

## A KUTATÁSI EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE

Az optikai izomerek eltérő biológiai sajátságaira a „Contergan” botrány hívta fel a figyelmet és azóta mind nagyobb erőfeszítés folyik -főleg a gyógyszeriparban- az egyes izomereknek „optikailag tiszta” formában való kinyerésére. Ez az erőfeszítés érthetővé válik annak a prognózisnak a fényében, mely 2030-ra az új gyógyszerek mintegy a felét királis molekulának jósolja.

A vizsgált vegyületek jelentős hányada nemfehérje alkotó aminosav vagy vele kapcsolatba hozható biológiai vagy analitikai szempontból fontos vegyület volt. Ezeknek az aminosavaknak peptidekbe való beépítésével olyan analógokhoz juthatunk, melyek speciális szerkezeti elemeket tartalmaznak, megváltoztatva a peptid sztereoelektromos, szterikus és konformációs viszonyait. A cél a peptid térbeliségének szabályozása, stabilitásnövelés és végső soron hatásmódosítás. A nemfehérje alkotó aminosavak enantiomerjei a peptidbe építve a peptidnek sokszor igen eltérő biológiai sajátságot kölcsönöznek, rámutatva a királisan tiszta anyagokkal való munka alapvető fontosságára.

Kutatócsoportunk 1992 óta foglalkozik alapkutatói szinten királis vegyületek elválasztásával, három korábbi OTKA pályázat (T 71/91, T 14898 és T 029460) anyagi támogatásának felhasználásával. Ezen az alapon született kutatási eredményeink széleskörű hazai és külföldi kapcsolatok kiépítését tették lehetővé, ami alapul szolgál a következő évekre is. Nagyrészt ezen eredményeknek köszönhetően a témavezető 1998-tól elnyerte a Széchenyi Professzori és 2002-től a Széchenyi István Ösztöndíjat, és 2004-ben megvédte Akadémiai Doktori Értekezését.

A kutatási programokkal célunk olyan új módszerek fejlesztése volt, melyeket elsősorban a peptidkémia hasznosít. Ezek az új módszerek magukban foglalták a királis elválasztások, enzimatis reakciók és a peptid analízis területeit. Célul tűztük továbbá a különféle királis szelektorok és modell molekulák közötti kölcsönhatások vizsgálatát a királis elválasztások mechanizmusának mélyebb megismerésére.

### 1. Vizsgált anyagok

A tervidőszak során az általunk vizsgált nemfehérje alkotó aminosavak és egyéb királis vegyületek a következő főbb csoportokba sorolhatók:

1.  $\alpha$ - alifás és aromás szubsztituenst tartalmazó glicin analógok
2. alifás szubsztituenst tartalmazó fenilalanin analógok
3. alifás és aromás szubsztituenst tartalmazó prolin analógok
4. alifás szubsztituenst tartalmazó tirozin analógok
5. szubsztituált triptofán származékok  
 $\beta$ -alkil- és aril-szubsztituált (metil-, 2-propil, 2-pentil-, fenil-, 2,5-dimetoxifenil-) triptofánok
6. cikloalkán vázat tartalmazó aminosavak ( $\beta$ -aminosavak)  
 ciklopentán-, ciklohexán-vázás aminosavak
7.  $\beta$ -3-homo aminosavak  
 3-szubsztituált alkil-, aril-, heteroaril- $\beta$ -3-homo aminosavak
8. metil-szubsztituált aminosavak:  
 $\beta$ -Me-Phe,  $\beta$ -Me-Tyr,  $\beta$ -Me-Tic,  $\beta$ -Me-Trp
9. „spin-jelölt” ciklusos  $\beta$ -aminosavak:  
*cisz-* és *transz-*4-amino-1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-3-karbonsav ( $\beta$ -TOAC)  
*transz-*3-amino-1-oxil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidin-4-karbonsav ( $\beta$ -POAC)
9. szekunder aminosavak

pirrolidin-, piperazine-, piperidine-2-karbonsavak és származékai, morfolin-, tiomorfolin-3-karbonsavak

10. 1- és 3-metil-szubsztituált 1,2,3,4-tetrahidro-6,6-dimetoxi-izokinolinok

11.  $\beta$ -laktám sztereoizomerek

biciklusos, és aril-szubsztituált analógok

12. 1- $\alpha$ (aminobenzil)-2-naftol, 2- $\alpha$ (aminobenzil)-1-naftol analógok (Betti bázisok)

13. bikalutamid és szintézisének királis közti és melléktermékei

Ezen aminosavak egy részének szintézise flamand-magyar együttműködés keretében valósult meg Dirk Tourwé (Vrije Universiteit Brussel), Norbert de Kimpe (University Ghent), Tóth Géza (SzBK) közreműködésével. A tetrahidro-izokinolinok,  $\beta$ -laktámok,  $\beta$ -aminosavak, Betti bázisok Fülöp Ferencsel (SZTE, Gyógyszerkémiai Intézet), a spin-jelölt aminosavak Jan-Paul Mazaleyrral (Versailles), a triptofán analógok János Sápival (Reims), a bikalutamid és származékai Lukács Ferencsel (Cf Pharma) való együttműködés eredménye.

## 2. Aminosavak analízise

Az előzőekben bemutatott **aminosavak** optikai izomerjeinek szétválasztására és optikai tisztaságának ellenőrzésére királis folyadékkromatográfiai módszereket alkalmaztunk. Folyadékkromatográfiai oldalról vizsgáltuk az elválasztás különböző lehetőségeit:

1. oszlop előtti származékképzés,
2. optikailag aktív állófázisok.

**2.1. Az oszlop előtti származékképzésre** az irodalomban jól bevált 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glükopiranozil-izotiocianát (GITC) és a Marfey által bevezetett 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanin amid (FDAA) mellet sikeresen alkalmaztunk az előző OTKA pályázatban (T 029460) kifejlesztett két új királis származékképzőnket, úgymint a (1*S*,2*S*)- illetve (1*R*,2*R*)-1,3-diacetoxi-1-(4-nitrofenil-2-propil)izotiocianátot [(1*S*,2*S*)- illetve (1*R*,2*R*)-DANI] és az (*S*)-*N*-(4-nitrofenoxikarbonil)fenilalanin-metoxietil-észtert [(*S*)-NIFE]. A származékképzés optimális körülményeinek megkeresése mellett, feladatunk volt a kromatográfiai elválasztás kidolgozása. Ez magában foglalta a megfelelő kolonna kiválasztását, eluensrendszer, pH, detektálás stb. optimalizálását.

Nagyszámú méréseink alapján néhány általános következtetést is levonhatunk:

Az FDAA és a GITC származékok összehasonlításában kevés kivételtől eltekintve, az FDAA rövidebb idő alatt nagyobb felbontással voltak elválaszthatók, mint a GITC-származékok.

A négy származékképző összehasonlításában általában az (*S*)-NIFE származékok választhatók el a leghatékonyabban (1- és 3-metil-szubsztituált 1,2,3,4-tetrahidro-6,6-dimetoxi-izokinolinok DANI-származék formájában választhatók el a legjobban).

A szerves módosítók közül a *MeOH* hatásosabb volt, mint az *MeCN*. Ennek valószínű oka, hogy a mozgófázisba az alkohol új H-hidak kialakítására képes az aminosavakkal.

A pH beállítására használt alkotók közül a *TFA* hatásosabb volt, mint az *acetát*- vagy *foszfát* puffer.

Az *elúciós sorrend enantiomerek* elválasztása esetén függött a származékképző minőségétől. A *diasztereomerek* (két aszimmetria centrumot tartalmazó sztereoizomerek) sorrendjét nemcsak származékképző, hanem az *eluens szerves módosítójának* minősége, sőt a *kolonna minősége* is befolyásolta.

Királis származékképzőket alkalmaztunk a „spin-jelölt” aminosav (2, 3, 4 és 18. számú közlemény)\*, a  $\beta$ -3-homo aminosav enantiomerek (5 és 7), az alifás és aromás szubsztituent tartalmazó prolin analóg enantiomerek (8),  $\beta$ -metil-aminosav (10) és a tetrahidro-izokinolin analóg (15) enantiomerek elválasztására.

## 2.2. Optikailag aktív állófázisok alkalmazása

Ezen fázisok alkalmazása az utóbbi években került előtérbe kutatásainkban. Lehetőségünk volt ezen a téren *Daniel Armstronggal*, *Wolfgang Lindnerrel* és *Myung Ho Hyunnal* való együttműködésre, akik a világ vezető kromatográfusai és élenjárók új királis állófázisok tervezésében és kivitelezésében. Így alkalmaztuk az Armstrong által kifejlesztett ciklodextrin- és antibiotikum-alapú fázisokat, a Lindner által fejlesztett kinin-alapú állófázisokat valamint a Myung Ho Hyun által kifejlesztett koronaéter alapú állófázist, kiegészítve a rendelkezésünkre álló egyéb kolonnákkal.

### Az alkalmazott királis kolonnák:

**koronaéter alapvázú:** (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav-alapú, 5  $\mu$ m, 150x4.0 mm, (Myung Ho Hyun ajándéka);

**makrociklusos glikopeptid alapvázú:** *Chirobiotic T, T2 és TAG, Chirobiotic R, Chirobiotic V és VAG* [mind 5  $\mu$ m, 250x4,6 I.D.mm, Astec, Whippany, USA]

**ciklodextrin (CD) alapvázú:** *Cyclobond I 2000* ( $\beta$ -CD), *Cyclobond I 2000 RSP* (R,S-2-hidroxi-propil-éter tartalmú  $\beta$ -CD), *Cyclobond I 2000 SN* ((S)-naftiletil-karbamát tartalmú  $\beta$ -CD), *Cyclobond DMP* (3,5-dimetilfenil-karbamát tartalmú  $\beta$ -CD), *Cyclobond III* ( $\alpha$ -CD), [mind 5  $\mu$ m, 250x4,6 mm, Astec];

**cellulóz alapvázú:** *Chiralcel OD* (tris-3,5-dimetilfenil-karbamát tartalmú cellulóz), 5  $\mu$ m (150x4,0 mm), *Chiralcel OD-RH*, 5  $\mu$ m, (150x4,0 mm), Daicel;

**kinin alapvázú,** gyenge anioncserélő típusú: 2,5-diizopropil-karbamát tartalmú kinin alapú állófázis: *Prontosil AX-QN-2*, és 2,5-diizopropil-karbamát tartalmú kinin alapú állófázis: *Prontosil 120-5tBuCQN* [mind 5  $\mu$ m, 150x4,6 mm, Bishoff, Leonberg, Németország].

**Ligandumcsere alapján működő oszlop:** D-penicillamine szelektort tartalmazó oszlop (5  $\mu$ m, 250x4,6 I.D.mm, Astec)

Nagyszámú méréseink alapján néhány összehasonlító megállapítást tehetünk a királis oszlopok alkalmazására. Figyelembe véve az elválasztási mechanizmusok bonyolultságát, az itt közölt ajánlások iránymutató jelleggel bírnak.

### 2.2.1. Makrociklusos glikopeptid alapú kolonnák alkalmazása

A *Chirobiotic T, T2, TAG, R és V* oszlopok a leghatékonyabbnak mutatkoztak a *nemfehérje-alkotó aminosav* sztereoizomerek elválasztásában. Az öt szelektor jól kiegészítette egymást, az általunk vizsgált aminosav rendszerek, *kevés kivételtől* eltekintve, valamelyik oszlopon jól elválaszthatók voltak. Ezeken az oszlopokon sikeresen választottunk el Phe, Tyr, cikloalkán vázas  $\beta$ -aminosav enantiomereket (6. számú közlemény), 3-szubsztituált alkil-, aril-, heteroaril- $\beta$ -3-homo aminosav enantiomereket (5., 7. és 20), szekunder aminosav enantiomereket (9).

Legújabb eredményeink szerint a teicoplanin aglikon változata, a *Chirobiotic TAG* oszlop, eredményesebben alkalmazható  $\alpha$ -aminosav enantiomerek elválasztására.

---

\*A közlemények számozása a Jelentéshez csatolt „Közlemények” sorszáma alapján történt.

$\beta$ -Aminosav enantiomerek esetén nem ilyen egyértelmű a TAG oszlop előnye. Úgy tűnik, hogy a cukorrészek eltávolítása sztérikusan kedvez az  $\alpha$ -aminosavak „kosárban” való elhelyezkedésének, míg  $\beta$ -aminosavak esetén a cukor részekkel való kölcsönhatás inkább segíti a királis rezolúciót. Hasonló megállapítást tehetünk a *Chirobiotic T* és *T2* összehasonlításában. A *T2* oszlop nagyobb borítottága és újfajta „spacer”-ek alkalmazása alkalmasabbá teszi az oszlopot a királis aminosav analízisre. Az oszlopok további előnye, hogy preparatív célokra is kiválóan alkalmazhatók és a víz/metanol eluens rendszer eltávolítása gondmentes.

### 2.2.2. A 2,5-diizopropil-karbamoil- és tert.-butil-karbamoil-kinin alapú állófázisok alkalmazása

A kinin alapú állófázisokon a szabad aminosav enantiomerek az esetek többségében nem választhatók el. Ehhez az aminosavakat amino-csoportjukon át kell alakítani, a legtöbb esetben valamilyen aromás és/vagy  $\pi$ -savas jellegű védőcsoportot alkalmazunk (benzoi-, benziloxikarbonil-, 3,5-dinitrobenzoi-, 3,5-dinitrobenziloxikarbonil-, 2,4-dinitrofenil-csoport). A kinin alapú, gyenge anioncserélő sajátságú „*Prontosil AX-QN-2*” oszlopot sikeresen alkalmaztuk  $\alpha$ -szubsztituált prolin analóg sztereoizomerek elválasztására. Meg kell jegyezni, hogy ezek a sztérikusan erősen gátolt aminosav enantiomerek *közvetlen* módszerrel csak ezen a királis kolonnán voltak elválaszthatók és a *közvetett* módszerek közül is csak az (S)-NIFE alkalmazása volt sikeres (1. sz. közlemény).

Részletesen vizsgáltuk a glicin és fenilalanin analógok enantiomerjeinek elválasztását tert.-butil-karbamoil-kinin alapú állófázison (28. és 29. sz. közlemények). Az elválasztások hőmérséklet függéséből néhány általános következtetést vontunk le az elválasztás mechanizmusára vonatkozóan. Megállapítottuk, hogy az elsődleges elektrosztatikus kölcsönhatás az aminosav deprotonált karboxil-csoportja és a kinin protonált tert.-aminocsoportja között jön létre. Járulékos kölcsönhatások a  $\pi$ -sav -  $\pi$ -bázis, dipol-dipol és a hidrofób kölcsönhatások. Megállapítottuk továbbá, hogy glicin analógok esetén a  $\pi$ -sav -  $\pi$ -bázis kölcsönhatások, míg a fenilalanin analógok esetén a C3-atomon jelenlévő szubsztituensek bírnak jelentős hatással a királis elválasztásra.

Ezen kolonnák alkalmazásának hátránya, hogy kolonna előtti származékképzést (nem királis) igényel, ami megnöveli az analízis időt és preparatív kromatográfiás szempontból sem előnyös.

### 2.2.3. Ligandumcsere alapján működő oszlop alkalmazása

A D-penicillamint mint szelektort tartalmazó oszlopot sikeresen alkalmaztuk szekunder aminosavak (pirrolidin-, piperazine-, piperidine-2-karbonsavak és származékai, morfolin-, tiomorfolin-3-karbonsavak) enantiomerjeinek elválasztására (21. sz. közlemény). Az aminosavak szerkezete alapján következtetéseket vontunk le az elválasztást irányító lehetséges koordinatív kölcsönhatások milyenségére.

### 2.2.4. Ciklodextrin alapú állófázisok alkalmazása

A ciklodextrint tartalmazó szelektorok közül -ebben a periódusban- az  $\alpha$ -ciklodextrint tartalmazó oszloppal értünk el sikeres eredményeket a  $\beta$ -alkil-triptofán analógok elválasztásában (22. sz. közlemény). Megállapítottuk, hogy az *eritro*-sztereoizomerek jobban elválaszthatók mint a *treo*-sztereoizomerek, és az elválasztás inkább függött a  $\beta$ -szubsztituensek minőségétől, mint a kromatográfiás paramétereiktől.

### 2.2.5. A (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav-alapú állófázis alkalmazása

Ezt az állófázist sikeresen alkalmaztuk  $\beta$ -aryl-szubsztituált  $\beta$ -3-homo aminosav enantiomerek elválasztására (25. sz. közlemény). Feltérképeztük a szerves és a savas jellegű módosítók hatását az elválasztásra. Megállapítottuk, hogy a szubsztituensek helyzete és minősége döntő hatással van a retencióra és a királis rezolúcióra.

### 2.2.6. Királis gázkromatográfia alkalmazása

Ezen vizsgálatokhoz Chirasil-L-Val alapú kolonnát, detektorként illetve MS detektort alkalmaztunk. Az utóbbi lehetővé tette a peptidszintézis és a peptidhidrolízis során bekövetkező racemizáció megkülönböztetését. E mérésekre brüsszeli együttműködésünk során került sor.

## 3. $\beta$ -Laktám sztereoizomerek elválasztása

A  $\beta$ -laktámok az utóbbi évtizedben mind biológiai, mind preparatív-kémiai szempontból egyre nagyobb jelentőséggel bírnak. Nemfehérje-alkotó aminosavak fontos kiindulási anyagai, enzimatiszta rezolválásuk során tiszta enantiomerekhez juthatunk. Ezért is fontos királis analízisük. Kettős és hármas gyűrűt tartalmazó  $\beta$ -laktám sztereoizomereket választottuk el *Chirobiotic T* és *TAG*, *Chiralcel OD-H* és *OD-RH* valamint *Cyclobond DMP* oszlopokon (13. 24., 26. és 27. sz. közlemény). A *Chirobiotic TAG*, a *Chiralcel OD-H* és a *Cyclobond DMP* oszlop kitűnt jobb elválasztó képességével a másik két oszlophoz képest. Méréseinkkel bizonyítottuk, hogy az esetek egy részében a hőmérséklet emelésével jobb felbontáshoz juthatunk, mint az egyéb kromatográfiai paraméterek változtatásával.

## 4. Betti bázisok elválasztása

A Betti-bázisok újabban felismert biológiai jelentősége irányította a figyelmet királisan tiszta formában való előállításukra és így királis analízisükre. Az 1- $\alpha$ (aminobenzil)-2-naftol és a 2- $\alpha$ (aminobenzil)-1-naftol analógok enantiomerjei sikeresen voltak elválaszthatók *Chiralcel OD-H* és *Cyclobond DMP* oszlopokon normál fázisú kromatográfiai módban (16. és 31. sz. közlemény).

Megállapítottuk, hogy az  $\alpha$ -aminobenzil gyűrűn lévő szubsztituensek helyzete befolyásolja a retenciót és a királis rezolúciót. *Ab initio* számításokkal rávilágítottunk az 1- és 2-naftol analógok elválasztásában meglévő különbségek lehetséges okára. Az elválasztások hőmérséklet függése a rezolúció entalpia vezérelt voltára utalt.

## 5. Bicalutamid és szintézise közti- és melléktermékeinek analízise

Az (*R*)-bicalutamid fontos prosztatarák ellenes gyógyszer. Királis szintézise megköveteli a végtermék valamint a közti és melléktermékek elválasztását és azonosítását. Ehhez dolgoztunk ki módszert *Chiralcel OD-H*, *Chirobiotic T*, *TAG* és *R*, *Cyclobond I 2000 SN* oszlopok alkalmazásával. Módszerünkkel a szintézis összes terméke két párhuzamos kromatográfiai futtatással kimutatható volt *Chirobiotic TAG* és *Cyclobond I 2000 SN* oszlopok felhasználásával.

## 6. Peptidek analízise

A fentebb említett aminosavak Boc és/vagy Fmoc származékai főleg opioid peptidekbe kerülnek beépítésre (Flamand-magyar TÉT projekt része). Új  $\delta$ -antagonista TIPP (Tyr-Tic-Phe-Phe) és az újonnan felfedezett  $\mu$ -agonista endomorfín-1 és -2 (Tyr-Pro-Trp-Phe és Tyr-Pro-Phe-Phe) módosítására elsősorban konformációsan gátolt és  $\beta$ -aminosavakat alkalmaztunk. Mivel a peptidszintézis a legtöbb esetben racém aminosavakkal történt illetve a szintézis során racemizáció lépett fel, elsődlegesen szükséges volt a peptid diasztereomerek kromatográfiás szétválasztása (analitikai és fél-preparatív méretben), majd az aminosavak konfigurációjának meghatározása. Ehhez két tényező volt szükséges: a peptidhidrolízis optimális kivitelezése és királisan tiszta ismert konfigurációjú aminosavak standardként való alkalmazása.

Ezen munkák megvalósításában, a szintézisek kivitelezésével, Dirk Tourwé, Fülöp Ferenc és Tóth Géza működött közre (**11.**, **12.**, **17.** és **30.** sz. közlemények). A fentiekben vizsgált aminosavak többségét biológiai hatású TIPP és endomorfín analógokba építettük be.

### 6.1. TIPP analógok

H-Tyr-Tic-*eritro*-D- $\beta$ -MeCha-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Tyr-Tic-*eritro*-L- $\beta$ -MeCha-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Tyr-Tic-*treo*-L- $\beta$ -MeCha-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Tyr-Tic-*treo*-D- $\beta$ -MeCha-Phe-NH<sub>2</sub>

H-Tyr-Tic-*eritro*-D- $\beta$ -MeCha-Phe-OH  
 H-Tyr-Tic-*eritro*-L- $\beta$ -MeCha-Phe-OH  
 H-Tyr-Tic-*treo*-L- $\beta$ -MeCha-Phe-OH  
 H-Tyr-Tic-*treo*-D- $\beta$ -MeCha-Phe-OH

H-Dmt-Tic-*eritro*-D- $\beta$ -MeCha-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-Tic-*eritro*-L- $\beta$ -MeCha-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-Tic-*treo*-D- $\beta$ -MeCha-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-Tic-*treo*-L- $\beta$ -MeCha-Phe-NH<sub>2</sub>

H-Dmt-Tic-*eritro*-D- $\beta$ -MeCha-Phe-OH  
 H-Dmt-Tic-*eritro*-L- $\beta$ -MeCha-Phe-OH  
 H-Dmt-Tic-*treo*-D- $\beta$ -MeCha-Phe-OH  
 H-Dmt-Tic-*treo*-L- $\beta$ -MeCha-Phe-OH

### 6.2. Endomorfín-1 és endomorfín-2 analógok

H-Tyr-Pro-Trp-*eritro*-D- $\beta$ -MePhe-NH<sub>2</sub>  
 H-Tyr-Pro-Trp-*eritro*-L- $\beta$ -MePhe-NH<sub>2</sub>  
 H-Tyr-Pro-Trp-*treo*-D- $\beta$ -MePhe-NH<sub>2</sub>  
 H-Tyr-Pro-Trp-*treo*-L- $\beta$ -MePhe-NH<sub>2</sub>

H-Tyr-Pro-*eritro*-D- $\beta$ -MePhe-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Tyr-Pro-*eritro*-L- $\beta$ -MePhe-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Tyr-Pro-*treo*-D- $\beta$ -MePhe-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Tyr-Pro-*treo*-L- $\beta$ -MePhe-Phe-NH<sub>2</sub>

H-Tyr-Pro-Phe-*eritro*-D- $\beta$ -MePhe-NH<sub>2</sub>  
 H-Tyr-Pro-Phe-*eritro*-L- $\beta$ -MePhe-NH<sub>2</sub>

H-Tyr-Pro-Phe-*treo*-D- $\beta$ -MePhe-NH<sub>2</sub>  
 H-Tyr-Pro-Phe-*treo*-L- $\beta$ -MePhe-NH<sub>2</sub>

H-Dmt-(1*S*,2*S*)-Acpc-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-(1*R*,2*R*)-Acpc-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-(1*S*,2*R*)-Acpc-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-(1*R*,2*S*)-Acpc-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>

H-Dmt-(1*S*,2*S*)-Achc-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-(1*R*,2*R*)-Achc-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-(1*S*,2*R*)-Achc-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-(1*R*,2*S*)-Achc-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>

H-Dmt-(1*S*,2*S*)-Acpc-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-(1*R*,2*R*)-Acpc-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-(1*S*,2*R*)-Acpc-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-(1*R*,2*S*)-Acpc-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

H-Dmt-(1*S*,2*S*)-Achc-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-(1*R*,2*R*)-Achc-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-(1*S*,2*R*)-Achc-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>  
 H-Dmt-(1*R*,2*S*)-Achc-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

*Dmt*: 2',6'-dimetiltirozín; *Acpc*, 2-aminociklopentán-karbonsav; *Achc*, 2-aminociklohexán-karbonsav;  
 $\beta$ -MeCha,  $\beta$ -metilciklohexil-alanin

Mivel e peptidek szintézise során a nemfehérje alkotó aminosavak vagy racém formában kerültek beépítésre vagy a szintézis során racemizáció következett be, módszereket dolgoztunk ki a diasztereomer párok elválasztására, fél preparatív méretekben is. Az így tisztított peptidekben a nem természetes aminosavak konfigurációjának megállapítása az általunk kifejlesztett kromatográfias módszerekkel történt, a peptidek hidrolízisét követően.

Mikrohullámú technikát alkalmaztunk a fehérjealkotó és nemfehérje alkotó aminosavakból felépülő peptidek hidrolízisére. Korábbi méréseink során (A. Péter et al., *Peptide Res.*, 6 (1993) 48) bizonyítottuk, hogy a hidrolízisre érzékeny fehérjealkotó aminosavak nagyobb hozammal és kisebb racemizációval nyerhetők vissza mikrohullámú technikát alkalmazva.

**6.3.** Enzimatisus folyamatokat vezettünk be a nemfehérje alkotó aminosav racemátok rezolválására.

Ez a módszer egyik lehetőség királisan tiszta standardok előállítására. A nemfehérje alkotó, racém aminosavak közül nem mindegyik reagált enzimekkel, ezért többféle enzimet alkalmaztunk: L- és D-aminosav-oxidáz, lipáz PS.

Az enzimatisus vizsgálatok másik nagy területe a peptidek stabilitás vizsgálata volt. A Flamand-magyar TÉT projekt egyik célja olyan új biológiailag aktív peptidek tervezése, melyek többek között elnyújtott hatással rendelkeznek. E jelleg vizsgálatának egyik módszere a peptidek stabilitásvizsgálata enzimatisus bontási módszerekkel, például patkányagy homogenizátum alkalmazásával. Patkányagy homogenizátum alkalmazásával sikerült felderíteni, hogy a 4 helyzetben (2*S*,3*S*)- $\beta$ -metilfenilalaninnal helyettesített endomorfín-1 és -2 valamint a 2. helyzetben Pro helyett (1*S*,2*R*)-Acpc vagy (1*S*,2*R*)-Achc-t tartalmazó analógok enzimstabilitása a legjobb.

## 7. Királis fluoreszcens származékképző reagens szintézise

Két új királis származékképzőt szintetizáltunk. Az (*S*)-2-naftoxi-propionil klorid előállításához első lépésben beta-naftolból kiindulva 2-bróm-propionsavval való reakcióban (*R,S*)-2-naftoxi-propionsavat állítottunk elő. Az (*R,S*)-2-naftoxi-propionsav rezolválását (*R*)-(+)-feniletilamin illetve (*S*)-(-)-feniletilaminnal való sópár képzéssel oldottuk meg. A 2-naftoxi-propionsavból tionil-kloriddal illetve oxalil-kloriddal való reakcióban nyertük a megfelelő 2-naftoxi-propionil kloridot.

Az (*R,S*)-1-izotiocianatometil-2-(naftalén-2-iloxi)-etilészter előállításához első lépésben  $\pi$ -naftolt epiklórhidrinnel reagáltattunk. A keletkező naftalén-2-iloximetil-oxiránt metanolos közegben ammóniával reagáltatva 1-amino-3-(naftalén-2-iloxi)-propanolhoz jutottunk, melyet jégecetes közegben acetilkloriddal acileztünk. Az 1-aminometil-2-(naftalén-2-iloxi)-etilészterből metil-klorid és tiofoszgen hozzáadásával nyertük a kívánt izotiocianát terméket.

A származékképző reagenseket  $\alpha$ - és  $\beta$ -aminosav enantiomerek elválasztásában próbáltuk ki. A kísérletek jelenlegi állása szerint nem találtunk olyan reakció körülményeket melyben a savklorid illetve az izotiocianát-csoportot tartalmazó reagens stabilis lett volna, a reagensek vizes rendszerekben még a származékképzés előtt elbomlottak (az aminosavak oldhatósága miatt szükséges a vizes rendszerek használata).

## 8. Új királis állófázisok szintézise

HPLC-s kromatográfias oszlop készítése céljából szilikagélből, 3-aminopropil-trimetoxiszilánból és *ösztron-3-metiléterből* olyan töltetanyagot állítottunk elő, amely alkalmas lehet különböző királis és akirális vegyületek sikeres elválasztására. Első lépésben a

szilikagélt 3-aminopropil-trimetoxiszilánnal reagáltattuk el. Az aminopropilcsoport mennyiségét sav-bázis titrálással 1,07 mmol/g –ban határoztuk meg. Királis szelektorként az *ösztron-3-metilétert* választottuk, a következő okok miatt: négy királis szénatomot tartalmaz; a 17-es helyzetű ketofunkció alkalmassá teszi kondenzációs reakciókban való részvételre, így egy megfelelő módon előkészített (aminopropilezett) szilikagéltre egyszerűen felvihető; a keletkező Schiff-bázist redukálva egy olyan származékhoz juthatunk, amely közvetlenül a sztereoszelektíven kialakuló új aszimmetriacentrum mellett tartalmazza az intermolekuláris kölcsönhatásra képes nitrogént; aromás molekularészt tartalmaz, így az esetlegesen szintén aromás szétválasztandó molekulákkal  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatás kialakítására van lehetőség.

Az elkészített szteroiddal módosított szilikagél alapú fázisból zagytöltéssel HPLC oszlopot készítettünk. Az oszlopon megkíséreltük az *ösztron-3-metiléter* és 13 $\alpha$ -*ösztron-3-metiléter* keverékének, valamint biciklusos karbonsav-észterek enantiomerpárjának elválasztását. Normál fázisú körülmények között, hexán/diklórometán/izopropanol 95/5/1 arányú keverékét eluensként alkalmazva sikerült elválasztani mind a szteroid epimereket, mind a biciklusos karbonsav enantiomereket.

A királis állófázis szintéziséhez a másik modell vegyületünk a *kólsav* volt. A kólsav három hidroxilcsoportja és a karboxilcsoportot tartalmazó oldallánc számos lehetőséget biztosít aromás molekularészek bevitelére, illetve az aminopropilezett szilikagélhez történő kapcsoláshoz.

Aromás molekularészlet jelenléte a molekulában  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatások kialakulását teszi lehetővé a szelektor és a szétválasztandó királis vegyület molekulái között. Az aromás csoport bevitele céljából *p*-aminobenzoésavval savamidképzési reakciót hajtottunk végre az oldallánc karboxilcsoportján. Az átalakítás során – a peptidkémiaiából ismert vegyes anhidrides módszerrel- trietil-amin és klórszénsav-etilészter alkalmazása mellett egy újabb szabad karboxilcsoportot tartalmazó savamidhoz, a 4-(kol-24-il-)-aminobenzoésavhoz jutottunk. Így nemcsak egy aromás gyűrűt, hanem egy újabb poláris csoportot (amidkötést) is bejuttattunk. Ilyen típusú királis szelektor eddig még ismeretlen az irodalomban.

Az oszlopot fordított-fázisú körülmények között tesztvegyületekkel vizsgáltuk. A tesztvegyületek egyik csoportját képezték a  $\beta$ -blokkolók, úgymint a oxprenolol, pindalolol, metaprolool, propranolol, etanolol. Eluensként víz/metanol, víz/acetonitril és 0,1% vizes trietil-ammónium-acetát (pH=4,1)/metanol eluens rendszereket alkalmaztunk. Tapasztalatunk szerint a szelektor a fent felsorolt  $\beta$ -blokkolóokra a körülmények széles tartományban való változtatása mellett is alig mutatott sztereoszelektivitást.

A tesztvegyületek másik csoportját a  $\beta$ -metil-aminosavak képezték, úgymint az *eritro- és treo*- $\beta$ -MeTyr,  $\beta$ -MePhe,  $\beta$ -MeTrp és a  $\beta$ -metil-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-3-karbonsav (Tic). 0,1% vizes trifluoecetsav/metanol eluens rendszereket alkalmazva a fenti aminosav sztereoiszomereket szabad aminosav formában nem, míg *N*-2,4-dinitrofenil-származék formájában sikerült elválasztani (kivéve a  $\beta$ -MeTrp analógokat). Az elválasztásokat a kólsav alapú kolonnán tovább folytatjuk, jelenleg a megfelelő vegyületek kiválasztása az egyik cél.

---

Köszönettel tartozom az **OTKA Zsűrinek** az 1991 óta folyamatosan nyújtott támogatásért, mellyel lehetővé tette egy új kutatási irányzatnak az SZTE, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén való meghonosítását. Ezzel egyrészt lehetővé vált a külföldi kapcsolatok kialakítása és megerősítése, másrészt a kromatográfiai módszerek oktatásának kutatási háttere is megvalósult. A 2003-ban elnyert támogatás (**T 042451**) lehetőséget nyújtott e tématerület további művelésére és bővítésére.

A kutatási témával kapcsolatos már megjelent közlemények a „*Közlemények*” részben találhatóak. A nemzetközi folyóiratokban illetve 'Proceedings' kötetekben megjelent közlemények megoszlása: **29+2=31**. A közlemények összesített impakt faktora: **~65.5**. A nemzetközi és hazai előadások és poszterek száma: **25+9=34**.

Dr. Péter Antal  
egyetemi tanár  
témavezető