

KÖRNYEZETI SZEMPONTBÓL FONTOS MANDULASAV- SZÁRMAZÉKOK ENANTIOMER SZELEKTÍV GÁZKROMATOGRÁFIÁS ELVÁLASZTÁSA GAMMA CIKLODEXTRIN SZELEKTORON

RÉPÁSSY Levente, JUVANCZ Zoltán, BODÁNE KENDROVICS Rita
Óbudai Egyetem, Rejtő Sándor Könnyűipari és Környezetmérnöki Kar,
Környezetmérnöki és Természettudományi Intézet

Kivonat: Mandulasavat csak származékolt formában lehet gázkromatografálni. A mandulasav izomerjeinek királis elválasztását vizsgáltuk különböző származékainak formájában, továbbá vizsgáltuk a gyűrűn klórszubsztituált mandulasavak királis szelektivitását a szubsztitúció helyének függvényében is. Szelektornak szilikon polimerben oldott diacetyl-terc-butylsilil-gamma ciklodextrint alkalmaztunk. Eredményesen választottuk el a vizsgált származékokat és megállapítottuk, hogy egy adott izomerpár elválasztásában csak egy fajta királis felismerő mechanizmus működik, de más származéknál lehet más mechanizmus is. Felismertük a királis elválasztásért felelős kölcsönhatásokat, beleértve a zárványkomplex képzést.

Kulcsszavak: mandulasav, királis elválasztás, gázkromatográfia, diacetyl-terc-butylsilil-gamma ciklodextrin

BEVEZETÉS

Egészségünk és környezetünk védelme érdekében is fontos, hogy a különböző ipari vagy lakossági tevékenység folytán a természetbe jutó anyagokról minél pontosabb ismeretekkel rendelkezünk. [1, 2] Antropogén tevékenység révén különböző vegyi anyagok kerülnek a természetbe, megváltozik a kémiai elemek megjelenési formája, valamint megoszlási aránya. Munkánk célja a környezetben is előforduló mandulasav analitikai módszerfejlesztése volt. Egy γ -ciklodextrin szelektort tartalmazó oszlopon vizsgáltuk a mandulasav különböző származékainak királis gázkromatográfias elválasztását. [3]

Analitikai szempontból kihívást jelent, hogy az enantiomerek, vagy más néven optikai izomerek [4], homogén térben azonosan viselkednek. Munkánk során a kitűzött cél a királis molekulák gázkromatográfias módszerrel történő elválasztása volt. A mérésekhez inhomogén térnek egy módosított γ -ciklodextrin szelektorttal ellátott kapilláris állófázist használtuk és sikerült számos különböző enantiomerpárt egymástól elválasztani.

Modellvegyületnek a legegyszerűbb királis aromás- α -hidroxisavat (AHA), a mandulasavat választottuk és ezek származékait. Vizsgáltuk a szubsztitúció hatását a királis elválasztásra. [5, 6]

ANYAG ÉS MÓDSZER

Származékképzés

A szubsztituálatlan mandulasav nagy polaritása és kis illékonyságának következtében nem gázkromatografálható származékképzés nélkül, ezért a következő származékolásokat alkalmaztuk:

Metil-, és etil-észter előállítás

Az eljárás során 0,066 mmol racém és 0,033 mmol tiszta R-mandulasavat egy 2 mL-es csavaros kupakos kisedénybe mértünk, majd 1 mL metanolt és egyetlen csepp tömény sósavoldatot adtunk hozzá, majd 80 °C-on 2 órán keresztül lezárva állni hagytuk.

Acilezés

Az észteresítési eljárás termékének egyharmadát (kb. 0,033 mmol) 800 µL etil acetátban feloldottuk, majd 45 µL (0,066 mmol, 2 ekvivalens) acetyl-kloridot csepegtettünk hozzá és lezártuk, majd két órán keresztül 80 °C-on állni hagytuk.

Trifluoro-acilezés

Az észteresítési eljárás termékének a harmadát (kb. 0,033 mmol) 800 µL etil acetátban feloldottuk, majd 90 µL (0,066 mmol, 2 ekvivalens) trifluoroecetsav anhidridet és 45 µL (0,033 mmol, 1 ekvivalens) trietil-amint csepegtettünk hozzá. Miután lezártuk, 80 °C-on állni hagytuk 2 órán keresztül.

A használt GC-MS készülék

Méréseinket az Óbudai Egyetem tulajdonában lévő Shimadzu 17A gázkromatográfiás készülékkel végeztük, mely egy QP5000-es gyártmányú tömegspektrométerrel volt összekötve.

Az eredményeket 100 °C-ra extrapolálva hasonlítottuk össze egymással. Minden származék esetén addig végeztünk a méréseket, amíg legalább 3 hőmérsékleten sikeres elválást nem tapasztaltunk. Általánosan elmondható, hogy a retenciós idő fordítottan arányos a hőmérséklettel, de az alacsonyabb hőmérséklet kedvez a szelektivitásnak, tehát minél alacsonyabb hőmérsékleten végezzük az elválasztást, annál hosszabb ideig tart a mérés.

A használt királis szelektorral ellátott oszlop tulajdonságai

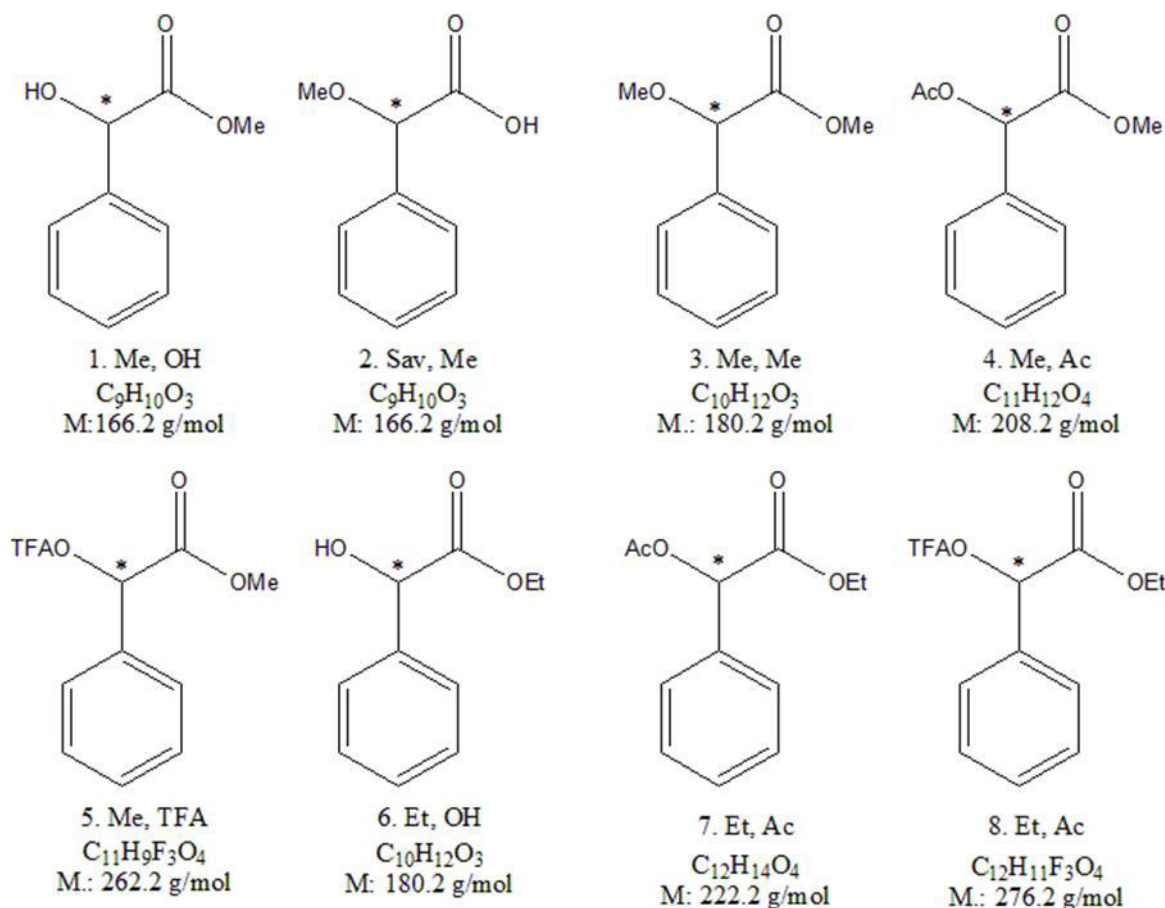
Méréseinkhez állófázisnak a kereskedelmi forgalomban kapható MEGA-DEX-DAC-Gamma oszlopot használtuk. Egy 25 m hosszú, 0,25 mm belső átmérőjű, 0,025 µm filmvastagságú kapilláris cső, melyben diacetyl-terc-butylsilil-gamma módosított ciklodextrin szelektor található

MÉRÉSI EREDMÉNYEK

A mandulasavból képzett származékok

Mandulasavból, a 1. ábrán látható 9 darab származékot állítottunk elő, A benzolgyűrű egyik esetben sem szubsztituált. Azt kívántuk vizsgálni, hogy a karboxil-, illetve a hidroxilcsoport megváltoztatása,

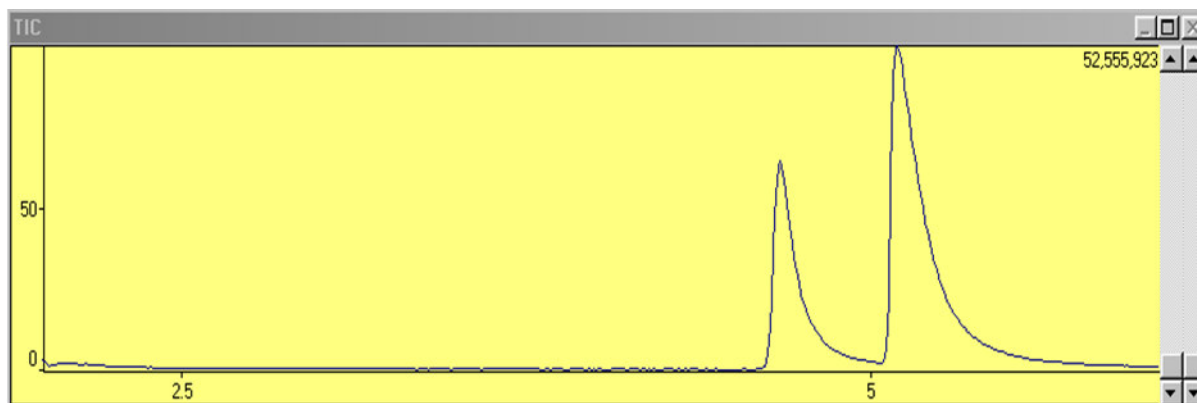
hogyan befolyásolja az elválást. Azért dolgoztunk minden esetben R-izomer feleslegben, hogy meg tudjuk állapítani az elúciós sorrendet is, azaz, hogy melyik izomer eluálódik először az adott körülmények között, illetve, hogy történik-e, korábbi más oszlopokon vizsgált megfigyelésekkel megegyezően elúciós sorrend inverzió.



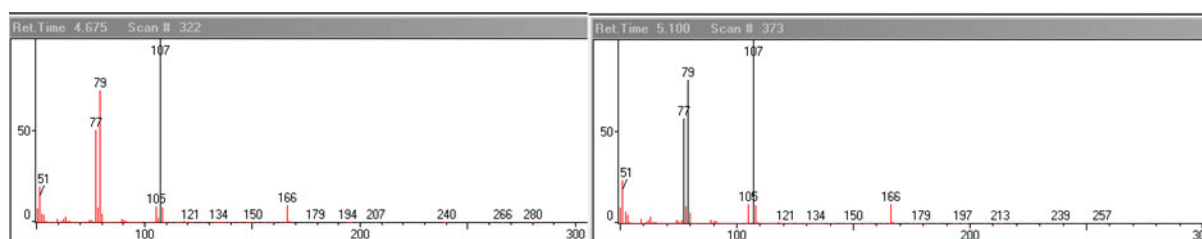
1. Ábra: A mandulasavból készített származékok szerkezete

A mérések eredményeképpen kapott retenciós időkből kiszámoltuk a szelektivitást, majd extrapoláltuk az értékét (ahol szükség volt rá) 100 °C-ra. A mérési eredmények közvetlenül mandulasavból előállított származékok esetén az 1. táblázat tartalmazza. Az elválasztás annál szelektívebb, minél nagyobb az α értéke, és a mérési idő annál rövidebb, minél kisebb a 120°C-on mért retenciós idő.

A vegyületek beazonosítása tömegspektrumuk alapján történt. A csúcsok nagyságából következtettünk az elúciós sorrendre mivel az R izomer volt feleslegben (2, 3 ábra).



2. Ábra: Az 1. sorszámú molekula kromatogramja 140 °C-on



3. Ábra: A két csúcshoz tartozó tömegspektrumok

A táblázatban szereplő „Elúció” oszlop az elúciós sorrendre utal, amennyiben az R-izomer szerepel elől, akkor az eluálódott először. Mivel R-enantiomer felesleggel dolgoztunk, ezért azt félkövér betűtípussal jelöltük a táblázatban, utalva arra, hogy az a nagyobb csúcs a kromatogramon. A kapott eredményekből látszik, hogy a karboxil csoporton, amennyiben a hidroxil csoport szubsztituátlan, az etil-észter jobb elválást mutat, míg az acilezett és trifluoro-acilezett származékok esetén a metil-észterrel érhetünk el nagyobb szelektivitást. A kötés polaritásának növekedését okozza, ha az oxigénhez további elektronszívó csoport (acetil, trifluoracetil) kapcsolódik. A szabad hidroxil csoportot tartalmazó származékok esetén, általánosan jobb elválást tapasztaltunk, feltételezhető tehát hogy a hidrogén-híd kötés(H donor)-re alkalmas hidroxil csoport kulcs szerepet játszik a királis felismerésben. A 3. számú, a karboxil és a hidroxil csoporton is metilezett származék szelektivitása, például kiugróan alacsony volt. A 2. sorszámú, szabad karboxil csoportot tartalmazó származék esetén az elválasztás időtartama jelentősen megnőtt a többi származékhoz képest.

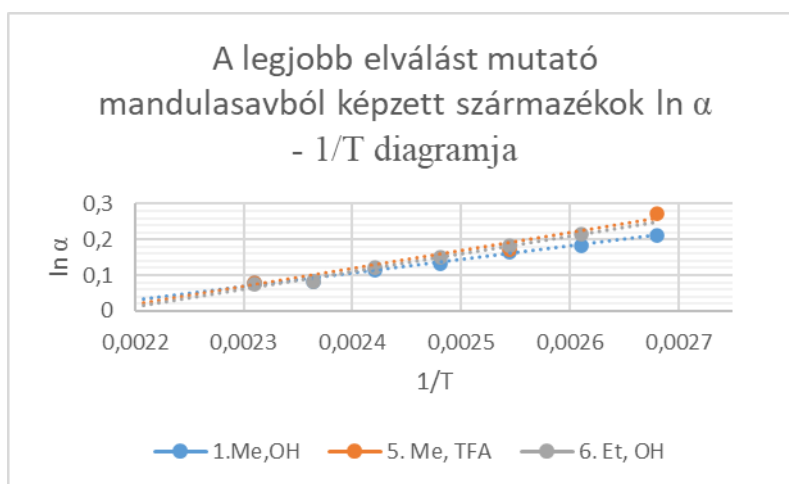
1.táblázat: a mandulasavból készített származékok szelektivitása 100°C-ra extrapolálva

Sorszám	Hidroxil csoport	Karboxil csoport	Kód	α 100 °C	Elúció	t_R /min 120 °C
1.	OH	Me	Me, OH	1,23599	S/R	14,434
2.	Me	Sav	Sav, Me	1,13979	S/R	80,634
3.	Me	Me	Me, Me	1,00944	S/R	24,611
4.	Ac	Me	Me, Ac	1,16516	R/S	14,768
5.	TFA	Me	Me, TFA	1,29619	R/S	5,280
6.	OH	Et	Et, OH	1,27391	S/R	14,303

7.	Ac	Et	Et, Ac	1,05874	R/S	17,181
8.	TFA	Et	Et, TFA	1,06922	S/R	5,089

A kapott eredményekből látszik, hogy a karboxil csoporton, amennyiben a hidroxil csoport szubsztituátlan, az etil-észter jobb elválást mutat, míg az acilezett és trifluoro-acilezett származékok esetén a metil-észterrel érhetünk el nagyobb szelektivitást.

Az elválasztás hőmérsékletfüggéséről elmondható, hogy $\ln \alpha - 1/T$ összefüggések lineárisok (4. ábra).

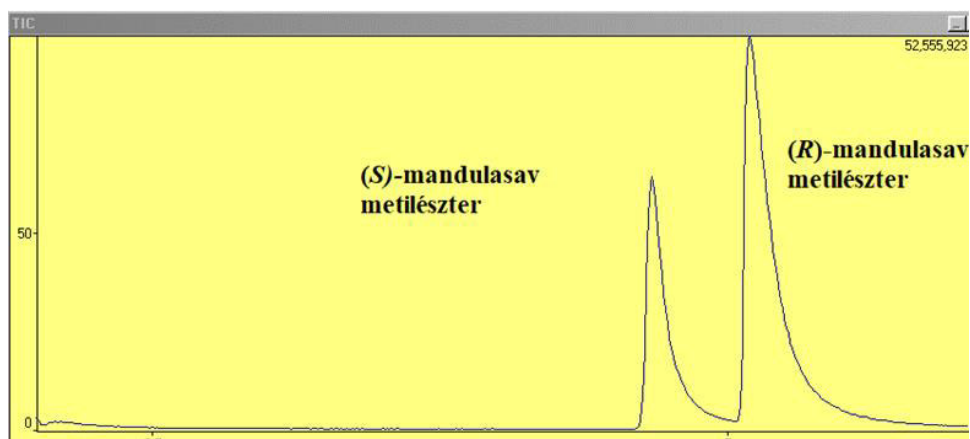


4. Ábra: A legjobb elválasztást mutató mandulasavból képzett származékok $\ln \alpha - 1/T$ diagramja

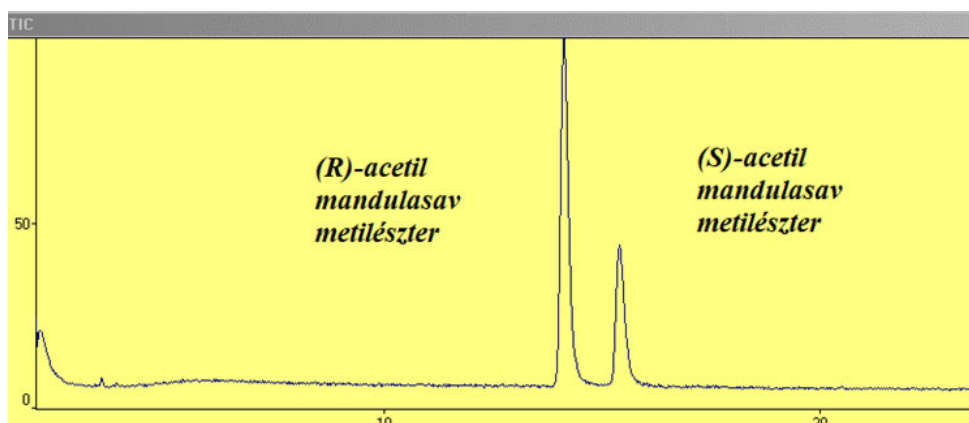
Az elúciós sorrend inverziója

A szabad hidroxil-csoportot tartalmazó származékok esetén a feleslegben használt, R-izomer eluálódott később, míg ez a sorrend néhány acilezett és trifluoro-acilezett származék esetén megfordult. Tehát a származékok különböző módon hatnak kölcsön az állófázissal, ami a retenciós sorrend inverzióját okozza (5, 6 ábrák). Fontos megemlíteni, hogy nem minden acilezett, és trifluoro acilezett származék esetén figyelhető meg ez a jelenség, amely a királis felismerés bonyolult és sokrétű mechanizmusára utal.

Fontos megemlíteni, hogy nem minden acilezett, és trifluoro acilezett származék esetén figyelhető meg ez a jelenség, amely a királis felismerés bonyolult és sokrétű mechanizmusára utal.



5. Ábra: Az 1.-es sorszámú vegyület kromatogramja 140 °C-on



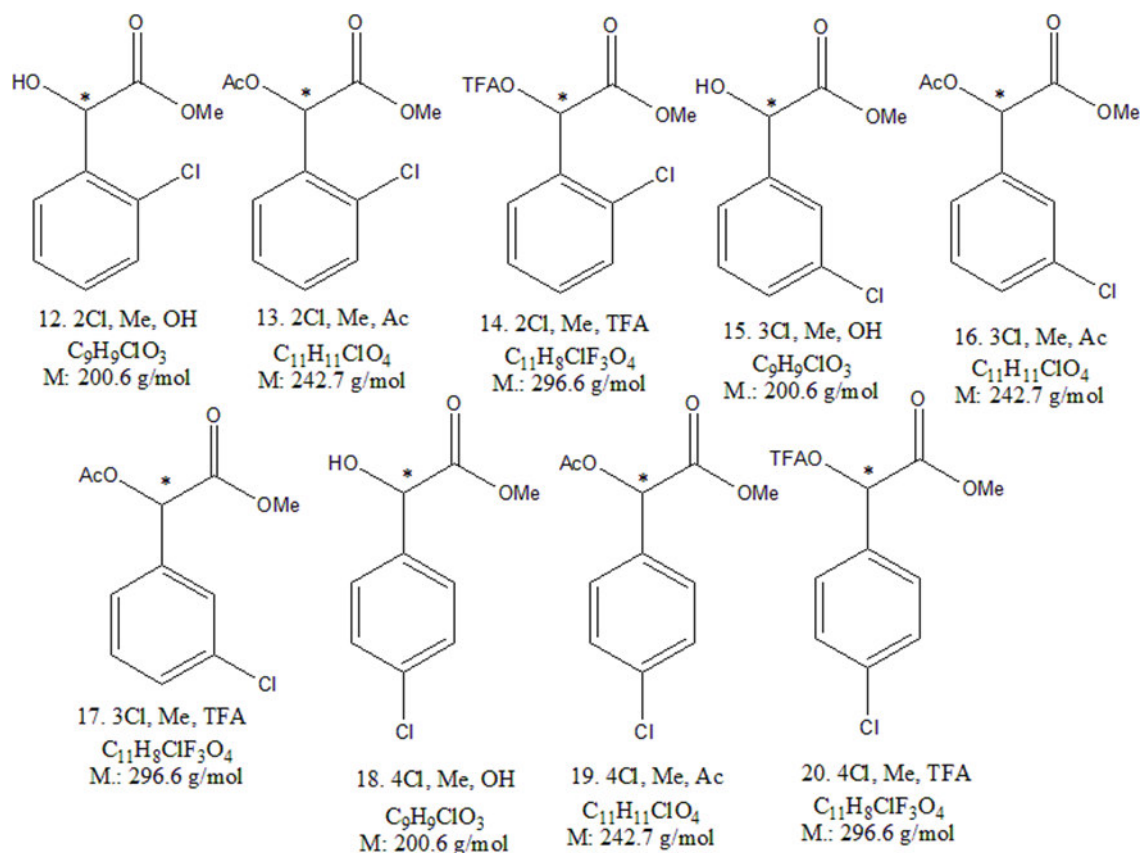
6. Ábra: A 4. sorszámú vegyület kromatogramja 130°C-on

Klórmandulasavak

A méréseket, a gyűrű 2-, 3-, 4-es pozícióban klórszubsztituált mandulasav-származékokkal is elvégeztük. Ezen molekulák esetében nem csak a karboxil csoport metil-észtereit, hanem a hidroxil-csoporton acilezett, és trifluoro acilezett származékokat is mértük, ugyanis rendelkezésre állt tiszta R-izomer, aminek segítségével az elúciós sorrend változását is vizsgálni tudtuk. A származékok szerkezeti képletét a 7. ábra mutatja, a mérési eredményeket pedig a 2. táblázat foglalja össze.

A halogének, így a klór is, $-I$ (indukív, azaz a σ -vázon keresztüli elektronszívó) és $+M$ (mezomer, azaz a π -vázon keresztül elektronküldő) effektussal rendelkező csoportok, mely esetén a σ -vázon keresztüli elektronszívó hatás erősebb, mint a π -vázon keresztül történő elektronküldés. A klór atomok az elektronszívó hatásuknak köszönhetően elektrosztatikus kölcsönhatást tudnak létesíteni a γ -

ciklodextrin gyűrű belsejében lévő oxigén atomok nem kötő elektronpárjaival, ezáltal erősítve a zárványkomplex képzést. A zárványkomplex képződés kulcs kölcsönhatás a királis felismerésben. A klórmandulasavak és a metoximandulasavak esetén is a legjobb elválást a para-(4,-)helyzetben szubsztituált származékok adták és mindkét esetben hasonlóan magas szelektivitást ($\alpha > 1,3$, 100 °C-on) sikerült elérni. Feltehetően ezen pozícióban a legstabilabb a zárványkomplex, a molekula alakja miatt. A hidroxil csoport acilezése és trifluoro acilezése a legtöbb esetben a benzolgyűrűn klórszubsztituált származékok esetén is rontotta az elválást, tehát feltételezhetjük, hogy a hidroxil csoport H-donor képessége kulcsszerepet játszik a királis felismerésben.



7. Ábra: Klórmandulasav-származékok

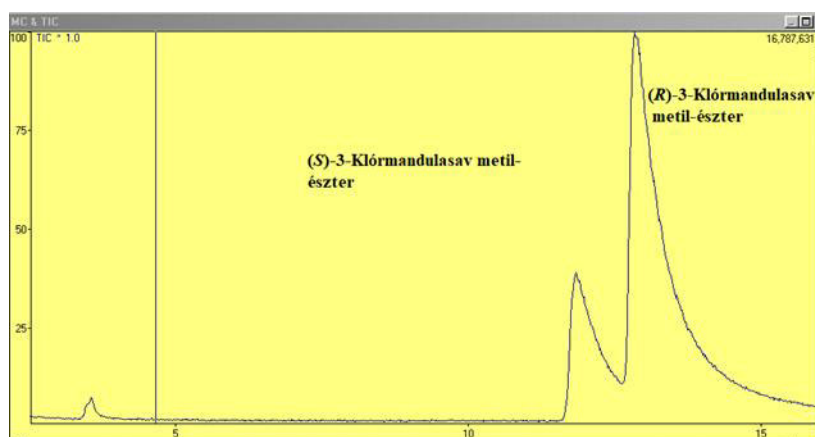
2.táblázat: A klórmandulasav-származékok

Sorszám	Hidroxil csoport	Karboxil csoport	Kód	α 100 °C	E	t_R /min 120 °C
12.	OH	Me	2Cl, Me, OH	1,12439	S/R	34,292
13.	Ac	Me	2Cl, Me, Ac	1,09686	R/S	36,654
14.	TFA	Me	2Cl, Me, TFA	1,10148	S/R	36,100
15.	OH	Me	3Cl	1,26791	S/R	35,824

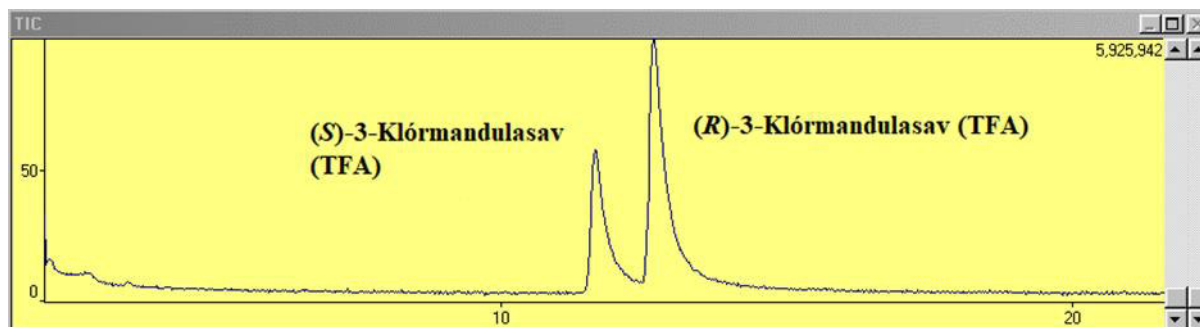
			Me, OH			
16.	Ac	Me	3Cl, Me, Ac	1,08214	R/S	32,258
17.	TFA	Me	3Cl, Me, TFA	1,19982	S/R	34,131
18.	OH	Me	4Cl Me, OH	1,38930	S/R	41,592
19.	Ac	Me	4Cl, Me, Ac	1,06659	R/S	39,359
20.	TFA	Me	4Cl, Me, TFA	1,08812	R/S	13,748

Az elúciós sorrend megfordulása a klórmandulasavak esetén

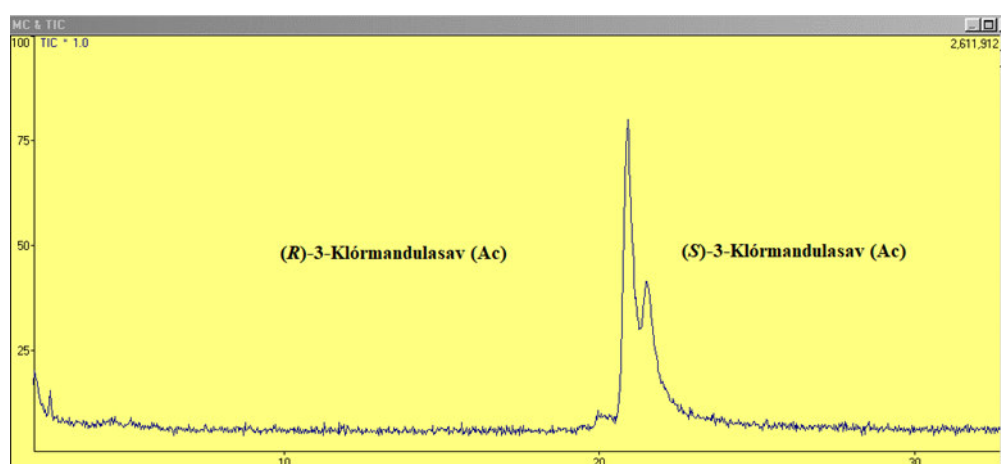
Az acilezett származékok esetén, akárcsak a gyűrűn szubsztituálatlan mandulsavnál, szintén tapasztaltam az elúciós sorrend megfordulását. A szabad hidroxil-csoportot tartalmazó származékok esetén a feleslegben használt, R-izomer eluálódott később, míg ez a sorrend az acilezett származékok esetén megfordult. A trifluoro-acilezett származékok esetén, ezzel szemben, kizárólag a 4-klórmandulasav (20.számú vegyület) esetén tapasztaltunk az elúciós sorrend inverziós jelenségét. A jelenség kiválóan szemléltethető a 3-klórmandulasav származékok példáján. A 8. ábrán látszik, hogy a szabad hidroxil csoportot tartalmazó 3-klórmandulasav származék esetén az R-izomer eluálódik később, a 9. ábrán a trifluoro acilezett 3-klórmandulasav származék esetén szintén az S-izomer eluálódik először, a 10. ábrán azonban látszik, hogy az elúciós sorrend az acilezett 3-klórmandulasav származék esetén megfordult.



8. Ábra: A 3-klórmandulasav metil-észter kromatogramja 140 °C-on



9. Ábra: A 3-klórmandulasav trifluoro acilezett származéka 140 °C-on



10. Ábra: A 3-klórmandulasav acilezett származéka 130 °C-on, melyen látható az elúciós sorrend megfordulása)

ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásunk témája a mandulasav különböző származékainak királis gázkromatográfiás elválasztása volt, melyhez egy diacetil-terc-butilszilil γ -ciklodextrint szelektort tartalmazó állófázis kiválóan alkalmas.

A mérések során a felvett $\ln \alpha - 1/T$ görbék minden esetben lineárisak voltak, tehát az elválasztások során, egy adott származékra csupán egy királis felismerési mechanizmus játszott szerepet.

A hidrogén donor képessége a vizsgált molekulának elősegíti a királis felismerést. A különböző származékoknak eltérő a királis felismerő mechanizmusa, amit az elúciós sorrend megváltozása mutat. A zárványkomplex képzés szerepet játszhat a királis felismerésben ezért a para izomereknek kiugró a szelektivitása.

HIVATKOZÁSOK

- [1] Kallenborn, R., H. Hühnerfuss, H.Y. Aboul-Enein, I. Ali (2021): Chiral Environmental Pollutants, Analytical Methods, Environmental Implications and toxicology, 2nd edition, Springer Verlag, Cham, ISBN: 978-3-030-62455-2
- [2] Ali, I., H. Y. Aboul-Enein, M.M.Sanagi, W. A. W. Ibrahim (2012) Chirality and Its Role in Environmental Toxicology, Exp Suppl. 2012;101:413-36. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4_14. PMID: 22945577
- [3] Juvancz, Z.; Bodáné-Kendrovics, R.; Szenté, L.; Maklári, D. Cyclodextrins are the Dominant Chiral Selective Agents in the Capillary Separation Techniques, Periodica Polytechnica Chemical Engineering, 2021,65, 580-594.
- [4] Nógrádi M. (1975): Bevezetés a sztereokémiába, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, ISBN: 963 10 0681 6
- [5] Valkó, I.E. et. al., Factor Affecting the Separation of Mandelic Acid, Chromatography Vol. 38, 1994, p.730-736
- [6] Juvancz, Z. et. al. Use of Achiral Derivatization to Increase Selectivity and Reverse the Order of Elution of Enantiomers on Chirasil-Dex, 2004 Chromatographia, 60:S161-S163

Répássy Levente
Óbudai Egyetem, Rejtő Sándor Könnyűipari és Környezetmérnöki Kar
Magyarország, 1034, Budapest, Doberdó utca 6.
Telefon: +(36) (1) 666-5941 E-mail: lrepassy2@freemail.hu

Prof. Dr. Juvancz Zoltán
Óbudai Egyetem, Rejtő Sándor Könnyűipari és Környezetmérnöki Kar
Magyarország, 1034, Budapest, Doberdó utca 6.
Telefon: +(36) (1) 666-5945 E-mail: juvancz.zoltan@rkk.uni-obuda.hu

Bodáné Dr. Kendrovics Rita
Óbudai Egyetem, Rejtő Sándor Könnyűipari és Környezetmérnöki Kar
Magyarország, 1034, Budapest, Doberdó utca 6.
Telefon: +(36) (1) 666-5941 E-mail: bodane.rita@rkk.uni-obuda.hu