

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás enantiomerelválasztás: β -aminosavak viselkedése antibiotikum szelektorokon

PATAJ Zoltán^{a,*}, ARANYI Anita^a, ILISZ István^a és PÉTER Antal^a

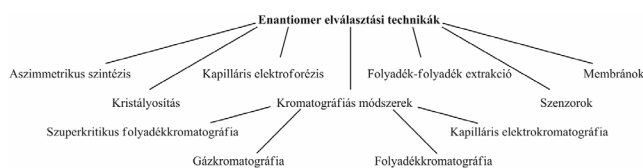
Szegedi Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Dóm tér 7, 6720 Szeged, Magyarország

1. Bevezetés

Az élő szervezetekben a királis molekulák kiemelkedő jelentőséggel bírnak. A fehérjék, a fehérjéket alkotó aminosavak, a cukrok, az enzimek mind királis vegyületek. A pontos magyarázat még ma sem ismeretes, de e molekulák kép-tükörkép párosából az esetek döntő többségében csak az egyik forma fordul elő.

A királis vegyületek világában az enantiomerek biológiai hatása nagymértékben különbözhet egymástól, attól függetlenül, hogy fizikai-kémiai tulajdonságaikat tekintve azonosak, kivéve hogy a síkban poláris fény rezgési síkját milyen irányban forgatják.¹ Ez azzal magyarázható, hogy a királis molekulák a biológiai rendszerekben ugyancsak aszimmetrikus molekulák egy adott konfigurációjával találkoznak, melyek képesek megkülönböztetni az enantiomereket.

Királis molekulák előállításának gazdaságos útja lehet a közvetlen királis katalitikus vagy enzimatiszintézis, illetve racém vegyületek szintézise és az azt követő valamilyen elválasztási technika alkalmazása. Mivel az aszimmetrikus szintézismódszerek is csak korlátozottan szolgáltathatnak 100%-os enantiomer tisztaságot, így a kristályosítással történő rezolválás (diasztereomerpár képzés), a kromatográfiás módszerek, folyadék-folyadék extrakció, szenzorok és membránok felhasználása, desztilláció, stb. jöhet szóba a valóban enantiomertiszta vegyületek előállítására (1. ábra).



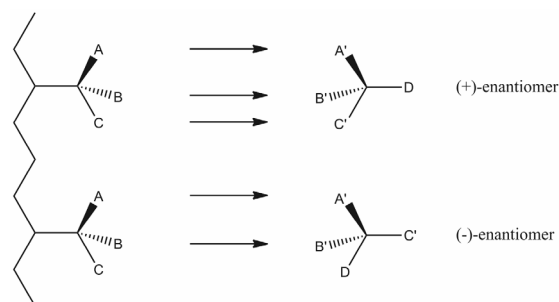
1. Ábra. Enantiomer elválasztási technikák.

Bármilyen úton is történik a királis molekula előállítása, elengedhetetlen a szintézist követő valamilyen elválasztási módszer alkalmazása a királis tisztaság ellenőrzésére. A leggyakrabban használt analitikai módszerek a kromatográfia családjából kerülnek ki, melyek közül is kiemelkedik a folyadékkromatográfiás eljárás.

2. Királis kromatográfia

Enantiomerpárok elválasztása a fent említett fizikai és kémiai tulajdonságbeli hasonlóságuk miatt csak olyan

sztereospecifikus kémiai kölcsönhatással lehetséges, amelynek során a sztereoisomerek eltérő módon reagálnak. Éppen ezért a kromatográfiás elválasztás alapja a diasztereomerpár-képzés a vizsgált vegyület és az állófázis vagy a mozgófázis királis komponense (anizotróp közeg) között. Királis állófázis alkalmazása esetén az elválasztás mértékét az enantiomerek állófázissal kialakított eltérő kölcsönhatása határozza meg (2. Ábra). Az enantiomer aktív centrumához kapcsolódó csoportok hárompontos kölcsönhatás (ezek lehetnek: sztérikus gátlás, π - π -, dipól-dipól-, ionos kölcsönhatás, komplexképzés, stb.) kialakítására képesek, így a királis állófázist ennek megfelelően kell megválasztani.^{2,3}



2. Ábra. A hárompontos illeszkedés modellje.

A módszer nagy előnye, hogy nem igényel hosszadalmas és bonyolult minta előkészítést, valamint az analízis után a vegyületek eredeti formájukban állnak rendelkezésünkre. A királis oszlopok alkalmasak analitikai mérések kivitelezésére minőségi és mennyiségi meghatározás céljából, valamint fél-preparatív, illetve preparatív méretben enantiomerek tisztítására is.

3. Makrociklusos glikopeptid szelektorok

Az elmúlt évtizedben megnövekedett az érdeklődés a β -aminosavak iránt, melyek igen fontos közbenső termékei különféle gyógyászatban használatos termékeknek, valamint alkotórészei olyan természetben jelen lévő fontos vegyületeknek, mint például az alkaloidok, peptidek és β -laktám antibiotikumok. A β -aminosavakat a biológiailag aktív peptidok szintézise során a szerkezet rögzítésére használják. Ezek a felhasználási módok megkövetelik a vegyületek enantiomer tisztaságát. Az irodalomban rendelkezésre álló eredmények alapján kijelenthető, hogy a különféle aminosavak királis elválasztásában

* Főszerző. Tel.: +36 (62) 34-3656; fax: +36 (62) 54-4340; e-mail: pataj@chem.u-szeged.hu

Makrociklusos antibiotikumok

Ansamicinek

- rifamicin

Glikopeptidek

- avoparcin
- teikoplanin
- teikoplanin aglikon
- risztocetin A
- vankomicin
-vankomicin aglikon

Polipeptidek

- tiosztrepton

Aminoglikozidok

- fradiomicin
- sztreptomycin
- kanamicin

3. Ábra. A makrociklusos antibiotikumok csoportosítása.

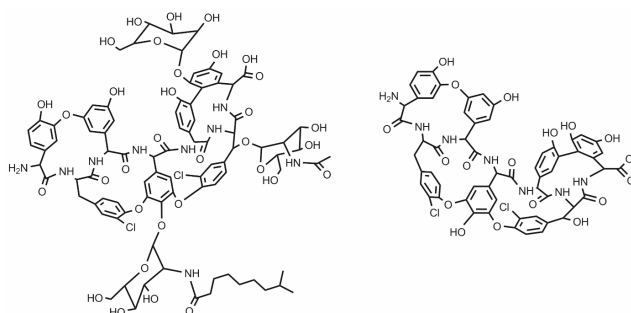
igen hatékonyak bizonyulnak a makrociklusos glikopeptid szelektorok.⁴⁻⁶

Armstrong és munkatársai alkalmazták először a makrociklusos antibiotikumok egyik családját, a makrociklusos glikopeptideket királis szelektorként.⁷ A ciklodextrinek és poliszacharidok mellett a királis kromatográfiában manapság a makrociklusos antibiotikum alapú állófázisok a legkeresettebbek, amit a megjelenő közlemények egyre növekvő száma is bizonyít.^{4-6,8-11}

A makrociklusos antibiotikumok családjába több száz vegyület tartozik, mely vegyületek szerkezetüket tekintve rendkívül széles skálán mozognak. A királis szelektorként is alkalmazható molekulák, a makrociklusos antibiotikumokon belül négy fő csoportba sorolhatók: ansamicinek, glikopeptidek, polipeptidek és aminoglikozidok (3. ábra). Sztereoselektivitás szempontjából a leghatékonyabbnak a glikopeptidek (teikoplanin, teikoplanin aglikon, risztocetin A, vankomicin és vankomicin aglikon) bizonyultak, de figyelemre méltó eredményeket értek el tiosztrepton, rifamicin, fradiomicin, sztreptomycin, kanamicin és avoparcin királis szelektorként való alkalmazása során is.¹²

Egyedi szerkezetüknek és a funkciós csoportok széles tárházának köszönhetően a makromolekulák ionos, hidrogénhidás, hidrofób, dipól-dipól, diszperziós, sztérikus, π - π , stb. kölcsönhatás kialakítására képesek.¹³ Hatékonyan használhatóak különböző kromatográfiai módokban, úgymint normál és fordított fázisban (NPM és RPM), nemvizes poláris szerves oldószert tartalmazó rendszerben (MeOH, ACN) (POM), valamint savas, illetve bázisos karakterű módosítót tartalmazó nemvizes poláris szerves fázisban (PIM), (MeOH/AcOH/TEA).¹⁴

A teikoplanin A₂-2 három szénhidrát csoporttal rendelkezik, melyekből kettő D-glükózamin, egy pedig D-mannóz (4. ábra). A teikoplanin legjellegzetesebb sajátága, hogy egy glükózamin magában foglal egy N-acilezett szénhidrogén láncot. Ennek köszönhető, hogy ez a szerkezet apolárisabb, mint a többi glikopeptid. A Chirobiotic TAG oszlop szelektora a teikoplanin aglikon, mely hét aromás gyűrűből áll, melyből kettőn klór szubsztituens található, négyen pedig fenolos hidroxilcsoport. A molekulán szintén megtalálható primer aminocsoport és hidroxilcsoportok valamint a szilikagél oldhatósága határozza meg azt a pH tartományt (tipikusan 3,5-8,0) ahol az ilyen szelektort tartalmazó kolonna használható.



4. Ábra. A teikoplanin és teikoplanin aglikon szerkezete.

A Chirobiotic T és T2 oszlop között a szelektor anyagát tekintve nincs különbség, mindkettőben a szilikagél hordozó teicoplaninnal A₂-2-vel borított. A különbség „csak” a borítottság mértékében, valamint a szilikagélhez való kötés módjában van. Irodalmi adatok alapján a T2 oszlop királis szelektivitása jobb az α -aminosavak elválasztásában, mint a Chirobiotic T oszlopé. A Ristocetin A a Chirobiotic R, míg a Vancomicin a Chirobiotic V királis oszlop szelektora.

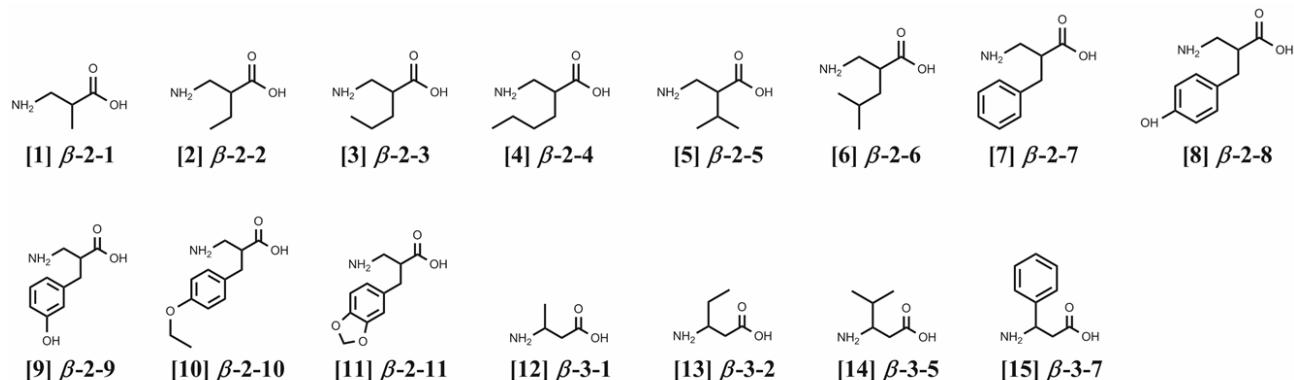
4. Eredmények

A királis elválasztásokhoz alkalmazott makrociklusos antibiotikum alapú királis állófázison az elválasztás alapja a molekula azon sajátága, hogy miként tud illeszkedni a királis szelektor kosarába. Ezt a folyamatot nagyban befolyásolja a két szelektor, a teikoplanin és a teikoplanin aglikon között fennálló lényeges különbség, nevezetesen a szénhidrátcsoportok jelenléte, illetve azok hiánya (4. ábra). Fontos eltérés még, hogy a teikoplaninon lévő glükózamin tartalmaz egy N-acilezett C9 szénhidrogén láncot, mely még inkább hidrofób jelleget kölcsönöz a szelektornak.

A vizsgált anyagok két csoportba oszthatók: megkülönböztetünk β -2- és β -3-aminosavakat. A β -2-aminosavak annyiban különböznek a β -3-aminosavaktól, hogy az előző vegyületcsoport esetén a karboxilcsoportot tartalmazó szénatomon található a molekula aszimmetria-centruma, míg az utóbbinál ez az aminocsoportot tartalmazó szénatomra igaz (5. ábra).

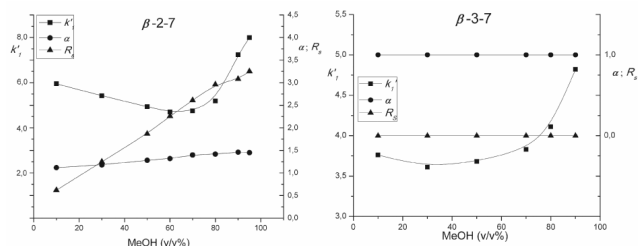
4.1. Eluensősszetétel-változás hatása az elválasztásra

Az aminosav enantiomerek elválasztásához fordított fázisú rendszert alkalmaztunk, mely mozgófázisként 0,1% trietilammóniumacetát puffer (TEAA, pH=4,1)/metanol



5. **Ábra.** Vizsgált anyagok szerkezeti képletei: [1] 3-amino-2-metilpropánsav; [2] 2-(aminometil)butánsav; [3] 2-(aminometil)pentánsav; [4] 2-aminometilhexánsav; [5] 2-(aminometil)-3-metilbutánsav; [6] 2-(aminometil)-4-metilpentánsav; [7] 2-(aminometil)-3-fenilpropánsav; [8] 2-(aminometil)-3-(4-hidroxifenil)propánsav; [9] 2-(aminometil)-3-(3-hidroxifenil)propánsav; [10] 2-(aminometil)-3-(4-etoxifenil)propánsav; [11] 2-aminometil-benzo(1,3)dioxolán-5-yl propánsav [12] 3-amino-butánsav; [13] 3-amino-pentánsav; [14] 3-amino-4-metil-pentánsav; [15] 3-amino-3-fenil-propánsav.

(MeOH) különböző térfogatarányú elegyét tartalmazta. Modell vegyületként különböző helyzetekben lévő alifás, elágazó alifás és aromás oldalláncot, valamint egy oxocsoportot tartalmazó β -aminosavat választva (β -2-1, β -3-1, β -2-5, β -3-5, β -2-7, β -3-7 és a β -2-11) tanulmányoztuk az eluens MeOH tartalmának hatását a kromatográfiás viselkedésre Chirobiotic T, T2 és TAG kolonnákon. Hat különböző eluens összetételt alkalmaztunk minden vegyület esetében, TEAA (pH=4,1)/MeOH = 10/90 és 90/10 (v/v) összetétel tartományban.



6. **Ábra.** Kromatográfiás adatok, retenciós faktor (k'), szelektivitás (α) és a felbontás (R_s) értékeinek változása az eluens összetétellel; Kolonna, Chirobiotic TAG; mozgófázis, 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH (v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml perc⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C.

Az alkil oldallánccal rendelkező β -2-1 és β -3-1 aminosav esetén a MeOH térfogatarányának növekedésével párhuzamosan nagymértékben növekedett a retenciós faktor (k'). Ennek magyarázata vélhetően a szolvatációs viszonyokban rejlik, melyet újabban HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) hatásként emleget az irodalom.¹⁵ A poláris jellegű, vízben jól oldódó aminosavak a szerves fázis (MeOH) térfogatarányának növelésével kisebb mértékben szolvatáltak, ezáltal jobban kötődnek az állófázishoz, növelve ezzel a visszatartást. Másként megfogalmazva, az apolárisabbá váló eluens egyre nagyobb teret enged a hidrofíli-hidrofíli kölcsönhatások kibontakozásának, megnövelve ezzel a molekula állófázison való tartózkodásának idejét (HILIC hatás).¹⁶ Ez a viselkedés mindhárom kolonnán megfigyelhető volt. Hasonló jelenségeket tapasztaltunk az elágazó és alifás oldallánccal rendelkező aminosavak esetén is.

Az aromás szubsztituenst tartalmazó aminosavak esetén (β -2-7, β -3-7 és β -2-11) a k' értékei minimum jellegű

görbét írtak le (6. ábra). A minimum pont utáni növekedés a k' értékekben a MeOH térfogatarányának növekedésével, hasonlóan magyarázható, mint az alifás oldalláncú vegyületeknél. A minimum pont előtti csökkenő szakasz abból adódik, hogy az aromás gyűrű az amúgy poláris aminosavaknak apoláris jelleget kölcsönöz. A vízben gazdagabb eluens esetén így előtérbe kerülnek a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások, melyek nagyobb víztartalom mellett nagyobb visszatartást eredményeznek. A hidrofób-hidrofób, illetve a HILIC hatások eredője eredményezi a görbék változó alakját, ez befolyásolja a görbe minimumának helyét, valamint a minimumpont előtti csökkenés, illetve az utána lévő emelkedés meredekségét, amely mintánként és kolonnánként változó volt¹⁷.

A mintamolekulákon lévő funkció csoportok helyzetétől, illetve az oldallánc helyzetétől és jellegétől függetlenül, a szelektivitás (α) és felbontás (R_s) értékek voltak, hogy a MeOH-ban gazdagabb mozgófázis esetén nagyobbak adódtak (kivéve képeznek azok a vegyületek, amelyek esetén nem sikerült az elválasztást megvalósítanunk).

4.2. Molekulaszerkezet és kromatográfiás viselkedés közti összefüggések

A β -aminosavak esetén ugyanazon a kolonnán a retenciós faktorok értéke csak kissé különbözött egymástól, függetlenül az oldallánc minőségétől. A jelenség lehetséges magyarázata az enantioszelektív felismerés olyan mechanizmusa, melyben az első enantiomer retenciós faktorának kialakításában a nemszelektív kölcsönhatások a jellemzőek, aminek köszönhetően a retenciós idők hasonlóak. A fennálló csekély eltérések a szerkezeti különbségekből adódhatnak.

A β -2-1, β -3-1, β -2-2 és β -3-2 vegyületek rendelkeznek a legrövidebb telített oldallánccal és ezek azok az aminosavak, melyek a legkisebb α és R_s értékeket adták, bár a k_i' viszonylag nagy. Ez valószínűleg abból adódik, hogy a rövid apoláris oldallánc és a királis szelektoron található zseb hidrofób részei között kicsi a kölcsönhatás mértéke, ami csekély királis felismerést eredményez. A β -2-3 - β -2-6 és β -3-5 enantiomerek már hosszabb alkil láncal rendelkeznek, mely egy kedvezőbb térállást és kölcsönhatást eredményezhet az aglikon kosarán belül. A β -2-5 és β -3-5 aminosav esetében azonban a csoport

szerkezete, nevezetesen egy elágazó 2-propil lánc, kedvezőtlenül hat a molekula-királis állófázis komplex kialakulására, ami kisebb retenciós faktort eredményez, ugyanakkor α (és R_s) kissé nagyobb volt összehasonlítva β -2-1 és β -3-1 adataival. Különösen szembevetünk az elágazó alkilcsoport negatív hatása, ha ezeket az adatokat összevetjük a β -2-3, β -2-4 és a β -2-6 aminosavakkal. Az analóg oldallánccal rendelkező β -3-5 vegyület estén az egyik legnagyobb szelektivitás és felbontás értéket tapasztaltuk a β -3-aminosavak közül, de ez az érték messze elmarad a β -2-aminosavaknál tapasztaltaktól. A viszonylagosan nagyobb szelektivitás és felbontás valószínűleg szterikus okokra vezethető vissza, a β -3-5 molekula elhelyezkedése kedvezőbb az aglikon kosarában, mint a β -3-1 és β -3-2 molekuláé. A β -2-6 molekulában a β -2-5 molekulához képest jelen lévő további CH_2 csoport már flexibilisebb teszi a molekulát, és optimálisabb körülményeket teremt a másodikként eluálódó enantiomer illeszkedéshez az aglikon kosarában, ennek megfelelően mindhárom kolonnán nagyobb α és R_s értékeket kaptunk.

A β -2-7 - β -2-11 és β -3-7 aminosavak mindegyike egy aromás gyűrűvel rendelkezik, mely nagymértékben változtatja meg a vegyületek fizikai és kémiai tulajdonságát. Fontos, hogy az elválasztásuk során már számolhatunk a poláris (π - π) kölcsönhatások jelenlétével is, mely a molekulák és a királis állófázis aromás gyűrűi közt jön létre. β -2-Alifás aminosavak esetén, a k'_1 értékek ugyanazon kolonnán csak kismértékben térnek el egymástól, függetlenül az oldallánc szerkezetétől. Ez a megállapítás az aromás oldallánccal tartalmazó vegyületekre is igaz, ami azt jelenti, hogy az elsőként eluálódó enantiomerek visszatartásában fontos szerep jut a nemszelektív kötőerőknek. Az aromás β -2- és -3-aminosavakhoz tartozó α és R_s értékek rendre nagyobbak voltak, mint az alkil láncot tartalmazók esetén (β -3-7 aminosavnál ez a szelektivitásra volt igaz). Ennek lehetséges magyarázata, hogy a másodikként eluálódó enantiomer visszatartásában nagyobb szerep jut a szelektív kölcsönhatásoknak, azon belül is nagy valószínűséggel a poláris kölcsönhatások járulnak hozzá leginkább a királis felismeréshez. A β -2-8 és a β -2-9 minta esetén a β -2-7 molekulához képest kapott kisebb k'_1 értékek valószínűleg az -OH csoport, mint szterikus gát jelenlétének voltak köszönhetőek a csoport helyzetétől függetlenül. Ugyanakkor a β -2-10 és β -2-11 aminosavak esetében kapott nagyobb retenciós faktorok az újabb -O- csoportok H-kötésben való részvételére vagy inkább szterikus okokra voltak visszavezethetőek, ugyanis a H-kötések kialakulásának a β -2-8 és a β -2-9 minták esetén is van esélye.

A β -2-aminosavak esetén az α és R_s értékek rendre nagyobbak adódtak, mint a β -3-aminosavaknál. Ha az oszlopok tekintetében vizsgáljuk a különböző aminosavakat, akkor a legnagyobb szelektivitást a β -2-aminosavak esetén a teikoplanin aglikont tartalmazó Chirobiotic TAG kolonnán tapasztaltuk (kivéve a β -2-1 vegyület). Az α és R_s értékek a β -3-aminosavaknál az egyaránt teikoplanin A_2 -2 szelektort tartalmazó T vagy T_2 oszlopon voltak a legnagyobbak (kivéve a β -3-1, az adott eluens összetétel mellett ezen vegyület enantiomerjeinek elválasztása egyik oszlopon sem valósult meg).

A kromatográfiai paraméterek egy részét az 1. Táblázat tartalmazza.

1. Táblázat. Kromatográfiai adatok, retenciós faktor (k'_1), szelektivitás (α) és a felbontás (R_s) értékei β -aminosavak enantiomerjeinek közvetlen elválasztása során, makrociklusos glikopeptid állófázisokon, állandó mozgófázis összetétel mellett

Vegyület	Kolonna	k'_1	α	R_s
β -2-2	T	2,34	1,15	1,20
	T_2	2,00	1,08	0,70
	TAG	3,71	1,16	1,65
β -2-5	T	2,10	1,14	1,15
	T_2	1,63	1,15	0,95
	TAG	3,36	1,22	1,30
β -2-7	T	2,35	1,31	2,50
	T_2	1,95	1,21	1,65
	TAG	4,64	1,38	3,10
β -2-11	T	2,60	1,27	3,20
	T_2	2,53	1,24	1,95
	TAG	5,40	1,44	3,35
β -3-2	T	2,50	1,04	0,50
	T_2	1,44	1,06	0,60
	TAG	3,32	1,00	0,00
β -3-5	T	1,97	1,07	0,90
	T_2	1,29	1,06	0,55
	TAG	3,23	1,00	0,00
β -3-7	T	2,10	1,00	0,00
	T_2	1,66	1,07	0,45
	TAG	3,83	1,00	0,00

Kolonna, T, Chirobiotic T, T_2 , Chirobiotic T_2 , TAG, Chirobiotic TAG; mozgófázis, 0,1% TEAA (pH=4,1)/MeOH = 30/70 (v/v); áramlási sebesség, 0,5 ml per⁻¹; detektálás, 205 nm; hőmérséklet, 25 °C

Köszönetnyilvánítás

Pataj Zoltán publikációt megalapozó kutatása a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

P.Z. köszönetét fejezi ki D.W. Armstrongnak (University of Texas at Arlington, USA) a királis kolonnáért.

Hivatkozások

- Hollósi, M. Barangolások a kiralitás birodalmában, Székfoglaló előadás, MTA, 2004.
- Easson, E. H.; Stedman, E. *Biochem. J.* **1933**, *27*, 1257-1266.
- Ogston, A.G. *Nature* **1948**, *4129*, 963-963.
- Ilisz, I.; Berkecz, R.; Péter, A. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1305-1321.
- Sharp, V.S.; Letts, M.N.; Risley, D.S.; Rose, J.P. *Chirality* **2004**, *16*, 153-161.
- Sipos, L.; Ilisz, I.; Nonn, M.; Fülöp, F.; Pataj, Z.; Armstrong, D.W.; Péter, A. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1232*, 142-151.

7. Armstrong, D.W.; Tang, Y.; Chen, S.; Zhou, Y.; Bagwill, C.; Chen, J.-R. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1473-1484.
8. Ekborg-Ott, K.H.; Kullman, J.P.; Wang, X.; Gahm, K.; He, L.; Armstrong, D.W. *Chirality* **1998**, *10*, 627-660.
9. Fanali, F.; Crucianelli, M.; De Angelis, F.; Presutti, C.; *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3035-3040.
10. Grobuschek, N.; Schmid, M.G.; Koidl, J.; Gübitz, G. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 1297-1302.
11. Péter, A.; Péter, M.; Ilisz, I.; Fülöp, F. *Biomed. Chromatogr.* **2005**, *19*, 459-465
12. Xiao, T.L.; Armstrong, D.W. *Chiral separations. Methods and protocols*, Humana press: Totowa, **2004**
13. Gasper, M.P.; Berthod, A.; Nair, U.B.; Armstrong, D.W. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2501-2514.
14. *Chirobiotic Handbook 4th Edition*, Advanced Separation Technologies Inc.: Whyppany, **2002**.
15. Guo, Y.; Gaiki, S. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5920-5938.
16. Pataj, Z.; Ilisz, I.; Aranyi, A.; Forró, E.; Fülöp, F.; Armstrong, D.W.; Péter, A. *Chromatographia* **2010**, *71*, 13-19.
17. Péter, A.; Arki, A.; Tourwe, D.; Forró, E.; Fülöp, F.; Armstrong, D.W. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1031*, 159-170.

Enantioseparation by high performance liquid chromatography: β -amino acids on antibiotic selectors

1. Introduction

The physical, biological and chemical properties determined by the symmetry and asymmetry play an especially important role in nature. Many of the organic materials from which different organisms are built up are chiral, so it is easy to understand that the presence of the enantiomers of a chiral compound in the organism can result in different interactions and therefore different effects and the pathways of the metabolism of the stereoisomers can also differ. Accordingly, a demand has arisen in pharmaceutical and other therapeutic fundamental research for the preparation of stereoisomers in enantiomerically pure form, and for the analytical qualification and quantification of pure chiral products.

Peptide-based receptor research involves the interactions of receptors with peptides with known conformations. Peptides with known conformations are prepared by the application of sterically hindered amino acids, which have special structures and special functional groups that can form conformational blocks in the structures of peptides. The preparation of peptides with known structures requires the application of enantiomerically pure amino acids.

Chirality is now a major theme in the design, discovery, development, launching and marketing of new drugs. The advances in stereoselective bioanalysis have led to a new awareness of the importance of stereoselective pharmacodynamics and pharmacokinetics, enabling differentiation of the relative contributions of enantiomers to the overall drug process.

There are several possibilities for the preparation of pure enantiomers, e.g. using enantioselective synthetic routes or the separation of enantiomers after the preparation of racemic mixtures (Figure 1). Such separations can be carried out by the traditional resolution processes or through the use of preparative chiral chromatographic techniques. The chromatographic processes play an important part not only in the production of the enantiomers, but also in the quality control of the chiral products. Chiral high-performance liquid chromatography (HPLC) is currently one of the most dynamically developing and most widely applied branches of the chiral analytics.

2. Results

Methods were developed for separation of the enantiomers of β -2- and β -3-amino acids by using chiral liquid chromatography.

The enantiomers of β -2- and β -3-amino acid analogs were separated on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases (CSPs), i.e. Chirobiotic T, T2, TAG and R. Separation could be accomplished in reversed-phase mode by using 0.1% Triethylammonium acetate (TEAA) buffer (pH 4.1)/MeOH mobile-phases with different compositions and at different temperatures.

For analytes with an alkyl side-chain, the retention factor progressively increased as the MeOH content of the mobile-phase was increased; this was probably due to the HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) effect. Similar behavior was found for γ -amino acid analogs in literature¹⁶. For analytes with an aromatic side-chain, a U-shaped curve was observed (Figure 5). At higher water content, the retention factor increased again with increasing water content, which was probably due to enhanced hydrophobic interactions in the water-rich mobile-phase.

All α values increased slightly with increasing MeOH content for all investigated unnatural amino acids (higher increases were observed for β -2-amino acids with aromatic side-chains). The R_s values progressively increased with increasing MeOH content on all CSPs.

The values of the chromatographic parameters depended on the structures of the compounds and on the CSPs applied. The possible interactions depend strictly on how the enantiomers fit into the aglycone cavity, which is determined by the structures of the analytes and CSPs and also by the mobile-phase composition (Table 1).

The elution sequence was determined in some cases, and was found to be (*R*) < (*S*) for β -amino acids.