

ENANTIOMEREK KIRÁLIS ELVÁLASZTÁSA ÉS MEGKÜLÖNBÖZTETÉSE

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

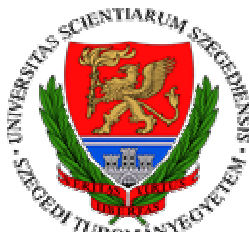
Készítette:

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

1. BEVEZETÉS



A gyógyszerek kiralitása napjainkban fő kutatási feladat a gyógyszermolekulák tervezésében és fejlesztésében. Az emberi szervezetben lejátszódó fizikai és kémiai folyamatok során a bejuttatott királis gyógyszermolekula aszimmetrikus biológiai makromolekulákkal kerül kölcsönhatásba és ez a királis környezet képes megkülönböztetni az enantiomereket. Az enantiomerek hatástani tulajdonságai, úgymint farmakodinamikai, farmakokinetikai, lebomlási és fehérjékhez kötődési hatásuk gyakran eltérő. Az alkalmazott terápiás hatásért felelős enantiomer, az *eutomer* mellett jelenlévő másik izomer, a *disztomer* csak ideális esetben inaktív. 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. Az enantiomer tisztaságának ellenőrzésére megbízható, pontos és robusztus módszerre van szükség. Analitikai módszerek közül a királis nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) a legszélesebb körben alkalmazott módszer, amely a fent említett követelményeknek megfelel.

2. CÉLKITŰZÉS

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

-  aromás β -laktám enantiomerek elválasztását makrociklusos glikopeptid alapú **Chirobiotic T** és **Chirobiotic TAG** királis állófázisokon,
-  kondenzált gyűrűs β -laktám és β -aminosav enantiomerek elválasztását makrociklusos glikopeptid (**Chirobiotic T, TAG, V, VAG** és **R**) és ciklodextrin (**Cyclobond DMP**) oszlopokon,

- 🌶️ 3-arilszubsztituált, alifás és aliciklusos β^3 -aminosav enantiomerek folyadékkromatográfiás elválasztását **(+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav** szelektort tartalmazó **koronaéter** állófázison,
- 🌶️ alifás és aromás β^2 -aminosav enantiomerek elválasztását **módosított koronaéter** állófázison.

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

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

3. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK





3.1. Folyadékkromatográfiás módszerek

A közvetlen királis folyadékkromatográfiás vizsgálatok során több típusú királis állófázist alkalmaztunk, ezek között volt makrociklusos antibiotikum, β -ciklodextrin és koronaéter királis szelektort tartalmazó állófázisok.

A vizsgálatok során alkalmazott 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 μ l-es mintaadagoló (Cotati, CA, USA), MK 70 termosztát (Mechanik Prüfgerate Medlingen Németország).

3.1.1. Vizsgált vegyületek

- 🌶️ 4-arilszubsztituált β -laktámok,
- 🌶️ kondenzált gyűrűs β -laktámok,
- 🌶️ kondenzált gyűrűs β -aminosavak,


-  aromás β^3 -aminosavak,
-  alifás és aliciklusos β^3 -aminosavak,
-  alifás β^2 -aminosavak,
-  aromás és heterociklusos β^2 -aminosavak

3.2. Gázfázisú királis megkülönböztetés

A β^3 -aminosavak gázfázisú királis megkülönböztetés folyamatának vizsgálata Cooks kinetikai módszer alapján ioncsapda tömegspektrométerrel történt α -aminosav referencia enantiomerek segítségével.

A 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).

3.2.1. Vizsgált vegyületek

-  aromás β^3 -aminosavak.

4. Eredmények

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 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. Az elválasztás során enantiomerek elúciós sorrendjét is meghatároztuk, egységesen $S < R$ sorrendet kaptunk.

2. A kondenzált gyűrűs β -laktám és β -aminosav enantiomerek elválasztását 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 a Chirobiotic **TAG** esetében kaptuk a legnagyobb szelektivitás és felbontás értékeket. Az elválasztási tényezőkből számolt $\Delta_{TAG-T}\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek jól mutatták, hogy Chirobiotic **T** esetében a szelektoron található cukorrészek kedvezőtlenül befolyásolták a királis megkülönböztetést. A Cyclobond **DMP** oszlop mind fordított, mind normál fázisban igen jó elválasztást mutatott a β -laktámok esetében. 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 β^3 - és β^2 -aminosav enantiomerek elválasztását tanulmányoztuk. Az első vegyületcsoport tizenöt 3-aril-szubsztituált β^3 -aminosavat foglalt magában. Az eluensösszetétel vizsgálatakor 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 retenciócsökkenést 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-szubsztituáció 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 szubsztituáció bizonyult a legkedvezőbbnek, míg az *orto*-szubsztituált vegyületek enantiomerjei, valószínűleg szterikus gátlás miatt, nehezen voltak elválaszthatók. Hat

vegyület esetében az enantiomerek elúciós sorrendje is meghatározásra került, egységesen $R < S$ sorrendet eredményezve.

4. Az alifás és aliciklusos β^3 -aminosav enantiomerek elválasztásának módszerét szintén (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav királis szelektort tartalmazó koronaéte állófázison dolgoztuk ki. Az eluensösszetétel hatásának vizsgálatok 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 etanol 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. Egységesen $S < R$ elúciós sorrendet kaptunk.

5. Az alifás és aromás β^2 -aminosav enantiomerek elválasztására módosított (endcapped) állófázison dolgoztunk ki módszereket. Az eluensösszetétel vizsgálatok 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, mind az aromás oldalláncot tartalmazó vegyületek esetén a szénatomszám növekedésével nőtt. A királis megkülönböztetési folyamat és az enantiomerek szerkezete közötti kapcsolat vizsgálatok 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.

6. A β^3 -aminosavak gázfázisú királis megkülönböztetési folyamatát ioncsapda tömegspektrométerrel vizsgáltuk, α -aminosav referens enantiomerek (**ref**) segítségével, amelyek a Cu^{II} és Ni^{II} központi fémiont tartalmazó $[\text{M}^{\text{II}}(\mathbf{ref})_2(\mathbf{A}_R \text{ vagy } S)\text{--H}]^+$ trimer komplexekben a királis környezet megteremtéséhez szükségesek (ahol: „**A**” vizsgált β -aminosav). Megállapítottuk, hogy a fenilcsoportot tartalmazó α -aminosav enantiomerek azon β^3 -aminosavak esetében voltak hatékonyak, amelyek királis szénatomjához szintén fenilcsoport kapcsolódott. Hasonló összefüggést találtunk a benzilgyűrűt tartalmazó referencia enantiomerek és a szintén benzilgyűrűt tartalmazó 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 (*S*)-2-amino-2-fenilecetsav és (*S*)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)ecetsav referencia aminosavak alkalmazásakor $[\text{Cu}^{\text{II}}(\mathbf{ref})(\mathbf{A}_R \text{ vagy } S)\text{--H}]^+$ komplexben lévő Cu^{II} ion redukcióját figyeltük, amely az MS/MS mérés során $[\text{Cu}^{\text{I}}(\mathbf{ref})(\mathbf{A}_R \text{ vagy } S)]^+$ komplexet eredményezett. A $\text{Cu}^{\text{II}}\text{--Cu}^{\text{I}}$ redukció hátterét rezonancia-szerkezetek segítségével vizsgáltuk.

5. KÖZLEMÉNYEK

5.1. 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. Hyyrylainen, 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

5.2. 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

5.3. 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.

5.4. 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. Kromatográfiai Továbbképző Tanfolyam, **2008.** január 28., Magyarország, Szeged.

Királis β^3 -aminosavak vizsgálata tömegspektrometriás módszerrel

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