

Óbudai Egyetem

R.S. Könnyűipari és Környezetmérnöki Kar

Környezetmérnök Intézet



TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

**KÖRNYEZETI SZEMPONTBÓL FONTOS
PIRETROID SAVAK ENANTIOMERJEINEK
ELVÁLASZTÁSA**

Szerző: **Laczkó Zita**
Környezetmérnök mérnök BSc. szak,
III. évf.

Konzulens: **Dr. Juvancz Zoltán**
egyetemi tanár

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	4
3. Kísérleti rész	8
3. 1 Vegyszerek	8
3. 2 Készülékek	8
3. 3 Származékképzés	8
3. 4 Mérőeszközök fényképei	9
4. Eredmények	12
4. 1 Spektrométer	12
4. 2 Kromatogram	16
4. 3 Általános következtetés	22
5. Irodalomjegyzék	24

1. Bevezetés

Dolgozatomban a környezeti szempontból fontos piretroid savak enantiomer párjainak elválaszthatóságát szisztematikusan vizsgálom. Az enantiomerek királszelektív elválasztása azért fontos, mert az enantiomer pár tagjai rendkívül hasonló szerkezetük ellenére különböző élettani hatást fejthetnek ki.

Célom, hogy olyan összefüggésekre derítsek fényt, melyek elősegítik a királis elválasztások célirányos, nem véletlenszerű megvalósítását. Az így kapott eredmények más környezeti szennyezőkre, és gyógyszerhatóanyagokra is alkalmazhatóak.

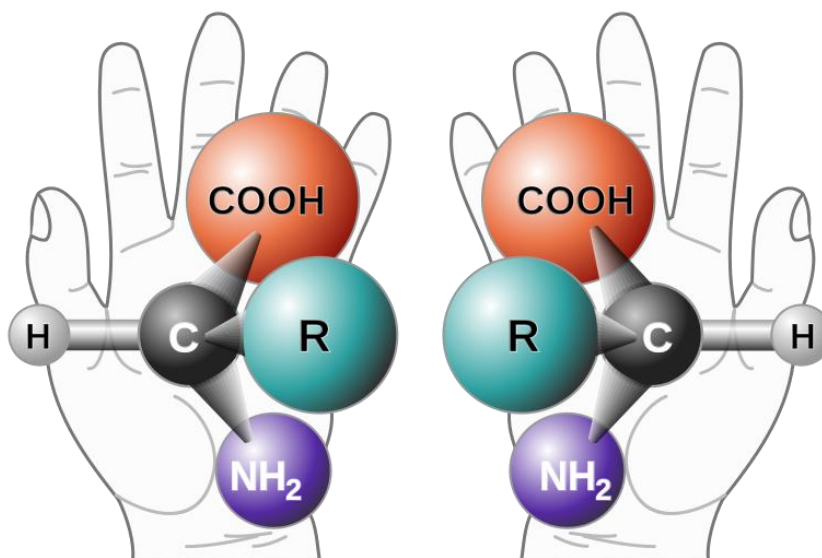
2. Irodalmi áttekintés

Az aszimmetrikus molekulákat királisnak nevezzük. [1,2] A királis molekulák nem hozhatók fedésbe a saját tükörképükkel. A királis molekulát és tükörképi párját enantiomer párnak nevezzük. Az enantiomer párok úgy viszonyulnak egymáshoz, mint a jobb és balkéz (1. ábra) Ha egy molekulában n aszimmetria centrum van, akkor 2^n izomer (diasztereomer) létezik, de csak egy enantiomer pár. Az enantiomerek homogén térben egymástól megkülönböztethetetlenek, de a többi diasztereomer izomerjüktől már homogén térben is különböznek. Az enantiomer pároknak azonos az UV spektruma és olvadáspontja, ami eltér a többi diasztereomer megegyező tulajdonságától.

Az enantiomer pár tagjai egymástól eltérő biológiai hatást mutathatnak. Erre volt példa a Contergan botrány, ahol az *S* enantiomer torzult szüléseket okozott, míg az *R* izomernek csak enyhe nyugtató hatása volt. [3]

A növényvédő szereknél is megfigyelték az enantiomerek eltérő hatását (pl. diklórprop). [4] A kiralitásnak fontos szerepe van a környezet védelemben, mert lehet, hogy az enantiomer pár egyik tagjának van csak kívánt hatása, de mellékhatása mind kettő izomernek (pl. permetrin, diklórprop, klórdán, α -HCH). A téma jelentőségét mutatja, hogy erről már két könyvet is publikáltak [5, 6] Királisan tiszta agrokemikáliák esetében a természet terhelését csökkenteni lehet, ha csak az egyik izomert juttatjuk ki. Enantiomer tiszta termékek létrehozásával felére csökken a környezet terhelés.

Az enantiomerek eltérő viselkedése miatt ma már csak enantiomer tiszta gyógyszereket lehet bevezetni. [7] Ez azt jelenti, hogy az egyik enantiomernek kevesebb mint 0,1 %-a lehet a másik enantiomer a termékben. Ezek a szabványok egyre inkább elfogadottak lesznek a növényvédő szer forgalmazásban is. Többek között ma már optikailag tiszta deltametrin piretroid rovarirtó, és *S*-metolaklór gyomíró van forgalomban.



[1. ábra: Enantiomer párok viszonyai egymáshoz]

A kép azt a centrális kiralitást mutatja, ahol egy szénatomnak négyfajta szubsztituense van.

A megfelelő enantiomer tisztaságú anyagok gyártáshoz és analíziséhez szükség van enantiomer szelektív elválasztásokra. [8] Azonban nincs univerzális enantiomer szelektor. Ugyanis nem csak kémiai megfelelő kölcsönható csoportok kellene az elválasztó ágensen és az elválasztó anyagon, hanem ezeknek térbelileg megfelelő elrendezés is. A legegyszerűbben kifejezve az egyik enantiomerre három ponton kell kölcsön hatni a szelektornak, míg a másikkal csak két ponton. [9] A megfelelő szelektor kiválasztása gyakran „próba szerencse” módon történik. Az enantiomer elválasztásoknál meglehetősen nehéz felismerni a szerkezet szelektivitás összefüggéseket.

A legtöbb esetben nagy hatékonyságú módszerek [4] vagy rendkívül szelektív elválasztó közegek szükségesek a kiralis elválasztásokhoz. Kis kölcsönhatási különbségek is kimutathatóak mind a gázkromatográfiás módszereknél mind a kapilláris elektroforézis módszerében, ezért kísérleteimben ezeket használtam.

Az enantiomer elválasztás nagyban függ az analízis hőmérsékletétől.

$$\ln \alpha = a/T + b$$

[1. képlet]

α szelektivitás, T abszolút hőmérséklet, a és b állandók

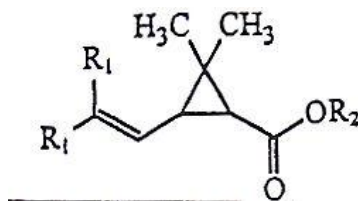
Az 1. képlet szerint a hőmérséklet csökkenésével a szelektivitás növekszik.

A piretroidok széles körben használt rovarirtó szerek. [10] Rendkívül kis hatással vannak a melegvérűekre, míg a rovarokra és a halakkal szemben erős mérgek.

Hatásukat a Na^+ ion csatornák áteresztő képességének gátlásával fejtik ki.[12] Lakásokban csótány irtásra elsősorban használják. Jól ismert, hogy a piretroid termékek hatását nagyban befolyásolja ezek enantiomer tisztasága.

„**Piretrum és piretroidok.** A *Chrysanthemum cinerariifolium* krizantémfaj szárított virágporából készült extraktumot évszázadok óta alkalmazzák rovarirtásra. A piretrum-hatóanyagban 6 összetevő szerepel, ezek a természetes krizantémsavak és piretrolon észterei. Alkalmazásuk korlátai, hogy e vegyületek oxidációra és UV-sugárzásra érzékenyek. Azonban az állandó testhőmérsékletű állatokban gyorsan bomlanak és kiválasztódnak, ezért a csoport a háztartásbeli rovarirtásban jelentős szerepet kap.” [12]

Vizsgálat alá helyezem a krizantém permetrin és deltametrin savakat és ezek metilezett származékait sav származékjait. Ugyanis a piretroid savaknak négy izomerje van, amelyek közül csak az egyik rendelkezik nagyhatással. [2. ábra]



[2. ábra: Piretroid savak és metil észterük általános képlete]

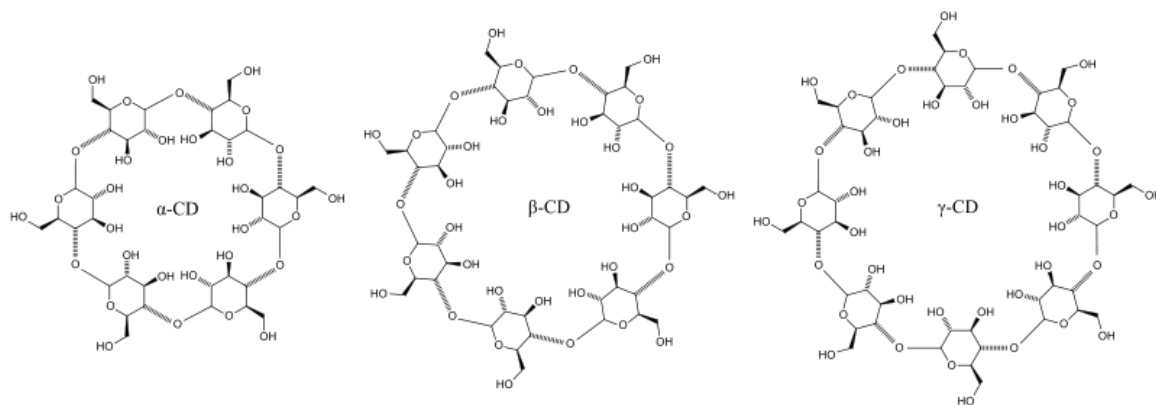
Krizantém sav (R_1 : CH_3), Permetrin sav (R_1 : C_1), Deltametrin sav (R_1 : Br), Szabad sav (R_2 : H), Metil észter (R_2 : CH_3)

*Cisz*nek nevezzük a molekulát ha a ciklopropán gyűrű karboxil és a vinil szubsztituensei egy irányba mutatnak. *Transz* a molekula, ha ezek a szubsztituensek két irányba mutatnak.

A *cisz* izomereknek a *transz* izomereknek diasztereomerjei. A két *cisz* és két *transz* izomer egymásnak enantiomerjei.

A termékek tisztaságának megállapításához szükséges a piretroid savak enantiomer arányának meghatározása.

Kísérleteimben kapilláris gázkromatográfiát használtam. A gázkromatográfias kapillárisok magas hatékonysággal (tányérszám) rendelkeznek, ezért a kis szelektivitású enantiomerek ($\alpha=1,03$) is meghatározhatók egymás mellett. [13, 4]



[3. ábra – Ciklodrextinek (CD) képlete]

Az α-CD a β-CD a γ-CD sorra 6-7-8 glükóz egységből áll.

A ciklodrextinek glükóz egységből álló gyűrű alakú molekulák. [3. ábra]

A molekula csavart szerkezete miatt egy β-ciklodrextin molekula harmincöt különböző királis felismerő tulajdonsággal rendelkezik, ezért a ciklodrextinek széles sprektumu királis elválasztó ágensek. [14] A ciklodrextineket alkalmazzák leggyakrabban gázkromatográfiás királis állófázisként. [4] Eddig az irodalomban több ciklodrextin alapú királis állófázist alkalmazása szerepel egymástól eltérő szelektivitással.

A különböző piretroid savak szelektivitását vizsgáltam a hőmérséklet függvényében.

Amennyiben $1/T \cdot \ln \alpha$ függvény [1. képlet] lineáris elmondhatjuk, hogy csak egyféle mechanizmus vesz részt az enantiomerek elválasztásban. Ugyanis a rendkívül sok királis centrum lehetőséget nyújt többféle királis elválasztási mechanizmusra. A különböző szubstituensek és származékok lehetővé teszik, hogy megállapítsuk a királis szelektivitás milyen csoportokhoz köthető az elválasztandó molekulában. Az így szerzett ismereteket fel lehet használni, hogy más vegyületek királis elválasztását ne csak „próba szerencse” alapján végezzük. Ugyanis ha más vegyületekben hasonló szerkezeti elemek vannak a megszerzett ismeretek rájuk is vonatkozhatnak.

Munkámban folytattam az intézetben elkezdett kutatásokat, amelyek a királis vegyületek környezeti hatásaival foglalkozik. [15]

3. Kísérleti rész

3. 1 Vegyszerek:

A felhasznált piretroit savakat a BMTE Kémiai technológiai tanszékéről kaptuk.

A diazo-metánt az ELTE TTK Szerves kémia tanszékén állították elő.

A felhasznált vegyszerek Hexán, Etil acetát, Dietiléter pro analízis tisztaságúak a MERK termékei voltak.

Az ioncserélt desztillált vizet MILLI – Q készülékből nyertük.

3. 2 Készülékek:

Gilson atomata pipetátokat használtunk az oldatok készítéséhez

Rázógépet használtunk az oldatok homogenizálásához MTA Kutesz IE 210

A származékképzést Pierce reakció edényekbe végeztük.

Az oldatok bepárlására akvárium pumpát használtunk.

Az analíziseket Simadzu GCMS-QP5000 gázkromatográf tömegspektrométeren végeztük.

Az elválasztásra használt oszlop 25 x 0,22mm volt.

Az állófázis Cydex-B (0,25µm – filmvastagság) SGE cég gyártmányú.

3. 3 Származékképzés:

A diazo-metán sárgaszínű mérgező gáz. Rendkívül reakcióképes vegyület. Éteres oldatban laboratórium körülmények között használjuk. A reagens protont hasít a karboxil-csoportból, és helyére metil csoportot köt, amint karbonsavat adunk hozzá. A reakció elegyből a nitrogén gáz formájában távozik, és ott marad a metil-észter származék. A metil- észterszármazékokat azért használtuk a gázkromatográfiás vizsgálat alatt, hogy a mérendő anyagok forrponjtját csökkentjük, ezért alacsonyabb az analízis hőmérséklete van lehetőség.

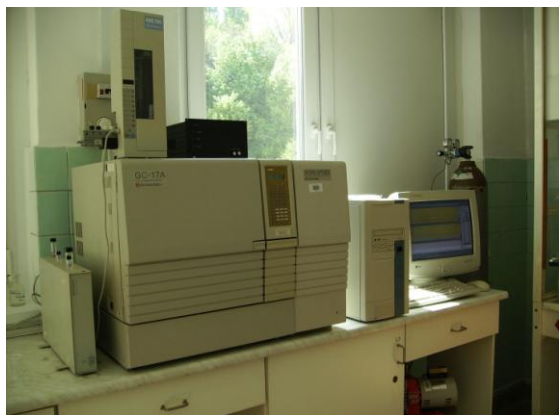
Előny az is, hogy szimmetrikusabb csúcsokat kapunk a metil-észter származékoknál mint a szabad savaknál. Ugyanis a metil-észter esetén az abszorpció a túlnyomó kölcsönhatási forma míg a szabad savaknál a tailinget okozó adszorpciós kölcsönhatásoknak is jelentős szerepe van.



[2. képlet: diazo-metán]

Diazo-metán [2. képlet] éteres oldatát a minták etil acetátos oldatával összekevertük. Zárt edényben rázattuk, ha a diazo-metán sárga színe öt percig megmaradt teljesnek tekintettük a reakciót.

3. 4 Mérő eszközök fényképei:



(1. kép)



(2. kép)



(3. kép)

A műszer kívülről, belülről, valamint az oszlop közeli felvételei



(4. kép)



(5. kép)

Automata beinjektáló és mintatartója

Minták és az azokat tároló pierce reakció edények:



(6. kép)



(7. kép)



(8. kép)

A rázógép



(10. kép)

Gilson automata pipetátkat



(11. kép)



(12.kép)



(13. kép)

Minták kaotikus állapota mérés közben/végén.

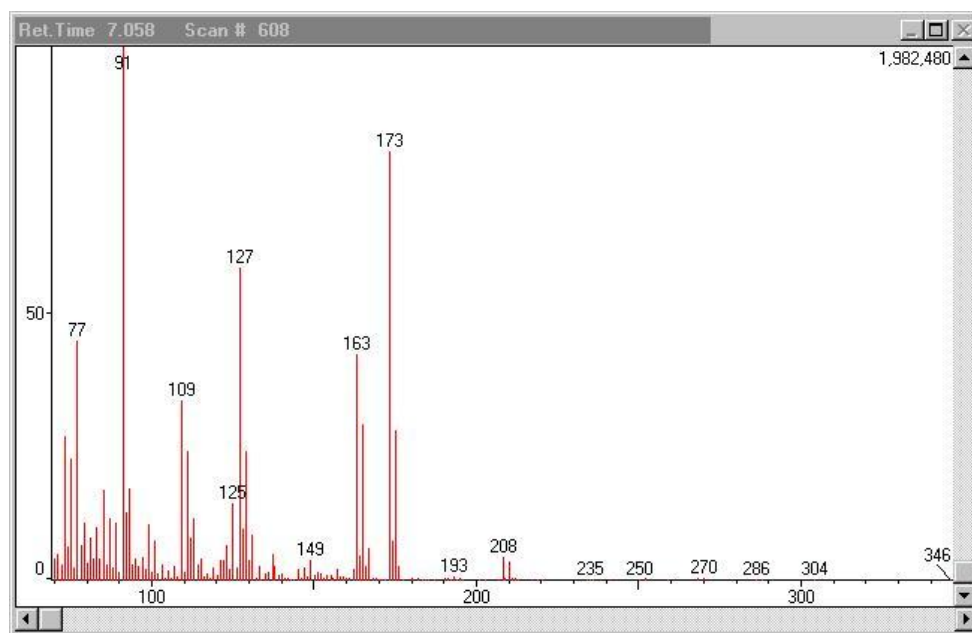
4. Eredmények

Mindegyik vizsgált vegyületet sikerült szabad sav és metilezett származék alakjában gázkromatográfon elemezni. Ezek közül egyedül csak a *transz*-permetrin metil észtert nem tudtuk elválasztani királisan az enantiomer párok közül. Az elválasztott csúcsok tömegspektrumát vizsgáltuk és teljes azonosságot kaptunk megállapítottuk, hogy ezek egy enantiomer pár tagjai.

4. 1 Spektrométerek:

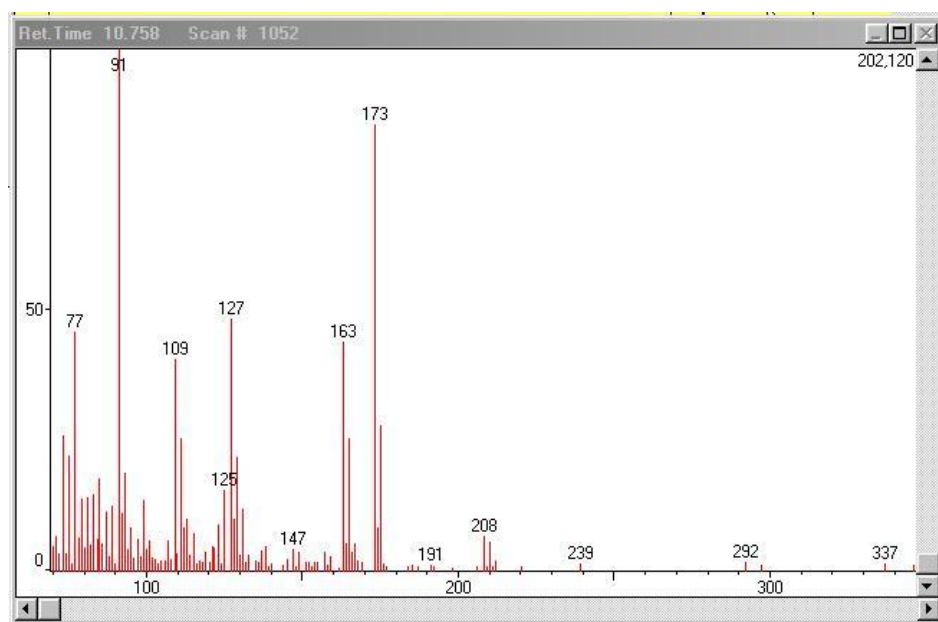
Minden esetben a plusz izomer eluálodott elsőként. Különbséget tudtunk tenni tömeg spektrum alapján a szabad sav és a metil észtere között. Valamint különbséget tudtunk tenni a különböző savak (krizantém, permetrin, deltametrin) között is.

A különböző vegyületek tömegspektrumának különbözőségét jól mutatják a 4. 5. 6. ábrák.



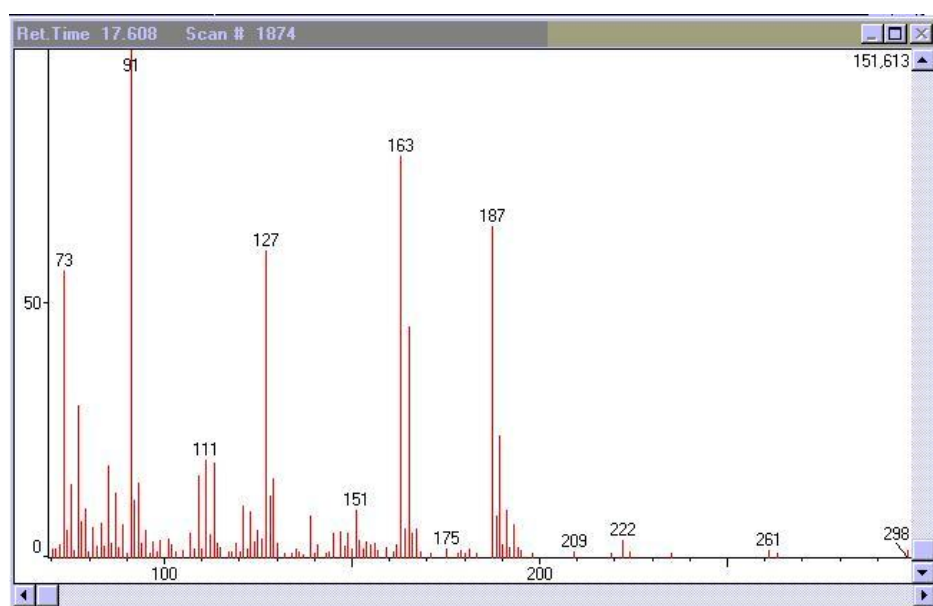
[4. ábra]

transz-permetrin sav tömegspektruma



[5. ábra]

cisz-permetrin sav tömegspektruma



[6. ábra]

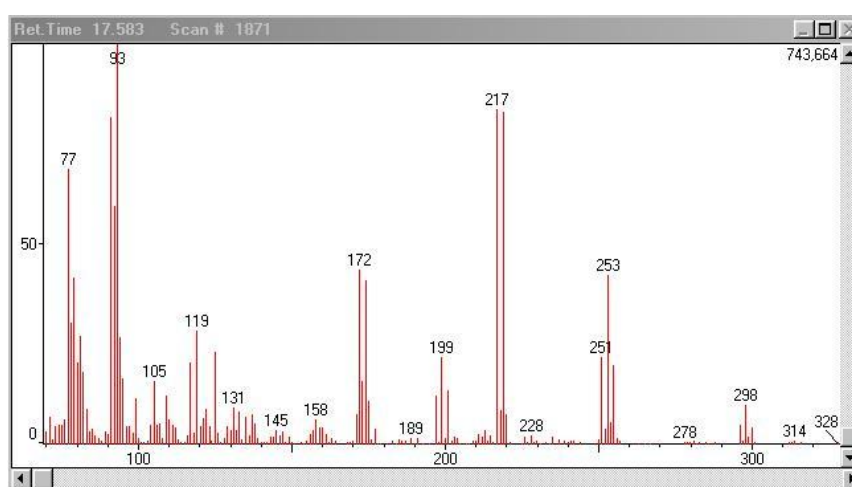
cisz-permetrin sav metilezett tömegspektruma

A *cisz*-permetrin sav fragmenseknél a csúcsok nagysága a következő sorrendben van 91, 173, 127, 163. A *cisz*-permetrin sav metil észternél 91, 163, 187, 127. A *cisz*-permetrin sav jellegzetes 173-as csúcsa a metil észternél nem is észlelhető.

Transz-permetrin sav és *cisz*-permetrin sav csak kisebb különbségeket észlelünk, mely megmutatkozik. A *cisz*-permetin savnál a 109, 127, 163 m/z ionok közel azonos intenzitásúak, míg a *transz*-nál a 127-es m/z ion szignifikánsan nagyobb a másik kettőnél.

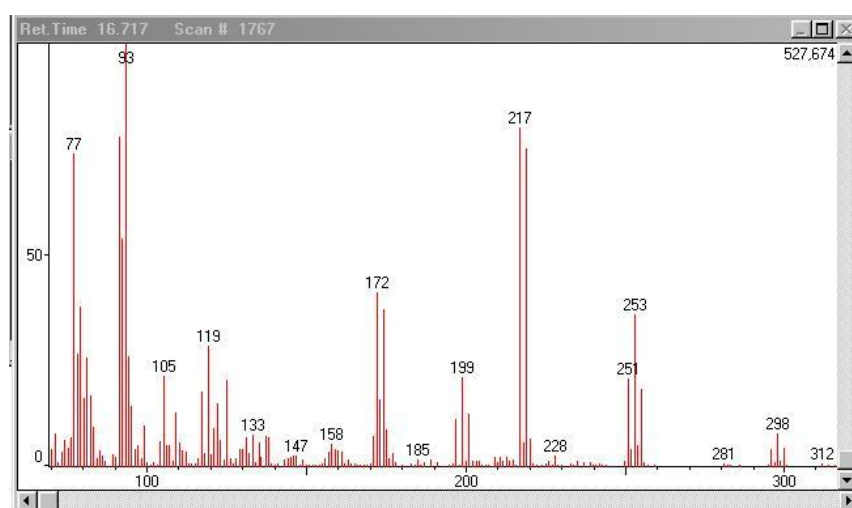
A következő ábrákon [7,8,9,10 ábra] a két csúcs közti hasonlóságot valamint a metilezett és nem metilezett származékok közötti hasonlóságot különbséget vizsgáljuk.

A *cisz*-deltametrin szabadsavak enantiomer párjáról felvett tömegspektrumok teljesen megegyeznek egymással.



[7. ábra]

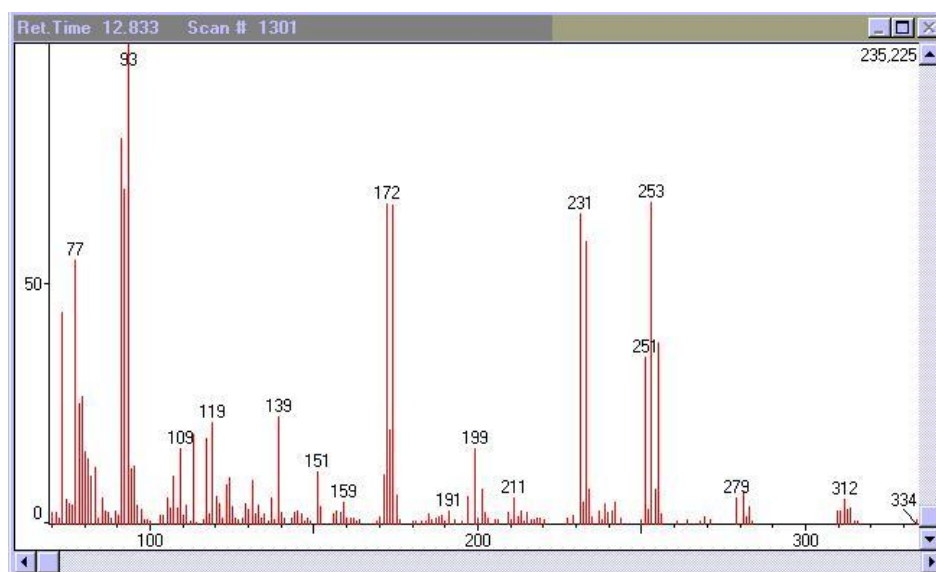
cisz-deltametrin szabad sav tömegspektruma



[8. ábra]

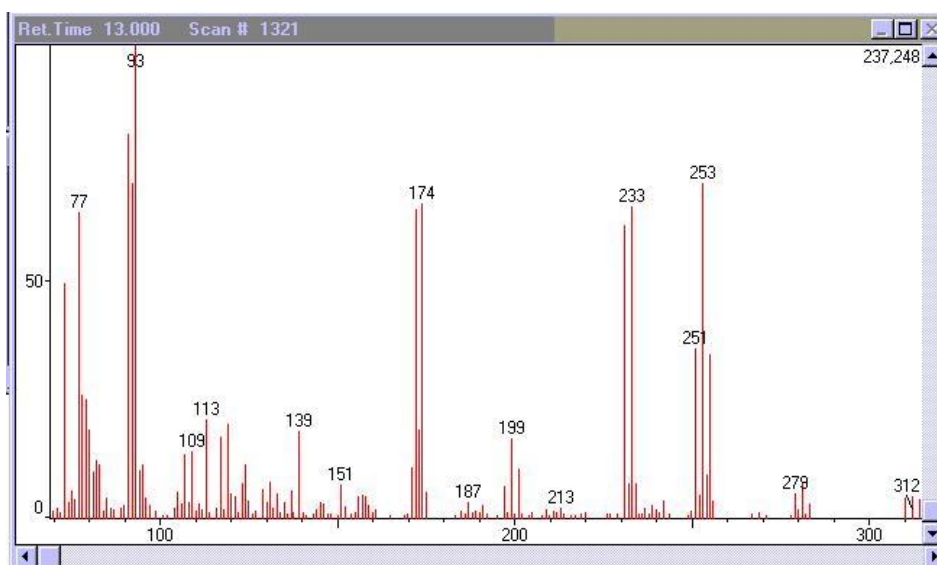
cisz-deltametrin szabad sav tömegspektruma

a második csúcs



[9. ábra]

cis-deltametrin sav metilezett tömegspektruma



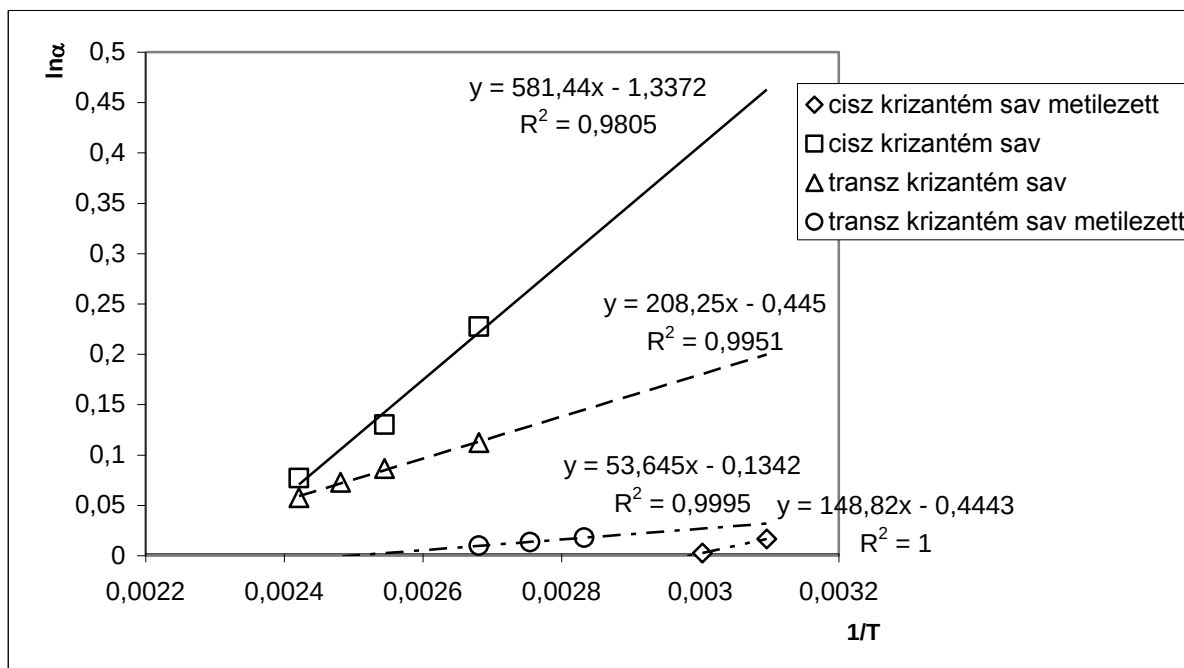
[10. ábra]

cis-deltametrin sav metilezett tömegspektruma
a második csúcs

Legjellegzetesebb különbség hogy a *cis*-deltametrin metilezett savban nincs 217 m/z fragmens és a 233 m/z fragmens ellenben van ellentétben a *cis*-deltametrin szabadsavval.

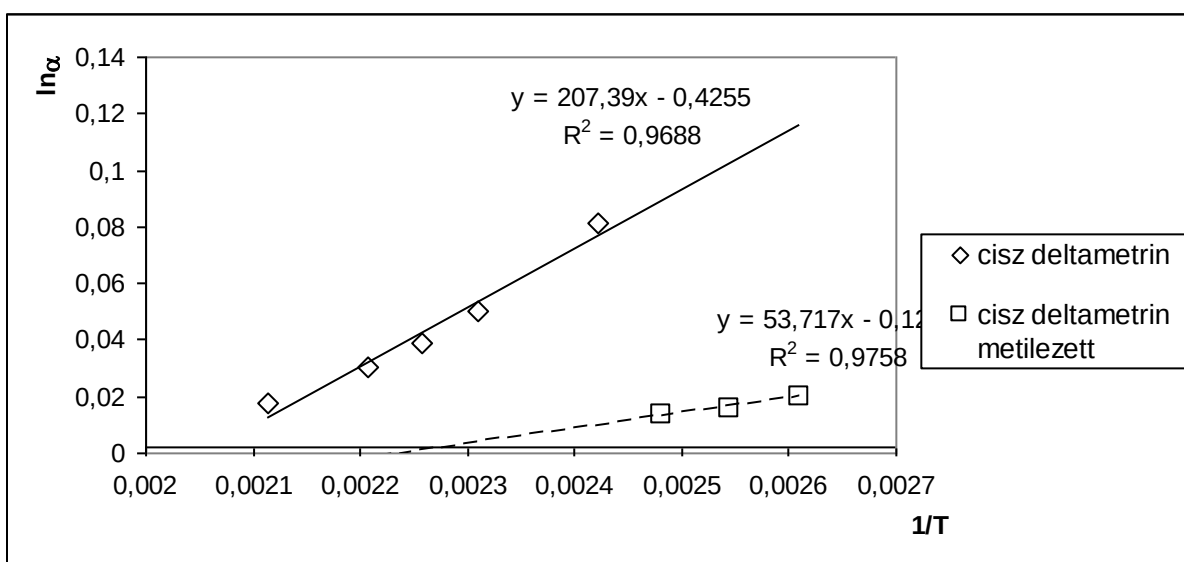
4. 2 Kromatogram:

A hőmérsékletfüggést legalább 40°C intervallumba vizsgáltuk, minden anyagra rendkívül jó linearitást találtunk az $1/T$ - $\ln \alpha$ [1. képlet] függvényben, amelyeket az 1-3 diagramok mutatnak.



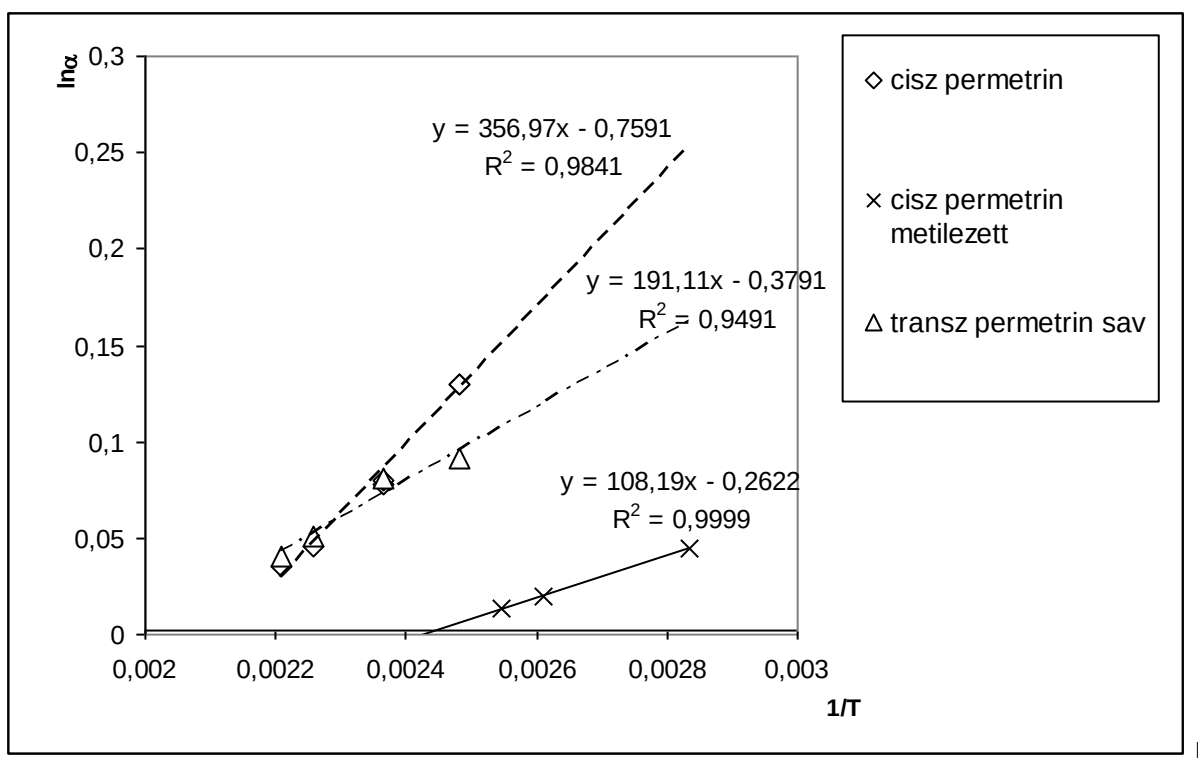
[11. ábra]

Krizantém savak és származékai



[12. ábra]

Deltametrin



13. ábra]

Permetrin

Sajnos nem állt rendelkezésünkre *transz*-deltametrin sav, ezért ezzel nem tudtunk kísérletet végre hajtani, következtetést levonni erre az anyag párra.

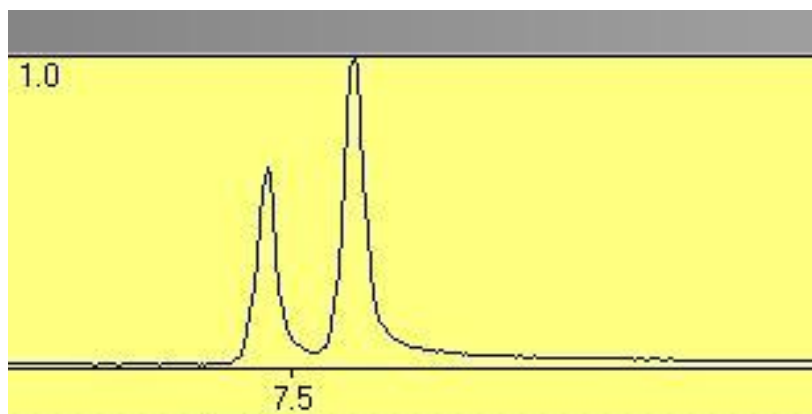
A vizsgált vegyületek közül *Transz*-permetrin sav metilezett másfél óra után se mutatott elválást, ezért erről nincs adat a diagramokon.

Minden esetben a *cisz transz* metilezett vagy szabad sav formában lévő anyagokra igaz hogy az r^2 értéke meghaladja a 0,95 értéket a $1/T$ - $\ln\alpha$ függvények linearitása. A linearitásból következik, hogy csak egy királis felismerő mechanizmus játszik szerepet az elválasztásokban. A savaknak nagyobb a szelektivitása ugyan azon a hőmérsékleten, mint a metil észterüknek. A szabad sav hidrogén-donor képessége nagyban hozzájárul a királis szelektivitáshoz. A savaknak meredekebb egyenest adnak az $1/T$ - $\ln\alpha$ [1. képlet] függvényben, mert a hidrogén híd kölcsönhatásoknak nagy hőmérséklet függése.

A szabad savak esetében a *cisz* izomereknek nagyobb a királ szelektivitásuk, mint a *transz* izomereknek. A metil-észterek esetében nem figyelhető meg ilyen egyértelmű tendencia.

A jobb összehasonlítás kedvéért azonos, 110°C hőmérsékleten vizsgáltuk a különböző enantiomer párok szelektivitás értékeit. Az értékeket mértük vagy más hőmérsékleten mért értékből extrapoláltuk (táblázat).

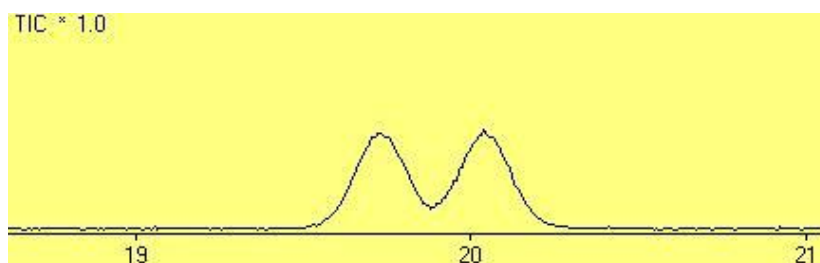
Szabadsav jobban elválik, mint a metilezett származék, de a kevésbé illékony savaknál rosszabb a csúcs alak, mint a metil észterek származékoknál.



[14. ábra]

cis-deltametrin gázkromatográfiás csúcsa

$t=180^{\circ}\text{C}$ / $T=453\text{K}$; $t_{R1}=7,43$; $t_{R2}=7,66$



[15. ábra]

cis-deltametrin metilezett kromatogramja

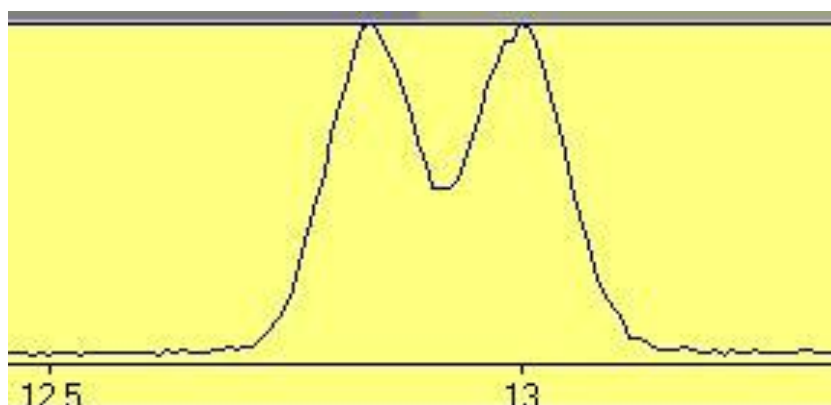
$t=120^{\circ}\text{C}$; $t_{R1}=19,72$; $t_{R2}=20,03$



[16. ábra]

cisz-permetrin sav szabad sav kromatogramja

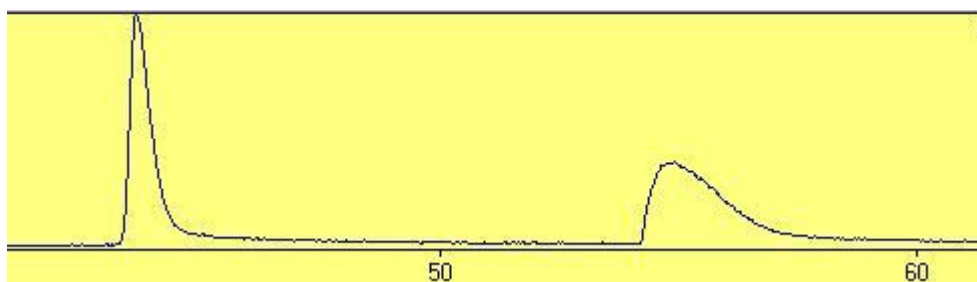
$t=170^{\circ}\text{C}$; $t_{R1}=6,7$; $t_{R2}=7,01$



[17. ábra]

cisz-permetrin sav metilezett kromatogramja

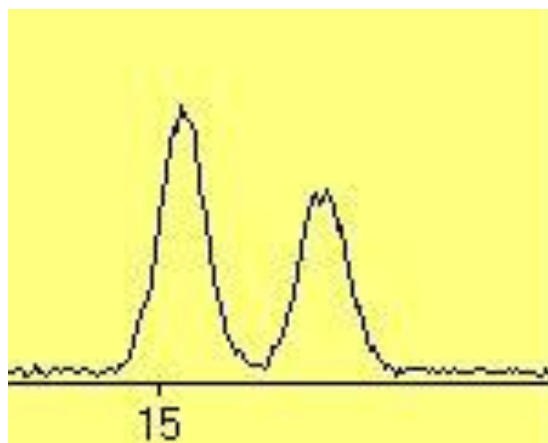
$t=90^{\circ}\text{C}$; $t_{R1}=12,84$; $t_{R2}=13,01$



[18. Ábra]

cisz-krizantém sav szab sav

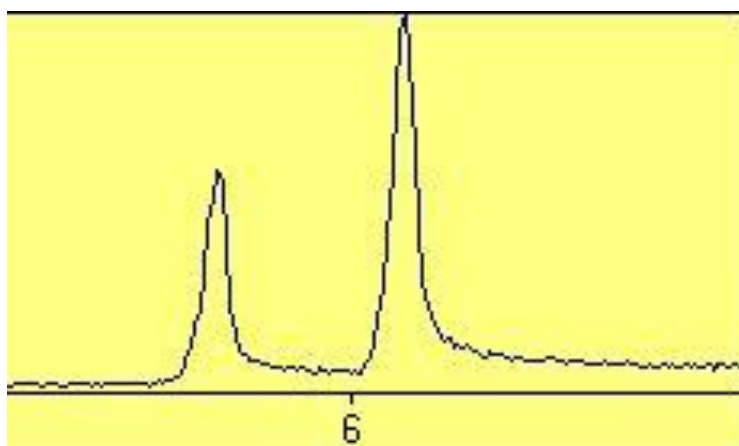
$t=100^{\circ}\text{C}$; $t_{R1}=43,66$; $t_{R2}=54,78$



[19. ábra]

cisz-krizantém sav metilezett

$t=140^{\circ}\text{C}$; $t_{R1}=14,98$; $t_{R2}=15,35$



[20. ábra]

transz-krizantém sav szabad sav

$t=130^{\circ}\text{C}$; $t_{R1}=5,74$; $t_{R2}=6,09$



[21. ábra]

transz-krizantém sav metilezett

$t=130^{\circ}\text{C}$; $t_{R1}=23,75$; $t_{R2}=24,35$

Azonos hőmérsékletre extrapoláltuk az összes mérést hogy meg tudjuk állapítani a szerkezet-szelektivitás összefüggéseket

A vizsgált anyagok királis szelektivitása 110°C-on		
Vegyület neve	Szabad sav (alfa)	Metil-észter (alfa)
<i>Cisz</i> -deltametrin	1,122983 *	1,020311
<i>Transz</i> -permetrin sav	1,127364 *	**
<i>Cisz</i> -permetrin sav	1,188791 *	1,020311
<i>Transz</i> -krizantém sav	1,109772 *	1,005883 *
<i>Cisz</i> -krizantém sav	1,198319 *	0,988333 *, ***

*Magasabb hőmérsékleten mért adatokból mért érték.

**Nem észleltünk elválást, másfél órás retenciós idő esetén sem.

*** Nem reális érték

[1. táblázat: királis szelektivitás 110°C-on]

A táblázatból is látszik, hogy a metil-észterek szelektivitása is sokkal kisebb, mint a szabad savaké. A *cisz*eknek szabadsav alakjában nagyobb a királis szelektivitása, mint a *transz* izomereknek. A *cisz* krizantém savak szelektivitása jóval kisebb, mint a másik két piretroid savé. Metil észtereknél nincs ilyen szignifikáns eltérés.

Az izomerek közül a legnagyobb szelektivitással a deltametrin, majd a permetrin végül a krizantém sav rendelkezik.

Előzetes kapilláris elektroforézises kísérleteinkkel megállapítottuk hogy a permetrin savak kriális felismerésére ezek deprotonált (ionizált) alakja a megfelelő, ha királis szelektorként permetilezett- β -ciklodextrint használunk.

A méréseket tovább folytatjuk, a dolgozat beadása után, és a legújabb eredményekről a szóbeli előadásban beszámolunk. Tervezzük, hogy eredményeinket NMR mérésekkel összehasonlítjuk és dokkolási számításokat végzünk más kutatókkal együttműködve.

4. 3 Általános következtetés:

Szabad sav formájában a vegyületek sokkal jobban elválnak, mint metilészter alakban. Ez azt mutatja a savak hidrogénjének aktív részvételét a kriális felismerésben, mint hidrogén donor.

A szabad savak esetén a *cisz*, izomerek nagyobb szelektivitást mutatnak, mint a *transz* izomerek.

A ciklopropán merev gyűrű rendszere jó királis felismerést nyújt permetilezet ciklodextrin esetében.

A különböző szubsztituens csoportok fajtája és elhelyezkedésének hatással vannak a királis szelektivitásra, amiből szerkezet-szelektivitás összefüggéseket lehet levonni.

Munkánk eredményeképpen, a megfelelő paramétereket célzottan lehet kiválasztani hasonló szerkezeti elemekkel rendelkező környezetre káros anyagok enantiomerjeinek elválasztására a véletlenszerű próbálgatások helyett.

A királisan tiszta piretroidok előállításához jó analízis módszert nyújtunk, amely megkönnyíti enantiomer tiszta előállításukat. Az így gyártott enantiomer tiszta termékekkel csökkenteni lehet a környezet terhelését.

5. Irodalom jegyzék

- [1] Kajtár M.: Változatok négy elemre, Gondolat, 1984
- [2] Nógrádi M.: Bevezetés a sztereokémiába, Műszaki könyvkiadó, 1975
- [3] <http://hu.wikipedia.org/wiki/Thalidomid>
- [4] Juvancz Zoltán: Enantiomerek elválasztása kapilláris technikákkal (GC, SFC és EKC), akadémiai doktori értekezés 2002.
- [5] I. Ali, H. Y. Aboul-Enein: Chiral Pollutants: Distribution, Toxicity And Analysis By Chromatography And Capillary Electrophoresis, Wiley, 2004
- [6] R. Kallenborn, H. Hühnefuss: Chiral environmental Pollutants
- [7] FDA's Policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. Chirality 4, 1992, p. 338-340.
- [8] Fogassy E., Ács M., Tőke L.: Optikai izomerek előállítása, (A kémia újabb eredményei, Akadémiai kiadó, 1987
- [9] <http://rkk.uni-obuda.hu/kmi/dokument.html#elval>
- [10] <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/6237>
- [11] http://www.google.hu/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CDYQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.epito.bme.hu%2Fvcst%2Foktatas%2Ffeltoltesek%2FBMEEOVKASH2%2Fchinoin_2006_harom.ppt&ei=wdRLU-buGfIOuAadxYDADQ&usg=AFQjCNFJZNC0oLe-2_6dxBlQndObR-K2-A&sig2=MKxfY5Fh1A97CNkMjNVaAw&bvm=bv.64542518,d.bGQ&cad=rja
- [12] http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_08_Novenyvedelem/h05s02.html
- [13] Balla J. A gázkromatográfia analitikai alkalmazása, Edison Hause , 2006
- [14] Z. Juvancz, R. Bodáné-Kendrovics, R. Iványi, L. Szenté, The role of the cyclodextrins in the chiral capillary electrophoresis, Electrophoresis 29 (2008) 1701-1712
- [15] Juvancz Z., Demény K., Iványi R., Enantiomerek meghatározása környezeti mintákból kromatográfiai módszerekkel, Előadás összefoglalók (48 o. VIII. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia, Eger, 2007