



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Tudományos Diákköri dolgozat

***N,N*-Dimetilanilin β -deutérium izotópeffektusának
mechanisztikus vizsgálata fordított fázisú
folyadékkromatográfiával**

Maszler Péter

II. évfolyamos Gyógyszervegyészmérnök MSc hallgató

Témavezetők:

Dr. Könczöl Árpád

Kutató-fejlesztő

Dr. Kupai József

MTA posztdoktor

Konzulensek:

Dr. Balogh György Tibor

c. egyetemi docens

Dr. Huszthy Péter

egyetemi tanár



RICHTER GEDEON

2015.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni hálámat témavezetőimnek, **Dr. Kupai Józsefnek** és **Dr. Könczöl Árpádnak**, hogy helyet, eszközöket, lehetőséget, és szellemi támogatást adtak nekem a kutatásra, munkámat mindig a legnagyobb odafigyeléssel és türelemmel irányították. Köszönetemet fejezem ki a munkám során átadott tapasztalataikért, tanácsaikért.

Köszönettel tartozom konzulenseimnek, **Dr. Huszthy Péternek** és **Dr. Balogh György Tibornak**, akik munkámhoz biztos szellemi háttérrel biztosítottak.

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

Hálás vagyok kollégáimnak, a **Richter Gedeon Nyrt. Szintézistámogató Laboratóriuma** valamennyi munkatársának, hogy bárkihez fordulhattam akár szakmáról akár mindennapi élet dolgairól volt szó, továbbá a biztatásért és a jó munkahelyi légkör kialakításáért.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1 Izotópeffektus (IE) általános értelmezése	5
2.2 Izotópeffektus a folyadékkromatográfiában	6
2.3 Ionizáció-kontrollált izotóp elválasztás	8
2.4 A β -helyzetű deutérium izotópeffektusa aminok bázicitására	10
3. Célkitűzés	12
4. Anyagok és módszerek	13
4.1 Izotopológ <i>N,N</i> -dimetilanilinek előállítása	13
4.2 Savi állandók (pK_a) potenciometrikus meghatározása	13
4.3 Kromatográfiás kísérletek	14
4.3.1 Általános kísérleti körülmények	14
4.3.2 Egyedi kísérleti körülmények–oszloptestelés	14
5. Eredmények és megvitatásuk	15
5.1 <i>N,N</i> -Dimetilanilinek pK_a értékeinek meghatározása	15
5.2 Gradiens mérés reprodukálása	15
5.3 Eluens acetonitril tartalmának optimalizálása	16
5.4 Eluens ionerősségének optimalizálása	16
5.5 Áramlási sebesség hatása	16
5.6 Hőmérséklet és pH optimalizálása – <i>van't Hoff</i> -elemzés	17
5.7 Puffer fajtájának hatása az elválasztásra	22
5.8 Optimális paraméterek	25
6. Összefoglalás	28
7. Irodalomjegyzék	30

Rövidítések jegyzéke

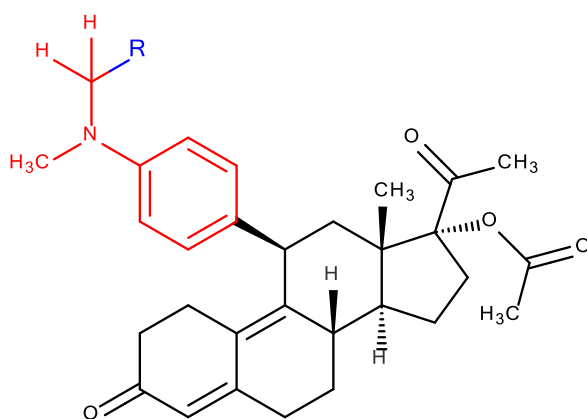
ACN	Acetonitril
DAD	Diódasoros detektor (D iode a rray d etector)
DMA	<i>N,N</i> -dimetilanilin
HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (H igh- p erformance l iquid chromatography)
IE	Izotópeffektus
$K_{a,D}$	Deuterált vegyület savi disszociációs állandója
$K_{a,H}$	Nem deuterált vegyület savi disszociációs állandója
k_B	Neutrális bázis (amin) retenciós tényezője
k_{BH^+}	Protonált bázis (amin) retenciós tényezője
k_D	Deuterált vegyület retenciós tényezője
k_H	Nem deuterált vegyület retenciós tényezője
k'_D	Deuterált vegyület reakciósebességi állandója
k'_H	Nem deuterált vegyület reakciósebességi állandója
$\ln k$	Retenciós tényező természetes alapú logaritmus
$\log D$	Látszólagos megoszlási hányados logaritmus értéke
$mtsai$	Munkatársai
NH ₄ Ac	Ammónium-acetát
NMR	Mágneses magrezonancia-spektroszkópia
pK_a	Savi disszociációs állandó negatív tízes alapú logaritmus ($pK_a = -\lg K_a$)
PNP	<i>p</i> -Nitrofenol
RP	Fordított fázis (R eversed p hase)
R_s	Felbontás
SIE	Fajlagos izotópeffektus
TIE	Össz izotópeffektus
t_R	Retenciós idő (R etention t ime)
ULIPA	Uliprisztál-acetát
UV	Ultraibolya (U ltraviolet) fény
α	Szelektivitás
ΔH^0	Entalpia
ΔS^0	Entrópia
ϕ	Fázisarány

1. Bevezetés

Mind a radioaktív, mind a stabil izotópok alkalmazása széles körben elterjedt és egyaránt nagy jelentőségű az élettudományok és az alkalmazott tudományok területén:

- kémia területén: reakciókinetikai vizsgálatok, jelzett belső standard mennyiségi meghatározásra.
- biológia területén: immunválasz vizsgálatok, enzim működés követése, receptor kötődés vizsgálata, szcintillációs technikák.
- orvostudomány területén (ahol általában radioaktív izotópokat használnak): képalkotó technikák (MRI, CT, PET).

Munkánk kiindulópontját *Béni és mtsai-nak* közleménye adta: egy tisztaságvizsgálat céljára fejlesztett fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszerrel sikerült a szerzőknek elválasztaniuk egy *N,N*-dimetilanilin egységet tartalmazó szteroid hatóanyag, az uliprisztál-acetát mono-deuterált izotopológját (**1. ábra**) [1]. Meglepő eredményük, miszerint az anilin nitrogénatomjához kapcsolódó metilcsoport hidrogénatomjának deutériumra történő cseréje kromatográfiásan mérhető effektussal bír, felkeltette érdeklődésünket. Ennek értelmében célul tűztük ki, hogy HPLC-módszerüket reprodukáljuk, és a kérdéses elválasztás legfőbb termodinamikai és kinetikai paramétereit részletesen megvizsgáljuk és optimalizáljuk.



R=H : ULIPA; R=D : D-ULIPA

1. ábra Az uliprisztál-acetát (ULIPA) és mono-deuterált izotopológjának (D-ULIPA) szerkezeti képlete, pirossal kiemelve az *N,N*-dimetilanilin részegységet.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Izotópeffektus (IE) általános értelmezése

A reakciókinetikai vizsgálatok által szerezhető információk az egyes kémiai reakciók mechanizmusára nézve általában korlátozottak. A kinetika tanulmányozása közben nem kaphatunk információt arról, hogy a sebesség-meghatározó lépésben az adott vegyület mely kötése alakul át, illetve hogy, hogyan és mely atomnak változik a hibridállapota. Ezt csak az izotópeffektus vizsgálatok során tudhatjuk meg. Egy izotóp cseréje a reakciócentrumon vagy közel ahhoz jellemzően a reakciósebesség megváltozását eredményezi. Amikor egy kötés szakadásába vagy átalakulásába bevonható a hidrogén, akkor az effektus hidrogénatom deutériumra való cseréjével gyakran növelhető és rutinszerűen mérhető. A kinetikai izotópeffektusok a könnyű elemeknél jelentkeznek nagyobb mértékben, mivel itt nagyobb a különböző izotópok tömegének, illetve az izotópmolekulák redukált tömegének fajlagos eltérése, ami a molekulák rotációs és vibrációs energiájában jelentkezik. Különösen jelentős ez az eltérés a H, C, N, O és S különböző izotópjai esetében [2].

Az izotopológok, azaz az olyan molekulák, amelyek csak izotópos összetételükben különböznek, eltérő sebességgel reagálhatnak. Az eltérés mértékét a reakció mechanizmusa befolyásolja, tehát a **kinetikai** izotópeffektusok reakciómechanizmusok vizsgálatára teremtenek lehetőséget. Az izotópeffektus nagysága (a k'_H/k'_D hányados eltérése 1-től, ahol k'_H és k'_D a nem deuterált és deuterált párok reakciósebességi állandója) mutatja meg a reakció mechanizmusát. Amennyiben k'_H/k'_D értéke 1, akkor arra következtethetünk, hogy az a kötés ahol az izotóp csere történt nem vesz részt a sebesség-meghatározó lépésben, de az is lehet, hogy az effektus kis mértéke nem mérhető precízen. Akkor vonhatunk le messzemenő következtetéseket az izotópeffektussal kapcsolatban, ha a k'_H/k'_D arány jelentősen eltér 1-től.

A kinetikai izotópeffektusoknak különböző változatai lehetségesek. Ha valamely molekula izotópváltozatai ugyanazon reakcióban vesznek részt úgy, hogy a reakció során a sebesség-meghatározó tényező az izotópatomok kötésének megváltozása, akkor elsődleges, azaz **primer** izotópeffektusról beszélünk (pl.: X–H/X–D). A primer effektusok ugyancsak kétfélek lehetnek: az intermolekuláris izotópeffektus egymástól izotóp-összetételben különböző két molekula reakciósebességének különbségét értjük, míg az intramolekuláris eset ugyanazon molekula két egyforma, egymástól csak izotóp-összetételben különböző csoportjának egymástól eltérő reakciósebességeként értelmezhető.

Szekunder, vagy másodlagos izotópeffektusról akkor beszélünk, amikor a sebesség-meghatározó reakciólépés során nem hasadó kötés valamely elemét helyettesítjük izotópjával. Ennek több típusa ismert, attól függően, hogy az izotópcseré a reakciócentrumtól egy-, két-, háromatomnyi távolságra történik α -, β -, γ -helyzetű izotópeffektusnak nevezzük.

Az izotopológok egymáshoz viszonyított viselkedése alapján normál, illetve inverz izotópeffektusról beszélhetünk. **Normálnak** nevezzük azt az esetet, amikor a k'_H/k'_D értéke nagyobb, mint 1. Ekkor a jelölt, deuterált vegyület lassabban reagál az adott reakcióban. **Inverz** izotópeffektusnak pedig azt, amikor a k'_H/k'_D hányados kisebb, mint 1. Ekkor a jelöletlen vegyület reagál lassabban a kérdéses reakcióban.

Egyensúlyi reakciók esetében, amikor az izotópcseré az egyensúly helyzetére gyakorol hatást, **egyensúlyi** (termodinamikai) izotópeffektusról beszélünk. Amennyiben az izotópcseré egyensúlyi állandóinak hányadosa 1, akkor izotópeffektus nem lép fel, az izotópok eloszlása mindkét vegyületben azonos. Ha azonban az izotópcseré egyensúlyi állandóinak hányadosa 1-től eltér, akkor egyensúlyi izotópeffektus áll fenn. Az izotópcserékhez rendelt egyensúlyi állandók hányadosa általában kevéssé tér el az egységtől, elméleti és gyakorlati jelentőségük azonban mégis nagy, mivel lehetőséget adnak az elemek és molekulák izotópjainak elválasztására és számos természeti (geológiai, biológiai) jelenség értelmezésére, nyomon követésére.

A vizsgálatunk tárgyát képező izotópeffektus egyensúlyi, normál irányú, másodlagos β -helyzetűként jellemezhető.

2.2 Izotópeffektus a folyadékkromatográfiában

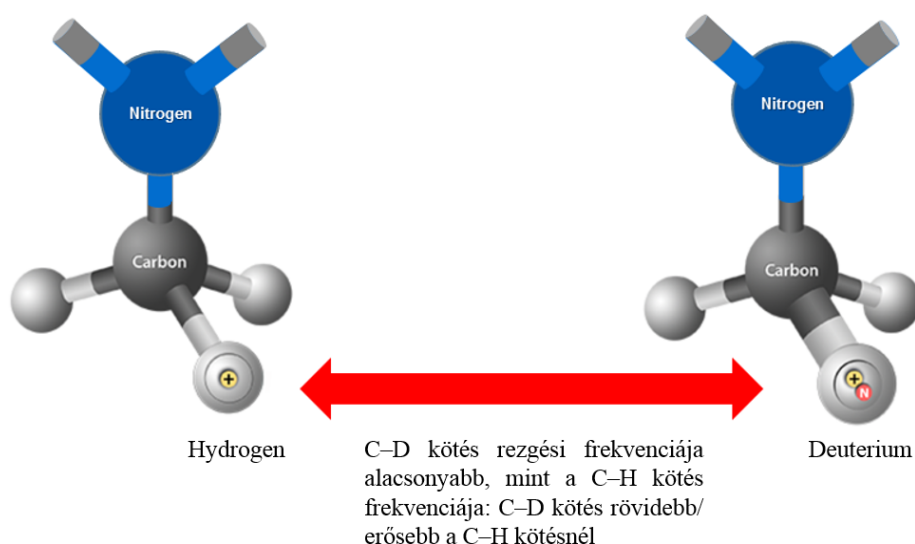
A folyadékkromatográfiás izotópeffektus kis molekulatömegű szerves vegyületek körében ismert, de relatív ritka jelenségnek tekinthető. Az izotopológok kromatográfiás viselkedésének különbözőségét a következő két paraméter fejezi ki (nem deuterált és deuterált párok ebben a példában):

$$\begin{array}{ll} \text{Össz Izotópeffektus (Total Isotope Effect):} & \text{TIE\%} = k_H/k_D \text{ (szelektivitás)} \\ \text{Fajlagos Izotópeffektus (Single Isotope Effect):} & \text{SIE\%} = 100[(k_H/k_D)^{1/n} - 1] \end{array}$$

ahol k_H és k_D a nem deuterált és deuterált párok retenciós tényezője, n a deutériumra cserélt hidrogénatomok a számát jelöli.

Jelen tárgyalást a C–H/C–D kötésrendszerre szűkítve, az alábbi általános tulajdonságokat vonhatjuk le a kísérleti adatok és a molekulák fizikai tulajdonságainak elemzése alapján [3]:

- A C–D kötés rövidebb, mint a C–H kötés (pl. etánban a C–H kötés 111,2 pm; hexadeuteroetánban a C–D kötés 110,7 pm) és nagyobb az elektronsűrűsége is, mint a H kötésnek. A deutériumatom kisebb, mint a hidrogénatom. Ez csekély, de a dipólus momentumban mérhető különbség (pl. $\mu(\text{CH}_3\text{-D})=3,7 \times 10^{-32} \text{ C}\cdot\text{m}$, $\mu(\text{HCl})-\mu(\text{DCl})=1,7 \times 10^{-32} \text{ C}\cdot\text{m}$).
- A C–D kötés kevésbé polarizálható, mint a C–H kötés.
- A C–D kötés rezgési frekvenciája ($\sim 2200 \text{ cm}^{-1}$) alacsonyabb, mint a megfelelő C–H kötés frekvenciája ($\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$).



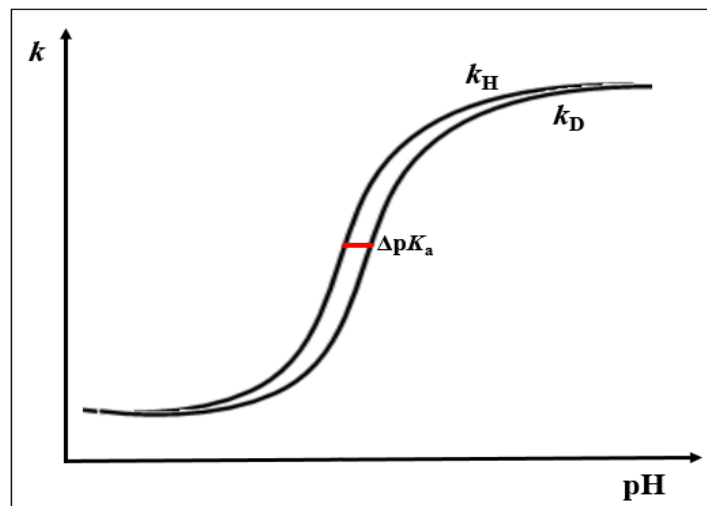
2. ábra A C–H és C–D kötés tulajdonságainak illusztrációja *N*-metil csoporton.

Egy adott molekula egyetlen atomjának izotópjával való helyettesítése (pl.: H/D, $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$) folyadékkromatográfias elválasztásban jellemzően nem nyilvánul meg, kifejeződéséhez extrém magas kinetikus hatékonyság ($N \geq 100000$) szükséges. A szakirodalomban közölt esetekben kevesebb, mint 1 SIE%-ot értek el tisztán hidrofób különbségen alapuló elválasztásokban [4–7]. E példákban, nem ionizálható, tipikusan perdeuterált aromás és alifás szénhidrogének izotóp frakcionálását közölték (pl.: benzol– H_6/D_6 , toluol– H_8/D_8). Ennél magasabb, 2–7 SIE%-ot sikerült elérni ionizáció-kontrollált módszerrel néhány proton-disszociációra képes (ionizálható) vegyületnél, kihasználva az izotopológok pK_a különbségéből fakadó eltérő retenciós viselkedésüket [8–15]. Az ionizáció-kontrollált izotóp elválasztás koncepcióját a következő fejezetben fejtem ki részleteiben.

2.3 Ionizáció-kontrollált izotóp elválasztás

Tanaka és mtsai dolgozták ki az ionizáció-kontrollált fordított fázisú izotóp elválasztás elméletét és gyakorlatát [8]. Munkájuk fő célja olyan nagy teljesítményű folyadékkromatográfias technika kidolgozása volt, amivel nitrogén és oxigén izotópokat tartalmazó vegyületek egyes izotopológiájainak közvetlen dúsítása elvégezhető olyan ionizálható vegyületekben, mint például aminok, fenolok vagy karbonsavak. Az elválasztási módszer (szelektivitás) az izotópeffektus gyenge savak és bázisok disszociációs egyensúlyára gyakorolt hatásán alapszik. Így, amennyiben a megfelelő disszociációs egyensúly létezik, standard technikák alkalmazásával a közvetlen izotópdúsítás elérhető lehet, komplex szintézisutak kidolgozása nélkül. A hagyományos izotóp elválasztási módszerekkel szemben, pl.: desztilláció, gázdifúzió, centrifugálás, elektromágneses szeparáció, elektrolízis, kémiai izotópcseré, lézeres módszerek és ioncserés kromatográfia, az ionizáció-kontrollált módszer előnye, hogy a rendelkezésre álló nagyteljesítményű kolonnákat használja, relatív gyors és a vegyületek széles körében alkalmazható.

A fordított fázisú folyadékkromatográfiában az ionizálható vegyületek neutrális formáját a hidrofób állófázis jobban visszatartja, mint az ionos formát, amely töltése révén sokkal hidrofílebb, így gyengébb kölcsönhatást képes csak kialakítani az állófázissal. Ezek szerint a savak pK_a értéküknél alacsonyabb pH-n, a bázisok pedig pK_a értéküknél magasabb pH-n visszatartottabbak. Az alábbi ábra két, bázikus, egymástól csak pK_a értékükben különböző vegyület retenciójának pH szerinti lefutását szemlélteti (**3. ábra**).



3. ábra Ionizáció-kontrollált elválasztás alapelve H/D1 páron bemutatva.

A disszociációs egyensúlyt aminokra felírva (B):

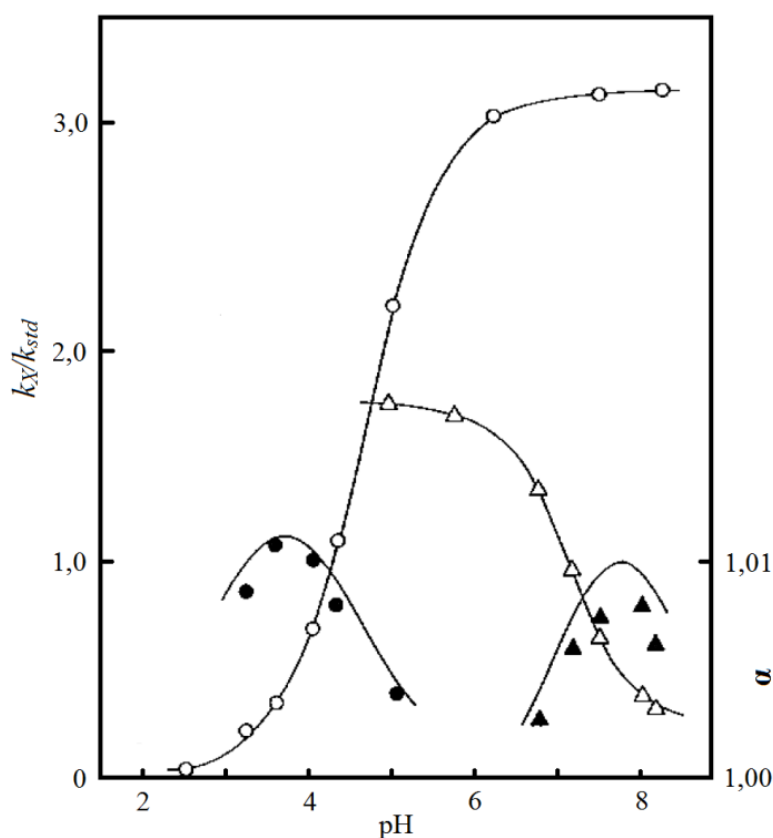


illetve a retenció tényező:

$$k = \frac{k_{BH^+}[BH^+]}{[BH^+] + [B]} + \frac{k_B \cdot [B]}{[BH^+] + [B]} = \frac{k_{BH^+} + k_B \cdot \frac{K_a}{[H^+]}}{1 + \frac{K_a}{[H^+]}} \quad (2. \text{ egyenlet})$$

ahol k_B és k_{BH^+} az adott amin neutrális és protonált formájának retenció tényezője.

Az ionizáció-kontrollált fordított fázisú folyadékkromatográfiában az egyes pH értékeken kialakuló ionizáció mértéke határozza meg a visszatartást. Az alábbi irodalmi ábra az *N,N*-dimetilanilin (DMA) és a *p*-nitrofenol (PNP), illetve ezek izotopológiai retenció tényezőjének (k) és a szelektivitási tényező (α) pH függését mutatja (4. ábra).



4. ábra Retenció tényezők pH függése *N,N*-dimetilanilin (DMA-¹⁴N, ○) és *p*-nitrofenol (PNP-¹⁶OH, △), az α szelektivitási tényezők pH függése DMA-¹⁴N és DMA-¹⁵N (●) között és PNP-¹⁶OH és PNP-¹⁸OH (▲) között. A k értékek a 3-fenilpropanol és a benzilalkohol k értékeivel DMA-re és PNP-ra normalizáltak. [8] hivatkozásból.

A disszociáció a proton és a nehezebb izotóp között némileg kedvezőtlenebb, mint a proton és a könnyebb izotóp között, ezért a K_a disszociációs állandó kisebb a nehezebb izotopológra nézve. Ez az izotópeffektus vezet az ionizáció mértékének különbségéhez, ami az izotopológ vegyületek eltérő kromatográfiai viselkedéséhez vezet a pK_a értékükhöz közeli pH-n. Ezért azt a következtetést vonták le, hogy gyenge sav izotopológok elválasztását jellemzően a pK_a értékük felett 0,5–1 pH egységgel, gyenge bázis izotopológok elválasztását a pK_a értékük alatt 0,5–1 pH egységgel célszerű elvégezni.

Az izotópeffektus és az elválasztás szelektivitása között tehát a következő összefüggés írható fel:

$$TIE = \frac{K_{a,H}}{K_{a,D}} \cong \frac{k_H}{k_D}(pH_{opt}) = \alpha(\max)$$

2.4 A β -helyzetű deutérium izotópeffektusa aminok bázicitására

Az irodalomban fellelhető cikkek alapján *Perrin és mtsai* foglalkoztak behatóan β -helyzetű deutérium izotópeffektusának különböző aminok bázicitására gyakorolt hatásának vizsgálatával, ami alapvető segítséget nyújtott a mi kutatási témánkhoz [16].

Állításuk szerint a β -helyzetű izotópeffektus értelmezése sokkal bonyolultabb lehet, mint az α -helyzetű eseté. Szolvólízisben a β -helyzetű izotópeffektus hatása általában hiperkonjugációnak tulajdonított, ahol a C–H kötésben résztvevő delokalizált elektronok stabilizálják a képződő karbokationt. Ezt összevetve a C–D kötéssel, aminek alacsonyabb a zérusponthoz képest energiája és erősebb, tehát a delokalizáció mértéke is kisebb. Ezekkel alátámasztva kizárható az induktív effektus hatása, továbbá a *Born–Oppenheimer*-közelítés is kimondja, hogy az elektron hullámfüggvénye független a molekula tömegétől, tehát csak a negatív hiperkonjugáció befolyásolja a β -helyzetű izotópeffektust.

Különböző aromás és alifás aminok és egyszeres, kétszeres és háromszoros izotopológjainak (pl.: dimetil-amin, *N,N*-dimetilanilin) bázicitását határozták meg nagy pontosságú NMR titrálás segítségével, azzal a céllal, hogy kiderítsék a β -helyzetű deutérium milyen irányban és mértékben befolyásolja az aminok bázicitását. A nagy pontosságú módszer szolgáltatva adatok alapján megállapították, hogy a β -helyzetű deutérium egységesen növeli a vizsgált aminok bázicitását. A számunkra is fontos *N,N*-dimetilanilin és egyszeresen deuterált izotopológja között $\Delta pK_a=0,014$ szignifikáns értéket közöltek.

Vizsgálták továbbá, a dimetilamin és háromszorosan deuterált izotopológ párján az izotópeffektus hőmérsékletfüggését is. A kapott eredmények azt mutatták, hogy az izotópeffektus hőmérsékletfüggő, azonban az eltérés nagyon kicsi, 30 °C csökkenés kevesebb, mint 2%-kal növeli az effektus mértékét, azaz a savi disszociációs állandók hányadosát (K_H/K_D).

Összegezve *Perrin és mtsai* eredményeit:

- a β -helyzetű deutérium növeli az aminosav bázicitását negatív hiperkonjugáció révén, induktív effektus teljesen kizárható.
- *N,N*-dimetilamin metil csoportján egyszerűen deuterált izotopológra extrapolált $\Delta pK_a=0,014$ érték rendkívül kicsi, de szignifikáns különbség a nagy pontosságú NMR titrálásnak köszönhetően.
- 30 °C csökkenés kevesebb, mint 2% növekedést eredményez a savi disszociációs állandók hányadosában.

3. Célkitűzés

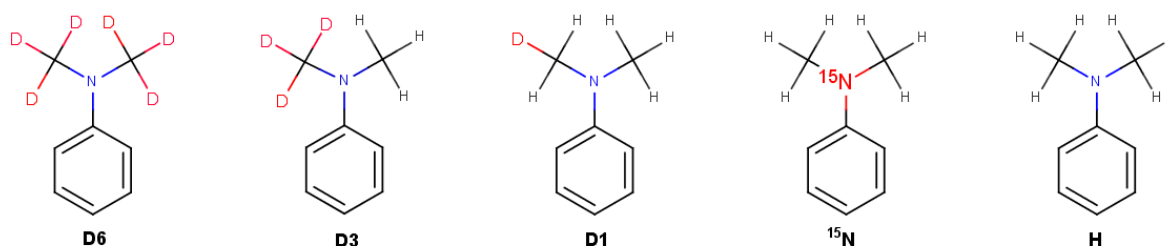
Munkánk során az alábbi konkrét célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- Első lépésben *Béni és mtsai* által közölt uliprisztál-acetát (ULIPA) elválasztás reprodukálását terveztük elvégezni a megfelelő DMA izotopológokat használva gradiens, majd izokratikus elúcióval.
- Munkánk alapvető célja volt, hogy a mozgófázist minden folyadékkromatográfiás paraméterre nézve (pl.: szelektivitás, felbontás, szimmetria, csúcsszélesség) optimalizáljuk. Ezért terveztük a mozgófázis hatását különböző szerves tartalom, pH, ionerősség és puffer (ellenanion) mellett megvizsgálni.
- Továbbá célul tűztük ki az izotópeffektus hőmérsékletfüggésének vizsgálatát is.
- Célunk volt a hőmérséklet (T) retenciós tényezőre (k) gyakorolt hatását is megvizsgálni, illetve a *van't Hoff*-elemzést ($\ln k - 1/T$) elvégezni, és az így szereshető különböző termodinamikai és kinetikai paramétereket megvizsgálni és optimalizálni.
- Bizonyítani, hogy az izotóp elválasztást kizárólag az ionizáció szabályozza, tehát valóban csak és kizárólag az izotopológok pK_a értékei közti különbség határozza meg az elválasztást.
- Végül pedig az optimált rendszeren különböző C18 állófázisú oszlopok tesztelését terveztük elvégezni.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Izotopológ *N,N*-dimetilanilinek előállítása

A kísérletekben tesztelt 5 db *N,N*-dimetilanilin (DMA) izotopológot (**5. ábra**) a Richter Gedeon Nyrt. Szteroid Szintetikus Laboratóriumban állították elő a megfelelő prekursor vegyületekből kiindulva metil-jodiddal. A dolgozat további részeiben rendre a **D6**, **D3**, **D1**, ^{15}N és **H** elnevezéssel jelölve.



5. ábra A kromatográfiásan vizsgált *N,N*-dimetilanilin izotopológok szerkezeti képlete, kiemelve pirossal a D és ^{15}N atomokat.

Érdemes itt megjegyezni, hogy az elválasztandó vegyületek közül a **D1/H** izotopológ pár esetén csak egyetlen darab neutron jelenti a különbséget a két molekula között.

4.2 Savi állandók ($\text{p}K_{\text{a}}$) potenciometrikus meghatározása

A tesztvegyületek (**D6**, **D3**, **D1**, ^{15}N , **H**) $\text{p}K_{\text{a}}$ értékeit a Richter Gedeon Nyrt. Szintézistámogató Laboratóriumban határozták meg UV–pH titrálással. A méréseket egy T3 SiriusTM (Sirius Analytical Instrument Ltd., Forest Row, UK) típusú automata $\text{p}K_{\text{a}}$ érték mérőkészülékkel végezték. A készülék egy kombinált Ag/AgCl pH mérő üvegelektóddal volt szerelve, amit az egyensúlyi állandó (K_{a}) meghatározására használtak. A $\text{p}K_{\text{a}}$ értékeket a készüléket vezérlő és a mérési adatokat feldolgozó RefinementProTM (Sirius Analytical Instrument Ltd., Forest Row, UK) nevű szoftverrel számolták. Minden kísérletben a mérendő anyag kb. 1,5 ml 1 mM koncentrációjú vizes oldatát vizsgálták úgy, hogy először megsavanyították 0,5 M HCl oldattal pH=2,0 értékig, majd ezt titrálták 0,5 M KOH oldattal egészen pH=12,0 értékig. A titrálást nitrogén atmoszféra alatt végezték, állandó ionerősség (0,15 M KCl) és hőmérséklet mellett ($25,0 \pm 0,1$ °C).

4.3 Kromatográfiai kísérletek

4.3.1 Általános kísérleti körülmények

Minden mérést egy Agilent 1100 típusú HPLC berendezéssel végeztem, ami egy Agilent 1200-as biner pumpával és gázmentesítővel, valamint diódasoros detektorral (DAD) volt szerelve. Az elválasztás szerves módosító tartalma (10–18% ACN, izokratikus elúcióval), ionerősség (5, 10, 20 és 50 mM), hőmérséklet (5–60 °C) és pH (3,6–6,0) függését vizsgáltam. Különböző pufferek (ammónium-formiát, -acetát, -propionát, -citrát) elválasztásra gyakorolt hatását is tanulmányoztam. Az elválasztások egy Kinetex XB–C18 kolonnán (150 × 4,6mm méretű; 2,6 μm szemcseátmérőjű, Phenomenex) történtek. Minden más esetben külön feltüntetésre kerül a használt kolonna. A 0,25 mg/ml-es koncentrációjú (minden komponensre nézve) ACN-ben oldott **D6**, **D3**, **D1**, **H**-ből készült keveréket 5 μl injektálási térfogat és 0,75 ml/perc áramlási sebesség mellett vizsgáltam. A kromatogramokat 248 ± 4 nm-en rögzítettem, a vegyületek UV elnyelésének maximumában.

A vizes oldatok pH-ját, illetve a szerves módosító (ACN) mellett mérhető látszólagos pH (p_sH) értékét egy METTLER TOLEDO SevenEasy™ S20 típusú pH-mérő készülékkel mértem, ami egy 3 mol/l koncentrációjú KCl oldattal töltött üvegelektóddal volt szerelve. A mérések során azt tapasztaltam, hogy a szerves oldószer növeli a mozgófázis pH értékét.

4.3.2 Egyedi kísérleti körülmények–oszloptesztelés

Az optimalizált paraméterekkel az alábbi oszlopon végeztem elválasztást:

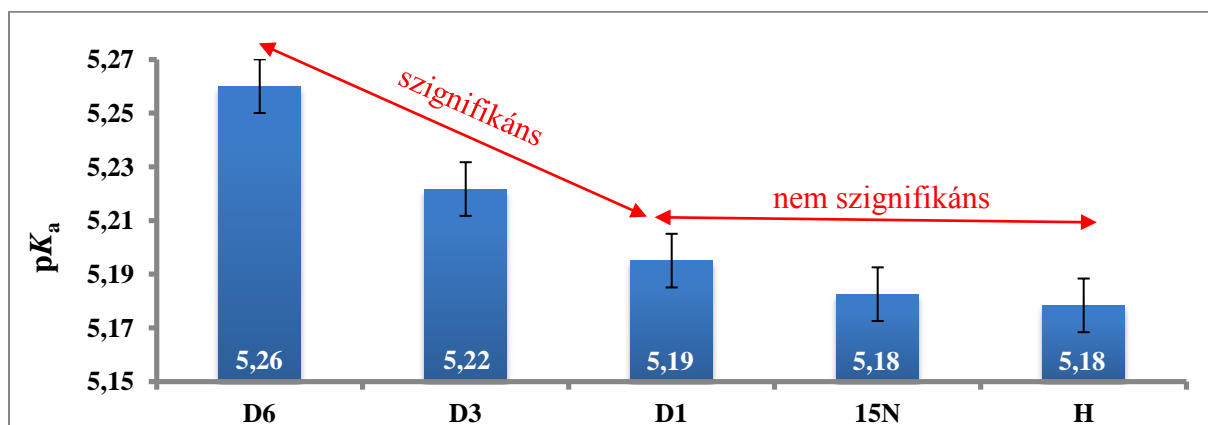
- Kinetex® XB–C18 (150 × 4,6mm; 2,6 μm, Phenomenex) (3 különböző sarzs)
- Kinetex® C18 (150 × 4,6mm; 2,6 μm, Phenomenex)
- Accucore® C18 (150 × 4,6mm; 2,6 μm, Thermo)
- Hypersil® BDS C18 (150 × 4,6mm; 2,4 μm, Thermo)
- Cortecs® C18 (150 × 4,6mm; 2,7 μm, Waters)

Ahol az alacsony hőmérsékletből (jellemzően 5–10 °C) és az eluens magas víztartalmából (90%) fakadó nyomásesés nem érte el a maximum 400 baros határértéket, ott magasabb áramlási sebesség (0,75–1,2 ml/perc) mellett is végeztem elválasztást.

5. Eredmények és megvitatásuk

5.1 *N,N*-Dimetilanilinek pK_a értékeinek meghatározása

Perrin és mtsai kimutatták, hogy a β -helyzetű deutérium növeli az anilin nitrogénjének bázicitását, úgynevezett negatív hiperkonjugáció révén [16]. Ezt a jelenséget kísérletes úton a tesztvegyületeink UV–pH titrálásával nekünk is sikerült visszaigazolni: lásd **H/D3**; **H/D6** párok (**6. ábra**). A **D1/H** pár esetén a nominálisan 0,017 pK_a egység különbség azonban nem adódott szignifikánsnak.



6. ábra A vizsgált *N,N*-dimetilanilin izotopológok potenciometrikusan meghatározott savi állandói ($n=6$).

Kérésünkre a pK_a értékek meghatározását különböző szerves tartalom mellett (0–30% ACN) és különböző hőmérsékleteken (10 és 25 °C) is elvégezték. Méréseikből azt a következtetést vontam le, hogy a szerves oldószer egységesen csökkenti, a csökkenő hőmérséklet pedig növeli a kérdéses savi állandókat, a köztük mért különbségek azonban a mérés pontatlansága miatt trendszerűen nem változtak.

5.2 Gradiens mérés reprodukálása

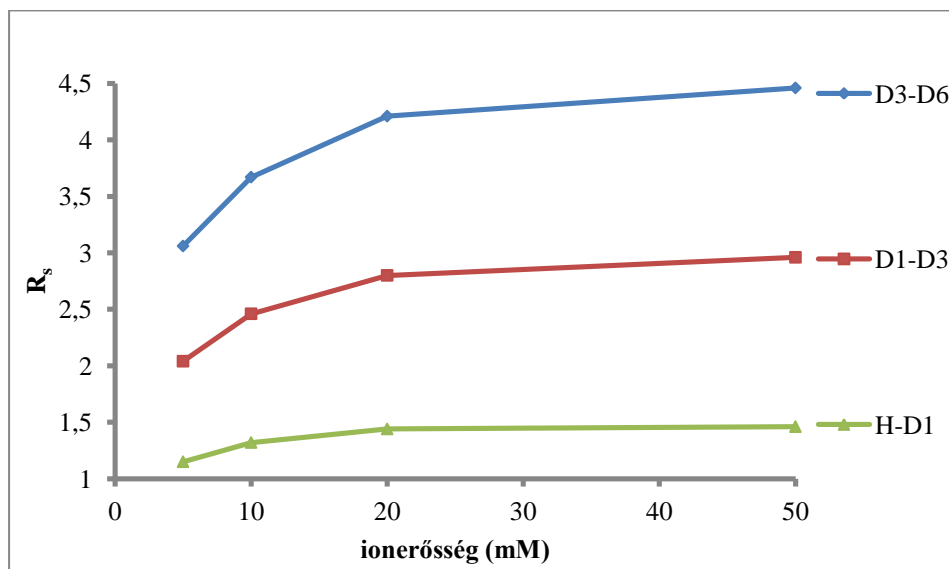
Elsőként egy, a kutatócsoportban fejlesztett gradiens elúcióval végzett mérés reprodukálását végeztem el 5 °C-on. Ehhez A eluensként 10 mM NH_4Ac :ACN=9:1 (v/v) (1 M NH_4Ac pH=4,0) B eluensnek ACN:10 mM NH_4Ac =9:1 (v/v) használtam 0–54 perc 0–40% B gradiens elúcióval. Sikerült reprodukálnom a mérést, ezért ezek után izokratikusan végeztem a méréseket.

5.3 Eluens acetonitril tartalmának optimalizálása

A fent említett A és B eluenseket használtam változó B% (0–10%) mellett izokratikusan 5 °C-on. Itt azt figyeltem meg, hogy a növekvő ACN tartalom hatására csökkent a retenció tényező (k), magasabbak és keskenyebbek lettek a csúcsok, de romlott a felbontás (R_s). Ezért a következő méréseket 10% ACN tartalom mellett végeztem el.

5.4 Eluens ionerősségének optimalizálása

A 10 mM-os NH_4Ac eluens mellett 5, 20 és 50 mM-os töménységű pufferrel is végeztem kísérleteket. Azt tapasztaltam, hogy a növekvő puffer koncentrációval kissé csökkent a retenció idő, javult a csúcsszimmetria, és a felbontás 20 és 50 mM-os ionerősségnél volt a legjobb (7. ábra). Így a továbbiakban a pH- és hőmérsékletfüggés méréseknél 20 mM-os ionerősség mellett dolgoztam.



7. ábra Eluens ionerősségének hatása a felbontásra (R_s).

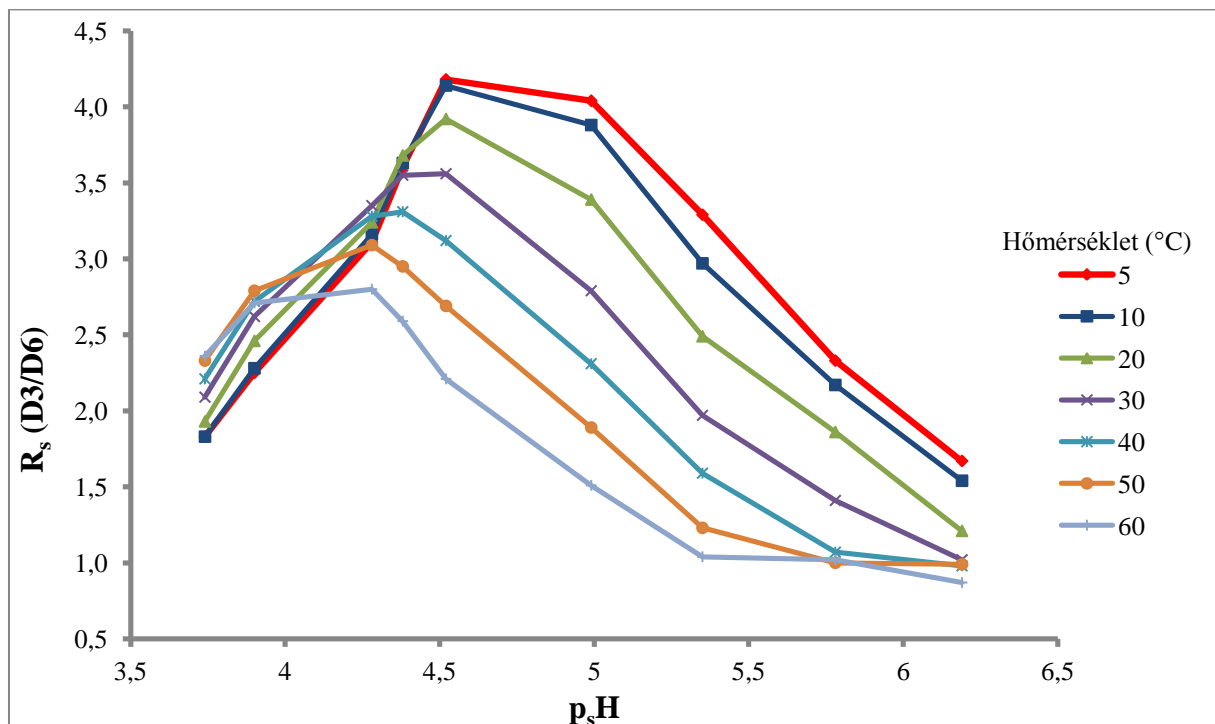
5.5 Áramlási sebesség hatása

A használt oszlopdimenzió mellett ($150 \times 4,6$ mm) az optimális áramlási sebesség tipikusan 1,5 ml/perc körül vagy a felett adódna. Az alkalmazott alacsony hőmérséklet (5–10 °C) és az eluens magas víztartalma (90%) miatt azonban nem tudtam 1,2 ml/perc áramlási sebesség feletti méréseket végezni a nagy nyomásesés miatt (~370 bar), holott a növekvő áramlási sebesség növelte az elválasztás kinetikai hatékonyságát (növekvő R_s értékeket nyertem).

5.6 Hőmérséklet és pH optimalizálása – van't Hoff-elemzés

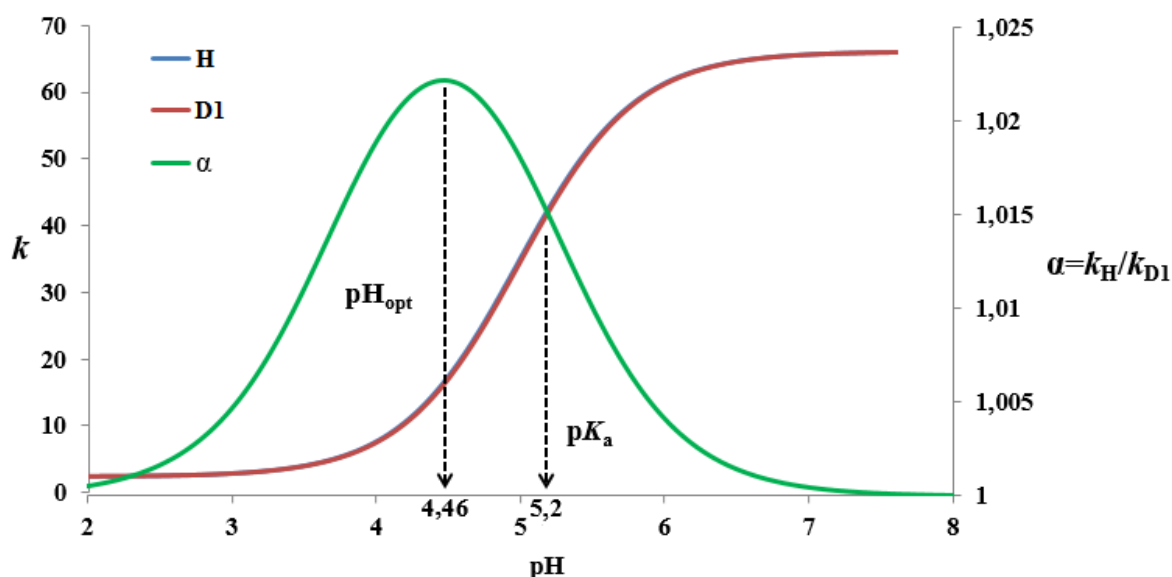
A hőmérséklet hatását széles tartományban, 5–10–60 °C-ig 10 °C-onként mértem minden pH-n. Az adatok ábrázolása és elemzése rámutatott, hogy alacsony pH-n a hőmérséklet emelkedésével az R_s nő, magas pH-n viszont csökken, a kettő között pedig maximumot ad. A legjobb elválasztást 5 °C-on 4,4-es pH-n értem el ($R_s=1,51$), de a kolonna-temperálás nehézkes technikai kivitelezése miatt inkább a 10 °C mellett döntöttem.

A pH hatásának vizsgálata során 0,2-es (magasabb pH-n 0,4-es) léptékekkel dolgoztam 3,6–6,0-os tartományban. A pH növekedésének hatására a csúcsok „frontingosból” „tailingesbe” hajlottak át, tehát javult a csúcsszimmetria és a pH=3,6–4,4 tartományban nőtt az R_s értéke, az afölötti pH-kon azonban csökkent. A további méréseket így az optimumban, pH=4,4-en végeztem (8. ábra).



8. ábra Hőmérséklet és pH hatása a D3/D6 izotopológ párok közötti felbontásra (R_s).

A **9. ábra** teljes mértékben hasonlít *Tanaka és mtsai* által közölt cikkben fellelhető ionizáció-kontrollált elválasztáshoz tartozó ábrához (**4. ábra**), továbbá visszaköszön az a kijelentésük is miszerint a gyenge bázisok elválasztását a pK_a értékük alatt 0,5–1 pH egységgel célszerű elvégezni [8]. Az ábráról leolvasható a maximális szelektiváshoz tartozó optimális pH érték ($pH_{opt}= 4,46$), továbbá a **H** és **D1** izotopológokhoz tartozó pK_a érték ($pK_a \approx 5,2$).



9. ábra A retenciós tényezők (k_H és k_D) illetve a szelektivitás (α) pH függése.

A **2. egyenletbe** behelyettesítve a mért k_B , k_{BH^+} és K_a értékeket.

Az $\ln k-1/T$ -pH diagram igazolja *Horváth és mtsai* fundamentális elméletét, miszerint a pK_a -nál alacsonyabb pH értékeken (endoterm tartomány) kationként eluálódnak a vizsgált anilinek és jellemzően a mobilfázissal való kölcsönhatás eredményezi a retenciójukat [17]. A pK_a értékük körül (termoneutrális tartomány) a mozgó és az állófázissal egyaránt kölcsönhatnak, végül pK_a értéküknél magasabb pH-n (exoterm tartomány) semleges állapotban eluálódnak és az állófázissal való kölcsönhatás válik dominánssá (**10. ábra**). Továbbá a mért pontokra egyenest illesztve és az R^2 értékek segítségével linearitásvizsgálatot végezve arra következtethetünk, hogy a termoneutrális tartományban egyszerre több retenciós mechanizmus szabja meg a visszatartást. Az illesztett egyenesek meredekségéből és tengelymetszetéből az elválasztás entalpiáját (ΔH^0) és entrópiáját (ΔS^0) is meg lehetett határozni.

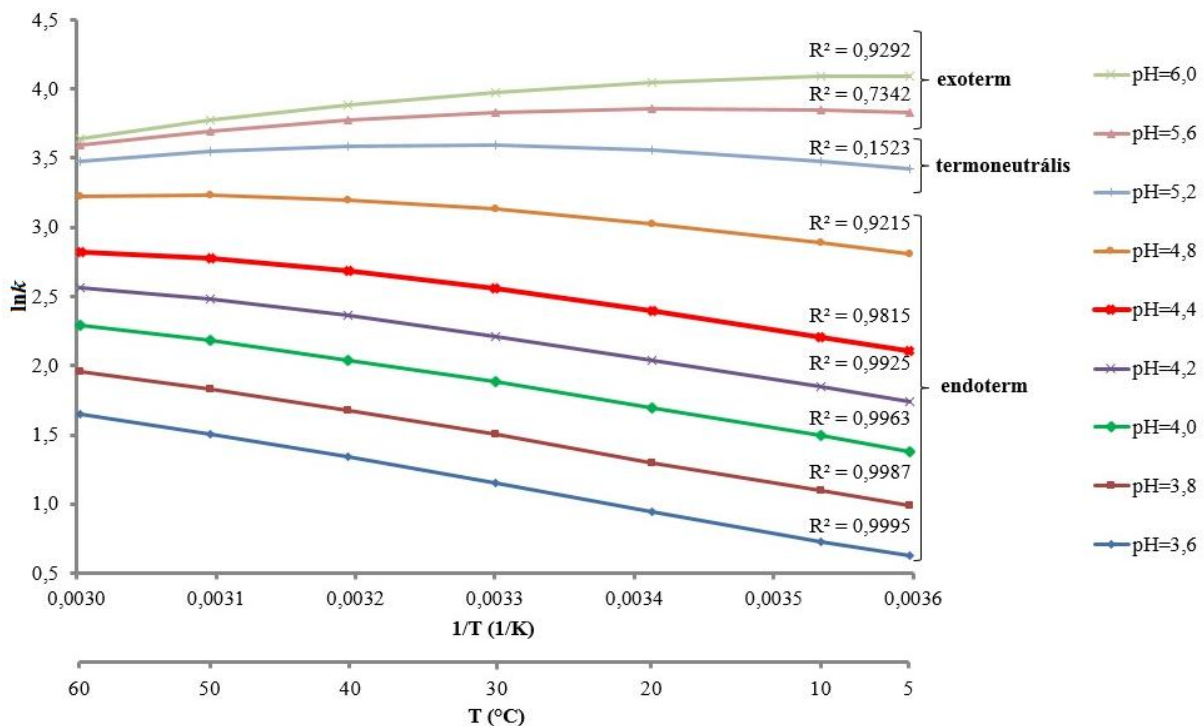
van't Hoff-egyenlet:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \phi \quad (3. \text{ egyenlet})$$

ahol ϕ a fázisarány, R az egyetemes gázállandó ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), $-\frac{\Delta H^0}{RT}$ az egyenes meredeksége és $\frac{\Delta S^0}{R}$ pedig a tengelymetszete, ebből az következik:

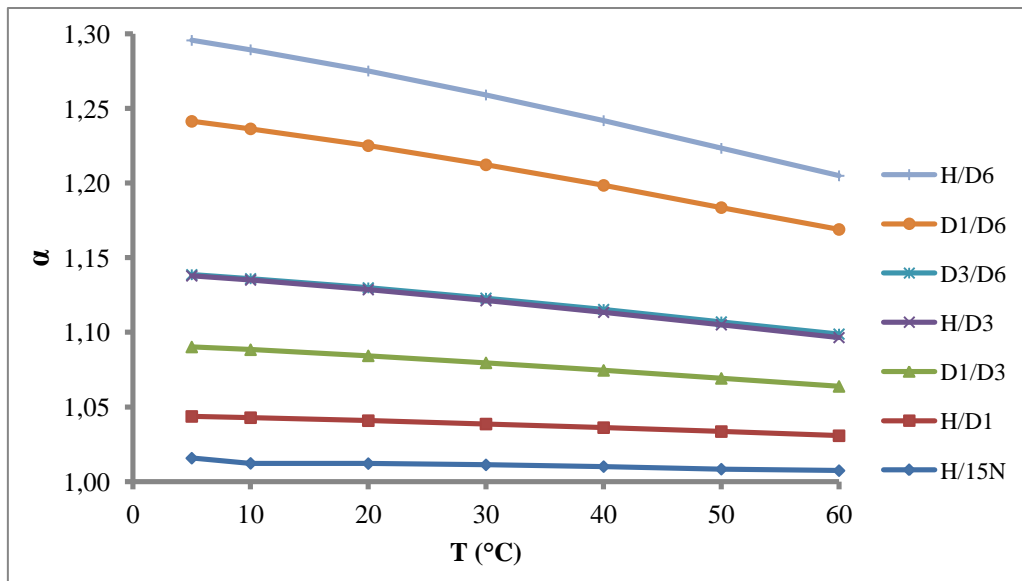
$$\Delta H^0 = -R * \text{meredekség} \quad (4. \text{ egyenlet})$$

$$\Delta S^0 = R * \text{tengelymetszet} \quad (5. \text{ egyenlet})$$



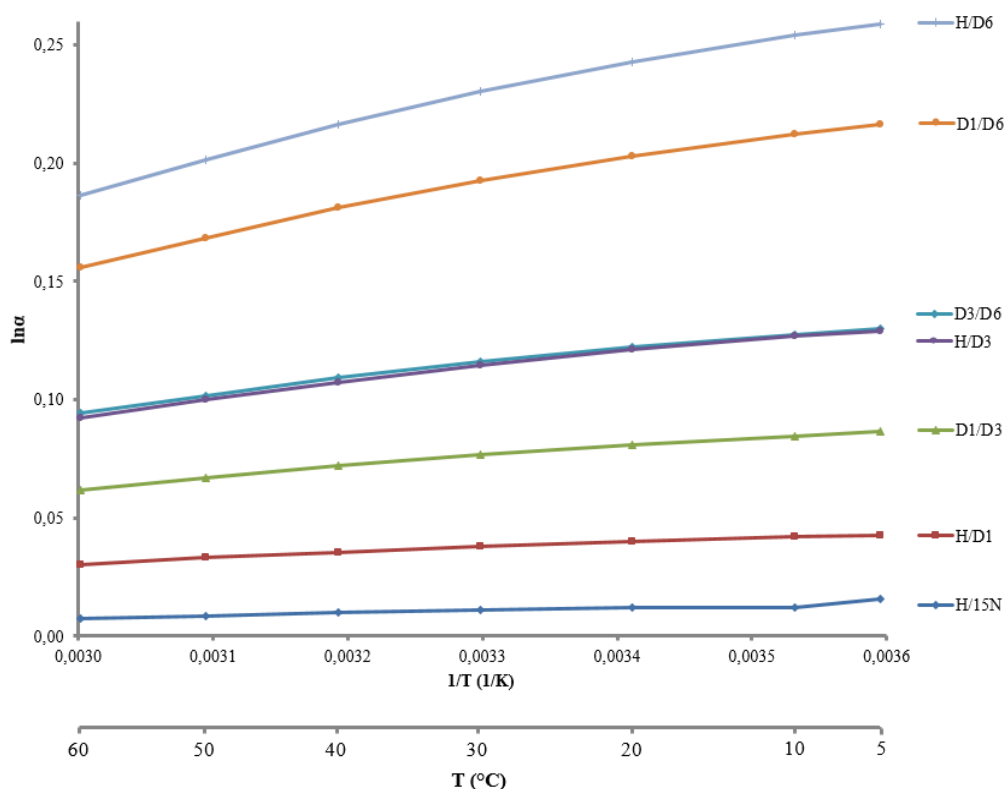
10. ábra A van't Hoff-elemzés összefoglaló ábrázolása a **D6** izotopológra nézve, pirossal kiemelve a pH=4,4 optimumot.

Jól látható, hogy az optimális pH-n (pH=4,4) végzett elválasztás az endoterm szakaszban van, tehát a k retenciós tényezőt a van't Hoff-egyenlet (3. egyenlet) entrópia (ΔS^0) tagja határozza meg.



11. ábra Szelektivitási tényező (α) hőmérsékletfüggése.

A kapott eredményekből elvégeztem a hőmérséklet–szelektivitási tényező (T – α) grafikus ábrázolását, amiből arra következtettem, hogy a csökkenő hőmérséklet egységesen növeli a szelektivitást (α) (11. ábra).



12. ábra A van't Hoff-elemzés összefoglaló ábrázolása az izotópeffektusra/szelektivitásra (összes izotopológ párra nézve) pH=4,4 optimumon (50 mM ammónium-citrát puffer mellett).

A **12. ábrán** a pontok az egyes izotopológ párokra nézve egy egyenesre illeszkednek és ezen egyenesek meredeksége pozitív, tehát maga az izotópeffektus exoterm jellegű, azaz entalpia-vezérelt. A két *van' Hoff*-elemzésből (**10., 11. és 12. ábra**) egy ritka, de érdekes jelenséget figyelhetünk meg, miszerint a csökkenő hőmérséklet hatására nő a szelektivitás (α), de egyúttal csökken a visszatartás (k). A **12. ábrán** 5 és 10 °C-hoz tartozó értékek kis mértékben rontják az egyenes illesztésének jóságát (R^2), ez az eltérés valószínűleg a nehézkes oszloptemperálásból adódik, ami a **H/¹⁵N** párra nézve a legszembetűnőbb, de a többi esetben is látható különbség. Ezért a termodinamikai paraméterek meghatározásakor ezeket az adatokat kihagytam és így végeztem el (**4. és 5. egyenlet**) a paraméterek meghatározását (**1. táblázat**)

1. táblázat Az egyes izotopológ párokra számolt izotópeffektusok termodinamikai paraméterei (n=3).

n (H/D csere)	izotopológ párok	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/mol·K)
6	H/D6	$-274,15 \pm 0,30$	$-0,4504 \pm 0,0009$
5	D1/D6	$-227,10 \pm 0,06$	$-0,3698 \pm 0,0002$
3	D3/D6	$-134,77 \pm 0,20$	$-0,2162 \pm 0,0007$
3	H/D3	$-139,38 \pm 0,32$	$-0,2342 \pm 0,0011$
2	D1/D3	$-92,33 \pm 0,16$	$-0,1537 \pm 0,0005$
1	H/D1	$-47,05 \pm 0,25$	$-0,0806 \pm 0,0009$
-	H/ ¹⁵ N	$-23,50 \pm 0,99$	$-0,0558 \pm 0,0031$

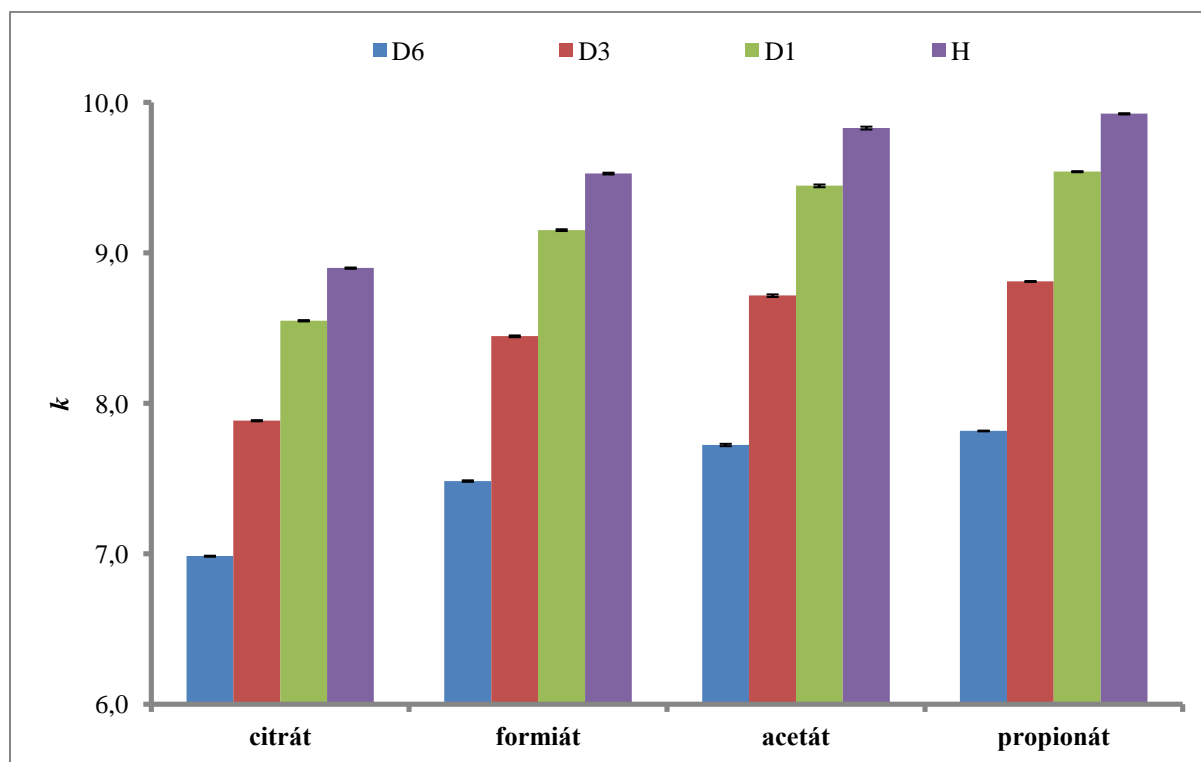
Itt érdemes megjegyezni, hogy ezen adatok grafikus ábrázolása ($n \cdot \Delta H^0$ vagy $n \cdot \Delta S^0$) is egyenesekhez vezet, ami viszont ennél is érdekesebb az a **H/D3** és **D3/D6** termodinamikai paraméterei közötti szignifikáns különbség, mert az elmélet szerint ezeknek az adatoknak egyezniük kellene. A dolgozat ezen eltérés megvitatására nem tér ki.

5.7 Puffer fajtájának hatása az elválasztásra

A retenciós adatok *van't Hoff*-elemzéséből megállapítottuk, hogy az elérhető maximális szelektivitás mellett az elválasztást döntően a tesztvegyületek és a mozgófázis közötti kölcsönhatás befolyásolja (endoterm tartomány), tehát az izotópok elválasztása ionizációkontrollált és a retenciót elsődlegesen a mozgófázis szabja meg. Ezért elengedhetetlennek éreztük az ammónium-acetát ($pK_a=4,75$) mellett más puffereket, mint ellenanionokat is megvizsgálni, hogy tisztázzuk az ionpár-képzés hatását az elválasztásban:

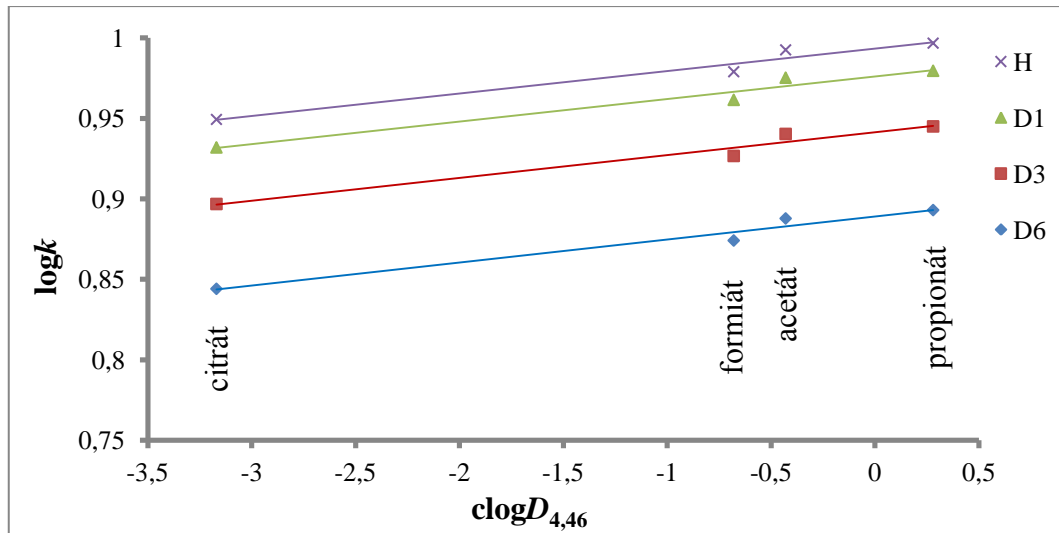
- ammónium-formiát ($pK_a=3,75$)
- ammónium-propionát ($pK_a=4,88$)
- ammónium-citrát ($pK_{a1}=3,15$; $pK_{a2}=4,77$)
- ammónium-benzoát ($pK_a=4,21$)

Az ellenanionok kiválasztásánál arra törekedtünk, hogy a pK_a értékük a pH optimum ($pH_{opt}=4,4$) közelében legyen, így biztosítva a megfelelő pufferkapacitást. Az ammónium-benzoátot csekély vízbéli oldhatósága miatt nem tudtuk lemérni. A pufferek összehasonlítása során minden vizsgálatot 10 °C-on 50 mM-os ionerősséggel és a 10% ACN melletti 4,46-os látszólagos pH-n (p_sH) végeztem. A következő ábrán az egyes pufferek retenciós tényezőre gyakorolt hatását mutatom be (**13. ábra**).



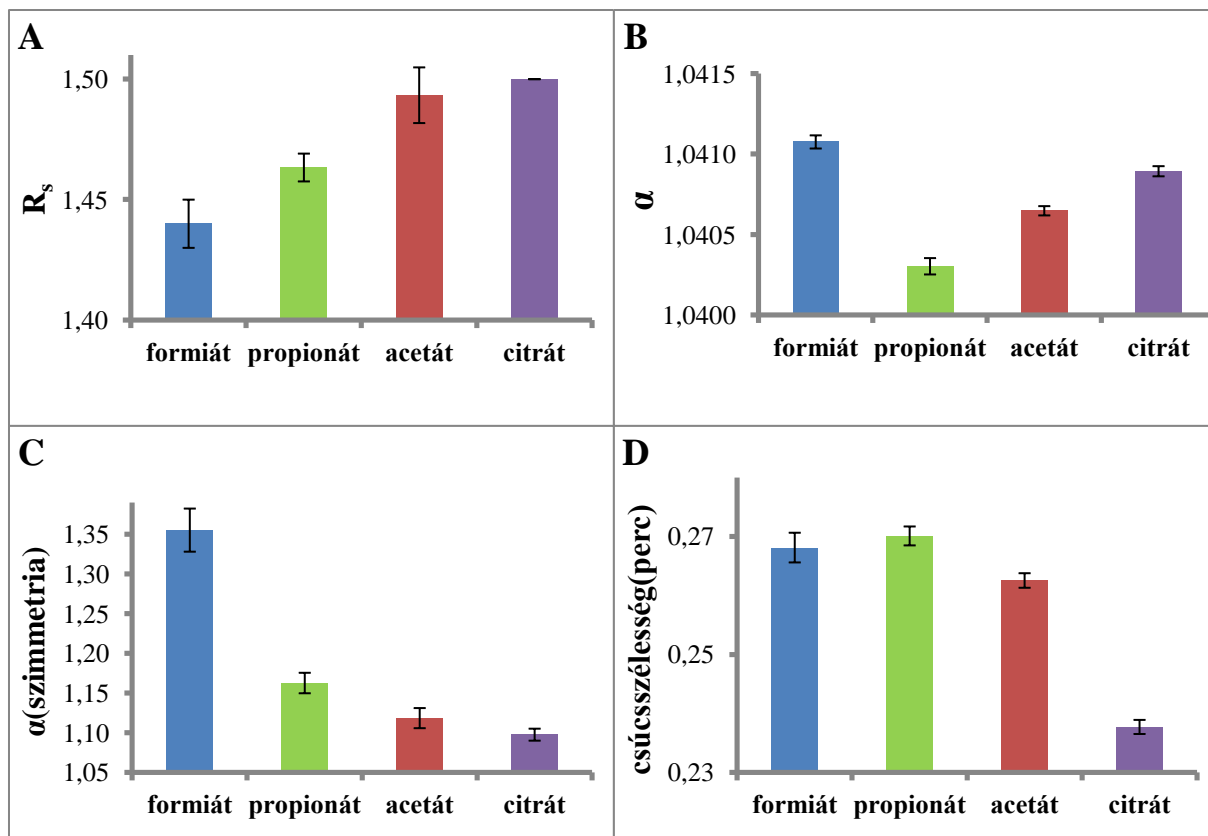
13. ábra Retenciós tényezők ellenanion függése (10 °C, 50 mM, $p_sH=4,46$).

A legkisebb visszatartást a citrát esetében mértük, míg legnagyobb retenciót a propionát puffer szolgáltatott. A kapott retenciokat az ellenanionok p_sH értéken vett látszólagos megoszlási hányadosának ($\log D_{4,46}$) függvényében ábrázolva mind a 4 tesztvegyületre jó korrelációt kaptunk (**14. ábra**). Ez az összefüggés is megerősítette, hogy a 4,46-os pH értékű eluensben ionpárképzés történik.



14. ábra Puffer ellenanionjának látszólagos megoszlási hányadosának ($\log D_{pH4,46}$) hatása a retenciós tényezőre (k).

Az egyes pufferek folyadékkromatográfias elválasztást meghatározó teljesítményjellemzőkre (felbontás, szelektivitás, csúcshélesség, csúcshimmetria) gyakorolt hatását a következő ábra szemlélteti (**15. ábra**).



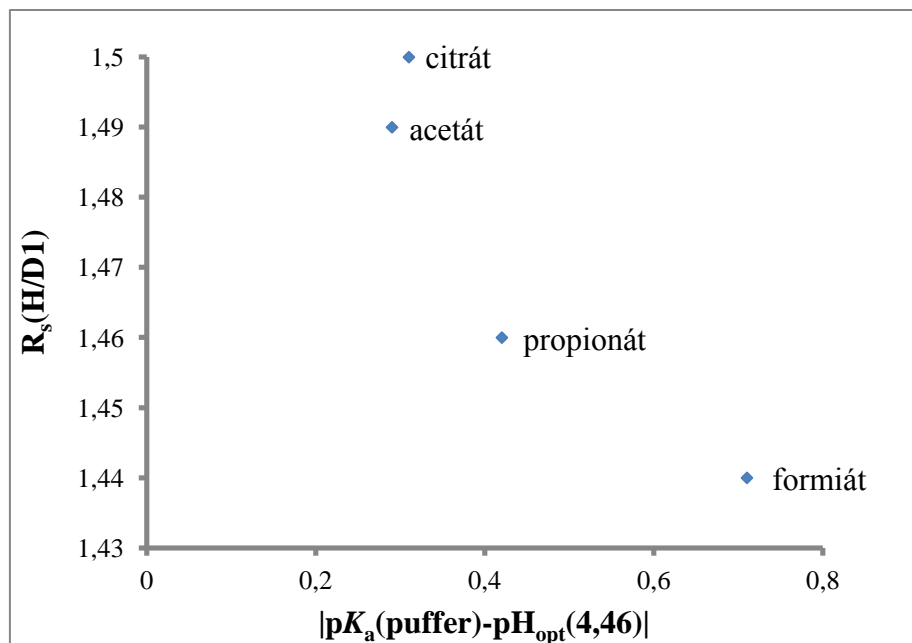
15. ábra A, felbontás ellenanion függése
C, szimmetria ellenanion függése

B, szelektivitás ellenanion függése
D, csúcsszélesség ellenanion függése

Az adatok grafikus elemzéséből látható, hogy a tesztvegyületeink elválasztására az ammónium-citrát a legjobb, több szempontból is:

- legkisebb visszatartás
- egyik legjobb felbontás
- egyik legjobb szelektivitás
- legjobb csúcsszimmetria
- legkisebb csúcsszélesség

Az ammónium-formiát viszonylag magas szelektivitási értéke ($\alpha=1,0411$) valószínűleg hibás és a gyenge csúcsszimmetria értékéből származik, a gyenge csúcsszimmetria értéke pedig az ezen a pH-n való alacsony pufferkapacitásból adódhat (**16. ábra**). Összegezve tehát, a következő méréseket 50 mM-os ammónium-citrát pufferrel végeztem.



16. ábra Az egyes pufferek pufferkapacitásának felbontóképességre gyakorolt hatása.

5.8 Optimális paraméterek

A legnagyobb R_s értéknél alkalmazott és egyben jól reprodukálható paramétereket választottunk optimálisnak (**2. táblázat**). Továbbá ezeken az értékeken különböző fordított fázisú kromatográfiás oszlopon méréseket végeztem, hogy a kolonnák hatékonyságát összehasonlíthassam.

2. táblázat A HPLC elválasztás optimális paraméterei.

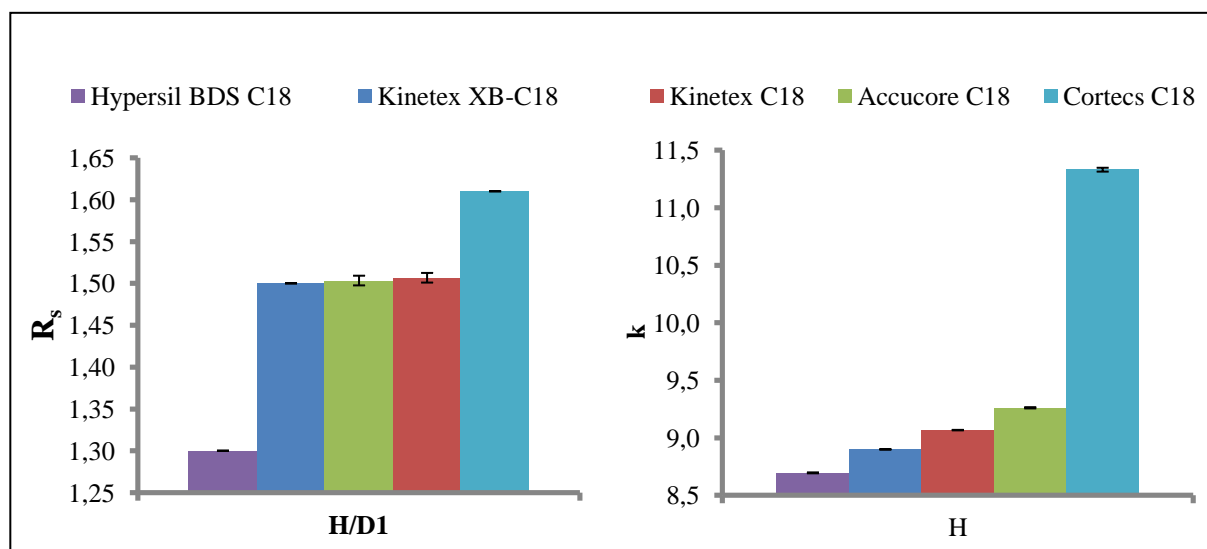
Paraméter	Érték
ACN %	10
ionerősség (mM)	50
áramlási sebesség (ml/perc)	0,9
p_sH	4,46
Hőmérséklet (°C)	10
puffer (ellenanion)	ammónium-citrát

Ezekon az értékeken több különböző gyártótól származó, ám nagyon hasonló karakterű C18 állófázisú oszlopon végeztem méréseket (**3. táblázat**). (Béni és mtsai által közzétett cikkben nem közölték, ám több különböző állófázisú oszlopon végeztek méréseket, de a C18 állófázisú oszlopon kapták a legjobb elválasztást [1]. Ezért mi csak C18 állófázisú oszlopokat teszteltünk.)

3. táblázat A tesztelt oszlopok paramétereit.

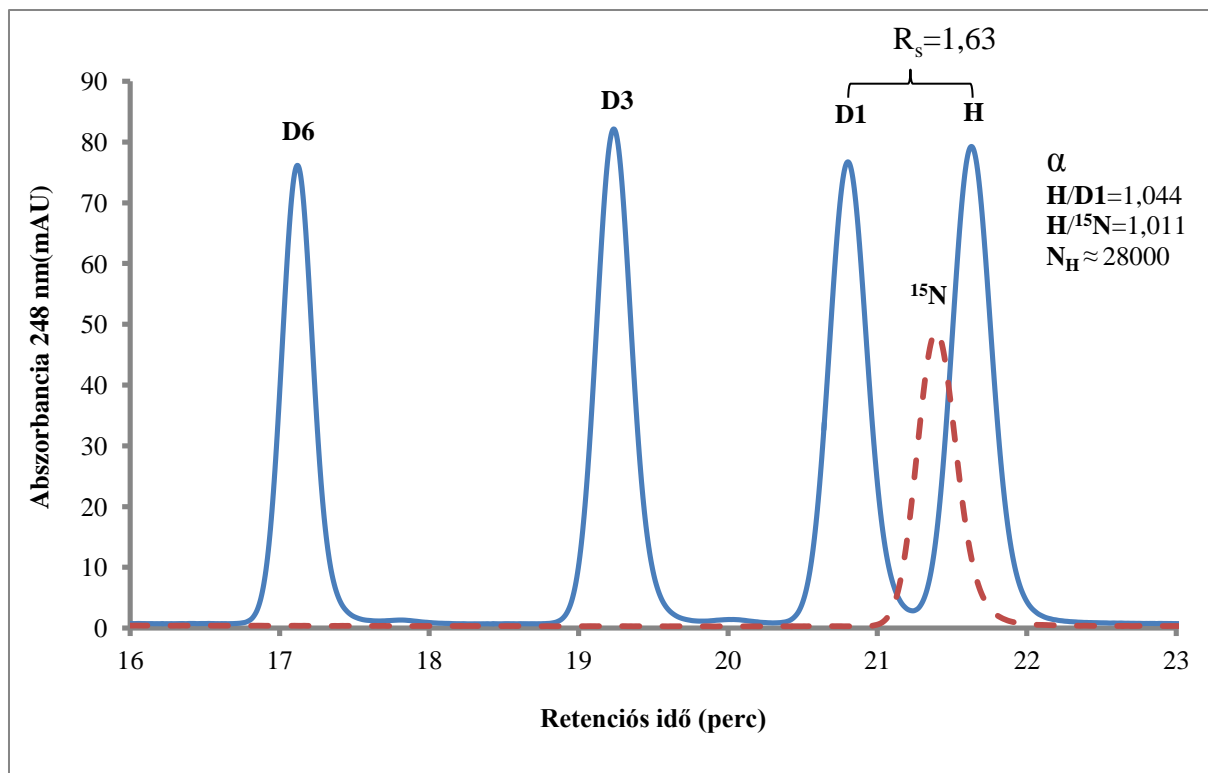
Gyártó	Név	Méret (mm)	Szemcseátmérő (µm)	Töltet típusa
Phenomenex	Kinetex XB-C18	150 × 4,6	2,6	mag-héj
	Kinetex C18	150 × 4,6	2,6	mag-héj
Thermo	Hypersil BDS C18	150 × 4,6	2,4	teljesen porózus
	Accucore C18	150 × 4,6	2,6	mag-héj
Waters	Cortecs C18	150 × 4,6	2,7	mag-héj

Az egyes oszlopokra nyert felbontást és retenciós tényezőket a következő ábrán szemléltetem (**17. ábra**).



17. ábra Az egyes oszlopok felbontása a **H/D1** izotopológokra és retenciós tényező értékei a **H** komponensre nézve.

A nagyon hasonló geometriai tulajdonságaikból fakadóan a vizsgált oszlopok nagyon hasonló eredményeket értek el az elválasztásban is. A várakozásoknak megfelelően a gyengébb kinetikai-hatékonyságú, teljesen porózus Hypersil BDS C18 oszlopon volt legrosszabb a felbontás és a visszatartás is. A többi oszlop közel azonos teljesítménnyel tudta elválasztani a **H** és **D1** izotopológokat, amiket a Cortecs C18 kolonna kiemelkedően nagy felbontással választott el (**18. ábra**). Mivel a Cortecs C18 kolonna ilyen jó teljesítményjellemzőkkel rendelkezik, ezért végeztem rajta méréseket különböző hőmérséklet (5–10 °C) és áramlási sebesség mellett (0,75–1,2 ml/perc).



18. ábra A Waters Cortecs C18 kolonnán elért legjobb elválasztás kromatogramja 5 °C-on 0,9 ml/perc áramlási sebesség mellett. Kiemelve a **H/D1** és **H/ ^{15}N** párokra kapott szelektivitás és felbontás értékét, illetve a **H** csúcsra számolt elméleti tényezszámot.

6. Összefoglalás

Munkám során több paraméter (eluens összetétel, ionerősség, pH, T, áramlási sebesség, ellenanion és oszlop) optimalizálása során sikerült a deuterálatlan (**H**) és a metilcsoporton egyszeresen deuterált *N,N*-dimetilanilint (**D1**) elválasztani egymástól ($R_s=1,63$) fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP–HPLC) módszerrel egy hagyományos, 400 baros HPLC készüléken. Részeredményeinket az alábbi pontok foglalják össze:

- Reprodukáltuk az uliprisztál-acetát (ULIPA) elválasztását *N,N*-dimetilanilin izotopológokon először gradiens, majd izokratikus elúcióval is.
- A mozgófázisra fókuszálva vizsgálatainkat olyan optimált rendszert kaptunk, amelyben majdnem az összes folyadékkromatográfiás paraméter (szelektivitás, felbontás, szimmetria, csúcshélesség, retenciós tényező) a lehető legjobb.
- Bizonyítottuk, hogy a csökkenő hőmérséklet növeli az izotópeffektus mértékét, azaz az elérhető kromatográfiás szelektivitást.
- Bizonyítottuk továbbá, hogy a másodlagos β -helyzetű deutérium körülbelül négyszer nagyobb effektussal bír, mint a primer helyzetű ^{15}N ($\alpha_{H/^{15}\text{N}} \stackrel{\sim}{\approx} \alpha_{H/D1}$).
- A hőmérséklet (T) retenciós tényezőre (k) gyakorolt hatását megvizsgáltuk, illetve az adatok *van't Hoff*-elemzését ($\ln k - 1/T$) elvégeztük, és az így nyerhető termodinamikai adatokat meghatároztuk.
- Az optimális paraméterek *van't Hoff*-elemzése segítségével bizonyítottuk, hogy az izotopológok elválasztását kizárólag az ionizáció szabályozza, tehát a mozgófázissal való kölcsönhatásuk a meghatározó. Továbbá, hogy a savi állandók különbözősége teljes mértékben kiaknázható ionizáció-kontrollált fordított fázisú folyadékkromatográfiával.
- A fejlesztett módszer univerzális ($\Delta p < 400$ bar), és segítségével több különböző C18 állófázisú oszlop tesztelését végeztem el a kolonnák hatékonyságának jellemzésére.

Habár az eredményeink elméleti jelentőségűek úgy gondoljuk, hogy az analitikai kémia más területein is felhasználásra kerülhetnek. A vizsgált izotópeffektus hőmérséklet és pH függésének kihasználását a következő metodikákban tartjuk relevánsnak:

- Nagy pontosságú kvantitatív folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás mérésekben meghatározni kívánt vegyületek izotopológjainak retenciós idő eltolódásának jobb kontroljára [18].
- Izotópeloszlás mérésen alapuló analitikai módszereknél (pl.: ionizálható, környezetszennyező vegyületek szilárd fázisú extrakciójakor) fellépő izotópeloszlás-torzulás elkerülése [19].
- Kvantitatív fehérje analízisben deuterált dimetil jelző csoportok használatakor [20].

A későbbiekben tervezzük még egy 0 °C alatti (kb.: -10–15 °C) mérés elvégzését és ennek a nagyon alacsony hőmérsékletnek a hatását vizsgálni az elválasztásra és az izotópeffektusra.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Béni, Z.; Orgoványi, J.; Kóti, J.; Sánta, C.; Horváth, J.; Mahó, S.; Szántay C. Jr.: Detection by HPLC and structural characterization by NMR and MS of a natural deuterium isotopologue of ulipristal acetate. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *98*, 279–286.
- [2] Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. *Experiments Related to Thermodynamics and Kinetics in Modern Physical Organic Chemistry*. University Science Books **2006**, 421–427.
- [3] Lešetický, L. *Isotope separations/Liquid Chromatography in Encyclopedia of Analytical Science (second edition)*. Worsfold, P.;Townshend, A.; Poole, C. (Eds.) Academic Press **2005**, 297–305.
- [4] Turowski, M.; Yamakawa, N.; Meller, J.; Kimata, K.; Ikegami, T.; Hosoya, K.; Tanaka, N.; Thornton, E. R.: Deuterium isotope effects on hydrophobic interactions: the importance of dispersion interactions in the hydrophobic phase. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13836–13849.
- [5] Lockley, W. J. S.: Regiochemical differences in the isotopic fractionation of deuterated benzoic acid isotopomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1989**, *483*, 413–418.
- [6] Valleix, A.; Carrat, S.; Caussignac, C.; Leonce, E.; Tchapla, A.: Secondary isotope effects in liquid chromatography behaviour of ^2H and ^3H labelled solutes and solvents. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1116*, 109–126.
- [7] Tanaka, N.; Thornton, E.: Isotope effects in hydrophobic binding measured by high-pressure liquid chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1617–1619.
- [8] Tanaka, N.; Hosoya, K.; Nomura, K.; Yoshimura, T.; Ohki, T.; Yamaoka, R.; Kimata, K.; Araki, M.: Separation of nitrogen and oxygen isotopes by liquid chromatography. *Nature* **1989**, *341*, 727–728.
- [9] Filer, C. N.; Fazio, R.; Ahern, D. G.: (+/-)-[methyl-H-3 and methyl-H-2]mianserin - participants in a dramatic instance of HPLC isotopic fractionation. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3344–3346.

- [10] Masters, C. F.; Markey, S. P.; Mefford, I. N.: Separation of deuteriated isotopomers of dopamine by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2131–2134.
- [11] Rohrer, J. S.; Olechno, J. D.: Secondary isotope effect: the resolution of deuterated glucoses by anion-exchange chromatography. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 914–916.
- [12] Yang, C. S.; Ishizaki, H.; Lee, M.; Wade, D.; Fadel, A.: Deuterium isotope effect in the interaction of *N*-nitrosodimethylamine, ethanol, and related compounds with cytochrome P-450IIE1. *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, *4*, 408–413.
- [13] Bushey, M. M.; Jorgenson, J. W.: Separation of dansylated methylamine and dansylated methyl-d₃-amine by micellar electrokinetic capillary chromatography with methanol-modified mobile phase. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 491–493.
- [14] Tanaka, N.; Araki, M.: Separation of oxygen isotopic compounds by reversed-phase liquid chromatography on the basis of oxygen isotope effects on the dissociation of carboxylic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7780–7781.
- [15] Tanaka, N.; Yamaguchi, A.; Araki, M.: Separation of nitrogen isotopic compounds by reversed-phase liquid chromatography on the basis of nitrogen isotope effects on the dissociation of amines. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7781–7782.
- [16] Perrin, C. L.; Ohta, B. K.; Kuperman, J.; Liberman, J.; Erdélyi, M.: Stereochemistry of β -deuterium isotope effects on amine basicity. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9641–9647.
- [17] Horváth, C.; Melander, W.; Molnár, I.: Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases. *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 142–154.
- [18] Szarka, S.; Prokai-Tatrai, K.; Prokai, L.: Application of screening experimental designs to assess chromatographic isotope effect upon isotope-coded derivatization for quantitative liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7033–7040.
- [19] Skarpeli-Liati, M.; Turgeon, A.; Garr, A. N.; Arnold, W. A.; Cramer, C. J.; Hofstetter, T. B.: pH-dependent equilibrium isotope fractionation associated with the compound specific nitrogen and carbon isotope analysis of substituted anilines by SPME-GC/IRMS. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1641–1648.

[20] Di Palma, S.; Raijmakers, R.; Heck, A. J. R.; Mohammed, S.: Evaluation of the deuterium isotope effect in zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography separations for implementation in a quantitative proteomic approach. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8352–8356.