

**GYÓGYSZERHATÓANYAGOK ÉS
SZTÉRIKUSAN GÁTOLT AMINOSAVAK
KIRÁLIS FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS
ELVÁLASZTÁSA**

Egyetemi Doktori (Ph.D.) Értekezés Tézisei

Török Roland Sándor



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

**SZEGED
2006**

**GYÓGYSZERHATÓANYAGOK ÉS
SZTÉRIKUSAN GÁTOLT AMINOSAVAK
KIRÁLIS FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS
ELVÁLASZTÁSA**

Egyetemi Doktori (Ph.D.) Értekezés Tézisei

Török Roland Sándor

Témavezető:
Dr. Péter Antal
Egyetemi tanár



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

SZEGED
2006

Bevezetés és célkitűzések

A természetben különösen fontos szerepet játszik a szimmetria és aszimmetria illetve a hozzájuk kapcsolódó és az általuk meghatározott fizikai, biológiai és kémiai tulajdonságok. Az élő szervezeteket felépítő szerves anyagok nagy része királis, könnyen érthető hogy a szervezetbe jutó királis anyagok enantiomerjei eltérően lépnek kölcsönhatásba a szervezetben található királis vegyületekkel, ott eltérő hatást fejthetnek ki és metabolizmusuk is más lehet. Megnőtt tehát az igény a gyógyszeripari és más gyógyászati alap kutatásokban is az enantiomerek tiszta formában történő előállítására, valamint mennyiségi és minőségi meghatározására.

A peptid alapú receptorkutatás lényege, hogy a receptorokat ismert konformációjú peptidmolekulákkal viszik kölcsönhatásba. Ismert konformációjú peptidok előállítása úgynevezett konformációsán gátolt aminosavak beépítésével lehetséges. Ezek olyan speciális kialakítású aminosavak, amelyek célzottan elhelyezett funkció csoportjai segítségével konformációs gátakat alakíthatnak ki a peptidszerkezetben. Az ismert peptidszerkezet eléréséhez azonban elengedhetetlen a királis tisztaságú aminosavak használata a szintézis során.

Az enantiomerek előállításnak több lehetősége van, például az enantioszelektív szintézis eljárások alkalmazása (egyre nagyobb teret nyer az enantioszelektív katalizátorok alkalmazása is), vagy racém keverékek előállítása, majd az enantiomerek elválasztása. Az elválasztás történhet hagyományosan rezolválással vagy preparatív királis kromatográfiás eljárásokkal.

A kromatográfiás eljárásoknak nemcsak a tiszta enantiomerek előállításában van jelentős szerepe, hanem a termékek minőségének biztosításában is. Napjaink királis analitikájának legdinamikusabban fejlődő,

és legszélesebb körben alkalmazott területe a királis nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC).

Munkánk során célul tűztük ki egy királis antitumor hatású gyógyszerhatóanyag és ennek kiindulási és köztitermékeinek királis kromatográfiás elválasztását, valamint néhány nem természetes, sztérikusan gátolt aminosav enantiomerjeinek elválasztását. Ezek között találhatóak gyűrűs, szabadgyököt tartalmazó aminosavak és különböző, speciálisan szubsztituált glicin (Gly) és alanin (Ala) származékok. Céljaink közé tartozott továbbá egy kinin alapú anioncserélő típusú királis állófázis (KÁF) kromatográfiás tulajdonságainak vizsgálata, valamint a lehetséges retenciós mechanizmus elemzése.

Alkalmazott vizsgálati módszerek

Vizsgálataink során közvetlen és közvetett kromatográfiás módszereket alkalmaztunk.

A közvetett módszerek alkalmazása során 3 különböző típusú királis származékképző reagenst (KSR) használtunk, az aktív fluor tartalmú *N*- α -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alanin-amidot, azaz Marfey reagenst (FDAA), az izotiocianát-csoportot tartalmazó 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil-izotiocianátot (GITC), valamint az aktív észter tartalmú *N*-(4-nitrofenoxi-karbonil)-L-fenilalanin-2-metoxietil-észtert (NIFE).

A közvetlen királis kromatográfiás vizsgálatok során több típusú királis állófázist alkalmaztunk, ezek között volt cellulóz-alapú, α - és β -ciklodextrin-alapú, makrociklusos antibiotikum-alapú illetve kinin-alapú állófázis. Az alkalmazott királis HPLC oszlopok az állófázisokat minden esetben kovalensen szilikagélhez kötve tartalmazták.

Az alkalmazott készülékek a következők voltak:

I. rendszer: M-600 jelű alacsony nyomású gradiens pumpa, M-996 jelű fotodióda soros detektor, Millenium 32 jel- és adatfeldolgozó szoftver (Waters, Milford, USA).

II. rendszer: 1525 jelű nagynyomású bináris pumpa, 487 jelű kétsatornás detektor, 717 jelű automata mintaadagoló, in-line gáztalanító rendszer, Breeze jel- és adatfeldolgozó szoftver (Waters, Milford, USA).

Mindkét rendszer tartalmaz egy-egy 7125 jelű manuális adagolót is 20 µl-es adagolóhurokkal (Rheodyne, Cotati, USA).

MK-70 jelű, hűtő-fűtő termosztát (Mechanik Prüfgeräte, Medlingen, Németország).

420 A típusú precíziós digitális pH-méter (Orion, Beverly, USA).

Eredmények

A bikalutamid egy nem sztereoid szerkezetű antiandrogén, melyet sikerrel alkalmaznak a prosztatatarák kezelésében. Feladatunk volt a gyártási alapanyagok illetve a közti- és melléktermékek királis tisztaságának ellenőrzésére alkalmas HPLC-s eljárások kifejlesztése.

1. Cellulóz-alapú Chiralcel™ OD-H oszlopon megoldottuk a bikalutamid, valamint egy gyártásközi-, illetve egy gyártási melléktermékének királis elválasztását, leírtuk az elválasztáshoz szükséges optimális körülményeket.

2. Több makrociklusos antibiotikum-alapú állófázissal rendelkező királis oszlop közül, a Chirobiotic™ T illetve a Chirobiotic™ TAG bizonyult a legeredményesebbnek a bikalutamid és alapanyagai valamint melléktermékei vizsgálata során. A Chirobiotic™ T normál fázisban, míg a Chirobiotic™ TAG fordított fázisban és poláris-ionos módban nyújtott kiemelkedő szelektivitást.

3. Megoldottuk a reaktív, és ennél fogva nehezen analizálható köztitermékek királis elválasztását β -ciklodextrin alapú, Cyclobond™ I 2000 SN oszlop alkalmazásával.

4. Megkíséreltük az öt vizsgált vegyület analízisét egyetlen kromatográfiás futtatással végrehajtani, azonban arra a következtetésre jutottunk, hogy ez oldhatósági problémák miatt lehetetlen. Az összes vegyület királis HPLC-s analíziséhez legalább két kromatográfiás felvétel szükséges.

5. Megállapítottuk a vizsgált vegyületek enantiomerjeinek elúciós sorrendjét az alkalmazott királis állófázisokon, valamint meghatároztuk az enantiomer tisztasági anyagok királis szennyezésének mértékét, amely a vizsgált esetekben maximum 1%-nak adódott.

Munkánk során lehetőségünk nyílt nitroxid szabadgyököt tartalmazó β -aminosavak királis kromatográfiás vizsgálatára. A stabil nitroxid szabadgyököt tartalmazó vegyületeket felhasználják biológiai tanulmányokban más gyökök spin-csapdájaként, az optikailag aktív típusaikat pedig királis oxidálószerként valamint akirális gyökök királis származékképző szereként. A szabadgyökös β -aminosavak bizonyos típusait peptidekbe építve alkalmazzák biológiai és konformációs ESR vizsgálatokhoz.

6. Megoldottuk a szabadgyököt tartalmazó Fmoc-védett aminosavak fordított fázisú közvetlen királis elválasztását, cellulóz-alapú Chiralcel™ OD-RH oszlopon. Az eluensösszetétel és az oszloptér hőmérséklet változtatásával optimalizáltuk az elválasztást.

7. Közvetett királis kromatográfiás eljárásokat fejlesztettünk ki a nem védett aminosavak enantiomerjeinek elválasztására. Az FDAA, a GITC és az (S)-NIFE királis származékképző reagens alkalmasságát vizsgáltuk, többek között hogy milyen hatással van a képződő diasztereomer

származékok konverziójára és az aminosavak racemizációjára a reakciókörülmények változtatása.

7.1. Azt tapasztaltuk, hogy az FDAA viszonylag kis reaktivitása miatt nem alkalmas ilyen típusú aminosavak származékképzésére és elválasztására.

7.2. A GITC alkalmazása során a megfelelő mértékű termékképződés mellett nagy mértékű racemizációt figyeltünk meg. Amikor megkíséreltük a racemizációt visszaszorítani (enyhébb reakciókörülmények alkalmazásával) a kitermelés is csökkent.

7.3. A vizsgált KSR-ek közül egyedül az (S)-NIFE bizonyult kellőképpen reaktívnek és szelektívnek a gyűrűs, szabadgyökös aminosavak királis elválasztásához.

8. Meghatároztuk a vizsgált enantiomerek elúciós sorrendjét minden kifejlesztett módszer alkalmazása során.

9. Meghatároztuk az enantiomer tisztaságú anyagok királis szennyezésének mértékét közvetlen és közvetett módszerekkel egyaránt. Az (S)-NIFE felhasználásával nyert szennyezés értékek összevethetőek a közvetlen módszerrel kapott értékekkel.

Vizsgálataink során szekunder α -aminosavak (iminosavak) enantiomerjeit választottuk el két, rokon szerkezetű makrociklusos glikopeptid alapú állófázison.

10. Közvetlen királis kromatográfias eljárásokat dolgoztunk ki a vizsgált iminosavak enantiomerjeinek elválasztására.

11. Megvizsgáltuk a mozgófázis összetételének és az eluens pH-jának hatását az elválasztásra. Az eluens pH-jának retencióra gyakorolt hatását vizsgálva bizonyítékot találtunk az állófázison található karboxilcsoporton keresztül létrejövő elektrosztatikus kölcsönhatások retenciós folyamatban betöltött szerepére.

12. Összehasonlítottuk a két rokon szerkezetű királis szelektor, a teicoplanin és a teicoplanin aglikon elválasztóképességét a vizsgált iminosavakra. Hasonló megállapításokat tehettünk, mint amit az irodalomban a β -aminosavakra vonatkozóan találtunk, azaz a teicoplanin szelektor gyakran hatékonyabbnak bizonyul a teicoplanin aglikonnál. Ezt azzal magyaráztuk, hogy a merev szerkezetű és sztérikusan gátolt β -aminosavak illetve az iminosavak kevésbé illeszkednek a szelektor hidrofób üregeibe, illetve gyengébb elektrosztatikus kölcsönhatásokat képesek létrehozni. Ezért annak ellenére, hogy a teicoplanin szelektor esetén a cukorrészek elfedik a szelektor hidrofób üregeit ez az állófázis mégis hatékonyabbnak bizonyulhat, hiszen az iminosavak és β -aminosavak elválasztása során előtérbe kerül a hidrogénkötések és a sztérikus kölcsönhatások kialakításának képessége.

Vizsgálataink során fordított fázisú körülmények között választottuk el tizenhat glicin és fenilalanin analóg aminosav 4-féle acilezett származékának enantiomerjeit. Munkánk során tanulmányoztuk a hőmérséklet, a mozgófázis összetétel és a vegyületek szerkezetének hatását az elválasztásra.

13. Előállítottuk a vizsgált aminosavak benziloxi-karbonil- (Z), 3,5-dinitro-benziloxi-karbonil- (DNZ), benzoil- (Bz), illetve 3,5-dinitro-benzoil- (DNB) származékait. Általánosságban elmondhatjuk, hogy a képződött származékok retenciója Z, Bz, DNZ, DNB sorrendben növekedett.

14. 278 és 343 K közötti hőmérséklettartományban nyolc hőmérsékleten felvettük a vizsgált anyagok kromatogramját. A hőmérséklet emelése során a retenciófaktorok (k') és a szelektivitási tényezők (α) értékei csökkentek, a felbontás (R_s) viszont maximum jellegű hőmérsékletfüggést írt le.

15. Annak érdekében, hogy vizsgálhassuk a fordított fázisú rendszerekben kulcsfontosságú hidrofób-hidrofób kölcsönhatások szerepét

az általunk vizsgált rendszerben, egy számítógépes szoftver segítségével kiszámítottuk a vegyületek 1-oktanol/víz elegyben kialakuló megoszlási hányadosának 10-es alapú logaritmusát ($\log P$), és összevetettük az eltérő oldalláncú aminosavak kromatográfiás viselkedésével. Ebből a célból továbbá megvizsgáltuk az eluensösszetétel változtatásának hatását néhány vegyület Z- és DNZ-származékainak kromatográfiás paramétereire. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások meghatározó szerepet játszanak ugyan a visszatartás létrejöttében, de szelektivitásuk kicsi. Más, nagyobb szelektivitású kölcsönhatások létrejöttével is számolnunk kell, különös tekintettel az elektrosztatikus és a Lewis-féle sav-bázis kölcsönhatásokra, valamint a hidrogén kötések kialakulására.

16. A különböző hőmérsékleten mért kromatográfiás paraméterekből kiszámítottuk a vizsgált rendszerben létrejövő enantiomer-megoszlásra jellemző termodinamikai paramétereket, vagyis a fellépő entalpia- és entrópiaváltozásokat, valamint az egyes enantiomerekre jellemző entalpia-, entrópia- és szabadentalpia változások különbségeit.

16.1. A szelektoron található π -bázikus kinolin gyűrű és a DNZ- és DNB-védett aminosavak π -savas nitro-szubsztituált aromás gyűrűi közt fellépő Lewis-féle sav-bázis kölcsönhatások jelentősen hozzájárulnak mind a visszatartás, mind pedig a szelektivitás létrejöttéhez.

16.2. A merevebb molekulaszervezet elősegíti a királis elválasztást.

16.3. A hidrogén kötések kialakulása nagyban hozzájárul a retenció létrejöttéhez, de a királis felismerésben kisebb szerepet játszik.

16.4. A szterikus kölcsönhatások jelentősen befolyásolják az elválasztást, de hatásuk lehet kedvező és kedvezőtlen is.

Közlemények listája

Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények:

1. K. Wright, M. Crisma, C. Toniolo, **R. Török**, A. Péter, M. Wakselman, J.-P. Mazaleyrat
4-Amino-1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-3-carboxylic acid (β -TOAC), the first spin-labelled, cyclic, chiral β -amino acid resolved in an enantiomerically pure state
Tetrahedron Letters, **44**, 3381-3384, 2003 IF: 2,326
2. K. Wright, F. Formaggio, C. Toniolo, **R. Török**, A. Péter, M. Wakselman, J.-P. Mazaleyrat
First access to the spin-labelled β -amino acid POAC in an enantiopure state by resolution through its binaphthyl esters
Tetrahedron Letters, **44**, 4183-4186, 2003 IF: 2,326
3. A. Péter, **R. Török**, K. Wright, M. Wakselman, J.-P. Mazaleyrat
Liquid chromatographic enantioseparation of spin-labelled β -amino acids
Journal of Chromatography A, **1021**, 1-10, 2003 IF: 2,922
4. A. Péter, **R. Török**, D. W. Armstrong
Direct high-performance liquid chromatographic separation of unusual secondary amino acids and a comparison of the performances of Chirobiotic T and TAG columns
Journal of Chromatography A, **1057**, 229-235, 2004 IF: 3,359
5. **R. Török**, Á. Bor, Gy. Orosz, F. Lukács, D. W. Armstrong, A. Péter
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of bicalutamide and its related compounds
Journal of Chromatography A, **1098**, 75-81, 2005 IF: 3,096
6. **R. Török**, R. Berkecz, A. Péter
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of α -substituted glycine analogs on a quinine-based anion-exchanger chiral stationary phase under variable temperature conditions
Journal of Chromatography A, **1120**, 61-68, 2006 IF: 3,096

7. **R. Török**, R. Berkecz, A. Péter

Enantioseparation of phenylalanine analogs on a quinine-based anion-exchanger chiral stationary phase. Structure and temperature effects
Journal of Separation Science, Közlésre elfogadva IF: 1,829

Összesített impakt faktor:

18,954

Egyéb közlemények:

1. R. Berkecz, **R. Török**, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -lactam and β -amino acid stereoisomers and a comparison of the performances of macrocyclic glycopeptide-based columns
Chromatographia, **63**, S37-S43, 2006 IF: 0,959

Konferencia előadások és poszterek:

1. **Török R.**, Péter A.
Új folyadékkromatográfias eljárások kidolgozása szabadgyökös β -aminosav enantiomerek elválasztására
XXVI. Kémiai Előadói Napok (KEN)
Szeged (2003. október 27-29.) Magyarország Előadás
2. A. Felinger, E. Vékes, **R. Török**, A. Péter
Temperature effects on the heterogenous adsorption in chiral separation
HPLC-2004: 28th International Symposium and Exhibition on High performance Liquid Phase Separation and Related Techniques
Philadelphia (2004. június 12-18.) USA Poszter
3. K. Wright, A. de la Croix de Castries, M. Sarciaux, M. Vakselman, J.-P. Mazaleyra, **R. Török**, A. Péter, M. Crisma, F. Formaggio, C. Toniolo
Enantiomerically pure, cyclic, spin-labelled β -amino acids; trans-POAC and cis/trans- β -TOAC
3rd International and 28th European Peptide Symposium
Prága (2004. szeptember 5-10.) Csehország Poszter

4. **R. Török**, N. Maier, W. Lindner, A. Péter
Effects of molecular structure and temperature on retention of acylated glycine and alanine analogs on a quinine-based anion-exchanger chiral stationary phase
HPLC-2005: 29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques
Stokholm (2005. június 26-30.) Svédország Poszter
5. **R. Török**, R. Berkecz, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -lactam and β -amino acid stereoisomers and a comparison of the performances of macrocyclic glycopeptide-based columns
6th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods
Siófok (2005. szeptember 7-9.) Magyarország Poszter
6. A. Péter, **R. Török**, Á. Bor, G. Orosz, F. Lukács, D. W. Armstrong
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of bicalutamide and its related compounds
17th International Symposium on Chiral Discrimination
Párma (2005. szeptember 11-14.) Olaszország Poszter
7. **Török R.**, Péter A.
Királis folyadékkromatográfiás elválasztások makrociklusos antibiotikum alapú állófázisokon
VI. Elválasztástudományi Ankét
Budapest (2006. február 23.) Magyarország Előadás