



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok enantiomerjeinek HPLC-s elválasztása

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Gecse Zsanett

Vegyész MSc. Szak, II. évf.

Témavezetők: Dr. Péter Antal
egyetemi tanár

Dr. habil. Ilisz István
egyetemi adjunktus

SZEGED

2012

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
1. BEVEZETÉS.....	3
2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK	4
2.1. SZTEREOKÉMIAI ALAPFOGALMAK.....	4
2.2. AZ ENANTIOMEREK ELVÁLASZTÁSÁNAK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS LEHETŐSÉGEI.....	5
2.2.1. Királis vegyületek elválasztása közvetett módszer alkalmazásával.....	6
2.2.2. Királis mozgófázis alkalmazása	6
2.2.3. Királis állófázis alkalmazása	7
2.3. KORONAÉTER ALAPÚ KIRÁLIS ÁLLÓFÁZISOK	8
2.4. AZ IZOXAZOLIN GYŰRŰT TARTALMAZÓ VEGYÜLETEK BIOLÓGIAI JELENTŐSÉGE.....	13
2.5. A VIZSGÁLT VEGYÜLETEK ELŐÁLLÍTÁSA	14
3. KÍSÉRLETI RÉSZ.....	19
3.1. A VIZSGÁLT β^3 -AMINOSAVAK	19
3.2. FELHASZNÁLT ANYAGOK	21
3.3. ALKALMAZOTT BERENDEZÉSEK.....	21
3.4. ALKALMAZOTT KOLONNÁK	21
3.5. KROMATOGRÁFIÁS ÖSSZEFÜGGÉSEK	22
4. CÉLKITŰZÉS	23
5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	24
5.1. AZ ENANTIOMEREK ELVÁLASZTÁSA KORONAÉTER ALAPÚ KIRÁLIS ÁLLÓFÁZISOKON	24
5.1.1. Az eluensösszetétel hatása a kromatográfiás paraméterekre	24
5.1.2. Az alkohol minőségének hatása az elválasztásra	27
5.1.3. A savas módosító minőségének hatása az elválasztásra	29
5.1.4. A savas módosító mennyiségének hatása az elválasztásra	32
5.1.5. A kémiai szerkezet és a kromatográfiás viselkedés összefüggése	33
5.1.6. A különböző kolonnák elválasztó képességének összehasonlítása.....	34
5.1.7. Az izoxazolin analógok négy sztereoizomerének elválasztása és az elúciós sorrend megállapítása	35
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	39
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	41
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	43

1. Bevezetés

A modern analitikai kémia és a gyógyszeripar fejlődésével a kiralitás és a hozzá kapcsolódó jelenségek (mint az enantiomerek elválasztása) az elmúlt évtizedekben mind tudományos, mind gazdasági szempontból egyre nagyobb jelentőséget kapott, elsősorban az orvostudomány, a gyógyszeripar, a biológia, valamint a növényvédőszer- és élelmiszeripar által támasztott igények miatt. A kutatók és az ipar érdeklődése többek között annak köszönhető, hogy a királis hatóanyagok egyre fontosabb szerepet játszanak a farmakológia területén is.

Az élőlényeket felépítő szerves molekulák túlnyomó része szerves vegyület. Minthogy az enantiomerek kétféle alakban léteznek, melyek minden tulajdonságukban megegyeznek (annak kivételével, hogy a síkban poláros fény rezgési síkját ellentétes irányba forgatják), így ezen enantiomerpárok eltérő biológiai hatást fejthetnek ki az élő szervezetre. A különböző anyagok élő szervezetre gyakorolt biológiai hatása nagymértékben függ attól, hogy melyik forma van jelen. Példaként említhető a limonén nevű természetes szerves anyag, melynek egyik konformációja narancs, míg a másik citromízű. Természetesen ennél sokkal fontosabb biológiai hatáskülönbségek is felléphetnek. Erre az 1960-as években a németországi úgynevezett Contergan-botrány hívta fel a figyelmet, szükségessé téve olyan elválasztási technikák kifejlesztését, amelyek viszonylag rövid idő alatt, valamint nagy hatékonysággal képesek ezen anyagok elválasztására, illetve ezáltal minőségi és mennyiségi analízisére.

Az ilyen típusú vegyületek elválasztására ezen technikák közül az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). A HPLC-ben az egyik hatékonyan alkalmazható módszer, amikor királis oszlopot használunk az elválasztások megvalósításához. Ennek során az enantiomerek az állófázis szelektórával különböző minőségű kölcsönhatásokat alakíthatnak ki. Ezek a szelektorok annál nagyobb jelentőséggel bírnak, minél többféle anyag elválasztására alkalmasak. Az enantiomerek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztásának területén csak néhány szelektornak tulajdonítható nagy jelentőség, úgymint a poliszacharid-, a makrociklusos antibiotikum-, a ciklodextrin- valamint a koronaéter alapú állófázisok.

2. Irodalmi előzmények

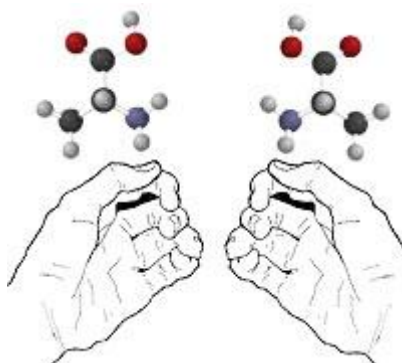
2.1. Sztereokémiai alapfogalmak

A sztereokémia pontos ismerete manapság elengedhetetlen az élő szervezetekkel foglalkozó tudományágakban. Ahhoz, hogy például egy gyógyszerkészítmény hatóanyaga a megfelelő hatást fejtse ki, mind sztereokémiai, mind pedig analitikai vizsgálatok elvégzése szükséges.

Az izomériát többféle szempont alapján is csoportosítják. Szokás két részre bontani, enantiomériára és diasztereomériára. Minden olyan anyagot, amelynek módosulatai tárgy-tükörképi viszonyban vannak egymással és nem hozhatók fedésbe, enantiomereknek nevezzük. Az enantiomerek fizikai és kémiai tulajdonságaikban megegyeznek egymással, ezért elválasztásuk nem egyszerű. Az optikailag aktív molekulák a polarizált fény rezgési síkját képesek elforgatni. A forgatási irány alapján lehetnek balra (-) és jobbra (+) forgató molekulák, de a forgatás szögének nagysága egymáshoz képest megegyezik. Abban az esetben, ha ezek egy elegyben 50-50%-ban vannak jelen, racém elegyről beszélünk. Értelemszerűen a racém elegyek optikailag inaktívak, mivel a két enantiomer módosulat ellentétes forgatása kioltja egymást. Ezt intermolekuláris kioltásnak nevezzük.

A diasztereomer módosulatok nincsenek tárgy-tükörképi viszonyban, és fedésbe sem hozhatók egymással, valamint a fizikai-kémiai tulajdonságaik eltérhetnek, ezért könnyebben szétválaszthatók.

Abban az esetben, ha egy molekulában lévő C-atomhoz négy különböző ligandum kapcsolódik, a molekulát királisnak, míg a C-atomot kiralitáscentrumnak vagy aszimmetriacentrumnak nevezzük (**1. ábra**). A kiralitást legegyszerűbben a kezünkkel tudjuk szemléltetni, nemhiába a görög „kheir”, azaz kéz szóból ered a név is.



1. ábra: Kiralitás

A négy különböző ligandum megléte egyértelművé teszi a molekulán belüli aszimmetriát. Optikai aktivitás, tükrözési szimmetriaelemmel rendelkező molekuláknál nem figyelhető meg.

A több kiralitáscentrumot tartalmazó molekulák esetén az izomerek között találunk enantiomereket és diasztereomereket is egyaránt. A kiralitásnak az eddig tárgyalt formáját centrális kiralitásnak nevezzük, de ezen kívül ismeretesek még axiális, planáris és helikális kiralitással rendelkező molekulák is [1].

Az utóbbi évtizedekben az optikailag aktív vegyületek farmakológiai jelentősége iránti érdeklődés megnövekedett, mert számos királis vegyület megtalálható az élő szervezetekben. Ugyan az enantiomerek csak forgatóképességükben térnek el egymástól, azonban a szervezetben lévő aszimmetria vegyületek jelenléte miatt ezek biológiai hatása akár még drasztikus eltéréseket is mutathat. Míg egy gyógyszerhatóanyag esetében az enantiomer egyik tagja kedvező hatással bír, addig a pár másik tagja mindeközben hatástalan, rosszabb esetben mérgező is lehet. Ezen tulajdonság egyik sajnálatos esete a talidomid molekula, amely a Contergan nevű gyógyszer hatóanyagaként került forgalomba Németországban. Nyugtatószerként alkalmazták, azonban a várandós nőknél a magzat szervezetében olyan drasztikus változások következtek be, amik végtag-torzulásokat eredményeztek. Sok évvel később derült ki, hogy az (S)-konfigurációjú enantiomer bizonyos állatokon teratogén hatást váltott ki, míg az (R) hatékony nyugtatónak bizonyult [2].

Ez az eset világított rá először, milyen nagy fontossággal bír a tiszta sztereoizomer molekulák szintézise illetve a racém elegyek enantiomerjeinek megkülönböztetése, szétválasztása.

2.2. Az enantiomerek elválasztásának folyadékkromatográfiás lehetőségei

Ahhoz, hogy enantiomereket szétválasszunk egymástól, az optikai aktivitásuk miatt mindenféleképpen királis környezetre ill. sztereospecifikus kémiai kölcsönhatások meglétére van szükség. A királis környezet megteremtése a kromatográfiában többféle módon is megvalósulhat.

Az optikai izomerek elválasztásának gyakorlati megvalósításait két fő típusba sorolhatjuk:

- ❖ közvetett módszer
 - oszlop előtti származékképzés királis reagens alkalmazásával
- ❖ közvetlen módszer
 - királis eluens (mozgófázis) alkalmazása
 - királis oszlop (állófázis) alkalmazása

2.2.1. Királis vegyületek elválasztása közvetett módszer alkalmazásával

A közvetett módszernél egy királis reagenssel származékot képezünk az enantiomerekkel, így azokat diasztereomer párokká alakítjuk. Diasztereomerek lévén, különböző fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján akirális állófázison is megvalósítható az elválasztásuk.

A módszert könnyedén alkalmazhatjuk, ha a királis reagens nagy optikai tisztaságú és stabil diasztereomerpárt képez mindkét enantiomerrel. Ezt követően mivel nincs szükség királis kolonnára, ezért a módszer lényegesen olcsóbbnak tekinthető. Az eltérő tulajdonságok maguk után vonják, hogy nagyobb különbségek lehetnek a kromatográfiás paraméterekben, ami előnyös az elválasztás szempontjából, illetőleg így az elúciós sorrend megállapítása is egyszerűbb. Azonban a hátrányokat is számításba véve elmondható, hogy a származékképzés illetve a folyamat végén az enantiomer visszanyerése időigényes folyamat is lehet, nem biztos, hogy mindkét enantiomer azonos sebességgel reagál a királis reagenssel, valamint zavaró csúcsként jelenhet meg a származékképző feleslege a kromatogramon.

2.2.2. Királis mozgófázis alkalmazása

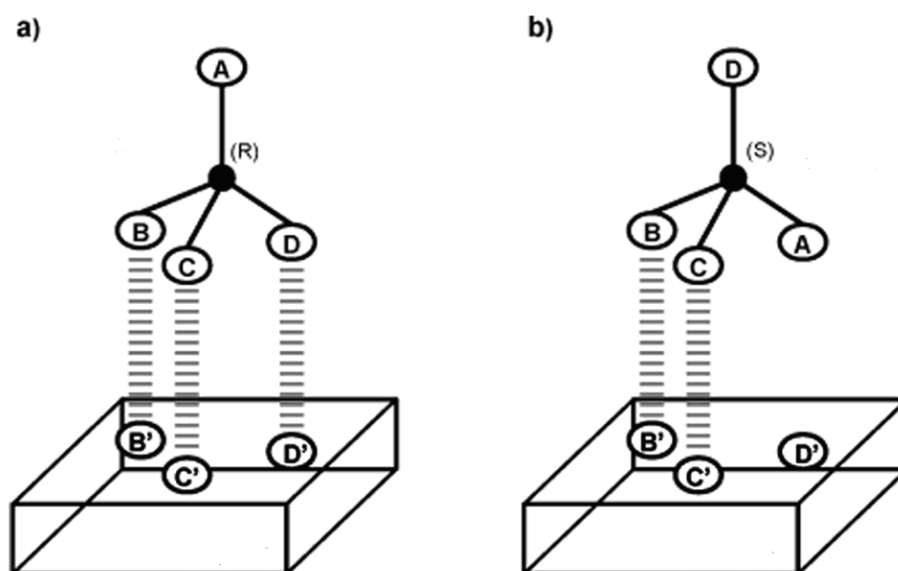
Az enantiomerek elválasztását akirális oszlopon úgy is elvégezhetjük, hogy az eluenshez adagoljuk a királis reagenst. Királis adalékok például a ciklodextrinek, illetve ellen ionként alkalmazott vegyületek, például: (+)-10-kámforszulfonsav, sőt az általunk használt királis állófázisok szelektora, a (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav is. A módszer alkalmazhatóságának korlátja a királis adalék ára. A folyadékkromatográfiában nagyobb mennyiségű eluensre van szükség az elválasztások megvalósításához és mivel ezek az oldószerek valamint a királis adalékok drágák, a

kapilláris elektroforézis technikában a kisebb oldószerigény miatt elterjedtebb az alkalmazásuk.

2.2.3. Királis állófázis alkalmazása

A királis állófázisok lehetnek természetes, fél szintetikus illetve szintetikus alapúak.

Az elválasztandó vegyület és a szelektor között akkor jön létre a stabilis kapcsolat, amikor az elválasztandó molekula legalább három ponton tud kötődni. Ezt az úgynevezett három-pontos kötődés modelljét (2. ábra) Dalgliesh írta le először és a mai napig ez a legelfogadottabb elmélet a minta és a szelektor közötti kölcsönhatások értelmezésére.



2. ábra: A Három-pontos illeszkedés modellje

Az enantiomereknek a szelektorral kialakított kölcsönhatásai határozzák meg az elválasztás mértékét, ezek lehetnek H-híd, hidrofób, hidrofil, szterikus gátlás, π - π -, dipól-dipól-, ionos kölcsönhatás, komplexképzés, stb.

A királis kolonnák alkalmazása lényegesen leegyszerűsíti a vizsgálatokat, mert nem igényel nagyfokú előkészületeket, ellenben a királis oszlopok jóval drágábbak, mint az akirálisok.

Az királis oszlopokat a szelektor típusa alapján a következő főbb csoportokba sorolhatjuk:

- zárványkomplex képzők (ciklodextrinek, koronaéterek)
- Pirkle-féle fázisok (π -sav, π -bázis kölcsönhatások)

- királis polimer fázisok
- ligandumcserélő fázisok
- makrociklusos antibiotikum fázisok
- fehérje alapúak
- molekulalenyomat alapúak
- poliszacharid alapúak

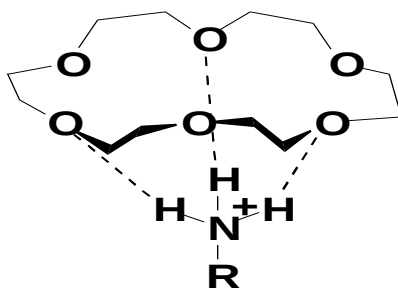
Munkám során koronaéter szelektor alapú királis állófázisokat alkalmaztam az elválasztásokhoz, ezért a továbbiakban csak ezekről fogok részletesebben szót ejteni.

2.3. Koronaéter alapú királis állófázisok

A koronaéter, mint elnevezés, *Pedersen* nevéhez fűződik, szerinte ugyanis a kationok reverzibilisen „megkoronázhatók” [4]. A koronaéterek kromatográfiás szempontból egyik hasznos tulajdonsága, hogy különböző alkálifémekkel és ammóniumionokkal komplexképzésre hajlamosak. A komplexstabilitás erőssége függ a koronaéter O-atomjainak elhelyezkedésétől és számától, valamint a komplex mindkét tagjának a méretétől. Röntgen diffraktogramok elemzése során kiderült, hogy az átmenetifém komplexeknél a maximális koordináció és a kötés irányultsága nagy jelentőséggel bír.

Az 1980-as években *Cram* és *mt sai*. voltak az elsők, akik szintetikus úton állítottak elő királis koronaétert [5], majd az előállítást követően először binaftil tartalmú koronaéterekkel különböző aminosavak elválasztását is tanulmányozták.

A királis koronaéter-ammóniumion komplex fontossága a folyadék kromatográfia szempontjából a protonált amino-csoportok esetén jelentős, a 3. ábrán látható módon, három hidrogén híd kötéssel valósulhat meg a feltételezett komplex képződése. Mint említettem, mindkét fél mérete számít, az ammóniumion 286 pm-es ionátmérője pontosan beleillik a poliéter 260-320 pm-es üregébe [6].

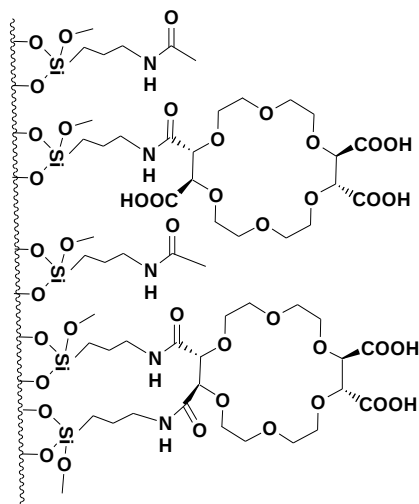


3. ábra: 18-korona-6 poliéter és ammóniumion komplexe

A már korábban is említett hárompontos illeszkedési modellből kiindulva a koronaéter alapú állófázisokra nézve általánosan az mondható el, hogy a kialakuló hidrogén híd kölcsönhatások megléte szükséges, de nem elégséges a királis megkülönböztetéshez [7]. Ahhoz, hogy a királis felismerés a lehető leghatékonyabb legyen, különböző funkciós-csoportok beépítése szükséges a szelektorra illetve a „kar”-ra („spacer”, a szelektort a szilikagéllal összekötő lánc), minek köszönhetően feltételezhető lesz további kölcsönhatások kialakulása az elválasztandó molekulával. A több kölcsönhatás stabilabb kötődést biztosít úgy, hogy rögzíti a vizsgált anyagot a szelektorhoz. Az enantiomerek megkülönböztetése az elmondottakon kívül akkor valósulhat meg, ha az egyik kölcsönhatás sztereokémiai, hiszen így a két enantiomer különböző stabilitású komplexeket fog képezni.

Az éterkötés jelentőségének igazolása *Sawada* és *mtsai.-nak* tulajdonítható [8]. A $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_2-$ stabilizáló hatását fenilglicin-metilészter enantiomerek esetén FAB/MS technikával vizsgálták. Két éterkötést két aromás gyűrűvel helyettesítettek és ennek köszönhetően rájöttek arra, hogy az éterkötés és annak száma nagyban hozzájárul a királis felismeréshez, és ezen felül még a molekulaion intenzitása is lényegesen kisebbnek adódott az alapvegyülettel képzett diasztereomerétől. *Still* és *mtsai.* flexibilitás vizsgálatok során bizonyították, hogy a szelektor rugalmasságának is fontos szerep jut a királis felismerésben [9]. Ha a kialakult komplexnek túlságosan nagy a flexibilitása, akkor az a szelektivitás csökkenésével jár, vagy rosszabb esetben a királis felismerés elmarad, mivel mind a két enantiomer nagy eséllyel kötődhet, szterikus hatás fellépése nélkül [10].

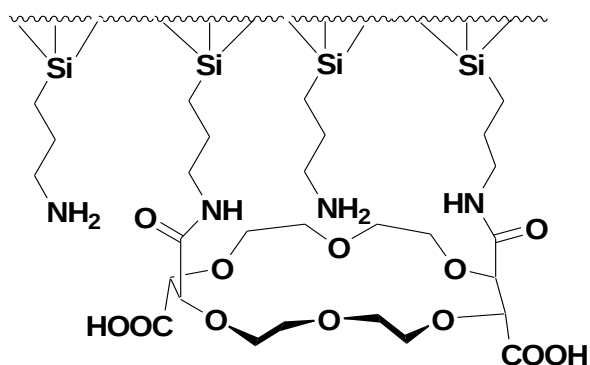
Machida és *mtsai.* (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsavat kötöttek 3-aminopropil szilikagélhez, így *n*-propilamin karon keresztül rögzítették a hordozóhoz a szelektort egy, illetve két egymás mellett lévő karboxil-csoporton (**4. ábra**).



4. ábra: Machida királis állófázisa

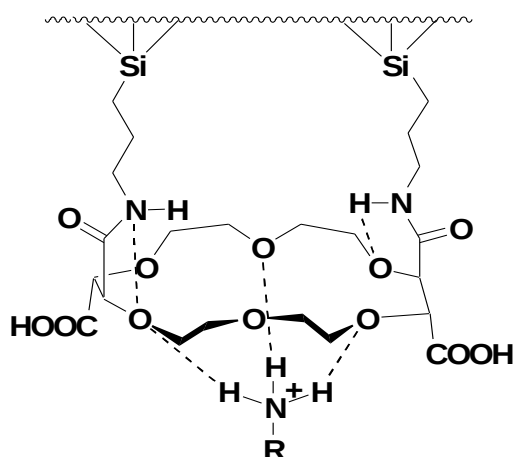
Az első vizsgálataik alkalmával α -aminosavak, aminok és amino-alkoholok enantiomerjeit választották el és az utóbb említett két molekulacsoport esetén jobb szelektivitást tapasztaltak, mint az α -aminosavak tanulmányozásakor [11].

1998-tól *Hyun* és *mtsai.* az imént említett szelektor számos változatát szintetizáltak az elválasztás javítása és a királis megkülönböztetés mechanizmusának tisztázása céljából. A (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektort aminopropil szilikagélhez rögzítették úgy, hogy a szelektor dianhidridjét két napig 0°C hőmérsékleten reagáltatták trietilamin (TEA) jelenlétében, száraz diklórmetánban, argon atmoszféra alatt [12]. A módosított szilikagélt MeOH, víz, 1,0 M HCl, víz, MeOH, diklórmetán és hexánnal való mosás, majd nagyvákuumban történő szárítás követte. A reakció eredményeképpen, a kialakult *szin*-diamid forma mobilitása sokkal kisebb lett [13] (**5. ábra**).



5. ábra: (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektor szilikagélen rögzítve (Korona 1)

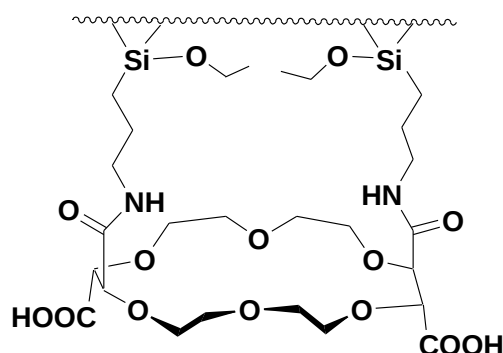
Az **5. ábrán** látható szelektoron elsőként primer-aminok enantiomerjeinek elválasztását tanulmányozták majd később α -aminosavak, α -aminosav amidok és észterek kromatográfiás viselkedését vizsgálták, miközben egy lehetséges mechanizmusáról is beszámoltak [14]. A prolin esetén nem volt jelentős a királis felismerés, amit a primer amino-csoport hiányának tulajdonítottak.



6. ábra: (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav és szubsztituált ammóniumion komplex képzése

A mozgó fázishoz adagolt sav minőségét (CH_3COOH , H_2SO_4 , HClO_4 és CF_3COOH) valamint mennyiségét (1,0–20,0 mM) változtatva azt tapasztalták, hogy a savkoncentráció növelése növeli a szelektivitást és a visszatartást is aminok, amino-alkoholok és α -amino-ke-tonok esetén [15]. Az aminosavak tanulmányozása ezzel ellentétes viselkedést mutatott, amire a feltételezések szerint a protonált karboxil- és amino-csoport közötti kölcsönhatás csökkenése, valamint a szabad karboxil-csoport protonáltsági állapotának növekedése adhat magyarázatot.

Hyun a korábban leírt szintézist módosítva, TEA helyett 2,6-lutidint is használt [16]. Az így előállított szelektor feltételezett szerkezete a **7. ábrán** látható.

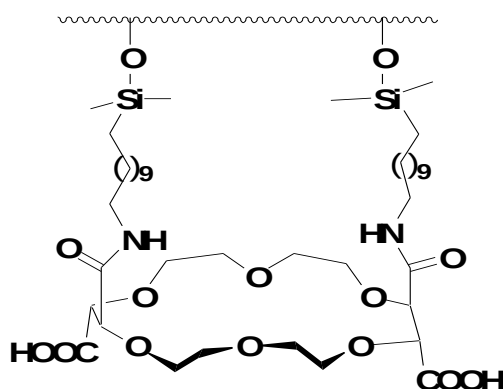


7. **ábra:** (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektor módosított aminopropil szilikagélen (Korona 2)

Az etoxi-csoport beépítése nem befolyásolta nagymértékben a már ismertetett kromatográfiás viselkedést. A szelektor primer amino-csoportokkal rendelkező, főként aminosav enantiomerek elválasztásának vizsgálatakor jónak bizonyult. A vizsgálatokat halogénatommal szubsztituált fenilalanin és fenilglicin analógokkal és más típusú primer amino-csoportot tartalmazó vegyületekkel végezték. Tanulmányozták a vegyületek szerkezete és a kromatográfiás viselkedés közötti összefüggést. Fordított fázisú mérésekben vizsgálták a MeOH és TEA hatását kénsav jelenlétében annak érdekében, hogy növelhető-e az enantioszelektivitás. Tapasztalatok azt mutatták, hogy a retenció növekedett a módosítók koncentrációjának növelésével. Nagyfokú enantioszelektivitás növekedést nagy MeOH és TEA koncentrációnál értek el, azonban feltételezhetően a HILIC hatásnak köszönhetően, a visszatartás nagymértékben megnövekedett.

Megfigyelték azt is, hogy a halogén atomok méretének növelése és helyzete a retenció változását okozta. Ezt a viselkedést azzal magyarázták, hogy szterikus gátlás lép fel az *orto*-szubsztitúció miatt, ami elnyomja a nem enantioszelektív kölcsönhatást, például a szabad propilamin-csoportok és az aminosav között, amely a retenció növekedését okozza, azonban az *orto*-szubsztitúció miatt a két enantiomer kötődése a szelektorról alig különbözik egymástól, ami a szelektivitás csökkenését segíti elő.

Hyun és mtsai a szelektort a szilikagéllal összekötő „kar” hosszának a hatását is vizsgálták a kromatográfiás paraméterekre, melynek során a már tárgyalt (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsavat alkalmazták szelektorként. Az primer-amin szénlánc hosszát megnövelték, és így a három szénatomszámú propilamint 11 szénatomszámú aminra cserélték, minek eredményeképp a felület apolárisabbá vált (8. **ábra**).



8. ábra: (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav szelektor aminoundecil-szilikagélen kötve (Korona 3)

A kevésbé hidrofil β -aminosav, amin és amino-alkohol enantiomerek esetében a retenció és a szelektivitás értékek megnövekedtek. Viszont α -aminosavak vizsgálata ezzel ellentétes eredményt szolgáltatott [17]. Feltételezhetően a szabad aminopropil- és aminoundecil-csoportok eltérő erősségű kölcsönhatásokat eredményeznek az aminosav oldalláncokkal.

2.4. Az izoxazolin gyűrűt tartalmazó vegyületek biológiai jelentősége

Az izoxazolin gyűrűt tartalmazó vegyületek számos képviselője különböző biológiai (influenzaellenes, antifungális) hatással rendelkeznek. *Kai és munkatársai* különböző szubsztituenseket tartalmazó izoxazolin származékokat állítottak elő annak érdekében, hogy megtalálják azt az optimális szerkezetet, amely leghatásosabb az emberi influenza vírussal szemben. Vizsgálataik során kimutatták, hogy a 2-alkoxiimino-N-(5-*terc*-butil-2-isoxazolin-3-ilmetil)-acetamidok az antivirális szerek olyan új osztályát képviselik, amelyek rendkívül hatékonynak bizonyultak az emberi influenza A vírusa ellen [18]. *Basappa és mtsai* δ 2-isoxazolin származékokkal szubsztituált 3-(2-butil-4-kloro-1H-imidazolil) vegyületeket szintetizáltak. Ezen vegyületek klinikailag izolált gombák ellen bizonyultak hatékonyak. Munkájuk során azonosították a 3-(2-butil-4-klór-1H-imidazolil)-5-methanolil- δ 2-isoxazolint, ami erős gombaellenes hatását tekintve egy új szerkezeti alternatívaként szolgál a szubsztituált imidazolil izoxazolinok osztályban. [19] *Rajendra Prasad és társai* 3-(2"-hidroxinaphthalen-1"-il)-5-fenil-2-isoxazolinokat állítottak elő, amelyek antidepresszáns hatását Swiss-Webster egereken tesztelték. Megállapítást nyert, hogy a vegyületek az izoxazolin gyűrűk 3-as és 5-ös pozíciójában elektronküldő csoportokkal rendelkeznek,

mint a dimetil-amino-, hidroxil-és metoxi szubsztituensek. Ezek pedig jelentősen növelték a depresszió ellenes hatást, ellentétben azzal, amikor az izoxazolin gyűrű szubsztituensét nem tartalmazott [20].

Farmakológiai hatásuknak köszönhetően a ciklusos β -aminosavakra az elmúlt években egyre nagyobb figyelem irányult. *Park és mtsai* összefoglalójából kiderül, hogy a ciklikus aminosav-származékok különösen érdekes célmolekulákként szolgálnak a peptid-alapú gyógyászatban és orvosi kémiában, mivel az aminosavak peptidláncba való beépítésével jelentős változások történnek a peptid konformációjában [21]. Széles körben alkalmazzák új típusú peptidek szintézisére [22], mivel beépítésükkel módosítható, azaz növelhető a peptidek biológiai aktivitása, illetve jól meghatározott három-dimenziós szerkezetek (foldamerek) hozhatók létre [23]. A természetben előforduló ciszpentacin [(1*R*,2*S*)-2-amino-1-ciklopentán karbonsav] [24, 25], valamint az icofungipen [(1*R*,2*S*)-2-amino-4-metilciklopentán karbonsav], baktériumellenes és antifungális hatású vegyületek [21]. Számos ciklusos aminosav-származék (Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir) különböző biológiai hatással rendelkezik [26]. Továbbá a cikloalkénnvázas β -aminosavak kettős kötése lehetőséget nyújt újabb funkciós csoportok szelektív kialakítására. A természetes eredetű ciszpentacint 1989-ben egymástól függetlenül, két japán kutatócsoport izolálta a *Streptomyces setonii* (*Streptomyces griseus*) [27,28] és a *Bacillus cereus* [29,30] baktériumokból.

2.5. A vizsgált vegyületek előállítása

Számos kutató munkájának köszönhetően az 1,3-dipoláris cikloaddíciós reakció a célzott szintézisek megbízható eszközévé vált, különösen a heterociklusos rendszerek kialakításában. Így az izoxazolin váz kiépítésére is széles körben alkalmazott, hatékony módszer a nitril-oxidok alkénekre történő 1,3-dipoláris cikloaddíciója. [31,32]. A nitril oxidok *in situ* előállításának két legismertebb módja van. Az egyik eljárás a (i) Mukaiyama módszer (**9. ábra**), amely primer nitroalkánok dehidratációján alapul [33], a másik (ii) a Huisgen módszer, azaz a hidroximoil-kloridok bázis indukált dehidrohalogénezése [34].

9. ábra: Nitril-oxid generálása a Mukaiyama módszer alapján, primer nitroalkánból Boc₂O vagy PhNCO vízelvonószer jelenlétében

Elsőként Kiss és munkatársai heterociklusos gyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok előállításával foglalkoztak. Kutatómunkájuk során a nitril-oxidok 1,3-dipoláris cikloaddíciójával izoxazolin gyűrűvel kondenzált új típusú β -aminosav származékok regio- és sztereoszelektív szintézisét valósították meg [41]. Munkájuk során első lépésként a *tert*-butoxikarbonil-csoporttal (Boc) védett etil-*cisz*-2-amino-ciklopenténkarboxilátra (**I**) hajtottak végre cikloaddíciót. Az alkén előállításához szükséges nitril-oxid generálásához nitroetánt, vízelvonószerként pedig *tert*-butoxikarbonil-anhidridet (Boc₂O), illetve bázisként 4-dimetilaminopiridint (DMAP), alkalmaztak. Ezen reakciókat szobahőmérsékleten, THF oldószerben végezték (**10. ábra**).

10. ábra: Nitroetánból generált nitril-oxid etil-(*cisz*-2-amino-ciklopenténkarboxilát)-tá történő 1,3- dipoláris cikloaddíciója

A reakció során a lehetséges négy regio- és sztereoizomerból három izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin származék keletkezett, a **II**, **III** és **IV** vegyületek. A szerzők a keletkezett izomereket oszlopkromatográfiás módszerrel választották el, és a

vegyületek szerkezetét ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, NOSY, HSQC spektroszkópiai módszerekkel állapították meg, valamint a **II** főtermék szerkezetét röntgendiffrakciós módszerrel is igazolták (**11. ábra**).

11. ábra: A **II** vegyület röntgendiffrakcióval kapott szerkezete

A **II** és **III** vegyületekben az izoxazolin gyűrű *transz* helyzetű az észter, illetve amino funkciókhoz viszonyítva, míg a melléktermékben (**IV**) *cisz* térállású. Ha megnézzük a **II** terméket, láthatjuk, hogy az izoxazol gyűrű O-atomja távolabb esik a karbamát, illetve amid funkciótól. Ez a szelektivitás a nitrogén elektronszívó hatásának köszönhető, aminek következtében a 4-es C-atom elektronsűrűsége lecsökken, és a dipol reagens oxigénjének kedvez az itt kialakult parciális pozitív töltés.

A nitril-oxid képzését a homológ 1-nitropropánnal is elvégezték, majd a korábbi reakciókörülményeket alkalmazva végrehajtották a cikloaddíciót, melynek során szintén három izoxazolinvázas izomer képződött (**12. ábra**). A termékek aránya megközelítőleg hasonlóan bizonyult.

12. ábra: Nitropropánból képzett nitril-oxid 1,3-dipoláros cikloaddíciója etil-(*cisz*-2-amino-ciklopenténkarboxilát)-ra

Ebben a reakcióban is a **VI** és **VII** termékekben az izoxazolin gyűrű *transz* helyzetű az észter és az amino funkciókhoz viszonyítva, valamint a **VI** vegyületben szintén távolabb esik a karbamát és amid csoportoktól.

Ezeket az anyagokat enantiomertiszta formában is előállították. Az enantiomertiszta **(-)-Ib** vegyületet a racém *Candida antartica B-Lipáz* által katalizált β -laktám enantioszelektív gyűrűnyitásával állították elő, majd észterre alakították, így a kívánt termékhez jutottak (**13. ábra**).

13. ábra: Az enantiomer tiszta izoxazolingyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok szintézise

Mivel ez az eljárás nem volt szelektív, folytatták a kísérleteket, hogy más, nagyobb szelektivitású szintetikus útvonalat találjanak izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacinok előállításához. Annak érdekében, hogy növeljék a regio- és sztereoszelektivitást, *Nonn és mtsai* a cikloaddíciós reakciókat fenilizocianát (PhNCO) vízelvonószer és TEA jelenlétében is elvégezték [35]. A **Xa** vegyületet ilyen körülmények között vetették alá 1,3-dipoláris cikloaddíciónak (**14. ábra**). A EtNO₂ vagy PrNO₂-ből származó nitril-oxidokkal történő reakciók PhNCO jelenlétében szelektívnek bizonyultak, így a **X** és **XI** anyagok keletkeztek.

14. ábra: Izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok regio- és sztereoszelektív szintézise fenilizocianát alkalmazásával

Szintén *Nonn és mtsai* [36] az előzőekben leírt ciszpentacin származékok transzpentacin izomereit is előállították. Ezt kétféleképpen valósították meg. Az első

esetben a már korábban előállított ciszpenticin vegyületek epimerizációjával (**15. ábra**) ill. a ciszpentacin epimerizációja után a fentebb említett 1,3-dipoláris cikloaddíciós reakciókkal (**16. ábra**).

15. ábra: A **II** és **VI** vegyületek epimerizációja

Az epimerizációt NaOEt-tal EtOH-ban végezték 20°C-on. Mindkét módszer közel azonos hatékonyságúnak bizonyult.

16. ábra: A **XV** és **XVI** vegyületek szintézise

Az általunk vizsgált anyagok a **II**, **III**, **VI**, **VII**, **XII**, **XIII**, **XIV** és **XV** vegyületek hidrolizált származékaik voltak, amit dioxánban 2:1 arányú HCl/H₂O hozzáadásával, kevertetés közben végeztek, 1 órán keresztül.

3. Kísérleti rész

3.1. A vizsgált β^3 -aminosavak

A diplomamunkám során tanulmányozott izoxazolin gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán karbonsavak az SZTE Gyógyszerkémiai Intézetében készültek. Előállításuk a korábban már ismertetett módon történt. Az általunk vizsgált négy vegyületcsoport közül az **1** és a **3** anyagok esetében az R-szubsztituens metil-csoportot, míg a **2** illetve **4** vegyületek esetében etil-csoportot tartalmaz. A vizsgált β^3 -aminosavak IUPAC szerinti elnevezései a következők:

1a, (3aS,4R,5S,6aS)-4-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

1b, (3aR,4S,5R,6aR)-4-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

1c, (3aS,4R,5R,6aS)-4-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

1d, (3aR,4S,5S,6aR)-4-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

2a, (3aS,4R,5S,6aS)-4-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

2b, (3aR,4S,5R,6aR)-4-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

2c, (3aS,4R,5R,6aS)-4-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]-isoxazol-5-karbonsav

2d, (3aR,4S,5S,6aR)-4-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

3a, (3aR,5S,6S,6aS)-6-amino-3-metil- 4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

3b, (3aS,5R,6R,6aR)-6-amino-3-metil- 4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

3c, (3aR,5S,6R,6aS)-6-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

3d, (3aS,5R,6S,6aR)-6-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

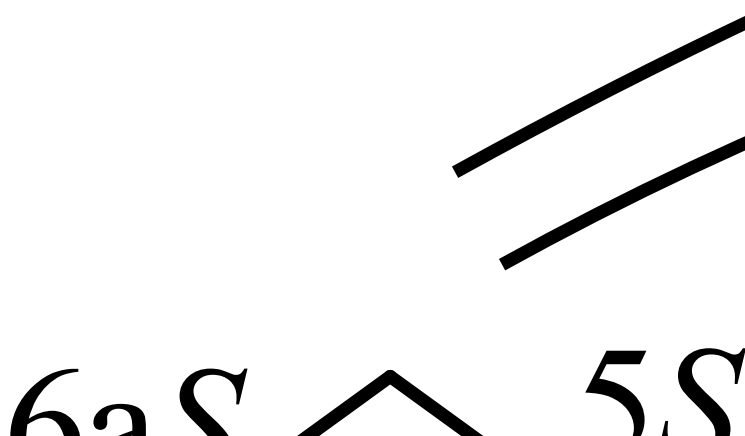
4a, (3a*R*,5*S*,6*S*,6a*S*)-6-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

4b, (3a*S*,5*R*,6*R*,6a*R*)-6-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

4c, (3a*R*,5*S*,6*R*,6a*S*)-6-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

4d, (3a*S*,5*R*,6*S*,6a*R*)-6-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]isoxazol-5-karbonsav

A felsorolt vegyületek szerkezeti képleteit a **17. ábra** mutatja.



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

3.2. Felhasznált anyagok

Méréseink során az eluens készítéséhez HPLC tisztaságú metanolt (MeOH), etanolt (EtOH) és 2-propanolt (IPA) (Scharlau, Sentmenat, Spanyolország), valamint savas módosítóként analitikai tisztaságú hangyasavat (HCOOH), ecetsavat (AcOH), trifluorecetsavat (TFA), kénsavat (H₂SO₄), perklórsavat (HClO₄) és foszforsavat (H₃PO₄) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk. A vizsgálatok során alkalmazott eluenseket Milli-Q vízzel készítettük és 0,45µm-es szűrőn szűrtük (Millipore, Molsheim, Franciaország).

Az elválasztások során használt eluenst Milli-Q vízből, valamint a fentebb említett alkohol valamelyikének különböző térfogatú keverékéből illetve a szintén említett savak egyikének hozzáadásával állítottuk elő. Az eluens gázmentesítését ultrahangos kirázatással vagy hélium átbuborékolatással oldottuk meg.

A minták elkészítését szilárd, kristályos formában lévő izoxazolin gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán karbonsavak eluensben való oldásával végeztük. Az így készült mintaoldatok koncentrációja 1 mg/ml volt, melyeket a szükséges esetekben a megfelelő mértékben hígítottunk.

3.3. Alkalmazott berendezések

Vizsgálataink során Waters Breeze kromatográfias rendszert alkalmaztunk, amely egy 1525 bináris HPLC pumpából, 2487 kétsatornás UV-VIS detektorból állt, valamint egy 717 plus automata mintaadagolóval volt ellátva (Waters, Milford, MA, USA). A fenti készülék egy 20 µl-es hurokkal rendelkező Rheodyne mintaadagolóval (Cotati, CA, USA) volt felszerelve. A kromatográfias mérésekből származó adatokat Breeze adatkezelő szoftver (Waters) segítségével értékeltük ki.

Egyéb kiegészítők közé tartozik a Rotring Sonic Cleaner ultrahangos fürdő (Rotring GmbH, Hamburg, Germany) és a Thermo Orion 420 pH mérő (Orion, USA).

3.4. Alkalmazott kolonnák

Az analitikai elválasztások során három különböző (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav alapú állófázist alkalmaztunk, a **Korona 1** (5. ábra), a **Korona 2** (7. ábra) valamint a **Korona 3** (8. ábra) királis oszlopokat. A **Korona 1** kolonna a [27]-es cikkben leírt módszer alapján készült, azzal a kivétellel, hogy a Kromasil aminopropil

szilikagél (Kromasil® NH₂, 5 µm) helyett Rainan AMINO szilikagélt tartalmaz, míg a **Korona 2**-ben a –SiOH csoport végén etil-csoport van, illetve a **Korona 3** kolonnában egy hosszú 11-metilén-egységből álló „spacer”-t („kar”-t) alkalmaztak [28]. Minden szilikagél 5 µm szemcseméretű volt. A kolonnák mérete 150 mm × 4,0 mm méretű ID. Az oszlopok közötti különbségek vagy a „kar” hosszában vagy a -SiOH csoport fedettségében nyilvánulnak meg.

3.5. Kromatográfiás összefüggések

A kromatográfiás adatok számítására az alábbi összefüggéseket használtuk:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{R}{M}; \quad \alpha = \frac{k_2'}{k_1'}; \quad R_s = \frac{t_R - t_M}{(W/2)}; \quad N = \frac{4}{W^2} \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

ahol k' , retenciós faktor, t_R , retenciós idő; t_M , holtidő, α , szelektivitási tényező, R_s , felbontás és W : csúcsalap szélesség, N : elméleti tányérszám.

4. Célkitűzés

Diplomamunkám elkészítése során célul tűztük ki izoxazolin gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán karbonsav analógok nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás vizsgálatát, mely során tanulmányozni kívántuk ezen vegyületek sztereoizomerjeinek elválasztását három különböző (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav alapú királis kolonnák segítségével, különböző eluens összetétel mellett.

A minták kromatográfiás paramétereinek meghatározásán keresztül vizsgálni kívántuk, hogy az eluens összetétel, az alkoholos illetve savas módosítók természetének és mennyiségének változtatása milyen hatást gyakorol a retenciós paraméterekre, valamint a molekulák szerkezete hogyan befolyásolja a királis felismerést.

Továbbá célunk volt az enantiomerek elúciós sorrendjének meghatározása.

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1. Az enantiomerek elválasztása koronaéter alapú királis állófázisokon

Az általunk vizsgált sztereoizomerek izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciklopentán vázzal rendelkeznek (**17. ábra**). Ezen vegyületek közül, mint ahogyan már korábban említésre került, az **1.** és **3.** analógok a karboxil és primer amino funkciók mellett a 3-as pozícióban metil-csoporttal vannak ellátva, míg a **2.** és **4.** analógok etil-csoporttal rendelkeznek. Az enantiomerek közötti ezen különbségek attól függően befolyásolják a hidrofóbicitást, a szterikus hatásokat, a molekulák merevségét és térfogatát, hogy atomjaik hogyan kapcsolódnak, valamint ezek hogyan képesek különböző kölcsönhatások kialakítására a szelektorrall.

A koronaéter alapú királis kolonnák szerkezeti sajátágaikból adódóan alkalmasak primer amino-csoportot tartalmazó enantiomerek elválasztására. Vizsgálataink során három különböző állófázist alkalmaztunk. Az enantiomer párok elválasztásához fordított fázisú folyadékkromatográfiás körülményeket választottunk. Minden komponens szétválasztása különböző összetételű H₂O/alkohol (v/v) + sav mozgófázis alkalmazásával történt.

5.1.1. Az eluensösszetétel hatása a kromatográfiás paraméterekre

A vizsgált vegyületek elválasztását mindhárom királis állófázison tanulmányoztuk különböző összetételű mozgófázisok alkalmazásával: H₂O/alkohol (v/v) + 10 mM sav, ahol az alkohol MeOH, EtOH és IPA voltak, a savas módosító pedig 10 mM AcOH volt. Az elválasztás szempontjából a legfontosabb paramétereket, mint a retenciók faktort, a szelektivitást, illetve a felbontást mindhárom kolonna esetében az **1. táblázat** tartalmazza. Azonban az adatok számát az egyszerűség kedvéért csökkentettük, így abban csak a három kolonnán azokat a kromatográfiás eredményeket közöltük, ahol H₂O/MeOH = 90/10 és 5/95 (v/v) + 10 mM AcOH mozgófázis elegyet alkalmaztunk. Kivételek ezek alól az **1a,1b**, **1c,1d**, **2a,2b** és **2c,2d** minták, ahol a kromatográfiás paraméterekből az is látható, hogy az alkohol koncentrációjának változtatása milyen hatást gyakorolt az elválásra. Az **1a,1b**, **1c,1d** és **2a,2b** analógok esetében a *k'* értékek U-alakú görbe szerint változnak az eluens összetételének változásával a **Korona 1** kolonnán, míg a többi minta retenciók ideje növekszik a MeOH tartalom növekedésével.

1. táblázat: Kromatográfiás paraméterek: retenciós faktor (k_1'), szelektivitási tényező (α), felbontás (R_s) és elúciós sorrend izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin analógok regio- és sztereoizomerjeinek közvetlen elválasztása során MeOH tartalmú mozgófázisban

Minta	Kolonna	Mozgó fázis (v/v)	k_1'	α	R_s	Elúciós sorrend
1a, 1b	Korona 1	90/10	0,20	1,20	0,25	$b < a$
		70/30	0,07	1,00	0,00	-
		30/70	0,23	1,00	0,00	-
		5/95	1,84	1,12	0,75	$b < a$
	Korona 2	90/10	0,03	1,00	0,00	-
		70/30	0,06	1,00	0,00	-
		30/70	0,20	1,00	0,00	-
		5/95	1,76	1,11	0,25	$b < a$
	Korona 3	90/10	0,31	1,00	0,00	-
		70/30	0,25	1,00	0,00	-
		30/70	0,26	1,00	0,00	-
		5/95	0,41	1,00	0,00	-
1c, 1d	Korona 1	90/10	0,92	1,75	2,70	$c < d$
		70/30	0,51	1,67	1,84	$c < d$
		30/70	5,92	1,00	0,00	-
		5/95	30,52	1,00	0,00	-
	Korona 2	90/10	0,39	1,34	0,80	$c < d$
		70/30	0,66	1,39	1,17	$c < d$
		30/70	2,23	1,09	0,20	$c < d$
		5/95	15,56	1,00	0,00	-
	Korona 3	90/10	0,62	1,22	0,60	$c < d$
		70/30	0,47	1,58	0,84	$c < d$
		30/70	0,50	1,47	1,58	$c < d$
		5/95	1,70	1,02	1,15	$c < d$
2a, 2b	Korona 1	90/10	0,09	1,38	0,25	$b < a$
		70/30	0,11	1,00	0,00	-
		30/70	0,21	1,00	0,00	-
		5/95	1,50	1,18	1,25	$b < a$
	Korona 2	90/10	0,06	3,05	1,60	$a < b$
		70/30	0,14	2,49	1,20	$a < b$
		30/70	0,53	1,00	0,00	-
		5/95	1,39	1,15	0,85	$a < b$
	Korona 3	90/10	0,42	1,00	0,00	-
		70/30	0,32	1,00	0,00	-
		30/70	0,27	1,00	0,00	-
		5/95	0,33	1,02	0,20	<i>n.d.</i>
2c, 2d	Korona 1	90/10	0,54	1,00	0,00	-
		70/30	0,85	1,00	0,00	-
		30/70	3,72	1,07	0,25	$c < d$
		5/95	18,28	1,10	0,45	$c < d$
	Korona 2	90/10	0,42	1,26	0,55	$c < d$
		70/30	0,66	1,26	0,75	$c < d$
		50/50	0,84	1,34	1,65	$c < d$
		30/70	1,96	1,06	0,45	$c < d$
	Korona 3	5/95	10,47	1,00	0,00	-
		90/10	0,88	1,30	1,55	$c < d$
		70/30	0,63	1,35	1,30	$c < d$
		30/70	1,02	1,31	0,95	$c < d$
		5/95	1,48	1,26	0,20	$c < d$

1. táblázat folytatása

Minta	Kolonna	Mozgó fázis (v/v)	k_1'	α	R_s	Elúciós sorrend
3a, 3b	Korona 1	90/10	0,07	1,20	0,30	$a < b$
		5/95	3,58	1,24	1,20	$a < b$
	Korona 2	90/10	0,08	1,00	0,00	-
		5/95	2,73	1,11	1,25	$b < a$
	Korona 3	90/10	0,23	1,71	1,50	$b < a$
		5/95	0,42	1,00	0,00	-
3c, 3d	Korona 1	90/10	0,08	1,00	0,00	-
		5/95	1,84	1,37	0,60	$d < c$
	Korona 2	90/10	0,05	1,00	0,00	-
		5/95	1,25	1,31	0,80	$d < c$
	Korona 3	90/10	0,46	1,00	0,00	-
		5/95	0,50	1,00	0,00	-
4a, 4b	Korona 1	90/10	0,16	1,00	0,00	-
		5/95	3,20	1,25	1,60	$a < b$
	Korona 2	90/10	0,20	1,00	0,00	-
4c, 4d	Korona 1	5/95	2,34	1,23	1,70	$b < a$
		90/10	0,08	1,00	0,00	-
	Korona 2	5/95	1,31	1,46	0,80	$d < c$
		90/10	0,05	1,00	0,00	-
		5/95	0,88	1,44	0,85	$d < c$

Kromatográfiás körülmények: kolonna, **Korona 1**, **Korona 2**, **Korona 3**; mozgó fázis, H₂O/MeOH (v/v) +10 mM AcOH; áramlási sebesség, 0,5 mL min⁻¹; detektálás, 210 nm

A **Korona 2** állófázison minden esetben nő a retenció a MeOH tartalom növelésével és a **Korona 3** szelektoron szintén U-alakú görbét írnak le a k' értékek minden mintánál. Az U-alakú görbékre a nagy alkoholtartalom esetén a hidrofíll kölcsönhatású kromatográfia (HILIC), míg a nagy víztartalomnál növekvő retencióra a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások kedvezményezettsége ad magyarázatot. A **Korona 2** kolonnán tapasztalt k' növekedés szintén a HILIC hatásnak tulajdonítható.

A HILIC kölcsönhatás meglétének egyik oka az állófázis solvatációjának mértékében, a másik pedig a polaritás erősségében rejlik. Az alkoholtartalom növekedése az állófázis menti vízréteget „elvékonyítja”, minek köszönhetően a minta poláris része még erősebben fog kötődni a szelektorhoz és következésképpen a retenció megnő. A három királis állófázist összehasonlítva, minden esetben a **Korona 3** kolonnán a visszatartás nagyobb mértékű volt kis alkoholtartalomnál, mint a **Korona 1** és **2** oszlopokon. Nagy szerves fázis tartalmú eluensekben viszont minden alkalommal kisebbnek adódtak a k' értékek. Ezen eredmények magyarázata az lehet, hogy mivel a **Korona 3** oszlop az aminoundecil-csoportok miatt az apolárisabb kölcsönhatásoknak kedvez, így a minták apolárisabb részei alakították ki a szelektorral a kedvezőbb kölcsönhatásokat.

A szelektivitás (α) és felbontás (R_S) értékekben egy kivétellel minden esetben egymáshoz képest azonos változás volt megfigyelhető. A kivétel a **2c,2d** vegyület a **Korona 3** kolonnán, ahol az α értékek maximum görbét írnak le az R_S értékekkel ellentétben, amelyek a MeOH tartalommal csökkentek. A szelektorokat összehasonlítva néhány kivételtől eltekintve, általánosan elmondható, hogy a **Korona 1** és **Korona 2** oszlopokon a nagyobb víztartalmaknál az enantioszelektív kölcsönhatások játszottak szerepet, amelynek eredményeként a felbontás (R_S) értékek **is** nagyobbak adódtak. Ezzel ellentétben a **Korona 3** kolonnán a kisebb víztartalom kedvezett az enantioszelektív, a nagyobb pedig a nem enantioszelektív kölcsönhatásoknak.

5.1.2. Az alkohol minőségének hatása az elválasztásra

Mindhárom állófázis alkalmazásakor vizsgáltuk az alkohol minőségének (MeOH, EtOH, IPA) elválaszra gyakorolt hatását, melyet a **2. táblázat** mutat be az **1a,1b, 1c,1d, 2a,2b** és **2c,2d** mintákra kapott eredmények példáján keresztül. A **2. táblázat** azokat az eredményeket tartalmazza, amelyeket a H₂O/alkohol (v/v) + 10mM AcOH (ahol az alkohol MeOH, EtOH vagy IPA voltak) mozgófázisok alkalmazása során kaptunk, néhány kiválasztott eluensösszetétel mellett.

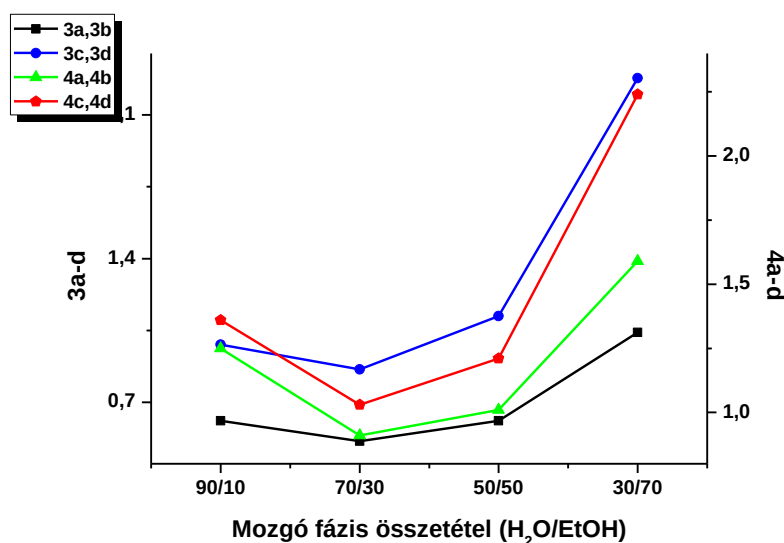
Minden esetben az elsőként eluálódó enantiomer retenciós faktora (k_1') az EtOH-t tartalmazó mozgófázissal történő elválasztások során volt a legnagyobb (részben nem közölt eredmények). A **2. táblázat** eredményei alapján elmondható, hogy a szelektivitási tényezőket (α) tekintve általános tendencia nem volt megfigyelhető. Az α értékek MeOH-ban a **Korona 1** oszlopon az **1a,1b** és **2a,2b** anyagokra, míg IPA-ban a **Korona 1** oszlopon a **2c,2d** vegyületekre és szintén IPA-ban **Korona 3** oszlopon az **1c,1d, 3a,3b, 3c,3d, 4a,4b** és **4c,4d** anyagokra adódtak nagyobbak. A legtöbb esetben a felbontás (R_S) értékek a MeOH-t tartalmazó eluens alkalmazása során voltak nagyobbak.

2. táblázat: Kromatográfiás paraméterek: retenciósfaktor (k_1'), szelektivitási tényező (α), felbontás (R_s) és elúciós sorrend a vizsgált anyagok regio- és sztereoiszomerjeinek közvetlen elválasztása során MeOH, EtOH vagy IPA tartalmú mozgófázisban

Minta	Kolonna	Mozgó fázis (v/v)	k_1'	α	R_s	Elúciós sorrend
1a,1b	Korona 1	90/10,a	0,20	1,20	0,20	$b < a$
		90/10,b	0,22	1,00	0,00	-
		90/10,c	0,04	1,00	0,00	-
	Korona 2	30/70,a	0,22	1,00	0,00	-
		30/70,b	0,73	1,07	0,50	$b < a$
		30/70,c	0,85	1,00	0,00	-
	Korona 3	90/10,a	0,31	1,00	0,00	-
		30/70,b	2,30	1,07	0,15	<i>n.d.</i>
		30/70,c	1,02	1,00	0,00	-
1c,1d	Korona 1	90/10,a	0,92	1,75	2,69	$c < d$
		30/70,a	5,92	1,00	0,00	-
		90/10,b	1,51	1,50	1,50	$d < c$
		70/30,b	3,23	1,59	1,99	$d < c$
		90/10,c	0,60	1,59	1,54	$c < d$
		30/70,c	3,95	1,13	0,36	$c < d$
	Korona 2	90/10,a	0,39	1,34	0,79	$c < d$
		30/70,a	2,23	1,09	0,20	$c < d$
		90/10,b	1,05	1,21	0,78	$d < c$
		50/50,b	2,87	1,54	2,10	$d < c$
		90/10,c	0,35	1,00	0,00	-
		30/70,c	3,16	1,00	0,00	-
	Korona 3	90/10,a	0,62	1,22	0,60	$c < d$
		30/70,a	0,50	1,47	1,58	$c < d$
		90/10,b	2,43	1,04	0,03	$d < c$
		30/70,b	14,40	1,29	0,80	$d < c$
		90/10,c	0,06	2,12	0,31	$d < c$
		30/70,c	4,92	1,29	1,10	$d < c$
2a, 2b	Korona 1	90/10,a	0,09	1,38	0,24	$b < a$
		30/70,b	1,54	1,23	0,14	<i>n.d.</i>
		30/70,c	0,56	1,00	0,00	-
	Korona 2	90/10,a	0,06	6,09	1,57	$a < b$
		90/10,b	0,28	4,19	2,47	$a < b$
		30/70,b	0,70	3,21	1,80	$a < b$
	Korona 3	30/70,c	0,66	1,08	0,14	<i>n.d.</i>
		90/10,a	0,42	1,00	0,00	-
		90/10,b	0,93	1,05	0,05	<i>n.d.</i>
2c, 2d	Korona 1	90/10,c	0,10	1,00	0,00	-
		30/70,a	3,72	1,07	0,16	$c < d$
		90/10,b	1,62	1,38	1,30	$c < d$
	Korona 2	70/30,b	3,45	1,42	1,51	$c < d$
		90/10,c	0,65	1,43	1,40	$c < d$
		30/70,c	6,85	1,51	2,10	$c < d$
	Korona 3	90/10,a	0,42	1,26	0,53	$c < d$
		90/10,b	1,10	1,19	0,61	$d < c$
		50/50,b	2,76	1,38	1,70	$d < c$
	Korona 1	90/10,c	0,58	1,00	0,00	-
		90/10,a	0,88	1,30	1,53	$c < d$
		90/10,b	3,07	1,20	0,14	$d < c$
Korona 3	30/70,b	13,85	1,30	1,02	$d < c$	

Kromatográfiás körülmények: kolonna, **Korona 1**, **Korona 2**, **Korona 3**; mozgó fázis, **a**, H₂O/MeOH (v/v)+10 mM AcOH, **b**, H₂O/EtOH (v/v)+10 mM AcOH, **c**, H₂O/IPA (v/v)+10mM AcOH; áramlási sebesség, 0,5 mL min⁻¹; detektálás, 210 nm

Korona 3 oszlopon EtOH-t tartalmazó mozgó fázissal történő elválasztásakor U-alakú retenciós görbékert kaptunk a **3a, 3b, 3c, 3d, 4a, 4b** és **4c, 4d** minták esetén. Ezeket az eredményeket a **17. ábra** szemlélteti, melyből látszik, hogy egy bizonyos eluensösszetétel után a retenciós faktor a víztartalom növelésével nőtt. Ez valószínűleg annak volt köszönhető, hogy a több vizet tartalmazó eluensben az állófázis és a minták között fokozottabbak voltak hidrofób kölcsönhatások. Amikor a mozgó fázis alkohol tartalma meghaladta a ~ 30-40%-ot, a retenciós faktorok értékei ismét emelkedtek. Ez, ahogyan már esett róla szó, arra utal, hogy a retenciós viselkedést a HILIC kölcsönhatás mechanizmusával lehet értelmezni. A **18. ábrán** láthatjuk azt is, hogy a *transz* (**c,d**) vegyületek sztereokémiája nagyobb visszatartást eredményezett a *cisz* (**a,b**) mintákhoz képest mind kis, mind pedig nagy alkohol tartalomnál. Az U-alakú görbék inflexiós pontjai és meredeksége az egyes vegyületek esetében a nagyobb illetve a kisebb alkohol tartalmaknál kissé eltérnek. Az alkohol tartalom változtatásával különbségek tapasztalhatók a szelektivitási tényezőkben (α) és felbontásokban (R_s) is, azonban általános tendenciák nem voltak megfigyelhetőek.



18. ábra: A **3** és **4** vegyületek k' értékeinek összehasonlítása EtOH tartalmú mozgó fázisban **Korona 3** oszlopon

5.1.3. A savas módosító minőségének hatása az elválasztásra

A savas módosító hatása a **3a,3b, 3c,3d, 4a,4b** és **4c,4d** minták elválasztása során kapott eredmények alapján kerül szemléltetésre. Az eluenshez adagolt savas módosítók minősége szerint vizsgáltuk azok elválasztásra gyakorolt hatását olyan vizes

mozgó fázisban, melyben az alkoholos módosítók mennyisége állandó volt. Az elválasztások során az eluens szerves fázisa MeOH, EtOH vagy IPA (70% v/v) volt, a savas módosító pedig HCOOH, AcOH, TFA, HClO₄, H₂SO₄ vagy H₃PO₄, melyek koncentrációja állandó volt (10 mM). Az elválasztások során kapott kromatográfiás eredményeket a **3. táblázat** tartalmazza.

Ha összevetjük a **3. táblázat**ban bemutatott egyes kromatográfiás adatokat kiderül, hogy a MeOH-t tartalmazó mozgó fázis alkalmazása során a *transz* vegyületek esetében (**c,d** minták) az AcOH illetve a TFA adagolása növelte a retenciós faktort, míg az EtOH tartalmú eluenssel történő elválasztások során a legtöbb esetben AcOH vagy HCOOH alkalmazása eredményezett nagyobb *k'* értéket. Az IPA-t tartalmazó mozgó fázis alkalmazása során kapott eredményekről elmondható, hogy a *cisz* (**a,b**) vegyületeknél az eluenshez adagolt H₂SO₄ illetve HCOOH növelte a visszatartást, ugyanakkor a *transz* (c,d) vegyületek elválasztása során AcOH vagy szintén HCOOH tartalmú mozgó fázis szolgáltatott nagyobb *k'* értéket. Tehát összességében elmondható, hogy a legtöbb esetben AcOH vagy HCOOH alkalmazásakor kaptunk nagyobb *k'* értéket, míg más savak kisebb retenciós faktor értékeket eredményeztek.

3. táblázat: Kromatográfiás paraméterek: retenciós faktor (k_1'), szelektivitási tényező (α), felbontás (R_S) **3a,3b, 4a,4b** és **4c,4d** enantiomerek közvetlen elválasztása a savas módosítók minőségének változtatásával MeOH, EtOH vagy IPA tartalmú mozgófázisban

Minta	Savminőség	H ₂ O/MeOH			H ₂ O/EtOH			H ₂ O/IPA		
		k_1'	α	R_S	k_1'	α	R_S	k_1'	α	R_S
3a, 3b	AcOH	0,61	1,23	0,85	1,84	1,18	0,38	0,93	1,10	0,23
	H ₂ SO ₄	0,36	1,24	0,18	0,50	1,35	0,72	0,96	1,21	1,04
	HCOOH	0,69	1,26	0,84	1,03	1,21	0,52	1,53	1,17	0,44
	TFA	0,39	1,15	0,04	0,24	1,50	0,25	0,43	1,10	0,05
	HClO ₄	0,31	1,13	0,03	0,53	1,10	0,05	0,71	1,13	0,07
	H ₃ PO ₄	0,54	1,26	0,62	0,59	1,26	0,64	0,72	1,20	0,44
3c, 3d	AcOH	0,33	1,56	0,84	1,22	1,32	1,25	0,96	1,20	0,97
	H ₂ SO ₄	0,08	2,00	0,38	0,10	2,50	0,67	0,54	1,35	0,98
	HCOOH	0,09	2,49	0,65	0,53	1,42	0,81	1,08	1,32	1,16
	TFA	0,21	1,16	0,07	0,04	2,42	0,12	0,11	1,55	0,10
	HClO ₄	0,13	1,45	0,10	0,21	1,25	0,08	0,34	1,23	0,10
	H ₃ PO ₄	0,14	1,36	0,06	0,14	1,91	0,70	0,30	1,42	0,60
4a, 4b	AcOH	0,56	1,30	0,84	1,78	1,20	0,58	0,79	1,15	0,56
	H ₂ SO ₄	0,36	1,39	0,15	0,50	1,45	1,39	0,83	1,30	1,31
	HCOOH	0,65	1,33	1,00	1,09	1,20	0,66	1,35	1,21	0,77
	TFA	0,41	1,18	0,10	0,25	1,51	0,07	0,23	1,65	0,26
	HClO ₄	0,32	1,37	0,06	0,52	1,17	0,07	0,74	1,06	0,04
	H ₃ PO ₄	0,57	1,26	0,51	0,57	1,34	0,65	0,64	1,29	0,54
4c, 4d	AcOH	0,28	1,60	0,85	1,17	1,31	1,26	0,75	1,26	0,97
	H ₂ SO ₄	0,07	2,05	0,34	0,09	2,61	0,54	0,44	1,42	1,01
	HCOOH	0,05	4,16	0,88	0,44	1,49	0,87	0,81	1,37	1,16
	TFA	0,21	1,19	0,05	0,03	2,78	0,12	0,09	1,68	0,11
	HClO ₄	0,11	1,55	0,10	0,20	1,24	0,08	0,23	1,58	0,21
	H ₃ PO ₄	0,12	1,51	0,06	0,09	2,35	0,56	0,21	1,56	0,51

Kromatográfiás körülmények: kolonna, **Korona 1**; mozgó fázis, H₂O/alkohol = 30/70 (v/v) + 10 mM sav; áramlási sebesség, 0,5 mL min⁻¹; detektálás, 205 nm

A H₂SO₄, HClO₄, H₃PO₄ és TFA savakat ugyanolyan koncentrációban alkalmaztuk, mint az AcOH-at, azonban előbbieket sokkal kisebb pH-t eredményeztek, és egyúttal az eluens ionerőssége is változott. Erősebb savak esetén a jobban protonált minta HILIC kölcsönhatása a polárisabb mozgó fázissal növekedett, aminek következtében a retenciós idő csökkent. A „gazda-vendég” típusú komplexek kialakulásában az ionerősség „pajzsként” működik, tehát ha nő az ionerősség, csökken a retenció. Ami szelektivitást és felbontást illeti, a legtöbb esetben az α és különösen az

R_s értékek nagyobbak adódtak, amikor AcOH, HCOOH és néhány esetben, amikor H_2SO_4 került alkalmazásra, különösen azokban az esetekben, amikor a mozgófázis EtOH vagy IPA tartalmú volt.

5.1.4. A savas módosító mennyiségének hatása az elválasztásra

A savas módosító mennyiségének elválasztásra gyakorolt hatását olyan mozgófázisok alkalmazásával vizsgáltuk, melyekben a sav AcOH vagy H_2SO_4 , a szerves módosító pedig MeOH vagy IPA volt. Míg az eluenshez adagolt sav mennyiségét változtattuk, addig az alkoholos módosítók mennyisége állandó maradt (70% v/v). Az elválasztások során kapott kromatográfiás eredmények szintén a **3a,3b, 3c,3d, 4a,4b** és **4c,4d** minták alapján kerülnek bemutatásra (**4. táblázat**).

A **4. táblázat** eredményei alapján megfigyelhető, hogy az eluenshez adagolt AcOH vagy H_2SO_4 tartalom növelése (a **4a,4b** minták kivételével) csökkenti a retenciósfaktort. Mivel az eluensben a savtartalom növekedett, így a mozgó fázis ionerőssége nőtt. Mint az már korábban is tárgyalásra került, a protonált minta hidrofíll kölcsönhatásának erőssége a poláris mozgó fázissal várhatóan növekedett, így csökkent a retenciósidő. Ezzel ellentétben az α és R_s értékek eltérő viselkedést mutattak a *cisz* (**a,b**) vagy *transz* (**c,d**) helyzetekben amino- és karboxil csoportot tartalmazó vegyületek esetében. A szelektivitás mindkét típusú minta elválasztásakor növekedett a hozzáadott sav mennyiségének növelésével, így kijelenthető, hogy az enantioszelektív kölcsönhatások aránya nagyobb lett. A felbontás az **a,b** anyagok esetében – bár nem egyértelműen, de – nőtt, és a **c,d** minták esetén pedig csökkent a sav koncentrációjának növelésével.

4. táblázat: Kromatográfiás adatok: retenciós faktor (k_1'), szelektivitási tényező (α), felbontás (R_S) **3a,3b**, **4a,4b** és **4c,4d** enantiomerek közvetlen elválasztása (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav állófázison a savas módosító koncentrációjának változtatásával MeOH és IPA tartalmú mozgófázisban

Minta	Sav koncentráció (mM)	Mozgó fázis: H ₂ O/alkohol = 30/70 (v/v) + sav					
		H ₂ O/MeOH + AcOH			H ₂ O/IPA + H ₂ SO ₄		
		k_1'	α	R_S	k_1'	α	R_S
3a,3b	0,5	1,25	1,10	0,04	1,46	1,18	0,57
	1,0	1,10	1,12	0,06	1,32	1,18	0,46
	5,0	1,07	1,22	0,61	0,72	1,27	0,43
	10,0	0,61	1,23	0,80	0,52	1,34	0,66
	20,0	0,60	1,26	0,84	0,53	1,37	0,76
	30,0	0,82	1,26	0,89	0,41	1,40	0,80
3c,3d	0,5	0,50	1,44	1,21	1,04	1,25	1,09
	1,0	0,44	1,48	1,14	0,46	1,43	1,05
	5,0	0,33	1,49	0,93	0,20	1,82	1,00
	10,0	0,25	1,70	0,87	0,16	1,97	0,96
	20,0	0,11	2,00	0,76	0,16	2,01	0,93
	30,0	0,04	2,63	0,16	0,12	2,22	1,01
4a,4b	0,5	1,64	1,10	0,20	1,06	1,21	0,75
	1,0	1,56	1,11	0,15	0,66	1,29	0,85
	5,0	1,11	1,23	0,65	0,51	1,44	0,90
	10,0	0,56	1,30	0,85	0,40	1,51	0,95
	20,0	0,58	1,28	0,90	0,37	1,55	1,05
	30,0	0,93	1,25	0,95	0,31	1,61	1,25
4c,4d	0,5	0,46	1,35	1,00	0,39	1,57	1,10
	1,0	0,39	1,51	0,95	0,26	1,71	1,00
	5,0	0,37	1,53	0,80	0,09	2,53	0,95
	10,0	0,20	1,87	0,75	0,05	3,56	0,90
	20,0	0,08	2,85	0,65	0,05	3,58	0,85
	30,0	0,02	4,00	0,20	0,07	3,97	0,75

Kromatográfiás körülmények: kolonna, **Korona 1**; mozgó fázis, H₂O/alkohol = 30/70 (v/v) + sav; áramlási sebesség, 0,5 mL min⁻¹; detektálás, 205 nm

5.1.5. A kémiai szerkezet és a kromatográfiás viselkedés összefüggése

A vizsgált izoxazolin gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán karbonsav analógok két csoportra oszthatók a hozzájuk kapcsolódó szubsztituensek minősége alapján. Az első csoportban az **1** és a **3** anyagok szubsztituense (R_1) metil-csoportot, míg a második csoportba tartozók, azaz a **2** illetve **4** vegyületek esetében a szubsztituens (R_2) etil-csoport tartalmaz (**17. ábra**).

A vizsgált vegyületek szerkezete befolyásolta a királis felismerést, azonban a fordított fázisú módban történő elválasztás során csekély hatása volt a retencióra annak,

hogy a vegyület metil-vagy etil-szubsztituenszt tartalmazott. Ugyanakkor a H₂O/MeOH = 90/10, illetve 5/95 (v/v) összetételű mozgó fázisok alkalmazásakor a metil-szubsztituált származékok valószínűleg jobban illeszkedtek a királis üregben, így a retenciós faktorok **Korona 1** és **Korona 2** állófázisok esetében nagyobbak voltak (**1. táblázat**).

A metil- vagy etil-csoport helyzete sztérikus kölcsönhatásokon keresztül befolyásolta a szelektivitás és felbontás értékeket. A **Korona 1** és **Korona 2** állófázisokon a **3a,3b** minták elválasztása jobb volt, mint az **1a,1b** enantiomereké, míg az **1c,1d** származékok jobb elválasztást mutattak, mint a **3c,3d** enantiomerek. Összehasonlítva a **2a-2d** és **4a-4d** enantiomerekre kapott eredményeket, általánosságban az mondható el, hogy az utóbbiak mutattak jobb elválasztást.

5.1.6. A különböző kolonnák elválasztó képességének összehasonlítása

Érdekes eredményeket tapasztaltunk, amikor összehasonlítottuk a három állófázis retenciós viselkedését azokban az esetekben, melyeknél kis vagy nagy mennyiségű vizet vagy alkoholt tartalmazott a mozgó fázis (**1. táblázat**). A H₂O/MeOH (v/v) + 10 mM AcOH eluens rendszer alkalmazásakor, összehasonlítva a kolonnákat a **Korona 3** oszlopon nagyobb víztartalom mellett volt nagyobb a k_1' (kivétel **1c,1d** a **Korona 1** oszlopon), és **Korona 1** oszlopon pedig abban az esetben, amikor az alkoholtartalom volt nagyobb. Az első esetben, mivel a **Korona 3** apolárisabb jellegű, így a több vizet tartalmazó mozgófázis kedvez a hidrofób kölcsönhatásoknak a minta és az állófázis szelektora között, emiatt nagyobb k_1' . A második esetben pedig, mivel a **Korona 1** polárisabb jellegű, így az alkoholban gazdag eluens kedvez a HILIC kölcsönhatásoknak, és ennek következtében nagyobb k_1' .

A vizsgált vegyületekhez kapcsolt szubsztituensek is befolyásolták a kromatográfiás viselkedést. A kapott eredmények alapján, többségében az EtOH illetve az IPA tartalmú eluensek alkalmazásakor a **Korona 1** és **Korona 2** állófázisokon a metil-szubsztituált vegyületek retenciós faktorai adódtak nagyobbak, míg az EtOH-t tartalmazó mozgófázissal történő elválasztások során kapott eredmények alapján a **Korona 3** kolonnán az etil-szubsztituált származékok k' értékei voltak nagyobbak.

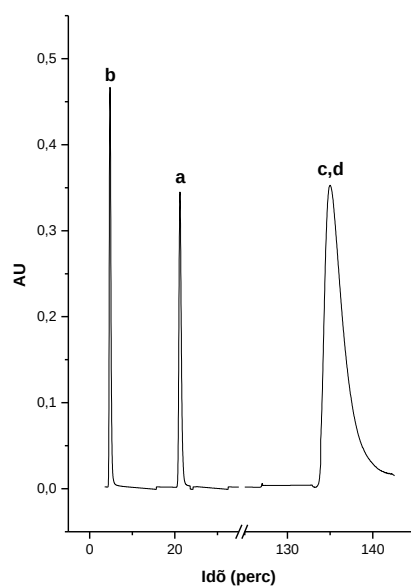
5.1.7. Az izoxazolin analógok négy sztereoizomerének elválasztása és az elúciós sorrend megállapítása

Az izoxazolin gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán karbonsav származékok biológiai aktivitása függ a konfigurációjuktól, ezért nemcsak az enantiomerek, hanem a diasztereomerek kromatográfiás úton történő elválasztása és azonosítása is alapvető feladat. Az **1.** és **2. táblázatban** felsorolt adatok azt mutatják, hogy a négy sztereoizomer elválasztását az adott körülmények között csak néhány esetben lehet elérni egy kromatográfiás mérésen belül. Ahhoz, hogy a négy sztereoizomer kromatográfiás úton történő elválasztása megvalósítható legyen, az elválasztást az állófázisok minősége, a mozgó fázis összetétele illetve a hőmérséklet változtatásával optimalizáltuk. A **19. ábrák** és az **5. táblázat** a négy izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin származék sztereoizomerjeinek elválasztását szemlélteti. Sajnos az **1a,1b** és **1c,1d** minták nem voltak elválaszthatóak egy adott kromatográfiás rendszerben, de két eluens rendszert alkalmazva az **a,b** illetve a **c,d** enantiomerekre kitűnő elválasztást kaptunk.

5. táblázat: Kromatográfiás adatok: retenciós faktor (k') és felbontás (R_S) értékek a négy enantiomer **Korona 1** és **2** kolonnákon történő elválasztásokra

Minta	Kolonna	Mozgó fázis	k'_1	k'_2	k'_3	k'_4	R_{S1}	R_{S2}	R_{S3}	Elúciós sorrend
1a-b	Korona 1	a	0,42	5,27	38,94	38,94	16,21	40,63	0,00	$b < a < c = d$
1c-d	Korona 1	b	0,20	0,26	0,93	1,67	0,20	3,72	3,39	$b < a < c < d$
2a-d	Korona 2	c	0,32	1,14	2,76	4,17	1,73	2,66	1,61	$a < b < c < d$
3a-d	Korona 1	d	2,01	2,86	11,40	12,99	1,92	13,68	1,72	$d < c < a < b$
4a-d	Korona 1	d	2,34	3,35	9,99	11,11	2,16	12,92	2,11	$d < c < a < b$

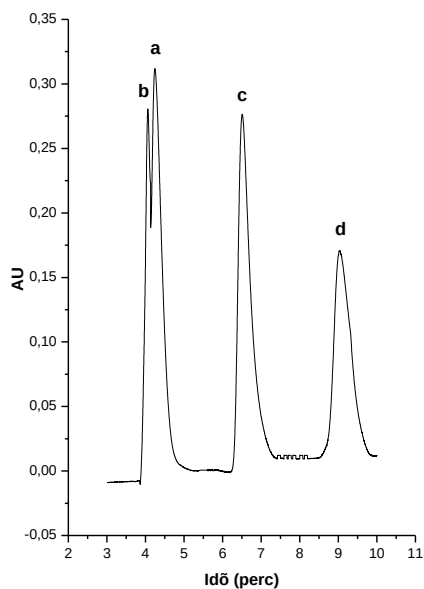
Kromatográfiás paraméterek: mozgó fázis, **a**, H₂O/MeOH = 5/95 (v/v) + 30 mM AcOH; **b**, H₂O/MeOH = 90/10 (v/v) + 10 mM AcOH; **c**, H₂O/EtOH = 50/50 (v/v) + 10 mM AcOH; **d**, H₂O/MeOH = 5/95 (v/v) + 10 mM AcOH; hőmérséklet, 5°C az 1a-1b, 2a-2d, 3a-3d és 4a-4d mintákra, 25°C az **1c-d** mintára; áramlási sebesség, 0,5 ml min⁻¹; detektálás, 210 nm



19.a. ábra: Az **1a,1b** sztereoizomereinek elválasztása

Oszlop: Korona 1; **eluens összetétel:** H₂O/MeOH = 5/95 (v/v) + 30 mM AcOH;

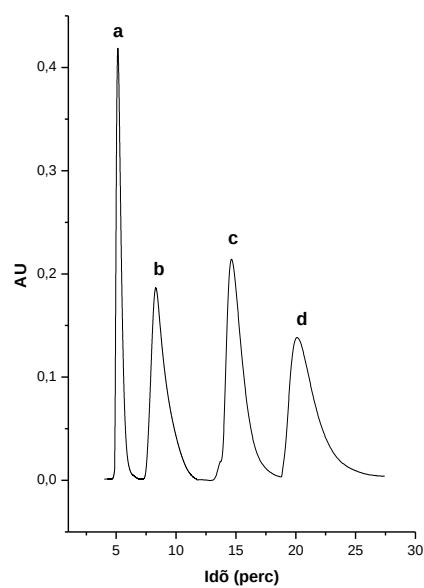
áramlási sebesség: 0,5 ml min⁻¹; **detektálás:** 210 nm, **hőmérséklet:** 5°C.



19.b. ábra: Az **1c,1d** sztereoizomereinek elválasztása

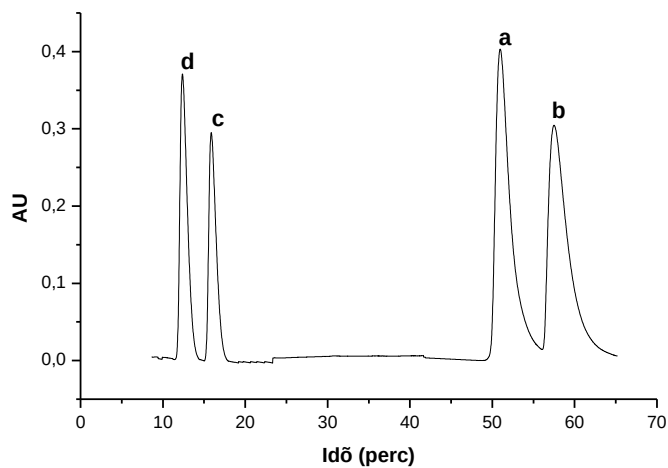
Oszlop: Korona 1; **eluens összetétel:** H₂O/MeOH = 90/10 (v/v) + 10 mM AcOH;

áramlási sebesség: 0,5 ml min⁻¹; **detektálás:** 210 nm, **hőmérséklet:** 25°C.



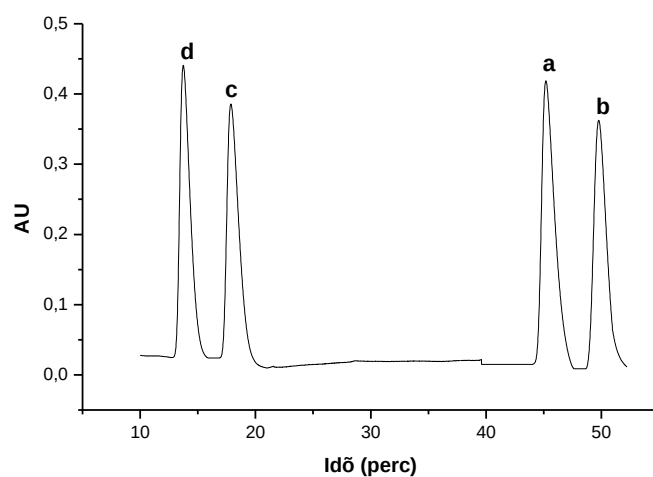
19.c. ábra: A 2a-2d sztereoizomereinek elválasztása

Oszlop: Korona 2; **eluens összetétel:** H₂O/EtOH = 50/50 (v/v) + 10 mM AcOH;
áramlási sebesség: 0,5 ml min⁻¹; **detektálás:** 210 nm, **hőmérséklet:** 5°C.



19.d. ábra: A 3a-3d sztereoizomereinek elválasztása

Oszlop: Korona 1; **eluens összetétel:** H₂O/MeOH = 5/95 (v/v) + 10 mM AcOH;
áramlási sebesség: 0,5 ml min⁻¹; **detektálás:** 210 nm, **hőmérséklet:** 5°C.



19.e. ábra: A **4a-4d** sztereoizomereinek elválasztása

Oszlop: Korona 1; **eluens összetétel:** H₂O/MeOH = 5/95 (v/v) + 10 mM AcOH;

áramlási sebesség: 0,5 ml min⁻¹; **detektálás:** 210 nm, **hőmérséklet:** 5°C.

6. Összefoglalás

Fordított fázisú kromatográfiás mérések során az izoxazolin gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán karbonsav származékok enantiomerjeinek elválasztását (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav alapú állófázisokon hasonlítottuk össze.

Vizsgáltuk az eluens összetétel, a szerves- és savas módosítók minőségének, valamint azok koncentráció-változásának hatását az elválasztásra.

Az eluens összetétel hatásának vizsgálatakor kiderült, hogy **Korona 2** kolonnán minden esetben nő a visszatartás a MeOH-tartalom növelésével, valamint a **Korona 3** állófázison minden anyag retenciós faktor értéke U-alakú görbét írt le. A MeOH tartalom növelésével a retenciós faktor növekedését a HILIC hatással magyaráztuk. A szelektivitást és felbontást tekintve a **Korona 1** és **Korona 2** oszlopokon többnyire a nagyobb alkoholtartalom biztosította a jobb elválasztást, kivételnek bizonyult az **1c,1d** valamint a **2a,2b** vegyület. A **Korona 3** oszlop királis szelektora – köszönhetően a hosszabb apoláris „kar”-nak – főként a nagyobb víztartalom esetén szolgáltatta a jobb felbontást.

Az alkohol minőségének változtatása során a k' értékek minden esetben az EtOH-t tartalmazó eluensek használatakor adódtak nagyobbak. Az enantioszelektivitást tekintve a **Korona 1** kolonnán, a **2c,2d** vegyület kivételével, az IPA és az MeOH, míg a **Korona 2** oszlopon minden esetben az EtOH biztosított nagyobb enantioszelektivitást. A **Korona 3** esetében nem mondható ki általános érvényű szabály.

Savas módosítóként alkalmazott hat sav közül MeOH-t tartalmazó mozgó fázisban a *cisz* vegyületek esetében az AcOH és HCOOH, míg a *transz* mintáknál az AcOH és TFA használatakor volt legnagyobb a visszatartás. A felbontás értékek azonban AcOH és HCOOH alkalmazása esetén bizonyultak nagyobbak, és ami a szelektivitást illeti, többnyire követték a felbontás értékek változását.

EtOH-t és IPA-t tartalmazó eluensekben a retenciós faktorokkal kapcsolatos tapasztalat az, hogy minden esetben az AcOH és HCOOH szolgáltatta a legnagyobb visszatartást. Az α értékeket tekintve mind EtOH, mind IPA tartalmú mozgófázisok esetén igaz, hogy a TFA tartalmú mozgófázis adta a legnagyobb értékeket (kivétel a **3c,3d** EtOH és H₂SO₄ tartalmú eluensben). Az R_S értékek EtOH tartalmú eluensben az **a,b** mintáknál H₂SO₄ és HCOOH, a **c,d** mintáknál pedig AcOH és HCOOH

használatkor adódtak nagyobbak. IPA-ban minden alkalommal a H_2SO_4 és HCOOH nyújtotta a jobb felbontást.

A savas módosító koncentrációjának vizsgálatakor MeOH tartalmú eluenshez AcOH-t, IPA tartalmúhoz pedig H_2SO_4 -t adagoltunk. A sav koncentrációjának növelése többnyire a visszatartás növekedésével járt, kivételt képeztek AcOH esetén a *cisz* minták, amelyek U-alakú görbét írtak le a savkoncentráció növelésével. Az enantiomer elválasztás szelektivitása a sav koncentráció növelésével növekedett, a felbontás értékek a *cisz* vegyületek esetében szintén növekedtek, azonban a *transz* vegyületeknél általában csökkenés volt megfigyelhető.

A vizsgált anyagok szerkezete is hatással volt a királis felismerésre. A **Korona 1** és **2** állófázisok esetében a metil-szubsztituált származékok valószínűleg jobban illeszkedtek a királis üregben, ezért a retenciók nagyobbak adódtak mind kis, mind pedig nagy MeOH tartalomnál. A metil- vagy etil-szubsztituensek szterikus helyzete is befolyásolta kromatográfiás paraméterek változását, különösen a szelektivitás és felbontás értékeket. A **Korona 1** és **2** kolonnákon a **3a,3b** minták elválása jobb volt, mint az **1a,1b** enantiomereké, míg az **1c,1d** származékok jobb eredményt mutattak, mint a **3c,3d**. A **2a-2d** és **4a-4d** enantiomerek közül az utóbbiak általánosságban jobb elválasztást mutattak.

A vegyületek négy sztereoizomer-keverékének elválasztását is sikeresen elvégeztük, azonban az **1a-1d** minták csak két kromatográfiás futtatásban voltak teljesen megkülönböztethetők.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Furka, Á., Szerves kémia, Tankönyvkiadó (1988).
- [2] B. Blaschke, H.P. Kraft, K. Fickentscher, F. Kohler, *Arzneim.-Forsch.* 29 (1979) 1640.
- [3] Fekete, J., Folyadékkromatográfia, Jáva-98 Kft, (2003) 322-345.
- [4] C.J. Pedersen, *J. Amer. Chem. Soc.* 89 (1967) 7017.
- [5] E. P. Kyba, L.R. Koga, L.R. Sousa, H.G. Siegel, D.J. Cram, *J. Amer. Chem. Soc.* 95 (1973) 2692.
- [6] H.K. Frensdorff, *J. Amer. Chem. Soc.* 93 (1971) 600.
- [7] R. Kuhn, C. Steinmetz, T. Bereuter, P. Haas, F. Erni *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 367.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] X.X. Zhang, J.S. Bradshaw, R.M. Izatt *Chem. Rev.* 97 (1997) 3313.
- [11] Y. Machida, H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato *J. Chromatogr. A* 805 (1998) 85.
- [12] M.H. Hyun, J.S. Jin, W. Lee *Bull. Kor. Chem. Soc.* 19 (1998) 819.
- [13] J.P. Behr, J.M. Lehn, D. Moras, J.C. Thierry *J. Amer. Chem. Soc.* 103 (1998) 701.
- [14] M.H. Hyun, J.S. Jin, W. Lee *J. Chromatogr. A* 822 (1998) 155.
- [15] M.H. Hyun, J.S. Jin, H.J. Koo, W.J. Lee *J. Chromatogr. A* 837 (1999) 75.
- [16] J.S. Jin, A.M. Stalcup, M.H. Hyun *J. Chromatogr. A* 933 (2001) 83.
- [17] M.H. Hyun, D.H. Kim *Chirality* 16 (2004) 294.
- [18] H. Kai, H. Matsumoto, N. Hattori, A. Takase, T. Fujiwara, H. Sugimoto *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (2001) 1997.
- [19] M. Basappa, P. Sadashiva, K. Mantelingu, N.S. Swamy, K.S. Ranappa *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 4539.
- [20] Y. Rajendra Prasad, P. Ravi Kumar, B. Ramesh *Int. J. Chem. Sci.* 5 (2007) 542.
- [21] K-H. Park, M.J. Kurth *Tetrahedron* 58 (2002) 8629.
- [22] I.M. Mándity, E. Wéber, T.A. Martinek, G. Olajos, G.K. Tóth, E. Vass, F. Fülöp *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 2171.

- [23] E. Torres, C. Acosta-Silva, F. Rua, A. Alvarez-Larena, T. Parella, V. Branchadell, R.M. Ortuno *Tetrahedron* 65 (2009) 5669.
- [24] F. Fülöp, In *Studies in Natural Product Chemistry* Vol. 22, Atta-ur-Rahman, (Ed.) Elsevier Science Publishers (2000) 273-306.
- [25] F. Fülöp *Chem. Rev.* 101 (2001) 2181.
- [26] L. Kiss, F. Fülöp *Synlett* (2010) 1302.
- [27] T. Iwamoto, E. Tsujii, M. Ezaki, A. Fujie, S. Hashimoto, M. Okuhara, M. Kohsaka, H. Imanaka, K. Kawabata, Y. Inamoto, K. Sakane *J. Antibiotics* 43 (1990) 1.
- [28] K. Kawabata, Y. Inamoto, K. Sakane, T. Iwamoto, S. Hashimoto *J. Antibiotics* 43 (1990) 513.
- [29] M. Konishi, M. Nishio, K. Saitoh, T. Miyaki, T. Oki, H. Kawaguchi *J. Antibiotics* 42 (1989) 1749.
- [30] T. Oki, M. Hirano, K. Tomatsu, K. Numata, H. Kamei *J. Antibiotics* 42 (1989) 1756.
- [31] V. Nair, T.D. Suja *Tetrahedron* 63 (2007) 12247.
- [32] I.N.N. Namboothiri, N. Rastogi, B. Ganguly, S.M. Mobin, M. Cojocar *Tetrahedron* 60 (2004) 1453.
- [33] T. Mukaiyama, T. Hoshino *J. Am. Chem. Soc.* 62 (1960) 5339.
- [34] M. Christl, R. Huisgen *Chem. Ber.* 106 (1973) 3345.
- [35] L. Kiss, M. Nonn, E. Forró, R. Sillanpää, F. Fülöp *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 2605.
- [36] M. Nonn, L. Kiss, E. Forró, Z. Mucsi, F. Fülöp *Tetrahedron Lett.* 67 (2011) 4079.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy diplomamunkámat a Tanszéken készíthettem.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Péter Antal egyetemi tanárnak a diplomamunka során felmerült elméleti, illetve a kísérleti munkában nyújtott gyakorlati segítségért, végtelen türelméért.

Köszönet illeti Dr. habil. Ilisz István egyetemi adjunktust szakmai útmutatásaiért, tanácsaiért, segítségéért.

Szeretném megköszönni a tanszék összes dolgozójának odaadó munkájukat, türelmüket, és a kellemes légkört, mely munkám során körülvett.

Köszönetet mondok az SZTE Gyógyszerkémiai Intézet munkatársainak, Dr. Fülöp Ferenc akadémikusnak illetve Nonn Melinda PhD hallgatónak, a méréseimhez szükséges minták előállításáért.

Végül, de nem utolsó sorban, hálásan köszönöm szüleimnek, hogy bizalmukkal, türelmükkel, kitartásukkal, és odaadó szeretetükkel mindvégig segítettek.