



Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

IZOXAZOLIN GYŰRŰVEL KONDENZÁLT 2-AMINOCIKLOPENTÁN KARBONSÁV ANALÓGOK SZTEREOIZOMERJEINEK ELVÁLASZTÁSA LIGANDUMCSERÉS KIRÁLIS ÁLLÓFÁZISON

GreCsó Nóra
II. évf. vegyész MSc.

Témavezetők: Dr. Péter Antal
egyetemi tanár

Dr. habil. Ilisz István
egyetemi adjunktus

SZEGED

2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	2
2. Irodalmi előzmények.....	3
2.1. A kromatográfia elméleti áttekintése.....	3
2.2. Az optikai izoméria és az optikailag aktív vegyületek folyadékkromatográfiás elválasztási lehetőségei.....	4
2.2.1. Az optikai izoméria	4
2.2.2. A királis vegyületek sztereoizomerjeinek elválasztása HPLC-vel	5
2.2.2.1. Királis származékképző reagensek alkalmazása	6
2.2.2.2. Királis állófázisok alkalmazása	6
2.2.2.3. Ligandumcserés állófázisok rövid irodalmi ismertetése	7
2.3. Termodinamika a kromatográfiában	10
2.3.1. Kromatográfiás elválasztás hőmérsékletfüggése.....	10
2.3.2. Termodinamikai alapfogalmak.....	10
2.3.3. A van't Hoff egyenlet és alkalmazása a kromatográfiában.....	12
2.4. Izoxazolin gyűrűt tartalmazó vegyületek előállításának és jelentőségének irodalmi összefoglalása.....	14
2.4.1. Izoxazolin gyűrűt tartalmazó vegyületek előállítása	14
2.4.2. Az izoxazolin gyűrűt tartalmazó vegyületek biológiai jelentősége.....	17
3. Kísérleti rész.....	19
3.1. A vizsgált izoxazolinok	19
3.2. Alkalmazott kolonna	20
3.3. Felhasznált anyagok	21
3.4. Alkalmazott berendezések.....	21
3.5. Kromatográfiás összefüggések.....	22
4. Célkitűzés.....	23
5. Kísérleti eredmények és értékelésük	24
5.1. Az eluensösszetétel hatása a kromatográfiás paraméterekre	24
5.2. Az alkohol minőségének hatása az elválasztásra	26
5.3. A Cu(II) só változtatásának hatása az elválasztásra	29
5.4. Szerkezet-retenció összefüggés vizsgálata	31
5.5. A hőmérsékletváltozás hatása a kromatográfiás elválasztásra	33
6.Összefoglalás.....	40
7. Irodalomjegyzék.....	41
8. Köszönetnyilvánítás	44

1. Bevezetés

Manapság különösen a gyógyszerkutatásban nőtt meg az érdeklődés a királis vegyületek elválasztása iránt. Ez alapján nem meglepő, hogy az ilyen típusú vegyületeket már jó ideje kíséri kitüntetett figyelem, különösen a gyógyszeriparban. Királis hatóanyag esetén az enantiomerek hatástani tulajdonságai (felszívódás, kiválasztás, aktiválás-gátlás, metabolizmus, fehérjekötődés, receptor kötődés stb.) eltérőek lehetnek, köszönhetően annak, hogy a receptrok, melyekkel kölcsönhatásba lépnek a hatóanyagok, is királisak [1]. Az alkalmazott terápiás hatás gyakran csak az egyik enantiomerhez (eutomer) rendelhető, míg a másik izomer (disztomer) csak ideális esetben ártalmatlan, semleges. A disztomer valamilyen nem kívánt mellékhatást, sőt toxikus hatást is kiválthat [2]. Fontos, hogy az enantiomerek tiszta formában álljanak rendelkezésre. A tiszta enantiomerek előállítására három lehetséges mód van:

- ✓ racém keverékek elválasztása,
- ✓ tiszta királis forrás alkalmazása,
- ✓ enantioszelektív szintézisek.

Bármelyik előállítási módot is választják, elengedhetetlen feltétel a királis tisztaság ellenőrzése. Mindezekből következik, hogy a gyógyszerfejlesztés és a gyógyszerellenőrzés céljára jól reprodukálható, nagy érzékenységű, sztereoszelektív módszerre van szükség. Ezen feltételeknek leginkább a királis nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia felel meg, azon belül is a királis oszlopot használó közvetlen módszer a legelterjedtebb. Ebben az esetben az enantiomerek az oszlopon lévő királis szelektorokkal különböző minőségű kölcsönhatásokat alakítanak ki, mely biztosíthatja az elválasztásukat.

Munkám során a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén működő kromatográfiai kutatócsoport munkájában vettem részt. Feladatunk az izoxazolin gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán karbonsav analógok sztereoizomerjeinek elválasztása volt. Tanulmányoztuk, hogy az eluensösszetétel, a hőmérséklet, a Cu^{2+} só mennyiségi és minőségi változtatása milyen hatást gyakorol a kromatográfiai elválasztást jellemző paraméterekre, úgymint a retenciósfaktorra, szelektivitásra és felbontásra. A mérési eredményekből termodinamikai adatokat számoltunk a van't Hoff egyenlet kromatográfiában használatos összefüggéseinek felhasználásával. A kapott eredményekből a vegyületek és az állófázis között fellépő kölcsönhatásokra vontunk le következtetéseket.

2. Irodalmi előzmények

2.1. A kromatográfia elméleti áttekintése

A kromatográfia többfokozatú, nagyhatékonyságú, dinamikus elválasztási módszerek gyűjtőneve. Közös alapjuk, hogy a komponensek az egymással érintkező állófázis és mozgófázis (eluens) között megoszlanak.

Az elválasztás tehát a komponens valamilyen szorpción alapuló megkötődése az állófázison és visszajutása a mozgófázisba. A mozgófázisba bejuttatott minta összetevői az állófázisra kerülnek, ahol a megoszlási hányadosuknak megfelelően megoszlanak a két fázis között; valódi egyensúly nem tud beállni, mert az egyik fázis mozog. A dinamikus kvázi-egyensúlynak megfelelően eltérő mértékben megosztott komponenseket a mozgófázis újabb állófázis részre juttatja, ahol ez a kvázi-egyensúly beáll. Ez a folyamat újra és újra lejátszódik, amíg az anyag az állófázis végére nem ér. Az elválasztandó komponensek különböző mértékű kölcsönhatásokat alakítanak ki, az állófázison eltérő ideig tartózkodnak, tehát a retenciós idejük eltérő lesz. Az állófázissal erősebb kölcsönhatást kialakító komponensek több időt töltenek az állófázison, lemaradnak, míg azok a komponensek, amelyek kisebb erősséggel kötődnek, gyorsabban eléri az állófázis végét.

Ezek a kölcsönhatások lehetnek:

1. Fizikai kölcsönhatások
 - van der Waals-féle gyenge kölcsönhatások,
 - méret szerinti kölcsönhatások.
2. Kémiai kölcsönhatások
 - ionos kölcsönhatások,
 - H-hidas kölcsönhatások,
 - sav-bázis kölcsönhatások,
 - átmeneti komplexképzés.
3. Biokémiai kölcsönhatások
 - biokémiai affinitás, stb.

A kromatográfiai módszereket többféleképpen, több szempont szerint lehet csoportosítani. A mozgófázis halmazállapota szerint beszélünk gáz- és folyadékkromatográfiáról, a megkötődés fizikai-kémiai folyamata szerint adszorpció, abszorpció, megoszlásos, ioncsere

stb. kromatográfiáról. Technikai kivitelezéstől függően beszélhetünk oszlop- vagy sík- (vékonyréteg-, papír-) kromatográfiáról [3].

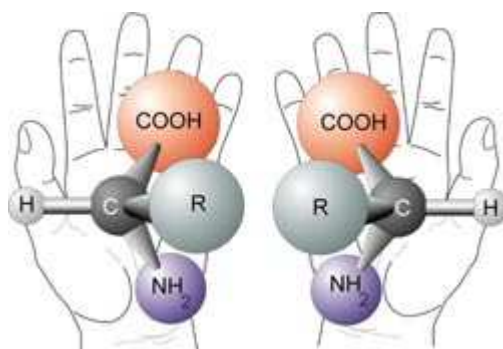
2.2. Az optikai izoméria és az optikailag aktív vegyületek folyadékkromatográfiás elválasztási lehetőségei

2.2.1. Az optikai izoméria

A sztereokémia más néven térizoméria a kémiának az az ága, amely az atomok térbeli szerkezetét vizsgálja egy molekulán belül.

Vannak olyan vegyületek, melyeknek módosulatai egymásnak nem szerkezeti izomereik, mert szerkezeti képletükben nem térnek el, de optikai aktivitásukban viszont igen (enantiomerek, királis vegyületek). Azt a tulajdonságot, hogy egy vegyület (vagy anyag) képes elforgatni a polarizált fény síkját, optikai aktivitásnak, a vegyületet (vagy anyagot) optikailag aktívnak nevezzük. Azok a vegyületek, amelyeknek nincs ilyen tulajdonsága, optikailag inaktívak (akirális vegyületek). Ha egy vegyület optikai forgatása az óramutató járásával megegyező irányú, akkor a vegyület jobbra forgató (jele +), ellenkező esetben (ha az optikai forgatás az óramutató járásával ellentétes irányú) balra forgatónak (jele -) nevezzük. A két optikailag aktív módosulat minden fizikai és kémiai tulajdonsága megegyezik, azonos körülmények között a mért elforgatásuk abszolút értéke is megegyezik. Enantiomereknek, tükörképi pároknak nevezzük az olyan izomereket, amelyek egymástól csak optikai forgatóképességükben térnek el, más fizikai és kémiai tulajdonságukban nem. Egy királis centrumot tartalmazó vegyületnek csak egy enantiomer párja lehet. Tükörképi (enantiomer) párok egy-egy arányú elegyét racém elegynek hívjuk.

A szerves molekulák kiralitása a legtöbb esetben arra vezethető vissza, hogy a vegyület egy vagy több kiralitás centrumot tartalmaz. Egy szénatom akkor kiralitás centrum, ha négy különböző atom vagy atomcsoport kapcsolódik hozzá (**1. ábra**). Az olyan szénatomot, amihez négy különböző csoport kapcsolódik, aszimmetrikus vagy aszimmetriás szénatomnak nevezzük.



1. ábra: Asszimetria centrumok

Azokat a sztereoizomereket, amelyek nem enantiomerek, tehát tükörképi viszonyban nem állnak egymással, diasztereomereknek nevezzük. A diasztereomerek fizikai és kémiai tulajdonságai eltérőek.

2.2.2. A királis vegyületek sztereoizomerjeinek elválasztása HPLC-vel

Az enantiomerek kromatográfiás elválasztásának alapját a kvázi diasztereomer vegyületepárok kialakítása jelenti. Ennek lehetséges módjai:

a, Közvetett módszerek:

- ✓ oszlop előtti származékképzés királis reagens segítségével.

b, Közvetlen módszerek:

- ✓ királis oszlop (állófázis) alkalmazása, melynek alapja, hogy az állófázison kémiaiilag kötött királis vegyület és az elválasztandó enantiomerek között kialakuló kölcsönhatások eredményezik az elválasztást,
- ✓ királis adalék alkalmazása a mozgófázisban, ahol az elválasztás az eluensben keletkező komplexek eltérő retenciós tulajdonságain alapul.

2.2.2.1. Királis származékképző reagensek alkalmazása

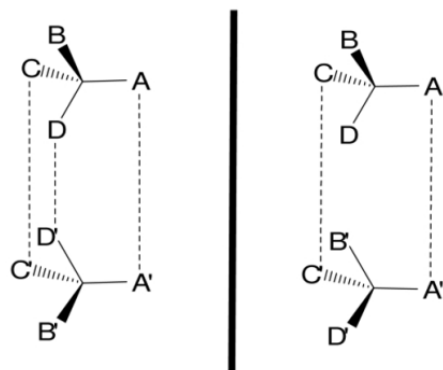
Az oszlop előtti származékképzés során a királisan tiszta reagens hozzáadásával kovalens kötésű diasztereomerek képződnek, amelyeknek az eltérő fizikai és kémiai tulajdonságaik miatt az elválasztás már akirális kolonnán is lehetséges. 1975-ben Furukawa volt az első, aki aminosav enantiomert, *p*-nitro-benzilésztereket, választott el (+)-10-kámfor-szulfonilklorid reagens felhasználásával [4,5]. A királis származékképzők alkalmazása számos előnnyel járhat, mivel a felbontás általában nagyobb, a detektálás alsó határa csökkenthető, az akirális kolonna olcsóbb, elúciós sorrend következtethető illetve a módszerfejlesztés kevésbé időigényes. Azonban a módszernek jelentős hátrányát jelenti, hogy a származékképző reagens nem feltétlenül enantiomer tiszta, az alkalmazás során felléphet racemizáció és kinetikai rezolúció, a képződő diasztereomerek moláris abszorbanciája különböző lehet, a reagens felesleg zavaró csúcsként jelentkezhethet valamint az enantiomer visszanyerése további műveleteket igényel.

2.2.2.2. Királis állófázisok alkalmazása

A királis állófázisokon végzett elválasztás széles körben alkalmazott folyadékkromatográfiás módszer. Ennek a módszernek számos előnye van: az elválasztás során racemizáció nem valószínű, származékképzésre alkalmas funkciós csoportokkal nem rendelkező racém elegyek is elválaszthatóak, az enantiomerek azonos moláris abszorbanciával rendelkeznek, a minta előkészítés egyszerű és az elválasztást a hőmérséklet változtatásával kedvező irányba lehet befolyásolni. Az előnyök mellett hátrányokkal is rendelkezik a módszer: a kolonna drága, az állófázis és a minta közötti kölcsönhatások nem teljesen tisztázottak, a királis kolonna a tárolási és használati körülményekre igen érzékeny.

Az állófázis és az elválasztandó vegyület közötti kapcsolatot a hárompontos illeszkedés modellje (2. *ábra*) szemlélteti, mely Easson és Dalglish nevéhez fűződik [6,7]. Ez a kapcsolat akkor a legstabilabb, ha az állófázishoz az elválasztandó molekula legalább három ponton tud kötődni. A két enantiomer nem képes ugyanazon kölcsönhatások kialakítására, ezért válósulhat meg az elválasztásuk.

A kialakuló kölcsönhatások lehetnek: hidrofób, π - π kölcsönhatások, dipól-dipól kötések, hidrogén-kötések, ionos kötések, komplexek keletkezése, ligandumcsere jelensége, stb.



2. ábra: A hárompontos illeszkedés

A királis állófázisokat a következő főbb csoportokba lehet sorolni:

- ✓ ligandumcserés (Davankov-féle) állófázisok,
- ✓ π donor- akceptor (Pirkle-féle) állófázisok,
- ✓ zárványkomplex képzők (ciklodextrinek, koronaéterek),
- ✓ poliszacharid alapúak (cellulóz, amilóz),
- ✓ fehérje alapúak,
- ✓ makrociklusos antibiotikumok,
- ✓ szintetikus polimer alapúak.

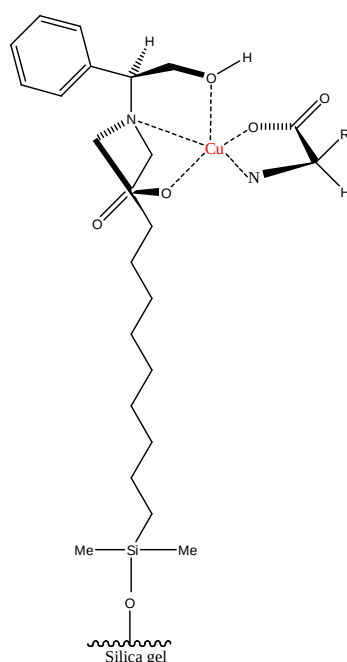
Munkánk során ligandumcserés kolonnát alkalmaztunk, melyet Hyun és munkatársai bocsájtottak rendelkezésünkre.

2.2.2.3. Ligandumcserés állófázisok rövid irodalmi ismertetése

Davankov és mtsai [8-10] úttörő munkái nyomán a királis ligandumcserés kromatográfiát széles körben alkalmazták, főként α -aminosav enantiomerek elválasztására. Hare és mtsai [11] valamint Wagner és mtsai [12] ugyanezen α -aminosav és származékaik Cu^{2+} komplexeit, mint királis mozgófázis adalékokat sikeresen alkalmazták α -aminosav enantiomerek megkülönböztetésére. Davankov és mtsai [13] valamint Roumeliotis és mtsai [14] ugyancsak ezeket az α -aminosavakat és származékait kovalensen kötötték szilikagél hordozóra és Cu^{2+} jelenlétében használták aminosavak megkülönböztetésére. Davankov és mtsai [15] heptil-, decil- és hexadecil-L-hidroxiprolint rögzítettek szilikagél állófázison. Vizsgálták a Cu^{2+} koncentráció, pH, NH_4OAc , szerves módosító hatását az enantioszelektivitásra α -aminosavak elválasztása esetén. Davankov és mtsai [16] valamint Remelli és mtsai [17] C18 állófázisra dinamikusan kötöttek *N*-decil-L-hisztidint illetve *N*-tau-*n*-decil-L-hisztidint. Cu^{2+} ionok jelenlétében α -

aminosav enantiomerek elválasztását tanulmányozták és megállapították, hogy az elúciós sorrend $L < D$. Karger és mtsai [18,19] a szelektivitás javítása érdekében a szelektor (α -aminosav származék) és a szilikagél hordozó közé *n*-butil illetve *n*-decil távtartó láncokat („spacer”) építettek be és az oszlopokat sikeresen alkalmazták Cu^{2+} , mint mozgófázis adalék jelenlétében aminoalkoholok és danzil-D,L-aminosavak elválasztására. Gübitz és mtsai különböző távtartó láncokon keresztül L-prolint, L-hidroxi-prolint rögzítettek szilikagél hordozóra [20,21]. 5-10 mM CuSO_4 jelenlétében sikeresen választottak el α -aminosavakat, danzilaminosavakat, hidroxisavakat, és különböző glicil-dipeptideket. Yuki és mtsai [22] (1*R*,2*S*) és (1*S*,2*S*)-2-karboximetilamino-1,2-difeniletanolt kovalensen rögzítettek szilikagél állófázisra. Az új állófázis sikeresen választott el α -aminosavakat és hidroxisavakat. Sliwka és mtsai [23] dinamikusan rögzítettek királis alkoholt, *N*-szubsztituált-*S*-fenilglicinolt C18 állófázisra. Tanulmányozták a szubsztituens (alkil C-7, C-9, C-12 lánc; aromás metoxibenzil, metilnaftil, metilantril csoportok) és különböző kromatográfiás paraméterek (Cu^{2+} ion, pH, hőmérséklet, szerves módosító) hatását a retencióra és az enantioszelektivitásra. Miyazawa és mtsai [24], Oi és mtsai [25] és Schlauch és mtsai [26] D-penicillamint és a származékait alkalmaztak ligandumcserés szelektorként Cu^{2+} jelenlétében, alifás és aromás aminosav enantiomerek megkülönböztetésére. Hyun és mtsai [27-30] új királis szelektorokat úgymint (1*S*,2*R*)-norefedrin, (*R*)-alaninol, (*S*)-*N,N*-karboximetilundecil leucinol nátrium dinamikusan kötöttek C18 állófázisra. A királis szelektorok igen hatékonyak bizonyultak Cu^{2+} jelenlétében α -aminosavak elválasztására. Az utóbbi szelektor egy újabb változata (*R*)-*N,N*-karboximetilundecil fenilglicinol nátrium kovalensen rögzítve szilikagélhez, Cu^{2+} jelenlétében nemcsak az α -aminosavaknak, hanem a β -aminosavaknak is kiváló szelektora volt [31,32].

Az ligandumcserés állófázisok szerkezetét tekintve a szilikagél állófázison a szilanol csoporthoz aminosav származék kapcsolódik egy szénláncon („spacer”) keresztül. A mozgófázis Cu^{2+} iont tartalmaz, amely kölcsönhatásba lép a szelektor amino-, karboxil- és hidroxil csoportjával és az elválasztandó enantiomer karboxil- és aminocsoportjával (**3. ábra**).



3. ábra: A Cu(II) komplex kialakulása

A ligandumcserés elválasztás mechanizmusát tekintve az általánosan elfogadott nézet szerint a Cu(II)-szelektor-minta komplex 5 tagú kelátgyűrűt képez és egy négyzetes sík elrendeződés javasolt a turner komplexre [28,33,34]. Az elválasztás alapja, hogy az elválasztandó izomerek eltérő erősségű komplexet alakítanak ki az állófázissal és ennek megfelelően eltérő időt töltenek az állófázison. Az enantioszelektivitást a kialakuló komplex létrejötte és eltérő stabilitása eredményezi. Ha a Cu^{2+} iont és a koordinációs kötést kialakító poláris csoportokat egy síkba helyezzük, akkor a vizsgált vegyület visszamaradó része a sík alatt vagy sík felett helyezkedhet el. Ha a rögzített résszel azonos oldalon van az elválasztandó vegyület, akkor a *cisz* térhelyzetű, ha viszont ellentétes oldalon, akkor a *transz* térállású komplex jön létre. Azok a vegyületek, amelyek ilyen turner komplexeket képesek kialakítani, valószínűleg elválaszthatóak ligandumcserés állófázison.

2.3. Termodinamika a kromatográfiában

2.3.1. Kromatográfiás elválasztás hőmérsékletfüggése

Az eddigi tapasztalatok alapján két igen fontos hatása van a kromatográfiás egyensúllyra a hőmérsékletnek.

Az első hatás a szelektivitási tényező (α) változásában figyelhető meg. Ez a termodinamikai hatás; Chen illetve Zhu és mtsai. mutattak rá, hogy a szelektivitási tényező általában csökken a hőmérséklet emelésével [35,36]. 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 eluens összetétel 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.

A második hatás a mozgófázis viszkozitásának és ebből eredően a diffúziós állandónak a változása, amit kinetikai hatásnak nevezünk. 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 csökken, így a királis felismerés mértékének csökkenése erősen függ a királis eredő kölcsönhatás nagyságától. Problémát jelenthet a hőmérséklet emelésével járó állófázis és/vagy a vizsgált molekula bomlása, illetve nagyobb hőmérsékletek alkalmazásának korlátot szab adott áramlási sebesség mellett kialakuló nyomáson az eluens forráspontja, illetve az oszlop utáni nyomás kiegyenlítésből adódó forráspont csökkenés is [37].

2.3.2. Termodinamikai alapfogalmak

Az állandó nyomáson bekövetkező hőcsere a rendszer egy termodinamikai sajátosságával, a H entalpiával egyezik meg.

$$H = U + pV \quad (1)$$

ahol: U = rendszer belső energiája,

p = nyomás,

V = térfogat.

Standard entalpia-változásnak (ΔH°) nevezzük egy olyan folyamat entalpiaváltozását, amelyben a kiindulási anyagok és végtermékek egyaránt standardállapotban vannak.

Az entrópia a rendszer rendezetlenségi fokának mértéke, mely entrópia a spontán lejátszódó folyamatok során növekszik, ha a rendszer izolált. Statisztikus definíciója:

$$S = k \ln W \quad (2)$$

ahol: k = Boltzmann állandó,

W = azon módozatok száma, melyben a rendszer energiája megvalósulhat.

Termodinamikai definíciója:

$$\Delta S = q' / T' \quad (3)$$

ahol: q' = a rendszerrel közölt hő.

T' = az a hőmérséklet, amelyen a hőátmenet végbemegy.

A standard reakcióentrópia (ΔS°) a tiszta, különálló termékek és a kiindulási anyagok entrópiái közötti különbség, miközben valamennyi anyag standard állapotban van a megadott hőmérsékleten.

Helmholtz-függvény:

$$A = U - TS \quad (4)$$

ahol: A = szabadenergia,

U = belső energia,

T = abszolút hőmérséklet,

S = entrópia.

Gibbs-függvény:

$$G = H - TS \quad (5)$$

ahol: G = szabadentalpia,

H = entalpia,

T = abszolút hőmérséklet,

S = entrópia.

2.3.3. A van't Hoff egyenlet és 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:

$$RT \ln K = -\Delta G^\circ \quad (6)$$

Ismert a standard szabadentalpia változás definíciója a Gibbs függvény alapján:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (7)$$

ahol:

ΔH° = standard entalpiaváltozás,

ΔS° = standard entrópiaváltozás.

Ezt az előző egyenletbe helyettesítve kapjuk:

$$\ln K = -\left(\frac{\Delta H^\circ}{RT} - \frac{\Delta S^\circ}{R}\right) = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (8)$$

Az egyensúlyi állandó egyenlő a retenciós faktor (k) és a fázisarány (β) szorzatával:

$$K = k\beta = kV_M/V_S \quad (9)$$

A fázisarány számítása: egy kromatográfiás oszlop fázisaránya a mozgófázis térfogatának (V_M) és az állófázis térfogatának (V_S) aránya,

$$\beta = V_M/V_S \quad (10)$$

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

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

Ezen egyenlet szerint $\ln k$ -t $1/T$ függvényében ábrázolva egyenest kapunk, melynek meredeksége $-\Delta H^\circ/R$, tengelymetszete, pedig $\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$, ahol $\Phi = V_S/V_M$ (ha nem ismerjük az

$\ln \Phi$ tagot, akkor a tengelymetszet R -el szorzott értékét $\Delta S^* = R \Delta S^\circ + R \ln \Phi$ tagot használjuk).

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

$$\Delta G_2^\circ - \Delta G_1^\circ = \Delta(\Delta G^\circ). \quad (12)$$

A már ismert Gibbs-Helmholtz formulát

$$-\Delta G^\circ = RT \ln K \quad (13)$$

az előző egyenletbe behelyettesítve a következő összefüggéshez jutunk:

$$-\Delta(\Delta G^\circ) = RT \ln (k_2/k_1). \quad (14)$$

Az α elválasztási tényező a két enantiomer csúcs retenciók faktorának a hányadosa,

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (15)$$

a k_1 és a k_2 a két enantiomer retenciók faktora. Az elválasztási tényezőt behelyettesítve a 13. egyenletbe a következő kifejezést kapjuk:

$$-\Delta(\Delta G^\circ) = RT \ln \alpha. \quad (16)$$

Az előző pontban megismert van't Hoff egyenlet (11) felhasználásával $\ln \alpha$ egyszerűsítések után kifejezhető a következő formulával:

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta(\Delta H^\circ)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S^\circ)}{R} \quad (17)$$

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

Ha a vizsgált komponensünk molekuláit intermolekuláris erők tartják az állófázisban, itt kisebb az entrópiájuk, mint a mozgófázisban, ahol ezek az erők gyengébbek, tehát a molekulák mozgásszabadsága jóval nagyobb. Ebből következik, hogy ha a mintamolekula a mozgóból az állófázisba kerül, csökken az entrópia, tehát az entrópiaváltozás negatív. Ha az entalpiaváltozás ($-\Delta H^\circ$) nagy, ez azt jelenti, hogy a megoszlás túlnyomórészt intermolekuláris erők által irányított. Ha erős a kölcsönhatás a molekulák és az állófázis között, akkor a retenciók idők nagyok. Ebben az esetben a szabadentalpiában az entalpiatag a meghatározó, így ezt a megoszlást entalpia-vezéreltnek nevezzük. Ha az entrópiaváltozás (ΔS°) nagy, akkor a mintamolekula mozgási szabadsága az állófázisban korlátozottabb, mint a mozgófázisban. Így a

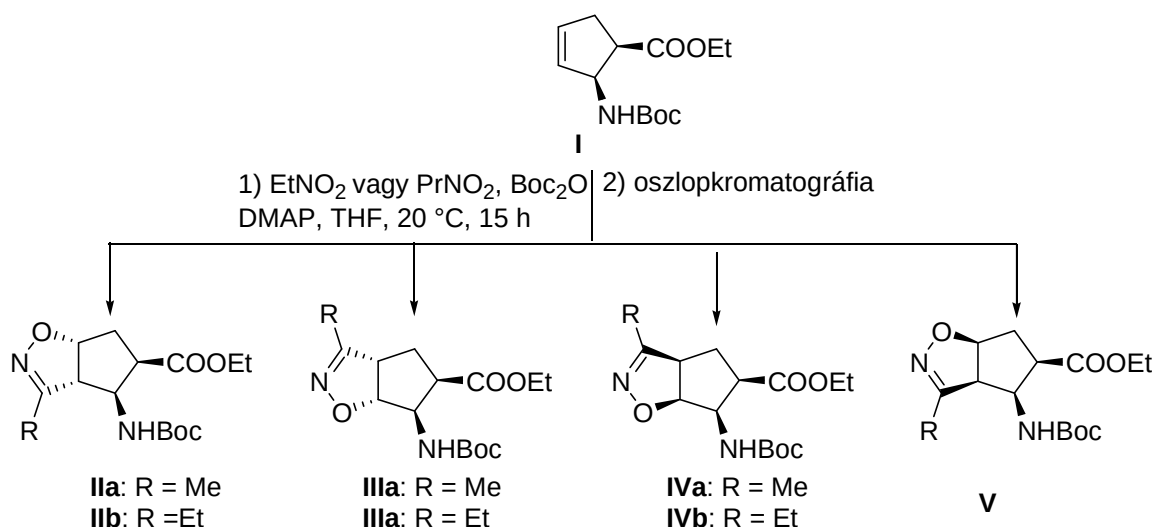
minta kevésbé jut át az állófázisba, csökken a retenció. Ez a megoszlás entrópia-vezérelt. Fizikai-kémiai szempontból a standard entalpiaváltozás különbség ($\Delta(\Delta H^\circ)$) ad felvilágosítást, hogy melyik a kedvezményezett folyamat, melyben a jobban kötődő enantiomer a mozgófázisból átlépve az állófázishoz kötődik. Negatívabb $\Delta(\Delta H^\circ)$ az enantiomer állófázissal való erősebb kölcsönhatására utal. A standard entrópiaváltozás különbség ($\Delta(\Delta S^\circ)$) a két enantiomer rendezettségének mértékében bekövetkező változást jellemzi az átmenet során.

2.4. Izoxazolin gyűrűt tartalmazó vegyületek előállításának és jelentőségének irodalmi összefoglalása

2.4.1. Izoxazolin gyűrűt tartalmazó vegyületek előállítása

Nitril-oxidok alkénekre történő 1,3-dipoláris cikloaddícióját széles körben alkalmazzák izoxazolin származékok szintézisére [38,39]. Instabilitásuknak köszönhetően a nitril-oxidokat általában *in situ* állítják elő a cikloaddíciós reakciókban. Generálásukra többféle módszer ismert a szakirodalomban, az egyik legismertebb a Huisgen módszer, ami hidroximoil kloridok bázis indukálta dehidrohalogénezése [40], valamint a Mukaiyama módszer, ami primer nitroalkánok dehidratációján alapszik [41].

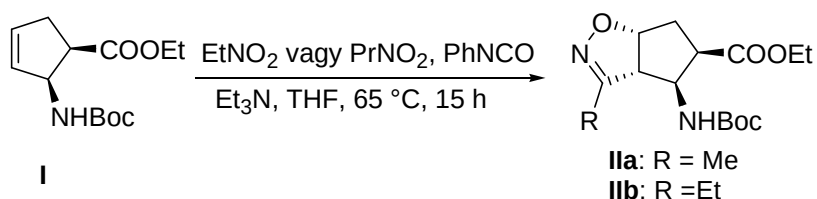
Az izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok regio- és sztereoizomerjeinek előállításával Kiss és mtsai [42,43] foglalkoztak. A heterociklusos vegyületeket **IIa,b**; **IIIa,b**; **IVa,b** a Boc védett etil-*cis*-2-aminociklopent-3-én karboxilátra (**I**) történő nitril-oxidok 1,3-dipoláris cikloaddíciójával állították elő. A nitril-oxidok generálását primer nitroalkánokból (EtNO₂, PrNO₂), *terc*-butoxikarbonil-anhidrid (Boc₂O) és 4-dimetilaminopiridin (DMAP) jelenlétében hajtották végre (Mukaiyama módszer, **4. ábra**).



4. ábra: Izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok szintézise

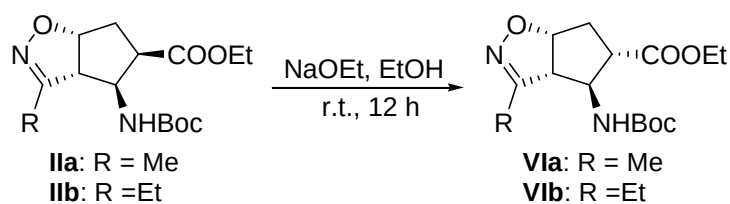
A reakciók során a lehetséges négy regio- és sztereoizomer közül csak három izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin származék **IIa,b**; **IIIa,b**; **IVa,b** képződött, melyeket oszlopkromatográfiás módszerrel választottak el egymástól, majd szerkezetüket XRD és 2D-NMR mérésekkel igazolták [42].

Az eljárás alacsony regio- és sztereoszelektivitása miatt más szintézismódszert alkalmaztak a ciszpentacin származékok előállítására. Az előbbieken leírt módszer a nitril-oxid generálására (nitroalkán, Boc_2O , DMAP) más vízelvonó szer alkalmazása mellett is ismert. Abban az esetben, amikor nitril-oxid előállítására Boc_2O helyett PhNCO -ot használtak vízelvonó szerként, a cikloaddíciós reakció a Boc védett etil-*cis*-2-aminociklopent-3-én karboxilátra (**I**) 100%-os szelektivitással egyetlen egy terméket **IIa,b** eredményezett (5. ábra) [43].



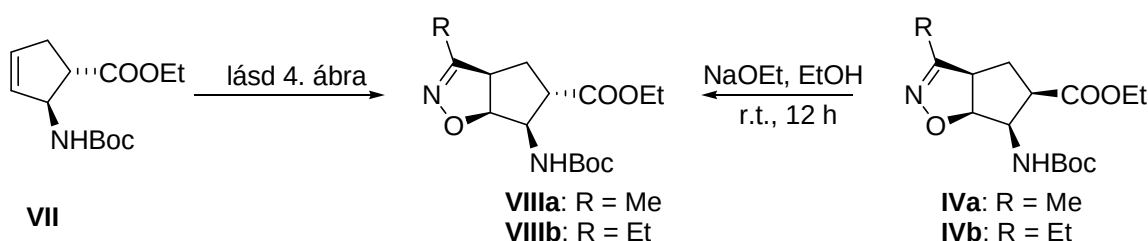
5. ábra: Izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok regio- és sztereoszelektív szintézise

A megfelelő transzpentacin származékokat **VIa,b** a cikloaddíciós főtermék **IIa,b** NaOEt-tal történő epimerizációjával állították elő EtOH oldószerben (6. ábra).



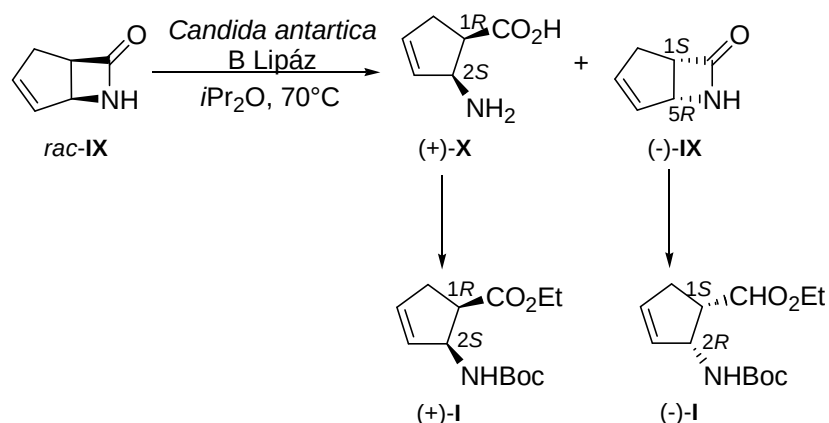
6. ábra: Transzpentin származékok szintézise

Az 1,3-dipoláris cikloaddíció az etil-*transz*-2-aminociklopent-3-én karboxilátra (**VII**) teljes regio- és sztereoselektivitással a **VIIIa,b** terméket eredményezte, amit a minor termék **IVa,b** NaOEt-os epimerizációjával is előállítottak (7. ábra) [43].



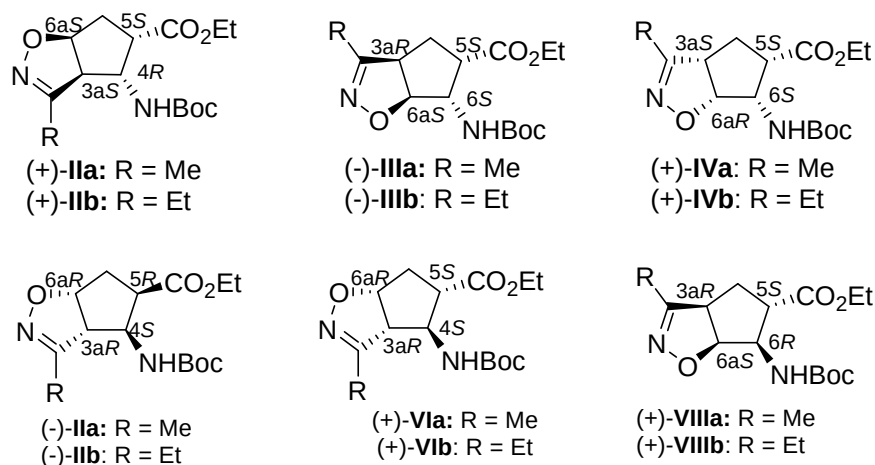
7. ábra: Transzpentin származékok szelektív szintézise

Az előállított ciszpentin és transzpentin származékokat (**II**, **III**, **IV**, **VI** és **VIII**) enantiomer tiszta formába is előállították (8. ábra). Az optikailag aktív kiindulási anyagokat [(+)-**I** és (-)-**I**] a racém β -laktám (**IX**) *Candida antarctica* B-Lipáz által katalizált enantioszelektív gyűrűnyitásával állították elő, majd az így kapott enantiomer tiszta vegyületeket továbbalakították a kívánt származékokká [(+)-**I** és (-)-**I**, 8. ábra).



8. ábra: Enantiomer tiszta (+)-I és (-)-I vegyületek szintézise

Az optikailag aktív, izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin és transzpentacin származékokat [(+)-**IIa,b**; (-)-**IIIa,b**; (+)-**IVa,b**; (-)-**IIa,b**; (+)-**VIa,b**; (+)-**VIIIa,b**] a racém vegyületeknél leírt reakció körülmények szerint állították elő (**4-7. ábra**) az enantiomer tiszta vegyületekből [(+)-**I** és (-)-**I**] kiindulva. (**9. ábra**) [42,43].



9. ábra: Enantiomer tiszta, izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin és transzpentacin származékok szintézise

Az általunk vizsgált anyagok a **II**, **III**, **VI** és **VIII** racém illetve optikailag aktív termékek savas hidrolíziséből származó β -aminosav származékok voltak. A hidrolízist, azaz a védőcsoportok (-Et és -Boc) eltávolítását HCl/H₂O 1:2 arányú keverékével valósították meg dioxánban [50].

2.4.2. Izoxazolin gyűrűt tartalmazó vegyületek biológiai jelentősége

Izoxazolin-vázat tartalmazó vegyületek évtizedek óta a figyelem középpontjában állnak, bizonyított biológiai hatásuknak (gyulladáscsökkentő, antibakteriális, antivirális, tumorelles) [44-48] köszönhetően. Emiatt jelentős szerepet töltenek be a gyógyszer- és agrokémiai iparban.

Rakesh és munkatársai 3,5-diszubsztituált, izoxazolin gyűrűt tartalmazó vegyületeket állítottak elő, és tanulmányozták TBC ellenes hatásukat [44]. A vizsgálatok során megállapították, hogy a C-3 helyzetben jelenlévő észter csoport növeli a vegyületek aktivitását

Izoxazolin vázat tartalmazó antranilsav-diamid származékok mérsékelt tumorelles hatását mutatta ki Shi és társai. [45].

Shah és munkatársai a fluortartalmú izoxazolin és pirazolin vegyületek biológiai aktivitásának különbözőségére alapozva fluor tartalmú izoxazolin származékokat állított elő, melyeknek antibakteriális hatását tanulmányozták *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negatív baktérium), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi A* (gram-pozitív baktérium) ellen. Eredményül azt kapták, hogy a különböző fluor tartalmú szubsztituenseket tartalmazó izoxazolin származékok eltérő antibakteriális hatást fejtenek ki a fentebb felsorolt baktériumok ellen [46].

A 3-(2-butil-4-kloro-1H-imidazolil)-5-szubsztituált- δ^2 -izoxazolin gyűrűt tartalmazó vegyületek gombaellenes hatását vizsgálta Sadashiva és munkatársai. A vegyületek aktivitását összehasonlították a gombaellenes hatásáról jól ismert nisztatinnal és az eredmények erős gombaölő hatást mutattak [47].

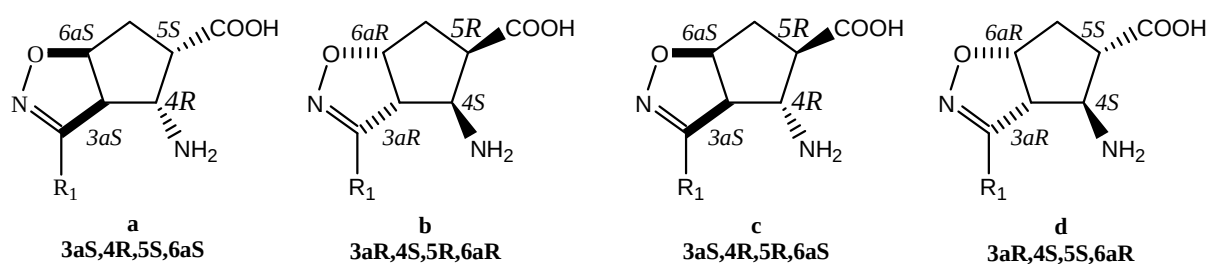
Kai és munkatársai olyan szubsztituált izoxazolin származékot állítottak elő (2-alkoxiimino-*N*-(5-*terc*-butil-2-isoxazolin-3-ilmetil)-acetamidok), mely rendkívül hatékony az emberi influenza A vírusa ellen [48].

Az előbbieken felsorolt néhány példa bizonyítéku szolgál az izoxazolin vázat tartalmazó vegyületek széleskörű biológiai alkalmazhatóságára. A biológiai aktivitás többnyire valamelyik enantiomerhez kötött, ami aláhúzza az enantiomer tisztaság ismeretének rendkívüli jelentőségét.

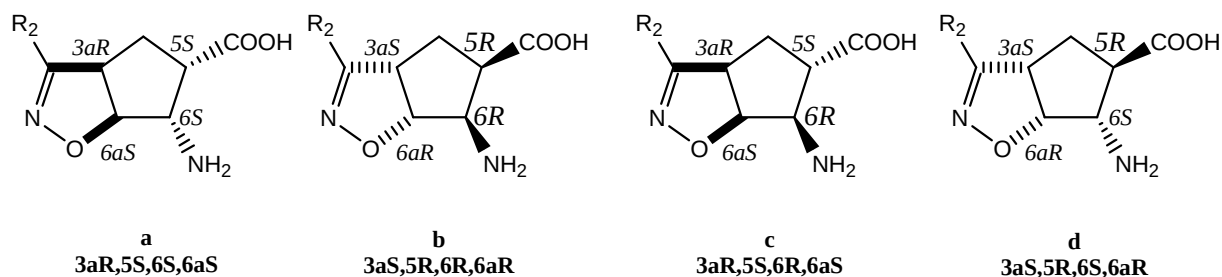
3. Kísérleti rész

3.1. A vizsgált izoxazolinok

A munkánk során izoxazolin gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán karbonsav analógokat vizsgáltunk [49,50], amelyeket a SZTE GYTK Gyógyszerkémiai Intézetében állítottak elő a fent leírtak alapján. Az általunk vizsgált nyolc modellvegyület közül az **1a-1d** és a **3a-3d** vegyületek metil-csoporttal, míg a **2a-2d** illetve **4a-4d** vegyületek etilcsoporttal szubsztituáltak (10. ábra).



R_1 : CH_3 - **1a-1d**
 C_2H_5 - **2a-2d**



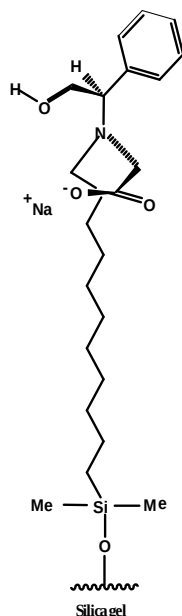
R_2 : CH_3 - **3a-3d**
 C_2H_5 - **4a-4d**

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

A vizsgált β -aminosavak IUPAC szerinti elnevezései a következők: **1a** (3a*S*,4*R*,5*S*,6a*S*)-4-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **1b** (3a*R*,4*S*,5*R*,6a*R*)-4-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **1c** (3a*S*,4*R*,5*R*,6a*S*)-4-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **1d** (3a*R*,4*S*,5*S*,6a*R*)-4-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **2a** (3a*S*,4*R*,5*S*,6a*S*)-4-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **2b** (3a*R*,4*S*,5*R*,6a*R*)-4-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **2c** (3a*S*,4*R*,5*R*,6a*S*)-4-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **2d** (3a*R*,4*S*,5*S*,6a*R*)-4-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **3a** (3a*R*,5*S*,6*S*,6a*S*)-6-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **3b** (3a*S*,5*R*,6*R*,6a*R*)-6-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **3c** (3a*R*,5*S*,6*R*,6a*S*)-6-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **3d** (3a*S*,5*R*,6*S*,6a*R*)-6-amino-3-metil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **4a** (3a*R*,5*S*,6*S*,6a*S*)-6-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **4b** (3a*S*,5*R*,6*R*,6a*R*)-6-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **4c** (3a*R*,5*S*,6*R*,6a*S*)-6-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav; **4d** (3a*S*,5*R*,6*S*,6a*R*)-6-amino-3-etil-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-ciklopenta[d]izoxazol-5-karbonsav.

3.2. Alkalmazott kolonna

Munkánk során Hyun által előállított kolonnát alkalmaztunk, melynek szerkezete a **11. ábrán** látható. A nátrium *N*-((*R*)-2-hidroxi-1-feniletíl)-*N*-undecilamino acetát szelektort Kromasil szilikagélre rögzítették a szerzők [51].



11. ábra: A kolonna szerkezete

3.3. Felhasznált anyagok

A mérésekhez használt HPLC tisztaságú oldószerek, metanol (MeOH), etanol (EtOH), *n*-propanol (PrOH), és propán-2-ol (2-PrOH) Scharlau (Sentmenat, Spanyolország) gyártmányúak voltak. A Cu^{2+} -sók, úgymint $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ és CuSO_4 Sigma-Aldrich (Steinheim, Németország) készítmények voltak. A mozgófázis készítéséhez Milli-Q vizet használtunk (Millipore, Molsheim, Franciaország).

3.4. Alkalmazott berendezések

A méréseink során Merck-Hitachi L-6000 Pump (Tokió, Japán) HPLC pumpát, Shimadzu SPD-6AV UV-VIS Spectrophotometric Detector (Tokió, Japán) detektort, Cole Parmer POLYSTAT[®] Refrigerated Circulator (Cole Parmer, Chicago, USA) folyadék termosztátot alkalmaztunk, valamint Borwin 1.21. (Prága, Csehország) adatgyűjtő programot használtunk.

3.5. Kromatográfiás összefüggések

A kromatográfiás adatok számítására az alábbi összefüggéseket használtuk:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}; \quad \alpha = \frac{k_2}{k_1}; \quad R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_1 + W_2} \cdot 2;$$

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

4. Célkitűzés

Munkánk során célul tűztük ki, az SZTE GYTK Gyógyszerkémiai Intézetében előállított izoxazolin gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán karbonsav analógok sztereoizomerjeinek folyadékkromatográfiás elválasztását királis ligandumcserés kolonnán.

Tanulmányozni kívántuk, hogy az eluensösszetétel, a hőmérséklet, a Cu^{2+} só mennyiségi és minőségi változtatása milyen hatást gyakorol a kromatográfiás elválasztást jellemző paraméterekre, úgymint a retenciós faktorra, szelektivitásra és felbontásra. Továbbá megállapítottuk az egyes enantiomerek elúciós sorrendjét is.

Célunk volt, hogy a kromatográfiában használatos van't Hoff egyenletek segítségével termodinamikai adatokat határozzunk meg, melyből következtetéseket vontunk le az elválasztás mechanizmusát illetően.

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1. Az eluensösszetétel hatása a kromatográfiás paraméterekre

Az izoxazolin gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán karbonsav analógokat különböző eluensösszetétel mellett kíséreltük meg elválasztani ligandumcserés oszlopon. Az eluensösszetételt **a**, H₂O/MeOH és **b**, H₂O/EtOH = (95/5, 85/15, 70/30 és 50/50 v/v) + 0,2 mM Cu(ClO₄)₂ arányban változtattuk. A kromatográfiás elválasztás során kapott eredményeket az **1. Táblázatban** foglaltuk össze. A könnyebb áttekinthetőség végett csak az **1a-1d** és **4a-4d** vegyületek esetén ismertetjük az összes eluensösszetételt, a többi komponensre az alkohol mennyiségének változtatása hasonló tendenciát mutatott. Látható, hogy a retenciós faktor erősen függ az eluens alkoholtartalmától. A MeOH és EtOH térfogatarányának növekedésével a retenciós faktor értékei minimum jellegű görbét írtak le. A minimum pont utáni növekedés azzal magyarázható, hogy a poláris, vízben jobban oldódó aminosavak a szerves fázis (MeOH és EtOH) térfogatarányának növekedésével kisebb mértékben vannak szolvatálva, így jobban kötődnek az állófázishoz, ezzel a visszatartás növekszik. A minimum előtti szakasz a hidrofób szakasz, ahol az állófázis és a vegyület között kialakuló hidrofób-hidrofób kölcsönhatások uralkodnak és növelik a retenciót a nagy víztartalmú eluensben.

EtOH alkalmazása esetén nagyobb retenciós faktort kaptunk, mint MeOH alkalmazásakor. Ez annak tulajdonítható, hogy a szénlánc növekedésével az oldószer apolárisabb jellegűvé válik ezért a poláris aminosav szívesebben tartózkodik az állófázisban, a retenció nő.

Az eluensösszetétel változtatása nemcsak a retenciós faktort befolyásolhatja, hanem a szelektivitást és a felbontást is. A *cisz* (**1a,1b; 2a,2b; 3a,3b és 4a,4b**) vegyületeknél mindkét alkohol alkalmazása esetén a szerves rész növekedésével a mozgófázisban nőtt a szelektivitás és a felbontás. A *transz* (**1c,1d; 2c,2d; 3c,3d és 4c,4d**) enantiomerpárok esetében a felbontás és a szelektivitás változására általánosan érvényes következtetés nem volt levonható.

1. Táblázat

Kromatográfiás paraméterek: retenciós faktor (k_1), szelektivitási tényező (α), felbontás (R_s) értékek és elúciós sorrend az izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin analógok közvetlen elválasztása során ligandumcserés kolonnán **a**, MeOH és **b**, EtOH tartalmú mozgófázisban

Minta	Mozgófázis H ₂ O/alkohol (v/v)+0,2 mM Cu(II)	k_1	k_2	α	R_s	Elúciós sorrend
1a,1b	95/5, a	12,17	13,02	1,07	0,40	-
	85/15, a	2,15	2,37	1,10	0,15	-
	70/30, a	2,75	3,79	1,38	1,60	$b < a$
	50/50, a	4,74	7,92	1,67	2,60	$b < a$
	95/5, b	11,97	12,45	1,04	0,20	-
	85/15, b	4,00	4,48	1,12	1,75	$b < a$
	70/30, b	4,50	6,44	1,43	1,80	$b < a$
	50/50, b	7,93	13,88	1,75	2,60	$b < a$
1c,1d	95/5, a	16,64	16,64	1,00	0,00	-
	85/15, a	3,72	3,72	1,00	0,00	-
	70/30, a	4,15	4,52	1,09	0,20	-
	50/50, a	6,54	7,72	1,18	0,80	$c < d$
	95/5, b	15,10	15,10	1,00	0,00	-
	85/15, b	6,43	6,43	1,00	0,00	-
	70/30, b	5,98	6,52	1,09	0,20	-
	50/50, b	12,55	14,56	1,16	0,90	$c < d$
2a,2b	85/15, a	2,76	2,76	1,00	0,00	-
	50/50, a	5,86	8,85	1,51	2,30	$b < a$
	85/15, b	5,12	5,12	1,00	0,00	-
	50/50, b	8,90	13,71	1,54	2,25	$b < a$
2c,2d	85/15, a	4,66	5,22	1,12	0,25	-
	50/50, a	8,84	9,11	1,03	0,20	-
	85/15, b	7,99	9,11	1,14	1,00	$c < d$
	50/50, b	9,55	15,85	1,66	2,80	$c < d$
3a,3b	85/15, a	3,23	3,59	1,11	0,25	-
	50/50, a	7,50	11,48	1,53	2,55	$b < a$
	85/15, b	6,08	6,75	1,11	0,50	$b < a$
	50/50, b	11,32	16,53	1,46	2,20	$b < a$
3c,3d	85/15, a	4,65	8,23	1,77	2,40	$c < d$
	50/50, a	8,62	12,15	1,41	1,85	$c < d$
	85/15, b	7,14	12,92	1,81	3,55	$c < d$
	50/50, b	13,95	17,72	1,27	1,45	$c < d$

1. Táblázat folytatása:

Minta	Mozgófázis H ₂ O/alkohol (v/v)+0,2 mM Cu(II)	k_1	k_2	α	R_s	Elúciós sorrend
4a,4b	95/5, a	20,80	23,50	1,13	1,00	$b < a$
	85/15, a	4,27	4,91	1,15	0,45	$b < a$
	70/30, a	5,15	6,85	1,33	1,65	$b < a$
	50/50, a	8,15	12,88	1,58	3,23	$b < a$
	95/5, b	19,32	21,09	1,09	0,18	$b < a$
	85/15, b	7,33	8,50	1,16	0,75	$b < a$
	70/30, b	9,88	13,63	1,38	1,65	$b < a$
	50/50, b	11,28	17,15	1,52	2,10	$b < a$
4c,4d	95/5, a	20,28	38,73	1,91	3,90	$c < d$
	85/15, a	5,72	11,15	1,95	3,10	$c < d$
	70/30, a	6,64	11,95	1,80	2,95	$c < d$
	50/50, a	9,59	15,25	1,59	1,95	$c < d$
	95/5, b	13,52	26,80	1,98	2,50	$c < d$
	85/15, b	20,80	23,50	1,13	1,00	$b < a$
	70/30, b	4,27	4,91	1,15	0,45	$b < a$
	50/50, b	5,15	6,85	1,33	1,65	$b < a$

Kromatográfiás körülmények: kolonna: ligandumcserés kolonna; mozgó fázis: **a**, H₂O/MeOH és **b**, H₂O/EtOH = (95/5, 85/15, 70/30 és 50/50 v/v) + 0,2 mM Cu(ClO₄)₂; áramlási sebesség: 0,8 ml perc⁻¹; detektálás: 230 nm.

A **2c,2d** minta esetében a különböző alkoholok használata ellentétes hatású volt. MeOH tartalmú eluensben a szelektivitás és a felbontás csökkent, viszont EtOH tartalmú eluensben nőtt. A jelenség magyarázata nem tisztázott, valószínűleg az eltérő solvatációs viszonyoknak tulajdonítható.

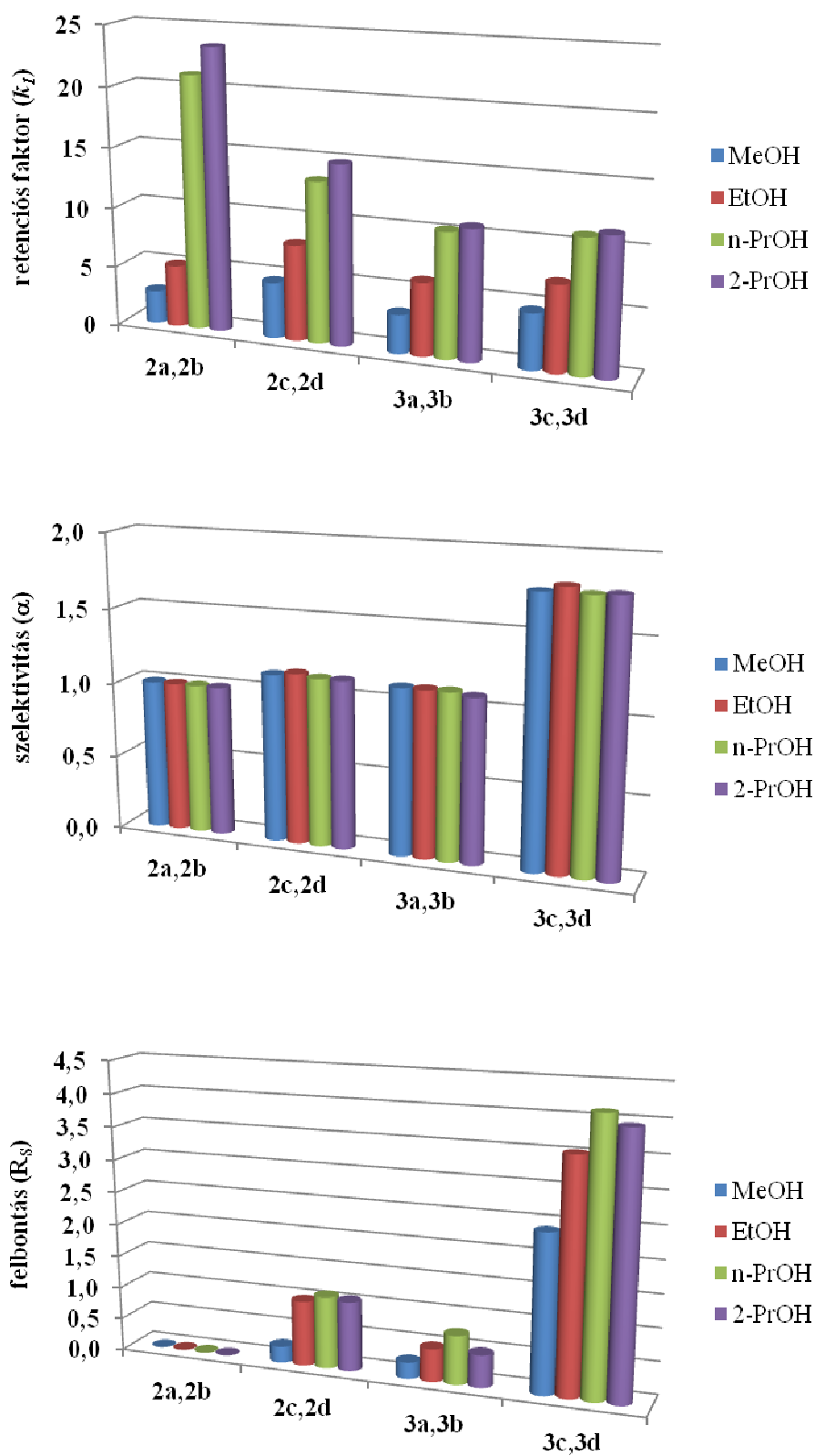
Az azonosítás enantiomer tiszta referenciaanyagok felhasználásával történt. Megállapítottuk, hogy a különböző *cis* és *transz* enantiomerek elúciós sorrendje külön-külön megegyezik.

5.2. Az alkohol minőségének hatása az elválasztásra

A **2a,2b**; **2c,2d** és **3a,3b**; **3c,3d** vegyületek esetén vizsgáltuk a kromatográfiás adatok alkohol minőségétől való függését. A vizsgálatokat H₂O/alkohol (85/15 v/v) + 0,2 mM Cu(ClO₄)₂ eluensösszetétel mellett végeztük. Az eredményeket a **12. ábrán** mutatjuk be.

Tapasztalatunk szerint az alkohol minősége jelentős hatással van a retencióra. Az elsőként eluálódó komponens retenciós faktora (k_1) nőtt az alkohol szénlánc hosszának növekedésével mind a négy enantiomerpár esetén (**12. ábra**). Ha az alkoholban a hidroxilcsoport láncközi C-atomhoz kapcsolódott, még tovább növekedett a visszatartás. Ez azzal magyarázható, hogy az alkoholok C-atomszámának növekedésével és a funkciós csoportok helyzetének függvényében az alkoholok apoláris jellege is növekszik: MeOH < EtOH < *n*-PrOH < 2-PrOH sorban. A növekvő szénatomszám (apolaritás) kedvezőtlen az aminosav (poláris jelleg) és az apoláris mozgófázis közötti kölcsönhatások kialakításához, így nő a retenció.

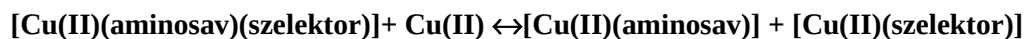
A nagyobb C-atomszámú alkoholok alkalmazásakor közel azonos enantioszelektivitást (**12. ábra**) figyelhettünk meg az egyes enantiomerek elválasztásánál. A felbontás viszont a **2a,2b** enantiomerpár kivételével növekedett az alkohol C-atomszámának növekedésével. A legnagyobb felbontás növekedés a **3c,3d** esetén figyeltük meg, mikor a metanolt propanollal helyettesítettük.



12. ábra: Az alkoholok minőségének hatása a kromatográfiás paraméterekre

5.3. A Cu(II) só változtatásának hatása az elválasztásra

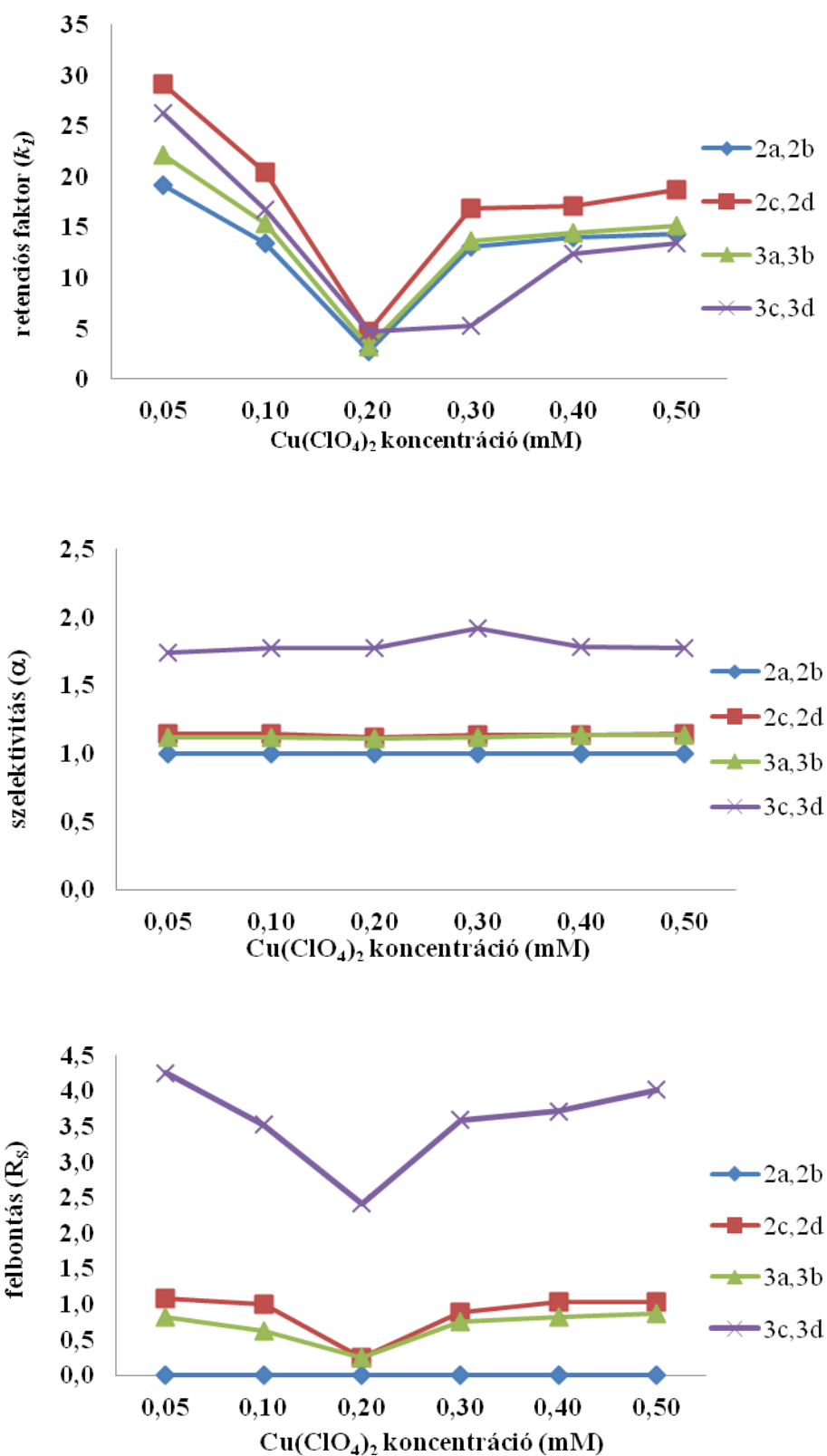
Az ionkoncentráció változása több szinten is hat az elválasztásra. Elsőként fontos megemlíteni, hogy Hyun és munkatársai a következő egyensúly jelenlétét feltételezik az elválasztás folyamatában [51]:



Az egyenlet alapján láthatjuk, hogy a Cu^{2+} -ion koncentrációjának növekedésével az egyensúly a felső nyíl irányába tolódik el, a Cu^{2+} koncentráció növelése az állófázis felületén kialakult komplexet megbontja, azaz a retencióban csökkenést tapasztalunk.

A Cu^{2+} -ion koncentráció mennyiségi hatását 0,05-0,5 mM $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ koncentráció tartományban vizsgáltuk a **2a,2b**; **2c,2d** illetve **3a,3b**; **3c,3d** vegyületepárok esetén. A vizsgálatot $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = (85/15 \text{ v/v})$ eluensösszetétel mellett végeztük. Azt tapasztaltuk, hogy a retenciós faktor a $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ koncentrációjának a növekedésével minimum jellegű görbe mentén változott és 0,3 mM koncentrációtól telítési szakaszba ment át mind a négy enantiomerpár esetében (**13. ábra**). Ezzel párhuzamban a szelektivitás alig változott, míg a felbontás a **2c,2d**; **3a,3b** és **3c,3d** enantiomerpárok esetén szintén minimum jellegű görbét írt le (**2a,2b** vegyületepár, ilyen eluensösszetétel esetén nem volt elválasztható).

0,2 mM Cu^{2+} koncentráció felett a retenciós faktor növelésére egyértelmű válasz nem adható. A perklorát anionok részt vehetnek a komplex kialakításában, és ennek stabilitása szintén befolyásolja a visszatartást. A só koncentrációjának növekedésével a negatív töltésű ionok mennyisége is, és egyben az ionerősség is növekszik. Ezen hatások eredőjeként alakulhat ki a kísérletileg tapasztalt viselkedés.

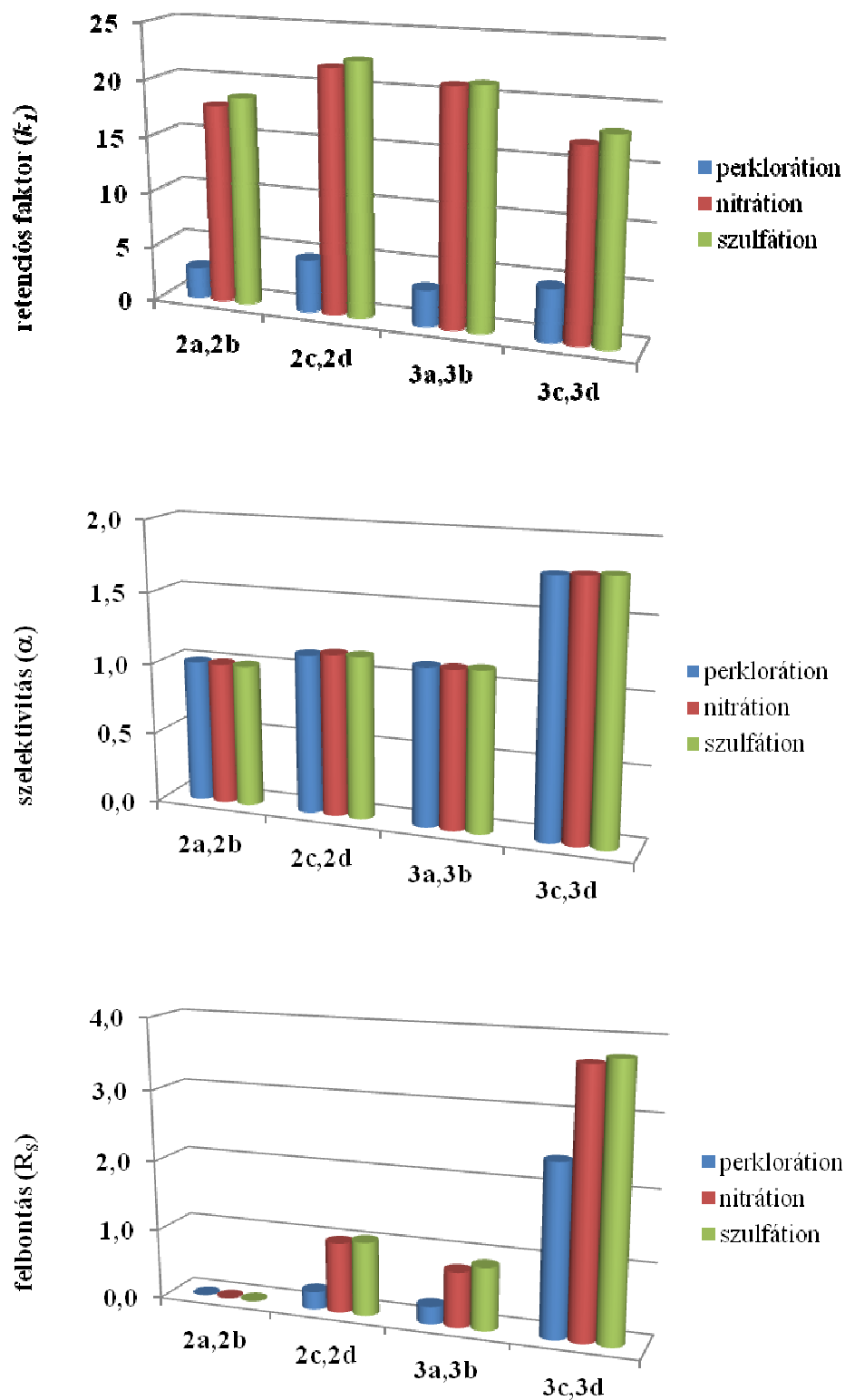


13. ábra: A $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ koncentráció változtatásának hatása a kromatográfiai paraméterekre

Vizsgáltuk a Cu^{2+} só mennyiségének változtatásán túl az anionok anyagiminőségének a hatását is az elválasztásra. A **2a,2b**; **2c,2d** illetve **3a,3b**; **3c,3d** enantiomerpárok esetén $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = (85/15 \text{ v/v})$ eluensösszetétel mellett Cu(II) -perklorát, -nitrát és -szulfát jelenlétében végeztük az enantiomerek elválasztását. A kapott eredményeket **14. ábrán** mutatjuk be. Tapasztalatunk szerint a nitrát- és a szulfátion használata a retenciót nagymértékben megnövelte, viszont a szelektivitás az egyes enantiomerpároknál alig változott. A felbontás mind a **2c,2d**, a **3a,3b** és a **3c,3d** esetében jelentősen növekedett, míg a **2a,2b** ilyen körülmények mellett nem volt elválasztható. Az anionok komplexképző sajátsága $\text{ClO}_4^- < \text{NO}_3^- < \text{SO}_4^{2-}$ sorban növekszik. Valószínűleg a nitrát- és szulfátionok jelenlétében stabilabb komplex jön létre, ami a retenció növekedéséhez vezet. A két enantiomerre nézve a komplex stabilitása valószínűleg nem nagyon különbözik, és ez okozhatja, hogy a perklorátionokhoz képest a szelektivitás alig változik.

5.4. Szerkezet-retenció összefüggés vizsgálata

Az aminosavak kémiai szerkezete befolyásolja a királis felismerést. Egy adott eluensösszetételnél, fordított fázisú kromatográfia esetén az etil-szubsztituált analógok a legtöbb esetben erősebb kölcsönhatásba lépnek az állófázissal, mint a metil-szubsztituáltak, ami kissé nagyobb retenciós faktort eredményez (**1. és 2. Táblázat**). Azonban az erősebb kölcsönhatás csak ritkán vezet nagyobb α és R_S értékekhez, jelezve, hogy a kölcsönhatások a két enantiomerre nézve alig különböznek. Sztérikus hatáson keresztül a metil- és etil-szubsztitúció helyzete befolyásolja α és R_S értékét is. Általánosan a **3a-3d** és **4a-4d** vegyületek nagyobb enantioszelektivitást tapasztaltunk, mint az **1a-1d** és **2a-2d** enantiomerpárok esetén. A legtöbb esetben a *transz* (**c,d**) izomerek enantioszelektivitása jobb volt, mint a *cisz* (**a,b**) izomereké.



14. ábra: A Cu^{2+} só hatása kromatográfiás paraméterekre

5.5. A hőmérsékletváltozás hatása a kromatográfiás elválasztásra

A hőmérséklet kromatográfiás paraméterekre gyakorolt hatását ligandumcserés kolonnán mind a nyolc modellvegyület esetén megvizsgáltuk 5-45 °C hőmérséklettartományban. Az eredményeket a **2. Táblázatban** mutatjuk be.

Adott eluens összetételnél, H₂O/MeOH = (85/15 v/v) + 0,2 mM Cu(ClO₄)₂ a hőmérséklet növekedésével minden vizsgált mintánál csökkent a retenciós faktor. Ez azzal magyarázható, hogy magasabb hőmérsékleten a rendszer belső energiája is nagyobb lesz, ezáltal a vegyületek hőmozgása növekszik, így könnyebben legyőzik az állófázissal kialakított kölcsönhatásokat. A szelektivitás illetve felbontás a hőmérséklet emelkedésével az egyes enantiomerpároknál különböző jelleget mutatott. Az **1a,1b** enantiomerpár esetében az α és az R_S csökkent a hőmérséklet emelkedésével (az **1c,1d** vegyület nem volt elválasztható). A **2a,2b**, **3a,3b** illetve **4a,4b** vegyület pároknál mind az α és az R_S nőtt a hőmérséklet emelkedésével, ezzel szemben a **3c,3d** és **4c,4d** esetén az α csökkent, míg a R_S nőtt (**2. Táblázat**). Az egyes vegyületepárok eltérő viselkedése miatt a kromatográfiás adatokból termodinamikai adatokat számoltunk, a különböző viselkedési módok felderítése céljából.

2. Táblázat

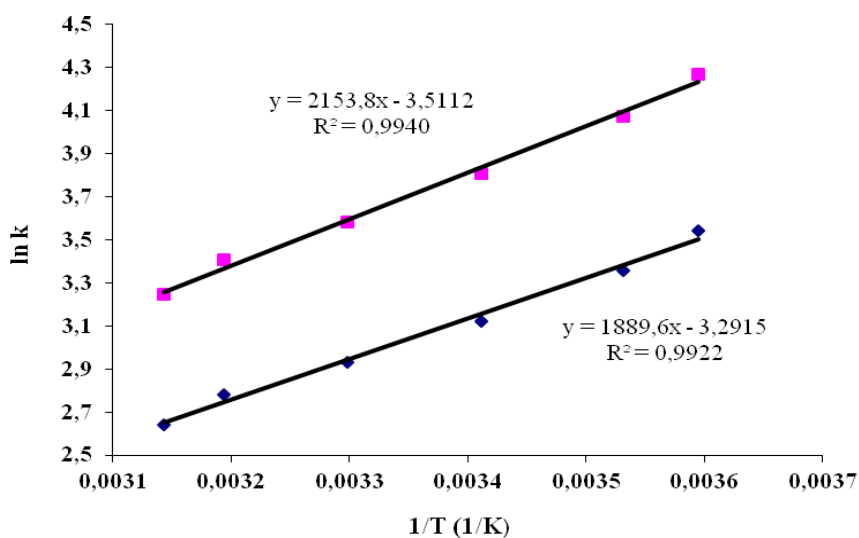
Az elsőként eluálódó enantiomer retenciós faktora (k_I), az elválasztási tényező (α) és a felbontás (R_S) változása izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin analógok esetén különböző hőmérsékleteken

Minta	k_I, α, R_S	Hőmérséklet (°C)					
		5	10	20	30	40	45
1a,1b	k_I	21,79	17,77	13,34	10,67	8,11	9,33
	α	1,11	1,10	1,08	1,07	1,06	1,00
	R_S	0,54	0,47	0,42	0,41	0,39	0,00
1c,1d	k_I	25,87	23,28	18,90	15,14	12,70	12,28
	α	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	R_S	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2a,2b	k_I	26,90	24,85	19,01	15,53	12,51	10,71
	α	1,00	1,00	1,07	1,09	1,11	1,11
	R_S	0,00	0,00	0,33	0,71	0,95	0,96
2c,2d	k_I	27,60	25,25	21,52	17,99	15,30	14,15
	α	1,21	1,20	1,18	1,16	1,14	1,13
	R_S	0,77	0,78	0,79	0,77	0,75	0,70
3a,3b	k_I	34,58	30,10	22,81	17,64	13,60	11,84
	α	1,00	1,06	1,08	1,08	1,09	1,10
	R_S	0,00	0,24	0,34	0,62	0,75	0,80
3c,3d	k_I	23,92	24,15	18,96	15,95	12,74	11,15
	α	2,01	1,83	1,86	1,77	1,73	1,70
	R_S	1,70	2,61	1,93	3,16	4,37	3,57
4a,4b	k_I	44,41	35,96	26,46	19,30	14,73	14,70
	α	1,00	1,11	1,12	1,13	1,14	1,14
	R_S	0,00	0,44	0,66	0,98	1,05	1,19
4c,4d	k_I	27,93	23,73	22,64	18,78	16,10	13,90
	α	2,08	2,05	2,01	1,91	1,88	1,87
	R_S	1,90	2,38	3,74	3,87	5,27	5,10

Kromatográfiás körülmények: kolonna: ligandumcserés oszlop; mozgó fázis: H₂O/MeOH = (85/15 v/v) + 0,2 mM Cu(ClO₄)₂; áramlási sebesség: 0,8 ml perc⁻¹; detektálás: 230 nm.

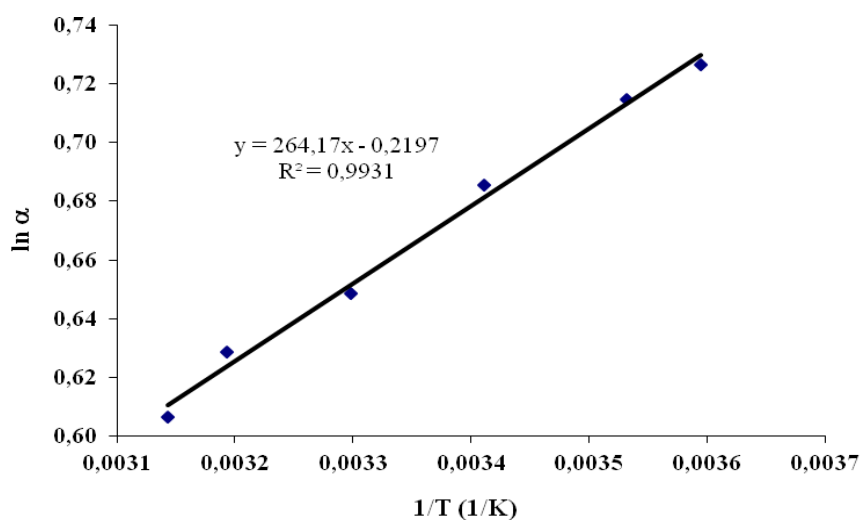
Ehhez a van't Hoff egyenlet segítségével grafikus úton meghatároztuk a termodinamikai paramétereket, úgymint standard entalpia, standard entrópia és standard szabadentalpia változás értékei. Az $\ln k - 1/T$ függvény meredeksége a standard entalpiaváltozás ($-\Delta H^\circ/R$), míg a tengelymetszetük a standard entrópiaváltozás ($\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$) értékét adja. A pontos ΔS° meghatározásához szükséges a $\Phi = V_S/V_M$, a fázis arány reciprokanak ismerete. Ennek hiányában a $\Delta S^\circ + R \ln \Phi$ értékek egymáshoz viszonyított nagyságát vehetjük figyelembe (15.

14. ábra). A $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$, értékeket a (16) egyenlet segítségével határoztuk meg, az $\ln \alpha - 1/T$ függvény ábrázolásával (**16. ábra**).



15. ábra: A **4c,4d** enantiomerek $\ln k$ értékei az $1/T$ függvényében

Kolonna: ligandumcserés oszlop; **Eluensösszetétel:** $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}=(85/15 \text{ v/v}) + 0,2 \text{ mM}$ $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$; **Áramlási sebesség:** 0,8 ml/perc; **Detektálás** 230 nm



16. ábra: A **4c,4d** enantiomerjeinek $\ln \alpha$ értékei az $1/T$ függvényében

Kolonna: ligandumcserés oszlop; **Eluensösszetétel:** $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}=(85/15 \text{ v/v}) + 0,2 \text{ mM}$ $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$; **Áramlási sebesség:** 0,8 ml/perc; **Detektálás:** 230 nm

1. Táblázat

Termodinamikai paraméterek, ΔH° , ΔS° , $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$, $\Delta(\Delta G^\circ)$, korrelációs koefficiens (R^2) és T_{iso} hőmérséklet értékei ligandumcserés kolonnán

Minta	Enantio- mer	$-\Delta H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta S^\circ$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	Korr. Koeff. (R^2)	$-\Delta(\Delta H^\circ)$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta(\Delta S^\circ)$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$-\Delta(\Delta G^\circ)_{298K}$ (kJ mol ⁻¹)	T_{iso} (°C)
1a,1b	1	19,9	46,0	0,9963	0,9	2,4	0,2	102
	2	20,7	48,4	0,9965				
1c,1d	1	14,2	24,0	0,9964	0,00	0,00	0,00	-
	2	14,2	24,0					
2a,2b	1	16,8	32,8	0,9952	-1,4	-5,4	0,2	5
	2	14,6	25,0	0,9921				
2c,2d	1	12,3	16,6	0,999	1,3	3,0	0,4	„155”
	2	13,6	19,6	0,9988				
3a,3b	1	19,6	40,9	0,9992	-0,7	-2,9	0,2	-8
	2	18,3	36,1	0,9959				
3c,3d	1	15,7	28,9	0,9954	1,4	<0,1	1,4	„522”
	2	18,0	31,9	0,9962				
4a,4b	1	19,6	39,2	0,9953	-0,4	-2,4	0,3	-15
	2	17,9	32,8	0,9979				
4c,4d	1	15,7	27,4	0,9922	2,2	1,8	1,7	„928”
	2	17,9	29,2	0,9940				

Kolonna: ligandumcserés oszlop; mozgófázis: H₂O/MeOH=(85/15 v/v) + 0,2 mM Cu(ClO₄)₂; (1) és (2), elsőként és másodikként eluálódó enantiomer; áramlási sebesség: 0,8 ml perc⁻¹; detektálás: 230 nm; $\Delta S^\circ = \Delta S^\circ + R \ln \Phi$ ahol Φ a fázisarány reciproka; R^2 , $\ln k - 1/T$ függvény korrelációs koefficiense.

A hőmérsékletfüggésből számolt termodinamikai adatokat a **3. Táblázatban** foglaltuk össze.

Az ΔH° és ΔS° ($\Delta S^\circ = \Delta S^\circ + R \ln \Phi$) értékek minden vegyületepárnál negatívnak adódtak. Általánosan elfogadott, hogy mindkét enantiomer ugyanazon nem-sztereospecifikus kölcsönhatásban vesz részt, míg a másodikként eluálódó enantiomer további sztereospecifikus kölcsönhatás résztvevője.

Az **1a,1b**; **2c,2d**; **3c,3d** és **4c,4d** enantiomerpárok közül az először eluálódott enantiomerek ΔH° és ΔS° értékei kevésbé voltak negatívak, ugyanakkor a **2a,2b**; **3a,3b** és **4a,4b** vegyületepároknál az elsőként eluálódott enantiomerre kaptunk negatívabb értékeket. A **3. Táblázat** adatai alapján ahol a ΔH° értékei negatívabbak egy oszlopsoron belül, azt jelenti, hogy ezen komponens kölcsönhatása az állófázissal energetikailag kedvezőbb. Abszolút értékekben minél nagyobbak ezek az értékek, annál stabilabb a kialakuló állófázis-enantiomer komplex, ami nagyobb mértékben növeli a rendezettséget is (ΔS°). Ha az enantiomerpárok esetében elemezzük a kapott adatokat a $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = (85/15 \text{ v/v}) + 0,2 \text{ mM Cu}(\text{ClO}_4)_2$ eluensösszetétel mellett, megfigyelhető, hogy a $-\Delta H^\circ$ értékek 12-21 kJ/mol tartományba estek. A legnagyobb $-\Delta H^\circ$ értékét az **1a,1b**; **3a,3b** és **4a,4b** vegyületekre kaptuk, míg a legkisebbet a **2c,2d** enantiomerpárra. A negatív standard entrópia a rendezettség növekedésére utal, tehát a molekula több ponton kötődik az állófázishoz, az enantiomer jóval stabilabb átmeneti komplexet képez az állófázissal, mozgásában és forgásában erősebben korlátozott. Nagyobb negatív ΔS° értéke az **1a,1b**; **3a,3b** és **4a,4b** enantiomerpároknak volt, míg a legkisebb negatív értéket pedig a **2c,2d** enantiomerpár esetén tapasztaltunk.

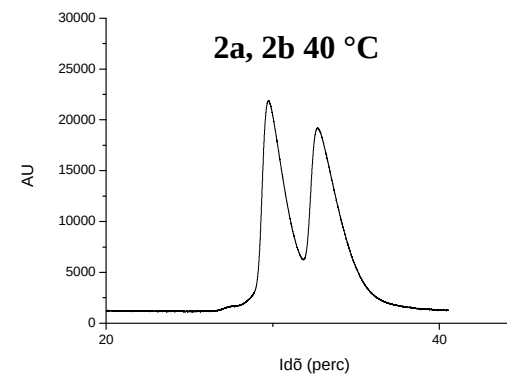
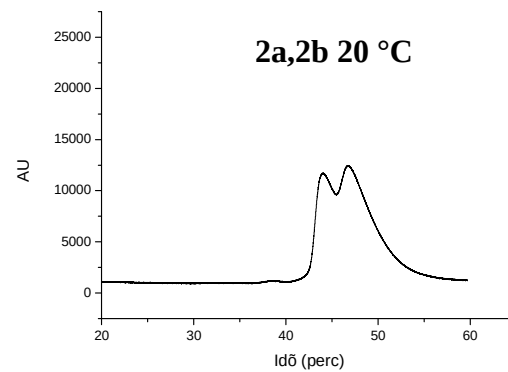
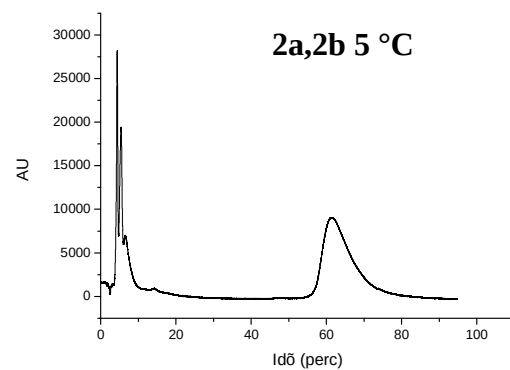
A $\Delta(\Delta H^\circ)$, $\Delta(\Delta S^\circ)$ és $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékek az elválasztás során a sztereoizomer pároknál fellépő kölcsönhatások különbségéből adódtak. A $\Delta(\Delta H^\circ)$ és a $\Delta(\Delta S^\circ)$ mind pozitív mind negatív értéket mutatott. Ha a $\Delta(\Delta H^\circ)$ és a $\Delta(\Delta S^\circ)$ értéke negatív, az elválasztás entalpiavezérelt, mint az a legtöbb esetben előfordul. A másodikként eluálódó enantiomer erősebb kölcsönhatást alakít ki az állófázissal, mint az elsőként eluálódó, melyhez egy kedvezőtlen (negatív) entrópia-tag járul. A szelektivitási tényező ebben az esetben csökken a hőmérséklet emelésével. Ha az elválasztás entrópiavezérelt, a szelektivitási tényező növekszik a hőmérséklet emelésével és a kolonna hatékonysága ezzel együtt nő. Ez a két hatás teszi az entrópiavezérelt elválasztásokat különlegessé. Erre példát a **17. ábrán** mutatunk be.

A $\Delta(\Delta H^\circ)$ értékei a vizsgált vegyületek esetén -2,2 – 1,4 kJ/mol tartományban változtak. A **4c,4d** az állófázissal kialakított kölcsönhatás során legnagyobb negatív $\Delta(\Delta H^\circ)$ értéket eredményezett, míg a legpozitívabb értéket a **2a,2b** esetén kaptuk. A $\Delta(\Delta S^\circ)$ értékei -2,4 – 5,4 J mol⁻¹ K⁻¹ tartományba estek, a számolt eredmények alapján a legnagyobb pozitív értéket

2a,2b enantiomerpárra kaptuk, míg a legnagyobb negatív $\Delta(\Delta S^\circ)$ értéket a **2c,2d** vegyületepárra adódott. A **3. Táblázatban** szereplő adatok alapján látható, hogy $\Delta(\Delta H^\circ)$ és a $\Delta(\Delta S^\circ)$ értékek a *cisz* vegyületek (**2a,2b**; **3a,3b**; **4a,4b**) esetében pozitívak lettek, ebből következően ezekben az esetekben az elválasztás entrópiavezérelt. A *transz* vegyületek (**2c,2d**; **3c,3d**; **4c,4d**) és egy *cisz* vegyület (**1a,1b**) $\Delta(\Delta H^\circ)$ és a $\Delta(\Delta S^\circ)$ értékei negatívnak adódtak, ezekben az esetekben az elválasztás entalpiavezérelt. Az entrópiavezérelt enantiomer elválasztásnak a nagyobb hőmérséklet kedvez, míg az entalpiavezérelt elválasztásokat kisebb hőmérsékleten tudjuk előnyösen megvalósítani.

A $-\Delta(\Delta G^\circ)$ értékei arra utalnak (**3. Táblázat**), hogy a **3c,3d** (*transz* térszerkezetű, CH₃ csoporttal szubsztituált analóg) és **4c,4d** (*transz* térszerkezetű, C₂H₅ csoporttal szubsztituált analóg) enantiomerpárok hatékonyan és szelektíven kötődnek a szelektorhoz, a legjobb elválasztást megvalósítva.

Meghatároztuk a T_{iso} hőmérsékletet, amely hőmérsékleten a két enantiomer együtt eluálódik. Ez a grafikus meghatározás alapján (**16. ábra**) egy adott hőmérséklet, a gyakorlat azonban azt mutatja, hogy nemcsak a T_{iso} hőmérsékleten, hanem annak környékén is sikertelen az enantiomerek elválasztása. Ezt a hőmérséklet tartományt „hőmérséklet indukált láthatatlan régió”-nak („temperature-induced blind zone”) nevezték el, mely tartomány nagyságát az alkalmazott körülmények, a vegyületek, valamint a kolonna befolyásolja [52].



17. ábra: A **2a,2b** enantiomerek kromatogramjai a hőmérséklet hatás vizsgálata esetén
Kolonna: ligandumcserés oszlop; **Eluensösszetétel:** H₂O/MeOH=(85/15 v/v) + 0,2 mM Cu(ClO₄)₂;
Áramlási sebesség: 0,8 ml/perc; **Detektálás** 230 nm

6. Összefoglalás

Munkánk során az izoxazolin gyűrűvel kondenzált 2-aminociklopentán karbonsav analógok sztereoizomerjeinek elválasztását valósítottuk meg nátrium *N*-((*R*)-2-hidroxi-1-feniletil)-*N*-undecilamino acetát alapú királis kolonnán.

Vizsgáltuk az eluensösszetétel változtatásának hatását a retencióra, a szelektivitásra és a felbontásra. A mozgófázist $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ és $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH} = (95/5-50/50 \text{ v/v})$ tartományban változtatva, azt tapasztaltuk, hogy a retenciós faktor minimum jellegű görbe mentén változott, míg a szelektivitás és felbontás eltérő viselkedést mutatott az alkoholok mozgófázisbeli mennyiségének függvényében.

A mozgófázisbeli alkohol minőségének vizsgálata során megállapítottuk, hogy a retenciót és a felbontást jelentősen befolyásolta az alkoholok C-atomszámának változtatása.

A vegyes komplexképzésben résztvevő Cu^{2+} só mennyiségének és minőségének hatását is tanulmányoztuk az elválasztásra. A Cu^{2+} mennyiségének változtatása során azt tapasztaltuk, hogy a retenciós faktor és a felbontása Cu^{2+} koncentráció növekedésével minimum jellegű görbét írtak le, miközben a szelektivitásra a koncentráció változtatása nem volt jelentős hatással. A Cu^{2+} -t perklorát, nitrát illetve szulfát só formájában adagolva tapasztalatunk szerint a nitrát és a szulfát anion jelenléte jelentős retenció növekedést okozott.

Vizsgáltuk a hőmérséklet hatását a kromatográfiás paraméterekre 5-45 °C hőmérséklet-tartományban. A van't Hoff egyenlet segítségével a ΔH° , a ΔS° , a $\Delta(\Delta H^\circ)$, a $\Delta(\Delta S^\circ)$, a $\Delta(\Delta G^\circ)$ értékeket határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a legtöbb enantiomerpár elválasztása entalpiavezérelt, de néhány esetben entrópiavezérelt elválasztást is megfigyeltünk. Ez utóbbi jelentősége abban rejlik, hogy nagyobb hőmérsékleten rövidebb retenciós idővel jobb elválasztást tudunk elérni.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Y.K. Agrawal, H.G. Bhatt, H.G. Raval, P.M. Oza, P.J. Gogoi, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 7 (2007) 451.
- [2] E.J. Äriens, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26 (1984) 663.
- [3] Burger K. Az analitikai kémia alapjai, Kémiai és műszeres elemzés, Alliter Kiadó, Budapest, 2002
- [4] H. Furukawa, E. Sakahibara; K. Ito, *Chem. Pharm. Bull.* 23 (1975) 1625.
- [5] H. Furukawa, Y. Mori, Y. Takkeucki, K. Ito, *J. Cromatogr.* 136 (1977) 428.
- [6] C. E. Dalglish, *J. Chem. Soc.* 137 (1952) 3940.
- [7] L.H. Easson, E. Stedman, *Biochem. J.* 27 (1933) 1257.
- [8] V.A. Davankov, J.D. Navratil, H.F. Walton, *Ligand Exchange Chromatography*, CRC Press, Boca Raton, FL. 1988.
- [9] V.A. Davankov, *Enantiomer* 5 (2000) 209.
- [10] A. Kurganov, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 51.
- [11] P.E. Hare, E. Gil-Av, *Science* 204 (1979) 1226.
- [12] J. Wagner, E. Wolf, B. Heintzelmann, C. Galet, *J. Chromatogr.* 392 (1987) 244.
- [13] V.A. Davankov, Yu.A. Zolotarev, *J. Chromatogr.* 155 (1978) 285.
- [14] P. Roumeliotis, K.K. Unger, A.A. Kurganov, V.A. Davankov, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 12 (1982) 930.
- [15] V.A. Davankov, A.S. Bochkov, A.A. Kurganov, P. Roumeliotis, K.K. Unger, *Chromatographia* 13 (1980) 677.
- [16] V.A. Davankov, A.S. Bochkov, Yu.P. Belov, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 547.
- [17] M. Remelli, P. Fornasari, F. Pulidori, *J. Chromatogr. A* 761 (1997) 79.
- [18] B. Feibush, M.J. Cohen, B.L. Karger, *J. Chromatogr.* 282 (1983) 3.
- [19] L.R. Gelber, B.L. Karger, J.L. Neumeyer, B. Feibush, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 7729.
- [20] G. Gübitz, Mihellyess S, Kobinger G, Wutt A, *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 91.
- [21] Gübitz G, B. Vollman, G. Cannazza, M.G. Schmid, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 19 (1996) 2933.
- [22] Y. Yuki, K. Saigo, H. Kimoto, K. Tachibana, M. Hasegawa, *J. Chromatogr.* 400 (1987) 65.
- [23] M. Sliwka, M. Slebioda, A.M. Kolodziejczyk, *J. Chromatogr. A* 824 (1998) 7.

- [24] T. Miyazawa, H. Minowa, K. Jamagawa, T. Yamada, *Anal. Lett.* 30 (1995) 867.
- [25] N. Oi, H. Kitahara, F. Aoki, *J. Chromatogr. A* 707 (1995) 380.
- [26] M. Schlauch, F.-J. Volk, K.P. Fondekar, J. Wede, A.W. Frahm, *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 145.
- [27] M.H. Hyun, N.-E. Lim, S.-N. Choi, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 12 (1991) 594.
- [28] M.H. Hyun, J.-J. Ryoo, N.-E. Lim, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 3249.
- [29] M.H. Hyun, D.H. Yang, H.J. Kim, J.-J. Ryoo, *J. Chromatogr. A* 684 (1994) 189.
- [30] M.H. Hyun, S. Ch. Han, Ch.W. Lee, Y.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 950 (2002) 55.
- [31] M.H. Hyun, S. Ch. Han, S.H. Whangbo, *J. Chromatogr. A* 992 (2003) 47.
- [32] M.H. Hyun, S.H. Whangbo, Y.J. Cho, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1615.
- [33] H. Yan, X. Cheng, A. Ni, B. He, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 1045.
- [34] G. Galaverna, R. Corradini, F. Dallavalle, G. Folesani, A. Dossena, R. Marchelli, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 151.
- [35] H. Chen, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* 705 (1995) 3.
- [36] 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.
- [37] A. Péter, G. Török, D.W. Armstrong, G. Tóth, D. Tourwé, *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 177.
- [38] V. Nair, T.D. Suja, *Tetrahedron* 63 (2007) 12247.
- [39] I.N.N. Namboothiri, N. Rastogi, B. Ganguly, S.M. Mobin, M. Cojocar, *Tetrahedron* 60 (2004) 1453.
- [40] M. Christl, R. Huisgen, *Chem. Ber.* 106 (1973) 3345.
- [41] T. Mukaiyama, T. Hoshino, *J. Am. Chem. Soc.* 62 (1960) 5339.
- [42] L. Kiss, M. Nonn, E. Forró, R. Sillanpää, F. Fülöp, *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 2605.
- [43] M. Nonn, L. Kiss, E. Forró, Z. Mucsi, F. Fülöp, *Tetrahedron* 67 (2011) 4079.
- [44] Rakesh, D.S. Sun, R.B. Lee, R.P. Tangallapally, R.E. Lee, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 460.
- [45] L. Shi, R. Hu, Y. Wei, Y. Liang, Z. Yang, S. Ke, *Eur. J. Med. Chem.* 54 (2012) 549.
- [46] T. Shah, V. Desai, *J. Serb. Chem. Soc.* 72 (2007) 443.
- [47] B.M.P. Sadashiva, K. Mantelingu, S.N. Swamy, K.S. Rangappa, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 4539.
- [48] H. Kai, H. Matsumoto, N. Hattori, A. Takase, T. Fujiwara, H. Sugimoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (2001) 1997.

- [49] L. Sipos, I. Ilisz, A. Aranyi, Zs. Gecse, M. Nonn, F. Fülöp, M.H. Hyun, A. Péter, *Chirality* 24 (2012) 817.
- [50] L. Sipos, I. Ilisz, M. Nonn, F. Fülöp, Z. Pataj, D.W. Armstrong, A. Péter, *J. Chromatogr. A* 1232 (2012) 142.
- [51] M.H. Hyun, S.C. Han, S.C. Whangbo *J. Chromatogr. A* 992 (2003) 47.
- [52] B. Yao, F. Zhan, G. Yu, Z. Chen, W. Fan, X. Zeng, Q. Zeng, W. Weng, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5429.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak a lehetőséget, hogy a Tanszéken készíthettem el dolgozatomat.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Péter Antal egyetemi tanárnak, aki szakmai tanácsokkal segítette és irányította munkámat, valamint dolgozatom írását.

Köszönet illeti Dr. habil. Ilisz István egyetemi adjunktust a felmerülő kérdések megválaszolásában és a problémák megoldásában való közreműködéséért.

Szeretném megköszönni Gecse Zsanett és Aranyi Anita doktorandusz hallgatónak illetve Dr. Pataj Zoltánnak, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért és fáradtságot nem ismerve mindig rendelkezésemre álltak.

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