

ENANTIOMEREK KIRÁLIS ELVÁLASZTÁSA ÉS MEGKÜLÖNBÖZTETÉSE

Ph.D. ÉRTEKEZÉS

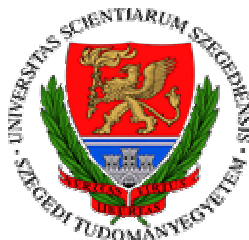
Készítette:

Berkecz Róbert

Témavezetők:

Péter Antal
egyetemi tanár

Ilisz István
egyetemi adjunktus



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

2010

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	2
AZ ÉRTEKEZÉSBEN HASZNÁLT GYAKORI RÖVIDÍTÉSEK	4
1. BEVEZETÉS	5
1.1. A KIRALITÁS ÉS A KIRÁLIS ELVÁLASZTÁSOK JELENTŐSÉGE	5
1.2. CÉLKITŰZÉS	6
2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ	7
2.1. KIRÁLIS ÁLLÓFÁZISOK.....	7
2.1.1. <i>Makrociklusos antibiotikum (glikopeptid) alapú királis állófázisok</i>	8
2.1.2. <i>Koronaéter alapú királis állófázisok</i>	15
2.1.3. <i>Ciklodextrin alapú királis állófázisok</i>	26
2.2. A HŐMÉRSÉKLET HATÁSA A KROMATOGRÁFIÁS ÉS A KIRÁLIS KROMATOGRÁFIÁS ELVÁLASZTÁSRA.....	31
2.2.1. <i>A kromatográfiás elválasztás hőmérsékletfüggése</i>	31
2.2.2. <i>A van 't Hoff egyenlet alkalmazása a kromatográfiában</i>	32
2.2.3. <i>A van 't Hoff egyenlet alkalmazása a királis kromatográfiában</i>	33
2.3. A TÖMEGSPEKTROMETRIA ALKALMAZÁSA A KIRÁLIS FELISMERÉSBEN.....	33
2.4. A β -LAKTÁM ÉS β -AMINOSAV SZÁRMAZÉKOK KÉMIAI ÉS BIOLÓGIAI JELENTŐSÉGE.....	35
3. KÍSÉRLETI RÉSZ	36
3.1. VIZSGÁLT ANYAGOK	36
3.2. FELHASZNÁLT VEGYSZEREK	41
3.3. ALKALMAZOTT BERENDEZÉSEK	42
3.4. ALKALMAZOTT FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS OSZLOPOK.	42
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	43
4.1. ELVÁLASZTÁSOK MAKROCIKLUSOS GLIKOPEPTID ÉS CIKLODEXTRIN ALAPÚ KIRÁLIS ÁLLÓFÁZISOKON	43
4.1.1. <i>A 4-Arilszubsztituált β-laktámok elválasztása Chirobiotic T és TAG állófázison</i>	43
4.1.2. <i>Kondenzált gyűrűs β-laktámok és β-aminosavak elválasztása Chirobiotic T, TAG, V, VAG és Cyclobond DMP oszlopokon</i>	49

4.2. ELVÁLASZTÁSOK KORONAÉTER ALAPÚ KIRÁLIS ÁLLÓFÁZISOKON	56
4.2.1. Aromás β^3 -aminosav enantiomerek elválasztása Korona 1 állófázison.....	56
4.2.2. Alifás és aliciklusos β^3 -aminosav enantiomerek elválasztása Korona 1 állófázison.....	64
4.2.3. Alifás és aromás β^3 -aminosav enantiomerek elválasztása Korona 2 állófázison	68
4.3. A β^3 -AMINOSAV ENANTIOMEREK KIRÁLIS TÖMEGSPEKTROMETRIÁS MEGKÜLÖNBÖZTETÉSE	73
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	80
6. SUMMARY	83
7. HIVATKOZÁSOK	86
8. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	92
8.1. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK	92
8.2. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ AZ ÉRTEKEZÉSSEN FEL NEM HASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK	93
8.3. POSZTEREK	94
8.4. ELŐADÁSOK.....	95
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	96
10. FÜGGELÉK.....	97
10.1. NÉHÁNY KIVÁLASZTOTT ARILSZUBSZTITUÁLT β -LAKTÁM KROMATOGRAMJA	97
10.2. NÉHÁNY KIVÁLASZTOTT ARIL SZUBSZTITUÁLT β^3 -AMINOSAV KROMATOGRAMJA	98
10.3. NÉHÁNY KIVÁLASZTOTT ARIL SZUBSZTITUÁLT β^2 -AMINOSAV KROMATOGRAMJA	99

Az értekezésben használt gyakori rövidítések

2-PrOH: propán-2-ol

2-BuOH: bután-2-ol

AcOH: ecetsav

CD: ciklodextrin

DMP: dimetilfenilkarbamoil- β -ciklodextrin oszlop

EtOH: etanol

KÁF: királis állófázis

Korona 1: koronaéter állófázis szabad szilanol csoportokkal

Korona 2: koronaéter állófázis szabad szilanol csoportok nélkül (endcapped)

MeCN: acetonitril

MeOH: metanol

PIM: poláris-ionos mód

POM: poláris-szerves mód

PrOH: propán-1-ol

R: ristocetin A oszlop (Chirobiotic™ R)

T: teicoplanin oszlop (Chirobiotic™ T)

TAG: teicoplanin aglikon oszlop (Chirobiotic™ TAG)

***t*-BuOH:** 2-metilpropán-2-ol

TEA: trietilamin

TEAA: trietil-ammóniumacetát

TFA: trifluorecetsav

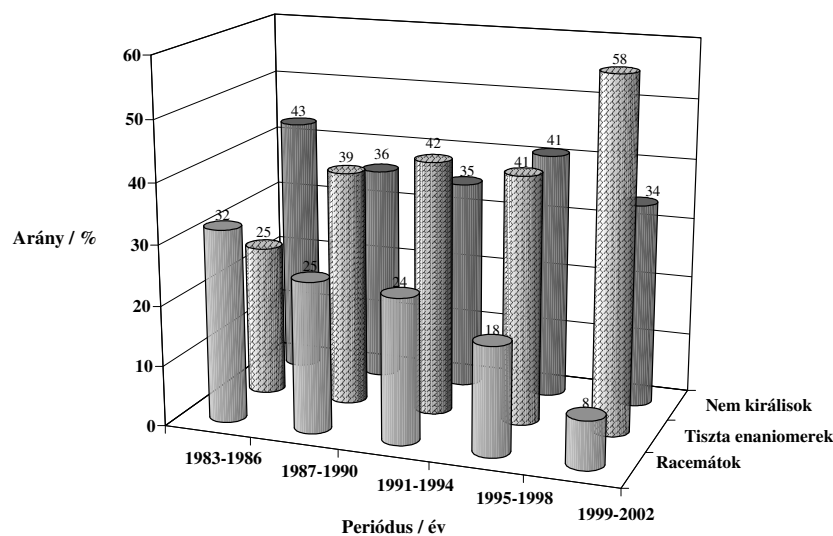
V: vankomicin oszlop (Chirobiotic™ V)

VAG: vankomicin aglikon oszlop (Chirobiotic™ VAG)

1. Bevezetés

1.1. A kiralitás és a királis elválasztások jelentősége

A kiralitás és a hozzá kapcsolódó jelenségek iránti érdeklődés az utóbbi években mind tudományos, mind gazdasági szempontból megsokszorozódott, elsősorban a biológia, az orvostudomány, a gyógyszeripar, valamint a növényvédőszer-, élelmiszer- és színezékipar támasztotta igényeknek köszönhetően. Egy 2004-es tanulmány az engedélyezett királis gyógyszerek százalékos megoszlását vizsgálta 1983-2002 között. Az eltelt 10 év alatt a racém hatóanyaggal rendelkező újonnan engedélyezett gyógyszerek száma jelentősen lecsökkent és a tiszta enantiomer formában való előállítás került előtérbe (**1. Diagram**). A tiszta enantiomert tartalmazó gyógyszerek piaci részesedése becslések szerint az 1996 évi 27 %-ról (74,4 milliárd USA \$) 2002-ben 39 %-ra nőtt elérve a 151,9 milliárd USA dollár bevételt [1].



1. Diagram. Gyógyszerek hatóanyagának kiralitás szerinti eloszlása 1983 és 2002 között

A biológiai és farmakológiai hatású anyagok nagy része királis. Az emberi szervezetben lejátszódó fizikai és kémiai folyamatok során a bejuttatott gyógyszermolekula aszimmetrikus biológiai makromolekulákkal (fehérjék, polinukleotidok, glikopeptidek) kerül kölcsönhatásba. Ez a királis környezet képes megkülönböztetni az enantiomereket is. Az enantiomerek hatástani tulajdonságai, úgymint farmakodinamikai, farmakokinetikai, lebomlási, fehérjékhez kötődési és mérgezési hatásuk gyakran eltérő [2]. 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.

Ennek következményeként a gyógyszerhatóanyag enantiomerek megkülönböztetése és elválasztása elengedhetetlen feladat. Napjainkban a jelentős piaci részesedéssel rendelkező gyógyszerek nagy része tiszta enantiomer formában törzskönyvezett, ami a királis analitika szükségességére utal [4].

1.2. Célkitűzés

Munkám során célul tűztük ki folyadékkromatográfiai módszerek fejlesztését különböző biológiai és gyógyszeripari szempontból fontos vegyületek elválasztására új fejlesztésű királis kolonnákon. Vizsgálni kívántuk:

- a) aromás β -laktám enantiomerek elválasztását makrociklusos glikopeptid alapú **Chirobiotic T** és **Chirobiotic TAG** királis állófázisokon,
- b) kondenzált gyűrűs β -laktám és β -aminosav enantiomerek elválasztását makrociklusos glikopeptid (**Chirobiotic T, TAG, V, VAG** és **R**) és ciklodextrin (**Cyclobond DMP**) oszlopokon,
- c) 3-arilszubsztituált, alifás és aliciklusos β^3 -aminosav enantiomerek folyadékkromatográfiai elválasztását (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektort tartalmazó **koronaéter** állófázison,
- d) alifás és aromás β^2 -aminosav enantiomerek elválasztását **módosított koronaéter** állófázison.

Célul tűztük ki, hogy közvetlen királis folyadékkromatográfiai elválasztások során, a vizsgált vegyületek és a királis szelektorok szerkezetének ismeretében, a kromatográfiai körülmények változtatásával befolyásoljuk az elválasztást és a kromatográfiai paraméterek változásának nyomonkövetésével értelmezni kívántuk az eluens minőségének és összetételének, a hőmérsékletnek és a vizsgált vegyületek szerkezetének hatását a királis megkülönböztetési folyamatokra.

További célunk között szerepelt Cooks kinetikai tömegspektrometriás módszer alkalmazásával aromás β^3 -aminosav enantiomerek királis megkülönböztetési mechanizmusának tanulmányozása.

2. Irodalmi összefoglaló

2.1. Királis állófázisok

Louis Pasteur 1848-ban fedezte fel, hogy a kristályos racém nátrium-ammóniumtartarát két enantiomorf alakból áll. Tíz évre rá írta le, hogy a mikroorganizmusok sokkal gyorsabban bontják a (+)-ammóniumtartarátot szemben (-)-enantiomerrel. Ez az áttörés indította el a királis vegyületek tanulmányozását és elválasztási technikájuk fejlődését. Az enantiomer elválasztási technikák több csoportra oszthatók, ennek egy lehetséges, de nem teljes, felosztása a következő:

- ✂ az enantiomorf kristályok kézi elválasztása, diasztereomer kristályosítás,
- ✂ komplex adduktum képzés optikailag aktív gazda molekulával,
- ✂ kinetikai rezolválás enzimekkel,
- ✂ közvetett kromatográfiás módszerek: diasztereomerpárok létrehozásával majd elválasztásával,
- ✂ közvetlen kromatográfiás módszerek: királis mozgófázis vagy mozgófázis adalék, illetve királis állófázis alkalmazása.

A két utóbbi módszer eltérő elválasztási mechanizmusokon alapuló technikákat jelent, úgymint gázkromatográfia (GC), folyadékkromatográfia (HPLC), kapilláris elektroforézis (CE), kapilláris elektrokromatográfia, stb. Közülük a GC és a HPLC tekinthető a legelterjedtebbnek.

Munkám során királis állófázisokat alkalmaztam, ezért a következőkben a közvetlen folyadékkromatográfiás módszereket ismertetem. Ennél a módszernél a minta közvetlenül vizsgálható. Természetesen itt is lehetséges származékképzési reakció alkalmazása, de ebben az esetben a származékképző ágens nem királis, célja további funkciócsoportok bevitele a vizsgálandó molekulába, növelve az állófázissal kialakuló kölcsönhatások számát és erősségét illetve kromofor csoportok beépítésével csökkentve a detektálás alsó határát [5].

A hárompontos, „three-point” illeszkedési modell a királis felismerésnek talán a legmegbízhatóbb és legelterjedtebb szemléltetési módja, amely *Easson* [6] és *Dalgliesh* [7] nevéhez fűződik, megteremtve a királis megkülönböztetési folyamatok értelmezésének alapját. *Dalgliesh* [7] úttörő munkájában királis Phe-származékok papírkromatográfiás elválasztását tanulmányozta, amelynek során feltételezte, hogy a királis megkülönböztetéshez legalább három kölcsönhatás kialakulása szükséges a vizsgált

enantiomerek és az állófázis között. Ezt a modellt további feltétellel bővítette *Pirkle és Pochapsky* [8], akik szerint a három szükséges kölcsönhatás közül legalább egynek sztereoselektívnek kell lennie. Ebből a megfontolásból a királis állófázist kutató és fejlesztő szakemberek igyekeznek minél több kölcsönhatás kialakítására alkalmas szelektorokat létrehozni. A teljesség igénye nélkül a leggyakrabban alkalmazott állófázis típusokat és a jellemző kölcsönhatásokat a **2.1. Táblázatban** mutatom be.

2.1. Táblázat. Fontosabb királis állófázisok csoportosítása

<i>Típus</i>	<i>Szelektor</i>	<i>Meghatározó kölcsönhatások</i>
makrociklusos antibiotikumok	antibiotikumok	elektrosztatikus, H-híd, π - π , hidrofób, sztérikus
koronaéterek	makrociklusos poliéterek	H-híd, komplex-képzés
oligoszacharidok	ciklodextrinek cellulóz-, amilóz alapúak	zárványkomplex-képzés, H-híd, sztérikus, π - π , π_{sav} - $\pi_{bázis}$
fehérje alapúak	fehérjék	hidrofób, ionos, H-híd
ligandumcserés	aminosav+fémion komplexek	komplex képzés
Pirkle-típusú („brush”)	π -elektron donor és akceptor csoportok	π - π , π_{sav} - $\pi_{bázis}$, dipól-dipól
polimer-bázisúak	szintetikus polimerek	hidrofób, sztérikus, H-híd

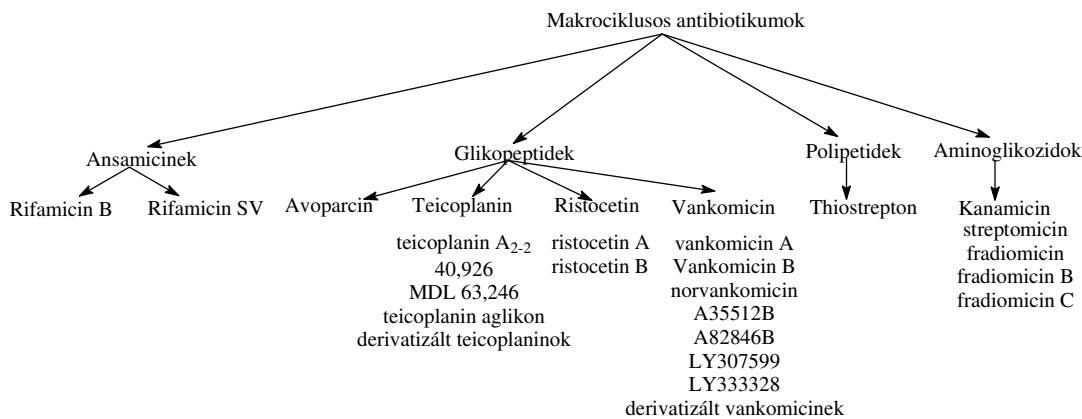
Munkám során három állófázis típusal foglalkoztam, a következőkben ezek fontosabb sajátosságait és alkalmazásait ismertetem.

2.1.1. Makrociklusos antibiotikum (glikopeptid) alapú királis állófázisok

1928-tól, a penicillin felfedezése után, azt gondolták, hogy a fenyegető fertőzéseket kézben tudják tartani. A penicillin rezisztens baktériumok megjelenése azonban felgyorsította újabb antibiotikumok kutatását és bevezetését. Természetesen a „kard-pajzs” folyamat napjainkban is tart, jelenleg a vankomicin család tagjai képviselik a „kard” szerepét [9]. Baktériumölő tulajdonságuk abban rejlik, hogy a Gramm(+) baktériumok falának D-alanil-D-alanin terminális részéhez kötődve gátolják a falépítő folyamatokat. A mechanizmus ismeretében *Armstrong* és munkatársai arra gondoltak, hogy a vankomicin sajátos királisan irányított kötődése aminosav enantiomerek elválasztására nyújthat lehetőséget. Hogy mennyire helyes volt ez a feltételezés, az a 1994-es Pittsburgh Konferencián vált nyilvánvalóvá, ugyanis akkor mutatták be először a makrociklusos glikopeptidok királis szelektorként való folyadékromatográfiás alkalmazását normál, illetve fordított fázisú kromatográfiás módban [10]. Azonos oszlopon különböző

kromatográfiás rendszerben eltérő szelektivitási értékeket kaptak, amiből más-más királis felismerési folyamatra következtettek [11,12]. Ebben a témában az elmúlt években több száz közlemény jelent meg. A makrociklusos antibiotikumok összetett szerkezetük és többféle funkciócsoportjuk révén többféle kölcsönhatás kialakítására képesek, úgymint elektrosztatikus, hidrofób-hidrofób, π - π , H-híd, poláris kölcsönhatások, sztérikus gátlás, így alkalmazhatóságuk a vegyületek széles spektrumát lefedi [13-15]. A kölcsönhatások sokféleségéből következik, hogy multimodális állófázisként alkalmazhatók, azaz normál, fordított fázisú, poláris-szerves (POM) illetve poláris-ionos (PIM) módban. A POM mozgófázisként nemvizes poláris szerves oldószer használatát jelenti, PIM esetében a nemvizes poláris szerves oldószerhez savas illetve bázisos karakterű módosítót adagolunk. [16]. Utóbbi nagy jelentőséggel bír ionizálható királis vegyületek elválasztásánál, ami az ionos kölcsönhatás meghatározó szerepével magyarázható.

Makrociklusos antibiotikumok részletes felosztása a **2.1. ábrán**, fizikai-kémiai jellemzői a **2.2. Táblázatban** találhatóak [17].

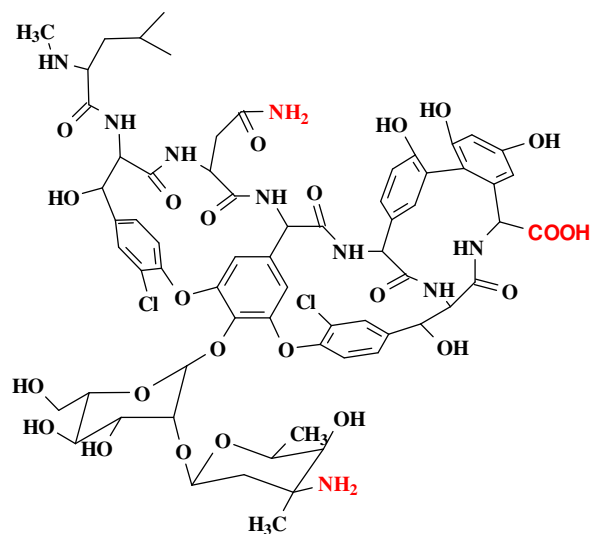


2.1. ábra

Makrociklusos glikopeptidok felosztása [17]

A **2.2. Táblázat** tartalmazza a fontosabb fizikai-kémiai adatokat, így a szelektorok jellemzése során csak a fontosabb tulajdonságokra térek ki és a makrociklusos antibiotikumok közül csak a makrociklusos glikopeptidok főbb sajátosságait, alkalmazásait mutatom be.

A természetes **vankomicin (2.2. ábra)** *Streptomyces orientalis* baktérium által termelt 18 kiralítás centrummal rendelkező amfoter glikopeptid [18]. A természetes vankomicin jól oldódik vízben és kevésbé alkoholban, ez a tulajdonsága poláris karakterére utal.



2.2. ábra

Vancomicin molekula szerkezete

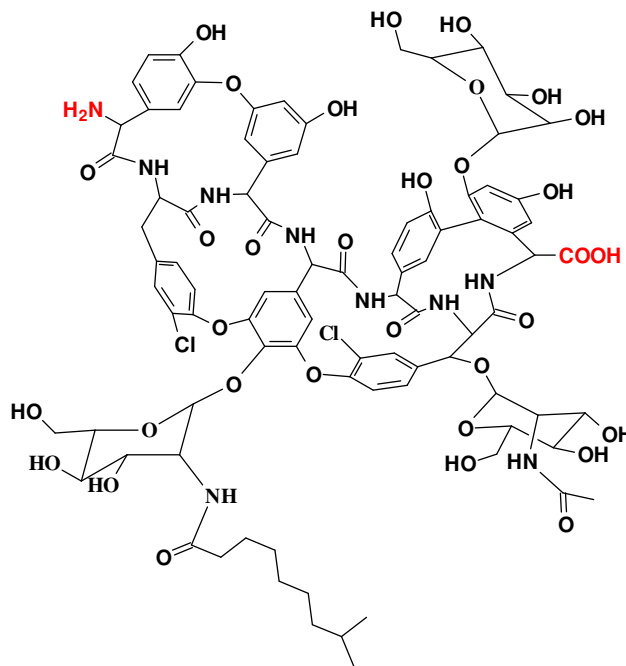
Három makrociklusos részből épül fel, amelyek a térben három apoláris zsebszerű formát hoznak létre, és együttesen egy kosárszerkezetet képeznek. Ennek a szerkezetnek tulajdonítják a királis kölcsönhatásban fontos szerepet betöltő hidrofób-hidrofób kölcsönhatást, illetve a szterikus hatást, az utóbbihoz hozzájárul a két cukoregység is. Az aromás gyűrűt tartalmazó vizsgálandó vegyülettel a π - π kötések kialakításaiért a szelektorban található öt aromás gyűrű a felelős. A két klór szubsztituenst tartalmazó aromás gyűrű π -savas jellegével járul hozzá a királis felismeréshez. Az ionos kölcsönhatás kialakításért a két primer amino-, egy szekunder amino- és egy karboxilcsoport a felelős [11]. *Nair* és *mtsai*. [19] vancomicin és Cu^{II} komplexének királis megkülönböztetési mechanizmusát hasonlították össze karbonsav és aminosav enantiomerek elválasztása esetén CE mérésekkel. A réz(II)ion a vancomicin *N*-metilleucin nitrogénjéhez és a környezetében lévő amid-nitrogének és karboxil oxigénhez koordinálódik. A Cu^{II} jelenlétében létrejövő gyűrűs komplex akadályozza a szelektor és aminosav közti kölcsönhatást és így a királis felismerést. A cukorrész szabad aminocsoportja nem vesz részt a koordinációban.

2.2. Táblázat. Makrociklusos glikopeptidek fizikai-kémiai tulajdonságai [17]

Tulajdonságok	Ansamicinek		Glikopeptidek							Polipeptidek
	Rifamycin B	Rifamycin SV	Avoparcin	Teicoplanin A _{2,2}	Teicoplanin A-40,926	Teicoplanin aglicon	Ristocetin A	Vankomicin	Norvankomicin	Thiostrepton
Molekula tömeg	755	698	$\alpha=1908$ $\beta=1942$	1877	B ₀ =1732 B ₁ =1718	1197	2066	1449	1435	1665
Kiralitás centrumok száma	9	9	32	23	B ₀ =19 B ₁ =18	8	38	18	18	17
Makrociklusok száma	1	1	3	4	4	4	4	3	3	2
Aromás gyűrűk száma	2	2	7	7	7	7	7	5	5	1
Monomer cukorrészek száma	0	0	5	3	2	0	6	2	2	0
Hidrofób lánc	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Hidroxilcsoportok száma	4	5	16	15	11	7	21	9	9	5
Aminocsoportok száma	0	0	2	1	0	1	2	2	2	1
Szekunder aminok száma	0	0	1	1	2	0	0	1	1	1
Amidocsoportok száma	1	1	6	7	6	6	6	7	7	11
Karboxilcsoportok száma	1	0	1	1	2	1	0	1	1	0
Metoxicsoportok száma	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Metoxi észterek száma	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Előállítása	<i>Nocardia mediterranei</i>	<i>Nocardia mediterranei</i>	<i>Streptomyces candidus</i>	<i>Actinoplanes teicomyceticus</i>	<i>Actinoplanes teicomyceticus</i>	<i>Teicoplaninból szintetikus úton</i>	<i>Nocardia lurida</i>	<i>Streptomyces orientalis</i>	<i>Streptomyces orientalis</i>	<i>Streptomyces azureus</i>

Ezáltal nyilvánvalóvá vált, hogy az elektrosztatikus kölcsönhatás az anion jellegű molekula és a szelektor protonált aminocsoportja között a meghatározó lépés a királis elválasztásban [19]. Dipól-dipól és H-híd kölcsönhatás a mintával az –OH és –Cl csoportok közreműködésével jöhet létre.

A **teicoplanin (2.3. ábra)** *Actinoplanes teichomyeticus* baktérium által termelt makrociklusos glikopeptid [20].



2.3. ábra

A teicoplanin A₂₋₂ molekula szerkezete

Hasonlóan a vankomicinhez, itt is megtalálható a kosár szerkezet, de itt négy makrociklus alakítja ki. A 7 aromás gyűrű, amelyek közül kettő egy-egy klór szubsztituenst tartalmaz a π - π kötés illetve π_{sav} - $\pi_{bázis}$ kölcsönhatás kialakítására alkalmas centrumok. A teicoplanin ionos jellegéért egy karboxil- (pK~2,5) illetve primer aminocsoport (pK~9,2) a felelős. A fordított fázisú kromatográfiai mérések ideális pH tartományában pH=3,5-8,0 között a molekula ikerionos állapotban van.

Az ionos kölcsönhatás meghatározó szerepét a visszatartásban α -aminosavak esetén *Berthod* és *mtsai.* igazolták [21]. H₂O/MeOH=60/40 eluensösszetételt alkalmazva, a semleges közegben anion jellegű Asp (pK=3,9) és Glu (pK=4,3) esetében csekély, a kation jellegű Lys, Arg és His esetén nagy visszatartást tapasztaltak. Az eluens pH-ját 3,80-ra csökkentve az Asp és Glu ionos jellege megváltozott, ami visszatartás növekedést eredményezett. Ezen a pH-n az állófázis karboxilcsoportjának deprotonálódása is visszaszorul, ami a kationos jellegű aminosavak esetén kisebb retenciós időt eredményezett. A retenciós idő növekedését figyelték meg az α -aminosavak esetén az

eluens víz tartalmának növelésével, amit a víz nagy dielektromos állandójával és a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások kialakulásával magyaráztak [21]. Néhány esetben nagy MeOH-tartalmú eluensben a MeOH-tartalom növelése retenciós idő növekedést eredményezett. Armstrong metanolban gazdag eluensben ezt a nem fordított fázisú viselkedést, amikor is a MeOH-tartalom növekedésével a visszatartás nő, a vizsgált poláris vegyületek csökkenő oldhatóságával magyarázta [14].

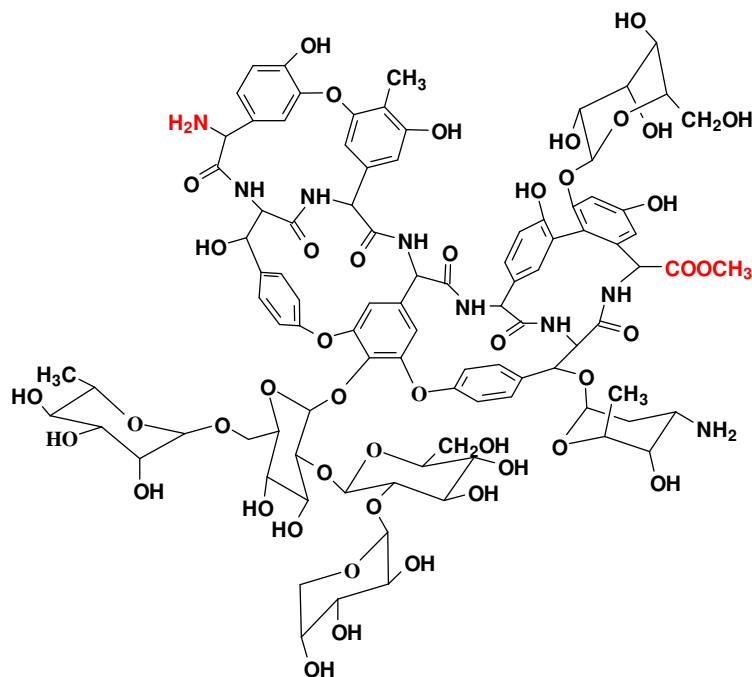
A **2.3. ábrán** látható, hogy a teicoplanin A_{2-2} vázához három cukorrész kapcsolódik, két D-glükózamin és egy D-mannóz formájában. A hidrofób-hidrofób kölcsönhatás kialakításért felelős nonil-lánc a D-glükózaminhoz kötődik. A cukorrész elválasztásban betöltött szerepének tisztázásához a teicoplanin és a baktérium sejtfal közti kölcsönhatás már ismert mechanizmusát használták fel; a glikopeptid a baktérium sejtfal D-Ala-D-Ala részhez kapcsolódik [22]. Ennek ismeretében *Arriaga* és *mtsai*. [23] meghatározták a teicoplanin acetyl-D-Ala-D-Ala dipeptidhez való kötési energiáját. A kötési energia natív teicoplanin esetén 31,2 kJ/mol, míg a cukorrész nélküli aglikon esetén 23,0 kJ/mol volt. Ez arra utal, hogy az aglikon rész alapvető, a cukorrész pedig további hozzájárulást jelent a kölcsönhatás kialakításához. A cukorrész lehetséges hozzájárulását a királis felismerési folyamathoz három pontban lehet összefoglalni:

- ✂ szterikusan gátolhatja a kosár belsejéhez való hozzájutást,
- ✂ meggátolhatja a lehetséges kölcsönhatás kialakítását az aglikon két fenolos és egy alkoholos hidroxilcsoportjával, amelyeken keresztül a három cukorrész kapcsolódik a natív teicoplanin esetén,
- ✂ a cukorrészen lévő alkoholos hidroxil-, éter- és amidcsoportok, valamint a nonillánc további kölcsönhatási lehetőséget biztosítanak a minta molekulákkal [24].

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

Péter és *mtsai*. [25] kevésbé poláris α - és β -aminosavak esetén a cukorrészek árnyékoló hatásaként visszatartás csökkenést tapasztaltak, szemben *Berthod* és *mtsai*. eredményeivel, akik poláris aminosavakat vizsgálva a visszatartás növekedését figyelték meg natív teicoplanin szelektoron teicoplanin aglikonhoz viszonyítva [24]. A cukorrész királis felismerésre gyakorolt hatását vizsgálva kevésbé poláris α - és β -aminosavak esetén, az általuk számolt enantioszelektív szabadenergia különbség az aglikon és a natív teicoplanin királis állófázis között -84 és -1255 J mol⁻¹ közé esett, ami a cukorrész kedvezőtlen hatását jelenti a királis elválasztásban [25].

A 38 kiralitás centrummal rendelkező **ristocetin A** (2.4. ábra) a *Nocardia lurida* fermentációs terméke. Az előző makrociklusos glikopeptidekhez hasonlóan itt is megtalálható az aglikon rész kosár szerkezete, amelyet négy makrociklus hoz létre. Jelentős különbség, hogy szabad karboxilcsoport helyett metilésztercsoportot tartalmaz a szelektor, ami a kationos jellegű vegyületekkel gyengébb kölcsönhatást eredményezhet, illetve a ristocetin A 21 darab hidroxilcsoportjának köszönhetően a legpolárisabb szelektor, amit a hidrofób lánc hiánya tovább erősít. *Ekborg-Ott és mtsai.* [26] több mint 234 vegyületet vizsgáltak ristocetin A oszlopon különböző kromatográfiai módokban (normál, fordított fázis, POM, PIM). Megállapították, hogy fordított fázisban a meghatározó kölcsönhatás az állófázis protonált aminocsoportjával létrejövő elektrosztatikus és a hidrofób zsebbel kialakuló hidrofób-hidrofób kölcsönhatás, járulékos a H-híd illetve szterikus gátló hatás.



2.4. ábra

A ristocetin A molekula szerkezete

Normál fázisú módban a π - π és H-híd kölcsönhatások a meghatározóak, illetve a szterikus hatás az irányadó. POM-ban a normál módhoz hasonló kölcsönhatások lépnek fel. Acetonitril (MeCN) tartalmazó mozgófázisban túl nagy retenciós idővel rendelkező vegyületek visszatartását a H-híd kötésre hajlamos MeOH hozzáadásával sikerült csökkenteni. Összehasonlítva a normál fázisban és POM-ban vizsgált vegyületeket, azokat sikerült az utóbbiban elválasztani, amelyek a következő funkciócsoportok közül legalább

egyét tartalmaztak:

- ✂ szabad amino- vagy amidcsoport,
- ✂ hidroxil-,
- ✂ fenil-,
- ✂ benzoil-,
- ✂ naftil-,
- ✂ karboxil és/vagy észtercsoport.

Az *N*-védett aminosavak enantiomerjeinél csak normál fázisban tapasztaltak megfelelő szelektivitást, ott is csak abban az esetben, ha a szelektor aminocsoportja protonált állapotban volt az eluenshez hozzáadott ecetsav hatására, ami a retenciós idő csökkentése mellett felbontás növekedést (talpszélesség csökkenés, elméleti tényérszám (*N*) növekedés) is eredményezett.

Ugyanebben a cikkben [26] a vizsgált vegyületek nagy számának köszönhetően a szerzők összehasonlították a különböző makrociklusos glikopeptid alapú állófázisokon mért azonos vegyületek kromatográfiás adatait. A három szelektoron (vankomicin, teicoplanin és ristocetin A) sikeresen elválasztott vegyületeket három csoportba sorolták:

- ✂ amidok, valamint semleges molekulák, melyek aromás, vagy más gyűrűs egységgel rendelkeznek,
- ✂ karboxilcsoportot tartalmazók, ide sorolandók az *N*-védett aminosavak is,
- ✂ szekunder és terciér aminocsoportot tartalmazók.

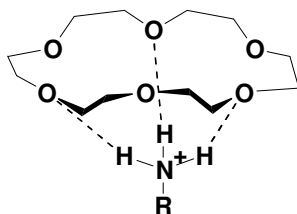
Számos esetben egyik, vagy másik makrociklusos glikopeptid szelektor szolgáltatott jobb enantiomer szelektivitást, azt sugallva, hogy bár hasonló szerkezettel rendelkeznek, de az eredő királis felismerés egyedi sajátosságuk, amit apróbb szerkezeti eltérések határoznak meg.

2.1.2. Koronaéter alapú királis állófázisok

A koronaéterek, mint makrociklusos poliéterek ismertek azon tulajdonságaik révén, hogy képesek az alkáli-, alkáli földfém- illetve ammóniumionokkal komplexet képezni. A „korona” jelző *Pedersen* [27] nevéhez fűződik, az általa leírtak szerint a kationok reverzibilisen „megkoronázhatók”. Az így létrejövő komplexek stabilitása az éteres oxigénatomok számától, elhelyezkedésétől, a poliéter és a kation méretétől függ. Vizsgálták a létrejövő komplexek röntgendiffrakciós kristályszerkezetét, ahol azt tapasztalták, hogy koordinatív telítettség és a kötés irányultsága kisebb jelentőségű, mint

számos átmenetifémkomplexnél. *Cram* és *mtsai*. [28] több mint 35 évvel ezelőtt írták le az első szintetikus királis makrociklusos koronaéter szintézisét. Koronaéter előállításával mellett különböző aminosavak királis megkülönböztetését is vizsgálták binaftil-tartalmú koronaéterekkel. *Shinbo* és *mtsai*. [29,30] oktadecil-szilikagélen dinamikusan rögzített (adszorbeált) királis koronaéter állófázist állítottak elő és D,L aminosavakat választottak el rajta. Az oxigén, illetve nitrogén tartalmú koronaétereknek a királis analízisben fellépő jelentőségének felismerésével számos publikáció jelent, illetve jelenik meg, vizsgálva többek között a különböző funkciós csoportokkal (szénhidrogén lánc, piridin, stb.) módosított koronaéterek királis szelektivitására gyakorolt hatását.

A királis koronaéterek elválasztástechnikai jelentősége többek között a protonált aminocsoportokkal képzett stabil komplexének köszönhető. Feltételezés szerint az ammóniumion három hidrogén híddal kötődik a nagy elektronsűrűségű poliéteres gyűrűben (**2.5. ábra**). A 18-korona-6 poliéter gyűrű üregmérete 260-320 pm tartományban van, amibe az ammóniumion 286 pm ionátméretjével beleillik [31].



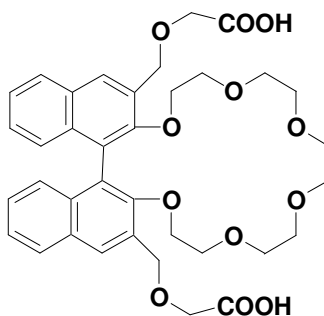
2.5. ábra

18-korona-6 koronaéter szubsztituált ammóniumionnal képzett komplexe

A hárompontos illeszkedési modellből kiindulva a koronaéter szelektorokra nézve általánosan elmondható, hogy ez az akirális kölcsönhatás szükséges, de nem elégséges a királis megkülönböztetéséhez [32]. Ezért a különféle funkciós csoportok jelenléte a szelektoron, illetve a „karon” („spacer”, a szelektort a szilikagéllal összekötő láncon) szükséges, hogy további kölcsönhatások alakuljanak ki az elválasztandó molekulával, meggátolva azok szabad rotációját és egyéb mozgásukat, így létrehozva a kvázidiasztereomer komplexeket. A hárompontos modell legalább egy sztereokémiától függő kölcsönhatást követel meg a három egyidejű kölcsönhatás közül. Enantiomer megkülönböztetés abban az esetben figyelhető meg, ha az egyik enantiomerre nézve kevésbé stabil komplex jön létre. Természetesen ehhez nem csak a szelektor szerkezete járul hozzá, hanem az enantiomeré is. *Dearden* és *mtsai*. [33] a koronaéter gyűrűjében piridint tartalmazó szelektoron négy különböző amin királis megkülönböztetését vizsgálták, FT-ICR/MS technikával. A királis megkülönböztetés a *sec-*

butilamin<ciklohexiletilamin<feniletilamin<naftiletilamin sorban nőtt. A legkisebb térkitöltésű *sec*-butilamin esetén nem tapasztaltak királis megkülönböztetést, a *sec*-butilcsoport nagyobb és merevebb ciklohexil gyűrűvel való helyettesítésével már enantioszelektivitást figyeltek meg. A két aromás amin esetén tapasztalták a legnagyobb fokú királis megkülönböztetést, melyet a fellépő π - π kölcsönhatás kialakulásával és a nagyobb fokú szterikus hatás fellépésével magyaráztak.

Cram és *mtsai*. [34,35] két naftilgyűrűt tartalmazó koronaéter és különböző aminosavak által képzett komplexek lehetséges kölcsönhatásait vizsgálták. Feltételezésük szerint a két karboxilcsoport elég hosszú láncon keresztül kapcsolódik a naftilgyűrűkhöz ahhoz (2.6. ábra), hogy a koronaéter gyűrűje alatt és felett elhelyezkedve H-híd kötést alakítsanak ki a vizsgált aminosav karboxilcsoportjával, illetve deprotonált formában az ammóniumionnal ion-párt képezzenek. Az aromás rendszer további poláris kölcsönhatások kialakításában vehet részt.



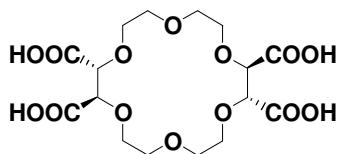
2.6. ábra
Binaftil tartalmú koronaéter

Izatt és *mtsai*. [36] a királis szelektoron lévő szubsztituens méretének hatását tanulmányozták. A szubsztituens méretének növelésével a szterikus taszítás nőtt, ami általában nagyobb enantiomer szelektivitást eredményezett. A nagyobb térkitöltésű csoportok azonban megakadályozhatják a diasztereomer komplex létrejöttét és így a királis felismerést.

A koronaéter gyűrűben található éterkötés jelentőségét igazolták *Sawada* és *mtsai*. [37]. FAB/MS technikával vizsgálták a koronaéter gyűrűjében található $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_2-$ stabilizáló hatását fenilglicin-metilészter enantiomerek esetén. A koronaéterben található két éterkötést két aromás gyűrűvel helyettesítve nem tapasztaltak megkülönböztetést és a molekulaion intenzitása is messze elmaradt az alapvegyülettel képzett diasztereomerétől. *Pirkle* [38] és *Armstrong* [39] írták le, hogy a királis felismerés a gazdamolekula és a vendégion közötti másodlagos vonzó és szterikus taszító kölcsönhatások eredőjeként jöhet

létre. *Still* és *mtsai*. [40] mutattak rá a makrociklusos szelektor flexibilitásának fontosságára a királis megkülönböztetésben. Ha a komplex szerkezete kellően rugalmas, akkor mind a két enantiomer találhat egy olyan konformációt, ami a szterikus hatás eliminálásával a szelektivitás csökkenését, illetve megszűnését eredményezheti [41]. Elmondható, hogy a merev makrociklusos szerkezet, illetve a többpontos kötés kialakítása a diasztereomer komplex konformációját csökkenti, így segítve az elválasztást.

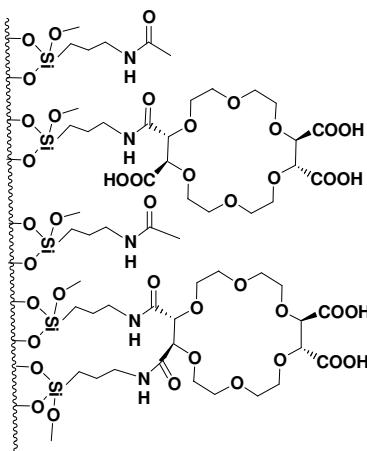
Kuhn [42] racém primer-aminok CE elválasztásáról számol be királis koronaéter, (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektor alkalmazásával (**2.7. ábra**).



2.7. ábra

(+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szerkezete

Machida és *mtsai*. [43] a (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsavat reagáltatták 3-aminopropil szilanizált szilikagéllel, így a szelektort egy, illetve két egymás mellett lévő karboxilcsoporton lévő *n*-propilamin karon keresztül rögzítették a hordozóhoz (**2.8. ábra**).



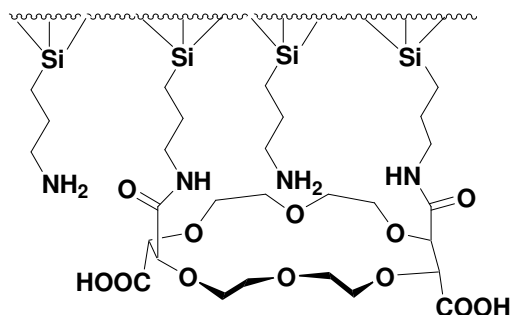
2.8. ábra

Machida királis állófázisa

A szerzők α -aminosavak, aminok és amino-alkoholok enantiomerjeit választották el és az utóbbi két molekulacsoport esetén jobb szelektivitást tapasztaltak.

Hyun [44] ugyanezt a szelektort rögzítette aminopropil szilikagélhez oly módon, hogy a szelektor dianhidridjét reagáltatta két napig 0°C hőmérsékleten, trietilamin jelenlétében, száraz diklórmetánban, argon atmoszféra alkalmazásával. A módosított

szilikagélt MeOH, víz, 1,0 M HCl, víz, MeOH, diklórmétán és hexánnal való mosás, majd nagyvákuumban történő szárítás követte. A dianhidrid gyűrű azonos oldali felnyílási reakciója primeraminnal, trietilamin jelenlétében, a szelektor merevebb struktúrával rendelkező *szin*-diamid formáját eredményezte [45] (**2.9. ábra**).

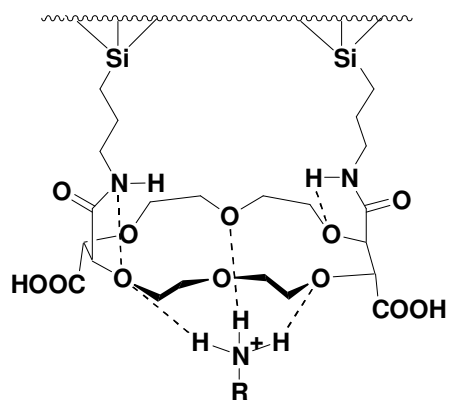


2.9. ábra

(+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektor szilikagélen rögzítve

Ezen a szelektoron primeramint tartalmazó kinolon antibiotikum enantiomerek elválasztását tanulmányozták elsőként [45]. Következő közleményükben racém természetes és szintetikus α -aminosavak, α -amino-amidok és észterek elválasztásáról és az elválasztás lehetséges mechanizmusáról számoltak be [46]. Az aminosav enantiomerek elválasztása mind sikeres volt, egyedül a Pro esetén figyeltek meg nagyon gyenge visszatartást és sikertelen elválasztást. Véleményük szerint a primeraminocsoport hiánya miatt nem tudott kialakulni az $R-NH_3^+$ -koronaéter diasztereomer komplex, amely alapvető fontosságú a kölcsönhatások kialakításában (**2.10. ábra**). Összehasonlítva a királis felismerés szempontjából az aminosavak szabad, *N*-alkil illetve *N,N*-dialkil formáit, a mono-alkil forma volt a legkedvezményezettebb, majd ezt a szabad aminosav és végül a dialkil-származék követte. Az elválasztási mechanizmus magyarázatakor a szelektor szabad karboxilcsoportjának jelentőségét említették, mint további kölcsönhatás kialakítására alkalmas funkciócsoportot [46].

Aminok, amino-alkoholok és α -amino-ke-tonok vizsgálatokor érdekes viselkedést figyeltek meg. Az eluens szerves összetevőjének növelésével nőtt a visszatartás a viszonylag hidrofilebb vegyületeknél, hasonlóan a makrociklusos glikopeptid szelektort tartalmazó állófázisokhoz. Ezt *Hyun* és *mtsai*. [47] a vegyületek és a mozgófázis közötti hidrofil kölcsönhatás csökkenésével magyarázták, ezáltal az állófázison való tartózkodás vált kedvezményezetté. A szelektivitás egységesen csökkent a mozgófázis MeOH tartalmának növelésével.

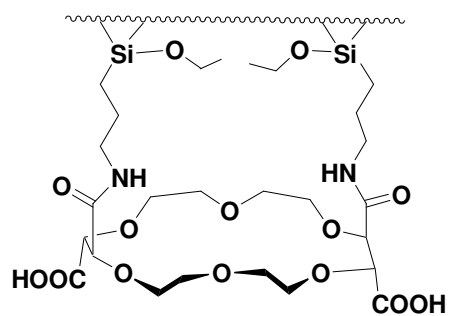


2.10. ábra

(+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav és szubsztituált amóniumion komplex képzése

Vizgálták a mozgófázishoz adagolt sav minőségének (H_2SO_4 , CH_3COOH , HClO_4 és CF_3COOH) és mennyiségének (1,0–20,0 mM) a kromatográfias folyamatokra gyakorolt hatását is. Aminok, amino-alkoholok és α -amino-ke-tonok esetén tapasztalataik szerint a savkoncentráció növelésével nőtt a visszatartás és többnyire a szelektivitás is [47]. Aminosavak esetén ezzel ellentétes viselkedést is megfigyeltek, amit a szabad karboxilcsoport protonáltsági állapotának növekedésével és a protonált karboxilcsoport és a felületi protonált aminocsoportok közötti kölcsönhatás csökkenésével magyaráztak.

Hyun és *mtsai* [48] az előzőleg ismertetett szintézist módosítva, trietilamin helyett 2,6-lutidint használtak. Az így kapott állófázis feltételezett szerkezete a **2.11. ábrán** látható. Ez a változtatás számottevően nem befolyásolta a szelektor már korábban leírt kromatográfias viselkedését. Vizgálták a halogénatommal szubsztituált aromás gyűrűt tartalmazó α -aminosavakat, illetve a vegyületek szerkezete és a kromatográfias viselkedés közötti összefüggést [48]. Tanulmányozták a másodikként eluálódó enantiomer retenciós faktorának változását a molekula szerkezetétől függően, abból a megfontolásból kiindulva, hogy a másodikként eluálódó enantiomer királis affinitása az állófázissal nagyobb.

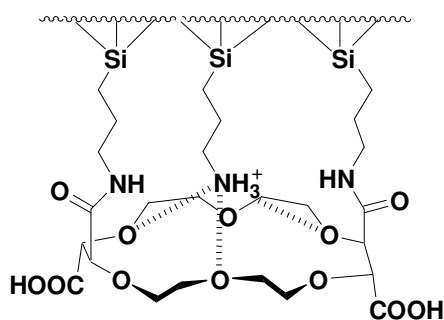


2.11. ábra

(+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektor módosított aminopropil szilikagélen

Megfigyelték, hogy az aminosavak aromás gyűrűjén található halogén szubsztituensek méretének növekedésével a visszatartás nőtt. A szubsztituens helyzete ugyancsak meghatározó volt: *orto*-helyzetben fluor szubsztituenset tartalmazó Phe másodikként eluálódó enantiomerjének retenciós faktora nagyobb volt a *para*- és *meta*-helyzetű fluor szubsztituenset tartalmazóknál, viszont kisebb szelektivitást eredményezett. A szerzők ezt a viselkedést azzal magyarázták, hogy az *orto*-szubsztitúció miatt fellépő szterikus gátlás felülmúlja a nemkirális kölcsönhatást, például a szilikagélen lévő szabad propilamincsoportok és az aminosav között, amely a retenció növekedését eredményezi, de a szterikus gátlás miatt a két *orto*-szubsztituált enantiomer kölcsönhatása az állófázissal egymástól alig különbözik, ezért a szelektivitás csökken.

1998-tól *Hyun* és *mtsai*. a (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektort tartalmazó állófázisnak számos változatát készítették el az elválasztás javítása és a királis megkülönböztetés folyamatának tisztázása céljából. Az állófázis szintézise során maradnak vissza elreagálatlan *n*-propilamincsoportok (**2.12. ábra**), melyeknek jelentős lehet a hozzájárulása az elválasztás sikeréhez vagy sikertelenségéhez.



2.12. ábra

Aminopropil szilikagélen kötött (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav és a szabad felületi protonált propilamin feltételezett komplexképzése

A szelektoron található karboxilcsoportok pK értéke 2,1-4,9 [49], az aminosavak karboxilcsoportjának pK értéke 1,7-2,3 tartományba esik [50]. *Jin* és *mtsai*. [51] vizsgálták az eluens pH hatását pH=2,0, 2,1 és 2,6 esetén, állandó koncentrációjú 10 mM kénsav mellett trietilamin jelenlétében. A pH 2,0-ről 2,1-re történő változása számottevően nem befolyásolta az aminosav és a koronaéter ionizáltsági állapotát, azonban 2,6 esetén már várható a karboxilcsoport deprotonálódása, segítve a szelektor karboxilátionja és az aminosav protonált aminocsoportja között, illetve az aminosav karboxilátionja és a felületen szabadon maradó primer protonált aminocsoportok között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatást.

Mindezek mellett a felületi szabad propilamin, illetve az aminosav protonált

aminocsoportjai között versengés alakulhat ki a koronaéter kötőhelyéért. Ennek a zavaró hatásnak a csökkentésénél szerepe lehet az alkalmazott savak anionjainak (ellenionjainak). β -Aminosavak esetén azonos koncentrációjú ecetsav, kénsav és perklórsav alkalmazásával ecetsav esetén tapasztalták a legnagyobb visszatartást és szelektivitást [52]. Feltételezés szerint az eluensben lévő sav ellenionja ionpárt képez az aminosav protonált ammóniumionjával, az így létrejövő ionpár a koronaéterrel egy komplex terner rendszert alakít ki. [30,31]. Az ellenion lipofil tulajdonsága befolyásolja a visszatartást az állófázison. Viszonylag apoláris, ionizálható csoportot nem tartalmazó, fenilglicin (Phg) és Met vizsgálatokor koronaéter oszlopon sósav, salétromsav és perklórsav tartalmú eluensek összehasonlításakor $\text{Cl}^- < \text{NO}_3^- < \text{ClO}_4^-$ sorrendben nőtt a visszatartás, ami megegyezik az anionok lipofil jellegének növekedési sorrendjével [53]. Ez az apoláris viselkedés kevésbé jelentős poláris koronaétereknél, hiszen a rajtuk lévő ionizálható funkciócsoport (pl. karboxilcsoport) és a vizsgált vegyület szintén ionizálható pl. aminocsoportja között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatás felülmúlja a viszonylag gyenge hidrofób-hidrofób kölcsönhatást [52,54-56].

Hyun és *mtsai*. a *n*-propilcsoportok hatásának csökkentésére két új állófázis szintézist dolgoztak ki. Az első esetben [57] a szabad *n*-propilamincsoportokat a szilikagélen acetil-, butiril- és pivaloil- védőcsoporttal látták el. Az általuk vizsgált vegyületek közül a Leu, Phe, Phg és Tyr eredményeit emelném ki. Míg az acetil és butiril védőcsoport jelenléte növelte a visszatartás mértékét, melyet a hidrofób-hidrofób kölcsönhatás erősödésével magyaráztak, addig a nagy térkitöltésű pivaloilcsoport sztérikusán gátolta az aminosav-koronaéter komplex létrejöttét, retenciós idő és szelektivitás faktor csökkenést eredményezve. Meglepő módon az első két védőcsoport alkalmazásával a szelektivitás kismértékű csökkenést mutatott, szemben a felbontással, amely nőtt. A jelenséget a szerzők a szabad *n*-propilamin csúcshévívelő hatásával magyarázták.

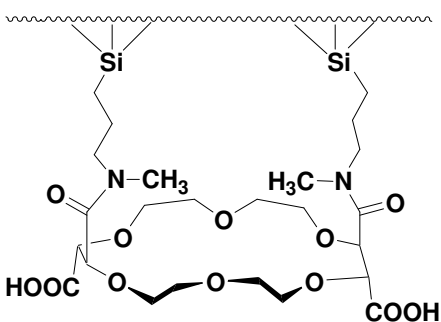
A második esetben [58] a szelektor *N,N'*-trietoxiszililpropil *szin*-amidját közvetlenül kötötték a szilikagélhez. Ezzel az eljárással készített oszloppal β -aminosav enantiomerek elválasztása esetén jelentős (közel nyolc-tízszeres) visszatartás növekedést tapasztaltak, igazolva a korábbi modellt: versengés lép fel a szabad felületi *n*-propilamin és az aminosav protonált aminocsoportja között a koronaéter üregéért. A megnövekedett visszatartás csökkentése céljából NH_4^+ -tartalmú módosítót alkalmaztak az eluensben (NH_4Cl vagy NH_4OAc).

Nishi és *mtsai*. [59] is vizsgálták a mozgófázisba adagolt különböző szervesen módosítók hatását. Azt találták, hogy $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{K}^+$ sorrendben csökken a

visszatartás, ami a káliumion 18-korona-6 poliéterrel képzett komplex nagy stabilitásával magyarázható [60]. A mozgófázisban levő kationok (hasonlóan a szabad felületi ligandumokhoz) versengenek a koronaéter kötőhelyeiért, ezáltal csökkentve a vizsgált vegyületek visszatartását. A csökkenés mértéke befolyásolható az alkalmazott koncentrációval és a kation melletti anion változtatásával is. Az ellenion hozzájárulása megegyezik a savaknál már korábban leírt lipofil jellegükből adódó viselkedéssel, kiegészítve a $\text{H}_2\text{PO}_4^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^-$ lipofilcitási sorrenddel.

Hyun és mtsai. [61] β -aminosavak és a szabad felületi *n*-propilamint nem tartalmazó állófázis kölcsönhatását vizsgálva azt tapasztalták, hogy a mozgófázisba adagolt kation koncentrációjának növelésével (0-0,5 mM) csökkent a visszatartás és a szelektivitás is, viszont a felbontás nőtt, köszönhetően a zónaszélesedés jelentős csökkenésének. A felbontás tekintetében hasonló eredményt tapasztaltak CH_3COO^- illetve Cl^- összehasonlításakor, az acetátion alkalmazása bizonyult hatékonyabbnak.

Vizsgálták a karon található *N*-hidrogének hatását is. *Gehin és mtsai.* [62] leírták, hogy a karon lévő nitrogén hidrogénje szintén kölcsönhatásba léphet a koronaéter karboxilcsoportjával párhuzamosan a vizsgált vegyületek ammóniumionjával, így gátolva az ammónium-koronaéter komplex létrejöttét. *Hyun és mtsai.* feltételezték, hogy a hidrogén metilcsoporttal történő kicserélésével javulhat a királis felismerés [63] (**2.13. ábra**). Az új állófázist (**2.13. ábra**) összehasonlítva a korábbival (**2.9. ábra**) a szerzők különböző amin enantiomerek és tokainid esetén jobb, míg α -aminosavak esetén hasonló szelektivitást tapasztaltak [64]. Érdekes viselkedést figyeltek meg β -aminosav enantiomerek elválasztása esetén. Ha a mozgófázis 10 mM koncentrációjú ecetsavat tartalmazott, a metilcsoport jelenléte a nitrogénen jelentősen csökkentette a visszatartást és a királis megkülönböztetést, míg az ugyanilyen koncentrációjú kénsavat tartalmazó eluens hatásosabbnak bizonyult.



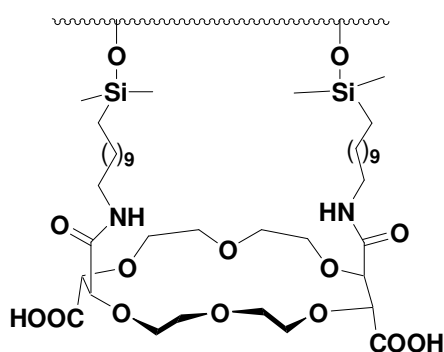
2.13. ábra

Aminopropil szilikagélhez kötött (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektor amid hidrogénje metilcsoporttal helyettesítve

Ez két dologban is eltérést mutat a korábbi irodalmi adatokhoz képest:

- ✂ pH csökkentésével nőtt a visszatartás,
- ✂ kénsav használata bizonyult kedvezőbbnek [65].

Az állófázis szintézise során visszamaradt elreagálatlan *n*-propilamincsoportok hatása mellett tanulmányozták a szelektort az állófázissal összekötő kar („spacer”) hosszának hatását is a kromatográfiás elválasztásra, szelektorként (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsavat alkalmazva. Az alifás-amin szénlánc hosszának növelésével az eredeti három szénatomú propilamint 11 szénatomszámú aminra cserélték, apolárisabbá téve a felületet ezáltal (**2.14. ábra**).



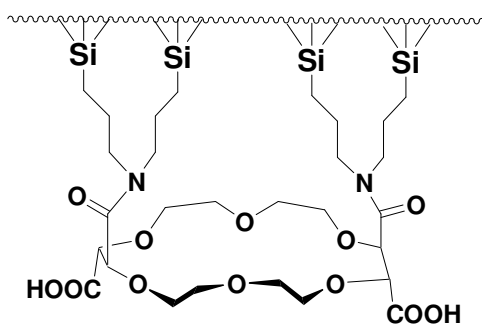
2.14. ábra

(+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektor aminoundecil-szilikagélen kötve

Viszonylag kevésbé hidrofil β -aminosav, amin és amino-alkohol enantiomerek elválasztását vizsgálva mind a visszatartásra, mind a szelektivitásra nagyobb értékeket kaptak, ugyanekkor α -aminosavak esetén ezek az értékek rendre kisebbnek adódtak [66]. A jelenség magyarázatára a szerzők a szabad aminopropilcsoport és a szabad aminoundecilcsoport koronaéterrel fellépő eltérő komplexképzési hajlamát feltételezték.

Hyun és *mtsai*. vizsgálták a kar rögzítési módjának az állófázis stabilitására gyakorolt hatását is [67]. A korábbi állófázisoknál a szelektort két karboxilcsoportján keresztül egy-egy *n*-propilamin karon kötötték a szilikagélhez (**2.9. ábra**). Az új állófázisnál *bis*(3-aminopropil) szilikagélt használtak, így a karboxilcsoportok két-két alifás láncsal kötődnek (**2.15. ábra**). Aminok, amino-alkoholok és α -amino-ke-tonok vizsgálatokor érdekes viselkedést figyeltek meg. Az eluens szerves összetevőjének növelésével nőtt a visszatartás a viszonylag hidrofilebb vegyületeknél, hasonlóan a makrociklusos glikopeptid szelektort tartalmazó állófázisokhoz. Ezt *Hyun* és *mtsai*. [47] a vegyületek és a mozgófázis közötti hidrofil kölcsönhatás csökkenésével magyarázták, ezáltal az állófázison való tartózkodás vált kedvezményezetté. A szelektivitás egységesen csökkent a mozgófázis MeOH

tartalmának növelésével.



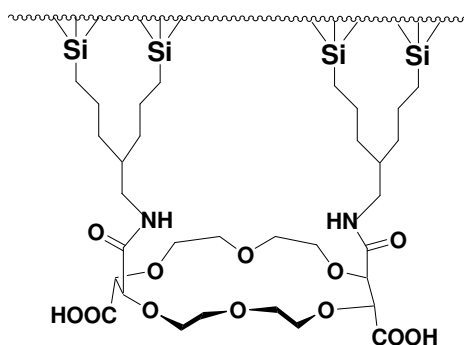
2.15. ábra

(+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektor kötése bis-(3-aminopropil) szilikagélhez

Ezzel a módszerrel az amid-hidrogén eliminálódik, ezért a pontos összehasonlítás végett a szerzők az eredeti szelektornál (**2.9. ábra**) is lecserélték az amid-hidrogént egy metilcsoportra (**2.13. ábra**). Az állófázis stabilitás vizsgálatakor a szelektivitási tényező és a retenciós faktor változását figyelték, viszonylag nagy 20 mM kénsav koncentráció mellett az átáramlott eluens térfogatának függvényében. Az N-CH₃ védett állófázist (**2.13. ábra**) alkalmazva aromás aminok elválasztása esetén 25000 ml eluens térfogat átáramoltatása után a szelektivitás több mint a felére, a retenciós faktor a negyedére csökkent. Az új oszlopnál (**2.15. ábra**) a szelektivitás ~10%-kal, a retenciós faktor mindössze ~20%-kal csökkent. Természetesen ez a változtatás a felület hidrofób jellegének növekedésén keresztül az elválasztási folyamatra is hatással bír, például aminok és aminoalkoholok esetén nagyobb visszatartást és kismértékű szelektivitás csökkenést figyeltek meg [67].

Hyun és mtsai. [68] utóbbi közleményükben újabb állófázisról tesznek említést. Figyelembe véve az amid-hidrogén kedvező hozzájárulását a királis megkülönböztetéshez, a szerzőknek sikerült a (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektort az amid hidrogén megtartása mellett két-két karral rögzíteni a szilikagélhez (**2.16. ábra**)

Összefoglalásként megállapítható, hogy a koronaéterek királis szelektorként primer- és szekunderamin funkciócsoportot tartalmazó vegyületek esetében alkalmazhatóak, figyelembe véve az aminocsoport-koronaéter komplex létrejöttének szükségességét. Hasonlóan a makrociklusos glikopeptidekhez, a koronaétereknél is a szelektoron, a karon illetve az állófázison lévő eltérések kisebb, vagy nagyobb mértékben, de befolyásolják a visszatartás és a királis megkülönböztetés mértékét.

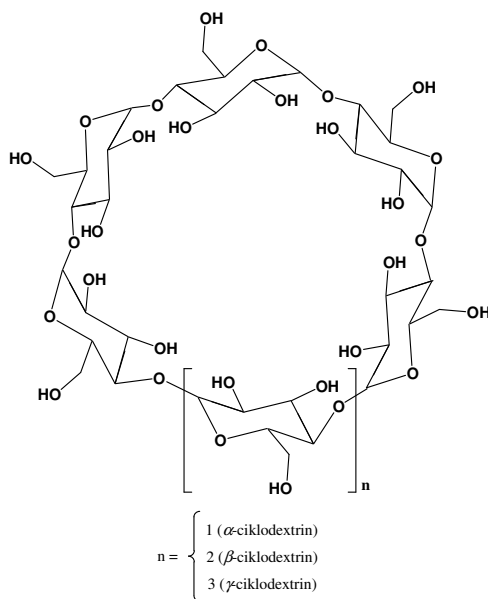


2.16. ábra

(+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektor „kétkarú” kötése szilikagélhez az N-H kötés megtartása mellett

2.1.3. Ciklodextrin alapú királis állófázisok

A ciklodextrinek (CD) α -1,4-kapcsolt D-glükóz gyűrűs oligomerek, melyekben az összes cukoregység a gyűrűs szerkezetben szék konformációs állapotban található [69]. Három, széles körben ismert és vizsgált CD az α -ciklodextrin (α -CD, ciklohexamilóz), β -ciklodextrin (β -CD, cikloheptamilóz) és a γ -ciklodextrin (γ -CD, ciklooktamilóz) (2.17. ábra). A cukoregységek számának növelésével nő a gyűrűs szerkezet átmérője, α , β és γ sorrendnek megfelelően 0,57, 0,78 és 0,95 nm.

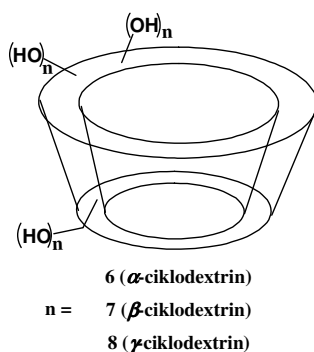


2.17. ábra

Ciklodextrinek szerkezete

A gyűrű hidrofób belseje és jól definiált átmérője alkalmassá teszi a CD-t zárványkomplexek képzésére számos szerves vegyülettel, ezt a tulajdonságát már az 1960-

as években leírták [70-72]. A hattagú aromás gyűrű a méretéből adódóan az α -CD-nel, a bifenil- és naftilcsoportot tartalmazó vegyületek β -CD-nel míg a pirén és származékai a γ -CD-nel képeznek viszonylag stabil zárványkomplexekeket. A zárványkomplex kialakulása hozzájárul a királis felismerési képességéhez, melynek felfedezése *Cramer és Dietsche* [73] nevéhez fűződik. Munkájukban racém karbonsav-észterek sztereoselektív kicsapását végezték, igazolva a CD-ek királis megkülönböztető képességét. A már korábban ismertett hárompontos illeszkedési modell feltételei a CD-ek esetében oly módon teljesülnek, hogy a térben kialakuló csonka kúp szerkezet viszonylag hidrofób belsejében hidrofób-hidrofób és sztérikus kölcsönhatások alakulnak ki. Ezen hatások mellett, a cukoregységek 2. és 3. pozícióban lévő szekunder hidroxilcsoportjai a csonka kúp szélesebb, a primer hidroxilcsoportok a glükóz egységek 6. pozíciójában a keskenyebb nyílásnál a felületi hidrofil karakter létrehozása mellett H-híd, dipól-dipól kölcsönhatás kialakításával járulnak hozzá a királis felismeréshez (**2.18. ábra**) [74-76].



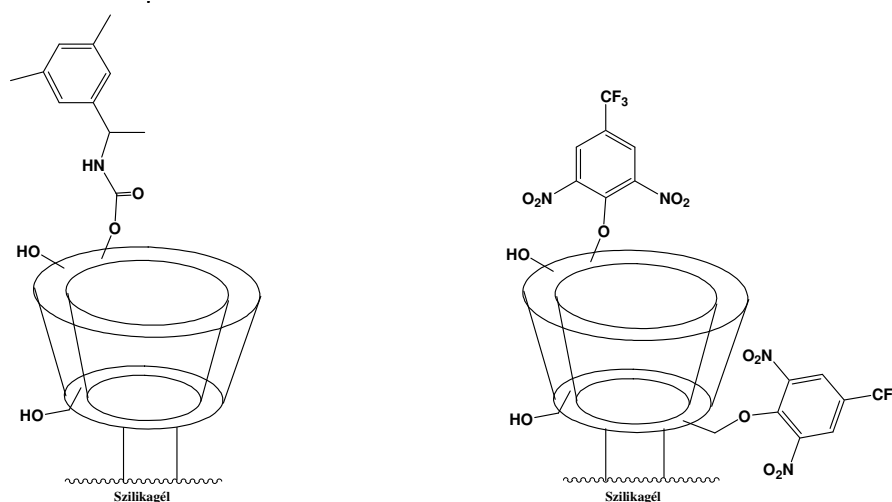
2.18. ábra

Ciklodextrin szerkezete

Míg a koronaéter szelektoroknál a $R-NH_3^+$ -koronaéter diasztereomer komplex létrejötte alapvető fontosságú, addig a CD szelektoroknál, a vizsgált vegyület kiralitás centrumához kapcsolódó szubsztituensnek kell elég közel lennie a CD üreg szélén lévő szekunder hidroxilcsoportokhoz, hogy kölcsönhatás alakulhasson ki közöttük. A vegyület szoros illeszkedése a csonka kúp belsejében segítheti az elválasztást, de nem alapvető követelmény olyannyira, hogy normál fázisú kromatográfiai mérésnél a CD üregében az apoláris eluens foglalhat helyet. Ezért a természetes CD-ek többnyire nem mutatnak királis felismerést normál fázisban, szemben a módosított változatokkal, ahol a származékképzéssel bevitt aromás gyűrűk π - π illetve π_{sav} - $\pi_{bázis}$ kölcsönhatásba léphetnek az enantiomerekkel. POM és PIM módszernél a fordított fázisú mérésekhez hasonlóan meghatározó a CD gyűrű mérete, illetve további követelmény, hogy a vizsgált vegyület α

vagy β helyzetben lévő szubsztituense H-híd kialakítására alkalmas legyen [77,78].

A glükózegységenként 1 primer és 2 szekunder hidroxilcsoport kiváló lehetőséget biztosít a szilikagélhez való kapcsolódáshoz, illetve CD-ek módosítására anélkül, hogy sérülne a gyűrűs szerkezet. Általában a módosítás eredményeképpen a csonka kúp „szája” részben fedetté válik, így bár a kialakuló H-hidak száma csökken, ugyanakkor az új funkciócsoportok beépítésével további kölcsönhatások léphetnek fel. A természetes CD-hez képest a módosítás jelentős szelektivitásbeli különbséget eredményezhet, továbbá a normál fázisú és POM alkalmazhatóságot is lehetővé teszi [78]. Így az utóbbi másfél évtizedben a CD-ek legkülönbözőbb származékait (pl. acetil, hidroxipropil, fenil, aminometil-benzil, naftiletilkarbamoil, dimetil-fenil, stb.) állították elő [79-81]. A CD-származékok esetén az egész molekulára vonatkozó úgynevezett átlagos szubsztitúciós fok mutatja meg, hogy hány hidroxilcsoporton történt meg a helyettesítés. A szubsztituensek eloszlása a hidroxilcsoportok reaktivitásától függ, amely a következő sorrendben nő: C-3<C-6<C-2 [82]. A szubsztitúciós fok általában a nagyobb térkitöltésű szubsztituensek esetén kisebb (pl. naftiletil- β -CD esetén hat az átlagos szubsztitúciós fok, acetyl- β -CD esetén a hidroxilcsoportok 90%-a védett). *Armstrong és mtsai.* [77] naftiletil-izocianáttal módosított három és hat szubsztitúciós fokú β -CD-ek kromatográfiás viselkedésének összehasonlításakor azt tapasztalták, hogy a védőcsoportok számának növekedésével csak a visszatartás nőtt, a szelektivitás nem változott. A CD-ek királis szelektorként való széleskörű elterjedése ezen speciális tulajdonságaik együttesének köszönhető.



2.19. ábra

3,5-dimetilfenilkarbamoil β -CD és 2,6-dinitro-4-trifluorometilfenil-éter- β -CD szerkezete

Az első királis CD állófázist *Harada* és *mtsai*. [83] α -CD és β -CD térhálósításával állították elő, melyeken fordított fázisú kromatográfiás módszerrel racém mandulasavat és annak észtereit és étereit választották el. Az azóta eltelt harminc évben a CD-nel foglalkozó közlemények száma évről-évre jelentősen nő.

A tíz átlagos szubsztitúciós fokú DMP- β -CD szelektor (**2.19. ábra**) a módosított CD π -bázis jellegű csoportjába tartozik. Ebbe a csoportba tartozó szelektorok π -elektron küldésre hajlamos molekularésszel rendelkeznek, amelyek a vizsgált vegyületek aromás részével π - π , π_{sav} - $\pi_{bázis}$ illetve sztérikus kölcsönhatásba léphetnek (a természetes CD-nél már ismertett kölcsönhatások mellett).

Mitchel és *mtsai*. [84] aromás szulfoxidok királis elválasztását végezték természetes (β -CD) és módosított (aromás DMP- β -CD és nem aromás dimetil- β -CD, acetyl- β -CD) állófázisokon. Vizsgálataik során néhány fontosabb megállapítást tettek:

- ✂ a kiralitás centrumhoz közeli nagy térkitöltésű molekularész jelentősen javította az enantiomer felismerést,
- ✂ kisebb mértékű változtatás a szulfoxidok szerkezetében jelentősen befolyásolta a szelektivitást,
- ✂ az aromás gyűrűn lévő szubsztituensek típusának és helyzetének eltérő volt a hozzájárulása,
- ✂ az aromás-szubsztituenszt tartalmazó CD-ek esetén nagyobb a visszatartás, összehasonlítva a nem aromás (alifás) jellegű szubsztituenszt tartalmazókkal.

Armstrong és *mtsai*. [85] a π -bázikus DMP- β -CD-t hatékonyan találták π -savas enantiomerek elválasztásában, ezt a logikát követve *Zhong* és *mtsai*. [86] elkészítették a π -savas, tíz átlagos szubsztitúciós fokú DNP- β -CD-t π -bázisos tulajdonságú királis vegyületek elválasztására. A DNP- β -CD π -savas karakterét az aromás gyűrűkön található negatív indukciós és konjugációs effektussal rendelkező két nitrocsoporthoz kösönheti, amelyet a *para*-helyzetű trifluormetilcsoport tovább erősít. A királis felismerési folyamatban a π - π , π_{sav} - $\pi_{bázis}$, dipól-dipól illetve sztérikus kölcsönhatás alakulhat ki a természetes CD-eknél már megismert hidrofób-hidrofób, H-híd és zárványkomplex (kromatográfiás módszertől függően) kialakulása mellett. A szerzők 9 π -savas karakterű β -CD királis állófázis kromatográfiás viselkedését hasonlították össze (többek között DNP- β -CD-t is) királis heterociklusok, savak, bázisok, alkoholok, szulfoxidok és *N*-védett aminosavak elválasztásakor. Az állófázisok az aromás gyűrűn található nitrocsoporthoz és trifluormetilcsoportok helyzetében, az aromás gyűrű CD-hez való kötésében (éter vagy

karbamoil), illetve az átlagos szubsztitúciós fokban különböztek. Míg a 3-5 helyzetű hidroxilcsoport származékképzése segítette, addig a 10 helyzetű hidroxilcsoport módosítása már jelentős szterikus gátlásával erősen rontotta az enantiomerek elválasztását. A szubsztituensek helyzete és száma az aromás gyűrűn jelentősen befolyásolta az enantiomer szelektivitást. Említést érdemel, hogy a szelektorok közül a 2,6-dinitro-4-trifluorometilfenil- β -CD bizonyult a legjobbnak. A szerzők összehasonlítottak két állófázist, amelyek ugyanezt a szelektort tartalmazták, de eltérő kapcsolással a CD-hez. Az egyik megegyezik az általunk használt DNP- β -CD oszloppal, ahol az aromás rész éterkötésen keresztül véletlenszerűen kapcsolódik a primer és szekunder hidroxilcsoportokhoz, a másik állófázisnál a kötés karbamoilcsoporton keresztül történik a C-2 és C-3 helyzetű szekunder hidroxilcsoportokhoz. Az utóbbi oszlop normál fázisban sokkal hatékonyabbnak bizonyult, ami a szelektor CD-hez való kötés típusának és helyzetének fontosságát is mutatja. Ennek az érdekes viselkedésnek a tanulmányozása végett a szerzők további DNP- β -CD állófázisokat állítottak elő, melyek a kar hosszában és a hidroxilcsoportokhoz való kapcsolat helyzetében különböztek. Összehasonlítva a véletlen eloszlású éter vagy karbamoilcsoporton kapcsolódó állófázisokat, nem volt számottevő különbség a szelektivitásban. Azonban, ha az aromás gyűrű csak a C-2 illetve C-3 hidroxilcsoportokhoz kapcsolódott és a CD a C-6 primer hidroxilcsoporton keresztül volt kötve a szilikagélhez, akkor az éterkötést tartalmazó állófázis sokkal hatékonyabbnak bizonyult. A szelektor hatása mellett vizsgálták a vegyületek szerkezetének hozzájárulását is a királis megkülönböztetéshez. Megállapították, hogy a királis centrum és a funkciócsoport (jelen esetben fenilgyűrű) közötti kisebb távolság esetében könnyebb enantiomer elválasztást elérni [87].

A módosított CD-ek hatékonyak lehetnek olyan esetekben, amikor a királis vegyületet nemkirális (főleg aromás gyűrűt tartalmazó) származékképzővel reagáltatjuk. A származékképzési reakció során lehetőség van olyan molekularész bevitelére (pl. π -savas állófázis esetén π -bázisos származékképző alkalmazásával), ami további kölcsönhatásba léphet a módosított CD szelektorral, lehetővé téve a királis felismerést [88].

Az első királis ciklodextrin állófázis megjelenése óta eltelt 30 évben nagyon sokat fejlődött a CD-ek kromatográfiás alkalmazása. Ezen a területen tapasztalt fejlődés a CD-k sajátos kémiai tulajdonságának köszönhető, hiszen a gyűrű méretével és a hidroxilcsoportokhoz való funkciócsoportok kötésével számos eltérő tulajdonsággal rendelkező királis származék és állófázis állítható elő, ezáltal lehetővé téve nagyszámú királis vegyület elválasztását.

2.2. A hőmérséklet hatása a kromatográfiás és a királis kromatográfiás elválasztásra

A királis kromatográfiás retenciós mechanizmus kutatásának egyik lehetséges módja a kromatográfiás paraméterek hőmérsékletfüggésének vizsgálata és az ezekből számolt termodinamikai adatok értékelése.

2.2.1. A kromatográfiás elválasztás hőmérsékletfüggése

Számos közlemény jelent meg ebben a témában, az eredmények tükrében két ismert hatást emelnék ki.

Az első hatás a szelektivitási tényező (α) változásában figyelhető meg. Ez a *termodinamikai hatás*, Chen és mtsai. [89] illetve Zhu és mtsai. [90] mutattak rá, hogy a szelektivitási tényező általában csökken a hőmérséklet emelésével. Ez azért következik be, mert változtatva a hőmérsékletet a megoszlási hányados is változik, ami maga után vonja a szabadentalpia változását, miközben a megoszlás létrejön a két fázis között. Ionosan disszociáló mozgófázis, vagy minta esetén a disszociáló vegyület pK-ja is befolyásolható az eluensösszetétel, vagy a hőmérséklet változtatásával. A hőmérséklet hatása a szelektivitási tényezőre nem teljesen tisztázott, mivel nem ismerjük, hogyan változik a komponens entalpiája a mozgófázisból az állóba történő átmenet során [89,90].

A második hatás a mozgófázis viszkozitásának és ebből eredően a diffúziós állandónak a változása, amit *kinetikai hatásnak* nevezünk. A hőmérséklet emelésével az eluens viszkozitásának csökkenése az oldott anyag diffúziós állandójának növekedését vonja maga után mind a mozgó-, mind az állófázisban, amely a hatékonyságért felelős anyagátadási gátlást csökkenti. Természetesen a hőmérséklet emelésével a másodlagos kötések kialakulásának erőssége is csökken, így a királis felismerés mértékének csökkenése erősen függ a királis eredő kölcsönhatás nagyságától. További problémát jelenthet a hőmérséklet emelésével járó állófázis és/vagy a vizsgált molekula bomlása. A nagyobb hőmérséklet alkalmazásának korlátot szab adott áramlási sebesség mellett kialakuló nyomáson az eluens forráspontja, illetve az oszlop utáni nyomás kiegyenlítésből adódó forráspontcsökkenés is [91].

2.2.2. A van't Hoff egyenlet alkalmazása a kromatográfiában

Értékes információkat nyerhetünk a retenciós mechanizmusról, ha a retenció hőmérsékletfüggését vizsgáljuk. Természetesen ezek a termodinamikai adatok egyensúlyi rendszerekre igazak, mely feltétel nem teljesül a kromatográfiás folyamatokra, azonban megfelelő becslést tudnak nyújtani az elválasztási folyamatok értelmezésénél.

Egy, a termodinamikából ismert összefüggés kapcsolatot teremt a standard szabadentalpia változása és az egyensúlyi állandó (ami kromatográfiás retenció esetén a megoszlási hányados) között, miközben az adott komponens az egyik fázisból a másikba kerül:

$$RT \ln K = -\Delta G^\circ \quad (9)$$

Ismert még a standard szabadentalpia változás definíciója is a Gibbs függvényből:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (10)$$

ahol:

ΔH° = standard entalpiaváltozás,

ΔS° = standard entrópiaváltozás.

Ezt az előző egyenletbe helyettesítve:

$$\ln K = -\left(\frac{\Delta H^\circ}{RT} - \frac{\Delta S^\circ}{R}\right) = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (11)$$

Az egyensúlyi állandó egyenlő a retenciós faktor (k) és a fázisarány (Φ) hányadosával.

$$K = \frac{k}{\Phi} \quad (12)$$

Ha ezt az előző egyenletbe helyettesítjük, megkapjuk a kromatográfiában használt van't Hoff egyenletet:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \Phi \quad (13)$$

Ezen egyenlet szerint $\ln k$ -t $1/T$ függvényében ábrázolva egyenest kapunk, melynek meredeksége $-\Delta H^\circ/R$, tengelymetszete, pedig $\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$ (ha nem ismerjük az $\ln \Phi$ tagot, akkor a tengelymetszet R -el szorzott értékét $\Delta S^{0\ddagger} = R \Delta S^\circ + R \ln \Phi$ használjuk).

A fázisarány számítása: egy kromatográfiás oszlop fázisaránya, a mozgófázis térfogatának (V_m) és az állófázis térfogatának (V_s) aránya.

2.2.3. A van't Hoff egyenlet alkalmazása a királis kromatográfiában

Fontos következtetéseket tudunk levonni a királis megkülönböztetési mechnizmusról, ha megvizsgáljuk a két enantiomer standard szabadentalpia változásának a különbségét

$$\Delta G_2^\circ - \Delta G_1^\circ = \Delta(\Delta G^\circ). \quad (15)$$

A már ismert Gibbs-Helmholtz formulát

$$-\Delta G^\circ = RT \ln K, \quad (16)$$

az előző egyenletbe behelyettesítve a következő összefüggéshez jutunk:

$$-\Delta(\Delta G^\circ) = RT \ln (k_2/k_1). \quad (17)$$

Az α elválasztási tényező a két enantiomer csúcs egymáshoz viszonyított helyzetét adja meg.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (18)$$

a k_1 és a k_2 a két enantiomer retenciós faktorát jelöli. Az elválasztási tényezőt behelyettesítve a 17. egyenletbe a következő kifejezést kapjuk:

$$-\Delta(\Delta G^\circ) = RT \ln \alpha. \quad (19)$$

Az előző pontban megismert van't Hoff egyenlet (13) felhasználásával $\ln \alpha$ egyszerűsítések után kifejezhető a következő formulával:

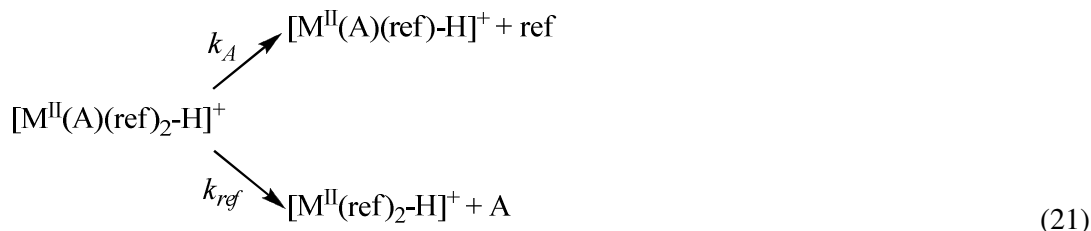
$$\ln \alpha = -\frac{\Delta(\Delta H^\circ)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S^\circ)}{R} \quad (20)$$

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

2.3. A tömegspektrometria alkalmazása a királis felismerésben

A tömegspektrometriában, a királis felismeréshez királis környezet szükséges, melyet királis molekulák (szelektorok) alkalmazásával biztosíthatunk. Többféle királis tömegspektrometriás módszer ismert, úgymint kinetikus módszer [92-105], rögzített-ligandum kinetikus módszer [102,105–108], ion/molekula reakciók (gazda/vendég komplexek) [109–111], valamint egyéb módszerek [112,113]. Ezek közül, a trimer

fémkomplexeken alapuló kinetikus módszer [92–95] a leggyakrabban alkalmazott természetes és szintetikus α - és β -aminosavak és királis gyógyszermolekulák analízisére [96–105]. Ebben a megoldásban, egyszeresen töltött trimer fémkomplexeket $[M^{II}(\mathbf{ref})_2(\mathbf{A})-H]^+$ képzünk és választunk ki. Ütközéssel indukált disszociáció során („collision-induced dissociation, CID”), a trimer-komplex ionok disszociálnak dimer komplexeket képezve (21), ahol \mathbf{A} a minta, M^{II} a kétértékű fémion és \mathbf{ref} a királis referencia anyag:



Az R és S enantiomerre vonatkozó R_R (22) és R_S (23) arányok a $[M^{II}(\mathbf{ref})(\mathbf{A}_{R \text{ vagy } S})-H]^+$ dimer és $[M^{II}(\mathbf{ref})_2-H]^+$ dimer hányadosából adódnak:

$$R_R = k_A/k_{ref} = [M^{II}(\mathbf{A}_R)(\mathbf{ref})-H]^+ / [M^{II}(\mathbf{ref})_2-H]^+ \quad (22)$$

$$R_S = k_A/k_{ref} = [M^{II}(\mathbf{A}_S)(\mathbf{ref})-H]^+ / [M^{II}(\mathbf{ref})_2-H]^+ \quad (23)$$

A királis szelektivitás ($R_{\text{királis}}$) az R és S enantiomerek R_R és R_S értékének a hányadosa:

$$R_{\text{királis}} = R_R/R_S = ([M^{II}(\mathbf{A}_R)(\mathbf{ref})-H]^+ / [M^{II}(\mathbf{ref})_2-H]^+) / ([M^{II}(\mathbf{A}_S)(\mathbf{ref})-H]^+ / [M^{II}(\mathbf{ref})_2-H]^+) \quad (24)$$

Abban az esetben amikor az $R_{\text{királis}}$ értéke eltér egytől, akkor királis felismerésről beszélhetünk. $R_{\text{királis}}$ értéke nagymértékben függ a minta és a referencia anyag szerkezetétől; általában a fémion hozzájárulása a királis felismeréshez sem hanyagolható el. A hárompontos kölcsönhatás kialakulása [104] szükséges a királis felismeréshez, ezért a minta, a királis referencia anyag és a fémion közti kölcsönhatások típusa és erőssége meghatározó jelentőségű [99–105]. Különböző α -aminosavak, mint minta és referencia anyagok viselkedését Cooks és *mtsai*. [96] részletesen vizsgálták és rámutattak, hogy a π - π „stacking” kölcsönhatás a referencia anyag aromás oldallánca és az aminosav karboxilcsoportja között meghatározó. Kumari és *mtsai*. [98] alifás, aromás és savas-jellegű aminosavak királis megkülönböztetését vizsgálták **L-Tyr** és jódozott **L-Tyr** királis referencia anyagok jelenlétében. A jódatomok jelenléte a referencia molekulában szterikus hatások eredményeként javította a királis felismerést. Kumari és *mtsai*. [98] elméleti számításokat felhasználva rámutattak, hogy a π - d „stacking” kölcsönhatás a referencia molekula fenilgyűrűje és a fémion között, valamint a jódatom és a fémion közti kölcsönhatás segíti a királis felismerést.

2.4. A β -laktám és β -aminosav származékok kémiai és biológiai jelentősége

A β -laktámok fontos kémiai (β -aminosav szintézis) és élettani (antibakteriális) tulajdonságuknak köszönhetően számos kutatás alapját képezik. A β -laktám antibiotikumok hatócsoportja a β -laktám gyűrű, az ehhez kapcsolódó oldalláncok (gyűrűk) határozzák meg a származék antibakteriális spektrumát, farmakokinetikáját és a vegyület stabilitását a baktériumok által termelt β -laktamáz enzimekkel szemben. Hatásmechanizmusok során a baktériumok sejtfalszintézisében résztvevő fehérjékhez kötődve gátolják a sejtfal felépítését, e fehérjéket nevezik penicillin-kötő fehérjéknek (penicillin binding protein - PBP). Biológiai aktivitásuk jelentősen függ sztereokémiai tulajdonságuktól, így királis azonosításuk, illetve elválasztásuk nagy jelentőséggel bír.

Az általunk vizsgált β -laktámok két csoportra oszthatók:

- ✂ 4-aril-szubsztituált-,
- ✂ kondenzált gyűrűs β -laktámok.

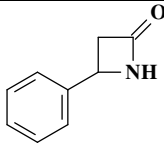
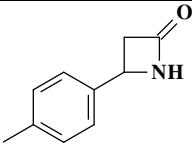
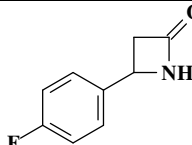
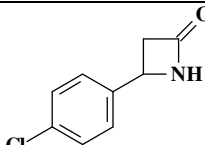
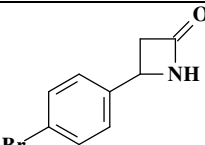
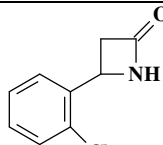
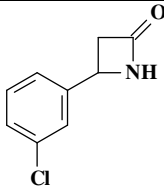
Különleges élettani hatásuknak köszönhetően a β -aminosavak kutatása az utóbbi tizenöt évben fellendült. Igazolt idegrendszeri aktivitással, receptor antagonistá és antitumor hatással bírnak. Természetesen a biológiai aktivitásuk felismerése magára vonta a szintetikus és analitikus kémikusok figyelmét is, nagyszámú publikációt eredményezve. Az aliciklusos β -aminosavak kiindulási anyagai a heterociklusos gyógyszerhatóanyagoknak. A peptidkémikusok számára is fontosak, hiszen konformációsán gátolt β -aminosavak beépítésével merevebb szerkezetű peptideket hozhatnak létre, lehetővé téve receptorokhoz való kötődésük tanulmányozását [114].

3. Kísérleti rész

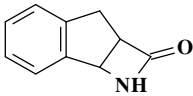
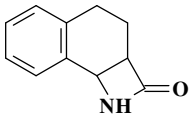
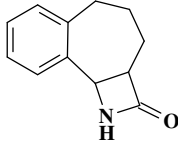
3.1. Vizsgált anyagok

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

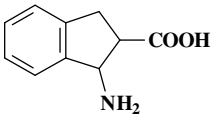
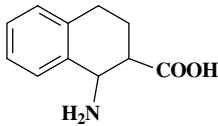
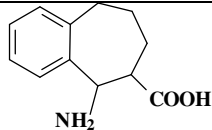
3.1. Táblázat. 4-Arilszubsztituált β -laktámok

		
1	2	3
4-fenilazetidin-2-on	4-(4-metilfenil)azetidin-2-on	4-(4-fluorfenil)azetidin-2-on
		
4	5	6
4-(4-klórfenil)azetidin-2-on	4-(4-brómfenil)azetidin-2-on	4-(2-klórfenil)azetidin-2-on
		
7		
4-(3-klórfenil)azetidin-2-on		

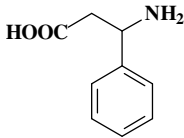
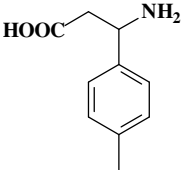
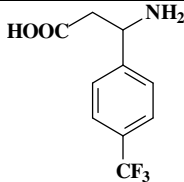
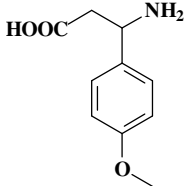
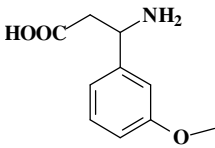
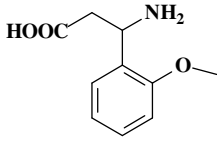
3.2. Táblázat. Kondenzált gyűrűs β -laktámok

		
8	9	10
benzo[e]1- azabicyclo[3.2.0]heptán-2- on	benzo[f]1- azabicyclo[4.2.0]oktán-2-on	benzo[e]1- azabicyclo[5.2.0]nonán-2-on

3.3. Táblázat. Kondenzált gyűrűs β -aminosavak

		
11	12	13
3-aminoindán-2-karbonsav	2- aminobenzo[c]ciklohexán- 1-karbonsav	2- aminobenzo[c]cikloheptán- 1-karbonsav

3.4. Táblázat. Aromás β^3 -aminosavak

		
14	15	16
3-amino-3-fenilpropánsav	3-amino-3-(4- metilfenil)propánsav	3-amino-3-(4- trifluormetilfenil)propánsav
		
17	18	19
3-amino-3-(4- metoxifenil)propánsav	3-amino-3-(3- metoxifenil)propánsav	3-amino-3-(2- metoxifenil)propánsav

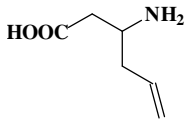
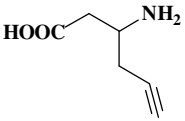
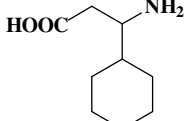
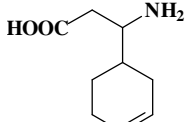
3.4. Táblázat (folytatás). Aromás β^3 -aminosavak

20	21	22
3-amino-3-(3,4-dimetoxifenil)propánsav	3-amino-3-(4-fluorfenil)propánsav	3-amino-3-[4-klór(fenil)]propánsav
23	24	25
3-amino-3-(3-klórfenil)propánsav	3-amino-3-(2-klórfenil)propánsav	3-amino-3-(3,4-diklórfenil)propánsav
26	27	28
3-amino-3-(4-brómfenil)propánsav	3-amino-3-(3-brómfenil)propánsav	3-amino-4-fenilbutánsav

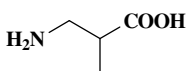
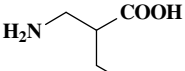
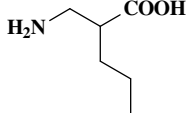
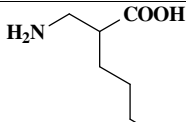
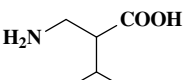
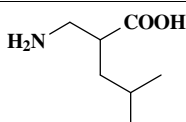
3.5. Táblázat. Alifás és aliciklusos β^3 -aminosavak

29	30	31
3-amino-butánsav	3-amino-pentánsav	3-amino-4-metilpentánsav
32	33	34
3-amino-4,4-dimetilpentánsav	3-amino-4-metilhexánsav	3-amino-4-etilhexánsav

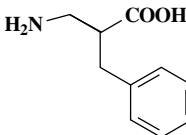
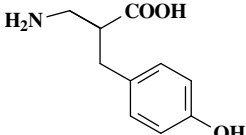
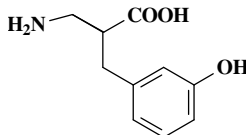
3.5. Táblázat (folytatás). Alifás és aliciklusos β^3 -aminosavak

		
35	36	37
3-aminohex-5-énsav	3-aminohex-5-ínsav	3-amino-3-ciklohexilpropánsav
		
38		
3-amino-3-(ciklohex-3-én-1-il)propánsav		

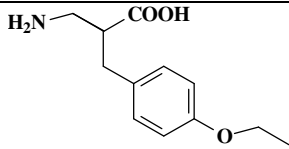
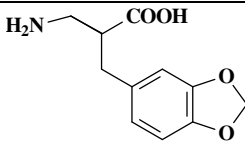
3.6. Táblázat. Alifás β^2 -aminosavak

		
39	40	41
3-amino-2-metilpropánsav	2-(aminometil)butánsav	2-(aminometil)pentánsav
		
42	43	44
2-(aminometil)hexánsav	2-(aminometil)-3-metilbutánsav	2-(aminometil)-4-metilpentánsav

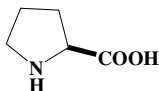
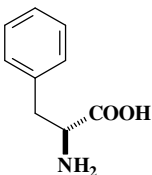
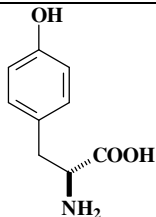
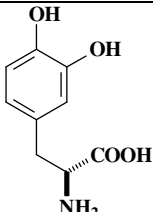
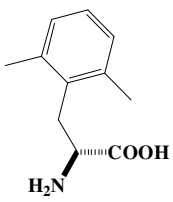
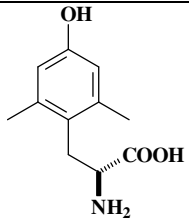
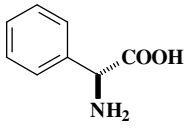
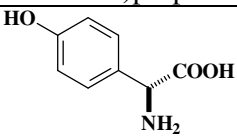
3.7. Táblázat. Aromás és heterociklusos β^2 -aminosavak

		
45	46	47
3-amino-2-benzilpropánsav	3-amino-2-(4-hidroxi-benzil)propánsav	3-amino-2-(3-hidroxi-benzil)propánsav

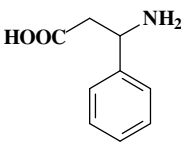
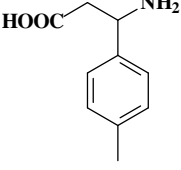
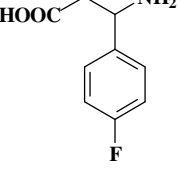
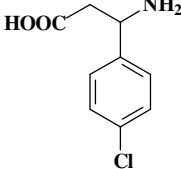
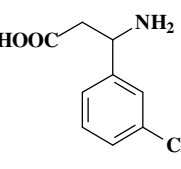
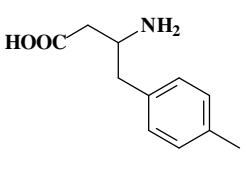
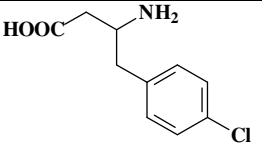
3.7. Táblázat (folytatás). Aromás és heterociklusos β^2 -aminosavak

	
48	49
3-amino-2-(4- etoxibenzil)propánsav	2-aminometil-3- (benzo[d]1,3-dioxolán-5-il)- propánsav

3.8. Táblázat. Tömegspektrometriás királis felismeréshez alkalmazott *referencia* anyagok (enantiomerek)

		
L-Pro	L-Phe	L-Tyr
(S)-pirrolidin-2- karbonsav	(S)-2-amino-3-fenilpropánsav	(S)-2-amino-3-(4- hidroxifenil)propánsav
		
L-DOPA	L-2',6'-diMePhe	L-2',6'-diMeTyr
(S)-2-amino-3-(3,4- dihydroxifenil)propánsav	(S)-2-amino-3-(2,6- dimetilfenil)propánsav	(S)-2-amino-3-(4-hidroxi- 2,6-dimetilfenil)propánsav
		
L-Phg	L-4'-OHPhg	
(S)-2-amino-2- fenilecetsav	(S)-2-amino-2-(4- hidroxifenil)ecetsav	

3.9. Táblázat. Tömegspektrometriás királis felismerésben alkalmazott aromás β^3 -aminosavak

		
50	51	52
3-amino-3-fenilpropánsav	3-amino-3-(4-metilfenil)propánsav	3-amino-3-(4-fluorfenil)propánsav
		
53	54	55
3-amino-3-(4-klórfenil)propánsav	3-amino-3-(3-klórfenil)propánsav	3-amino-4-(4-metilfenil)butánsav
		
56		
3-amino-4-(4-klórfenil)butánsav		

3.2. Felhasznált vegyszerek

Az alkalmazott HPLC tisztaságú oldószerek, metanol (MeOH), etanol (EtOH), propán-1-ol (PrOH), propán-2-ol (2-PrOH), bután-2-ol (2-BuOH), 2-metilpropán-2-ol (t-BuOH), acetonitril (MeCN) Merck (Darmstadt, Németország), a HPLC tisztaságú ecetsav (AcOH) Scharlau Chemie S. A., (Barcelona, Spanyolország) gyártmányúak voltak.

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

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

3.3. Alkalmazott berendezések

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

A folyadékkromatográf a következő egységekből épült fel: Waters 1525 bináris HPLC-pumpa, 2487 kétcsatornás UV-VIS detektor, Breeze adatfeldolgozó rendszer (Waters, Milford, MA, USA), Rheodyne 7125 20 µl-es mintaadagoló (Cotati, CA, USA), MK 70 termosztát (Mechanik Prüfgerate Medlingen Németország).

A tömegspektrometriás mérésekhez Bruker Esquire 3000 plus kvadrupol-ioncsapda (QIT) tömegspektrométert és Bruker Daltonics Compass 1.1 MS vezérlő és adatfeldolgozó szoftvert alkalmaztunk (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Németország).

A tömegspektrométer pozitív „elektroporlasztásos ionizációs” módban (ESI) működött, a következő paraméterekkel: a mintát közvetlenül vezettük a tömegspektrométerbe 2,5 µL perc⁻¹ áramlási sebességgel. A bemeneti kapilláris feszültség -4,0 kV; „end plate” -3,5 kV; a „skimmer” feszültség 46,5 V; oktopol 1 dc 4,73 V; oktopol 2 dc 2,43 V; és oktopol RF amplitudé 258 V. 100–990 *m/z* tömegtartomány; maximális gyűjtési idő, 20 ms; maximális ion szám, (ICC) 20 000. Porlasztó és szárító gáz, 250 °C-os N₂; ütközési gáz, He. CID mérés alatt mind a prekursor ion izolálása mind a fragmentációs ablak szélessége 3,0 *m/z* volt. Az ütközési feszültség 0,17–0,40 V között változott optimalizálva minden egyes komplexre. Azonos enantiomerpárra azonos fragmentációs feszültséget alkalmaztunk.

3.4. Alkalmazott folyadékkromatográfias oszlopok.

A makrociklusos glikopeptid alapú oszlopok: Chirobiotic™ V (**V**), királis szelektora vankomicin, Chirobiotic™ VAG (**VAG**), királis szelektora vankomicin aglikon, Chirobiotic™ T (**T**), királis szelektora teicoplanin, Chirobiotic™ TAG (**TAG**) királis szelektora teicoplanin aglikon, Chirobiotic™ R (**R**), királis szelektora ristocetin A. Az oszlopok méretei és gyártói megegyeznek, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm szemcseátmérő (Astec, Whippany, USA).

Koronaéter alapú királis oszlopok: (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav királis szelektort tartalmazó két oszlopot használtunk, a **Korona 1** (2.9. ábra) és a **Korona 2** (2.11. ábra). Szintézis módjából adódóan a **Korona 1** szabad szilanolcsoporttal rendelkezik, a **Korona 2** esetén nincs szabad szilanolcsoport (az oxigén éterkötés formájában van). A két oszlop mérete és gyártója megegyezik, 150 mm × 4,0 mm, 5 µm szemcseátmérő (Myung Ho Hyun, Pusan National University, Busan, Dél-Korea).

Ciklodextrin alapú oszlopok: Cyclobond I 2000 DMP (**DMP**), királis szelektora 3,5-dimetilfenilkarbamoil- β -ciklodextrin. Az oszlopok mérete és gyártója: 250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m szemcseátmérő (Astec, Whippany, USA).

4. Kísérleti eredmények és értékelésük

Az eredmények bemutatása három részre tagolódik az irodalmi összefoglalóban tárgyalt állófázisok sorrendjét követve. A jobb és egyszerűbb áttekinthetőség érdekében, a kísérleti részben bevezetett rövidítéseket és a vizsgált vegyületek számozási rendszerét használok, illetve csak a magyarázatok értelmezéséhez szükséges adatok közlésére szorítokozom. Az összes mérési eredmény a feldolgozott közleményekben megtalálható.

4.1. Elválasztások makrociklusos glikopeptid és ciklodextrin alapú királis állófázisokon

4.1.1. A 4-Arilszubsztituált β -laktámok elválasztása Chirobiotic T és TAG állófázison

A 4-arilszubsztituált β -laktámok (**1-7**) (*N*-peptidil származékai szerint proteáz, elasztáz és cisztein proteáz papain inhibitorok) [115], a laktám gyűrű mellett egy fenilgyűrűt is tartalmaznak (**3.1. Táblázat**). Az **1** vegyület esetén a fenilgyűrű nem szubsztituált szemben a **2-7** β -laktámokkal, így összehasonlítási alapként használható a szubsztituens kromatográfiás hatásának vizsgálatára. Méréseink kiterjedtek a szelektor minősége (**T**, **TAG**), az eluensösszetétel és a hőmérséklet hatásának tanulmányozására is.

β -laktámok kromatográfiás viselkedését két oszlopon (**T** és **TAG**), illetve két eluensösszetétel mellett 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 60/40 (v/v) és MeOH = 100% vizsgáltuk, (**4.1. táblázat**) továbbá a hőmérsékletfüggés hatását 278-318 K tartományban tanulmányoztuk. Mind a két állófázison sikerült a hét vegyületet alapvonalra elválasztani. Az enantiomerek elúciós sorrendjének meghatározásakor minden esetben az *S* enantiomer eluálódott elsőként, (az **5** minta esetében, tiszta enantiomer hiányában nem tudtuk az elúciós sorrendet meghatározni).

Mind a két állófázisnál egységesen a puffert tartalmazó eluens alkalmazása esetén nagyobb k' értékeket tapasztaltunk, mint 100% MeOH alkalmazásakor, ami az ionos kölcsönhatások meghatározó szerepére utal a visszatartásban. Ez a különbség **TAG** oszlop alkalmazása esetén jelentősebb, sok esetben meghaladja a 4-5-szörös retenciós faktor

különbséget. Ez a viselkedés megfelel *Berthod* és *mtsai*. [21] által kation jellegű aminosavak vizsgálatakor az eluens pH csökkentésénél tapasztalt nagyobb visszatartásnak. A β -laktámok kationos jellegűek, a gyűrűben levő nitrogén képes protonálódni, ikerionos illetve anionos állapot nem alakulhat ki, mivel szabad karboxilcsoportot és aminocsoportot nem tartalmaznak. Az alkalmazott pH=4,1 mellett az ikerionos állófázis karboxilcsoportjával a β -laktám protonált aminocsoportja ionos kölcsönhatásba tud lépni.

Az eluens összetételének hatását a kromatográfiás paraméterekre a **2** és **4** vegyület esetén vizsgáltuk. A retenciósfaktor, a szelektivitási tényező és a felbontás változását a **T** és **TAG** állófázisokon a **4.1. ábra** szemlélteti.

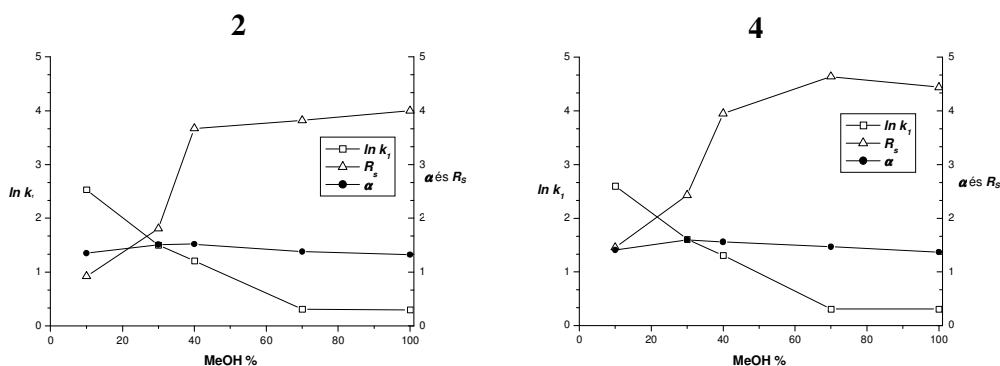
4.1. Táblázat. A 4-aril-szubsztituált β -laktámok kromatográfiás paraméterei (k_I' , α és R_S) és az enantiomerek elúciós sorrendje Chirobiotic **T** és **TAG** oszlopon

Vegyület	KÁF	Mozgófázis	k_I'	α	R_S	Elúciós sorrend
1	T	a	2,79	1,48	4,64	$S < R$
	T	b	1,39	1,30	3,60	$S < R$
	TAG	a	10,04	1,69	3,31	$S < R$
	TAG	b	1,99	1,49	4,46	$S < R$
2	T	a	3,34	1,52	3,67	$S < R$
	T	b	1,35	1,32	4,00	$S < R$
	TAG	a	12,51	1,78	4,21	$S < R$
	TAG	b	1,84	1,68	6,50	$S < R$
3	T	a	2,63	1,64	4,59	$S < R$
	T	b	1,30	1,40	4,67	$S < R$
	TAG	a	8,10	1,99	5,56	$S < R$
	TAG	b	1,78	1,65	6,67	$S < R$
4	T	a	3,69	1,56	3,95	$S < R$
	T	b	1,36	1,37	4,44	$S < R$
	TAG	a	13,44	2,03	6,27	$S < R$
	TAG	b	1,95	1,76	6,96	$S < R$
5	T	a	3,42	1,52	2,78	*
	T	b	1,37	1,36	3,64	*
	TAG	a	16,19	1,99	3,91	*
	TAG	b	1,94	1,73	5,73	*
6	T	a	3,32	1,46	3,14	$S < R$
	T	b	1,20	1,23	2,56	$S < R$
	TAG	a	13,16	1,63	3,84	$S < R$
	TAG	b	1,66	1,73	6,44	$S < R$
7	T	a	3,50	1,39	3,00	$S < R$
	T	b	1,25	1,17	1,89	$S < R$
	TAG	a	12,31	1,63	4,28	$S < R$
	TAG	b	1,89	1,34	4,00	$S < R$

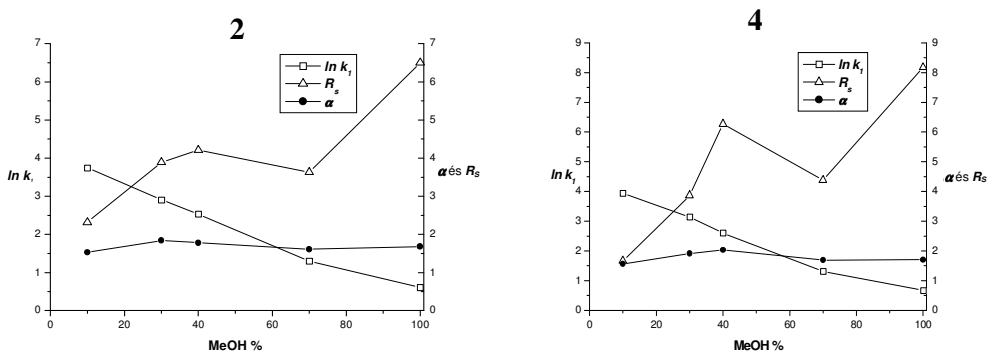
Kromatográfiás körülmények: királis állófázis (**KÁF**), Chirobiotic T (**T**) és Chirobiotic TAG (**TAG**); eluens, **a**, 0,1% TEAA (pH 4,1)/MeOH=60/40 (v/v), **b**, 100% MeOH; detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K; * nincs elúciós sorrend meghatározás.

Mindkét állófázisnál és vegyületnél a mozgófázisban a szerves komponens arányának növelésével a visszatartás csökkenése figyelhető meg, ami megfelel a klasszikus fordított fázisú viselkedésnek. A szelektivitási tényező 30-40% MeOH-tartalom mellett maximumot mutatott. A felbontás a **T** oszlopnál telítési görbe szerint alakult, a **TAG** oszlop esetében a szerves komponens növelésével végső soron 100% MeOH-tartalomig egy folyamatos növekedés volt megfigyelhető (a 70% MeOH-tartalomnál bekövetkező csökkenésre nem találtunk érdemi magyarázatot).

T



TAG



4.1. ábra

Az eluensösszetétel hatása a kromatográfiai paraméterekre 2 és 4 vegyületek esetén T és TAG oszlopokon

Kromatográfiai körülmények: oszlop, Chirobiotic T (T) és Chirobiotic TAG (TAG); eluens, 0,1% TEAA (pH 4,1)/MeOH (v/v), detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

Az enantiomerek szerkezeti hozzájárulását vizsgálva megállapítható, hogy a metil-, klór- és brómszubsztituensek jelenléte a β -laktám aromás gyűrűjén egységesen visszatartás növekedést eredményeztek a szubsztituálatlan **1** vegyülethez képest. Amíg a klór szubsztituensek helyzete a visszatartást jelentősen nem befolyásolja, addig a szelektivitásban és felbontásban eltérés figyelhető meg. A királis felismerési folyamatban

egységesen legkedvezőbbnek a *para*-helyzetű szubsztitúció bizonyult mind a két állófázis esetén. A *meta*-szubsztituált **7** vegyület esetén figyelhető meg a legkisebb szelektivitás és felbontás utalva a kedvezőtlen sztérikus hozzájárulásra. A szubsztituensek helyzetéből adódó eltérő szelektivitás és felbontás értékek valószínűleg Guiochon és mtsai [116] által adszorpciós izotermák felvételével meghatározott nem-enantioszelektív (I.) és enantioszelektív (II.) adszorpciós kötőhelyekkel magyarázhatóak. Az I. típusú nem-enantioszelektív helyeken az elektrosztatikus, H-híd, poláris, van der Waals és diszperziós kölcsönhatások a meghatározóak. A II. típusú enantioszelektív kötőhelyek vesznek részt a királis felismerési folyamatban. Esetünkben a klór szubsztituens helyzete az aromás gyűrűn az enantioszelektív kötőhelyekkel kialakított kölcsönhatásokban játszhat jelentős szerepet.

A királis szelektor szerkezete szintén jelentősen befolyásolja a királis megkülönböztetési folyamatot. A **T** szelektor esetében kisebb szelektivitást és felbontást kaptunk, mint a **TAG** oszlop esetén, ami a cukorrészek sztérikus gátló hatásával magyarázható. Az irodalmi részben már említett van't Hoff összefüggés alapján az $\ln\alpha$ - $1/T$ függvény meredekségéből és tengelymetszetéből számolt standard entalpiaváltozás különbség $\Delta(\Delta H^\circ)$, standard entrópiaváltozás különbség $\Delta(\Delta S^\circ)$ és standard szabadentalpia változás különbség $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek segítséget nyújtanak a királis megkülönböztetési folyamatok értelmezésében. Ha a vizsgált hőmérséklettartomány nem túl nagy [116] és a $\Delta(\Delta H^\circ)$ konstans az adott hőmérséklettartományon belül, az $\ln\alpha$ - $1/T$ 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 nyújt arról, hogy mennyire kedvezményezett a folyamat, amely során 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 állófázishoz való kötődés során. A negatívabb $\Delta(\Delta H^\circ)$ nagyobb energia felszabadulással járó (exoterm) átmenetre utal a nagyobb retencióval rendelkező (másodikként eluálódó) enantiomerre nézve, azaz erősebb kölcsönhatás alakul ki az állófázissal. Természetesen a kialakuló kölcsönhatás a rendezettségben bekövetkező változást is magával vonja, negatív $\Delta(\Delta S^\circ)$ eredményezve. Általánosan elmondható, hogy az alacsony hőmérséklet kedvez az intermolekuláris kölcsönhatások kialakulásának, azonban néhány esetben az asszociációt megelőző deszolvatációs folyamatok pozitív $\Delta(\Delta S^\circ)$ eredményeznek. Ezekben az esetekben az enantioszelektivitás magasabb hőmérsékleten kedvezőbb lesz.

A királis szelektor hozzájárulását vizsgálva az enantioszelektivitáshoz, korábbi kutatások rámutattak arra, hogy a cukorrészek a királis felismerési folyamatban betöltött szerepe összetett. Egyrésztől gátolhatják a királis felismerést, oly módon, hogy a cukorrészek elfedik a makrociklusos üregeket, illetve az elektrosztatikus kölcsönhatások kialakítására képes aminos- és karboxilcsoportokat. Másrésztől viszont segíthetik a királis megkülönböztetést, hiszen a cukorrészek számos kiralitás centrum és hidrogénkötések kialakítására alkalmas csoport van.

A hőmérsékletfüggés méréséhez 100% MeOH-tartalmú eluent választottunk- 278-318 K hőmérséklettartományban mértük az enantiomerek kromatográfiás adatait és az $\ln k-1/T$ ábrázolásból nyert termodinamikai adatokat a **4.2. Táblázatban** foglaltam össze. Amint a bemutatott korrelációs együtthatók bizonyítják, a kapott függvények megfelelő jósággal leírhatók voltak egy-egy egyenes egyenletével. Az enantioszelektivitást jellemző $-\Delta(\Delta H^\circ)$, $-\Delta(\Delta S^\circ)$ és $-\Delta(\Delta G^\circ)$ értékekből az alábbi általános következtetések vonhatóak le. A számolt $\Delta(\Delta G^\circ)$ 298 K-en a **T** és a **TAG** állófázisokra -0,4--0,9 illetve -0,7--1,4 kJ/mol tartományba esnek (**4.2. Táblázat**), és mind a hét vegyület esetében nagyobbak voltak **TAG** állófázison. Összefoglalóan megállapítható, hogy a vizsgált β -laktámoknál a cukorrészek kedvezőtlenül befolyásolták a királis megkülönböztetési folyamatot.

4.2. Táblázat. A 4-aril-szubsztituált β -laktámok termodinamikai paraméterei, $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$, $\Delta(\Delta G^\circ)_{298\text{K}}$, és az $\ln \alpha-1/T$ függvény korrelációs koefficiense (szórásnégyzete, R^2)

Vegyület	T			
	$-\Delta(\Delta H^\circ)$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta(\Delta S^\circ)$ (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	$-\Delta(\Delta G^\circ)_{298\text{K}}$ (kJ mol ⁻¹)	R^2
1	3,8	10,5	0,6	0,995
2	4,0	11,2	0,7	0,995
3	5,3	14,8	0,9	0,996
4	4,8	13,3	0,8	0,997
5	4,3	12,0	0,8	0,998
6	1,8	4,2	0,5	0,999
7	2,0	5,4	0,4	0,991
Vegyület	TAG			
	$-\Delta(\Delta H^\circ)$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta(\Delta S^\circ)$ (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	$-\Delta(\Delta G^\circ)_{298\text{K}}$ (kJ mol ⁻¹)	R^2
1	3,8	9,4	1,0	0,998
2	4,6	11,0	1,3	0,999
3	5,1	12,6	1,3	0,963
4	5,4	13,7	1,4	0,975
5	4,2	9,6	1,4	0,997
6	4,2	9,8	1,3	0,991
7	2,2	5,0	0,7	0,995

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Chirobiotic T (**T**) és Chirobiotic TAG (**TAG**); eluens, 100% MeOH; detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 278–318 K.

Természetesen nemcsak a szelektor, hanem a vizsgált vegyületek szerkezeti hozzájárulásával is számolni kell. Összehasonlítva a $-\Delta(\Delta H^\circ)$ különbségeket a **2, 3, 4, 5** vegyületek esetében nagyobb értékeket kapunk, szemben a szubsztituálatlan **1** β -laktámmal, amely a *para*-helyzetű szubsztituensek kedvező hozzájárulását mutatja a királis felismerésre. Az *orto*- és a *meta*-klór-szubsztituált **6** és **7** vegyület esetében kisebb $-\Delta(\Delta H^\circ)$ -t kaptunk összehasonlítva a *para*-klór-szubsztituált **4** vegyülettel mind a két állófázis esetében. A kisebb $-\Delta(\Delta H^\circ)$ arra utal, hogy az enantioszelektív kölcsönhatások **6** és **7** vegyület esetében jóval gyengébbek.

Összefoglalásként elmondható, hogy a makrociklusos glikopeptid alapú **T** és **TAG** királis állófázisokon a hét vizsgált aromás β -laktám enantiomerjeit sikerült alapvonalra elválasztani. Az enantiomerek elúciós sorrendje *S*<*R* volt, (az **5** vegyület esetén nem állt rendelkezésre tiszta enantiomer a meghatározáshoz). Összehasonlítva a két oszlopot a **TAG** hatékonyabbnak bizonyult, nagyobb szelektivitási tényező és felbontás értékeket kaptunk.

Vizsgáltuk az eluensösszetétel és a hőmérséklet hatását a királis elválasztásra. A szerves komponens növelésével jelentősen csökkent a visszatartás mind a két vizsgált oszlopnál. A szelektivitási tényező enyhe maximum görbe szerint változott, a felbontás 100% MeOH esetén volt a legjobb. A hőmérsékletváltozás adataiból termodinamikai paramétereket számoltunk, amelyek a királis felismerési folyamatban a szelektorok és a vizsgált vegyületek szerkezeti hozzájárulása közötti kapcsolat értelmezését segítették. Az **1-7** vegyületek kiválasztott kromatogramjai a **10.1. Függelékben** találhatóak.

4.1.2. Kondenzált gyűrűs β -laktámok és β -aminosavak elválasztása *Chirobiotic T, TAG, V, VAG és Cyclobond DMP oszlopokon*

Ebben a fejezetben három triciklusos β -laktám (**8-10**) és három biciklusos β -aminosav (**11-13**) enantiomerjeinek kromatográfiás viselkedését tárgyalom (**3.2. Táblázat**). Mind a hat vegyület *cis*-izomer. Öt makrociklusos glikopeptid teicoplanin (**T**), teicoplanin aglikon (**TAG**), vankomicin (**V**), vankomicin aglikon (**VAG**), ristocetin A (**R**) és 3,5-dimetilfenilkarbamoil β -ciklodextrin (**DMP**) királis szelektort tartalmazó állófázisokon történtek a vizsgálatok fordított fázisú, poláris-szerves és poláris-ionos körülmények között. A vizsgálataink kiterjedtek az eluensösszetétel és a hőmérsékletfüggés tanulmányozására is.

A két vegyületcsoport fordított fázisú analízisében érdekes viselkedés figyelhető meg a retenció faktorok tekintetében. A β -laktámok esetében a szerves komponens növelésével a mozgófázisban csökken a visszatartás a makrociklusos glikopeptid alapú állófázisokon, hasonlóan az előző fejezetben tárgyalt hét β -laktámhoz, ami megfelel a klasszikus fordított fázisú viselkedésnek (nem bemutatott eredmények). A β -aminosavak vizsgálatakor ezzel ellentétes hatást figyeltünk meg. Ez azzal magyarázható, hogy nagy MeOH-tartalomnál (>70%) az aminosavak oldhatósága csökken a MeOH-tartalom további növelésével, így az állófázissal való kölcsönhatás válik kedvezményezetté.

Az egyes oszlopok összehasonlításakor, fordított fázisú elválasztásoknál 0,1% TEAA (pH 6,5)/MeOH=10/90 (v/v) eluensösszetételnél az elsőként eluálódó enantiomerek retenció faktoraira **T** oszlop esetében a **8-10** vegyületeknél 0,87-1,00, **11-13** vegyületeknél 2,89-3,31 értékeket kaptunk (**4.3. Táblázat**). Hasonló tendenciát figyeltünk meg **TAG** állófázis alkalmazásakor 0,1% TEAA (pH 6,5)/MeOH=30/70 (v/v) eluensösszetételnél, a k_1' értékek β -laktámokra 1,57-1,81 a β -aminosavakra 2,89-3,58 között változtak. A β -laktámok esetén tapasztalt kisebb visszatartás a hasonló szerkezetű aminosavakhoz viszonyítva a szabad amino- és karboxilcsoportok hiányával magyarázható, amelyek az ionos kölcsönhatások kialakításáért felelősek, továbbá a laktámgyűrű létrejöttével a hármas gyűrűs szerkezet sztérikusan már kedvezőtlen a szelektor zsebeiben való illeszkedéshez. Ezt támasztja alá, a **TAG** oszlopon tapasztalt nagyobb visszatartás, ahol nem érvényesül a cukorrészek sztérikus gátló hatása. A **4.3. Táblázat** adatai szerint a k_1' értékek **TAG** oszlopon minden esetben nagyobbak voltak, mint **T** oszlopon.

4.3. Táblázat. Triciklusos β -laktámok és biciklusos β -aminosavak kromatográfiás paraméterei (k_I' , α , R_S), szabadentalpiaváltozás különbség értékei ($\Delta(\Delta G^\circ)_{298K}$) valamint az enantiomerek elúciós sorrendje Chirobiotic **T**, **TAG**, **V**, **VAG**, **R** és Cyclobond **DMP** oszlopokon fordított fázisú elválasztások esetén

Vegyület	KÁF	Mozgófázis	k_I'	α	R_S	$-\Delta(\Delta G^\circ)_{298K}$ (kJ mol ⁻¹)	Elúciós sorrend
8	T	a	0,98	1,19	1,71	0,40	1R,5R<1S,5S
	TAG	b	1,81	1,46	2,81	0,90	1R,5R<1S,5S
	DMP	d	3,52	1,10	1,76	0,20	1R,5R<1S,5S
9	T	a	0,89	1,00	0,00	0,00	-
	TAG	b	1,57	1,00	0,00	0,00	-
	DMP	d	4,77	1,14	2,46	0,30	1R,6R<1S,6S
10	T	a	0,87	1,07	0,70	0,20	1R,7R<1S,7S
	TAG	b	1,64	1,63	4,00	1,20	1R,7R<1S,7S
	DMP	d	6,86	1,05	0,88	0,10	1R,7R<1S,7S
11	T	a	3,31	1,03	0,50	0,10	1R,2R<1S,2S
	TAG	b	3,21	1,17	1,14	0,40	1R,2R<1S,2S
	DMP	c	0,72	1,24	1,49	0,50	1S,2S<1R,2R
12	T	a	3,12	1,27	2,85	0,60	1R,2R<1S,2S
	TAG	b	3,58	1,70	5,00	1,30	1R,2R<1S,2S
	TAG	c	2,82	1,33	3,43	0,70	1R,2R<1S,2S
13	T	a	2,89	1,37	4,00	0,80	1R,2R<1S,2S
	TAG	b	3,80	1,33	2,57	0,70	1R,2R<1S,2S
	V	a	0,81	1,68	3,47	1,30	1R,2R<1S,2S

Kromatográfiás körülmények: oszlop (**KÁF**), Chirobiotic **T** (**T**), Chirobiotic **TAG** (**TAG**), Chirobiotic **V** (**V**), Chirobiotic **VAG** (**VAG**) és Cyclobond **DMP** (**DMP**); eluens, **a**, 0,1% TEAA (pH 6,5)/MeOH=10/90 (v/v), **b**, 0,1% TEAA (pH 6,5)/MeOH=30/70 (v/v), **c**, 0,1% TEAA (pH 6,5)/MeOH=55/45 (v/v), **d**, 0,1% TEAA (pH 6,5)/MeOH=60/40 (v/v), detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

β -Laktámok és β -aminosavak esetében **8<9<10** és **11<12<13** sorrendben változik a hidrofób jelleg. Fordított fázisú elválasztás folyamán egy adott oszlopon és eluensösszetételnél a vegyületek hidrofób jellegének hozzájárulását vizsgálva a retenció kialakulásához és a két vegyületcsoportot összehasonlítva, a kevésbé hidrofób β -aminosavak esetében a **13** vegyületnél, míg a β -laktámoknál a **8** vegyület esetében tapasztaltuk a legnagyobb visszatartást. Ez a jelentős különbség a két vegyületcsoport között az állófázissal kialakult kölcsönhatások különbségéből adódhat, a β -aminosavak esetében nem a hidrofób jelleg, hanem az amino- és karboxilcsoportok elektrosztatikus kölcsönhatása az állófázissal lehet a meghatározó.

A poláris-szerves (100% MeOH) és a poláris-ionos mérések (MeOH/AcOH/TEA=100/0,01/0,01 (v/v/v)) összehasonlításakor (**4.4. táblázat**) a poláris-ionos módban nagyobb visszatartást figyeltünk meg mind a β -laktámok, mind a β -

aminosavak esetében, ez a különbség **TAG** oszlopon még jelentősebb. Például a **10** vegyületnél **T** ($k_1'=6,33$), **TAG** ($k_1'=9,44$) értékeket kaptunk. A **V** és **VAG** oszlopoknál is a fentihez hasonló tendenciát tapasztaltunk. Sav illetve bázis jelenléte az eluensben meghatározza az aminosavak és a szelektor karboxil- és aminocsoportjának, és az állófázison található szabad szilanolcsoportok protonáltsági állapotát is, így befolyásolják a létrejövő elektrosztatikus kölcsönhatások kialakulását és erősségét. Az eluensben az ecetsav mennyiségének 0,01 %-ról 0,1 %-ra növelésével és a TEA 0,01 % értéken tartásával retenciós idő csökkenést figyeltünk meg, ami a karboxilcsoportok protonálódásának növekedésével magyarázható.

Poláris-ionos módban adott eluensösszetételnél (MeOH/AcOH/TEA=100/0,01/0,01 (v/v/v)) a **13** vegyületre kapott k_1' értékeket összehasonlítva különböző oszlopokon, **T** ($k_1'=4,66$), **TAG** ($k_1'=8,55$), **V** ($k_1'=1,32$), **VAG** ($k_1'=1,60$) és **R** ($k_1'=2,57$), a **V** és **VAG** esetében kaptuk a legkisebb visszatartást. Ez azzal magyarázható, hogy a **V** és **VAG** három makrociklusa által formált kisebb kosárban nem tud megfelelően illeszkedni a viszonylag nagy térkitöltésű biciklusos aminosav, szemben a **T** illetve **TAG** négy makrociklusa által létrehozott nagyobb kosarával. A **V** és **VAG** oszlopok esetében kapott retenciós faktorokat ($k_1'=1,32$, $k_1'=1,60$) összehasonlítva nem kaptunk jelentős különbségeket, így kijelenthető, hogy a cukorrészek árnyékoló hatása itt kevésbé érvényesül. A risztocetin A szelektort tartalmazó **R** oszlop esetében tapasztalt kisebb k_1' a **T** és **TAG** oszlopokhoz viszonyítva az állófázis polárisabb jellegével (több cukorrész, nincs nonillánc), illetve a szabad karboxilcsoport hiányával magyarázható.

A királis elválasztásra jellemző szelektivitási értékeket megvizsgáltuk a β -laktám és β -aminosav enantiomerek fordított fázisú elválasztása esetén (**4.3. táblázat**). Amíg a β -laktámokra Chirobiotic **T** oszlopon 1,19; 1,00; 1,07, addig **TAG** esetében 1,46; 1,00 és 1,63 szelektivitási tényezőket kaptunk. Ezzel szemben β^3 -aminosavaknál Chirobiotic **T** oszlopon 1,03; 1,27; 1,37 és **TAG** oszlopon 1,17; 1,70; 1,33 értékeket kaptunk. Elmondható, hogy mindkét vegyületcsoportnál, a **13** β -aminosav esetén nem jelentős az eltérés, a **TAG** bizonyult hatékonyabbnak. A fentiekhez hasonló eredményt kaptunk **V** és **VAG** oszlopok esetében is.

Irodalmi adatok alapján várható volt, hogy a PIM alkalmazása α -aminosavak esetében **T** és **TAG** állófázisokon jelentős szelektivitás javulást eredményez [16].

4.4. Táblázat. Triciklusos β -laktámok és biciklusos β -aminosavak kromatográfiás paraméterei (k_1' , α , R_s), szabadentalpiaváltozás különbség értékei ($\Delta(\Delta G^\circ)_{298K}$) valamint az enantiomerek elúciós sorrendje Chirobiotic **T**, **TAG**, **V**, **VAG**, **R** és Cyclobond **DMP** oszlopokon poláris-szerves és poláris-ionos elválasztások esetén

Vegyület	KÁF	Mozgófázis	k_1'	α	R_s	$-\Delta(\Delta G^\circ)_{298K}$ (kJ mol ⁻¹)	Elúciós sorrend
8	T	a	1,00	1,15	0,70	0,3	1R,5R<1S,5S
	T	b	1,00	1,16	1,17	0,4	1R,5R<1S,5S
	TAG	a	1,27	1,76	4,57	1,4	1R,5R<1S,5S
	TAG	b	1,36	1,74	5,54	1,4	1R,5R<1S,5S
9	T	a	0,87	1,00	0,00	0,0	-
	T	b	0,95	1,00	0,00	0,0	-
	TAG	a	1,09	1,09	1,09	0,2	1R,6R<1S,6S
	TAG	b	1,12	1,08	0,50	0,2	1R,6R<1S,6S
	R	b	0,19	1,21	0,52	0,5	-
10	T	a	0,88	1,09	0,77	0,2	1R,7R<1S,7S
	T	b	0,95	1,08	<0,40	0,2	1R,7R<1S,7S
	T	c	0,95	1,08	0,80	0,2	1R,7R<1S,7S
	TAG	a	1,11	1,58	3,56	1,1	1R,7R<1S,7S
	TAG	b	1,13	1,60	1,79	1,2	1R,7R<1S,7S
	TAG	c	1,14	1,59	2,93	1,1	1R,7R<1S,7S
11	T	a	6,24	1,06	0,68	0,1	1R,2R<1S,2S
	T	b	6,41	1,06	0,76	0,1	1R,2R<1S,2S
	TAG	a	6,33	1,11	0,67	0,3	1R,2R<1S,2S
	TAG	b	9,44	1,10	0,98	0,2	1R,2R<1S,2S
	TAG	c	8,20	1,11	1,00	0,3	1R,2R<1S,2S
	R	a	2,41	1,16	0,86	0,4	1R,2R<1S,2S
	R	b	1,92	1,18	1,08	0,4	1R,2R<1S,2S
	V	b	0,99	1,09	0,91	0,2	1S,2S<1R,2R
VAG	b	1,05	1,13	1,67	0,3	1S,2S<1R,2R	
12	T	a	5,02	1,25	1,95	0,6	1R,2R<1S,2S
	T	b	5,19	1,34	2,10	0,7	1R,2R<1S,2S
	TAG	a	6,03	1,90	4,33	1,6	1R,2R<1S,2S
	TAG	b	7,84	1,71	3,85	1,3	1R,2R<1S,2S
	TAG	c	6,77	1,77	3,92	0,4	1R,2R<1S,2S
	R	a	2,80	1,78	4,25	1,4	1S,2S<1R,2R
	R	b	2,32	1,92	4,00	1,6	1S,2S<1R,2R

Kromatográfiás körülmények: oszlop, Chirobiotic T (**T**), Chirobiotic TAG (**TAG**), Chirobiotic V (**V**) és Chirobiotic VAG (**VAG**); eluens, **a**, MeOH 100%, **b**, MeOH/AcOH/TEA=100/0,01/0,01 (v/v/v) és **c**, MeOH/AcOH/TEA=100/0,1/0,01 (v/v/v); detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

4.4. Táblázat (folytatás). Triciklusos β -laktámok és biciklusos β -aminosavak kromatográfiás paraméterei (k_1' , α , R_s), szabadentalpiaváltozás különbség értékei ($\Delta(\Delta G^\circ)_{298K}$ valamint az enantiomerek elúciós sorrendje Chirobiotic **T**, **TAG**, **V**, **VAG**, **R** és Cyclobond **DMP** oszlopokon poláris-szerves és poláris-ionos elválasztások esetén

Vegyület	KÁF	Mozgófázis	k_1'	α	R_s	$-\Delta(\Delta G^\circ)_{298K}$ (kJ mol ⁻¹)	Elúciós sorrend
13	T	a	5,42	1,46	3,46	0,9	1R,2R<1S,2S
	T	b	4,66	1,40	2,00	0,8	1R,2R<1S,2S
	TAG	a	8,55	1,29	1,18	0,6	1R,2R<1S,2S
	TAG	b	8,55	1,27	1,65	0,6	1R,2R<1S,2S
	TAG	c	8,64	1,27	1,70	0,6	1R,2R<1S,2S
	R	a	3,55	1,05	<0,40	0,1	-
	R	b	2,57	1,05	<0,40	0,1	1S,2S<1R,2R
	V	a	1,74	1,47	3,15	1,0	1R,2R<1S,2S
	V	b	1,32	1,56	3,18	1,1	1R,2R<1S,2S
	VAG	a	0,79	1,24	2,08	0,5	1R,2R<1S,2S
VAG	b	1,60	0,12	2,50	0,4	1R,2R<1S,2S	

Kromatográfiás körülmények: oszlop (**KÁF**), Chirobiotic T (**T**), Chirobiotic TAG (**TAG**), Chirobiotic V (**V**) és Chirobiotic VAG (**VAG**); eluens, **a**, MeOH 100%, **b**, MeOH/AcOH/TEA=100/0,01/0,01 (v/v/v) és **c**, MeOH/AcOH/TEA=100/0,1/0,01 (v/v/v); detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

Az általunk vizsgált két vegyületcsoport esetében az α értékeket összehasonlítva a fordított fázisú (0,1% TEAA (pH 6,5)/MeOH), poláris-szerves (MeOH) és a poláris-ionos (MeOH/AcOH/TEA) mérések között nem tapasztaltunk jelentős különbséget a makrociklusos állófázisok között.

A teicoplanin királis szelektoron található cukorrész hatását a királis elválasztásra igen jól szemlélteti a

$$\Delta_{TAG-T}\Delta(\Delta G^\circ)=\Delta(\Delta G^\circ)_{TAG}-\Delta(\Delta G^\circ)_T \quad (24)$$

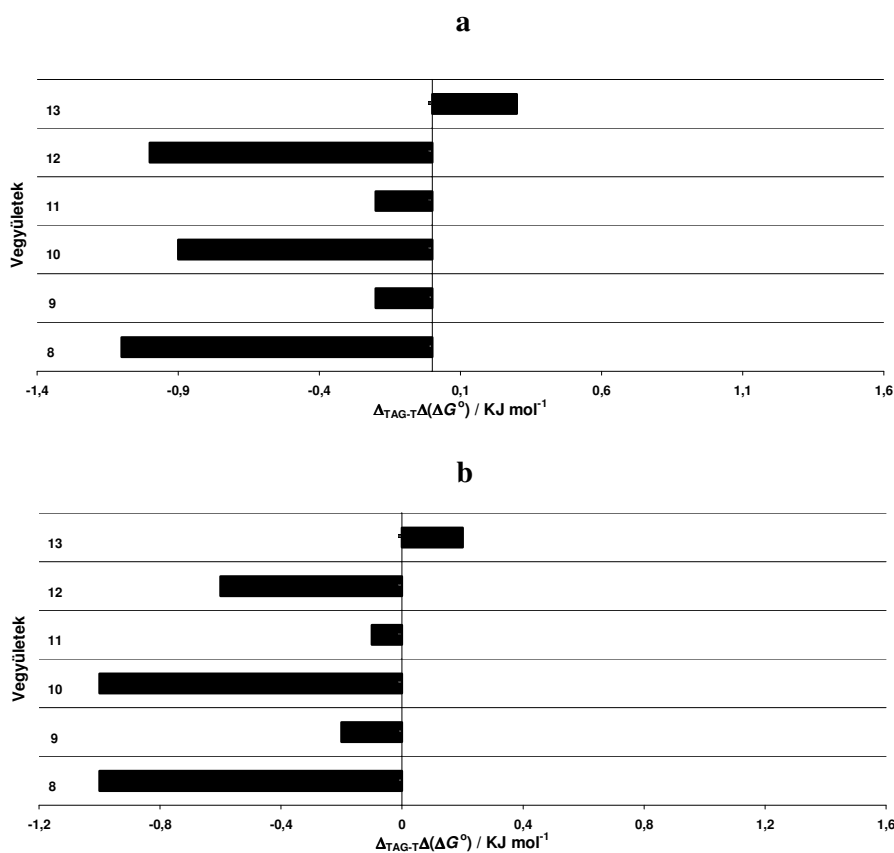
különbség.

Ha ez a különbség negatívnak adódik, akkor az adott vegyület enantiomerjei jobban elválaszthatók az aglikon szelektoron. Azonban, ha ez az érték pozitív, akkor a cukorrészeket tartalmazó szelektor a hatékonyabb az adott vegyület optikai izomerjeinek elválasztásában. A **4.3. ábrán** POM (**a**) PIM (**b**) és normál fázisú (**c**) mérések eredményéből számolt $\Delta_{TAG-T}\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek láthatóak mind a két vegyületcsoportra vonatkozóan. A POM és PIM körülmények között a **13** β -aminosav kivételével negatív értékeket kaptunk, ami a cukorrészek kedvezőtlen hatását mutatja a királis felismerésre. A **8** és **10** (és **12**) vegyületek esetében a különbség meghaladja az 1,0 kJ/mol $\Delta(\Delta G^\circ)$ értéket. Normál fázisú körülmények között csak a **8**, **9** és **10** vegyületeket sikerült elválasztani

Chirobiotic **T** és **TAG** oszlopokon. A cukorrészek kedvezőtlen hatása a királis megkülönböztetési folyamatban alapvetően kétféle úton nyilvánulhat meg:

- ✂ sztérikusan gátolhatja a kosár belsejéhez való hozzáfutásukat,
- ✂ meggátolhatja a lehetséges kölcsönhatás kialakítását az aglikon két fenolos és egy alkoholos hidroxilcsoportjaival, amelyeken keresztül a három cukorrész kapcsolódik a natív teicoplanin esetén [24]

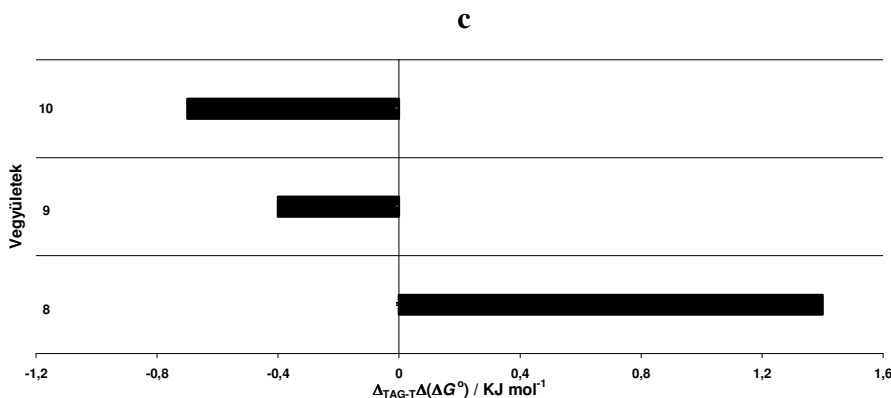
A Cyclobond **DMP** állófázis fordított fázisú alkalmazásakor csak a **8-11** vegyületeknél figyeltünk meg királis megkülönböztetést a **8, 9** és **10** vegyületek esetében alapvonalra történő elválasztást kaptunk 1,76, 2,46 és 1,49 felbontás értékekkel. A **10** β -laktám valószínűleg már nem tudott megfelelően illeszkedni a hozzávetőleg 0,78 nm átmérőjű ciklodextrin gyűrűben, így nem tudott létrejönni a királis felismeréshez elengedhetetlen zárványkomplex.



4.3. ábra

A teicoplanin és teicoplanin aglikon állófázisok enantioszelektivitása közti különbség POM (a) és PIM (b) körülmények között

Kromatográfiai körülmények: oszlop, Chirobiotic T (**T**) és Chirobiotic TAG (**TAG**); eluens, **a**, MeOH 100%, **b**, MeOH/AcOH/TEA=100/0,01/0,01 (v/v/v); detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.



4.3. ábra folytatása

A teicoplanin és teicoplanin aglikon állófázisok enantioszelektivitása közti különbség normál fázisú (c) körülmények között

Kromatográfiai körülmények: oszlop, Chirobiotic T (T) és Chirobiotic TAG (TAG); eluens, **a**, MeOH 100%, **b**, MeOH/AcOH/TEA=100/0,01/0,01 (v/v/v), **c**, hexán/IPA=90/10 (v/v); detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

A **8-10** vegyületek esetében a Cyclobond **DMP** oszlop normál fázisban is hatékonyak bizonyult, ami a π - π kölcsönhatásra alkalmas 3,5-dimetilfenilkarbamoil módosítás királis felismerésre gyakorolt hozzájárulásának köszönhető.

Meghatároztuk az enantiomerek elúciós sorrendjét is azokban az esetekben, amikor az elválasztás megfelelő volt (**4.3.** és **4.4. táblázat**). A Chirobiotic **T** és **TAG** állófázisoknál egységesen *R,R*<*S,S* sorrendet kaptunk a hat vegyületre vonatkozóan, a **12** és **13** β -aminosavaknál **R** oszlopon, illetve **10** vegyület esetében a **V**, **VAG** és **DMP** állófázisoknál elúciós sorrendváltozást *1S,2S*<*1R,2R* figyeltünk meg.

Összefoglalásként elmondható, hogy a vizsgált β -aminosav és β -laktám enantiomereket sikerült alapvonalra elválasztani fordított és normál fázisú (csak β -laktámok), illetve poláris-szerves és poláris-ionos körülmények között makrociklusos glikopeptid és ciklodextrin alapú királis állófázisokon. A vizsgált makrociklusos glikopeptid szelektorok közül a **TAG** esetében kaptuk a legnagyobb szelektivitás és felbontás értékeket. A számolt $\Delta_{TAG-T}\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek jól mutatták, hogy a vizsgált hat vegyület esetében (a **13** kivételével) a cukorrészek a szelektoron kedvezőtlenül befolyásolták a királis megkülönböztetési folyamatokat.

A Cyclobond **DMP** oszlop mind fordított, mind normál fázisban igen jó elválasztást mutatott a **8, 9** β -laktámok és a **11** β -aminosav vizsgálatokor.

Az enantiomerek elúciós sorrendjét meghatároztuk, és három β -aminosav esetén sorrendbeli változást figyeltünk meg különböző állófázisokon.

4.2. Elválasztások koronaéter alapú királis állófázisokon

A királis koronaéter szelektort tartalmazó állófázisok szerkezeti sajátságukból adódóan alkalmasak primer amino funkcióscsoportot tartalmazó enantiomerek elválasztására. A β^3 -aminosavak primer amincsoportjaik révén komplexet képezhetnek a koronaéter gyűrűjében. Vizsgálataink kiterjedtek alkil, aromás és heterociklusos oldalláncot tartalmazó β^3 -aminosav enantiomerek elválasztási mechanizmusának tanulmányozására koronaéter állófázison. Két típusú állófázist alkalmaztunk, mind a kettő azonos (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav királis szelektort tartalmazott úgymint a **Korona 1** (2.9. ábra) és **Korona 2** (2.11. ábra). A szintézis módjából adódóan a **Korona 1** szabad szilanolcsoportokkal rendelkezik, szemben a **Korona 2** oszloppal, ahol a szilanolcsoportot etoxicsoporttá alakították. Az állófázis hozzájárulása mellett vizsgáltuk az eluens összetételnek, az eluensbe adagolt savak minőségének és mennyiségének, továbbá a β^3 -aminosavak szerkezetének hatását a királis elválasztásra. A könnyebb áttekinthetőség végett a vizsgált vegyületeket három csoportra osztottuk, külön fejezetekben tárgyalva azokat.

4.2.1. Aromás β^3 -aminosav enantiomerek elválasztása Korona 1 állófázison

Az általunk vizsgált tizennégy 3-arilszubsztituált β -aminosav a **14** kivételével az aromás gyűrűn eltérő pozícióban különböző szubsztituenseket tartalmaz (3.3. Táblázat). Alapvegyületnek a szubsztituálatlan 3-fenil-propánsavat (**14**) választottuk, így azonos kromatográfiás körülmények között összevethető a szubsztituensek hozzájárulása a királis megkülönböztetési folyamathoz **Korona 1** állófázison. Az eluensösszetétel változtatása mellett vizsgáltuk a szerves és ásványi savak minőségének és mennyiségének hatását is.

Koronaéter állófázisokon az ammóniumion-koronaéter komplex létrejötte az egyik legfontosabb kölcsönhatás a szelektor és a protonált primeramint tartalmazó vegyületek között. Az aminocsoportok protonálódása meghatározó folyamat, ennek érdekében az eluenshez ecetsavat adagoltunk. A vizsgálatok elején a mozgófázis szerves összetevőként acetonitrilt vagy metanolt tartalmazott; a MeOH-tartalmú eluenssel nagyobb szelektivitási értékeket és szebb csúcsalakokat kaptunk, így a további kísérletek során MeOH-t használtunk szerves komponensként. Eluens összetételnek a H₂O/MeOH=80/20, 50/50 és 20/80 (v/v) választottunk, melyhez 5, vagy 10 mM AcOH-at adagoltunk a primer aminocsoport protonálása érdekében. A mérések eredményét a 4.5. Táblázat tartalmazza.

Az eluensösszetétel hatását vizsgálva a visszatartásra, az elsőként eluálódó

komponens retenciós faktorai H₂O/MeOH=80/20 (v/v) + 10,0 mM AcOH mozgófázisban 1,31-8,97 illetve H₂O/MeOH=20/80 (v/v) + 10,0 mM AcOH eluens esetén 2,71-24,35 tartományba estek. A **4.5. Táblázat** adatai alapján megállapítható, hogy a szerves komponens mennyiségének növelésével nőtt a visszatartás. A **4.4. ábra** a **14, 15, 17, 22, 23** és **24** vegyületek kromatográfiás paramétereinek eluensösszetétel függését mutatja, ahol a **15** vegyület kivételével egységesen nőtt a k_1' a MeOH-tartalom növelésével. Ez a viselkedés valószínűleg az eluens poláris jellegének csökkenésével függ össze, amely a poláris kölcsönhatások erősségének csökkenését vonja maga után a mozgófázisban, ezáltal nagyobb visszatartást eredményezve.

4.5. Táblázat. Aromás β^3 -aminosavak kromatográfiás paramétere (k_1' , α , R_S), valamint az enantiomerek elúciós sorrendje **Korona 1** oszlopon fordított fázisú elválasztások esetén

Vegyület	Mozgófázis (v/v)	k_1'	k_2'	α	R_S	Elúciós sorrend
14	80/20, a	2,27	2,94	1,30	1,44	$R < S$
	20/80, b	8,66	9,89	1,14	1,13	
	50/50, c	2,98	3,93	1,32	1,77	
15	80/20, a	2,96	3,71	1,26	0,85	$R < S$
	20/80, b	6,85	8,21	1,20	1,06	
	50/50, c	2,86	3,63	1,27	1,46	
16	80/20, a	4,16	5,68	1,36	0,90	-
	20/80, b	17,87	23,55	1,32	2,38	
	50/50, c	3,52	5,33	1,51	1,97	
17	80/20, a	2,66	3,43	1,29	1,31	-
	20/80, b	7,09	8,56	1,21	1,05	
	50/50, c	2,92	3,83	1,31	1,73	
18	80/20, a	3,60	4,51	1,25	1,45	-
	20/80, b	10,50	12,28	1,17	1,00	
	50/50, c	3,83	5,02	1,31	1,71	
19	80/20, a	1,31	1,31	1,00	0,00	-
	20/80, b	2,71	2,71	1,00	0,00	
	50/50, c	1,36	1,36	1,00	0,00	
20	80/20, a	3,06	3,94	1,29	1,43	-
	20/80, b	17,44	21,30	1,22	1,84	
	50/50, c	4,43	5,68	1,28	1,88	
21	80/20, a	2,84	4,02	1,42	1,97	$R < S$
	20/80, b	10,74	13,72	1,28	1,58	
	50/50, c	3,25	4,53	1,39	1,59	
22	80/20, a	4,24	6,06	1,43	1,86	$R < S$
	20/80, b	10,39	13,84	1,34	2,03	
	50/50, c	3,18	4,62	1,45	1,73	

Kromatográfiás körülmények: oszlop, **Korona 1**; eluens, **a**, H₂O/MeOH=80/20 (v/v)+10,0 mM AcOH, **b**, H₂O/MeOH=20/80 (v/v)+10,0 mM AcOH, **c**, H₂O/MeOH=50/50 (v/v)+ 5,0 mM AcOH; detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K

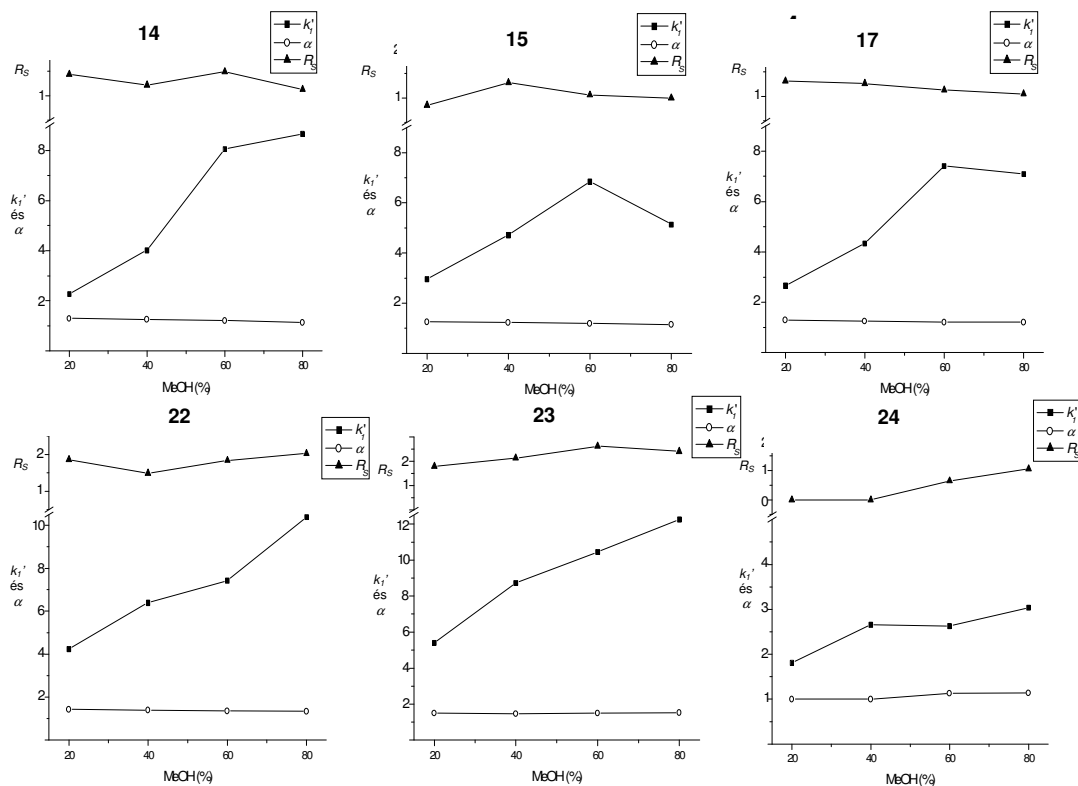
4.5. Táblázat folytatása. Aromás β^3 -aminosavak kromatográfiás paraméterei (k_1' , α , R_S), valamint az enantiomerek elúciós sorrendje **Korona 1** oszlopon fordított fázisú elválasztások esetén

Vegyület	Mozgófázis (v/v)	k_1'	k_2'	α	R_S	Elúciós sorrend
23	80/20, a	5,40	8,09	1,50	1,79	$R < S$
	20/80, b	12,27	18,64	1,52	2,40	
	50/50, c	5,69	9,19	1,62	2,53	
24	80/20, a	1,81	1,81	1,00	<0,40	$R < S$
	20/80, b	3,04	3,47	1,14	1,06	
	50/50, c	1,73	1,94	1,12	0,69	
25	80/20, a	8,97	14,95	1,62	2,27	-
	20/80, b	24,35	39,70	1,63	2,40	
	50/50, c	6,27	7,66	1,22	1,91	
26	80/20, a	3,80	5,61	1,48	1,54	$R < S$
	20/80, b	14,58	20,15	1,38	2,32	
	50/50, c	3,56	5,26	1,48	1,91	
27	80/20, a	5,78	8,83	1,53	1,87	-
	20/80, b	22,30	34,52	1,55	1,80	
	50/50, c	6,66	11,32	1,70	3,07	

Kromatográfiás körülmények: oszlop, **Korona 1**; eluens, **a**, H₂O/MeOH=80/20 (v/v)+10,0 mM AcOH, **b**, H₂O/MeOH=20/80 (v/v)+10,0 mM AcOH, **c**, H₂O/MeOH=50/50 (v/v)+ 5,0 mM AcOH; detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

Az eluensösszetétel hatását vizsgálva a MeOH-tartalom csökkenésével az α kismértékben növekedett (**14**, **15**, **16**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21** és **22**) vagy alig változott (**23**, **25** és **27**), míg a **24** minta esetén kismértékű csökkenés volt megfigyelhető. A MeOH-tartalom csökkenésével a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások váltak kedvezményezetté, amelynek mértéke a két enantiomerre nézve eltérően változott, ezáltal növekedést okozva a szelektivitásban (és a felbontásban). A **24** minta esetében a MeOH-tartalom csökkenésével csökkent a szelektivitás. Ennek valószínű oka az *orto*-helyzetű klóratom szterikus hatása. A felbontás változása nem mindig követte a szelektivitás változását a MeOH-tartalom változtatásával.

A β^3 -aminosavak szerkezetének a királis felismerésre gyakorolt hatását a retenciós faktor, a szelektivitási tényező és a felbontás változásán keresztül szemléltetjük. Egy adott eluensösszetételnél (H₂O/MeOH=50/50 (v/v) + 5 mM AcOH) vizsgálva a k_1' értékek az elsőként eluálódó enantiomerekre nézve 1,31-8,97 tartományba esnek. A *para*-helyzetű szubsztituensek hozzájárulását vizsgálva a visszatartásra a következő sorrendet kaptuk CH₃-<CH₃O-<(14)<Cl-≈F-<CF₃-<Br-. Összehasonlítva a nem szubsztituált aromás gyűrűvel rendelkező **14** vegyülettel a metil- és a metoxicsoport a fenilgyűrűn csökkentette, illetve alig változtatta, addig a többi szubsztituens növelte a retenciós időt.



4.4. ábra

β^3 -aminosavak retenciós faktorának, szelektivitásának és felbontásának függése az eluens összetételétől

Kromatográfiai körülmények: oszlop, **Korona 1**; eluens, H₂O/MeOH=80/20, 60/40, 40/60, 20/80 (v/v)+10 mM AcOH; detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

Hasonlóan a monoszubsztituált vegyületekhez a diszubsztituált fenilgyűrűvel rendelkező vegyületekre (**20** és **25**) CH₃O-<Cl- sorrendet kaptunk, értékét tekintve a két szubsztituens a gyűrűn tovább növelte a visszatartást. Ezek az eredmények a H-híd kölcsönhatások jelentőségére hívják fel a figyelmet abban az esetben, amikor nagy elektronegativitású atom kapcsolódik a fenilgyűrűhöz, akkor azok H-híd kötést képesek kialakítani a szelektor protonált karboxilcsoportjaival. Ennek köszönhető, hogy az *orto*-helyzetben szubsztituált vegyületeknél kaptuk a legkisebb visszatartást (*orto*<*para*<*meta*), hiszen a kialakuló hidrogénkötés sztérikusan gátolt lehet a koronaéter-aminosav komplex kialakulásában.

A szelektivitás és a felbontás változása és a minta kémiai szerkezete közti összefüggésre szintén a **4.5. Táblázat** adataiból vonhatunk le következtetéseket. A H₂O/MeOH=50/50 (v/v) + 5 mM AcOH mozgófázis összetételénél a szubsztituálatlan fenilgyűrűt tartalmazó **14** vegyület esetén $\alpha=1,32$ és $R_s=1,77$. *Para*-helyzetű halogén szubsztitúció esetében (**21**, **22** és **26**) nagyobb szelektivitás értékeket kaptunk, $\alpha=1,39$ - $1,48$,

amely a H-híd és dipól-dipól kölcsönhatások hozzájárulásának köszönhető. A *para*-helyzetű metilcsoport kismértékű csökkenést ($\alpha=1,27$), a trifluorocsoport növekedést ($\alpha=1,51$) eredményezett, a metoxicsoport esetén nem tapasztaltunk jelentős változást. A diszubsztituált aromás gyűrűt tartalmazó **20** és **25** vegyületek esetén a szelektivitás értékekben kismértékű csökkenést, a felbontásokban pedig növekedést figyeltünk meg. A kismértékű szelektivitás csökkenésnek valószínűleg szterikus okai vannak, a két enantiomer hozzáférése a szelektorhoz kevésbé különbözik, míg az R_s értékek növekedése a csúcshélesség csökkenéséből adódik. A metoxicsoport helyzetének vizsgálatakor (**17**, **18** és **19**) *meta*- és *para*-helyzetben nem tapasztaltunk jelentős eltérést, *orto*-helyzetben azonban nem történt királis felismerés. Az *orto*-helyzet kedvezőtlen szterikus szerepére példa a klór szubsztituált **24** vegyület is ($a=1,12$; $R_s=0,69$). Míg a *para*- és *meta*-helyzetű halogén szubsztitúció H-híd és poláris kölcsönhatások révén igen kedvező a királis felismerésre, addig az *orto*-helyzet szterikusan kedvezőtlen, a retenciós faktor, a szelektivitási tényező és a felbontás is csökken a nem szubsztituált analóghoz viszonyítva.

Mint már ennek a fejezetnek a bevezetőjében említettem a koronaéter-NH₃⁺-ion komplex létrejötte alapvető a hárompontos kölcsönhatás kialakulásához. A β^3 -aminosavak primer aminocsoportjának protonálása, valamint a **Korona 1** állófázison található szabad propilamincsoportok protonálása érdekében öt különböző minőségű savat adagoltunk a H₂O/MeOH=50/50 (v/v) összetételű mozgófázishoz, úgymint ecetsav (AcOH), trifluoecetsav, perklórsav, kénsav és foszforsav. A mérések eredményeit a **4.6. Táblázat** foglalja össze. A **19**, **22** és **24** minta esetén azonos 5 mM savkoncentráció mellett a legnagyobb retenciós faktorokat AcOH esetében figyeltük meg, az erősebb savak jelentősen csökkentették a visszatartást. A vizsgált savak pK értékei a következőképpen alakulnak: pK_(AcOH)=4,74; pK_(H₃PO₄)=2,12 (7,21; 12,32); pK_(TFA)=-0,25; pK_(H₂SO₄)=-3,00 (1,99); pK_(HClO₄)=-10. Az adatokból kiderült, hogy önmagában nemcsak a savak erőssége befolyásolja a visszatartást, hiszen a **19** és **24** β^3 -aminosavaknál TFA esetében kaptuk a legkisebb visszatartást (a trifluoroacetát- és foszfát-anionok igen jó ionpárképzők). Ez az eltérés azzal magyarázható, hogy a savak disszociációja során keletkezett anionok (adott sav konjugált bázisa) az aminosav ammóniumionjával és a szelektor koronaéter gyűrűjével egy terner rendszert alakítanak ki, és ennek a terner rendszernek a stabilitása befolyásolja a visszatartás erősségét. Ezt a hatást nevezzük *ellenion* hatásnak.

Önmagában nemcsak az ellenion, hanem az aminosavak hozzájárulása is meghatározó. Ezt támasztja alá, hogy **22** vegyület esetében foszforsavnál kaptuk a

legkisebb k_I' -t. A savak koncentrációjának növelésével visszatartás csökkenést figyeltünk meg (**4.5. ábra**), ami egyrészt a β^3 -aminosav karboxilcsoportja disszociációjának visszaszorulásával ($pK=1,7-1,3$) magyarázható, ezáltal csökkentve az állófázis protonált szabad propilamincsoportjaival kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatás erősségét, továbbá a koronaéter karboxilcsoportjainak a disszociációja ($pK=2,1-4,9$) is visszaszorul, ami csökkenti a terner rendszer stabilitását, ezáltal a visszatartás erősségét.

A HClO_4 , H_2SO_4 , H_3PO_4 , TFA és AcOH alkalmazása azonos koncentrációban az ionerősségben (I) jelentős eltérést eredményez a mozgófázisban. Figyelembe véve a savi disszociációs állandó értékeket, a mozgófázis ionerősségét állandó értéken tartottuk ($I=0,85$) és az eredményeket a **28** minta példáján a **4.7. Táblázatban** mutatom be. A mérési adatok jól tükrözik, hogy amíg állandó koncentráció mellett a k_I' értéke a gyenge savnak számító AcOH esetén 3,03, addig a közepes és erős savak esetén a 0,03-0,14 tartományban esett. Azonban állandó ionerősség mellett az elsőként eluálódó enantiomerek retenciósfaktora már egy jóval szűkebb tartományban változott (k_I' : 1,66-4,59). A kénsav esetén kaptuk a legnagyobb visszatartást, ami a kialakult terner rendszer nagyobb stabilitására utal, összehasonlítva a többi ellenionnal. A TFA valószínűleg viszonylag nagy térkitöltésének köszönhetően rontotta az aminosav-ellenion-koronaéter rendszer stabilitását, a legkisebb visszatartást eredményezve.

Az alkalmazott savak minősége és koncentrációja befolyásolja az α és R_S értékeket is (**4.6. Táblázat**). Azonos savkoncentráció mellett általában az AcOH vagy H_2SO_4 alkalmazásával tapasztaltunk nagyobb α és R_S értékeket. Amíg a visszatartásban a sav koncentráció növelésével jelentős változást figyeltünk meg, addig a szelektivitásban és a felbontásban ez a változás kisebb mértékű. Érdekes módon állandó ionerősség alkalmazása mellett a felbontás értékek (R_S : 1,2-2,4) jelentősen meghaladták az állandó savkoncentráció mellett mértéket (R_S : 0,3-1,2) és viszonylag szűk tartományba estek (**4.7. Táblázat**). Az eredmények arra utalnak, hogy állandó ionerősség mellett különböző anyagi minőségű savak alkalmazásával is viszonylag hasonló kromatográfiai adatokhoz juthatunk. Azonban ezek az adatok erősen függenek a vizsgálandó vegyület szerkezeti sajátosságától is. A **14**, **15**, **21**, **22**, **23**, **24** és **26** vegyületek esetén rendelkezésre állt tiszta enantiomer, így az elúciós sorrendeket meghatároztuk: egységesen $R < S$ sorrendet kaptunk.

4.6. Táblázat. Aromás β^3 -aminosavak kromatográfiás paramétereinek (k_1' , α , R_S) függése az alkalmazott savak minőségétől és mennyiségétől **Korona 1** oszlopon

Vegyület	Sav	Sav koncentráció	k_1'	α	R_S
19	AcOH	5,0	2,18	1,00	0,00
	HClO ₄	5,0	0,78	1,00	0,00
	HClO ₄	10,0	0,02	1,10	0,60
	H ₂ SO ₄	5,0	0,18	1,50	0,60
	H ₃ PO ₄	5,0	0,23	1,00	0,00
	H ₃ PO ₄	10,0	0,20	1,25	<0,40
	TFA	5,0	0,00	1,00	0,00
22	AcOH	1,0	8,84	1,45	2,41
	AcOH	5,0	6,82	1,45	2,40
	AcOH	10,0	5,70	1,45	2,38
	AcOH	20,0	4,58	1,45	2,20
	HClO ₄	5,0	1,28	1,16	0,64
	H ₂ SO ₄	5,0	2,65	1,32	1,56
	H ₃ PO ₄	5,0	0,71	1,00	0,00
	TFA	5,0	0,97	1,23	0,75
24	AcOH	1,0	3,27	1,11	0,70
	AcOH	5,0	2,51	1,10	0,85
	AcOH	10,0	2,01	1,10	0,70
	AcOH	20,0	1,64	1,11	0,70
	HClO ₄	5,0	0,20	1,00	0,00
	H ₂ SO ₄	5,0	0,35	1,00	0,00
	H ₃ PO ₄	5,0	0,71	1,00	0,00
	TFA	5,0	0,10	1,00	0,00

Kromatográfiás körülmények: oszlop, **Korona 1**; eluens, H₂O/MeOH=50/50 (v/v)+1,0-20,0 mM sav; detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

4.7. Táblázat. A **28** vegyület kromatográfiás paramétereinek (k_1' , α , R_S) függése az alkalmazott savak minőségétől és mennyiségétől állandó koncentráció illetve ionerősség mellett **Korona 1** oszlopon

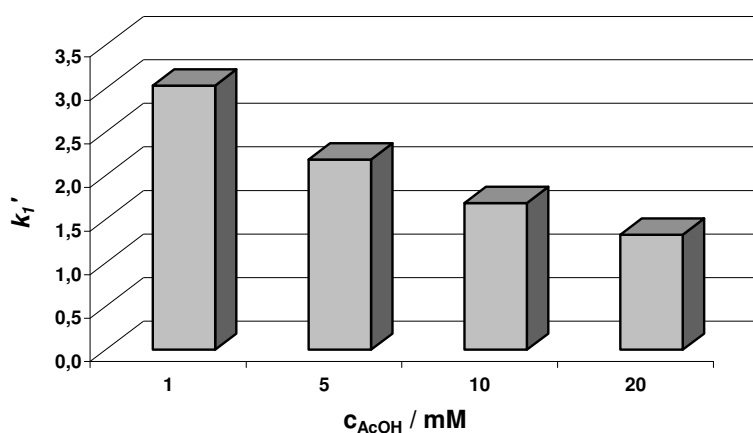
Vegyület	Sav	Sav koncentráció (mM)	k_1'	α	R_S
28	AcOH	10,0	3,03	1,31	1,20
	H ₃ PO ₄	10,0	0,14	1,30	0,80
	HClO ₄	10,0	0,13	1,31	0,50
	H ₂ SO ₄	10,0	0,21	1,29	0,50
	TFA	10,0	0,03	1,29	<0,4

Kromatográfiás körülmények: oszlop, **Korona 1**; eluens, H₂O/MeOH=50/50 (v/v); detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K

4.7. Táblázat folytatása. A **28** vegyület kromatográfiás paramétereinek (k_1' , α , R_S) függése az alkalmazott savak minőségétől és mennyiségétől állandó koncentráció illetve ionerősség mellett **Korona 1** oszlopon

Vegyület	Sav	Ionerősség (mM)	k_1'	α	R_S
28	AcOH	0,85	3,03	1,31	1,2
	H ₃ PO ₄	0,85	2,53	1,38	2,0
	HClO ₄	0,85	2,73	1,32	2,1
	H ₂ SO ₄	0,85	4,59	1,37	2,4
	TFA	0,85	1,66	1,40	1,9

Kromatográfiás körülmények: oszlop, **Korona 1**; eluens, H₂O/MeOH=50/50 (v/v); detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K



4.5. ábra

A 19 β^3 -aminosav retenciós faktorának függése az eluenshez adagolt ecetsav mennyiségétől

Kromatográfiás körülmények: oszlop, **Korona 1**; eluens, H₂O/MeOH=50/50 (v/v)+1-20 mM AcOH; detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

Összefoglalásként elmondható, hogy a mozgófázisban a MeOH-tartalom növelésével nőtt a visszatartás, azonban ez a hatás kedvezőtlenül befolyásolta a királis megkülönböztetési folyamatot, a szelektivitás és a felbontás értékekben csökkenést idézve elő. A mozgófázishoz adagolt sav koncentráció növelésével jelentős retenciósökkenést tapasztaltunk. Ezt a β^3 -aminosav és a szelektor karboxilcsoportja disszociációjának visszaszorulásával és a savból származó anion *ellenion* hatásával értelmeztük. Azonos koncentrációjú savak alkalmazásakor ezek a folyamatok a k_1' és R_S értékeket jelentősen, az α értékeket alig befolyásolták. Állandó ionerősség alkalmazásával hasonló kromatográfiás paraméterek (k_1' , α és R_S) nyerhetők. A vegyületek szerkezetének hatását vizsgálva az aromás gyűrűn *para*-helyzetű F-, Cl-, Br- és CF₃-szubsztitúció növelte a visszatartást, a szelektivitást és a felbontást. A metoxi- és metilcsoport nem, vagy kis mértékben

csökkentette a királis szelektivitást. A szubsztituensek helyzetét vizsgálva, a *meta*- és a *para*-helyzetű szubsztitúció bizonyult a legkedvezőbbnek, míg az *orto*-szubsztituált vegyületek, valószínűleg szterikus okok miatt, nehezen voltak elválaszthatók. Hat vegyület esetében az enantiomerek elúciós sorrendjét is meghatároztuk, egységesen $R < S$ sorrendet tapasztaltunk. A **14-17**, **21**, **22** és **26** vegyületek kiválasztott kromatogramjai a **10.2. Függelékben** találhatóak.

4.2.2. Alifás és aliciklusos β^3 -aminosav enantiomerek elválasztása Korona I állófázison

A vizsgált vegyületek közül a C-3 szénatomhoz kapcsolódó alifás csoportokat tekintve hat telített (**29-34**), kettő pedig telítetlen (**35**, **36**). A két aliciklusos β -aminosav esetén a C-3 szénatomhoz ciklohexán- (**37**) illetve ciklohexéngyűrű (**38**) kapcsolódik (**3.4. Táblázat**). Az enantiomerek elválasztása során a mozgófázisban lévő szerves oldószer és sav minőségének és mennyiségének hatása mellett vizsgáltuk a királis elválasztási folyamat a molekulák szerkezetétől való függését.

Az eluensösszetétel függésének vizsgálatokor, hasonlóan az előző fejezetben tárgyalt aromás β -aminosavakhoz, a MeOH-tartalom növelésével nőtt a visszatartás (**4.6. ábra**, **4.8. Táblázat**). Hasonló tendencia volt megfigyelhető EtOH alkalmazásakor is, azonban a visszatartás mértéke jelentősen meghaladta a MeOH esetében mért értékeket. Ez a poláris kölcsönhatások csökkenésével magyarázható a nagy szerves tartalmú eluens és a poláris β -aminosavak között: az enantiomereknek állófázissal való kölcsönhatása kedvezőbbé vált. A szelektivitást tekintve a mozgófázis szerves komponensének növekedésével nőtt α értéke, a magasabb alkohol tartalom mellett a királis kölcsönhatások váltak kedvezményezetté (**4.6. ábra**). A szerves oldószerek minőségének változtatásával, a poláris jelleg csökkenésével visszatartás növekedést tapasztaltunk a MeOH < EtOH < PrOH < 2-PrOH < *t*-BuOH sorrendben (**4.7. ábra**). 2-PrOH és *t*-BuOH esetében még kifejezettebb volt a retenció növekedés, amely az apoláris jelleg növekedésével és szterikus okokkal magyarázható: a nagy térkitöltésű, apoláris alkoholok a mozgófázisban nem szívesen lépnek kölcsönhatásba a poláris aminosavakkal. A mozgófázisban levő alkohol minősége, szemben a k_1' értékekkel a szelektivitást kisebb mértékben befolyásolta. Azonos összetételű, de eltérő szénatomszámú alkoholt tartalmazó mozgófázisoknál a **31** vegyület esetében (**4.7. ábra**), hasonlóan a többi vegyülethez, az EtOH használatakor kaptuk a legnagyobb α értékeket. Az alkohol minőségének a felbontás

értékére gyakorolt hatása a vártnál kedvezőbben alakult: a szénatomszám növekedésével az alkoholok viszkozitása is jelentősen nő, amely anyagátadási gátlást, ezáltal csúcscsúszését idézheti elő, azonban nem tapasztaltuk a felbontás csökkenését PrOH, 2-PrOH és *t*-BuOH alkalmazása esetében.

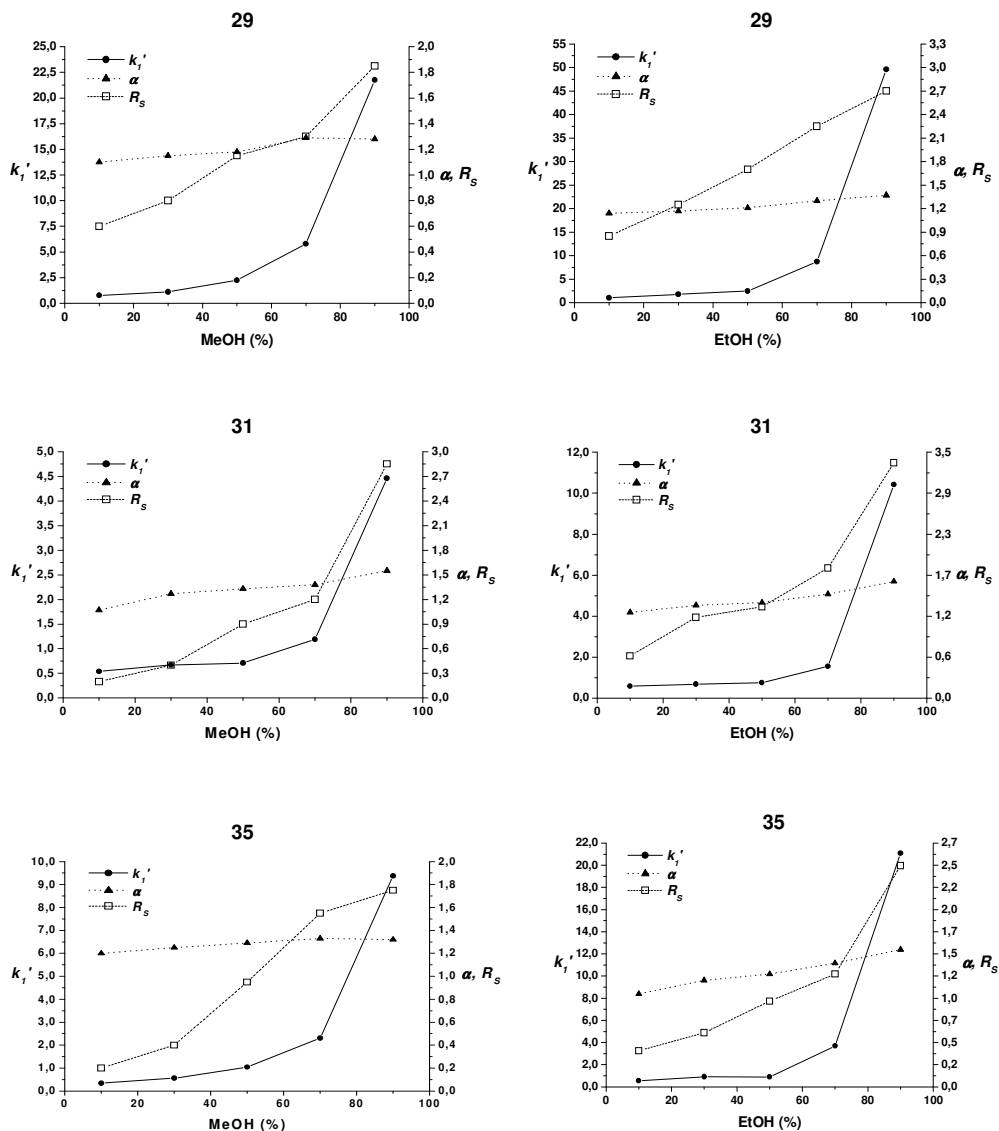
4.8. Táblázat. Alifás és aliciklusos β^3 -aminosavak kromatográfiai paraméterei (k_1' , α , R_S), valamint az enantiomerek elúciós sorrendje **Korona 1** oszlopon fordított fázisú elválasztások esetén

Vegyület	Mozgófázis (v/v)	k_1'	k_2'	α	R_S	Elúciós sorrend
29	30/70, a	5,75	7,40	1,29	1,30	S<R
	50/50, b	2,48	3,0	1,21	1,70	
	50/25/25, c	2,04	2,54	1,25	1,75	
30	30/70, a	2,37	3,25	1,37	1,80	-
	50/50, b	1,38	1,92	1,39	2,40	
	50/25/25, c	1,12	1,55	1,38	2,10	
31	30/70, a	1,19	1,65	1,38	1,20	-
	50/50, b	0,75	1,02	1,36	1,30	
	50/25/25, c	0,71	0,97	1,37	1,25	
32	30/70, a	0,40	0,63	1,57	<0,60	-
	50/50, b	0,88	0,92	1,05	<0,40	
	50/25/25, c	0,43	0,52	1,21	<0,40	
33	30/70, a	0,90	1,11	1,23	<0,60	-
	50/50, b	0,86	0,86	1,00	<0,40	
	50/25/25, c	0,71	0,83	1,17	<0,40	
34	30/70, a	0,72	1,23	1,71	1,25	-
	50/50, b	0,73	0,98	1,34	1,35	
	50/25/25, c	0,86	1,38	1,60	2,05	
35	30/70, a	2,30	3,06	1,33	1,70	S<R
	50/50, b	0,90	1,13	1,25	1,05	
	50/25/25, c	1,17	1,67	1,42	2,25	
36	30/70, a	2,40	3,49	1,45	1,55	S<R
	50/50, b	0,80	0,99	1,24	1,85	
	50/25/25, c	1,05	1,39	1,32	1,65	
37	30/70, a	1,13	1,69	1,50	1,40	-
	50/50, b	0,93	1,30	1,39	1,55	
	50/25/25, c	0,68	1,05	1,54	2,00	
38	30/70, a	1,19	1,89	1,59	1,65	-
	50/50, b	0,96	1,49	1,55	1,75	
	50/25/25, c	0,84	1,28	1,54	1,40	

Kromatográfiai körülmények: oszlop, **Korona 1**; eluens, **a**, H₂O/MeOH=30/70 (v/v)+5,0 mM AcOH, **b**, H₂O/EtOH=50/50 (v/v)+5,0 mM AcOH, **c**, H₂O/MeOH/EtOH=50/25/25 (v/v/v)+5,0 mM AcOH; detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

Az előző fejezetben már rámutattunk az eluensben lévő savak minőségének és mennyiségének a retencióra gyakorolt hatására. H₂SO₄, H₃PO₄ és AcOH vizsgálatokkor hasonlóan az aromás β^3 -aminosavakhoz a savi disszociációs állandó csökkenésével

párhuzamosan nőtt a retenciós faktor értéke. A felbontás és szelektivitás minden esetben szintén AcOH alkalmazása esetén volt a legnagyobb.

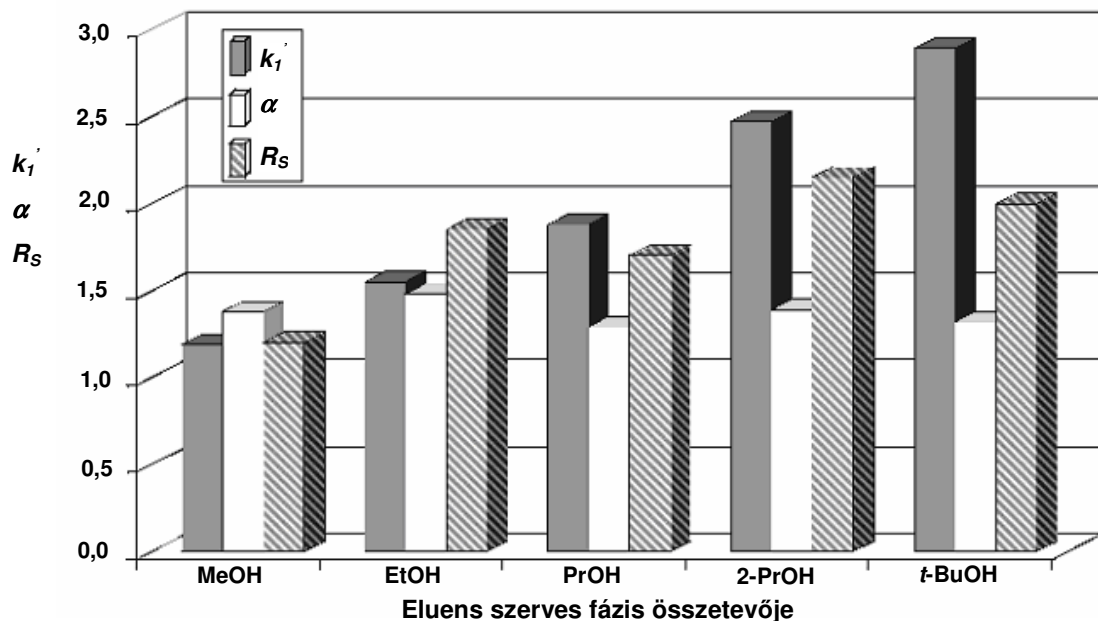


4.6. ábra

A 29, 31 és 35 β^3 -aminosavak retenciós faktorának, szelektivitásának és felbontásának függése az eluens összetételtől

Kromatográfiai körülmények: oszlop, **Korona 1**; eluens, H₂O/MeOH és H₂O/EtOH=90/10, 70/30, 60/40, 50/50, 30/70, 10/90 (v/v)+5 mM AcOH; detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

A β^3 -aminosavak szerkezetének hatását vizsgálva H₂O/MeOH=30/70 (v/v) + 5,0 mM AcOH, H₂O/EtOH=50/50 (v/v) + 5,0 mM AcOH és H₂O/MeOH/EtOH=50/25/25 (v/v/v) + 5,0 mM AcOH eluens összetétel mellett az elsőként eluálódó enantiomerek retenciós faktorai rendre nagyobbak adódtak a 29, 30, 35 és 36 enantiomerek esetén, mint a 31-34, 37 és 38 enantiomerekre (4.8. Táblázat).



4.7. ábra

A β^3 -aminosav k_1' , α , R_s függése az eluens szerves fázisától függően

Kromatográfiai körülmények: oszlop, **Korona 1**; eluens, H₂O/alkohol=30/70 (v/v)+5 mM AcOH; detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 278 K.

A **31-34** enantiomerek hosszabb és elágazó oldallánca (különösen a **32** minta esetén) csökkenti az állófázissal történő poláris és szterikus kölcsönhatások valószínűségét, ezért k_1' csökken. Összehasonlítva a **35** és **36** vegyületeket a **31-34** enantiomer párokkal és a **37** és **38** vegyületepárt, a nagyobb retenciós faktorok a **35**, **36** és **38** vegyületek esetén a π -kötést tartalmazó minták és az állófázis közti poláris kölcsönhatások meglétének tulajdoníthatók. Ez a retenció növekedés azonban többnyire nem párosult a szelektivitás növekedésével. A H₂O/MeOH=30/70 (v/v) + 5,0 mM AcOH eluensösszetétel esetében a szelektivitás (1,23-1,71) és a felbontás (<0,4-1,80) között változott. A szelektivitás összehasonlításakor az alifás vegyületeknél **32** és **34** esetében kaptuk a legnagyobb értékeket; amíg a nagy térkitöltésű csoportok csökkentették az állófázissal való kölcsönhatás lehetőségét, kisebb visszatartást eredményezve, addig a királis megkülönböztetési folyamatot kedvezően befolyásolták. A **35** és **36** vegyületek kettős és a hármas kötésük révén a szelektorrall való dipól-dipól kölcsönhatás kialakításával segítették az elválasztást. Az aliciklusos **37** és **38** vegyületek esetében a gyűrűben lévő kettőskötés révén a **38** minta mutatott nagyobb szelektivitást.

Három β^3 -aminosav **29**, **35** és **36** esetén állt rendelkezésünkre tiszta enantiomer, amelyeknél egységesen $S < R$ elúciós sorrendet kaptunk.

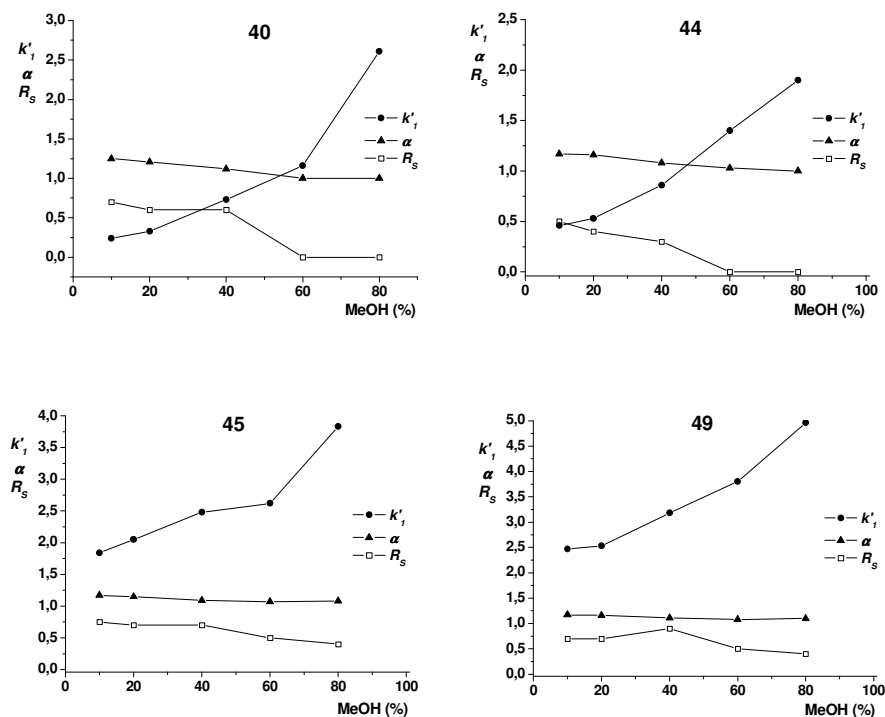
Összefoglalásként elmondható, hogy az eluensösszetétel hatásának vizsgálatakor a mozgófázis nagyobb szerves módosító tartalma nagyobb visszatartást, szelektivitást és felbontást eredményezett. Az eluensben alkalmazott alkoholok szénatomszámának növekedésével k' növekedést tapasztaltunk. Ez a tendencia már nem volt megfigyelhető a királis megkülönböztetési folyamatban, ugyanis nem a *t*-BuOH hanem az EtOH esetében kaptuk a legnagyobb α értékeket. Az enantiomerek szerkezetének szerepét vizsgálva a visszatartásban és a királis megkülönböztetésben megállapítottuk, hogy az aminosavak nagyobb térkitöltésű alifás oldalláncjai jelentősen csökkentették az enantiomer-koronaéter komplex stabilitását, kisebb retenciót eredményezve, viszont kedvezően befolyásolták az enantiomerek királis megkülönböztetését. A **29**, **35** és **36** enantiomer párok esetében *S*<*R* elúciós sorrendet kaptunk.

4.2.3. Alifás és aromás β^3 -aminosav enantiomerek elválasztása Korona 2 állófázison

A korábbi két fejezetben (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav királis szelektor a szintézisből adódóan szabad szilanolcsoportokkal rendelkezik. Ezen a **K₁** állófázison aromás, alifás és aliciklusos β^3 -aminosav enantiomerek kromatográfiás elválasztását tanulmányoztuk (**3.6. és 3.7. Táblázat**). Ebben a fejezetben alifás és aromás β^2 -aminosav enantiomerek kromatográfiás viselkedése kerül tárgyalásra a **2.11. ábrán** feltüntetett szabad szilanolcsoportot nem tartalmazó módosított aminopropil szilikagélhez kötött szintén (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektorral rendelkező **Korona 2** oszlopon.

Az eluens szerves módosító tartalmának vizsgálatakor, hasonlóan a **K₁** oszlopnál tapasztaltakkal, itt is a mozgófázisban lévő alkohol mennyiségének növelésével a retenciófaktor nőtt: a poláris molekula szívesebben tartózkodik a poláris állófázisban, mint a kevésbé poláris mozgófázisban (**4.8. ábra**). A szerves fázis arányának növekedése az aromás β^2 -aminosavaknál alig befolyásolta, az alifás oldalláncúak esetében pedig jelentősen csökkentette a felbontást és a szelektivitási tényezőt (**4.8. ábra**). Az alkohol szénatom számának növekedésével szintén nőtt a visszatartás. A **40** vegyület esetében H₂O/alkohol=80/20 (v/v)+10 mM H₂SO₄ eluensösszetétel mellett a különböző alkohol tartalmú eluensben mért retenciófaktorok: MeOH k_1' =0,32; EtOH k_1' =0,35; PrOH k_1' =1,18; 2-PrOH k_1' =1,25, azaz az alkoholok poláris jellegének csökkenésével nőtt a kölcsönhatás erőssége az állófázissal. Az alkohol szénatom számának növekedése a szelektivitást előnyösen befolyásolta: a **40** vegyület esetén az α értéke a MeOH, EtOH,

PrOH, 2-PrOH sorban $\alpha=1,22-1,34$, míg a **45** vegyület esetén $\alpha=1,21-1,45$ tartományban növekedett.



4.8. ábra

40, 44, 45 és 49 β^2 -aminosavak retenciós faktorának, szelektivitásának és felbontásának függése az eluens összetételtől

Kromatográfiai körülmények: oszlop, **Korona 2**; eluens, H₂O/MeOH=90/10, 80/20, 60/40, 40/60, 20/80 (v/v)+2,0 mM H₂SO₄; detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

Mint már korábban említettem, az eluensben levő sav minőségének és mennyiségének meghatározó a szerepe a visszatartásban. A **40** és **45** vegyületek esetén H₂O/MeOH=80/20 (v/v)+10 mM sav eluens összetétel mellett a legnagyobb visszatartást AcOH alkalmazásakor, a legkisebbet H₃PO₄ esetében figyeltük meg. Ennek valószínű oka a foszforsav igen jó komplexképző (ionpárképző) tulajdonsága, csökkentve a protonált β -aminosav-koronaéter komplex stabilitását és ezáltal a retenciót (**4.9. Táblázat**). Általunk vizsgált savak AcOH, TFA, HClO₄, H₂SO₄ és H₃PO₄ savi disszociációs állandója igen különböző (lásd: **4.2.1. fejezet**), koncentrációjuk állandó értéken tartása igen különböző pH-t eredményez. Ezt kiküszöbölendő, megvizsgáltuk, hogy a különböző savaknál a pH-t állandó értéken tartva milyen tendencia figyelhető meg a visszatartásban. A **4.9. Táblázat** adatainak elemzésekor feltűnő, hogy míg azonos koncentrációjú savat tartalmazó eluens alkalmazásakor a retenciós faktor a **40** vegyület esetén ($k_I'=0,01-1,18$) és a **45** vegyület esetén ($k_I'=0,63-3,41$) széles tartományban változik, addig állandó (pH=3,55) pH mellett a

retenciós faktorok **40** (k_I' =1,07-1,33) és **7** (k_I' =3,41-4,24) kisebb tartományban változnak. Ennek valószínű magyarázata, hogy állandó pH-n a szelektor karboxilcsoportjai ($pK=2,1-4,9$) disszociációjának mértéke alig változik, illetve közel azonos koncentrációjú ellenion van az eluensben. Mind a két vegyületnél a legnagyobb visszatartást perklórsav esetében kaptuk, ami a perklórsav igen gyenge komplexképző tulajdonságával magyarázható. Az eluensben levő sav minőségének hozzájárulása a királis megkülönböztetéshez elhanyagolhatónak tekinthető. Az azonos koncentrációjú illetve pH-jú mérések során kapott α és R_S értékek összehasonlításakor nem kaptunk számottevő különbséget, igazolva, hogy az ammóniumion – koronaéter komplex a nem királis kölcsönhatások kialakításában játszik meghatározó szerepet a kromatográfiás elválasztás során.

4.9. Táblázat. A 40 és 45 β^2 -aminosavak kromatográfiás paraméterei (k_I' , α , R_S) Korona 2 oszlopon fordított fázisú elválasztások esetén azonos sav koncentrációjú és pH-jú eluens esetében

Mozgófázis	40			45		
	k_I'	α	R_S	k_I'	α	R_S
H ₂ O/MeOH=80/20+10 mM AcOH (pH=3,55)	1,18	1,06	0,40	3,41	1,02	<0,4
H ₂ O/MeOH=80/20+10 mM H ₂ SO ₄ (pH=1,91)	0,32	1,22	0,65	1,21	1,28	1,25
H ₂ O/MeOH=80/20+10 mM HClO ₄ (pH=2,10)	0,13	1,32	0,40	1,24	1,30	0,75
H ₂ O/MeOH=80/20+10 mM TFA (pH=2,11)	0,04	1,00	0,00	1,12	1,21	0,65
H ₂ O/MeOH=80/20+10 mM H ₃ PO ₄ (pH=3,55)	0,01	1,40	0,40	0,63	1,22	0,60
H ₂ O/MeOH=80/20 + AcOH (pH=3,55)	1,18	1,06	0,40	3,41	1,02	<0,4
H ₂ O/MeOH=80/20 + H ₂ SO ₄ (pH=3,54)	1,07	1,05	0,50	3,63	1,14	0,75
H ₂ O/MeOH=80/20 + HClO ₄ (pH=3,55)	1,20	1,08	0,55	4,24	1,04	0,70
H ₂ O/MeOH=80/20 + H ₃ PO ₄ (pH=3,55)	1,16	1,08	0,50	3,59	1,04	<0,4
H ₂ O/MeOH=80/20 + TFA (pH=3,54)	1,17	1,14	0,65	3,48	1,01	<0,4

Kromatográfiás körülmények: oszlop, **Korona 2**; eluens, H₂O/MeOH=80/20 (v/v)+10 mM sav és H₂O/MeOH=80/20 (v/v) + sav (pH=3,54-3,55); 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

A β^2 -aminosavak (**3.6.** és **3.7. Táblázat**) szerkezetének hatását vizsgálva, jelentős eltérést tapasztalunk az alifás (**39-44**) és aromás (**45-49**) oldalláncot tartalmazó vegyületek viselkedésében (**4.10. Táblázat**) H₂O/MeOH=80/20 (v/v)+10 mM H₂SO₄ eluens összetétel mellett 25 °C-on. Aromás β^2 -aminosavak esetében a k_I' értékek 1,14-2,02 tartományba estek, jelentősen meghaladva az alifás oldallánccal rendelkezőkét (k_I' : 0,1-0,42). Érdekes viselkedést figyeltünk meg a **39-44** vegyületeknél: a **39** minta esetén tapasztalt legkisebb visszatartás a szénatomszám növekedésével nőtt, amely ellenkező irányú az előző fejezetben tárgyalt β^3 -aminosavaknál tapasztaltakkal. Ez azzal magyarázható, hogy a β^2 -aminosavaknál a protonált aminocsoporttól az oldalláncok egy szénatommal távolabb helyezkednek el, így azok szterikusan kevésbé gátolják a komplex kialakulását, valamint így az oldalláncok további kölcsönhatásba léphetnek az állófázissal.

4.10. Táblázat. Alifás és aromás β^2 -aminosavak kromatográfiás paraméterei (k_I' , α , R_S) **Korona 2** oszlopon fordított fázisú elválasztások esetén

Vegyület	Hőmérséklet	Mozgófázis (v/v)	k_I'	α	R_S
39	25,0	H ₂ O/MeOH, a	0,11	1,00	0,00
	7,0	H ₂ O/MeOH, a	0,48	1,00	0,00
	7,0	H ₂ O/EtOH, b	0,61	1,00	0,00
40	25,0	H ₂ O/MeOH, a	0,32	1,22	0,65
	7,0	H ₂ O/MeOH, a	0,59	1,18	0,50
	7,0	H ₂ O/EtOH, b	0,69	1,18	0,50
41	25,0	H ₂ O/MeOH, a	0,25	1,25	0,40
	7,0	H ₂ O/MeOH, a	0,75	1,22	0,85
	7,0	H ₂ O/EtOH, b	0,86	1,22	0,75
42	25,0	H ₂ O/MeOH, a	0,42	1,20	0,40
	7,0	H ₂ O/MeOH, a	1,20	1,08	0,40
	7,0	H ₂ O/EtOH, b	1,14	1,21	0,70
43	25,0	H ₂ O/MeOH, a	0,24	1,20	0,40
	7,0	H ₂ O/MeOH, a	0,75	1,19	0,40
	7,0	H ₂ O/EtOH, b	0,87	1,18	0,55
44	25,0	H ₂ O/MeOH, a	0,32	1,20	0,40
	7,0	H ₂ O/MeOH, a	0,82	1,21	0,65
	7,0	H ₂ O/EtOH, b	0,89	1,22	0,70
45	25,0	H ₂ O/MeOH, a	1,21	1,28	1,25
	7,0	H ₂ O/MeOH, a	2,86	1,37	1,45
	7,0	H ₂ O/EtOH, b	3,18	1,38	1,50
46	25,0	H ₂ O/MeOH, a	1,14	1,22	0,80
	7,0	H ₂ O/MeOH, a	3,28	1,30	1,35
	7,0	H ₂ O/EtOH, b	3,57	1,30	1,35
47	25,0	H ₂ O/MeOH, a	1,14	1,22	1,45
	7,0	H ₂ O/MeOH, a	3,53	1,35	1,55
	7,0	H ₂ O/EtOH, b	4,37	1,33	1,45
48	25,0	H ₂ O/MeOH, a	1,26	1,25	0,75
	7,0	H ₂ O/MeOH, a	4,15	1,32	1,35
	7,0	H ₂ O/EtOH, b	4,44	1,35	1,35
49	25,0	H ₂ O/MeOH, a	2,02	1,20	1,16
	7,0	H ₂ O/MeOH, a	3,97	1,36	1,40
	7,0	H ₂ O/EtOH, b	4,88	1,36	1,50

Kromatográfiás körülmények: oszlop, **Korona 2**; eluens, **a**, H₂O/MeOH=80/20 (v/v)+10 mM H₂SO₄, **b**, H₂O/EtOH=80/20 (v/v)+10 mM H₂SO₄; 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 280,15 K és 298 K.

A H₂O/MeOH=80/20 (v/v)+10 mM H₂SO₄ eluens összetétel mellett 25 °C-on az alifás oldalláncot tartalmazó vegyületek közül az *n*-butil-oldallánccal rendelkező **42** minta esetében kaptuk a legnagyobb visszatartást (k_I' =0,42). Aromás vegyületek vizsgálatakor **48** és **49** esetében figyeltük meg a legnagyobb retenciós adatokat, amely valószínűleg az éter kötésekben lévő oxigének H-híd kialakítására alkalmas tulajdonságával magyarázható.

Érdekes módon a fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó **46** és **47** esetében összehasonlítva a szubsztituátlan fenilgyűrűt tartalmazó **45** vegyülettel retenció csökkenést figyeltünk meg. Fenol esetében a –OH csoport pK-ja 9,9 (természetesen ez csak közelítő érték a **46** és **47** esetében), így az alkalmazott pH-n nem kell számolni a fenolos –OH disszociációjával. Ennek ellenére a fenolos –OH csoport valószínűleg mégsem vesz részt visszatartást segítő H-híd kölcsönhatásokban, hanem sztérikus gátlás révén akadályozza a minta és a szelektor közti kapcsolatot, ezért a retenció csökken a nem szubsztituált **45** vegyülethez képest.

A β^2 -aminosavak esetén a kémiai szerkezet és a kromatográfiás viselkedés közti összefüggést vizsgálva az alifás illetve aromás oldallánc helyzete jelentős befolyással bírt. β^2 -aminosavak esetében az aminocsoport sztérikusan kevésbé gátolt a komplex kialakításában a β^3 -aminosavakhoz képest, hiszen a kettes szénatomon található az oldallánc. Ez visszatartásnövekedést eredményezett, azonban a királis megkülönböztetési folyamatot kedvezőtlenül befolyásolta. Az utóbbi egyik oka lehet, hogy a kiraliás centrum és a protonált aminocsoport már nem ugyanazon a szénatomon található illetve a sztérikus gátlás egy meghatározó kölcsönhatás, mely a két enantiomer esetén jelentősen különbözhet, hozzájárulva a királis felismeréshez. A **4.10. Táblázat** adatai alapján a hat alifás oldalláncú aminosav közül csak egyet sikerült alapvonalra elválasztani, az aromás oldalláncú β^2 -aminosavak elválasztása sikereesebbnek mondható. A **39** vegyület esetében egyáltalán nem tapasztaltunk elválást, **40-44** esetében nem kaptunk szignifikáns különbséget a szelektivitási tényezőben ($\alpha=1,20-1,25$). Aromás oldalláncot tartalmazó vegyületek esetében a legnagyobb felbontás értéket ($R_S=1,45$) a **47** vegyület esetén kaptuk, ahol az aromás gyűrű *meta*-helyzetben szubsztituált, hasonlóan az aromás β^3 -aminosavakhoz.

A hőmérséklet hatásának vizsgálatára 280 és 298 K hőmérséklet tartományban történtek a mérések. Az általános tapasztalatnak megfelelően, kisebb hőmérsékleteken a retenció növekedett, amely a hőmozgás csökkenéséből adódó másodlagos kölcsönhatások erősödésének eredménye. A szelektivitást tekintve a **40-44** vegyületek esetében a hőmérséklet csökkenésével az α értéke alig változott, vagy csökkent, amely nem tekinthető klasszikus viselkedésnek. Aromás oldalláncú vegyületeknél a szelektivitási tényezők a hőmérséklet csökkenésével nőttek.

Összefoglalva, a β^2 -aminosavak elválasztása **Korona 2** állófázison különböző körülmények között valósult meg. A szerves komponens minősége és mennyisége eltérő módon befolyásolta az alifás és aromás oldalláncú enantiomerek elválasztását. A mozgófázisban lévő sav minősége és koncentrációja csak a nem királis kölcsönhatások

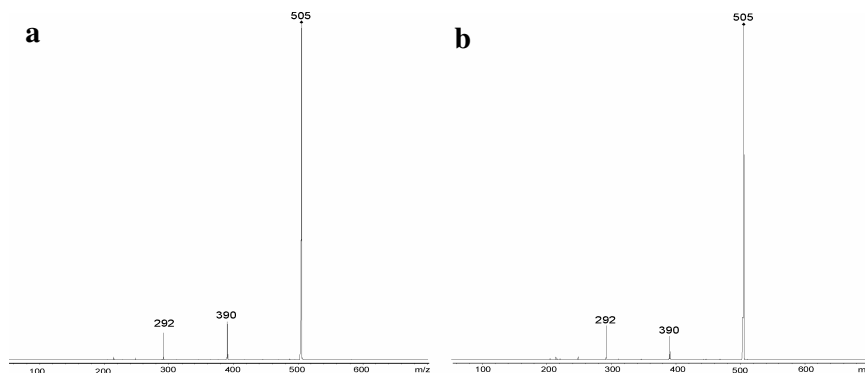
kialakítására volt jelentős hatással. A visszatartást tekintve szemben a β^3 -aminosavaknál tapasztaltakkal az alifás oldalláncot tartalmazó vegyületek esetén (39-44) a szénatomszám növekedésével nőtt a visszatartás; az aromás oldalláncú vegyületek (45-49) nagyobb retenciós idővel eluálódtak. A királis megkülönböztetési folyamatokat tekintve megállapítható, hogy az aromás gyűrű részt vesz a királis kölcsönhatások kialakításában, továbbá a *meta*-helyzetű szubsztitúció esetében nagyobb szelektivitás és felbontás értékek voltak megfigyelhetők. A tizenegy β^2 -aminosav enantiomerjeinek elválasztásában a **Korona 2** állófázis kevésbé bizonyult hatékonynak. A hőmérséklet szerepét vizsgálva a kromatográfiás folyamatokra, hasonlóan az eluens összetételre, itt is egymástól eltérő viselkedést figyeltünk meg a 39-44 és a 45-49 vegyületek esetében. A 45-49 vegyületek kiválasztott kromatogramjai a **10.3. Függelékben** találhatóak.

4.3. A β^3 -aminosav enantiomerek királis tömegspektrometriás megkülönböztetése

Ebben a fejezetben királis β^3 -aminosav enantiomerek gázfázisú tömegspektrometriás királis megkülönböztetését ismertetjük az irodalmi részben (2.3. fejezet) bemutatásra került Cooks kinetikai módszer alapján (3.8. és 3.9. Táblázat). Ugyan gázfázisú vizsgálatról beszélünk, azonban a méréshez szükséges anyagok H₂O/MeOH=50/50 (v/v) összetételű oldószeres oldatát közvetlen mintabevitellel (direkt infúzióval) 2,5 $\mu\text{L perc}^{-1}$ áramlási sebességgel vezettük a tömegspektrométerbe. A vizsgált és a referencia enantiomerek oldatának koncentrációja 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, az átmeneti fémionok koncentrációja 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ volt. Más szerves oldószerek is kipróbálásra kerültek, úgymint EtOH és ACN, de alkalmazásuk kisebb intenzitású jelet eredményezett, összehasonlítva a MeOH-lal.

A módszer rövid ismertetése: a mérés során a β^3 -aminosav *R* és *S* enantiomerjének külön oldata (ennél a módszernél szükség van a tiszta *R* és tiszta *S* enantiomerre), amely tartalmazza a referencia enantiomert és a fémiont, külön-külön injektálva a tömegspektrométerbe, 100-990 *m/z* tömegtartományban néhány tömegspektrum készült, majd kiválasztásra került a $[\text{M}^{\text{II}}(\text{ref})_2(\text{A})-\text{H}]^+$ komplexnek megfelelő tömegű ion MS/MS módban. Az ion izolálása után az ütközési energia optimalizálásával a maximális intenzitású $[\text{M}^{\text{II}}(\text{ref})(\text{A}_{R \text{ vagy } S})-\text{H}]^+$ és $[\text{M}^{\text{II}}(\text{ref})_2-\text{H}]^+$ dimereket kiválasztottuk úgy, hogy közben más fragmenst adó fragmentációs út ne jelenjen meg. Néhány esetben CO₂ veszteséget következett be már viszonylag kis ütközési energia alkalmazásakor, ez a veszteség az irodalomból jól ismert [114, 115]. Egy-egy aminosav két enantiomerjénél mindig azonos

ütközési energiát alkalmaztunk. Az optimalizálást követően 1 percig történt az adatgyűjtés. Az **56** vegyület két enantiomerjére kapott MS/MS spektrumot mutatja be a **4.9. ábra**. Látható, hogy a 292 m/z $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L-Pro})_2\text{-H}]^+$ referencia csúcs intenzitása és 390 m/z -vel rendelkező $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L-Pro})(\mathbf{56}_R)\text{-H}]^+$ illetve a másik enantiommernél a $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L-Pro})(\mathbf{56}_S)\text{-H}]^+$ intenzitások aránya eltérő a két spektrumon. A kiértékelés a (22), (23) és (24) összefüggések felhasználásával történt. A kiértékelés során az 505 m/z -vel rendelkező szülőion $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L-Pro})_2(\mathbf{56}_R)\text{-H}]^+$ és $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L-Pro})_2(\mathbf{56}_S)\text{-H}]^+$ trimer komplex intenzitásával nem számoltunk. Hasonlóan jártunk el az összes vizsgált β^3 -aminosav esetén. A (22) és (23) összefüggékből kapott R_R és R_S értékek hányadosából határoztuk meg $R_{\text{királis}}$ (24) értékét. Ha R_R értéke nagyobb az R_S -nél, akkor $R_{\text{királis}} > 1$, ellenkező esetben $R_{\text{királis}} < 1$. Mind a két esetben királis megkülönböztetésről beszélhetünk, azaz, ha $R_{\text{királis}}$ értéke 1-től eltérő.



4.9. ábra

A **56** minta CID spektruma **L-Pro** referencia anyag jelenlétében: **a**) $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L-Pro})_2(\mathbf{56}_R)\text{-H}]^+$ and **b**) $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L-Pro})_2(\mathbf{56}_S)\text{-H}]^+$ komplexeknek

Átmeneti fémionokat a jó komplexképző tulajdonságaik végett alkalmazzák a kinetikai módszernél, legelterjedtebben a $\text{Cu}^{\text{(II)}}$ és a $\text{Ni}^{\text{(II)}}$ ionokat használják [117-121]. Vizsgálataink során mind a két fémet alkalmaztuk (**4.11. és 4.12. Táblázat**). Összehasonlítva a két fémion hatását az enantiomer megkülönböztetésben, a $\text{Cu}^{\text{(II)}}$ **L-Pro**, **L-Phe**, **L-Tyr** esetében jobbnak bizonyult. Nagy eltérés **L-DOPA** alkalmazásakor volt megfigyelhető, amíg a réz komplexek esetében nem kaptunk királis megkülönböztetést, addig $\text{Ni}^{\text{(II)}}$ komplexeknél igen.

4.11. Táblázat. β^3 -aminosavak Cu^{II} komplexének számolt $R_{\text{királis}}$ értékei különböző

referencia enantiomerek alkalmazása esetén

Vegyület	Referencia enantiomerek						
	<i>L</i> -Pro	<i>L</i> -Phe	<i>L</i> -2',6'-diMePhe	<i>L</i> -Tyr	<i>L</i> -2',6'-diMeTyr	<i>L</i> -Phg	<i>L</i> -4'-OH-Phg
	<i>R</i> _{királis}						
50	1,19±0,07	a)	1,06±0,06	0,84±0,10	e)	b) c) d)	0,50±0,05 0,73±0,01 0,90±0,03 1,13±0,05 0,41±0,11 0,63±0,01
51	1,28±0,18	0,88±0,11	0,91±0,07	1,30±0,12	e)	b) c) d)	0,79±0,02 0,71±0,04 1,16±0,01 1,15±0,06 0,53±0,03 0,55±0,05
52	1,28±0,16	0,87±0,02	e)	e)	0,82±0,10	b) c) d)	0,63±0,03 0,54±0,06 1,09±0,10 1,00±0,12 0,49±0,02 0,47±0,06
53	1,31±0,17	0,83±0,11	1,19±0,01	e)	0,90±0,08	b) c) d)	0,66±0,03 0,81±0,11 1,24±0,05 1,60±0,17 0,51±0,02 0,71±0,10
54	1,28±0,11	0,91±0,01	e)	e)	e)	b) c) d)	0,65±0,07 0,68±0,02 1,04±0,14 1,14±0,11 0,54±0,05 0,62±0,03
55	2,68±0,17	1,10±0,07	a)	1,67±0,30	1,39±0,25	b) c) d)	1,70±0,19 1,25±0,07 0,96±0,08 1,08±0,04 1,51±0,12 1,34±0,09
56	1,88±0,02	1,79±0,07	e)	1,56±0,07	1,56±0,35	b) c) d)	1,53±0,11 1,21±0,03 1,37±0,07 1,12±0,06 1,64±0,14 1,24±0,04

a) nem számolható az *R*_{királis} értéke a vizsgált β³-aminosav és a referencia azonos molekulatömege miatt.

b) a királis megkülönböztetés [Cu^{II}(ref)(A_R vagy S)-H]⁺ és [Cu^I(ref)(A_R vagy S)]⁺ komplexek együttes intenzitásával számolva.

c) a királis megkülönböztetés a [Cu^{II}(ref)(A_R vagy S)-H]⁺ intenzitásával számolva.

d) a királis megkülönböztetés a [Cu^I(ref)(A_R vagy S)]⁺ intenzitásával számolva.

e) Nem volt királis megkülönböztetés.

4.12. Táblázat. β³-aminosavak Ni^{II} komplexének számolt *R*_{királis} értékei különböző referencia enantiomerek alkalmazása esetén

Vegyület	Referenci enantiomerek					
	<i>L</i> -Pro	<i>L</i> -Phe	<i>L</i> -2',6'-diMePhe	<i>L</i> -Tyr	<i>L</i> -2',6'-diMeTyr	<i>L</i> -DOPA
	<i>R</i> _{királis}					
50	1,13±0,09	a)	1,07±0,02	b)	1,22±0,08	1,12±0,08
53	b)	0,86±0,11	b)	1,30±0,06	b)	1,23±0,06
56	1,25±0,15	1,16±0,09	1,19±0,01	0,92±0,10	b)	0,85±0,07

a) Nem számolható az *R*_{királis} értéke a vizsgált β³-aminosav és a referencia azonos molekulatömege miatt.

b) Nem volt királis megkülönböztetés.

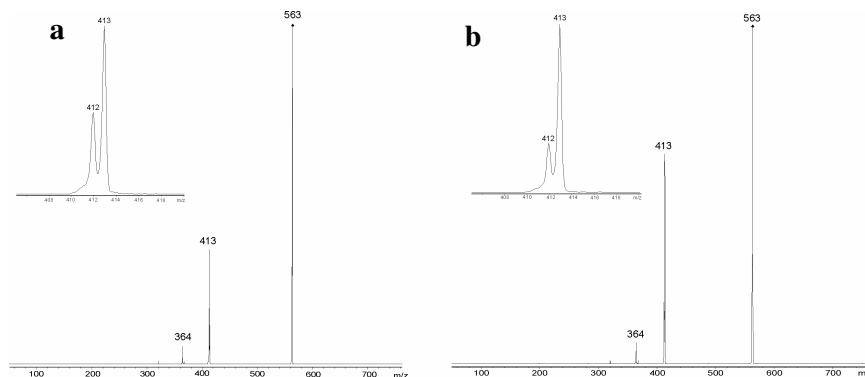
A gázfázisú királis megkülönböztetési folyamatban a referencia enantiomereknek jelentős szerepük van. Jellemző kölcsönhatások a referencia enantiomer-vizsgált enantiomer-fémion komplexben a π - π , sztérikus és π -d kölcsönhatások, amelyek a koordinatív kötés mellett jelentkeznek. A legnagyobb $R_{királis}$ értéket az **55** vegyület esetén **L-Pro** alkalmazásával kaptuk, $R_{királis}=2,68$. Az **L-Pro** α -aminosavak esetén is igen hatékonynak bizonyult, amit viszonylag merev szerkezetével magyaráztak. A referencia vegyületek kiválasztásakor döntő, hogy szubsztituált vagy nem szubsztituált aromás gyűrűt tartalmazzanak, feltételezve, hogy π - π és π_{sav} - $\pi_{bázis}$ kölcsönhatásba tudnak lépni a vizsgált aromás β^3 -aminosavakkal [98].

L-Phe, **L-Tyr**, **L-2,6-diMeTyr** és **L-2,6-diMePhe** referencia enantiomerek összehasonlításakor az **L-Tyr** alkalmazásakor **50**, **51** és **55** vegyületek esetében kaptuk a legnagyobb $R_{királis}$ értékeket. Feltételezhető, hogy ez a vizsgált enantiomerek és az **L-Tyr** között fellépő π_{sav} - $\pi_{bázis}$ kölcsönhatásnak tulajdonítható. Az **51** és **55** vegyületek pozitív indukciós effektussal rendelkező metilszubsztituensnek köszönhetően π -bázisos karakterűeknek tekinthetőek, míg az **L-Tyr** π -savas karakterű (fenolos -OH csoport). Érdekes módon az erősen π -savas **L-DOPA** esetében nem volt megfigyelhető királis megkülönböztetés, ez valószínűleg sztérikus okokkal magyarázható. A szelektivitási értékekből jól látható, hogy a benzilcsoportot tartalmazó α -aminosav enantiomerek (**L-Phe**, **L-2',6'-diMePhe**, **L-Tyr**, **L-2',6'-diMeTyr**) azon β^3 -aminosavak esetében (**55,56**) voltak hatékonyak, amelyek királis szénatomjához szintén benzilcsoport kapcsolódik. Hasonló összefüggést figyeltünk meg a fenilgyűrűt tartalmazó **L-Phg** és **L-4-OHPhg** referencia enantiomerek és β^3 -aminosavak (**1-5**) között. A fémion szerepének jelentőségét mutatja, hogy Ni^(II) esetében ez a szerkezeti hatás nem volt megfigyelhető.

A vizsgált β^3 -aminosavakat fenil- (**50-54**) és benzilcsoportjuk (**55,56**) alapján elkülönítve megállapítható, hogy amíg **50-54** esetében a fenilgyűrűn található szubsztituens minősége és helyzete alig befolyásolta a királis megkülönböztetést, kivéve **L-Phg** és **L-4-OHPhg** referencia enantiomerek alkalmazásakor (ahol az előbbi az **50**, az utóbbi az **52** minta esetében bizonyult a legjobbnak), addig az **55** és **56** vegyület esetében a *para*-helyzetű metil- illetve kloridcsoport jelenléte **L-Pro** referenciaként való alkalmazásakor kedvezően befolyásolta a királis megkülönböztetést.

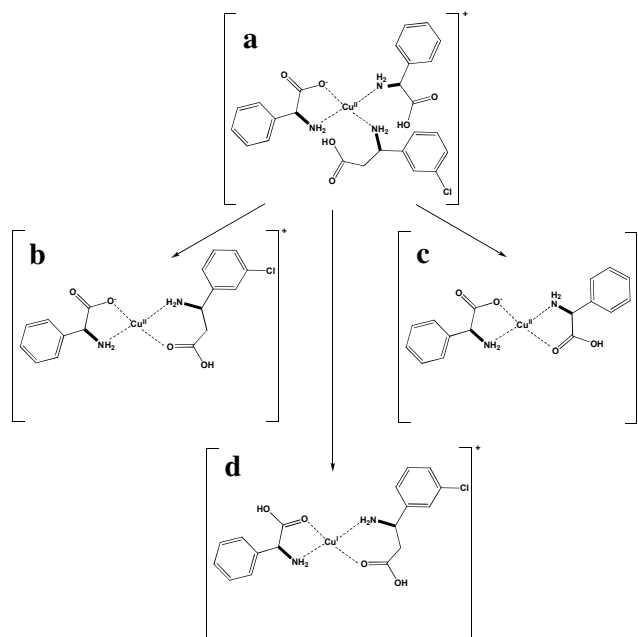
L-Phg és **L-4-OHPhg** alkalmazásakor Cu^(II) esetében az összes β^3 -aminosavnál érdekes viselkedést figyeltünk meg a $[Cu^{II}(\mathbf{ref})_2(\mathbf{A})-H]^+$ komplex fragmentációjakor. A várt dimer komplex mellett $[Cu^{II}(\mathbf{ref})(\mathbf{A}_R \text{ vagy } s)-H]^+$ 1 Da-nal nagyobb tömegnél megjelent

egy csúcs, amely a Cu^{II} redukciójából adódóan $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{ref})(\text{A}_R \text{ vagy } \text{S})]^+$ szerkezettel magyarázható (4.9. és 4.10. ábra). Ni^{III} esetében nem tapasztaltunk redukción.



4.9. ábra


a) $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L-Phg})_2(54_R) - \text{H}]^+$ és b) $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L-Phg})_2(54_S) - \text{H}]^+$ komplexek CID tömegspektruma.





4.10. ábra

a, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L-Phg})_2(54_R) - \text{H}]^+$ komplex fragmentációja során keletkezett b, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L-Phg})(54_R) - \text{H}]^+$, c, $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{L-Phg})_2 - \text{H}]^+$ és d, $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{L-Phg})(54_R)]^+$ dimer komplexek lehetséges szerkezetei



A szelektivitás a Cu^{III} redukcióját feltételezve háromféle képpen került kiszámításra:

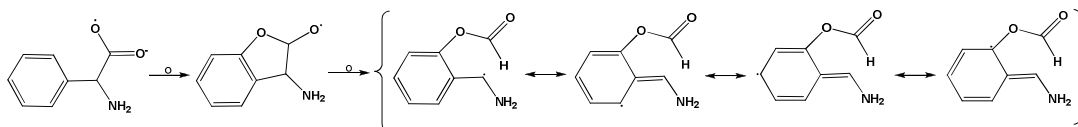
 $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ref})(\text{A}_R \text{ vagy } \text{S}) - \text{H}]^+$ és $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{ref})(\text{A}_R \text{ vagy } \text{S})]^+$ komplexek együttes intenzitásának,

 $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ref})(\text{A}_R \text{ vagy } \text{S}) - \text{H}]^+$ intenzitásának,

 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{ref})(\text{A}_R \text{ vagy } S)]^+$ intenzitálásának felhasználásával.

A kapott $R_{\text{királis}}$ értékek tanulmányozásakor megállapítható, hogy a szokásos $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ref})(\text{A}_R \text{ vagy } S)-\text{H}]^+$ intenzitásával történő számolás esetén a többi referencia esetében mértékkel összevethető szelektivitás értékeket kaptunk (**4.11. Táblázat**). Azonban az együttes illetve a redukált forma intenzitásával számolt szelektivitás értékek az **50**, **53** és **54** esetén kiugróan jobbak. Összehasonlítva a két fenilcsoportot tartalmazó referencia enantiomert, **L-Phg** esetén nagyobb $R_{\text{királis}}$ értékek voltak megfigyelhetők, kivéve a **51** és **52** vegyületeket.

A redukciós mechanizmus vizsgálatakor felmerült, hogy miért csak az α pozícióban fenilgyűrűt tartalmazó **L-Phg** és **L-4-OHPhg** esetében lép fel és miért nem tapasztalható a benzil analógoknál? További érdekesség, hogy normál esetben neutrális vesztés formájában egy referencia molekula kilép, azonban a redukció során egy gyökvesztés lép fel **L-Phg-H \cdot** és **L-4-OHPhg-H \cdot** formájában. Ez a kilépés a gyök stabil rezonancia szerkezetével magyarázható. A gyök a benzil oldallánc esetén is kialakulhat, azonban a fenil oldallánc esetében további három lehetséges rezonancia szerkezet alakulhat ki (**4.11. ábra**). Ez egyben megmagyarázza, hogy miért nem volt megfigyelhető a redukció $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ref})_2]^+$ dimer komplex esetében, hiszen a kilépő β^3 -aminosav gyököknél nem alakulhat ki ez a rezonancia stabilizált szerkezetet. Legvégül a  és  szerint számolt $R_{\text{királis}}$ értékek **50-54** esetében $<1,0$, amely arra utal, hogy *S* β^3 -aminosav enantiomerek esetében a $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{ref})(\text{A}_S)]^+ / [\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ref})_2]^+$ intenzitásának aránya nagyobb volt, mint az *R* enantiomer $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{ref})(\text{A}_R)]^+ / [\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ref})_2]^+$ esetében, tehát a redukció kedvezményezettebb volt az *S* enantiomer esetében. Az $R_{\text{királis}}$ **55** és **56** esetében >1 -nek adódott, ezt a Cahn-Ingold-Prelog (C.I.P.) szabály magyarázhatja.



4.11. ábra
L-Phg-H \cdot gyök lehetséges rezonancia szerkezetei

Összefoglalásként elmondható, hogy hét β^3 -aminosav tömegspektrometriás kinetikus módszerrel való vizsgálata során a $[\text{M}^{\text{II}}(\text{ref})_2(\text{A})-\text{H}]^+$ trimer komplexek fragmentálása után kapott $[\text{M}^{\text{II}}(\text{ref})(\text{A}_R \text{ vagy } S)-\text{H}]^+$ és $[\text{M}^{\text{II}}(\text{ref})_2-\text{H}]^+$ dimer komplexek intenzitás arányából meghatározható a királis szelektivitás. A vizsgált β^3 -aminosavak, a referenciaként

alkalmazott α -aminosavak és a fémion hozzájárulását vizsgálva a királis megkülönböztetési folyamathoz megállapítottuk, hogy a fenilcsoportot tartalmazó α -aminosav enantiomerek (**L-Phg** és **L-4-OHPhg**) azon β^3 -aminosavak esetében (**50-54**) voltak hatékonyak, amelyek királis szénatomjához szintén fenilcsoport kapcsolódott. Hasonló összefüggést figyeltünk meg a benzilgyűrűt tartalmazó (**L-Phe**, **L-2',6'-diMePhe**, **L-Tyr**, **L-2',6'-diMeTyr**) referencia enantiomerek és β^3 -aminosavak (**55,56**) között. A vizsgált β^3 -aminosavak aromás gyűrűjén található szubsztituens tulajdonságának és helyzetének a királis szelektivitást befolyásoló szerepe erősen függött az alkalmazott referencia enantiomertől. Kitértünk a komplex központi fémion tulajdonságának a királis szelektivitásban betöltött szerepére Cu^{II} és Ni^{II} komplexek példáján keresztül. Legvégül **L-Phg** és **L-4-OHPhg** vizsgálatokor a $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ref})(\text{A}_{\text{R}} \text{ vagy } \text{S})-\text{H}]^+$ komplexben lévő Cu^{II} ion redukcióját figyeltük, amely $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{ref})(\text{A}_{\text{R}} \text{ vagy } \text{S})]^+$ komplexet eredményezett MS/MS mérés során, és ennek hátterét vizsgáltuk rezonancia szerkezetek segítségével.

5. Összefoglalás

Munkánk során β -laktám, β -, β^2 - és β^3 -aminosav enantiomerek királis folyadékkromatográfiás elválasztására dolgoztunk ki módszereket illetve tanulmányoztuk β^3 -aminosav enantiomerek gázfázisú királis megkülönböztetési folyamatát.

1. Hét aromás β -laktám (**3.1. Táblázat**) enantiomerjeit makrociklusos glikopeptid alapú Chirobiotic **T** és **TAG** királis állófázisokon választottuk el. Összehasonlítva a két oszlopot, Chirobiotic **TAG** esetében nagyobb szelektivitási tényező és felbontás értékeket kaptunk. Vizsgálataink kitértek az eluensösszetétel és a hőmérséklet változásának a királis elválasztásra gyakorolt hatására. Megállapítottuk, hogy a szerves komponens növelésével jelentősen csökkent az enantiomerek visszatartása mind a két állófázison. A szelektivitási tényező enyhe maximum görbe szerint változott, a felbontás 100% MeOH esetén volt a legjobb. A hőmérsékletváltozás adataiból termodinamikai paramétereket számoltunk, amelyek a királis felismerési folyamatban a szelektorok és a vizsgált vegyületek szerkezeti hozzájárulása közti kapcsolat értelmezését segítették. Az elválasztás során enantiomerek elúciós sorrendjét is meghatároztuk, egységesen $S < R$ sorrendet kaptunk.

2. A kondenzált gyűrűs β -laktám és β -aminosav enantiomerek elválasztását (**3.2. és 3.3. Táblázat**) öt makrociklusos glikopeptid alapú teicoplanin (Chirobiotic **T**), teicoplanin aglikon (Chirobiotic **TAG**), vankomicin (Chirobiotic **V**), vankomicin aglikon (Chirobiotic **VAG**), ristocetin A (Chirobiotic **R**) és 3,5-dimetilfenilkarbamoil β -ciklodextrin (Cyclobond **DMP**) királis szelektort tartalmazó királis állófázisokon oldottuk meg. A vizsgálatok fordított fázisú, poláris-szerves és poláris-ionos körülmények között történtek. A makrociklusos glikopeptid szelektorok közül ismét a Chirobiotic **TAG** esetében kaptuk a legnagyobb szelektivitás és felbontás értékeket. Az elválasztási tényezőkből számolt $\Delta_{\text{TAG-T}}(\Delta G^{\circ})$ értékek jól mutatták, hogy Chirobiotic **T** esetében a szelektoron található cukorrészek a **13** vegyület kivételével kedvezőtlenül befolyásolták a királis megkülönböztetést. A Cyclobond **DMP** oszlop mind fordított, mind normál fázisban igen jó elválasztást mutatott a **8** és **9** β -laktámok valamint a **11** β -aminosav enantiomerek elválasztásakor. Az enantiomerek elúciós sorrendje meghatározásra került, a különböző állófázisokon a három β -aminosav esetén elúciós sorrendváltozást figyeltünk meg.

3. A (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav királis szelektort tartalmazó koronaéter állófázison (**Korona 1**) β^3 - és β^2 -aminosav enantiomerek elválasztását tanulmányoztuk. Az első vegyületcsoport tizenöt 3-aryl-szubsztituált β^3 -aminosavat foglalt magában. Az eluensösszetétel vizsgálatokor a mozgófázisban a MeOH-tartalom növelésével nőtt a visszatartás, azonban ez a hatás kedvezőtlenül befolyásolta a királis megkülönböztetési folyamatot, kisebb szelektivitás és a felbontás értékeket eredményezett. A mozgófázishoz adagolt sav koncentrációjának növelésével jelentős retenciósökkenést tapasztaltunk, amit a β^3 -aminosav és a szelektor karboxilcsoportja disszociációjának visszaszorulásával és a savból származó anion *ellenion* hatásával értelmeztünk. A vegyületek szerkezetének és a kromatográfiás viselkedésének kapcsolatát vizsgálva az aromás gyűrűn *para*-helyzetű F-, Cl-, Br- és CF₃-szubsztitúció növelte a visszatartást, a szelektivitást és a felbontást. A metoxi- és metilcsoport nem, vagy kis mértékben csökkentette a királis szelektivitást. A szubsztituensek helyzetét vizsgálva, a *meta*- és a *para*-helyzetű szubsztitúció bizonyult a legkedvezőbbnek, míg az *orto*-szubsztituált vegyületek enantiomerjei, valószínűleg szterikus gátlás miatt, nehezen voltak elválaszthatók. A tizenöt vizsgált vegyület közül mindössze a **19** és **24** enantiomerjei mutattak részleges elválást (**3.4. Táblázat**). Hat vegyület esetében az enantiomerek elúciós sorrendje is meghatározásra került, egységesen *R*<*S* sorrendet eredményezve.

4. Az alifás és alicikus β^3 -aminosav enantiomerek (**3.5. Táblázat**) elválasztásának módszerét szintén **Korona 1** állófázison dolgoztuk ki. Az eluensösszetétel hatásának vizsgálatokor a mozgófázis nagyobb szerves módosító tartalma nagyobb visszatartást, szelektivitást és felbontást eredményezett. Vizsgáltuk az eluensben alkalmazott alkoholok szénatomszámának hatását és egységesen a hosszabb szénláncú alkoholok esetében *k'* növekedést tapasztaltunk. Az alkoholok szénatomszámának hatása a királis megkülönböztetési folyamatra nem volt egyértelmű, ugyanis az EtOH esetében kaptuk a legnagyobb α értékeket. A visszatartásban és a királis megkülönböztetési folyamatban az aminosavak nagyobb térkitöltésű alifás oldalláncai jelentősen csökkentették az enantiomer-koronaéter komplex stabilitását, kisebb retenciót eredményezve, azonban a kialakuló gyengébb nemkirális kölcsönhatások nem csökkentették az enantioszelektivitást, a kisebb retenciós faktorok ellenére a két enantiomer kölcsönhatása közti különbség megmaradt. A **29**, **35** és **36** vegyületek esetében rendelkezésre állt a tiszta enantiomer, egységesen *S*<*R* elúciós sorrendet kaptunk.

5. Az alifás és aromás β^2 -aminosav enantiomerek (**3.6.** és **3.7. Táblázat**)

elválasztására **Korona 2** állófázison dolgoztunk ki módszereket. A **Korona 2** hasonlóan a **Korona 1**-hez (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav királis szelektort tartalmaz, a különbség a hordozóban van: a királis szelektor módosított aminopropil szilikagélhez van kötve, melyen a szilanolcsoportok védettek (endcapped). Az eluensösszetétel vizsgálatokor megállapítottuk, hogy a szerves komponens minősége és mennyisége eltérő módon befolyásolta az alifás és aromás oldalláncú enantiomerek elválasztását. A mozgófázisban lévő sav minősége és koncentrációja csak a nem királis kölcsönhatások kialakítására volt jelentős hatással. A visszatartás a β^3 -aminosavaknál tapasztaltaktól eltérően mind az alifás (39-44), mind az aromás (45-49) oldalláncot tartalmazó vegyületek esetén a szénatomszám növekedésével nőtt. A királis megkülönböztetési folyamat és az enantiomerek szerkezete közötti kapcsolat vizsgálatokor megállapítottuk, hogy az aromás gyűrű meghatározó a királis kölcsönhatások kialakításában, tovább a *meta*-helyzetű szubsztitúció esetében nagyobb szelektivitás és felbontás értékek voltak megfigyelhetők. A hőmérséklet szerepét vizsgálva az enantiomerek elválasztása során, hasonlóan az eluens összetétel hatásának tanulmányozásakor itt is egymástól eltérő viselkedést figyeltünk meg az alifás és az aromás β^2 -aminosavak között. A **Korona 2** állófázison az aromás oldalláncú β^2 -aminosavak elválasztása sikeresebbnek mondható.

6. A β^3 -aminosavak (3.9. Táblázat) gázfázisú királis megkülönböztetési folyamatát ioncsapda tömegspektrométerrel vizsgáltuk, α -aminosav referens enantiomerek (**ref**) segítségével (3.8. Táblázat), amelyek a Cu^{II} és Ni^{II} központi fémiont tartalmazó $[\text{M}^{\text{II}}(\text{ref})_2(\text{A}_R \text{ vagy } S)\text{-H}]^+$ trimer komplexekben a királis környezet megteremtéséhez szükségesek (ahol: „A” vizsgált β -aminosav). Megállapítottuk, hogy a fenilcsoportot tartalmazó α -aminosav enantiomerek (**L-Phg** és **L-4-OHPhg**) azon β^3 -aminosavak esetében (50-54) voltak hatékonyak, amelyek királis szénatomjához szintén fenilcsoport kapcsolódott. Hasonló összefüggést találtunk a benzilgyűrűt tartalmazó (**L-Phe**, **L-2',6'-diMePhe**, **L-Tyr**, **L-2',6'-diMeTyr**) referencia enantiomerek és a szintén benzilgyűrűt tartalmazó 55 és 56 β^3 -aminosavak között. A vizsgált β^3 -aminosavak aromás gyűrűjén található szubsztituens tulajdonságának és helyzetének a királis szelektivitást befolyásoló szerepe erősen függött az alkalmazott referencia enantiomertől. A komplex központi fémion tulajdonságának a királis szelektivitásában betöltött szerepét Cu^{II} és Ni^{II} komplexek példáján mutattuk be. Az **L-Phg** és **L-4-OHPhg** vizsgálatokor a $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ref})(\text{A}_R \text{ vagy } S)\text{-H}]^+$ komplexben lévő Cu^{II} ion redukcióját figyeltük, amely az MS/MS mérés során $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{ref})(\text{A}_R \text{ vagy } S)]^+$ komplexet eredményezett. A $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Cu}^{\text{I}}$ redukció háttérét vizsgáltuk rezonancia-szerkezetek segítségével.

6. Summary

We developed methods for the separation of β -lactam, β -, β^2 - és β^3 -amino acid enantiomers by using chiral liquid chromatography, and we have investigated the process of gas phase chiral discrimination of β^3 -amino acid enantiomers. The summary of the part on liquid chromatography is divided according to applied stationer phases and the compounds, similarly to the main part of the thesis.

1. Enantiomers of seven aromatic β -lactams (Table 3.1) were separated on chiral stationer phases containing macrocyclic glycopeptide antibiotic teicoplanin (Chirobiotic T) and teicoplanin aglycone (Chirobiotic TAG). Upon comparing the two columns, both the selectivity factor and the resolution value were larger in the case of the Chirobiotic TAG. This investigation also covered the effects of eluent composition and changes in temperature on chiral separation. We have concluded that upon increasing the organic component, the retention of enantiomers decreased significantly in both stationer phases. The separation factor (α) changed on a slight maximum curve; the resolution (R_s) was the best in the case of MeOH. Based on the data of temperature changes, we calculated thermodynamic parameters, which helped to understand the relationship between the structure of the selectors and the studied compounds during the chiral recognition process. We also determined the elution sequence of the enantiomers, what consistently proved to be $S < R$.

2. The direct separation of tricyclic β -lactam and bicyclic β -amino acids enantiomers (Tables 3.2. and 3.3.) was achieved on five macrocyclic glycopeptide-based columns teicoplanin (Chirobiotic T), teicoplanin aglycone (Chirobiotic TAG), vancomycin (Chirobiotic V), vancomycin aglycone (Chirobiotic VAG), ristocetin A (Chirobiotic R) and 3,5-dimethylphenyl carbamate-derivatized β -cyclodextrin (Cyclobond DMP) based column. The results achieved with the different methods (POM, PIM and reversed-phase mode), were compared in systematic chromatographic examinations. Among the macrocyclic glycopeptide selectors, the highest separation factor and resolution were observed in the case of chirobiotic TAG. The $\Delta_{TAG-T}(\Delta G^0)$ value calculated from the α clearly showed that in the case of chirobiotic T the carbohydrate moieties found on the selector have always influenced the chiral discrimination negatively except in the case of the 13 compounds. The Cyclobond DMP column indicated good separation of 8 and 9 β -lactams and the 11 β -amino acid both in reversed- and normal-phase mode. The elution sequence was determined in all cases and a general rule was established for the sequence

of elution of the stereoisomers. We witnessed a change of elutional order in different stationary phase in the case of the three β -amino acids.

3. High-performance liquid chromatographic methods were developed for the separation of enantiomers of β^2 - and β^3 -amino acids on a chiral stationary phase containing (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid as a chiral selector. The chromatographic retention and the resolution behavior of fifteen 3-aryl substituted β^3 -amino acids was found to be dependent in different way on the mobile phase composition. An increase in the content of MeOH in the aqueous mobile phase increases the retention while the α and R_S decreases. The retention factors continuously decreased with increasing the concentration of acidic modifier in the aqueous mobile phase. It may be explained by the lower dissociation of the carboxylic group of amino acid and the crown ether moreover effect of the counter ion of acid. The nature and position of the substituents had substantial effects on the retention, but the α changed to a much lower extent than the retention. Higher k_I' , α and R_S were observed for the analytes containing the F-, Cl-, Br- és CF₃- substituents in *para* positions on the aromatic ring comparing with ortho and meta substituted analogs. Ortho position of the substituents was unfavorable regarding the enantioseparation. The elution sequence was determined, what proved to be was $R < S$.

4. Chiral separation of enantiomers of aliphatic and alicyclic β^3 -amino acids was studied on a chiral stationary phase also containing (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid as a chiral selector. The chromatographic data of different mobile phase composition revealed that an increase in the content of MeOH in the aqueous mobile phase increased the retention, the selectivity and the resolution. The nature of alcoholic modifier had substantial effects on the retention, but the selectivity changed to much lower extent than the k value. At constant mobile phase composition the longer aliphatic chain or branching structure of the substituents on the β -carbon atom resulted in lower retention, but the selectivity and the resolution did not decrease. At **29**, **35** and **36** compounds the elution sequence was $S < R$.

5. High-performance liquid chromatographic methods were developed for the separation of enantiomers of aliphatic and alicyclic β^2 -amino acids on a endcapped chiral stationary phase containing (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid as a chiral selector. The chromatographic data of the analytes revealed that elevation of the content of MeOH in the aqueous mobile phase increased the retention. The nature of acidic modifier influenced substantially only the non-chiral chromatographic process. The nature of the

substituent on the α -carbon atom of the analyte exerted a substantial effect on the retention, but the selectivity changed to a much lower extent than the k' value. Different chromatographic behavior was observed at aliphatic β^2 -amino acids comparing with aromatic ones using different mobile phase composition. The analytes with aromatic side-chains exhibited better resolution on this type of selector than that for the analytes with aliphatic side-chains. The change of temperature exerted different effects on the β^2 -homoamino acids with either aliphatic or aromatic side-chains (Table 2). The lowering of the temperature increased the retention factor in all cases, while the α values for the amino acids with aliphatic side-chains slightly decreased, and those for the amino acids with aromatic side-chains increased with decreasing temperature. The R_S values in most cases increased with decreasing temperature.

6. Chiral discrimination of seven enantiomeric pairs of β^3 -amino acids ($A_{R \text{ or } S}$) was studied by using the kinetic method and trimeric metal-bound complexes $[M^{II}(\mathbf{ref})_2(A_{R \text{ or } S})-H]^+$, with natural and unnatural α -amino acids as chiral reference (\mathbf{ref}) compounds and divalent metal ions Cu^{II} and Ni^{II} as the center ions (M^{II}). The highest enantioselectivities were achieved for the analytes with benzyl side chain, β^3 -amino acids. Benzyl side chain makes the analytes (enantiomers of interest) more flexible allowing more effective $\pi-\pi$ interactions between the analyte and reference molecules. The highest enantioselectivities were obtained using **L-Pro**, **L-Phg** and **L-4-OHPhg** as reference compounds, so the combination of relatively rigid reference compound and more flexible analyte generates the optimal environment for chiral discrimination. For all the analytes studied, interesting behavior was noticed, the Cu^{II} reduced to Cu^I when **L-Phg** and **L-4-OHPhg** were used as reference compounds and copper as the central metal ion.

7. Hivatkozások

- [1] Y.K. Agrawal, H.G. Bhatt, H.G. Raval, P.M. Oza, P.J. Gogoi, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 7 (2007) 451.
- [2] E.J. Ariens, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26 (1984) 663.
- [3] E.J. Ariens, W. Soudijn, P. Timmermans (Eds.), *Stereochemistry and Biological Activity of Drugs*, Blackwell, Oxford, 1983.
- [4] H. Caner, E. Groner, L. Levy, I. Agranat, *Drug Discovery Today*, 9 (2004) 105.
- [5] S. Görög, M. Gazdag, *J. Chromatogr. B* 659 (1994) 51.
- [6] L.H. Easson, E. Stedman, *Biochem. J.* 27 (1933) 1257.
- [7] C.E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.* 137 (1952) 3940.
- [8] W.H. Pirkle, T. C. Pochapsky, *Chem. Rev.* 89 (1989) 347.
- [9] A.M.A. van Wageningen, P.N. Kirkpatrick, D.H. Williams, B.R. Harris, J.K. Kershaw, N.J. Lennard, M. Jones, S.J.M. Jones, P.J. Solenberg, *Chem. Biol.* 5 (1998) 155.
- [10] D.W. Armstrong, *Pittsburg Conference Abstracts, Pittcon, 1994*, p. 572.
- [11] D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, J.-R. Chen, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1473.
- [12] D.W. Armstrong, Y. Liu, K.H. Ekborg-Ott, *Chirality* 7 (1995) 474.
- [13] M.P. Gasper, A. Berthod, U.B. Nair, D.W. Armstrong, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2501.
- [14] D.W. Armstrong, *LC-GC* (1997) S20.
- [15] D.W. Armstrong, U.B. Nair, *Electrophoresis* 18 (1997) 2331.
- [16] *Chirobiotic Handbook*, Advanced Separation Technologies Inc., 07981, Whippany, NJ, USA, 4th Edition (2002)].
- [17] I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1305.
- [18] G.K. Best, N.H. Best, N.N. Durham, *Antimicrob. Agents Chemometr.* 4 (1968) 115.
- [19] U.B. Nair, S.S.C. Chang, D.W. Armstrong, Y.Y. Rawjee, D.S. Eggleston, J.V. McArdle, *Chirality*, 8 (1996) 590.
- [20] J.C.J. Barna, D.H. Williams, D.J.M. Stone, T.-W.C. Leung, D.M. Dodrell, *J. Amer. Chem. Soc.* 106 (1984) 4895.
- [21] A. Berthod, Y. Liu, C. Bagwill, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 123.
- [22] S. Somma, L. Gastaldo, A. Corti, *Antimicrob. Agents Chemother.* 26 (1984) 917.
- [23] P. Arriaga, J. Laynez, M. Menendez, J. Cañada, F. Garcia-Blanco, *Biochem. J.* 265 (1990) 69.

- [24] A. Berthod, X. Chen, J.P. Kullman, D.W. Armstrong, F. Gasparri, I. D'Acquarica, C. Villani, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1767.
- [25] A. Péter, A. Árki, E. Vékes, D. Tourwé, E. Forró, F. Fülöp, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* 1031 (2004) 159.
- [26] K.H. Ekborg-Ott, Y. Liu, D.W. Armstrong, *Chirality* 10 (1998) 434.
- [27] C.J. Pedersen, *J. Amer. Chem. Soc.* 89 (1967) 7017.
- [28] E. P. Kyba, L.R. Koga, L.R. Sousa, H.G. Siegel, D.J. Cram, *J. Amer. Chem. Soc.* 95 (1973) 2692.
- [29] T. Shinbo, T. Yamaguchi, K. Nishimura, M. Sugiura, *J. Chromatogr.* 405 (1987) 145.
- [30] T. Shinbo, T. Yamaguchi, H. Yanagishita, D. Kitamoto, K. Sakaki, M. Sugiura, *J. Chromatogr. A* 625 (1992) 101.
- [31] H.K. Frensdorff, *J. Amer. Chem. Soc.* 93 (1971) 600.
- [32] R. Kuhn, C. Steinmetz, T. Bereuter, P. Haas, F. Erni, *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 367.
- [33] C. Dejsupa, Y. Liang, J.S. Bradshaw, R.M. Izatt, D.V. Dearden, *J. Amer. Chem. Soc.* 119 (1997) 353.
- [34] D.J. Cram, R.C. Helgeson, L. R.Sousa, J.M. Timko, M. Newcomb, P. Moreau, F. de Jong, G.W. Gokel, D.H. Hoffman, L.A. Domeier, S.C. Peacock, K. Madan, L. Kaplan, *Pure Appl. Chem.* 43 (1975) 327.
- [35] Helgeson, R. C.; Koga, K.; Timko, J. M.; Cram, D. J. *J. Amer. Chem. Soc.* 95 (1973) 3021.
- [36] R.M. Izatt, T. Wang, J.K. Hathaway, X.X. Zhang, J.C. Curtis, J.S. Bradshaw, C.Y. Zhu, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 17 (1994) 157.
- [37] M. Sawada, Y. Takai, H. Yamada, T. Kaneda, K. Kamada, T. Mizooku, K. Hirose, Y. Tobe, K. Naemura, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1997) 2497.
- [38] W.H. Pirkle, C.J. Welch, *J. Chromatogr. A* 683 (1994) 347.
- [39] S.M. Han, D.W. Armstrong, In *Chiral Separations by HPLC*; Krstulovic, A. M., Ed.; Ellis Horwood Limited: Chichester, 1989; Chapter 10.
- [40] W.C. Still, J.D. Kilburn, P.E.J. Sanderson, R. Liu, M.R. Wiley, F.P. Hollinger, R.C. Hawley, M. Nakajima, A. Bernardi, J.-I. Hong, S.K. Namgoong, *Isr. J. Chem.* 32 (1992) 41.
- [41] X.X. Zhang, J.S. Bradshaw, R.M. Izatt, *Chem. Rev.* 97 (1997) 3313.
- [42] R. Kuhn, F. Erni, T. Bereuter, *J. Heusler, Anal. Chem.* 64 (1992) 2815.

- [43] Y. Machida, H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, *J. Chromatogr. A* 805 (1998) 85.
- [44] M.H. Hyun, J.S. Jin, W. Lee, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 19 (1998) 819.
- [45] J.P. Behr, J.M. Lehn, D. Moras, J.C. Thierry, *J. Amer. Chem. Soc.* 103 (198) 701.
- [46] M.H. Hyun, J.S. Jin, W. Lee, *J. Chromatogr. A* 822 (1998) 155.
- [47] M.H. Hyun, J.S. Jin, H.J. Koo, W.J. Lee, *J. Chromatogr. A* 837 (1999) 75.
- [48] J.S. Jin, A.M. Stalcup, M.H. Hyun, *J. Chromatogr. A* 933 (2001) 83.
- [49] J.M. Lin, Lin, T. Nakamura, T. Hobo, *Chromatographia* 42 (1996) 559.
- [50] D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 5th ed., W.H. Freeman, New York, 1998.
- [51] J.S. Jin, A.M. Stalcup, M.H. Hyun, *J. Chromatogr. A* 933 (2001) 83.
- [52] M.H. Hyun, Y.J. Cho, J.S. Jin, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 648.
- [53] R.A. Thompson, Z. Ge, N. Grinberg, D. Ellison, P. Tway, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1580.
- [54] M.H. Hyun, J.S. Jin, W. Lee, *J. Chromatogr. A* 822 (1998) 155.
- [55] M.H. Hyun, S.C. Han, J.S. Jin, W. Lee, *Chromatographia* 52 (2000) 473.
- [56] M.H. Hyun, S.C. Han, Y.J. Cho, J.S. Jin, W. Lee, *Biomed. Chromatogr.* 16 (2002) 356.
- [57] M.H. Hyun, Y.H. Kim, Y.J. Cho, *Bull. Korean Chem. Soc.* 25 (2004) 400.
- [58] M.H. Hyun, Y.J. Cho, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 31.
- [59] H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 225.
- [60] A. Shibukawa, in: A.M. Krstulovic (Ed.), *Chiral Separations by HPLC: Applications to Pharmaceutical Compounds*, Ellis Horwood, Chichester, 1989, Chapter 16
- [61] M.H. Hyun, H.J. Choi, B.S. Kang, G. Tan, Y.J. Cho, *Bull. Korean Chem. Soc.* 27 (2006) 1775.
- [62] D. Gehin, P.A. Kollmann, G.J. Wipff, *J. Amer. Chem. Soc.* 111 (1989) 3011.
- [63] M.H. Hyun, Y.J. Cho, J.A. Kim, J.S. Jin, *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.* 26 (2003) 1083.
- [64] M.H. Hyun, H.J. Min, Y.J. Cho, *Bull. Korean Chem. Soc.* 24 (2003) 911.
- [65] M.H. Hyun, Y.J. Cho, J.A. Kim, J.S. Jin, *J. Chromatogr. A*, 984 (2003) 163.
- [66] M.H. Hyun, D.H. Kim, *Chirality* 16 (2004) 294.
- [67] M.H. Hyun, D.H. Kim, Y.J. Cho, J.S. Jin, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 421.
- [68] M.H. Hyun, Y.J. Cho, Y. Song, H.J. Choi, B.S. Kang, *Chirality* 19 (2007) 74
- [69] L.M. Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, 1978, Springer-Verlag, Berlin.

- [70] J.A. Thoma and L. Stewart, in *Starch; Chemistry and Technology*, Vol. 1, R. L. Whistler and E. F. Paschall, Eds., Academic Press, New York, 1965, 209.
- [71] F. Cramer, W. Saenger, H.C. Spatz, *J. Amer. Chem. Soc.*, 89 (1967) 14.
- [72] P.V. Demarco, A.L. Thakker, *Chem. Commun.* (1970) 2.
- [73] F. Cramer, W. Dietsche, *Chem. Ber.*, 92, 378 (1959).
- [74] C.A. Chang, Q. Wu, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr.* 354 (1986) 454.
- [75] C.A. Chang, Q. Wu, L. Tan, *J. Chromatogr.* 361 (1986) 199.
- [76] D.W. Armstrong, H. L. Jin, *J. Chromatogr.* 462 (1989) 219.
- [77] S.C. Chang, G.L. III. Reid, S. Chang, C.D. Chang, D.W. Armstrong, *Trends Anal. Chem.* 12, 144.
- [78] D.W. Armstrong, A.M. Stalcup, M.L. Hilton, J.D. Duncan, J.R. Faulkner, S.C. Chang, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1610.
- [79] *Cyclobond Handbook: A guide to using cyclodextrin bonded phases for chiral LC Separations*, Advanced Separation Technologies, 7th ed. Whippany, NJ, 2005
- [80] T. Takeichi, H. Toriyama, S. Shimura, Y. Takayama, M. Morikawa, *J. High Resolut. Chromatogr.* 18 (1995) 179.
- [81] X.Y. Shi, M. Wang, G.R. Chen, R.N. Fu, J.L. Gu, *Anal. Chim. Acta* 445 (2001) 221.
- [82] D. Rong, V. T. D'Souza, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 4275.
- [83] A. Harada, M. Furue, S. I. Nozakura, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* 16 (1978) 189.
- [84] C. Mitchel, M. Desai, R. McCulla, W. Jenks, D. W. Armstrong, *Chromatographia* 56 (2002) 127.
- [85] D.W. Armstrong, A.M. Stalcup, M.L. Hilton, J.D. Duncan, J.R. Faulkner, Jr., S.C. Chang, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1610.
- [86] Q. Zhong, L. He, T.E. Beesley, W.S. Trahanovsky, P. Sun, C. Wang, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, 1115 (2006) 19.
- [87] Q. Zhong, L. He, T.E. Beesley, W.S. Trahanovsky, P. Sun, C. Wang, D.W. Armstrong, *Chromatographia* 64 (2006) 147.
- [88] R. Török, R. Berkecz, A. Péter, *J. Chromatogr. A*, 1120 (2006) 61.
- [89] H. Chen, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* 705 (1995) 3.
- [90] P.L. Zhu, J.W. Dolan, L.R. Snyder, N.M. Djordjevic, D.W. Hill, J.-T. Lin, L.C. Sander, L. van Heukelem, *J. Chromatogr. A* 756 (1996) 63.
- [91] A. Péter, G. Török, D.W. Armstrong, G. Tóth, D. Tourwé, *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 177.

- [92] A. Filippi, A. Giardini, S. Piccirillo, M. Speranza, *Int. J. Mass. Spectrom.* 198 (2000) 137.
- [93] W.A. Tao, R.G. Cooks, *Anal. Chem.* 75 (2003) 25A.
- [94] R.G. Cooks, J.S. Patrick, T. Kotiaho, S.A. McLuckey, *Mass Spectrom. Rev.* 13 (1994) 287.
- [95] R.G. Cooks, P.S.H. Wong, *Acc. Chem. Res.* 31 (1998) 379.
- [96] W.A. Tao, D. Zhang, E.N. Nikoalev, R.G. Cooks, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 10598.
- [97] D. Zhang, W.A. Tao, R.G. Cooks, *Int. J. Mass Spectrom.* 204 (2001) 159.
- [98] S. Kumari, S. Prabhakar, M. Vairamani, C.L. Deci, G.K. Chaitanya, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 18 (2007) 1516.
- [99] L. Ming, L. Zhiqiang, C. Huanwen, L. Shiyang, J. Qinhan, *J. Mass Spectrom.* **2005**, 40, 1072.
- [100] D.V. Augusti, R. Augusti, *Tetrahedron Asym.* 16 (2005) 1881.
- [101] W.A. Tao, F. G. Gozzo, R.G. Cooks, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1692.
- [102] L. Wu, R. G. Cooks, *Anal. Chem.* 75 (2003) 678.
- [103] W.A. Tao, D. Zhang, F. Wang, P.D. Thomas, R.G. Cooks, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4427.
- [104] L. Salem, X. Chapuisat, G. Segal, P. C. Hiberty, C. Minot, C. Leforestier, P. Sautet, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 2887.
- [105] A.R.M. Hyryläinen, J.M.H. Pakarinen, E. Forró, F. Fülöp, P. Vainiotalo, *J. Mass Spectrom.* 45 (2010) 198.
- [106] W.A. Tao, R. L. Clark, R.G. Cooks, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3783.
- [107] L. Wu, R.G. Cooks, *Eur. J. Mass Spectrom.* 11 (2005) 231.
- [108] L. Wu, R.G. Cooks, *Anal. Chem.* 75 (2003) 678.
- [109] G. Grigorean, C. B. Lebrilla, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1684.
- [110] S. Ahn, J. Ramirez, G. Grigorean, C.B. Lebrilla, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 278.
- [111] J.F. Gal, M. Stone, C.B. Lebrilla, *Int. J. Mass Spectrom.* 222 (2003) 259.
- [112] O. Lapr'évotte, P. Ducrot, C. Thal, L. Serani, B. C. Das, *J. Mass. Spectrom.* 31 (1996) 1149.
- [113] G. Giorgi, M. Speranza, *Int. J. Mass Spectrom.* 249–250 (2006) 112.
- [114] F. Tureček, *Mass Spectrom. Rev.* 26 (2007) 563
- [115] P. Wang, G. Ohanessian, C. Wesdemiotics, *J. Mass Spectrom.* 15 (2009) 325.

[116] G. Guiochon, S.G. Shirazi, A.M. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Academic Press, Boston (1994)

8. Közlemények listája

8.1. Az értekezés alapját képező közlemények

1. **R. Berkecz**, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter, LC enantioseparation of aryl-substituted β -lactams using variable-temperature conditions *Chromatographia* 63 (2006) S29.

Impakt faktor: 1,171

2. **R. Berkecz**, R. Török, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter LC enantioseparation of β -lactam and β -amino acid stereoisomers and a comparison of macrocyclic glycopeptide- and β -cyclodextrin-based columns, *Chromatographia* 63 (2006) S37.

Impakt faktor: 1,171

3. **R. Berkecz**, A. Sztojkov-Ivanov, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, M.H. Hyun, A. Péter, High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -amino acid stereoisomers on a (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid-based chiral stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 138.

Impakt faktor: 3,554

4. **R. Berkecz**, I. Ilisz, F. Fülöp, M.H. Hyun, A. Péter, High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β^3 -amino acid stereoisomers on a (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid-based chiral stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 285.

Impakt faktor: 3,756

5. **R. Berkecz**, I. Ilisz, Z. Pataj, F. Fülöp, H.J. Choi, M.H. Hyun, A. Péter LC enantioseparation of β -amino acids on a crown ether-based stationary phase, *Chromatographia* 68 (2008) S13.

Impakt faktor: 1,312

6. **R. Berkecz**, I. Ilisz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, H.J. Choi, M.H. Hyun, A. Péter HPLC enantioseparation of β^2 -amino acids using crown ether-based stationary phase, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 981.

Impakt faktor: 2,746

7. **R. Berkecz**, A.R.M. Hyrylainen, F. Fülöp, A. Péter, T. Janáky, P. Vainiotalo, J.M.H. Pakarinen, Chiral discrimination of β^3 -amino acids using the kinetic method, *J. Mass Spectrom.* 45 (2010) 1312.

Impakt faktor₍₂₀₀₉₎: 2,940

Összes impakt faktor: 16,650

8.2. Az értekezés témájához kapcsolódó az értekezésben fel nem használt közlemények

1. R. Török, **R. Berkecz**, A. Péter, High-performance liquid chromatographic enantioseparation of alpha-substituted glycine analogs on a quinine-based anion-exchanger chiral stationary phase under variable temperature conditions, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006), 61.

Impakt faktor: 3,554

2. I. Ilisz, **R. Berkecz**, A. Péter, HPLC separation of amino acid enantiomers and small peptides on macrocyclic antibiotic-based chiral stationary phases: a review, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1305.

Impakt faktor: 2,535

3. R. Török, **R. Berkecz**, A. Péter, Enantioseparation of phenylalanine analogs on a quinine-based anion-exchanger chiral stationary phase: structure and temperature effects, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2523.

Impakt faktor: 2,535

4. I. Ilisz, **R. Berkecz**, A. Péter, Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 1.

Impakt faktor: 2,629

5. Z. Pataj, I. Ilisz, **R. Berkecz**, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter, Comparison of performance of Chirobiotic T, T2 and TAG columns in the separation of β^2 - and β^3 -amino acids, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3688.

Impakt faktor: 2,746

6. **R. Berkecz**, I. Ilisz, G. Benedek, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter, High-performance liquid chromatographic enantioseparation of 2-aminomono- and dihydroxycyclopentanecarboxylic and 2-aminodihydroxycyclohexanecarboxylic acids on macrocyclic glycopeptide-based phases, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 927.

Impakt faktor: 3,756

7. I. Ilisz, **R. Berkecz**, E. Forró, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter, The role of pi-acidic and pi-basic chiral stationary phases in the high-performance liquid chromatographic enantioseparation of unusual beta-amino acids, *Chirality* 21 (2009) 339.

Impakt faktor: 2,212

8. I. Ilisz, **R. Berkecz**, A. Péter, Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1845.

Impakt faktor: 3,756

9. I. Ilisz, G. Fodor, **R. Berkecz**, R. Iványi, L. Szente, A. Péter, Enantioseparation of beta-substituted tryptophan analogues with modified cyclodextrins by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3360.

Impakt faktor: 3,756

10. Z. Pataj, R. Berkecz, I. Ilisz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, W.D. Armstrong, A. Péter, High-performance liquid chromatographic chiral separation of β^2 -amino acids, *Chirality* 21 (2009) 787.

Impakt faktor: 2,212

11. Z. Pataj, I. Ilisz, R. Berkecz, E. Forró, F. Fülöp, A. Péter Comparison of separation performances of amylose- and cellulose-based stationary phases in the high-performance liquid chromatographic enantioseparation of stereoisomers of beta-lactams, *Chirality* 22 (2010) 120.

Impakt faktor: 2,212

12. I. Ilisz, Z. Pataj, R. Berkecz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, J.H. Choi, M.H. Hyun, A. Péter, High-performance liquid chromatographic enantioseparation of beta(2)-amino acids using a long-tethered (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid-based chiral stationary phase, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1075.

Impakt faktor: 3,756

13 I. Ilisz, Z. Pataj, R. Berkecz, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter High-performance liquid chromatographic enantioseparation of aminonaphthol analogs on polysaccharide-based chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2980.

Impakt faktor: 3,756

Összes impakt faktor: 39,415

8.3. Poszterek

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of aryl-substituted β -lactams

R. Berkecz, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter
6th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2005. Szeptember 7-9., Magyarország Siófok.

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -lactam and β -amino acid stereoisomers

R. Török, R. Berkecz, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter
6th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2005. Szeptember 7-9., Magyarország, Siófok.

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of aryl-substituted β -lactams on macrocyclic glycopeptide antibiotic-based columns

R. Berkecz, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter
The 12th Symposium on Analytical and Environmental Problems, 2005. Szeptember 26., Magyarország, Szeged.

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -lactam and β -amino acid stereoisomers

R. Török, R. Berkecz, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter
The 12th Symposium on Analytical and Environmental Problems, 2005. Szeptember 26., Magyarország, Szeged.

High performance liquid chromatographic enantioseparation of aryl substituted β -lactams

R. Berkecz, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter

In Peptides 2006, Proceedings of the 29th European Peptide Symposium, eds.: K. Rolka, P. Rekowski, J. Silberring, KENES International, **2007** Svájc, Genf, 298.

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

A. Péter, **R. Berkecz**, I. Ilisz, F. Fülöp, G. Hauspie, M.H. Hyun

31st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques HPLC **2007.**, Belgium, Gent.

8.4. Előadások

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -amino acid stereoisomers on a crown-ether based chiral stationary phase

Workshop on International Cooperation in Science & Technology between Flanders-Hungary, **2006.** október 20., Belgium, Brüsszel.

Királis β -aminosavak vizsgálata tömegspektrometriás módszerrel

A XXXIX. Kromatográfias Továbbképző Tanfolyam, **2008.** január 28., Magyarország, Szeged.

Királis β^3 -aminosavak vizsgálata tömegspektrometriás módszerrel

Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány Előadóülése, **2008.**, Magyarország, Szeged.

9. Köszönetnyilvánítás

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

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

Köszönettel tartozom Fülöp Ferenc egyetemi tanárnak, hogy szakmai támogatásával segítette a doktori munkámat és segítségével eljuthattam Finnországba, ahol a kutatás mellett megismerhettem Európa legszebb országát.

Dr. Janáky Tamásnak szeretném megköszönni, hogy támogatott és ösztönzött a dolgozatom megírásában.

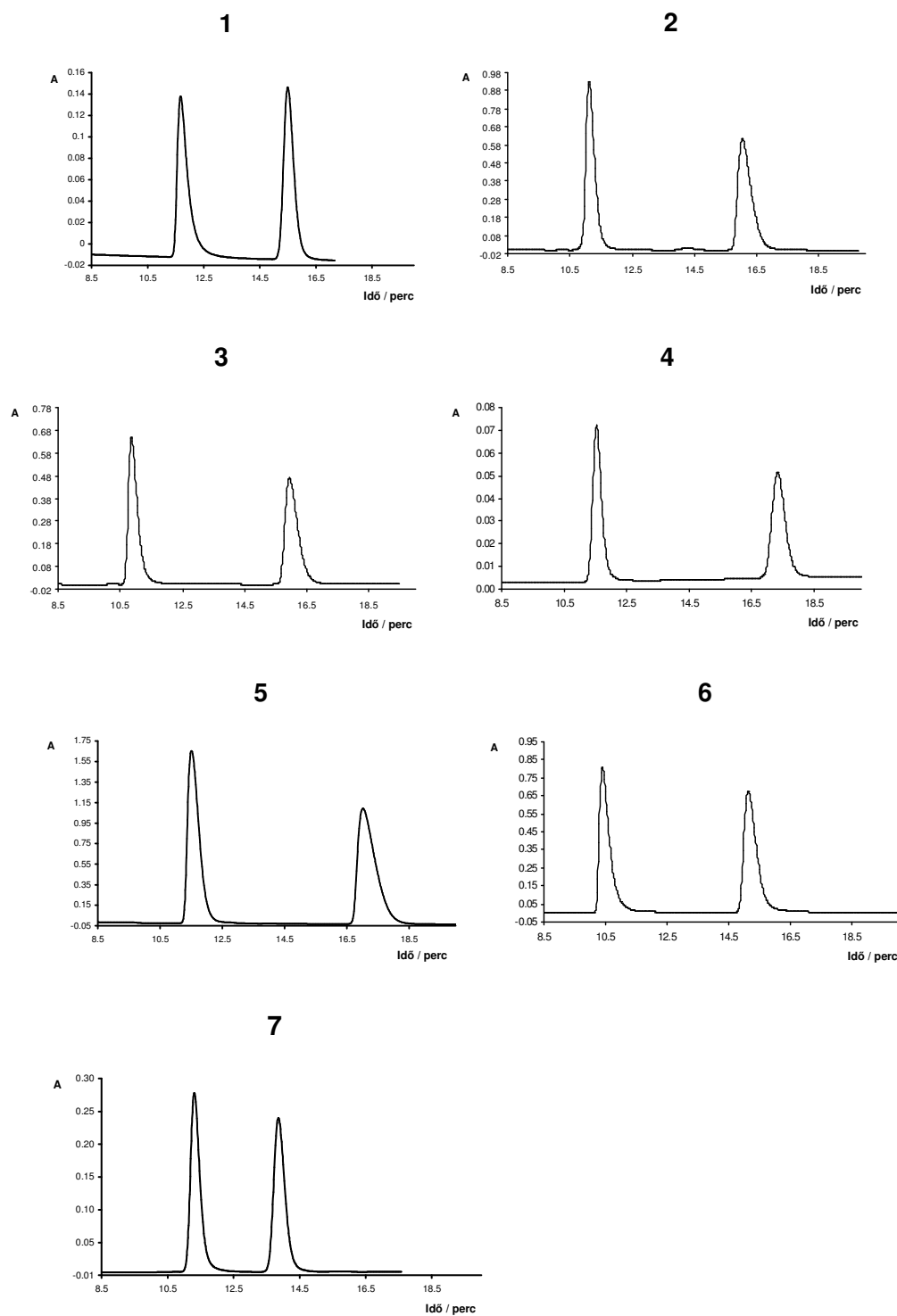
Köszönöm Halasiné Varga Ilona technikusnak a segítséget, amelyet kísérleti munkámhoz adott.

Köszönöm kedvesemnek Kovács Líviának, hogy türelemmel viselte a dolgozatom megírásának nehéz időszakát és mikor szükségem volt rá, akkor erőt adva biztatott.

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

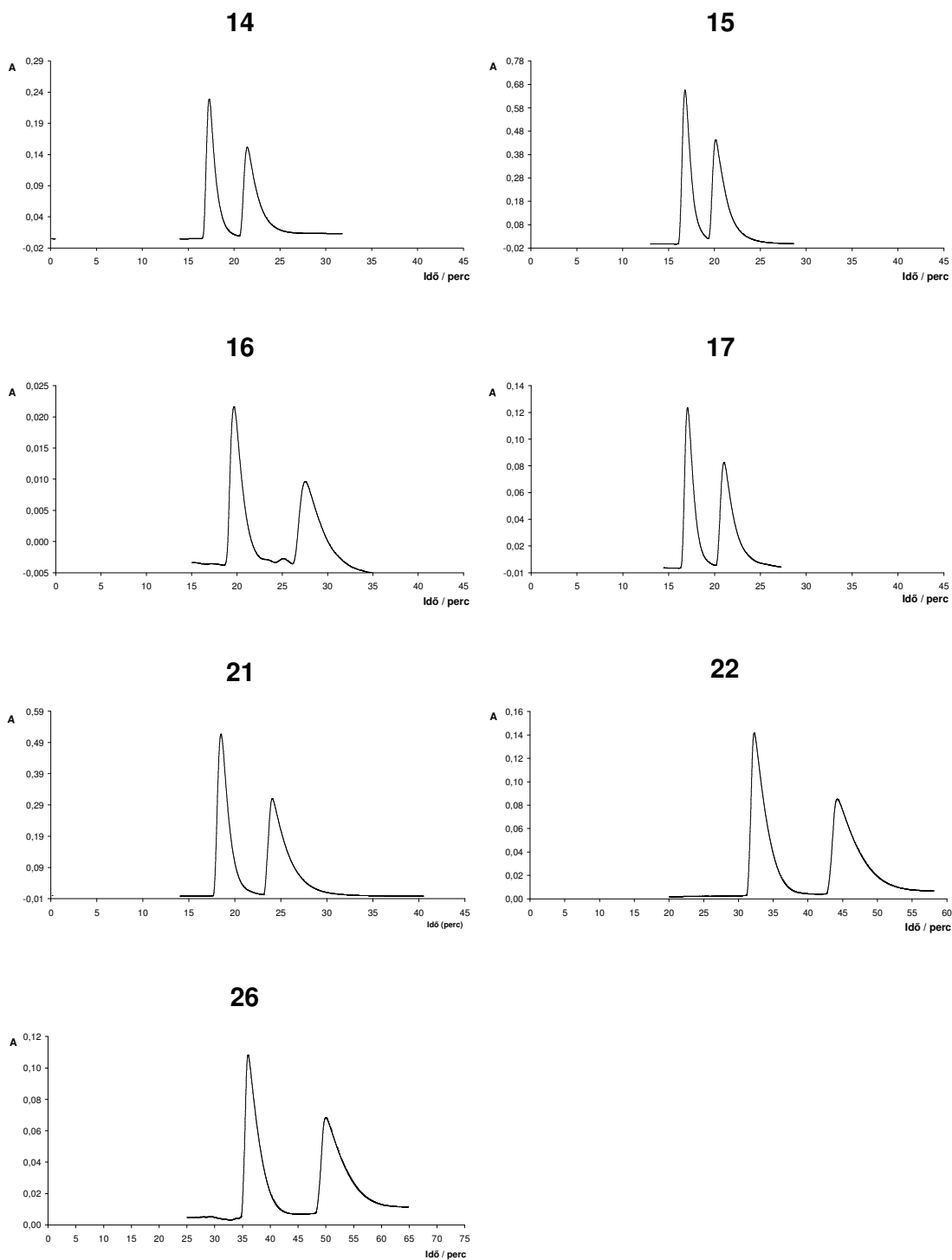
10. Függelék

10.1. Néhány kiválasztott arilszubsztituált β -laktám kromatogramja



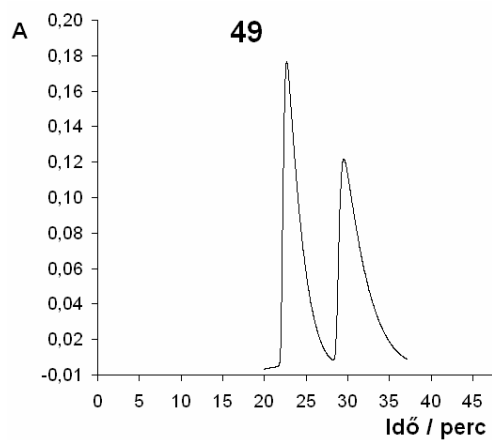
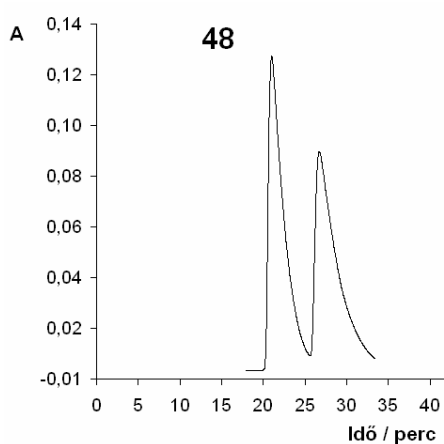
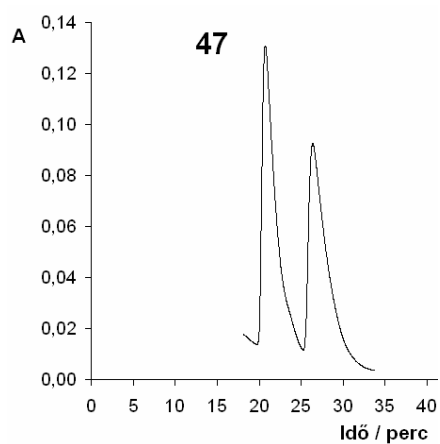
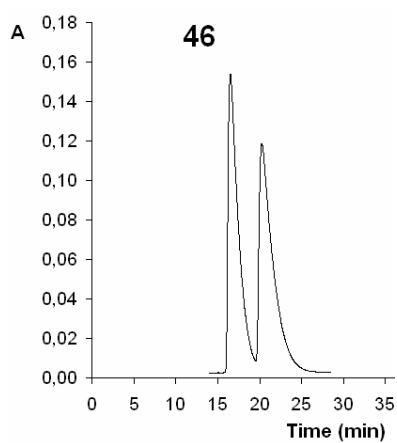
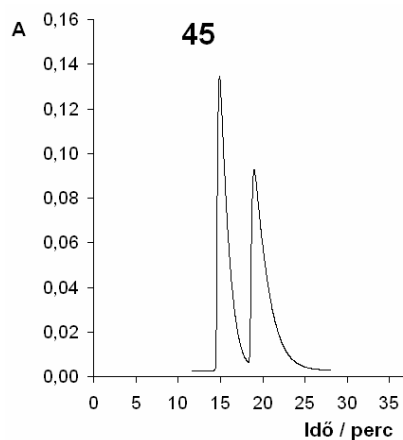
Kromatográfiai körülmények: oszlop, TAG; eluens, 100% MeOH; detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

10.2. Néhány kiválasztott aril szubsztituált β^3 -aminosav kromatogramja



Kromatográfiai körülmények: oszlop, **Korona 1**; eluens, **16-17** H₂O/MeOH=50/50 (v/v)+5 mM AcOH, **21-22**, **26** H₂O/MeOH=20/80 (v/v)+10 mM AcOH, detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 298 K.

10.3. Néhány kiválasztott aril szubsztituált β^2 -aminosav kromatogramja



Kromatográfiai körülmények: oszlop, **Korona 2**; eluens, **45-46** H₂O/MeOH=80/20 (v/v)+10 mM H₂SO₄, **47-49**, H₂O/EtOH=80/20 (v/v)+10 mM H₂SO₄, detektálás, 210 nm; áramlási sebesség, 0,5 mL perc⁻¹; hőmérséklet, 280 K.