

Monika ASZTEMBORSKA

Instytut Chemii Fizycznej PAN
ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

ZASTOSOWANIE METOD SEPARACYJNYCH W BADANIU ENANCJOMERYZACJI

WPROWADZENIE

Związki chiralne są w naturze bardzo powszechne. Najbardziej istotne dla życia biopolimery tj. białka i DNA są zbudowane z chiralnych aminokwasów i cukrów.

Wiele innych substancji należących do grupy flawonoidów, alkaloidów, terpenoidów i steroidów jest związkami optycznie czynnymi. Co ciekawsze większość z tych naturalnych substancji jest biosyntezowana tylko w postaci jednej z dwu możliwych form. O takich związkach mówi się, że są homochiralne. Homochiralne są peptydy i DNA zbudowane z L-aminokwasów i D-cukrów. Flawanony syntezowane w świecie roślinnym są lewoskrętne.

Taki wysoki stopień homochiralności w żywych organizmach jest entropowo niekorzystny. Proces racemizacji homochiralnej substancji prowadzi do wzrostu entropii systemu. Tak więc wraz ze śmiercią organizmu homochiralne substancje powinny racemizować powodując wzrost nieuporządkowania systemu.

W zależności od struktury chiralnej biomolekuły proces racemizacji może być bardzo szybki jak w przypadku atropiny [1] lub wystarczająco wolny jak w przypadku kwasu aspartamowego [2] aby być użytecznym w wyznaczaniu wieku organizmów. Czasami jest też tak, że cząsteczka zostaje rozłożona lub zdegradowana zanim ulegnie racemizacji.

Innym istotnym problemem związanym ze związkami chiralnymi jest fakt, że dwa enancjomery chiralnej substancji chociaż tak podobne pod względem budowy chemicznej mogą mieć drastycznie różną aktywność biologiczną. Nie jest to szczególnie dziwne gdy uświadomimy sobie, że organizmy żywe zbudowane z chiralnych białek i cukrów stanowią chiralne środowisko rozróżniające dwa enancjomery tej samej substancji. Szczególnie istotne jest to w przypadku leków. Znanych jest wiele chiralnych substancji farmakologicznych z których tylko jeden z enancjomerów ma właściwości lecznicze, drugi w najlepszym przypadku może być nieaktywny a w najgorszym może się okazać toksyczny. Np. atropina jest komercyjnie dostępna jako mieszanina racemiczna (DL-hioscyamina) jednakże tylko L-hioscyamina ma aktywność farmakologiczną. D-hioscyamina jest nieefektywna i powstaje jako produkt racemizacji podczas ekstrakcji L-hioscyaminy z surowców roślinnych.

Znajomość stabilności konfiguracyjnej substancji staje się więc koniecznością gdy chodzi o rejestrację chiralnych leków. Instytucje rządowe

dopuszczające leki jak np. FDA nie tylko kontrolują sprzedaż leków racemicznych ale wymagają jednoznacznych danych na temat konfiguracyjnej stabilności czystych enancjomerów. W konsekwencji producenci leków są zobowiązani do oszacowania stereochemicznej trwałości enancjomerów i zbadania ich potencjalnej podatności na konwersję.

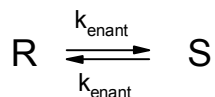
Z drugiej strony znajomość szybkości reakcji enancjomeryzacji substancji występujących naturalnie może być wykorzystana praktycznie do sprawdzania jakości, stopnia świeżości i zafałszowań produktów spożywczych.

Stopień racemizacji aminokwasów w białkach zębów (głównie jest to kwas aspartamowy) jest np. wykorzystywany do oznaczenia wieku denata w naukach sądowych [3, 4]. Jest on również wykorzystywany w oznaczaniu wieku próbek archeologicznych i geochemicznych [5, 6]. Ma również zastosowanie w paleotermometrii [7].

Znajomość barier racemizacji substancji chiralnych może więc być istotna z punktu widzenia zastosowań praktycznych.

DEFINICJE

Przez *enancjomeryzację* rozumiemy mikroskopowy proces odwracalnej interkonwersji enancjomerów.

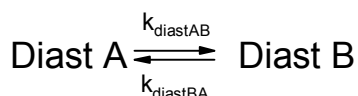


Racemizacja to z kolei makroskopowy proces nieodwracalnej transformacji enancjomerycznie wzbogaconej lub czystej próbki do mieszaniny racemicznej.



Przy czym stała szybkości racemizacji jest dwukrotnie większa od stałej szybkości enancjomeryzacji ($k_{\text{enant}}=2k_{\text{rac}}$). Można to wytłumaczyć w ten sposób, że na każdą cząsteczkę (-) utworzoną z cząsteczki (+) dwie molekuly ulegają racemizacji, jako że utworzona w ten sposób cząsteczka (-) równoważy skręcalność optyczną innej nie przekształconej cząsteczki (+).

Diastereomeryzacja to z kolei molekularny proces transformacji jednego diastereomeru w drugi, przy czym stałe szybkości diastereomeryzacji nie są sobie równe ($k_{\text{diastAB}} \neq k_{\text{diastBA}}$)



Do badania kinetyki enancjomeryzacji i diastereomeryzacji substancji można stosować wiele różnych metod m.in. polarymetria, dichroizm kołowy

(CD), dyspersja zdolności skręcającej (ORD), protonowy rezonans magnetyczny $^1\text{H-NMR}$ [8].

Wśród tych metod istotne miejsce zajmują metody chromatograficzne (wysokosprawna chromatografia cieczowa, chromatografia gazowa) oraz metody elektroforezy kapilarnej, które ogólnie można nazwać analitycznymi metodami separacyjnymi. Ze względu na pewne uproszczenia czasami obie techniki będą określane jako techniki chromatograficzne, chociaż metoda elektroforezy kapilarnej zasadniczo zalicza się do technik elektromigracyjnych.

Metody separacyjne służące do badania barier enancjomeryzacji można w zasadzie podzielić na dynamiczne metody separacyjne [9-13] i metody separacyjne z zatrzymanym przepływem (stopped-flow) [14-16].

Wykorzystanie metod separacyjnych do wyznaczania barier enancjomeryzacji labilnych enancjomerów zapoczątkowano w latach 80-tych ubiegłego wieku wraz z rozwojem enancjoselektywnych metod separacyjnych. Oba rodzaje metod zostały opisane w pracach przeglądowych [17, 18].

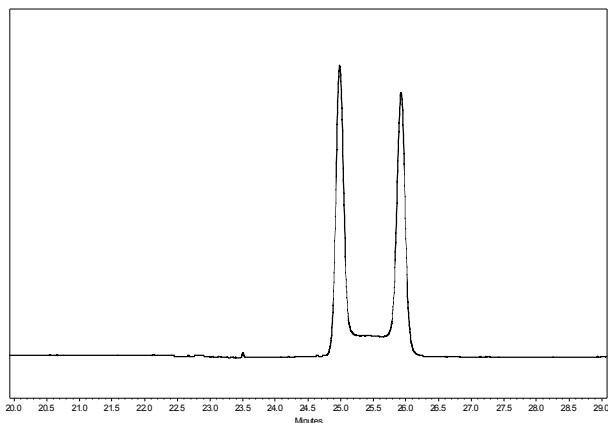
Przy pomocy DHPLC można mierzyć bariery enancjomeryzacji w granicach 65-105 kJ/mol, DGC 70-130 kJ/mol, natomiast przy pomocy SFMDGC 70-180 kJ/mol a SFMDCE 100-130 kJ/mol.

DYNAMICZNE METODY SEPARACYJNE

Chromatografia dynamiczna jest definiowana jako metoda służąca do badania procesów odwracalnej interkonwersji zachodzących w czasie chromatografowania.

Została ona wykorzystana do wyznaczania barier enancjomeryzacji.

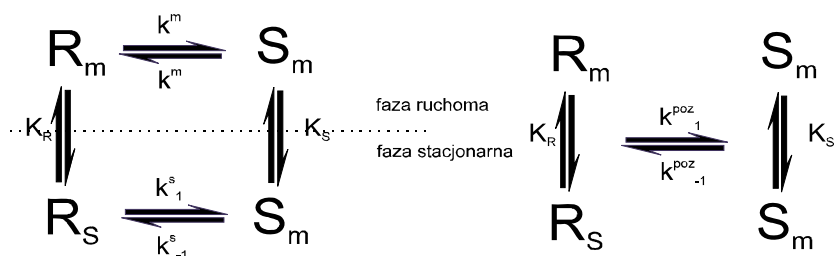
W chromatografii enancjoselektywnej szybka interkonwersja enancjomerów powoduje tworzenie się plateau pomiędzy rozdzielonymi pikami. Przy dostatecznie szybkiej reakcji obserwuje się nakładanie się pików.



Rys. 1. Przykładowy chromatogram z widocznym plateau tworzącym się pomiędzy rozdzielonymi enancjomerami

W przypadku przeprowadzania analizy enancjoselektywnej zjawiska te są niepożądane i stanowią komplikacje, które likwiduje się poprzez dodatek modyfikatora organicznego bądź zmianę chiralnej fazy stacjonarnej. W dynamicznej chromatografii natomiast charakterystyczny profil piku nie tylko stanowi źródło diagnostyczne zachodzącego w kolumnie procesu interkonwersji enancjomerów ale jest warunkiem do ilościowego wyznaczenia bariery enancjomeryzacji.

Stałe szybkości oraz bariery enancjomeryzacji wyznacza się poprzez porównanie symulowanych komputerowo profili elucji z uzyskanymi eksperymentalnie chromatogramami [19, 20].



Rys. 2. Schemat równowag zachodzących w kolumnie w czasie procesu chromatograficznego

Odwracalna pseudo-pierwszorzędowa reakcja enancjomeryzacji na kolumnie przebiega z różnymi stałymi szybkości k^s w fazie stacjonarnej i k^m w fazie ruchomej. Dla enancjomerów stałe szybkości reakcji enancjomeryzacji w achiralnej fazie ruchomej są jednakowe dla obu enancjomerów. W chiralnej fazie stacjonarnej sytuacja się zmienia stałe szybkości enancjomeryzacji są różne dla obu enancjomerów z uwagi na tworzenie się diastereomerycznych kompleksów pomiędzy rozdzielanymi enancjomerami i chiralnym selektorem. Nie obserwujemy jednak w rezultacie enancjomerycznego wzbogacenia próbki gdyż enancjomer który reaguje wolniej przebywa dłużej w fazie stacjonarnej.

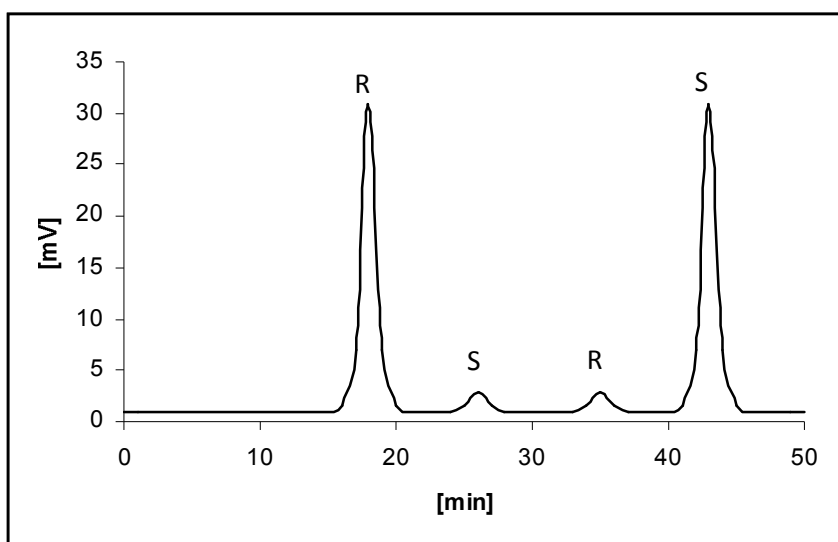
K_S i K_R są współczynnikami podziału enancjomerów R i S pomiędzy fazę ruchomą i stacjonarną.

Z danych chromatograficznych możemy wyliczyć pozorne stałe szybkości enancjomeryzacji, które są średnimi ważonymi stałymi szybkości w fazie stacjonarnej i ruchomej. Stałe szybkości w fazie ruchomej można wyznaczyć niezależnie za pomocą innych metod.

Dynamiczna chromatografia gazowa [21-23], dynamiczna chromatografia cieczowa [24-27], dynamiczna elektroforeza kapilarna oraz micelarna elektrokinetyczna chromatografia cieczowa [28, 29] jak również dynamiczna chromatografia w stanie nadkrytycznym [30] zostały wykorzystane do wyznaczania barier enancjomeryzacji wielu stereolabilnych związków.

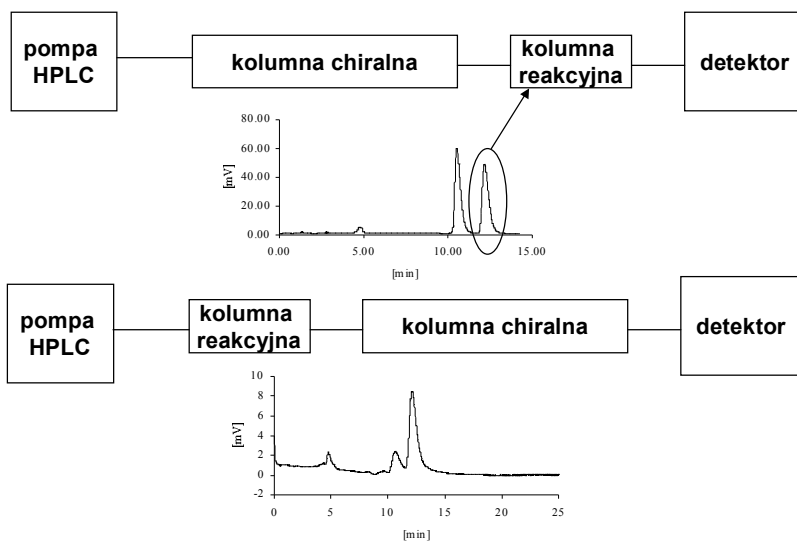
METODY SEPARACYJNE Z ZATRZYMANYM PRZEPLÝWEM

W metodach chromatograficznych z zatrzymanym przepływem racemiczna mieszanina jest wstępnie rozdzielana na kolumnie z fazą chiralną w temperaturze, w której nie obserwuje się procesu enancjomeryzacji. W momencie gdy wiadomo, że enancjomery zostały rozdzielone zostaje zatrzymany przepływ fazy ruchomej i kolumna jest ogrzewana w określonej temperaturze przez określony czas. Następuje wtedy enancjomeryzacja rozdzielonych pików w środowisku chiralnym. Następnie schładza się kolumnę do temperatury analizy, przywraca się przepływ fazy ruchomej i kontynuuje się analizę. Na uzyskanym chromatogramie oprócz rozdzielonych enancjomerów pojawiają się dodatkowe piki pochodzące z ulegających enancjomeryzacji rozdzielonych związków.



Rys. 3. Przykładowy chromatogram rozdzielania enancjomerów otrzymany za pomocą chromatografii z zatrzymanym przepływem

W metodach chromatografii wielowymiarowej z zatrzymanym przepływem, racemiczna mieszanina jest wstępnie rozdzielana na chiralnej fazie stacjonarnej, następnie jeden z enancjomerów jest kierowany do achiralnej kolumny reakcyjnej gdzie podczas podgrzewania następuje enancjomeryzacja w achiralnym środowisku. Potem zenancjomeryzowana próbka jest kierowana na drugą chiralną kolumnę w celu rozdzielania jej na enancjomery. Zaletą tej metody jest to, że enancjomeryzacja zachodzi w warunkach achiralnego otoczenia a nie w środowisku chiralnym.



Rys. 4. Schemat wielowymiarowej chromatografii cieczowej z zatrzymanym przepływem

Parametry kinetyczne reakcji enancjomeryzacji i diastereomeryzacji niestabilnych stereoizomerów zostały również wyznaczone za pomocą metod separacyjnych z zatrzymanym przepływem, m. in. chromatografii cieczowej z zatrzymanym przepływem [31] oraz dwuwymiarowej chromatografii gazowej z zatrzymanym przepływem [32].

PODSUMOWANIE

Podsumowując można powiedzieć, że obydwie metody znajdują zastosowanie do wyznaczania barier enancjomeryzacji. Pierwsza z nich to znaczy chromatografia dynamiczna wymaga bardziej skomplikowanych obróbki matematycznej i symulacji komputerowej za to nie wymaga dodatkowego sprzętu chromatograficznego. W przypadku metody z zatrzymanym przepływem wymagana jest bardziej skomplikowana aparatura za to same obliczenia są proste.

Obie metody posiadają wiele zalet:

- nie wymagają substancji optycznie czystych lub wzbogaconych, reagentów wystarcza do badań,
- wymagana jest bardzo mała ilość próbki ok. 10^{-8} g,
- zanieczyszczenia są na ogół oddzielone od próbki na kolumnie w związku z tym nie przeszkadzają,
- w przypadku GC mogą być badane próbki gazowe lub też bardzo lotne,

- pomiary mogą być prowadzone w szerokim zakresie dobrze kontrolowanej temperatury,
- metody są szybkie, proste a wyniki są powtarzalne.

Jednak metody chromatograficzne nie składają się z samych zalet. Podstawową wadą tych metod jest to, że konieczne jest do ich zastosowania uzyskanie bardzo dobrego rozdzielania enancjomerów co oczywiście w wielu przypadkach jest sprawą trudną. Tam gdzie rozdzielenie enancjomerów jest wystarczające do określenia czystości optycznej niekoniecznie jest wystarczające do wyznaczenia bariery enancjomeryzacji.

LITERATURA

1. A. Huhtikangas, T. Lehtola, R. Virtanen, P. Peura, *Finn. Chem. Lett.*, **5**(1982)63.
2. S. Ritz, H. Schütz, *J. Forensic Sci.*, **38**(1993)633.
3. S. Ohtani, K. Yamamoto, *J. Forensic Sci.*, **36**(1991)792.
4. E. Waite, M. Collins, S. Ritz-Time, H. Schutz, C. Cattaneo, H. Borrmann, *Forensic Sci. Int.*, **103**(1999)113.
5. G. Goodfriend, M. Kashgarian, M. Harasevych, *Cosmochim. Acta*, **59**(1995)1125.
6. M. Collins, E. Waite, A. van Duin, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **354**(1999)51.
7. G. Miller, J. Magee, A. Jull, *Nature*, **385**(1997)241.
8. M. Reist, B. Testa, P.-A. Carrupt, *Enantiomer*, **2**(1997)147.
9. J. Veciana, M. Crespo, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**(1991)74.
10. F. Gasparrini, D. Misiti, M. Pierini, C. Villani, *Tetrahedron Assym.*, **8**(1997)2069.
11. J. Oxelbark, S. Allenmark, *J. Org. Chem.*, **64**(1999)1483.
12. G. Schoetz, O. Trapp, V. Schurig, *Anal. Chem.*, **72**(2000)2758.
13. F. Gasparrini, M. Pierini, C. Villani, *J. Org. Chem.*, **68**(2003)3173.
14. K. Rossen, J. Sager, Y. Sun, *Chem. Commun.*, **1**(1998)115.
15. S. Reich, O. Trapp, V. Schurig, *J. Chromatogr. A*, **892**(2000)487.
16. O. Trapp, G. Schoetz, V. Schurig, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **27**(2002)497.
17. J. Krupcik, P. Oswald, P. Majek, P. Sandra, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, **1000**(2003)779.
18. Ch. Wolf, *Chem. Soc. Rev.*, **34**(2005)595.
19. M. Jung, V. Schurig, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**(1992)529.
20. O. Trapp, V. Schurig, *Chirality*, **14**(2002)465.
21. W. Bürkle, H. Karfunkel, V. Schurig, *J. Chromatogr.*, **288**(1984)1.
22. M. Jung, V. Schurig, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**(1992)529.
23. D. Hochmuth, W. König, *Tetrahedron Asymmetry*, **10**(1999)1089.
24. T. Nishikawa, Y. Hayashi, S. Suzuki, H. Kubo, H. Ohtani, *J. Chromatogr. A*, **767**(1997)93.

25. K. Lorenz, E. Yashima, Y. Okamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**(1998)1922.
26. J. Oxelbark, S. Allenmark, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**(1999)1587.
27. J. Oxelbark, S. Claeson, S. Allenmark, *Enantiomer*, **5**(2000)413.
28. D. Wistuba, O Trapp, N. Gel-Moreto, R. Galensa, V. Schurig, *Anal. Chem.*, **78**(2006)3424.
29. G. Schoetz, O. Trapp, V. Schurig, *Enantiomer*, **5**(2000)391.
30. Ch. Wolf, W. Pirkle, Ch. Welch, D. Hochmuth, W.A. König, G.-L. Chee, J. Charlton, *J. Org. Chem.*, **62**(1997)5208.
31. M. Asztemborska, J. Żukowski, *J. Chromatogr. A*, **1134**(2006)95.
32. Ph. Marriott, K. Aryasuk, R. Shellie, D. Ryan, K. Krisnangkura, V. Schurig, O. Trapp, *J. Chromatogr. A*, **1033**(2004)135.