

# **Akadémiai Doktori Értekezés**

Aminosavak és peptidok  
folyadékkromatográfiás elválasztása

*Péter Antal*

**Szegedi Tudományegyetem  
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék**

**2003**



## Tartalomjegyzék

Oldal

Az értekezésben használt gyakoribb rövidítések	
Magyarázat az értekezésben használt számozások és jelölések jelzésére	
1. Bevezetés	1
2. Kísérleti rész	6
3. Aminosavak <i>közvetett</i> királis kromatográfiája	
3.1. Aminosavak <i>közvetett</i> királis kromatográfiájának rövid irodalmi áttekintése	8
3.2. Nemfehérje-alkotó aminosav enantiomerek <i>közvetett</i> folyadékkromatográfiás elválasztása	10
3.3. Új izotiocianát típusú királis származékképző reagens fejlesztése	14
3.4. Új „aktív uretán” típusú királis származékképző reagens fejlesztése	20
3.5. <i>Közvetett</i> folyadékkromatográfiás elválasztások összehasonlítása	26
4. Nemfehérje-alkotó aminosav enantiomerek <i>közvetlen</i> folyadékkromatográfiás elválasztása	32
4.1. <i>Közvetlen</i> királis elválasztások koronaéter alapú, Crownpak CR(+) kolonnán	32
4.2. Nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek <i>közvetlen</i> folyadékkromatográfiás elválasztása makrociklusos glükopeptid alapú kolonnán	35
4.3. Nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek <i>közvetlen</i> folyadékkromatográfiás elválasztása kinin alapú, gyenge anioncserélő típusú „Prontosil AX-QN-2” oszlopon	43
4.4. Ciklodextrin alapú állófázisok néhány <i>közvetlen</i> folyadékkromatográfiás alkalmazása	50
4.5. <i>Közvetlen</i> folyadékkromatográfiás elválasztások összehasonlítása	52
5. Királis oszlopon végzett elválasztások hőmérsékletfüggése	55
5.1. Koronaéter alapú királis oszlopon végzett elválasztások hőmérsékletfüggése	57
5.2. Királis elválasztások hőmérsékletfüggése makrociklusos glükopeptid szelektort tartalmazó állófázison	59
5.3. A retenció valószínű mechanizmusa makrociklusos glikopeptid (teicoplanin illetve risztocetin A) tartalmú állófázisokon	69
5.4. Entalpia-entrópia kompenzáció	69
6. Alkoholszármazékok királis elválasztása	71
7. Nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek királis vékonyréteg-kromatográfiás elválasztása	78
8. Peptidek folyadékkromatográfiás analízise	80
9. Peptidek mikrohullámú hidrolízise	83
10. Peptidstabilitás vizsgálatok	86
11. Összefoglalás	89
12. Az értekezés alapját képező közlemények	91
13. Felhasznált irodalom	97
Köszönetnyilvánítás	107

## Az értekezésben használt gyakoribb rövidítések

$\alpha$ :	szelektivitási tényező (szeparációs faktor)	
Ac, MeCO:	acetyl-	CH <sub>3</sub> CO-
$\beta$ :	kompenzációs hőmérséklet	
Boc:	<i>tert</i> -butiloxikarbinil-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COCO-
<i>t</i> -Bu:	<i>tert</i> -butil-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C-
Bz:	benzoi-	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO-
Bzl:	benzil-	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> -
CD:	ciklodextrin	
CE:	kapillaris elektroforézis	
Chirobiotic T:	teicoplanin alapú királis állófázis	
Chirobiotic R:	risztocetin A alapú királis állófázis	
C.I.P. szabály:	Cahn-Ingold-Prelog-szabály a konfiguráció jelölésére és meghatározására	
Crownpak CR(+):	királis koronaéter alapú állófázis	
DANI:	1,3-diacetoxi-1-(4-nitrofenil)-2-propil-izotiocianát	
DNB:	3,5-dinitrobenzoi-	3,5-(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO-
DNZ:	3,5-dinitrobenziloxikarbonil-	3,5-(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> OCO-
DNP:	2,4-dinitrofenil	2,4-(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -
Et:	etil-	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -
$\phi$ :	fázisarány	
FDA:	2,4-dinitrofenil-5-L-alanin-amid (Marfey reagens)	
Fmoc:	fluorenil-metil-kloroformát-csoport	
GC:	gázkromatográfia	
GITC:	2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-glükopiranozil-izotiocianát	
HPLC:	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia	
<i>k</i> :	retenciós faktor	
Me:	metil-	CH <sub>3</sub> -
MeCN:	acetonitril	
MeO:	metoxi-	CH <sub>3</sub> O-
MeOH:	metanol	
MTPA-Cl:	$\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -(trifluormetil)fenilacetyl-klorid (Mosher reagens)	
<i>N</i> :	elméleti tányérszám	
NIFE:	<i>N</i> -(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietilészter	
3-Pent:	3-pentil-	(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH-
Ph:	fenil-	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -
Pr:	propil-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> -
2-Pr:	2-propil-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-
PrCO:	butiril-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO-
„Prontosil AX-QN-2”:	kinin alapú, gyenge anioncserélő típusú királis állófázis	
<i>R</i> <sub>S</sub> :	felbontás	
( <i>R</i> ):	a sztereoizomer konfigurációja a Cahn-Ingold-Prelog-szabály alapján	
( <i>S</i> ):	a sztereoizomer konfigurációja a Cahn-Ingold-Prelog-szabály alapján	
<i>t</i> <sub>M</sub> :	holdidő	
<i>t</i> <sub>R</sub> :	retenciós idő	
TEA:	trietyl-amin	
TEAA:	trietyl-ammonium-acetát	
TFA:	trifluorecetsav	
THF:	tetrahydrofuran	
<i>V</i> <sub>M</sub> :	az oszlop holdtér fogata (ml)	
VRK:	vékonyréteg-kromatográfia	
<i>w</i> :	csúcsalap szélesség	
<i>w</i> <sub>1/2</sub> , <i>w</i> <sub>2/2</sub> :	félmagasságban mért csúcsszélesség	
Z=CBZ:	benziloxikarbonil-	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> OCO-

### Magyarázat az értekezésben használt számozások és jelölések jelzésére:

- Az egyes fejezetekben [*félkövér és dőlt számmal*] szögletes zárójelben szereplő és a 12. Fejezetben felsorolt hivatkozási számok azokat a munkákat jelölik, melyek alapján a doktori értekezés készült. Példa: [2, 3, 12] vagy [2, 3, 12-18].
- Az értekezésben [normál és álló számmal] szögletes zárójelben szereplő, az értekezés végén a 13. Fejezetben azokat a szakirodalomban talált hivatkozásokat soroljuk fel, melyeket az értekezés során felhasználtunk. Példa: [252, 268-293].
- A Függelékben szereplő Táblázatokat az Értekezés szövegében a táblázatszám előtt F. betűvel jelöltük. Példa: F.2.3.1.a.,b. Táblázat.
- A szövegben szereplő (félkövér számok) kerek zárójelben a vegyületek számozását jelentik, a hozzájuk tartozó szerkezeti képletek és elnevezések a F.2.3.A. és F.2.3.B. Táblázatokban és Fejezetekben található. Példa: (71) vagy felsorolásnál (69)-(72).  
Ha az Értekezésben saját közleményeinkben szereplő adatokra hivatkozunk, ezekben a közleményekben a vegyületek számozása eltérő. Az olvasó dolgát megkönnyítendő, az Értekezésben a F.2.3.A. és B. szerinti számozás (félkövér számok) után, attól vesszővel elválasztva, normál álló számok (kerek zárójelben) jelzik a megfelelő közleményben szereplő számozását ugyanannak a sztereoizomernek. Példa: (71),(5) vagy felsorolásnál ((69)-(72), (3)-(6)).

### A kromatográfiai adatok számítására alkalmazott összefüggések:

- $k = (t_R - t_M) / t_M$
- $\alpha = k_2 / k_1$
- $N = 16(t_R/w)^2$  vagy  $N = 5,54(t_R/w_{1/2})^2$
- $R_S = 0.25 \times \sqrt{N_2} \times [(\alpha - 1) / \alpha] \times [k_2 / (1 + k_2)]$  (két egymást követő csúcs felbontása) vagy
- $R_S = [(t_{R2} - t_{R1})] / [0,5 \times (w_1 + w_2)]$  vagy  $R_S = 1.18 \times [(t_{R2} - t_{R1})] / [(w_{1/2} + w_{2/2})]$   
(több egymást követő csúcs felbontása)

# 1. Bevezetés

## 1.1. A kiralitás jelentősége

A kiralitás és a hozzá kapcsolódó jelenségek iránti érdeklődés az utóbbi években mind tudományos, mind gazdasági szempontból megsokszorozódott, elsősorban a biológia, a gyógyszeripar valamint a növényvédőszer-, élelmiszer- és színezékipar támasztotta igényeknek köszönhetően. 1997-es adatok szerint a világ 500 vezető gyógyszere közül 269 került enantiomer formában forgalomba és értékük meghaladta a 100 milliárd dollárt, mely az összforgalom 28 %-a [1].

Ariëns [2] szerint a gyógyszerben előforduló enantiomerek a szervezetben különböző biológiai hatást fejthetnek ki. Az emberi szervezetben lejátszódó fizikai és kémiai folyamatok során a gyógyszermolekula aszimmetrikus biológiai makromolekulákkal (fehérjék, polinukleotidok, glükolipidek) kerül kölcsönhatásba. Ez a királis környezet megkülönbözteti a nagyon hasonló enantiomereket is. A sztereoizomerek különbözhetnek a farmakológiai aktivitás típusában és mértékében, vagy farmakokinetikai tulajdonságaikban. Az alkalmazott terápiás hatásért felelős enantiomer az *eutomer* mellett jelenlévő másik izomer a *disztomer* csak ideális esetben inaktív [3]. Számos példa bizonyítja, hogy a *disztomer* mutathat:

- azonos farmakológiai hatást, de nagyobb toxicitást,
- más farmakológiai hatást vagy
- antagonizmust.

Kutatási érdeklődésünk a királis vegyületek körében elsősorban az aminosavak, az aminosavakhoz vezető, illetve belőlük származtatható vegyületek és a peptidek területére esett. Végső soron a peptidalapú gyógyszerkutatás célja nagy aktivitású és receptor szelektív peptidek szintézise.

A peptidek igen flexibilis molekulák, melyek a térben számtalan konformációt vehetnek fel és ezek oldatbeli szerkezete, függ a környezettől is. A receptorokkal való kölcsönhatás során azonban konformációjuk meghatározott, rögzített. A bioaktív konformáció rendszerint nem ismert, röntgendiffrakciós és NMR-spektroszkópai mérések segítenek a felismerésben, a ténylegesen aktív szerkezetek kutatása ma az egyik fő irány. A közvetett stratégia a megismerésben helyi konformációs gátak beépítése a peptidekbe és így a biológiailag aktív konformáció rögzítése [4]. Erre számos lehetőség kínálkozik, legcélszerűbben konformációs gátolt aminosavak beépítése, melyekkel olyan másodlagos szerkezeteket hozhatunk létre, mint  $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -kanyar,  $\gamma$ -kanyar, *transz*-, *cisz*- és *gauche*(+), *gauche*(-) térállások, stb. Konformációs gát kiépíthető nemfehérje-alkotó aminosavakkal, ilyenek például  $\alpha$ - és  $\beta$ -metil(alkil) szubsztituált analógok, prolin analógok, szubsztituált aromás aminosavak vagy peptidek

ciklizálásával az aminosav oldallánc kötésével a peptidlánchoz vagy a C-terminális és N-terminális aminosavak gyűrűbe zárásával.

Ugyancsak különleges szerkezeti elemek hozhatók létre  $\beta$ -aminosavak beépítésével, mely az utóbbi tíz év kutatási eredménye. A már említett helikális,  $\beta$ -kanyar,  $\gamma$ -kanyar szerkezetek mellett parallel és antiparallel redőzött rétegek, nanocsöves modellek is létrejöhetnek. A fenti másodlagos, harmadlagos szerkezeti hatásokon túlmenően olyan alapvető sajátságok is változhatnak, mint a receptor szelektivitás, agonista-antagonista sajátság, aktivitás növekedés-csökkenés, proteolízissel szembeni stabilitás.

Mind az *alapvető*, mind a *szerkezeti sajátságok* meghatározásában döntő jelentősége lehet az újonnan beépített aminosavak *konfigurációjának*.

A módosításra használt nemfehérje-alkotó aminosavak szintetikus eredetűek (néhány ugyan előfordul alacsonyabb rendű szervezetekben is) és szintézisük nem mindig vezet tiszta enantiomer termékhez. Hasonló a helyzet az általunk vizsgált ciklikus királis alkoholok, aminosav-amidok és egyéb vegyületek esetén. A *királis tisztaság* meghatározása analitikai feladat, melyre a *kromatográfia* különböző módszerei a legalkalmasabbak. A királis tisztaság meghatározásának ki kell egészülnie a *konfiguráció* megállapításával. A konfiguráció azonosításához a kromatográfia önmagában véve nem elegendő, ehhez igénybe kell venni szerkezetvizsgáló módszereket, mint a röntgendiffrakció, az NMR-spektroszkópia vagy enzimikus reakciókat.

## 1.2. Az enantiomerek elválasztásának jelentősége

Királis vegyületek enantiomer-elválasztása kromatográfias módszerekkel a modern analitika egyik legdinamikusabban fejlődő területe. Az elválasztási módszerek fejlesztése iránti igény legfőképpen a biológia és a gyógyszerkutatás területén jelentkezett. A királis kromatográfia fontosságát a nyolcvanas évek végétől megjelenő könyvek, összefoglaló munkák emelkedő száma is mutatja [5-29], melyek alapvető forrásai az e területen dolgozó kutatóknak.

Az enantiomerek, lévén egymás tükörképi párjai, hagyományos folyadékkromatográfias módszerekkel nem választhatók el, csak akkor, ha olyan sztereospecifikus kémiai reakciót vagy kölcsönhatást alkalmazunk, melynek során eltérő sajátságú vegyületek keletkeznek, illetve a két antipód különbözőképpen reagál. Ezek alapján a sztereoizomerek elválasztási lehetőségei az alábbiak szerint csoportosíthatók:

1. oszlop előtti királis származékképzéssel készült diasztereomer-párok elválasztása (*közvetett* módszer),
2. elválasztás optikailag aktív állófázison (*közvetlen* módszer),
3. elválasztás optikailag aktív reagenst tartalmazó eluenssel (*közvetlen* módszer).

Munkánk során a 3. módszert nem alkalmaztuk, az 1. *közvetett* és 2. *közvetlen* módszerek előnyeit és hátrányait a 1.2.1. **Táblázatban** foglaltuk össze. (Az összeállításkor Lough [10], Toyo'oka [23] munkájára és saját tapasztalatainkra hagyatkoztunk). A táblázatból látható, hogy mindkét módszer számos előnnyel és hátránnyal rendelkezik. Összefoglalóan azt mondhatjuk, hogy a két módszer inkább kiegészítője, mint riválisa egymásnak, azonban egyes területeken egyik vagy másik hangsúlyozottan kerül előtérbe (közvetlen módszer: gyógyszeripar, preparatív kromatográfia; közvetett módszer: nyomanalízis, nagy felbontási igény, kedvező ár).

### 1.2.1. Táblázat

#### *A közvetett és közvetlen királis folyadékkromatográfiai módszerek összehasonlítása*

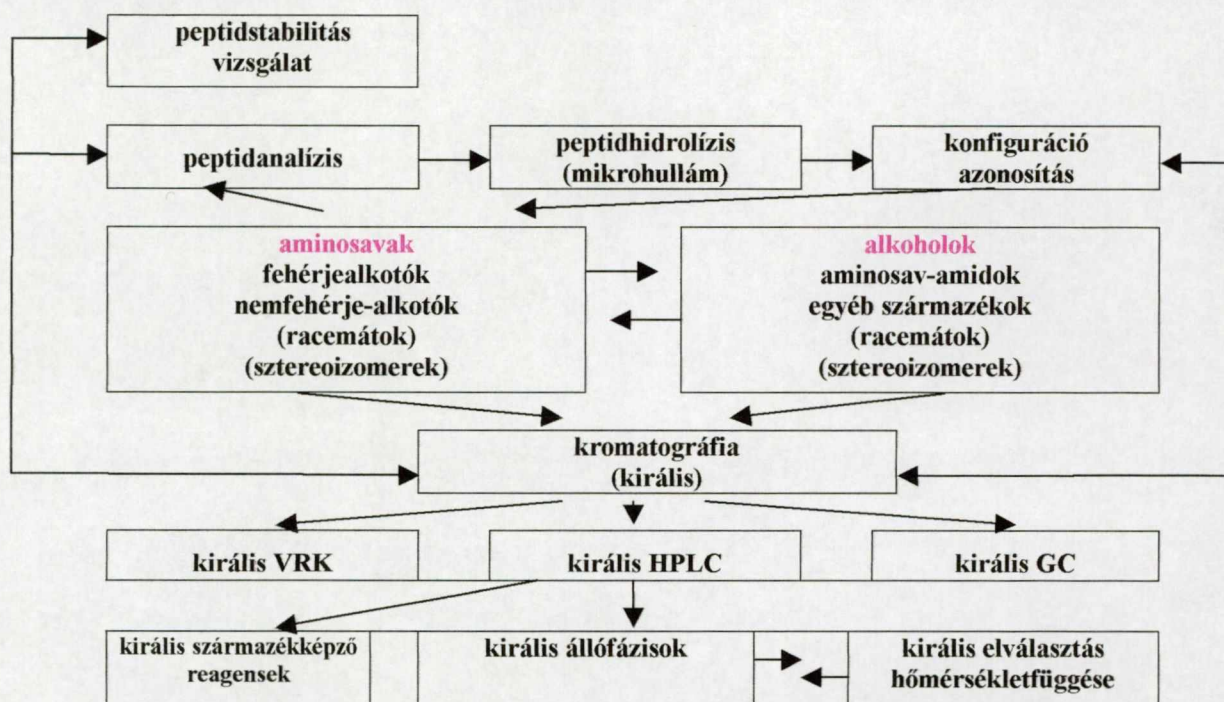
<i>Előnyök</i>	
<i>Közvetett módszerek</i>	<i>Közvetlen módszerek</i>
1. Az elválasztás általában egyszerűbb, a felbontás nagyobb.	1. A királis szelektor enantiomer tisztasága nem kritikus.
2. Az elúciós sorrend következtethető illetve megfordítható (antipód reagens).	2. Az enantiomerek azonos moláris abszorbanciával rendelkeznek.
3. A detektálás alsó határa csökkenthető.	3. Racemizáció nem valószínű az analízis során.
4. Az akirális kolonna olcsóbb.	4. Funkciós csoporttal nem rendelkező racemátok is elválaszthatók.
5. A módszerfejlesztés kevésbé időigényes.	5. Preparatív célra is hasznosítható.
6. A szelektivitás növelhető (előtisztítás).	6. A hőmérséklet változtatása gyakran kedvező az elválasztás szempontjából.
	7. Egyszerű mintaelőkészítés és kromatografálás.

<i>Hátrányok</i>	
<i>Közvetett módszerek</i>	<i>Közvetlen módszerek</i>
1. A származékképző enantiomer tisztasága kritikus.	1. Az elméleti tányérszám általában kicsi.
2. A képződött diasztereomerek moláris abszorbanciája különbözhet.	2. A deszorpció kinetikája egyes esetekben igen lassú.
3. A származékképzés során racemizáció léphet fel.	3. Az elúciós sorrend és a királis kölcsönhatások mibenléte nem tisztázott.
4. A származékképzés során „kinetikai rezolúció” léphet fel.	4. Nincs általánosan használható kolonna.
5. A reagens feleslege és a melléktermékek zavaró csúcsként jelentkezhetnek.	5. A királis kolonnák rendkívül érzékenyek a munkakörülmények változtatására.
6. Az enantiomerek visszanyerése további műveleteket igényel.	6. A kolonna drága.
7. A származékképzés időigényes lehet.	

### 1.3. A munka célkitűzése

Az értekezés célkitűzéseinek megvalósítására szolgáló munkatervet összefoglalóan az

#### 1.3.1. ábrán szemléltetjük.



1.3.1. ábra. Az értekezés alapját képező vizsgálatok

A munka célja módszerek fejlesztése fehérjealkotó és nemfehérje-alkotó aminosav sztereoisomerek, valamint rokon vegyületek sztereoisomereinek királis kromatográfias elválasztására. Vizsgálataink további tárgyát képezte a nemfehérje-alkotó aminosavak felhasználásával készült peptidok analitikája a szintézistől kezdve a peptid stabilitás vizsgálatokig bezárólag. A főbb pontokat a következőkben foglaljuk össze:

1. Új, közvetett folyadékkromatográfias módszerek fejlesztése az újonnan szintetizált konformációsán gátolt, vagy más fontos szerkezeti elemet tartalmazó nemfehérje-alkotó aminosav sztereoisomerek elválasztására és az enantiomer tisztaság meghatározására. A közvetett folyadékkromatográfias módszerhez az irodalomban ismert, de az általunk vizsgált rendszerekre az irodalomban eddig kevés kivételtől eltekintve nem alkalmazott királis származékképzőket kívántuk használni.
2. Új királis származékképzők tervezése, szintézise és alkalmazása. Elsősorban olyan reagens fejlesztése volt a célunk, mely alkalmas konformációsán gátolt aminosavak, szekunder aminosavak (iminosavak) származékképzésére, jó szelektivitást biztosít a több kiralitáscentrumot tartalmazó aminosav diasztereomerek elválasztásában és a képződő diasztereomer termék stabilis. Ehhez a munkához az elválasztás optimális körülményeinek kidolgozása mellett a származékképzés optimalizálása elsőrendű feladat.

3. Célunk volt a *közvetlen* folyadékkromatográfiai módszerek nyújtotta előnyök kihasználása. Az alkalmazott kolonnák és aminosavak újdonsága iránymutató lehet hasonló szerkezetű vegyületek elválasztásában. Az itt kifejlesztett módszerek elvileg közvetlenül alkalmazhatók *preparatív* kromatográfiai célokra is, ami sok esetben, teljesen új aminosavakról lévén szó, jelentős előny enantiomertiszta izomerek előállítására.
4. A *közvetlen* folyadékkromatográfiai királis elválasztások *hőmérsékletfüggésének* tanulmányozásával az elválasztásokat irányító kölcsönhatások szerepére kívántunk következtetni. A termodinamikai adatok ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ,  $\Delta G^\circ$ ) mérésével következtetések vonhatók le a minta és az állófázis között lejátszódó kölcsönhatások milyenségére.
5. Új, főleg *közvetlen* folyadékkromatográfiai módszer fejlesztését tűztük ki célul néhány gyógyszer alapanyagként fontos *alkohol sztereoizomer* királis elválasztására. A módszerrel ezen alkoholok enzimatisz rezolválásának optimalizálása volt a cél.
6. Célul tűztük ki a sztereoizomerek elválasztásán túlmenően az egyes optikai izomerek *konfigurációjának azonosítását*. A standardok előállításához magunk fejlesztettünk enzimatisz módszereket, vagy a más módon (pl. királis kromatográfia, kristályosítás) kapott enantiomerek azonosítását spektroszkópiai úton (NMR-spektroszkópia, röntgendiffrakció) óhajtottuk elvégezni.
7. Ligandumcserés királis *vékonyréteg-kromatográfiai* vizsgálatokkal célunk volt a molekulaszervezet hatásának tanulmányozása az elválasztásra.
8. A nemfehérje-alkotó aminosavak főleg *opioid peptidekbe* kerültek beépítésre. Munkánk jelentős célja volt a biológiai hatásvizsgálatokat megelőzően, a peptidekben lévő nemfehérje-alkotó aminosavak konfigurációjának meghatározása. Ehhez a peptidhidrolízist követően az általunk kifejlesztett módszereket kívántuk használni.
9. A hosszú termikus peptidhidrolízis helyett célul tűztük ki rövidebb és hatékonyabb *mikrohullámú hidrolízis* kidolgozását. A módszertől az idő megtakarításán túlmenően a racemizáció csökkenését vártuk.
10. A nemfehérje-alkotó aminosavak egyik kedvező hatása, hogy peptidekbe építve növelik a proteolízissel szembeni stabilitást. Célunk volt a *proteolízis* nyomon követése néhány GNRH (gonadotropin hormon-releasing hormon) és endomorfín analóg esetén, mely vizsgálatok további kiterjedt *in vitro* kísérletek alapját képezték.

## 2. Kísérleti rész

### 2.1. Készülékek

#### Az alkalmazott folyadékkromatográfiai rendszerek:

1. Type M-600 pumpa, Type M-996 detektor, Millennium 2010 és 32 jelfeldolgozó rendszer (Waters, Milford, USA),
2. Type 1525 pumpa, Type 487 detektor, Type 717 automataadagoló, Breeze jelfeldolgozó rendszer (Waters),
3. Type L-6200 pumpa, Type L-3000 detektor, D-6000 HPLC jelfeldolgozó rendszer (Merck, Darmstadt, Germany),
4. Type 325 pumpa, Type 332 detektor, Type 465 automataadagoló (Kontron, Milano, Italy),
5. Type L-6000 pumpa (Merck), Type SPD6AV detektor (Shimadzu, Tokyo, Japan), Type HP 3395 Integrátor (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany).

#### Tömegspektrométerek:

1. MS 902S FAB spektrométer, (AEI, Manchester, Anglia),
2. Quattro II (Micromass UK, Altrincham, Anglia).

#### NMR-készülékek:

Brucker 250 és 500 MHz (Bettendorf, Switzerland).

### 2.2. Kolonnák

**C<sub>18</sub> alapú kolonnák:** *Nucleosil*, 5 µm, (150x4,6 mm), *Nucleosil*, 10 µm, (250x4,6 mm), Macherey-Nagel, Düren, Germany; *LiChrospher 100 RP18*, 5 µm, (125x4,0 mm), *LiChrospher 300*, 10 µm, (250x4,0 mm), Merck; *Vydac 218TP54*, 5 µm, (250x4,6 mm), *Vydac 218TP104*, 10 µm, (250x4,6 mm), The Separations Group, Hesperia, USA; *NovaPak*, 4 µm, (150x3,9 mm), *Symmetry*, 5 µm, (150x4,0 mm), Waters, Milford, USA; *Hyperpep 300*, 5 µm, (250x4,6 mm), *Hypersil ODS*, 5 µm, (250x4,6 mm), (Shandon, Rucaron, Anglia); *Discovery*, 5 µm, (Supelco, Bellafonte, USA); *APEX ODS*, 5 µm, (250x4,6 mm), Jones Chromatography, Hengoed, Anglia.

A C<sub>18</sub> kolonnák legfontosabb fizikai-kémiai adatai a F. 2.2.1. Táblázatban találhatók.

**C<sub>4</sub> alapú kolonna:** *Eurosphere 100*, 4 µm, (250x4,0 mm), Knauer, Berlin, Germany.

#### *Királis kolonnák:*

koronaéter alapvázú: *Crownpak CR(+)*, 5 µm, (150x4.0 mm), Daicel, Tokyo, Japan;

**makrociklusos glükopeptid alapvázú:** *Chirobiotic T*, 5  $\mu\text{m}$ , (250x4,6 mm), *Chirobiotic R*, 5  $\mu\text{m}$  (250x4,6 mm), Astec, Whippany, USA);

**ciklodextrin (CD) alapvázú:** *Chiradex* ( $\beta$ -CD), 5  $\mu\text{m}$ , (250x4,6 mm), Merck; *Cyclobond I 2000* ( $\beta$ -CD), 5  $\mu\text{m}$ , (250x4,6 mm), *Cyclobond I 2000 RSP* (*R,S*-2-hidroxi-propil-éter tartalmú  $\beta$ -CD), 5  $\mu\text{m}$ , (250x4,6 mm), *Cyclobond I 2000 SN* ((*S*)-naftiletil-karbamát tartalmú  $\beta$ -CD), 5  $\mu\text{m}$ , (250x4,6 mm), *Cyclobond III* ( $\alpha$ -CD), 5  $\mu\text{m}$ , (250x4,6 mm), mind Astec;

**cellulóz alapvázú:** *Chiralcel OD* (tris-3,5-dimetilfenil-karbamát tartalmú cellulóz), 5  $\mu\text{m}$  (150x4,0 mm), *Chiralcel OD-RH*, 5  $\mu\text{m}$ , (150x4,0 mm), Daicel; **cellulóz-triacetát**, 10  $\mu\text{m}$ , (250x10 mm), Merck;

**kinin alapvázú, gyenge anioncserélő típusú:** *Prontosil AX-QN-2*, 5  $\mu\text{m}$ , (150x4,6 mm), Bishoff, Leonberg, Germany.

**Vékonyréteg-kromatográfia:** *Chiralplate* lap, 10x10 cm (Macherey-Nagel)

### 2.3. Vizsgált vegyületek és felhasznált reagensek

A fehérjealkotó aminosav enantiomerek Sigma (St. Louis, MO, USA) termékek voltak. A nemfehérje-alkotó aminosavak többnyire fehérjealkotó aminosav vázra épültek vagy egyéb speciális szerkezeti elemet hordoztak. Az első csoportba tartoznak a *glicin, glutaminsav, alanin, fenilalanin, tirozin, triptofán és prolin analógok*, míg a második csoportot alkotják a *tetralin vázas, 1,2,3,4-tetrahidro-izokinolin vázas (Tic), binaftil vázas aminosav analógok* és a  *$\beta$ -aminosavak*. Ezeket az *aminosavakat*, az *alkohol analógokat* valamint a *peptideket* együttműködő partnereink állították elő. Szerkezetük és elnevezésük a „Függelék”-ben (F.2.3.A. és F.2.3.B.), előállításuk módja illetve az erre való hivatkozás a megfelelő közleményeinkben találhatóak. Az aminosavak és a vegyületek magyar elnevezése egyrészt a IUPAC [30], másrészt Erdey-Grúz T., Fodorné Csányi P.[31] és Nyitrai J., Nagy J. [32] útmutatása alapján történt (F.2.3.B.).

Az alkalmazott királis származékképzők, reagensek és oldószerek Sigma, Aldrich (Steinheim, Németország), Merck és Fluka (Buchs, Switzerland) gyártmányúak voltak.

Az enzimek közül a lipáz PS (*Pseudomonas cepacia*) Amano Pharmaceuticals Co. Ltd (Nagoya, Japan), a *Pseudomonas putida*, *Ochrabactum anthopi* (DSM, Geelen, Netherlands), a többi Sigma gyártmányú volt.

### 3. Aminosavak közvetett királis kromatográfiája

A 3.1. Fejezetben röviden áttekintjük az aminosavak közvetett királis kromatográfiájának irodalmi előzményeit, majd a 3.2. Fejezetben bemutatjuk az irodalomban két leggyakrabban használt reagens a 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glükopiranozil-izotiocianát (GITC) és az 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanin-amid (Marfey-reagens, FDAA) alkalmazását a *nemfehérje-alkotó aminosav* sztereoizomerek elválasztásában. Egyúttal rámutatunk e származékképző reagensek alkalmazásának *hátrányaira és korlátaira a nemfehérje-alkotó aminosavak* analízise során.

#### 3.1. Aminosavak közvetett királis kromatográfiájának rövid irodalmi áttekintése

##### 3.1.1. Aminosavak aminocsoporton történő származékképzése

Az aminosavak mindkét funkciós csoportja ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ) alkalmas származékképzésre, ezek közül kétségtelenül az aminocsoport származékképzése a jelentősebb. Az erre vonatkozó fontosabb módszereket a F.3.1.1. Táblázatban foglaltuk össze. Az „aktivált karbonsavak”-on belül jelentősebb alcsoportot képviselnek a savkloridok [33-54], melyekből képződő diasztereomer amidok általában jól elválaszthatók és fluoreszcens változataik a detektálás alsó határának jelentős csökkentését teszik lehetővé. Ugyancsak jó fluoreszcens sajátsággal rendelkeznek a Toyo’oka és munkatársai [55-59] által kifejlesztett benzoxadiazol származékok. A szukcinimidil-észterek [60-64] és a karbonsav anhidridek [65-68] a vizsgált körülmények között stabilis terméket szolgáltatnak, használatuk mégis szűk körű az irodalom szerint. Ugyanez mondható el a karbonsav- és aminosav-származékokról [61,69,70].

A klórformiátok sorában a (-)-mentil-kloroformát [71-77] mind normál-, mind fordított fázisú kromatográfiában jól alkalmazható, míg a (+/-)-1-(9-fluorenil-etil)kloroformát [78-83] nagy előnye a diasztereomer termék jó stabilitása, az eljárás szekunder aminokra is alkalmazható.

Az izotiocianát [84-102] és izotiocianát [103-123] típusú reagensek enyhe reakciókörülmények között általában kvantitatíven, zavaró mellékreakciók nélkül reagálnak és a képződő karbamid és tiokarbamid származékok 250 nm körül jól kimutathatók. Fluoreszcens változataik [84-93, 102, 116-121] a detektálás alsó határának jelentős csökkentését teszik lehetővé. Az izotiocianát-típusú reagensek közül a szénhidrát alapvázú GITC [65, 100, 103-110] az egyik leggyakrabban alkalmazott származékképző. Ha a reakció sztérikusan nem gátolt, szobahőmérsékleten stabilis tiokarbamid-származék képződik, mely igen jó kromatográfiás sajátságokkal rendelkezik. Lindner és munkatársai [122, 123] egy új ciklusos alifás szénhidrogénezen alapuló izotiocianát típusú reagenst fejlesztettek ki.

Az „aktivált haloid”-ot tartalmazó reagensek közül legjelentősebb a Sanger-reagensből származtatható Marfey-reagens és rokon vegyületei [124-137]. Bár a származékképzés nem szobahőmérsékleten (40°C) történik és a reagens hidrolízis terméke zavaró csúcsként jelentkezik a kromatogramon, alkalmazhatóságát az eddig megjelent kb. 150 dolgozat is bizonyítja.

Brückner [125, 128-130, 133] a reagens számos új változatát dolgozta ki, míg Scaloni [137] a módszer automatizálását végezte el.

A detektálás alsó határának csökkentése iránti igény az *o*-ftálaldehid + királis tioltípusú fluoreszcens reagensek egész sorát hozta létre [138-148]. Az eljárás annak ellenére igen nagy népszerűsége tett szert (számos automatizált változatát is megvalósították), hogy a keletkezett diasztereomer stabilitása kicsi (néhány perctől néhány óráig terjed) és szekunder aminokra (aminosavakra) nem alkalmazható.

### **3.1.2. Aminosavak karboxilcsoporton történő származékképzése**

A királis karbonsavak alkohollal észteresíthetők, aminokkal amidkötés kialakítására képesek. Királis alkoholokkal való diasztereomer képzésre példa a (+)-oktán-2-ol [149], (-)-mentol, (+)-1-fenil-etanol és a (-)-bután-2-ol alkalmazása [24, 27].

A királis aminok alkalmazása ennél jóval szélesebb körű. Az amidkötés kialakítására a karboxilcsoport aktiválásához a peptidkémiából jól ismert aktiváló szereket, úgymint a diciklohexil-karbodiimid (DCC), diizopropil-karbodiimid (DIPCDI), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid, stb. alkalmazzuk. A karboxilcsoport származékképzésére szolgáló királis aminok közül (F.3.1.2. Táblázat) elsőként magyar szerzők munkáit említjük. Görög és munkatársai [150] D- és L-*O*-(4-nitrobenzil)tirozin-metil-észtert míg Ladányi és munkatársai [151] (1*R*,2*R*)-2-amino-1-(4-nitrofenil)-1,3-propándiolt alkalmaztak a megfelelő kapcsoló szerekekkel. Mint a F.3.1.2. Táblázatból látható, az újabb királis reagensek főként fluoreszcens sajátosságúak, és ezt elsősorban a naftalin, benzoxazol vagy benzoxadiazol gyűrűk jelenléte biztosítja [153-172]. A hidrazin [174] és trifluormetán-szulfonát-csoportot [175] tartalmazó reagensek használata alig terjedt el.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a királis aminosavak aminocsoportjának származékképzésére szolgáló reagensek közül néhány széleskörű alkalmazást nyert. A karboxilcsoport származékképzésében az alkoholok mellett főként az aminok játszanak szerepet. Ez a típusú származékképzés kevésbé elterjedt, és ezt az irodalmi alkalmazások jóval kisebb száma is tükrözi.

### 3.2. Nemfehérje-alkotó aminosav enantiomerek közvetett folyadékkromatográfiás elválasztása

#### 3.2.1. A 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glükopiranozil-izotiocianát (GITC) és 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanin-amid (Marfey-reagens, FDAA) származékképzők alkalmazása

Az általunk vizsgált nemfehérje-alkotó aminosavak jelentős része konformációsán gátolt [1-31], és ez reakciókészségüket is befolyásolta. Ezért a fehérjealkotó aminosavakra az irodalomban leírt származékképzési reakciókon változtattunk. A GITC-vel való származékképzés Nimura [103] által kidolgozott módszerét a reakcióidő (1,5–6 óra), a reagens/aminosav mólarány (2/1, 5/1) és sok esetben a hőmérsékletet (40°C) növelésével változtattuk meg. Ugyancsak megváltoztattuk a Marfey [124] által kidolgozott FDAA-val való származékképzést, elsősorban a reakcióidő (5 óra–7 nap) és a reagens/aminosav mólarány (10/1, 15/1) növelésével. Tapasztalatunk szerint FDAA esetén a hőmérséklet további emelése nem volt járható út, 40°C felett számos mellékreakció lépett fel. Hasonló tapasztalatokat írtak le Szókán és munkatársai [126,127]. Sztérikusan erősen gátolt vegyületek esetén ( $\alpha$ -szubsztituált aminosavak, nagy térkitöltésű csoportok jelenléte az aminocsoport közelében) azonban több órás vagy több napos reagáltatás sem eredményezett 100%-os konverziót. A két kiralitáscentrumot tartalmazó  $\alpha$ - és  $\beta$ -aminosav sztereoizomerek elválasztása szintén nehézségekbe ütközött.

Alapvető követelmény az aminosavak *fordított fázisú analízisének* a reprodukálhatóság érdekében az ionizálható csoportok —jelen esetben a szabadon maradó karboxilcsoport— protonáltságának állandó szinten tartása. A pH befolyását és a pH szabályozására szolgáló adalékok minőségének a retencióra gyakorolt hatását tanulmányozva megállapítottuk, hogy vizes foszfát- vagy acetátpuffert valamint 0,1% trifluor-ecetsavat (TFA) tartalmazó víz mozgófázis adalékok közül a TFA használata tűnt előnyösnek a retenció és felbontás optimalizálása szempontjából [7,8]. Ez az előny további kedvező hatással párosult, ha a kromatografált termékből az eluens eltávolítását (preparatív célú elválasztás), tömegspektrométerrel kombinált analízis szükségességét vagy egyáltalán az eluenskészítés technikáját nézzük.

Szerves módosítóként MeCN-t, MeOH-t és néhány esetben tetrahidrofuránt (THF) alkalmaztunk. Az eluensbe kevert szerves módosító mennyisége jelentősen befolyásolta a nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek GITC és FDAA származékának retenciós viselkedését. Egy szűk szerves koncentrációtartományon belül  $\ln k$  lineárisan változott a szerves módosító tartalommal, ami tipikusan hidrofób kölcsönhatásokon alapuló kromatográfiás viselkedésre utalt. A szerves módosítók (MeCN–MeOH) cseréje jelentős szelektivitásbeli növekedést eredményezett, ami általánosan igaz poláris vegyületek elválasztása esetén [1-31].

### 3.2.2. Nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek elválasztása GITC, illetve FDAA származék formájában

Ebben az alfejezetben röviden összefoglaljuk a nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek GITC és FDAA származék formájában végzett elválasztásának eredményeit és rámutatunk *alkalmazásuk hátrányaira* illetve *korlátaira*.

Az alább felsorolt eredeti közleményeink [7], 1. és 2. ábra, [3] és [15] a **Glu analóg**, a [31], 4. Táblázat] a **Gly és Ala analóg sztereoizomerek**, valamint a [1, 4, 5, 9, 11, 14, 17, 24, 31] a **Phe analóg sztereoizomerek** elválasztásának eredményeit tartalmazzák. A **Phe analóg sztereoizomerek** válogatott adatait a 3.2.1. Táblázatban külön összefoglaltuk. A vegyületek retencióját elsősorban *hidrofób jellegük* szabta meg (például a fluor- és metil-szubsztituensek száma). A két származékképző közti hatékonyságbeli különbséget a felbontás és a másodikként eluálódó csúcs retenciós idejének együttes figyelembevételével jellemezhetjük, amit Szepesy [177] királis GC kolonnák jellemzésére javasolt. Kevés kivételtől eltekintve, a *Marfey-származékok* rövidebb idő alatt nagyobb felbontással voltak elválaszthatók, mint a *GITC-származékok*. Az eluensalkotók közül a *MeOH* hatásosabb volt, mint az *MeCN*, és a *TFA* hatásosabb volt, mint az *acetát-* vagy *foszfátpuffer*. A *szterikusan gátolt α-MePhe* sztereoizomerek csak részlegesen váltak el (3.2.1.a.b., Táblázat).

A **F.3.2.2. Táblázatban** külön mutatjuk be az aromás gyűrűn és az  $\alpha$ -szénatomon egyaránt szubsztituált **Phe analóg sztereoizomerek** és savamid-származékainak elválasztását [27]. Ennek oka, hogy ezen sztereoizomerek elválasztását preparatív méretben enzimatis rezolválással valósítottuk meg a DSM (Geelen, Hollandia) cég együttműködésével. Az eljárás alapja, hogy a *Pseudomonas putida* vagy az *Ochrabactum anthopi* enzimek a racém savamidból (*S*) konfigurációjú aminosavat termelnek és visszamarad az (*R*) konfigurációjú savamid. Az enzimatis reakció követése, megfelelő időpontban való leállításuk mind az aminosav, mind a savamid királis elválasztását tette szükségessé. A táblázatból látható, hogy GITC származék formájában csak a (34) vegyület nem analizálható. Az összes  $\alpha$ -metil-szubsztituált analóg (26)-(28) és (32)-(34) FDAA származéka csak nagyon lassú reakcióban képződik, 24 óra után a hozam alig éri el a 5-10%-ot. Az  $\alpha$ -metil-szubsztituált analógok enyhe reakciókészsége miatt a GITC-vel való származékképzést is módosítanunk kellett a hőmérséklet és a reakcióidő emelésével (40°C, 1,5–3 óra). Összefoglalóan azt mondhatjuk, hogy az  $\alpha$ -helyzetben hidrogént tartalmazó Phe analóg sztereoizomerek mind GITC-, mind FDAA-származékként elválaszthatók (az FDAA itt is hatásosabb, mint a GITC), az  $\alpha$ -metil-szubsztituált analóg *sztereoizomerek csak GITC-származék formájában* analizálhatók, de a hosszú reakcióidő és magasabb hőmérséklet a mellékreakciók fellépése miatt fokozottabb figyelmet igényel. *Ez új eljárások kidolgozását ösztönözte.*

Több közleményünkből válogatott adatok alapján megfigyelhető, hogy a Tyr [9, 11, 14, 17, 24] (3.2.3. Táblázat), a tetralin-vázás [2, 6, 17, 21, 26, 29] (3.2.3. Táblázat), a Trp [17, 19, 24, 26, 28] (lásd 3.5. Fejezet) és a 1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-vázás aminosav analóg [2, 5, 6, 11, 14, 17, 19, 24, 25] (3.2.4. Táblázat) sztereoizomerek valamint a  $\beta$ -szubsztituált- $\beta$ -alanin sztereoizomerek [30], 4. Táblázat GITC- és FDAA-származékai esetén is a *hidrofóbicitás* az egyik meghatározó tényező a retenció kialakulásában. Általánosan itt is megfogalmazható, hogy a Marfey-származékok rövidebb idő alatt nagyobb felbontással voltak elválaszthatók, mint a GITC-származékok és a MeOH hatásosabb eluensalkotó volt, mint az MeCN. A *szterikus gátlás* hátrányos szerepe például a tetrahydroizokinolin-vázás aminosav analógok esetén,  $\alpha$ -MeTic3 (63) és *treo*- $\beta$ -MeTic3 (65) (GITC-származék), a rossz elválasztásban nyilvánult meg (F.3.2.4.a.,b. Táblázat).

Az  $\alpha$ -szubsztituált Pro analóg sztereoizomerek szintén *szterikusan erősen gátolt* szerkezetűek. Ez főleg reakciókészségüket befolyásolta, GITC-val való reakciójuk 40°C-on 5 napot vett igénybe, míg Marfey-reagenssel 40°C-on 7 nap után is mindössze 5-10%-os konverziót értünk el, így ez utóbbi módszert nem is alkalmaztuk [*nem közölt eredmények*].

Az atropizomer binaftil-származékok (88, 89) közül a H- $\beta$ -Bin-OH (88) sztereoizomerek *csak GITC-származék* formájában ([16], 2. Táblázat), a  $\beta$ -aminosavat képviselő H- $\beta^2$ -Bin-OH (89) sztereoizomerek és észter származékaik *csak FDAA-származék* formájában voltak elválaszthatók ([23], 1. és 2. Táblázat). Új *közvetlen* módszereink viszont jó eredményre vezettek (4.4. Fejezet).

A két kiralitáscentrumot tartalmazó cikloalkán- és alkén-vázás  $\beta$ -aminosav sztereoizomerek [8,12,18,20] (3.2.5. és F.3.5.2. Táblázat), valamint a szintén két kiralitáscentrumot, azaz négy sztereoizomert tartalmazó *eritro- és treo*- $\beta$ -metil(alkil)-szubsztituált Phe-, Tyr-, Trp-, Tic-analógok [9-11,14,22,24,25,28] négy izomerjének elválasztása (3.5.1. Táblázat) nem minden esetben volt sikeres, és a két származékképző sem volt egyformán hatásos (3.5. Fejezet).

Összefoglalóan, az egyszerűbb szerkezetű *nemfehérje-alkotó aminosav* sztereoizomerek GITC- és FDAA-származék formájában többnyire elválaszthatók voltak. A két kiralitáscentrumot tartalmazó illetve *konformációsan gátolt* aminosav sztereoizomerek elválasztása nem minden esetben volt megvalósítható és ez *új származékképző reagensek* kutatására ösztönzött.

### 3.2.3. A diasztereomerek elúciós sorrendje

Az enantiomerek (diasztereomerek) elúciós sorrendje a királis kromatográfia egyik legfontosabb kérdése. A legtöbb esetben kívánatos, hogy a „minor” komponens a fő komponens

előtt eluálódjon, ellenkező esetben már 1%-os enantiomertisztaság kimutatása is nehézségekbe ütközhet.

**GITC-származékok** esetén Nimura [103-106] már első közleményeiben leírta, hogy az általánosan jellemző L<D [(S)<(R)] sorrenddel ellentétben a Ser, His és az Arg ezzel ellenkező sorrendben eluálódott C<sub>18</sub> oszlopról. Az eltérő retenciós sorrendre magyarázatot nem adtak.

Méréseink során az (S)<(R) sorrendtől eltérő elúciós sorrendet a következő aminosavak esetén tapasztaltunk: *α*-MePhe (21), 2-Me-*α*-MePhe (26), 3-MeO-*α*-MePhe (27), *H*-Bin-OH (88), *H*-β<sup>2</sup>-Bin-OH (89) és *H*-β<sup>2</sup>-Bin-OEt (89a). Ezen aminosavak közös sajátága, hogy konformációgátlás vagy más sztérikus okok miatt merev szerkezettel rendelkeztek, és ez a merev szerkezet megváltoztatva a felület hidrofóbicitását és ezáltal az állófázissal való kölcsönhatást okozhatta az elúciós sorrend változását. A 2-CN-*α*-MePhe (28), a hozzá hasonló szerkezetű aminosavakkal (26) és (27) nem mutatott hasonló viselkedést, melynek valószínű magyarázata a -CN-csoport erős hidrophil sajátága, mely módosítja az GITC-aminosav adduktum hidrofóbicitását (F.3.2.2.a. Táblázat). Hasonló okokkal magyarázható, hogy a hidrophilebb (32), (33) savamidok szintén (S)<(R) és nem (R)<(S) sorrendben eluálódtak, mint ahogy a nekik megfelelő szerkezetű karboxilcsoportot tartalmazó analógok (26) és (27) (F.3.2.2.a. Táblázat).

A β-szubsztituált-β-alanin analógok sorában a 3-aminobutánsav (90),(1) analóg (S)<(R), míg a 3-amino-3-ciklohexilpropánsav (96),(6) és 3-amino-3-fenilpropánsav (98),(8) aminosavak GITC-származéka (R)<(S) sorrendben eluálódtak ([30], 4. Táblázat). Az ellentmondás csak látszólagos, mert a Cahn-Ingold-Prelog-szabály alapján a megfelelő atomcsoportok elrendeződése a királis szénatom körül azonos.

A β-aminosavak közül a két kiralitáscentrumot tartalmazó monociklusos cikloalkánvázis aminosavak (100)-(103) (2S)<(2R) illetve a cikloalkén-vázis aminosavak (104) és (105) (6S)<(6R), a biciklusos változataik (106)-(109) (3S)<(3R) elúciós sorrendet mutattak (F.3.2.5.a. Táblázat). Mono- és biciklusos-származékok esetén az elúciós sorrendet az aminocsoporthoz kapcsolódó szénatom konfigurációja szabta meg, ami érthető, mert a származékképzés itt történt. (az elúciós sorrend külön értendő a *cisz*- és *transz*-, valamint a *diendo*- és *diexo*-származékokra).

A **Marfey-származékok** kromatográfiájában sokáig tartotta magát az a nézet, hogy az elúciós sorrend L<D [(S)<(R)] állandó, nem függ az anyagi minőségétől. Ennek magyarázata az volt, hogy D-enantiomerek esetén erősebb belső hidrogénhid kölcsönhatást tételeztek fel, mint L-enantiomer esetén, mely lipofilabb molekulát eredményezett [124]. Fujii és társai [134,135] 1997-ben a Ser és Asp, Harada és társai [136] 2001-ben az Orn esetén írtak le D<L elúciós sorrendet. Szabó [178] PhD Értekezésében az Arg és His esetén az elúciós sorrend pH függését figyelte meg. A Fujii és társai [134] által felállított, NOE-NMR-mérésekkel alátámasztott modell szerint az aminosav (D,L-Val) és az L-alanin-amid α-szénatomhoz kapcsolódó atomcsoportjai a

dinitro-fenil síkjához viszonyítva *cisz-transz* helyzetet vehetnek fel. A *cisz*-típusú adduktumot, mely D-aminosavból keletkezett és nagyobb hidrofóbicitással rendelkezett, az oszlop jobban visszatartotta. A szerzők az Asp és Ser fordított elúciós sorrendjét kivételként kezelték.

*Az L<D [(S)<(R)] sorrendtől eltérő viselkedést először mi írtunk le* 1995-ben [7], majd később újabb eltérő sorrendeket találtunk [17, 19, 27]. A kivételes sorrendet mutató aminosavak a *Gla* (6), a *2-CNPheNH<sub>2</sub>* (31), a *Tcc* (51), a *Hat* (54), a *6-OHTic3* (59), a *7-OHTic3* (60) és a *H-β<sup>2</sup>-Bin-OH* (89). Ezek, az utolsó aminosavat kivéve mind olyan járulékos csoportot (-COOH, -OH, =NH, -CN, -NH<sub>2</sub>) tartalmaztak az alapvegyülethez képest, melyek egyrészt csökkentették a molekula hidrofóbicitását, másrészt további hidrogénhid kölcsönhatások kialakítására voltak képesek. Ez a két hatás együttesen okozhatta a retenciós sorrend változását. *H-β<sup>2</sup>-Bin-OH* (89) esetén, a molekula merev szerkezete (atropizomeria) a valószínű oka az elúciós sorrend változásának, hasonlóan a GITC-származéknál tapasztaltakhoz.

A mono- és biciklusos-cikloalkán- és cikloalkén-vázás *β*-aminosavak (100)-(109) elúciós sorrendje hasonlóan alakul a GITC-származékokhoz (F.3.2.5.b. Táblázat). A *β*-szubsztituált-*β*-alanin analógok ([30], 4. Táblázat) vegyes (S)<(R) (90),(1) illetve (R)<(S) (96),(6); (98),(8) sorrendje GITC-hez hasonlóan a Cahn-Ingold-Prelog-szabály alapján magyarázható.

### 3.3. Új izotiocianát típusú királis származékképző reagens fejlesztése

Az új királis származékképzők szintézisével és alkalmazásával célunk volt a *több kiralitáscentrumot* tartalmazó valamint a *szterikusan gátolt* aminosav sztereoizomerek elválasztásának javítása.

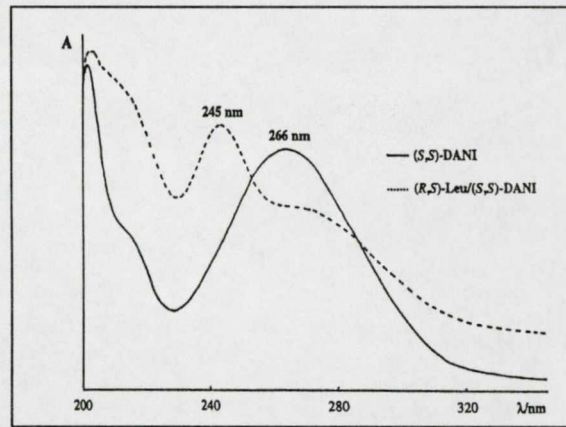
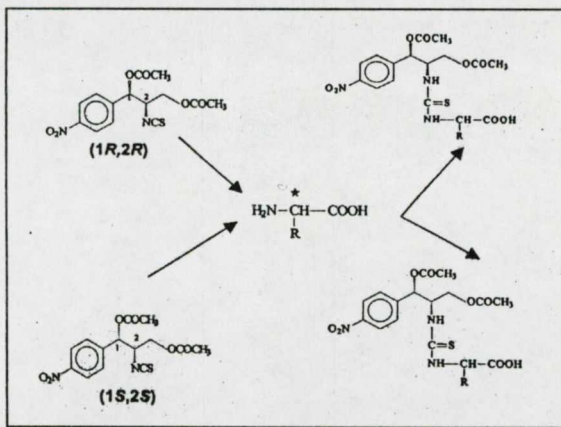
#### 3.3.1. A reagens szintézise és a származékképzés optimális körülményeinek kidolgozása

A klóramfenikol-gyártás köztitermékéből [2-amino-1-(4-nitrofenil)-1,3-propándiol] kiindulva új királis származékképző reagensünk, az (1*S*,2*S*)-illetve (1*R*,2*R*)-1,3-diacetoxi-1-(4-nitrofenil)-2-propil-izotiocianátot (DANI) szintézisét a [32-36] közleményeinkben írtuk le. A reagens nitrogénatmoszféra alatt szilárd állapotban évekig, acetonitrilben készített oldata hónapokig eltartható kémiai és sztereokémiai átalakulás nélkül. A reagens enantiomertisztaságát közvetett módon ismert enantiomertisztaságú (>99,9%) (S)-fenilalaninnal (Sigma) ellenőrizve az ≥99,8%-nak adódott, mindkét reagens enantiomerre nézve.

##### 3.3.1.1. A származékképzés kinetikája aminosavak esetén

A származékképzővel reagált minták egy hétig tárolhatók hűtőszekrényben számottevő bomlás nélkül. A vizsgált körülmények között sem a reagens, sem az elválasztandó minták racemizációját nem tapasztaltuk.

A származékképzési folyamat általános sémáját a **3.3.1. ábrán** mutatjuk be. Az  $(R,S)$ -Leu, mint modell aminosav esetére a **DANI** és a keletkező tiokarbamid *UV-spektruma* az **3.3.2. ábrán** látható. A származékképzési reakció optimalizálásánál először a reakcióelegy *pH*-jának hatását vizsgáltuk. A származékképzési reakciókat MeCN–H<sub>2</sub>O tartalmú (1/1 arányú elegy) rendszerben végeztük. A vizes fázis *pH*-jának beállítására trietil-amint (TEA), nátrium-hidrogén-karbonátot és borátpuffert alkalmaztunk és ezek közül a TEA volt a leghatásosabb. A **3.3.3. ábrán** az  $(R)$ -Val +  $(S,S)$ -DANI reakció *pH* függését szemléltetjük. A *pH* szabályozására TEA-t használva, *pH*=9 alatt a tiokarbamid képződés gyakorlatilag nem játszódott le, ezért további kísérleteinkhez *pH*>11 értéket biztosítottunk (0,4% TEA-oldat).



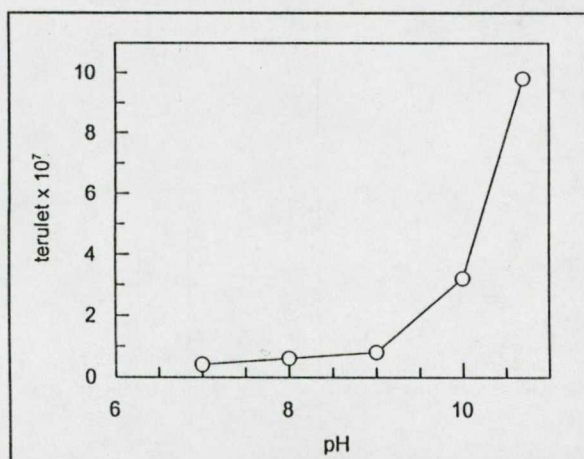
**3.3.1. ábra** Az  $(1S,2S)$ -illetve  $(1R,2R)$ -1,3-diacetoxi-1-(4-nitrofenil)-2-propil-izotiocianáttal (**DANI**) való származékképzés általános sémája

**3.3.2. ábra** Az  $(1S,2S)$ -DANI és az  $(R,S)$ -Leu- $(1S,2S)$ -DANI adduktum *UV-spektruma*

A *reagens felesleg* és a *reakcióidő* együttes hatását a származékképzésre néhány fehérjealkotó aminosavval —Ala (neutrális), Val (neutrális, szterikusan gátolt), Phe (aromás), Asp (savas) és Arg (bázikus)— vizsgáltuk, példaként az  $(R)$ - és  $(S)$ -Val-ra kapott eredményeket a **3.3.4. ábra** szemlélteti. Az ábrán látható, hogy a reakció kezdeti szakaszán  $(S,S)$ -DANI/ $(R)$ -Val vagy  $(S)$ -Val=1/1 mólaránynál kinetikai rezolúció figyelhető meg. A DANI/aminosav mólarányt 2/1 vagy 5/1 értékre emelve, a reakció 2 óra után érte el a telítési szakaszt kinetikai rezolúció nélkül. A reakció teljes lejátszódását, a reagens elegyet TLC-lapra cseppentve, ninhidrin próbával követtük (vagy kromatográfálás során PDA-detektorral 205 nm-en).

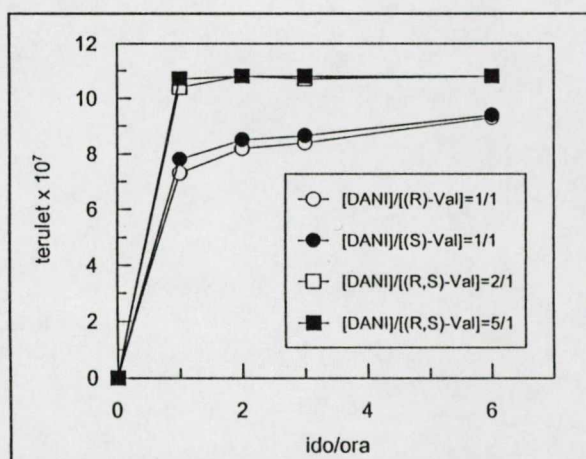
A *hőmérséklet* és a *reakcióidő* együttes hatását a **3.3.5.** és a **3.3.6. ábrán** szemléltetjük. A kísérletekhez  $\alpha$ - és  $\beta$ -aminosavat választottunk. A reakcióelegy *pH*-ját *pH*=11 és a **DANI**/ $(R,S)$ -Val illetve **DANI**/*transz*-Acpc (101) kezdeti mólarányt (2/1) konstans értékre állítva mindkét aminosav esetén 60°C és 2 óra reakcióidő bizonyult optimálisnak. Szobahőmérsékleten a reakció lejátszódásához 7 órára volt szükség. A hőmérséklet további emelése gyorsította ugyan a reakciót, de a származékképző bomlásának termékei zavarták a kromatográfiai analízist. Azokban az esetekben, mikor az aminosav konformációsán gátolt vagy egyéb szterikus okok miatt az aminosavval való reakció lassú volt és nagyobb DANI/aminosav mólarányt (5/1,

10/1) alkalmaztunk, a reagens nagy feleslege zavaró jelként jelent meg a kromatogramon. A reagensfelesleg eltávolításának kitűnő módszere volt a származékképzési reakció lejátszódása után glicinnel való reakciója. A kromatogram elején megjelenő **DANI-Gly** adduktum nem zavarta az analízist. A bemutatott vizsgálatok mindkét reagens enantiomerre azonos eredményekhez vezettek. Az optimalizált körülmények a későbbiekben jól alkalmazhatók voltak más aminosoprotot tartalmazó vegyületekre is.



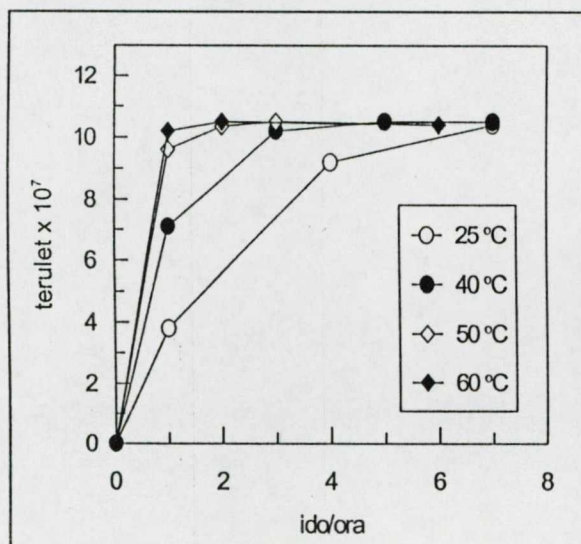
**3.3.3. ábra** Az (R)-Val+(1S,2S)-DANI származékképzési reakció hozamának pH függése

Származékképzés: hőmérséklet, 25°C; reakcióidő, 3 óra; DANI/(R)-Val molarány, 2/1; Kromatográfia: oszlop, Nova Pak; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 245 nm; eluens, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/MeOH=45/55 (v/v).



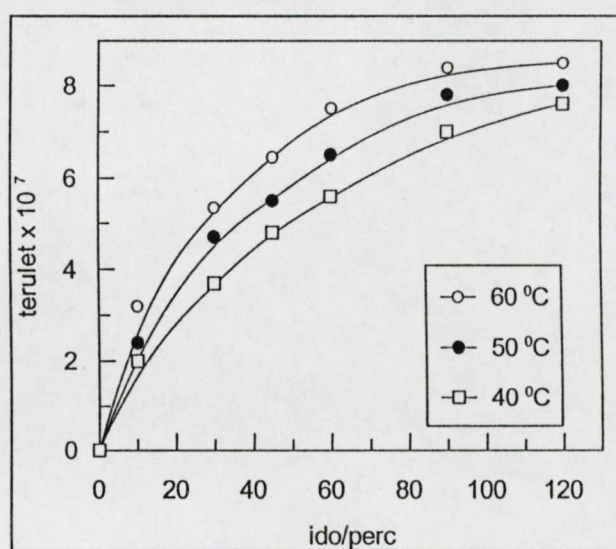
**3.3.4. ábra** A reagensfelesleg és a reakcióidő hatása az (R)-Val és (S)-Val +(1S,2S)-DANI származékképzési reakció hozamára

Származékképzés: pH=11; hőmérséklet, 60°C; reakcióidő, 0-6 óra; DANI/(R) és (S)-Val molarány, 1/1, 2/1, 5/1; Kromatográfia: oszlop, Nova Pak; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 245 nm; eluens, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/MeOH=45/55 (v/v).



**3.3.5. ábra** A hőmérséklet és a reakcióidő hatása az (R,S)-Val+(1S,2S)-DANI származékképzési reakció hozamára

Származékképzés: pH=11; hőmérséklet, 25, 40, 50, 60°C; reakcióidő, 0-7 óra; DANI/(R,S)-Val molarány, 2/1; Kromatográfia: oszlop, Nova Pak; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 245 nm; eluens, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/MeOH=45/55 (v/v)..



**3.3.6. ábra** A hőmérséklet és a reakcióidő hatása az (1S,2S)-transz-2-aminociklopentán-karbonsav+(1S,2S)-DANI származékképzési reakció hozamára

Származékképzés: pH=11; hőmérséklet, 25, 40, 50, 60°C; reakcióidő, 0-7 óra; DANI/transz-Acpc molarány, 2/1; Kromatográfia: oszlop, LiChrospher 100RP18; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 245 nm; eluens, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/MeOH=45/55 (v/v).

A DANI-reagenssel végzett származékképzés optimális körülményeit a [33] és [34] közleményeinkben írtuk le. Kromatografiás analízishez a képződött származékot eluenssel kívánatos mértékben hígítottuk.

### 3.3.2. Aminosav sztereoizomerek folyadékkromatografiás analízise DANI-val képzett diasztereomerek formájában

#### 3.3.2.1. A mozgófázis pH-jának hatása az elválasztásra

Az eluens pH-jának hatását (*R,S*)-Val származékok elválasztására a [33] közleményünk 1. Táblázatában mutatjuk be. Összefoglalóan azt mondhatjuk, hogy tekintettel a felbontás és az analízisidő ( $k_3$ , a reagens retenciós faktora) optimalizálására, pH=2 eluens használata előnyös, amit más aminosavakkal végzett analíziseink is megerősítettek.

#### 3.3.2.2. Fehérjealkotó és nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek elválasztása

A fehérjealkotó aminosavak (*S,S*)-DANI-val képzett származékainak kromatografiás paramétereit a [33] közleményünk 2. és 3. Táblázatában és rendszerezve a (F.3.3.1. Táblázatban) tüntettük fel. Legalább az egyik szerves módosítóval (MeCN vagy MeOH) a Cys kivételével az összes fehérjealkotó aminosav enantiomert sikerült megfelelő mértékben ( $R_S > 1,0$ ) elválasztani. MeOH-tartalmú eluensben a Trp és a Ser, míg MeCN-tartalmúban az Asp, Glu, Asn, Gln elválasztása nem volt sikeres (a jelenségre magyarázatot jelenleg nem találtunk). Azokban az esetekben, amikor mindkét szerves komponenst sikerrel alkalmaztuk, MeOH-lal általában rövidebb idő alatt hasonló vagy jobb felbontást értünk el, mint MeCN-lel. Összehasonlítva az *apoláris* és *poláris* oldalláncú sztereoizomerek elválasztását (F.3.3.1. Táblázat), megállapíthatjuk, hogy a hidrofóbicitásuknak megfelelően az *apoláris* oldallánccal rendelkező sztereoizomerek elúciója erősebb eluenst igényelt, és a  $k$  értékek az Ala és a Phe kivételével főleg MeCN-tartalmú eluensben meglehetősen nagyok voltak. A *poláris* oldalláncúak közül az erősen hidrofil sajátságú Asp, Asn, Glu, Gln még gyengébb eluens rendszerekben is csak közelítették az alapvonalra történő elválasztást (kivétel az Asp MeOH-tartalmú eluensben), a gyengébb hidrofób kölcsönhatások eredményeként. Az *apoláris* oldallánccal rendelkező sztereoizomerekre a felbontás értékek, valószínű az erősebb hidrofób-hidrofób kölcsönhatásoknak köszönhetően általában nagyobb értékek voltak.

A *nemfehérje-alkotó* aminosavak közül a két kiralitáscentrumot tartalmazó  $\beta$ -metil-aminosav és a *cisz*- és *transz*-2-aminociklopentán- és -ciklohexánkarbonsav sztereoizomerek elválasztását vizsgáltuk [34], (F.3.3.2. Táblázat). A reagens hatékonyabbnak bizonyult a  $\beta$ -metil-aminosav diasztereomerek elválasztásában, mint az eddig alkalmazott GITC vagy FDAA

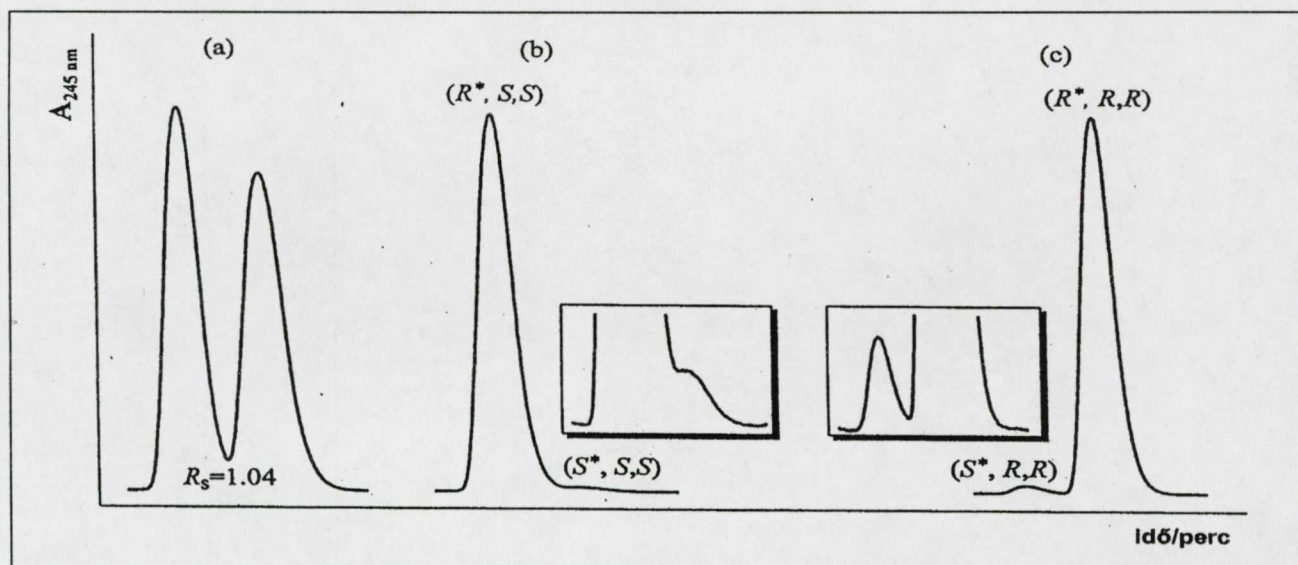
(kivételem a  $\beta$ -MeTic). Hasonló megállapítást tehetünk *cisz*- és *transz*-2-aminociklopentán- és -ciklohexánkarbonsavak (100)-(103) esetében, mind a diasztereomerek elválaszthatóságát, mind a GITC és FDAA-val való összehasonlítást illetően (lásd 3.5.1. Fejezet). A szerves módosítókra vonatkozóan ugyanolyan tapasztalatokat szereztünk, mint a fehérjealkotó aminosavak analízisének, azaz a MeOH sokkal hatékonyabbnak bizonyult, mint az MeCN.

### 3.3.2.3. Az elúciós sorrend

Tanulmányoztuk az (*S,S*)-DANI-val képzett diasztereomer tiokarbamidok elúciós sorrendjét, de általános szabályszerűséget nem tudtunk megállapítani. A savas karakterű aminosavakra Asp és Glu (*R*)<(*S*) sorrendet határoztunk meg. A semleges aminosavak többsége (*R*)<(*S*) sorrendben eluálódott. Kivételek az Asn, Gln, Trp, melyek az  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-csoport mellett egy további, de nem bázikus =NH vagy -NH<sub>2</sub> funkciós csoportot tartalmaztak. A bázikus aminosavak, Arg, Lys és His (*S*)<(*R*) sorrendben eluálódottak (kivételem a Lys MeOH-tartalmú eluensben).

Az aromás aminosavak, a Phe és Tyr közül a Phe szokatlan kromatográfiás viselkedést mutatott. MeCN tartalmú eluensekkel nemcsak az  $R_S$  érték volt kicsi, szemben a MeOH-lal elért eredménnyel ( $R_S = 2,67$ ), de a diasztereomerek elúciós sorrendje is változott az MeCN-tartalom függvényében ([33], 3. Táblázat). Tyr esetén a szerves módosító cseréje MeOH-ról MeCN-re az elúciós sorrend megfordulását eredményezte, de itt a felbontás nem csökkent olyan mértékben, mint Phe esetén.

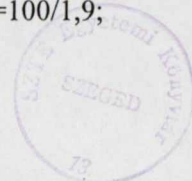
### 3.3.2.4. A megfelelő elúciós sorrend megválasztásának lehetősége



### 3.3.7. ábra. A megfelelő elúciós sorrend megválasztása Val példáján bemutatva

Oszlop, NovaPak C<sub>18</sub>; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 245 nm; eluens, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/MeCN=68/32 (v/v); (a), (*R,S*)-Val+(*S,S*)-DANI vagy (*R,S*)-Val+(*R,R*)-DANI; (b), [(*R*)-Val+(*S,S*)-DANI]/[(*S*)-Val+(*S,S*)-DANI]=100/1,2; (c), [(*R*)-Val+(*R,R*)-DANI]/[(*S*)-Val+(*R,R*)-DANI]=100/1,9;

\* az aminosav konfigurációját jelöli.



Enantiomerszennyezés kimutatásánál és főleg mennyiségi meghatározáskor fontos, hogy megválaszthassuk az elúciós sorrendet. Perry és munkatársai [179] kimutatták, hogy amennyiben a szennyezés a főkomponens előtt eluálódik, akkor kimutathatósága 3-4 nagyságrenddel javulhat. Az elúciós sorrend megfordíthatósága lehetővé teszi a megbízható kiértékelést akár nem teljesen ideális felbontás ( $R_S \leq 1,00$ ) esetén is. A **3.3.7. ábrán** az elúciós sorrend megválasztását mutatjuk be (*R,R*)- és (*S,S*)-DANI alkalmazása esetén.

A detektálás alsó határát Val esetén 245 nm-en 3/1 jel/zaj viszony mellett 3 pmol-ban (0,16 nmol/ml) határoztuk meg (0,1% minor komponens a főkomponens mellett). Figyelembe véve a kapott jel nagyság értékeket, a többi aminosavra hasonló kimutatási határértékek állapíthatók meg.

### 3.3.2.5. A kiralitáscentrumok távolságának hatása az elválaszthatóságra

A kiralitáscentrumok molekulán belüli távolságának hatását a felbontásra a *cisz*- és *transz*-2-amino-1-(hidroximetil)ciklohexanol (**I**) és (**II**) valamint a *cisz*- és *transz*-2-(amino-metil)ciklohexanol (**III**) és (**IV**) példáján mutatjuk be (**3.3.8. ábra**) [36]. Az utóbbi esetben

	alkohol	n	m	$R_S$	alkohol	n	m	$R_S$
	<b>I</b> ( <i>cisz</i> )		0	1	1,61	<b>II</b> ( <i>transz</i> )	0	1
<b>III</b> ( <i>cisz</i> )		1	0	0,63	<b>IV</b> ( <i>transz</i> )	1	0	0,40

**3.3.8. ábra.** A kiralitáscentrumok (csillaggal jelezve) távolságának hatása a felbontásra

**I.** *cisz*-2-amino-1-(hidroximetil)ciklohexanol, **II.** *transz*-2-amino-1-(hidroximetil)ciklohexanol, **III.** *cisz*-2-(amino-metil)ciklohexanol, **IV.** *transz*-2-(amino-metil)ciklohexanol

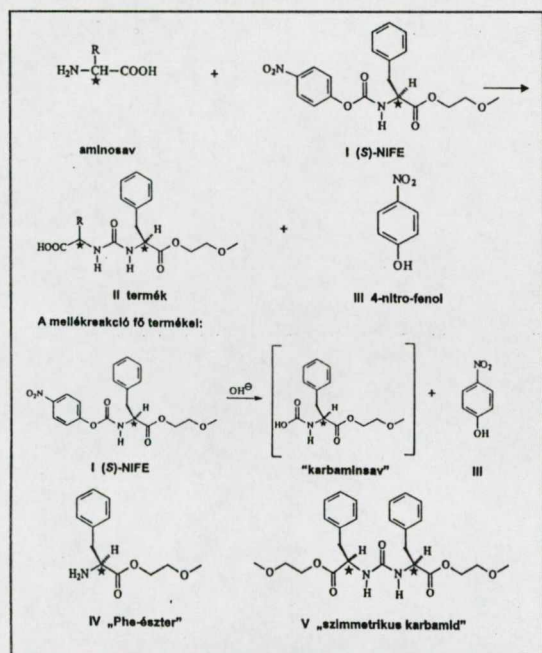
Oszlop, NovaPak C<sub>18</sub>; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 245 nm; eluens, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/MeOH=55/45 (v/v); n és m, a  $-(CH_2)-$  csoportok száma.

az amino funkcióscsoport, vagyis a származékképzéskor a reakciócentrum szerepét betöltő csoport nem közvetlenül kapcsolódik a kiralitáscentrumhoz. Összehasonlítva az (**I**) és (**III**), valamint a (**II**) és (**IV**) helyzeti izomereket, megállapíthatjuk, hogy a belőlük származó tiokarbamidok közötti leglényegesebb különbség a reagensben és az aminoalkoholban lévő kiralitáscentrumok eltérő távolsága, ami az amino-metilcsoportot tartalmazó diasztereomerekben (**III**) és (**IV**) egy szénatomnyival hosszabb (**3.3.8. ábra**). Ezekre a vegyületekre lényegesen kisebb felbontásokat kaptunk, ami igazolja azt a tényt, hogy a kiralitáscentrumok optimális távolsága a diasztereomerekben (ötatomnyi), a jó elválaszthatóság feltételei közé tartozik.

### 3.4. Új „aktív uretán” típusú királis származékképző reagens fejlesztése

#### 3.4.1. A reagens szintézise és a származékképzés optimális körülményeinek kidolgozása

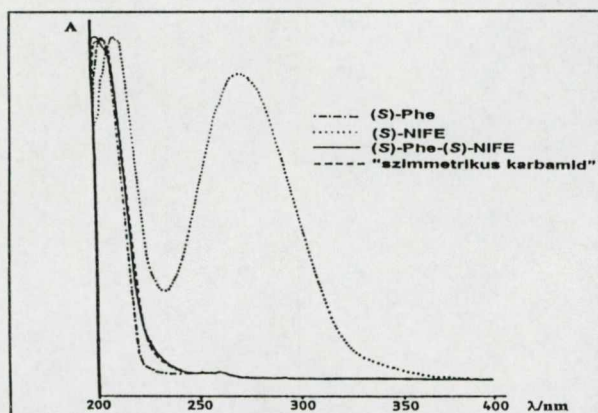
Az (*S,S*)-DANI reagenssel sikeresen oldottuk meg néhány két kiralitáscentrumot tartalmazó  $\beta$ -metil-aminosavak analízisét. Az újabb reagens fejlesztését a *sztérikusan erősen gátolt* aminosavak GITC és FDAA származékképzőkkel szemben mutatott renyhe reakciókészsége és elválasztásuk sikertelen vagy rendkívül hosszú idejű volta indokolta. Az új „aktív uretán” típusú királis származékképző fejlesztését a Solvay-Peptisyntha (Brussel) munkatársaival közösen végeztük. A módszerfejlesztés és alkalmazás körülményeit a [37-42] közleményeinkben írtuk le. Az (*S*)-*N*-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil-észter [(*S*)-NIFE] reagens szilárd formában stabilis, vízmentes, dioxános oldata 6°C-on bomlás nélkül két-három hétig tartható el. A reagens enantiomer tisztasága közvetett módon, ismert tisztaságú (>99,9%) fenilalaninnal (Sigma) meghatározva 99,8 %-nak adódott.



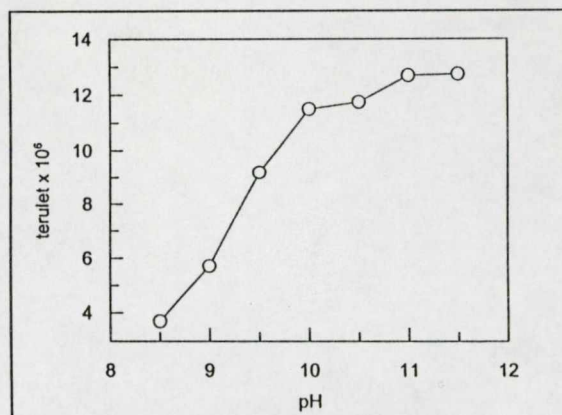
3.4.1. ábra (*S*)-*N*-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil-észter [(*S*)-NIFE] reagenssel való származékképzés általános sémája

Hasonlóan a DANI-val végzett mérésekhez a származékképzés és a kromatográfiai elválasztások körülményeit itt is optimalizáltuk. A származékképzési folyamat általános sémáját a 3.4.1. ábrán mutatjuk be. Mint az ábrából látható, a származékképzési főreakciót legalább három melléktermék keletkezése kísérte. Ez a származékképző nem teljesíti azon a „Bevezetőben” megfogalmazott követelményt, hogy a reakció csak egy termékhez vezessen, azonban számtalan előnye indokolta használatát. A melléktermékek közül a 4-nitrofenol (III) a kromatogram

elején jelentkezett, és vele csaknem egy időben eluálódott a fenilalanin-metoxietil-észter (IV). Az *N,N'*-bisz-(3-fenilpropionsav-metoxietil-észter-2-il)karbamid (V, „szimmetrikus karbamid”), mint apoláris termék a kromatogram végén jelent meg. A legtöbb aminosav diasztereomerpár a 4-nitrofenol és a „szimmetrikus karbamid” közt jelent meg a kromatogramon (példa: [37], 3. ábra).



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



**3.4.3. ábra** Az (S)-Phe+(S)-NIFE származékképzési reakció hozamának pH függése

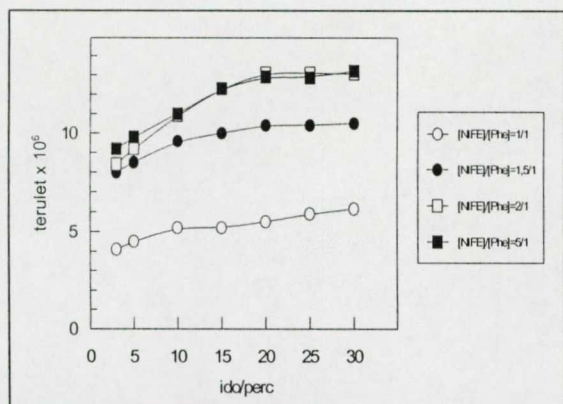
Származékképzés: hőmérséklet, 25°C; reakcióidő, 30 perc; (S)-NIFE/(S)-Phe molarány, 2/1; Kromatográfia: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 205 nm; eluens, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/acetonitril (gradienselúció)

Az (S)-Phe, mint modell aminosav (S)-NIFE-vel képzett termékeinek UV-spektruma a 3.4.2. ábrán látható. A fenti mechanizusból következően, a 4-nitrofenil-csoport lehasadásával a termék spektrumában csak a peptidsáv jelentkezett nagy intenzitással, a spektrum 205 nm körül mutatott elnyelési maximumot.

A származékképzés optimalizálásánál először a reakcióelegy pH-jának hatását vizsgáltuk. A pH beállítására alkalmazott adalékok megválasztásánál, figyelembe véve, hogy a reagens dioxánban oldódott jól, foszfát-, borátpufferek vizes oldatai helyett, a pH szabályozására a TEA bizonyult a legmegfelelőbbnek. Az 3.4.3. ábrán az (S)-Phe + (S)-NIFE reakció pH-függését szemléltetjük, a pH beállítására TEA-t használva. A reakcióelegy pH-jának növelésével a termékhozam növekedett és pH>11 értéken érte el a telítési szakaszt, ezért kísérleteinkhez a továbbiakban pH>11 értéket biztosítottunk.

A reagens felesleg és a reakcióidő együttes hatását a 3.4.4. és 3.4.5. ábra szemlélteti. Az ábrákból látható, hogy a termékhozam szempontjából az (S)-NIFE/aminosav molarány sokkal nagyobb szerepet játszott, mint a reakcióidő. Az (S)-NIFE/(S)-Phe arányt 2/1 vagy 5/1 arányra emelve, a reakció 20 perc után teljesnek tekinthető. Más a helyzet, ha konformációsán erősen gátolt aminosavról van szó. Például, az (S)-2-amino-2-metil-3-o-tolilpropánsav (26) esetén az (S)-NIFE/aminosav molarányt 10/1-re kellett emelni, hogy a reakció teljesen lejátszódjon. A reakció teljes lejátszódását a kromatogramon 205 nm-nél a szabad aminosav csúcsának eltűnésével, vagy TLC lapon ninhidrinreakcióval tudtuk követni. Az (S)-NIFE/aminosav molarányt 20/1 értékre emelve a termékhozam nem növekedett tovább érdemlegesen.

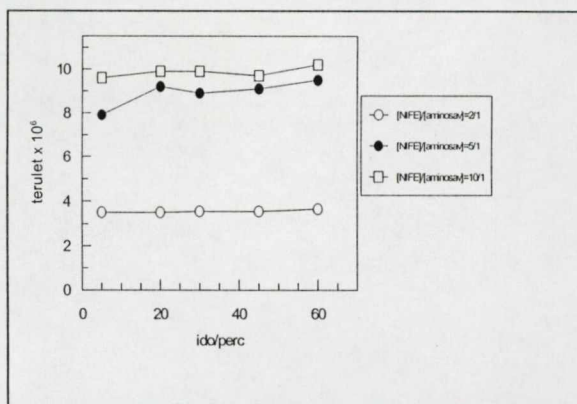
A nagy reagensfelesleg hátránya, a melléktermékek, 4-nitrofenol és „szimmetrikus karbamid”, nagy koncentrációban való keletkezése. Az utóbbi mennyisége jelentősen csökkent-



**3.4.4. ábra** A reagensfelesleg és a reakcióidő hatása az (S)-Phe+(S)-NIFE származékképzési reakció hozamára

Származékképzés: pH=11,2; hőmérséklet, 25°C; reakcióidő, 30 perc; (S)-NIFE/(S)-Phe molarány, 1/1, 1,5/1, 2/1, 5/1;

Kromatográfia: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 205 nm; eluens, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/acetonitril (gradienselúció)



**3.4.5. ábra** A reagensfelesleg és a reakcióidő hatása az (S)-2-amino-2-metil-3-o-tolilpropánsav (26)+(S)-NIFE származékképzési reakció hozamára

Származékképzés: pH=11,2; hőmérséklet, 25°C; reakcióidő, 30 perc; (S)-NIFE/aminosav molarány, 2/1, 5/1, 10/1;

Kromatográfia: oszlop, Vydac 218TP54; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 205 nm; eluens, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/acetonitril (gradienselúció)

hető volt, ha a származékképzési reakció lejátszódása után a reakcióelegyben az (S)-NIFE feleslegét glicinnel elreagáltattuk. A (S)-NIFE-Gly adduktum a kromatogram elején a 4-nitrofenol után, többnyire nem zavaró csúcsként jelentkezett. E módszerre valamint az optimalizált származékképzési reakcióra példa a [38] közleményünkben a 3. ábrán található.

### 3.4.2. Aminosav sztereoiszomerek folyadékromatográfiai analízise (S)-NIFE-vel képzett diasztereomerek formájában

A mozgófázis pH-ja döntően befolyásolta a képződött diasztereomerek kromatográfiai viselkedését. Tapasztalatunk szerint, semleges közegben a retenciós idő nem reprodukálható és a csúcsok felszálló ága erősen aszimmetrikus volt. Mindez a zavaró hatás megszűnt, ha az eluensnek mind a vizes, mind a szerves komponenst alkotó része 0,1% TFA-t tartalmazott, mely biztosította a hasonló ionizációs fokot a kromatográfálás folyamán.

A szerves módosító minőségének hatásáról összefoglalóan azt mondhatjuk, hogy a szerves módosító mozgófázisbeli koncentrációjának növelése csökkentette a retenciót (hidrofób kromatográfiai viselkedés) és az MeCN–MeOH közül a MeOH volt a hatásosabb.

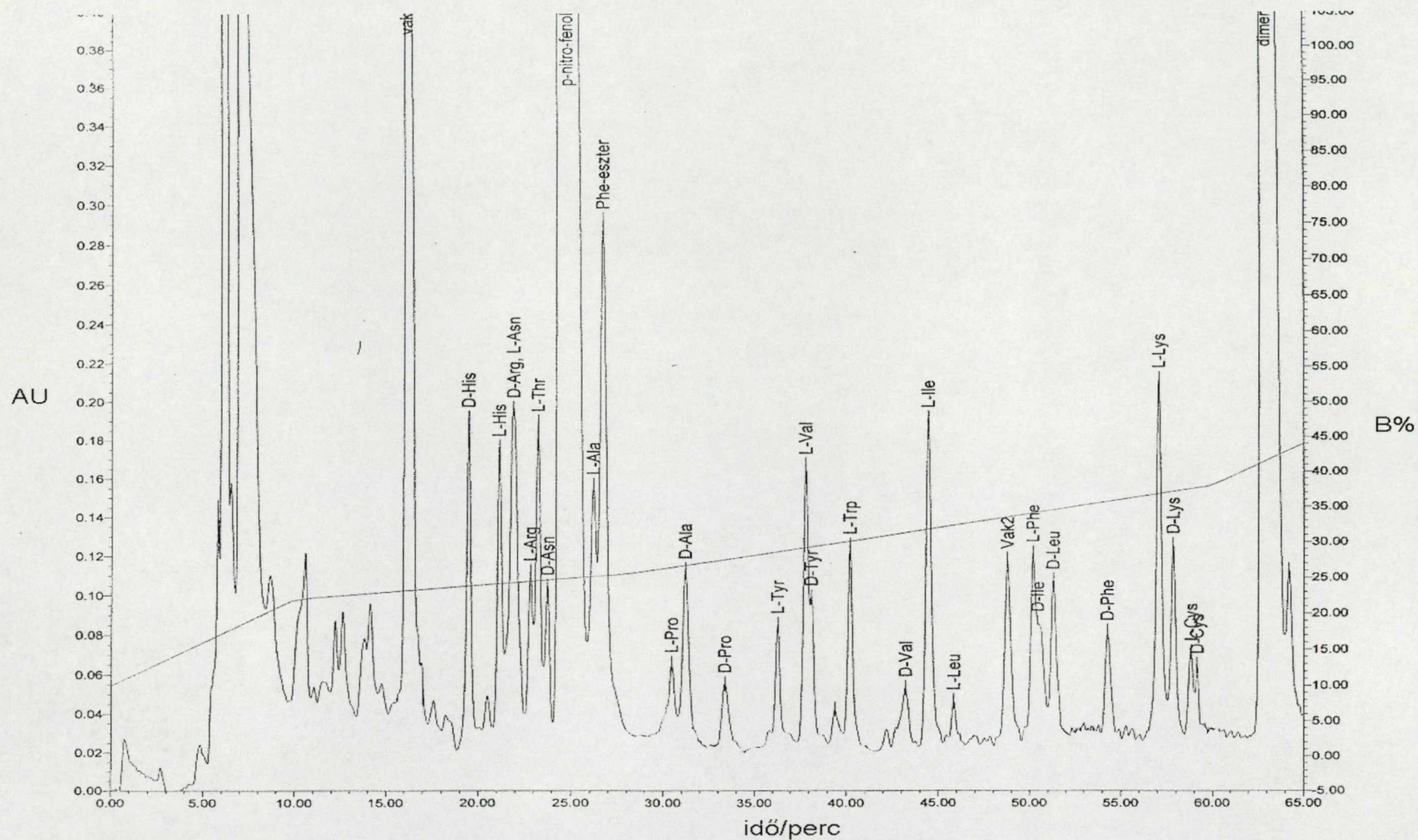
**Fehérjealkotó aminosav** enantiomerek (S)-NIFE származékai elválasztásának kromatográfiai adatait a [37] közleményünk I. és II. Táblázatában foglaltuk össze. Az apoláris és poláris oldalláncú aminosav diasztereomerek, gradienselúciót alkalmazva, mind MeCN-, mind MeOH-tartalmú eluensben elválaszthatók voltak, kivéve az Asn és a Ser diasztereomereket, melyek az MeCN-tartalmú eluensben együtt eluálódtak. A két szerves módosító közül a MeOH bizonyult hatásosabbnak, nagyobb felbontás rövidebb retenciós idővel volt elérhető. A MeOH egyetlen hátránya, hogy néhány esetben az egyik diasztereomer együtt eluálódott a

„szimmetrikus karbamid”-dal, de ez az együttes elúció a gradiensmeredekség változtatásával könnyen kiküszöbölhető volt. A Cys, Lys és a Tyr kettősszármazékot képzett, vagyis ezek az aminosavak az –SH, a láncvégi –NH<sub>2</sub> és a fenolos –OH-csoportjukon is reakcióba léptek az (S)-NIFE-vel és a nagyobb moláris tömegű adduktumok a kromatogram végén jelentek meg. A Tyr esetén mind a mono- mind a kettősszármazék megfelelő gradiens alkalmazásával elválasztható volt. Ezen aminosavak analízise esetén célszerű a reagens/aminosav mólarányt 5/1 arányra beállítani, hogy a származékképzés 100%-os legyen. A gradienselúciós technika alkalmazásával a fehérjealkotó aminosav diasztereomerek többségének elválasztására (kivétel az Asn, Gln, Asp, Glu) a 3.4.6. ábrán mutatunk be példát.

Az elúciós sorrendet tekintve, savas aminosavak Asp és Glu retenciós sorrendje (S)<(R). A bázikus aminosavak közül a kettősszármazékot képző Lys elúciós sorrendje szintén (S)<(R), míg az Arg és His, melynél további hidrogénhidás kölcsönhatásokban résztvevő –NH<sub>2</sub> és =NH csoportok is vannak, (R)<(S) sorrendben eluálódtak. A semleges aminosavak elúciós sorrendje is (S)<(R), kivétel a két további hidrogénhid kapcsolatra hajlamos semleges –NH<sub>2</sub>-csoportot tartalmazó Asn és Gln. Ez arra enged következtetni, hogy a fehérjealkotó aminosavak elúciós sorrendjét az állófázissal létrejövő kölcsönhatásaik közül valószínűleg a hidrogénhid kölcsönhatások befolyásolták. A Cys (R)<(S) elúciós sorrendje nem jelent kivételt (Cahn-Ingold-Prelog-szabály).

Az adott kromatográfiai körülmények között, MeOH szerves módosító jelenlétében néhány aminosav esetén meghatároztuk a kimutatás alsó határát. Ez az érték (S)-Phe-re 205 nm-nél, 3/1 jel/zaj viszony mellett 30 pmol-nak adódott. Figyelembe véve, hogy a kapott jel nagyság értékek azonos aminosav koncentrációknál közel azonosak, ez az érték más aminosavakra is érvényesnek tekinthető.

A *nemfehérje-alkotó* aminosavak közül elsőként az aromás gyűrűn és az α-szénatomon egyaránt szubsztituált Phe analóg sztereoizomerek és savamid származékaik (16, 24-34) elválasztását tárgyaljuk [38], melyek analízise a GITC- és FDAA-származék formájában nehézségekbe ütközött (3.2 Fejezet). Az (S)-NIFE-származékok kromatográfiai elválasztása gradienselúcióval mind MeCN-, mind MeOH-tartalmú eluensben megvalósítható volt (kivéve a (26), MeOH-tartalmú eluens esetén) (F.3.4.1. Táblázat). A (34) analóg sztereoizomerek, amelyek fontos farmakonok kiindulási anyagai, mind a *közvetett*, mind a *közvetlen* módszerek közül egyedül (S)-NIFE- származék formájában voltak elválaszthatók. Az elúciós sorrend az aminosav és a savamid származékok esetén egyaránt (S)<(R), ha az α-szénatom hidrogén szubsztituenst tartalmaz. Ugyanezen analógok α-metil-szubsztituált származékai (R)<(S) sorrendben eluálódtak. Ennek valószínű magyarázata az α-metil-szubsztitúció okozta merev szerkezet, mely jelentősen befolyásolta az adduktum alakját (felületét) és hidrofóbicitását.



**3.4.6. ábra** Fehérjealkotó aminosav enantiomerek elválasztása (S)-NIFE származék formájában

Oszlop, Vydac 218Tp54 C<sub>18</sub>; áramlási sebesség, 1.0 ml/perc; detektálás, 205 nm; eluens, **A**, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O, **B**, 0,1% TFA acetonitrilben, gradienselúció, 0 perc 10% **B**, 10 perc 22% **B**, 28 perc 25,5% **B**, 40 perc 30% **B**, 50 perc 34% **B**, 60 perc 38% **B**, 70 perc 50% **B**.

A szekunder aminosavak sorába tartozó **Trp-analóg (51),(19); (52),(18)** és **Tic-analóg ((57)-(63),(11)-(16))** sztereoizomerek (*S*)-NIFE-származék formában sokkal hatásosabban elválaszthatók, mint akár GITC-, akár FDAA-származék alakjában ([39], 1. és 2. Táblázat). Külön meg kell említeni az  $\alpha$ -MeTic3 (63),(13) kitűnő elválasztását, melynek merev szerkezete nem kedvezett az eddig alkalmazott származékképzési reakcióknak.

A [39] közleményünk 2. és 3. ábráján bemutatjuk, hogy a 6-hidroxi-1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-3-karbonsav (59),(15) és a 7-hidroxi-1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-3-karbonsav (60),(16) fenolos -OH-csoportjával képződő kettősszármazék a kromatográfiai körülmények megfelelő optimalizálásával a monoszámazéktól elválasztható.

Ugyancsak a szekunder aminosavak sorába tartozó néhány **Pro (67),(1); (68),(2)**, **pipekolinsav ((69)-(72),(3)-(6))**, **piperazin- (73),(7); (74),(8))**, **morfolin- (75),(9)- és tiomorfolin-karbonsav (76),(10)** sztereoizomerek elválasztására mutatunk be példát ([41], III. és IV. Táblázat). A mozgófázisban mind az MeCN-, mind a MeOH-tartalom csökkentése a *k*,  $\alpha$  és  $R_S$  növekedését vonta maga után, igazolva a hidrofób kölcsönhatások jelentőségét az elválasztásban. A két **Pro** analóg közül a hidrofilabb (67),(1) sztereoizomerek elválasztása sokkal „gyengébb” eluenst igényelt. A ((69)-(72),(3)-(6)) **Pip** analógok közül a telítetlen (69),(3) és a hidroxilcsoportot tartalmazók (71),(5), (72),(6) hidrofilabb sajátságuknak megfelelően hamarabb eluálódtak, mint maga a **Pip**, ezért a megfelelő felbontás eléréséhez (71),(5) és (72),(6) esetén „gyengébb” eluenst alkalmaztunk. A piperazin-vázis analógok (73),(7), (74),(8) a **Pip**-hez (70),(4) viszonyítva jelentősen később eluálódtak. Ez arra utal, hogy ebben az esetben mindkét „iminocsoport” reagált a származékképzővel, és a kettősszármazéket az oszlop jobban visszatartotta, amelynek a keletkezését HPLC-MS módszerrel is igazoltuk. A (73),(7) és (74),(8) viszonylatában a -CH<sub>3</sub>-csoport hidrofóbicitást növelő sajátsága érvényesült. A (75),(9) és (76),(10) analógok esetén, az oxigénatomok és kénatomok beépülése növelte a molekula hidrofilitását és ezáltal a **Pip**-hez (70),(4) viszonyítva a retenció csökkent. Az =NH (imino)- és fenolos -OH-csoporttal ellentétben a telített vázhoz kapcsolódó alkoholos -OH-csoportok (67),(1); (71),(5); (72),(6) nem reagáltak a származékképzővel, nem tapasztaltunk kettősszármazék-képződést. Az alifás jellegű alkoholos csoportok csekély reakciókészségét más esetekben is megfigyeltük [6.3. Fejezet]. Az *elúciós sorrend* minden esetben (*S*)<(*R*) volt.

A szterikusan erősen gátolt,  $\alpha$ -szubsztituált **Pro** analóg sztereoizomerek elválasztását a **F.3.4.2. Táblázatban** mutatjuk be [*nem közölt eredmények*]. Mint az előző fejezetekben láttuk, ezen analógok rendkívül erős szterikus gátlása akadályozta a GITC-vel és FDAA-val való reakciót. (*S*)-NIFE-vel a származékképzés szobahőmérsékleten tízszeres reagensfelesleg mellett 20 perc alatt lejátszódott, és az (*S*)-NIFE felesleget, ha zavarta a kromatografálást, Gly-nel

távolítottuk el. A képződött diasztereomerek gradienselúcióval, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/MeCN eluens rendszerben, a legtöbb esetben  $R_S \sim 1,5$  körüli vagy nagyobb felbontás értékkel voltak jellemezhetők [kivételet a (80)]. A hatékonyabb MeOH helyett MeCN használatát azért választottuk, mert néhány esetben az egyik diasztereomer MeOH-tartalmú eluensben együtt eluálódott a „szimmetrikus karbamid”-dal.

A F.3.4.2. Táblázat adatai a hidrofóbicitás meghatározó szerepére utalnak az elúcióban. Alifás szubsztitúció esetén az alkil lánc hossza és telítettségének mértéke a retenció meghatározója. Az  $\alpha$ -halo-benzil-szubsztituált analógok F-, Cl-, Br-szubsztituens sorrendben eluálódtak míg metilnaftil-szubsztituált analógok mutatták a legnagyobb visszatartást. A  $k$  növekedésével párhuzamosan nem nőtt  $R_S$  értéke, mivel a szubsztituensek térkitöltésének növekedésével a csúcshélesedés is egyre nagyobb mértékűvé vált.

Az elúciós sorrend  $\alpha$ -MePro (68) és  $\alpha$ -PrPro (77) esetén (S)<(R), a többi sztereoizomer esetén (78)-(87) (R)<(S). Az  $\alpha$ -allil-,  $\alpha$ -benzil- és  $\alpha$ -naftil-szubsztituált analógoknak (78)-(87) a Cahn-Ingold-Prelog-szabály alapján változott meg a konfigurációjuk, de az atomcsoportok elrendeződése a királis szénatom körül ugyanaz maradt, mint  $\alpha$ -metil-szubsztitúció esetén.

A  $\beta$ -metil(alkil)Trp analóg sztereoizomerek [40] elválasztását a 3.5. Fejezetben tárgyaljuk.

A  $\beta$ -szubsztituált- $\beta$ -alanin analóg sztereoizomerek (90)-(98) (S)-NIFE származékainak kromatográfiás adatait a F.3.4.3. Táblázatban mutatjuk be [*nem közölt eredmények*]. A képződött diasztereomereket gradienselúcióval 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/MeCN eluens rendszerben választottuk el. Az elválasztást Discovery C<sub>18</sub> és a Hyperpep 300 C<sub>18</sub> oszlopon is elvégeztük. A Hyperpep oszlopon alkalmazott kisebb meredekségű gradiens valamelyest jobb felbontást eredményezett. Itt jegyezzük meg, hogy a (94) és (97) aminosavak két királis szénatomot tartalmaztak, de a négy sztereoizomer elválasztásának semmi jelét nem tapasztaltuk (a GITC- és FDAA-származékok hasonló viselkedést mutattak, ezért ezen eredményeket a 3.2. Fejezetben nem is tüntettük fel. Ezen sztereoizomerek elválasztása egyedül *közvetlen* kromatográfiás módszerrel „Prontosil AX-QN-2” oszlopon volt megvalósítható).

Az elúciós sorrend a (90) aminosav esetén (S)<(R), míg a (96) és (98) aminosavak esetén (R)<(S) volt. Az ellentmondás a Cahn-Ingold-Prelog-szabály alapján értelmezhető.

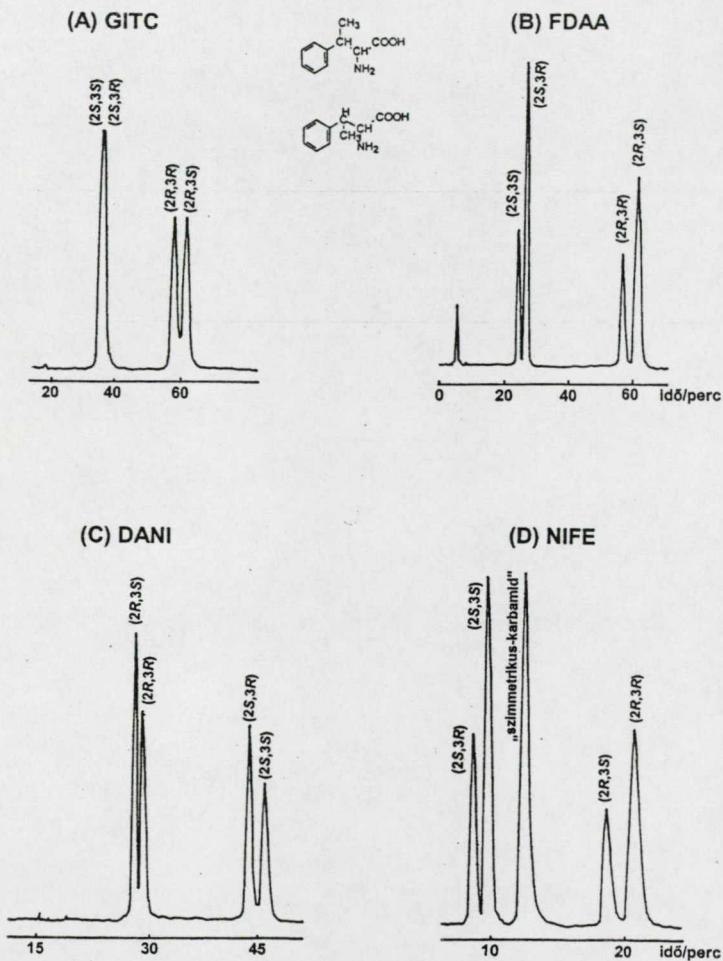
### 3.5. Közvetett folyadékkromatográfiás elválasztások összehasonlítása

#### 3.5.1. Az eritro- és treo- $\beta$ -metil(alkil)-aminosav enantiomerek elválasztása közvetett kromatográfiás módszerekkel

A  $\beta$ -metil-aminosavak, mint a legújabb opioid peptidek építőelemei, négy optikai izomer formában fordulnak elő. A peptidszintézisnél általában tiszta D,L-eritro- vagy D,L-treo- $\beta$ -metil-

aminosavat használtunk, ezért elvileg a szintézis után egy peptidepimer párt kaptunk. A peptidszintézis során azonban a különböző lépésekben (védőcsoport beépítése az aminosavra, az aminosav kapcsolása, a védőcsoport eltávolítása a peptidről, peptidhidrolízis) mindig létrejöhet racemizáció, és az amint a **F.2.3.A „ $\beta$ -metil aminosavak konfigurációja”** című ábrán látható a C2 szénatomon bekövetkezve, például *L-eritro-* módosulattól *D-treo-*sztereoizomerhez vezet. Ezért a  $\beta$ -metil aminosavak analízisére olyan módszer fejlesztése volt a cél, mellyel mind a *négy sztereoizomer elválasztása* megoldható. Az eddig tárgyalt,  $\beta$ -metil-aminosavakra kidolgozott közvetett kromatográfiás módszereket a **F.3.5.1. Táblázatban** foglaltuk össze és a **3.5.1.-3.5.4. ábrákon** mutatjuk be. A Táblázatok és az ábrák válogatott, optimalizált elválasztásokat tartalmaznak. Az eredményekből a következő általános következtetések vonhatók le:

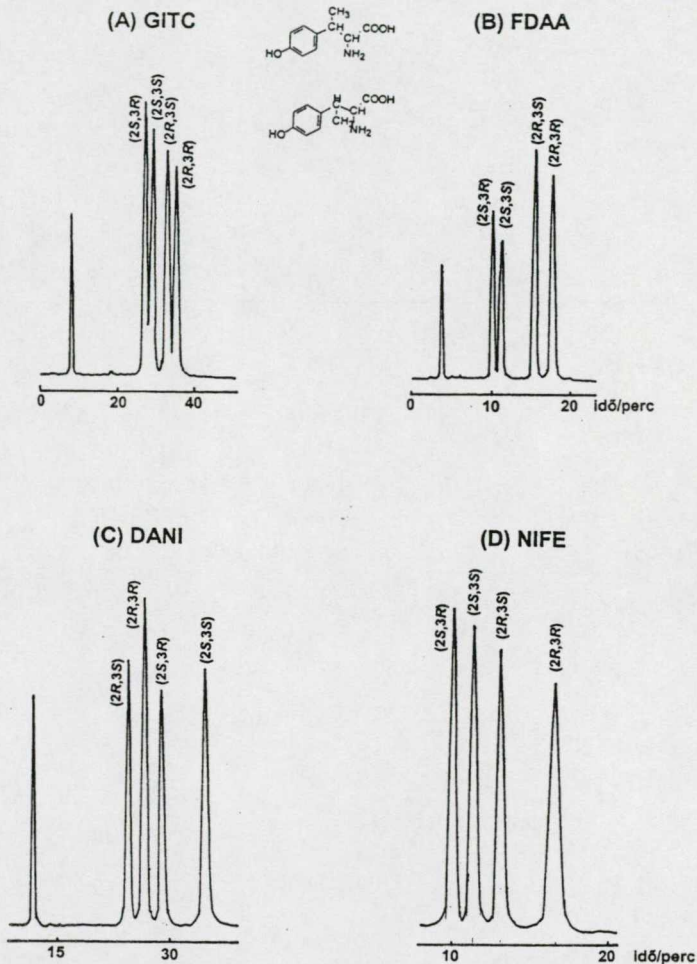
1. Az *elúciós sorrend változó*. Általánosan érvényes, hogy **GITC, FDAA** és **(S)-NIFE** esetén az enantiomerekre vonatkozó elúciós sorrend **L<D** azaz  $(2S,3S)<(2R,3R)$  illetve  $(2S,3R)<(2R,3S)$ ; **(S,S)-DANI** esetén **D<L** azaz  $(2R,3R)<(2S,3S)$  illetve  $(2R,3S)<(2S,3R)$ ; a sorrend **(R,R)-DANI** alkalmazásával megfordítható, **L<D** azaz  $(2S,3S)<(2R,3R)$  illetve  $(2S,3R)<(2R,3S)$ . Ez a teljesen változatos sorrend nagy szabadságot biztosít a megfelelő módszer kiválasztásában, hogy a „minor” komponens a főkomponens előtt eluálódjon. A *diasztereomerek sorrendjét* nemcsak származékképző, hanem az *eluens szerves módosítójának* minősége, sőt a *kolonna minősége* is befolyásolta.
2. Az enantiomerek elválasztása során az eddigiekben azt tapasztaltuk, hogy a két szerves módosító közül a *MeOH* sokkal hatékonyabb volt, mint az *MeCN*. Ez a megállapítás nem teljesen igaz, ha a sztereoizomerekre vonatkozó *diasztereoselektivitást* tekintjük; az *MeCN* alkalmazása sok esetben jobb elválasztáshoz vezetett, ha a *négy sztereoizomer elválasztása* volt a cél. Példaként említhetjük a *FDAA- $\beta$ -MePhe*, *GITC- $\beta$ -MePhe*, *GITC- $\beta$ -MeTyr*, *GITC- $\beta$ -MeTrp*, *(S,S)-DANI- $\beta$ -MeTrp*, *FDAA- $\beta$ -PhTrp*, *(S)-NIFE- $\beta$ -PhTrp*, *FDAA- $\beta$ -MeTic* és *(S)-NIFE- $\beta$ -MeTic* származék diasztereomerek elválasztását, ahol az *MeCN* vagy az *MeCN-MeOH* vegyes eluensrendszer sokkal hatásosabbnak bizonyult.
3. A *GITC* és az *FDAA* összehasonlításában az *FDAA* rendelkezett jobb enantioszelektivitással, a különbség sokszor kiugró volt. A diasztereoselektivitást tekintve már nem minden esetben egyértelmű az *FDAA* előnye (például:  *$\beta$ -2-PrTrp*,  *$\beta$ -PhTrp*).
4. Az új királis származékképzők [(*S,S*)- illetve (*R,R*)-DANI, (*S*)-NIFE] diasztereoselektivitása megközelítette, illetve felülmúlta a *GITC* és *FDAA* diasztereoselektivitását. Az (*S,S*)-DANI a  $\beta$ -MePhe,  $\beta$ -MeTyr,  $\beta$ -MeTrp, az (*S*)-NIFE pedig a  $\beta$ -MePhe,  $\beta$ -MeTyr,  $\beta$ -MeTrp,  $\beta$ -PhTrp és  $\beta$ -MeTic elválasztásában sokkal hatékonyabbnak bizonyult, mint az eddig alkalmazott *GITC* vagy *FDAA* (**3.5.1. Táblázat**).



**3.5.1. ábra**  $\beta$ -metilfenilalanin (22,23) sztereizomerek közvetett folyadék-kromatográfiás elválasztása különböző származékképzők esetén

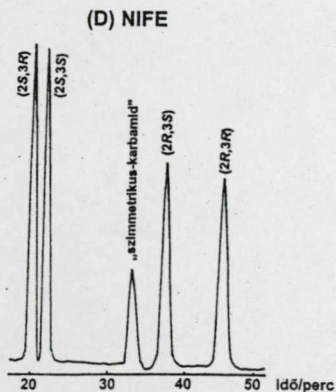
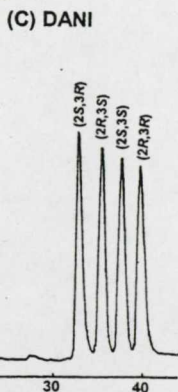
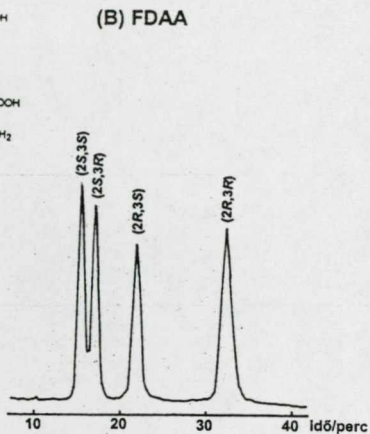
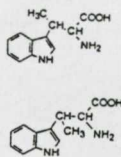
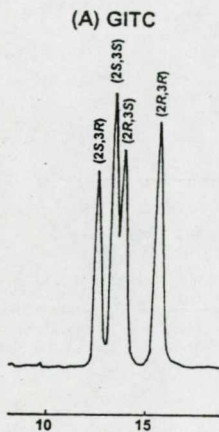
Királis származékképző, **A**, GITC, **B**, FDAA, **C**, DANI, **D**, NIFE; kolonna, **A**, **B**, Vydac 218TP54 C<sub>18</sub>, **C**, **D**, Discovery C<sub>18</sub>; áramlási sebesség, **A**, **B**, **C**, 0,8 ml/perc, **D**, 1,0 ml/perc; eluens, **A**, 0,1% TFA\*/MeOH=55/45 (v/v), **B**, 0,01 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH=3,0)/MeCN/MeOH=53/7/40 (v/v/v), **C**, 0,1% TFA\*/MeOH=45/55 (v/v), **D**, 0,1% TFA\*/MeOH=48/52 (v/v)

\*0,1% TFA: 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O



### 3.5.2. ábra $\beta$ -metiltirozin (40,41) sztereoisomerek közvetett folyadékromatográfias elválasztása különböző származékképzők esetén

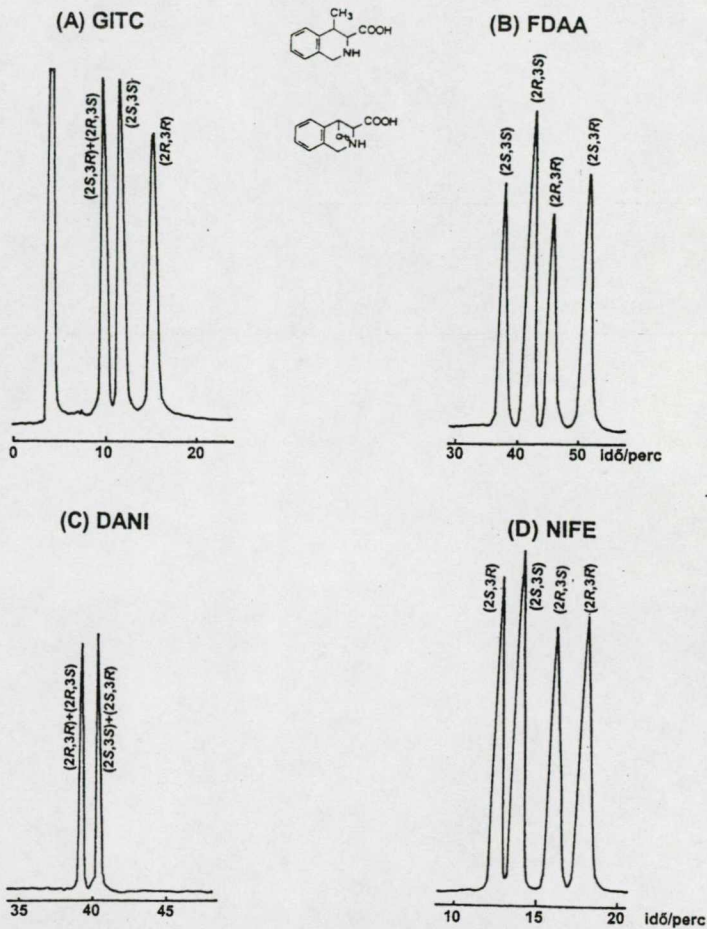
Királis származékképző, **A**, GITC, **B**, FDAA, **C**, DANI, **D**, NIFE; kolonna, **A**, **B**, **D**, Vydac 218TP54 C<sub>18</sub>, **C**, Discovery C<sub>18</sub>; áramlási sebesség, **A**, **B**, **C**, 0,8 ml/perc, **D**, 1,0 ml/perc; eluens, **A**, 0,1% TFA\*/MeOH=75/25 (v/v), **B**, 0,01 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/MeOH=36/64 (v/v), **C**, 0,1% TFA\*/MeOH=50/50 (v/v), **D**, 0,1% TFA\*/MeOH=40/60 (v/v)



**3.5.3. ábra**  $\beta$ -metiltryptofán (43,44) sztereoisomerek közvetett folyadék-kromatográfias elválasztása különböző származékképzők esetén

Királis származékképző, **A**, GITC, **B**, FDAA, **C**, DANI, **D**, NIFE; kolonna, **A**, **B**, Vydac 218TP54 C<sub>18</sub>, **C**, Hyperpep 300 C<sub>18</sub>, **D**, Discovery C<sub>18</sub>; áramlási sebesség, **A**, **D**, 1,0 ml/perc, **B**, **C**, 0,8 ml/perc; eluens, **A**, 0,1% TFA\* / MeCN = 65/35 (v/v), **B**, 0,1% TFA\* / MeOH = 50/50 (v/v), **C**, 0,1% TFA\* / MeCN / MeOH = 52/32/16 (v/v/v), **D**, 0,1% TFA\* / MeOH = 50/50 (v/v);

\*0,1% TFA: 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O



**3.5.4. ábra**  $\beta$ -metil-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-3-karbonsav izomerek (64,65) közvetett folyadékromatográfiás elválasztása különböző származékképzők esetén  
 Királis származékképző, **A**, GITC, **B**, FDAA, **C**, DANI, **D**, NIFE; kolonna, **A**, **B**, **D**, Vydac 218TP54 C<sub>18</sub>, **C**, Hyperpep 300 C<sub>18</sub>; áramlási sebesség, **A**, **B**, **C**, 0,8 ml/perc, **D**, 1,0 ml/perc; eluens, **A**, 0,1% TFA\*/MeOH=45/55 (v/v), **B**, 0,1% TFA\*/MeCN/MeOH=51/12/37 (v/v/v), **C**, 0,01 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH=3,0)/MeOH, gradiens elució, 0 perc, 0,01 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH=3,0)/MeOH=80/20 (v/v), 30 perc 0,01 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH=3,0)/MeOH=20/80 (v/v), 50 perc 0,01 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH=3,0)/MeOH=20/80 (v/v), **D**, 0,1% TFA\*/MeCN=68/32 (v/v);

### 3.5.2. A *cisz-* és *transz-2-aminociklopentán-* és *-ciklohexán-karbonsav sztereoiszomerek elválasztásának összehasonlítása*

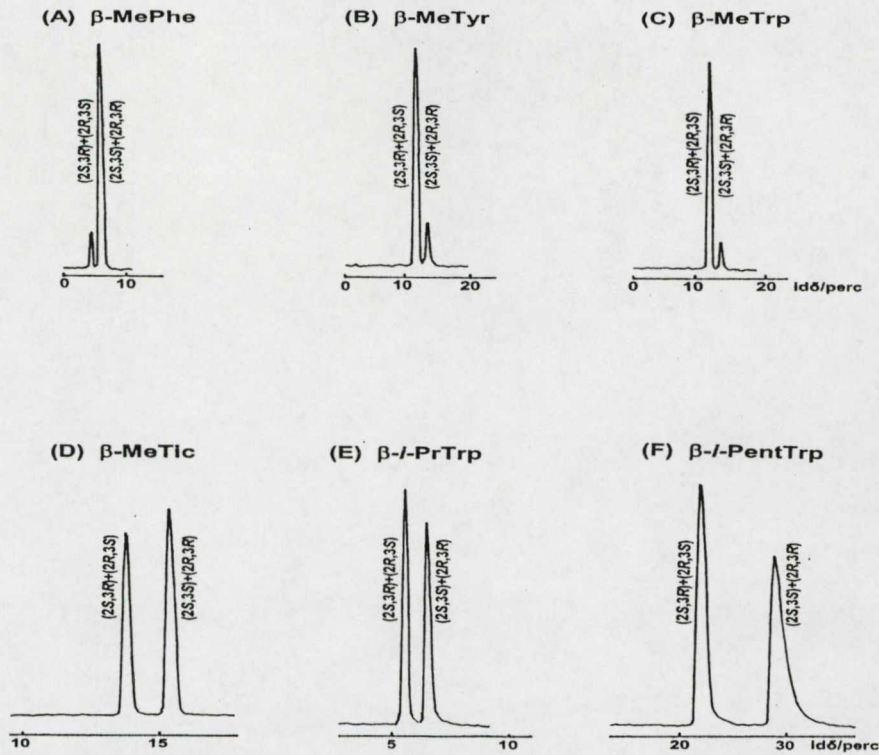
A két kiralitáscentrumot tartalmazó cikloalkán-vázis karbonsavak közül a *cisz*-pentacin a természetben is előforduló gombaölőszer, míg a többiek fontos farmakonok kiindulási anyagai [8, 12, 18]. A négy sztereoiszomer egy kromatogramon belüli elválasztását három származékképző (GITC, FDAA, (*S,S*)-DANI) esetén a **F.3.5.2. Táblázatban** mutatjuk be. Az **Acpc (100)** és **(101)** sztereoiszomerek elválasztására mindhárom származékképző alkalmasnak bizonyult, míg az **Achc (102)** és **(103)** sztereoiszomerek FDAA-származékként csak három komponensre voltak elválaszthatók, és a legjobb elválasztást (*S,S*)-DANI-származékként kaptuk.

A királis elválasztásban fontos *elúciós sorrend*, GITC és FDAA esetén, hasonló a  $\beta$ -metil-aminosavaknál tapasztaltakhoz, itt (*1S,2S*)<(*1R,2R*) illetve (*1R,2S*)<(*1S,2R*). Itt a C2 szénatomon lévő  $-\text{NH}_2$ -csoport vesz részt a származékképzésben, és így ennek a konfigurációja a meghatározó, ezért a sorrend (*2S*)<(*2R*). Az (*S,S*)-DANI esetén a *transz*-izomerek követik ezt a sorrendet, a *cisz*-izomerekre az **Acpc** és **Achc** esetén ellentétes elúciós sorrendet tapasztaltunk.

Ami az egyes származékképzők diasztereoselektivitását illeti, itt is változó képet kaptunk. GITC és (*S,S*)-DANI esetén a *transz*-izomerek a *cisz*-izomerek előtt eluálódtak, míg az FDAA-származékok vegyes sorrendet mutattak. A származékképzők diasztereoselektivitásában meglévő különbségek lehetőséget adtak az elúciós sorrend megfelelő megválasztására a királis szennyezés vizsgálatok során.

### 3.5.3. Az *eritro-* és *treo- $\beta$ -metil(alkil)-aminosavak elválasztása*

A két kiralitáscentrumot tartalmazó  $\beta$ -metil(alkil)-szubsztituált aminosavak jelentős szerepet játszottak a kilencvenes évek opioid peptidkémiaájában. Hogy csak a legfontosabbakat említsük a hetvenes években felfedezett enkefalin [183], a nyolcvanas években felfedezett deltorfin [180,181], dermorfin [182], a kilencvenes években felfedezett TIPP [184], endomorfin-1 és -2 [185] módosítása konformációsán gátolt  $\beta$ -metil(alkil)-szubsztituált aminosavakkal számos új, az eredetnél aktívabb és szelektivebb analóghoz vezetett (a fenti peptidek szerkezetét a **8. Fejezetben** illetve az **F.8.-ban** ismertetjük). A  $\beta$ -metil-aminosavak szintézise legegyszerűbben racém formában oldható meg [14], de a keletkező *eritro-* és *treo*-diasztereomerek általában egymással szennyezettek. A tiszta *eritro*-módosulat kristályosítással előállítható, de a *treo*-módosulat kristályosítása hosszadalmas és a termék általában mindig *eritro*-komponenssel szennyezett marad. Ezért olyan HPLC-módszert dolgoztunk ki, mellyel preparatív méretben is királisan tiszta *eritro-* és *treo*-módosulat volt nyerhető. A módszer lényege, hogy  $\text{C}_{18}$  állófázison puffer- illetve savmentes (TFA) eluenst (víz) alkalmazva, 1-2% MeCN (Trp analógok esetén 10-15% MeCN) jelenlétében az *eritro-* és *treo*-diasztereomerek



### 3.5.5. ábra Eritro és treo- $\beta$ -alkil-aminosav diasztereomerek elválasztása

Kromatográfia: oszlop, Vydac 218TP54 C<sub>18</sub>; áramlási sebesség, 1,5 ml/perc; detektálás, 205 nm; *eluens*, **A**, víz/acetonitril=99/1 (v/v), **B**, víz, **C**, víz/acetonitril=95/5 (v/v), **D**, víz/acetonitril=98/2 (v/v), **E**, **F**, víz/acetonitril=85/15 (v/v).

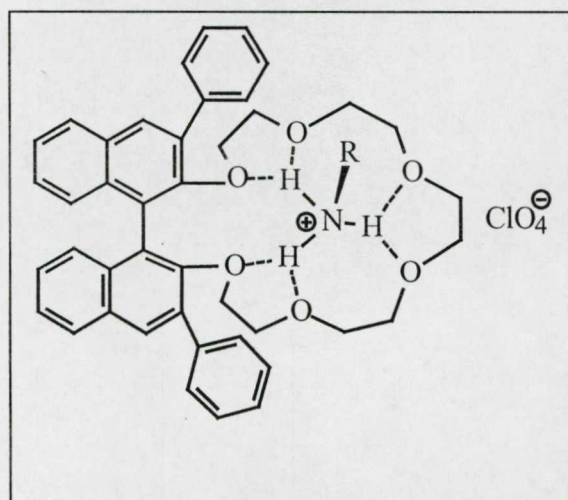
kvantitatíven, preparatív méretben elválaszthatók és az egyes diasztereomerek >99,8% tisztaságban nyerhetők. A módszer érdekessége, hogy a mozgófázis gyakorlatilag csak vizet tartalmazott, és ilyen nagy víztartalom mellett a C<sub>18</sub> állófázis olyan szerkezetet vett fel (feltételezhetően a C<sub>18</sub>-láncok beborítják a felületet), mely alkalmas volt a két diasztereomer-pár elválasztására. Ha a mozgófázis H<sub>2</sub>O-MeCN rendszeren kívül valamilyen puffert vagy 0,1% TFA-t tartalmazott, az *eritro*- és *treo*-sztereoizomerek nem váltak el. A 3.5.5. ábrán a  $\beta$ -alkil-aminosavak *eritro*- és *treo*-diasztereomerjeinek elválasztását mutatjuk be Vydac 218TP54 állófázison. A módszer más típusú C<sub>18</sub> állófázison is sikeres (LiChrospher, Discovery, NovaPak, Hypersil, Hyperpep, Nucleosil). Az eljárás előnye, hogy izokratikus elválasztásról lévén szó, nincs szükség a kolonna kondicionálására (időnyereség) és olcsó (gyakorlatilag a mozgófázis alig tartalmaz szerves módosítót).

## 4. Nemfehérje-alkotó aminosav enantiomerek *közvetlen* folyadékkromatográfiás elválasztása

A *közvetlen módszerek* a közvetett módszerekkel ellentétben a kovalens kötések helyett nemkovalens kötésű diasztereomer asszociátumokon keresztül segítik elő a sztereoszelektív elválasztást. A kiralitás felismeréséhez hozzájáruló kötőerők lehetnek elektrosztatikusak, hidrogénhid kölcsönhatások, van der Waals-féle vonzás/taszítás, hidrofób-hidrofób,  $\pi$ - $\pi$  vagy dipól-dipól kölcsönhatások. Nagy jelentőségű a királis elválasztásokban a „host-guest” zárványkomplekxképződés is. Az enantiomerek közvetlen elválasztása az állófázishoz kötött vagy mozgófázisba adagolt királis szelektor és az enantiomer keverék kölcsönhatásának az eredménye.

### 4.1. *Közvetlen* királis elválasztások koronaéter alapú, Crownpak CR(+) kolonnán

Koronaéter alapú királis állófázist a hetvenes évek végétől Cram és társai [186,187] úttörő munkássága nyomán alkalmazzák, akik szilikagélre és polisztirolra kötött *bisz*-(1,1'-binaf-til)-22-



korona-6 szelektoron sikeresen választottak el  $\alpha$ -aminosav származékokat. A módszer alapja, hogy a koronaéter a protonált primer aminocsoportokkal méreténél fogva stabilis asszociátumot képez, és ez az elsődleges kötőerő a molekula és a szelektor közti kölcsönhatásban. Shinbo és munkatársai az (*R*)-2,3:4,5-*bisz*[1,2-(3-fenilnafto)]-1,6,9,12,15,18-hexaoxaciklo-eikosa-2,4-dién-t [188] és 6-oktilnafto-szubsztituált változatát [189] dinamikusán kötötték oktadecil-szilikagélre

4.1.1. ábra A Crownpak CR királis szelektor és a kialakuló asszociátum szerkezete

és az előbbi oszlopot a Daicel cég Crownpak CR(+) illetve (-) néven forgalmazza. Az oszlop hátránya, hogy a szelektor csak primer aminocsoportot tartalmazó vegyületekre hatásos és ha az eluensben a MeOH-tartalom meghaladja a 15%-ot a szelektor lemosódik az oszlopról. Ennek ellenére a nyocvanas-kilencvenes években számos szerző alkalmazta nemcsak primer-aminok, aminosavak, hanem kis peptidek analízisére is [190-202]. A kilencvenes évek végétől Machida és munkatársai [203-205] valamint Hyun és munkatársai [206-212] által indult új fejlesztésekben a hordozóhoz kovalensen kötött koronaéter fázisokat szintetizáltak, melyek sokkal stabilisabbak és egyes változataik szekunder aminokra is alkalmazhatók [213].

A koronaéter oszlopon történő visszatartást döntően a protonált primer aminocsoport,  $-\text{NH}_3^+$  és a koronaéter-oxigének között kialakuló molekula-asszociátum stabilitása szabja meg. Ez a stabilitás függ a pH-tól, a hőmérséklettől és az oszlop borítottságától (ez utóbbi egy adott oszlop esetén nem befolyásolható). A pH szabályozására a leggyengébb komplexképző sajátsággal bíró perklórsavat alkalmazzuk. Az asszociátum stabilitása a pH csökkentésével növelhető, a protonált primer aminocsoport és a poliéter gyűrű oxigénjei közötti kapcsolatot a protonált karboxilcsoportok és poliéter oxigének között kialakuló hidrogénhidak tovább erősítik [190]. Az asszociátum stabilitásának másik meghatározója a hőmérséklet (ennek hatásával az 5. Fejezetben részletesen foglalkozunk). A szelektivitást az asszociátum stabilitása mellett a szelektor és az elválasztandó sztereoizomerek R-csoportja (4.1.1. ábra) között kialakuló másodlagos kölcsönhatások befolyásolják. Döntő hatással lehet az aminocsoport melletti szénatomon lévő szubsztituensek térkitöltése, hidrofóbicitása, az aminocsoport és a királis szénatom távolsága [194, 195].

Méréseinket a kereskedelmi forgalomban is kapható, a szelektor (S)-antipódját tartalmazó Crownpak CR(+) kolonnán végeztük, a pH és a hőmérséklet optimalizálásával. Az eluens vizes perklórsavoldat volt, szerves módosító alkalmazását kerültük (kivéve Trp analógok) az oszlop dinamikus fedése miatt. Néhány esetben az áramlási sebesség csökkentése elősegítette a felbontás növelését.

A Gly és Ala analóg sztereoizomerek elválasztását a [31] közleményünk I. Táblázatában mutatjuk be. A PhGly (1),(1) a 4-(OHPh)Gly (2),(2) és a Thg (4),(4)  $\alpha$  és  $R_S$  értékei különösen jók. A jó elválasztás valószínű magyarázata, hogy az aromás fenil-és tienil-gyűrűk  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatása a királis szelektorral elősegítette a királis felismerést. Valószínű ez a magyarázata a telítetlen elágazó láncú (2-metilallil)glicin sztereoizomerek (5),(5) jó elválasztásának is. A többgyűrűs rendszerek (indán-2-il)glicin (3),(3), 1- és 2-naftilalanin (10),(16) és (11),(17) a nagy  $k$  értékek ellenére kevésbé hatásosan voltak elválaszthatók. Ezekben az esetekben a pH és a hőmérséklet csökkentése sem vezetett jobb eredményhez. A (3),(3); (10),(16) és (11),(17) sztereoizomerek esetén, a hidrofóbicitás és a szelektorral való erős  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatás mindkét enantiomer esetén olyan mértékben növelte a retenciót és a *sávszélesedést*, hogy a felbontás romlott. Itt kell megemlíteni, hogy a binaftil-szubsztituenst tartalmazó, (R,S)-6-amino-6,7-dihidro-5H-dinafto[2,1]cikloheptén-6-karbonsav (88) és (R,S)-6-aminometil-6,7-dihidro-5H-dinafto[2,1]cikloheptén-6-karbonsav (89) sztereoizomerek a szelektorral való erős hidrofób-hidrofób és  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatás következtében nem eluálódtak az oszlopról.

A F.4.1.1. Táblázatban a Phe analóg sztereoisomerek elválasztásának adatait gyűjtöttük össze [17, 24, 27, 31]. A mérések döntő többségét pH=2 perklórsav eluenssel végeztük. A fluorozott Phe-származékok (13-15) a Phe-hez viszonyítva apolárosabbak és nagyobb  $k$  értékkel rendelkeztek, amit nem kísért az  $\alpha$  és  $R_S$  növekedése, sőt a pentafluoro-származék, F5F (15) nagy térkitöltése gátló hatással volt a királis felismerést elősegítő kölcsönhatásokra. Az aromás gyűrű térkitöltésének (és valószínűleg a hidrofóbicitásnak) a növekedése a metil-szubsztituált Phe analógok (16-20) esetén sem volt kedvező az elválasztás szempontjából. A retenció ugyan a metilcsoportok számának növekedésével nőtt (16-20), de az  $\alpha$  és  $R_S$  értéke csökkent. A metilcsoportok gátolták az aromás rendszerek  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatását, ezáltal hátráltatták a királis felismerést. A közvetett analízisek esetén is tapasztaltuk, hogy az  $\alpha$ -MePhe (21) és itt a *treo*- $\beta$ -MePhe (23) térbeli szerkezete gátja a királis elválasztásnak. A *Crownpak CR(+)* kolonna azzal a sajátsággal rendelkezett, hogy azon a *treo*- $\beta$ -metil szubsztituált aminosav sztereoisomerek nem voltak elválaszthatók.

A [27] közleményünk 1. Táblázatában további Phe (16),(2); (24),(1); (25),(3) analóg és Phe-amid analóg (29),(8); (30),(7); (31),(9) sztereoisomerek kromatográfiás adatai jól mutatják az  $-\text{NH}_2$ -csoport jelentőségét. A hidrofilabb amid-származékok ((29)-(31),(7)-(9)) nemcsak kisebb  $k$ -val rendelkeztek, mint a nekik megfelelő karboxilcsoportot tartalmazó Phe analógok (16),(2); (24),(1); (25),(3), hanem  $\alpha$  és  $R_S$  értékük is nagyobb volt. Korábbi munkájában Hilton és Armstrong [195] is utalt arra, hogy egy további  $-\text{NH}_2$ -csoport jelenléte növelte a királis szelektivitást. Ennek valószínű oka, hogy az amidcsoport a koronaéter oxigénjeivel újabb hidrogénhid kapcsolatok kialakítására képes.

A Tyr analóg sztereoisomerek adatait ([17], 2. Táblázat) összevetve a nekik megfelelő Phe analógokkal (F.4.1.1. Táblázat) (2-MeTyr—2-MePhe; 2,6-diMeTyr—2,6-diMePhe; *eritro*- $\beta$ -MeTyr—*eritro*- $\beta$ -MePhe) azt tapasztaltuk, hogy az előbbieket egyrészt rövidebb retenciós idővel rendelkeztek, másrészt az  $-\text{OH}$ -csoport (az  $-\text{NH}_2$ -csoportoz hasonlóan) hidrogénhid kölcsönhatás révén elősegítette a királis felismerést, és a rövidebb retenciós idő ellenére az  $\alpha$  és  $R_S$  értékek hasonlóak vagy jobbak voltak.

A  $\beta$ -szubsztituált Trp analóg sztereoisomerek közül, mint már említettük, a *treo*-analógok nem mutattak enantioszelektivitást ezen a kolonnán, és az *eritro*-analógok közül csak a  $\beta$ -MeTrp (43),(1)  $R_S=1,2$  és a  $\beta$ -3PentTrp (47),(3)  $R_S=2,38$  volt elválasztható ([28], II. és IV. Táblázat).

A  $\beta$ -karbolin származék Tcc (51),(21) sztereoisomerek ([17], 2. Táblázat), annak ellenére, hogy szekunder aminosavak, viszonylag jó felbontással ( $R_S = 0,95$ ) elválaszthatók voltak. A molekula aromás, nagy térkitöltésű szerkezete, a primer aminocsoporttal való asszociátum képzése

nélkül is lehetővé tette másodlagos kölcsönhatások kialakulását (hidrogénhidak,  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatások).

A  $\beta$ -aminosav sztereoizomerek királis koronaéteren való elválasztására Armstrong és társai [195] Gly tartalmú dipeptidek esetén kimutatták, hogy az enantioszelektivitás nagyban romlott, ha a királis szénatom az  $-\text{NH}_2$ -csoporthoz viszonyítva  $\beta$ -helyzetben volt. A [30] közleményünk 1. Táblázatában felsorolt aminosavak esetén a királis szénatom az asszociátum képzésben résztvevő  $-\text{NH}_2$ -csoporthoz képest  $\alpha$ -helyzetű, a kolonna szelektivitása a legtöbb esetben mégsem volt megfelelő. A  $\beta$ -szubsztituensek térkitöltésének (és hidrofóbicitásának) növekedésével ((90)-(96),(1)-(6)) a  $k$  nőtt, ami hidrofób-hidrofób kölcsönhatásra utalt, a felbontás pedig jelentősen romlott. A  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatások jelentőségét (98),(8) aminosav valószínűsíti, melynél a  $\beta$ -helyzetű aromás szubsztitúció lehetővé tette a királis felismerést.

A F.4.1.2. Táblázatban feltüntetett cikloalkán- és alkén-vázás aminokarbonsavak ( $\beta$ -aminosavak) négy sztereoizomerjének elválasztása *közvetett* módszerrel sem volt egyszerű feladat. A Crownpak CR(+) oszlop enantio- és diasztereoselektivitása a cikloalkán-vázás aminokarbonsavak Acpc (100),(101), Achc (102),(103), Abhc (106),(107) esetén jónak mondható [12, 18, 43], a négy egymást követő sztereoizomerre vonatkozó felbontás legkisebb értéke  $R_S > 0.95$ . Ez azért meglepő, mert ezek az aminosavak mentesek minden aromás jellegtől, mely eddigi tapasztalatunk szerint döntően hozzájárult a királis felismeréshez. Ugyanakkor a telítetlen kötést tartalmazó aminosavak egyes sztereoizomerjei, Achc-én (104) és Abhc-én (108), melyekkel elvileg lehetséges a  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatások kialakulása, gyenge enantioszelektivitást mutattak.

A Crownpak CR(+) oszlopon az irodalmi ( $R$ )<( $S$ ) sorrendtől eltérő, ( $S$ )<( $R$ ) *elúciós sorrendet* a  $\beta$ -aminosavak esetén tapasztaltunk. A [30] közleményünk I. Táblázatában a (96),(6) és (98),(8) komponensek esetén mért ( $S$ )<( $R$ ) elúciós sorrend csak látszólagos eltérés, a Cahn-Ingold-Prelog-szabály szerint az atomcsoportok elrendeződése a királis szénatom körül (96),(6) és (98),(8) esetén ugyanaz, mint (90),(1) esetén. A cikloalkán- és -alkénvázás aminokarbonsavak (100)-(109) ( $S$ )<( $R$ ), elúciós sorrendjére az 5.1. Fejezetben visszatérünk.

## 4.2. Nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek *közvetlen* folyadékkromatográfiás elválasztása makrociklusos glükopeptid-alapú kolonnán

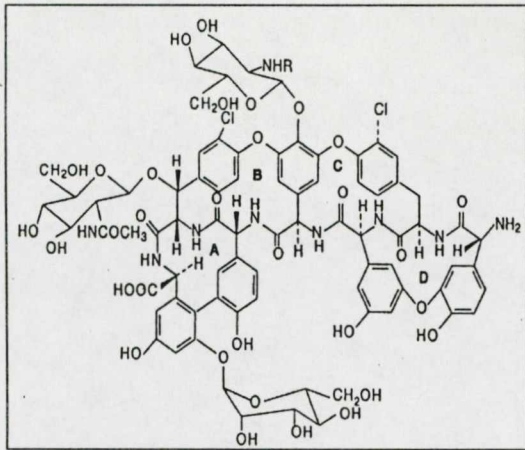
### 4.2.1. Makrociklusos glükopeptid alapú oszlopok rövid irodalmi áttekintése

A makrociklusos glükopeptidek királis szelektorként való alkalmazásának elvét 1994-ben Armstrong és társai [214] dolgozták ki, vankomicin, rifamicin B és a tiosztrepton molekulákat

kovalensen kötöttek szilikagél hordozóra. A vankomicint ugyanebben az időszakban vékonyréteg-kromatográfiás [215] és kapilláris elektroforézis (CE) mozgófázisbeli adalékként [216, 217] is sikerrel alkalmazták. A három glükopeptid közül a vankomicin bizonyult a leghatásosabbnak. A kolonna igen jó stabilitása mellett, mind fordított, mind normál fázisú módban használható volt. A további fejlesztésekben 1995-től a teicoplanin [218-220], a risztocetin A [221-223] valamint az  $\alpha$ - és  $\beta$ -avoparcin [224] makrociklusos glükopeptideket királis szelektorként mind a HPLC mind a CE technikában alkalmazták. A fejlesztésekbe olasz kutatók is bekapcsolódtak [225, 226].

Vizsgálataink során a **teicoplanin alapú, Chirobiotic T** és a **risztocetin A alapú, Chirobiotic R** fázisokat alkalmaztuk. A **teicoplanin** 23 királis szénatomot tartalmaz és több figyelemre méltó szerkezeti elemmel rendelkezik (4.2.1. ábra), melyeket részletesebben [43] közleményünk és a [220] irodalom tartalmaz. A molekula két jelentős funkciós csoportja egy primer aminocsoport és egy karboxilcsoport. Ezek felelősek a molekula ikeriönos szerkezetének kialakításáért. Ezen kívül lényeges elem a D-glükózaminhoz kapcsolódó hidrofób nonil lánc, melynek fontos szerepe van a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások kialakításában.

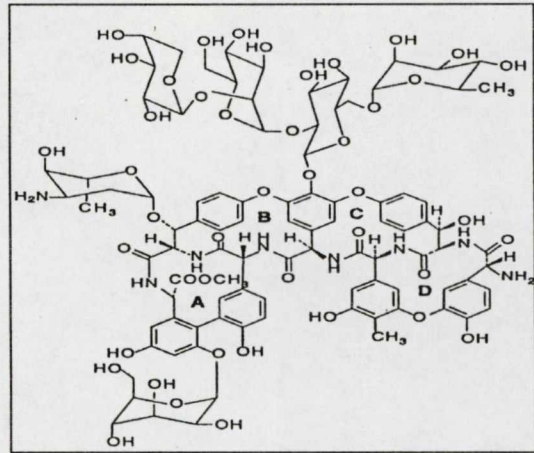
A **risztocetin A** molekula 38 kiralitáscentrumot és 7 aromás gyűrűt tartalmaz (4.2.2. ábra). A szerkezetet részletesen [44] közleményünk és a [220] irodalom írja le. A molekula legfontosabb egysége két protonált aminocsoport. Fontos eltérés a két makrociklusos glükopeptid között, hogy a risztocetin A nem rendelkezik hidrofób oldallánccal. A teicoplanin és risztocetin A alapú oszlopok az utóbbi időben egyre nagyobb szerepet kaptak a királis elválasztások területén, nemcsak az aminosavak és származékaik, hanem más biológiailag fontos sztereoizomerek analízisében is. A makrociklusos glükopeptid oszlopokról összefoglaló munkák Beesley és Scott [21] valamint Chankvetadze szerkesztésében [28] jelentek meg. A további idézett közlemények [227-247], melyek főleg a teicoplanin és risztocetin A alapú oszlopok felhasználásával születtek, a teljesség igénye nélkül próbálják szemléltetni e terület növekvő jelentőségét. E szelektorokkal készült oszlopok előnye, hogy mind fordított mind normál fázisú módban, sőt az 1995-ben bevezetett **polár-organikus** módban is alkalmazhatók [248,249]. A **polár-organikus** módszer normál fázisú módnak tekinthető; lényege, hogy vízmentes körülmények között szerves módosítóként MeCN-t (vagy MeOH-t) alkalmazva az eluens polaritását jégecet és TEA adagolásával szabályozzuk. Általános tapasztalat szerint a retenciót a jégecet és TEA koncentrációja szabja meg. Mindkettőt 0,01-1,0 % koncentráció-tartományban használva, a koncentráció növelése a retenció csökkenését (és fordítva) eredményezte. A szelektivitás változtatása a jégecet/TEA arány változtatásával történt.



R:  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{CO}-$

4.2.1. ábra

*A teicoplanin molekula szerkezete*



4.2.2. ábra

*A ristocetin A molekula szerkezete*

#### 4.2.2. Nemfehérje-alkotó aminosav sztereoiszomerek elválasztása teicoplanin alapú (Chirobiotic T) és ristocetin A alapú (Chirobiotic R) kolonnán

A nemfehérje-alkotó aminosavak analizését teicoplanin és ristocetin A alapú kolonnákon fordított fázisú módban végeztük, de a jobb felbontás reménye érdekében a polár-organikus módszert [218, 222, 223] is többször alkalmaztuk. Armstrong szerint [218, 219] a retenció és a sztereoselektivitás elsősorban a mozgófázis összetételével és minőségével befolyásolható, de az áramlási sebesség és a hőmérséklet változtatása sok esetben jelentős hozzájárulást eredményez a felbontás javításában. (A hőmérséklet hatását az **5. Fejezetben** külön tárgyaljuk). Az oszlopok elsősorban víz/szerves módosító (MeOH) eluens alkalmazásával működtek, de sok esetben pH-kontrollált körülmények nagyobb felbontást és szebb csúcsalakat eredményeztek. A pH szabályozására 0,1% vagy 1,0% trietil-ammónium-acetát (TEAA) vizes oldatát (pH 4.1 vagy 6.5) használtuk. Fontos megemlíteni, hogy a Chirobiotic T kolonnán 1% vagy 0,1 mol/dm<sup>3</sup> TEAA használata ajánlatos, míg a Chirobiotic R kolonna érzékenysége miatt csak ezen koncentrációk egytizedével terhelhetők (0,1% illetve 0,01 mol/dm<sup>3</sup>).

A Gly és Ala analóg sztereoiszomerek elválasztásának kromatográfiai adatai a [31] közleményünk II. és III. Táblázatában találhatók. Mindkét oszlopon egy adott eluens összetételnél (TEAA/MeOH=20/80 (v/v) illetve 70/30 (v/v)), a hidrofóbicitás tűnt az egyik meghatározó tényezőnek a retencióban. Azonos eluens összetételnél a hidrofílebb sztereoiszomerek *k* értéke kisebb (1),(1) illetve (2),(2) és (4),(4), és az erősebben hidrofób sajátságú komponensek (10),(16); (11),(17) erősebb eluens összetételnél is később eluálódtak, mint a PhGly (1),(1). Összefoglalva azt

mondhatjuk, hogy az ((1)-(5),(1)-(5)) és (10),(16); (11),(17)) aminosav sztereoizomerek mindkét oszlopon jól elválaszthatók voltak.

Itt kell megjegyezni a két kolonna eltérő viselkedését. A Chirobiotic T kolonna jellegzetessége, hogy a szerves módosító koncentrációjának növelésével a retenció növekedett, ami ellentmond egy fordított fázisú rendszer sajátosságainak. Ezért nagyobb  $k$ ,  $\alpha$  és  $R_S$  elérése érdekében nagyobb MeOH-tartalmú eluenseket kellett alkalmazni. A Chirobiotic R oszlop „igazi” fordított fázisú oszlopként működött, azaz a szerves módosító koncentrációjának növelésével  $k$  csökkent (a jelenség magyarázatára az 5.2. Fejezetben visszatérünk).

A Phe analóg sztereoizomerekre [24, 31, 43-45] összegyűjtött kromatográfiás adatokat a F.4.2.1.a,b. Táblázatban foglaltuk össze. Első általános következtetéseink a hidrofóbicitás és a retenció közti összefüggésre vonatkoznak. Fluoratomok (13-15), illetve metilcsoportok (16-20) fokozatos beépítése a vegyületekbe kis mértékben változtatta meg a retenciós faktorokat a hidrofíli-hidrofób jellegben bekövetkező változásnak megfelelően. A penta-fluor származék (F5F) (15) sztereoizomerek elválasztása, valószínűleg a nagy térkitöltés okozta gyengébb kölcsönhatások miatt, gyengébb eluenst igényelt, ami a két kolonnán ellentétes irányú MeOH-koncentráció változtatást jelentett. A mono-, di-, és trimetil-szubsztituált Phe analóg sztereoizomerek egyre növekvő hidrofób jellege a két oszlopon, egy-egy adott eluens összetételnél [TEAA/MeOH=20/80 illetve TEAA/MeOH=70/30 (v/v)] a  $k$  és  $R_S$  értékekben alig mutatkozott. Összefoglalóan azt mondhatjuk, hogy a hidrofóbicitás valószínűleg egyéb kölcsönhatások mellett szerepet játszott a retenció meghatározásában.

Az  $\alpha$ -MePhe (21) és *treo*- $\beta$ -MePhe (23) sztereoizomerek a Crownpak CR(+) oszloppal ellentétben, Chirobiotic T és R kolonnán viszonylag jól, illetve igen jól elválaszthatók voltak.

Az eluens pH-jának hatását Chirobiotic R oszlopon Phe analógok esetén vizsgáltuk. Ehhez az irodalomban is alkalmazott pH=4,1 és pH=6,5, 0,1% TEAA-t tartalmazó vizes oldatokat használtunk [222, 223]. pH=6,5 esetén mind az aminosav, mind a szelektor aminocsoportja protonált és a karboxilcsoportok deprotonáltak. pH=4,1 esetén az aminocsoportok protonáltak, míg a karboxilcsoportok az aminosav pK-jától függő mértékben deprotonáltak. Tapasztalatunk szerint ilyen mértékű pH-változás nem okozott jelentős különbséget a kromatográfiás viselkedésben (*nem közölt adatok*).

A Phe analógokra a polár-organikus módszer a [44] közleményünk 2. Táblázatának adatai (valamint *nem közölt adatok*) alapján a legtöbb esetben kevésbé volt hatásos, mint a fordított fázisú

módszer, sőt a (19),(3) és (21),(4) analógok, egyáltalán nem vagy rosszabbul voltak elválaszthatók (4.2.3. Fejezet).

A F.4.2.2.a. és b. Táblázatokban további Phe analóg sztereoizomerek analízisét mutatjuk be H<sub>2</sub>O/MeOH rendszerben ([27], és nem közölt eredmények). Ezek az analógok a közvetett módszereknél már ismertetett speciális enzimatisz rezolválások termékei (3.2. Fejezet), és Chirobiotic T kolonnán jól, míg Chirobiotic R oszlopon a (16) és (24) analóg sztereoizomereket kivéve alig, vagy nem (28) választhatók el. A (26)-(28) analógok esetén a metilcsoport beépítése a hidrofóbicitás növekedése mellett olyan szterikus gátlást jelentett, mely akadályozta a másodlagos kölcsönhatások kialakítását a királis szelektorral. Chirobiotic T oszlopon nagy MeOH-tartalmú (90% illetve 100%) eluenssel (mely itt gyenge eluent jelent), viszonylag jó  $R_S$  értékeket kaptunk, míg Chirobiotic R oszlopon a sztereoizomerek nagy víztartalmú eluensben sem voltak jól elválaszthatók. Az enzimatisz rezolválás követése céljából a (16), (24)-(28) analógoknak megfelelő savamid sztereoizomerek (29)-(34) elválasztása is szükséges (3.2. Fejezet). Sajnos mindkét kolonnán a (29)-(34) savamid sztereoizomerek visszatartódtak ugyan az oszlopon, de enantioselektivitást nem mutattak ([27], és nem közölt eredmények). Ez a jelenség a karboxilcsoport meghatározó szerepére utal az elválasztás mechanizmusában. (5.2. Fejezet).

A Tyr analóg sztereoizomerek, m-Tyr (35), 2-MeTyr (36), Dmt (37), *eritro*- $\beta$ -MeTyr (40), *treo*- $\beta$ -MeTyr (41) a [24] valamint a [43-45] közleményeink 1. Táblázatainak adatai alapján H<sub>2</sub>O/MeOH eluens rendszerben hatékonyan elválaszthatók,  $R_S > 1,05$  [kivéve a *treo*- $\beta$ -MeTyr (41) Chirobiotic R oszlopon]. A Dmt-NH<sub>2</sub> sztereoizomerek (38), a fent említett savamid-származékokhoz hasonlóan egyik módszerrel sem voltak elválaszthatók (5.2. Fejezet). Ugyanez mondható el az  $\alpha$ -MeTyr sztereoizomerekre.

Chirobiotic T oszlopon a  $\beta$ -szubsztituált Trp analóg sztereoizomerek közül egyedül a  $\beta$ -MeTrp (43,44),(1.a-d) és a  $\beta$ -PhTrp (49,50),(4.a-d) sztereoizomerek ([28], II.,V. Táblázat), míg Chirobiotic R kolonnán polár-organikus módban [MeOH/AcOH/TEA=100/0,1/0,1 (v/v/v)] eluens összetételnél a  $\beta$ -MeTrp (43,44), ( $R_{S,eritro}=1,4$ ;  $R_{S,treo}=3,37$ ), a  $\beta$ -2PrTrp (45,46), ( $R_{S,eritro}=1,1$ ;  $R_{S,treo}=1,2$ ), és a  $\beta$ -3PentTrp (47,48), ( $R_{S,eritro}=2,36$ ;  $R_{S,treo}=0,8$ ) sztereoizomerek választhatók el [nem közölt adatok]. A várakozással ellentétben az alkilláncot tartalmazó (45)-(48) sztereoizomerek Chirobiotic T szelektoron, mely egy nonilláncot tartalmaz, nem voltak elválaszthatók. Chirobiotic R oszlopon a polár-organikus módban való sikeres elválasztás a  $\pi$ - $\pi$ , hidrogénhid és szterikus kölcsönhatások jelentőségére utal.

A [43], 1. Táblázat és a [44], 1. és 2. Táblázat adatai szerint Tcc (51),(20 vagy 27)) és Tnc (52),(21 vagy 28) analóg sztereoizomerek bár szerkezetileg csak a karboxilcsoport helyzetében különböztek, jelentős különbséget mutattak a  $k$  és  $R_s$  értékében a két kolonnán. A szekunder aminocsoport térállása a karboxilcsoporthoz képest drámaian megváltoztatta a másodlagos kölcsönhatások jellegét.

Fordított fázisú kromatográfiát alkalmazva a tetralin-vázás (53-55), [43], (18,19); [44], (22-24); [45], (21-23) és a tetrahydroizokinolin-vázás analóg (57-65) sztereoizomerek [43], (11-17); [44], (14-21); [45], (13-20) valamint [25] szerkezete mindkét oszlopon kedvezett a királis felismerésnek. A konformáció merevítése és a nagy térkitöltésű csoport közelsége a karboxilcsoporthoz igen hatásos elválasztást eredményezett. H<sub>2</sub>O/MeOH eluens rendszerekben mindkét oszlopon az elválasztás  $R_s > 1,5$  értékkel volt jellemezhető (kivételem Chirobiotic R oszlopon [44], az Atc (53),(22), ahol az  $R_s = 1,2$  és az  $\alpha$ -MeTic3 (63),(19), ahol az  $R_s < 0,2$ ). A Chirobiotic R oszlopon fordított fázisú módszert alkalmazva ([44], 1. Táblázat) az  $\alpha$ -MePhe (21),(4) és az  $\alpha$ -MeTic3 (63),(19) fordított elúciós sorrendet [(R)<(S)] mutatott, ami az elválasztás mechanizmusának eltérő voltára utalt.

A makrociklusos glükopeptid oszlopokon szekunder aminosav („iminosav”) ((67)-(76), (1)-(10)) sztereoizomerek elválasztását H<sub>2</sub>O/MeOH illetve 0,1 mol/dm<sup>3</sup> és 0,01 mol/dm<sup>3</sup> TEAA/MeOH eluens rendszerekben [41] közleményük, I. és II. Táblázatában írtuk le. Chirobiotic T oszlopon ([41], I. Táblázat) az esetek többségében H<sub>2</sub>O/MeOH eluens rendszerekben alapvonalra történő, illetve ahhoz közeli elválasztást kaptunk, kivéve a ((72)-(74),(6)-(8)) sztereoizomereket. A (73),(7) és (74),(8) analógok esetén, pH-ellenőrzött körülmények között az elválasztás javult, míg (72),(6) analóg esetén alig változott. A Chirobiotic R oszlop ([41], II. Táblázat) a ((67)-(72),(1)-(6)) aminosav sztereoizomereket kedvezőbben választotta el, mint a Chirobiotic T. A polárisabb jellegű, hidrogén donor-akceptor kölcsönhatásokra hajlamos ((73)-(76),(7)-(10)) sztereoizomerekre a Chirobiotic T oszlop volt a hatásosabb. Érdekes módon a piperazin-vázás analóg (73),(7); (74),(8) sztereoizomerek csak TEAA tartalmú közegben választhatók el, az =NH-csoportok protonált állapota erősen befolyásolta a másodlagos kölcsönhatásokat.

A szerkezet és retenció közti kapcsolatot keresve, egy adott kolonnán azonos eluens összetétel esetén, a két oszlopra vonatkozóan hasonló megállapításokat tehetünk. A két Pro-analóg közül (67),(1) és (68),(2) a sokkal hidrofílabb (67),(1) rendelkezik kisebb  $k$  értékkel. A Pip-analógok sorában, ((69)-(72),(3)-(6)), a hidrofílabb (69),(3), (71),(5) és (72),(6) gyorsabban eluálódott, mint a Pip (70),(4). A (70),(4) analóg 4. helyzetében a -CH<sub>2</sub>-csoport helyett =NH, -S-,

és –O– atomcsoportok beépítése (73),(7); (75),(9); (76),(10) a hidrofób jelleg csökkenésének eredményeként, általában kisebb  $k$  értékeket eredményezett, de a retenciót a hidrofób jellegén kívül más kölcsönhatások is befolyásolták.

A cikloalkán- és cikloalkén-vázis  $\beta$ -aminosavak (100)-(109) nem túl jó hatásfokkal analizálhatók Chirobiotic T kolonnán ([43], 1. Táblázat). Közülük alapvonalra történő vagy ahhoz közeli elválasztást csak a telítetlen *cisz*-Abhc-én (104),(26), ( $R_S=1,75$ ), *diendo*-Abhc-én (108),(31), ( $R_S=3.70$ ) és *diexo*-Abhc-én (109),(30), ( $R_S=1,10$ ) esetén tapasztaltunk 100% MeOH eluens esetén.

A  $\beta$ -szubsztituált- $\beta$ -alanin sztereoisomerek ((90)-(98),(1)-(8)) elválasztása Chirobiotic T és R kolonnán váltakozó eredményt hozott ([30], 2. és 3. Táblázat). Chirobiotic T oszlopon fordított fázisú módszerrel, azonos eluens összetételnél (H<sub>2</sub>O/MeOH=10/90 v/v), növekvő hidrofóbicitással (növekvő szénatomszám) ((90)-(96),(1)-(6)) csökkenő retenciós faktort és ezzel párhuzamosan növekvő  $\alpha$  és  $R_S$  értéket kaptunk (kivétel (95),(5)). A (95),(5) esetén a MeOH-tartalom 100%-ra emelése jelentősen növelte  $k$ ,  $\alpha$  és  $R_S$  értékét. A kritikus esetekben a felbontás javítására a mozgó fázis szerves komponensét etanolra cserélve, vagy polár-organikus módszert alkalmazva sem sikerült jobb felbontást elérni ([30], 2. Táblázat és *nem közölt adatok*).

Chirobiotic R oszlopon fordított fázisú módszerrel a (92),(3) valamint a nagy térkitöltésű, szimmetrikus *t*-butil-csoportot tartalmazó (93),(4) sztereoisomereket kivéve, a többi aminosav sztereoisomerek alig vagy egyáltalán nem váltak el ([30], 3. Táblázat), ugyanakkor Chirobiotic T oszlopon a ((90)-(96),(1)-(6)) sztereoisomerek jól elválaszthatók voltak. A jelenség valószínű magyarázata, hogy a Chirobiotic T rendelkezett egy apoláris noniloldallánccal, mely hidrofób-hidrofób kölcsönhatásokban vehetett részt, míg a Chirobiotic R nem. Polár-organikus módszerrel, MeOH/AcOH/TEA=100/0,4/0,1 (v/v/v) eluens összetétel esetén, a leghidrofilabb (90),(1) és (91),(2) és az aromás jellegű (98),(8) aminosav sztereoisomerek elválasztása volt sikeres. Ez alátámasztja azt a feltevést, hogy a polár-organikus módban elsősorban  $\pi$ - $\pi$ , hidrogénhíd, dipól-dipól és szterikus kölcsönhatások a meghatározók, a hidrofób-hidrofób kölcsönhatásoknak alig van szerepe.

#### 4.2.2. Az elúciós sorrend Chirobiotic T és R oszlopon

Az irodalmi adatokkal összhangban  $\alpha$ -aminosavak esetén L<D, azaz (S)<(R) sorrendet tapasztaltunk. Ennek értelmezésére biológiai párhuzamot találtunk. Például a vankomicin csoportba tartozó antibiotikumok sokkal erősebben kötődnek a sejt falban lévő D-alanil-D-alanin dipeptidhez [250, 251]. Az elválasztásnál is a D-aminosavval létrejövő kölcsönhatás tűnt erősebbnek.

Esetünkben ez alól kivétel a két  $\alpha$ -metil-szubsztituált, sztérikusan erősen gátolt  $\alpha$ -MePhe (21) és  $\alpha$ -MeTic3 (63) volt.

A cikloalkán- és alkén-vázás  $\beta$ -aminosavak (100)-(109) mindkét elúciós sorrendben eluálódtak. A  $\beta$ -szubsztituált- $\beta$ -alanin származékok közül a (90) (R)<(S), míg a (96) és (98) (S)<(R) sorrendben eluálódtak. Ez a változás a Cahn-Ingold-Prelog-szabály alkalmazásának következménye.

#### 4.2.3. A fordított fázisú és a polár-organikus módszer összehasonlítása

Az általunk vizsgált aminosav rendszerekben a fordított fázisú módszer általában hatékonyabb volt, mint a polár-organikus módszer (4.2.3. Táblázat, és [45] közleményünk, 2. ábra). Ennek valószínű oka az elválasztás kinetikájában keresendő, annak ellenére, hogy a polár-organikus rendszer viszkozitása lényegesen kisebb, mint a fordított fázisú vizes-organikus rendszeré. Így elvileg az anyagátadási sebesség a polár-organikus rendszerben nagyobb. A valószínű magyarázat mégis az, hogy az anyagátadást az állófázisban az adszorpciós-deszorpciós kinetika szabja meg. Ha a molekula különböző formát vehet fel az állófázison („zwitter-ion”, protonált, deprotonált, ionpár, stb.) és csak egy formában létezik a mozgófázisban (a legoldhatóbb forma) akkor az állófázison kialakuló komplex egyensúly csökkentheti az anyagátadás sebességét.

#### 4.2.3. Táblázat

A fordított fázisú és a polár-organikus módszer összehasonlítása Chirobiotic R oszlopon

Aminosav	elméleti tényérszám (N)	
	fordított fázisú módszer	polár-organikus módszer
L-4-MePhe(17)	720	265
D-4-MePhe (17)	510	200
L-eritro- $\beta$ -MePhe (22)	580	250
D-eritro- $\beta$ -MePhe (22)	490	230
L-treo- $\beta$ -MePhe (23)	955	250
D-treo- $\beta$ -MePhe (23)	850	210
L-2-MeTyr (36)	2300	260
D-2-MeTyr (36)	1800	210
L-Tic1 (57)	2200	600
D-Tic1 (57)	1600	550
L-treo- $\beta$ -MeTic3 (65)	1250	130
D-treo- $\beta$ -MeTic3 (65)	1130	100
L-6-OHTic3 (59)	1800	480
D-6-OHTic3 (59)	700	430
L-7-OHTic3 (60)	1150	380
D-7-OHTic3 (60)	975	310

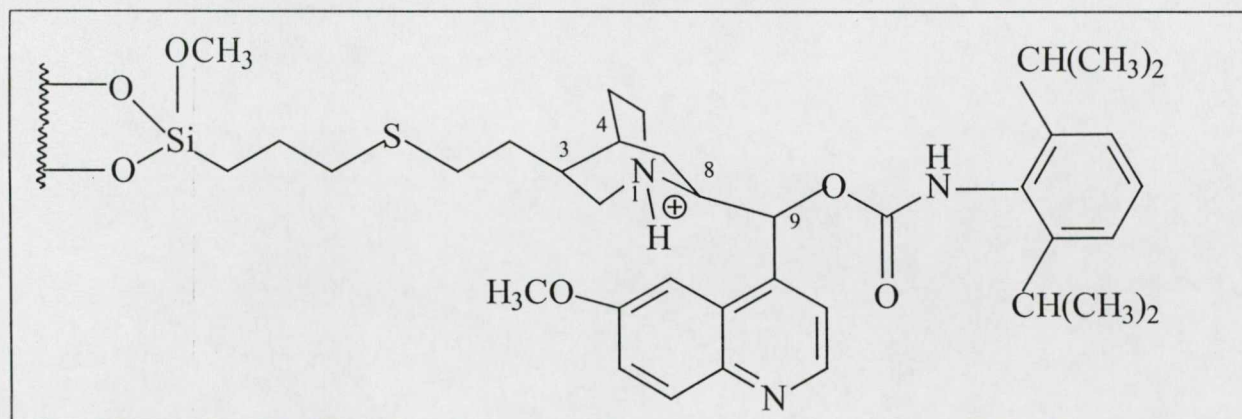
Aminosavak estén, polár-organikus módban, a mozgófázisban az aminosav ionpár formát vesz fel (a jécect/TEA ionpárral) és ennek következtében erősen solvatált. Ez a forma

különbözhet az állófázison kialakuló formától, mely deszolvatált és az aminosav szabad karboxilcsoportja elektrosztatikus kölcsönhatásba lép az állófázis protonált amincsoportjával. A kisebb anyagátadási sebesség a polár-organikus módszerben csúcsszélesedéshez és kisebb elméleti tényérszámhoz ( $N$ ) vezetett (4.2.3. Táblázat).

A jelenség hasonlítható a szobahőmérsékleten ionos-folyadékok inverz gázkromatográfiájához [252, 6. ábra], ahol az állófázisként alkalmazott ionos-folyadék poláris kölcsönhatása például 1-oktanollal jelentős anyagátadási sebesség csökkenést okozott, a hatékonyság ( $N$ ) csökkent.

#### 4.3. Nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek közvetlen folyadékkromatográfiás elválasztása kinin alapú, gyenge anioncserélő típusú „Prontosil AX-QN-2” kolonnán

A cinkona alkaloidokat széles körben alkalmazzák rezolváló ágensként királis savakra, katalizátorként sztereoszelektív szintézisekhez [253-256]. Királis szelektorként való felhasználásuk a kromatográfiában a nyolcvanas évekre nyúlik vissza, amikor is először a cinkona alkaloidok közül a kinint és a kinidint mozgófázis adalékaként [257-259], majd szilikagélhez kovalensen kötött szelektorként alkalmazták [260-266]. A legújabb fejlesztésekben Lindner és munkatársai a kinin és kinidin különböző karbamát-származékait szintetizálták és használták királis szelektorként HPLC-ben [267-271] és kapilláris kromatográfiában [272-274]. Az általunk is alkalmazott kininalapú szelektort, a „Prontosil AX-QN-2”-t a 4.3.1. ábrán mutatjuk be.



(1S,3R,4S,8S,9R)

##### 4.3.1. ábra A kininalapú királis szelektor szerkezete

E típusú szelektorok alkalmasak karbonsavak,  $N$ -védett aminosavak, szulfonsav-, foszfonsav- és foszforsav-származék sztereoizomerek elválasztására [265-272]. A kinuklidin-gyűrű

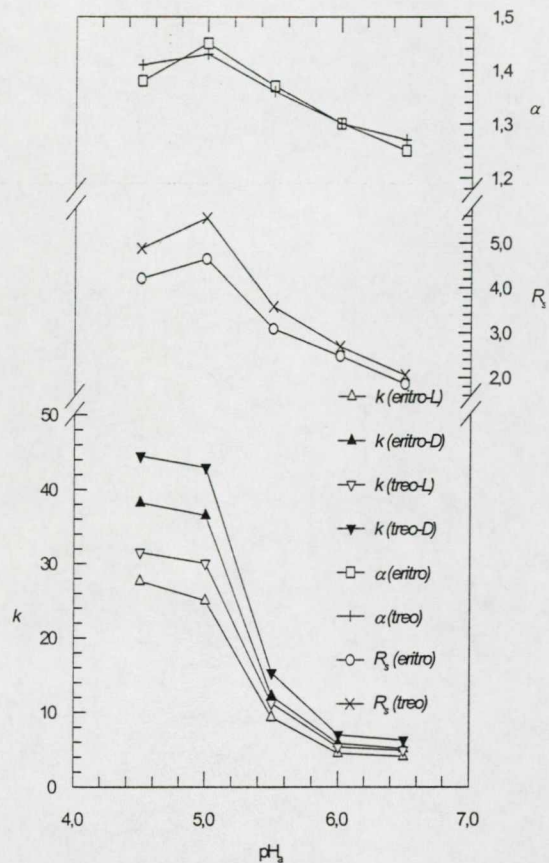
*tercier* nitrogénje ( $pK$  9,1) gyenge anioncserelő sajátságú, *elektrosztatikus* kölcsönhatásban vehet részt. A további kölcsönhatások a 4. Fejezet elején ismertetett hatások lehetnek.

#### 4.3.1. Nemfehérje-alkotó $\beta$ -metil-szubsztituált aminosav sztereoizomerek elválasztása

A szelektor és az aminosavak közti kapcsolat erősítése érdekében az aminosavak *N*-védett formáit szintetizáltuk, melyek különböző mértékben alkalmasak az előbb felsorolt kölcsönhatások létrehozására. A **F. 4.3.1. Táblázatban** az *eritro*- és *treo*- $\beta$ -MePhe és -Tyr példáján mutatjuk be az *N*-védőcsoportok hatását a kromatográfiás elválasztásra. Az adatok arra engednek következtetni, hogy az alkil-szubsztituenszt tartalmazó **Ac**- és **Boc**-védőcsoportok hozzájárulnak a leggyengébb kölcsönhatást, az aromás **Bz**- és **Z**-védőcsoportok  $\pi$ - $\pi$  jellegű kölcsönhatása a szelektorral már erősebb kapcsolatot jelent. A  $\pi$ -savas jellegű dinitroaril (**DNB**, **DNZ**, **DNP**)- és az **Fmoc**-származékok jelentős retenciónövekedést okoztak, mellyel párhuzamosan általában a szelektivitási tényező is nőtt. Hasonló jellegű tendenciákat kaptunk, ha az *eritro*- és *treo*- $\beta$ -MeTyr-t választottuk modellvegyületként. "Prontosil AX-QN-2" oszlopon a  $\beta$ -metil-aminosavakat a *N*-2,4-DNP- illetve *N*-Boc védett formában analizáltuk. Az utóbbi formát, a peptidszintézishez használt *N*-Boc védett aminosavak ellenőrzése miatt választottuk. Az oszlop gyenge anioncserelő sajátsága ismeretében, az analízis körülményeinek optimalizálásához a **pH**, a **pufferkoncentráció** és a **hőmérséklet** hatása mellett **szerves módosító** mennyiségének hatását vizsgáltuk.

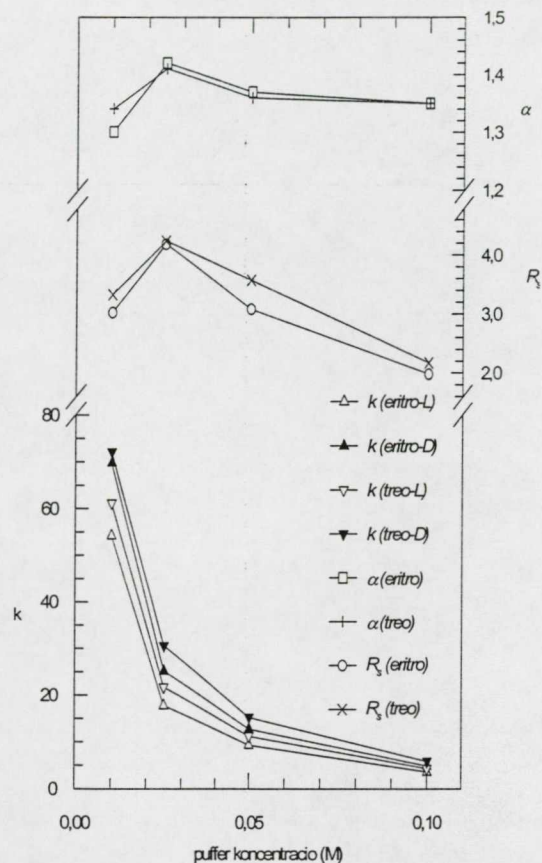
##### 4.3.1.1. A pH és a pufferkoncentráció hatása az elválasztásra

A **4.3.2. ábrán** az *eritro*- és *treo*- $\beta$ -MePhe sztereoizomerek *N*-2,4-DNP származékainak  $k$ ,  $\alpha$  és  $R_S$  értékeit tüntettük fel az aktuális  $pH_a$  (a víz-szerves eluens elegyben mért pH) függvényében [46]. A  $pH_a$  csökkentésével a  $k$ ,  $\alpha$  és  $R_S$  növekedett, de  $\alpha$  és  $R_S$   $pH_a=5$  körül maximumot mutatott. A pH beállítására és a puffer hatásának vizsgálatára foszfát- vagy acetátpuffereket alkalmaztunk. Ha a **pufferkoncentráció** hatását nézzük (**4.3.3. ábra**), a koncentráció növelésével a  $k$  csökkent,  $\alpha$  alig változott és az  $R_S$  értéke csaknem kétszeresére csökkent, ha a koncentrációt 0,02–0,1 mol/dm<sup>3</sup> tartományban növeltük. A pH és a pufferkoncentráció-függés alátámasztja az elválasztás feltételezett ioncsere mechanizmusát.  $pH_a=4,5-6,5$  tartományban a királis szelektor pozitív töltésű ( $pK=9,1$ ), az aminosav karboxilcsoportja negatív töltésű, ami kedvezett az elektrosztatikus vonzásnak. Növekvő pufferkoncentráció esetén a szelektor és a puffer közti ionpár képződés valószínűleg gátolta a szelektor és az aminosav közti kölcsönhatást, így  $k$ ,  $\alpha$  és  $R_S$  csökkent. A nem irányított elektrosztatikus vonzás mellett az enantiomer-elválasztásért az aminosav és a szelektor



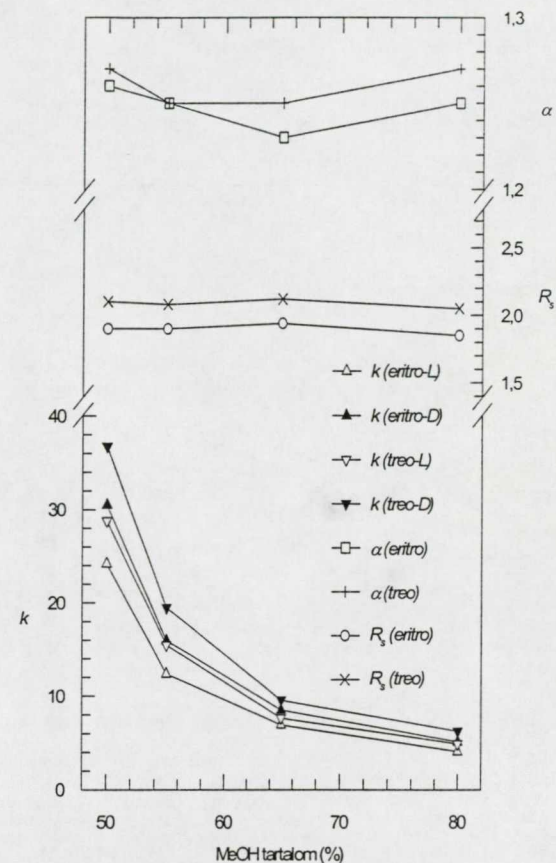
4.3.2. ábra A pH hatása a retenciós faktor ( $k$ ), elválasztási tényező ( $\alpha$ ) és felbontás ( $R_s$ ) értékére az *N*-2,4-dinitrofenil-eritro- és *treo*- $\beta$ -metilfenilalanin (22,23) sztereoiszomerek elválasztása esetén

Eluens, 0,05 mol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/MeOH=20/80 (v/v); pH<sub>a</sub>=4,5-6,5; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 360 nm; hőmérséklet, 40°C.



4.3.3. ábra A pufferkoncentráció hatása a retenciós faktor ( $k$ ), elválasztási tényező ( $\alpha$ ) és felbontás ( $R_s$ ) értékére az *N*-2,4-dinitrofenil-eritro- és *treo*- $\beta$ -metilfenilalanin (22,23) sztereoiszomerek elválasztása esetén

Eluens, 0,01-0,10 mol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/MeOH=20/80 (v/v); pH<sub>a</sub>=5,5; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 360 nm; hőmérséklet, 40°C.



4.3.4. ábra Az eluens metanol-tartalmának hatása a retenciós faktor ( $k$ ), elválasztási tényező ( $\alpha$ ) és felbontás ( $R_s$ ) értékére az *N*-2,4-dinitrofenil-eritro- és *treo*- $\beta$ -metilfenilalanin (22,23) sztereoiszomerek elválasztása esetén

Eluens, 0,05 mol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/MeOH=50/50-20/80 (v/v); pH<sub>a</sub>=5,5; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 360 nm; hőmérséklet, 40°C.

közi irányított intermolekuláris kölcsönhatások is felelősek. A pufferek alkalmazásánál figyelembe kell venni korlátozott oldhatóságukat víz-szerves eluens elegyekben (az ajánlott maximális koncentráció  $50 \text{ mmol/dm}^3$ ). Acetátpuffer alkalmazása foszfátpuffer helyett ugyanolyan koncentrációban jelentős retenciónövekedést okozott, melynek valószínű oka az acetátpuffer kisebb ionerőssége. Ugyanakkor néhány kivételtől eltekintve (pl.  $\beta$ -MeTyr) a szelektivitási tényező értéke a két puffer rendszer esetén nagyon hasonló volt.

#### 4.3.1.2. A hőmérséklet hatása az elválasztásra

Az oszlop működése szobahőmérsékleten sávszélesedést és az aszimmetrikus csúcsalakat eredményezett, mely  $40^\circ\text{C}$  hőmérsékleten megszűnt.

#### 4.3.1.3. A szerves módosító hatása az elválasztásra

Az *N*-2,4-DNP- $\beta$ -metil-szubsztituált aminosav sztereoizomerek tapasztalatunk szerint a MeOH szerves módosítóval jobb felbontást és szimmetrikusabb csúcsalakat eredményeztek, mint MeCN-lel. Az elválasztás *MeOH-koncentrációtól* való függését szintén *N*-2,4-DNP-*eritro*- és *treo*- $\beta$ -MePhe sztereoizomerek példáján mutatjuk be (4.3.4. ábra). Az ábrából látható, hogy *k* erőteljesen nőtt a MeOH-koncentráció csökkenésével, ugyanakkor az  $\alpha$  és  $R_S$  értékében alig tapasztaltunk változást. Az analízis gyorsítása érdekében ezért a nagyobb MeOH-koncentráció használatát javasoljuk.

#### 4.3.1.4. Az *N*-2,4-DNP- $\beta$ -metil-szubsztituált aminosav sztereoizomerek elválasztása

A „Prontosil AX-QN-2” oszlopon valószínű, hogy a retenciót az elektrosztatikus vonzás mellett a molekula hidrofób jellege és térkitöltése befolyásolta. A  $\beta$ -metil-szubsztituált aminosav sztereoizomerekre (egy adott eluens összetételnél, pH-n és hőmérsékleten) a [46] közleményünk 1. Táblázatában mutatjuk be ezek hatását. A leghidrofílabb  $\beta$ -MeTyr rendelkezik a legkisebb *k* értékekkel, míg a leglipofílabb jellegű és legnagyobb térkitöltésű  $\beta$ -MeTrp *k* értékei a legnagyobbak (a  $\beta$ -MeTyr <  $\beta$ -MeTic <  $\beta$ -MePhe <  $\beta$ -MeTrp relatív lipofilitási sorrendjét külön kísérletekben,  $\text{C}_{18}$  állófázison állapítottuk meg). A Táblázatból látható, hogy az egyes *eritro*- illetve *treo*-enantiomerek (kivéve a *treo*- $\beta$ -MeTic)  $R_S > 1,5$  értékkel választhatók el. A négy enantiomer együttes elválasztása  $R_S > 1,5$  értékkel, mely a közvetett módszerek esetén is nehéz feladat volt, a  $\beta$ -MeTic kivételével a  $\beta$ -MeTyr,  $\beta$ -MePhe esetén teljes mértékben, a  $\beta$ -MeTrp esetén részlegesen megvalósítható. E problémával a *közvetlen* módszerek ismertetése után külön foglalkozunk (4.5. Fejezet).

Irodalmi adatok alapján az *N*-2,4-DNP-védett  $\alpha$ -aminosavak esetén az *elúciós sorrend* (*S*)<(*R*). A két kiralitáscentrumot tartalmazó  $\beta$ -metil-aminosavak esetén az enantiomer párokra a következő sorrendet állapítottuk meg: (2*S*,3*S*)<(2*R*,3*R*) illetve (2*S*,3*R*)<(2*R*,3*S*) ([46], 1. Táblázat). A sorrend itt (2*S*)<(2*R*), valószínű, hogy az elsődleges kölcsönhatást biztosító, karboxilcsoportot tartalmazó C2 szénatom konfigurációja a sorrend meghatározója.

#### 4.3.1.5. Az *N*-Boc- $\beta$ -metil-szubsztituált aminosav sztereoizomerek elválasztása

Az aminosavak *N*-Boc védeése mindig magában hordozza a racemizáció veszélyét, ezért megvizsgáltuk, hogy a „Prontosil AX-QN-2” kolonna mennyire alkalmas *N*-Boc védett aminosav sztereoizomerek analizésére. Az aromás csoport és vele a  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatások hiánya miatt az *N*-Boc védett származékok például a *N*-2,4-DNP-származékokhoz képest kisebb retencióval rendelkeztek (nem közölt adatok). Ez eltérő retenciós mechanizmust eredményezett a kétféle aminosav-származék között, amit az eltérő retenciós sorrendek is alátámasztottak [268]. Az *N*-Boc védett  $\beta$ -metil-aminosav sztereoizomerek elválasztását adott eluens összetételeknél és pH-n a [46] közleményünk 2. Táblázata szemlélteti. Mint látható, a hidrofóbicitásnak és a molekula térkitöltésének itt is meghatározó szerepe volt, a  $\beta$ -MeTrp sztereoizomerek elválasztása volt a legjobb. Az egyes enantiomerpárokon belül a felbontás a legtöbb esetben  $R_S > 1,5$ , kivéve az *eritro*- és *treo*- $\beta$ -MeTic, melynek sztereoizomerjei MeOH-tartalmú rendszerben alig vagy egyáltalán nem voltak elválaszthatók. Meglepő módon az *eritro*- és *treo*- $\beta$ -MeTic sztereoizomerek MeCN-tartalmú eluensben sokkal jobb elválasztást eredményeztek, itt a négy enantiomer részleges elválasztása is megoldható volt.

Az *N*-Boc védett  $\beta$ -metil-aminosavak *elúciós sorrendje* az irodalmi adatokkal egyezően fordított, mint az *N*-2,4-DNP védett aminosavaké: (2*R*,3*R*)<(2*S*,3*S*) illetve (2*R*,3*S*)<(2*S*,3*R*).

#### 4.3.2. $\beta$ -Szubsztituált- $\beta$ -alanin aminosav sztereoizomerek elválasztása „Prontosil AX-QN-2” kolonnán

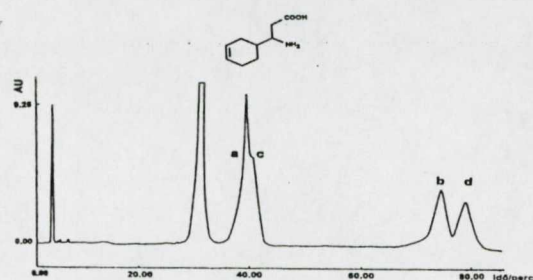
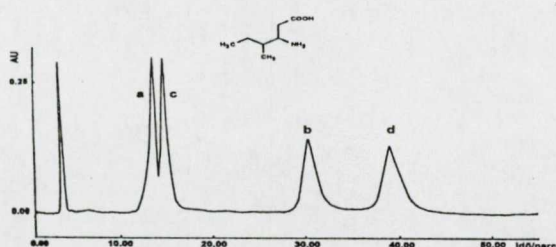
Mint az előző fejezetekben láttuk a  $\beta$ -szubsztituált- $\beta$ -alanin aminosav sztereoizomerek (90)-(98) elválasztása koronaéter alapú és makrociklusos glükopeptid tartalmú állófázisokon nem minden esetben volt sikeres. „Prontosil AX-QN-2” oszlopon a  $\beta$ -szubsztituált- $\beta$ -alanin aminosav sztereoizomereket *N*-2,4-DNP formában elemeztük és a  $\beta$ -metil-aminosavakhoz hasonlóan meghatároztuk az analízis optimális körülményeit. A *pH* hatását vizsgálva az *N*-2,4-dinitrofenil-3-amino-4-metilhexánsav (94),(5) sztereoizomerek elválasztására ([47], 3. ábra), hasonló eredményre

jutottunk, mint az *N*-2,4-DNP-*eritro*- és *treo*- $\beta$ -MePhe esetén. A pH csökkenésével (pH=6,5-5,0; 0,05 mol/dm<sup>3</sup> NH<sub>4</sub>OAc) a *k* jelentősen nőtt, míg gyakorlatilag  $\alpha$  alig változott. A *k* növekedésével egyidejűleg az *R*<sub>S</sub> mintegy 30%-os növekedését tapasztaltuk. A *pufferkoncentrációtól* (0,01-0,1 mol/dm<sup>3</sup> NH<sub>4</sub>OAc, pH=6,0) való függés annyiban tért el az *N*-2,4-DNP-*eritro*- és *treo*- $\beta$ -MePhe esetén tapasztalttól, hogy itt az *R*<sub>S</sub> értéke is alig változott a pufferkoncentráció növelésével (*R*<sub>S</sub>~6,1-6,5), és  $\alpha$  értéke gyakorlatilag állandó volt ( $\alpha$ ~1,9) (*nem közölt adatok*). Az eluens *MeOH-tartalmának* hatását az *N*-2,4-dinitrofenil-3-amino-4,4-dimetilpentánsav (93),(4) példáján mutatjuk be, a MeOH-tartalmat 75-98% (v/v) tartományban változtatva ([47], 1. Táblázat). Állandó ionerősség mellett (0,01 mol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) az ln*k* lineárisan csökkent a *MeOH-tartalom* növelésével, ami a hidrofób kromatográfias kölcsönhatás jellemzője. Az  $\alpha$  értéke gyakorlatilag változatlan maradt ( $\alpha$ ~2,63-2,81), míg az *R*<sub>S</sub> értékekben a MeOH-koncentráció csökkenésével enyhe emelkedést tapasztaltunk (*R*<sub>S</sub>~11,78-14,01). Az *R*<sub>S</sub> növekedése az MeOH-koncentráció csökkenésével nem volt általános. A ((90-92),(1-3)) és a (96),(7); (97),(8) komponensekre kisebb MeOH-koncentrációknál kisebb *R*<sub>S</sub> értéket mértünk ([47], 1. Táblázat). A kísérleti adatok azt mutatják, hogy a retenció ezen az oszlopon jelentősen függött a sztereoizomer *hidrofóbicitásától*, a szubsztituens *térkitöltésétől* és *aromás jellegétől*. Egy adott eluens összetételnél [0,05 mol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/MeOH=15/85 (v/v), pH=5,5] a leghidrofilabb (90),(1) rendelkezett a legkisebb *k* értékkel, míg a leginkább hidrofóbnak tekinthető (96),(7) a legnagyobbal ([47], 1. Táblázat). A másik következtetés, hogy *k* értéke a szubsztituens szénatomok számának növekedésével (térkitöltéssel) nőtt ((90-96),(1-7)). Ez az adatsor alátámasztja, hogy az elektrosztatikus vonzás mellett a hidrofóbicitás meghatározó a retenció szabályozásában. Ezen analógok a 3. helyzetben különböző hosszúságú és elágazó szubsztituens tartalmaztak, mely nemcsak a *hidrofóbicitást*, hanem a *térkitöltést* és a *szterikus hatásokat* is befolyásolta. A leghidrofilabb (90),(1) és (91),(2) rendelkezett a legkisebb  $\alpha$  és *R*<sub>S</sub> értékkel, míg ((92-96),(3-7)) esetén  $\alpha$ ~2 és *R*<sub>S</sub>~8-9 volt (kivéve (93),(4)). A (92),(3); ((94-96),(5-7)) komponensekre kapott nagyon hasonló  $\alpha$  és *R*<sub>S</sub> értékek azt mutatják, hogy a növekvő hidrofóbicitás hozzájárul a retencióhoz, de a királis felismeréshez alig. A (93),(4) kiemelkedő  $\alpha$  és *R*<sub>S</sub> értéke arra utal, hogy a szimmetrikus, nagy térkitöltésű *t*-butilcsoport térbeli szerkezete előnyös a legkedvezőbb kölcsönhatás kialakításához az állófázison. A ((96-98),(7-9)) sztereoizomerekben a szénatomok száma megegyező, ami közel azonos *k* értékeket eredményezett. A (98),(9) kissé nagyobb *k* értéke az állófázissal való  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatással magyarázható, de ennek mértéke mindkét enantiomerre nézve ugyanakkora volt. Ennélfogva  $\alpha$  és *R*<sub>S</sub> a (96),(7); (97),(8) sztereoizomerekhez képest nem javult.

A retenció MeOH-koncentrációtól való függése megerősítette a hidrofóbicitás jelentőségét. A *k* növekedése az MeOH-koncentráció csökkenésével azon sztereoisomerek esetén volt sokkal nagyobb, melyek nagyobb hidrofóbicitással rendelkeztek (nagyobb szénatomszám, aromás jelleg nőtt). Ez a viselkedés jellemző, ha az állófázis-szubsztrátum kölcsönhatásban a hidrofób-hidrofób kölcsönhatás meghatározó.

Az elúciós sorrend a (90),(1) sztereoisomer esetén (*S*)<(*R*), míg a (96),(7) és (98),(9) sztereoisomerek esetén (*R*)<(*S*) volt. A (96),(7) és (98),(9) sztereoisomerek irodalmitól eltérő sorrendje a Cahn-Ingold-Prelog-szabályból következik, az atomcsoportok elhelyezkedése a királis szénatom körül mindhárom esetben ugyanaz.

#### 4.3.2.1. A „Prontosil AX-QN-2” kolonna diasztereoselektivitása



**4.3.5. ábra** Az *N*-3,5-DNB-3-amino-4-metil-hexánsav (94) és az *N*-2,4-DNP-3-amino-3-(ciklohex-3-én-1-il)propánsav (97) sztereoisomerek elválasztása  
Kromatográfia: oszlop, „Prontosil AX-QN-2”; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 250 és 360 nm; hőmérséklet, 40°C; eluens, (94), 0,025 mol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/MeOH=30/70 (v/v), pH<sub>2</sub>=4,5, (97), 0,05 mol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/MeOH=30/70 (v/v), pH<sub>2</sub>=5,5.

A vizsgált β-aminosavak közül a (94) és (97) két kiralitáscentrummal rendelkezett, és szintézisük racém terméket eredményezett (4 enantiomer). Az eddig ismertetett módszerek és kolonnák csak az enantiomerpárok elválasztását tették lehetővé. E fejezet bevezetőjében említett mechanizmus szerint a dinitroaril-csoportok jelenléte jelentősen növeli a királis szelektorral létrejövő kölcsönhatások lehetőségét, növelve ezzel a királis felismerést. „Prontosil AX-QN-2” oszlopon, optimalizált körülmények között, a (94) diasztereomerek csaknem teljes elválasztását *N*-3,5-dinitrobenzoil-, míg a (97) aminosav diasztereomerek részleges elválasztását *N*-2,4-dinitrofenil védett formában sikerült megvalósítani (4.3.5. ábra).

Az oszlop β-metil-szubsztituált aminosavakra vonatkozó diasztereoselektivitásáról a 4.5.1. Fejezetben szólnunk.

### 4.3.3. $\alpha$ -Szubsztituált prolin analóg sztereoizomerek elválasztása

Az  $\alpha$ -szubsztituált prolin analóg sztereoizomerek (79)-(87) közvetlen analízise az eddig ismertett oszlopokon nem volt megvalósítható. A koronaéter alapú oszlop nem alkalmas szekunder aminosavak analízisére, a Chirobiotic T és R oszlopokon pedig alig tapasztaltunk elválasztást. A „Prontosil AX-QN-2” oszlopon ezek a konformációsan erősen gátolt aminosav sztereoizomerek *N*-2,4-DNP-védett formában jól analizálhatók voltak.

Az elemzés körülményeit a pH, pufferkoncentráció és szerves módosító koncentráció változtatásával optimalizáltuk hasonlóan a  $\beta$ -metil-aminosavak és  $\beta$ -aminosavak méréséhez. Modellanyagként  $\alpha$ -(2-klórbenzil)prolint (81) választottuk. A kapott függések a  $\beta$ -aminosavak esetén mértékhez hasonlítottak, azzal a csekély eltéréssel, hogy az  $R_S$  a sókoncentráció növelésével (0,01–0,1 mol/dm<sup>3</sup> NH<sub>4</sub>OAc) határozott növekedést (~40%), míg a MeOH-tartalom növelésével [60-90% (v/v) MeOH-tartalom között] határozott csökkenést (30%) mutatott (*nem közölt adatok*).

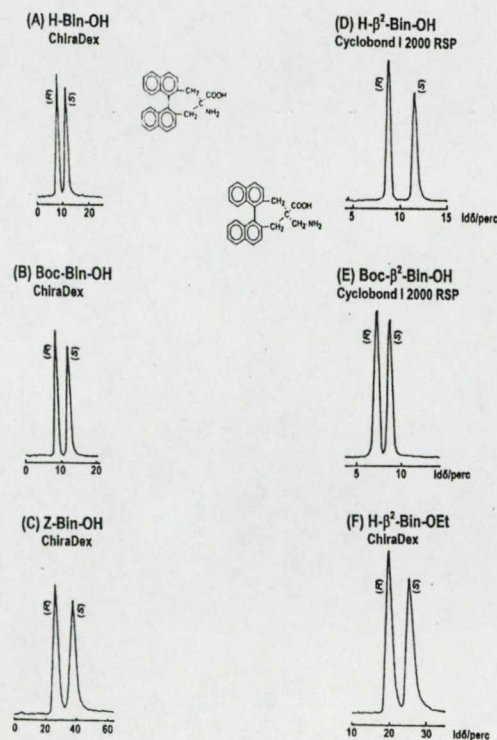
Az *N*-2,4-DNP-védett Pro analóg sztereoizomerek *k*,  $\alpha$  és  $R_S$  adatait két eluens összetételnél és pH-n a F.4.3.2. Táblázatban mutatjuk be [*nem közölt adatok*]. Az adatokból kitűnt, hogy itt is a hidrofóbicitás és a térkitöltés jelentős szerepet játszott a retenció meghatározásában. Az  $\alpha$ -alkil- és alkén szubsztitúcióhoz képest (68),(77),(78) az  $\alpha$ -benzil-, fluor-, klór- és brómbenzil valamint a metilbenzil- és metilnaftilcsoportokkal való szubsztitúció(79)-(87) egyre növekvő retenciós faktort, *k* eredményezett. Ezzel egy időben az  $\alpha$  és  $R_S$  értékekben általában kismértékű csökkenés következett be, ami arra utal, hogy a hidrofób jelleg növelése jelentős a retenció szempontjából, de csak kis mértékben járult hozzá a királis felismeréshez. A F.4.3.2. Táblázat adataiból ugyanakkor az is kitűnt, hogy a MeOH-koncentráció csökkentése többnyire jelentős retenciós faktor (*k*) és felbontás ( $R_S$ ) növekedést eredményezett,  $\alpha$  egyidejű csökkenése mellett (a kisebb MeOH-tartalom egyúttal magasabb hőmérséklettel párosult). A „Prontosil AX-QN-2” oszlop igen hatékonyan bizonyult a konformációsan gátolt, szekunder aminosav sztereoizomerek elválasztásában.

### 4.4. Ciklodextrin alapú állófázisok néhány közvetlen folyadékromatográfiás alkalmazása

A ciklodextrinek (CD) kromatográfiás állófázisként való felhasználása a gázkromatográfiában kezdődött és mai alkalmazása annyira széleskörű, hogy csak néhány összefoglaló munkát említünk [7,10,16,21,26]. Mindenképpen elismerésre méltó Szejtli úttörő munkássága ezen a területen [275].

Az aminosavak köréből a zárványkomplex képződés analitikai alkalmazására itt a dinaftil-aminosav-származék sztereoizomerek (88) és (89) elválasztására mutatunk be példát (a 6.

Fejezetben aminoalkoholokra), melyek az eddig alkalmazott királis állófázisokon nem voltak elválaszthatók [16, 23]. A dinaftil-aminosav származékok közül az  $\alpha$ -aminosav családba tartozó **H-Bin-OH** (88) és *N*-Boc, *Z*-Boc védett analógjai jól elválaszthatók voltak természetes  $\beta$ -CD-t tartalmazó állófázison (4.4.1. ábra). A naftilgyűrű szoros illeszkedése a  $\beta$ -CD üregében jó kiindulási pont a királis felismeréshez. A  $\beta$ -aminosav családba tartozó **H- $\beta^2$ -Bin-OH** sztereoisomerek, valamint *N*-Boc védett és etilészter-származékai közül csak az utóbbi volt elválasztható természetes  $\beta$ -CD alapú fázison. Az előző két aminosav analóg sztereoisomerjei hidroxipropiléter tartalmú  $\beta$ -CD-n, Cyclobond RSP oszlopon voltak elválaszthatók. Legjobb tudomásunk szerint ez volt az *első eset, hogy atrópzimomereket sikerült hidroxipropil-éter tartalmú  $\beta$ -CD-n elválasztani. A hidroxipropil-éter csoport beépítése növelte a hidrogénhid kapcsolatok lehetőségét, különösen azon sztereoisomerek esetén, melyek a királis szénatomhoz képest  $\beta$ -helyzetben nagy térkitöltésű csoportot tartalmaztak [276]. A 4.4.1. ábrán jól látható az oszlop hatékonysága, a nem védett és *N*-Boc védett aminosavak esetén viszonylag rövid idő alatt  $R_S > 1,5$  felbontás volt elérhető.*



4.4.1. ábra *(R,S)*-6-amino-6,7-dihidro-5H-dinafto[2,1]cikloheptén-6-karbonsav [(*R,S*)-*H*-Bin-OH] és származékai (88) és (*R,S*)-6-aminometil-6,7-dihidro-5H-dinafto[2,1]-cikloheptén-6-karbonsav [(*R,S*)-*H- $\beta^2$* -Bin-OH] és származékai (89) elválasztása ciklodextrin alapú állófázisokon

Királis kolonna, **A, B, C, F**, ChiraDex ( $\beta$ -ciklodextrin), **D, E**, Cyclobond I 2000 RSP (*R,S*-2-hidroxipropil-éter tartalmú  $\beta$ -ciklodextrin); áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 205-220 nm; hőmérséklet, 25°C; eluens, **A, B**, 0,01 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=3,0)/MeOH=75/25 (v/v), **C**, 0,01 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=3,0)/MeOH=60/40 (v/v), **D**, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/MeOH=25/75 (v/v), **E**, 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O/MeCN=50/50 (v/v), **F**, 0,01 mol/dm<sup>3</sup> NaOAc (pH=3,0)/MeOH=20/80 (v/v)

Az *elúciós sorrendet* illetően minden esetben (*R*)<(*S*) sorrendet tapasztaltunk. Ez ellentétes a fehérjealkotó aminosavakra  $\beta$ -CD-alapú oszlopokon kapott (*S*)<(*R*) sorrenddel, ami rávilágít az egyes enantiomerek azonosításának szükségességére.

#### 4.5. Közvetlen folyadékkromatográfiás elválasztások összehasonlítása

##### 4.5.1. Az eritro- és treo- $\beta$ -metil-aminosav sztereoizomerek elválasztása

Az eddig tárgyalt  $\beta$ -metil-aminosavakra kidolgozott *közvetlen* kromatográfiás módszerek eredményeit a F.4.5.1. Táblázatban foglaltuk össze. A Táblázat válogatott, optimalizált elválasztásokat tartalmaz. Az eredményekből a következő általános következtetések vonhatók le:

1. A Crownpak CR(+) kolonna nem alkalmas a *treo*-enantimerpárok, és szekunder aminosav sztereoizomerek elválasztására
2. A  $\beta$ -MePhe,  $\beta$ -MeTyr és  $\beta$ -MeTrp sztereoizomerek (2 enantiomerpár) elválasztására legalkalmasabb a Chirobiotic R és a „Prontosil AX-QN-2”, a  $\beta$ -MeTic sztereoizomerekre a Chirobiotic T oszlop.
3. Az *elúciós sorrend* változó.  $\beta$ -metil-aminosavakra általánosan érvényes, hogy Chirobiotic T és R valamint “Prontosil AX-QN-2” oszlopok esetén (az utóbbi csak az *N*-2,4-DNP-védett aminosavakra vonatkozik) az enantiomerek *elúciós sorrendje* L<D, azaz, (2*S*,3*S*)<(2*R*,3*R*) illetve (2*S*,3*R*)<(2*R*,3*S*); Crownpak CR(+) oszlopon D<L, azaz (2*R*,3*R*)<(2*S*,3*S*) a sorrend és “Prontosil AX-QN-2” oszlopon (a nem *N*-2,4-DNP-védett aminosavakra) D<L, azaz (2*R*,3*R*)<(2*S*,3*S*) illetve (2*R*,3*S*)<(2*S*,3*R*) a sorrend.

A *diasztereomerek* sorrendje még változatosabb képet mutat. Ez kellő szabadságot biztosított a megfelelő módszer kiválasztásában, hogy a „minor” komponens a fő komponens előtt eluálódjon.

4. Az enantiomerek elválasztása során az eddigiekben azt tapasztaltuk, hogy a két szerves módosító közül a MeOH sokszor hatékonyabb volt, mint az MeCN. A sztereoizomerekre vonatkozó *diasztereoselektivitást* tekintve, az MeCN alkalmazása néhány esetben (például *N*-Boc védett  $\beta$ -metil-aminosav sztereoizomerek szeparálása „Prontosil AX-QN-2” oszlopon) jobb elválasztást eredményezett.

##### 4.5.2. A királis oszlopok alkalmazásának összehasonlítása

Ebben az alfejezetben az általunk használt királis oszlopok alkalmazására néhány általános következtetést fogalmazunk meg, összefoglalva és előlegezve az 5. és 6. Fejezet tapasztalatainak

következtetéseit is. Figyelembe véve az elválasztási mechanizmusok bonyolultságát, az itt közölt ajánlások iránymutató jelleggel bírnak.

Az aminosavakra alkalmazott szelektorok közül a **Crownpak CR(+)** oszlop használata a legkorlátozottabb. Alkalmas egyszerűbb szerkezetű, főleg aromás (fenil) csoportot tartalmazó aminosav sztereoizomerek elválasztására. Az aromás jelleg növelése (naftil-, binaftilcsoportok) vagy egyre hosszabb szénláncú alkilcsoportok jelenléte a molekulában növekvő visszatartás mellett egyre rosszabb elválasztást eredményez, a növekvő csúcshidrofóbítás miatt (növekvő hidrofób-hidrofób és  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatások). Ugyanakkor hidrofíll jellegű csoportok jelenléte ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $=\text{NH}$ ) kisebb retenciós faktorok mellett is jobb elválasztáshoz vezetett, valószínűleg a koronaéter oxigénekkel kialakuló hidrogénhid kölcsönhatások eredményeként.

A Crownpak CR(+) oszlop nem alkalmas *trans*- $\beta$ -szubsztituált aminosav, sztérikusan erősen gátolt aminosav valamint szekunder aminosav sztereoizomerek elválasztására [az utóbbira egyetlen kivételt találtunk a  $\beta$ -karbolin származék Tcc-t (51), 4.1. Fejezet]. Az oszlop további hátránya, hogy preparatív elválasztás esetén az eluensként alkalmazott perklórsav eltávolítása fokozott figyelmet igényel.

A **Chirobiotic T** és **R** oszlopok a leghatékonyabbnak mutatkoztak a *nemfehérje-alkotó aminosav* sztereoizomerek elválasztásában. A két szelektor jól kiegészítette egymást, az általunk vizsgált aminosav rendszerek, *kevés kivételtől* eltekintve, valamelyik oszlopon jól elválaszthatók voltak.

A kevés kivételhez tartoznak a  $\beta$ -aminosav sztereoizomerek, az aminosav-amidok valamint a sztérikusan erősen gátolt  $\alpha$ -szubsztituált prolin analóg sztereoizomerek egy része. Meg kell jegyezni, hogy legújabb kutatásaink szerint a teicoplanin aglikon változata, a **Chirobiotic TAG** oszlop, eredményesen alkalmazható  $\beta$ -aminosav sztereoizomerek elválasztására (*nem közölt eredmények*). Az aminosav-amid sztereoizomerek rossz elválasztása a deprotonált karboxilcsoport jelentőségét bizonyítja az elválasztás mechanizmusában (5. Fejezet). Az oszlopok további előnye, hogy preparatív célokra is kiválóan alkalmazhatók és a víz/metanol eluens rendszer eltávolítása gondmentes.

A kinin alapú, gyenge anioncserélő sajátságú „**Prontosil AX-QN-2**” oszlop előnye, hogy az  $\beta$ -aminosav valamint a sztérikusan erősen gátolt  $\alpha$ -szubsztituált prolin analóg sztereoizomerek elválasztására is alkalmazható. A két kiralitáscentrumot tartalmazó  $\beta$ -szubsztituált- $\beta$ -alanin sztereoizomerekre (94) és (97) mind a *közvetett* mind a *közvetlen* módszerek közül ez a szelektor mutatott egyedül diasztereoselektivitást. Hátránya hogy kolonna előtti származékképzést (nem

királis) igényel, ami megnöveli az analízisidőt és preparatív kromatográfiás szempontból sem előnyös.

A  $\beta$ -ciklodextrin alapú szelektorok közül a természetes  $\beta$ -ciklodextrint és a hidroxipropiléter tartalmú változatát (az utóbbit *az irodalomban elsőként*) sikeresen alkalmaztuk binaftil-szubsztituenst tartalmazó  $\alpha$ - és  $\beta$ -aminosav *atrópiomerek* elválasztására (4.4. Fejezet).

Aminoalkoholok és származékaik elválasztására a  $\beta$ -ciklodextrin alapú (*S*)-naftiletil-karbamát-szelektort tartalmazó királis állófázis (Cyclobond I 2000 SN), valamint a cellulózalapú *trisz*(3,5-dimetilfenil-karbamát)cellulózt tartalmazó (Chiralcel OD) oszlop volt alkalmas (6. Fejezet).

Összefoglalóan azt mondhatjuk, hogy a *nemfehérje-alkotó aminosav* sztereoizomerek elválasztására a Chirobiotic T és R oszlopok a legalkalmasabbak, kiegészítve a kinin alapú „Prontosil AX-QN-2” sajátos elválasztó képességével. *Aminoalkoholokra* az aromás szubsztituenst és karbamát szelektort tartalmazó *cellulóz-* vagy  *$\beta$ -ciklodextrin alapú* oszlopok a legjobban hasznosíthatók.

## 5. Királis oszlopon végzett elválasztások hőmérsékletfüggése

Minden kromatográfias rendszerben a retencióra és a szelektivitásra az álló- és mozgófázist alkotó komponensek minőségén és koncentrációján kívül jelentős befolyással lehet a pH, az áramlási sebesség és a hőmérséklet. A hőmérséklet változtatása, mint a rendszer variabilitásának lehetséges módja egyre növekvő szerepet kap, főleg a fordított fázisú kromatográfiában [277-288]. Az eddigi tapasztalatok alapján a hőmérsékletnek legalább két igen fontos hatása van a kromatográfias egyensúlyra.

Az egyik hatás a szelektivitási tényező ( $\alpha$ ) változásában figyelhető meg, és általában csökken a hőmérséklet emelésével. A megoszlási állandó változik a hőmérséklettel, ami maga után vonja a mozgó fázisból az álló fázisba való átmenet szabadentalpia változását. Ezt a hatást *termodinamikai hatásnak* nevezzük, mely a csúcsok egymástól való távolságát befolyásolja [51]. Ionosan disszociáló mozgófázis és minta esetén a pK befolyásolható a hőmérséklet változtatásával is. Chen és Horváth [281], valamint Zhou és munkatársai [282] szerint a hőmérséklet hatása a szelektivitási tényezőre nem teljesen tisztázott, mivel nem ismerjük, hogyan változik a komponens entalpiája a mozgó fázisból az állóba való átmenet során.

A másik effektusban a hőmérséklet emelése növeli a minta diffúziós együtthatóját mind a mozgó-, mind az állófázisban és a fázisok viszkozitásának csökkentésével növeli a bennük lejátszódó anyagtranszportot. Ez ugyan csökkenti az elúciós időt, de növelheti a felbontást a hatékonyság növelése révén (keskenyebb csúcsok). Ezt a hatást *kinetikai hatásként* definiáljuk az irodalomban [51].

A hőmérséklet befolyásolhatja még a nyomásesést a kolonnán, a viszkozitás változása révén.

Nagyobb hatékonyságú elválasztási technikáknál (akirális HPLC) általában kisebb jelentősége van a hőmérsékletnek. A kevésbé hatékony királis elválasztásoknál a hőmérséklet szerepe sokkal fontosabb. Egy sor királis oszlopon, így többek között koronaéter, ciklodextrin,  $\alpha$ -savanyú glükoprotein,  $\pi$ -komplex molekulák (Pirkle-típusú fázisok), cellulóz-származékok, makrociklusos glükopeptid, kininalapú fázisokon tanulmányozták a hőmérséklet hatását [188, 189, 195, 196, 235, 289-300].

A hőmérsékletfüggő kromatográfias egyensúlyban a retenciós faktor szoros összefüggésben áll a megoszlási állandóval és ez lehetővé teszi, hogy a kromatogramból termodinamikai információt olvassunk ki, majd ebből következtessünk a retenció mechanizmusára. A kromatográfias egyensúly hőmérsékletfüggésének tanulmányozására a van't Hoff-egyenlet egy módosított változatát használjuk, mely kapcsolatot teremt a retenciós faktor

( $k$ ) és mozgó fázisból az állóba történő átmenetet kísérő entalpia- ( $\Delta H^\circ$ ) és entrópiaváltozás ( $\Delta S^\circ$ ) között:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi \quad (1)$$

Lineáris kromatográfiai körülmények között  $\ln k$  vs.  $1/T$  függvény egyenest ad, melynek meredeksége  $\Delta H^\circ/R$ , tengelymetszete  $\Delta S^\circ/R + \ln \phi$ . A  $\phi$  fázisarány számítására a kolonnát jellemző fizikai-kémiai adatok birtokában Sentell [301], illetve ennek hiányában, a geometriai méretek ismeretében Jandera [302] módszere alkalmazható.

A két enantiomerre jellemző entalpiaváltozás és entrópiaváltozás különbségeket  $\Delta(\Delta H^\circ)$  és  $\Delta(\Delta S^\circ)$  vagy a  $\Delta H_2^\circ - \Delta H_1^\circ$  és  $\Delta S_2^\circ - \Delta S_1^\circ$  különbségeként vagy a Gibbs-Helmholtz-egyenletből a mért szelektivitási tényezőtől kaphatjuk:

$$-\Delta(\Delta G^\circ) = RT \ln \alpha \quad (2)$$

$$-\Delta(\Delta G^\circ) = -\Delta(\Delta H^\circ) + T\Delta(\Delta S^\circ) \quad (3)$$

$$\ln \alpha = -\Delta(\Delta H^\circ)/RT + \Delta(\Delta S^\circ)/R \quad (4)$$

Ha a vizsgált hőmérséklettartomány nem túl nagy [305] és a  $\Delta(\Delta H^\circ)$  konstans az adott hőmérséklettartományon belül, az  $\ln \alpha$  vs.  $1/T$  függvény meredeksége adja  $-\Delta(\Delta H^\circ)$  és a tengelymetszet a  $\Delta(\Delta S^\circ)$  értékeket.

Fizikai-kémiai szempontból a  $\Delta(\Delta H^\circ)$  felvilágosítást ad arról, hogy melyik a kedvezményezett folyamat, melyben a relatíve jobban kötődő enantiomer a mozgófázisból átlépve az állófázishoz kötődik. A  $\Delta(\Delta S^\circ)$  a két enantiomer rendezettségének mértékében bekövetkező változást jellemzi az átmenet során. Negatívabb  $\Delta(\Delta H^\circ)$  hatékonyabb exoterm átmenetre utal a jobban kötődő enantiomer esetén és/vagy az állófázissal való erősebb kölcsönhatásra. Negatív  $\Delta(\Delta S^\circ)$  jellemzi a két enantiomer esetén fellépő különböző mértékű rendezettség növekedést és/vagy a szabadsági fokok csökkenését az adszorpció vagy asszociáció során. Nagyon rendezett szelektor-minta asszociátumok a szabadsági fokok jelentős csökkenése révén termodinamikailag kedvezőtlen folyamatot eredményeznek. Az alacsony hőmérséklet általában kedvez az intermolekuláris kölcsönhatásoknak, az enantioszelektivitás javul. Azonban az entrópia csökkenését sokszor az asszociációt megelőző deszolvatációs folyamatok kompenzálják. Ilyen esetekben pozitív  $\Delta(\Delta S^\circ)$  is létrejöhethet, és ezáltal az enantioszelektív asszociáció magasabb hőmérsékleten lesz kedvezőbb.

A lineáris kromatográfia retenció és szelektivitás adataiból nyert termodinamikai paraméterek mechanisztikus következtetéseket engednek meg. Guiochon és munkatársai [303-

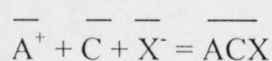
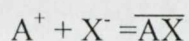
305] széles koncentrációtartományban adszorpciós izotermák felvételével nemenantioszelektív és enantioszelektív adszorpciós helyeket különböztettek meg és az adszorpciót egy bővített Langmuir-egyenlettel írták le. Az I. típusú helyeken a van der Waals- és diszperziós-kölcsönhatások, az egyszerű poláris kölcsönhatások, beleértve a Debye és Keesom-féle erőket és a hidrogénhid kölcsönhatások játszanak szerepet. Ezek felelősek a nemenantioszelektív retencióért. A II. típusú helyeken lejátszódó szelektív kölcsönhatások felelősek az enantiomer-elválasztásért. Az izotermák értékelése alapján termodinamikai szempontból megkülönböztettek mért és „igazi” szelektivitási tényezőt és ezekből határozták meg az „igazi” termodinamikai paramétereket, melyek csak az enantioszelektív kölcsönhatáshoz kötődtek. A gázkromatográfia esetén Schurig és munkatársai [306-308] egy „referencia kolonnával” választották le a nemenantioszelektív hozzájárulást a retencióhoz.

Mindezen új eredmények mellett, melyek a nemenantioszelektív és enantioszelektív hozzájárulások elkülönítésére törekedtek, *ha a mért retenciós adatok van't Hoff-típusú ( $\ln k$  vs.  $1/T$ ) lineáris függéssel leírhatók, az alapot teremt a termodinamikai adatokból levonható mechanisztikus következtetések megtételére.* Ezen irodalmi előzmények alapján három különböző állófázison vizsgáltuk a hőmérséklet hatását és vontunk le következtetéseket.

### 5.1. Koronaéter alapú királis oszlopon végzett elválasztások hőmérsékletfüggése

A hőmérsékletfüggés méréséhez modellanyagként a cikloalkán- és alkénvázas-amino-karbonsavakat (100)-(109) választottuk [48]. 278-298 K hőmérséklettartományban mértük az enantiomerek kromatográfiás adatait és az  $\ln k$  vs.  $1/T$  ábrázolásból nyert termodinamikai adatokat a **F.5.1. Táblázatban** mutatjuk be. Az  $\ln k$  vs.  $1/T$  függvények jó közelítéssel egyenesek voltak, *nem mutattak határozott görbületet*, amit a korrelációs koefficiens adatok is megerősítettek.

A kapott eredmények birtokában, a koronaéter állófázison végrehajtott elválasztások mechanizmusára a másodlagos kölcsönhatásokat is figyelembe vettük, szemben a Shinbo [188, 189] által kialakított képpel,



$A^+$ : protonált aminosav

$X^-$ : anion ( $ClO_4^-$ )

C: állófázis

$\overline{\quad}$ : kölcsönhatás az állófázison

amely nem tükrözte a másodlagos kölcsönhatások jelentőségét, és csak ionpár és ternerkomplex képződést tételezett fel.

A **F.5.1. Táblázat** adataiból látható, hogy  $\Delta H^\circ$  a vizsgált esetekben negatív, a mozgó fázisból az állófázisba való átmenet entalpia változása kedvezményezett. A  $\Delta S^\circ$  szintén negatív.

A komponens rendezettsége az átmenet során nőtt, a rendezettség az állófázisban nagyobb, mint a mozgófázisban volt. A koronaéteren történő királis szelekció első lépése minden bizonnyal a protonált primer aminocsoport hidrogén donor-akceptor kölcsönhatása a koronaéter oxigénatomjaival. Primer aminocsoport hiánya, például szekunder aminosavak esetén, a királis felismerés megghiúsulásához vezetett, tehát az asszociátum képződés fontos enantioszelektív kötőhely. Ez alól *egyetlen kivételt* találtunk a Tcc-t (51) (4.1. Fejezet).

A  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  csökkenése a gyűrű tagszámának növekedésével (Apc, Achc, Abhc sorban) arra utalt, hogy az apoláris jelleg növekedése csökkenti a molekula kölcsönhatását az aromás jellegű szelektorral.

A ciklo-alkének (Achc-én és Abhc-én) nagyobb  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  értéke a ciklo-alkánokéhoz viszonyítva (Achc és Abhc) a poláris kölcsönhatások jelentőségét mutatta. A  $\pi$ - $\pi$  jellegű kölcsönhatások létrejötte az aromás gyűrű és a telítetlen kötés között elősegítette a minta és a szelektor közti kapcsolat kialakulását.

A két telítetlen molekulát nézve Abhc-én esetén  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  kisebb, mint Achc-én esetén. Ez valószínűleg a már említett gyűrű tagszám (hidrofóbicitás) növekedés eredménye.

A szterikus kölcsönhatások szerepére utalt a *cisz*- és *transz*-izomerek viselkedése. A *transz*-izomerek (1*S*,2*S* és 1*R*,2*R*) sokkal nagyobb  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  értéke valószínű ezek kedvezőbb térállásának köszönhető, kölcsönhatásuk a szelektorral előnyösebb volt.

Egy adott diasztereomer-párban a másodikként eluálódó izomer rendelkezett nagyobb  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  értékkel. Erre a sztereoizomerre jellemző, hogy a karboxilcsoporthoz kapcsolódó szénatom konfigurációja (*R*). Irodalmi adatok (*R*)<(*S*) sorrendet adnak meg erre a szelektorra. Ezen  $\beta$ -aminosavak esetén a karboxilcsoporthoz kapcsolódó szénatom konfigurációja alapján kapunk egységes elúciós sorrendet, ami(*S*)<(*R*). Ez a sorrend ellentétes az  $\alpha$ -aminosavakra jellemző (*R*)<(*S*) sorrenddel. Valószínű, hogy a két kiralitáscentrumot tartalmazó  $\beta$ -aminosavak esetén az asszociátum kialakulása mellett a karboxilcsoport másodlagos hidrogénhid kölcsönhatása a koronaéter oxigénekkel meghatározó az elválasztás és a sorrend kialakulása szempontjából.

A  $-\Delta(\Delta G^\circ)$ , mely a királis felismerést jellemzi, további értékes információt szolgáltatott (F.5.1. Táblázat). A gyűrű tagszámának, vagyis a hidrofóbicitásnak a növelésével  $-\Delta(\Delta G^\circ)$  egyre pozitívabb, az elválasztás romlott. Telítetlen sztereoizomerek esetén (ahol történt elválasztás)  $-\Delta(\Delta G^\circ)$  nagyobb, mint a megfelelő telített komponens esetén (*transz*-Achc-én illetve *transz*-Achc; *diexo*-Abhc-én illetve *diexo*-Abhc), a sztereoizomerek jobban elválasztódtak.

A *transz*-izomerek sokkal nagyobb  $-\Delta(\Delta G^\circ)$  értéke annak köszönhető, hogy ezek az izomerek a szelektorral való kapcsolat létrehozásában valószínűleg kedvező térállást vettek fel.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a koronaéter alapú szelektoron a primer kapcsolódó pont a koronaéter ürege, ahol a protonált primer aminocsoporttal az asszociátum képződés lejátszódott. Másodlagos poláris, hidrogén donor-akceptor és szterikus kölcsönhatások további hozzájárulást jelentettek a retenció és a szelektivitás meghatározásában. A két kiralitáscentrumot tartalmazó  $\beta$ -aminosavak esetén a karboxilcsoport másodlagos hidrogénhid kölcsönhatása a koronaéter oxigénekkel meghatározó az elválasztás és a sorrend kialakulása szempontjából.

## 5.2. Királis elválasztások hőmérsékletfüggése makrociklusos glükopeptid szelektort tartalmazó állófázison

Armstrong [218-221] az általa bevezetett makrociklusos glükopeptidek és az elválasztandó aminosav izomerek közti kölcsönhatásokat a következőkben határozta meg. Primér kapcsolat az aminosav karboxil- és a szelektor protonált aminocsoportja között alakul ki, melyet hidrofób, hidrogénhid, dipól-dipól,  $\pi$ - $\pi$  és szterikus kölcsönhatások kísérnek. *Megállapításaink szerint jelenlétük és dominanciájuk a molekulaszervezet és az alkalmazott kromatográfiás módszer függvénye.*

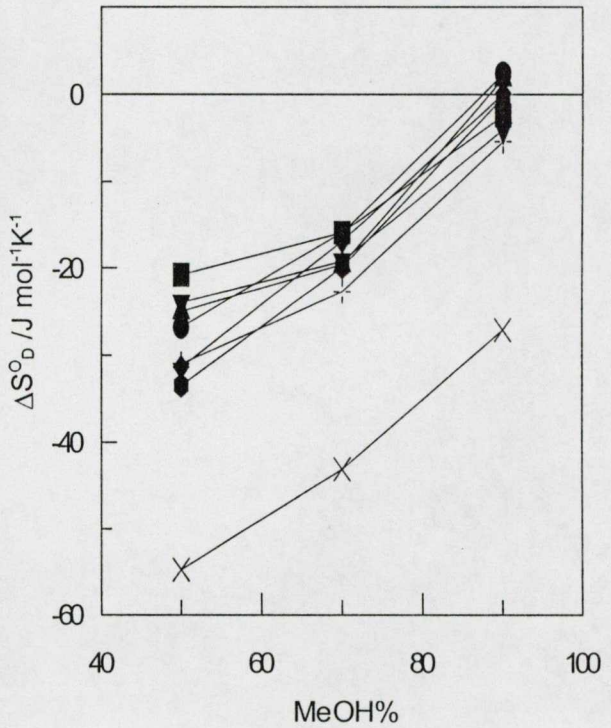
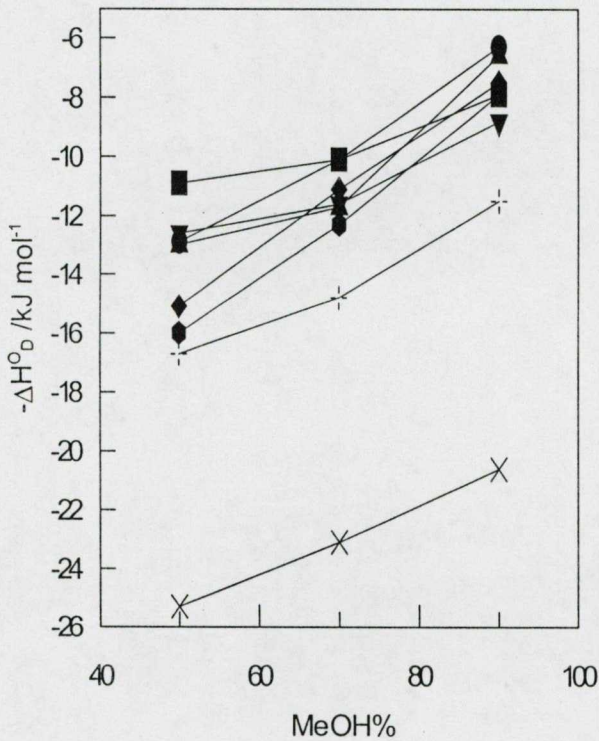
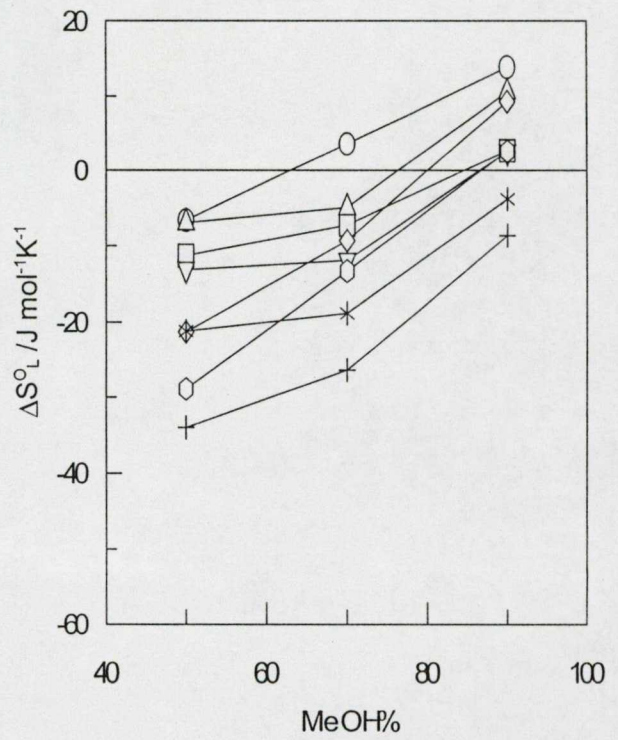
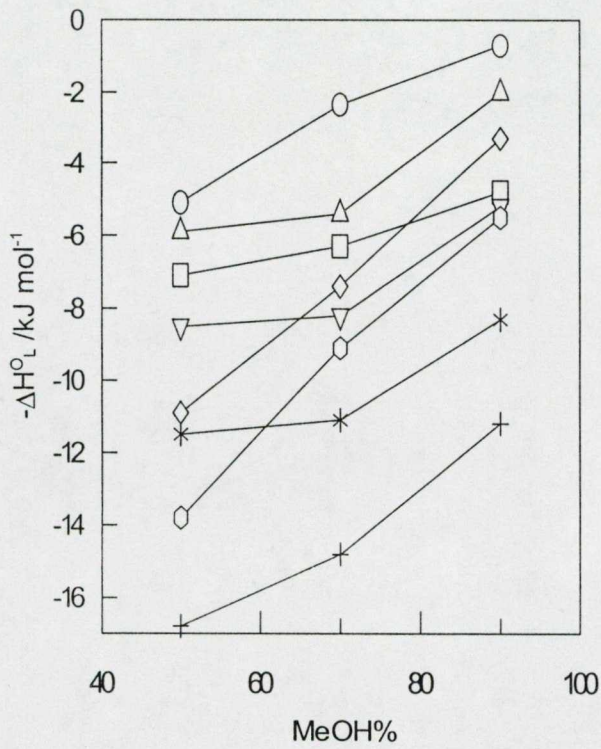
### 5.2.1. Királis elválasztások hőmérsékletfüggése teicoplanin szelektort tartalmazó állófázison fordított fázisú kromatográfiás módszer esetén

Modellvegyületként  $\beta$ -metil-aminosavakat választva, 274,5–323 K hőmérséklet tartományban, három eluensösszetétel esetén, víz/metanol=50/50, 30/70 és 10/90 (v/v), vizsgáltuk a hőmérséklet hatását az elválasztásra [49]. A retenciós adatokból számolt termodinamikai paramétereket a F.5.2. – F.5.4. Táblázatokban foglaltuk össze. A táblázatokból és az 5.2.1. ábrából látható, hogy egy adott eluens összetételnél a  $\Delta H^\circ$  értéke mindig negatív, míg  $\Delta S^\circ$  mind negatív mind pozitív lehet, az előjel az aminosav minőségének és az eluens MeOH-tartalmának függvénye.

A  $\beta$ -MeTyr,  $\beta$ -MePhe,  $\beta$ -MeTrp,  $\beta$ -MeTic sorban a hidrofóbicitás növekedésével a  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  növekedett.

A molekula térkitöltésének növekedésével ( $\beta$ -MePhe <  $\beta$ -MeTrp) a  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  szintén növekedett.

A szerkezet merevítése ( $\beta$ -MePhe <  $\beta$ -MeTic) kedvezett az állófázissal való kapcsolatnak,  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  növekedett.



5.2.1. ábra Az eritro- és treo- $\beta$ -metil-aminosav sztereoizomerek (22,23;40,41;43,44;64,65)  $\Delta H^\circ$  és  $\Delta S^\circ$  értékei az eluens metanol-tartalmának függvényében

Kromatográfia: oszlop, Chirobiotic T; áramlási sebesség, 1 ml perc<sup>-1</sup>; hőmérséklet, 274-323 K; eluens, víz/metanol=50/50, 30/70, 10/90 (v/v); üres jel, elsőként eluálódó sztereoizomer; tele jel, másodikként eluálódó sztereoizomer; ○, ● eritro- $\beta$ -MeTyr; □, ■ treo- $\beta$ -MeTyr; △, ▲ eritro- $\beta$ -MePhe; ▽, ▼ treo- $\beta$ -MePhe; ◇, ◆ eritro- $\beta$ -MeTrp; ○, ● treo- $\beta$ -MeTrp; +, × eritro- $\beta$ -MeTic, \*, † treo- $\beta$ -MeTic; (+, \*, L-sztereoizomer, ×, †, D-sztereoizomer).

A másodikként eluálódó D konfigurációjú [(2*R*,3*R*) és (2*R*,3*S*)] enantiomerek esetén  $\Delta H^\circ$  és  $\Delta S^\circ$  negatívabb, mint az elsőként eluálódó L konfigurációjú [(2*S*,3*S*) és (2*S*,3*R*)] enantiomerek esetén. Ennek valószínű magyarázata, hogy a másodikként eluálódó enantiomer:

- több ponton kötődött az állófázishoz,
- kevésbé volt képes mozgásra, forgásra és/vagy
- kevesebb szolvátmolekulát szorított le az állófázisról.

A szolvatációt tekintve a két enantiomer szolvatációja azonos mértékű a mozgófázisban, de az állófázishoz való kötődés során különböző számú szolvátmolekula szabadulhat fel. Ezért a  $\Delta S^\circ$ -hoz való hozzájárulás nem egyforma.

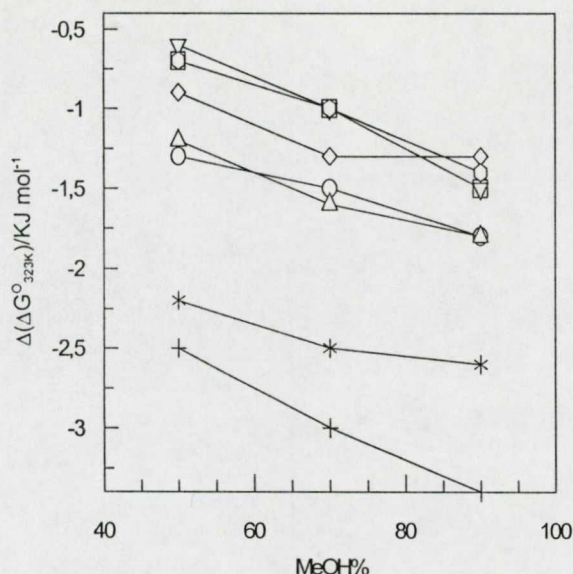
A *treo*-sztereoizomerek  $\Delta H^\circ$  és  $\Delta S^\circ$  értéke negatívabb, mint az *eritro*-sztereoizomereké (kivéve  $\beta$ -MeTic). Ennek valószínű oka, hogy a *treo*-sztereoizomerek térállása kedvezett az állófázissal való kölcsönhatásnak.

Az eluens MeOH-tartalmának növelésével a  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  értékek csökkentek (F.5.2.–F.5.4. Táblázatok és 5.2.1. ábra). Ez tipikusan a hidrofób kölcsönhatások csökkenésének az eredménye. Teicoplanin szelektoron a MeOH-tartalom növelésével a retenció nőtt, ami szokatlan a fordított fázisú kromatográfiában. Nagyobb MeOH-tartalomnál a kisebb  $-\Delta H^\circ$  értékeket a viszonylagosan pozitívabb  $\Delta S^\circ$  értékek kiegyenlítették,  $\Delta G^\circ$  negatívabb lett, a retenció nőtt. Ennek valószínű magyarázata, hogy MeOH-ban gazdag eluensben az enantiomerek szolvatációja nagyobb mértékű, a szerkezet rendezettebb, a mozgófázisból az állóba való átmenet pozitívabb entrópiaváltozást ( $\Delta S^\circ$ ) eredményezett (feltéve, hogy az enantiomerek ugyanolyan szabadsági fokkal rendelkeztek az állófázison mind MeOH-ban gazdag, mind MeOH-ban szegény eluensben).

Az enantioszelektivitást jellemző  $-\Delta(\Delta H^\circ)$ ,  $-\Delta(\Delta S^\circ)$  és  $-\Delta(\Delta G^\circ)$  értékekből az alábbi általános következtetéseket vonhatjuk le. Az *eritro*-sztereoizomerek negatívabb  $-\Delta(\Delta H^\circ)$  és  $-\Delta(\Delta S^\circ)$  értékekkel rendelkeztek, mint a *treo*-sztereoizomerek, annak ellenére, hogy a *treo*-sztereoizomerek kötődése a szelektoron erősebb volt ( $\Delta H^\circ$  és  $\Delta S^\circ$  negatívabb volt). A kisebb negatív  $-\Delta(\Delta H^\circ)$  és  $-\Delta(\Delta S^\circ)$  értékek a *treo*-sztereoizomerek esetén azt jelentették, hogy az L-*treo*- és D-*treo*-izomerek elválasztása rosszabb, mint a megfelelő *eritro*-sztereoizomereké. Az *eritro*-sztereoizomerek entrópia változásának nagyobb negatív különbsége [ $-\Delta(\Delta S^\circ)$ ] arra utalt, hogy az L-*eritro*- és D-*eritro*-sztereoizomerek szabadsági foka között az állófázison nagyobb volt a különbség, mint az L- és D-*treo*-sztereoizomerek esetén.

A MeOH-tartalom növelésével a  $-\Delta(\Delta H^\circ)$  és  $-\Delta(\Delta S^\circ)$  csökkent, pozitívabbá vált. Az entalpiakülönbség [ $-\Delta(\Delta H^\circ)$ ] csökkenését az entrópiakülönbség növekedés kiegyenlítette, a  $-\Delta(\Delta G^\circ)$  növekedett a MeOH-tartalom növelésével (5.2.2. ábra). Ez azt jelentette, hogy

teicoplanin szelektoron nagyobb MeOH-tartalomnál tapasztaltunk nagyobb szelektivitást, ami nem jellemző a fordított fázisú kromatográfiás rendszerekre.



5.2.2. ábra

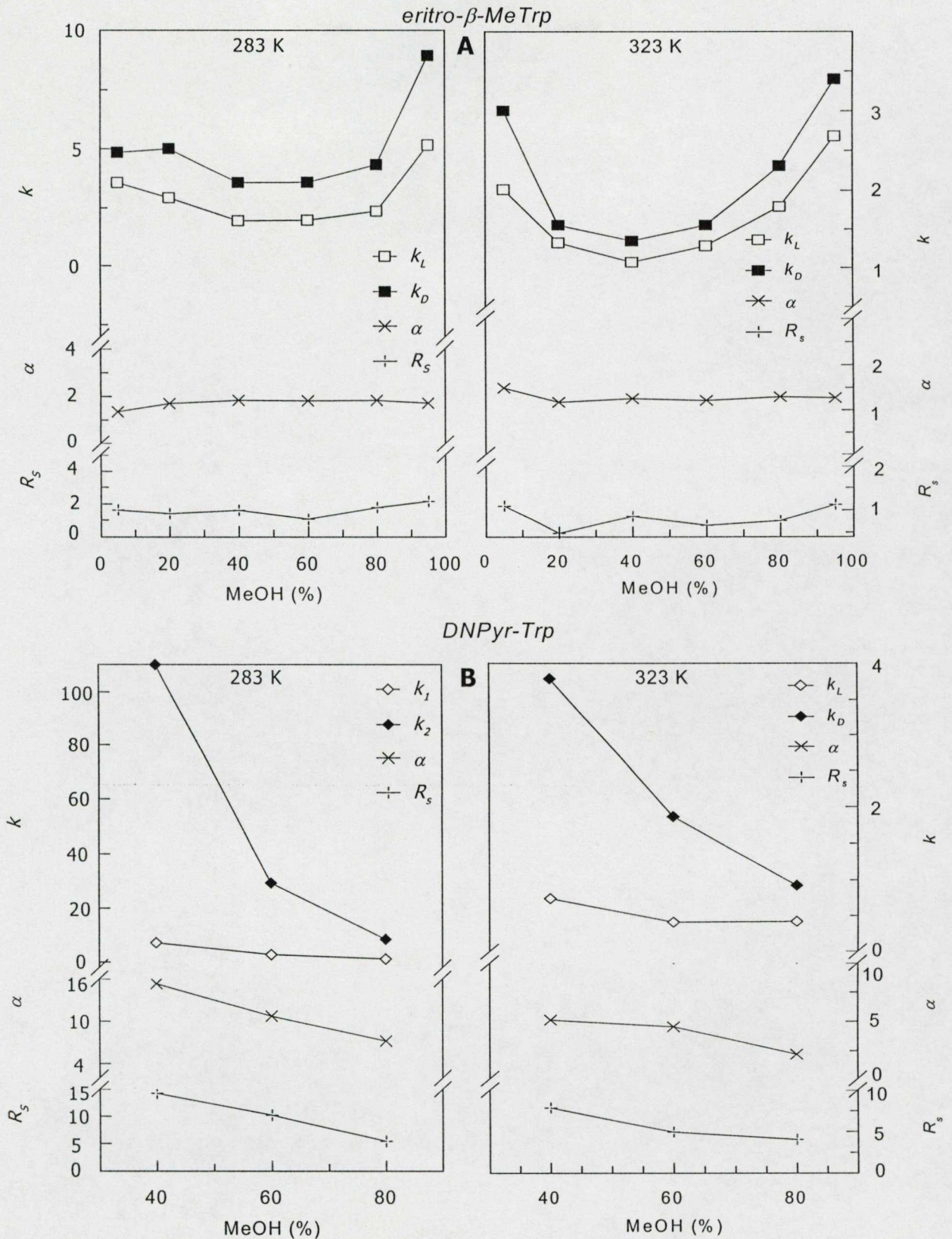
A másodikként és elsőként eluálódó sztereoizomerek ( $\Delta G^\circ$ ) értékeinek különbsége 323 K-en a MeOH-tartalom függvényében

Kromatográfia: eluens, H<sub>2</sub>O/MeOH=50/50, 30/70, 10/90 (v/v);

○ eritro-β-MeTyr; □ treo-β-MeTyr; △ eritro-β-MePhe; ▽ treo-β-MePhe; ◇ eritro-β-MeTrp; ◊ treo-β-MeTrp; + eritro-β-MeTic; \* treo-β-MeTic.

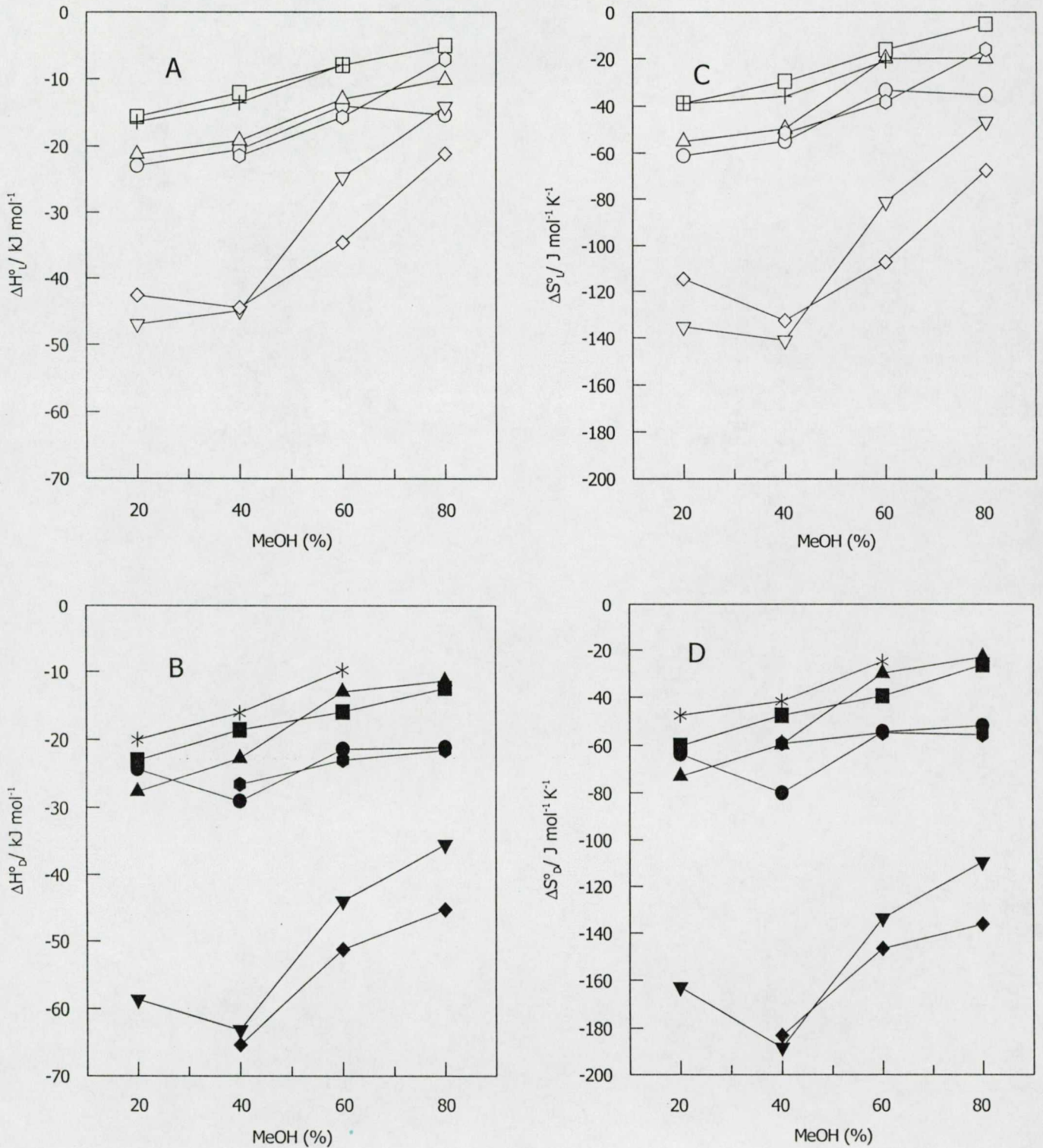
### 5.2.2. Királis elválasztások hőmérsékletfüggése risztocetin A szelektort tartalmazó állófázison fordított fázisú kromatográfiás módszer esetén

A hőmérsékletfüggés tanulmányozásához választott vegyületek a vizsgált körülmények között vagy *ikerionos*-szerkezetűek D,L-Trp, *eritro*- és *treo*-D,L-β-MeTrp (43, 44), vagy *negatív* töltésűek *N*-benziloxikarbonil-D,L-Trp (*Z*-Trp) és *N*-(3,5-dinitro-2-piridil)-D,L-triptofán (DNPy-Trp) (122) voltak. *Pozitív* töltésű volt a (*R,S*)-1-[5-klór-2-(metilamino)fenil]-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin (CMP-Tic) (123) és *semleges* volt a (*R,S*)-5-fenil-tetrahydrofuran-2-on-butano-4-lakton („butirolakton”) (124) [52]. Az alkalmazott hőmérséklettartomány 276-323 K volt. A hőmérséklet valamint a MeOH-koncentráció hatását négy eluensösszetétnél vizsgáltuk: 0,1% trietil-ammónium-acetát vizes oldata (pH=6,5)/MeOH=80/20, 60/40, 40/60, 20/80 (v/v). A retenciós viselkedés alapján a sztereoizomereket két csoportra osztottuk (5.2.3. ábra). Az első típusba tartoztak a Trp, az *eritro*- és *treo*-β-MeTrp, ahol minden hőmérsékleten a *k* vs. MeOH (%) görbék U-alakúak és az  $\alpha$  és  $R_S$  csekély változást mutatott a MeOH-koncentráció változásával. A *Z*-Trp, DNPy-Trp (122), CMP-Tic (123) és „butirolakton” (124) esetén hagyományos retenciós viselkedést tapasztaltunk. Nagy víztartalom és alacsony hőmérséklet esetén mért nagy *k* értékek a MeOH-koncentráció és a hőmérséklet emelésével csökkentek. A szelektivitás és felbontás is sokkal jelentősebb mértékben csökkent a hőmérséklet és MeOH-tartalom növelésével, mint az előbbi csoport esetén.



**5.2.3. ábra** Az eritro- $\beta$ -MeTrp (A) (43) és DNPy-Trp (B) (122) retenciósfaktor ( $k$ ), szelektivitási tényező ( $\alpha$ ) és felbontás ( $R_s$ ) értékei a MeOH-tartalom és a hőmérséklet függvényében

Kromatográfia: oszlop, Chirobiotic R; áramlási sebesség, 1 ml perc<sup>-1</sup>; hőmérséklet, 283 K és 323 K; eluens, 0,1% TEAA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O(pH 6.5)/MeOH=95/5, 80/20, 60/40, 40/60, 20/80 és 5/95 (v/v);  $k$ , üres jel, elsőként eluálódó sztereoizomer; tele jel, másodikként eluálódó sztereoizomer;  $\square$ ,  $\blacksquare$  eritro- $\beta$ -MeTrp;  $\diamond$ ,  $\blacklozenge$  DNPy-Trp;  $\alpha$ ,  $\times$ ;  $R_s$ ,  $+$ .



**5.2.4. ábra** Az első és másodikként eluálódó sztereoizomerek termodinamikai ( $\Delta H^\circ$  és  $\Delta S^\circ$ ) paramétereinek a MeOH-tartalom függvényében

Kromatográfia: oszlop, Chirobiotic R; áramlási sebesség, 1 ml perc<sup>-1</sup>; hőmérséklet, 276 K - 323 K; eluens, 0,1% TEAA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O (pH 6.5)/MeOH=80/20, 60/40, 40/60 és 20/80 (v/v); üres jel, elsőként eluálódó sztereoizomer; tele jel, másodikként eluálódó sztereoizomer; ○, ● Trp; □, ■ eritro-β-MeTrp; △, ▲ treo-β-MeTrp; ▽, ▼ Z-Trp; ◇, ◆ DNPyr-Trp; ○, ● CMP-Tic; +, \* „butirolakton”.

A retenciós faktorokból származtatott  $\Delta H^\circ$  és  $\Delta S^\circ$  termodinamikai paramétereket az 5.2.4. ábrán tüntettük fel. Az ábrából is látható, hogy mind a  $\Delta H^\circ$  mind a  $\Delta S^\circ$  értéke negatív és függ az eluens MeOH-tartalmától. Az összes vizsgált sztereoizomer esetén a másodikként eluálódó enantiomer  $\Delta H^\circ$  és  $\Delta S^\circ$  értéke negatívabb, mint az elsőként eluálódó enantiomeré. A magyarázat hasonló a teicoplanin szelektorra leírtakhoz.

Az 5.2.4. ábra szemlélteti, hogy a Trp, az *eritro*- és *treo*- $\beta$ -MeTrp, a CMP-Tic és a „butirolakton”  $\Delta H^\circ$  és  $\Delta S^\circ$  értékei jóval pozitívabbak, mint a Z-Trp és a DNPy-Trp hasonló értékei és általában mind az entalpia- mind az entrópiaváltozás a MeOH-tartalom növelésével pozitívabbá vált. A *treo*- $\beta$ -MeTrp sztereoizomerek  $\Delta H^\circ$  és  $\Delta S^\circ$  értéke negatívabb, mint az *eritro*-sztereoizomereké (hasonlóan a teicoplanin szelektoron tapasztaltakhoz). A Trp és a  $\beta$ -MeTrp (43) és (44) sztereoizomerek 0,1% TEAA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O (pH=6,5)/MeOH-tartalmú eluensben ikerionos szerkezetűek és képesek elektrosztatikus kölcsönhatás kialakítására az állófázis -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-csoportjával. 0,1% TEAA/MeOH=80/20 (v/v) eluens összetételből kiindulva és növelve a MeOH-koncentrációt a *k*, a  $-\Delta H^\circ$  és a  $-\Delta S^\circ$  értékek csökkentek (5.2.3. és 5.2.4. ábra). Ennek valószínű magyarázata a hidrofób kölcsönhatások csökkenése a rendszer polaritásának csökkenésével.

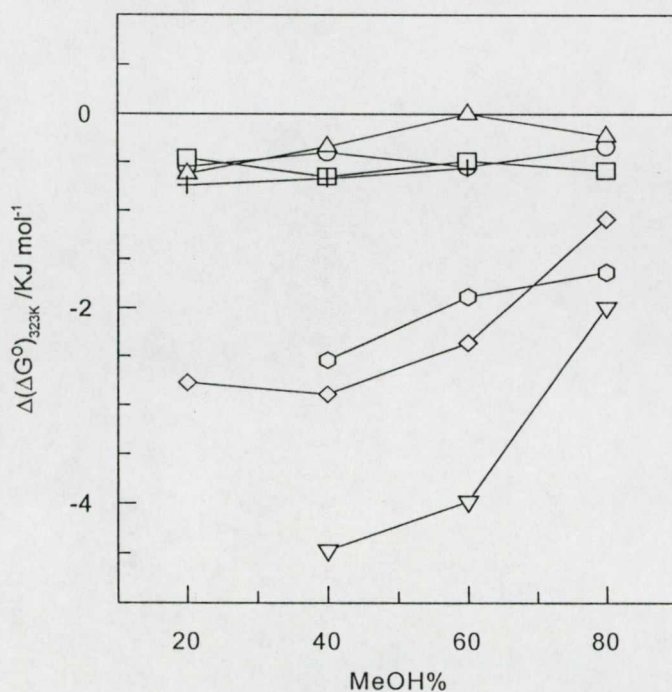
A Z-Trp és DNPy-Trp (122) sztereoizomerek nagy negatív entalpia- és entrópiaváltozása a molekulák szerkezetével függött össze. Ezek a sztereoizomerek az eluens pH-ján negatív töltésűek [50], ezért erős elektrosztatikus kölcsönhatást alakítanak ki a pozitív töltésű szelektorral. A nagy  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  értékeket magyarázhatják még a hidrofób, hidrogénhid és sztérikus kölcsönhatások kialakulásának lehetőségei, ugyanis a Z- és DNPy-csoportok beépítése a Trp-ba a molekulát sokkal inkább alkalmassá teszi ezeknek a kölcsönhatásoknak a kiépítésére. A  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  80% víztartalomnál bekövetkező csekély növekedése (5.2.4. ábra) azzal magyarázható, hogy a rendszer igyekszik kompenzálni azt a molekuláris kölcsönhatást, amelyet egy erősen hidrofób molekulának vízmolekulák közé való beékelődése okoz. Emiatt a vízmolekuláknak időlegesen nagyobb szervezettsége jött létre a mintamolekula körül („iceberg” képződés), mely entrópiánövekedéssel járt. A nagyobb MeOH-tartalomnál bekövetkező pozitívabb entrópiaváltozás a már említett nagyobb fokú mozgófázisbeli solvatációval függhet össze.

A CMP-Tic (123) és a szelektor az eluens pH-ján (pH=6,5) egyaránt pozitív töltésű. A retenció és a királis felismerés kialakulásában az elektrosztatikus kölcsönhatásnak nem lehetett szerepe. A molekulaszervezetből következően, az egymásra merőleges síkban elhelyezkedő két gyűrű kedvező sztérikus viszonyokat teremtett a hidrofób és hidrogénhid kölcsönhatások kialakításának. A negatív csoport hiánya miatt az elektrosztatikus vonzás kizárt, ami kedvezőbb

anyagtranszport és adszorpciós-deszorpciós kinetika kialakulását tette lehetővé. Emiatt a MeOH-tartalom és a hőmérséklet növelése a felbontás növekedését eredményezte (4.2.3. Fejezet).

A „butirolakton” (124) semleges molekula és fordított fázisú kromatográfiás rendszerben a legkisebb  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  értékkel rendelkezett, ami a MeOH-tartalom növelésével tovább csökkent. Ez a viselkedés hidrofób jellegű kölcsönhatásra utalt és valószínű, hogy e mellett a karbonil-oxigénen keresztül létrejövő hidrogénhid is szerepet játszott a retencióban és a királis felismerésben.

A királis elválasztást jellemző, általunk megállapított  $\Delta(\Delta H^\circ)$  és  $\Delta(\Delta S^\circ)$  értékeket és változásukat a MeOH-tartalommal a F.5.5. Táblázat tartalmazza. A **Z-Trp** és **DNPyr-Trp**  $-\Delta(\Delta H^\circ)$  és  $-\Delta(\Delta S^\circ)$  értékei az eluens MeOH-tartalmától függően 2-3-szor nagyobbak, mint a többi vizsgált sztereoizomeré. A **Z-Trp** és **DNPyr-Trp** a **Trp**-hoz viszonyítva a már említett többféle kölcsönhatás kialakítására képes (hidrofób, hidrogénhid, szterikus) és feltételezhető, hogy ezek közül az erősen hőmérsékletfüggő hidrogénhid kapcsolat meghatározó az enantioszelektív elválasztásban [292]. A nagy  $-\Delta(\Delta H^\circ)$  hidrogénhid kapcsolatból eredhet. A  $-\Delta(\Delta H^\circ)$  csekély növekedése a MeOH-tartalommal a **Z-Trp**, **DNPyr-Trp** és **CMP-Tic** esetén arra utal, hogy a hidrogénhid kölcsönhatás a molekula és a szelektor között nagyobb MeOH-tartalomnál a két izomerre nézve jobban különbözik. Az *eritro*- $\beta$ -**MeTrp**  $-\Delta(\Delta H^\circ)$  és  $-\Delta(\Delta S^\circ)$  értékei nagyobbak, mint a *treo*- $\beta$ -**MeTrp** esetén tapasztaltak. A jelenség hasonló a teicoplanin szelektoron észlelthez, vagyis a D- és L-*eritro*-izomerek energiájában és entrópiájában az oszlopon nagyobb a különbség, mint a *treo* sztereoizomerek esetén.



5.2.5. ábra

A másodikként és elsőként eluálódó sztereoizomerek ( $\Delta G^\circ$ ) értékeinek különbsége 323 K-en a MeOH-tartalom függvényében

Kromatográfia: eluens, 0,1% TEAA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O (pH=6,5)/MeOH=80/20, 60/40, 40/60, 20/80 (v/v);

○ Trp; □ *eritro*- $\beta$ -MeTrp; △ *treo*- $\beta$ -MeTrp; ▽ Z-Trp; ◇ DNPyr-Trp; ○ CMP-Tic; + „butirolakton”.

Az enantioszelektivitást jellemző  $\Delta(\Delta G^\circ)$  323 K-en számított értékeit a 5.2.5. ábrán tüntettük fel. A Z-Trp, DNPy-Trp (122) és CMP-Tic (123) nagyobb negatív  $\Delta(\Delta G^\circ)$  értékei az előzőekben már említett kedvező szerkezeti elemek következménye. A többféle kölcsönhatás létrejötte a két izomerre nézve kedvezőbb entalpia- és entrópiakülönbségeket hozott létre, ezért a szelektivitás e molekulák esetén nagyobb. A  $-\Delta(\Delta G^\circ)$  a legtöbb esetben csökkent a MeOH-tartalom növekedésével. Ez a viselkedés megegyezett a fordított fázisú kromatográfiában tapasztaltakkal, de ellentétes a rokon típusú szelektort, teicoplanint tartalmazó oszloppal, ahol nagyobb MeOH-tartalom éppen kedvezett a királis elválasztásnak (5.2.2. ábra). Risztocetin A szelektoron a MeOH-ban gazdag eluensben létrejövő solvatációból eredő entrópiánövekedés a két izomer esetén nem különbözött annyira, hogy a szabadentalpia-változás különbsége nagyobb MeOH-tartalomnál csökkent volna.

### 5.2.3. Királis elválasztások hőmérsékletfüggése risztocetin A szelektort tartalmazó állófázison polár-organikus kromatográfiás módszer esetén

Armstrong szerint a fő kölcsönhatások polár-organikus módban a hidrogén donor-akceptor,  $\pi$ - $\pi$ , poláris (elektrosztatikus) és szterikus kölcsönhatások.

Polár-organikus módszerrel a hőmérséklet hatását egy adott eluens összetételnél vizsgáltuk. A mérési eredményeink alapján lineáris  $\ln k$  vs.  $1/T$  függvényekből származtatott termodinamikai paramétereket a F.5.6. Táblázat felső részében foglaltuk össze. A táblázat adatai alapján a  $\Delta H^\circ$  értéke minden esetben negatív, de ezek az értékek jóval kisebbek voltak a fordított fázisú kromatográfiában mértékhez képest. A  $\Delta S^\circ$  értékei szintén negatívak, kivéve a  $\beta$ -MeTrp analógokat. A pozitív entrópia magyarázata lehet, hogy az erős oldószerek jól adszorbeálódtak az állófázison. A két enantiomer solvatációja azonos mértékű a mozgófázisban, de az állófázishoz való kötődés során az egyik kevesebb solvátmolekulát szorított le, ezért a  $\Delta S^\circ$ -hoz való hozzájárulásuk különböző volt. A másodikként eluálódó enantiomer itt is negatívabb entalpia- és entrópiaváltozással volt jellemezhető, az erősebb kölcsönhatás és több ponton való kötődés eredményeként.

A Trp és  $\beta$ -MeTrp analógokra kapott negatív  $\Delta H^\circ$  és negatív vagy pozitív  $\Delta S^\circ$  értékek végül is negatív  $\Delta G^\circ$  értékeket eredményeztek, és ezek nem nagyon különböztek a fordított fázisban mért értékektől. Ez tükröződik a két módban tapasztalt kromatográfiás viselkedésben, vagyis a retenciós idők a két módban hasonlóak voltak.

A Z-Trp, DNPy-Trp (122) és CMP-Tic (123)  $\Delta H^\circ$  és  $\Delta S^\circ$  értékei jóval negatívabbak voltak, mint a Trp és  $\beta$ -MeTrp hasonló adatai, de sokkal pozitívabbak voltak a fordított fázisban mértékhez képest. A  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  polár-organikus módban mért kisebb értékei

valószínűleg a megváltozott retenciós mechanizmusból eredtek. A hidrofób kölcsönhatások helyett itt az elektrosztatikus valamint kisebb energiával jellemezhető hidrogénhid, poláris,  $\pi$ - $\pi$  és szterikus kölcsönhatások játszottak szerepet.

A királis elválasztást jellemző  $\Delta(\Delta H^\circ)$ ,  $\Delta(\Delta S^\circ)$  és  $\Delta(\Delta G^\circ)$  értékek is jóval pozitívabbak voltak, ami azt jelentette, hogy a fordított fázisú kromatográfiához képest polár-organikus módban az egyes enantiomer-párok kötődésében az állófázison nem volt nagy különbség. A **Z-Trp**, **DNPy-Trp** és **CMP-Tic** negatívabb értékei a **Trp** és  **$\beta$ -MeTrp** analógokhoz képest az előbbiek kedvezőbb szerkezetének tulajdoníthatók (a funkciós csoportok többféle kölcsönhatást tesznek lehetővé).

Polár-organikus módban általában a *felbontás növekedését* tapasztaltuk *növekvő hőmérséklettel*. Ennek valószínű oka, hogy magasabb hőmérsékleten kedvezőbb *adszorpciós-deszorpciós* kinetika és *anyagtranszport* jött létre.

#### **5.2.4. Királis elválasztások hőmérsékletfüggése risztocetin A szelektor állófázison normál fázisú kromatográfia esetén**

Normál fázisú módban a főbb kölcsönhatások hasonlóak a polár-organikus módszerrel ismertekkel. A van't Hoff-féle egyenletből származtatott termodinamikai paramétereket a **F.5.6. Táblázat** alsó része tartalmazza. Oldhatósági problémák miatt a **Trp** és **CMP-Tic** sztereoizomerek elválasztásának hőmérsékletfüggését nem tanulmányoztuk. A normál fázisú módban mért  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  és  $\Delta G^\circ$  értékek mind negatívak, és tulajdonképpen a polár-organikus módban mért értékekhez voltak közelállóak.

A királis elválasztást jellemző  $\Delta(\Delta H^\circ)$ ,  $\Delta(\Delta S^\circ)$  és  $\Delta(\Delta G^\circ)$  értékek szintén a polár-organikus módban mérthez voltak közelállóak és jóval pozitívabbak voltak a fordított fázisú módszerrel mértékhez képest. Ez tükröződött abban is, hogy ezek a sztereoizomerek normál fázisú eluens rendszerben rosszabb szelektivitással rendelkeztek.

A „**butirolakton**” (124) mely fordított fázisú módszerben a legkisebb  $-\Delta H^\circ$  és  $-\Delta S^\circ$  értékeket adta (**5.2.4. ábra**), normál fázisú kromatográfiával hexánban gazdag, hexán-etanol eluensben viszonylag nagy negatív értékeket eredményezett. Valószínű magyarázat, hogy nagy hexánkoncentrációnál, egyrészt az etanol kölcsönhatása a szelektorral kisebb, másrészt az enantiomerek kölcsönhatása a szelektorral kedvezőbb. A két enantiomer a szelektorral közel azonos erősségű kölcsönhatást létesített, ezért a  $\Delta(\Delta H^\circ)$  és  $\Delta(\Delta S^\circ)$  értéke közel zérus volt, melynek eredményeként a visszatartás mellett a szelektivitás sajnos nem volt kielégítő.

### 5.3. A retenció valószínű mechanizmusa makrociklusos glükopeptid (teicoplanin illetve risztocetin A)-tartalmú állófázisokon

#### 5.3.1. Fordított fázisú elválasztások lehetséges mechanizmusa

Az oszlopok működési pH-ján (pH=5–7) a szelektorok primer aminocsoportja protonált  $-NH_3^+$  formában volt, míg a teicoplanin és az aminosavak karboxilcsoportja deprotonált. Aminosavak esetén az aminosav deprotonált karboxilcsoportja elektrosztatikus kölcsönhatásba lépett a szelektor  $-NH_3^+$ -csoportjával.

Megállapítottuk, hogy a csak negatív töltéssel rendelkező (nem ikerionos szerkezetű molekulák) *Z*-Trp és DN<sub>Pyr</sub>-Trp (122) visszatartása és királis szelekciója igen kedvező. Viszonylag egyszerű aminosav-amidok esetén (29)-(33), 38) az elektrosztatikus kölcsönhatás hiánya a királis felismerés megghiúsulásához vezetett, noha az oszlop a komponenseket visszatartotta.

A *Z*- és DN<sub>Pyr</sub>-szubsztituált aminosavak példáján igazoltuk, hogy a másodlagos hidrofób kölcsönhatások, hidrogénhid kapcsolat kialakulása és a molekulaszervezet bizonyos fokú merevítése kedvezett a királis felismerésnek.

Igazoltuk, hogy elektrosztatikus kölcsönhatás hiányában még a molekula pozitív töltése esetén is [CMP-Tic (123)] létrejöhet visszatartás és királis szelekció, ha a molekula megfelelő számú másodlagos kölcsönhatások kialakítására képes funkciócsoporttal rendelkezett. Ugyanez vonatkozott a semleges „butirolakton” esetére.

A  $\beta$ -metil-szubsztituált aminosavak példáján igazoltuk, hogy a hidrofób jelleg növelése, a térszerkezet bizonyos fokú merevítése és nagyobb térkitöltésű szubsztituensek beépítése kedvezett a királis felismerésnek.

#### 5.3.2. Polár-organikus és normál fázisú elválasztások lehetséges mechanizmusa

Termodinamikai adatok alapján e módszerekkel elsősorban azon sztereoizomerek elválasztása volt kedvező, amelyek hidrogén donor-akceptor kölcsönhatások kialakítására képesek. A királis felismerést segítették a poláris (polár-organikus módban az elektrosztatikus) és  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatások, továbbá a kedvező szterikus elrendeződés.

A fordított fázisú elválasztásoknál oly fontos hidrofób kölcsönhatások itt elhanyagolható szerepet játszottak.

### 5.4. Entalpia-entrópia kompenzáció

A fizikai-kémiai adatok termodinamikai vizsgálatának egyik lehetséges útja az entalpia-entrópia kompenzáció [309]. Az entalpia-entrópia kompenzációt a fordított fázisú

kromatográfiában Horváth [310] a hidrofób kölcsönhatás, Koppenhoefer és Bayer [311] a gázkromatográfiában az enantioszelektív-retenció mechanizmusának tanulmányozására alkalmazta. A különböző szerzők más-más formulát javasoltak a kompenzáció kifejezésére. Matematikailag az entalpia-entrópia kompenzáció kifejezhető a

$\beta = \Delta H^\circ / \Delta S^\circ$  egyenlettel [312], vagy a

$\Delta H^\circ = \beta \Delta S^\circ + \Delta G_\beta^\circ$  formulával [313, 314],

ahol  $\beta$  a kompenzációs hőmérséklet,  $\Delta G_\beta^\circ$  a fizikai-kémiai kölcsönhatás szabadentalpia változása a  $\beta$  kompenzációs hőmérsékleten ( $\beta$  és  $\Delta G_\beta^\circ$  konstans). Valamilyen kémiai átalakulásban (vagy például a kromatográfiás visszatartás folyamán) az entalpia-entrópia kompenzáció az anyagok egy csoportjára, ha megfigyelhető, akkor minden komponens azonos,  $\Delta G_\beta^\circ$  szabadentalpiával rendelkezik a  $\beta$  kompenzációs hőmérsékleten. Vagyis, ha a kromatográfiában entalpia-entrópia kompenzáció figyelhető meg a komponensek egy csoportjára, ezek a komponensek ugyanazon retencióval rendelkeznek a  $\beta$  kompenzációs hőmérsékleten, de a hőmérsékletfüggésük különböző lehet. A kompenzációs hőmérséklet hasonlósága arra utal, hogy *a molekulák hasonló mechanizmus szerint választódnak el az oszlopon*. Ezért a kompenzáció tanulmányozása hasznos eszköz a mechanizmus kutatásában, azonban az eredményeket óvatosan kell kezelni az entalpiaváltozás meghatározásának bizonytalansága miatt [313, 314].

Vizsgálataink alapján, a koronaéter alapú fázison (F.5.1. Táblázat) valamint a teicoplanin ([49], 4. ábra) és risztocetin A alapú fázison ([50], 7. ábra) kapott kompenzációs hőmérsékleti adatok kielégítik az entalpia-entrópia kompenzáció követelményeit. Az egyes molekulacsoportokon belül, az egyes állófázisokon az L és D [(S) és (R)] enantiomerek kompenzációs hőmérsékleti adatai jó egyezést mutattak, ami arra utal, hogy az enantiomerek elválasztása az azonos szelektoron, fordított fázisú kromatográfia esetén hasonló mechanizmus szerint történt. A mozgó fázis összetételének változása valószínűleg befolyásolja ezt a mechanizmust.

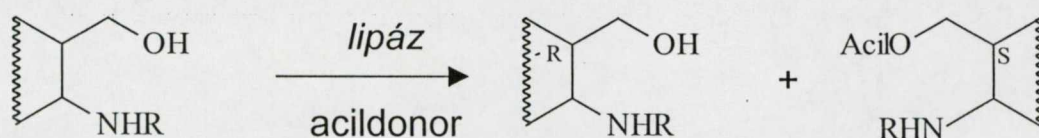
## 6. Alkoholszármazékok királis elválasztása

### 6.1. (2-Aminociklohexil)metanol, (6-aminociklohex-3-én-1-il)metanol sztereoizomerek, *diendo*- és *diexo*-3-amino-biciklo[2.2.1]heptán-2-il-metanol és *diendo*- és *diexo*-3-amino-biciklo[2.2.1]hept-5-én-2-il-metanol sztereoizomerek közvetlen folyadékkromatográfiás elválasztása

A két kiralitáscentrummal rendelkező monociklusos *cisz*- és *transz*-1,3-aminoalkoholok (110)-(113) közül a **110a** fontos fázis-transzfer-katalizátor [315], a **111a** orálisan aktív angiotenzin-konvertáló enzim köztiterméke [316]. A (110) és (111) *N*-benzil-származéka racém karbonsavak rezolváló ágense [317]. A (110)-(113) enantiomerek farmakológiai szempontból fontos 1,3-heterociklusok építőkövei [318, 319].

A biciklusos 1,3-aminoalkoholok (114)-(117), hasonlóan a monociklusos változataikhoz, a természetben is előforduló fontos farmakonok [320, 321]. Enantiomer változataik farmakológiailag aktív, kapcsolt 1,3-heterociklusok királis építőelemei [322].

E szintetikus és farmakológiai szempontból lényeges vegyületcsalád enantiomertiszta előállításának egyik lehetséges útja enzimatisz rezolválásuk különböző lipázenzimekkel (PS, AZ, F, G, M) [323]. A módszer lényege, hogy a különböző *N*-védett aminoalkoholokból lipázkatalizálta *O*-acilezési reakcióban acildonor (vinil-acetát, vinil-butanoát) jelenlétében az (*R*) konfigurációjú alkohol mellett (*S*) konfigurációjú acilezett termék keletkezik (6.1.1. ábra).

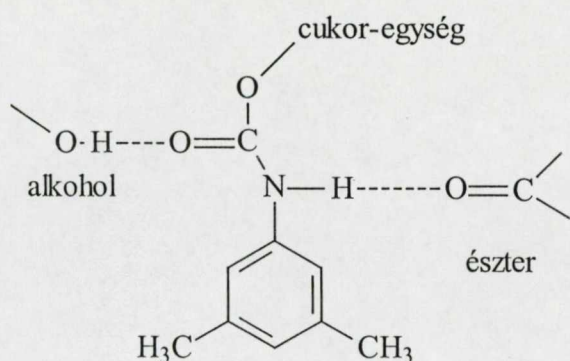


6.1.1. ábra A sztereoizomerek enzimatisz rezolválásának sémája lipázenzimmel

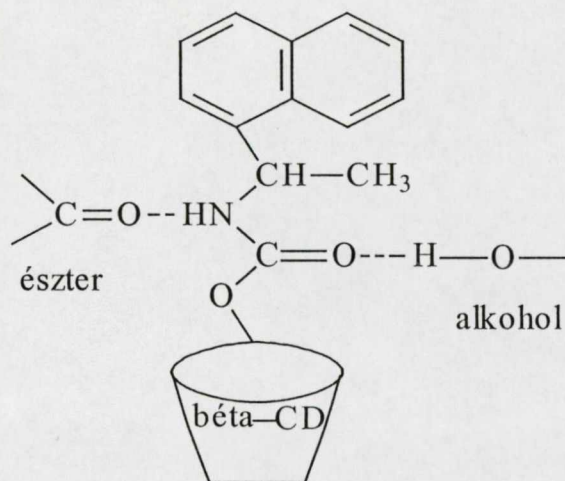
A visszamaradó alkohol és a keletkező acilezett termék sztereoizomerek megkülönböztetése mindenképp szükséges a rezolválás nyomon követése szempontjából. A különböző *N*-védőcsoportok és acilezőszerek hatását a kromatográfiás elválasztásra a *cisz*-(2-aminociklohexil)metanol esetén [51] közleményünk 1. Táblázata tartalmazza, mely a *Z*-védőcsoport és a vinil-butanoát acilezőszer előnyét mutatta.

A közvetlen analíziseket monociklusos 1,3-aminoalkoholok esetén *trisz*(3,5-dimetilfenil-karbamát)cellulóz szelektoron (Chiralcel OD), normál fázisú módban, hexán/2-propanol eluenst alkalmazva végeztük [51]. Biciklusos 1,3-aminoalkoholok közvetlen folyadékkromatográfiás analízisében (*S*)-naftiletal-karbamát-tartalmú  $\beta$ -CD-t tartalmazó királis állófázist (Cyclobond I 2000 SN) alkalmaztunk polár-organikus módban [52,53]. A fő kölcsönhatások normál fázisú és polár-organikus módban hasonlóak, így várható volt, hogy az

észter és alkohol sztereoizomerek, mindkét szelektoron elválaszthatók. A két oszlop királis szelektorának szerkezeti hasonlósága alapján (6.1.2. és 6.1.3. ábra), az oszlopok működésére hasonló mechanizmust tételeztünk fel [51-53].



**6.1.2. ábra** Feltételezett kölcsönhatások a cellulóz-trisz(3,5-dimetilfenil-karbamát álló-fázison (Chiralcel OD)

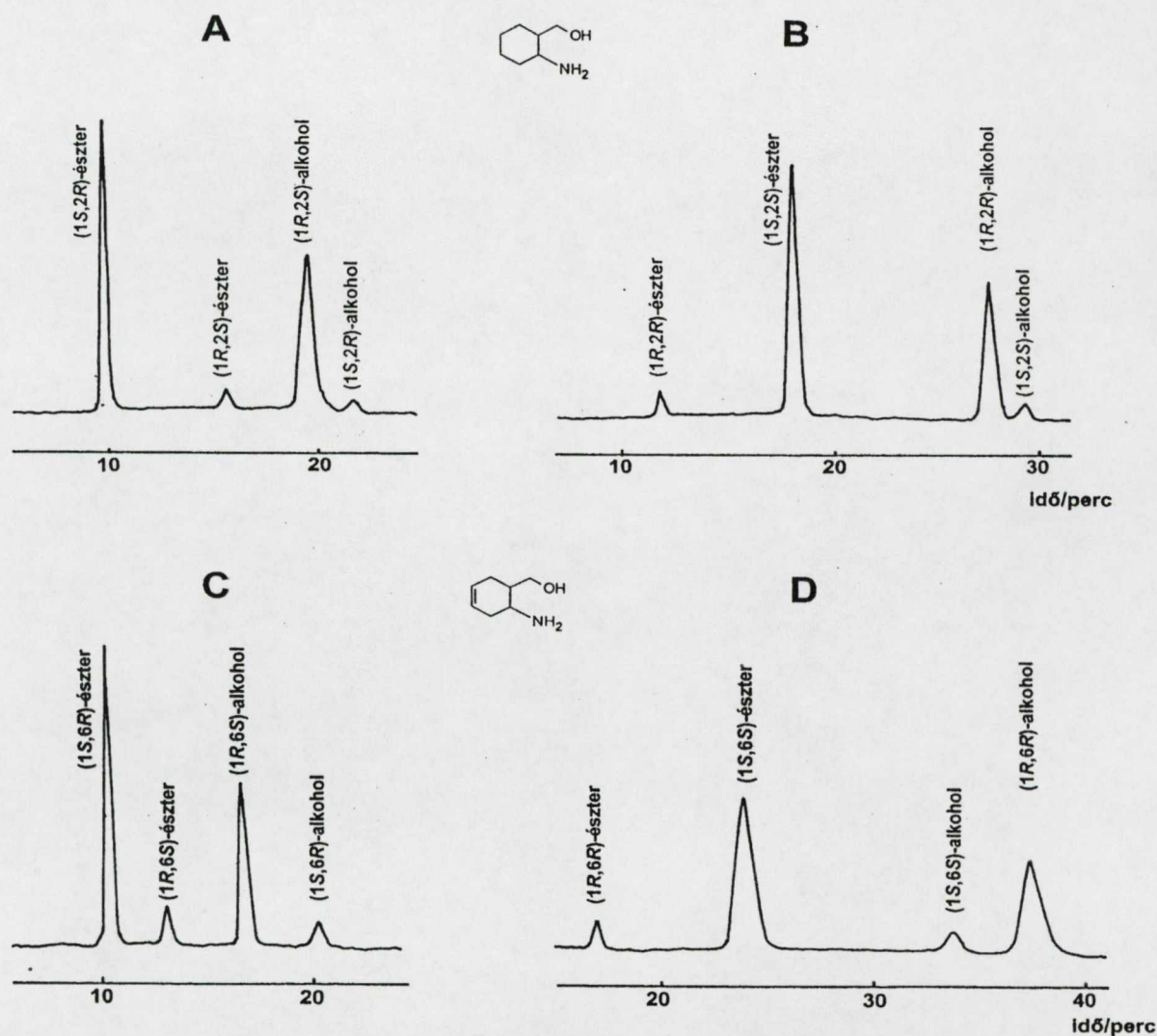


**6.1.3. ábra** Feltételezett kölcsönhatások az (S)-naftiletil-karbamát tartalmú  $\beta$ -ciklodextrin-állófázison (Cyclobond I 2000 SN)

A királis felismerés döntő kötőhelye ezeken a szelektorokon a poláris aril-szubsztituált karbamátcsoport, amely az elválasztandó enantiomerekkel hidrogénhid, dipol-dipol és/vagy  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatásokon keresztül fejt ki hatását [324]. Egy adott eluenszösszetételnél az alkohol  $k$  értéke mindig nagyobb volt, mint a neki megfelelő észteré és az  $R_1$ -csoport térkitöltésének növelésével ( $H < COMe < COPr$ )  $k$  csökkent ([51], 1. Táblázat). Ezek az adatok alátámasztották a retenció feltételezett mechanizmusát. Alkoholok esetén a meghatározó hidrogénhidas kapcsolat az alkohol  $-OH$ -csoportja és a 3,5-dimetilfenil-karbamát illetve a naftiletil-karbamát karboniloxigén-csoportja között jött létre (6.1.2. és 6.1.3. ábra), míg az észter karbonilcsoportja a karbamát  $=NH$  protonjával lépett kapcsolatba [324]. Azonban a 3,5-dimetilfenil-karbamát-csoporton lévő metilcsoportok és a naftiletil-karbamát-csoporton lévő etilcsoport elektronküldő sajátsága miatt a karbamát  $=NH$  protonjának savassága csökkent, míg a karbamát karboniloxigénjén az elektronsűrűség nőtt [325]. Ennek megfelelően a hidrogénhidas kapcsolat az észtercsoporttal gyengébb, mint az alkoholcsoporttal, és ezért az észter sztereoizomerek hamarabb eluálódtak, mint az alkohol sztereoizomerek.

Ha az  $R_2$  csoport minőségét nézzük, az aromás jellegű  $Z$ -szubsztituenst tartalmazó analógok (alkohol és észter egyaránt)  $k$  értékei sokkal nagyobbak voltak ([51] és [53] közleményünk 1. Táblázatai). Ez arra engedett következtetni, hogy a szelektor 3,5-dimetilfenil- illetve naftiletil-csoportja valamint az alkohol és észter  $N$ -benziloxikarbonil-csoportja között létrejövő  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatás erős visszatartó hatást jelentett az oszlopon.

Az *N*-benziloxikarbonil-*cisz*- és *transz*-(2-amino-ciklohexil)metanol és *N*-benziloxikarbonil-*cisz*- és *transz*-(6-amino-ciklohex-3-én-1-il)metanol és butanoát analógjainak enzimatisz rezolválás után kapott kromatogramjait **6.1.4. ábra** szemlélteti ([51], **2. Táblázat**).



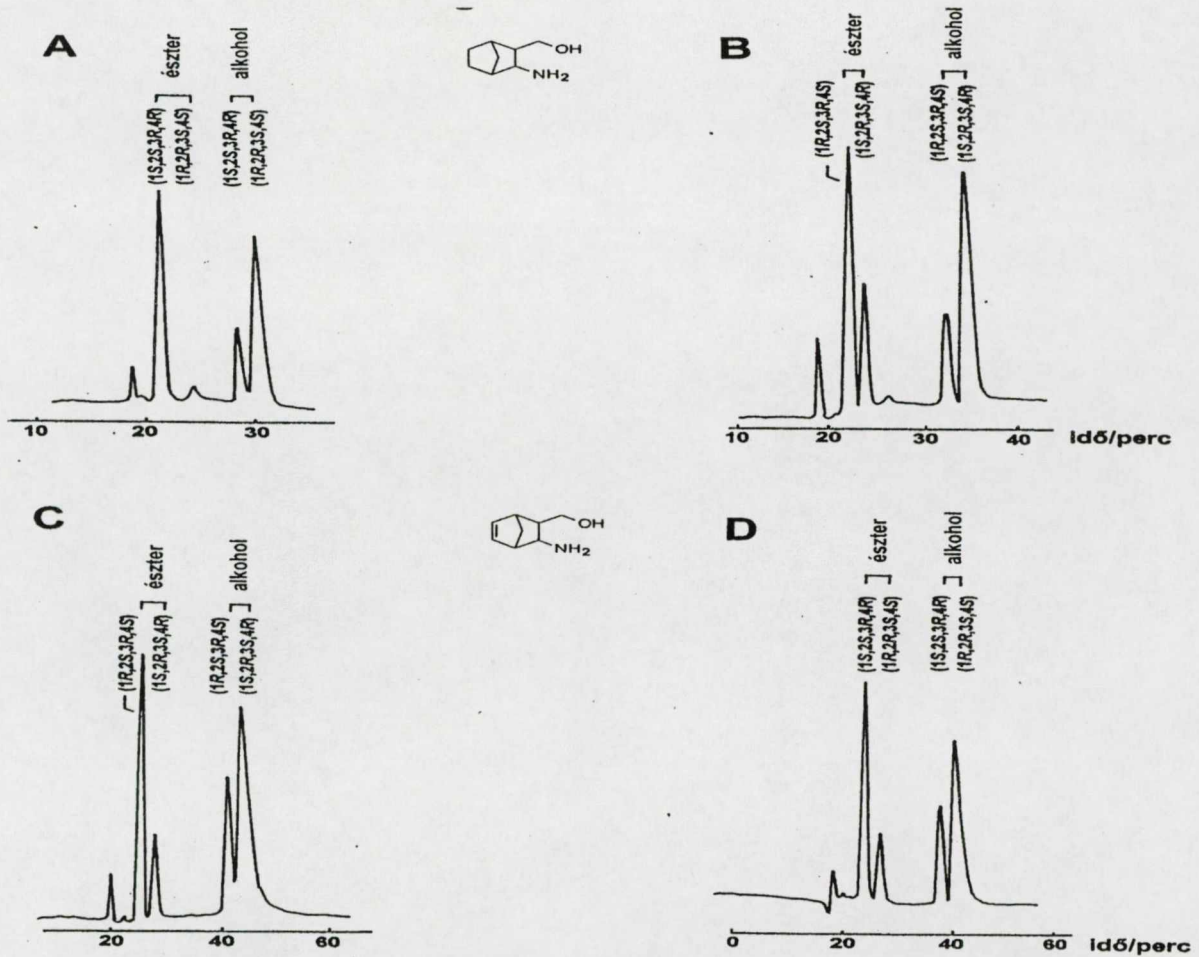
**6.1.4. ábra** A *cisz*- és *transz*-*N*-benziloxikarbonil-2-aminociklohexil-metanol, a *cisz*- és *transz*-*N*-benziloxikarbonil-(6-aminociklohex-3-én-1-il)metanol sztereoizomerek és butanoát analógjainak folyadékromatográfiás elválasztása cellulóz-trisz(3,5-dimetilfenil-karbamát) állófázison

**Kolonna,** Chiralcel OD; **áramlási sebesség,** 0,9 ml/perc; **detektálás,** 205 nm; **eluens,** n-hexán/2-propanol=95/5(v/v); **A,** (1*S*,2*R*)- és (1*R*,2*S*)-*N*-benziloxikarbonil-2-aminociklohexil-metil-butanoát, (1*R*,2*S*)- és (1*S*,2*R*)-*N*-benziloxikarbonil-2-aminociklohexil-metanol, **B,** (1*R*,2*R*)- és (1*S*,2*S*)-*N*-benziloxikarbonil-2-aminociklohexil-metil-butanoát, (1*R*,2*R*)- és (1*S*,2*S*)-*N*-benziloxikarbonil-2-aminociklohexil-metanol, **C,** (1*S*,6*R*)- és (1*R*,6*S*)-*N*-benziloxikarbonil-(6-aminociklohex-3-én-1-il)metil-butanoát, (1*R*,6*S*)- és (1*S*,6*R*)-*N*-benziloxikarbonil-(6-aminociklohex-3-én-1-il)metanol, **D,** (1*R*,6*R*)- és (1*S*,6*S*)-*N*-benziloxikarbonil-(6-aminociklohex-3-én-1-il)metil-butanoát, (1*S*,6*S*)- és (1*R*,6*R*)-*N*-benziloxikarbonil-(6-aminociklohex-3-én-1-il)metanol

A **6.1.4.** ábrából látható, hogy az észter sztereoizomerek az alkohol izomerek előtt eluálódtak, és az enzimatisz acilezés előrehaladtával az (1*S*)-észter és az (1*R*)-alkohol mennyisége nőtt. A kromatográfiás eljárás kiválóan alkalmas az acilezési reakció lefolyásának követésére.

Az enantiomerek *elúciós sorrendje* az észter- illetve alkohol-származékok esetén teljesen változó, általános szabály nem volt megállapítható, ami a retenció fent vázolt mechanizmusának bonyolultabb voltára utal.

A **6.1.5. ábra** bemutatja a biciklusos *N*-benziloxikarbonil-védett észter- és alkohol-sztereoizomerek optimalizált elválasztását, melynek alapján a módszer alkalmas az enzimatisz rezolválás konverziójának követésére.



**6.1.5. ábra** A diendo- és diexo-*N*-benziloxikarbonil-3-aminobicyclo[2.2.1]heptán-2-il-metanol és a diendo- és diexo-*N*-benzil-oxikarbonil-3-aminobicyclo[2.2.1]hept-5-én-2-il-metanol sztereoizomerek és butanoát analógjainak folyadékromatográfiás elválasztása (*S*)-naftiletil-karbamát- $\beta$ -CD állófázison

**Kolonna,** Cyclobond I 2000 SN; **áramlási sebesség,** 0,8ml/perc; **detektálás,** 205 nm; **eluens:** metanol/jégecet/trietil-amin, **A és B,** 100/0,8/0,2 (v/v/v), **C és D,** 100/0,04/0,01 (v/v/v); **hőmérséklet,** **A és B,** 25°C, **C és D,** 5°C; **A,** diendo-(1*S*,2*S*,3*R*,4*R*)- és (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*)-*N*-benziloxikarbonil-3-aminobicyclo[2.2.1]heptán-2-il-metil-butanoát, diendo-(1*S*,2*S*,3*R*,4*R*)- és (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*)-*N*-benziloxikarbonil-3-aminobicyclo[2.2.1]heptán-2-il-metanol, **B,** diexo-(1*R*,2*S*,3*R*,4*S*)- és (1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-*N*-benziloxikarbonil-3-aminobicyclo[2.2.1]heptán-2-il-metanol-butanoát, diexo-(1*R*,2*S*,3*R*,4*S*)- és (1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-*N*-benziloxikarbonil-3-aminobicyclo[2.2.1]hept-5-én-2-il-metil-butanoát, diendo-(1*R*,2*S*,3*R*,4*S*)- és (1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-*N*-benziloxikarbonil-3-aminobicyclo[2.2.1]hept-5-én-2-il-metanol, **D,** diexo-(1*R*,2*S*,3*R*,4*S*)- és (1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-*N*-benziloxikarbonil-3-aminobicyclo[2.2.1]hept-5-én-2-il-metil-butanoát, diexo-(1*S*,2*S*,3*R*,4*S*)- és (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*)-*N*-benziloxikarbonil-3-aminobicyclo[2.2.1]hept-5-én-2-il-metanol.

A legjobb felbontás elérése érdekében polár-organikus módban a jégecet/trietil-amin koncentrációt és arányt, a hőmérsékletet és az áramlási sebességet optimalizáltuk (6.1.5. ábra és [53], 1. Táblázat).

A tapasztalt *elúciós sorrend* szabályszerűséget mutatott. Mind az *N-Z*-védett alkohol-, mind az *N-Z*-védett észter-sztereoizomerek esetén a (2*S*,3*R*) konfigurációjú izomer a (2*R*,3*S*) konfigurációjú előtt eluálódott. Cyclobond I 2000 SN oszlopon az egy kiralitáscentrumot tartalmazó sztereoizomerek elúciós sorrendje (*R*)<(*S*) [326]. Esetünkben a másodikként eluálódó izomer a C3 szénatomon (*S*) konfigurációjú. Valószínű, hogy a C3 szénatom, melyhez a benziloxikarbonil-csoport kapcsolódott, a  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatások létrejötte révén kitüntető szerepet játszott a királis felismerésben.

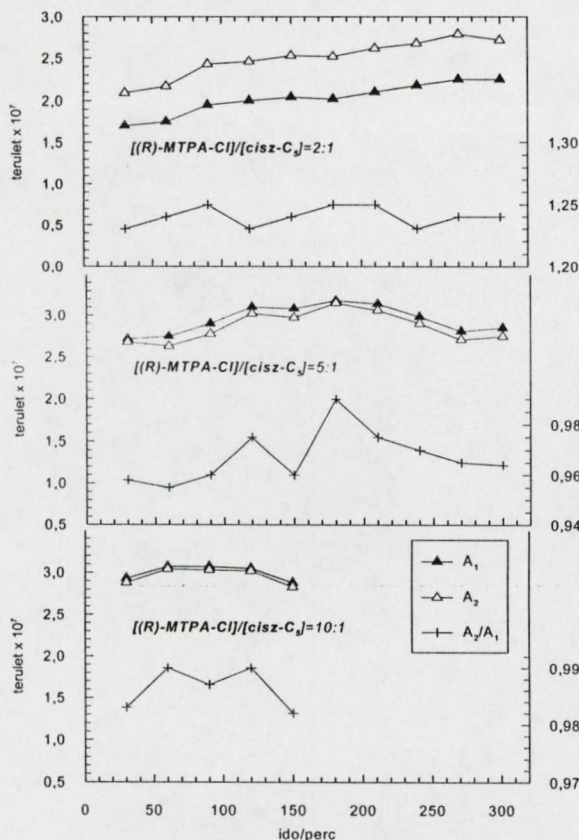
## 6.2. Mono- és biciklusos alkohol sztereoizomerek közvetett folyadékkromatográfiai meghatározása

Mono- és biciklusos aminoalkohol sztereoizomerek (110)-(117) *közvetett* folyadékkromatográfiai meghatározásával célunk független módszer fejlesztése volt az enzimatikusan rezolvált szabad amino- és hidroxilcsoportot tartalmazó analógok kimutatására. A *közvetett* módszerhez Marfey-reagenssel való származékképzést alkalmaztunk, és a képződött diasztereomereket C<sub>18</sub> kolonnán választottuk el (FDAA-val a reakció csak az -NH<sub>2</sub>-csoporton játszódott le, -OH-csoporton nem). Az eredményeket a F.6.2.1. Táblázatban foglaltuk össze. Mivel a derivatizátum nem tartalmazott ionizálható csoportokat, az elválasztáshoz víz/metanol vagy víz/acetonitril eluent használtunk (sav- és puffermentes). A Táblázat adataiból kitűnt, hogy mindkét eluensrendszer hatásosan alkalmazható a képződött diasztereomerek elválasztására (a MeOH itt is hatékonyabbnak bizonyult, mint az MeCN) és az elúciós sorrend ismerete alapján az enzimek sztereoszelektivitásának ellenőrzésére.

## 6.3. *Cisz*- és *transz*-2-hidroxiciklopentán- és -ciklohexánkarbonitril sztereoizomerek közvetett folyadékkromatográfiai elválasztása

A két királis szénatomot tartalmazó 2-hidroxicikloalkánkarbonitrilek (118)-(121) biológiailag értékes 1,3-heterociklusos vegyületek, amidok, karbonsavak [322, 327, 328] kiindulási anyaga. Biológiailag és farmakológiailag fontos vegyületek alapanyagaiként, enantiomer tisztaságuk ellenőrzése szintézisük és enzimatis rezolválásuk (*lipáz PS*) kritikus pontja. Gázkromatográfiai módszerek ismertek erre a célra [329], *folyadékkromatográfiai elválasztásukra nem volt példa* az irodalomban. *Közvetlen* folyadékkromatográfiai meghatározásukhoz a rendelkezésre álló kolonnaállományból nem sikerült megfelelő oszlopot találni. *Közvetett* meghatározásuk szintén kritikus, valószínűleg az alkánvázhhoz kapcsolódó alkoholos hidroxilcsoport csekély reakciókészsége miatt. Az általunk eddig alkalmazott

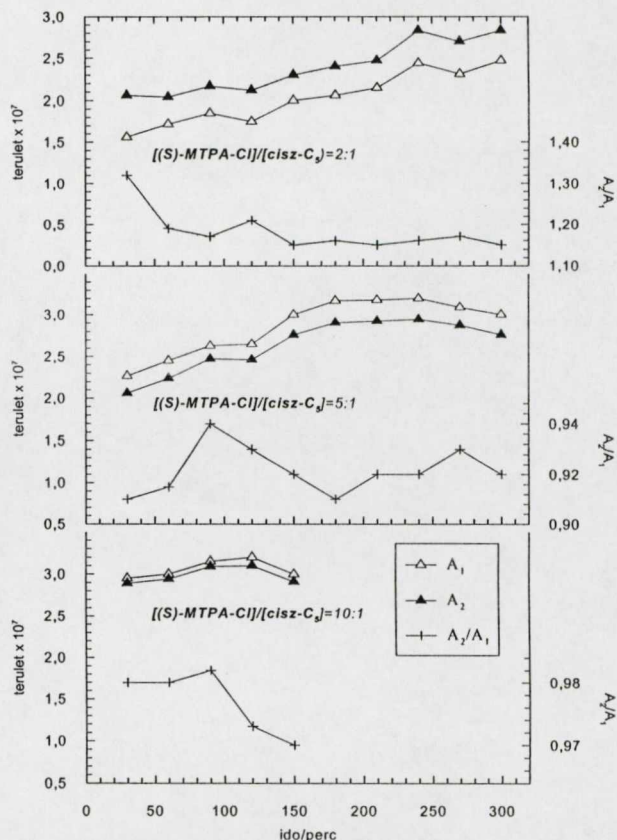
származékképző szereken kívül, az 1-(9-fluorenil)kloroformát, a mentil-kloroformát, a kámforsav-klorid szintén nem, míg a Mosher-reagens, az (*S*)- vagy (*R*)- $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -(trifluormetil)fenilacetil-klorid (MTPA-Cl) alkalmasnak bizonyult a hidroxilcsoporttal való származékképzésre [54]. A keletkezett alkohol diasztereomerek C<sub>18</sub> oszlopon elválaszthatók voltak. A származékképzési reakció hozama függött a reagens/alkohol molaránytól, a reakcióidőtől, a hőmérséklettől. Ezen kívül kisebb reagens/alkohol molarányánál (2/1, 5/1) erőteljes kinetikai rezolúció volt megfigyelhető (6.3.1. és 6.3.2. ábra).



**6.3.1. ábra** A származékképzés hozamának függése a (*R*)-MTPA-Cl/*cis*-2-hidroxiciklopentánkarbonitril (**118**) molarányától és a reakcióidőtől

Származékképzés: (*R*)-MTPA-Cl + *cis*-(1*S*,2*S*)- és (1*R*,2*R*)-2-hidroxiciklopentánkarbonitril

Kromatográfiai körülmények: kolonna, Vydac 218TP54 C<sub>18</sub>; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 250 nm; eluens, A, víz/metanol=95/5 (v/v), B, víz/metanol=5/95 (v/v), gradiens, 0 perc, 30% B, 20 perc 100% B; elúciós sorrend, (1*R*,2*R*) < (1*S*,2*S*);  $\Delta$ , (1*S*,2*S*),  $\blacktriangle$ , (1*R*,2*R*)



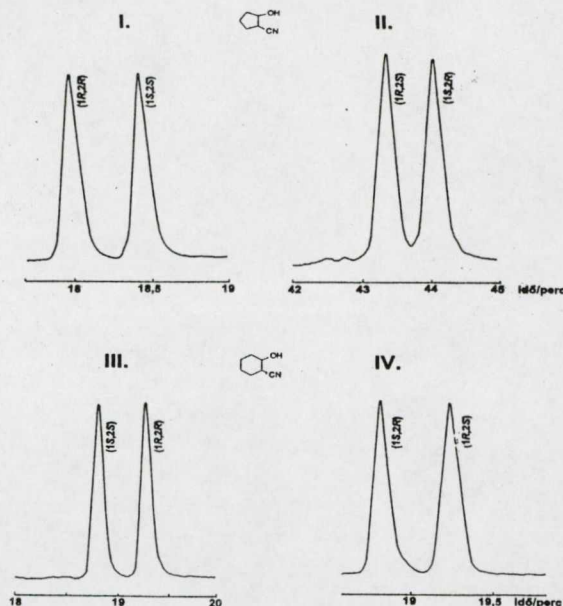
**6.3.2. ábra** A származékképzés hozamának függése a (*S*)-MTPA-Cl/*cis*-2-hidroxiciklopentánkarbonitril (**118**) molarányától és a reakcióidőtől

Származékképzés: (*S*)-MTPA-Cl + *cis*-(1*S*,2*S*)- és (1*R*,2*R*)-2-hidroxiciklopentánkarbonitril

Kromatográfiai körülmények: kolonna, Vydac 218TP54 C<sub>18</sub>; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 250 nm; eluens, A, víz/metanol=95/5 (v/v), B, víz/metanol=5/95 (v/v), gradiens, 0 perc, 30% B, 20 perc 100% B; elúciós sorrend, (1*S*,2*S*) < (1*R*,2*R*);  $\Delta$ , (1*S*,2*S*),  $\blacktriangle$ , (1*R*,2*R*)

Az (*R*) konfigurációjú reagens, kis reagens/alkohol molarányánál (2/1) nagyobb sebességgel reagált az (1*S*,2*S*) konfigurációjú sztereoizomerrel, mint az (1*R*,2*R*) izomerrel és fordítva. Ez azt jelentette, hogy az (*R*)-származékképző szívesebben reagált azzal a hidroxilcsoporttal, mely (*S*) konfigurációjú szénatomhoz kapcsolódott, míg az (*S*)-

származékképző előnyben részesítette azt a hidroxilcsoportot, mely (*R*) konfigurációjú szénatomhoz csatolt. Nagyobb reagens/alkohol mólarányánál ez a sebességkülönbség kiegyenlítődt. Minden körülményt figyelembe véve a származékképzést 40°C-on, 10/1 reagens/alkohol mólarányánál, 2 óra reakcióidővel végeztük. A reagensfelesleg eltávolítására 50-szeres feleslegben Gly-t alkalmaztunk.



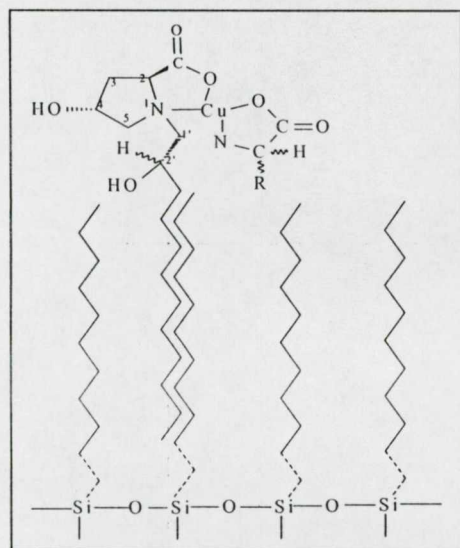
**6.3.3. ábra** A *cisz*- és *transz*-2-hidroxiciklopentán- és -ciklohexánkarbonitril sztereoizomerek közvetett folyadékkromatográfiás elválasztása Mosher reagens alkalmazása esetén

*Kromatográfiás körülmények: kolonna, Vydac 218TP54 C<sub>18</sub>; áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 250 nm; eluens, A, víz/metanol=95/5 (v/v), B, víz/metanol=5/95 (v/v), gradiens, I, III, IV, 0 perc, 30% B, 20 perc 100% B, gradiens, II, 0 perc, 30% B, 90 perc 100% B; I, cisz-(1*R*,2*R*)- és (1*S*,2*S*)-2-hidroxiciklopentánkarbonitril, II, transz-(1*R*,2*S*)- és (1*S*,2*R*)-2-hidroxiciklopentánkarbonitril, III, cisz-(1*S*,2*S*)- és (1*R*,2*R*)-2-hidroxiciklohexánkarbonitril, IV, transz-(1*S*,2*R*)- és (1*R*,2*S*)-2-hidroxiciklohexánkarbonitril; származékképzés, I és IV, (*R*)-MTPA-Cl, II és III, (*S*)-MTPA-Cl*

A HPLC-s elválasztásokat Vydac 218TP54 oszlopon víz/metanol illetve víz/acetonitril eluens rendszerekkel, gradienselúcióval végeztük (F.6.3.1. Táblázat és 6.3.3. ábra), [54]. A MeOH ebben az esetben is hatásosabb szerves módosítónak bizonyult, mint az MeCN. A 6.3.3. ábra a *cisz* és *transz*-2-hidroxiciklopentán- és -ciklohexánkarbonitril sztereoizomerek elválasztását mutatja be. A *transz*-2-hidroxiciklopentánkarbonitril kivételével viszonylag rövid idő alatt  $R_S > 1,5$  felbontás érhető el (F.6.3.1. Táblázat). A (118)-(121) sztereoizomerekkel (*S*)- vagy (*R*)-MTPA-Cl származékképző alkalmazásával olyan diasztereomerek képződtek, melyekkel tetszőleges elúciós sorrendű elválasztás volt megvalósítható C<sub>18</sub> oszlopon víz/metanol eluensrendszerekkel.

## 7. Nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek királis vékonyréteg-kromatográfiás elválasztása

Davankov [330, 331] munkássága nyomán ismert, hogy fém-kelátkomplex adalékanyagok az álló- vagy a mozgófázisba helyezve alkalmasak hatékony folyadékkromatográfiás elválasztások kidolgozására. A ligandumcserés kromatográfiának nevezett módszer elve, hogy a mintakomponensek eltérő módon tudják kiszorítani a ligandumot a fémkomplexből, és a mintából keletkezett fémkomplexek kromatográfiás sajátságai különbözőek. A ligandumcserés kromatográfia speciális alkalmazási területe, mikor a ligandum és a minta komponensei is részt vesznek a fémionnal való vegyes ligandumú komplex kialakításában. Ez utóbbira példa a Günther [332] által kidolgozott királis vékonyréteg-kromatográfiás módszer, melynek alapja, hogy  $C_{18}$  vékonyréteg lapon a  $2S,4R,2'RS-N-(2$ -hidroxi-dodecil)-4-hidroxi-prolin-Cu(II) komplexét impregnálják (**Chiralplate lap**) és az elválasztandó sztereoizomerek eltérő stabilitású vegyes ligandumú komplexet képeznek az állófázison (**7.1. ábra**). A királis vékonyréteg-kromatográfiát sikeresen alkalmazták különböző



7.1. ábra. A vegyes ligandumú komplex szerkezete a Chiralplate lapon

sztereoizomerek [332-344] analízisére. Nyiredy és munkatársai [345] a módszer kényszeráramlásos változatát dolgozták ki és az eljárás általános összefoglalását a [346-348] munkákban találjuk. Martens [348] munkájában utalt arra, hogy  $\alpha$ -aminosavak esetén az oldallánc szénatomszámának növelése kedvezett az elválasztásnak és ezt a bázikus csoportok jelenléte gátolta.

Értekezésünkben  $\alpha$ -aminosav sztereoizomerek elválasztásán túlmenően a molekulaszervezet és a retenció közti kapcsolatra is kitérünk [14,55,56].

A **F.7.1. Táblázatban** látható hogy  $\beta$ -metil-szubsztituált aminosavak esetén a retenció függött a

molekula lipofil jellegétől, annak csökkenésével a  $\beta$ -MeTrp >  $\beta$ -MeCha >  $\beta$ -MePhe >  $\beta$ -MeTic >  $\beta$ -MeTyr sorban a molekula kölcsönhatása az állófázissal csökkent, mozgékonyasága nőtt. A lipofilicitás növelése más, hasonló szerkezetű vegyületek esetén is általában a vándorlás csökkenését vonta maga után, igazolva a *hidrofób-hidrofób* kölcsönhatások jelentőségét a retenció meghatározásában. A mért mozgékonyasági sorrendek a legtöbb esetben követték a molekulák lipofil jellegét, az  $R_f$  értékek a lipofilicitás növelésével csökkentek: **Dit < Dmt < Tyr;** **Atc < Hat;** **Dih < Hat;** **5-MeTic3 < Tic3 ~ Tic1 < 6-OHTic3 ~ 7-OHTic3.**

$\beta$ -metil-aminosavak esetén Martens [348] állításával ellentétben a szelektivitás a hidrofóbicitás növelésével nem nőtt, ami arra utal, hogy a lipofil jellegén kívül más tényezők is szerepet játszottak az állófázissal való kölcsönhatás kialakításában. Másrészt, valószínűleg szterikus okok miatt a  $\beta$ -metil-aminosavak esetén az *eritro*-sztereoizomerek szelektivitása minden esetben nagyobb volt, mint a *treo*-sztereoizomereké és a (2*S*,3*S*) és (2*S*,3*R*) sztereoizomerek gyakorlatilag együtt futottak, így a  $\beta$ -metil-aminosavak esetén a négy sztereoizomer ezzel a módszerrel nem választható el egymástól.

A növekvő hidrofóbicitás szelektivitást növelő sajátja más esetekben sem egyértelmű. A lipofilabb **Dih** sztereoizomerek nem, míg a kevésbé lipofil **Hat** sztereoizomerek elválaszthatók. Ugyanez vonatkozik az **5-MeTic3**, az  $\alpha$ -**MeTic3** illetve **Tic3** sztereoizomerekre. Az **5-MeTic3** és az  $\alpha$ -**MeTic3** esetében a túl merev szerkezet nem kedvezett az állófázissal való kölcsönhatásnak.

Az indol- (**Tcc**, **Tnc**) és imidazol-vázak (**Tip**) analógok hasonló szerkezetűek a **Tic** analógokhoz. Közülük egyedül a **Tnc** sztereoizomerek választhatók el acetonitril/metanol/víz=4/1/1 (v/v/v) futtatásban. Ennek valószínű oka, hogy a karboxilcsoport közelében indolvázban lévő iminocsoport részt vett a vegyes ligandumú komplex kialakításában. Lúgos futtatásban, acetonitril/metanol/víz/di-2-propil-metilamin=4/1/1/0,1 (v/v/v/v) a szelektivitás javult, mindhárom analóg sztereoizomerjei elválaszthatók. A szelektivitás növekedés magyarázata lehet, hogy a lúgos közeg kedvezett az indol- és imidazol-váz deprotonálásnak és így semleges iminocsoportja és az állófázis közötti másodlagos kölcsönhatások kialakításának. Ugyanakkor a **Dmt** és **Dit** szelektivitás növekedése lúgos körülmények között a fenolátcsoporthoz való kölcsönhatásával magyarázható.

A *retenciós sorrend* az általunk vizsgált nemfehérje-alkotó aminosavak esetén (*R*)<(*S*), ami megfelel az irodalmi adatoknak. A két királis szénatomot tartalmazó  $\beta$ -metil-aminosavak esetén (2*R*)<(2*S*). Ez a viselkedés valószínűleg annak a következménye, hogy a vegyes ligandumú komplex kialakításában elsődlegesen a C2 szénatomon lévő karboxil- és aminocsoportok vettek részt.

## 8. Peptidek folyadékkromatográfiai analízise

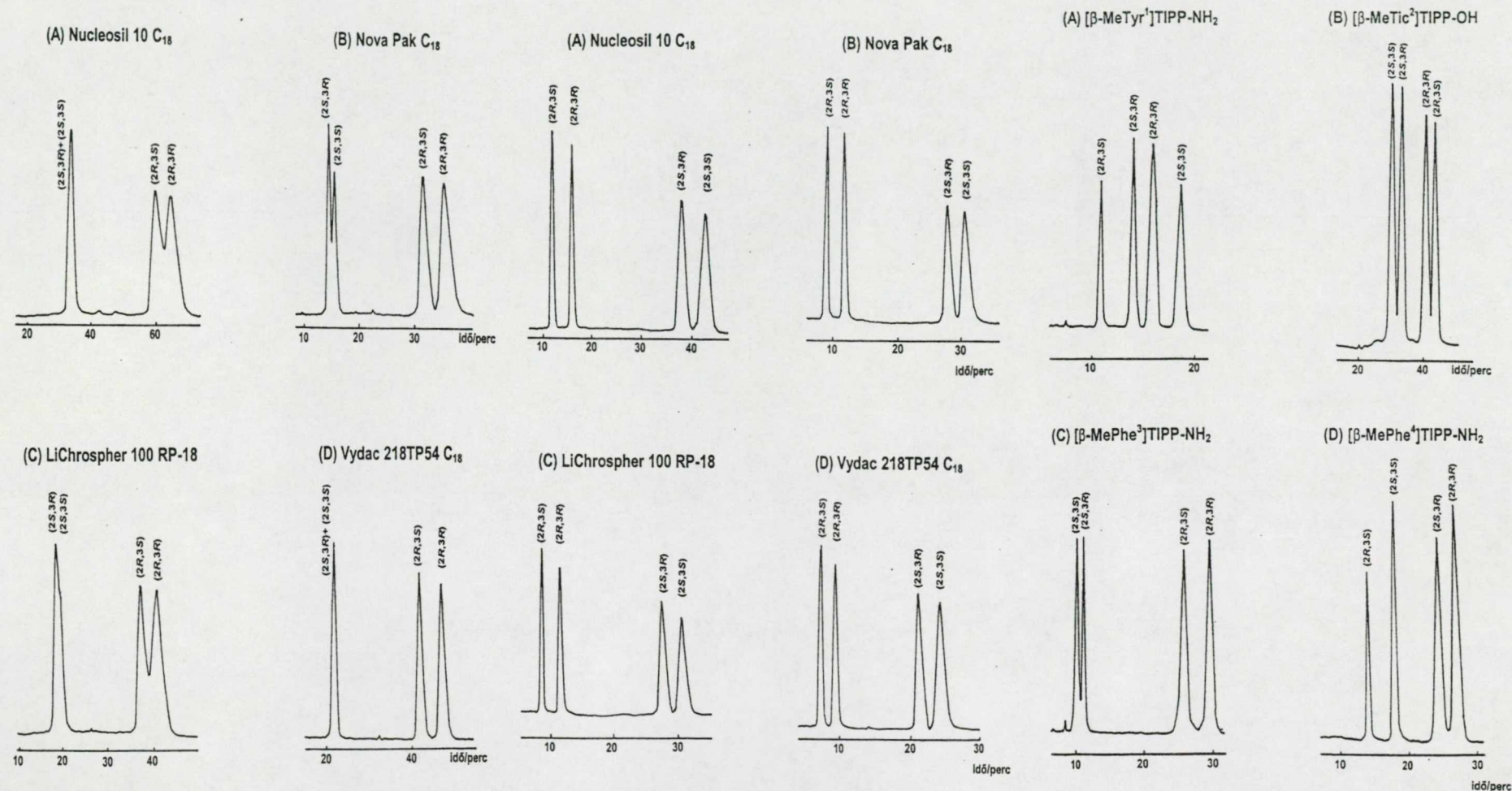
Peptidek fordított fázisú folyadékkromatográfiai analízisének mechanizmusára vonatkozóan alapvetően két nézet terjedt el az irodalomban [349-351]. Az adszorpciós modellben a peptid és a mozgófázis verseng az adszorpciós helyekért, és a hidrofób felületen adszorbeált peptid addig marad a felületen, amíg a szerves oldószer megfelelő koncentrációba kerülve le nem szorítja. A leszorítás után a peptid kapcsolata a hidrofób felülettel elhanyagolható. Ezt a mechanizmust támasztja alá a gradienselúció, vagyis a retenció függése a az eluens szerves komponens koncentrációja időbeli változásának sebességétől. Figyelembe kell venni, hogy adszorpció lejátszódhat a „szabad” szilanol részeken is.

A megoszlási modellben a peptid megoszlik az álló- és a mozgófázis között, hasonlóan a víz-oktanol rendszerhez. Erősen hidrofób peptidek nagyobb affinitást mutatnak az állófázis iránt.

Az elválasztás mechanizmusa valószínűleg a kétféle elképzelés keveréke. Sőt, a szerves oldószer adszorbeálódva a hordozón „új” állófázist hozhat létre, amely részt vehet a megoszlásban. A kis peptidek és nagyobb fehérjék nem ugyanazokat a kötőhelyeket felhasználva választódnak el. Körülbelül 10 aminosav tagszámig a retenció követi a hidrofóbicitást, felette a harmadlagos szerkezetek jelentős befolyással bírnak az elválasztásban.

Az általunk végzett peptidanalízisekben többnyire *egyetlen aminosav konfigurációjában különböző* peptid diasztereomerek (epimerek) elválasztásáról volt szó. A vizsgált peptideket, amelyek deltorfin, dermorfin, TIPP, endomorfín, szomatosztatin, enkefalin, oxitocin és oszteokalcin analógok voltak, az **F.8. Táblázatban** mutatjuk be [3-5, 9-11, 13, 21, 22, 26, 29, 55, 57-60]. A peptidek szintézise többnyire *racém* aminosav beépítésével készült és az analitika feladata volt az epimer peptidek tisztítása, *elválasztása* és az így különválasztott peptidekben az egyes aminosavak konfigurációjának meghatározása *a biológiai vizsgálatokat megelőzően*. A peptidekben lévő nemfehérje-alkotó aminosavkonfiguráció meghatározásának első lépése tehát „tisztá” peptidepimerek előállítás, mely elsősorban kromatográfiai feladat. A **8.1. ábrán** néhány *eritro-* és *treo-*β-metil-aminosavat tartalmazó peptidepimer elválasztása látható.

A H-Tyr-D-Ala-Gly-β-MePhe-Val-Val-Gly-OH enkefalin analóg diasztereomerjeit négy kolonnán kíséreltük meg elválasztani. A kolonnák fizikai-kémiai jellemzőit a **F.2.2.1. Táblázat** tartalmazza. Az eluens szerves módosítója, ha MeCN volt, a kromatogramon négy helyett két csúcst kaptunk. MeOH szerves módosítóval a legjobb elválasztást a Nova Pak C<sub>18</sub> oszlopon értük el, a legrosszabbat a Nucleosil 10 C<sub>18</sub> oszlopon. A különbséget magyarázhatja a szemcseátmérő (4 illetve 10 μm) eltérése. A Nova Pak C<sub>18</sub> oszlop rendkívül kicsiny pórusátmérője (60 Å) ellenére jobb elválasztási képességet mutatott, mint a nagyobb pórusátmérőjű LiChrospher 100 RP-18 és Vydac 218TP54 (300 Å), bár a Vydac keskenyebb



8.1. ábra Peptidimeriek elválasztása

H-Tyr-D-Ala-Gly-β-MePhe-Val-Val-Gly-OH

Eluens, **A,B**, 0,1% TFA\*/MeOH=60/40 (v/v), **C,D**, 0,1% TFA\*/MeOH=65/35 (v/v); áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 205 nm.

\*0,1% TFA: 0,1% TFA-t tartalmazó H<sub>2</sub>O

H-Tyr-D-Ala-β-MePhe-Asp-Val-Val-Gly-NH<sub>2</sub>

Eluens, **A,B,C,D**, 0,1% TFA\*/MeOH=80/20 (v/v); áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 205 nm.

Oszlop: **A, C, D**, Vydac 218TP54 C<sub>18</sub>, **B**, Hyperpep 300 C<sub>18</sub>; eluens, **A, D**, 0,1% TFA\*/MeOH =50/50 (v/v), **B**, 0,1% TFA\*/MeCN/MeOH=45/14/41 (v/v/v) **C**, 0,1% TFA\*/MeCN=58/32 (v/v); áramlási sebesség, 0,8 ml/perc; detektálás, 210 nm.

csúcsai (nagyobb hatékonyság) a nagyobb pórusátmérőből adódó előny következménye. Az a tény, hogy az enkefalin analóg diasztereomerek a kis pórusátmérőjű oszlopon is elválaszthatók voltak, a peptid viszonylagos kis méretével magyarázható.

A H-Tyr-D-Ala- $\beta$ -MePhe-Asp-Val-Val-Gly-NH<sub>2</sub> deltorfin 1 analóg diasztereomerek az Asp-tartalom miatt hidrofilabb sajátságúak és egy újabb karboxilcsoport jelenléte valószínűleg kedvezett a hidrogénhidás kölcsönhatásoknak. Az oszlopok szemcse- és pórusátmérője alig befolyásolta elválasztásukat, talán a Vydac oszlop hatékonysága volt egy kissé jobb.

A különböző  $\beta$ -metil-aminosavakat tartalmazó TIPP epimerek, bár csak négy aminosavat tartalmaztak, [ $\beta$ -MeTyr<sup>1</sup>]TIPP-NH<sub>2</sub>, [ $\beta$ -MeTic<sup>2</sup>]TIPP-OH, [ $\beta$ -MePhe<sup>3</sup>]TIPP-NH<sub>2</sub> és [ $\beta$ -MePhe<sup>4</sup>]TIPP-NH<sub>2</sub> elválasztásuk a kisebb pórusátmérőjű Nucleosil 10 C<sub>18</sub>, Nova Pak C<sub>18</sub>, LiChrospher 100 RP-18 oszlopokon nem, míg a nagyobb pórusátmérőjű Vydac 218TP54 C<sub>18</sub> és Hyperpep 300 C<sub>18</sub> (pórusátmérő 300 Å) oszlopokon megfelelő eluensösszetétel mellett megvalósítható volt.

Vizsgálataink eredményeként az opioid peptidepimerek elválasztására levonható általános következtetéseink:

- az opioid peptidok esetén a MeOH hatásosabb eluens összetevőnek bizonyult, mint az MeCN,
- a Tyr<sup>1</sup> helyettesítése bármilyen Tyr analóggal, komoly analitikai kihívást jelentett. Az epimerek csak kerülő úton szeparálhatók (a [ $\beta$ -MeTyr<sup>1</sup>]TIPP-NH<sub>2</sub> epimerek kitűnő elválasztása kivételt jelent),
- a hidrofóbicitáson alapuló, szerkezet és biológiai hatás közti kapcsolat, vagyis a Tyr<sup>1</sup> és a  $\beta$ -metil-aminosav közötti peptiden belüli távolság nem volt döntő a retenció meghatározásában,
- a  $\beta$ -metil-aminosavakat tartalmazó opioid peptid epimerek az általunk alkalmazott kolonnákon jól elválaszthatók, ha az L- és D-*eritro*-[(2*S*,3*S*) és (2*S*,3*R*) illetve az L- és D-*treo*-[(2*S*,3*R* és (2*R*,3*S*)]-diasztereomerpárok elválasztásáról volt szó. Az L-*treo* – L-*eritro* illetve a D-*treo* – D-*eritro*-diasztereomerek elválasztása már jelentősen függött az alkalmazott kolonnától, eluenstől, és nem is mindig vezetett eredményre. Ezért volt járható út az a szintetikus stratégia, hogy királisan tiszta D,L-*eritro*- vagy D,L-*treo*- $\beta$ -metil-aminosavból kiindulva végeztük a szintézist. Figyelembe kellett venni azonban, hogy ha a peptidszintézis során racemizáció lépett fel, akkor például L-*eritro*-sztereoizomerből D-*treo*-sztereoizomer keletkezett, tehát mindenképpen törekedni kellett a négy peptidepimer elválasztására.

Az általunk fejlesztett és alkalmazott módszerek alkalmasak voltak a **F.8. Táblázatban** bemutatott peptidepimerek >99% királis tisztaságban való elválasztására, félpreparatív méretekben is.

## 9. Peptidek mikrohullámú hidrolízise

### 9.1. Módszer fejlesztése peptidek mikrohullámú hidrolízisére

A nemfehérje-alkotó aminosavak többnyire racém formában kerültek beépítésre a peptidekbe az olcsóbb szintézis stratégia következményeként. A peptid epimerok elkülönítése után további feladatot jelentett a bennük lévő nemfehérje-alkotó aminosavak konfigurációjának és az esetleges racemizáció mértékének a meghatározása. Ehhez a peptideket aminosav komponenseire kellett bontani, amit hagyományosan termikus, savas hidrolízissel oldanak meg (6N HCl, 110°C, 24 óra) [352]. A savas hidrolízis egyrészt mindig magában hordozza az epimerizáció (racemizáció) veszélyét, másrészt az érzékeny aminosavak (Ser, Thr, Tyr, Cys, Met, Trp) jelentős bomlást szenvedhetnek. E hibák kiküszöbölésére, illetve mérséklésére számos módszert dolgoztak ki (sósav helyett különböző savkeverékek használata, a hidrolízis időtartamának és hőmérsékletének optimalizálása [353]). Az általunk, a kilencvenes évek elején, kifejlesztett és alkalmazott módszerrel az akkor a peptidhidrolízisre ismertté vált mikrohullámú technikát [354-357] vezettük be. A hidrolízist deutérium-kloriddal végezve, tömegspektrometriás elemzéssel meg tudtuk különböztetni a hidrolízis során, illetve a hidrolízis előtt (Boc-védőcsoport beépítése, peptidszintézis) bekövetkezett epimerizációt [358-360] és a kíméletesebb hidrolízistől az aminosavak jobb visszanyerését reméltük. A 9.1. Táblázatban 450 W mikrohullámú teljesítménynél és hagyományos hidrolízisnél a ciklikus H-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub> peptid példáján mutatjuk be a hidrolízis időtartamának hatását

Aminosav	Visszanyerés (%)			
	Hidrolízis időtartama (perc)			
	10 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>	1440 <sup>b</sup>
Val	1	67	60	68
Cys	5	40	40	50
Tyr	15	72	68	70
Lys	14	71	65	66
Trp	4	25	27	12
Nal	33	56	54	58
Thr	36	74	73	73

<sup>a</sup>Mikrohullámú hidrolízis

<sup>b</sup>Hagyományos hidrolízis, 110°C

Aminosav	Inverz forma hozama (%)			
	Hidrolízis időtartama (perc)			
	10 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>	1440 <sup>b</sup>
Val	0,5	3	3	7
Cys	5	9	12	26
Tyr	0,5	2	3	5
Lys	2	3	4	4
Trp	1	3	4	5
Nal	8	13	15	12
Thr	<<0,1	<<0,1	<<0,1	<<0,1

<sup>a</sup>Mikrohullámú hidrolízis

<sup>b</sup>Hagyományos hidrolízis, 110°C

**9.1. Táblázat** A ciklikus [H-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>] peptid visszanyerési % értékei mikrohullámú és hagyományos hidrolízis során (mikrohullámú teljesítmény: 450 W)

**9.2. Táblázat** Az inverz forma hozama a ciklikus [H-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>] peptid mikrohullámú és hagyományos hidrolízise során (mikrohullámú teljesítmény: 450 W)

a visszanyerés hozamára, míg a **9.2. Táblázat** ugyanilyen körülmények között végrehajtott hidrolízis után kimutatható inverz forma mennyiségét szemlélteti [61]. A 30 perces mikrohullámú hidrolízis gyakorlatilag ugyanolyan hozamokat eredményezett, mint a hagyományos 24 órás termikus módszer, és az érzékeny Trp nagyobb hozammal volt visszanyerhető. Az epimerizációra érzékeny Cys pedig kisebb racemizációt szenvedett. Ha a hidrolízist nagyobb mikrohullámú teljesítménnyel hajtottuk végre (850 W), a visszanyerési hozamok rövidebb idő alatt érik el maximális értéküket, de a nagyobb teljesítmény nem kedvezett az érzékeny aminosavak (Trp, Cys) visszanyerésének és a racemizáció mértékének [61]. A **9.3. Táblázatban** egy nehezen bontható Val-Val kötést tartalmazó peptid, H-Tyr-D-Ala-Tic-Glu-Val-Val-Gly-NH<sub>2</sub> visszanyerési és epimerizációs hozamait hasonlítjuk össze a kétféle hidrolízis után, amely egyértelműen mutatja a mikrohullámú hidrolízis előnyét. A **9.4. Táblázatban** további aminosavak racemizációs adatait vetjük össze különböző peptidok hidrolízise után.

Aminosav	Visszanyerés (%) (Inverz forma hozama (%))			
	Hidrolízis időtartama (perc)			
	30 <sup>a</sup>	30 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	1440 <sup>c</sup>
Ala	46(0,4)	84	102(1,4)	61(0,7)
Val	19(0,1)	48	85(0,9)	46(0,4)
Glu	52(0,1)	78	94(0,1)	58(0,1)
Gly	62	85	102	61
Tyr	38(0,1)	70	55(0,1)	12(0,3)

<sup>a</sup>Mikrohullámú teljesítmény: 450 W  
<sup>b</sup>Mikrohullámú teljesítmény: 850 W  
<sup>c</sup>Hagyományos hidrolízis, 110 °C

Aminosav	Inverz forma mennyisége (%)	
	Mikrohullámú	Hagyományos
	hidrolízis	
Ile	0,6	0,5
Leu	0,5	1,5
Pro	0,5-1,0	2,0-2,5
Asp	0,5	2,5-3,0
Phe	0,5	2,5
Glu	0,5	1,0
Tyr	0,5-2,0	2,0-5,0

**9.3. Táblázat** A H-Tyr-D-Ala-Tic-Glu-Val-Val-Gly-NH<sub>2</sub> peptid visszanyerési értékei (%) és az inverz forma perc, 450 W és hagyományos (24 h, 110°C) hidrolízise hozama (%) mikrohullámú és hagyományos hidrolízis során keletkező inverz aminosav mennyisége (%)

Mindezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy mikrohullámú hidrolízissel:

- a hidrolízis időtartama jelentősen csökkenthető (30 perc, 450 W),
- az epimerizáció mértéke csökkent,
- az „érzékeny” aminosavak (Ser, Thr, Tyr, Cys, Met, Trp) nagyobb hozammal voltak visszanyerhetőek,
- hidrolízis szempontjából stabilis kötések (Val, Leu és Ile kombinációi) az idő és a teljesítmény optimalizálásával rövidebb idő alatt voltak bonthatók.

Meg kell azonban jegyezni, hogy más laboratóriumok tapasztalata szerint a természetes fehérjékre a mikrohullámú hidrolízissel kapott visszanyerési és epimerizációs adatok nem mindig voltak jobbak. Ennek valószínű magyarázata, hogy a fehérjék fémtartalma nehezen

reprodukálható katalizált bomlást indíthat el mikrohullámú besugárzás során (szintetikus peptideknél ez a veszély kevésbé áll fenn).

## 9.2. Aminosavak konfigurációjának meghatározása peptidhidrolízis után

A nemfehérje-alkotó aminosavak konfigurációját hidrolízis után az eddig ismertett *közvetett* vagy *közvetlen* módszerek valamelyikével határoztuk meg. Ha nem állt rendelkezésre a bizonyításhoz enantioszelektív szintézissel nyert sztereoizomer, az esetek többségében tiszta enantiomert vagy az egyik enantiomerre nézve dúsított terméket enzimatiszikus rezolválással állítottunk elő. Az enzimatiszikus rezolváláshoz *L-aminosav oxidázt* ( $\beta$ -alkil-aminosavak), *Pseudomonas putida* és *Ochrabactum anthopi* (Phe analógok), *lipáz* (alkoholok) és *karboxipeptidáz A* (Atc, Hat) enzimeket alkalmaztunk. Az utóbbi két esetben a konfigurációt röntgendiffrakciós módszerrel is megerősítettük. Azokat a molekulákat, ahol nem állt rendelkezésre az azonosításhoz standard, közleményeinkben megemlítettük illetve jelen **Értekezés 3-5. Fejezetének Táblázataiban** külön #-tel jelöltük.



a Tyr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup> kötések mentén találhatóak. A Tyr<sup>5</sup>ψGly<sup>6</sup> illetve Gly<sup>6</sup>ψD,L-Leu kötésmódosítások stabilizálták a szomszédos Trp<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup> és a Tyr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup> kötéseket.

*Szubtilizin* jelenlétében a fő hasadási pont a Tyr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup> kötés. Ennél fogva, a Tyr<sup>5</sup>ψGly<sup>6</sup> kötést tartalmazó peptid nagy stabilitást mutatott, felezési ideje  $t_{1/2} > 20$  óra. A Gly<sup>6</sup>ψD,L-Leu kötés stabilizáló hatása a Tyr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup> kötésre kismértékben érvényesült ( $t_{1/2} = 9$  perc).

Összefoglalva: a redukált peptidkötések beépítése összességében néhány esetben növelte a stabilitást, és a degradáció útját módosította.

## 10.2. Endomorfín 1 és 2 stabilitásvizsgálata

Az 1997-ben felfedezett endomorfínok igen aktív és szelektív  $\mu$ -opioid agonista sajátsággal rendelkeznek [185]. Metabolizmusuk során való viselkedésük nem volt ismert, *elsőként* tanulmányoztuk az irodalomban. Az enzimstabilitás vizsgálatokhoz a központi idegrendszerben és a cerebrospinális folyadékban is előforduló *amino-, endo- és karboxipeptidáz* enzimeket alkalmaztuk [63,64], az *in vitro* vizsgálatokat patkányagy homogenizátumban végeztük [65]. A *karboxipeptidáz A*, mint metallopeptidáz, főként a C-terminális aromás és hosszú alifás szénláncú aminosavrészeket hasítja [362], míg a *karboxipeptidáz Y*, egy széles spektrumú szerin-proteáz, képes katalizálni a peptid-észterek és -amidok hidrolízisét [363]. Az *aminopeptidázok* előfordulnak az agyban és főként *N*-terminális oldalról hasítják a peptideket [364-367]. A peptid, ha 2. helyzetben Pro-t tartalmaz, az *N*-terminális rész X-Pro dipeptidként hasad le. A *proteináz A* képes az amidált peptidek hidrolízisére.

Analitikai szempontból e vizsgálatok az előbb ismertetettekhez képest annyi változtatást igényeltek, hogy a közvetlen folyadékkromatográf-tömegspektrométer (HPLC-ESI-MS) kapcsolat miatt az előtisztítás nagyobb gondosságot igényelt (ESI: „electrospray” ionizáció).

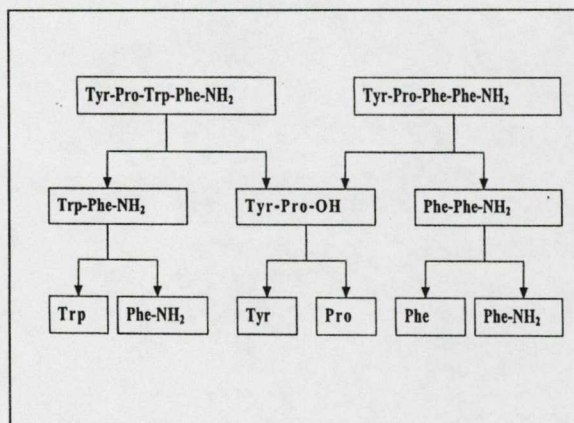
Az endomorfín 1 és 2 termékspektrumát *karboxipeptidáz Y*, *aminopeptidáz M* és *proteináz A* enzimekkel való emésztés után a **F.10.2.1. Táblázatban** tüntetjük fel. A peptidek felezési ideje percekben mérhető, gyorsan bomlottak. A *karboxipeptidáz Y* és *proteináz A* első lépésben a -CONH<sub>2</sub>-csoportot -COOH-csoporttá alakította, majd a Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kötések mentén hasította az endomorfínokat. A maradék *N*-terminális tripeptid stabilis a további hidrolízissel szemben. Az *aminopeptidáz M* a Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup> és a Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> kötések mentén hasította az endomorfínokat. Az *aminopeptidáz M* eltérő viselkedése (nem egy *N*-terminális aminosav hasad) a Pro stabilizáló hatásával volt magyarázható proteázok okozta hidrolízissel szemben. A keletkező *N*-terminális dipeptid, a H-Tyr-Pro-OH viszonylagosan nagy stabilitással rendelkezett. A keletkező C-terminális dipeptidek (H-Trp-Phe-NH<sub>2</sub> és H-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>) viszont gyorsan hidrolizáltak.

Az enzimstabilitás vizsgálatok jó alapot teremtettek a patkányagy homogenizátumban, mint enzimentartalmú természetes anyagban, *in vitro* végrehajtott kísérletek kivitelezéséhez és értelmezéséhez [64,65]. Az endomorfínok az opioid peptidekhez képest viszonylagosan lassan bomlottak a patkányagy homogenizátumban, az endomorfín 1 és 2 felezési ideje  $t_{1/2}=4,9$  illetve  $t_{1/2}=3,8$  perc volt. Az enziminhibíciós vizsgálatok azt mutatták, hogy a *metalloproteázok* és *aminopeptidázok* inhibíciója nagymértékben stabilizálta a peptideket, ugyanakkor a *karboxipeptidázokra* jellemző metabolitok a termékspektrumban nem jelentek meg (10.2.2. Táblázat).

Inhibitor	Koncentráció (µM)	Inhibeált enzim	Inhibíció (%)	
			endomorfín 1	endomorfín 2
			PMSF	1000
1,1-fenantrolin	1000	metalloproteáz	82,5	82,8
Bestatin	100	aminopeptidáz	34,2	30,3
Kaptopril	20	angiotenzin konvertáló enzimek	44,0	33,5
Tiorfán	20	endopeptidáz 3.4.24.II.	25,8	10,5
Aktinonin	100	aminopeptidáz M (enkefalin bontó enzimek)	47,9	67,6

10.2.2. Táblázat Proteáz inhibitorok hatása az endomorfínok degradációjára patkányagy homogenizátumban

Endomorfín koncentrációja, 100 µmol/dm<sup>3</sup>; patkányagy homogenizátum fehérje tartalma, 5,4 mg/ml; PMSE, fenil-metán-szulfonil-fluorid



10.2.1. ábra Endomorfínok bomlásterképe patkányagy homogenizátum jelenlétében

Radioaktív (tríciált) Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup> és Phe<sup>3</sup> jelenlétében végzett mérések az *aminopeptidáz* indította degradáció jelentőségére utaltak. A degradáció végterméke minden esetben aminosav és a tömegspektrometriás mérések bizonyították, hogy a H-Tyr-Pro-OH és H-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub> köztiterméként jelent meg a degradáció során. Az endomorfínok végső bomlásterképét a 10.2.1. ábrán mutatjuk be.

Összességében: a peptidstabilitás-vizsgálatokra kidolgozott módszerünk alkalmas volt az enzimatis emésztés minőségi és mennyiségi nyomon követésére. A reakcióelegyből vett minták előtisztítása kritikus pontja az analízisnek. A HPLC-MS-technika nélkülözhetetlen a metabolizmus pontos feltérképezésében. A degradációs utak ismerete elősegítette új analógok tervezését.

## 11. Összefoglalás

1. Nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek elválasztására *közvetett* folyadékkromatográfiás módszereket vezettünk be a 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glükopiranozil-izotiocianát (GITC) és 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanin-amid (FDAA) királis származékképzők felhasználásával. A fehérjealkotó aminosavakra kidolgozott módszereket az új igényeknek megfelelően továbbfejlesztettük. Feltártuk a *származékképző reagensek és az eluent alkotó szervetlen- és szerves módosítók közti szelektivitásbeli különbségeket*.

Megállapítottuk az eljárás *hátrányait és korlátait*, nevezetesen, hogy a *szterikusán gátolt és/vagy két kiralitáscentrumot* tartalmazó sztereoizomerek származékképzése és kromatográfiás analízise nem mindig eredményes.

*Először* mutattunk rá, hogy Marfey-származékok esetén a sztereoizomerek *nemcsak L<D sorrendben* eluálódnak. Mindkét származékképző esetén magyarázatot találtunk az irodalmitól eltérő elúciós sorrendre. Az elúciós sorrend megállapításához a standardokat sztereoszelektív szintézis mellett főleg enzimátikus úton állítottuk elő.

2. Új *királis származékképzőket* terveztünk és vezettünk be, melyeket sikeresen alkalmaztunk a GITC- és FDAA-származékok helyett a nemfehérje-alkotó aminosav sztereoizomerek elválasztásában. Az új származékképzők jól alkalmazhatók voltak *konformációsán gátolt és/vagy több kiralitáscentrumot* tartalmazó aminosav sztereoizomerek esetén. A keletkező termékek kitűnő stabilitással rendelkeztek. Az elúciós sorrendek változását a molekulák szerkezete alapján részben magyarázni tudtuk.

3. *Közvetlen* folyadékkromatográfiás módszereket fejlesztettünk új királis (koronaéter-, makrociklusos glükopeptid-, kinin- és ciklodextrin-alapú) állófázisok felhasználásával. Az alkalmazott oszlopok és aminosavak újdonsága iránymutató volt hasonló szerkezetű vegyületek elválasztásában. Megállapítottuk az egyes királis szelektorok alkalmazhatóságának előnyeit és hátrányait. A retenciós viselkedést a molekulászerkezettel és az állófázison kialakuló lehetséges kölcsönhatásokkal értelmeztük.

Az itt kifejlesztett módszerek közvetlen alkalmazhatók *preparatív* kromatográfiás célokra. Az elúciós sorrendek  $\alpha$ -aminosavak esetén koronaéter- és kinin-alapú állófázison valószínűsíthetők, makrociklusos antibiotikum alapú állófázisokon, biológiai alapon magyarázhatók voltak.

4. A *közvetlen* folyadékkromatográfiás elválasztások *hőmérsékletfüggéséből* nyert termodinamikai adatok birtokában rámutattunk a királis szelektorok (koronaéter, teicoplanin, risztocetin A) és az elválasztandó izomerek *lehetséges és meghatározó kölcsönhatásaira*. Feltártuk a mechanizmus néhány fontosabb részletét, mely az elválasztandó izomerek szerkezetének ismeretében segített a megfelelő állófázis és kromatográfiás körülmények (normál-, fordított fázisú, polár-organikus kromatográfia, eluensalkotók) kiválasztásában.

5. A nemfehérje-alkotó aminosavakból származtatható vagy ahhoz vezető, farmakológiailag fontos alkohol sztereoizomerek *közvetlen* (és *közvetett*) folyadékkromatográfias elválasztására fejlesztettünk módszereket. Eljárásunkkal követni tudtuk enzimatiszta rezolválásukat, enantiomertiszta komponensek előállítását. Megerősítettük a cellulóz- és ciklodextrin-alapú karbamáttípusú állófázisokon lejátszódó elválasztások mechanizmusát (alkohol sztereoizomerek–észter sztereoizomerek elválasztása).

6. Királis *vékonyréteg-kromatográfias* vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a nemfehérje-alkotó aminosavak esetén a királis szelektor–Cu(II)–aminosav vegyes ligandumú komplex stabilitása mellett a molekulát alkotó másodlagos kölcsönhatásokra képes csoportok jelenléte (-OH, -NH<sub>2</sub>, =NH) segítette a királis felismerést. Megállapítottuk, hogy főleg a lúgos közeg kedvezett az indol- és imidazol-váz deprotonált és így semleges iminocsoportja és az állófázis közti másodlagos kölcsönhatások kialakításának.

7. Új, olcsó módszert fejlesztettünk ki a két kiralitáscentrumot tartalmazó *eritro-* és *treo-*sztereoizomerek preparatív méretű folyadékkromatográfias elválasztására.

A nemfehérje-alkotó aminosavak többnyire racém formában, főleg opioid peptidekbe építettük be. Módszereket dolgoztunk ki a peptid epimerek elválasztására. Megállapítottuk, hogy opioid peptidek esetén a MeOH szerves módosítóként való használata előnyösebb. Kimutattuk, hogy az L- és D-*eritro* illetve az L- és D-*treo* diasztereomer párok elválasztása általában sikeres volt, míg az L-*treo* – L-*eritro* illetve a D-*treo* – D-*eritro* diasztereomerek elválasztása már jelentősen függött a *kolonnától*, az *eluenstől* és nem is mindig vezetett eredményre.

8. A *biológiai hatásvizsgálatok* előtt fontos kérdés a peptid epimerekben lévő nemfehérje-alkotó aminosavak *konfigurációja*. Meghatározásukhoz a peptidet aminosav komponenseire kell bontanunk. Új, *mikrohullámú peptidhidrolízist* vezetünk be, mellyel jelentősen csökkentettük a hidrolízis időtartamát, az epimerizáció mértékét és növeltük a visszanyerési hozamokat. Deutérium-klorid és MS-technika alkalmazásával a hidrolízis és a peptidszintézis során fellépő racemizáció megkülönböztethető volt.

9. Analitikai módszert fejlesztettünk az újonnan szintetizált peptidek élő szerkezetbeli stabilitásának modellezésére. A stabilitásvizsgálatok során, enzimpreparátumok és patkánygy homogenizátum alkalmazásával, HPLC-MS-módszerrel *elsőként* határoztuk meg az endomorfín-1 és -2 lehetséges degradációs útjait. Pseudo peptidkötést [ $\psi(-CH=CH)-$ ] tartalmazó GNRH analógok esetén tanulmányoztuk a kötésmódosítások hatását. A degradációs utak feltérképezése mindkét esetben elősegítette hatékonyabb analógok tervezését.

## 12. Az értekezés alapját képező közlemények

1. A. Péter, G. Tóth, E. Cserpán, D. Tourwé  
*Monitoring of optical isomers of  $\beta$ -methyl-phenylalanine in opioid peptides*  
**J. Chromatogr. A**, 660 (1994) 283.
2. A. Péter, G. Tóth, D. Tourwé  
*Monitoring of optical isomers of some conformationally constrained amino acids with tetrahydroisoquinoline or tetraline ring structures*  
**J. Chromatogr. A**, 668 (1994) 331.
3. Cs. Somlai, T. Janáky, M. Mák, A. Péter, B. Penke  
*Synthesis of osteocalcin (14-26) and osteocalcin (1-49) with Fmoc and Boc strategies*  
In **Peptides 1994**, Proceedings of the 23<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, ed. H.L.S. Maia, Escom-Leiden, (1995) 369.
4. G. Tóth, A. Péter, D. Tourwé, H. Jaspers, P.M.F. Verheyden, Z. Tóth  
*New analogues of deltorphin C and enkephalin-Val<sup>5,6</sup>-Gly<sup>7</sup>-NH<sub>2</sub> with replacement of Phe by  $\beta$ -MePhe*  
In **Peptides 1994**, Proceedings of the 23<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, ed. H.L.S. Maia, Escom-Leiden, (1995) 335.
5. A. Horváth, H. Jaspers, A. Péter, Gy. Kéri, D. Tourwé, Gy. Bökönyi, G. Laus, V. Csernus, O. Csuka, I. Teplán, G. Van Binst  
*Conformationally restricted new somatostatin analogs*  
In **Peptides 1994**, Proceedings of the 23<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, ed. H.L.S. Maia, Escom-Leiden, (1995) 564.
6. A. Péter, G. Tóth, E. Olajos, F. Fülöp, D. Tourwé  
*Monitoring of optical isomers of some conformationally constrained amino acids with tetrahydroisoquinoline or tetraline ring structures II.*  
**J. Chromatogr. A**, 705 (1995) 257.
7. A. Péter, Cs. Somlai, B. Penke  
*High-performance liquid chromatographic method for the separation of the optical isomers of  $\gamma$ - $\gamma'$ -ditert-butyl-D,L- $\gamma$ -carboxyglutamic acid and D,L-carboxyglutamic acid*  
**J. Chromatogr. A**, 710 (1995) 297.
8. A. Péter, F. Fülöp  
*High-performance liquid chromatographic method for the separation of isomers of cis- and trans-2-amino-cyclopentane-1-carboxylic acid*  
**J. Chromatogr. A**, 715 (1995) 219.
9. E. Mannekens, D. Tourwé, S. Vanderstichele, T. N. Thi Diem, G. Tóth, A. Péter, N.N. Chung, P. W. Schiller  
*Synthesis of the diastereomers of  $\beta$ -Me-Tyr and  $\beta$ -Me-Phe and their effect on the biological properties of the delta opioid receptor antagonist TIPP*  
**Letters in Peptide Science**, 2 (1995) 190.
10. D. Tourwé, G. Tóth, K. Verschueren, E. Mannekens, T. N. Thi Diem, P. Verheyden, H. Jaspers, A. Péter, A. Borsodi  
*Sidechain conformational constraints as a bases for opioid peptidomimetics*  
**Actualités de Chimie Thérapeutique**, 22 (1996) 93.

11. A. Péter, G. Tóth, G. Török, D. Tourwé  
*Separation of enantiomeric  $\beta$ -methyl amino acids and of peptides containing them*  
**J. Chromatogr. A**, 728 (1996) 455.
12. A. Péter, G. Török, P. Csomós, M. Péter, G. Bernáth, F. Fülöp  
*High-performance liquid chromatographic methods for separation of enantiomers of alicyclic  $\beta$ -amino acids*  
**J. Chromatogr. A**, 761 (1997) 103.
13. G. Tóth, Zs. Darula, A. Péter, F. Fülöp, D. Tourwé, H. Jaspers, P. Verheyden, Z. Tóth, A. Borsodi  
*Conformationally constrained deltorphin analogs with 2-aminotetralin-2-carboxylic acid in position 3.*  
**J. Med. Chem.**, 40 (1997) 990.
14. A. Péter, G. Tóth  
*Chromatographic methods for separation of enantiomers and epimers of  $\beta$ -alkyl amino acids and peptides containing them*  
**Anal. Chim. Acta**, 352 (1997) 335.
15. Cs. Somlai, A. Péter, B. Penke  
*Improved chemical synthesis of optically pure *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)- $\gamma,\gamma'$ -di-*tert*-butyl- $\gamma$ -carboxyglutamic acid*  
**J. Prakt. Chem. Chem. Ztg.**, 339 (1997) 464.
16. A. Péter, G. Török, J.-P. Mazaleyrat, M. Wakselman  
*High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers of 1',1'-binaphthyl-substituted  $\alpha$ -aminoisobutyric acid*  
**J. Chromatogr. A**, 790 (1997) 41.
17. A. Péter, G. Török, G. Tóth, W. Van Den Nest, G. Laus, D. Tourwé  
*Chromatographic methods for monitoring of optical isomers of unusual aromatic amino acids*  
**J. Chromatogr. A**, 797 (1998) 165.
18. G. Török, A. Péter, P. Csomós, L.T. Kanerva, F. Fülöp  
*High-performance liquid chromatographic methods for separation of the isomers of  $\beta$ -amino acids possessing bicyclo[2.2.1]heptane or heptene skeletons*  
**J. Chromatogr. A**, 797 (1998) 177.
19. A. Péter, G. Török, G. Tóth, W. Van Den Nest, G. Laus, D. Tourwé, D.W. Armstrong  
*Enantiomeric separation of unusual secondary aromatic amino acids*  
**Chromatographia**, 48 (1998) 53.
20. Zs. Szakonyi, F. Fülöp, G. Bernáth, G. Török, A. Péter  
*Preparation of cycloalkane-fused dihydropyrimidine-4[3H]-on enantiomers*  
**Tetrahedron: Asymmetry**, 9 (1998) 993.
21. G. Tóth, A. Péter, Zs. Darula, A. Borsodi, D. Tourwé  
*Conformationally constrained hydrophobic deltorphin analogues with 2-aminotetralin-2-carboxylic acid*  
In **Peptides 1996**, Proceedings of the 24<sup>th</sup> European Peptide Symposium, eds.: R. Ramage and R. Epton, Mayflower Scientific Ltd, 833 (1998).
22. D. Tourwé, E. Mannekens, T.N.T. Diem, P. Verheyden, H. Jaspers, G. Tóth, A. Péter, I. Kertész, G. Török, N.N. Chung, P.W. Shiller  
*Sidechain methyl substitution in the  $\delta$ -opioid receptor antagonist TIPP has an important effect on the activity profile*  
**J. Med. Chem.**, 41 (1998) 5167.

23. G. Török, A. Péter, A. Gaucher, M. Wakselmann, J.-P. Mazaleyrat, D.W. Armstrong  
*High-performance liquid chromatographic separation of novel atropic  $\alpha,\alpha$ -disubstituted- $\beta$ -amino acids, either on different  $\beta$ -cyclodextrin bonded phases or as their 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide derivatives*  
**J. Chromatogr. A**, **846** (1999) 83.
24. A. Péter, G. Török, G. Tóth, D. Tourwé, E. Mannekens, W. Van Den Nest, J. Sápi, D. W. Armstrong  
*Chiral separation of unusual  $\beta$ -methyl amino acids*  
In **Peptides 1998**, Proceedings of the 25<sup>th</sup> European Peptide Symposium, eds.: S. Bajusz and F. Hudecz, Akadémiai Kiadó, Budapest (1999) 300.
25. G. Török, A. Péter, G. Tóth, D. Tourwé, W. Van Den Nest, K. Itebeke, D. W. Armstrong  
*Chiral separation of secondary amino acids possessing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and related structures*  
In **Peptides 1998**, Proceedings of the 25<sup>th</sup> European Peptide Symposium, eds.: S. Bajusz and F. Hudecz, Akadémiai Kiadó, Budapest (1999) 302.
26. G.K. Tóth, K. Bakos, B. Penke, I. Pávó, Cs. Varga, G. Török, A. Péter, F. Fülöp  
*Synthesis of oxytocin antagonists containing conformationally constrained amino acids in position 2*  
**Bioorg. Med. Chem. Lett.**, **9** (1999) 667.
27. A. Péter, E. Olajos, R. Casimir, D. Tourwé, Q.B. Broxterman, B. Kaptein, D.W. Armstrong  
*High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers of unusual  $\alpha$ -amino acids*  
**J. Chromatogr. A**, **871** (2000) 105.
28. G. Török, A. Péter, E. Vékes, J. Sápi, M. Laronze, J.-Y. Laronze, D.W. Armstrong  
*Enantiomeric high-performance liquid chromatographic separation of  $\beta$ -substituted triptophane analogues*  
**Chromatographia**, **51** (2000) 165.
29. Zs. Darula, K.E. Kövér, K. Monory, A. Borsodi, É. Makó, A. Rónay, D. Tourwé, A. Péter, G. Tóth  
*Deltorphin II analogs with 6-hydroxy-2-aminotetralin-2-carboxylic acid in position 1*  
**J. Med. Chem.**, **43** (2000) 1359.
30. A. Péter, L. Lázár, F. Fülöp, D.W. Armstrong  
*High-performance liquid chromatographic enantioseparation of  $\beta$ -amino acids*  
**J. Chromatogr. A**, **926** (2001) 229.
31. A. Péter, E. Vékes, L. Gera, M. Stewart, D.W. Armstrong  
*A Comparison of the Most Effective Direct and Indirect LC Methods for Separating Enantiomers of Unusual Glycine and Alanine Amino Acid Analogues*  
**Chromatographia**, **56** (2002) S-79.
32. M. Péter, A. Péter, F. Fülöp  
*Development of a new isothiocyanate based chiral derivatizing agent for amino acids*  
**Chromatographia**, **50** (1999) 373.
33. M. Péter, A. Péter, F. Fülöp  
*Application of (1S,2S)- or (1R,2R)-1,3-diacetoxy-1-(4-nitrophenyl)-2-propylisothiocyanate for the indirect enantioseparation of racemic proteinogenic amino acids*  
**J. Chromatogr. A**, **871** (2000) 115.
34. A. Péter, M. Péter, F. Fülöp, G. Török, G. Tóth, D. Tourwé, J. Sápi  
*High-performance Liquid Chromatographic Separation of Unusual Amino Acid Enantiomers Derivatized with (1S,2S)-1,3-diacetoxy-1-(4-nitrophenyl)-2-propyl-isothiocyanate*  
**Chromatographia**, **51** (2000) S-148.

35. A. Péter, M. Péter, F. Fülöp, G. Tóth  
*Development of a new isothiocyanate-based chiral derivatizing agent for amino acid analysis*  
In **Peptides 2000**, Proceedings of the 26<sup>th</sup> European Peptide Symposium, eds.: J. Martinez and J.-A. Fehrentz, Éditions EDK, Paris, France, (2001) 569.
36. M. Péter, A. Péter, F. Fülöp  
*Új királis derivatizáló reagens szintézise és alkalmazása aminocsoportot tartalmazó vegyületek enantiomerjeinek folyadékkromatográfiás elválasztására*  
**Magyar Kémiai Folyóirat**, 108 (2002) 173.
37. A. Péter, E. Vékes, G. Török  
*Application of (S)-N-(4-nitrophenoxycarbonyl)phenylalanine methoxyethyl ester as a new chiral derivatizing agent for proteinogenic amino acid analysis by high-performance liquid chromatography*  
**Chromatographia**, 52 (2000) 821.
38. E. Olajos, A. Péter, R. Casimir, D. Tourwé  
*HPLC Enantioseparation of Phenylalanine Analogs by Application of (S)-N-(4-Nitrophenoxycarbonyl)phenylalanine Methoxyethyl Ester as a New Chiral Derivatizing Agent*  
**Chromatographia**, 54 (2001) 77.
39. A. Péter, E. Vékes, G. Tóth, D. Tourwé, F. Borremans  
*Application of a new chiral derivatizing agent for the enantioseparation of secondary amino acids*  
**J. Chromatogr. A**, 948 (2002) 283.
40. E. Vékes, G. Török, A. Péter, J. Sápi, D. Tourwé  
*Indirect high-performance liquid chromatographic separation of stereoisomers of  $\beta$ -alkyl-substituted amino acids by the application of (S)-N-(4-nitrophenoxycarbonyl)phenylalanine methoxyethyl ester as chiral derivatizing agent*  
**J. Chromatogr. A**, 949 (2002) 125.
41. A. Péter, E. Vékes, D.W. Armstrong, D. Tourwé  
*HPLC enantioseparation of imino acids on macrocyclic glycopeptide stationary phases and as (S)-N-(4-nitrophenoxycarbonyl)phenylalanine methoxyethyl ester derivatives*  
**Chromatographia**, 56 (2002) S-41.
42. G. Török, A. Péter, F. Fülöp  
*High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers of unusual amino acids possessing cycloalkane or cycloalkene skeletons on a chiral crown ether containing stationary phase*  
**Chromatographia**, 48 (1998) 20.
43. A. Péter, G. Török, D.W. Armstrong  
*High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers of unusual amino acids on a teicoplanin chiral stationary phase*  
**J. Chromatogr. A**, 793 (1998) 283.
44. A. Péter, G. Török, D.W. Armstrong, G. Tóth, D. Tourwé  
*High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers of synthetic amino acids on a ristocetin A chiral stationary phase*  
**J. Chromatogr. A**, 904 (2000) 1.

45. G. Török, A. Péter, D.W. Armstrong, D. Tourwé, G. Tóth, J. Sápi  
*Direct chiral separation of unnatural amino acids by high-performance liquid chromatography on ristocetin A-bonded stationary phase*  
**Chirality**, 13 (2001) 648.
46. A. Péter, G. Török, G. Tóth, W. Lindner  
*Direct high-performance liquid chromatographic enantioseparation of  $\beta$ -methyl-substituted unusual amino acids on a quinine-derived chiral anion-exchanger stationary phase*  
**HRC, J. High Resolut. Chromatogr.**, 23 (2000) 628.
47. A. Péter  
*Direct high-performance liquid chromatographic enantioseparation of apolar  $\beta$ -amino acids on a quinine-derived chiral anion-exchanger stationary phase*  
**J. Chromatogr. A**, 955 (2002) 141.
48. A. Péter, G. Török, F. Fülöp  
*Effect of temperature on retention of cyclic  $\beta$ -amino acid enantiomers on a chiral crown ether stationary phase*  
**J. Chromatogr. Sci.**, 36 (1998) 311.
49. A. Péter, G. Török, D.W. Armstrong, G. Tóth, D. Tourwé  
*Effect of temperature on retention of enantiomers of  $\beta$ -methyl amino acids on teicoplanin chiral stationary phase*  
**J. Chromatogr. A**, 828 (1998) 177.
50. A. Péter, E. Vékes, D.W. Armstrong  
*Effect of temperature on retention of chiral compounds on a ristocetin A chiral stationary phase*  
**J. Chromatogr. A**, 958 (2002) 89.
51. M. Péter, A. Péter, J. Van der Eycken, P. Csomós, G. Bernáth, F. Fülöp  
*High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers of cyclic 1,3-amino alcohol derivatives*  
**J. Chromatogr. A**, 816 (1998) 123.
52. J. Kámán, J. Van der Eycken, A. Péter, F. Fülöp  
*Enzymatic resolution of bicyclic 1,3-amino alcohols in organic media*  
**Tetrahedron: Asymmetry**, 12 (2001) 625.
53. A. Péter, J. Kámán, F. Fülöp, J. Van der Eycken, D.W. Armstrong  
*High-performance liquid chromatographic enantioseparation of bicyclic 1,3-amino alcohols*  
**J. Chromatogr. A**, 919 (2001) 79.
54. G. Török, A. Péter, E. Forró, F. Fülöp  
*Method development for high-performance liquid chromatographic enantioseparation of 2-cyanocycloalkanols*  
**J. Chromatogr. Sci.**, 39 (2001) 188.
55. Zs. Darula, A. Péter, G. Tóth  
*Tritiated deltorphin analogues with high specific radioactivity and high affinity and selectivity for delta opioid receptors*  
**J. Label. Comp. Rad.**, 39 (1997) 817.

56. Zs. Darula, G. Török, G. Tóth, E. Mannekens, K. Iterbeke, D. Tourwé, A. Péter  
*A rapid, qualitative thin-layer chromatographic method for the separation of enantiomers of unusual aromatic amino acids*  
**J. Planar Chromatogr.**, **11** (1998) 346.
57. A. Péter, G. Tóth, E. Olajos, D. Tourwé  
*Chromatographic behavior of opioid peptides containing  $\beta$ -methyl-phenylalanine isomers*  
**J. Chromatogr. A**, **705** (1995) 267.
58. M. Ceusters, D. Tourwé, J. Callaerts, J. Mertens, A. Péter  
*New Single-Step radioiodination technique for peptides: Cu(I)-Catalyzed nucleophilic nonisotropic displacement reaction. Synthesis of radioiodinated deltorphin and dermorphin analogues*  
**J. Org. Chem.**, **60** (1995) 8324.
59. G. Tóth, J. Farkas, I. Kertész, Cs. Tömböly, Zs. Darula, A. Péter  
*Tritium labelling of neuropeptides*  
In **Peptides 1998**, Proceedings of the 25<sup>th</sup> European Peptide Symposium, eds.: S. Bajusz and F. Hudecz, Akadémiai Kiadó, Budapest (1999) p. 636.
60. G. Tóth, Cs. Tömböly, A. Péter, D. Biyashev, A. Borsodi, A. Rónai, R. Przewlocki  
*New endomorphin analogues: Design, synthesis and biological properties*  
In **Peptides 2000**, Proceedings of the 26<sup>th</sup> European Peptide Symposium, eds.: J. Martinez and J.-A. Fehrentz, Éditions EDK, Paris, France, (2001) p.759.
61. A. Péter, G. Laus, D. Tourwé, E. Gerlo, G. Van Binst  
*An evaluation of microwave heating for the rapid hydrolysis of peptide samples for chiral amino acid analysis*  
**Peptide Research**, **6** (1993) 48.
62. A. Péter, S. Devadder, G. Laus, D. Tourwé  
*Liquid chromatography studies on the enzymatic degradation of luteinizing hormone-releasing hormone analogues with off-line identification by mass spectrometry*  
**J. Chromatogr. A**, **729** (1996) 137.
63. A. Péter, G. Tóth, Cs. Tömböly, G. Laus, D. Tourwé  
*Liquid chromatographic study of the enzymatic degradation of endomorphins with identification by electrospray ionization mass spectrometry*  
**J. Chromatogr. A**, **846** (1999) 39.
64. Cs. Tömböly, A. Péter, G. Tóth  
*Metabolism of endomorphins*  
**DOLOR; Investigación, Clínica & Terapéutica**, **14** (1999) 37.
65. Cs. Tömböly, A. Péter, G. Tóth  
*In vitro quantitative study of the degradation of endomorphins*  
**Peptides**, **23** (2002) 1571.

### 13. Felhasznált irodalom

1. S.C. Stinson, *Chem. Eng. News*, **77** (1998) 101.
2. E.J. Ariëns, *Med. Res. Rev.*, **6** (1986) 451.
3. E.J. Ariëns, W. Soudijn, P. Timmermans (Eds), *Stereochemistry and Biological Activity of Drugs*, Blackwell, Oxford, 1983.
4. V.J. Hruby, *Life Sci.*, **31** (1982) 189.
5. R.W. Souter, *Chromatographic Separation of Stereoisomers*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1985.
6. W. Lindner, C. Petterson, in I.M. Wainer (Ed), *Chromatography in Pharmaceutical Development*, Aster Springfield, Oregon, 1985, pp. 63.
7. M. Zief, L.J. Crane (Eds), *Chromatographic Chiral Separations*, Marcel Dekker, New York, NY, USA, 1988.
8. V.A. Davankov, in A.M. Krstulovic (Ed), *Chiral Separation: Applications to Pharmaceutical Compounds*, Ellis Horwood, Chichester, England, 1989.
9. T. Stevenson, I.D. Wilson, *Chiral Separation*, Plenum Press, New York, 1989.
10. M. Ahnhoff, S Einarsson in W.J. Lough (Ed), *Chiral Liquid Chromatography*, Blackie, Glasgow, 1989, p.39.
11. T. Shibata, K. Mori, Y. Okamoto in A.M. Krstulovic (Ed.), *Chiral separations by HPLC: Application to Pharmaceutical Compounds*, Ellis Horwood, Chichester, England, 1989, p. 336.
12. S. Görög in H. Lingeman, W.J.M. Underberg (Eds), *Detection-Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 1990, p. 193.
13. S.G. Allenmark, *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*, Ellis Horwood, 2nd ed., New York, USA, 1991.
14. J. Gal in I.W. Wainer (Ed), *Drug Stereochemistry. Analytical Methods and Pharmacology*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, NY, 1993, p. 65.
15. M.W. Skidmore in K. Blau, J. Halket (Eds), *Handbook of Derivatives for Chromatography*, J. Wiley and Sons, Chichester, 2nd ed., 1994, p. 215.
16. G.A. Subramanian, *Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH Verlagsgesellschaft mbh, Weinheim, Germany, 1994.
17. H.Y. Aboul-Einen, I.W. Wainer, *The Impact of Stereochemistry on Drugs Development and Use*, Chemical Analysis Series, Vol. 142, Wiley, New York, USA, 1997.
18. K. Hatada, T. Kitayama, O. Vogl (Eds), *Macromolecular Design of Polymeric Materials*, Marcel Dekker, New York, USA, 1997.
19. S. Ahuja (Ed), *Chiral Separations, Application and Technology*, American Chemical Society, Washington DC, 1997.
20. K. Jinno, *Chromatographic Separations Based on Molecular Recognition*, Wiley-VCH, New York, 1997.
21. T.E. Beesley, R.P.W. Scott, *Chiral Chromatography*, Wiley, Chichester, 1998
22. G. Lunn, L.C. Hellwig, *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC*, Wiley and Sons, Chichester, 1998.
23. T. Toyo'oka, *Modern Derivatization Methods for Separation Sciences*, Wiley and Sons, Chichester, 1999.
24. I.D. Wilson, E.R Adlard, M. Cooke, C.F. Poole (Eds), *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, New York, 2000, p. 2310.
25. C. Petterson, *Trends. Anal. Chem.*, **7** (1988) 209.
26. D.W. Armstrong, S.M. Han, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **19** (1988) 175.
27. S. Görög, M. Gazdag, *J. Chromatogr. B*, **659** (1994) 51.
28. B. Chankvetadze (Ed.), *J. Chromatogr. A*, **906** (1-2) kötet (2001).

29. B. Chankvetadze, K. Krommen (Eds.), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **27** kötet (2002).
30. IUPAC, IUB-JCBN, *Pure Appl. Chem.*, **56** (1984) 595.
31. Erdey-Grúz T., Fodorné Csányi P., *A magyar kémiai elnevezés és helyesírás szabályai*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1972.
32. Nyitrai J., Nagy J., *Útmutató a szerves vegyületek IUPAC-nevezéktanához*, MKE, Budapest, 1998.
33. J. Hermansson, C. von Bahr, *J. Chromatogr.* **221** (1980) 109.
34. J.A. Dale, H.S. Mosher, *J. Amer. Chem. Soc.*, **95** (1973) 512.
35. K.J. Miller, J. Gal, M.M. Ames, *J. Chromatogr.*, **307** (1984) 335.
36. T. Ishida, S.V. Bounds, J. Caldwell, *Chirality*, **7** (1995) 278.
37. H. Furakawa, E. Sakakibara, A. Kamei, K. Ito, *Chem. Pharm. Bull.*, **23** (1975) 1625.
38. H. Furakawa, I. Mori, I. Takeuchi, K. Ito, *J. Chromatogr.*, **136** (1977) 428.
39. C. Vogt, T. Jira, T. Beyrich, *Pharmazie*, **45** (1990) 691.
40. C.R. Clark, J.M. Barksdale, *Anal. Chem.*, **56** (1984) 958.
41. J.M. Barksdale, C.R. Clark, *J. Chromatogr. Sci.*, **23** (1985) 176.
42. S. Alessi-Severini, F. Jamali, F.M. Pasutto, R.T. Coutts, S. Gulamhusein, *J. Pharm. Sci.*, **79** (1990) 257.
43. G. Pflugman, H. Spahn, E. Mutschler, *J. Chromatogr.*, **416** (1987) 331.
44. H. Weber, H. Spahn, E. Mutschler, W. Mohrke, *J. Chromatogr.*, **307** (1984) 145.
45. H. Spahn, H. Weber, E. Mutschler, W. Mohrke, *J. Chromatogr.*, **310** (1984) 167.
46. H. Spahn, D. Krauss, E. Mutschler, *Pharm. Res.*, **5** (1988) 107.
47. P. Langguth, H. Spahn, H.-P. Merkle, *J. Chromatogr.*, **528** (1990) 55.
48. H. Spahn, *J. Chromatogr.*, **427** (1988) 131.
49. H. Spahn-Langguth, B. Podkowik, E. Stahl, E. Martin, E. Mutschler, *J. Anal. Toxicol.*, **15** (1991) 209.
50. H. Spahn, *Arch. Pharm.*, **321** (1988) 847.
51. H. Spahn, W. Henke, P. Langguth, J. Schloss, E. Mutschler, *Arch. Pharm.*, **323** (1990) 465.
52. G. Helmchen, W. Strubert, *Chromatographia*, **7** (1974) 713.
53. G. Gamberini, V. Ferioli, *Farmaco*, **43** (1988) 357.
54. M. Matsuoka, K. Banno, T. Sato, *J. Chromatogr. B*, **676** (1996) 117.
55. T. Toyo'oka, M. Ishibashi, T. Terao, K. Imai, *Analyst*, **118** (1993) 759.
56. T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, N. Hanioka, H. Jinno, M. Ando, K. Imai, *J. Chromatogr.*, **675** (1994) 79.
57. T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, N. Hanioka, H. Jinno, M. Ando, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.*, **8** (1994) 85.
58. T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, N. Hanioka, H. Jinno, M. Ando, *Anal. Chim. Acta*, **285** (1994) 343.
59. T. Toyo'oka, *Biomed. Chromatogr.*, **10** (1996) 265.
60. T. Yamada, S. Nonomura, H. Fujiwara, T. Miyazawa, S. Kuwata, *J. Chromatogr.*, **515** (1990) 475.
61. J. Goto, M. Hasegawa, S. Nakamura, K. Shimada, T. Nambara, *J. Chromatogr.*, **152** (1978) 413.
62. J. Goto, N. Goto, A. Hikichi, T. Nambara, *J. Liq. Chromatogr.*, **2** (1979) 1179.
63. P.A. Husian, J.E. Colbert, S.R. Sirimanne, D.G. Van Derveer, H.H. Herman, S.W. May, *Anal. Biochem.*, **178** (1989) 177.
64. E.P. Lankmayr, K.W. Budna, F. Nachtmann, *J. Chromatogr.*, **198** (1980) 471
65. I. Demian, D.F. Gripshover, *J. Chromatogr.*, **466** (1989) 415.
66. W. Lindner, C. Leitner, G. Uray, *J. Chromatogr.*, **316** (1984) 605.
67. W. Lindner, M. Rath, K. Stoschitzky, G. Uray, *J. Chromatogr.*, **487** (1989) 375.

68. M. Pugniere, H. Mattras, B. Castro, A. Previero, *J. Chromatogr.*, **767** (1997) 69.
69. K. Gamoh, H. Sawamoto, *Anal. Chim. Acta.*, **243** (1991) 251.
70. J. Kondo, T. Inaoka, N. Suzuki, T. Kawasaki, A. Nakanishi, Y. Kawahara, *Anal. Sci.*, **10** (1994) 697.
71. L. Rees, C.J. Suckling, H.C.S. Wood, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1987) 470.
72. C. Prakash, H.K. Jajoo, I.A. Blair, R.F. Mayol, *J. Chromatogr.*, **493** (1989) 325.
73. R. Mehvar, *J. Pharm. Sci.*, **78** (1989) 1035.
74. F. Li, S.F. Cooper, M. Cote, *J. Chromatogr. B*, **668** (1995) 67.
75. M. Ahnoff, S. Chen, A. Green, I. Grundevik, *J. Chromatogr.*, **506** (1990) 593.
76. R. Büshges, R. Devant, E. Mutschler, H. Spahn-Langguth, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15** (1996) 201.
77. R. Büshges, H. Linde, E. Mutschler, H. Spahn-Langguth, *J. Chromatogr. A*, **725** (1996) 323.
78. S. Einarsson, B. Josefsson, P. Möller, D. Sanchez, *Anal. Chem.*, **59** (1987) 1589.
79. A. Roux, G. Blanchot, A. Baglin, B. Flouvat, *J. Chromatogr.*, **570** (1991) 453.
80. M.T. Rosseel, A.M. Vermeulen, F.M. Belpaire, *J. Chromatogr.*, **568** (1991) 239.
81. D.T. Witte, M. Ahnoff, K.-E. Karlsson, J.-P. Franke, R.A. de Zeeuw, *J. Chromatogr.*, **641** (1993) 39.
82. E. Okuma, H. Abe, *J. Chromatogr. B*, **660** (1994) 243.
83. C. Boursier-Neyret, A. Baune, P. Klippert, I. Castagne, C. Sauveur, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11** (1993) 1161.
84. W.H. Pirkle, M.S. Hoekstra, *J. Org. Chem.*, **39** (1974) 3904.
85. A. Darmon, J.P. Thenot, *J. Chromatogr.*, **374** (1986) 321.
86. Y. Gietl, H. Spahn, E. Mutschler, *J. Chromatogr.*, **426** (1988) 305.
87. M. Piquette-Miller, R.T. Foster, F.M. Pasutto, F. Jamali, *J. Chromatogr.*, **526** (1990) 129.
88. D.S. Dunlop, A. Neidle, *Anal. Biochem.*, **615** (1987) 38.
89. F.J. Belas, M.A. Phillips, N.R. Srinivas, R.H. Barbhuiya, I.A. Blair, *Biomed. Chromatogr.*, **9** (1995) 140.
90. M. Hoshino, K. Yajima, Y. Suzuki, A. Okahira, *J. Chromatogr. B*, **661** (1994) 281.
91. A.L. Peyton, R. Carpenter, K. Rutkowski, *Pharm. Res.*, **8** (1991) 1528.
92. M. Piquette-Miller, F. Jamali, *Pharm. Res.*, **10** (1993) 294.
93. R. Mehvar, *J. Chromatogr.*, **527** (1990) 79.
94. G. Pflugmann, H. Spahn, E. Mutschler, *J. Chromatogr.*, **421** (1987) 161.
95. S. Laganière, E. Kwong, D.D. Shen, *J. Chromatogr.*, **488** (1989) 407.
96. A.A. Gulaid, G.W. Houghton, A.R. Boobis, *J. Chromatogr.*, **318** (1985) 393.
97. S.K. Chin, A.C. Hui, K.M. Giacomini, *J. Chromatogr.*, **489** (1989) 438.
98. H.G. Schaefer, H. Spahn, L.M. Lopez, H. Derendorf, *J. Chromatogr.*, **527** (1990) 351.
99. J. Maibaum, *J. Chromatogr.*, **436** (1988) 269.
100. L. Olsen, K. Brønnum-Hansen, P. Helboe, G.H. Jørgensen, S. Kryger, *J. Chromatogr.*, **636** (1993) 231.
101. Y. Zhou, Z. Sun, *Yaoxue Xuebao*, **26** (1991) 701.
102. E. Martin, K. Quinke, H. Spahn, E. Mutschler, *Chirality*, **1** (1989) 223.
103. N. Nimura, H. Ogura, T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, **202** (1980) 375.
104. T. Kinoshita, Y. Kasahara, N. Nimura, *J. Chromatogr.*, **210** (1981) 77.
105. N. Nimura, Y. Kasahara, T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, **213** (1981) 327.
106. N. Nimura, A. Toyama, T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, **316** (1984) 547.
107. R. Hasegawa, M. Murai-Kushiya, T. Komuro, T. Kimura, *J. Chromatogr.*, **494** (1989) 381.
108. Z. Tian, T. Hrinyo-Pavlina, R.W. Roeske, *J. Chromatogr.*, **541** (1991) 297.
109. J. Gal, D.M. Desai, S. Meyer-Lehnert, *Chirality*, **2** (1990) 43.

110. A.J. Sedman, J. Gal, *J. Chromatogr.*, **278** (1983) 199.
111. K.J. Miller, J. Gal, M.M. Ames, *J. Chromatogr.*, **307** (1984) 335.
112. M. Lobell, M.P. Schneider, *J. Chromatogr.*, **633** (1993) 287.
113. J. Gal, A.J. Sedman, *J. Chromatogr.*, **314** (1984) 275.
114. T. Nambara, S. Ikegawa, M. Hasegawa, J. Goto, *Anal. Chim. Acta*, **101** (1978) 111.
115. D.M. Desai, J. Gal, *J. Chromatogr.*, **579** (1992) 165.
116. T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, *Analyst*, **120** (1995) 385.
117. T. Toyo'oka, T. Suzuki, T. Watanabe, Y.-M. Liu, *Anal. Sci.*, **12** (1996) 779.
118. T. Suzuki, T. Watanabe, T. Toyo'oka, *Anal. Chim. Acta*, **352** (1997) 357.
119. Y.-M. Liu, J.-R. Miao, T. Toyo'oka, *Anal. Chim. Acta*, **314** (1995) 169.
120. T. Toyo'oka, Y.-M. Liu, *J. Chromatogr. A*, **689** (1995) 23.
121. Y.-M. Liu, T. Toyo'oka, *Chromatographia*, **40** (1995) 645.
122. O.P. Kleidernigg, K. Posch, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, **729** (1996) 33.
123. O.P. Kleidernigg, W. Lindner, *Chromatographia*, **44** (1997) 465.
124. P. Marfey, *Carlsberg Res. Commun.*, **49** (1984) 91.
125. H. Brückner, C. Gah, *J. Chromatogr.*, **555** (1991) 81.
126. Gy. Szókán, G. Mező, F. Hudecz, *J. Chromatogr.*, **444** (1988) 115.
127. Gy. Szókán, G. Mező, F. Hudecz, Zs. Majer, I. Schön, O. Nyéki, T. Szirtes, R. Dölling, *J. Liq. Chromatogr.*, **12** (1984) 2855.
128. H. Brückner, B. Strecker, *J. Chromatogr.*, **627** (1992) 97.
129. H. Brückner, S. Zivny, *Amino Acids*, **4** (1993) 157.
130. H. Brückner, C. Keller-Hochl, *Chromatographia*, **30** (1990) 81.
131. Gy. Szókán, S. Hadfi, K. Krizsán, A. Limbeck, I. Krecz, M. Almás, Cs. Somlai, *J. Liq. Chromatogr.*, **17** (1994) 2759.
132. Gy. Szókán, Zs. Majer, E. Kollát, M. Kajtár, M. Hollósi, M. Peredy-Kajtár, *J. Liq. Chromatogr.*, **18** (1995) 941.
133. H. Brückner, M. Leitenberger, *Chromatographia*, **42** (1996) 683.
134. K. Fujii, Y. Ikai, T. Mayumi, H. Oka, M. Suzuki, K.-i. Harada, *Anal. Chem.* **69** (1997) 3346.
135. K. Fujii, Y. Ikai, T. Mayumi, H. Oka, M. Suzuki, K.-i. Harada, *Anal. Chem.* **69** (1997) 5146.
136. K.-i. Harada, A. Matsui, Y. Shimizu, R. Ikemoto, K. Fujii, *J. Chromatogr.*, **921** (2001) 187.
137. A. Scaloni, M. Simmaco, F. Bossa, *Amino Acids*, **8** (1995) 305.
138. A. Duchateau, M. Crombach, J. Kamphuis, W.J.H. Boesten, H.E. Schoemaker, E.M. Meijer, *J. Chromatogr.*, **471** (1989) 263.
139. H. Brückner, R. Wittner, H. Godel, *J. Chromatogr.*, **476** (1989) 73.
140. D.M. Desai, J. Gal, *J. Chromatogr.*, **629** (1993) 215.
141. M.R. Euerby, L.Z. Partridge, P. Rajani, *J. Chromatogr.*, **447** (1988) 392.
142. M.R. Euerby, P.B. Nunn, L.Z. Partridge, *J. Chromatogr.*, **466** (1989) 407.
143. R.H. Buck, K. Krummen, *J. Chromatogr.*, **315** (1984) 279.
144. H. Brückner, P. Jack, M. Langer, H. Godel, *Amino Acids*, **2** (1992) 271.
145. H. Brückner, R. Wittner, H. Godel, *Chromatographia*, **32** (1991) 383.
146. A. Jegorov, V. Matha, T. Trnka, M. Cerny, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **13** (1990) 718.
147. A. Jegorov, J. Triska, T. Trnka, M. Cerny, *J. Chromatogr.*, **434** (1988) 417.
148. S. Einarsson, S. Folestadt, B. Josefsson, *J. Liq. Chromatogr.*, **10** (1987) 1589.
149. D.M. Jonsson, A. Reuter, J.M. Collins, G.F. Thompson, *J. Pharm. Sci.*, **68** (1979) 112.
150. S. Görög, B. Herényi, M. Löw, *J. Chromatogr.*, **353** (1986) 417.
151. L. Ladányi, I. Sztruhár, P. Slégel, G. V.-Donáth, *Chromatographia*, **22** (1987) 477.

152. H. Nishi, K. Yamasaki, Y. Kokusenya, T. Sato, *J. Chromatogr. A*, **672** (1994) 125.
153. H. Spahn, *J. Chromatogr.*, **423** (1987) 334.
154. H. Spahn, I. Spahn, *J. Chromatogr.*, **433** (1988) 331.
155. P.J. Hayball, J.G. Tamblyn, Y. Holden, J. Wrobel, *Chirality*, **5** (1993) 31.
156. C.R. Noe, J. Freissmuth, D. Rothley, B. Lachmann, P. Richter, *Pharmazie*, **51** (1966) 868.
157. D. Valentin, K.K. Chan, C.G. Scott, K.K. Johnson, K.K. Toth, G. Saucy, *J. Org. Chem.*, **41** (1976) 62.
158. H. Spahn, P. Langguth, *Pharm Res.*, **7** (1990) 1262.
159. S. Mayer, E. Mutschler, H. Spahn-Langguth, *Chirality*, **3** (1991) 35.
160. B. Liebmann, S. Mayer, E. Mutschler, H. Spahn-Langguth, *Drug Res.*, **42** (1992) 1354.
161. J. Goto, N. Goto, T. Nambara, *J. Chromatogr.*, **239** (1982) 559.
162. H. Nagashima, Y. Tanaka, H. Watanabe, R. Hayashi, K. Kawada, *Chem. Pharm. Bull.*, **32** (1984) 251.
163. S.C Tan, S.H.D. Jackson, G.G. Swift, A.J. Hutt, *Chromatographia*, **46** (1997) 23.
164. R. Mehvar, F. Jamali, F.M. Pasutto, *Clin. Chem.*, **34** (1988) 493.
165. K. Kwaki, T. Bunin, Y. Kameda, M. Yamazaki, *J. Chromatogr.*, **662** (1994) 87.
166. J. Kondo, N. Suzuki, H. Naganuma, T. Imaoka, T. Kawasaki, A. Nakanashi, Y. Kawahara, *Biomed. Chromatogr.*, **8** (1994) 170.
167. T. Toyo'oka, M. Ishibashi, T. Terao, *J. Chromatogr.*, **627** (1992) 75.
168. T. Toyo'oka, M. Ishibashi, T. Terao, *Anal. Chim. Acta*, **278** (1993) 71.
169. T. Toyo'oka, M. Ishibashi, T. Terao, *Analyst*, **117** (1992) 727.
170. D. Pecanac, W.R.G. Baeyens, V. Imai, A. Van Overbeke, G. Van der Weken, C. De Waele, *Biomed. Chromatogr.*, **11** (1997) 83.
171. Al-Kindy T. Santa, T. Fukushima, K. Homma, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.*, **11** (1997) 137.
172. S. Mayer, E. Mutschler, H. Spahn-Langguth, *Chirality*, **3** (1991) 35.
173. K. Shimada, F. Xie, T. Niwa, T. Wakasawa, T. Nambara, *J. Chromatogr.*, **400** (1987) 215.
174. T. Toyo'oka, M. Takahashi, A. Suzuki, Y. Ishii, *Biomed. Chromatogr.*, **9** (1995) 162.
175. Y. Yasaka, T. Matsumoto, M. Tanaka, *Anal. Sci.*, **11** (1995) 295.
176. L.S. Ettre, *Chromatographia*, **8** (1975) 291.
177. L. Szepesy, K. Lakszner, L. Podmaniczky, *Periodica Polytechnica, Chem. Eng.*, **24** (1980) 139.
178. Szabó L., *PhD Értekezés*, ELTE, TTK, 2000.
179. J.A. Perry, J.D. Rateike, T.J. Szczerba, *J. Chromatogr.*, **389** (1987) 57.
180. V. Erspamer, P. Melchiorri, G. Falconieri Erspamer, L. Negri, R. Corsi, C. Severeini, D. Barra, M. Simacco, G. Kreil, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, (1989) 5188.
181. G. Kreil, D. Barra, M. Simmaco, V. Erspamer, G. Falkioneri Erspamer, L. Negri, C. Severin, R. Corsi, P. Melchiorri, *Eur. J. Pharm.*, **162**, (1989) 123.
182. P.C. Montecucchi, R. de Castiglione, S. Piani, L. Gozzini, V. Erspamer, *Int. J. Pept. Protein Res.*, (1981) 275.
183. J. Hughes, T.W. Smith, H.W. Kosterlitz, L.A. Fothergill, B.A. Morgan, H.R. Moris, *Nature*, **258**, (1975) 577.
184. P.W. Schiller, T.M.-D. Nguyen, G. Weltrowska, B.C. Wilkes, B.J. Marsden, C. Lemieux, N.N. Chung, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, (1992) 11871.
185. J. Zadina, L. Hackler, L.-J. Gee, A.J. Kastin, *Nature*, **386** (1997) 499.
186. L.R. Sousa, G.D.Y. Sogah, D.H. Hoffmann, D.J. Cram, *J. Amer. Chem. Soc.*, **100** (1978) 4569.
187. G.D.Y. Sogah, D.J. Cram, *J. Amer. Chem. Soc.*, **101** (1979) 3035.
188. T. Shinbo, T. Yamaguchi, K. Nishimura, M. Sigiura, *J. Chromatogr.*, **405** (1987) 145.

189. T. Shinbo, T. Yamaguchi, H. Yanagishita, D. Kitamoto, K. Sakaki, M. Sigiura, *J. Chromatogr.*, **625** (1992) 101.
190. J.-P. Jolly, N. Moll, *J. Chromatogr.*, **521** (1990) 134.
191. J.-P. Jolly, B. Gross, *Tetrahedron Lett.*, **30** (1989) 4231.
192. P.M. Udvarhelyi, D.C. Sunter, J.C. Watkins, *J. Chromatogr.*, **519** (1990) 69.
193. S. Motellier, I.W. Wainer, *J. Chromatogr.*, **516** (1990) 365.
194. B. Esquivel, L. Nicholson, L. Peerey, M. Fazio, *HRC, J. High Resolut. Chromatogr.*, **14** (1991) 816.
195. M. Hilton, D.W. Armstrong, *J. Liquid Chromatogr.*, **14** (1991) 9.
196. M. Hilton, D.W. Armstrong, *J. Liquid Chromatogr.*, **14** (1991) 3673.
197. H.Y. Aboul-Einen, S.A. Bakr, M.R. Islam, R. Rothschild, *J. Liquid Chromatogr.*, **14** (1991) 3475.
198. J. Zukowski, M. Pawlowska, M. Pietraszkiewicz, *Chromatographia*, **32** (1991) 82.
199. M. Okamoto, K.-I. Takahashi, T. Doi, *J. Chromatogr.*, **675** (1994) 244.
200. B. Kersten, *J. Liquid Chromatogr.*, **17** (1994) 33.
201. S. Lin, N.J. Maddox, *J. Liquid Chromatogr.*, **18** (1995) 1947.
202. W. Lee, C.Y. Hong, *J. Chromatogr.*, **879** (2000) 113.
203. Y. Machida, H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, *J. Chromatogr.*, **805** (1998) 85.
204. Y. Machida, H. Nishi, K. Nakamura, *J. Chromatogr.*, **810** (1998) 33.
205. Y. Machida, H. Nishi, K. Nakamura, *J. Chromatogr.*, **830** (1999) 311.
206. M.H. Hyun, J.S. Jin, W. Lee, *J. Chromatogr.*, **822** (1998) 155.
207. M.H. Hyun, J.S. Jin, H.J. Koo, W. Lee, *J. Chromatogr.*, **837** (1999) 75.
208. M.H. Hyun, S.C. Han, J.S. Jin, W. Lee, *Chromatographia*, **52** (2000) 473.
209. J.S. Jin, A.M. Stulcap, M.H. Hyun, *J. Chromatogr.*, **933** (2001) 83.
210. M.H. Hyun, J.S. Jin, S.C. Han, Y.J. Cho, *Microchem. J.*, **70** (2001) 205.
211. M.H. Hyun, S.C. Han, B.H. Lipshutz, Y.-J. Shin, C.J. Welch, *J. Chromatogr.*, **910** (2001) 359.
212. M.H. Hyun, S.C. Han, B.H. Lipshutz, Y.-J. Shin, C.J. Welch, *J. Chromatogr.*, **959** (2002) 75.
213. R.J. Stefeck, Y. Zelochonok, K.H. Gahm, *J. Chromatogr.*, **947** (2002) 301.
214. D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, J.R. Chen, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 1473.
215. D.W. Armstrong, Y. Zhou, *J. Liquid Chromatogr.*, **17** (1994) 1695.
216. D.W. Armstrong, K.L. Rundlett, *J. Liquid Chromatogr.*, **18** (1998) 3659.
217. U.B. Nair, S.S.C. Chang, D.W. Armstrong, Y.Y. Rawjee, D.S. Eggleston, J.V. McArdle, *Chirality*, **8** (1996) 590.
218. D.W. Armstrong, Y. Liu, K.H. Ekborg-Ott, *Chirality*, **7** (1995) 474.
219. A. Berthod, Y. Liu, C. Bagwill, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, **731** (1996) 123.
220. M.P. Gasper, A. Berthod, U.B. Nair, D.W. Armstrong, *Anal. Chem.*, **68** (1996) 2501.
221. D.W. Armstrong, M.P. Gasper, K.L. Rundlett, *J. Chromatogr. A*, **689** (1995) 285.
222. K.H. Ekborg-Ott, Y. Liu, D.W. Armstrong, *Chirality*, **10** (1998) 434.
223. K.H. Ekborg-Ott, X. Wang, D.W. Armstrong, *Microchem. J.*, **62** (1999) 26.
224. K.H. Ekborg-Ott, J.P. Kullman, X. Wang, K. Gahn, L. He, D.W. Armstrong, *Chirality*, **10** (1998) 627.
225. A. Berthod, X. Chen, J.P. Kullman, D.W. Armstrong, F. Gasparrini, I. D'Acquarica, C. Villani, *Anal. Chem.*, **72** (2000) 1767.
226. I. D'Acquarica, F. Gasparrini, D. Misiti, G. Zappia, C. Cimarelli, G. Palmieri, A. Carotti, S. Cellamare, C. Villani, *Tetrahedron: Asymmetry*, **11** (2000) 2375.
227. H. Reinhard, B. Zimmerli, *J. Chromatogr. A*, **862** (1999) 147.

228. A.S. Carter-Finch, N.W. Smith, *J. Chromatogr. A.*, **848** (1999) 375.
229. H.Y. Aboul Einen, V. Serginese, *J. Liquid Chromatogr.*, **22** (1999) 2177.
230. E. Tesarova, K. Zaruba, M. Flieger, *J. Chromatogr. A*, **844** (1999) 137.
231. E. Tesarova, Z. Boskova, V. Pecakova, *J. Chromatogr. A*, **838** (1999) 121.
232. H.Y. Abul-Enein, I. Ali, *Chromatographia*, **52** (2000) 679.
233. F. Gasparrini, I. D'Acquarica, J.G. Vos C.M. O'Connor, C. Villani, *Tetrahedron: Asymmetry*, **11** (2000) 3535.
234. E. Tesarova, Z. Boskova, I. Zuskova, *J. Chromatogr. A*, **879** (2000) 147.
235. M. Schlauch, A.W. Frahm, *J. Chromatogr. A*, **868** (2000) 197.
236. K. Petritis, A. Valleix, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A*, **913** (2001) 331.
237. P. Jandera, M. Skavrada, K. Klemmova V. Bačkovská, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **917** (2001) 123.
238. P. Jandera, V. Bačkovska, A. Felinger, *J. Chromatogr. A*, **919** (2001) 67.
239. E. Peyrin, A. Ravel, C. Grosset, A. Villet, C. Ravelet, E. Nicolle, J. Alary, *Chromatographia*, **53** (2001) 645.
240. E. Peyrin, C. Ravelet, E. Nicolle, A. Villet, C. Grosset, A. Ravel J. Alary, *J. Chromatogr. A*, **923** (2001) 37.
241. E. Carlsson, H. Wikström, P.K. Owens, *Chromatographia*, **53** (2001) 419.
242. M. Schlauch, O. Kos, A.W. Frahm, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **27** (2002) 409.
243. J. Aires-de-Sousa, J. Gasteiger, *J. Mol. Graphics and Modelling*, **20** (2002) 373.
244. C.M. Courderot, F.X. Perrin, Y.C. Guillaume, T.T. Troung, J. Millet, M. Thomassin, J.P. Chaumont, L. Nicod, *Anal. Chim. Acta*, **457** (2002) 149.
245. T.L. Xiao, B. Zhang, J.T. Lee, F. Hui, D.W. Armstrong, *J. Liquid Chromatogr.*, **24** (2001) 2673.
246. P.K. Owens, L.A. Svensson, J. Vessman, *J. Pharmaceut. Biomed*, **25** (2001) 453.
247. Y.C. Guillaume, T.T. Truong, J. Millet, L. Nicod, C. Guinchard, J.F. Robert, M. Thomassin, *Chromatographia*, **55** (2002) 143.
248. D.W. Armstrong, S. Chen, C.D. Chang, S.C. Chang, *J. Liquid. Chromatogr.*, **15** (1992) 545.
249. S.C. Chang, G.L. Reid III, S. Chen, C.D. Chang, D.W. Armstrong, *Trends Anal. Chem.*, **12** (1993) 144.
250. K. Nieto, H.R. Perkins, *Biochem. J.*, **123** (1971) 789.
251. D.L. Boger, Y. Nomoto, B.R. Teegarden, *J. Org. Chem.*, **58** (1993) 1425.
252. J.L. Anderson, J. Ding, T. Welton, D.W. Armstrong, *J. Amer. Chem. Soc.*, **124** (2002) 14247.
253. H.C. Kolb, P.G. Andersson, K.B. Sharpless, *J. Amer. Chem. Soc.*, **116** (1994) 1287.
254. K. Kacprzak, J. Gawrowski, *Synthesis*, (2001) 961.
255. M. Bartók, K. Felföldi, B. Török, T. Bartók, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1998) 2605.
256. B. Török, K. Balázsik, K. Felföldi, M. Bartók, *Ultrason Sonochem.*, **8** (2001) 191.
257. C. Pettersson, *J. Chromatogr.*, **316** (1984) 553.
258. C. Pettersson, G. Schill, *J. Liquid Chromatogr.*, **9** (1986) 269.
259. A. Karlsson, C. Pettersson, *Chirality*, **4** (1992) 323.
260. C. Rosini, P. Altemura, D. Pini, C. Bertucci, G. Zullino, P. Salvadori, *J. Chromatogr.*, **348** (1985) 79.
261. C. Pettersson, C. Gioeli, *J. Chromatogr.*, **398** (1987) 247.
262. C. Rosini, C. Bertucci, D. Pini, P. Altemura, P. Salvadori, *Chromatographia*, **24** (1987) 671.
263. H.W. Sturman, J. Köhler, G. Schomburg, *Chromatographia*, **25** (1988) 265.
264. C. Coors, R. Matusch, *Arch. Pharm.*, **322** (1989) 817.

265. R. Mathur, S. Bohra, C.K. Narang, N.K. Mathur, *J. Liquid Chromatogr.*, **15** (1992) 573.
266. P.N. Nesterenko, V.V. Krotov, S.M. Staroverov, *J. Chromatogr.*, **667** (1994) 19.
267. W. Lindner, M. Lämmerhofer, N.M. Maier, *PCT/EP97/02888*, 1997.
268. M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, **741** (1996) 33.
269. A. Mandl, L. Nicoletti, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, **858** (1999) 1.
270. E. Zarbl, M. Lämmerhofer, F. Hammerschmidt, F. Wuggenig, M. Hanbauer, N.M. Maier, L. Sajovic, W. Lindner, *Anal. Chim. Acta*, **404** (2000) 169.
271. N.M. Maier, L. Nicoletti, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *Chirality*, **11** (1999) 522.
272. M. Lämmerhofer, F. Svec, J.M.J. Fréchet, W. Lindner, *Anal. Chem.*, **72** (2000) 4623.
273. M. Lämmerhofer, E.C. Peters, C. Yu, F. Svec, J.M.J. Fréchet, W. Lindner, *Anal. Chem.*, **72** (2000) 4614.
274. M. Lämmerhofer, F. Svec, J.M.J. Fréchet, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, **925** (2001) 265.
275. J. Szejtli, *Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982.
276. *Cyclobond Chiral Separations*, Advanced Separation Technologies Inc., Whippany, NJ, USA, 1999.
277. A. Tchaplá, S. Heron, H. Colin, G. Guiochon, *Anal. Chem.*, **60** (1988) 1443.
278. L.A. Cole, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.*, **64** (1992) 1317.
279. L.A. Cole, J.G. Dorsey, K.A. Dill, *Anal. Chem.*, **64** (1992) 1324.
280. H.K. Lee, N.E. Hoffmann, *J. Chromatogr. Sci.*, **32** (1994) 97.
281. H. Chen, Cs. Horvath, *J. Chromatogr. A*, **705** (1995) 3.
282. P.L. Zhu, J.W. Dolan, L.R. Snyder, N.M. Djordjevic, D.W. Hill, J.T. Lin, L.C. Sander, L.V. Heukelem, *J. Chromatogr. A*, **756** (1996) 63.
283. J. Li, P.W. Carr, *Anal. Chem.*, **69** (1997) 3884.
284. J. Li, *Anal. Chim. Acta*, **369** (1998) 21.
285. C.S. Lee, W.J. Cheong, *J. Chromatogr. A*, **848** (1999) 9.
286. J.W. Dolan, L.R. Snyder, T. Blanc, L. Van Heukelem, *J. Chromatogr. A*, **897** (2000) 37.
287. J.W. Dolan, L.R. Snyder, T. Blanc, *J. Chromatogr. A*, **897** (2000) 51.
288. D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, **902** (2000) 311.
289. C.B. Castells, P.W. Carr, *Chromatographia*, **52** (2000) 535.
290. H.J. Issaq, M.L. Glennon, D.E. Weiss, S.D. Fox, *High Performance Liquid Chromatography using  $\beta$ -cyclodextrin bonded silica column: Effect of temperature on retention*, in W.L. Hinze, D.W. Armstrong (Editors) *Ordered media*, Chemical Separation, ACS Sym. Series, **342** (1987) 260.
291. J. Hermansson, *Trends Anal. Chem.*, **8** (1989) 251.
292. R.J. Smith, D.R. Taylor, S.M. Wilkins, *J. Chromatogr. A*, **697** (1995) 591.
293. B. Sellergren, K.J. Shea, *J. Chromatogr. A*, **690** (1995) 29.
294. T. Takagi, T. Suzuki, *J. Chromatogr. A*, **625** (1992) 163.
295. W.H. Pirkle, P.G. Murray, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **16** (1993) 285.
296. W.H. Pirkle, J.A. Burke, *J. Chromatogr. A*, **557** (1991) 173.
297. C.B. Castells, P.W. Carr, *Chromatographia*, **52** (2000) 535.
298. F. Wang, T. O'Brien, T. Dowling, G. Bicker, J. Wyvratt, *J. Chromatogr. A*, **958** (2002) 69.
299. J. Kobayashi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano, *J. Chromatogr. A*, **958** (2002) 109.
300. W.R. Oberleitner, N.M. Maier, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, **960** (2002) 97.
301. K.B. Sentell, J.G. Dorsey, *J. Liquid Chromatogr.*, **11** (1988) 1875.
302. P. Jandera, H. Colin, G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, **248** (1982) 325.
303. T. Fornstedt, P. Sajonz, G. Guiochon, *J. Amer. Chem. Soc.*, **119** (1997) 1254.
304. T. Fornstedt, G. Götmar, M. Andersson, G. Guiochon, *J. Amer. Chem. Soc.*, **121** (1999) 1664.

305. G. Götmar, T. Fornstedt, G. Guiochon, *Chirality*, **12** (2000) 558.
306. V. Schurig, M. Juza, *J. Chromatogr. A*, **757** (1997) 119.
307. I. Španik, J. Krupčik, V. Schurig, *J. Chromatogr.*, **843** (1999) 123.
308. V. Schurig, *J. Chromatogr. A*, **906** (2001) 275.
309. J. Leffler, E. Grunwald, *Rates, Equilibria in Organic Reactions*. Wiley, New York, 1963.
310. W. Melander, D.E. Campbell, C. Horvath, *J. Chromatogr.*, **158** (1978) 215.
311. B. Koppenhoefer, E. Bayer, *Chromatographia*, **19** (1984) 123.
312. H.M.J. Boots, P.K. de Bokx, *J. Phys. Chem.*, **93** (1989) 8240.
313. R.R. Krug, W.G. Hunter, R.A. Gieger, *J. Phys. Chem.*, **80** (1976) 2335.
314. R.R. Krug, W.G. Hunter, R.A. Gieger, *J. Phys. Chem.*, **80** (1976) 2341.
315. K. Saigo, H. Koda, H. Nohira, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **52** (1979) 3119.
316. F. Brion, C. Marie, P. Mackiewicz, J. M. Roul, J. Buendia, *Tetrahedron. Lett.*, **33** (1992) 4889.
317. Y. Hayashi, J.J. Rhode, E.J. Corey, *J. Amer. Chem. Soc.*, **118** (1996) 5502.
318. B. Vanderplas, C.V. Murtishaw, T. Sinay, F. Urban, *Org. Prep. Proc. Int.*, **24** (1992) 685.
319. F. Fülöp, Z. Szakonyi, G. Bernáth, P. Sohár, *J. Heterocyclic Chem.*, **69** (1998) 349.
320. C. Saotome, M. Ono, H. Akita, *Tetrahedron: Asymmetry*, **11** (2000) 4137.
321. S. Barrett, P.O'Brien, H.C. Steffens, T.D. Towers, M. Voith, *Tetrahedron*, **56** (2000) 9633.
322. F. Fülöp, G. Bernáth, K. Pihlaja, *Adv. Heterocyclic Chem.*, **69** (1998) 349.
323. M. Péter, J. Van der Eycken, G. Bernáth, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry*, **9** (1998) 2339.
324. Y. Okamoto, Y. Kaida, *J. Chromatogr. A*, **666** (1994) 403.
325. E. Yashima, Y. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **68** (1995) 3289.
326. C. Cachau, A. Thienpont, M.-H. Soulard, G. Félix, *Chromatographia*, **44** (1997) 411.
327. D.J. Curran, S. Siggia, *The Chemistry of the Cyano Group*, Z. Rapport, Ed., Interscience, London, UK, 1970.
328. K. Faber, *Biotransformation in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1992.
329. E. Forró, K. Lundell, L.T. Kanerva, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry*, **8** (1997) 3095.
330. V. Davankov, S. Rogozhin, A. Semechkin, T. Sachkova, *J. Chromatogr.*, **82** (1973) 359.
331. V. Davankov, in J.C. Giddings, E. Grushka, J. Cazes, D.R. Brown, *Adv. Chromatogr.*, **18** (1980) 139-95. Marcel Dekker, New York, Vol. 18.
332. K. Günther, J. Martens, M. Schikedanz, *Angew. Chem.*, **96** (1984) 514; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **23** (1984) 506.
333. K. Günther, J. Martens, M. Schikedanz, *Naturwissenschaften*, **72** (1985) 149.
334. U.A.Th. Brinkman, D.K. Kamminga, *J. Chromatogr.*, **330** (1985) 375.
335. K. Günther, J. Martens, M. Schikedanz, *Angew. Chem.*, **98** (1986) 284; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **25** (1986) 278.
336. L.K. Gont, S.K. Neuendorf, *J. Chromatogr.*, **391** (1987) 343.
337. K. Günther, M. Schikedanz, K. Drautz, J. Martens, *Z. Anal. Chem.*, **325** (1986) 297.
338. H. Brückner, *Chromatographia*, **24** (1987) 725.
339. B.K. Vriesma, W. ten Hoeve, H. Weinberg, R.M. Kellog, *Tetrahedron Lett.*, **26** (1986) 2045.
340. R. Rausch, *Recent Advances of Thin-Layer Chromatography*, in F.A.A. Dallas, H. Read, R.J. Raune, I.D. Wilson (eds), Proceedings of the Chromatographic Society International Symposium on Thin Layer Chromatography, 1987, Plenum Press, New York, 1988, p.151.
341. K. Günther, J. Martens, M. Schikedanz, *Z. Anal. Chem.*, **322** (1985) 513.
342. K. Günther, J. Martens, M. Schikedanz, *Arch. Pharm.*, **319** (1986) 461.
343. K. Günther, J. Martens, M. Schikedanz, *Arch. Pharm.*, **319** (1986) 572.

344. G. Tóth, M. Lebl, V.J. Hruby, *J. Chromatogr.*, **504** (1990) 450.
345. Sz. Nyiredy, K. Dallenbach-Toelke, D. Sicher, *J. Chromatogr.*, **450** (1988) 241.
346. K. Günther, *J. Chromatogr.*, **448** (1988) 11.
347. M. Mack, H.E. Hauck, *Chromatographia*, **26** (1988) 197.
348. J. Martens, R. Bhushan, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **34** (1989) 433.
349. W.S. Hancock, *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. I,II., CRC Press, Boca Raton, Fl., 1984.
350. R.K. Scope, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, 1993.
351. C.T. Mant, R.S. Hodges, *HPLC of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl, 1991.
352. C.H.W. Firs, W.H. Stein, S. Moore, *J. Biol. Chem.*, **211** (1954) 941.
353. C.W. Gehrke, L.L. Wall, J.S. Abheer, F.E. Kaiser, R.W. Zumwalt, in R.W. Zumwalt, K.C.T. Kuo, C.W. Gehrke (Eds), *Amino Acid Analysis by Gas Chromatography*, Vol. I, CRC Press, Boca Raton, 1987.
354. S.-T. Chen, S.-H. Chiou, Y.-H. Chu, K.-T. Wang, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **30** (1987) 572.
355. H.-W. Lahn, W. Lergier, M. Manneberg, R. Knorr, *J. Protein Chem.*, **7** (1988) 258.
356. C. Woodward, L.B. Gilman, W.G. Engelhart, *Int. Lab.*, (1990) 40.
357. H.-M. Yu, S.-T. Chen, S.-H. Chiou, K.-T. Wang, *J. Chromatogr.*, **456** (1988) 357.
358. I. Abe, S. Kuramoto, in R.W. Zumwalt, K.C.T. Kuo, C.W. Gehrke (Eds), *Amino Acid Analysis by Gas Chromatography*, Vol. 3, CRC Press, Boca Raton, 1987.
359. E. Gil-Av, A. Tishbee, P.E. Hare, *J. Amer. Chem. Soc.*, **102** (1980) 5115.
360. R. Liardon, S. Ledermann, V. Ott, *J. Chromatogr.*, **203** (1981) 385.
361. D.E. Benovitz, A.F. Spatola, *Peptides*, **6** (1985) 257.
362. R.P. Ambler, *Methods Enzymol.*, **25** (1972) 262.
363. P.F. Berne, S. Blanquett, J.-M. Schmitter, *J. Amer. Chem. Soc.*, **114** (1992) 2603.
364. S.J. Remington, K. Breddam, *Methods Enzymol.*, **244** (1994) 231.
365. A.K. Dua, C. Pinsky, F.S. Labella, *Life Sci.*, **37** (1985) 985.
366. K. Neubert, B. Hartrodt, I. Born, A. Barth, H.-L. Reuthrich, G. Grecksch, U. Schrader, C. Liebmann, in F. Nyberg, V. Brantl (eds),  *$\beta$ -Casomorphins and Related Peptides*, Fyris-Tryck, Uppsala, 1990.
367. B.F. Roques, F. Noble, V. Dange, M.-C. Fournie-Zaluski, A. Bleaumont, *Pharmacol. Rev.*, **45** (1993) 87.

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet mindazoknak, akik segítséget nyújtottak dolgozatom megírásához és az azt megelőző több évtizedes munkámhoz.

Hálás vagyok egykori tanszékvezetőmnek, néhai **Burger Kálmán** akadémikusnak, akinek a tanácsára kezdtem el foglalkozni kromatográfias kutatásokkal és jelenlegi tanszékvezetőmnek, **Prof. Dr. Kiss Tamásnak**, aki biztosította számomra a munkához szükséges önállóságot.

A huszadik század végének tudományos kutatómunkája egyre inkább a csoportmunka felé tolódott el. Az értekezésemben bemutatott eredmények, és az azt megalapozó közlemények, számos kutatóval végzett közös munka gyümölcse, melyen belül, a kromatográfiával kapcsolatos kutatások jelentik saját munkámat.

Kiemelten hálás vagyok **Prof. Dirk Tourwénak** és **Dr. Tóth Gézának** azért a szintetikus munkáért, amely vizsgálati alapot nyújtott kromatográfias kutatásaimhoz. A több, mint egy évtizedes szoros kutatási együttműködésünket számos, közösen elnyert pályázat is megalapozta, mely hozzájárult kutatásunk anyagi háttérének megteremtéséhez. Egyúttal szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dirk Tourwé** és **Dr. Tóth Géza** munkatársai közül **Dr. Georges Lausnak** a tömegspektrometriás analízisekért, **Dr. Richard Casimirnak**, **Dr. Marc Ceustersnek**, **Dr. Serge Devaddernek**, **Dr. Wim Van Den Nestnek**, **Dr. Els Mannekensnek**, **Dr. Darula Zsuzsának**, **Dr. Kertész Istvánnak** és **Dr. Tömböly Csabának** az aminosavak és peptidek szintézisében való részvételért.

Hálás köszönetem fejezem ki **Prof. Dr. Fülöp Ferencnek** és munkatársainak, **Prof. Dr. Bernáth Gábornak**, **Dr. Csomós Péternek**, **Dr. Forró Enikőnek**, **Dr. Kámán Juditnak**, **Dr. Lázár Lászlónak**, **Dr. Szakonyi Zsoltnak** a  $\beta$ -aminosavak, az aminoalkoholok és származékaik szintéziséért. Külön köszönöm **Dr. Péter Mária**nak a DANI reagens fejlesztésében nyújtott munkáját. Hálás köszönetet mondok **Prof. Dr. Penke Botond** akadémikusnak és munkatársainak, **Prof. Dr. Tóth Gábornak**, **Dr. Somlai Csabának** az aminosav származékok és peptidek szintézisében való közreműködésért.

Külföldi partnereim közül, köszönettel tartozom **Prof. Daniel W. Armstrongnak** és **Prof. Wolfgang Lindnernek** a munkámhoz nyújtott anyagi támogatásért és a szakmai diskuszióikért. Köszönet illeti a Solvay-Peptisyntha munkatársait, **Dr. Roland Callenst** és **Thierry Delplancht** a NIFE reagens fejlesztésében való együttműködésért. Köszönöm **Jean-Paul Mazaleyratnak** és munkatársainak **Michel Vakselmannak** és **Anna Gauschernak** az atrópiomerek terén való együttműködést, valamint **János Sápina**k és munkatársainak **J.-Y. Laronzenek** és **M. Laronzenek** a szubsztituált triptofánok terén való közös munkát. Szeretném

megköszönni **Prof. Johan Van Der Eyckennek** és **Prof. Liiza Kanervának** az aminoalkoholok enzimatisz rezolválása során való közreműködését.

Hálás köszönet illeti volt és jelenlegi PhD hallgatóimat, **Olajos Editet**, **Dr. Török Gabriellát**, **Vékes Erikát**, **Árki Anitát**, valamint **Halasiné, Varga Ilona** vegyésztechnikust, akik megbízható, pontos és áldozatos munkájukkal segítették az értekezésben foglalt kísérletek kivitelezését.

Köszönetet mondok a **Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék** mindazon munkatársainak, akik hosszabb-rövidebb időn keresztül segítettek munkámat, közülük is őszintén hálás vagyok **Dr. Dombi Andrásnak** és **Dr. Nemesné Dr. Vetéssy Zsuzsannának**, akik hasznos észrevételeikkel hozzájárultak Értekezésem megírásához.

Hálás köszönet illeti a **Szerves Kémiai Tanszék** munkatársait, **Prof. Dr. Bartók Mihály** akadémikust, **Prof. Dr. Schneider Gyulát**, **Prof. Dr. Notheisz Ferencet**, **Dr. Wölfling Jánost**, akik szakmai tanácsaikkal segítettek Értekezésem megírásában.

Kiemelt hálával tartozom az MTA Elválasztástudományi Munkabizottság által felkért előbírálóknak, **Prof. Dr. Szepesy Lászlónak** és **Prof. Dr. Idei Miklósnak**, akik Értekezésem első változatának gondos áttanulmányozását vállalva, nagy segítséget nyújtottak az Értekezés átdolgozához, a hibák javításához.

Különös hálával tartozom feleségemnek az otthoni nyugodt háttér megteremtéséért, valamint gyerekeimnek, családomnak és barátaimnak türelméért és megértéséért, mellyel hozzájárultak az értekezésem megszületéséhez.