

# Aminonaftol enantiomerek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás vizsgálata: A hőmérséklet hatása a királis elválasztásra

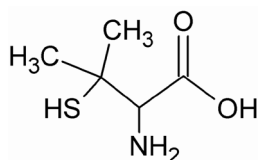
ARANYI Anita,\* PATAJ Zoltán, ILISZ István és PÉTER Antal

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

## 1. Bevezetés

A mai modern analitikai kémia egyik legfontosabb feladata a királis vegyületek, különösen a biológiai és gyógyszerészeti jelentőséggel bíró anyagok enantiomerjeinek elválasztása.

Ha egy racém gyógyszermolekula a királisan szelektív élő szervezetbe kerül, annak enantiomerjei különbözhetnek a biológiai hasznosíthatóság, megoszlás, metabolizmus, kiürülés vagy a hatás típusában és mértékében. Ilyen például a penicillamin (*S*) enantiomer formája, mely kiváló ízületi gyulladáscsökkentő hatóanyag, míg (*R*) enantiomer párja toxikus (1. ábra).



1. Ábra. Penicillamin.

Érthető tehát, hogy sztereoizomer keveréket gyógyszerhatóanyagként csak indokolt esetben lehet forgalomba hozni. Napjainkra a szabályozás olyannyira szigorodott, hogyha racemát hatóanyagot kívánunk bevezetni, akkor mindkét enantiomerre, és a racemátra is el kell végeznünk az összes klinikai és toxikológiai vizsgálatot. Így egyértelmű, hogy a racemát forgalomba hozatala többletkiadással jár, tehát a fejlesztések mára már kizárólag enantiomer tiszta vegyületek irányába folynak.<sup>1</sup>

A királis vegyületek izomerjeinek elválasztására több lehetőség adódik, melyek közül a kristályosítás (rezolválás), a kromatográfia különböző fajtáit, és a kapilláris elektroforézist alkalmazzák leggyakrabban.

A folyadékkromatográfia a mozgó-, illetve az állófázisok egyszerű változtatása révén (igen sok eltérő jellegű állófázis kapható napjainkban kereskedelmi forgalomban) a királis vegyületek elemzésének leggyakrabban alkalmazott analitikai módszere. Bármilyen kromatográfiás módszernél az elválasztás úgy történik, hogy a vizsgált vegyület időlegesen diasztereomer párt képez az állófázis vagy a mozgófázis optikailag aktív komponensével.<sup>2</sup>

## 2. Poliszacharid alapú királis szelektorok

A poliszacharid alapú kolonnák királis állófázisként történő alkalmazásának nagy hagyománya van a folyadékkromato-

gráfiában. A mikrokristályos cellulóz-triacetát alkalmazása (MCTA) - mint váz nélküli polimer szelektor – az 1970-es évekre nyúlik vissza. Napjainkban makropórusos szilikagélre felvitt poliszacharid származékokat használnak, amelyeknek jobb a mechanikai stabilitása. A 2. ábrán látható, hogy a glükóz egységek három szénatomjának OH-csoportját módosítva, különböző kölcsönhatásra alkalmas észter és karbamát csoportokat építhetünk be a molekulába.

Polimer lánc	Szelektor szerkezete	Szelektor elnevezése	Kereskedelmi név
		cellulóz <i>trisz</i> -(4-metilbenzol)	<b>a</b>
		cellulóz <i>trisz</i> -(3,5-dimetilfenilkarbamát)	<b>b</b>
		cellulóz <i>trisz</i> -(3,5-diklorofenilkarbamát)	<b>c</b>
		cellulóz <i>trisz</i> -(4-klór-3-metilfenilkarbamát)	<b>d</b>
		cellulóz <i>trisz</i> -(3-klór-4-metilfenilkarbamát)	<b>e</b>

2. Ábra. A különböző cellulóz alapú kolonnák szerkezete *a*, Chiralcel OJ; Lux Cellulose-3 *b*, Chiralcel OD, Kromasil CelluCoat, Lux Cellulose-1, RegisCell, Nucleocel Delta, Eurocel 01; *c*, Chiralpak IC; *d*, Chiralcel OZ; Lux Cellulose-4 *e*, Lux Cellulose-2;

Az ilyen állófázisokat a Daicel (Tokió, Japán) cég tervezte és hozta először forgalomba, de az utóbbi években számos új cég jelentkezett hasonló típusú kolonnákkal. Ezek az állófázisok a hordozó szilikagél minőségében, az amilóz és cellulóz lánc polimerizációs fokában, és az állófázishoz való rögzítés módjában jelentősen különbözhetnek egymástól, ezért szelektivitásukban is jelentős különbségek jelentkezhetnek.

Ha a polimerek csak fizikailag kötődnek az állófázis felületén, akkor a hordozóról való lemosás lehetősége miatt nem alkalmazható minden oldószer. Ezáltal jelentős előrehaladást jelentett a kémiailag kötött poliszacharid fázisok bevezetése. A szilikagélhez történő kémiai kötés lehetővé teszi a mozgófázisként szóba jöhető oldószerek minőségének kiterjesztését az úgynevezett nem-standard oldószerekre, például a diklórmetán, kloroform, tetrahidrofuran, dioxán, stb. Érdemes azt is megemlíteni, hogy ezek a fázisok manapság *fordított fázisú* rendszerként is alkalmazhatók,

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

azonban tudnunk kell, hogy a fázisok közötti váltással némi hatékonyság csökkenést tapasztalhatunk.

A poliszacharid alapú királis állófázisok optikai szelektivitása három fő szerkezeti tulajdonságból tevődik össze:

- \* molekuláris kiralitás: amely a glükóz csoportokon elhelyezkedő kiralitáscentrumoknak tulajdonítható,
- \* konformációs kiralitás: amely a szénhidrátlánc lineáris (cellulóz alapú), vagy helikális (amilóz alapú) konformációs szerkezetének tulajdonítható, és
- \* szupramolekuláris kiralitás: amely a szomszédos polimerláncok királis rendezettségéből adódik.

A poliszacharid állófázisok esetében az izomerekkel  $\pi$ -sav  $\pi$ -bázis, dipól-dipól és hidrogénhidás kölcsönhatások alakulhatnak ki. Mindemellett fontos szerepet játszhat a nagyobb terjedelmű aromás oldalláncok szterikus hatása is. A merev, viszonylag nagy térkitöltésű aromás szubsztituensek ebben az esetben a felületen helyezkednek el, és jelentősen befolyásolják a H-híd kötés kialakulását, ugyanis az „mélyen elrejtett” a szénlánc mentén.

A  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatás számos királis állófázisnál játszik döntő szerepet. Ha az aromás részen elektronküldő, vagy elektronhiányos csoport van szubsztituensként, akkor a két aromás gyűrű között kölcsönhatás alakulhat ki. Az állófázist, amelynél elektron hiány van, nevezhetjük az általános sav-bázis elmélet értelmében Lewis savnak, amelynél az elektronsűrűség megnövekszik Lewis bázisnak. A vizsgálendő vegyületeknél általában az aromás gyűrű elektron hiányos vagy elektron többlete van, ez az alapja, hogy egy elektron hiányos aromás rész és egy elektron többlettel rendelkező enantiomer között  $\pi$ -sav- $\pi$ -bázis kölcsönhatás alakulhat ki. A karbamát és észter funkció csoportok stabilizálják a molekula-szelektor komplexet, illetve erősítik a  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatást.

A poliszacharid állófázisoknak ezt az általános kötésmechanizmusát IR és NMR mérések is alátámasztják.<sup>3</sup>

### 3. A hőmérséklet királis kromatográfiás elválasztásra gyakorolt hatásának rövid irodalmi áttekintése

A kromatográfiás paraméterek hőmérséklet függésének vizsgálata a királis kromatográfiás retenciós mechanizmus feltérképezésének egyik lehetséges módja is lehet. Ennek során kapott termodinamikai adatok ugyan egyensúlyi rendszerekre igazak - mely nem feltétlen teljesül a kromatográfiás folyamatok dinamikus rendszereire - 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:

$$RT \ln K = -\Delta G^\circ \quad (1)$$

Ha megvizsgáljuk a két enantiomer standard szabadentalpia változásának a különbségét, következtetéseket tudunk

levonni a mechanizmusról:

$$\Delta G_2^\circ - \Delta G_1^\circ = \Delta(\Delta G^\circ) \quad (2)$$

A már ismert Gibbs-Helmholtz formulát (1), az előző egyenletbe behelyettesítve a következő összefüggéshez jutunk:

$$-\Delta(\Delta G^\circ) = RT \ln (k_2/k_1) \quad (3)$$

A  $k_1$  és a  $k_2$  a két enantiomer retenciós faktorát jelöli, ezáltal az  $\alpha$  elválasztási tényező a két enantiomer csúcs egymáshoz viszonyított helyzetét adja meg. Az elválasztási tényezőt behelyettesítve az előző egyenletbe a következő kifejezést kapjuk:

$$-\Delta(\Delta G^\circ) = RT \ln \alpha \quad (4)$$

Ismerjük még a standard szabadentalpia változás különbségének definícióját is a Gibbs-függvényből:

$$\Delta(\Delta G^\circ) = \Delta(\Delta H^\circ) - T\Delta(\Delta S^\circ) \quad (5)$$

Így  $\ln \alpha$  egyszerűsítések után kifejezhető a következő formulával, melyet kromatográfiában használatos van't Hoff egyenletnek is hívunk:

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta(\Delta H^\circ)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S^\circ)}{R} \quad (6)$$

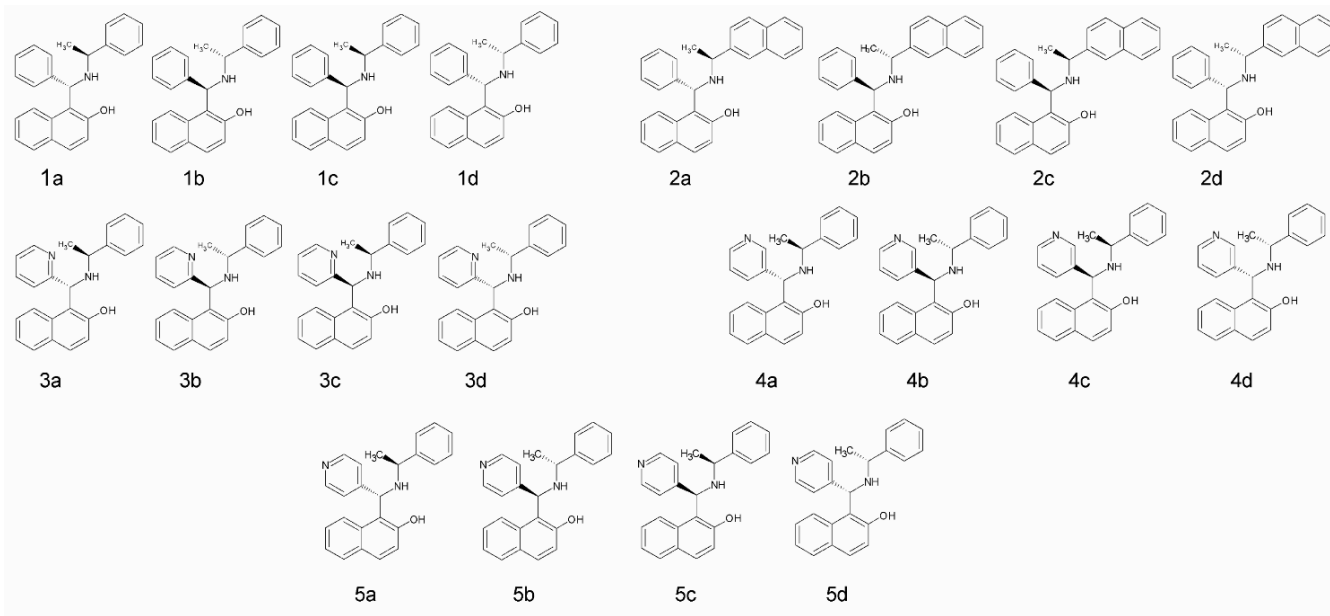
Tehát az egyenlet szerint  $\ln \alpha$ -t  $1/T$  függvényében ábrázolva egyenest kapunk, melynek meredeksége  $-\Delta(\Delta H^\circ)/R$ , tengelymetszete, pedig  $\Delta(\Delta S^\circ)/R$ .

A királis kromatográfiában a van't Hoff ábrázolások gyakran eltérnek az egyenestől, ami a felület inhomogén jellegére utal és vegyes retenciós mechanizmust feltételez.<sup>4,5</sup> Ráadásul egy királis molekula retenciója nemkirális és királis kölcsönhatások eredménye, melyek aránya jelentősen változhat a kromatográfiás körülményekkel.

Ha a  $\Delta(\Delta H)^\circ$  és  $\Delta(\Delta S)^\circ$  értéke negatív, a folyamat entalpiavezérelt, mint a legtöbb esetben. A másodikként eluálódó enantiomer stabilisabb komplexet képez a szelektorral, mint az elsőként eluálódó, kedvezőtlen entrópiatagot eredményezve. Az elválasztási tényező csökken a hőmérséklet emelkedésével. Ha az elválasztás hőmérséklete eléri azt a pontot ( $T_{iso}$ ) ahol az entalpia tagot az entrópia tag kiegyenlíti, ezen a hőmérsékleten  $\alpha = 1,0$ , azaz a két enantiomer együtt eluálódik.  $T_{iso}$  számítható az  $\ln k$  vs  $1/T$  egyenesekből. A  $T_{iso}$  hőmérséklet felett a folyamat entrópiavezérelt és fordított elúciós sorrend figyelhető meg. Az elválasztási faktor növekszik a hőmérséklet emelkedésével, együtt a kolonna hatékonyságának növekedésével. Ez a két kedvező hatás teszi az entrópiavezérelt elválasztásokat különlegessé.

A  $T_{iso}$  hőmérséklet létét elsőként Koppenhoefer and Bayer valószínűsítette.<sup>6</sup> Az első közvetlen kísérleti bizonyíték Gil-Av és mtsai.<sup>7</sup> valamint Schurig és mtsai.<sup>8</sup> gázkromatográfiás munkáiból ismert.

A folyadékkromatográfiában alkalmazható szűk hőmérséklet tartomány miatt az entrópiavezérelt királis elválasztás és az elúciós sorrend változása a hőmérséklettel csak ritkán figyelhető meg. Az elúciós sorrend változása mellett alapvonalra történő elválasztás kis és nagy hőmérsékleten



**3. Ábra.** Az aminonaftol enantiomerek szerkezete: **(1)** 1- $\{N-(1\text{-fenilmetil})[1\text{-fenil(aminometil)}]\}$ -naftalin-2-ol; **(2)** 1- $\{N-(1\text{-naftilmetil})[1\text{-fenil(aminometil)}]\}$ -naftalin-2-ol; **(3)** 1- $\{N-(1\text{-piridin-2-ilmetil})[1\text{-fenil(aminometil)}]\}$ -naftalin-2-ol; **(4)** 1- $\{N-(1\text{-piridin-3-ilmetil})[1\text{-fenil(aminometil)}]\}$ -naftalin-2-ol; **(5)** 1- $\{N-(1\text{-piridin-4-ilmetil})[1\text{-fenil(aminometil)}]\}$ -naftalin-2-ol.

szintén ritkán volt észlelhető. Egyedül Fulde és Frahm<sup>9</sup> szotalol enantiomerek elválasztása esetén Cellubiohydrolase-I-típusú kolonnán figyeltek meg alapvonalra történő ( $R_s > 1,5$ ) elválasztást mind kis mind nagy hőmérsékleteken.

Yao és mtsai<sup>10</sup> tapasztalata szerint az izo-enantioszelektív hőmérséklet ( $T_{iso}$ ) környékén nem mindig sikerül elválasztani az enantiomer vegyületpárt. A szerzők ezt úgynevezett „hőmérséklet indukált láthatatlan régió”-nak nevezték („temperature-induced blind zone”) mely néhány tíz fok hőmérséklet tartományra terjed ki.

#### 4. A hőmérséklet hatása az aminonaftol enantiomerek királis kromatográfiás elválasztására

A vizsgált öt aminonaftol analóg szerkezeti képletét a 3. ábrán tüntettük fel. Ezek az anyagok két kiralitáscentrumot tartalmaznak, így a következő konfigurációjú sztereoizomerek léteznek:  $1S,1'S$  (a)– $1R,1'R$  (b) és  $1R,1'S$  (c)– $1S,1'R$  (d). A Cahn-Ingold-Prelog szabály következtében a 3 vegyület konfigurációja a nitrogén *orto* helyzete miatt megváltozik-  $1R,1'S$  (a)– $1S,1'R$  (b);  $1S,1'S$  (c)– $1R,1'R$  (d). Az  $1S,1'S$  és  $1R,1'R$  valamint az  $1S,1'R$  és  $1R,1'S$  konfigurációk enantiomer viszonyban, míg a konfigurációk többi párosításában ezek a sztereoizomerek diasztereomer viszonyban állnak egymással. A diasztereomerek elvileg akirális környezetben is elválaszthatóak, viszont a fent említett enantiomer párok elválasztásához feltétlenül királis környezet szükséges.

A hőmérséklet kromatográfiás paraméterekre gyakorolt hatását Lux Cellulose-1 oszlopon vizsgáltuk, mind az öt aminonaftol analóg esetén  $5\text{ }^\circ\text{C} - 40\text{ }^\circ\text{C}$  tartományban, a 2c-2d enantiomerpár esetén  $-5\text{ }^\circ\text{C} - 80\text{ }^\circ\text{C}$  hőmérséklet tartományban is (1. Táblázat).

Egy adott eluens összetételnél - heptán/2-PrOH/DEA=90/10/0,1 (v/v/v) - a hőmérséklet emelkedésével a retenció

faktor minden általunk vizsgált anyagnál csökkent. Ez annak tulajdonítható, hogy nagyobb hőmérsékleten a rendszer belső energiája nagyobb, ezáltal a vegyületek hőmozgása nő, így könnyebben legyőzik az állófázissal kialakított kölcsönhatásokat. A szelektivitás illetve felbontás a hőmérséklet emelkedésével a retenciósfaktorral párhuzamosan csökkent.

A heptán/2-PrOH/DEA=90/10/0,1 (v/v/v) eluens összetételnél kivételt képezett a 2c-2d analóg, melyre  $-5\text{ }^\circ\text{C} - 15\text{ }^\circ\text{C}$  tartományban a szelektivitás és felbontás először csökkent, majd  $70\text{ }^\circ\text{C}$  után kismértékben nőtt a hőmérséklet emelkedésével (1. Táblázat).

Az elválasztást kísérő standard entalpia, standard entrópia és standard szabadentalpia változás értékeit a van't Hoff egyenlet segítségével grafikus úton határoztuk meg, ahol a  $-\Delta H^\circ/R$  az egyenes meredekségével, míg a  $\Delta S^\circ/R + \ln\phi$  a tengelymetszettel egyezik meg. A hőmérsékletfüggésből számolt termodinamikai adatokat a 2. Táblázatban foglaltuk össze. A  $\Delta H^\circ$  és  $\Delta S^\circ$  ( $\Delta S^\circ = \Delta S^\circ + R \ln\phi$ ) értékek minden vegyületnél negatívnak adódtak.

A kialakuló kölcsönhatások standard entalpiaváltozás szempontjából kedvezményezettek, de a standard entrópiaváltozás szempontjából már nem. A negatív standard entrópia a rendezettség növekedését fejezi ki (a molekula több ponton kötődik az állófázishoz) de ezt a standard entalpiaváltozás mértéke meghaladta, így a standard szabadentalpia változás is negatívnak adódott (kivétel a 3c-3d enantiomerjei, ahol nem tapasztaltunk elválást).

A 2. Táblázat adatai alapján a másodikként eluálódott enantiomer esetében a  $\Delta H^\circ$  értékek negatívabbak, mint az elsőként eluálódott enantiomeré, azaz a másodikként eluálódó komponens kölcsönhatása az állófázissal energetikailag kedvezőbb. Az entrópia értékeket tekintve a nagyobb  $-\Delta S^\circ$  értékek azt jelentik, hogy a jobban

visszatartott enantiomer jóval stabilabb átmeneti komplexet képez az állófázissal, mozgásában erősebben korlátozott.

**1. Táblázat.** Az elsőként eluálódó enantiomer retenciósfaktora ( $k'_1$ ), az elválasztási tényező ( $\alpha$ ) és a felbontás ( $R_s$ ) változása aminonaftol analógok esetén különböző hőmérsékleten

Minta	Eluens	$k'_1, \alpha, R_s$	Hőmérséklet (°C)					
			5	10	15	20	30	40
1a,1b	a	$k'_1$	1,22	1,10	1,04	0,95	0,78	0,66
		$\alpha$	1,39	1,32	1,27	1,25	1,17	1,12
		$R_s$	3,43	2,73	2,48	2,25	1,33	0,99
1c,1d	a	$k'_1$	1,48	1,33	1,23	1,10	0,92	0,74
		$\alpha$	1,29	1,28	1,27	1,26	1,24	1,23
		$R_s$	2,86	2,79	2,77	2,26	2,21	2,14
2a,2b	a	$k'_1$	2,69	2,23	2,09	1,77	1,50	1,23
		$\alpha$	1,76	1,68	1,65	1,54	1,52	1,41
		$R_s$	5,14	5,12	4,97	4,70	4,49	4,08
2c,2d	a	$k'_1$	1,51	1,33	1,17	1,16	0,98	0,82
		$\alpha$	1,12	1,06	1,00	1,00	1,00	1,00
		$R_s$	1,54	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00
2c,2d	b	$k'_1$	2,89	2,48	-	2,23	1,99	1,70
		$\alpha$	1,09	1,08	-	1,00	1,03	1,09
		$R_s$	1,16	0,93	-	0,00	0,60	1,18
3a,3b	a	$k'_1$	0,81	0,75	0,68	0,63	0,54	0,47
		$\alpha$	1,22	1,20	1,18	1,17	1,15	1,13
		$R_s$	1,88	1,49	1,38	1,24	1,00	0,84
3c,3d	a	$k'_1$	1,61	1,43	1,27	1,16	0,98	0,82
		$\alpha$	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
4a,4b	a	$k'_1$	3,50	3,30	3,13	2,91	2,52	2,16
		$\alpha$	2,07	1,99	1,93	1,85	1,74	1,65
		$R_s$	7,66	7,64	7,61	7,58	7,53	7,35
4c,4d	a	$k'_1$	6,16	5,62	5,15	4,65	3,84	3,17
		$\alpha$	1,40	1,37	1,35	1,32	1,27	1,23
		$R_s$	4,11	4,08	4,05	3,96	3,84	3,33
5a,5b	a	$k'_1$	8,06	7,50	6,95	6,57	5,45	4,78
		$\alpha$	1,17	1,16	1,15	1,13	1,11	1,09
		$R_s$	1,79	1,76	1,74	1,67	1,64	1,06
5c,5d	a	$k'_1$	8,92	8,28	7,48	6,82	5,92	5,01
		$\alpha$	1,88	1,83	1,79	1,75	1,69	1,60
		$R_s$	9,66	7,66	7,10	7,04	7,00	6,60

Kolonna, Lux Cellulose-1; Eluens, **a**, heptán/2-PrOH/DEA=90/10/0,1 (v/v/v), **b**, heptán/2-PrOH/DEA=98/2/0,1 (v/v/v); áramlási sebesség, 0,5 mL/perc; detektálás 230 nm.

**1. Táblázat.** (folytatás) Az elsőként eluálódó enantiomer retenciósfaktora ( $k'_1$ ), az elválasztási tényező ( $\alpha$ ) és a felbontás ( $R_s$ ) változása aminonaftol analógok esetén különböző hőmérsékleten

Minta	Eluens	$k'_1, \alpha, R_s$	Hőmérséklet (°C)					
			-5	0	50	60	70	80
2c,2d	a	$k'_1$	1,80	1,67	0,69	0,60	0,50	0,43
		$\alpha$	1,16	1,15	1,00	1,00	1,05	1,12
		$R_s$	1,75	1,60	0,00	0,00	0,37	0,44
2c,2d	b	$k'_1$	-	2,97	1,47	-	-	-
		$\alpha$	-	1,13	1,15	-	-	-
		$R_s$	-	1,90	1,90	-	-	-

Kolonna, Lux Cellulose-1; Eluens, **a**, heptán/2-PrOH/DEA=90/10/0,1 (v/v/v), **b**, heptán/2-PrOH/DEA=98/2/0,1 (v/v/v); áramlási sebesség, 0,5 mL/perc; detektálás 230 nm

A két enantiomerre vonatkozó entalpia- és entrópiaváltozás különbségeket tekintve, a 4a-4b kölcsönhatása a Lux Cellulose-1 állófázissal a legnagyobb  $-\Delta(\Delta H^\circ)$  értéket eredményezte, míg 1c-1d enantiomerpárra a legkisebb  $-\Delta(\Delta H^\circ)$  adódott. A  $-\Delta(\Delta S^\circ)$  értéke a 2a-2b és 4a-4b analógok esetén volt a legnagyobb (2. Táblázat). A  $\Delta(\Delta S^\circ)$  értékét nagyrészt az állófázishoz kötött két enantiomerre vonatkozó szabadsági fokok különbsége valamint az állófázishoz való kötődés során felszabaduló oldószer molekulák száma határozza meg.

A  $-\Delta(\Delta G^\circ)_{298}$  értéke azt sugallja (2. Táblázat), hogy a 2a-2b (naftilgyűrűt tartalmazó analóg) és a 4a-4b és az 5c-5d analógok (piridil-csoportot tartalmazó enantiomerpár ahol a N-atom 3 vagy 4 helyzetben van) igen hatékonyan kötődnek a szelektorhoz.

A heptán/2-PrOH/DEA=90/10/0,1 (v/v/v) eluens összetétel-nél a 2. Táblázat adatai alapján számoltuk a  $T_{iso}$  hőmérsékletet, ahol az enantioszelektivitás megszűnik és az elúciós sorrend megfordul. A legtöbb esetben a  $T_{iso}$  hőmérséklet jóval meghaladta a szobahőmérsékletet; entalpiavezérelt elválasztást tapasztalunk. A 2c-2d enantiomerpárra a  $T_{iso}$  hőmérséklet 38 °C (4.A. ábra, 2. Táblázat). -5 °C-tól kezdődően  $\alpha$  csökkent a hőmérséklet emelésével majd a  $T_{iso}$  hőmérséklet közelében, egy tartományban elválasztást nem tapasztaltunk.

Tovább emelve a hőmérsékletet azonban  $\alpha$  újra nőtt. A 2c-2d aminonaftol analóg esetében heptán/2-PrOH/DEA=90/10/0,1 (v/v/v) eluens összetétel-nél ez a tartomány 20 °C és 60 °C között volt (4.A. ábra).

Ha megnézzük a 2. Táblázatban szereplő  $\Delta(\Delta H^\circ)$  és  $\Delta(\Delta S^\circ)$  értékeket, láthatjuk, hogy negatívak, vagyis az elválasztásoknál az entalpiaváltozás dominál. A 2c-2d analóg esetén azonban a  $T_{iso}$  hőmérséklet alatt negatív, a  $T_{iso}$  hőmérséklet felett pedig pozitív értékeket kapunk. Ha elérjük a  $T_{ison}$  hőmérsékletet az entalpia hozzájárulást az entrópia változása kompenzálja. Ekkor az  $\alpha=1$  tehát a két enantiomer nem választható el. A  $T_{iso}$  hőmérséklet feletti tartományban azonban a folyamatot az entrópiaváltozás határozza meg, az enantiomerek újra elválaszthatóak, az elúciós sorrend pedig megfordul. Ezt a jelenséget mutatja az 5.A. ábra.

**2. Táblázat.** Termodinamikai paraméterek,  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ,  $\Delta(\Delta H^\circ)$ ,  $\Delta(\Delta S^\circ)$ ,  $\Delta(\Delta G^\circ)$ , korrelációs koeficiens ( $R^2$ ) és  $T_{iso}$  hőmérsékletértékei Lux Cellulose-1 kolonnán.

Minta	Eluens	Sztereoizomer	$-\Delta H^\circ$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$-\Delta S^\circ$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	Korr. koef. ( $R^2$ )	$-\Delta(\Delta H^\circ)$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$-\Delta(\Delta S^\circ)$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$-\Delta(\Delta G^\circ)_{298K}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$T_{iso}$ (°C)
1	a	b(1)	14,0	48,2	0,9955	3,0	8,7	0,5	80
		a(2)	17,0	56,9	0,9991				
	a	c(1)	14,1	47,2	0,9961	1,0	1,6	0,5	373
		d(2)	15,1	48,8	0,9966				
2	a	a(1)	15,6	48,1	0,9911	4,3	11,0	1,0	121
		b(2)	20,0	59,1	0,9904				
	a	c(1)*	12,6*	41,8*	0,9970	2,0*/-2,0**	6,5*/-6,5**	>0,2* (273K)	38
		d(2)*	14,6*	48,3*	0,9997			0,1** (323K)	
	b	c(1)*	8,1*	20,8*	0,9908	3,7*/-3,7**	12,7*/-12,7**	>0,2* (273K)	22
		d(2)*	11,8*	33,5*	0,9965			0,4** (323K)	
3	a	b(1)	11,4	42,8	0,9997	1,6	4,0	0,4	117
		a(2)	13,0	46,8	0,9995				
	a	c(1)	13,8	45,8	0,9988	-	-	-	-
		d(2)	13,8	45,8	0,9988				
4	a	b(1)	10,0	25,4	0,9980	4,7	10,8	1,5	160
		a(2)	14,7	36,3	0,9987				
	a	c(1)	13,8	34,3	0,9903	2,8	7,2	0,7	114
		d(2)	16,6	41,5	0,9964				
5	a	b(1)	11,0	22,0	0,9947	1,5	4,1	0,3	93
		a(2)	12,5	26,1	0,9963				
	a	d(1)	12,0	24,7	0,9983	3,2	6,1	1,4	244
		c(2)	15,1	30,8	0,9984				

Kolonna, Lux Cellulose-1; mozgófázis, **a**, heptán/2-PrOH/DEA=90/10/0,1 (v/v/v), **b**, heptán/2-PrOH /DEA=98/2/0,1 (v/v/v); (1) és (2), elsőként és másodikként eluálódó enantiomer; áramlási sebesség, 0,5 mL/perc; detektálás 230 nm;  $\Delta S^\circ = \Delta S^\circ + R \ln \Phi$  ahol  $\Phi$  a fázisarány;  $R^2$ ,  $\ln k' - 1/T$  függvény korrelációs koeficiense. A vizsgált hőmérséklettartomány: 5 °C - 40 °C; **2c-d** esetén: -5 °C - 80 °C; \*  $T_{iso}$  hőmérséklet alatt; \*\*  $T_{iso}$  hőmérséklet felett.

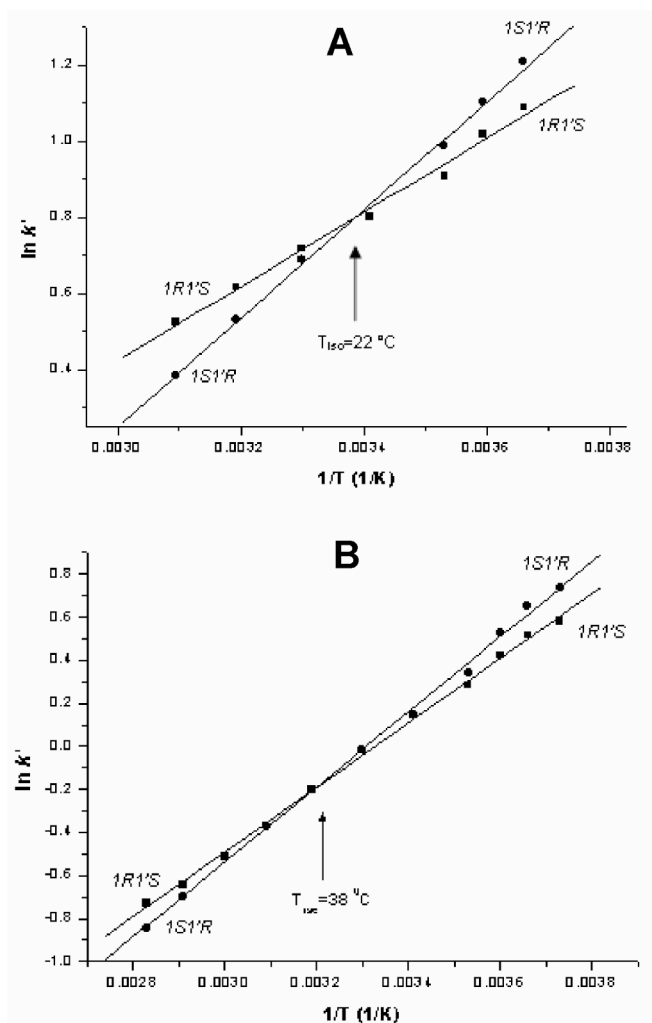
Az 4.A. ábrán és a 4. Táblázatban bemutatott adatok alapján az említett enantiomerek a vizsgált hőmérséklet tartományban kis felbontással, rövid időkülönbséggel eluálódtak, így a retenciósi időök szórásából adódóan az elúciós sorrend egyértelmű meghatározása is kétséges. Heptán/2-PrOH/DEA=98/2/0,1 (v/v/v) eluens összetételénél különböző hőmérsékleteken megismételve a 2c-2d enantiomerpár elválasztását mind kis, mind nagy hőmérsékleten a szelektivitás (és felbontás) jelentősen javult és a „hőmérséklet indukált láthatatlan régió” jelentősen szűkült (4.B. ábra). A racém mintához 2c enantiomert keverve a csúcsterületek arányából egyértelműen bizonyítható volt az elúciós sorrend változása a  $T_{iso}$  hőmérséklet környezetében. A heptán/2-PrOH/DEA=98/2/0,1 (v/v/v) eluens összetételénél kivitelezett mérésekkel újabb példán bizonyítottuk, hogy lehetséges az enantiomerek alapvonalra történő elválasztása mind az enantialpia-, mind az entrópiavezérelt hőmérséklet

tartományban. Ezen mérésekhez tartozó kromatogramokat a 5. ábrán mutatjuk be.

Összegezve az eredményeket kijelenthető, hogy az intermolekuláris kölcsönhatások kialakulása az állófázis és a mintavegyületek között energia felszabadulásával jár, ezek a kölcsönhatások általában exotermek, és a megfelelő entrópiaváltozások – bizonyos eseteket kivéve - negatívak.

### Köszönetnyilvánítás

A. A. köszönetét fejezi ki Fülöp Ferenc akadémikusnak és Szatmári Istvánnak (SZTE, Gyógyszerkémiai Intézet) a minták rendelkezésünkre bocsátásáért, valamint a GenLab kft-nek (Phenomenex, Torrance, USA) a Lux királis kolonnáért. A munka a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0052 támogatásával készült.



4. Ábra. A 2 aminonaftol analóg c-d enantiomerjeinek  $\ln k'$  értékei  $1/T$  függvényében; Kolonna, Lux Cellulose-1; eluens, A, heptán/2-PrOH/DEA=90/10/0,1 (v/v/v), B, heptán/2-PrOH/DEA=98/2/0,1 (v/v/v); áramlási sebesség, 0,5 mL/perc; detektálás 230 nm.

## Hivatkozások

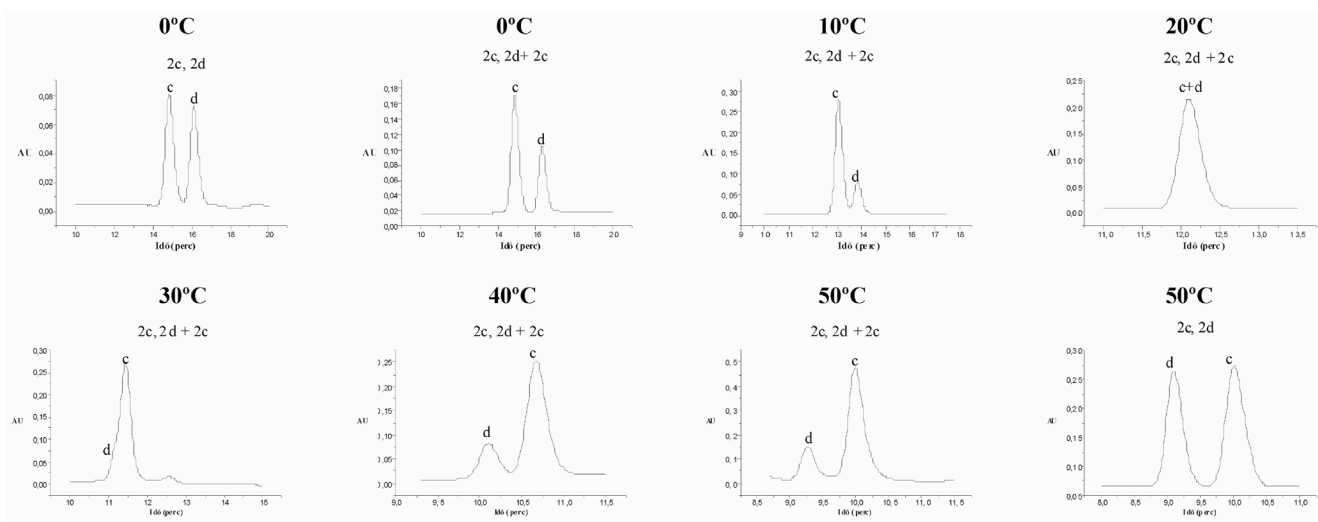
- Hollósi, M. Laczkó, I. Majer, Zs. *A sztereokémia és kiroptikai spektroszkópia alapjai*, Nemzeti Tankönyvkiadó Rt: Budapest, **2004**.
- Fekete, J. *Folyadékromatográfia*, Jáva-98 Kft: Budapest, **2003**.
- Piette, V., Lammerhofer, M., Lindner, W., Crommen, J. *J. Chromatogr. A* **2003**, 987, 421-427.
- Fornstedt, T., Sajonz, P., Guichon, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1254-1264.
- Fornstedt, T., Sajonz, P., Guichon, G. *Chirality* **1998**, 10, 375-381.
- Koppenhoefer, B., Bayer, E., *Chromatographia* **1984**, 19, 123-130.
- Watabe, K., Charles, R., Gil-Av, E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 192-194.
- Schurig, V., Betschinger, F. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 873-888.
- Fulde, K., Frahm, A. *J. Chromatogr. A* **1999**, 858, 33-43.
- Yao, B.; Zhan, F.; Yu, G.; Chen, Z.; Fan, W.; Zeng, X.; Zeng, Q.; Weng, W. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 5429-5435.

## Aminonaphthol enantioseparation by high performance liquid chromatography: The effect of temperature on chiral separation

### 1. Introduction

The separation of enantiomers of chiral compounds by chromatography methods and related techniques is one of the most important tasks in modern analytical chemistry, especially in the analysis of compounds of biological and pharmaceutical interest.

On a molecular level of living organisms, chirality is an important property of the building blocks of life, such as amino acids and sugars, and therefore peptides, and proteins. In biological systems, these biomolecules exist in only one of the possible enantiomeric forms and display different responses to one of a pair of enantiomers of drugs, agrochemicals, food additives, fragrances, etc. Accordingly chirality is also a major concern in the pharmaceutical industry. When the enantiomers of a drug are administered into a chiral selective living system, these enantiomers often exhibit



5. Ábra. A hőmérséklet hatására bekövetkező elúciós csere; Kolonna: Lux Cellulose-1, eluens, heptán/2-PrOH/DEA=98/2/0,1 (v/v/v); áramlási sebesség, 0,5 mL/perc; detektálás, 230 nm; hőmérséklet, 0-50°C.

differences in distribution, metabolic and excretion behavior, and action. The differences in biological properties of enantiomers arise from the differences in protein transport and binding, the kinetics of their metabolism and their stability in the environment.

As a result, the pharmaceutical industry has raised its emphasis on the generation of enantiomerically pure compounds in the search for safer and more effective drugs. The US Food and Drug Administration (FDA) has required evaluation of each enantiomer in the development of stereoisomeric drugs.

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. 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.

The present paper describes normal-phase HPLC methods for the enantioseparation of new racemic 1-(phenylethylamino)methyl-2-naphthol or 1-(naphthylethylamino)methyl-2-naphthol analogs possessing two chiral centers (Fig. 4). These HPLC methods rely on the use of recently commercialized polysaccharide-based chiral CSP: *tris*-(3,5-dimethylphenyl)-carbamoylated cellulose (Lux Cellulose-1).

In chromatographic enantioseparations, the van't Hoff plot shows the relationship between the chromatographic data and the column temperature. This relationship is useful in order to study the retention mechanism.

The van't Hoff plots often deviate from linearity, possibly as a result of the inhomogeneity of the CSP surface, leading to a mixed retention mechanism. Additionally, there are both achiral and chiral contributions to retention that can vary with a wide variety of experimental parameters.

If  $\Delta(\Delta H)^\circ$  and  $\Delta(\Delta S)^\circ$  values are both negative, the enantioseparation is enthalpically driven, as in the common case. The second-eluted enantiomer forms a more stable complex with the selector than does the first-eluted enantiomer, with a more unfavorable entropy for enantioseparation. The separation factor decreases with increasing temperature. When the column temperature reaches a point referred to as the enantioselective temperature ( $T_{iso}$ ), the enthalpy contribution is wholly compensated by the entropy term. At this point  $\alpha = 1.0$ , and the two enantiomers coelute.  $T_{iso}$  can be calculated from  $\ln k$  vs  $1/T$  curves. Above  $T_{iso}$ , the enantioseparation is entropically driven, and a reversal of the elution sequence for a pair of enantiomers is observed. The separation factor increases with increasing temperature in this domain, and the column

efficiency increases concurrently. These two features make entropically driven enantioseparation especially attractive.

## 2. Results

In order to investigate the effects of temperature on the chromatographic parameters, a variable-temperature study was carried out Lux Cellulose-1 column, usually over the temperature range 5-40 °C (Table 1).

A comparison of the retention factors in Table 1 reveals that all of the recorded values decreased with increasing temperature (similar tendencies were measured at other mobile phase compositions). In most cases an increase of the separation temperature lowered the separation factor,  $\alpha$ , and the resolution,  $R_s$ , while for 1a,1b and 2c,2d at high temperature increase, in  $\alpha$  and  $R_s$  were observed.

The second-eluting enantiomers have more negative  $\Delta S^*$  values, and it is likely that they have fewer degrees of freedom on the CSP, i.e. they are held at more points or are less able to move or rotate. It is widely accepted that both enantiomers undergo the same nonspecific interactions, whereas the more strongly retained one is subject to additional stereospecific interactions.

The differences in the changes in enthalpy and entropy,  $\Delta(\Delta H)^\circ$  and  $\Delta(\Delta S)^\circ$ , are presented in Table 2. The interactions of 4a,4b on the Lux Cellulose-1 were characterized by the highest negative  $\Delta(\Delta H)^\circ$  value, while 1c,1d exhibited the least negative  $\Delta(\Delta H)^\circ$ .

The data were used to calculate the temperature,  $T_{iso}$ , at which the enantioselectivity balanced out and the elution sequence changed (Table 2). In most cases,  $T_{iso}$  was considerably higher than room temperature; enthalpically driven enantioseparation was obtained. For 2c,2d,  $T_{iso}$  was 38 °C (Fig. 4). From -5 °C,  $\alpha$  decreased with increasing temperature; then after a domain where no separation occurred,  $\alpha$  increased with increasing temperature (Table 2). In a domain around the isoenantioselective temperature, enantioseparation could not be obtained. This domain may be referred to as a "temperature-induced blind zone" in chiral recognition<sup>10</sup>. A "temperature-induced blind zone" was similarly observed for 1a,1b in the temperature range 60-90 °C (Table 2). The essence of this phenomenon is enthalpy-entropy compensation. Outside the blind zone, enthalpically- or entropically-driven enantioseparation can be observed. Farther away from the blind zone, better molecular recognition should be obtained and the elution sequence also changes, as can be seen in the case of 2c,2d with change of the column temperature (Fig. 5).

The elution sequence was determined in all cases, but no general rule could be found.