

**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Szerves Kémia és Technológia Tanszék**

Tudományos Diákköri Dolgozat

**Piridino-18-korona-6-éter alapú új királis állófázisú kromatográfiás
rendszer optimalizálása**

Földi Tamás

I. éves MSc vegyészmérnök hallgató

Témavezetők:

Dr. Huszthy Péter, egyetemi tanár

Dr. Balogh György Tibor, c. egyetemi docens

Konzulensek:

Lévai Sándor

Dr. Kupai József



RICHTER GEDEON

Budapest, 2012

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ez úton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek **Dr. Huszthy Péternek** és **Dr. Balogh György Tibornak**, akik bizalmukat belém fektetve helyet, eszközöket és szellemi támogatást biztosítottak számomra ahhoz, hogy a kutatómunkában részt vehessek és ez a dolgozat elkészülhessen.

Köszönettel tartozom konzulenseimnek, **Lévai Sándornak** és **Dr. Kupai Józsefnek**, akikhez a munkám során felmerülő kérdéseimmel mindig bizalommal fordulhattam.

Köszönöm a **Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Nyrt.-nek** , hogy munkám elvégzéséhez helyet és lehetőséget biztosított.

TARTALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	1
1. BEVEZETÉS	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. Koronaéter alapú királis állófázisok előállítása és alkalmazásuk enantiomerek elválasztására	6
3. ELMÉLETI RÉSZ	13
3.1. Enantiomer elválasztás	13
3.2. Vendégmolekulák	14
4. KÍSÉRLETI RÉSZ	17
4.1. A kromatográfiás módszer fejlesztése	17
5. ALKALMAZOTT KÉSZÜLÉKEK, MÓDSZEREK	33
5.1. A kromatográfiás oszlop előállítása	33
5.2. Kromatográfia.....	34
6. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	35
IRODALOMJEGYZÉK	36

1. BEVEZETÉS

A molekuláris felismerés egy gyakran előforduló jelenség a természetben, amely alatt azt értjük, amikor egy molekula egy azt körülvevő halmazból képes szelektíven kiválasztani egy másik molekulát vagy iont, és azzal rendezett szerkezetet alkotni. A jelenség speciális esete az enantiomer-felismerés, amely egy vendégmolekula enantiomerjeinek királis gazdamolekulával történő megkülönböztetését jelenti, vagyis különböző stabilitású komplexek képződnek az enantiomerekkel (termodinamikusan kontroll), illetve a komplexképzés vagy a komplexdisszociáció sebessége (kinetikus kontroll) különbözhet. Az így létrejött komplexeket intermolekuláris másodlagos kötőerők tartják össze, melyek több ponton hatnak. Jó példa erre a szubsztrát specifikus kapcsolódása az enzim aktív centrumához vagy az immunrendszer működésének alapját képező antigén–antitest kölcsönhatás.

Az 1960-as évekig a molekuláris felismerést kizárólag biológiai jelenségként tartották számon, mely elképzelést *C. J. Pedersen* a koronaéterek szintézisével és komplexképzésük vizsgálatával változtatta meg [1].

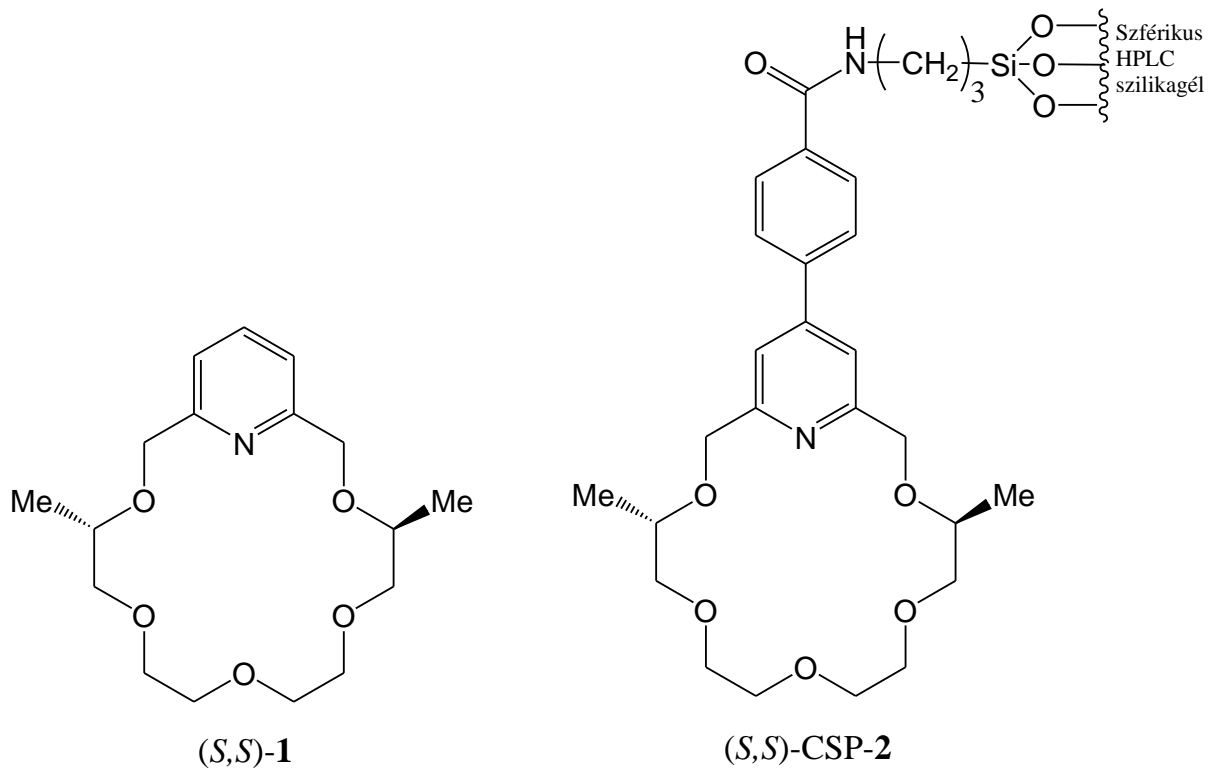
Az enantiomerkeverékek szétválasztása kiemelkedő fontosságú a gyógyszeriparban.

A királis koronaéterek enantiomer-felismeréséről elsőként *Cram és munkatársai* számoltak be protonált primer aminok enantiomerjeinek sikeres elválasztását követően [2]. Ma a királis koronaétereket szelektív komplexképzésük miatt széles körben alkalmazzák mesterséges szelektormolekulákként. Számos tudományos közlemény vizsgálja a piridino-18-korona-6-éter típusú ligandumok protonált primer aminok, valamint aminosavak és származékaik enantiomerjei esetén mutatott megkülönböztető képességét.

Jelen dolgozat témája az (*S,S*)-1 enantiomertiszta piridino-18-korona-6-éter új módon történő szilikagélhez kötésével előállított királis állófázis [(*S,S*)-CSP-2] (1. ábra) kromatográfiás tulajdonságainak LC/DAD módszerrel végzett vizsgálatának és eredményeinek bemutatása.

Munkám során tizenöt analittal végeztem a kromatográfiás rendszer optimális paramétereinek meghatározását. Ezen legfontosabb paraméterek a mozgófázis összetétel, valamint a savas és bázikus módosítók koncentrációja voltak.

Ily módon törekedtem olyan módszer kifejlesztésére, amely a vizsgált anyagok lehető legszélesebb körére jól alkalmazható.



1. ábra A vizsgált szelektor és a királis állófázis szerkezete

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A kromatográfia napjaink legszélesebb körben alkalmazott analitikai elválasztási módszere. Ezen belül is a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia kiemelt jelentőségű, amit a gyógyszeriparban főként a minőségbiztosítás során hatóanyag, illetve szennyező anyag tartalom meghatározásban alkalmazzák. Felhasználják továbbá az élelmiszeranalitikában tartósítószer, adalékok, toxinok és vitaminok mennyiségi vizsgálatában, valamint környezetanalitikai mérések során.

Szintén nagy jelentőségű az optikailag aktív vegyületek enantiomerjeinek elválasztása királis állófázisokkal, esetenként használják preparatív méretben is egyes elegyek tisztítására vagy tiszta enantiomerek előállítására.

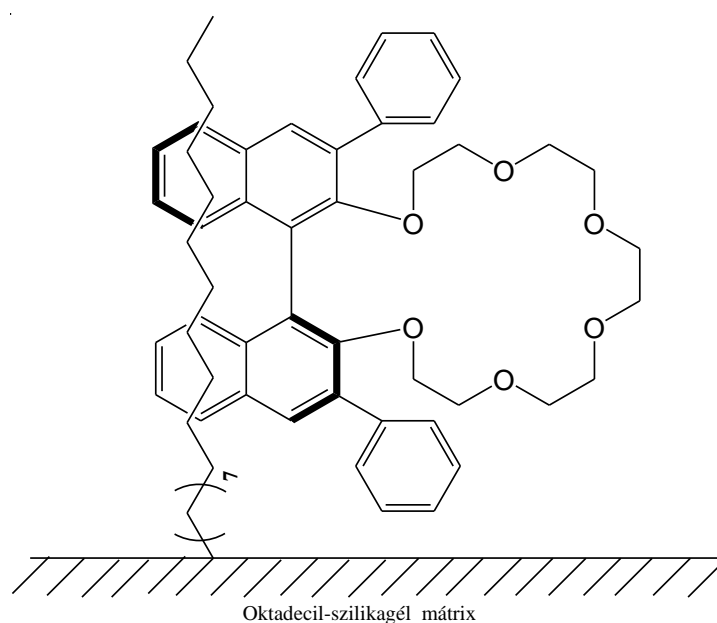
A gyógyszeripar számára kiemelten fontos az egyes enantiomerelegyek elválasztása, valamint mennyiségi meghatározása, hiszen a különböző sztereoizomerek gyakran eltérő biológiai hatást, aktivitást mutathatnak, sok esetben a hasznos izomerek tükörképi párja nem kívánt mellékhatással is rendelkezhet. Emiatt a gyártások során követelmény a kiválasztott terápiás célpontra kevésbé hatásos, esetleg hatástalan enantiomerek eltávolítása a készítményekből.

Az enantiomerek analitikai megkülönböztetésére gyakran alkalmazzák a királis állófázisú HPLC-s rendszereket, ezek közül számos típus a kereskedelmi forgalomban is kapható [3] ilyenek a:

- poliszacharid alapú
- ciklodextrinnekkel módosított
- aminosav-származékokkal módosított
- makrociklusos antibiotikum alapú
- szintetikus polimer alapú
- koronaéter alapú.

2.1. Koronaéter alapú királis állófázisok előállítása és alkalmazásuk enantiomerek elválasztására

A fentiekben leírt, szélesebb körben használt koronaéterek szilárd fázishoz történő kötését követően 1987-ben *Shinbo és munkatársai* *D,L*- α -aminosavak elválasztásáról számoltak be az axiális kiralitással rendelkező (3,3'-difenil-1,10-binaftil)-20-korona-6-éter alkalmazásával, mely CSP-3 „dinamically coated” típusú volt. Ebben az esetben a hidrofób koronaéter nem volt kovalens kötéssel rögzítve az oktadecils csoportokkal borított szilikagél felülethez, hanem csak az apoláris részek között fellépő másodlagos kötőerők tartották a felszín közelében (2. ábra).



2. ábra A kereskedelmi forgalomban is kapható CROWNPACK CR(+) CSP-3

Az állófázis és a koronaéter közötti apoláros–apoláros kölcsönhatás ebben az esetben határt szabott az alkalmazható eluens összetételnek, mely víz és szerves oldószerekkel módosítottakon túl legfeljebb 15% metanol tartalmú lehetett [4].

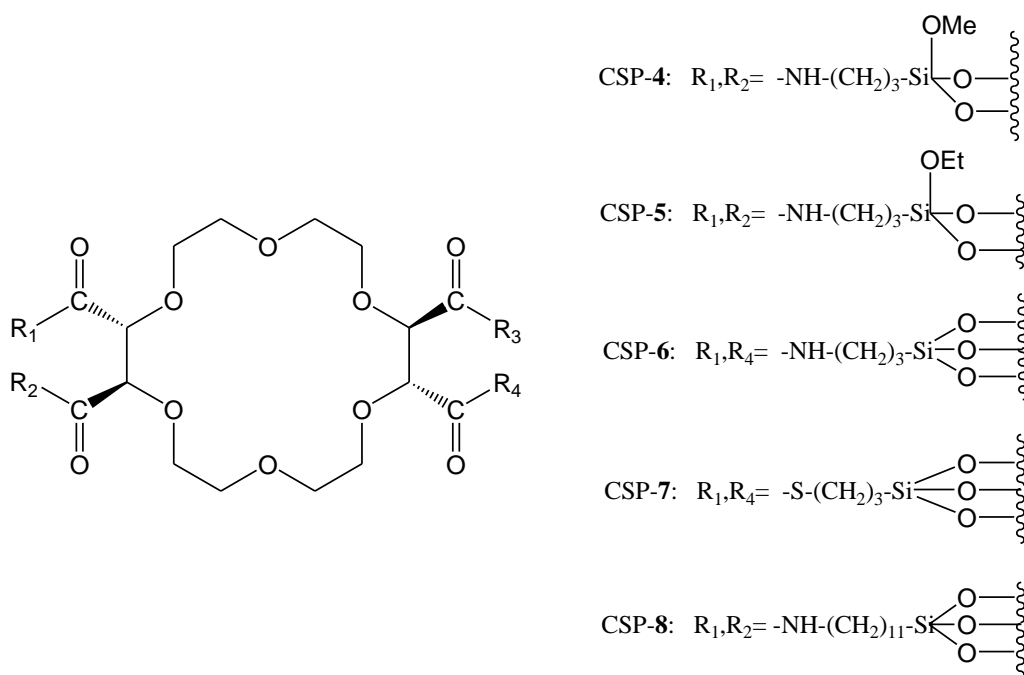
Ezen problémára kínált megoldást *Machida munkatársaival*. Ugyanis az eddig alkalmazott módszerrel túl hosszú ideig tartott az általuk vizsgált alanin- β -naftilamid (Ala- β -NA) és 1-(1-naftil)-etilamin (1-NEA) elválasztása. Az új módszerrel viszont ezt az időt sikerült mintegy harmadára csökkenteni a mozgófázisban β -ciklodextrin (β -CD) alkalmazásával Ala- β -NA esetében, valamint kálium sók alkalmazásával 1-NEA esetében. A CD alkalmazása esetén az analit a mozgófázisban lévő CD-vel, valamint az állófázis makrociklusával is képes komplexet képezni. Ennek köszönhetően kompetíció alakul ki a két komplexképző tulajdonságú anyag között és a CD nélküli esettel összehasonlítva arányosan több időt tölt az analit a mozgófázisban,

ami összességében rövidebb retenciós időt eredményez. A káliumion esetén a makrociklussal történő komplexképzés során alakul ki versengés az analit és a káliumion között, ezáltal az analit ugyancsak kevesebb időt tölt az állófázison, ami szintén retenciós idő csökkenéshez vezet [5].

Először 1999-ben számoltak be (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav alapú CSP-4 szelektorként történő alkalmazásáról (3.ábra) [6].

Ezt követően *Jin és munkatársai* CSP-5 esetében a mozgófázishoz adott trietilamin hatását vizsgálták az elválasztás hatékonyságára és a szelektivitásra vonatkozóan [7].

Ugyanezen makrociklus alapú CSP-6 kromatográfias vizsgálatát végezte *Choi munkatársaival* szekunder aminoalkoholok esetében. Az analitokat két csoportba sorolták az alapján, hogy a kiralitáscentrumhoz a hidroxilcsoport vagy a szekunder amin nitrogénatomja van közelebb, ugyanis ez utóbbi csoportba tartozó vegyületek esetében sokkal jobb elválasztást tapasztaltak. Megfigyelték továbbá, hogy ezen két vegyületcsoport esetén a szelektivitás eltérően változott a kolonnater hőmérsékletének változtatására [8].



3. ábra (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav alapú királis állófázisok

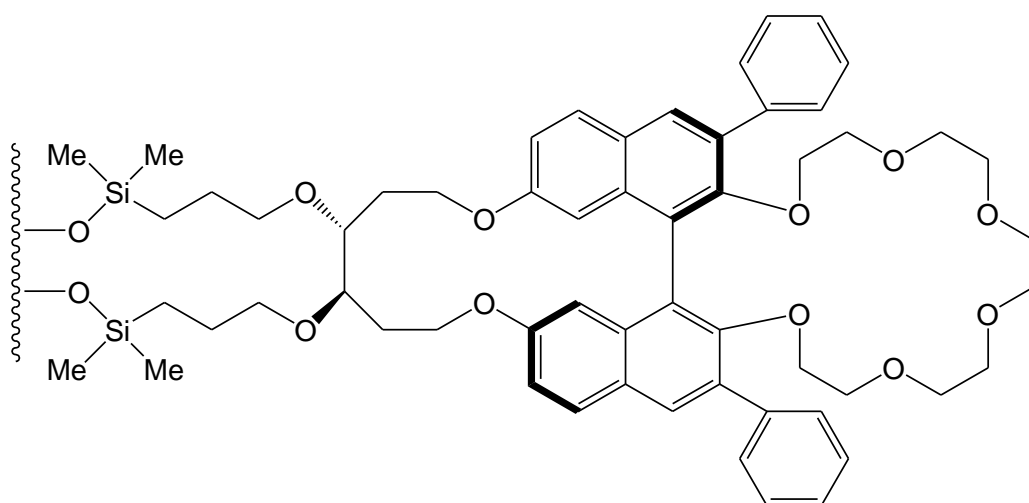
2009-ben *Cho és munkatársai* számoltak be egy (+)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarbonsav alapú CSP-7 előállításáról, ahol a makrociklus rögzítéséhez tioészter kötést tartalmazó egységet használtak a korábban leírt amid egység helyett. Racém aminok és aminoalkoholok esetében rendre jobb elválasztást értek el, mint a korábban előállított állófázis esetén. α -Aminosavak esetén a metionin, szerin és treonin kivételével szintén jobb elválasztást

tapasztaltak. Vizsgálták továbbá az elúciós sorrendeket is, amikből arra következtettek, hogy a királis felismerés mechanizmusát nem befolyásolta az állófázishoz rögzítés módjának változása [9].

Egy évvel később *Ilisz és munkatársai* tizenegy metilén egységet tartalmazó „spacer-rel” rögzített CSP-8-at használtak eredményesen nem természetes β -aminosavak elválasztására. Méréseik során megállapították, hogy a retenciót leginkább befolyásoló tényezők a savas és bázikus módosítók minősége és mennyisége, az eluens összetétel, valamint a hőmérséklet. Bizonyos esetekben az elúciós sorrendet is vizsgálták, ahol azt találták, hogy mindig az *S*-enantiomer eluálódott hamarabb [10].

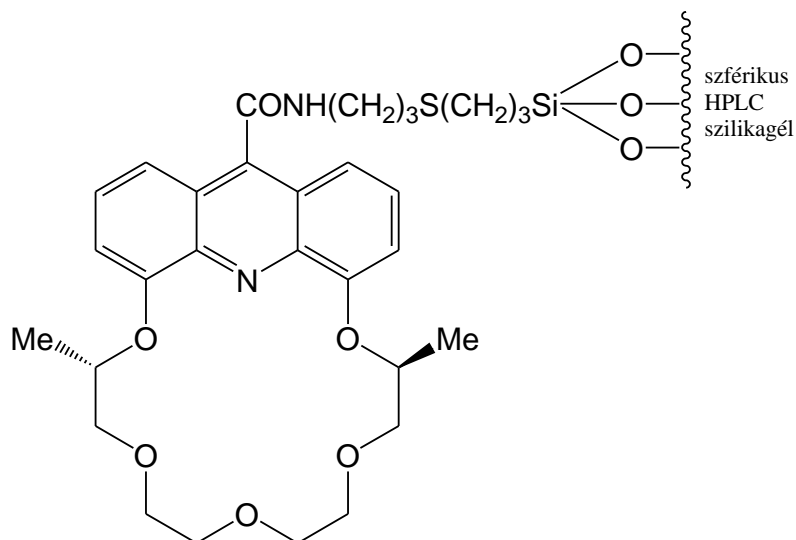
A közelmúltban *Lee és munkatársai* szekunder aminok, biológiailag fontos 1-aril-1,2,3,4-tetrahidro-izokinol analogonok elválasztására vizsgálták a CSP-6 tulajdonságait. Mozgófézisként 30:70:0,5 metanol-acetonitril-trietilamin elegy bizonyult a leghatékonyabbnak, ebben a rendszerben a vizsgált analogonokra 0,99 és 6,32 közötti felbontás értékeket kaptak [11].

Hyun és munkatársai különböző racém aminok, aminoalkoholok és α -aminokarbonil vegyületek, köztük gyógyászatilag fontos vegyületek pl.: amfetamin analogonok, norefedrin enantiomerjeinek elválasztását vizsgálták difenil-szubsztituált 1,1'-binaftil koronaéter alapú CSP-9 alkalmazásával (4. ábra). Méréseik során négy kiválasztott vegyületen vizsgálták a vizes eluens szerves, savas és kationos módosítóinak mennyiségi és minőségi változtatása esetén fellépő retenció változásokat, valamint a hőmérséklet változtatásának hatását. Ily módon jutottak el a 80:20 acetonitril-víz + H₂SO₄ (10mM) + CH₃COONH₄ (1mM) eluens összetételhez 20°C-os kolonna hőmérséklet mellett, mely módszer alkalmazásával a legtöbb analit esetében igen jó elválasztást tapasztaltak [12].



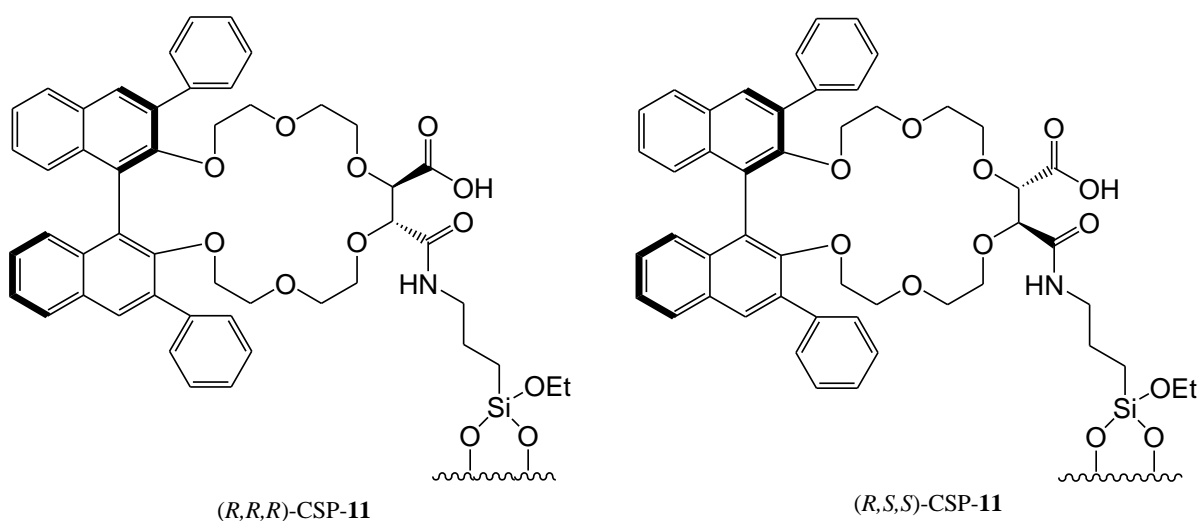
4. ábra Difenil-szubsztituált 1,1'-binaftil-koronaéter alapú CSP-9

Lakatos és munkatársai beszámoltak egy dimetil-szubsztituált akridino-18-korona-6-éter előállításáról és annak szilikagélhez kötésével létrehozott állófázisról [(*R,R*)-CSP-10] (5. ábra), mely hatékonynak bizonyult az 1-NEA- és a 2-NEA-hidrogén-perklorát sók enantiomerjeinek elválasztására [13].



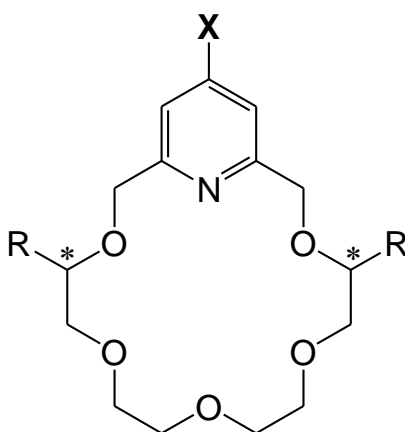
5. ábra Akridin egységet tartalmazó (*R,R*)-CSP-10

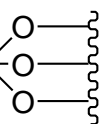
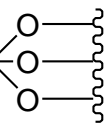
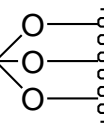
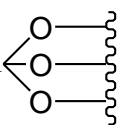
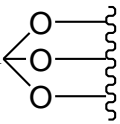
2008-ben Cho és munkatársai sikeresen szintetizáltak kétféle királis egységet tartalmazó koronaéter származékot, melyeket szilikagél felületére kötve kapták az (*R,R,R*)-CSP-11, valamint az (*R,S,S*)-CSP-11 állófázisokat (6. ábra), melyeket királis primer aminok, aminoalkoholok és tokaidin analogonok elválasztása esetén vizsgáltak. Méréseik során érdekes módon az (*R,R,R*)-CSP-11 alkalmazásakor minimális enantiomerfelismerést tapasztaltak, míg a diasztereomer esetében megfelelő felbontásra vonatkozó értékeket kaptak eredményül [14].



6. ábra Cho és munkatársai által előállított állófázisok

Elsőként *Bradshaw és munkatársai* számoltak be optikailag aktív dimetil szubsztituált piridino-18-korona-6-éterek szintéziséről és normál szilikagélhez történő rögzítéséről [(*S,S*)-CSP-12] (7. ábra). A kromatográfiás tulajdonságok vizsgálata során elsőként metanol-aceton elegyet használtak eluensként, viszont ezzel a módszerrel nem sikerült megfelelő elválasztást elérni. Később racém 1-NEA esetén tisztán metanosos mozgófázis alkalmazásával, légköri nyomáson jó elválasztást értek el [15, 16].



CSP	R	X
(<i>S,S</i>)-CSP-12	Me	O(CH ₂) ₃ Si  normál szilikagél
(<i>R,R</i>)-CSP-13	Ph	O(CH ₂) ₁₁ Si  normál szilikagél
(<i>R,R</i>)-CSP-14	<i>t</i> Bu	O(CH ₂) ₃ Si  normál szilikagél
(<i>R,R</i>)-CSP-15	<i>t</i> Bu	OCH ₂ CONH(CH ₂) ₃ Si  HPLC minőségű szilikagél
(<i>R,R</i>)-CSP-16	Me	OCH ₂ CONH(CH ₂) ₃ Si  szférikus HPLC szilikagél

7. ábra Piridino-koronaéter alapú királis állófázisok

A későbbi kutatások során előállították a difenil-piridino-18-korona-6-étert, valamint normál szilikagél felületére kötésével kapták a *(R,R)*-CSP-13-at. Sajnálatos módon a kromatográfiai vizsgálatok során gyenge enantiomerfelismerő képességet tapasztaltak [16]. Ennek az lehet a fő oka, hogy a fenilcsoport planáris szerkezete miatt az egyszeres szén–szén kötés körüli elfordulással minimalizálni tudja a sztérikus feszültséget, aminek köszönhetően csökken az enantioszelektivitás.

A kiralitáscentrumok kialakításához használt alkilcsoportok szelektivitásra gyakorolt hatását vizsgálva azt tapasztalták, hogy a nagyobb térkitöltésű gömbszimmetrikus csoportokkal szubsztituált koronaéterek a jelentkező fokozott sztérikus taszítás miatt megnövekedett enantioszelektivitással, viszont ezzel együtt csökkent komplexstabilitással bírnak [17].

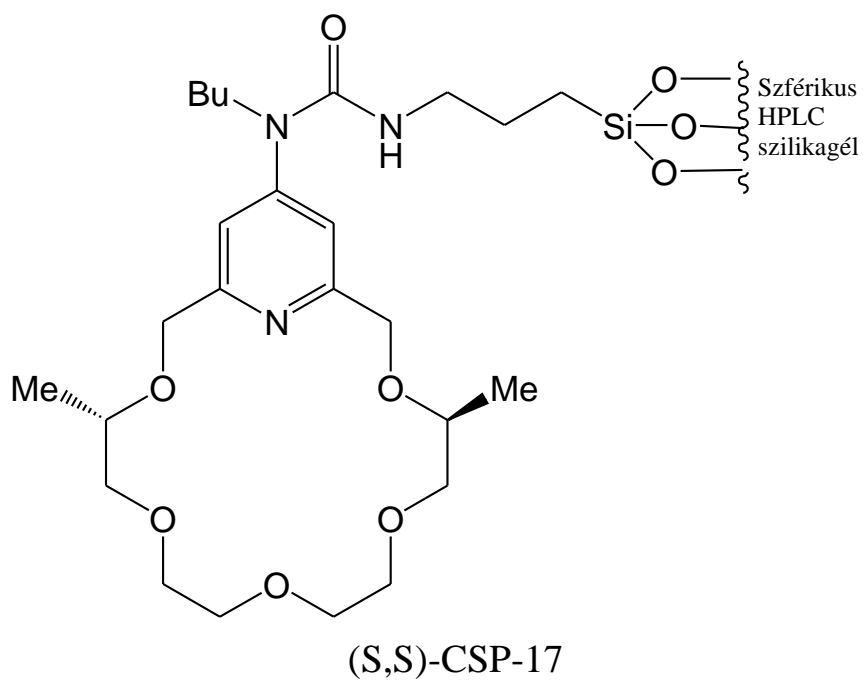
Az enantiomertiszta di-*tert*-butilpiridino-18-korona-6-éter származékot elsőként 1999-ben kötötték normál szilikagélhez [(*R,R*)-CSP-14]. Az 1-NEA, az 1-PEA, valamint a fenilalanin- és a fenilglicin-metilésztereket légköri nyomáson vizsgálva megfelelő elválasztás értékeket tapasztaltak [18,19].

A későbbiekben az enantiomer elválasztás hatékonyságának növelése céljából HPLC minőségű szilikagél felületére kötötték a di-*tert*-butilpiridino-18-korona-6-éter származékot oly módon, hogy a piridingyűrű 4-es helyzetében kapcsolódó kar savamid kötést is tartalmazott [(*R,R*)-CSP-15]. Magas nyomáson racém 1-NEA és PEA esetén nagy fokú elválasztást tapasztaltak, míg aminosav származékok esetén csak kis hatékonysággal működött a töltet [20].

Farkas és munkatársai az aminoszármazékok enantiomerjeivel stabilabb komplexet képző, a kiralitás centrumok kialakításához metilcsoportokat tartalmazó enantiomertiszta piridino-koronaéter származékot rögzítettek szférikus, HPLC minőségű szilikagél felületén [(*S,S*)-CSP-16]. Az előállított állófázison az 1-NEA, a 2-NEA, a PEA és az aromás oldalláncú aminosav-származékok enantiomerjei esetén, HPLC-s módszer alkalmazása mellett hatékony elválasztást tapasztaltak [21, 22].

Az eddig felsorolt piridino-egységet tartalmazó koronaéterek a piridingyűrű 4-es helyzetében oxigén atomon keresztül kapcsolódtak a szilárd hordozóhoz (pl.: szilikagél, Merrifield-féle polimer gyanta). Kutatócsoportunkban korábban sikeresen állítottak elő olyan állófázisokat, melyek esetében a piridingyűrű 4-es helyzetében szén vagy nitrogén atomon keresztül kapcsolódik a szelektormolekula a szilikagélhez. Ilyen a dimetil-szubsztituált (*S,S*)-CSP-17, ahol a piridingyűrű 4-es szénatomja egy karbamid-származék nitrogénatomján keresztül

kapcsolódik a szilikagélhez, mely alkalmasnak bizonyult aromás egységet tartalmazó primer aminok enantiomerjeinek elválasztására (8. ábra) [23].



8. ábra

3. ELMÉLETI RÉSZ

3.1. Enantiomer elválasztás

A enantiomerek elválasztása minden esetben arra vezethető vissza, hogy valamilyen módon diasztereomer asszociátumokat képzünk, melyek eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek.

Az enantiomerek folyadékkromatográfias elválasztására a királis állófázisokat alkalmazzák a gyakorlatban, ugyanis így nincs szükség a vizsgált anyagok előzetes asszociátum képzésére, királis segédanyagok alkalmazására. A módszer további előnye, hogy a vizsgált minták roncsolásmentesen eredeti formájukban visszanyerhetők. Ezáltal lehetőség nyílik az enantiomerkeverékek preparatív méretben történő elválasztására is.

Az enantioszelektív komplexképzés feltétele három egymástól független kölcsönhatás kialakulása a gazda- és a vendégmolekula között. A komplexstabilitás szempontjából fontosak a vonzó kölcsönhatások, melyek közül az egyik általában a (i) hidrogénkötés, egy további pedig az aromás rendszerek között fellépő (ii) π - π kölcsönhatás. A szelektivitást mértékét viszont döntően a (iii) taszító kölcsönhatások szabják meg, melyek a vendégmolekulák enantiomerjei között eltérő mértékben lépnek fel. A koronaéterek esetében a taszító kölcsönhatások többségéért a makrogyűrű királiscentrumaiban szubsztituált csoportok a felelősek. Ha túl nagy térkitöltésű királis csoportot viszünk be a makrogyűrűbe, azzal növelhetjük a szelektivitást, viszont csökkentjük a komplexstabilitást. A szelektivitást befolyásolja még a gazdamolekula, valamint a képződő komplexek szerkezetének merevsége, ugyanis a merevebb szerkezet csökkenti az olyan konformációk kialakulásának valószínűségét, melyek kiküszöbölik a sztérikus taszítást.

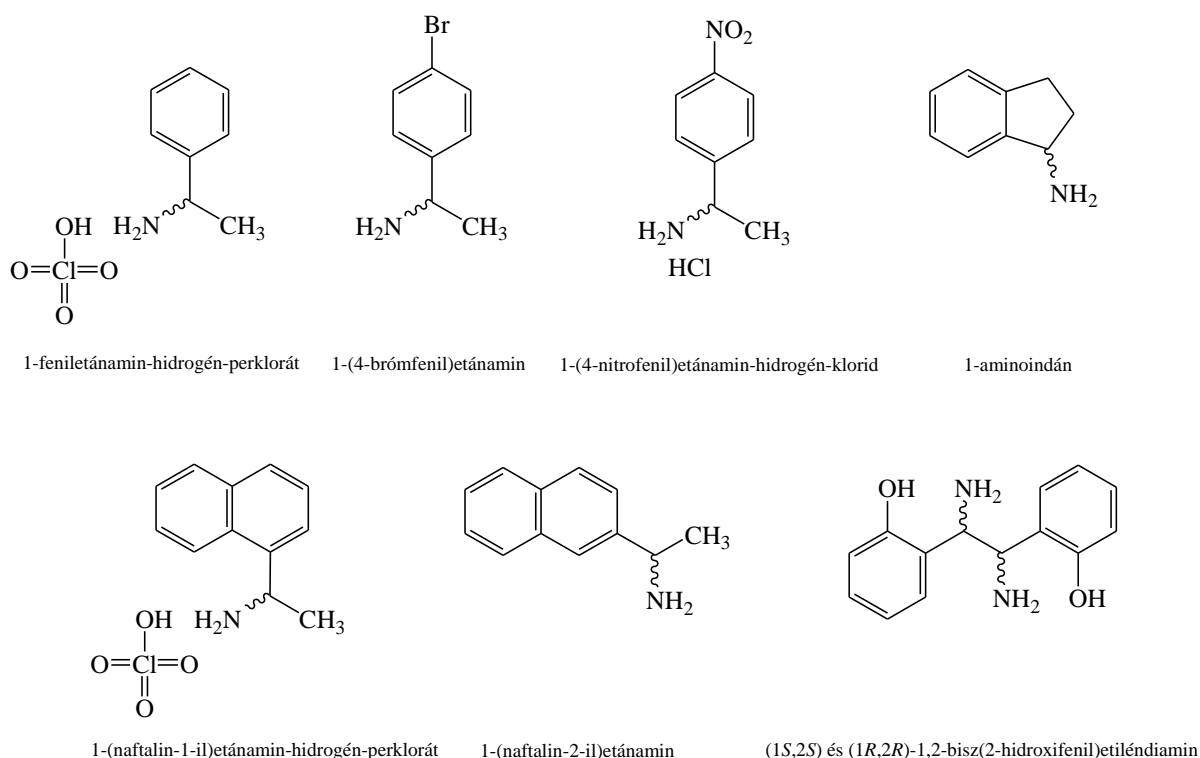
Koronaétereket királis szelektorként alkalmazva megfelelő elválasztásokat értek el primer aminok, aminoalkoholok és aminosav származékok esetén. A felsorolt vendégmolekulák mindegyike tartalmaz bázikus aminocsoportot, mely a feltételezett mechanizmus szerint protonált formában képes a koronaéterekkel hárompontos hidrogénkötés kialakítására. *Hyun és munkatársai* vizsgálták az eluenshez adott savas módosítók hatását [24]. Méréseik során ecetsavat, kénsavat, perklórsavat és trifluorecetsavat használtak 1,0-20,0 mM koncentrációban, melyek közül a kénsav bizonyult a legjobbnak, mennyiségének növelésével javult a felbontás és nőtt a retenció idő.

3.2. Vendégmolekulák

Az (*S,S*)-CSP-2 kromatográfias tulajdonságainak vizsgálatát tizenöt királis primer aminocsoportot tartalmazó vegyülettel végeztem. A vendégmolekulák kiválasztása során az előbbi megfontolások alapján három fő szempontot vettem figyelembe:

- a molekulák rendelkezzenek bázikus primer aminocsoporttal a hárompontos hidrogénkötés kialakítása érdekében
- tartalmazzanak aromás gyűrűt a π - π kölcsönhatás érvényesülése érdekében
- az előbbi két molekularész legyen egymáshoz közel, hogy a szterikus hatások érvényesülhessenek (két-három atomnyi távolságra).

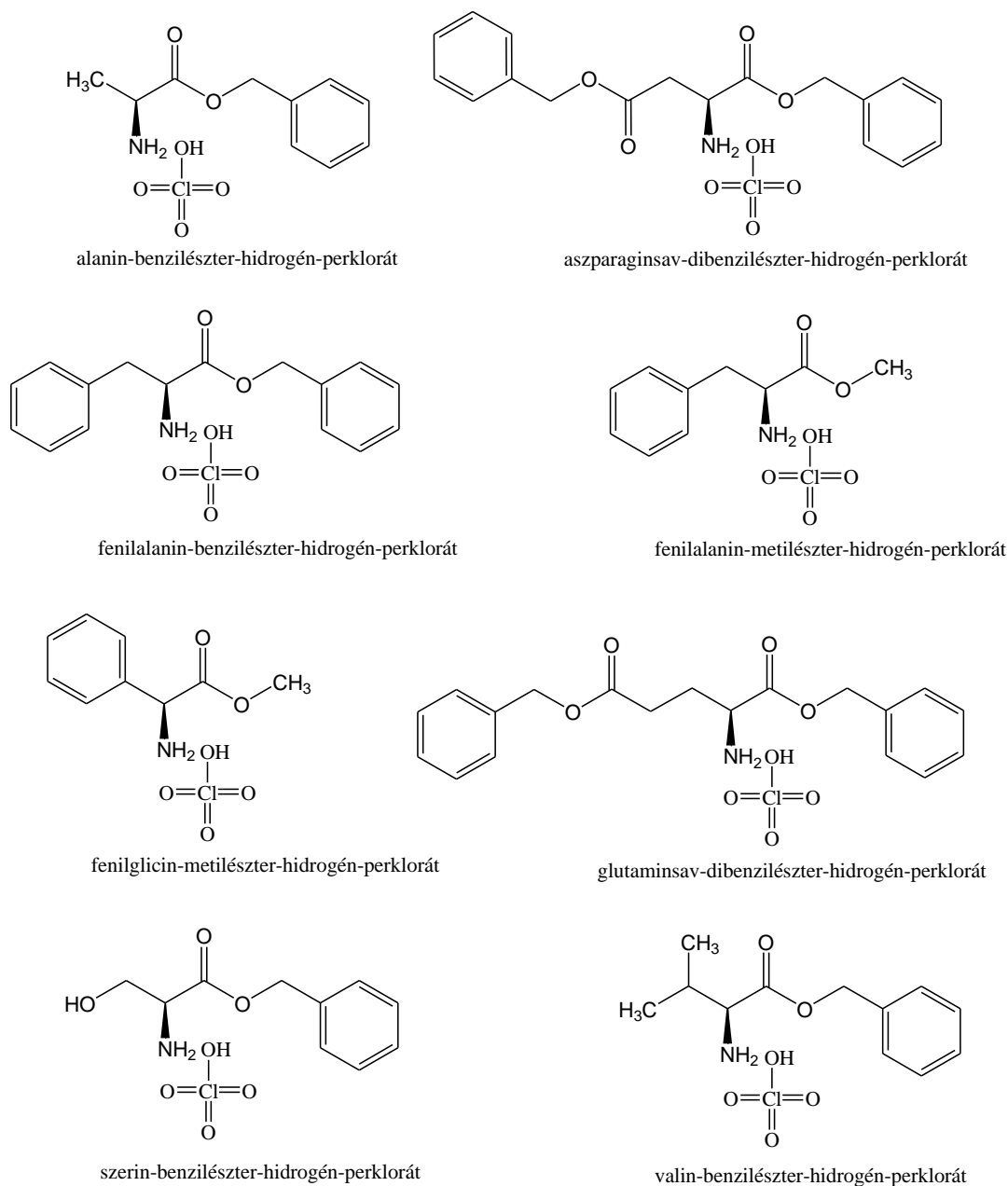
A felsorolt szempontokat követve választottam ki a fenil- és naftilcsoportokat tartalmazó primer aminokat, illetve sóikat (9.ábra): az 1-feniletánamin-hidrogén-perklorátot, az 1-(4-brómfenil)etánamint, az 1-(4-nitrofenil)etánamin-hidrogén-kloridot, 1-(naftalin-1-il)etánamin-hidrogén-perklorátot és az 1-(naftalin-2-il)etánamint. Az eddig felsorolt aminok mellett további két eltérő szerkezetű amint: az (1*S*,2*S*)- és (1*R*,2*R*)-1,2-bisz(2-hidroxifenil)etiléndiamin és az 1-aminoindán elválasztását is vizsgáltam az új kolonnán.



9. ábra Primer aminok

Az aminosavak többsége nem rendelkezik aromás résszel, ezért többségében azok benzil-észtereit vizsgáltam. Az észterezés egyúttal maszkírozó szerepet is betölt, így a fenilalanin és a

fenilglicin esetén is szükségesnek láttuk a karboxilcsoport védését, azonban ezekben az esetekben nem volt szükség az aromás gyűrű bevitelére a molekulába, így a két aminosav metilészterét vizsgáltuk. Az aminosav-észterek szerkezete a 10. ábrán látható. A vizsgált aminokat és aminosav-észtereket a továbbiakban a szisztematikus nevük helyett az 1. táblázatban található rövidítések jelölik.



10. ábra Aminosav észterek

Név	Rövidítés
1-feniletánamin-hidrogén-perklorát	PEA
1-(4-brómfenil)etánamin	bróm-PEA
1-(4-nitrofenil)etánamin-hidrogén-perklorát	nitro-PEA
1-(naftil-1-il)etánamin-hidrogén-perklorát	1-NEA
1-(naftil-2-il)etánamin	2-NEA
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>) és (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-bisz(2-hidroxifenil)etiléndiamin	biszamin
1-aminoindán	1-aminoindán
alanin-benzilészter hidrogén-perklorát	Ala-OBn
aszparaginsav-dibenzilészter-hidrogén-perklorát	Asp-diOBn
fenilalanin-benzilészter-hidrogén-perklorát	Phe-OBn
fenilalanin-metilészter-hidrogén-perklorát	Phe-OM
fenilglicin-metilészter-hidrogén-perklorát	PhGly-OM
glutaminsav-dibenzilészter-hidrogén-perklorát	Glu-diOBn
szerin-benzilészter-hidrogén-perklorát	Ser-OBn
valin-benzilészter- hidrogén-perklorát	Val-OBn

1. táblázat: Az aminosav-észterek elnevezése

4. KÍSÉRLETI RÉSZ

4.1. A kromatográfiás módszer fejlesztése

A kutatócsoport munkájába bekapcsolódva az új (*S,S*)-CSP-2 vizsgálatát megelőzően rövid ideig az (*S,S*)-CSP-17 kromatográfiás tulajdonságainak meghatározásával is foglalkoztam. A szelektormolekulában megegyező, korábban vizsgált állófázis esetén a kromatográfiás mérések alapján a működési paraméterek optimumát izokratikus elúciót alkalmazva, polár-organikus módban találták.

Ilyen előzményeket követően az új (*S,S*)-CSP-2 állófázison elsőként az 1-NEA, 1-PEA és a 2-NEA tiszta enantiomerjeinek retencióját vizsgáltam acetonitril:metanol 20:80, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin eluens alkalmazása mellett. A kapott eredményeket a 11. ábra és a 2. táblázat tartalmazza. A savas és bázikus módosítókat minden esetben az acetonitrilben oldottam. A kolonnahőmérséklet minden mérés során 25°C-ra volt termosztálva.

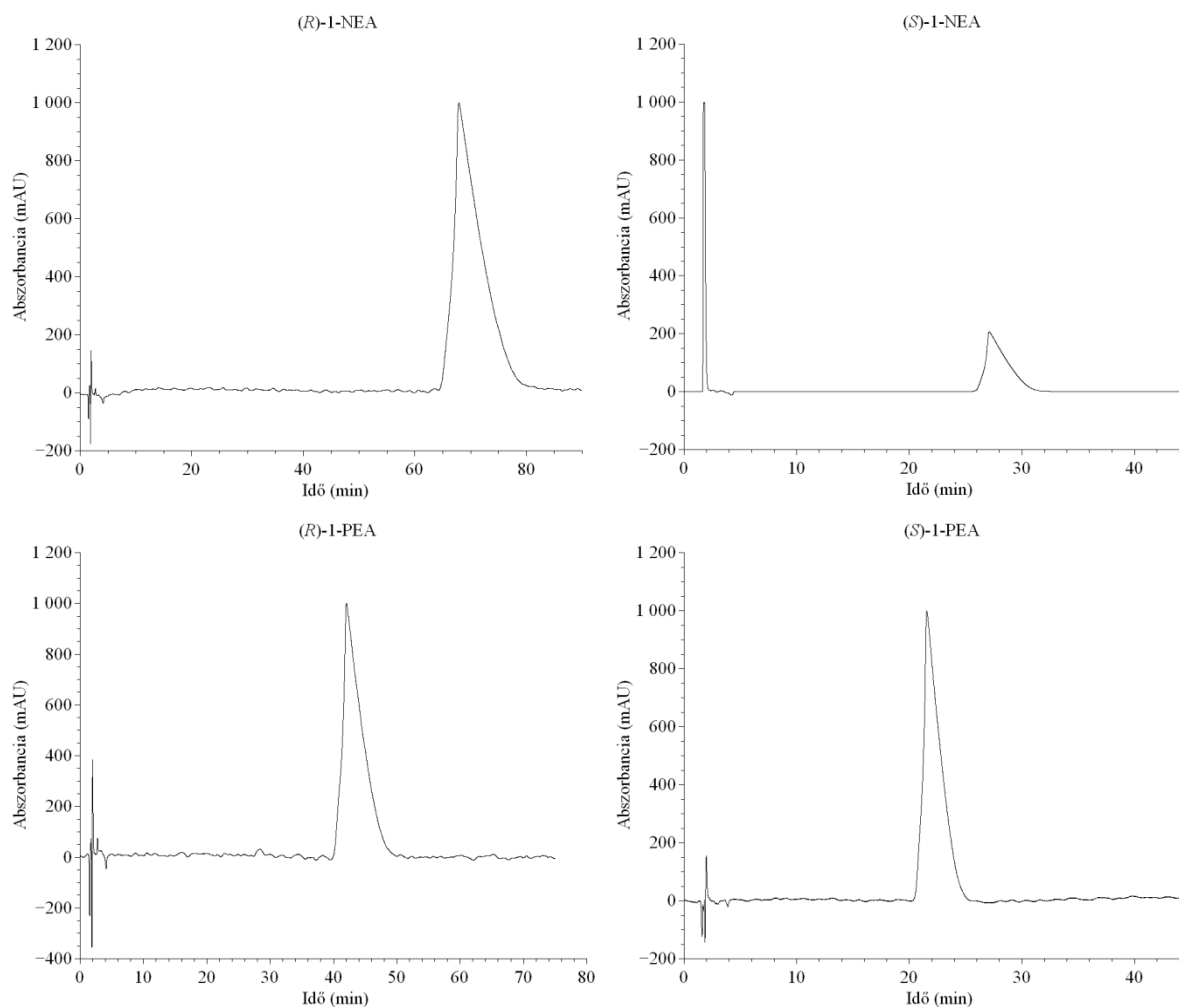
Analit neve	t_{R1}	k
(<i>R</i>)-1-NEA	67,90	38,48
(<i>S</i>)-1-NEA	27,10	14,75
(<i>R</i>)-1-PEA	42,05	23,45
(<i>S</i>)-1-PEA	21,55	11,53
(<i>R</i>)-2-NEA	37,63	20,88
(<i>S</i>)-2-NEA	27,07	14,74

2. táblázat 1-NEA, 1-PEA és 2-NEA enantiomerek retenciója acetonitril:metanol 20:80, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin eluens alkalmazása esetén

A 2. táblázat és a 11. ábra alapján látható, hogy mindhárom anyag enantiomerjei esetén viszonylag nagy retenciós időket kaptunk, továbbá mindegyik esetben az *S*-enantiomerek esetén kaptuk a kisebb retenciós időket. Ebből arra következtethetünk, hogy a (*S,S*)-CSP-2 jelentős enantioszelektivitással rendelkezik, valamint a primer aminok *R*-enantiomerjei és az (*S,S*)-CSP-2 által képzett heterokirális komplexek stabilitása nagyobb a homokirális komplexek stabilitásánál.

Az irodalomban is hasonló eredményről számoltak be *Gérczei és munkatársai*, akik 1-naftil-etánamin és (*R,R*)-dimetilfenazino-18-korona-6-éter komplexképződését vizsgálták

röntgendiffrakciós módszerrel. Méréseik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a heterokirális (*R,R*)-(*S*) komplex sokkal stabilabb a homokirális (*R,R*)-(*R*) komplexnél [25].



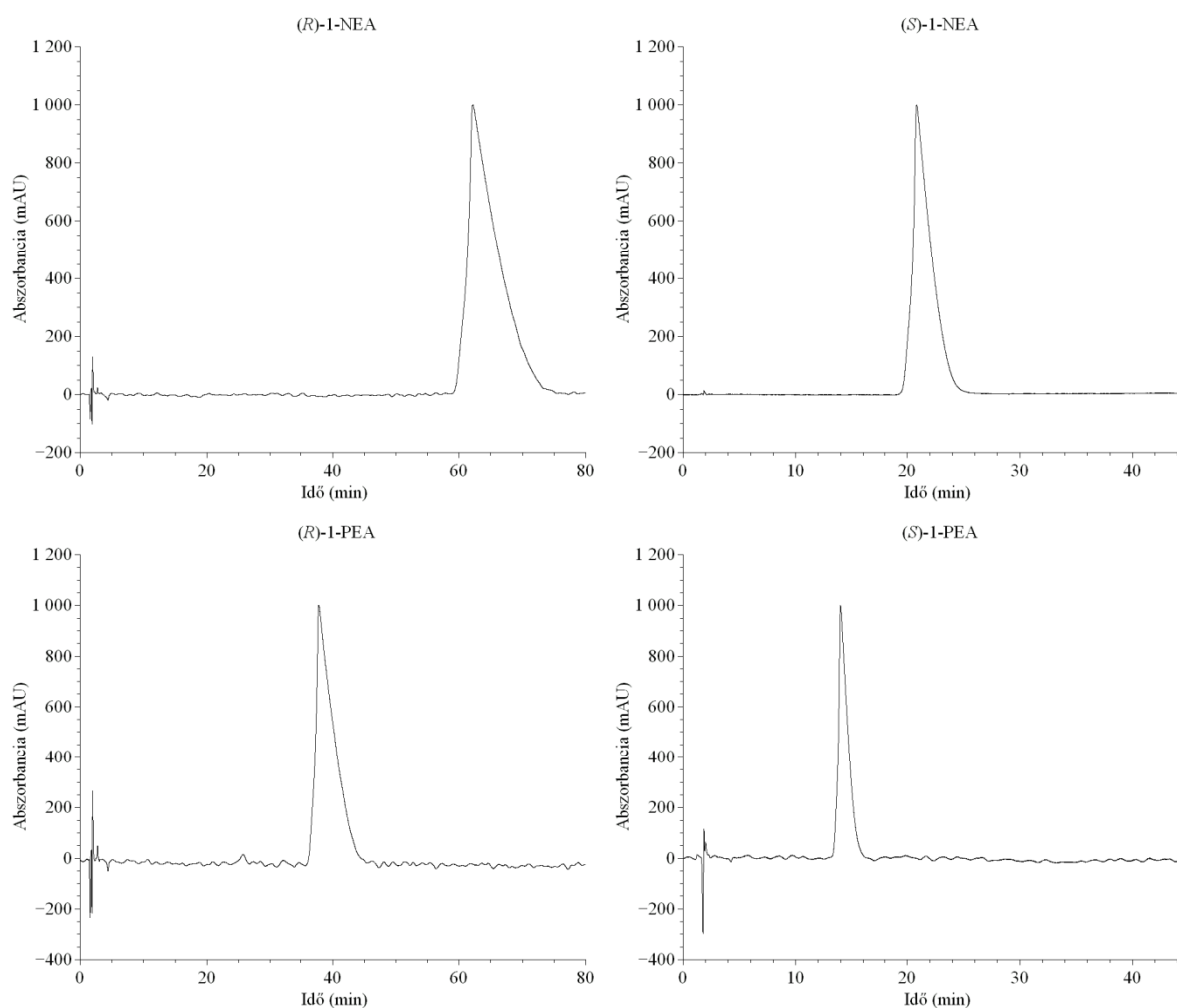
11. ábra *R*-1-NEA, *S*-1-NEA, *R*-1-PEA, *S*-1-PEA retenciója az (*S,S*)-CSP-2 állófázison. Eluens: acetonitril:metanol 20:80, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin.

A savas és bázikus módosítók arányának megtartása mellett az eluens acetonitril-metanol arányának változtatásával további méréseket végeztem az előbbi három amin enantiomerjei esetén. A kapott eredmények a 3. táblázatban és a 12., 13. ábrán találhatóak. Az alkalmazott módszerekben az eluensösszetételek a következők voltak:

- acetonitril:metanol 15:85, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin
- acetonitril:metanol 25:75, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin

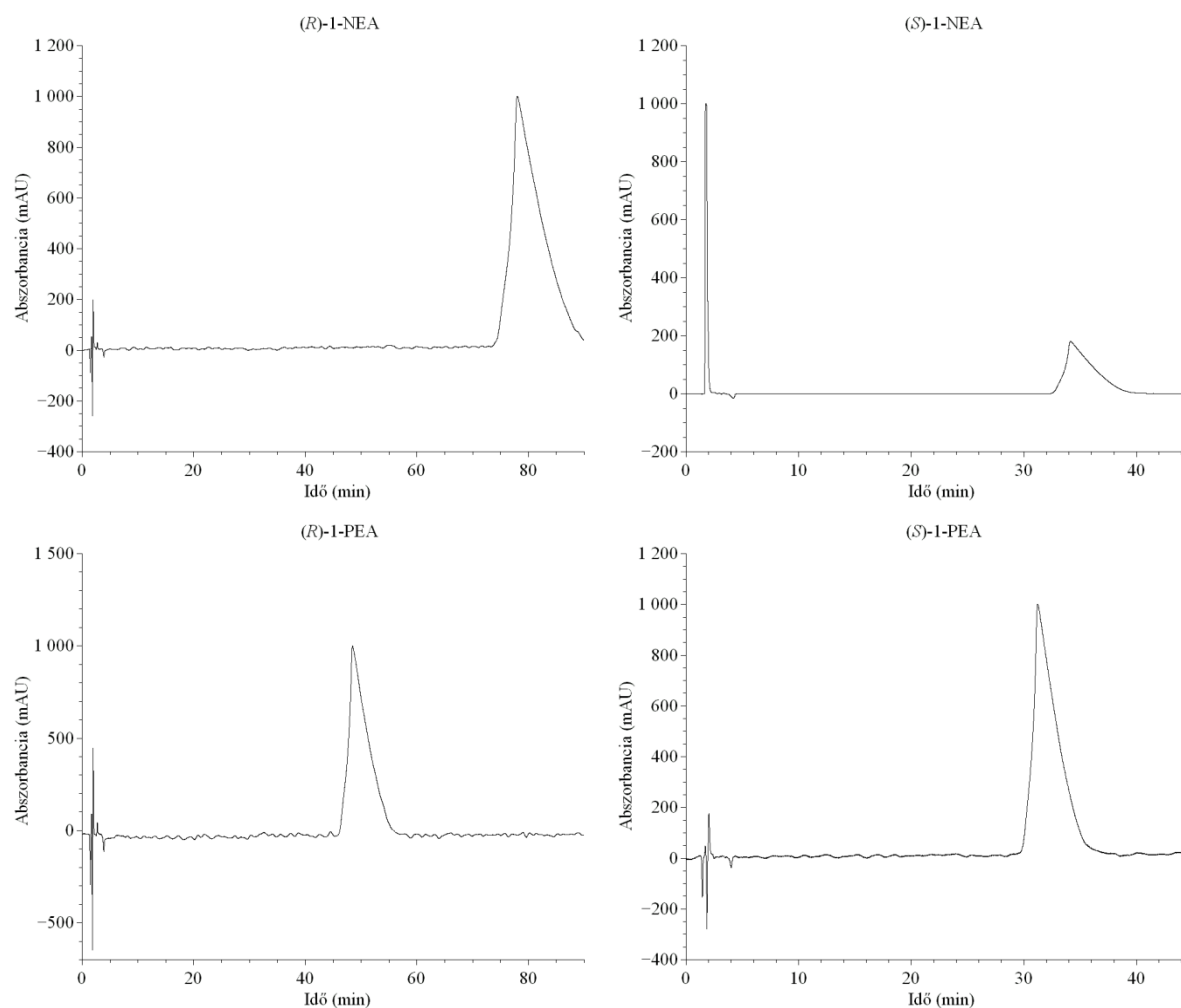
Analit neve	acetonitril:metanol 15:85		acetonitril:metanol 25:75	
	t_R	k	t_R	k
(R)-1-NEA	62,153	35,14	78,013	44,36
(S)-1-NEA	20,833	11,11	34,133	18,84
(R)-1-PEA	37,847	21,00	48,460	27,17
(S)-1-PEA	13,983	7,13	31,213	17,15
(R)-2-NEA	41,440	23,09	52,773	29,68
(S)-2-NEA	26,463	14,39	34,850	19,26

3. táblázat Az 1-NEA, 1-PEA és a 2-NEA enantiomerek retenciója



12. ábra R-1-NEA, S-1-NEA, R-1-PEA, S-1-PEA retenciója az (S,S)-CSP-2 állófázison.
 Eluens: acetonitril:metanol 15:85, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin.

A 2. és 3. táblázatokban szereplő adatok alapján megállapítható, hogy az eluensösszetétel változtatásával nem változtak meg az egyes enantiomerek retenciós sorrendjei, valamint megfigyelhető, hogy a mozgófázis metanol tartalmának növelése rendre csökkent retenciós időket eredményezett. Ebből arra következtethetünk, hogy a vizsgált aminok esetén a metanol eluenserőssége nagyobb a savas és bázikus módosítókat tartalmazó acetonitrilhez viszonyítva.

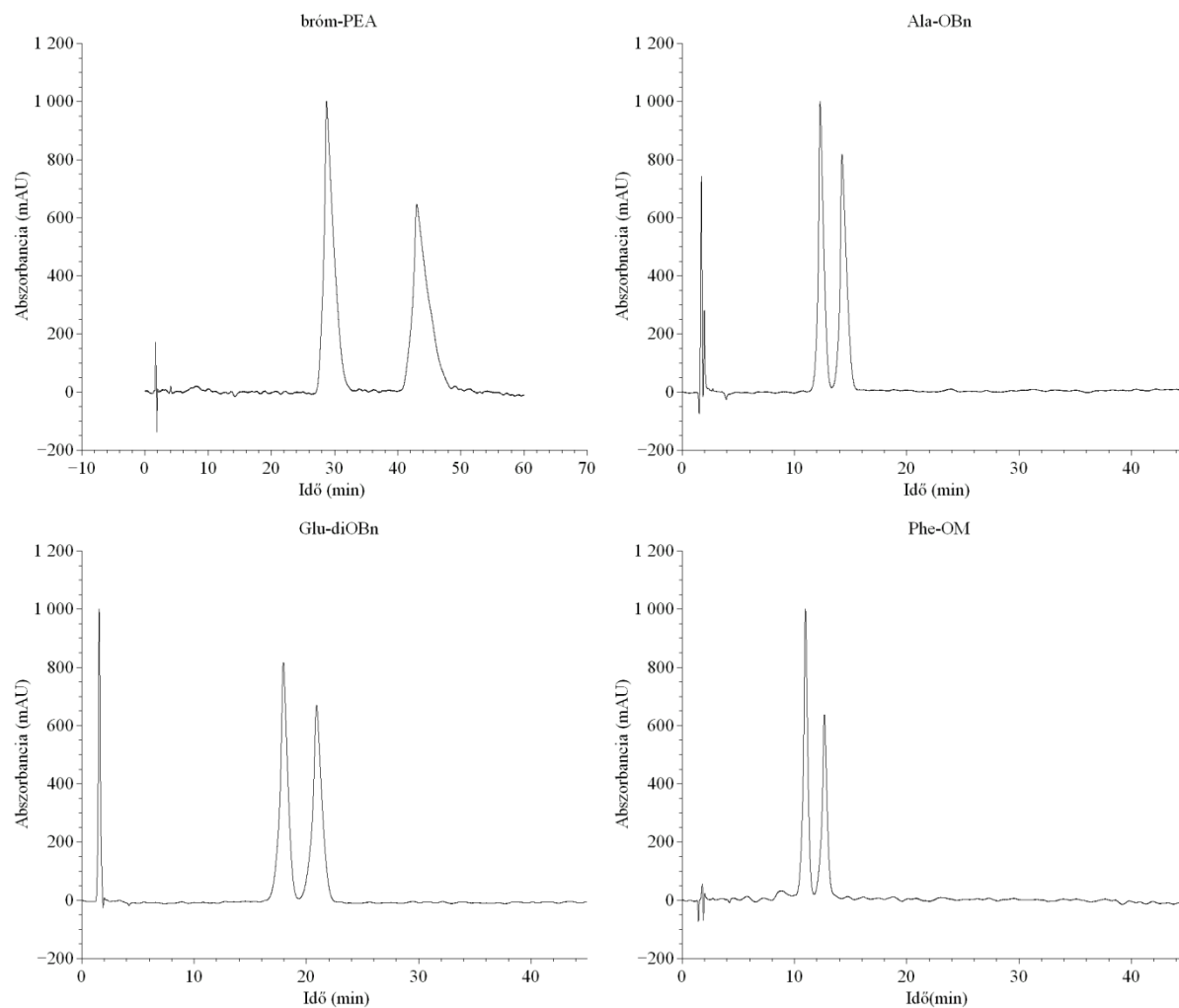


13. ábra R-1-NEA, S-1-NEA, R-1-PEA, S-1-PEA retenciója az (S,S)-CSP-2 állófázison. Eluens: acetonitril-metanol 25:75, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin.

A fenti méréseket követően a kromatográfiai rendszer vizsgálatát kiterjesztettem. Először a savas és bázikus módosítók arányát változatlanul hagyva a további tizenkét vegyület esetén mutatott kromatográfiai tulajdonságokat vizsgáltam (5. táblázat). A vizsgált vegyületek közül három primer amin és három aminosav-észtert emeltem ki, melyek esetén a különböző módszerekkel kapott kromatogramokat a következőkben ábrázoltam (14., 15., 16. ábra) és a kromatográfiai jellemzőiket a 4. táblázatban foglaltam össze.

Az alkalmazott módszerekben az eluensösszetételek a következők voltak:

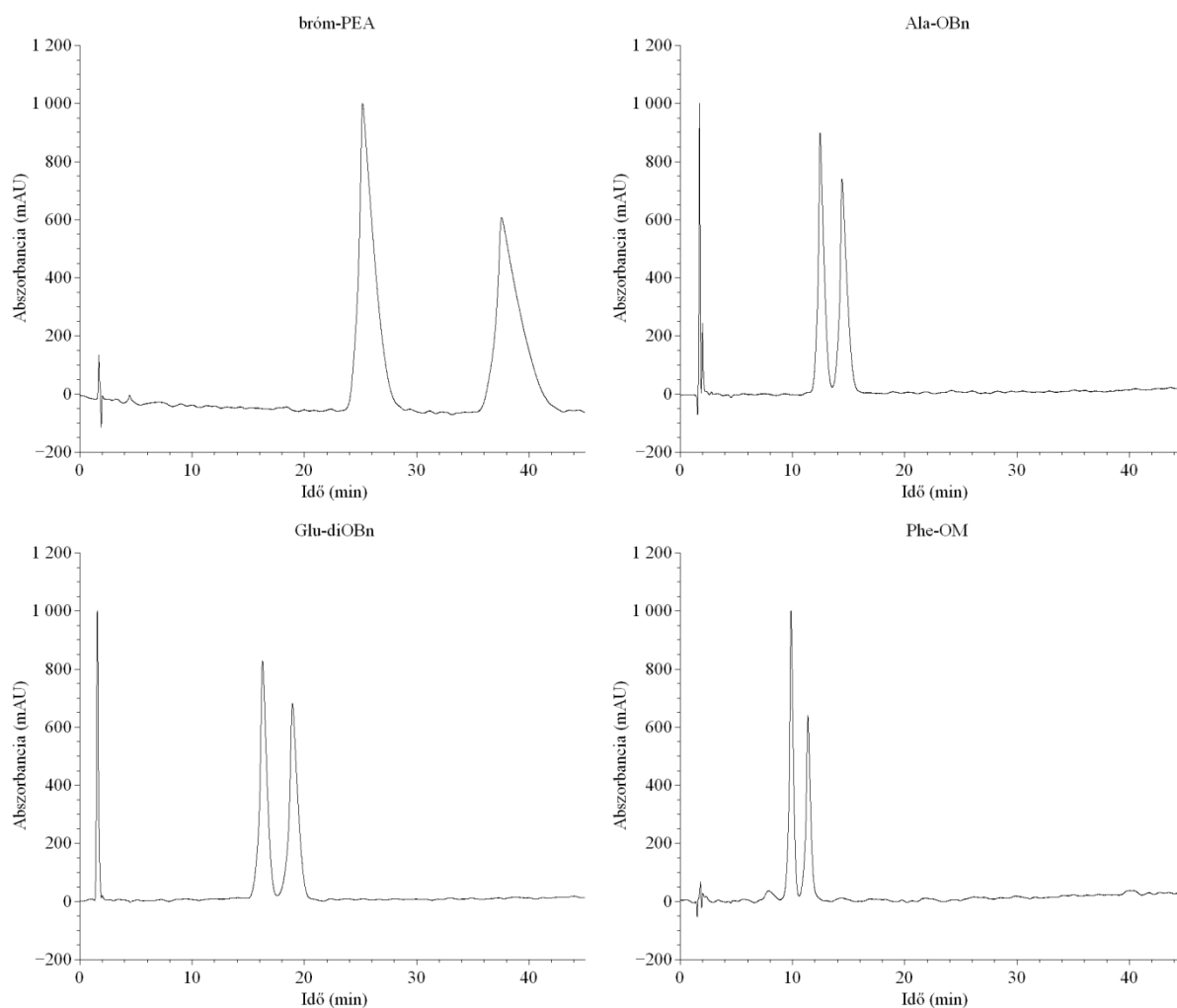
- acetonitril:metanol 20:80, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin
- acetonitril:metanol 15:85, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin
- acetonitril:metanol 10:90, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin



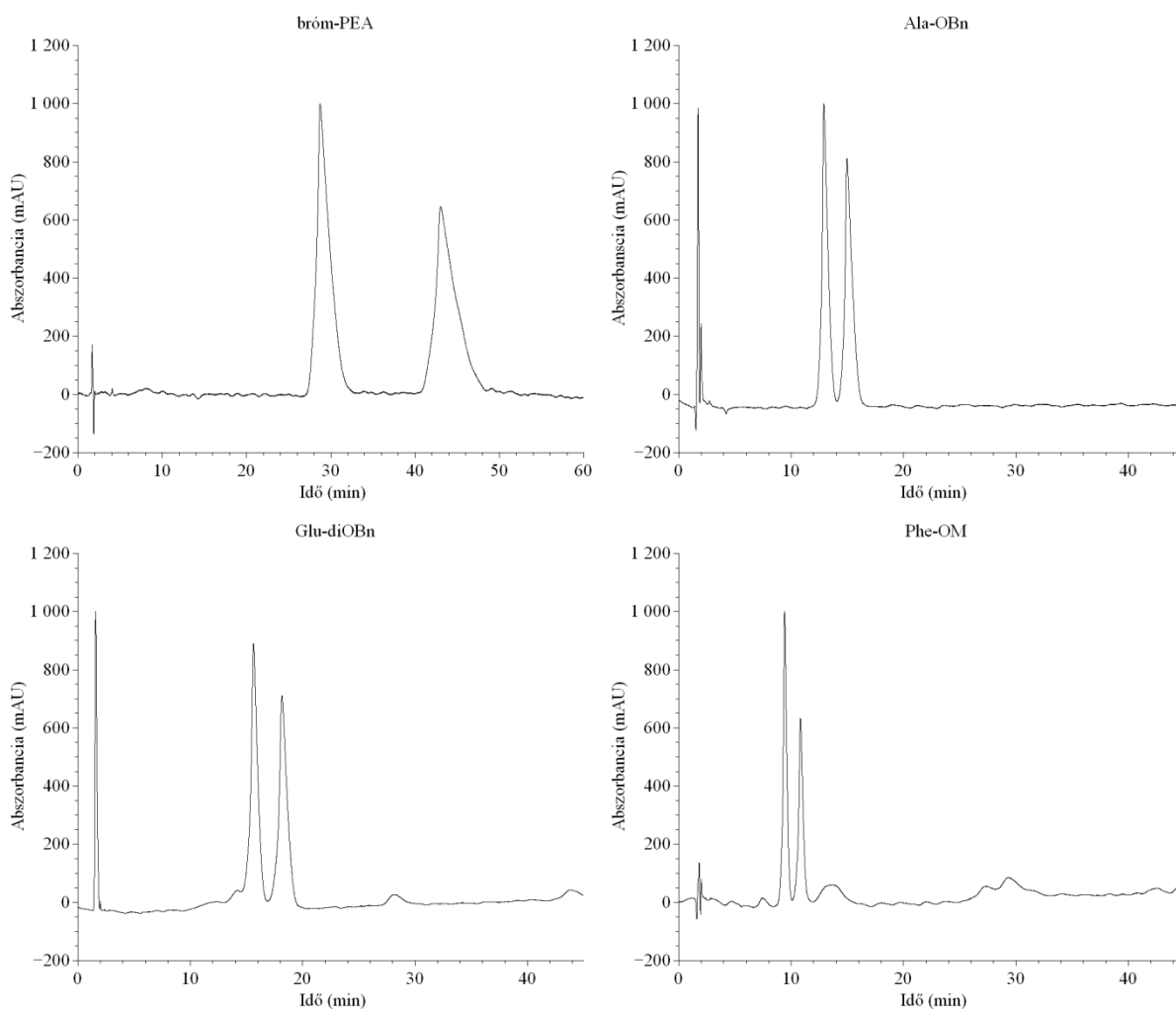
14. ábra bróm-PEA, Ala-OBn, Glu-diOBn, Phe-OM elválasztása az (S,S)-CSP-2 állófázison.
Eluens: acetonitril:metanol 20:80, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin

	acetonitril:metanol 20:80			acetonitril:metanol 15:85			acetonitril:metanol 10:90 (AlaOBn esetén: acetonitril:metanol 17:83)		
Analit neve	t_{R1}	α	R_s	t_{R1}	α	R_s	t_{R1}	α	R_s
bróm-PEA	28,74	1,53	3,79	25,18	1,53	3,71	23,11	1,52	3,43
Ala-OBn	12,28	1,18	1,96	12,45	1,15	1,82	12,90	1,18	1,83
Glu-diOBn	17,95	1,18	2,16	16,27	1,18	2,09	15,62	1,18	2,08
Phe-OM	10,97	1,18	2,33	9,86	1,19	2,22	9,42	1,18	2,14

4. táblázat Az eluensösszetétel változtatásának hatása



15. ábra bróm-PEA, Ala-OBn, Glu-diOBn, Phe-OM elválasztása az (*S,S*)-CSP-2 állófázison. Eluens: acetonitril:metanol 15:85, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin.



16. ábra bróm-PEA, Ala-OBn, Glu-diOBn, Phe-OM elválasztása az (*S,S*)-CSP-2 állófázison. Eluens: acetonitril:metanol 10:90, 0,2% hangyasav, 0,1% trietil-amin.

A 4. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy a mozgófázis metanol tartalmának növelésével az Ala-OBn kivételével a retenciós idők csökkentek. A szelektivitás és felbontás értékekre nem hatott jelentősen a mozgófázis oldószerarányának változtatása, viszont megfigyelhető, hogy a legjobb felbontás értékeket az acetonitril:metanol 20:80 összetételű eluens alkalmazása mellett kaptuk. Az 5. táblázat alapján látható, hogy a legtöbb analit a fent megállapítottaknak megfelelően viselkedik. A retenciós idő változását figyelembe véve kivételt képeznek ez alól az Ala-OBn, az Asp-diOBn, a PhGly-OM és a Val-OBn. Ugyanakkor az Asp-diOBn esetében egyáltalán nem, míg a Ser-OBn esetén csekély enantioszelektivitást tapasztaltam.

Analit neve	acetonitril:metanol 20:80			acetonitril:metanol 15:85			acetonitril:metanol 10:90		
	t _{R1}	α	R _s	t _{R1}	α	R _s	t _{R1}	α	R _s
biszamin	10,06	1,51	0,84	9,26	1,52	0,87	9,50	1,50	0,83
bróm-PEA	28,74	1,53	3,79	25,18	1,53	3,71	23,11	1,52	3,43
Glu-diOBn	17,95	1,18	2,16	16,27	1,18	2,09	15,62	1,18	2,08
Phe-OBn	12,78	1,21	2,24	11,45	1,21	2,09	10,63	1,21	2,01
Phe-OM	10,97	1,18	2,33	9,86	1,19	2,22	9,42	1,18	2,14
Ser-OBn	13,15	1,02	0,00	11,60	1,02	0,00	10,96	1,02	0,00
acetonitril:metanol 17:83									
Ala-OBn	12,28	1,18	1,96	12,45	1,15	1,82	12,90	1,18	1,83
Asp-diOBn	13,41	n. é.	n. é.	15,16	n. é.	n. é.	15,50	n. é.	n. é.
PhGly-OM	26,22	1,22	1,25	27,53	1,22	1,29	28,38	1,21	1,22
Val-OBn	7,20	1,08	0,70	7,81	1,07	0,69	8,06	1,07	0,69
acetonitril:metanol 25:75									
1-aminoindán	27,38	1,30	1,02	23,95	1,30	0,99	31,33	1,31	1,06
nitro-PEA	28,86	1,39	2,77	25,59	1,38	2,64	32,03	1,40	2,60

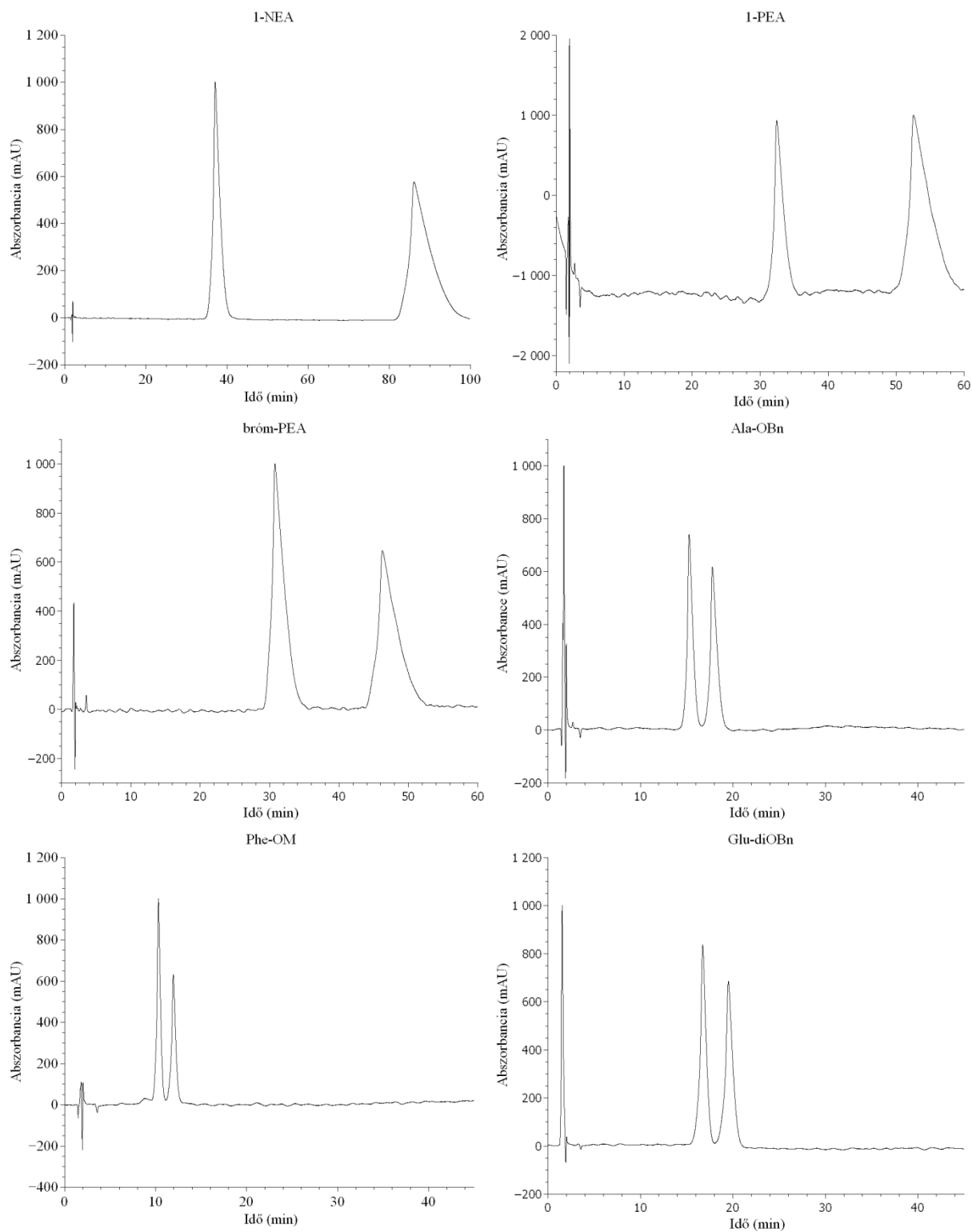
5. táblázat Az eluensőszeretétel változtatásának hatása 0,2% hangyasav és 0,1% trietil-amin módosítók alkalmazása esetén (n.é.: nincs értékelhető adat).

Az állófázis vizsgálatát az acetonitrilhez adott hangyasav és trietil-amin arányának változtatásával folytattam, majd a kromatográfias jellemzőket minden esetben háromféle metanol-acetonitril arány mellett hasonlítottam össze. Az általam alkalmazott módszerekben a következő eluensőszeretetelek szerepeltek:

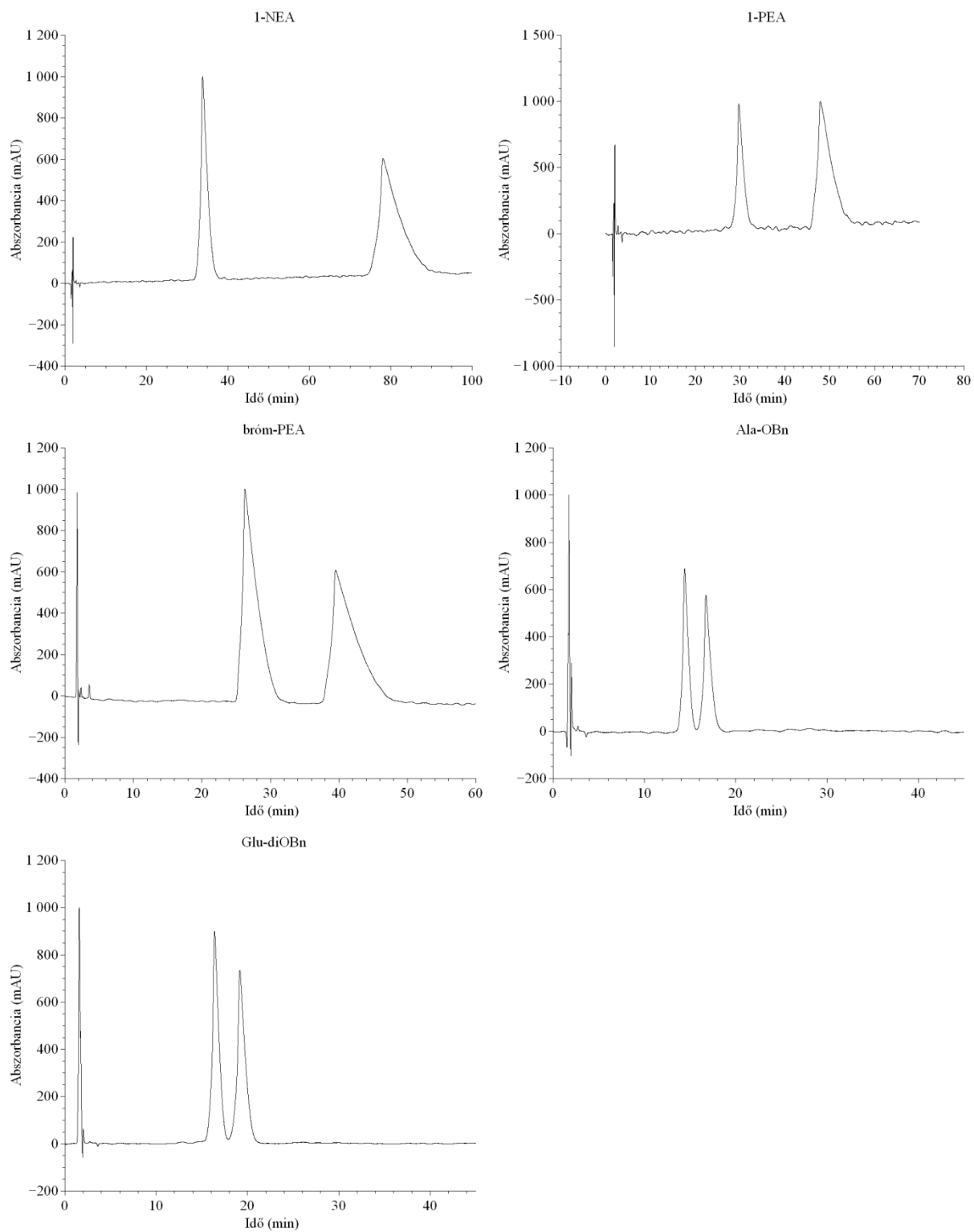
- acetonitril:metanol 20:80, 0,2% hangyasav, 0,2% trietil-amin (17. ábra)
- acetonitril:metanol 15:85, 0,2% hangyasav, 0,2% trietil-amin (18. ábra)
- acetonitril:metanol 10:90, 0,2% hangyasav, 0,2% trietil-amin (19. ábra)

- acetonitril-metanol 20:80, 0,4% hangyasav, 0,1% trietil-amin (20. ábra)
- acetonitril-metanol 15:85, 0,4% hangyasav, 0,1% trietil-amin (21. ábra)
- acetonitril-metanol 10:90, 0,4% hangyasav, 0,1% trietil-amin (22. ábra).

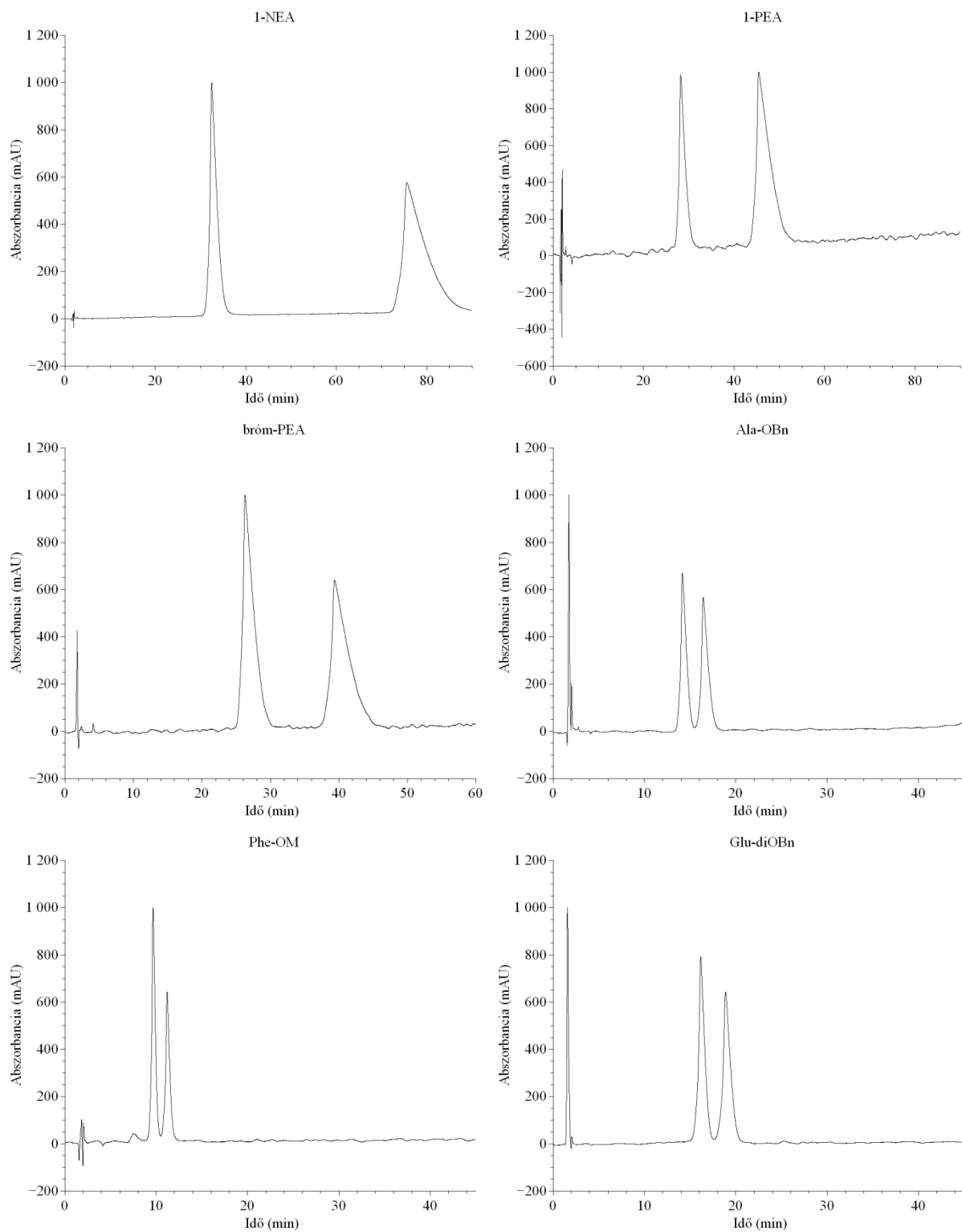
A kapott kromatográfias értékeket a 6. és 7. táblázatok tartalmazzák.



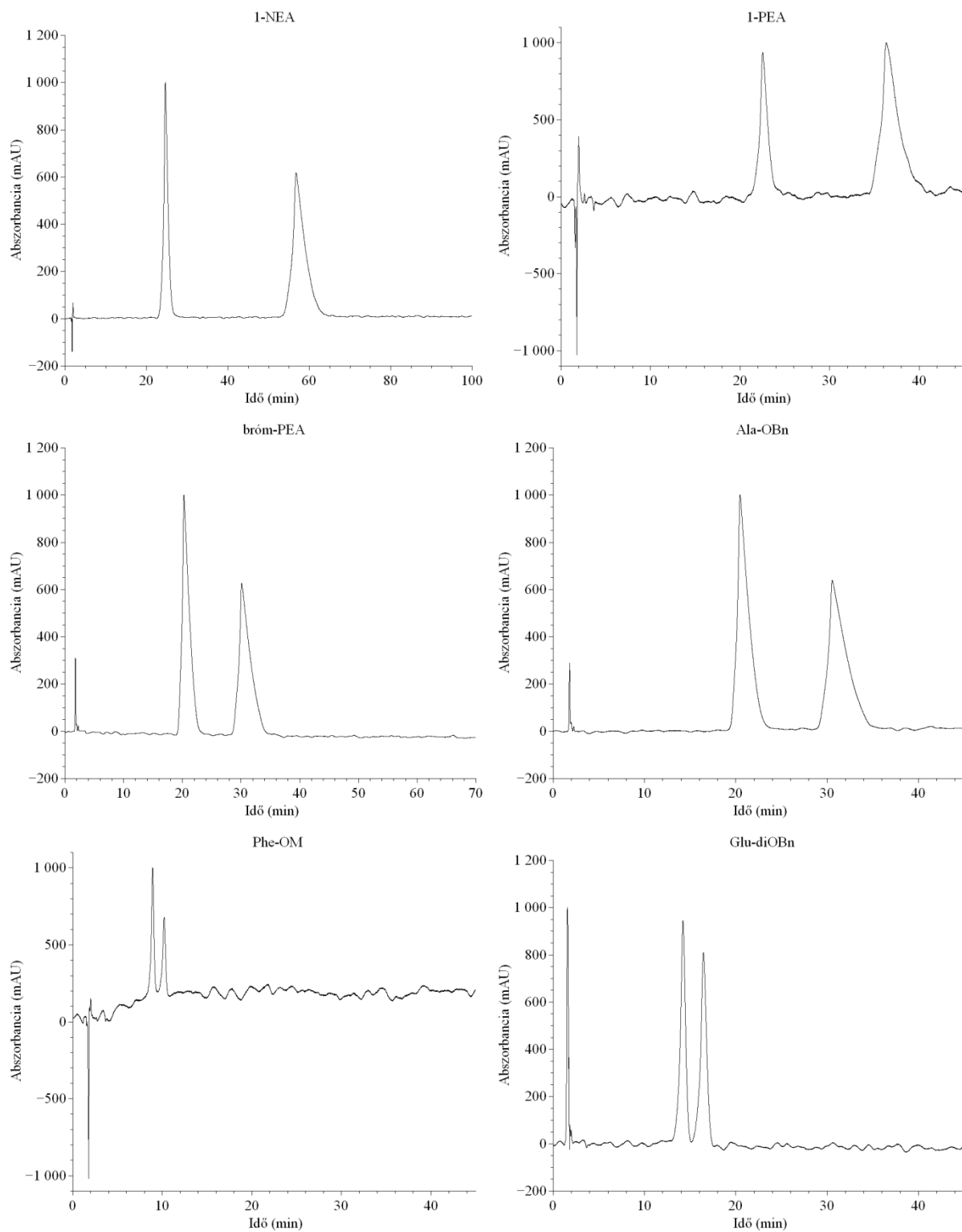
17. ábra 1-NEA, 1-PEA, bróm-PEA, Ala-OBn, Phe-OM, Glu-diOBn elválasztása az (*S,S*)-CSP-2 állófázison. Eluens: acetonitril:metanol 20:80, 0,2% hangyasav, 0,2% trietilamin.



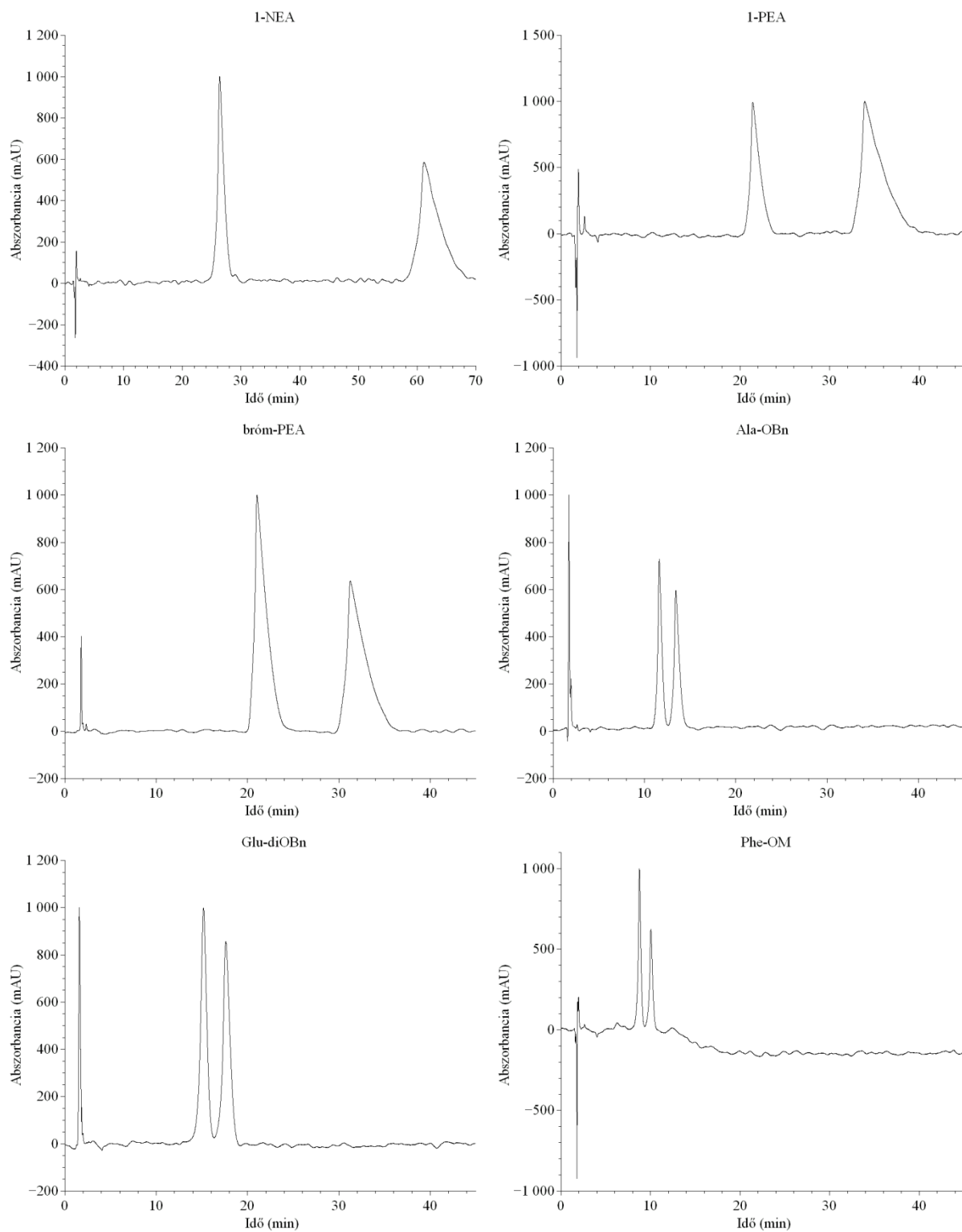
18. ábra 1-NEA, 1-PEA, bróm-PEA, Ala-OBn, Glu-diOBn elválasztása az (*S,S*)-CSP-2 állófázison. Eluens: acetonitril:metanol 15:85, 0,2% hangyasav, 0,2% trietil-amin.



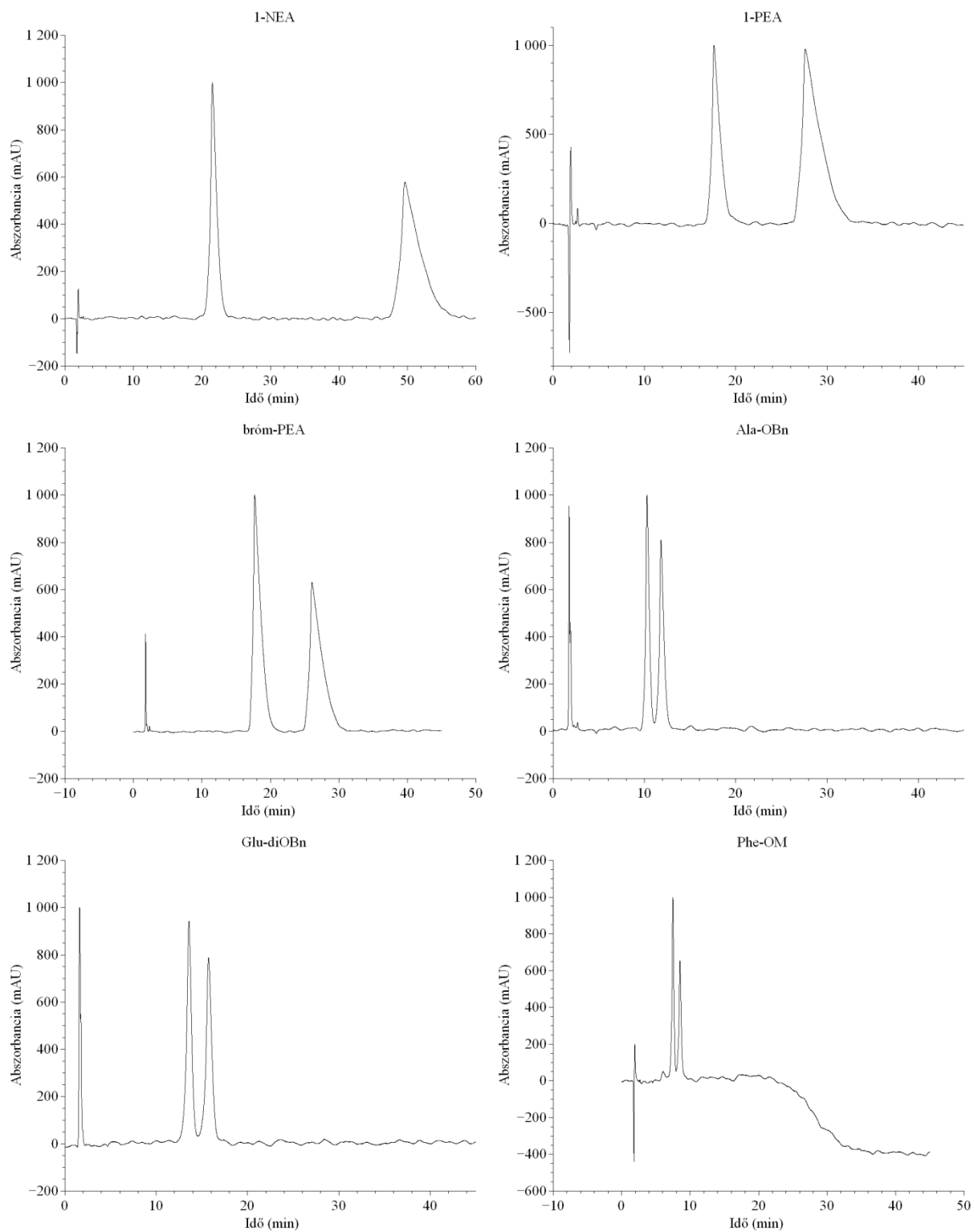
19. ábra: 1-NEA, 1-PEA, bróm-PEA, Ala-OBn, Phe-OM, Glu-diOBn elválasztása az (*S,S*)-CSP-2 állófázison. Eluens: acetonitril:metanol 10:90, 0,2% hangyasav, 0,2% trietilamin.



20. ábra 1-NEA, 1-PEA, bróm-PEA, Ala-OBn, Phe-OM, Glu-diOBn elválasztása az (*S,S*)-CSP-2 állófázison. Eluens: acetonitril:metanol 20:80, 0,4% hangyasav, 0,1% trietilamin.



21. ábra 1-NEA, 1-PEA, bróm-PEA, Ala-OBn, Phe-OM, Glu-diOBn elválasztása az (*S,S*)-CSP-2 állófázison. Eluens: acetonitril:metanol 15:85, 0,4% hangyasav, 0,1% trietilamin.



22. ábra 1-NEA, 1-PEA, bróm-PEA, Ala-OBn, Phe-OM, Glu-diOBn elválasztása az (*S,S*)-CSP-2 állófázison. Eluens: acetonitril:metanol 10:90, 0,4% hangyasav, 0,1% trietilamin.

acetonitril:metanol 20:80				acetonitril:metanol 15:85			acetonitril:metanol 10:90		
Analit neve	t _{R1}	α	R _s	t _{R1}	α	R _s	t _{R1}	α	R _s
1-aminoindán	29,52	1,31	1,02	26,19	1,31	0,93	25,03	1,31	0,93
1-NEA	37,09	2,39	7,75	33,81	2,38	7,21	32,42	2,41	7,07
2-NEA	36,49	1,58	3,96	33,80	1,57	3,46	32,21	1,58	3,44
Ala-OBn	15,26	1,19	2,03	14,40	1,18	1,85	14,15	1,18	1,80
Asp-diOBn	13,94	n.é.	n.é.	14,12	n.é.	n.é.	14,27	n.é.	n.é.
biszamin	11,16	1,43	0,47	10,82	1,42	0,41	11,88	1,36	0,00
bróm-PEA	30,77	1,53	3,72	26,27	1,54	2,47	26,29	1,53	3,32
Glu-diOBn	16,73	1,18	2,14	16,39	1,19	1,94	16,16	1,19	1,98
nitro-PEA	29,67	1,39	2,30	n.é.	n.é.	n.é.	25,88	1,37	1,90
PEA	32,44	1,65	4,85	29,69	1,65	4,41	28,17	1,65	4,14
Phe-OBn	11,74	1,21	2,08	11,38	1,22	1,83	11,03	1,22	1,86
Phe-OM	10,30	1,19	2,21	n.é.	n.é.	n.é.	9,65	1,19	2,02
PhGly-OM	32,85	1,20	1,24	27,86	1,21	1,24	26,21	1,21	1,14
Ser-OBn	12,86	1,02	n.é.	12,20	1,02	n.é.	10,91	1,27	n.é.
Val-OBn	9,07	1,07	0,79	8,64	1,08	0,76	8,44	1,07	0,71

6. táblázat Az eluensőszététel változtatásának hatása 0,2% hangyasav és 0,2% trietil-amin módosítók alkalmazása esetén (n.é.: nincs értékelhető adat).

acetonitril:metanol 20:80				acetonitril:metanol 15:85			acetonitril:metanol 10:90		
Analit neve	t _{R1}	α	R _s	t _{R1}	α	R _s	t _{R1}	α	R _s
1-aminoindán	21,30	1,29	1,15	21,26	1,29	1,18	17,18	1,28	1,07
1-NEA	24,65	2,40	8,73	26,36	2,41	8,73	21,54	2,42	7,97
2-NEA	25,00	1,59	4,35	25,92	1,59	4,38	21,57	1,59	4,09
Ala-OBn	20,46	1,54	3,27	11,62	1,18	1,91	10,28	1,18	1,89
Asp-diOBn	15,26	n.é.	n.é.	15,75	n.é.	n.é.	13,46	n.é.	n.é.
biszamin	9,44	1,47	1,09	8,68	1,47	1,07	7,74	1,46	0,97
bróm-PEA	20,27	1,53	3,28	21,03	1,53	3,19	17,71	1,52	3,06
Glu-diOBn	14,22	1,18	1,97	15,17	1,18	1,79	15,10	1,18	2,01
nitro-PEA	21,09	1,40	3,23	22,04	1,39	2,95	18,67	1,37	2,66
PEA	22,51	1,66	5,70	21,40	1,64	3,96	17,61	1,63	3,66
Phe-OBn	10,23	1,21	2,36	11,10	1,21	2,38	10,60	1,21	2,33
Phe-OM	8,91	1,18	2,21	8,74	1,18	2,16	7,48	1,18	1,92
PhGly-OM	25,10	1,21	1,43	19,78	1,25	1,44	19,24	1,21	1,14
Ser-OBn	10,19	1,01	n.é.	10,09	1,01	n.é.	8,59	n.é.	n.é.
Val-OBn	7,33	1,07	0,75	7,33	1,08	0,77	6,37	1,07	0,65

7. táblázat Az eluensőszététel változtatásának hatása 0,4% hangyasav és 0,1% trietil-amin módosítók alkalmazása esetén (n.é.: nincs értékelhető adat).

A 6. és a 7. táblázatban szereplő retenciós idők alapján megfigyelhető, hogy minden esetben volt visszatartás. A 0,2% hangyasav és 0,2% trietil-amin módosítók alkalmazása mellett (6. táblázat) az aminok esetén –a biszamin kivételével– az eluens metanol tartalmának növelésével csökkentek a retenciós idők (a biszamin esetén nem állapítható meg ilyen tendencia). Az aminosav-észterek esetén, egyedülként az enantiomer elválasztás jelét sem mutató Asp-diOBn kivételével, az eluens metanol tartalmának növekedésével szintén retenciós időt csökkentő hatást figyelhetünk meg. A szelektivitás és a felbontás értékek a legtöbb esetben a metanol:acetonitril 80: 20 arány mellett voltak a legmagasabbak. A PhGly-OM felbontás értéke megegyezik a 20:80 és a 15:85 eluens arányok alkalmazása esetén, viszont a metanol arány további növelésére jelen esetben is alacsonyabb felbontás értékeket kaptunk. A Val-OBn esetén 15:85 metanol eluens arány mellett kaptam a legjobb felbontás értéket. A Ser-OBn esetén csekély enantioszelektivitást tapasztaltam.

Savas és bázikus módosítóként 0,4% hangyasavat és 0,1% trietil-amint alkalmazva acetonitril:metanol 20:80 arány mellett a legtöbb amin esetében az összes általam alkalmazott módszerhez képest a legjobb elválasztási értékeket kaptuk. Az 1-aminoindán és a 2-NEA, esetén a 15:85 oldószer arány alkalmazásával kaptam a legjobb elválasztás értékeket (7. táblázat). Az aminosav-észterek közül az Asp-diOBn ebben az esetben sem, míg a Szerin-OBn minimális enantiomer elválasztást mutatott. Az Ala-OBn viszont a többi összetétel esetén mért elválasztáshoz képest kiemelkedően jó elválasztást mutatott. A Glu-diOBn esetében 10:90 acetonitril:metanol eluens arány mellett kaptam a legnagyobb felbontás értéket. A retenciós idők változásában 0,4% hangyasav és 0,1% trietil-amin módosítókat tartalmazó eluensek alkalmazása esetén nem tapasztalható vegyületcsoportonként fennálló tendencia.

5. ALKALMAZOTT KÉSZÜLÉKEK, MÓDSZEREK

A vizsgálataimhoz használt HPLC berendezés típusa: VWR HITACHI ELITE LaChrom Pump L-2310, Autosampler L2200, Column Oven L-2300, Diode Array Detector L-2450, Organizer. Vezérlő és kiértékelő szoftver: EZChrom ELITE.

5.1 A kromatográfiás oszlop előállítása

Az (*S,S*)-CSP-2 királis állófázist Dr. Kupai József a megfelelő trietoxiszilil-végcsoportú koronaéterből szférikus HPLC minőségű szilikagéllal toluolban mechanikusan kevertetve 20 óráig forráshőmérsékleten állította elő. A királis állófázis felületi borítottságát elemanalízissel határozták meg.

Mintát vettek a HPLC minőségű szférikus szilikagélből, és ugyanolyan körülmények között kezelték, mint az előbbi királis állófázist. A mintából felvett elemanalízis vizsgálatok a következő eredményt adták: C, 0,32; H, 1,28; N, 0,00.

Az (*S,S*)-CSP-2 elemanalízis vizsgálatai pedig a következő eredményt adták: C, 1,79; H, 1,45; N, 0,13. A két elemanalízis vizsgálat eredménye alapján megadható, hogy az (*S,S*)-CSP-2 grammonként 0,045 mmol (C%-ból számolva), 0,046 mmol (H%-ból számolva) és 0,046 mmol (N%-ból számolva) királis koronaétert tartalmazott [26].

A kromatográfiás oszlop töltését 500 bar nyomáson, Haskel pumpával, „slurry packing” módszerrel végezték. A töltet alapanyaga Superspher[®] (Si 60, Cat. No. 119609, Merck) a normál fázisú kromatográfiában használt gömb alakú HPLC szilikagél szorbens, melynek geometriai paraméterei: 4 µm-es részecskeméret, 60 Å-ös pórusátmerő. Az oszlop hossza 150 mm, átmérője 4 mm, anyaga rozsdamentes acél.

5.2. Kromatográfia

Oldatkészítés: a kromatográfiai vizsgálatokhoz a vendégmolekulákból 2 mg/ml koncentrációjú metanosos oldatokat készítettem. A rendelkezésemre álló tiszta enantiomerekből (1-NEA, 2-NEA, nitro-PEA, PEA, biszamin) *R:S* 2:1 arányú keverékeket készítettem, így a kapott kromatográfiai csúcsterületek arányából megállapítható volt az egyes enantiomerek elúciós sorrendje.

Kolonnahőmérséklet: 25°C

Injektálási térfogat: 2 µl

Áramlási sebesség: 1 ml/min

Detektálás: 190–800 nm között diódasoros detektorral, értékelés anyagonként az optimális hullámhosszon.

6. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Munkám során az (*S,S*)-CSP-2 piridino-koronaéter alapú királis állófázis enantioszelektivitását vizsgáltam elsőként a rendelkezésemre álló tiszta 1-NEA, 2-NEA, 1-PEA, nitro-PEA, biszamin enantiomerekkel végzett kromatográfiás mérések során. Megállapítottam, hogy a nagymértékben eltérő szerkezetű biszamin kivételével az *R*-enantiomerek eluálódtak később az eluensként acetonitril:metanol 20:80, 0,2% hangyasavat, 0,1% trietil-amint alkalmazó módszer esetén.

Kerestem a vizsgált vegyületek lehető legszélesebb körében jól alkalmazható kromatográfiás paramétereket. Méréseimet polár-organikus módban hangyasav és trietil-amin módosítók alkalmazásával végeztem.

A primer aminok és az aminosav-észterek esetén vizsgáltam a savas és bázikus módosítók, valamint az eluens acetonitril:metanol arányváltozásának hatását. A legtöbb analit esetében az eluens metanol tartalmának növelésével retenciós idő csökkenést tapasztaltam azonos savas és bázikus módosító arány mellett. Összességében a legtöbb analit esetén a legjobb elválasztás értékeket –az azonos acetonitril:metanol arány mellett a legalacsonyabb retenciós időket eredményező– acetonitril:metanol 20:80, 0,4% hangyasav, 0,1% trietil-amin eluens alkalmazása esetén kaptam.

Ily módon a vizsgált (*S,S*)-CSP-2 állófázishoz sikerült kidolgoznom egy olyan kvalitatív analitikai módszert, ami relatív széles körben alkalmazható aromás gyűrűt tartalmazó királis primer aminok enantiomerpárjainak elválasztására.

Irodalomjegyzék:

1. Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 2495, ugyanott 7017,
2. Sousa, L. R.; Sogah, G.D.Y.; Hoffman, D.H.; Cram, D.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 4569.
3. Ward, T. J.; Ward, K. D. *Anal Chem.*, **2012**, *84*, 626–635.
4. Shinbo T.; Yamaguchi T.; Nishimura K.; Sugiura, M. *J. Chromatogr.*, **1987**, *405*, 145.
5. Machida, Y.; Nishi, H.; Nakamura, K. *J. Chromatogr. A*, **1999**, *830*, 311–320.
6. Machida, Y.; Nishi, H.; Nakamura, K.; Nakai, H.; Sato, T. *J. Chromatogr. A*, **1998**, *805*, 85–92.
7. Jin, J. S.; Stalcup, A. M.; Hyun, M. H. *J. Chromatogr. A*, **2001**, *933*, 83–90.
8. Choi, H. J.; Park, Y. J.; Hyun, M. H. *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1164*, 235–239
9. Cho, H. S.; Choi, H. J.; Hyun, M. H. *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, 7446–7449.
10. Ilisz, I.; Pataj, Z.; Berkecz, R.; Misicka A.; Tymecka D.; Fülöp, F.; Choi, H., J.; Hyun, M., H. *J. Chromatogr. A*, **2010**, *1217*, 1075–1082.
11. Lee, A.; Choi, H., J.; Jin, K., B.; Hyun, M. H. *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*, 4071–4076.
12. Hyun, M. H.; Han, S. C.; Lipshutz, B. H.; Shin, Y.-J.; Welch, C, J. *J. Chromatogr. A*, **2002**, *959*, 75–83.
13. Lakatos, Sz.; Fetter, J.; Bertha, F.; Huszthy, P.; Tóth, T.; Farkas, V.; Orosz, Gy.; Hollósi, M. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 1012–1022.
14. Cho, Y. C.; Choi, H. J.; Hyun, M. H. *Journal . J. Chromatogr. A*, **2008**, *1191*, 193–198.
15. Bradshaw, J. S; Huszthy, P.; Wang, T. M.; Zhu, C. Y.; Nazarenko, A. Y.; Izatt, R. M. *Supramol.Chem.*, **1993**, *1*, 267–275.
16. Huszthy, P.; Bradshaw, J.S; Bordunov, A. V.; Izatt, R. M. *ACH -Models Chem.*, **1994**, *131*, 445–454.
17. Hathaway, J. K.; Izatt, R. M.; Zhu, Z. Y.; Huszthy, P.; Bradshaw, J. S. *Supramol. Chem.*, **1995**, *5*, 9–13.
18. Köntös, Z.; Huszthy, P.; Bradshaw, J. S.; Izatt R. M. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 2087–2099.
19. Köntös, Z.; Huszthy, P.; Bradshaw, J. S.; Izatt R. M. *Enantiomer*, **2000**, *5*, 561–566.
20. Horváth, G.; Huszthy, P.; Szarvas, S.; Szókán, G.; Redd, J. T.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2000**, *39*, 3576–3581.

21. Izatt, R. M.; Wang, T. M.; Hathaway, J. K.; Zhang, X. X.; Curtis, J. C.; Bradshaw, J. S.; Zhu, C. Y.; Huszthy, P. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, **1994**, *17*, 157–175.
22. Farkas, V.; Tóth, T.; Orosz, G.; Huszthy, P.; Hollósi, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1883–1889.
23. Kupai, J.; Lévai, S.; Antal, K.; Balogh, G. T.; Tóth, T.; Huszthy, P. *Tetrahedron:Asymmetry*, **2012**, *23*, 415–427.
24. . Hyun, M. H; Jin, J. S.; Lee W. *J. Chromatogr. A*, **1998**, *822*, 155.
25. Gérczei, T.; Bölskei, Zs.; Keserű, Gy. M.; Samu, E.; Huszthy, P. *Tetrahedron:Asymmetry*, **1999**, *10*, 1995–2005.
26. Kupai, J. *Doktori értekezés* **2012**.