hogy a legtöbb esetben CH<sub>3</sub>COOH és HCOOH használata eredményezte a nagyobb  $k'$  értékeket. Az említett két savas módosító alkalmazásakor nagyobb szelektivitás és felbontás volt megfigyelhető, és néhány esetben a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> használata is hasznosnak bizonyult (főként EtOH vagy IPA alkohol módosító használata esetén). Tanulmányoztuk a savas módosító koncentrációjának elválasztásra gyakorolt hatását is CH<sub>3</sub>COOH és H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> alkalmazásával. A savkoncentráció növelése a retenció csökkenését eredményezte ugyanakkor  $\alpha$  növekedett a savkoncentráció növelésével. Az  $R_S$ -értékek azonban nem egyértelműen változtak a savkoncentráció növelésével: az  $R_S$ -értékek csökkentek a *transz*-analógok vizsgálatakor, és növekedtek a *cisz*-analógok esetében.

A minták szerkezete szintén befolyásolta a királis felismerést. Mindhárom állófázison a szelektivitás- és felbontás-értékek jobbnak adódtak a **8a,8b** és **9a,9b** molekulák esetén, mint a **6a,6b** és **7a,7b** analógok esetén. Valószínűsíthető, hogy ennek oka az R-szubsztituens eltérő helyzetben való elhelyezkedése. A *transz*-analógok szintén eltérő viselkedést mutattak.

Az elúciós sorrendet minden esetben meghatároztuk, de nem találtunk általános érvényű szabályt ezen anyagok elúciós viselkedésére.

## PUBLIKÁCIÓK

1. **László Sipos**, István Ilisz, Zoltán Pataj, Zsolt Szakonyi, Ferenc Fülöp, Daniel W. Armstrong, Antal Péter  
*High-performance liquid chromatographic enantioseparation of monoterpene-based 2-amino carboxylic acids on macrocyclic glycopeptide-based phases*  
Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 6956-6963. i.f.: 4.194
2. **László Sipos**, István Ilisz, Melinda Nonn, Ferenc Fülöp, Zoltán Pataj, Daniel W. Armstrong, Antal Péter  
*High-performance liquid chromatographic enantioseparation of unusual isoxazoline-fused 2-aminocyclopentanecarboxylic acids on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases*  
Journal of Chromatography A, 1232 (2012) 142-151. i.f.: 4.194
3. **László Sipos**, István Ilisz, Anita Aranyi, Zsanett Gecse, Melinda Nonn, Ferenc Fülöp, Myung Ho Hyun, Antal Péter  
*High-performance liquid chromatographic enantioseparation of unusual isoxazoline-fused 2-aminocyclopentanecarboxylic acids on (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid-based chiral stationary phases*  
Chirality, 24 (2012) 817-824. i.f.: 2.982

**Összesített impakt faktor: 11.370**

## POSZTEREK

1. **Sipos László**, Ilisz István, Pataj Zoltán, Szakonyi Zsolt, Fülöp Ferenc, Daniel W. Armstrong, Péter Antal  
*Monoterpén alapvázú 2-amino-karbonsavak enantiomerjeinek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztása makrociklusos glikopeptid-vázú állófázisokon*  
Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Tapolca, 2010. November 10-12, Absztr.: P-37.
2. **László Sipos**, Melinda Nonn, Lóránd Kiss, Ferenc Fülöp, Daniel W. Armstrong, Antal Péter  
*High-performance liquid chromatographic enantioseparation of isoxazoline-fused cispentacin derivatives on chiral stationary phases*  
36th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Budapest, 2011. Június 19-23, Absztr.: P-79.

## ELŐADÁSOK

1. *Monoterpén alapvázú 2-amino-karbonsavak enantiomerjeinek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztása makrociklusos glikopeptid-vázú állófázisokon*  
XXXIII. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2010. Október 25-27.