

Biológiailag aktív vegyületek ciklodextrin komplexei: stabilitást és enantiomer elválasztást befolyásoló tényezők vizsgálata

Doktori értekezés

Sohajda Tamás

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Noszál Béla egyetemi tanár, D. Sc.
Hivatalos bírálók: Dr. Barczáné Dr. Buvári Ágnes, egyetemi docens, C.Sc.
Dr. Tábi Tamás, egyetemi adjunktus, Ph. D.
Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vincze Zoltán, egyetemi tanár C. Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Perjési Pál, egyetemi tanár C. Sc.
Dr. Kalász Huba, egyetemi tanár D. Sc.

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet
Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

| | |
|---|----------|
| 1. Rövidítések jegyzéke | 4 |
| 2. Bevezetés | 7 |
| 3. Irodalmi háttér | 9 |
| 3.1 A kiralitás..... | 9 |
| 3.1.1 Az optikai izoméria vagy kiralitás fogalma | 9 |
| 3.1.2 A konfiguráció, az enantiomerek szerkezetének meghatározása..... | 10 |
| 3.1.3 Az enantiomerek eltérő biológiai tulajdonságai | 11 |
| 3.1.4 Az enantiomerek elválasztása, arányuk meghatározása | 13 |
| 3.1.5 Enantiomer szelektív kromatográfia | 13 |
| 3.1.6 Az enantiomer arány meghatározásának felhasználási területei..... | 16 |
| 3.2 A vizsgált vegyületek | 16 |
| 3.2.1 Aszpartám | 16 |
| 3.2.2 Pregabalin | 17 |
| 3.2.3 Vinka alkaloidok..... | 18 |
| 3.2.4 Imperanén | 21 |
| 3.2.5 Szitagliptin | 22 |
| 3.2.6 Dapoxetin..... | 23 |
| 3.3 Kapilláris elektroforézis..... | 24 |
| 3.3.1 A kapilláris elektroforézis alapjai | 24 |
| 3.3.2 A királis kapilláris elektroforézis alapjai | 28 |
| 3.3.3 Háttér pufferek vagy elektrolitok..... | 32 |
| 3.3.4 A királis kapilláris elektroforézis módjai..... | 33 |
| 3.3.5 Királis szelektorok kombinálása | 34 |
| 3.4 A ciklodextrinek | 34 |
| 3.4.1 A ciklodextrinek történetének rövid áttekintése | 37 |
| 3.4.2 A ciklodextrinek felhasználása és gyógyszerészeti jelentősége | 37 |
| 3.4.3 A ciklodextrinek zárványkomplex képzése | 39 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.4.4 | A ciklodextrin komplexek egyensúlyi és szerkezeti jellemzésének módszerei | 41 |
| 3.4.4.1 | Kapilláris elektroforézis | 41 |
| 3.4.4.2 | NMR spektroszkópia | 43 |
| 3.4.5 | Enantiomerek elválasztása ciklodextrinekkal kapilláris elektroforézisben..... | 46 |
| 3.5 | Sav-bázis egyensúlyok..... | 49 |
| 3.5.1 | NMR-pH titrálás | 50 |
| 3.5.2 | CE-pH titrálás | 52 |
| 4. | Célkitűzések | 54 |
| 5. | Módszerek | 55 |
| 5.1 | Protonálódási állandók meghatározása..... | 56 |
| 5.1.1 | Anyagok..... | 56 |
| 5.1.2 | NMR-pH titrálások | 57 |
| 5.1.3 | CE-pH titrálások | 58 |
| 5.2 | Ciklodextrinekkal való kölcsönhatások vizsgálata | 59 |
| 5.2.1 | Anyagok..... | 59 |
| 5.2.2 | Kapilláris elektroforézis..... | 61 |
| 5.2.3 | NMR spektroszkópia | 63 |
| 6. | Eredmények, megbeszélés | 67 |
| 6.1 | Protonálódási állandók meghatározása..... | 67 |
| 6.1.1 | CE-pH titrálások | 67 |
| 6.1.1.1 | Pregabalin | 67 |
| 6.1.1.2 | Szitagliptin | 69 |
| 6.1.1.3 | Imperanén és dapoxetin | 70 |
| 6.1.2 | ¹ H NMR-pH titrálások | 70 |
| 6.1.2.1 | Aszpartám | 71 |
| 6.1.2.2 | Szitagliptin | 73 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 6.2 | Ciklodextrinekkel való kölcsönhatás vizsgálata | 74 |
| 6.2.1 | Komplex stabilitás és királis elválasztás vizsgálata..... | 74 |
| 6.2.1.1 | Aszpartám | 74 |
| 6.2.1.2 | Pregabalin | 79 |
| 6.2.1.3 | Vinka alkaloidok..... | 90 |
| 6.2.1.4 | Imperanén | 95 |
| 6.2.1.5 | Szitagliptin..... | 98 |
| 6.2.1.6 | Dapoxetin..... | 101 |
| 6.2.2 | A komplexek sztöchiometriájának vizsgálata..... | 109 |
| 6.2.3 | A komplexek térszerkezetének vizsgálata | 110 |
| 7. | Következtetések | 115 |
| 8. | Összefoglalás | 117 |
| 9. | Summary | 118 |
| 10. | Irodalomjegyzék | 119 |
| 11. | Az értekezés alapját képező saját közlemények..... | 143 |
| 12. | Köszönetnyilvánítás | 144 |

1. Rövidítések jegyzéke

| | |
|------------------|--|
| Ac- β -CD | random acetyl-béta-ciklodextrin |
| Asm | aszpartám |
| CD | ciklodextrin |
| CM- α -CD | karboximetil-alfa-ciklodextrin nátrium só |
| CM- β -CD | karboximetil-béta-ciklodextrin nátrium só |
| CM- γ -CD | karboximetil-gamma-ciklodextrin nátrium só |
| CE | kapilláris elektroforézis |
| CE- β -CD | karboxietil-béta-ciklodextrin |
| C.I.P konvenció | Cahn-Ihngold-Prelog konvenció |
| ClAc | klórecetsav |
| DAD | diódasoros detektor (diode-array detector) |
| DIMEB-CD | heptakis(2,6-di-O-metil)-béta-ciklodextrin |
| DMSO | dimetil-szulfoxid |
| DNS | dezoxiribonukleinsav |
| Dns-preg | danzilezett pregabalin származék |
| DPP-IV | dipeptidil-peptidáz-4 |
| Dpx | dapoxetin |
| DS | szubsztitúciós fok (degree of substitution) |
| DSS | 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav |
| EOF | elektroosmotikus áramlás (electroosmotic flow) |
| GC | gázkromatográfia |
| HP- α -CD | 2-hidroxipropil-alfa-ciklodextrin |
| HP- β -CD | 2-hidroxipropil-béta-ciklodextrin |
| HP- γ -CD | 2-hidroxipropil-gamma-ciklodextrin |
| HPLC | nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia |
| ICH | Nemzetközi Harmonizációs Konferencia (International Conference on Harmonization) |
| Ipn | imperanén |

| | |
|-------------------|--|
| IR | infravörös |
| Kplx | komplex |
| LC | folyadékkromatográfia |
| MA- β -CD | 6-monodezoxi-6-monoamino-béta-ciklodextrin hidroklorid |
| MeOH | metanol |
| MS | tömegspektroszkópia |
| NMR | mágneses magrezonancia spektroszkópia |
| NOESY | mag-Overhauser hatás spektroszkópia (nuclear Overhauser effect spectroscopy) |
| P- β -CD | foszfátált-béta-ciklodextrin nátrium só |
| PA- β -CD | 6-monodezoxi-6-mono(2-hidroxi)propilamino-béta-ciklodextrin hidroklorid |
| Preg | pregabalin |
| RAMEA-CD | random metil-alfa-ciklodextrin |
| RAMEB-CD | random metil-béta-ciklodextrin |
| RAMEG-CD | random metil-gamma-ciklodextrin |
| ROESY | „rotating frame” Overhauser hatás spektroszkópia (rotating frame Overhauser effect spectroscopy) |
| SB- α -CD | szulfobutiléter-alfa-ciklodextrin |
| SB- β -CD | szulfobutiléter-béta-ciklodextrin |
| SB- γ -CD | szulfobutiléter-gamma-ciklodextrin |
| SFC | szuperkritikus folyadékkromatográfia |
| Sgli | szitagliptin |
| SHP- β -CD | szulfohidroxipropil-béta-ciklodextrin nátrium só |
| SHP- γ -CD | szulfohidroxipropil-gamma-ciklodextrin nátrium só |
| SP- α -CD | szulfopropil-alfa-ciklodextrin nátrium só |
| SP- β -CD | szulfopropil-béta-ciklodextrin nátrium só |
| SP- γ -CD | szulfopropil-gamma-ciklodextrin nátrium só |
| SSRI | szelektív szerotonin-visszavétel gátló (selective serotonin reuptake inhibitor) |

| | |
|------------------|---|
| Suc- β -CD | szukcinil-béta-ciklodextrin |
| TLC | vékonyréteg kromatográfia |
| Tos-preg | tozilezett pregabalin származék |
| TRIMEA-CD | hexakis(2,3,6-tri-O-metil)-alfa-ciklodextrin |
| TRIMEB-CD | heptakis(2,3,6-tri-O-metil)-béta-ciklodextrin |
| TRIMEG-CD | oktakis(2,3,6-tri-O-metil)-gamma-ciklodextrin |
| Tris | tris(hidroximetil)aminometán |
| UV | ultraibolya |
| UV-VIS | ultraibolya-látható (ultraviolet-visible) |

2. Bevezetés

Az élő szervezetek alapvetően királis jellegéből adódóan az optikai izomerek – köztük az enantiomerek – azonos konstitúciójuk ellenére gyakran eltérő biológiai hatást fejtenek ki. Az enantiomerpárok tagjainak lehetséges eltérő hatása miatt az enantiomertiszta termékek gyártása, illetve az enantiomerek elválasztása és egyedi biológiai tulajdonságainak vizsgálata ma már alapvető gyógyszerkönyvi követelmény. A gyógyszerkönyvek előírják a legalább 0,1 százalékban jelenlevő szennyezések meghatározását - beleértve az enantiomer szennyezéseket is. A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv az enantiomerek és más rokon szerkezetű hatóanyagok és biomolekulák elválasztására nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC), réteg- (TLC) és gázkromatográfiás (GC), valamint kapilláris elektroforézis (CE) módszereket ír elő. Számos esetben szerepel emellett a megfelelő enantiomer jelenlétének megerősítésére a fajlagos optikai forgatóképesség meghatározása is.

A királis elválasztásokat bonyolulttá teszi, hogy a kölcsönható csoportoknak nemcsak fizikailag és kémiailag kell egymásnak megfelelniük, hanem térbeli elrendezésükben is. A kölcsönhatások bonyolultsága rendkívül megnehezíti az elválasztás sikerének előrejelzését. Ezért választottuk kutatásaim fő témájául – a tudományos szempontok és a felmerült gyakorlati igények figyelembe vételével – az enantiomer szelektív analíziseket mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópiával kiegészített kapilláris elektroforézis (CE) technikával. Ahhoz, hogy az enantiomerek kapilláris elektroforézissel elválaszthatók legyenek, királis szelektorra van szükség. A királis elválasztás területén a leggyakrabban és legnagyobb sikerrel alkalmazott ilyen additívek a ciklodextrinek (CD-k), melyek diasztereomer zárványkomplex képzés révén tesznek különbséget az izomerek között. A ciklodextrinek sajátos szerkezete nemcsak azt biztosítja, hogy számos molekulával képezzenek eltérő stabilitású komplexet, hanem azt is, hogy hidroxilcsoportjaik szubsztituálása révén szinte végtelen számú származék-féleséget lehessen előállítani, melyek egyedi, sok esetben szelektív komplexképző tulajdonságokkal és királis felismerő képességgel rendelkeznek. Bár a gazda- és vendégmolekula között csak másodrendű kémiai kötések jönnek létre, a ciklodextrin üregének nagy elektronsűrűsége megváltoztathatja a bezárt vendégmolekula elektron-átmeneteit, ezáltal különböző elektrokémiai és spektrális sajátosságait. Ennek

következtében a vendégmolekula fizikai és kémiai tulajdonságai nagymértékben megváltozhatnak, így a komplexképződés védelmet nyújthat számos külső hatás ellen (pl. oxidáció, fotokémiai bomlás), növelheti a hatóanyag oldékonyságát, vagy a mellékhatásait enyhítheti. Mindez rendkívül érdekes felhasználásokat tesz lehetővé többek között a gyógyszer- és élelmiszeriparban, illetve az analitikában. A gazda- és vendégmolekula közötti specifikus kapcsolat kialakulásának feltétele, hogy a vendég mérete, illetve funkciós csoportjainak típusa és térbeli elhelyezkedése a ciklodextrin üregében megfelelő legyen a másodlagos kötőerők (H-kötés, van der Waals erők, hidrofób és elektrostatikus kölcsönhatások) létrejöttéhez.

A vendégmolekuláknál a már említett paraméterek mellett az ionizáltsági állapot is alapvetően befolyásolja a kialakuló komplex stabilitását. Egy ionizálható vegyület ténylegesen előforduló állapotait savi/bázikus disszociációs állandóján, a közeg relatív permittivitásán és a hőmérsékleten kívül a közeg pH-ja szabja meg. A gazda és vendég közötti molekuláris szintű kölcsönhatások megértéséhez nyolc, eltérő számú protonálható csoporttal rendelkező vegyületet választottunk ki, melyeknek ionizáltsági állapottól függő komplexképzését vizsgáltuk.

Doktori munkám során a CD alapú királis elválasztási problémák minél sikeresebb megoldását és az elválasztás háttérében álló molekuláris kölcsönhatások megértését tűztük ki fő célul. A tudományos szempontok és a felmerült gyakorlati igények figyelembe vételével számos enantiomerpár eddig még kapilláris elektroforézissel, illetve több esetben egyáltalán nem megvalósított enantiomer szelektív analízisét végeztük el és tanulmányoztuk. Fontos részt képvisel a vegyületek enantiomerjeinek ciklodextrin alapú királis elválasztása kapilláris elektroforézissel, az egyes módszerek optimalizálása a felbontást legnagyobb mértékben befolyásoló paraméterek függvényében, illetve egy módszer ICH irányelveknek megfelelő validálása. Végül nagy hangsúlyt fektettünk a komplexek kapilláris elektroforézistől független módszerrel (NMR spektroszkópiával) történő tanulmányozására, mellyel számos esetben komplex stabilitást, az enantiomerek elválásának detektálhatóságát, valamint a legtöbb vegyületnél a komplexek sztöchiometriájának és térszerkezetének vizsgálatát végeztük el.

3. Irodalmi háttér

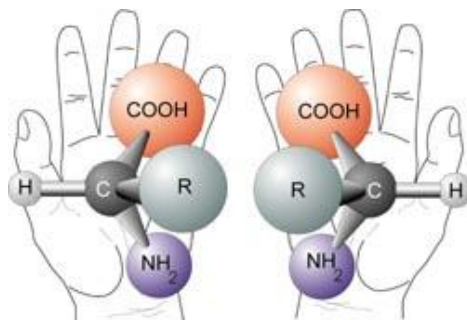
3.1 A kiralitás

3.1.1 Az optikai izoméria vagy kiralitás fogalma

Már a 19. század közepe óta ismertek olyan szerves és szervetlen vegyületek, melyek a poláros fény síkját elforgatni képesek. Ezen tulajdonságuknál fogva optikailag aktívnak nevezzük őket. 1848-ban Pasteur ismerte fel, hogy az optikailag aktív molekulák lehetséges térszerkezete úgy viszonyul egymáshoz, mint a tárgy a tükörképéhez; az optikai aktivitás tehát a molekulák atomi felépítésének szimmetriáján alapul [1, 2].

Azokat a vegyületeket, amelyek csak atomjaik térbeli elrendeződésében különböznek egymástól, sztereoizomereknek, a jelenséget pedig sztereoizomériának (térizoméria) nevezzük. A modern sztereo-kémia 1874-ben vette kezdetét, amely szerint az optikai izoméria vagy kiralitás a sztereoizoméria egyik formája [3]. A kiralitás elnevezést, mely a görög kheir szóból ered (jelentése: kéz) Lord Kelvin vezette be 1884-ben.

Az enantiomerek olyan sztereoizomerek, melyek csak az optikai forgatás irányában térnek el egymástól, egyéb fizikai-kémiai tulajdonságaik megegyeznek, térszerkezetiileg pedig tükörképi párt alkotó molekulák (konfigurációjuk egymással ellentétes) (1. ábra). Egy molekulának csak egy enantiomerje lehetséges, amelynek minden aszimmetriacentruma ellentétes kiralitású. A diasztereomerek olyan sztereoizomerek, amelyek egymásnak nem tükörképei, és nem is hozhatók fedésbe egymással (egyik aszimmetriacentrumaik megegyező, mások ellentétes kiralitásúak). Az enantiomerekkel ellentétben a diasztereomerek eltérő fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, így elválaszthatók, megkülönböztethetők. Egy n számú aszimmetriacentrummal rendelkező molekula lehetséges sztereoizomereinek száma 2^n .



1. ábra. Az enantiomerek térszerkezetének egymáshoz való viszonyulása.

Forrás: http://nai.nasa.gov/library/images/news_articles/159_1.jpg

A kiralitásnak több típusa ismert. A leggyakoribb a centrális kiralitás, azon belül is annak az az esete, amikor a kiralitáscentrum egy aszimmetrikus, vagyis olyan szénatom, melyhez négy különböző atom vagy atomcsoport kapcsolódik. Az, hogy egy molekula aszimmetriás szénatomot tartalmaz, sem nem szükséges, sem nem elégséges feltétele annak, hogy a molekula királis legyen. A királis centrum lehet egy gyűrűrendszer közepe is pl. aszimmetrikusan szubsztituált adamantán. A centrális kiralitás mellett a kiralitás-fogalom több más változatával is találkozunk: pl. axiális kiralitás (pl. diszubsztituált allének), atropizoméria (pl. poliklórozott bifenilek), planáris (pl. *transz*-cikloparaffinok) és helikális (pl. fehérjék, poliaramás szénhidrogének, DNS) kiralitás [4].

3.1.2 A konfiguráció, az enantiomerek szerkezetének meghatározása

A királis molekulák enantiomerjei akirális környezetben egymástól megkülönböztethetetlenek. Megkülönböztetésükhöz és elválasztásukhoz térben inhomogén hatás (pl. poláros fény) vagy a molekula térbeni rögzítettsége (pl. kristályrács) szükséges. Az enantiomerek más királis vegyülettel kölcsönhatásba lépve diasztereomer párokká alakulnak (pl. diasztereomer sóképzés, hárompontos receptor kölcsönhatás), amelyek homogén térben is megkülönböztethetők, eltérő fizikai tulajdonságaik (pl. forráspont, oldékonyság, kristályforma, stabilitás, elektroforetikus mozgékonyosság, stb.) révén.

A királis vegyületek térszerkezetének jellemzésére először a Fisher által 1891-ben kidolgozott relatív konfiguráció volt alkalmas. A konfiguráció jelölésére a D és L betű szolgált, amely a (+)-glicerin-aldehidre való visszavezetést tette lehetővé. A jelölés hasznosságát mutatja, hogy a cukroknál és aminosavaknál ma is ez használatos. 1956-ban Cahn, Ingold és Prelog egy új, általánosan használható jelölési rendszert javasolt (C.I.P. konvenció), amely lehetővé tette mind a kiralitáscentrummal rendelkező, mind a kiralitáscentrum nélküli vegyületek konfigurációjának leírását. A C.I.P. konvenció értelmében az aszimmetriacentrumhoz kapcsolódó szubsztituenseket bizonyos szabályok szerint rangsoroljuk. A sorrend megállapítását követően a körbejárás iránya alapján az enantiomerpár egyik tagja (*R*) (az óramutató járásával megegyező, (+)), másik tagja pedig (*S*) (az óramutató járásával ellentétesen forgató, (-)) betűjelzést kap a kiralitáscentrum konfigurációjának jelölésére [5]. A továbbiakban a dolgozatban az enantiomerekre a Cahn-Ingold-Prelog szabály szerinti (*R*) és (*S*) jelölést használom.

A relatív konfiguráció meghatározására hagyományosan klasszikus kémiai és biológiai reakciók használatosak, melyek mára kiegészültek fejlett spektroszkópiás, kromatográfiás és kapilláris elektroforetikus módszerekkel [6-9].

3.1.3 Az enantiomerek eltérő biológiai tulajdonságai

A kiralitás jelensége az egész univerzumban fellelhető és különösen fontos szerepet tölt be a bolygónkon kialakult életben. Az élő szervezetek biokémiai folyamatainak túlnyomó többségében királis molekulák, homokirális egységekből felépülő fehérjék, nukleinsavak, szénhidrátok vesznek részt. Ez a térszerkezeti homogenitás a földi élet alapja, vagyis a kiralitás alapvető fontosságú az élet számára.

A szervezet biomolekuláinak szelektivitását egyedi, gyakran királis szerkezetük biztosítja, ezáltal a szervezettel kölcsönhatásba lépő enantiomerpárok számos esetben különböző biológiai hatást fejtenek ki [10, 11]. Az enantiomerek különbözhetnek egymástól aktív transzportjukban, a vér fehérjéihez való kötődésükben, a szövetek közötti eloszlásukban, receptorkötődésükben, metabolizmusukban (annak módjában és sebességében) és kiürülésükben, továbbá előfordulhat az is, hogy az ellentétes kiralitású módosulat másik receptorhoz kötődik [10, 12]. Nem hiába jelentős az utóbbi években az a törekvés, hogy nem csak az új, originális gyógyszermolekulákat, hanem a régóta racemátként alkalmazott hatóanyagokat is enantiomertiszta formában hozzák forgalomba. Ennek megfelelően az utóbbi évtizedekben jelentősen megnövekedett az izomertiszta formában törzskönyvezett készítmények száma a gyógyszerkincsben, amit a 2. ábra szemléltet [13]. A gyógyszerek törzskönyvezése előtt a királis molekulák enantiomerjeit minden esetben el kell választani, együttesen és külön-külön is vizsgálni kell őket. A gyógyszer enantiomertiszta bevezetésétől csak abban az esetben lehet eltekinteni, ha a két optikai izomer hatása teljesen azonos [14]. A hatékony (kívánt hatású) enantiomer – az ún. *eutomer* – mellett előforduló, hatástalan vagy éppen káros hatású *disztomer* kiküszöbölésének számos oka lehet:

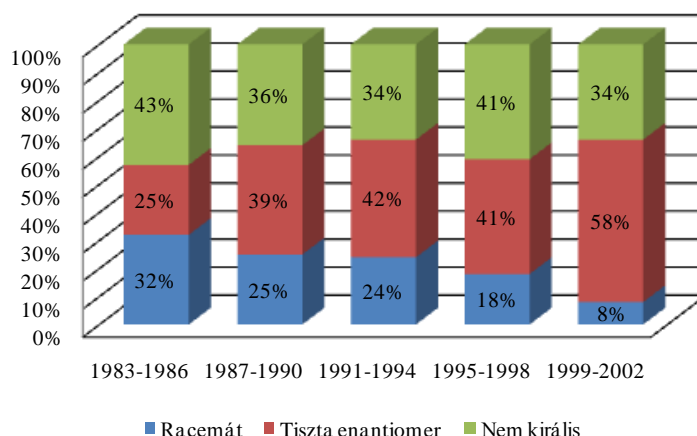
- A disztomer nem hat a célmolekulán, de ballasztként növeli a szervezet detoxifikáló rendszerei számára a terhelést. Ide tartozik az általunk vizsgált pregabalin és a vinka alkaloidok is.
- Az egyik enantiomer gyakran nem csak hatástalan, hanem toxikus is. Az 1950-es években bekövetkezett talidomid botrány (Contergan-ügy) rendítette meg a

bizalmat a hatóanyagot racém formában tartalmazó gyógyszerek iránt és ezzel forradalmi változást idézett elő a gyógyszeriparban [15]. Ebben az esetben az (*R*)-enantiomer szedatív, míg az (*S*)-enantiomer teratogén hatású. Hasonló példaként említhető a bupivakain ahol az (*R*)-enantiomer erősen kardiotoxikus vagy a ketamin, aminek (*R*)-izomere rémálmokat okoz.

- Előfordul, hogy mindkét enantiomer hasznos terápiás hatású, de más-más területen. Az (*R*)-fluoxetin antidepresszáns, míg az (*S*)-fluoxetin migrénelles hatást képes kifejteni.
- Az enantiomerek eltérő hatékonyságát okozhatja a metabolizmusuk eltérő módja vagy sebessége, melyre az omeprazol kiváló példa, ahol az (*S*)-forma jóval lassabban metabolizálódik, ami a prodrug adagolását jelentősen nehezíti. Nemcsak sebességében, hanem a metabolizáló citokróm P450 enzimek fajtájában is eltér az (*R*)- és (*S*)-warfarin metabolizmusa, melynek a gyógyszer-interakciók előrejelzésében van esszenciális szerepe [10, 12].

Az enantiomerek hatásmechanizmusát tovább bonyolítja, hogy az enantiomerek inverziót szenvedhetnek a metabolikus út folyamán.

Az enantiomerek elválasztása nem könnyű feladat és rendkívüli többletköltséget jelent. Célravezetőbb a molekulákat irányított, sztereoselektív szintézissel előállítani. Az enantiomertiszta szintézisek kiemelt jelentőségét mutatja, hogy 2001-ben a kémiai Nobel-díjat három, ezen a területen kiemelkedő eredményeket elérő kutató (Knowles, Noyori és Sharpless) kapta [16].



2. ábra. A racém, izomertiszta illetve nem királis hatóanyagok eloszlása a gyógyszerkincsben az utóbbi évtizedekben.

Forrás: Agrawal és munkatársai, Chirality (2007) [13], alapján saját szerkesztés.

3.1.4 Az enantiomerek elválasztása, arányuk meghatározása

Az enantiomerek arányának gyors és hatékony meghatározására a kromatográfia és a kapilláris elektroforézis (CE) nyújtja a legváltozatosabb lehetőségeket. A kromatográfián alapuló technikák közül a gázkromatográfia (GC), a szuperkritikus kromatográfia (SFC) és a folyadékkromatográfia (LC) a leggyakrabban alkalmazott módszerek. A királis CE a kapilláris elektroforézis egy olyan speciális alkalmazási lehetősége, ami elektromigráción és kromatográfián egyaránt alapszik [17]. Ezen kromatográfiás módszereknek számos olyan kedvező tulajdonsága van, ami miatt a királis elválasztásban a legelterjedtebben alkalmazzák őket:

- Akár 99,9 % feletti enantiomer arány is pontosan megállapítható [18, E2].
- A mátrixkomponensek zavaró hatása kiszűrhető [19].
- Rendkívül alacsony mintaigény.
- Egy analízis alatt akár több enantiomerpár aránya is meghatározható [20, 21].
- Rövid analízisidő, általában néhány perc.
- Más elven működő analitikai rendszerekkel könnyen megvalósítható összekapcsolás (GC/MS, GC/IR, HPLC/MS, CE/MS, CE/Cirkuláris dikroizmus, HPLC/NMR, CE/NMR) [22-24].

3.1.5 Enantiomer szelektív kromatográfia

Az enantiomer szelektív kromatográfia az utóbbi két évtizedben rohamos fejlődésen ment keresztül, és mára népszerű kutatási területté vált. Gyakorlati jelentőségét jól mutatja a *Chirbase* kromatográfiás adatbázis, amely megközelítően 170000 királis szeparálást referál [25]. A legtöbb elválasztás folyadékkromatográfián alapul, az utóbbi években azonban a kapilláris elektroforézis alapú módszerek száma is rohamosan gyarapodott. A ciklodextrinek királis elválasztásban betöltött kiemelkedő szerepét jól példázza, hogy a CD-t királis szelektorként alkalmazó publikációk száma több mint négyezerre tehető a tudományos irodalomban.

Az optikai izomerek kromatográfiás elválasztása történhet *direkt* és *indirekt* módon. A *közvetlen* módszernél a királis szelektor dinamikus egyensúlyi folyamatban nem-kovalens kölcsönhatással átmenetileg diasztereomert képez az enantiomerekkel. A diasztereomerek képződése ekkor az analízis ideje alatt történik. A szelektor lehet az állófázis része vagy királis mozgófázis adalék. A királis elválasztás az enantiomerek és

a szelektor közötti eltérő erősségű kölcsönhatáson alapszik. A szelektorral erősebben kölcsönható izomer több időt tölt a szelektort tartalmazó fázisban, mint a gyengébben kölcsönható, ekképpen a két sztereoizomer megoszlása különböző lesz a két fázisban, amely eltérő haladási sebességben nyilvánul meg [26].

Közvetett elválasztás esetén az optikai izomerekből királis reagenssel először diasztereomereket képezünk, majd ezeket választjuk el. Az enantiomereket a királis reagenssel ekkor rendszerint egy stabil kötés (általában kovalens kötés) köti össze [7]. A közvetett módszerben több zavaró momentum léphet fel (pl. az enantiomerek reakciókinetikai különbözősége, a reagens királis tisztasága, a mátrixban lévő királis vegyületek kompetíciója, a diasztereomerek eltérő detektálási érzékenysége, stb.), mint a közvetlen módszernél, ugyanakkor általában nagyobb enantioszelektivitás érhető el és egyes esetekben a detektálás érzékenysége is növelhető [9]. A dolgozatban kizárólag *közvetlen* módszerrel elért eredményeket ismertetek, az általunk végrehajtott valamennyi királis elválasztás a szelektort mozgófázis adalékként alkalmazva történt.

A kromatográfiában két csúcs elválasztását az elválasztási faktorról vagy felbontási értékkel (R_s) jellemezzük. Azonos nagyságrendű csúcsok esetén az alapvonal elválasztáshoz legalább $R_s=1,5$ érték szükséges. Ha a két komponens mennyisége nagyságrendileg eltér egymástól vagy jelentős a csúcsok asszimetriája, akkor ennél hatékonyabb ($R_s>2,0$) elválasztás is szükséges lehet a megfelelő kvantitatív jellemzéshez [27, 28]. Az elválasztási faktor a következőképpen függ a különböző paramétereiktől:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{k' + 1} \quad (2.1)$$

ahol N az elméleti tányérszám (az elválasztás hatékonysága); k' a fázisarány (a mozgófázis és az állófázis térfogatának aránya); α a szelektivitás.

Eredményes királis elválasztásoknál a szelektivitás értéke 1,01-100 tartományban, míg elméleti tányérszám 5.000-1.000.000 között van az enantiomerek elválasztására használt folyadékkromatográfiás oszlopoknál. A jó elválasztáshoz a fázisarányt 3-10 érték között célszerű tartani, mivel hatása az elválasztásra telítési görbét mutat. A nagy hatékonyságú elválasztások esetén akár $\alpha=1,01$ is elegendő lehet az alapvonal-elválasztáshoz [29].

A királis kromatográfiára általában GC, LC, SFC és CE alkalmas. Az egyes módszerek sajátosságait az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat. A különböző elválasztástechnikai módszerek alapvető tulajdonságai.

| Tulajdonság | Elválasztástechnikai módszer | | | |
|-------------------------------|------------------------------|-----|------|------|
| | GC | SFC | LC | CE |
| Hatékonyság | ++++ | +++ | ++ | ++++ |
| Alacsony analízis hőmérséklet | + | +++ | ++++ | ++++ |
| Állófázis változatosság | +++ | ++ | +++ | +++ |
| Mozgófázis változatosság | - | + | +++ | ++++ |
| Terhelhetőség | + | ++ | ++++ | + |
| Detektálhatóság | ++++ | +++ | +++ | ++ |
| Analízis gyorsasága | ++++ | ++ | + | ++++ |
| Módszer kidolgozottsága | ++++ | + | ++++ | ++++ |

A + jelek száma az adott kromatográfiás mód hatékonyságának mértékét mutatja az adott szempont szerint.

Bár a CE alapjaiban nem kromatográfiás módszer, de a CE-vel végzett királis elválasztások mindegyike tartalmaz kromatográfiás elemet is, hiszen az enantioszelektivitás kromatográfián, míg a komponensek vándorlása elektromigráción alapuló jelenség [17, 30].

A kromatográfiás királis elválasztások mechanizmusa. A legtöbb királis kromatográfiás elválasztás levezethető a hárompontos kölcsönhatási modellből [31]. Az elmélet szerint ahhoz, hogy a királis felismerés megtörténjen a szelektornak és az analizálandó izomerek legalább egyikének legkevesebb három ponton és egy időben kell kölcsönhatásba lépni. A három kölcsönhatási ponthoz térbeli (3 dimenzió) megfeleltetés szükséges, míg a két pontos kölcsönhatás (2 dimenzió, sík) nem tesz különbséget a molekula és tükörképi párja között. A szelektor és a minta kölcsönhatási pontjai közötti térbeli megfeleltetés az oka, hogy nem képzelhető el olyan királis fázis, amely minden enantiomerpárt el tud választani. A különböző aszimmetriacentrumok testre szabott királis fázisokat, szelektorokat igényelnek. A merev felépítésű királis fázisokon (pl. fehérjék) általában nagy szelektivitás várható, de viszonylag kevés számú komponens esetében. A flexibilis szerkezetű királis fázisok (pl. ciklodextrinek) viszonylag kis szelektivitást mutatnak, de az enantiomerek széles körében.

3.1.6 Az enantiomer arány meghatározásának felhasználási területei

Egy anyag enantiomer tisztaságát a két enantiomer arányával jellemezzük. Mivel a gyógyszerkönyvi előírások megkövetelik a legalább 0,1 százalékban jelenlevő szennyezések meghatározását - beleértve az enantiomer szennyezéseket is - az enantiomerek arányának meghatározása leginkább a gyógyszeriparban jellemző [32]. A farmakokinetikai kutatások során az enantiomer szelektív metabolizmusok felderítése ugyancsak megköveteli a vizsgált vegyület enantiomer arányának pontos meghatározását [33].

További példákat lehet említeni a környezetvédelem, a kozmetikai- és élelmiszeripar, a régészet és az űrkutatás területéről is. Környezetvédelmi vizsgálatokban az enantiomer arány alapján szennyeződések idejére és körülményeire lehet következtetni, ugyanis a racém anyagok biodegradációja általában enantiomer szelektív [19]. Gyakori jelenség, hogy az egyes enantiomerek illata eltérő. Ennek megfelelően az egyes illatszerek a komponensek enantiomerjeit ujjlenyomatszerűen egyedi arányban tartalmazhatják, így az enantiomerek arányának meghatározása az eredetiségvizsgálat kulcseszköze lehet. Az élelmiszerekben a D-aminosavak jelenléte intenzív hőkezelésre vagy bakteriális fertőzésre utal [34]. Az aminosavak D/L arányának megállapítása régészeti leletek, üledékek kormeghatározására is alkalmas, mivel az idő múlásával az aminosavak racemizálódnak [35]. Az űrkutatásban a földönkívüli élet keresése során az egyik nem földi eredetű kőzetmintában az aminosavak D/L arányának vizsgálatát mikrochip méretű kapilláris elektroforézis analitikai rendszerrel, királis szelektorként γ -CD-t használva végezték (Murchison meteorit) [36].

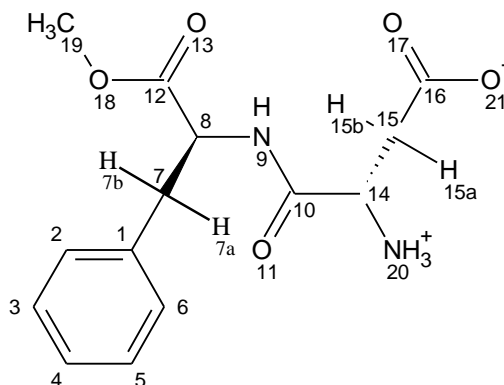
3.2 A vizsgált vegyületek

3.2.1 Aszpartám

Az aszpartám (Asm, *N*-(L- α -aszpartil)-L-fenilalanin-1-metilészter) egy L-aszparaginsavból és L-fenilalaninból álló dipeptid metilészter (3. ábra). Az élelmiszer- és gyógyszeriparban évtizedek óta széleskörűen alkalmazzák, mint mesterséges, nem-szacharid típusú édesítőszer (NutraSweet[®], AminoSweet[®], E951). pH-tól függően jelen lehet pozitív, ikerionos és negatív töltésű formában, így számos elektrosztatikus, hidrofób és H-hidas kölcsönhatás kialakítására képes. Miután az FDA 1974-ben engedélyezte segédanyagként történő alkalmazását, az aszpartám biztonságossága

számos orvosi és politikai vita tárgya volt. Végül 2007-ben tisztázódott, hogy az élelmiszerekben alkalmazott mennyiségben a vegyületnek nincs egészségkárosító hatása [37]. A vegyület protonálódási állandóit Kholeif és Anderegg ($\log K_1=7,39$ és $\log K_2=3,01$), Scriba és munkatársai ($\log K_1=7,87$ és $\log K_2=3,04$) és Maheswaran és munkatársai ($\log K_1=7,49$ és $\log K_2=3,20$) határozták meg [38-40]. Ezidáig a vegyület komplexképzési tulajdonságait (a komplexek stabilitása, a komplexképzés bomlékonyságát befolyásoló hatása) behatóan tanulmányozták savas közegben β -, HP- β - és DIMEB-CD-vel, meghatározták a kialakuló komplexek sztöchiometriáját, valamint számos publikáció foglalkozik az Asm és hasonló dipeptid CD komplexeinek térszerkezeti vizsgálatával is [39-48].

Mivel az aszpartám enantiomertiszta formájával végeztük a vizsgálatokat, itt királis elválasztásra nem, csupán a CD-komplexek stabilitásának, sztöchiometriájának és térszerkezetének vizsgálatára került sor.



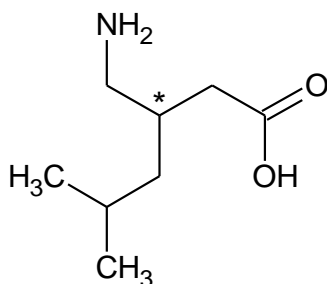
3. ábra. Az aszpartám szerkezete és munkánk során alkalmazott számozása.

3.2.2 Pregabalin

A pregabalin (Preg, (*S*)-3-aminometil-5-metilhexánsav, Lyrica[®]) a szerkezet egyik fő inhibitoros neurotranszmitterének, a gamma-amino-vajsavnak alkilezett izomertiszta analógja (4. ábra). Széleskörűen alkalmazzák diabetikus perifériás neuropátiás fájdalmak [49], posztherpetikus neuralgia kezelésében [50], parciális epilepsziás rohamokban és fibromialgiában szenvedőknél [51], illetve az EU-ban generalizált szorongásos megbetegedésekben [52]. A pregabalin hatását a központi idegrendszer feszültségfüggő Ca^{2+} csatornáinak gátlása révén fejt ki, aminek eredményeképpen az excitációs neurotranszmitterek felszabadulását mérsékli. Az (*R*)-enantiomer aktivitása

kb. egy nagyságrenddel alulmúlja az eutomerét, így optikai szennyezőként tartják számon, mely a királis elválasztást nélkülözhetetlenné teszi [53-54]. A pregabalin két, sav-bázis szempontból jelentős csoportot, egy primer amino és egy karboxil funkciót tartalmaz, valamint egy kiralitáscentrummal rendelkezik.

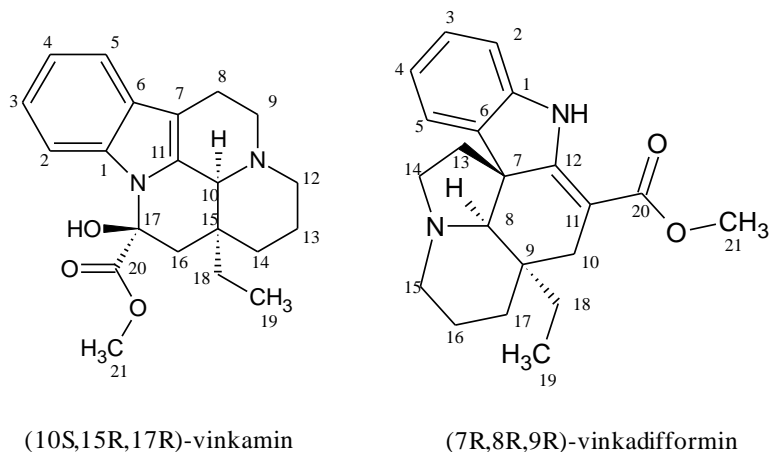
A hatóanyagot humán plazmából LC-MS-MS módszerrel határozták meg [55]. Mivel gyenge az UV elnyelése, így költségghatékony analíziséhez UV- vagy fluoreszcens aktív származék előállításra van szükség. Szérumból történő meghatározásához (HPLC) pikril-szulfonsavval, illetve *o*-ftálaldehiddel képzett származékait alkalmazták [56, 57]. A pregabalin enantiomerek elválasztására az irodalomban egy direkt és két indirekt LC módszer szerepel: egy makrociklusos glikopeptid állófázist alkalmazó LC módszer tömegspektrometriás detektálással, illetve két, fordított fázisú HPLC (hagyományos C18 oszlop) módszer, melyeket a racém vegyület *N*-5-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-*L*-alanin (Marfey reagens) származékának szintézise előzi meg [58-60].



4. ábra. A pregabalin szerkezeti képlete.

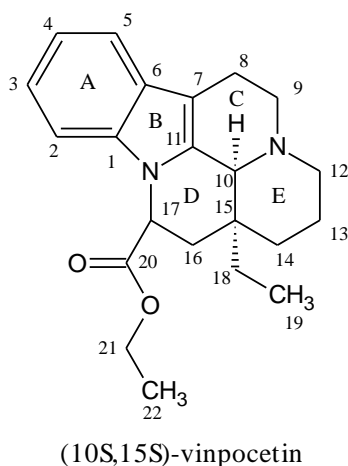
3.2.3 Vinka alkaloidok

Az Apocynaceae családba tartozó *Vinca minor* hazánkban is gyakori, lila virágú növény. A gyógynövény drogja a szárított, leveles hajtás (*Vincae minoris herba*) több mint 30 alkaloidot tartalmaz. Gyógyászatilag ezek közül a vinkamin és a vinkadiformin (5. ábra) valamint az izovinkamin és a vincin jelentősek. Ezen alkaloidok az eburnánváz vegyületek körébe tartoznak, melyek közös építőeleme az indolokinolizin gyűrűrendszer.



5. ábra. A vinkamin és a vinkadiformin szerkezeti képlete a dolgozatban alkalmazott számozással.

A vinkamin szerkezetét 1961-ben tisztázták, értágító hatása miatt hamar az érdeklődés középpontjába került [61]. A molekulából szintetikus úton egy új vinkaminszármazékot, a vinpocetint állították elő (6. ábra). A vinpocetin szelektívebb a vinkaminnál, az agyi vérellátást több mint kétszer hatékonyabban növeli, és a későbbi Cavinton[®] készítmény hatóanyaga lett. Az eredeti fejlesztésű gyógyszer a magyar originális gyógyszerkutatás egyik legsikeresebb terméke lett 1978-as bevezetése óta [62].



6. ábra. A vinpocetin szerkezete a dolgozatban alkalmazott számozással.

A vinkamin és a vinpocetin pentaciklusos eburnánvázat tartalmazó alkaloidok, ahol a D/E gyűrűanelláció *cisz*, azaz 10*S*, 15*S* konfigurációjú. A vinpocetin két kiralitáscentrummal (C-10 és C-15) rendelkezik, így összesen 4 sztereoizomerje létezik két enantiomerpárt alkotva. A vinkamin esetén a C-17 szénatom is kiralitáscentrum, így

a három kiralitáscentrumot tartalmazó molekulának 2^3 , azaz összesen 8 sztereoizomerje létezik, melyek közül csak az egyik hatásos. A cerebrovaszkuláris hatás hordozója a *cisz*-15 α -etil(10*S*, 15*S*)-eburnamin váz, míg a *transz*- β perifériás értágító hatású [63]. A vinkadiformin a vinkaminhoz hasonlóan 3 kiralitáscentrumot tartalmaz (8 sztereoizomerje létezik), de ezek elhelyezkedése eltérő (C-7, C-8 és C-9). Mindhárom vegyület tartalmaz egy bázikus tercier aminocsoportot. Irodalmi adatok szerint a vinpocetin protonálódási állandójának logaritmus 7,31 [64].

A vinkamin és a vinpocetin a cerebrovaszkuláris rendszerre hatnak, az agyi erek tágítása révén fokozva az agyi véráramlást [65, 66]. Hatásosnak bizonyultak iszkémiás stroke (szélütés) esetén is [67]. Antivazokonstriktor és antianoxiás hatásuk is jelentős, csökkentik a vér viszkozitását, serkentik az agyi metabolizmust, fokozzák a neuronok glükóz- és O₂-felvételét és felhasználását [68], ezen hatásaik révén serkentik az agy kognitív folyamatait [69]. A vazodilatáció az érfal simaizmainak kontrakciós rendszerén keresztül hat. A vinpocetin csökkenti a Ca²⁺ csatornák vezetőképességét, gátolja a sejtmembrán feszültségfüggő Na⁺ csatornáit [70, 71], továbbá a Ca²⁺-kalmodulin függő foszfodiészteráz enzimet [72, 73]. Ezen hatásokon keresztül növeli az agy ciklikus adenzin-monofoszfát és ciklikus guanozin-monofoszfát szintjét és fokozza a helyi véráramlást. A neuroprotektív hatás védi az idegsejtet az apoptózis beindulásától. A vinpocetin a feszültségfüggő Na⁺ és Ca²⁺ csatornákon átfolyó ionáramokat csökkenti és ezáltal elősegíti a neuron túlélését, védő hatást fejt ki az idegsejtek oxigénhiány következtében fellépő károsodása esetén [74]. A kognitív folyamatokat javító hatás valószínű oka az, hogy a vinpocetin fokozza a hippocampális neuronokban előidézett ún. „hosszútávú potenciáció”-t, azaz a szinaptikus hatékonyság (plaszticitás) tartós megnövekedését, ami az emléknym képződésének első, celluláris szinten megfigyelhető lépése [75].

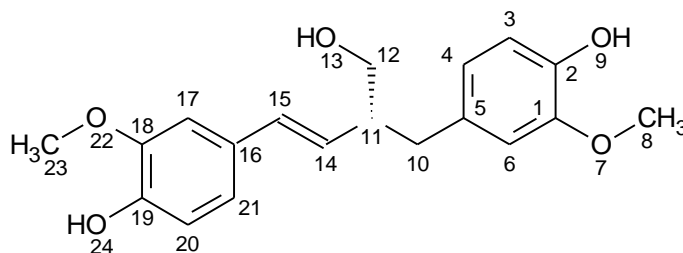
A vinka alkaloidok egymás melletti elválasztására, biológiai mintákból történő kimutatására és enantiomerjeik, ill. diasztereomerjeik elválasztására több kapilláris elektroforézis és HPLC módszert dolgoztak ki [76-81]. A közelmúltban jelent meg egy tanulmány a vinka alkaloidok nemvizes közegű [82], illetve vizes közegű elválasztásáról [83].

Az irodalomban korábban a vinpocetin - β -CD, γ -CD, HP- β -CD és SB- β -CD komplexeinek stabilitásának, valamint vinpocetin - β -CD, RAMEB-CD, SB- β -CD és

vinkadifformin – HP- γ -CD komplexek sztöchiometriájának vizsgálatát publikálták, mely minden esetben 1:1-nek adódott. A vinpocetin - SB- β -CD komplex térszerkezetének felderítését ^1H és 2D ROESY NMR vizsgálatokkal végezték, melyekből arra következtettek, hogy az alkaloid aromás gyűrűje a szekunder nyílás irányából illeszkedik a CD üregébe, és a ciklodextrin oldallánca is részt vesz a komplexképzésben [84-86].

3.2.4 Imperanén

A lignánok a növényi fenolok egy fontos csoportját képviselő vegyületek. Az izomertiszta (*S*)-imperanén (Ipn, (E)-4,4'-(3-(hidroximetil)but-1-én-1,4-diil)bisz(2-metoxifenol)) a lignánok ritka, C₆-C₄-C₆ szerkezetű osztályába tartozó vegyület (7. ábra), melyet az *Imperata cylindrica* (L.) rizómájából sikerült extrahálni [87]. A vegyület egy kiralitáscentrummal rendelkezik és két, sav-bázis szempontból jelentős fenolos hidroxilcsoportot tartalmaz.



7. ábra. Az (*S*)-imperanén szerkezeti képlete a dolgozatban alkalmazott számozással.

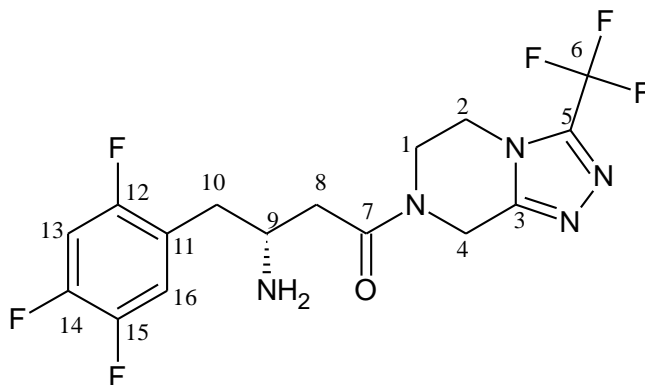
A vegyület vérlemezke aggregációt gátló hatással rendelkezik, és a humán tirozináz enzim kompetitív inhibitora [87, 88]. Az (*R*)-enantiomer biológiai aktivitását ezidáig nem igazolták. A vérlemezke aggregációt gátló hatás ígéretes hatóanyag jelöltté teszi a vegyületet agyvérzés vagy szívroham terápiájában [89]. A humán tirozináz enzim a tirozin L-DOPA-vá, majd DOPAkinonná történő átalakítását végzi, mely folyamat a bőrszín kialakításában, így helyi hiperpigmentációkban (melasma, lentigo) játszik fontos szerepet. Ennek megfelelően a tirozináz inhibitorokat (arbutin, katekinok, rezveratrol, hidrokinon) hiperpigmentáció kezelésében és kozmetikumokban alkalmazzák [90-93]. Ezen a területen az imperanén szintén ígéretes hatóanyag jelölt lehet.

Az imperanént racém és enantiomer tiszta formában számos módon előállították [94-99]. Az enantiomer tisztaságot ezen tanulmányokban HPLC-vel, Chiralcel OD-H,

Chiralpak AD-RH vagy (R,R)-Whelk-O 1 királis analitikai oszlopokon, 254 nm-en történő UV detektálás mellett ellenőrizték [95-97, 99]. A vegyület ciklodextrin komplexképzésének vizsgálatát és enantiomerjeinek elektromigráción alapuló elválasztását az eddigiekben nem publikálták.

3.2.5 Szitagliptin

A szitagliptin (Sgli, (R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)bután-2-amin, Javunia[®], korábban MK-0431), (8. ábra) a dipeptidil-peptidáz-4 (DPP-IV) enzim rendkívül hatásos és igen szelektív inhibitora, melyet a 2-es típusú diabétesz kezelésére fejlesztettek ki a közelmúltban [100]. A DPP-IV felelős a glukagon-szerű peptid és a glukóz-dependens inzulinotróp peptid lebontásáért a szervezetben [101, 102]. Az enzim gátlásán keresztül a Sgli növeli a glukóz-dependens inzulin szekréciót, csökkenti a rendellenes glukagon szekréciót, lassítja a gyomorürülést, növeli a β -sejt számot és csökkenti az étvágyat [101-104]. A mellékhatásprofilja nagyon kedvező: a testsúlyra nincs hatása, a hipoglikémia és az emésztőrendszeri mellékhatások előfordulása is alacsonyabb a hasonló indikációjú hatóanyagokénál [105-107]. Önmagában, vagy más antidiabetikumokkal (metformin, pioglitazon) kombinációban is alkalmazzák [108, 109].



8. ábra. A szitagliptin szerkezete és a dolgozatban alkalmazott számozása.

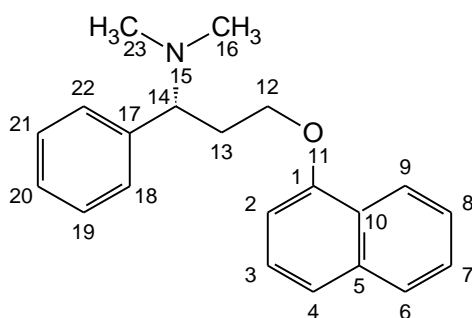
A vegyület egy kiralitáscentrumot tartalmaz, valamint egy protonálható primer amino funkciót. Humán plazmában protein precipitációt [110], valamint folyadék-folyadék extrakciót [111] követően LC-MS-MS módszerrel határozták meg.

A hatóanyag és prekurzorainak előállítására számos szintetikus módszert publikáltak [100, 112-116]. Ezen módszerek többsége magában hordozza a lehetőséget, hogy a nem

kívánatos (*S*)-enantiomer szennyezi az izomertiszta terméket. A Sgli enantiomerjeinek elválasztását, illetve CD komplexképzésének vizsgálatát ezidáig nem publikálták.

3.2.6 Dapoxetin

A dapoxetin (Dpx, (*S*)-*N,N*-dimetil-(3)-[1-naftaleniloxi]-1-fenilpropil-amin hidroklorid, Priligy[®]) egy új, hatékony szelektív szerotonin visszavétel gátló (SSRI), mely egyedi fizikai-kémiai és farmakokinetikai sajátosságokkal rendelkezik, így alkalmas a korai magömlés terápiájára (9. ábra). A hagyományos SSRI hatóanyagok (citaloprám, fluoxetin, fluvoxamin, paroxetin, szertralin) a depresszió, szorongásos megbetegedések, és egyes személyiség zavarok kezelésében alkalmazott szerek. Az átlagos SSRI-ekel szemben - melyek a csúcs plazmakoncentrációt kb. 4-12 óra alatt érik el, és féléletidejük hosszú (12-48 óra) - a Dpx egy gyorsan ható vegyület, mely a csúcs plazmakoncentrációját kb. 1,5 órán belül éri el és 24 óra elteltével koncentrációja ennek kb. 5%-ára csökken le [117]. Ezek az egyedi farmakokinetikai tulajdonságok teszik lehetővé, hogy a hatóanyag szükséglethez igazíthatóan legyen adagolható.



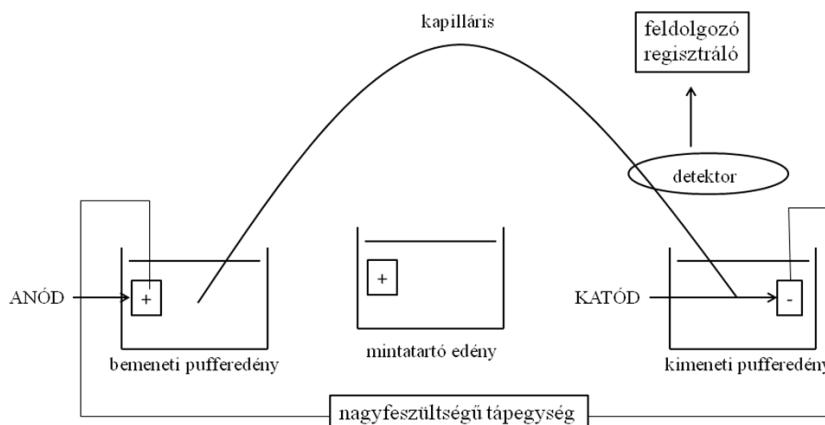
9. ábra. A dapoxetin szerkezete és a dolgozatban alkalmazott számozása.

A dapoxetin egy kiralitáscentrummal és egy, protonálódásra alkalmas terciér amino funkcióval rendelkezik. Mind a racém, mind az enantiomer tiszta Dpx előállítására számos irodalmi módszer létezik, melyeknél az enantiomerek arányát királis HPLC módszerekkel határozták meg [118-125]. A vegyület ciklodextrin komplexképzését, illetve az enantiomerek kapilláris elektroforézissel megvalósítható elválasztását ezidáig nem publikálták.

3.3 Kapilláris elektroforézis

Az elektroforézis (elektromigráció) a klasszikus folyadékkromatográfia mellett az egyik leggyakrabban alkalmazott elválasztástechnikai módszer, melynek során a töltéssel rendelkező részecskék egyenáramú elektromos térben a töltésükkel ellentétes polaritás irányába vándorolnak. A részecskék vándorlási sebessége alapvetően (egyéb tényezők mellett) fajlagos töltésüktől, vagyis a töltés/méret aránytól függ. A kapilláris elektroforézis módszerrel lehetővé válik a molekulák elektromigrációs sebességkülönbségén alapuló elválasztása és félkvantitatív meghatározása.

Miután 1981-ben Jorgenson és Lukacs elkészítette az első kapilláris elektroforézis készüléket [126-128], megindult a modern, könnyen kezelhető és többféle üzemmódban (izoelektromos fókuszálás, izotachoforézis, micelláris elektrokinetikus kromatográfia, stb.) is alkalmazható készülékek fejlesztése. A modern kapilláris elektroforézis készülékek általános, sematikus felépítését a 10. ábra szemlélteti. A műszerben található kapilláris egy 20-100 cm hosszú, 25-100 μm belső átmérőjű, kívülről poliimiddel bevont rugalmas „csatorna”. A mérések során a kapillárisban nagy feszültséget (10-30 kV) és ennek megfelelően nagy térerőt (100-1000 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$) alakítunk ki.



10. ábra. A kapilláris elektroforézis készülék sematikus felépítése.

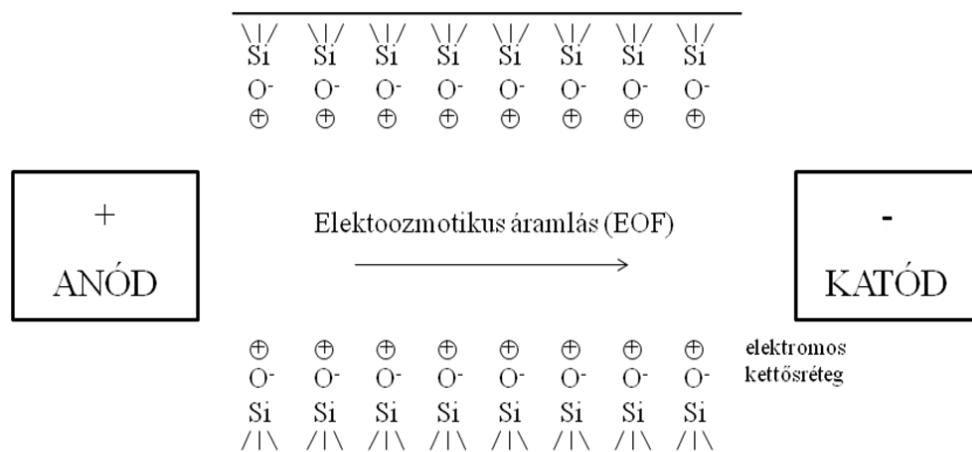
3.3.1 A kapilláris elektroforézis alapjai

A kapilláris elektroforézis napjainkban az elválasztástechnika egyik legdinamikusabban fejlődő ága, mely az 1990-es években vált általánosan elérhetővé [18]. A CE egyedülálló előnyökkel rendelkezik az ionizálható anyagok analízisében [129-130], de képes semleges anyagok elválasztására is [131].

Az elektroforézis technika lényege, hogy az ionizált részecskék az elektromos térerő hatására az ellentétes polaritású elektród felé áramlanak, az elválasztás a részecskék eltérő elektroforetikus mozgékonyaságán (mobilitás, μ) alapul [132]. Az elektroforetikus mozgékonyaság közvetlenül vagy közvetve függ olyan tényezőktől, mint a részecske töltése, disszociációjának mértéke, sugara, alakja, szolvatáltságának mértéke, a közeg viszkozitása, dielektromos állandója, pH-ja és a kapilláris hőmérséklete.

Egy további meghatározó jelenség, amely lényegesen befolyásolhatja a részecskék elektroforetikus mozgékonyaságát az elektrooszmózis. Az elektrooszmózis minden elektroforetikus módszernél fellépő alapvető jelenség, mely az elektromos tér hatására a folyadéknak egy töltéssel rendelkező felület mentén kialakuló áramlásaként definiálható. Ezt a folyadékáramlást nevezzük elektrooszmotikus áramlásnak (electroosmotic flow, EOF).

Kapilláris elektroforézisben általában előkezeletlen kvarc kapillárist alkalmaznak, melynek belső felületén - ha vizes oldattal érintkezik – szilanolcsoportok alakulnak ki nagy felületi sűrűséggel. Ezen szilanolcsoportokról a kapillárisban lévő folyadék pH-jától függően hidrogénionok disszociálhatnak le, valamint a háttélektrolit negatív töltésű ionjai is adszorbeálódhatnak a kapilláris belső falára. Az így kialakuló negatív töltésű csoportokat a háttélektrolit hidratált kationjai veszik körül, elektromos kettősréteget kialakítva (11. ábra).



11. ábra. Az elektromos kettős réteg a kapilláris belső felületén és az elektrooszmotikus áramlás.

A szilanol csoportok az elektrolit pH-jától függően töltéssel rendelkezhetnek:

ha a $\text{pH} < 2,5$, többségben pozitív töltésűek (SiOH_2^+),

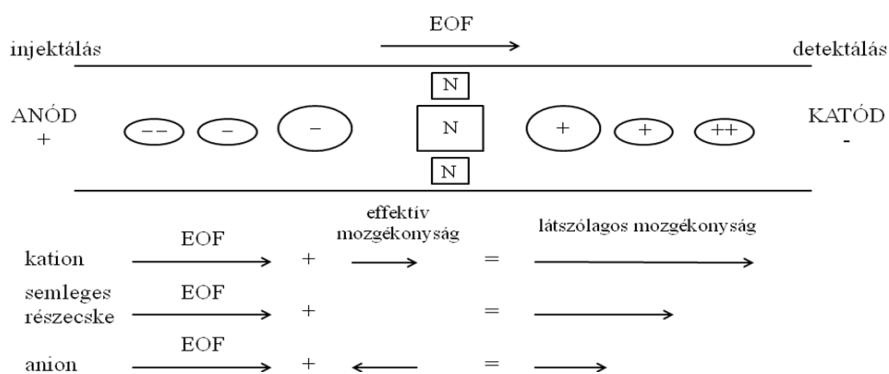
ha a $\text{pH} \sim 2,5$, semleges töltésűek (SiOH),

ha a $\text{pH} > 2,5$, többségben negatív töltésűek (SiO^-).

A fentiekből következően $\text{pH} = 2,5$ felett a szilanolcsoportok egyre inkább pozitív töltésű hidratált kationokat vonzanak a kapilláris falához az oldatból. A kapilláris falánál lévő kationok az elektromos tér hatására elmozdulnak a negatív elektród, a katód irányába, megindítva a kapillárisban lévő teljes folyadéktömeg egyidejű áramlását, az elektroosmotikus áramlást. Ez az áramlás az anionokat és semleges részecskéket is magával viszi, annak ellenére, hogy azok saját elektroforetikus mobilitásuk alapján az anód felé vándorolnának, illetve helyben maradnának. Az így keletkezett EOF mozgékonyasága (μ_{EOF}) hozzáadódik az i részecske saját effektív mozgékonyaságához (μ_i^{eff}) létrehozva a kísérletileg meghatározható látszólagos mozgékonyaságot (μ_i^{app}).

$$\mu_i^{\text{app}} = \mu_i^{\text{eff}} + \mu_{\text{EOF}} \quad (2.2)$$

Ezeknek megfelelően a detektorablak előtt először a leggyorsabban haladó kationok, majd az EOF-fel együtt haladó semleges molekulák, végül az anionok haladnak el (12. ábra). Az egyes kationok és anionok sebessége közötti különbséget a fajlagos, vagyis az egységnyi méretre vonatkoztatott töltésük határozza meg: a nagyobb fajlagos töltésű kationok gyorsabban, míg a nagyobb fajlagos töltésű anionok lassabban migrálnak.



12. ábra. Az elektroosmotikus áramlás hatása a kationok, anionok és semleges részecskék migrációs sebességére, a kialakult látszólagos mozgékonyaságuk és sorrendjük az elektroferogrammon.

Az elektroosmotikus mobilitás függ az alkalmazott térerősségtől, a háttélelektrolit pH-jától és ionerősségétől (koncentrációjától, alkotóelemeitől). A μ_{EOF} annál nagyobb,

minél magasabb a háttélelektrolit pH-ja, hiszen magasabb pH-n (pH=2,5 felett) egyre több hidrogénion disszociál le a szilanolcsoportokról. pH=8 felett a pH növelése már nincs befolyással az EOF mozgékonyosságának nagyságára, ilyen közegben gyakorlatilag az összes szilanolcsoport deprotonált állapotban van.

Ha az EOF mozgékonyossága abszolút értékben nagyobb az anionok effektív mozgékonyosságánál, akkor lehetőség nyílik nemcsak a kationok és a semleges molekulák, hanem az anionok detektálására is. Szükség esetén az EOF iránya pozitív töltésű detergenssel átfordítható az anód irányába, vagy az oszlopot akrilamiddal borítva az EOF meg is szüntethető [133]. Kísérletileg az EOF mozgékonyossága a következőképpen határozható meg:

$$\mu_{EOF} = \frac{v_{EOF}}{E} = \frac{l_{eff} \cdot l_t}{t_{EOF} \cdot U} \quad (2.3)$$

ahol l_{eff} a kapilláris hossza a detektorig [cm]; l_t a kapilláris teljes hossza [cm]; t_{EOF} az EOF marker migrációs ideje [s]; U az alkalmazott feszültség [V].

(2.2) és (2.3) alapján az i részecske effektív elektroforetikus mozgékonyosságát a következő egyenlet fejezi ki:

$$\mu_i^{eff} = \frac{l_{eff} \cdot l_t}{U} \cdot \left(\frac{1}{t_i} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (2.4)$$

ahol t_i az i részecske migrációs ideje [s].

A CE-ben az EOF áramlási profilja „dugószerű” vagy U-alakú, mert a kapilláris belsejében az áramlás hajtóereje szinte mindenütt azonos, így az áramlás egyenletesnek tekinthető, szemben a nyomás által generált lamináris (parabolikus) áramlási profilt mutató analitikai rendszerekkel (pl. HPLC). Az U-alakú áramlási profil esetén a csúcsok nem szélesednek, ezért nagy a hatékonyság: akár milliós nagyságrendű elméleti tányérszám elérése is lehetővé válik.

A kapillárisban a részecskék súrlódása során jelentős mennyiségű hő (Joule hő) képződik, amely az aránylag kis tömegű pufferhez képest nagy felületen adódik le. Ez a nagymérvű hőleadás teszi lehetővé, hogy a CE nagy migrációs sebességet biztosító - akár 1000 V/cm nagyságú - térerőn dolgozzon a hagyományos elektroforézis nagyságrenddel kisebb térereje helyett.

A kapilláris elektroforézis az egyéb elválasztástechnikai módszerekkel szemben számos előnnyel rendelkezik: kísérleti paraméterei széles körben változtathatók (pH,

ionerősség, alkalmazott segédanyagok mennyisége, hőmérséklet, alkalmazott feszültség), hidrodinamikus és elektrokinetikus injektálás egyaránt megvalósítható, vizes és nemvizes pufferek is alkalmazhatók valamint számos detektálási lehetőség (UV, lézer-indukált fluoreszcens detektálás, MS kapcsolás) adódik. A módszerek magas szinten automatizálhatók, mintaigényük rendkívül alacsony (1-50 nl), hatékonyságuk kiemelkedő ($N \sim 10^5$ - 10^6), a molekulák széles körét képesek elválasztani (az egyszerű ionoktól a több millió Da tömegű biomolekuláig). A CE egyik nagy előnye, hogy nincs szükség munkaigényes mintaelőkészítésre. Akár vérplazma vagy vizelet minták is tisztítás nélkül analizálhatók, a kvarc kapilláris pedig minden egyes analízis után regenerálható. A regenerálás mólos koncentrációjú savas vagy lúgos mosással történik, ami a kapillárisban nem okoz károsodást.

Néhány nem kívánt hatás azonban leronthatja az elméletileg elérhető rendkívül nagy hatékonyságot. Ha a mintának és a háttér elektrolitnak jelentősen eltér a vezetőképessége, akkor az elektrodiszperzió torzult, széles csúcsokat eredményez, az oldatok kiegyensúlyozatlan vezetőképessége ugyanis diffúz vándorló zónát hoz létre a határfelületen [134]. A jelenséget ki lehet küszöbölni a puffer és a minta vezetőképességének összhangba hozásával [135]. A minta adszorpciója az oszlop falán szintén nem kívánt csúcshévedést vagy a csúcs szimmetriájának torzulását okozhatja. Az adszorpció csökkentését és megszüntetését jól megválasztott pufferrel vagy az oszlop falának dezaktiválásával lehet elérni.

3.3.2 A királis kapilláris elektroforézis alapjai

Kezdetben a királis anyagok elválasztását elsősorban HPLC és GC módszerekkel végezték. Ezek az analitikai módszerek azonban bonyolultak, optimalizálásuk nehézkes, a királis állófázisok meglehetősen drágák. Ezzel szemben a királis anyagok CE-vel történő direkt elválasztásánál csupán királis szelektort kell a pufferhez adagolni, mely sokkal egyszerűbb, hatékonyabb és legtöbbször olcsóbb módszer. Ezeknek az előnyöknek köszönhetően a kapilláris elektroforézis a királis elválasztás legdinamikusabban fejlődő ágává vált. Ezt mi sem bizonyítja jobban, mint hogy a kapilláris elektroforézisen alapuló királis elválasztást publikáló cikkek száma mára meghaladja a négyezret.

Kromatográfias technikákkal szemben a CE-ben a királis felismerés molekuláris szinten és nem a fázisok makroszkópikus szintjén történik. A királis kapilláris elektroforézisben az enantiomer elválasztás csak kis mértékben alapul elektroforetikus elválasztó elven. Az elektroforetikus elválasztási elv feltételezné, hogy az elválasztandó enantiomer komponensek (szelektandók) eltérő töltéssűrűségük következtében különböző sebességgel vándoroljanak. Azonban a királis vegyületek enantiomerjeinek a töltéssűrűsége megegyezik, így azok elektroforetikusan nem lennének elválaszthatóak és az EOF sem enantioszelektív transzport. Az enantiomerek sztereoszelektív felismerése csak egy királis szelektorra való sztereoszelektív kölcsönhatásuk következtében történhet meg, amely viszont kromatográfias elválasztó elv [17].

A CE-ben az oldott királis szelektort pszeudo-állófázisnak is nevezik, mivel az enantiomerek vándorlási sebessége különböző szabadon és ideiglenesen képződött asszociátumként. Tehát a technikának a molekuláris szinten történő enantioszelektív felismerést az enantiomerek tényleges mozgékonyaság különbségévé kell alakítania ahhoz, hogy alkalmas legyen királis elválasztásra. Ennek figyelembe vételével a saját mozgékonyasággal (az adott körülmények között) nem rendelkező szelektort „kvázi-állófázisnak”, a saját mozgékonyasággal rendelkezőt pedig „mozgóágyas állófázisnak” nevezhetjük [17, 30].

A királis CE gyakorlatában a puffer vagy elektrolit a királis szelektort oldott formában tartalmazza. Az enantiomerek mozgékonyaság különbsége ($\Delta\mu$) az alábbi egyenlettel számítható ki [136]:

$$\Delta\mu = \mu_R - \mu_S = \frac{\mu_{\text{szabad}} + \mu_{\text{kplx,R}} K_R C}{1 + K_R C} - \frac{\mu_{\text{szabad}} + \mu_{\text{kplx,S}} K_S C}{1 + K_S C} \quad (2.5)$$

ahol μ_R és μ_S az egyes enantiomerek effektív mozgékonyaságai; K_R és K_S a szelektor-enantiomer komplexek átlagos stabilitási állandói [M^{-1}]; μ_{szabad} és μ_{kplx} a szabad és a szelektorhoz kötött enantiomerek effektív mozgékonyaságai; C a pufferben oldott királis szelektor koncentrációja [M].

A (2.5) egyenletből látható a királis CE két fő előnye a hagyományos kromatográfias elválasztásokkal szemben:

- Megvalósítható, hogy a szelektivitás meghaladja (elvben a végtelenbe tartva) a királis felismerés által nyújtott termodinamikai szelektivitást [137].

- Elérhető az enantiomerek migrációs sorrendjének megváltoztatása a szelektor és a szelektandok közötti affinitás megfordítása nélkül is. Ez elérhetetlen állófázishoz kötött királis szelektort alkalmazó kromatográfiai technikáknál.

Mivel méretük és töltéssűrűségük is azonos, a szabad enantiomerek mozgékonyága megegyezik ($\mu_R = \mu_S = \mu_{szabad}$). Ahhoz, hogy a (2.5) egyenlet egyszerűsíthető legyen, két szelektivitási fogalom, a komplexálási szelektivitás ($b = K_R/K_S$) és a méret szerinti szelektivitás ($s = \mu_{kplx,R}/\mu_{kplx,S}$) vezethető be [138]. Ha a méret szerinti szelektivitás elhanyagolhatóan kicsi ($0,999 \leq s \leq 1,001$) vagy ha a komplexálási szelektivitás legalább két nagyságrenddel nagyobb a méret szerinti szelektivitásnál ($(b-1)/(s-1) \geq 100$), akkor a diasztereomer komplexek mozgékonyágát megegyezőnek feltételezve ($\mu_{C,R} = \mu_{C,S} = \mu_C$) a (2.5) egyenletből egy, a következtetések levonására alkalmasabb egyenletet kapunk [136]:

$$\Delta\mu = \frac{C(\mu_{szabad} - \mu_{kplx})(K_R - K_S)}{1 + C(K_R + K_S) + C^2 K_R K_S} \quad (2.6)$$

A (2.6) egyenletből világossá válik, hogy enantiomer elválasztás eléréséhez nem elegendő, ha a két enantiomer komplexképzési állandója eltérő ($K_R \neq K_S$). Az enantiomer elválasztáshoz az is szükséges, hogy az enantiomerek szabad formájának és komplexének mozgékonyága is különbözzön ($\mu_{szabad} \neq \mu_{kplx}$). Amennyiben ez a két feltétel teljesül, úgy az enantiomerek komplexált formáinak mozgékonyága eltérőnek adódik az elválasztás során ($\mu_{kplx,R} \neq \mu_{kplx,S}$). Abban az esetben, ha az enantiomerek mind szabad, mind komplexált formában semlegesek, vándorlási sebességük megegyezik az EOF sebességével, vagyis nem tapasztalható elválasztás függetlenül a két enantiomer komplex stabilitási állandója közötti különbségtől. Ez a magyarázata annak, hogy pusztán semleges szelektorokkal semleges enantiomerek nem választhatók el CE-ben.

A (2.6) egyenlet alapján értelmezhető az is hogy a szabad és komplexált formák közötti minél nagyobb mozgékonyág különbség az enantiomerek egyre jobb elválasztását eredményezi. Ennek a mozgékonyág különbségnek a fő befolyásoló tényezője a gazda- és vendégmolekula között kialakuló kölcsönhatás erőssége. Amennyiben ellentétes töltésű a szelektor és az elválasztandó anyag, ionos kölcsönhatás is erősítheti az interakciót. Ilyen esetben újabb előnye a módszernek, hogy a komplexképzőt kisebb koncentrációban is elegendő lehet alkalmazni [139, 140].

A (2.6) egyenletből az is következik, hogy a két enantiomer mozgékonyságának különbsége maximumot mutat a szelektor koncentrációjának és az átlagos komplex stabilitási állandó nagyságrendjének függvényében [136].

A királis elválasztás felbontására az elektroforézis során számos tényező lehet befolyással. Alapvetően meghatározó az alkalmazott királis szelektor minősége és koncentrációja a háttér elektrolitban. Fontos szerepet játszik emellett a pufferképző minősége és koncentrációja, a háttérelktrolit pH-ja, a szerves módosítók mennyisége és minősége, az elektroforézis során alkalmazott feszültség, a kapilláris belső hőmérséklete valamint az esetleges egyéb adalékanyagok minősége és mennyisége is.

A sztereoizomerek (enantiomerek) elválasztásához nélkülözhetetlenek a sztereokémiaailag aktív segédanyagok: a királis szelektorok. Minthogy univerzális királis szelektor nem létezik, rendkívül sokféle vegyületet próbáltak már ki CE-ben. UV fényáteresztő képességük és relatív alacsony árak miatt a ciklodextrinek a leggyakrabban használt szelektorok. Származékaik széles választéka biztosítja az egyszerű módszerfejlesztést, segítségükkel CE-ben töltéssel rendelkező és semleges enantiomerek is sikeresen elválaszthatók. A CD alapú királis CE témakörében már több mint háromezer publikáció látott napvilágot. A CD-ken kívül egyéb szelektorokat is ismerünk, melyeket az alábbiak szerint csoportosíthatunk:

- makrociklusos antibiotikumok (pl. vankomicin, teikoplanin, risztocetin)
- peptidek, polipeptidek, fehérjék (pl. humán szérum albumin)
- nem ciklusos oligo- és poliszacharidok (pl. maltóz, dextrans, amilóz, heparin)
- koronaéterek (pl. 18-korona-6-éter)
- micellaképző királis felületaktív anyagok (pl. Cu(II)-*N,N*-didecil-alaninát)
- királis fém-komplexek (pl. Cu(II)-aszpartám komplexek)

Az enantiomerek migrációs sorrendjének megfordulása a királis szelektor kémiai vagy szerkezeti módosulása által előidézhető legdrámaibb változás. A szelektor akár legkisebb szerkezeti vagy kémiai módosítása is nagy hatással lehet a királis felismerésre és a migrációs sorrendet megfordíthatja. Ciklodextrinek esetében például a szelektand-CD kölcsönhatás széleskörű vizsgálatakor fény derült arra, hogy az affinitás a CD-n lévő szubsztituens típusától, helyzetétől illetve az üregmérettől függ, valamint a szubsztitúciós fok is befolyásolhatja [141, 142]. Valamennyi típusú migrációs sorrend változás az irodalomban jól ismert. Üregméretfüggő megforduláskor a szelektor-

szelektand kölcsönhatások azonosak, a nemkovalensen kölcsönható csoportok közötti távolság változhat CD-ről CD-re [142-145]. A gyűrű szubsztituálása hatással van az üregméretre és a komponensek között kialakuló intermolekuláris kölcsönhatások természetére, mely hatás szintén az enantiomer sorrend megváltozásához vezethet [142, 146-151]. Tanaka vizsgálatai szerint nemcsak a szubsztituens természete, hanem annak elhelyezkedése is hatással lehet az enantiomer sorrendre [152, 153]. Ezt a jelenséget Chankvetadze is alátámasztotta acetil és szulfát szubsztituensek esetén [154, 155]. Az enantiomer sorrend megváltoztatásának lehetősége nagyon fontos a királis analitikában az enantiomer tisztasági vizsgálatok tekintetében, ugyanis *tailing* jelenség esetén a 0,1% királis szennyező komponens megfelelő, biztonságos meghatározása általában csak akkor lehetséges, ha a minor csúcs halad előbb, *heading* esetén pedig pont fordítva, ha a minor csúcs halad később. Természetesen kiemelkedően jó felbontás esetén a meghatározás a kedvezőtlenebbnek tartott esetben is megvalósítható. A migrációs sorrend megfordítása akkor is nagy jelentőséggel bír, ha a fő komponens zavarja az elválasztást [156]. Semleges és ionizálható CD-k alkalmazásával úgy tudunk változtatni az enantiomer sorrenden, ahogy azt a felhasználás megkívánja.

Nagy különbségű enantiomer arányok meghatározása (pl. enantiomer tisztasági vizsgálat) akkor oldható meg egyszerűbben, ha a kisebb csúcs migrál előbb [157-160]. Ilyen esetekben az enantiomerek vándorlási sorrendjének szükség szerinti megváltoztatására kényszerülhetünk. Erre a feladatra a királis CE adja a legsokoldalúbb és legkönnyebben elérhető megoldási lehetőségeket [161]. A migrációs sorrend potenciálisan megváltoztatható a pH eltolása (a minta vagy a szelektor ionizáltságának megváltoztatása) [30, 156], más mechanizmusú királis szelektor alkalmazása [146, 156], az EOF megszüntetése vagy irányának megfordítása [156] és akirális micellaképzők alkalmazása révén [162].

3.3.3 Háttér pufferek vagy elektrolitok

Az elválasztások eredményessége szempontjából rendkívül fontos szerepe van a megfelelő puffer kiválasztásának. A háttélektrolitnak a következő alapvető jellemzőknek kell megfelelnie:

- nagy pufferkapacitás a kiválasztott pH-tartományban,
- optimális koncentráció (20-100 mM),

- kis elnyelés a detektálás hullámhosszán,
- a pufferion és a vizsgált anyag mozgékonyága igazodjon egymáshoz,
- szerves adalékok optimális alkalmazása (0-40%).

Az EOF nagyfokú pH-függése megköveteli az állandó pH biztosítását. Ez általában a $pK_s \pm 1$ pH-tartományát jelenti. Leggyakrabban foszfát, formiát, acetát, citrát vagy borát anionokat és Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , trietil- vagy trietanol-ammónium kationokat alkalmaznak.

A puffer minél nagyobb koncentrációjának különféle előnyös (kisebb adszorpció, elektrodiszperzió, túlterhelés) és hátrányos (növekvő áramerősség és Joule-hő termelődés, zónaszélesedés) hatásai lehetnek. Ennek megfelelően az ionos szelektorok alkalmazásánál azok vezetőképességét is figyelembe kell venni a kísérlet tervezésekor. A szerves adalékok hatása többféle lehet: csökkentik az EOF nagyságát és a minták kapilláris falán való adszorpcióját, növelik az apoláris anyagok oldékonyságát, továbbá fontos szerepük lehet az enantioszelektivitás növelésében. Az utóbbi hasznos hatásuk azon alapul, hogy kompetitív komplexképzési folyamat révén megváltoztathatják a szelektor-enantiomer komplexek stabilitási állandóit [163]. A leggyakrabban használt adalék a metanol, de más alkoholok és az acetonitril sikeres alkalmazása is előfordul [164-165].

3.3.4 A királis kapilláris elektroforézis módjai

A királis CE hagyományos módjának nevezzük azt az eljárást, amikor mind a kapillárist, mind a bemeneti (inlet) és a kimeneti (outlet) pufferedényeket (vial-okat) a királis szelektort tartalmazó pufferrel töltjük meg és a szelektandók a saját elektroforetikus mozgékonyáguk, az EOF általi mozgékonyáguk vagy a kettő kombinációjának hatására vándorolnak a bemeneti oldalról a kimeneti oldal felé a detektoron keresztül. Vizsgálatainkat valamennyi esetben a királis CE hagyományos módjának megfelelően végeztük. Ezen a módon kívül számos alternatív megoldás alkalmazására találhatunk példát:

- Részlegesen töltött kapilláris technika: kapillárisnak csak egy meghatározott részét töltjük meg királis szelektorról, a kimeneti pufferedény királis szelektor mentes puffert tartalmaz.

- Ellenáramú technika: a teljes kapilláris megtölthető a királis szelektorral, ha a királis szelektornak töltése van és az ebből származó saját elektroforetikus mozgékonyága ellentétes a szelektandéval [166].
- Áramlás ellenegyensúlyozott mód: a minta előre irányuló mozgását az elektromigráció, míg az ellenirányú vándorlását a nyomás indukált folyadékáramlás biztosítja. Kétféle megvalósítási formája ismeretes: a szakaszos [167] és a folyamatos forma [137].
- Hordozó mód: a szelektand csak a királis szelektorhoz kötött állapotában migrál a detektor felé, azaz amikor résztvevője a királis felismerő folyamatnak [168].

3.3.5 Királis szelektorok kombinálása

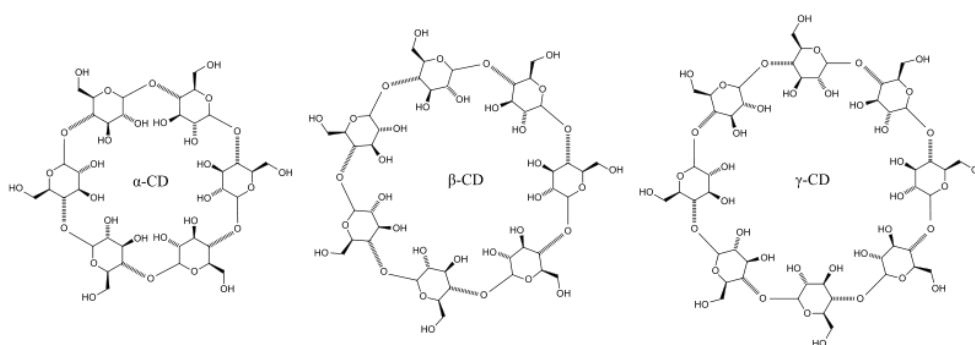
A királis szelektorok kombinálása egy jól ismert módszer a királis CE-ben [169, 170]. Legfőbb előnye, hogy az egyes szelektorok elválasztó képessége összeadódhat. Egy királis elválasztó rendszer tervezésekor azonban kettőnél több szelektor kombinálása már túl bonyolulttá válhat, miközben a jobb elválasztási eredmény nem garantált. Ebből következően a két királis szelektort alkalmazó (röviden: duál) rendszerek fordulnak elő leggyakrabban. Egy duál királis rendszer tervezése előtt ismernünk kell az egyes szelektorok királis affinitás-mintázatát, vagyis az általuk biztosított enantiomer sorrendet az adott körülmények között. Ez ideális esetben azt jelenti, hogy ismerjük a szelektor egyes enantiomerekkel adott komplex stabilitási állandóit is, de gyakorlatilag elegendő, ha tudjuk, hogy melyik enantiomerrel erősebb a szelektor kölcsönhatása. Ilyen rendszerekben hagyományosan egy ionos és egy semleges szelektort alkalmaznak. A semleges szelektor a szelektivitásért, az ionos a megfelelő szelektivitás és mozgékonyág biztosításáért egyaránt felelős. Vizsgálataink során többször tanulmányoztuk behatóan a duál ciklodextrin rendszerek hatását az enantiomerek elválasztásának hatékonyságára [E2, E4, E5].

3.4 A ciklodextrinek

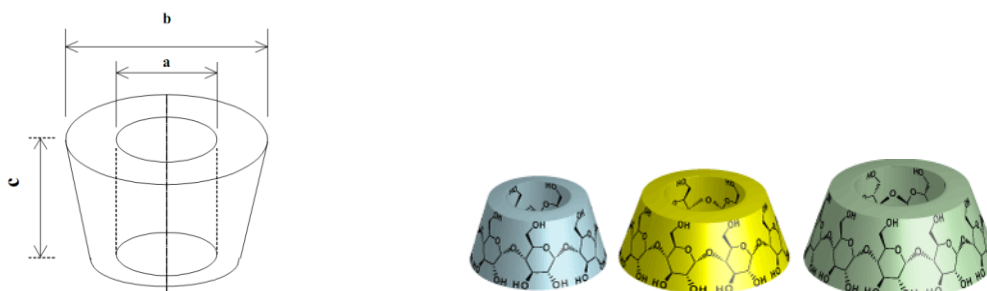
A ciklodextrinek ciklikus, nem redukáló oligoszacharidok, amelyek D-glükopiranoz egységekből épülnek fel α -(1,4)-glikozidos kötésekkel keresztül. A natív CD-eket a felépítő glükóz egységek száma alapján nevezzük el, melyek közül a 6, 7, ill. 8

egységből álló rendre α -, β - és γ -CD-k a leggyakoribbak. Izoláltak nagyobb tagszámú CD-eket is, de ezek hidrolízissel szembeni stabilitása nagymértékben csökkent. A CD-eket alkotó glükopiranoz egységek egy csonkakúp alakú palást felületén helyezkednek el egy üreget határolva. A molekula belsejét alkotó üreg a hidrogénatomok és glikozidos oxigénhidak révén enyhén apoláris tulajdonságú. Az oxigénhidak nemkötő elektronpárjai az üreg belseje felé mutatnak, nagy elektronsűrűséget, ezáltal némi Lewis-bázis karaktert kölcsönözve annak. A sajátos szerkezet eredménye egy hidrofíl külsővel rendelkező molekula, relatív jó vízdoldhatósággal, és gyengén hidrofób üreggel, mely megfelelő környezetet biztosít apoláris vendégmolekulák számára [171, 172].

A csonkakúp keskenyebb nyílását primer, míg a szélesebbet szekunder hidroxilcsoportok határolják, ennek megfelelően primer, illetve szekunder nyílásnak nevezzük őket. A primer hidroxilcsoportok szabad rotációja lecsökkenti az üreg peremének átmérőjét, a másik oldalon viszont a szekunder hidroxilcsoportok közti intramolekuláris hidrogénkötések kissé „kimerevítik” azt. A molekula két peremének poláris jellege miatt a CD-k jól oldódnak vízben (kivéve a β -CD). A β -CD molekulában az egyik glükóz C-2 hidroxilcsoportja képes hidrogénkötést létesíteni egy szomszédos egység C-3-OH csoportjával, így a molekulán belül egy másodlagos öv alakul ki a hidrogénkötések által, mely meglehetősen merevvé teszi a szerkezetet. Ez a jelenség magyarázhatja a csökkent oldhatóságot is, mivel így csökken a lehetőség a vízmolekulákkal való kölcsönhatásra [173]. A CD-k vázlatos és háromdimenziós szerkezetét a 13. ábra mutatja be, míg a natív CD-k általános fizikai tulajdonságait a 2. táblázat foglalja össze [174].



13. ábra. A natív ciklodextrinek szerkezeti felépítése.

2. táblázat. A natív ciklodextrinek néhány jellemző fizikai-kémiai paramétere.

| Paraméter | α -CD | β -CD | γ -CD |
|--|--------------|-------------|--------------|
| Glükózegységek száma | 6 | 7 | 8 |
| Molekulatömeg [g/mol] | 973 | 1135 | 1297 |
| a: az üreg átmérője [nm] | 0,47-0,6 | 0,65-0,8 | 0,83-1,0 |
| b: a perem átmérője [nm] | 1,46 | 1,54 | 1,75 |
| c: az üreg magassága [nm] | 0,79 | 0,79 | 0,79 |
| Az üreg térfogata [nm ³] | 0,18 | 0,33 | 0,52 |
| Felvehető vízmolekulák száma | 6 | 11 | 17 |
| Kristályvíz tartalom [%] | 10,2 | 13,2-14,5 | 8,13-17,7 |
| Oldhatóság vízben [g/100 cm ³ , 25°C] | 14,5 | 1,85 | 23,2 |

A CD-k glükózegységenként egy primer és két szekunder alkoholos hidroxilcsoportot tartalmaznak (összesen 18, 21 és 24 szabad OH csoport található rendre α -, β - ill. γ -CD esetén), amelyek kitűnő lehetőséget nyújtanak a legkülönbözőbb származékok (pl. metil, acetil, hidroxipropil, fenil, aminometil-benzil, naftiletikarbamoil, dimetil-fenil, stb.) előállítására [175-177]. Napjainkban számos hidrofil, hidrofób és ionizálható származékot használnak a különböző fizikai-kémiai tulajdonságok és zárványkomplex képző igények kielégítésére. A CD-származékok esetében szubsztitúciós fokon (degree of substitution, DS) azt értjük, hogy egész CD molekulánként átlagosan hány hidroxilcsoporton történt szubsztitúció. Mára az irodalomban leírt ciklodextrin-származékok száma ezer fölé tehető. Alapvető csoportosításuk a szubsztituensek száma (mono- vagy többfunkciós), elhelyezkedése (random vagy izomertiszta) és azok ionizálhatósága (semleges vagy ionizálható) alapján történik. Ionizálható szubsztituensek bevitelével állandó vagy pH-függő töltéssel láthatjuk el a ciklodextrint. Semleges szubsztituensek lehetnek pl. különféle alkil, hidroxialkil,

acil, aril, tercierbutil-dimetilszilil, szulfonil, halogenido- vagy azido-csoportok, míg ionizálhatók pl. karboxialkil, szulfoalkil, szukcinil, foszfáto-, szulfáto-, amino-, (hidroxi)alkilamino- vagy (hidroxi)alkil-trimetilammónium-csoportok.

Munkánk során mindhárom natív ciklodextrinnel, illetve ezek számos semleges, pozitív és negatív töltésű származékával végeztünk vizsgálatokat.

3.4.1 A ciklodextrinek történetének rövid áttekintése

A CD-ket először Villiers írta le [178], zárványkomplex képző képességüket pedig Schardinger ismerte fel [179]. A Heidelbergi Egyetemen Freudenberg és munkatársai izolálták először tisztán a három natív CD-t, majd 1938-ban bizonyították azok gyűrűs szerkezetét [180]. A glükózegységek pontos számát French és Rundle határozták meg [181]. French az Iowa Egyetemen és Cramer Heidelbergben kidolgozták a ciklodextrinek enzimatiskus előállításának és tisztításának módját, és felderítették fizikai-kémiai tulajdonságaikat. Ők fedezték fel 1953-ban a ciklodextrinek legfontosabb alkalmazhatóságát, a gyógyszerformulálásban rejlő lehetőségeket. Számos példán keresztül igazolták ciklodextrinek révén a könnyen oxidálódó anyagok stabilizálását, rossz oldhatóságú anyagok oldhatóságának növekedését, illékony komponensek megkötését, stb. Az ígéretes és különleges tulajdonságú CD-k iránt a hatvanas-hetvenes években kezdett komolyabb tudományos érdeklődés mutatkozni a legkülönbözőbb iparágakban.

3.4.2 A ciklodextrinek felhasználása és gyógyszerészeti jelentősége

A ciklodextrinek felhasználása - tekintettel a sokféle származékra és változatos alkalmazási lehetőségre - napjainkban már nagyon sokrétű [174, 182]. A legnagyobb mennyiségben a RAMEB-CD-t (festékiparban vízbázisú festékek, fakezelő oldatok előállítása) és a HP- β -CD-t (tisztító- és kozmetikai szerek) használják fel [183]. Az élelmiszeriparban különféle aromák megnövelt vízoldhatósággal és kémiai stabilitással rendelkező β -CD komplexeit értékesítik [184]. Az analitikai kémia elsősorban a kromatográfiai technikák területén alkalmazza széleskörűen a CD származékokat királis felismerő képességüket kihasználva.

A ciklodextrinekről szóló első összefoglalót French adta ki 1957-ben [185], melyből tévesen a CD-ek nagyfokú toxicitására következtettek, ez évekre visszavetette a CD-ek

humán célra történő alkalmazását. Mivel azóta patkányok ezrei kaptak nagy dózisban CD-t, feltételezhető, hogy az akkori tökéletlen előállítási technológia során szerves szennyezők maradtak az anyagban, melyek az érzékeny szaglászú állatokból visszautasítást válthattak ki. A megfelelően tisztított ciklodextrin nem toxikus, biológiailag degradálódik, fő lebomlási terméke pedig a glükóz, ennek megfelelően emberi alkalmazása is hamarosan lehetővé vált [186].

A gyógyszeriparban elsősorban a kedvezőtlen farmakokinetikai tulajdonságú hatóanyagok molekuláris kapszulázására alkalmazzák a ciklodextrineket és azok származékait. A komplexképzés révén a gyógyszermolekulák számos sajátsága (pl. oldhatóság, biohasznosíthatóság, stabilitás) javítható, gátolható a peptidek aggregációja, a helyi irritációk és egyes mellékhatások enyhíthetők, valamint a CD-k íz és szagfedésre is alkalmasak lehetnek [174]. Jelenleg már több tucat olyan készítmény van forgalomban, amelyben a hatóanyag ciklodextrin zárványkomplexben található.

A CD-k nagy, poláris molekulák, az ionizált származékok a bélből egyáltalán nem, a semlegesek kismértékben felszívódnak. A sejtmembránnal illetve a vér-agy gáttal való kapcsolatukról ma még keveset tudunk. A hidrofíli ciklodextrinek nem, a lipofilek is csak bizonyos koncentráció felett toxikusak, i.v. alkalmazásuk nem javasolt. Egyes CD-k (pl. a natív α -, β - és γ - ciklodextrin valamint a hidroxipropil- β -CD) már az amerikai, japán vagy európai gyógyszerkönyvekben valamint élelmiszeriparban hivatalos segédanyagok, más ciklodextrinek engedélyeztetése pedig folyamatban van.

A ciklodextrint tartalmazó gyógyszerformák szinte a teljes spektrumot lefedik. A törzskönyvezett készítmények között megtalálhatók az oldatok, infúziók, szemcseppek, orrspray-k, kenőcsök, tabletták, bukkális vagy szublingvális készítmények és kúpok, de számos készítmény készül intravénás vagy intramuszkuláris alkalmazásra is. Ezen gyógyszerekben a ciklodextrinek a hatóanyagok legkülönbözőbb osztályainak alkalmazhatóságát könnyítik meg vagy javítják hátrányos tulajdonságaikat főképp szolubilizáló vagy stabilizáló ágensként. Az ilyen készítményekben leggyakrabban alkalmazott ciklodextrinek jelenleg a natív α - és β -CD-k, a módosítottak közül pedig a metil-, 2-hidroxipropil- és szulfobutiléter- β -CD, illetve a 2-hidroxipropil- γ -CD származékok [187-190]. Egyes CD-ket ezen kívül alkalmasnak találtak elnyújtott hatású illetve célzott bejuttatású készítmények segédanyagainak is. Bioadhezív, filmképző sajátságaik miatt transzdermális gyógyszerformulációkban is alkalmazást nyerhetnek.

A ciklodextrinek széleskörű alkalmazhatóságát bizonyítja, hogy segédanyagként történő alkalmazásuk mellett egyre szélesebb körben tűnnek fel más minőségben is a medicinában. Ilyen pl. a nemrégiben felfedezett, rocuronium-specifikus, ciklodextrin-alapú, mesterséges „receptor”, a Sugammadex (Bridion[®]), mely a rocuronium műtét utáni izomrelaxáns hatását hatékonyan szünteti meg, jelentősen megnövelve az anesztézia biztonságosságát, csökkentve a mellékhatásokat és gazdaságosabbá téve az altatást [191]. Célzott hatóanyag bejuttatást elősegítő hordozó rendszerként (kopolimerek, nanopartikulumok) történő alkalmazásuk is népszerű kutatási terület, főleg kemoterápiás szerek szállítására [192]. Újabban hatóanyagként (pl. Niemann-Pick C betegség) történő alkalmazásuk is előtérbe került [193]. Számos betegségben lehetőség nyílik a ciklodextrinek diagnosztikai alkalmazására: pl. arany-ciklodextrin szupramolekuláris bioszenzorok alkalmazása antitestek kimutatására [194].

3.4.3 A ciklodextrinek zárványkomplex képzése

A ciklodextrinek különleges sajátossága, hogy hossz tengelyük mentén mindkét végén nyitott, henger alakú apoláris üreggel rendelkeznek, melybe számos eltérő kémiai szerkezetű (elsősorban nagyobb apoláris csoportot tartalmazó), geometriailag az adott üregnek megfelelő méretű ionokat, molekulákat képesek befogadni. A zárványkomplex képződésekor a ciklodextrin üregének megfelelő méretű vendégmolekula és a ciklodextrin gazdamolekula között nem-kovalens kölcsönhatás lép fel (hidrogénhíd, dipól-dipól kölcsönhatás, egyes esetekben elektrosztatikus kölcsönhatás). A ciklodextrin üregében tartózkodó, energetikailag kedvezőtlen állapotú vízmolekuláknak apoláris vendégmolekulával történő helyettesítése a komplexképzés kulcslépése. A CD-k általában 1:1 sztöchiometriájú komplexeket képeznek, de előfordulhat 1:2 vagy 2:1 arányú komplex is. Az irodalomban rendkívül változatos összetételekre is találunk példát [195].

A zárványkomplex kialakulásának feltétele a megfelelő szterikus illeszkedés, azaz hogy a vendégmolekula bizonyos részlete, esetleg egésze képes legyen bezáródni a ciklodextrin üregébe. Bár az egyes ciklodextrin molekulák magassága gyűrűtagszámtól függetlenül egyforma, a belső átmérő és ezáltal az üreg térfogata behatárolja a lehetséges vendégmolekulák körét. Az α -CD inkább a kis molekulatömegű, általában alifás oldalláncot tartalmazó vendégmolekulákat „kedveli”, a β -CD ezzel szemben az

aromás és heterociklusos részecskékkel képez stabilis komplexet, míg a γ -CD méreténél fogva makrociklusok, szteroidok befogadására a legalkalmasabb [196].

A komplex képződésekor fontos a megfelelő termodinamikai viszonyok kialakulása a rendszer komponensei, azaz a gazda, a vendég, és az oldószer között [197]. Vizes oldatban a gyengén apoláris ciklodextrin üregében nagy entalpiájú vízmolekulák foglalnak helyet. A kedvezőtlen poláris–apoláris kölcsönhatás eredményeként a víznel kevésbé poláris vendégmolekulák szubsztitúciója preferált. Vizes közegben a vízmolekulák kiszabadulása az üregből, majd az általuk létrehozott nagyszámú hidrogénkötés létrejötte a többi oldószer molekulával termodinamikailag kedvez a komplex kialakulásának. További hajtóerő a hidrofób vendégmolekula és a poláris oldószer közötti kölcsönhatások megszűnése, majd a ciklodextrin apoláris ürege és a hidrofób vendég között létrejövő másodlagos kötőerők, ezen belül is elsősorban van der Waals, hidrofób kölcsönhatások, illetve hidrogénhidak kialakulása [198].

A komplexképződés létrejötte számos következménnyel jár. A jelenség hatására megnőhet az egyébként rosszul oldódó vegyületek oldhatósága. A komplex oldhatósága az esetek többségében kisebb a tiszta ciklodextrinénél [199], de egyes esetekben pl. a H-kötés stabilizáló hatására akár növekedés is tapasztalható lehet [200]. Megváltozhatnak a gazda- és vendégmolekula egyes spektrális tulajdonságai, mely jelenség számos analitikai módszer alapját képezi. Ilyen változás az elnyelési maximum helyének eltolódása az UV, az atomok kémiai eltolódásának megváltozása NMR spektrumban, vagy az erős indukált Cotton effektus kialakulása a cirkuláris dikroizmus spektrumon [201, 202]. A legtöbb esetben a komplexképződés stabilizálja a vendégmolekulát (védi a külső behatásoktól), mely megváltozott reakcióképeséget eredményezhet. Előfordul azonban, hogy a CD, mint mesterséges enzim felgyorsít egyes kémiai reakciókat [203]. Arra hajlamos anyagok esetén csökkenhet a vendégmolekula diffúziója, párolgása, szublimációja [204]. A komplex hidrofilitása nagyobb lesz, mint a szabad vendégmolekulának, emiatt változik a kromatográfiás mobilitás, a töltéssűrűség megváltozása pedig az elektroforetikus mobilitást befolyásolja.

3.4.4 A ciklodextrin komplexek egyensúlyi és szerkezeti jellemzésének módszerei

A ciklodextrinek zárványkomplexeinek fizikai-kémiai paraméterekkel történő jellemzése egyaránt fontos az élelmiszeripartól az analitikán át a gyógyszerformulálásig. Egy L ligandum (vendégmolekula) és a CD egyensúlyi reakciójában képződő szupramolekuláris komplex kialakulását és a komplex stabilitását jellemző termodinamikai állandót a (2.7) egyenlet szemlélteti [195]:



A ciklodextrin-komplexek stabilitásának számszerű jellemzésére mindazon módszerek alkalmasak, melyekben a mért fizikai-kémiai mennyiség változása egyértelmű kapcsolatba hozható a komplexképzéssel.

A ciklodextrinek komplex stabilitásának vizsgálatára leggyakrabban alkalmazott módszerek a teljesség igénye nélkül: spektroszkópia (UV-VIS spektroszkópia [205, 206], NMR spektroszkópia [207, 208, E1, E3], pH-potenciometria [209], oldhatósági vizsgálatok [210], mikrokalorimetria [211], kapilláris elektroforézis [212, 213, E1-E6], kromatográfia [214] és tömegspektrometria [215, 216]. Elektroaktív vendégmolekula esetén számtalan elektrokémiai módszer közül választhatunk (polarográfia, potenciometria, voltammetria), melyek nemcsak a komplex stabilitási állandóról, hanem a vendég redukciójának kinetikájáról, valamint a komplex egyéb fizikokémiai állandóiról is információt adhatnak [217]. Az alkalmazott módszerek közül kiemelendő az NMR spektroszkópia, mely nemcsak a komplexek stabilitásáról és sztöchiometriájáról ad pontos információt, hanem a zárványkomplex térszerkezetének beható tanulmányozására is messzemenően alkalmas.

A fenti módszerek közül az alábbiakban részletesen a munkánk során a komplex stabilitás számszerűsítésére alkalmazott kapilláris elektroforézisen, illetve mágneses magrezonancia spektroszkópián alapuló módszereket ismertetjük.

3.4.4.1 Kapilláris elektroforézis

Mind királis analízisekben, mind a komplexek stabilitásának vizsgálatában a kapilláris elektroforézis egy egyszerű, gyors, olcsó és széles körben alkalmazott

technika. A stabilitási állandó meghatározása a migrációs idők komplexképzés hatására bekövetkező változásán alapul. A vendégmolekulát először komplexképző nélkül, majd annak növekvő koncentrációit tartalmazó háttérektrólit jelenlétében futtatjuk. A stabilitási állandót a migrációs idők (pontosabban az azokból számított effektív mobilitás) változásaiból kalkuláljuk. Ahhoz, hogy az effektív mozgékonyaság számítható legyen, szükség van az EOF meghatározásához (detektálásához) alkalmas ún. EOF markerre, mely az adott körülmények között semleges, így az EOF-fel vándorol és detektálható. Az i vegyület effektív mozgékonyaságát (μ_i^{eff}) a (2.4) egyenletnek megfelelően számíthatjuk ki a kapilláris paramétereit, az alkalmazott feszültség, valamint a vizsgált vegyület és az EOF migrációs idejének ismeretében [218]. A ciklodextrin hozzáadása a háttér elektrolithoz, nemcsak a vendégmolekulával kialakított kölcsönhatások révén, hanem a közeg viszkozitásának növelésével is befolyásolja mind az anyag, mind az EOF migrációs idejét. A vegyület effektív mozgékonyasága az aktuális CD koncentráció és a zárványkomplex stabilitásának függvényében is kifejezhető:

$$\mu_i^{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{szabad}} + \mu_{\text{kplx}} K[\text{CD}]}{1 + K[\text{CD}]} \quad (2.8)$$

ahol μ_{szabad} és μ_{kplx} a szabad vendégmolekula és a komplex mozgékonyasága.

A (2.8) egyenlet megfelelő átrendezésével a stabilitási állandó grafikus meghatározására számos lehetőség nyílik. Ezek közül munkánk során mi a linearizációs x-reciprok módszert alkalmaztuk, mely a (2.8) egyenlet átalakításából vezethető le:

$$\frac{\mu_{\text{eff}} - \mu_{\text{szabad}}}{[\text{CD}]} = -K(\mu_{\text{eff}} - \mu_{\text{szabad}}) + K(\mu_{\text{kplx}} - \mu_{\text{szabad}}) \quad (2.9)$$

A grafikus megjelenítés során a $\frac{\mu_{\text{eff}} - \mu_{\text{szabad}}}{[\text{CD}]}$ vs. $(\mu_{\text{eff}} - \mu_{\text{szabad}})$ függvényt ábrázoljuk

különböző CD koncentrációknál. Az egyes adatpontokra egyenes illeszhető, melynek negatív előjelű meredeksége a zárványkomplex stabilitási állandóját számszerűsíti. Hasonlóképpen határozható meg az állandó a 3. táblázatban bemutatott további grafikus módszerekkel [218].

3. táblázat. A komplex stabilitási állandó kapilláris elektroforézis alapú meghatározására alkalmas grafikus módszerek.

| Módszer | Függvény | K |
|-------------------------|--|---|
| mobilitás-arány módszer | $\frac{\mu_{\text{szabad}} - \mu_{\text{eff}}}{\mu_{\text{eff}} - \mu_{\text{kplx}}} \text{ vs. } [\text{CD}]$ | meredekség |
| dupla reciprok módszer | $\frac{1}{\mu_{\text{eff}} - \mu_{\text{szabad}}} \text{ vs. } \frac{1}{[\text{CD}]}$ | $\frac{\text{tengelymetszet}}{\text{meredekség}}$ |
| y-reciprok módszer | $\frac{[\text{CD}]}{\mu_{\text{eff}} - \mu_{\text{szabad}}} \text{ vs. } [\text{CD}]$ | $\frac{\text{meredekség}}{\text{tengelymetszet}}$ |
| x-reciprok módszer | $\frac{\mu_{\text{eff}} - \mu_{\text{szabad}}}{[\text{CD}]} \text{ vs. } (\mu_{\text{eff}} - \mu_{\text{szabad}})$ | -meredekség |

A kapilláris elektroforézis korlátja, hogy semleges szelektornak csak ionizált molekulával képzett komplexének vizsgálatára alkalmas, illetve, hogy semleges molekula komplexképzése csak töltéssel rendelkező szelektorról vizsgálható a technika alapvető tulajdonságaiból adódóan. Emellett szükséges, hogy a molekula detektálható legyen, vagyis a leggyakrabban alkalmazott diódasoros detektorok esetében kellő UV elnyeléssel kell, hogy rendelkezzen. Ezen felül a (2.8) egyenletből adódik, hogy a komplex kialakulása során feltételezzük az 1:1 sztöchiometriát. Amennyiben a valós arány ettől eltérő, úgy a számítás és így az állandó nagysága is jelentős hibával terhelt és a kiindulási egyenlet korrekcióra szorul [162].

3.4.4.2 NMR spektroszkópia

Az NMR spektroszkópia az egyik legsokoldalúbban alkalmazható technika CD-komplexek oldatfázisú egyensúlyi és szerkezeti jellemzésére [219]. Az első NMR eredmények közt publikálták a különböző natív ciklodextrinek szekunder hidroxilcsoportjai között kialakuló hidrogénhidas szerkezetet, mellyel sikerült magyarázatot adni a β -CD kiugróan alacsony (0,013 M) oldhatóságára [174]. Már a korai vizsgálatok során meghatározták a ciklodextrinek ^1H és ^{13}C kémiai eltolódásait, analizálták a spinrendszereiket és konformációváltozásait, majd a nagyobb térerejű készülékek, valamint a gradiens technikák elterjedésével lehetőség nyílt a különböző szubsztituált CD-k és komplexeik vizsgálatára is.

A ciklodextrin-vendégmolekula rendszer egyensúlyi jellemzésére az ún. „NMR shift titration” (vagy NMR titrálás) a leggyakrabban használt módszer. Általában a vendégmolekula egy vagy több NMR-aktív magján mérjük a növekvő gazda/vendég koncentráció arány hatására bekövetkező kémiai eltolódásváltozást ($\Delta\delta$). A $\Delta\delta$ - CD-koncentráció adatsor(ok)ból nemlineáris paraméter illesztéssel számíthatjuk a komplex stabilitási állandót [195, 208, 220]. Az állandó pontos meghatározásának érdekében a titrálást 0–80% komplexáltsági fokok közti intervallumban célszerű végrehajtani, ha az oldhatóság ezt lehetővé teszi. Ennek megtervezése természetesen a stabilitási állandó nagyságrendi ismeretét igényli. A különböző gazda/vendég koncentráció arányoknál felvett ^1H (ritkábban ^{13}C) spektrumokban mért kémiai eltolódás a részecskék szabad és teljesen komplexált formájában mérhető kémiai eltolódásainak móltörttekkel súlyozott átlaga, ha a komplexképződési reakció megfelelően gyors az NMR időskálán [221]:

$$\delta^{\text{mért}} = \delta_{\text{L}} \cdot x_{\text{L}} + \delta_{\text{L-CD}} \cdot x_{\text{L-CD}} = \frac{\delta_{\text{L}} + \delta_{\text{L-CD}} \cdot K_{\text{L-CD}} [\text{CD}]}{1 + K_{\text{L-CD}} [\text{CD}]} \quad (2.10)$$

ahol δ_{L} és $\delta_{\text{L-CD}}$ a szabad és komplexált ligandum egyedi kémiai eltolódásai; x_{L} és $x_{\text{L-CD}}$ a szabad és komplexált ligandum móltörtje; K a zárványkomplex stabilitási állandója [M^{-1}]; $[\text{CD}]$ az aktuális ciklodextrin koncentráció [M].

Az NMR titrálás előnye, hogy mind a vendégmolekula, mind a CD összes spinaktív magján egyszerre követhetjük a komplexképződés hatását, így egyetlen titrálásból is több adatsor áll rendelkezésre a K meghatározására. A módszernek jó kontrollja továbbá, hogy az egyes magokon mért kémiai eltolódásváltozásokat külön-külön kiértékelve, a látszólagos stabilitási állandók mennyire térnek el egymástól. Amennyiben az egyes magokra kiszámított állandók jelentős eltérést mutatnak, úgy feltételezhető, hogy a keletkező komplex átlagosan nem 1:1 sztöchiometriájú [222]. A módszer hátrányai között megemlítendő, hogy a komplex stabilitása korlátot szab a meghatározásnak: sem a túl alacsony ($K < 10 \text{ M}^{-1}$) sem a túl nagy ($K > 1000 \text{ M}^{-1}$) stabilitású komplexek állandói nem határozhatók meg kellő pontossággal [223].

További előnyei a módszernek (például a kapilláris elektroforézissel szemben), hogy sem a ciklodextrin, sem a vendégmolekula ionizáltsági állapota nem befolyásolja a mérést, tehát akár semleges vegyületek komplexképzése is vizsgálható, valamint, hogy a detektálás egyedi igényeihez (UV abszorpció, fluoreszcencia) nem szükséges a vendégmolekulát igazítani.

Job módszerét alkalmazva (Job plot titration) az NMR spektroszkópia alkalmas a komplex átlagos sztöchiometriájának nagy pontosságú meghatározására is. A metódus során egy-egy megegyező háttérű (pH, ionerősség, puffer, CD, ill. vendég koncentráció) ciklodextrin és vendégmolekula törzsoldatot készítünk, majd ezeket különböző arányban elegyítjük. Az egyes oldatokban az eltérő komplexáltsági fok, eltérő kémiai eltolódásváltozást eredményez a „tisztá” CD, illetve vendégmolekula oldatokhoz képest. A móltörttel súlyozott kémiai eltolódásváltozást ($\Delta\delta \cdot x$) a móltört (x) függvényében ábrázolva szerkeszthetők meg a Job görbék bármely vendég vagy CD magra. Ezen görbék maximuma (vagy az eltolódásváltozás irányától függően minimuma) a komplexre jellemző sztöchiometria arányánál található (tehát 1:1 esetén 0,5-nél, 1:2 esetén 0,66-nál, stb.). Ennek megfelelően a Job plot analízist célszerű a stabilitási állandók meghatározása előtt elvégezni, hogy a későbbiekben helyes képletet alkalmazva számítsuk a konstansokat [224, E2-E5].

A modern NMR pulzusprogramok segítségével a szupramolekulák 3D szerkezete is vizsgálható. A kétdimenziós mag-Overhauser hatás spektroszkópia (NOESY) [225] intramolekuláris keresztcsúcsai nem szimmetrikus CD-származékok jelasszignációjában és konformációik meghatározásában is hasznos információkat nyújtanak. A hagyományos NOE módszerek alkalmazhatóságát nagymértékben befolyásolja a molekulák korrelációs mozgása. A kritikus keresztrelaxációs idők egyaránt függenek az oldószer viszkozitásától, a rotációs korrelációs időtől (τ_c) és a spektrométer frekvenciájától. 500-600 MHz-es készüléken pozitív NOE-t (gyors mozgás, $\omega\tau_c \ll 1$) az 1000 Da alatti, míg negatív ($\omega\tau_c \gg 1$) csak a jóval 5000 Da fölötti mólsúlyú vegyületeknél várhatunk. A CD-k és komplexeik mérettartományában $\omega\tau \approx 1$, ezért a NOESY kevésbé alkalmazható. A „rotating frame” Overhauser-hatás spektroszkópiában (ROESY) a keverési idő (*mixing time*) alatt spin-lock tér alkalmazásával érhető el, hogy a keresztrelaxáció nem a z-tengely, hanem egy x,y-komponenseket is tartalmazó effektív tengely mentén (és a spektrométer alapfrekvenciájától eltérő ω_{eff} frekvenciánál) megy végbe, így gyakorlatilag tetszőleges sebességű rotációs mozgásra (molekulaméretre) biztosított a $\omega\tau_c \ll 1$ feltétel, tehát a főátlóval ellentétes fázisú keresztcsúcs [226]. Ennek eredményeképpen az egymással térközelségben lévő ($d < 5 \text{ \AA}$) protonok intra- és intermolekuláris keresztcsúcsokat adnak, melyekből információ nyerhető egyes molekulák térszerkezetéről, a kialakuló komplex szerkezetéről és arról, hogy az

illeszkedés a CD melyik nyílásának irányából megy végbe, a vendégmolekula mely része kerül a ciklodextrin üregébe, illetve, hogy mennyire jelentősek a kölcsönhatások a vizsgált vegyület és a CD oldalláncok között [208, E1-E4].

3.4.5 Enantiomerek elválasztása ciklodextrinekkal kapilláris elektroforézisben

A kereskedelemben fellelhető számos ciklodextrin-származék a legszerteágazóbb kémiai szerkezetek elválasztására ad lehetőséget. Az elválasztás hatékonysága előre nem megjósolható, azonban a kapilláris elektroforézis korlátai és az egyes CD származékok töltése megszabja az adott szelektorról elválasztható enantiomerek töltését (4. táblázat).

4. táblázat. A CD származékokkal kapilláris elektroforézissel elválasztható enantiomerek csoportosítása töltésük alapján.

| CD töltése* | Az elválasztható enantiomer | CD származékok |
|-------------|-----------------------------|--|
| Semleges | ionos | natív, metil-, acetyl-, hidroxialkil-CD |
| Negatív | ionos és semleges | karboxialkil-, szukcinil-, szulfato-, foszfato-, szulfoalkil-, szulfohidroxialkil-CD |
| Pozitív | ionos és semleges | amino-, alkilamino-CD |

*A pozitív és negatív származékok többségének nem a teljes pH tartományban, csak megfelelő körülmények között van töltése.

A már korábban ismertetett hárompontos illeszkedési modell feltételei a CD-ek esetében oly módon teljesülnek, hogy a térben kialakuló csonkakúp-szerkezet viszonylag hidrofób belsejében hidrofób-hidrofób és sztérikus kölcsönhatások alakulnak ki. Ezen hatások mellett, a glükózegységek 2. és 3. pozícióban lévő szekunder hidroxilcsoportok a csonka kúp szélesebb, míg a primer hidroxilcsoportok a glükóz egységek 6. pozíciójában a keskenyebb nyílásnál H-híd és dipól-dipól kölcsönhatások kialakításával járulnak hozzá a királis felismeréshez [227-229].

A ciklodextrineknél, a vizsgált vegyület kiralitáscentrumához kapcsolódó szubsztituensnek elég közel kell lennie a CD üreg szélén lévő szekunder hidroxilcsoportokhoz, hogy kölcsönhatás alakulhasson ki közöttük. A vegyület szoros illeszkedése a csonka kúp belsejébe segítheti az elválasztást, de nem alapvető követelmény [230].

A CD alapú királis CE kezdetén a natív CD-kel és az olcsó, semleges származékokkal történtek vizsgálatok. A természetes CD-k saját mozgékonyságának hiánya és korlátozott szelektivitásspektrumuk miatt mára főképp csak szelektor-kombináció alkotórészeként vagy összehasonlítási alapként szerepelnek a királis elválasztást tanulmányozó publikációkban. Az utóbbi másfél évtizedben a CD-k legkülönbözőbb származékait állították elő és próbálták ki nagy sikerrel a királis CE területén. Az irodalomból kitűnik, hogy a királis CE fejlődésében a CD-származékoknak döntő szerepe volt.

A semleges CD-k közül elsőként a **metilszármazékok** említhetők. A metilezés növeli a CD-k és a komplexek vízdékonyságát, továbbá a metilszármazékok enantioszelektivitási spektruma általában szélesebb a természetes CD-knél. Megállapítható, hogy a (2,6-di-O-metil)-CD-k (pl. DIMEB-CD) és a (2,3,6-tri-O-metil)-CD-k (pl. TRIMEG-CD) bizonyultak a legsikeresebb metilezett CD származékoknak [231, 232]. Míg a trimetil CD-k izomertiszták, addig a dimetilek izomertisztasága a gyártótól függ.

A hidroxialkil-származékok közül a 2-**hidroxipropilezett** származékok (HP-CD-k) váltak be leginkább, ezeket alkalmazzák legszélesebb körben [233, 234]. Ezen származékoknál a szubsztituens is tartalmaz királis szénatomot, ami lehetőséget adhat a szelektivitás növelésére, ill. a szelektivitási spektrum szélesítésére. A gyakorlatban alkalmazott HP-CD származékok random jellegűek, szubsztitúciós fokuk általában ~3, ~4,5 vagy ~6,3.

A királis elválasztásban ritkábban alkalmazott származékok az **acetilezett** cilodextrinek, melyek szubsztitúciós foka általában ~7 vagy ~15. A kiterjedt acetilezés révén a gyűrű mérete jelentős változáson megy át, így a natív származékhoz képest a szubsztituált jelentős különbséget mutathat a zárványkomplex stabilitásában [E1].

Az ionizálható szelektorok közül a karboxilcsoportot tartalmazó származékok is gyakran használt királis szelektorok. Közülük a **karboximetilezett** CD-k nyertek szélesebb körű alkalmazást [30, 235, 236], de a **karboxietil-** [30] és a **szukcinil-** [30, 236] származékok felhasználására is akadnak példák. Ezen csoport tagjai is zömében random jellegűek, szubsztitúciós fokuk 3 körüli. Alacsony pH tartományban (pH<3) semlegesek, ezért pH-tól függően több fajta királis felismerésük is lehet. Ezen szelektorokat főleg bázikus és semleges enantiomerek elválasztására használják.

A permanensen negatív, **szulfo**-szubsztituált CD-k jelenleg a leggyakrabban használt ionos CD-k. A szulfocsoport kapcsolódhat közvetlenül (**szulfáto-**) [237-240] vagy különböző hosszúságú alkiláncon keresztül (**szulfoalkil-**) [237-240] a CD-hez. Ezen CD-k szelektivitása nagyban függ a szubsztitúció fokától és módjától. Már az enantiomerek migrációs sorrendjének megfordulását is megfigyelték a CD szulfát szubsztitúciós fokának függvényében (szubsztitúciós fok=7 és 12) [240]. A szulfatált CD-k általában különösen stabil komplexet képező és rendkívül nagy elválasztó képességű királis ágensek. Gyakran 1 mM alatti koncentrációban, vagy rövid oldatdugóként is alapvonal elválasztást eredményeznek [238], főleg az utóbbi okból a királis CE-MS-ben is kedvelt szelektorok. 10 mM fölötti koncentrációban a nagy vezetőképességük miatt ritkán alkalmazzák ezeket a CD-eket. A szulfatált CD-k főleg a bázikus és semleges enantiomerek elválasztásában bizonyultak eredményesnek, de sok gyengén savas enantiomer elválasztása is megoldható felhasználásukkal.

Számos bázikus szubsztituenszt tartalmazó CD származékot is kipróbáltak már a királis CE-ben savas és semleges enantiomerek elválasztására. Az eddig leggyakrabban használt bázikus CD-k **kvaterner ammónium**csoportot tartalmazó származékok [241, 242]. Gyakran alkalmazott szelektorok ezek mellett a munkánk során felhasznált **6-monodezoxi-6-mono-3-hidroxi-propilamino** és a **6-monodezoxi-6-monoamino**-származékok is. A bázikus CD-k a pozitív töltésű szubsztituensek számától függően a kapilláris falához tapadva hatással lehetnek az EOF nagyságára és irányára, ami miatt a többszörös pozitív töltésű CD-k alkalmazása nagyobb körültekintést igényel. Fontos megjegyezni, hogy a kvaterner ammóniumiont tartalmazó CD-k az egész pH-tartományban ionizáltak, míg az amino funkciót tartalmazó CD-k a pH-tól függően változtatják ionizáltságukat és ezzel együtt királis elválasztó képességüket.

Ahhoz, hogy a zárványkomplex képződést használjuk királis elválasztásra, több feltételnek kell teljesülnie. A ciklodextrinek számos kiralitáscentrumot tartalmaznak (glükóz monomerenként ötöt), ezért belső üregük királis mikrokozmoszként fogható fel. Racém vegyületek CD komplexeinek képződésekor az enantiomerek eltérő kötődése miatt különböző stabilitású diasztereomer komplexpár keletkezhet. A kialakuló komplexek stabilitását a cukoregységek által alkotott üreg mérete, a vendégmolekula üregbeli elhelyezkedése és az esetleges oldalláncokkal kialakuló kölcsönhatások erőssége befolyásolja. Az enantiomerek ciklodextrinnel történő kölcsönhatásának

következménye (CE szempontból) a mozgékonyaságuk megváltozása. Ciklodextrin típusú szelektor pufferhez való hozzáadásával a mozgékonyaság különbség a (2.6) egyenlet szerint alakul [243].

Az enantiomerek elválasztásának jellemzésére leggyakrabban a felbontást (R_s) alkalmazzuk, mely a gyakorlatban az elektroferogramról egyszerűen számolható:

$$R_s = 2 \frac{(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (2.11)$$

ahol t_R , t_S az enantiomerek migrációs ideje; w_R , w_S az enantiomerek csúcsának extrapolált szélessége az alapvonalnál.

Annak a számszerűsítésére, hogy az adott ciklodextrin-származék mennyivel mutat nagyobb affinitást az egyik enantiomer felé, a szelektivitást (α) használjuk [17]:

$$\alpha_{\text{sep}} = \frac{t_R}{t_S} \quad (2.12)$$

ahol t_R , t_S az egyes enantiomerek migrációs ideje.

Az enantiomerek komplex stabilitási állandóinak ismeretében a Wren és Rowe által kidolgozott egyenlet segítségével jó közelítéssel becsülhető az a szelektor koncentráció, mellyel adott körülmények között a legteljesebb elválasztás érhető el [136]:

$$c_{\text{opt}} = \frac{1}{\sqrt{K_R \cdot K_S}} \quad (2.13)$$

K_R és K_S az egyes enantiomerek komplexeinek stabilitási állandói.

A királis elválasztást kapilláris elektroforézisben számos tényező befolyásolja, ezek vizsgálata és optimalizálása az enantiomerek elválasztása során sok esetben lehet indokolt. Ilyen tényezők az alkalmazott szelektor típusa és koncentrációja, a háttér elektrolit összetétele (puffer alapanyag, szerves módosító) és koncentrációja, a kapilláris belső hőmérséklete, az alkalmazott feszültség és a pH.

3.5 Sav-bázis egyensúlyok

Mind a komplexképzés vizsgálata, mind a királis elválasztás szempontjából alapvető fontosságú a jelenlévő gazda- és vendégmolekulák protonáltsági állapota, töltése. Különösen igaz ez a kapilláris elektroforézissel végzett kísérletek esetében, ahol a vizsgálatok szempontjából létfontosságú követelmény, hogy legalább az egyik kölcsönható molekula ionizált állapotban legyen.

A hidrogénion és egy vegyület közötti kölcsönhatást makroszkópikus és mikroszkópikus szinten jellemezhetjük. A globális, *makroszkópikus* leírás keretében a reagáló és keletkező részecskéket sztöchiometriai összetételük szerint definiáljuk. A csoportspecifikus vagy *mikroszkópikus* jellemzés során a sztöchiometrián kívül azt is meghatározzuk, melyik csoporthoz kötődik a proton és eközben milyen egyéb csoport(ok) protonált(ak) [244].

Amennyiben az egyensúlyokat a (konjugált) bázis protonfelvételének irányából szemléljük, egy L protonátlan ligandum, protonálódását leíró folyamat és protonálódási állandó (K) a (2.14) egyenleteknek megfelelően írható le:



A látszólagos protonálódási állandók csak az adott hőmérsékleten és ionerősségnél érvényesek és mérésükhöz az elektródot a p[H]-skálára kell kalibrálni [245]. A továbbiakban a $\log K_i$ jelölés alatt mindig a (2.14) egyenlet szerinti sztöchiometrikus állandókat értjük, melyek számértékben megegyeznek a megfelelő savi disszociációs állandók negatív logaritmusával: $\log K_i = -\log K_{s,n-i+1}$, ahol n a maximálisan felvehető protonok számát jelenti.

Makroszkópikus protonálódási állandók meghatározására mindazon módszerek alkalmasak, melyekben a mért fizikai-kémiai mennyiség pH-függő változása a molekula H^+ -felvételével egyértelmű kapcsolatba hozható. A számos metodika közül az alábbiakban csak azokat tekintjük át, amelyek a jelen dolgozatban felhasználásra kerültek, a többi technika leírása megfelelő monográfiákban megtalálható [246].

3.5.1 NMR-pH titrálás

Egy NMR aktív mag ppm-ben mért δ kémiai eltolódását a következő egyenlettel definiáljuk [247]:

$$\delta \equiv \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_0} \cdot 10^6 [\text{ppm}] = \frac{\sigma_{\text{ref}} - \sigma}{1 - \sigma_{\text{ref}}} \cong \sigma_{\text{ref}} - \sigma \quad (2.15)$$

ahol ν és ν_{ref} a vizsgált és egy referenciaanyag magjának rezonanciafrekvenciája [Hz]; σ és σ_{ref} ugyanezek árnyékolási tényezője; ν_0 pedig a használt spektrométer alapfrekvenciája [MHz] a mért magra.

A protonálódás hatására a funkciós csoport körül csökken az elektronsűrűség, ezért a közeli NMR magok diamágneses árnyékolása, így kémiai eltolódása is megváltozik. Mivel a legtöbb kismolekula vízben a diffúziós limit közeli sebességgel cserél protont, ezek a reakciók pillanatszerűen gyorsak a „kémiai eltolódás” időskálán. Ilyenkor csak egy közös rezonanciajel figyelhető meg a részecskék egyedi δ_L és δ_{HL} kémiai eltolódásainak móltörttekkel súlyozott átlagánál [221, 248]:

$$\delta^{\text{mért}} = \delta_L x_L + \delta_{HL} x_{HL} = \frac{\delta_L + \delta_{HL} K [\text{H}^+]}{1 + K [\text{H}^+]} \quad (2.16)$$

K számú NMR-aktív mag kémiai eltolódását M pH-értéknél megmérve egy $M \times K$ méretű adatmátrixot kapunk, melynek kiértékelése során a $\log K$ makroállandókat és a különböző protonáltsági izomerek határeltolódásait számíthatjuk ki minden vizsgált magra. A szupravezető mágnesek térerejének növekedésével a kémiai eltolódások egyre pontosabban mérhető mennyiséggé válnak, így a számított $\log K$ pontosságát egyre inkább a pH-mérés precizitása ($\pm 0,02$) determinálja. Az NMR titrálás kivitelezésének több formája ismert:

- A munka- és anyagigényes *egyedi minták módszere* során az oldatok pH-ját nagyobb térfogatú, jól kevert oldatban mérjük, és a mintákat egyenként töltjük NMR csövekbe.
- Az *egycsöves* technikánál a titráló oldatot μl részletekben adagoljuk egyetlen NMR csőbe és a pH-t mikroelektróddal mérjük a csőben adekvát kevertetés nélkül, meglehetősen pontatlanul.

Az egycsöves titrálás során előnyösebb a pH *in situ* meghatározása egy, az oldatban jelenlévő indikátor molekulával. Az indikátor aktuális kémiai eltolódásából a pH a (2.16) egyenlet Henderson-Hasselbalch típusú átrendezésével számítható ki:

$$\text{pH} = \log K_{\text{Ind}} = \log \frac{\delta_{\text{Ind}}^{\text{mért}} - \delta_{\text{HInd}}}{\delta_{\text{Ind}} - \delta_{\text{Ind}}^{\text{mért}}} \quad (2.17)$$

ahol δ_{Ind} és δ_{HInd} az indikátor egyes protonáltsági izomereinek határeltolódása; K_{Ind} az indikátor külön kísérletből ismert protonálódási állandója.

A (2.17) egyenletből számított pH pontosságát (hibaterjedésen keresztül) a kémiai eltolódások standard deviációja határozza meg, és a pH a $[\log K_{\text{Ind}} - 1, \log K_{\text{Ind}} + 1]$ intervallumban számítható ki elfogadható pontossággal [249]. NMR indikátor használata már régóta elterjedt biológiai minták *in situ* pH mérésére [250], analitikai

alkalmazása szintén kézenfekvő, mióta rendelkezésre állnak olyan indikátor-sorozatok, melyekkel a teljes (0-14) pH tartomány lefedhető [249, 251].

Fontos szempont végezetül olyan referensanyag választása az NMR titráláshoz, amely a vizsgált pH-tartományban nem változtatja ionizációs állapotát [252]. Erre a célra kísérleteink során DSS-t alkalmaztunk.

Az NMR spektroszkópiás pK_s meghatározás előnyei közé tartozik, hogy a mérendő anyag pontos koncentrációját nem szükséges ismerni és esetleges szennyezők sem zavarnak, ha a rezonanciajelek hovatartozása egyértelműen eldönthető, és a vizsgálandó anyag a szennyezővel nem lép asszociációs vagy egyéb reakcióba.

3.5.2 CE-pH titrálás

Kapilláris elektroforézisben a pH megváltoztatása befolyásolja a kapillárisfal protonáltsági állapotát (változtatva az EOF mobilitását), valamint hatással van a vizsgálandó vegyület ionizáltsági állapotára, így annak mobilitására is. A pH növekedésével az EOF egyre gyorsul, sebessége kb. pH=8 felett változatlan, míg kb. pH=3 alatt sebessége közelítőleg zérus. A vizsgálandó anyag az elektroforézis normál módjában minél nagyobb pozitív töltéssűrűséggel rendelkezik, annál gyorsabban halad, míg minél nagyobb a negatív töltéssűrűsége, annál lassabban. Elsődleges válaszként a CE-pH titrálás során is a migrációs időket (vizsgálandó vegyület és EOF) regisztráljuk, melyekből a (2.4) egyenletnek megfelelően effektív mozgékonytságot számítunk. Egy részecskének az elektroferogramon megfigyelhető aktuális elektroforetikus mobilitása adott pH-n ($\mu_{\text{mért}}$) mindig a különböző protonáltsági izomerek mobilitásának (μ_{A^-} , μ_{HA}) móltörttel (x_{A^-} , x_{HA}) súlyozott összegével egyezik meg. Ez az összefüggés egy protonálható csoportot tartalmazó sav esetében a következőképpen írható fel:

$$\mu_{\text{mért}} = \mu_{A^-} \cdot x_{A^-} + \mu_{HA} \cdot x_{HA} \quad (2.18)$$

Az effektív mobilitást ezután a pH függvényében ábrázolva titrálási görbét kapunk. Az effektív mobilitás-pH adatsorokat kiértékelve a vizsgált vegyület $\log K$ értékeit, valamint az egyes protonáltsági izomerek egyéni effektív mobilitását számíthatjuk ki.

A (2.18) egyenlet átrendezéssel olyan formára hozható (2.19), mellyel a μ_{eff} -pH függvény pontjaira görbe illelhető:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{A^-} + \mu_{HA} \cdot 10^{pK_s - \text{pH}}}{1 + 10^{pK_s - \text{pH}}} \quad (2.19)$$

A CE-pH titrálás során az alkalmazott háttélelektrolitoknak a pH-n kívül a lehető legtöbb egyéb paraméterben (ionerősség, pufferalkotó koncentrációja, pufferalkotó típusa) nagy hasonlóságot célszerű mutatni.

A CE-pH titrálásnak a gyakorlatban alkalmazott módszerekhez képest számos előnye és hátránya is létezik. A technika hátulütője, hogy reprodukálhatósága alacsony, az EOF és a minta migrációs ideje is viszonylag nagy tartományon belül ingadozhat a párhuzamos mérések között. Egy titrálásból az NMR-pH titrálással ellentétben csak egy adatsor készíthető és így egy állandó számítható, vagyis a megbízható eredményhez több párhuzamos mérés szükséges. Hátránya ezen felül az NMR-pH titrálással szemben, hogy alkalmazhatóságának pH tartománya jóval korlátozottabb: kb. $3,5 < pK_s < 9,5$ állandók meghatározására alkalmas. A módszer előnye, hogy gyors, könnyen automatizálható, speciális oldószer nem szükséges hozzá és a mintaigénye is rendkívül alacsony.

4. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki számos biológiailag aktív anyag (aszpartám, pregabalin, vinka alkaloidok, szitagliptin, imperanén, dapoxetin) ciklodextrin komplex képzésének vizsgálatát kapilláris elektroforézissel és mágneses magrezonancia spektroszkópiával.

A vegyületek protonáltsági állapota mind a szerkezetbeni viselkedésüket, mind a ciklodextrinnek szembeni affinitásukat döntően befolyásolja. Ahhoz, hogy vizsgálni tudjuk az egyes protonáltsági izomerek eltérő komplexképzését, célunk volt a vegyületek sav-bázis tulajdonságainak beható jellemzése, melyet kapilláris elektroforézis- és NMR-pH titrálásokkal végeztünk el.

Célul tűztük ki, hogy meghatározzuk a fenti vegyületek számos ciklodextrinnel képzett komplexének stabilitását kapilláris elektroforézissel és két vegyület esetében ezt alátámasztandó vagy kiegészítendő, mágneses magrezonancia spektroszkópiával is.

Valamennyi vizsgált vegyület rendelkezik egy vagy több kiralitáscentrummal, melynek következménye, hogy enantiomerjeik biológiai aktivitása eltérő lehet. A törzskönyvezési eljárás során ma már alapvető kritérium a gyógyszerfejlesztésben a lehetséges enantiomer-szennyezők azonosítása és izomertiszta hatóanyagok forgalmazása. Ezért is elengedhetetlen, hogy gyors és robosztus módszerek álljanak rendelkezésre a hatóanyagok ilyen jellegű vizsgálatára. Célunk volt ennek megfelelően kidolgozni a pregabalin, a vinka alkaloidok, a szitagliptin, az imperanén és a dapoxetin enantiomerjeinek királis elválasztására könnyen alkalmazható, ciklodextrin alapú kapilláris elektroforetikus módszereket.

Célul tűztük ki, hogy a kidolgozott módszerek közül a dapoxetin enantiomerek elválasztását az ICH irányelveknek megfelelően validáljuk.

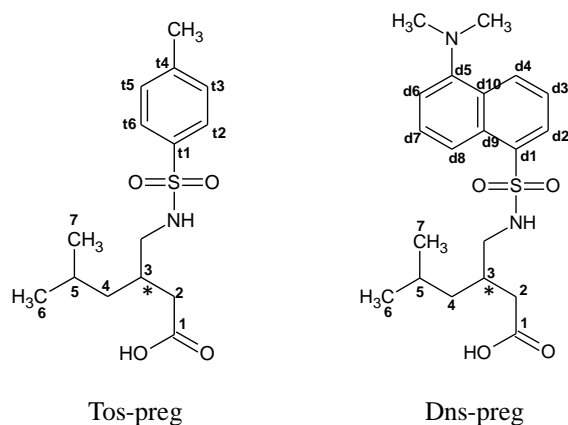
Célunk volt végül, hogy a komplexek jellemzésének teljességét szem előtt tartva meghatározzuk a zárványkomplexek sztöchiometriáját és térszerkezetét NMR spektroszkópia segítségével.

5. Módszerek

A kísérleti munka során használt anyagokat és módszereket az *Eredmények, megbeszélés* c. fejezetnek megfelelően két részre tagoltuk. Külön fejezetben tárgyaljuk a protonálódási állandók meghatározása, valamint külön fejezetben a ciklodextrinnel való interakciók vizsgálata során felhasznált anyagokat és módszereket.

A vizsgálandó anyagok közül az **aszpartámot** a Cyclolab Kft. állította elő és bocsátotta rendelkezésünkre izomertiszta formában (csak a széleskörűen alkalmazott enantiomert).

Mivel a **pregabilint** gyenge UV elnyelése miatt kapilláris elektroforézissel nem lehetne vizsgálni (diódasoros detektorral), így annak tozilezett (Tos-preg) és danzilezett (Dns-preg) származékát dr. Neumajer Gábor PhD hallgató (Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet) segítségével állítottuk elő. Ezzel a módosítással a vegyület kiralitása nem változik, azonban UV aktivitása az aromás szubsztituenseknek köszönhetően jelentősen megnő és a hidrofób csoportok bevitele a molekulába a ciklodextrinnel való komplexképzésben is előnyös. A tozilezett-, illetve danzilezett pregabalin-származékok szerkezetét a 14. ábra mutatja. Az előállítás a [253] cikkben publikáltak szerint történt kisebb módosításokat bevezetve [E2]. A szintézis során mind a racém, mind az enantiomertiszta származékokat előállítottuk mindkét vegyület esetében. A szilárd vegyületeket 2-5 °C-on tároltuk.



14. ábra. A Tos-preg és Dns-preg szerkezete és dolgozatban alkalmazott számozása.

Mindhárom **vinka alkaloidot** a Cyclolab Kft. bocsátotta rendelkezésünkre enantiomertiszta formában. A 2.2.3 fejezetben leírtaknak megfelelően ezen vegyületek

több enantiomerpárral rendelkeznek. Ezek közül vizsgálatainkban kizárólag az eutomert és annak enantiomerjét használtuk fel.

A racém és az enantiomertiszta (*S*)-**imperanént** Yuichi Kobayashi és munkatársai (Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japán) szintetizálták és bocsátották rendelkezésünkre [99]. A szilárd formában instabil vegyületeket MeOH-ban oldottuk (5 mg / 1,5 ml), majd -20 °C-on tároltuk.

Az (*R*)- és (*S*)-**szitagliptint** Wen Hui Hu és munkatársai állították elő és bocsátották rendelkezésünkre [115]. Mindkét vegyületet metanolban feloldva -20 °C-on tároltuk.

A racém **dapoxetint** dr. Neumajer Gábor PhD hallgató és Darcsi András tudományos diákköri hallgató állították elő a Torre és munkatársai által kidolgozott módszer kisebb módosításával (a nagyobb hozam érdekében) [120]. Az enantiomertiszta (*S*)-dapoxetint Vicente Gotor Fernández állította elő és bocsátotta rendelkezésünkre [120]. A vegyületeket metanolban feloldva -20 °C-on tároltuk.

A vegyületek jellemzésére és tisztaságának vizsgálatára NMR spektroszkópia, LC-MS vizsgálat, valamint olvadáspont meghatározás és vékonyréteg-kromatográfia szolgált. A vegyületek szerkezetének meghatározása NMR spektroszkópiával, a VNMRJ 2.2C/Chempack 4.0 szoftverekben megtalálható rutin egy- és kétdimenziós pulzusszekvenciákkal történt. Az ¹H és ¹³C kísérleteket egy 600MHz Varian VNMRS spektrométeren végeztük, mely *inverz detektálású z-gradiens* mérőfejjel van felszerelve. Valamennyi NMR kísérletet standard 5 mm-es NMR csövekben, a hőmérsékletet 25 °C-on tartva hajtottunk végre.

5.1 Protonálódási állandók meghatározása

5.1.1 Anyagok

A protonálódási állandók meghatározásához használt alapvegyszereket (NaOH, NaCl, tömény sósav, foszforsav, ecetsav) analitikai tisztaságban a Reanal és Sigma-Aldrich gyártóktól szereztük be. Az NMR spektroszkópiához referensanyagként a 3-trimetilszilil-1-propánszulfonsav nátriumsóját (DSS, ≥99%, Fluka) használtuk. A minták megfelelő térfogatszázalékban ≥99,8 atom% izotóptisztaságú D₂O oldószerrel (Sigma-Aldrich) készültek. Az *in situ* pH méréssel végrehajtott NMR-pH titrálást indikátor molekulaként klórecetsavat, ecetsavat, imidazolt és trisz(hidroximetil)aminometánt (Tris) használva végeztük, melyek mindegyikét a

Sigma-Aldrich gyártótól szereztük be. A titrálások oldószereként kétszer desztillált Millipore vizet használtunk, a kereskedelemből beszerzett anyagokat további tisztítás nélkül alkalmaztuk.

A protonálódási állandó meghatározását az aszpartám és a szitagliptin esetében NMR-pH titrálással végeztük, melyet az utóbbi vegyületnél CE-pH titrálással is kiegészítettünk. A pregabalin-származékok sav-bázis tulajdonságait kizárólag CE-pH titrálással vizsgáltuk. A vinka alkaloidok, az imperanén és a dapoxetin esetében a pontos protonálódási állandókat nem határoztuk meg, kizárólag egy előkísérlet sorozatot hajtottunk végre, amellyel a kapilláris elektroforézis méréseknél alkalmazható pH tartomány nagyságrendjét határoztuk meg.

5.1.2 NMR-pH titrálások

Az aszpartám protonálódási állandóinak meghatározására egycsöves ^1H NMR-pH titrálást végeztünk *in situ* pH mérésrel [249], 0,15 M ionerősség mellett, $25,0 \pm 0,1$ °C hőmérsékleten. A titrálást $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1 arányú oldószerben végeztük, referenciaként DSS-t ($\delta=0,000$ ppm) használva. A spektrumokat 128 tranziensből vettük fel 4800 Hz-es spektrális ablakkal, melyet 32K adatpontba gyűjtve 0,3 Hz/pont digitális felbontást értünk el. Törzsoldatunk 3 mM Asm-t, illetve a pH 1,7-9,2 tartományban pontos *in situ* pH mérésre alkalmas indikátor molekulákból (klórecetsav, ecetsav, imidazol, Tris) 2-2 mM-t tartalmazott [254]. Az ionerősség stabilizálására (0,15 M) 0,14 M NaCl-t használtunk. Titráló ágensként 0,1 M HCl-t, ill. 0,1 M NaOH-t adagoltunk 5-20 μl részletekben a mérések között Hamilton fecskendőből, majd a mintákat homogenizáltuk. Az egyes spektrumokhoz tartozó aktuális pH-t a megfelelő indikátor molekula aktuális kémiai eltolódásából a (2.17) egyenletnek megfelelően számítottuk. Az egyes indikátorok protonálódási állandóit irodalmi adatokból merítettük [254]. Az Asm protonok kémiai eltolódásából és az aktuális pH értékből NMR-pH adatsorokat készítettünk. A vízjel elnyomására előtelítő (presaturation) pulzust alkalmaztunk.

A szitagliptin protonálódási állandóit az aszpartámmal ellentétben nem egycsöves *in situ*, hanem *egyedi minták* módszerével határoztuk meg. Az ^1H NMR-pH titrálásokat 0,1 M NaCl jelenlétében 30 mM foszfát pufferben végeztük 6,23-10,15 pH tartományban. A pH pontos meghatározása kalibrált, kombinált üvegelektroddal történt. Titrálószerként 0,1 M HCl, ill. NaOH, míg referenciaként DSS ($\delta=0,000$ ppm) szolgált.

A kísérleteket H₂O/D₂O 9/1 elegyben végeztük, *dpgse_water* pulzusszekvenciát alkalmazva a vízjel elnyomására. Mintánként 128-256 tranziens rögzítettünk 5400 Hz-es ablakkal, melyet 64K adatpontba gyűjtve 0,17 Hz/pont-os felbontást kaptunk. A SgI protonok kémiai eltolódását és az aktuális pH-t felhasználva NMR-pH adatsorokat szerkesztettünk.

Az NMR-pH adatsorok együttes kiértékelése az OPIUM programmal történt [255], a spektrumok feldolgozására a Mestre-C programot valamint a MestreNova 5.3.1-4825 szoftvert használtuk.

5.1.3 CE-pH titrálások

A vegyületek protonálódási állandóinak pontos meghatározását kapilláris elektroforézissel a két pregabalin-származék (Tos-preg, Dns-preg) illetve a szitagliptin esetében végeztük el. Kísérleteinket egy diódasoros detektorral felszerelt ^{3D}CE készüléken (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) végeztük, adatainkat a HP^{3D} CE Chemstation szoftverrel dolgoztuk fel. Méréseinkhez valamennyi esetben kezeletlen szilika kapillárist használtunk (50 µm belső átmérő, 64,5 cm teljes hossz, 56 cm effektív hossz), melyet az Agilentől szereztünk be. Az új kapillárisok kondicionálását 30 percig 1 M NaOH-dal, majd 60-60 percig 0,1 M NaOH-dal és pufferrel végeztük. A tálcát és a kapillárist 25 °C-ra termosztáltuk, a mérések során +30 kV feszültséget alkalmaztunk. A több hullámhosszon történő UV detektálás mellett (200, 215, 230 nm) az áramerősséget és feszültséget is monitoroztuk. A kapillárist minden kísérlet előtt két percig vízzel, egy percig 0,1 M NaOH-dal, egy percig újra vízzel, végül két percig a háttélektrolittal prekondicionáltuk. A mintákat hidrodinamikai injektálást (50 mbar, 4 mp) alkalmazva juttattuk a kapillárisba. Minden esetben három párhuzamost végeztünk.

Tozilezett pregabalinból 1,6 mM, míg Dns-preg-ből 2,0 mM koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, melyek az oldódás elősegítésére 20 V/V% MeOH-t és 0,1 V/V%, EOF markerként szolgáló DMSO-t tartalmaztak. A CE-pH titrálások során háttélektrolitként 50 mM foszfát és acetát puffereket (illetve egyes pH értékeken ezek keverékeit) használtunk a megfelelő pufferkapacitás fenntartása érdekében. A pH-t 1,99 és 5,99 között változtattuk, a pontos értéket kalibrált üvegelektrod segítségével határoztuk meg.

A szitagliptin sav-bázis tulajdonságait az NMR-pH titrálás mellett CE-pH titrálással is jellemeztük. A vegyület törzsoldata 0,1 mM (*R*)- és (*S*)-szitagliptint, 1 V/V% MeOH-t valamint 0,1 V/V% DMSO-t tartalmazott. A méréseket 30 mM foszfát pufferben, 2,01 és 10,56 közötti pH-n végeztük, a pH-t kalibrált üvegelektroddal mérve.

A protonálódási állandók számítása a 2.5.2 fejezetben leírtak alapján történt. A migrációs időkből a (2.4) egyenletnek megfelelően effektív mozgékonytságot számítottuk, amit a pH függvényében ábrázolva jutottunk titrálási görbékhez. A görbe pontjait a (2.24) egyenlet segítségével illesztettük, ehhez a μ_{eff} -pH adatsorokból az OPIUM program segítségével kalkuláltuk a protonálódási állandókat és az egyes protonáltsági izomerek határmozgékonyságait [255].

A vinka alkaloidok, az imperanén és a dapoxetin esetében kísérletsorozatokat végeztünk kapilláris elektroforézissel különböző pH-jú és alapú puffereket alkalmazva annak megállapítására, hogy milyen háttérelektrolitot alkalmazva lesz a komplex stabilitási állandók és a királis elválasztás vizsgálata megfelelő. Ennek következtében itt a protonálódási állandók pontos megállapítására nem került sor, annak értékét csak közelítőleg határoztuk meg.

5.2 Ciklodextrinekkel való kölcsönhatások vizsgálata

5.2.1 Anyagok

A ciklodextrinekkel való kölcsönhatások vizsgálata során alkalmazott valamennyi ciklodextrint a Cyclolab Kft-től kaptuk. Ezen vizsgálatok kiterjednek a kapilláris elektroforézissel illetve NMR-rel elvégzett komplex stabilitási vizsgálatokra, királis elválasztásokra, valamint az NMR spektroszkópiával elvégzett sztöchiometriai és komplex térszerkezeti vizsgálatokra. Az 5. táblázatban a vizsgálataink során alkalmazott ciklodextrineket azok rövidítésével, szubsztituenseivel és szubsztitúciós fokával együtt tüntettük fel.

5. táblázat. A munkánk során alkalmazott ciklodextrinek, azok rövidítése, szubsztituensei és szubsztitúciós foka (DS).

| CD-származék | rövidítés | szubsztituens | DS |
|--|------------------|---|-------------------|
| α -CD | α -CD | (-) | 0 |
| β -CD | β -CD | (-) | 0 |
| γ -CD | γ -CD | (-) | 0 |
| Random metil-α-CD | RAMEA-CD | -CH ₃ | ~10 |
| Random metil-β-CD | RAMEB-CD | -CH ₃ | ~12 |
| Random metil-γ-CD | RAMEG-CD | -CH ₃ | ~14 |
| Heptakis(2,6-di-O-metil)- β -CD* | DIMEB-CD | -CH ₃ | ~14 |
| Hexakis(2,3,6-tri-O-metil)- α -CD | TRIMEA-CD | -CH ₃ | 18 |
| Heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- β -CD | TRIMEB-CD | -CH ₃ | 21 |
| Oktakis(2,3,6-tri-O-metil)- γ -CD | TRIMEG-CD | -CH ₃ | 24 |
| 2-hidroxipropil- α -CD | HP- α -CD | -CH ₂ -CH(OH)-CH ₃ | ~3 |
| 2-hidroxipropil- β -CD | HP- β -CD | -CH ₂ -CH(OH)-CH ₃ | ~3; ~4,5; ~6,3 |
| 2-hidroxipropil- γ -CD | HP- γ -CD | -CH ₂ -CH(OH)-CH ₃ | ~3 |
| Random acetyl- β -CD | Ac- β -CD | -COCH ₃ | ~7; ~15 |
| 6-monodezoxi-6-monoamino- β -CD hidroklorid | MA- β -CD | -NH ₂ | 1 |
| 6-Monodezoxi-6-mono(2- hidroxi)propilamino- β -CD hidroklorid | PA- β -CD | -CH ₂ -CH(OH)-CH ₂ - NH ₂ | 1 |
| Karboximetil-α-CD nátrium só | CM- α -CD | -CH ₂ COO ⁻ | 3 |
| Karboximetil-β-CD nátrium só | CM- β -CD | -CH ₂ COO ⁻ | 1; ~3 |
| Karboximetil-γ-CD nátrium só | CM- γ -CD | -CH ₂ COO ⁻ | 3 |
| Karboxietil-β-CD | CE- β -CD | -(CH ₂) ₂ COOH | ~3 |
| Szulfopropil-α-CD nátrium só | SP- α -CD | -(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻ | ~2 |
| Szulfopropil-β-CD nátrium só | SP- β -CD | -(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻ | ~2; ~4 |
| Szulfopropil-γ-CD nátrium só | SP- γ -CD | -(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻ | ~2 |
| Szulfohidroxipropil-β-CD nátrium só | SHP- β -CD | -CH ₂ CH(OH)CH ₂ SO ₃ ⁻ | ~2 |

| | | | |
|--|-------------------|--|--------|
| Szulfohidroxipropil- γ -CD nátrium só | SHP- γ -CD | $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ | ~2 |
| Szukcinil- β -CD | Suc- β -CD | $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ | ~4; ~6 |
| Foszfátált- β -CD nátrium só | P- β -CD | $-\text{PO}(\text{OH})\text{O}^-$ | ~4 |
| Szulfobutiléter- α -CD nátrium só | SB- α -CD | $-(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3^-$ | ~4 |
| Szulfobutiléter- β -CD nátrium só | SB- β -CD | $-(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3^-$ | ~4; ~6 |
| Szulfobutiléter- γ -CD nátrium só | SB- γ -CD | $-(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3^-$ | ~4 |

* A metilezett CD származékok triviális nevében szereplő szorzók és az ezeknek megfelelő rövidítések hagyományosan a glükopiranoz egységenként előforduló szubsztituensek számát jelölik.

A táblázatban feltüntetett ciklodextrinek nem mindegyikét alkalmaztuk az összes vegyületnél. Az egyes anyagoknál konkrétan használt CD-eket az adott vegyület eredményeinek ismertetésénél pontosítjuk.

A kapillaris elektroforézisnél és NMR kísérleteknél a pufferek készítéséhez használt HCl, NaOH, NaCl, foszforsav és foszfát sók, ecetsav, H_3BO_3 és MeOH mind analitikai tisztaságúak voltak és a Reanal vagy Sigma-Aldrich gyártóktól származtak. Az oldatokat minden esetben kétszer desztillált vízzel készítettük, az NMR kísérleteknél a Sigmától beszerzett D_2O -t (>99,8%) alkalmaztunk.

5.2.2 Kapillaris elektroforézis

A kapillaris elektroforézis módszer kiválóan alkalmas mind a ciklodextrin-vendég zárványkomplexek stabilitásának jellemzésére, mind az egyes enantiomerek királis elválasztásának tanulmányozására. A stabilitási állandók vizsgálatát valamennyi vegyülettel elvégeztük, a királis elválasztást pedig egyedül az aszpartám esetében nem tanulmányoztuk.

Kísérleteinket egy diódasoros detektorral felszerelt $^{3\text{D}}$ CE készüléken (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) végeztük, adatainkat a HP $^{3\text{D}}$ CE Chemstation szoftverrel dolgoztuk fel. Munkánk során mindvégig kezeletlen szilika kapillarisokat használtunk (50 μm belső átmérő, 64,5 cm teljes hossz, 56 cm effektív hossz), melyeket első használat előtt és az egyes mérések között a 5.1.3 fejezetben leírtaknak megfelelően kezeltünk. A méréseket a kapillaris belső hőmérsékletét 25 °C-on tartva, +30 kV feszültséget alkalmazva végeztük, a minták injektálása hidrodinamikusan, 200 mbar-s nyomással történt. Az ettől való eltéréseket az adott kísérletnél külön jelezzük. A

detektálás három hullámhosszon, 200, 215 és 230 nm-en történt. EOF markerként valamennyi esetben DMSO-t (Reanal) használtunk 0,1 V/V%-ban, oldatainkat kétszer desztillált vízzel készítettük. Valamennyi kísérletből három párhuzamost végeztünk.

Az aszpartám-CD komplex stabilitási vizsgálatokat CE-vel két háttérelktrolitban (pH=9,0, 75 mM borát puffer; pH=2,5, 50 mM foszfát puffer) vizsgáltuk, hogy mind a pozitív, mind a negatív töltésű részecske komplexképzéséről információt kapjunk. A stabilitás vizsgálatához a natív, RAMEB-, DIMEB-, TRIMEA-, TRIMEB-, TRIMEG-, HP- β - (DS~3, 4,5, 6,3), CM- β -, CE- β -, SP- β - (DS~2), MA- β -, Ac- β - (DS~7) és P- β -CD-eket használtuk fel. Az Asm törzsoldat 3,4 mM-os volt, valamint 10 V/V% MeOH-t tartalmazott.

A pregabalin-származékok és valamennyi egyéb vizsgált molekula esetében a kialakuló komplexek stabilitásvizsgálata mellett célunk volt a királis elválasztás tanulmányozása és megvalósítása is. A Tos-preg és Dns-preg esetében a kísérleteket négy (a protonálódási állandók alapján kiválasztott) pH értéken (pH=9,2 – 80 mM borát; pH=7,2 – 50 mM foszfát; pH=4,7 – 50 mM acetát; pH=2,5 – 15 mM foszfát puffer) végeztük a különböző töltésű gazda- és vendégmolekulák közötti eltérő kölcsönhatások tanulmányozása érdekében. A három magasabb pH-n +30 kV, míg a legsavasabb értéken -25 kV feszültséget alkalmaztunk. A vizsgálatokhoz mindkét származék esetében 29 különböző ciklodextrint használtunk fel.

A vinka alkaloidok CD komplexeinek vizsgálatát mindhárom natív ciklodextrinnel, valamint ezek random metil-, hidroxipropil-, szulfobutil- és karboximetil-származékaival végeztük el. A mérésekhez 33,5 cm teljes hosszúságú (25 cm effektív hossz), 50 μ m belső átmérőjű kapillárist használtunk, a detektálás 200 nm-en történt. A 2,5-ös pH-jú háttérelktrolit 15 mM-os NaOH-ból készült 10 m/m%-os foszforsav adagolásával. A minták metanolos törzsoldata 1 mg/ml koncentrációjú volt.

Az imperanén, szitagliptin és dapoxetin esetében mind az átlagos komplex stabilitást, mind a királis elválasztást kizárólag kapilláris elektroforézissel vizsgáltuk. A dapoxetin esetében az optimalizált királis elválasztást az ICH irányelveknek megfelelően validáltuk. Mindhárom anyag esetén a vizsgálatokat számos, rendre 27, 29, illetve 22 ciklodextrinnel végeztük el.

Az Ipn-nek két UV elnyelési maximuma van 210 és 268 nm-en, azonban mivel 268 nm-en a jel/zaj arány kedvezőtlenebbnek bizonyult, 210 nm-en detektáltunk.

Háttérelektrolitként pH=9,0-ra beállított 75 mM borát puffert használtunk, ebben az imperanén fenolos OH csoportjai részlegesen deprotonáltak (az előzetes kísérletek alapján pH=7,0-n a vegyület semleges és az EOF-fel migrál), így a vegyület megfelelő töltéssel rendelkezik a CE vizsgálatokhoz. Az Ipn törzsoldat 0,2 mM koncentrációjú volt, és az EOF marker mellett 1,5 V/V% MeOH-t tartalmazott.

A szitagliptin törzsoldattal (0,1 mM mindkét enantiomerre, 1 V/V% MeOH) végzett kísérleteket az előzetes mérések alapján kiválasztott 6,0 pH-jú 30 mM foszfát pufferben végeztük.

A dapoxetinnel 50 mM acetát pufferben (pH=5,5) végeztük az elektroforézist. A törzsoldat a Dpx rossz vízoldhatósága miatt MeOH-ban készült és a vizsgálandó anyagra 0,1 mg/ml koncentrációjú volt.

Az átlagos stabilitási állandók vizsgálata során a vendégmolekulát először CD nélküli, majd annak növekvő koncentrációit (5-50 mM) tartalmazó háttérelektrolitban futtattuk, ezután effektív mozgékonyságokat számítottunk. Az effektív mozgékonyságból és az aktuális CD koncentrációból a 3.4.4.1 fejezetben bemutatottak szerint x-reciprok módszerrel, grafikus úton számítottuk ki az egyes stabilitási állandókat.

A királis elválasztás jellemzésére a felbontási értéket (R_S) használtuk, melyet a (2.11) egyenletnek megfelelően számítottunk. A legjobb felbontást - az egyes enantiomer-CD komplexek stabilitásának ismeretében - legtöbbször a Wren egyenlete (2.13) alapján számolt CD koncentrációnál tapasztaltuk. Az enantiomerek azonosítása minden esetben a racém mintához adott izomertiszta anyaggal történt.

5.2.3 NMR spektroszkópia

A kapilláris elektroforézis mellett a CD-vendég komplexek stabilitásának megállapítására és egyes esetekben a királis elválasztás megfigyelésére az NMR spektroszkópia is kiváló módszer. A kapilláris elektroforézissel szemben a jobb reprodukálhatóság mellett nagy előnye, hogy a stabilitási állandókat több adatsorból számíthatjuk, így pontosabb értéket kaphatunk (igaz némileg eltérő körülmények mellett pl. oldószer), valamint semleges molekulák komplexei is tanulmányozhatók ezzel a módszerrel. Méréseinket ez esetben is a 600MHz Varian VNMRs spektrométeren végeztük, azonos mérőfejet alkalmazva H₂O/D₂O 9/1 elegyben, a vízjel elnyomására

pedig előtelítő (presaturation) pulzust alkalmazva. A spektrumokat $T=25,0 \pm 0,1$ °C-on, számított mennyiségű NaCl hozzáadásával $I=0,15$ M mellett regisztráltuk. Belső referenciaanyagként MeOH-t ($\delta=3,300$ ppm) alkalmaztunk. Komplex stabilitási vizsgálatokban egy anyag akkor lehet jó referens, ha bizonyítható, hogy az adott koncentrációban nem lép számottevő interakcióba a gazdamolekulával. Ennek igazolására egy külön kísérletet végeztünk, melyben *insert* csőben lévő, D₂O-ban oldott DSS szolgált referenciaként a metanol proton kémiai eltolódásváltozásának vizsgálatához. 10 mM β -CD-t adva az oldathoz a MeOH kémiai eltolódásváltozása 0,002 ppm-nek adódott, ami elhanyagolható, figyelembe véve a kémiai eltolódásváltozás bizonytalanságát ($\pm 0,002$ ppm). Ennek megfelelően a MeOH megfelelő referenciaanyag a CD komplexek NMR spektroszkópiás vizsgálatához [202]. A spektrumokat 32–128 tranziensből (kísérlettől függően) vettük fel 4800 Hz-es spektrális ablakot használva, melyet 32K adatpontba gyűjtve 0,3 Hz/pontos digitális felbontást kaptunk.

A látszólagos stabilitási állandók meghatározása NMR titrálás révén az aszpartám és a vinka alkaloidok esetében történt a CD-ek egy szűk körével. A mintákat a mérés előtt 12 óráig állni hagytuk az egyensúly beállításához. Az egyes adatpontokhoz tartozó kémiai eltolódást a $[CD]/[Asm]$ arány függvényében ábrázolva egy telítési görbét kapunk valamennyi gazda- illetve vendégmolekula magra. Az adatsorokból ezután az OPIUM program segítségével számítható a komplex stabilitási állandója, valamint a komplexált és szabad részecskék határeltolódásai a 3.4.4.2 fejezetben bemutatottaknak megfelelően. Ezek ismertében a (2.10) egyenlettel a titrálási pontok jól illeszthetők.

Aszpartám esetében a vizsgálatokat pH=5,2-n acetát pufferben (50 mM) végeztük a semleges (ikerionos) részecske komplexképzésének tanulmányozására, valamint pH=9,0-n külön kísérletet végeztünk annak vizsgálatára, hogy a lúgos pH-n legstabilabbnak bizonyuló komplex állandója NMR-rel meghatározva mennyinek adódik. Az Asm-t (1 mM) és CD-t (10 mM) tartalmazó törzsoldatokat úgy elegyítettünk, hogy a vizsgálandó oldatban a $[CD]/[Asm]$ arány 0,3 és 50 között változzon. A vizsgálatot pH=9,0-n Ac- β -CD-nel (DS~7), pH=5,2-n β -, TRIMEA-, MA- β - és Ac- β -CD-nel (DS~7) végeztük el.

A kapilláris elektroforézissel meghatározott stabilitási állandókat a vinka alkaloidok esetében NMR kísérletekkel is alátámasztottuk. A kísérleteket H₂O/D₂O 9/1

oldószerben 15 mM foszfát pufferben (pD=2,5, I=0,1 M) végeztük. Az enantiomerek azonosítása az izomertiszta (*S*)-enantiomer hozzáadásával történt. Az alkaloid törzsoldat 2 mM, míg a CD törzsoldat 20 mM koncentrációjú volt, melyeket megfelelő arányban elegyítve 1,2-166 [CD]/[alkaloid] arányt értünk el. A stabilitási állandókat csak megfelelő intervallumban ($K=10\cdot 10^4\text{ M}^{-1}$) lehet NMR spektroszkópiával meghatározni, érdeklődésünk pedig kifejezetten a nagyobb különbséget mutató, királis elválasztást okozó komplex stabilitási állandóinak meghatározására irányult, így ezzel a módszerrel a vinkadiformin-CM- γ -CD és vinkadiformin-HP- γ -CD komplexeket vizsgáltuk, melyek kiválasztása az előzetes CE kísérletek alapján történt.

A stabilitási állandó meghatározása mellett az NMR spektroszkópia kiválóan alkalmas a zárványkomplexek átlagos sztöchiometriájának meghatározására is. Ennek megállapítására Job módszere kézenfekvően alkalmazható [224]. A gazda-vendég arányt a kialakuló komplexekben az aszpartám-CD és Dpx-CD kölcsönhatások kivételével valamennyi esetben meghatároztuk ^1H NMR titrálással, a szitagliptin esetében a vegyület fluortartalma miatt ez kiegészíthetővé vált ^{19}F NMR titrálással is. A titrálásokat $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1 arányú oldószerkeletben, mindig az adott komplex CE vizsgálatának megfelelő pH-n és pufferalkotóban vizsgáltuk. Referenciaként ezen kísérletekben is 0,05 V/V% MeOH-t alkalmaztunk. A mérések kivitelezése a 3.4.4.2-ben leírtaknak megfelelően történt. A spektrumok felvételéhez kísérlettől függően 32-256 tranzienszt regisztráltunk, a vízjel elnyomására a *presaturation* pulzusszekvenciát alkalmaztuk. A pregabalin-származékok esetében 5 mM Tos-preg ill. Dns-preg és 5 mM β -CD törzsoldatokból indultunk ki, a kísérleteket 7,2 pH-jú foszfát pufferben végeztük. A vinka alkaloid-CD komplexek átlagos sztöchiometriájának megállapítását vinpocetin/RAMEB-CD és vinkadiformin/HP- γ -CD rendszerekben végeztük el mindkét enantiomerrel 15 mM foszfát pufferben (pH=2,5). Mind az alkaloid, mind a CD törzsoldatok 2-2 mM koncentrációjúak voltak. Az Ipn Job analízisét 1 mM (*S*)-imperanén és 1 mM HP- β -CD illetve 1 mM SB- γ -CD törzsoldatokból kiindulva 50 mM foszfát pufferben (pH=9,0) végeztük el. A szitagliptin esetében a sztöchiometria meghatározásának a kölcsönható anyagok ((*R*)-Sgli és β -CD vagy SB- β -CD) koncentrációját 4 mM-on tartottuk, a vizsgálatokat 30 mM foszfát pufferben végeztük (pH=5,5). A ^{19}F méréseket Varian Mercury Plus spektrométeren (400 MHz) végeztük a Semmelweis Egyetem Szerves Kémiai Intézetében. Ezen kísérletekben a Sgli fluor

atomjainak jelét követtük nyomon, referenciaként NaF-ot ($\delta=-122,000$ ppm) alkalmazva. Valamennyi esetben a CD törzsoldatok koncentrációjának számításakor a CD-k víztartalmát figyelembe vettük.

A zárványkomplex szerkezetének meghatározására 2D ROESY spektroszkópiát alkalmaztunk a 3.4.4.2-ben bemutatottak szerint. Ilyen vizsgálatokat az aszpartám, a pregabalin-származékok, a vinka alkaloidok, az imperanén és a szitagliptin komplexeinek esetében végeztünk. A ROESY kísérleteket 256-512 inkrementummal, 16-32 tranziensből vettük fel 100 és 500 ms közötti keverési idővel 2,2 kHz spinlock teret alkalmazva. Az oldószer valamennyi esetben D₂O volt. Az adatokat 4000 (F2) * 1000 (F1) adatpontos mátrixként dolgoztuk fel a továbbiakban. Az aszpartám- β -CD komplexek vizsgálata során 1 mM CD-t és 2 mM Asm-ot tartalmazó pD=5,2 acetát pufferben dolgoztunk. A pregabalin-származékok esetén 70 mM Na₂HPO₄-ban, további pH beállítás nélkül végeztük el a kísérleteket. Az egyes minták 5 mM Tos-preg vagy Dns-preg vendégmolekulát és 5 mM β -, γ -, illetve PA- β -CD-t tartalmaztak így összesen hat komplex térszerkezetét vizsgáltuk. A vinka alkaloidok CD komplexeinek térszerkezetét pD=2,5 oldatban vizsgáltuk 5 mM alkaloidot és 3 mM CD-t tartalmazó rendszerekben. Ilyen vizsgálatokat a CE elővizsgálatok alapján érdekes, migrációs sorrend változást okozó rendszerekben, vagyis vinpocetin - HP- β -CD/HP- γ -CD, vinkadiformin - HP- β -CD/HP- γ -CD, vinkadiformin - RAMEB-CD/RAMEG-CD (üregméretfüggő megfordulás) és vinpocetin - HP- β -CD/RAMEB-CD (szubsztituensfüggő megfordulás) végeztünk. Ipn esetében a ROESY spektrumokat 1 mM (*S*)-Ipn-t és vagy 3 mM HP- β -CD-t (DS~4,6) vagy 3 mM β -CD-t vagy 3 mM SB- β -CD-t tartalmazó rendszereket vettünk fel, mely CD-eket a CE kísérletek eredményei alapján választottuk. A Sgli ROESY kísérleteihez 5 mM (*R*)-Sgli tartalmú 30 mM NaH₂PO₄ törzsoldatot használtunk saját pH-n, melyhez vagy 3 mM β -CD vagy 3 mM SB- β -CD vagy 2-2 mM β -/SB- β -CD duál CD komplexképzőt adtunk.

6. Eredmények, megbeszélés

6.1 Protonálódási állandók meghatározása

A töltésfüggő komplexképződési és komplex stabilitási vizsgálatok elvégzése megköveteli, hogy elsősorban tisztában legyünk a jelenlévő molekulák átlagos töltésével. Ennek megállapításához a protonálódási állandók meghatározása vagy ismerete létfontosságú. A protonálódási állandók nagy pontosságú meghatározását a vizsgált vegyületek közül négyenél (Asm, Tos-preg, Dns-preg, Sgli) végeztük el, ezek közül a szitagliptin esetében két, egymástól független módszert alkalmazva. A további vegyületek esetében vagy irodalmi adatokra támaszkodva (vinka alkaloidok, Dpx) vagy előzetes vizsgálatok alapján (Ipn és Dpx) állapítottuk meg a későbbi CE és NMR vizsgálatokra alkalmas pH-t.

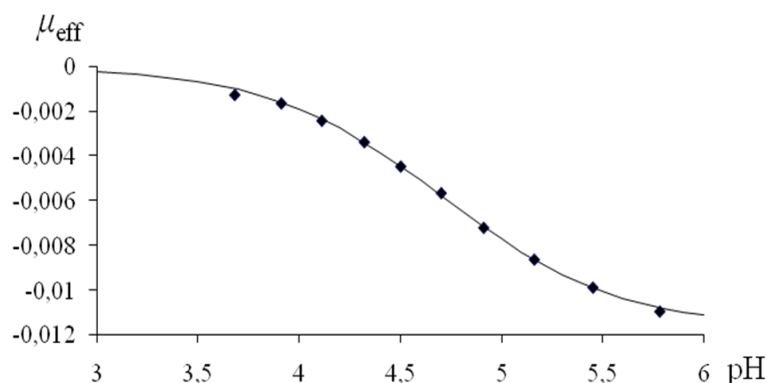
6.1.1 CE-pH titrálások

A CE-pH titrálások során a háttélektrolit pH-ját változtatva érhető el, hogy a vizsgált vegyület eltérő protonáltsági állapotba kerüljön, és így eltérő migrációs idővel érje el a detektort. A BGE pH-ja természetesen nem csak a vizsgált vegyület, hanem az EOF mozgékonyágát is befolyásolja (bizonyos határokon belül), így a migrációs idők és a kapilláris paraméterek ismeretében a protonálódási állandók meghatározására az effektív mozgékonyágat használjuk, melyet a (2.4) egyenletnek megfelelően számíthatunk ki. A CE-pH titrálásokkal megbízhatóan meghatározható protonálódási állandók a kb. $3,5 \leq pK_s \leq 9,5$ tartományba esnek. A háttélektrolitok pH-ját minden esetben kalibrált üvegelektrod segítségével állítottuk be. A megfelelő pK_s értékek kiszámítása a $\mu_{\text{eff}}\text{-pH}$ adatsorokból, az OPIUM program segítségével történt. Minden esetben három párhuzamos mérést végeztünk.

6.1.1.1 Pregabalin

A protonálódási állandók meghatározását mindkét pregabalin-származék esetében CE-pH titrálással végeztük el. A származékok közül a Tos-preg egy karboxil, míg a Dns-preg egy karboxil- és egy tercier aminocsoporttal rendelkezik (14. ábra). A titrálás pH tartományát előzetes kísérletek alapján Tos-preg esetében pH 3,68-5,78, míg Dns-preg esetében pH 1,99-5,99 közöttinek választottuk. A migrációs időkből számolt

effektív mozgékonyaságokat a pH függvényében ábrázolva titrálási görbékhez jutunk, melyeket az 15. ábrán a Tos-preg esetében szemléltetünk.



15. ábra. A Tos-preg CE-pH titrálási görbéje.

A μ_{eff} – pH adatsorokból az OPIUM program segítségével a vegyületek pK_s értékeit és az egyes protonáltsági izomerek egyedi migrációs időit számoltuk ki. Ezek (2.19) egyenletbe helyettesítésével vált lehetővé a görbe illesztése a függvény pontjaira. A Dns-preg esetében, mivel két protonálódási állandóval rendelkezik, az egyenlet módosított formáját alkalmaztuk (5.1):

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{A}^-} + \mu_{\text{HA}} \cdot 10^{\text{p}K_{\text{s}2} - \text{pH}} + \mu_{\text{H}_2\text{A}^+} \cdot 10^{\text{p}K_{\text{s}1} + \text{p}K_{\text{s}2} - 2\text{pH}}}{1 + 10^{\text{p}K_{\text{s}2} - \text{pH}} + 10^{\text{p}K_{\text{s}1} + \text{p}K_{\text{s}2} - 2\text{pH}}} \quad (5.1)$$

A pregabalin Tos-preg és Dns-preg származékaira determinált savi disszociációs állandókat a 6. táblázat mutatja.

6. táblázat. A pregabalin-származékok CE-pH titrálással meghatározott savi disszociációs állandói.

| Származék | pK_{s1} | pK_{s2} |
|-----------|-----------------|-----------------|
| Tos-preg | $4,75 \pm 0,02$ | |
| Dns-preg | $3,47 \pm 0,06$ | $4,67 \pm 0,06$ |

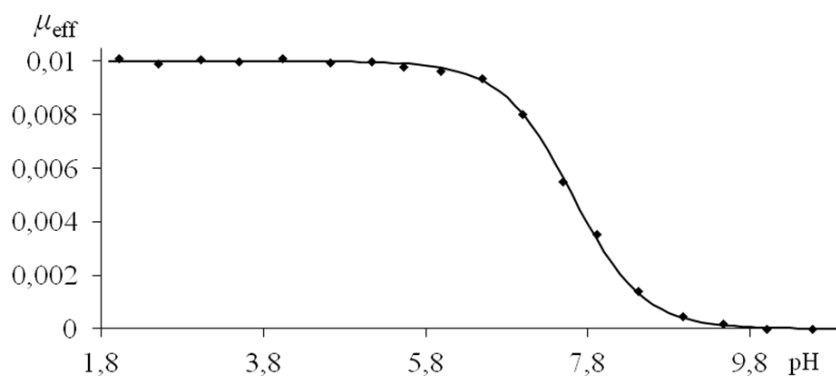
Vagyis a tercier aminocsoport protonálódása $\text{pH}=4,67$ -nél következik be a Dns-preg származéknál, míg a karboxilcsoportok $\text{pH}=4,75$ -n, illetve $\text{pH}=3,47$ -n protonálódnak rendre a tozilezett és danzilezett vegyületeknél. Mivel a Dns-preg protonálódási állandói átfednek egymással, az állapítható meg, hogy alacsonyabb pH-n döntően a karboxil, míg magasabb pH-n döntően az amino funkció protonálódása következik be. A danzil molekularészlet aminocsoportjának protonálódását más, nem-pregabalin származékok

esetében már jellemezték, ahol szintén hasonló nagyságrendűnek adódott ($pK_s \approx 4,1-4,3$) [256]. A kapilláris elektroforézis kísérletekben alkalmazott háttér elektrolytok pH-ját a fenti állandóknak megfelelően választottuk ki:

- pH=9,2, ahol mindkét származék negatív töltésű;
- pH=7,2, ahol a származékok szintén negatív töltésűek, azonban a pozitív töltésű CD-k csak részlegesen protonáltak és az analízis pH-ja jól közelíti a biológiailag releváns értéket;
- pH=4,7, ahol a negatív töltésű és semleges részecskék összemérhető arányban vannak jelen, vagyis a származékok részlegesen negatív töltésűek;
- pH=2,5, ahol a Tos-preg csaknem 100%-ban semleges részecskeként, míg a Dns-preg pozitív ionként van jelen.

6.1.1.2 Szitagliptin

A szitagliptin esetében a sav-bázis tulajdonságokat mind kapilláris elektroforézissel, mind mágneses magrezonancia spektroszkópiával jellemeztük. A vegyület egy, a protonálódás szempontjából jelentős primer aminocsoporttal rendelkezik a kiralitáscentrumhoz kapcsolódóan (8. ábra). A vegyület CE-pH titrálását a 2,01-10,56 pH tartományban végeztük el foszfát pufferben. A korábban tárgyaltaknak megfelelően a μ_{eff} -pH adatsorokat ábrázoltuk függvényként és ezekből számoltuk ki a savi disszociációs állandókat és az egyes protonáltsági izomerek migrációs idejét. A szitagliptin titrálási pontjait és az azokra illesztett görbét az 16. ábra szemlélteti.



16. ábra. A szitagliptin CE-pH titrálási görbéje.

A titrálás alapján a Sgli aminocsoportjának savi disszociációs állandója $pK_s = 7,61 \pm 0,07$. Ez az állandó némiképp alacsonyabb, mint a hasonló primer amino

funkcióké általában ($pK_s \sim 9-10$). Ennek a csökkent bázicitásnak magyarázata lehet az elektronszívó trifluor-aromásgyűrű közelsége illetve az amino- és karbonilcsoportok között esetlegesen kialakuló hidrogénhid. Az állandó meghatározását az eredmény megerősítése végett NMR-pH titrálással is elvégeztük.

6.1.1.3 Imperanén és dapoxetin

Az imperanén és dapoxetin pK_s értékeit pontosan nem határoztuk meg, kizárólag előzetes kísérleteket végeztünk a háttéreltrolit megfelelő pH-jának kiválasztásához. Az imperanén két fenolos hidroxilcsoporttal rendelkezik (7. ábra), a dapoxetin töltését pedig a terciar aminocsoport protonáltsági állapota határozza meg (9. ábra).

Az imperanén esetében az előzetes vizsgálatokat nyolc különböző pH-jú (pH: 5,2-10,0) és pufferalapú (acetát, foszfát, borát) rendszerben végeztük el. A vegyület pH 7,0-n még nettó semleges töltésű, az EOF-fel vándorol, ezután kezdődik meg a fenolos hidroxilcsoportok disszociációja. Ennek megfelelően a további CE kísérletekhez háttéreltrolitként pH=9,0 borát puffert választottunk, ahol a vegyület már dominánsan negatív töltésű részecskéként van jelen és az EOF-től kellő távolságra haladt. Az Ipn protonálódási állandóit a MarvinSketch program $pK_{s1}=9,81$ és $pK_{s2}=10,45$ értékeknek prediktálta.

Irodalmi adatok alapján a dapoxetin pK_s értéke 8,6, ennek megfelelően végeztük el az előzetes vizsgálatokat CE-vel [257]. Mivel pH 7,5-nél a Dpx még az EOF-fel migrált, a későbbi kísérletek során acetát puffert alkalmaztunk pH=5,5-n, ahol a vegyületnek már bizonyosan a protonált, pozitív töltésű formája dominál.

6.1.2 ^1H NMR-pH titrálások

A protonálódási állandók meghatározására az NMR-pH titrálás nagy pontosságú módszer, melynek különleges előnye a többi technikával szemben, hogy megfelelő pH meghatározást alkalmazva széles skálán (akár 0-14) meghatározhatók az állandók. A két vizsgált vegyület közül az aszpartám két protonálódási állandóját *in situ* pH mérést alkalmazva indikátor molekulák segítségével, míg a szitagliptin aminocsoportjának bázicitását hagyományosan, a pH-t kalibrált üvegelektroddal mérve határoztuk meg. Referenciaként mindkét kísérlet során DSS-t ($\delta=0,000$ ppm) alkalmaztunk.

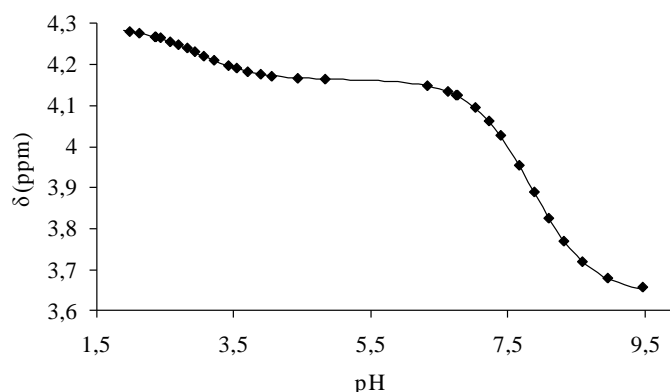
6.1.2.1 Aszpartám

Az aszpartám (3. ábra) egy karboxil- és egy primer aminocsoporttal rendelkezik, így két protonálódási lépcsőt kell a titrálás során meghatározni. Ezen disszociációs állandók meghatározása során az egycsöves titrálás módszerét alkalmaztuk *in situ* pH mérésével. Az egycsöves titrálás során alkalmazott *in situ* pH-mérésnek előfeltétele, hogy a megfelelő indikátor molekula δ_{Ind} és δ_{HInd} határeltolódásai, valamint $\log K_{\text{Ind}}$ protonálódási állandója pontosan ismertek legyenek, ugyanis a (2.17) egyenlet segítségével csak ezen paraméterek ismeretében számítható a titrálás tetszőleges pontján felvett NMR spektrumhoz tartozó pH. A 7. táblázatban foglaljuk össze a független potenciometriás mérésekkel meghatározott indikátor protonálódási állandókat. Az indikátorok határeltolódásai az NMR titrálás során a kísérleti hiba ($\pm 0,002$ ppm) határán belül maradtak. Ezzel bizonyítottnak tekintettük az indikátor molekulák alkalmazhatóságának azon feltételét is, miszerint semmilyen specifikus kölcsönhatás nem lépett fel a vizsgált vegyület és az indikátor molekula között [254].

7. táblázat. Az alkalmazott indikátor molekulák protonálódási állandói, a megbízhatóan alkalmazható pH tartomány és a kémiai határeltolódások (δ) [ppm] ($T=25,0\pm 0,01$ °C; $I=0,15$ M NaCl).

| indikátor molekula | $\log K_{\text{Ind}}$ | alkalmazhatósági pH-intervallum | δ_{Ind} | δ_{HInd} |
|--------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| klórecetsav (ClAc) | 2,70 | 1,7-3,7 | 4,049 | 4,280 |
| ecetsav | 4,51 | 3,5-5,5 | 1,907 | 2,086 |
| imidazol | 7,08 | 6,0-8,0 | 7,766 | 8,677 |
| | | | 7,128 | 7,472 |
| Tris | 8,13 | 7,1-9,1 | 3,509 | 3,733 |

A kísérletet pH=1,7-9,2 között végeztük el, az indikátor molekulák alkalmazhatóságára való tekintettel. A titrálás során az aszpartám egyes protonjainak kémiai eltolódásváltozását rögzítettük a megfelelő indikátor aktuális eltolódásából számolt pH függvényében. A kémiai eltolódásváltozás a legtöbb protonon szembetűnő volt, a legkifejezettebb azokon, melyek a protonálódásban részt vevő csoportok közelében tartózkodnak. Ennek megfelelően az aszpartám H^{14} metin protonjának eltolódását a pH függvényében ábrázolva mindkét protonálódási lépcső jól megfigyelhető, azonban a közelebb lévő primer aminocsoport protonálódására érzékenyebb (17. ábra).

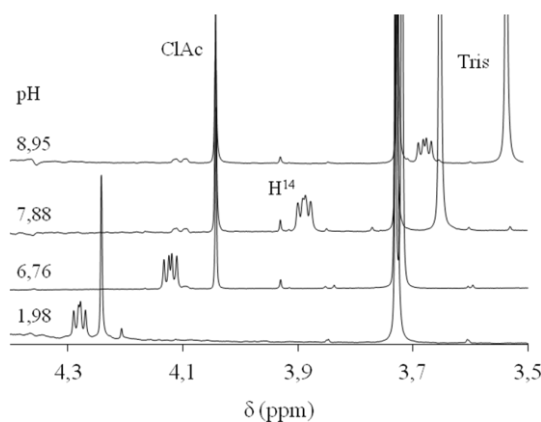


17. ábra. Az aszpartám H^{14} protonjának kémiai eltolódás-pH görbéje az NMR-pH titrálás alapján.

Az OPIUM program segítségével számolt protonálódási állandók és az egyes protonáltsági izomerek határeltolódásainak segítségével a titrálási görbe pontjaira a (5.2) egyenletnek megfelelően görbét illesztettünk.

$$\delta^{\text{obs}} = \frac{\delta_{\text{Asm}^-} + \delta_{\text{HAsm}} (10^{\log K_1 - \text{pH}}) + \delta_{\text{H}_2\text{Asm}^+} (10^{\log K_1 + \log K_2 - 2\text{pH}})}{1 + 10^{\log K_1 - \text{pH}} + 10^{\log K_1 + \log K_2 - 2\text{pH}}} \quad (5.2)$$

A számos magra meghatározott NMR-pH adatsorok alapján az aszpartám aminocsoportjának protonálódási állandója $\log K_1 = 7,83 \pm 0,02$, míg a karboxilátcsoporté $\log K_2 = 2,96 \pm 0,03$. A protonálódásra legérzékenyebben a H^{14} és H^{15a-b} protonok reagáltak, rendre $\Delta\delta = 0,623$; $0,336$ és $0,454$ ppm kémiai eltolódásváltozásokkal, míg az aromás gyűrű és metoxicsoprot protonjainak kémiai eltolódása alig mutatott változást. A H^{14} proton kémiai eltolódás-változását szemléltető, különböző pH-kon felvett spektrumsorozat a 18. ábrán látható.

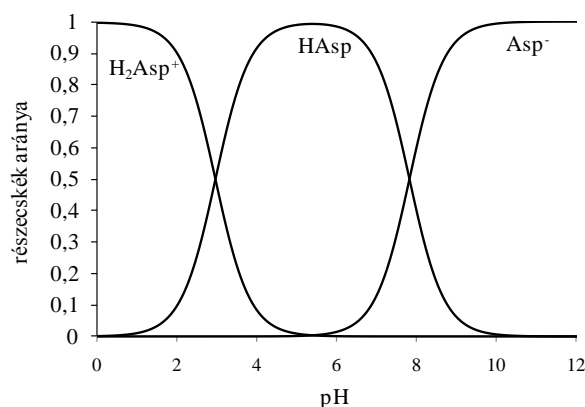


18. ábra. Az Asm H^{14} protonjának pH-függő kémiai eltolódás-változását szemléltető spektrumsorozat.

A meghatározott állandók összhangban vannak az irodalomban korábban, más módszerekkel megállapított konstansokkal [38-40]:

- Kholeif és Anderegg ($\log K_1=7,39$; $\log K_2=3,01$),
- Scriba és munkatársai ($\log K_1=7,87$; $\log K_2=3,04$ (CE)),
- Scriba és munkatársai $\log K_2=3,19$ (potenciometriás titrálás),
- Maheswaran és munkatársai ($\log K_1=7,49$; $\log K_2=3,20$).

A protonálódási állandók ismeretében megszerkeszthető a vegyület részecskeeloszlás-görbéje, mely szemlélteti, hogy az adott pH-n a részecske mely protonáltsági izomere milyen arányban van jelen. Az aszpartám állandói alapján szerkesztett görbét a 19. ábra mutatja.



19. ábra. Az aszpartám pH-függő részecskeeloszlás görbéi.

A görbéről leolvasható, hogy az egyes protonáltsági izomerek vizsgálatára mely pH értékek a legalkalmasabbak. Ezt összevetve a kapilláris elektroforézis önmagából adódó korlátaival a pozitív töltésű részecske komplexképzését $\text{pH}=2,5$, az ikerionosét $\text{pH}=5,2$, míg a negatív töltésűét $\text{pH}=9,0$ közegben vizsgáltuk.

6.1.2.2 Szitagliptin

A szitagliptin primer aminocsoportjának bázicitását CE-pH titrálás segítségével már meghatároztuk ($\text{p}K_s=7,61\pm 0,07$), azonban mivel ez váratlanul alacsonynak adódott, szükséges volt egy másik, az előzőtől független technikával is megállapítani az állandót. Erre a célra szintén NMR-pH titrálást alkalmaztunk, az egyes oldatok pH-ját ez esetben kalibrált üvegelektroddal követve nyomon. A mérést 6,23-10,15 pH tartományban végeztük el, a CE-pH titrálás eredményére hagyatkozva 30 mM foszfát pufferben az

ionerősséget állandó értéken (0,1 M) tartva. Az előzőekhez hasonlóan az egyes magok kémiai eltolódásának pH-ra vonatkoztatott függvényét ábrázoltuk. Az NMR-pH adatsorokból az OPIUM program segítségével számítottuk a határeltolódásokat és a disszociációs állandót. A függvény adatpontjaira az (5.3) egyenlet alapján illesztettünk görbét.

$$\delta^{\text{obs}} = \frac{\delta_{\text{SgIi}} + \delta_{\text{HSgIi}} 10^{\log K - \text{pH}}}{1 + 10^{\log K - \text{pH}}} \quad (5.3)$$

Az NMR-pH titrálások alapján a SgIi disszociációs konstansa $\text{p}K_s=8,03\pm 0,05$ -nek adódott, mely a CE-pH titrálás eredményével jól korrelál. A kisebb eltérések oka a különböző mérési körülmények (oldószer, hőmérséklet, ionerősség) vagy a módszer pontossága lehet.

A mérések eredményei alapján a szitagliptinnel folytatott vizsgálatokat a későbbiekben pH=6,0-n vagy attól savasabb közegben végeztük, ahol a vegyület már dominánsan pozitív ionként van jelen.

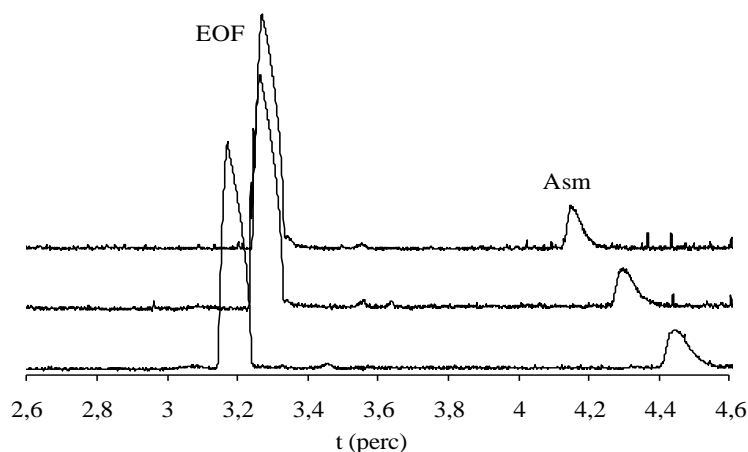
6.2 Ciklodextrinnek való kölcsönhatás vizsgálata

6.2.1 Komplex stabilitás és királis elválasztás vizsgálata

6.2.1.1 Aszpartám

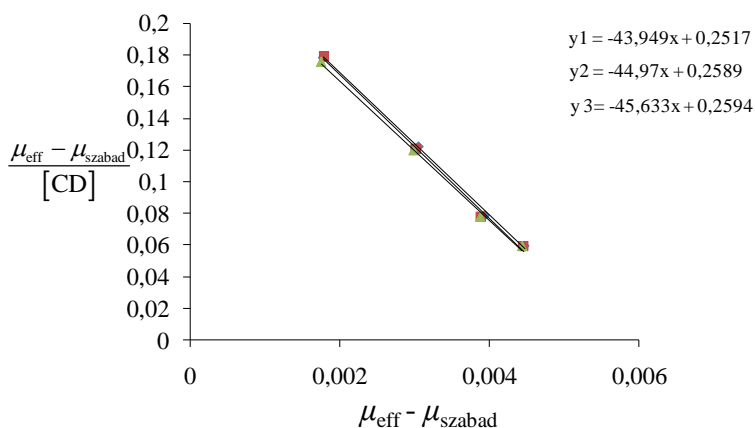
Az enantiomertiszta aszpartám esetében a ciklodextrin komplexek stabilitását vizsgáltuk két pH értéken (9,0; 2,5) kapilláris elektroforézissel és két pH értéken (9,0; 5,2) mágneses magrezonancia spektroszkópiával.

Komplex stabilitási vizsgálatok CE-vel. A CE vizsgálatokat pH 9,0 és pH 2,5 háttéreltrolitban végeztük, ahol az Asm dominánsan rendre negatív illetve pozitív töltésű részecskeként van jelen. A futtatás során az Asm effektív mobilitását az aktuális CD koncentráció függvényében vizsgáltuk. Az egyes mérések során alkalmazott növekvő CD koncentráció mind az Asm, mind az EOF mozgékonyágát befolyásolja a komplexképződés és a háttéreltrolit egyre nagyobb viszkozitása révén. A különböző koncentrációjú komplexképző okozta mobilitásváltozást a 20. ábra szemlélteti.



20. ábra. A növekvő CD koncentráció hatása az Asm és az EOF migrációs idejére.

Az effektív elektroforetikus mobilitás értéket az Asm és az EOF markerként alkalmazott DMSO migrációs időiből és a kapilláris paramétereiből a (2.4) egyenletnek megfelelően számítottuk, majd a linearizációs x-reciprok módszert alkalmazva a $\frac{\mu_{\text{eff}} - \mu_{\text{szabad}}}{[\text{CD}]}$ -t a $(\mu_{\text{eff}} - \mu_{\text{szabad}})$ függvényében ábrázoltuk. A függvény pontjaira egyenest illesztve a komplex stabilitás a 21. ábrán bemutatottnak megfelelően, az egyenesek meredekségéből számítható, és az Asm-HP- β -CD komplex esetében átlagosan $44,95 \pm 0,9 \text{ M}^{-1}$ -nek adódik.

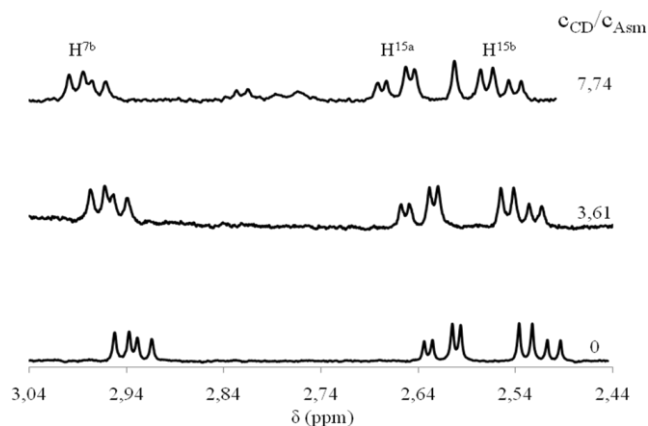


21. ábra. Az Asm-HP- β -CD komplex stabilitásának meghatározása x-reciprok módszerrel.

Mivel az x-reciprok módszer alkalmazása során szerkesztett egyenesek nagy pontossággal illeszkedtek a függvény pontjaira, a kialakuló komplex sztöchiometriája 1:1-nek tekinthető, hiszen a számítás ebből a feltevésből indul ki. A kísérletek során

pH=9,0-n valamennyi alkalmazott CD komplexét vizsgáltuk, míg savas tartományban csak azokat, amelyek stabilitása lúgos tartományban relatíve magas volt. A CE kísérletek alapján számított átlagos stabilitási állandókat a 9. táblázat tartalmazza.

Komplex stabilitási vizsgálatok NMR-rel. NMR-rel azon komplexek stabilitását határoztuk meg, melyek a CE mérések alapján magas stabilitási állandójuk miatt ígéretesnek bizonyultak, így a natív β -, TRIMEA-, MA- β - és Ac- β -CD komplexeket. A vizsgálatokat pH=5,2 acetát pufferben végeztük (H₂O/D₂O 9/1), ahol az Asm dominánsan ikerionos formában van jelen. Végeztünk emellett egy kiegészítő vizsgálatot a CE mérések alapján legmagasabb stabilitást mutató Asm-Ac- β -CD komplex stabilitásának jellemzésére a CE méréseknek megfelelő pH=9,0 borát pufferben is. A titrálás során az Asm valamennyi protonja kémiai eltolódásváltozást szenvedett, ezt az 22. ábra mutatja be különböző c_{CD}/c_{Asm} arányok mellett.



22. ábra. Az Asm H^{15a-b} és H^{7b} protonjainak kémiai eltolódásváltozása a növekvő komplexáltsági fok hatására ¹H NMR spektrumokon.

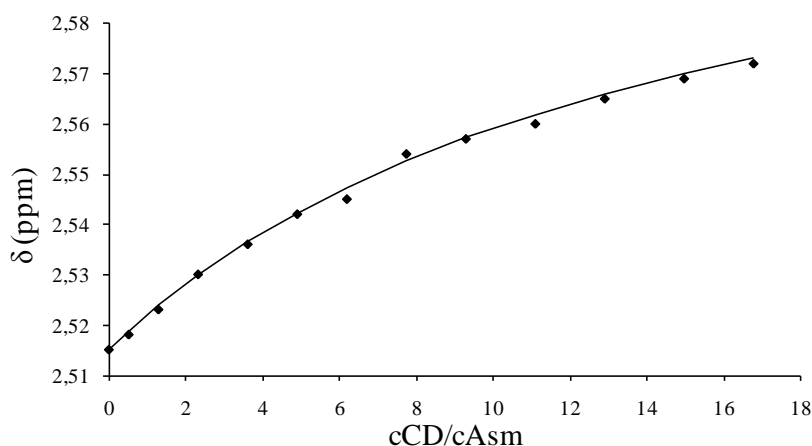
A titrálás során valamennyi CD protonon és az Asm metilén és metin protonjainak kémiai eltolódása nő, míg az aromás és metil protonok jelei alacsonyabb ppm értéknél jelennek meg. A CD protonok közül a legmarkánsabb változáson az üreg belsejében található H-3 és H-5 protonok mennek át, mely a vendégmolekula üregbe illeszkedését sugallja. Az Asm esetében meglepő módon a legnagyobb változást a H^{15a-b}, H^{7b} és H¹⁴ protonok szenvedték el, annak ellenére, hogy az üregbe illeszkedést az aromás gyűrűtől várnánk. Ennek következtében a zárványkomplex térszerkezetének vizsgálata elengedhetetlennek bizonyult. Az Asm H⁸ protonjának tripletje a titrálás során nem volt követhető a maradék vízzel való átfedés következtében. Az Asm és β -CD protonok

szabad illetve komplexált formában leolvasott kémiai eltolódását az 8. táblázat szemlélteti.

8. táblázat. A szabad és komplexált Asm és β -CD protonok kémiai eltolódása pH=5,2 acetát pufferben 25 °C-on.

| Asm proton | Szabad | Komplexált | β -CD proton | Szabad | Komplexált |
|------------------|--------|------------|--------------------|--------|------------|
| H ²⁻⁶ | 7,144 | 7,120 | H-1 | 4,928 | 4,934 |
| H ³⁻⁵ | 7,255 | 7,202 | H-2 | 3,512 | 3,517 |
| H ⁴ | 7,196 | 7,180 | H-3 | 3,881 | 3,938 |
| H ^{7a} | 3,195 | 3,210 | H-4 | 3,710 | 3,713 |
| H ^{7b} | 2,933 | 3,074 | H-5 | 3,599 | 3,647 |
| H ¹⁴ | 4,027 | 4,164 | H-6 | 3,826 | 3,833 |
| H ^{15a} | 2,615 | 2,750 | | | |
| H ^{15b} | 2,515 | 2,624 | | | |
| H ¹⁹ | 3,596 | 3,556 | | | |

A titrálás eredményeképpen $\Delta\delta$ vs. c_{CD}/c_{Asm} adatsorokat rögzítettünk az Asm H²⁻⁶, H³⁻⁵, H⁴, H^{7a-b}, H¹⁴, H^{15a-b} és H¹⁹ protonjaira, melyekből az OPIUM program segítségével számítottuk ki a stabilitási állandókat és a szabad illetve komplexált formák határeltolódásait. Adatainkat a (2.10) egyenletbe helyettesítve tudtuk a titrálási pontokra telítési görbét illeszteni, melyet a H^{15b} proton esetében a 23. ábrán szemléltetünk.



23. ábra. Az Asm H^{15b} protonjának kémiai eltolódásváltozása az egyre teljesebb komplexképződés hatására a titrálási pontokra illesztett görbével.

A CE-vel valamint NMR-rel meghatározott stabilitási állandókat a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat. Az Asm-CD komplexek átlagos stabilitási állandói (M^{-1}) három pH értéken, 25°C-on.

| CD | $K_{Asm^- - CD}$ | $K_{HAsm^+ - CD}$ | $K_{H_2Asm^{2+} - CD}$ |
|----------------------|------------------|-------------------|------------------------|
| α -CD | $8,3 \pm 0,4$ | | |
| β -CD | 111 ± 4 | 123 ± 1 | 94 ± 2 |
| γ -CD | $17,8 \pm 0,8$ | | |
| RAMEB-CD | $52,3 \pm 5$ | | $34,9 \pm 6,4$ |
| DIMEB-CD | $61,1 \pm 4,1$ | | $37,2 \pm 8,2$ |
| TRIMEA-CD | $21,6 \pm 0,1$ | $34,1 \pm 1,1$ | |
| TRIMEB-CD | $13,3 \pm 1,6$ | | |
| TRIMEG-CD | <5 | | |
| HP- β -CD ~3 | $68,6 \pm 3,3$ | | $7,4 \pm 1,2$ |
| HP- β -CD ~4.5 | $20,6 \pm 0,4$ | | $19,2 \pm 7,2$ |
| HP- β -CD ~6.3 | $45 \pm 0,9$ | | $26,9 \pm 0,6$ |
| CM- β -CD | <5 | | <5 |
| CE- β -CD | <5 | | $19,1 \pm 0,9$ |
| SP- β -CD | $10,4 \pm 1,4$ | | <5 |
| MA- β -CD | 94 ± 9 | $118,6 \pm 1,1$ | 82 ± 7 |
| Suc- β -CD~4 | <5 | | 115 ± 22 |
| Suc- β -CD~6 | <5 | | 40 ± 10 |
| Ac- β -CD~7 | $333 \pm 5^*$ | 253 ± 1 | 163 ± 17 |
| Ac- β -CD~15 | <5 | | <5 |
| P- β -CD | $29,8 \pm 8,5$ | | <5 |

*A komplex stabilitást 1H -NMR titrálással is meghatároztuk, ami $560 \pm 2 M^{-1}$ -nek adódott.

A fenti stabilitási állandók alapján a következő következtetések vonhatók le:

- Az Asm a legstabilabb komplexet a β -CD származékokkal képezi, ez az üregméret a legmegfelelőbb az illeszkedéshez.
- A β -CD metilezése a szubsztitúciós fok növekedésével a komplex stabilitásának fokozatos csökkenéséhez vezet. Ennek oka a metilezés folytán az üregméret „növekedése” lehet.
- A natív CD-k permetilezése az α -CD esetén a komplex stabilitás erősödését, a másik két esetben csökkenését vonja maga után. Ennek oka szintén az, hogy a metilezés kapcsán a ciklodextrin ürege kvázi megnövekszik, így az eredetileg kis üregű α -CD esetén a komplexképzésre pozitív hatással van a változás.

- A legstabilabb komplexet az Ac- β -CD-nel (DS~7) képezte a vegyület mindhárom pH értéken, a további acetilezés azonban látszólag meggátolja a komplexképződést.
- A MA- β -CD kiemelkedő stabilitását okozhatja a hidrofób mellett kialakuló esetleges ionos kölcsönhatás.
- A töltésfüggő komplex stabilitást vizsgálva megállapítható, hogy a legstabilabb komplexeket általában az ikerionos Asm képezi.

A legstabilabb komplex (pH=9,0 Asm-Ac- β -CD) NMR-rel és CE-vel meghatározott állandója közötti különbség adódhat az egyensúly beállításig bekövetkező idő (percek vs. 12 óra), a hőmérséklet eltérő kontrollja vagy az eltérő oldószerekből fakadóan. Az általunk meghatározott állandók az irodalomban leírtakkal jó egyezést mutatnak [40, 42, 45].

6.2.1.2 Pregabalin

A két, korábban szintetizált pregabalin-származék, a Tos-preg és Dns-preg ciklodextrin komplexeinek stabilitását és enantiomerjeik elválaszthatóságát négy, a CE-pH titrálások alapján kiválasztott pH értéken (9,2; 7,2; 4,7 és 2,5) vizsgáltuk számos ciklodextrinnel. Lúgos és semleges közeli pH-n mindkét származék negatív töltésű, pH=4,7-n a semleges és negatív izomerek összemérhető arányban vannak jelen, míg erősebben savas tartományban a Tos-preg semleges, a Dns-preg pedig pozitív töltésű ion. Ennek megfelelően pH=2,5-n a tozilezett származék komplexképzését és királis elválasztását kizárólag ionizált CD-kel vizsgáltuk. pH=7,2-n, csak azon CD-k királis elválasztását vizsgáltuk, melyek pH=9,2-n részleges vagy teljes elválasztást okoztak.

Komplex stabilitás és királis elválasztás vizsgálata. A kialakuló komplexek stabilitását a korábban bemutatottakkal analóg módon, x-reciprok módszerrel határoztuk meg a racém mintákon különböző CD koncentrációjú háttérektritolokban futtatva a vizsgált vegyületeket. A királis felismerést nem mutató CD-k esetében az enantiomerek jelei azonos migrációs idővel érik el a detektort, míg ha a CD szelektív az enantiomerekre, azok elválnak. Ilyen esetben a komplex stabilitást az egyes enantiomerekre külön-külön számítjuk. Wren elmélete szerint az egyes enantiomerek CD komplexei stabilitásából egyszerű képlettel (2.14) számítható az az optimális CD

koncentráció, mellyel az adott körülmények között a legteljesebb elválasztás érhető el [136].

Kísérleteink során először megállapítottuk az egyes enantiomerek stabilitási állandóit, majd amennyiben érdemesnek találtuk, tovább vizsgáltuk az izomerek elválaszthatóságát a Wren képletével számolt optimális CD koncentrációt alkalmazva. A vizsgálat során alkalmazott CD-eket, a kialakult komplexek stabilitását valamint az elválasztást jellemző felbontást (Wren képlete szerint számolt CD koncentrációnál) (R_S) a 10-13. táblázatban foglaltuk össze.

10. táblázat. A pregabalin-származékok CD-függő komplex stabilitása (K), valamint a királis elválasztás hatékonysága (R_S) pH=9,2-n.

| CD | Komplex stabilitás és királis elválasztás | | | |
|----------------------|---|--------------|----------------------------|--------------|
| | Tos-preg | | Dns-preg | |
| | K (M^{-1}) | R_S | K (M^{-1}) | R_S |
| α -CD | 63,8 (1)* | | 51,6 (6) | |
| β -CD | 286 (2) | | 365,1 (3) | |
| γ -CD | 169 (1) | | 426 (20) | |
| HP- α -CD | 42 (1) | | S: 43,7 (5) R: 48,0 (6) | $R_S = 0,40$ |
| HP- β -CD ~3 | 291 (3) | | 261 (8) | |
| HP- β -CD ~4,6 | 265 (2) | | S: 270 (3) R: 309 (4) | $R_S = 0,54$ |
| HP- β -CD ~6,3 | 177 (5) | | 414 (1) | |
| HP- γ -CD | S: 91 (1) R: 82 (1) | $R_S = 0,65$ | 365 (3) | |
| TRIMEA-CD | 201 (10) | | 86 (2) | |
| TRIMEB-CD | 73 (3) | | 65 (10) | |
| TRIMEG-CD | 41 (2) | | 25 (3) | |
| DIMEB-CD | 249 (6) | | S:406 (3) R:270 (1) | $R_S = 1,11$ |
| RAMEB-CD | 248 (1) | | 325 (18) | |
| Ac- β -CD ~7 | 505 (7) | | 527 (3) | |

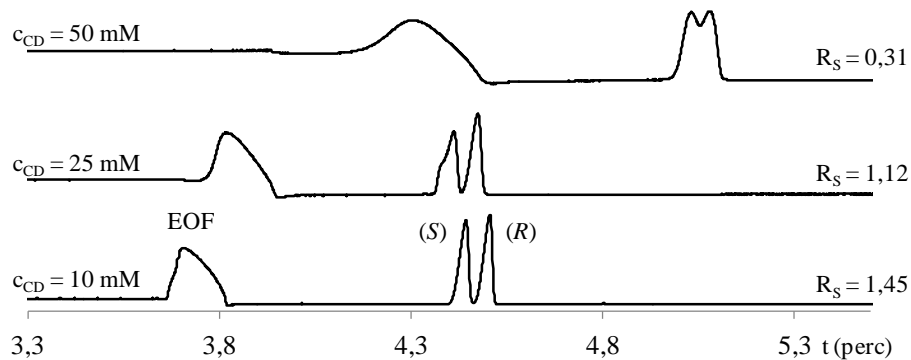
| | | | | |
|---------------------|----------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| MA- β -CD | S: 117 (2) R: 116 (2) | $R_S = 0,98$ | S: 70 (2) R: 63 (1) | $R_S = 1,03$ |
| PA- β -CD | S: 277 (1) R: 242 (1) | $R_S = 1,45$ | S: 184(1) R: 141(1) | $R_S = 1,21$ |
| Suc- β -CD ~4 | 0** | | 0 | |
| Suc- β -CD ~6 | 0 | | 0 | |
| CM- β -CD ~1 | 0 | | 0 | |
| CM- β -CD ~3 | 62 (2) | | 85 (1) | |
| CE- β -CD | S: 29,7 (3) R: 14,3 (2) | $R_S = 0,87$ | S: 26,1 (5) R: 10,4 (2) | $R_S = 0,61$ |
| SP- α -CD | 28 (1) | | 48 (1) | |
| SP- β -CD ~2 | 182 (1) | | 128 (4) | |
| SP- β -CD ~4 | 14,8 (5) | | 0 | |
| SP- γ -CD | S: 35 (3) R: 38 (3) | $R_S = 0,33$ | 90 (2) | |
| P- β -CD | 0 | | 0 | |
| SHP- β -CD | 17,8 (8) | | 22 (1) | |
| SHP- γ -CD | 0 | | 67 (3) | |
| SB- β -CD ~4 | 46 (5) | | 0 | |

* A stabilitási állandók esetén zárójelben az utolsó értékes jegy szórása áll.

** 0 stabilitási állandó esetén a komplex stabilitása CE-vel nem határozható meg.

A mérési eredményekből látható, hogy pH=9,2-n mindkét származék affinitása jelentős a β -CD származékok iránt, Dns-preg esetében több γ -CD származék iránt is, de szinte valamennyi ciklodextrin többé-kevésbé stabil komplexet képez a vegyületekkel. A Tos-preg különösen stabil komplexet képez a natív, hidroxipropilezett és metilezett β -CD származékokkal, valamint a PA- β -CD-vel, míg a Dns-preg esetében ezek mellett a natív γ -CD komplex is jelentős stabilitású, melyet a hidrofób naftol gyűrű nagyobb mérete magyaráz. Az enantiomerek részleges vagy teljes elválását az előbbinél a HP- γ -, MA- β -, PA- β -, CE- β - és SP- γ -CD-k, míg a Dns-preg esetében a HP- α -, HP- β - (~4.6), DIMEB-, MA- β -, PA- β - és CE- β -CD-k okozták, így pH=7,2-n ezeket vizsgáltuk. Ezek

közül mindkét származék esetén a PA- β -CD-vel sikerült elérni a legjobb, rendre $R_S=1,21$ és $R_S=1,45$ felbontást. A PA- β -CD eltérő koncentrációinak felbontást befolyásoló hatását a 24. ábra szemlélteti.



24. ábra. A PA- β -CD koncentrációjának hatása a Tos-preg enantiomerek elválasztására (pH=9,2).

11. táblázat. A pregabalin-származékok CD-függő komplex stabilitása (K), valamint a királis elválasztás hatékonysága (R_S) pH=7,2-n.

| CD | Komplex stabilitás és királis elválasztás | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------------------|--------------|
| | Tos-preg | | Dns-preg | |
| | K (M^{-1}) | R_S | K (M^{-1}) | R_S |
| HP- α -CD | | | 28 (1) | |
| HP- β -CD ~4,6 | | | 89 (4) | |
| HP- γ -CD | S: 57 (5) R: 49 (5) | $R_S = 0,54$ | | |
| DIMEB-CD | | | S: 151 (2) R: 147 (2) | $R_S = 0,57$ |
| MA- β -CD | S: 361 (1) R: 324 (1) | $R_S = 1,72$ | S: 305 (2) R: 204 (1) | $R_S = 1,17$ |
| PA- β -CD | S: 502 (4) R: 358 (4) | $R_S = 2,32$ | S: 399 (5) R: 292 (4) | $R_S = 2,85$ |
| CE- β -CD | 47 (2) | | 42 (3) | |
| SP- γ -CD | 14.7 (5) | | | |

A lúgos pH-n bekövetkező királis elválasztások pH és pufferalkotó függését pH=7,2-n foszfát pufferben vizsgáltuk. Semleges (HP- és DIMEB-CD-k) és negatív (CE- és SP-CD-k) esetében a háttérektrólit megváltozása kevésbé hatékony elválasztást eredményezett. Mivel ezen a pH-n a MA- β - és PA- β -CD-k már részben protonáltak, így elektrosztatikus kölcsönhatások erősíthetik a kialakuló komplexek stabilitását és javíthatják a ciklodextrinek szelektivitását. Ezt igazolja, hogy a pozitív CD-k stabilabb komplexeket képeztek és hatékonyabban választották el az enantiomereket. Külön kísérletet végeztünk azt vizsgálva, hogy a Wren képletével számolt optimális CD koncentráció mennyiben különbözik az empirikus úton megállapítottól. A stabilitási állandók alapján a Dns-preg enantiomereket 3,15 mM PA- β -CD választja el a leghatékonyabban. Ez az érték kiválóan megfelel a ciklodextrin koncentráció kismértékű (0,2 mM) változtatásával meghatározott 3,2 mM-os koncentrációnak.

12. táblázat. A pregabalin-származékok CD-függő komplex stabilitása (K), valamint a királis elválasztás hatékonysága (R_S) pH=4,7-n.

| CD | Komplex stabilitás és királis elválasztás | | | |
|----------------------|---|--------------|----------------------------|--------------|
| | Tos-preg | | Dns-preg | |
| | K (M^{-1}) | R_S | K (M^{-1}) | R_S |
| α -CD | 64 (4) | | 0 | |
| β -CD | 252 (19) | | 195 (11) | |
| γ -CD | S: 242 (2) R: 230 (2) | $R_S = 0,55$ | S: 42,2 (3) R: 34,1 (2) | $R_S = 0,56$ |
| HP- α -CD | 55,4 (7) | | 40 (4) | |
| HP- β -CD ~3 | S: 365 (6) R: 363 (6) | $R_S = 0,56$ | 252 (6) | |
| HP- β -CD ~4,6 | 427(30) | | 141(6) | |
| HP- β -CD ~6,3 | 297(2) | | 142(3) | |
| HP- γ -CD | S: 181 (1) R: 165 (1) | $R_S = 0,55$ | S: 261 (25) R: 218 (19) | $R_S = 0,36$ |
| TRIMEA-CD | 210 (2) | | S: 109 (3) R: 130 (4) | $R_S = 2,30$ |
| TRIMEB-CD | 16,8 (6) | | S: 33,7 (7) | $R_S = 1,0$ |

| | | | | |
|---------------------|------------------|-----------------------|-----------|--|
| | | | R: 52 (1) | |
| TRIMEG-CD | S < 10 R < 10 | R _S = 1,68 | 0 | |
| DIMEB-CD | 721 (34) | | 893 (75) | |
| RAMEB-CD | 420 (2) | | 283 (4) | |
| Ac- β -CD ~7 | 144 (1) | | 79(13) | |
| MA- β -CD | 0 | | 0 | |
| PA- β -CD | 0 | | 0 | |
| Suc- β -CD ~4 | 29,7 (8) | | 41 (5) | |
| Suc- β -CD ~6 | 29,3 (8) | | 44 (8) | |
| CM- β -CD ~1 | 0 | | 0 | |
| CM- β -CD ~3 | 0 | | 0 | |
| CE- β -CD | 47 (5) | | 71 (5) | |
| SP- α -CD | 0 | | 0 | |
| SP- β -CD ~2 | 36 (8) | | 0 | |
| SP- β -CD ~4 | 0 | | 0 | |
| SP- γ -CD | 17(2) | | 0 | |
| P- β -CD | 0 | | 0 | |
| SHP- β -CD | 0 | | 0 | |
| SHP- γ -CD | 0 | | 0 | |
| SB- β -CD ~4 | 0 | | 0 | |

4,7-es pH-n 50 mM acetát puffert használtunk háttélektrolitként, így itt a negatív és nettó semleges töltésű pregabalin-származékok összemérhető koncentrációban vannak jelen. Az 12. táblázatból kitűnik, hogy a lúgos pH-n stabil komplexet képező negatív töltésű CD-k affinitása a Preg származékok iránt alacsony, királis elválasztást pedig egyetlen ionos CD-vel sem tudtunk elérni. Kimagasló stabilitást mutat ugyanakkor mindkét származék DIMEB-CD-vel képzett komplexe. Az enantiomerek elválasztásának szempontjából Tos-preg esetén a γ -, HP- β - (~3) és HP- γ -CD-k okoztak részleges, a TRIMEG-CD pedig alapvonal elválasztást. Meglepő, hogy ezen

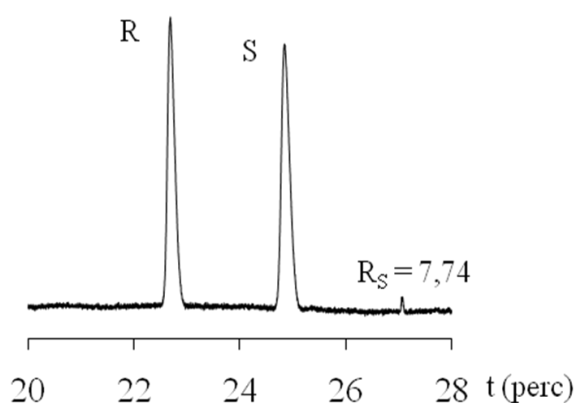
körülmények között az a TRIMEG-CD választotta el leghatékonyabban a Tos-preg izomerjeit ($R_S=1,68$), amely komplexének stabilitása kiemelkedően alacsony volt ($K < 10 \text{ M}^{-1}$). Ennek megfelelően megállapítható, hogy az elválasztásnak a magas stabilitású komplex képzése nem, csak a CD szelektivitása a feltétele. A Dns-preg enantiomerek elválasztására a γ -, HP- γ -CD, TRIMEA- és TRIMEB-CD-k voltak alkalmasak. A Tos-preghez hasonlóan a permetilezett CD-k bizonyultak itt is hatékonyabbnak.

13. táblázat. A pregabalin-származékok CD-függő komplex stabilitása (K), valamint a királis elválasztás hatékonysága (R_S) pH=2,5-n.

| CD | Komplex stabilitás és királis elválasztás | | | |
|----------------------|---|-------|----------------------------|--------------|
| | Tos-preg | | Dns-preg | |
| | $K (\text{M}^{-1})$ | R_S | $K (\text{M}^{-1})$ | R_S |
| α -CD | | | 96 (4) | |
| β -CD | | | 550 (20) | |
| γ -CD | | | 220 (10) | |
| HP- α -CD | | | 38 (3) | |
| HP- β -CD ~3 | | | S: 489 (7) R: 470 (5) | $R_S = 1,05$ |
| HP- β -CD ~4,6 | | | S: 191 (4) R: 182 (5) | $R_S = 1,16$ |
| HP- β -CD ~6,3 | | | S: 424 (2) R: 426 (2) | $R_S = 1,36$ |
| HP- γ -CD | | | S: 154 (3) R: 159 (1) | $R_S = 0,39$ |
| TRIMEA-CD | | | S: 125 (3) R: 133 (4) | $R_S = 7,38$ |
| TRIMEB-CD | | | S: 21,7 (9) R: 18,7 (6) | $R_S = 7,74$ |
| TRIMEG-CD | | | S: 40,4 (8) R: 42,2 (6) | $R_S = 1,05$ |
| DIMEB-CD | | | S: 372 (5) | $R_S = 3,87$ |

| | | | | |
|---------------------|----------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| | | | R: 360 (4) | |
| RAMEB-CD | | | S: 436 (8) R: 428 (5) | $R_S = 0,7$ |
| Ac- β -CD ~7 | | | 198 (14) | |
| MA- β -CD | S < 10 R < 10 | $R_S = 0,52$ | S < 10 R < 10 | $R_S = 0,59$ |
| PA- β -CD | S < 10 R < 10 | $R_S = 1,19$ | S < 10 R < 10 | $R_S = 1,37$ |
| Suc- β -CD ~4 | | | 230 (20) | |
| Suc- β -CD ~6 | | | 300 (30) | |
| CM- β -CD ~3 | | | 0 | |
| CE- β -CD | | | S: 336 (4) R: 340 (5) | $R_S = 1,15$ |
| SP- α -CD | S: 24 (1) R: 27 (1) | $R_S = 1,05$ | 0 | |
| SP- β -CD ~2 | S: 288 (2) R: 302 (2) | $R_S = 1,02$ | S: 329 (12) R: 408 (14) | $R_S = 1,00$ |
| SP- β -CD ~4 | S: 716 (16) R: 760 (18) | $R_S = 0,89$ | 1286(11) | |
| SP- γ -CD | 189(8) | | S: 29,5 (2) R: 38,2 (3) | $R_S = 1,38$ |
| P- β -CD | S: 680 (20) R: 620 (20) | $R_S = 1,16$ | S: 379 (13) R: 368 (12) | $R_S = 1,20$ |
| SHP- β -CD | S: 376 (15) R: 398 (16) | $R_S = 0,98$ | S: 110 (3) R: 131 (3) | $R_S = 1,83$ |
| SHP- γ -CD | 284(12) | | S: 73 (2) R: 79 (2) | $R_S = 1,10$ |
| SB- β -CD ~4 | S: 946 (5) R: 1014 (8) | $R_S = 1,92$ | S: 672 (12) R: 756 (15) | $R_S = 2,29$ |

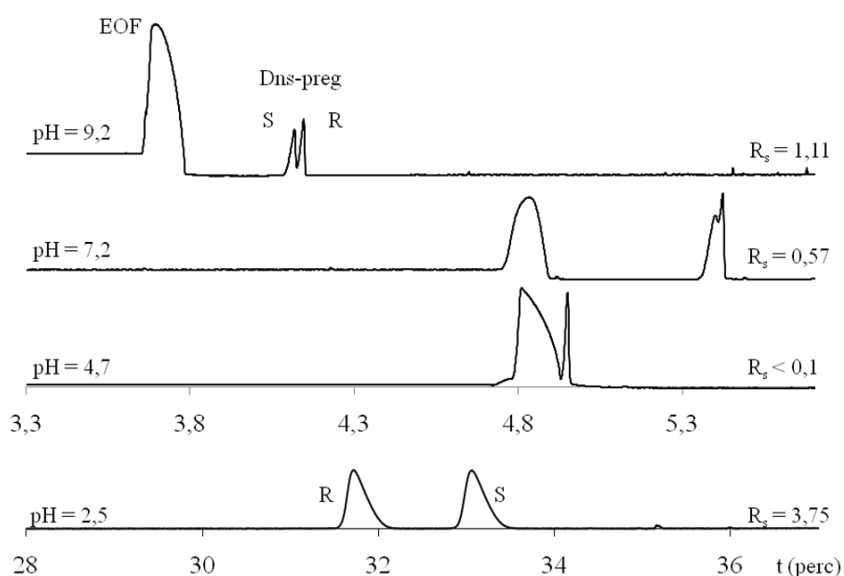
pH=2,5-n 15 mM foszfát puffert alkalmaztunk. Ebben a közegben már számos, pH=4,7-n még negatív töltésű CD (CM-, CE-, Suc-CD származékok) protonálódik, így azok Tos-preg-gel való vizsgálata CE-vel már nem lehetséges. A Dns-preg CD komplexeit valamennyi szelektor esetében lehetett tanulmányozni, hiszen a vendégmolekula itt pozitív töltéssel rendelkezik. A komplexek stabilitásáról általánosságban elmondható, hogy ezen a pH-n képezték a legstabilabb komplexeket a pregabalin-származékok. A tozilezett származéknak az SB- β -CD, míg a danzilezettnek az SP- β -CD DS~4 iránt volt a legnagyobb az affinitása. Általánosságban elmondható továbbá az is, hogy ilyen körülmények között volt a legtöbb szelektor királisan aktív. Az ionos CD-k közül valamennyi elválasztotta legalább az egyik származék enantiomerjeit és a semleges szelektoroknak is nagy hányada ismerte fel szelektíven a Dns-preg enantiomereket. Tos-preg esetében a legjobb elválasztást az igen stabil komplexet képző SB- β -CD-nel sikerült elérni ($R_S=1,92$), míg a Dns-pregnél a permetilezett α - és β -CD kiváló ($R_S=7,38$, ill. $R_S=7,74$) szeparációt eredményezett (25. ábra).



25. ábra. A vizsgálatok során a Dns-preg származékot leghatékonyabban elválasztó (50 mM TRIMEB-CD, pH=2,5) rendszer elektroferogramja.

A komplex stabilitás és királis elválasztás eltérő közegben történő nyomon követése lehetővé teszi, hogy tanulmányozzuk az elválasztás pH függését is. A pH hatását az enantiomerek elválasztására és migrációs sorrendjére a 26. ábrán a Dns-preg-DIMEB-CD rendszer példáján szemléltetjük, melyről látszik, hogy a pH nemcsak a felbontásra, hanem a migrációs sorrendre is nagy hatással lehet. Lúgos pH-n még az (S) enantiomer halad előbb, pH=4,7-n, nincs királis felismerés, míg erősebben savas tartományban már

az (*R*) izomer éri el hamarabb a detektort. A folyamat során a CD enantiomerek iránti affinitása nem változik meg, mindvégig az (*S*) forma képezi a stabilabb komplexet. A migrációs sorrend megváltozása a molekula töltésének megváltozása miatt következik be, vagyis a negatív töltésű Dns-preg származék (*S*) enantiomerjének migrációját a DIMEB-CD jobban gyorsítja, míg pozitív töltésű izomer esetében jobban lassítja, mint a másik enantiomert. A migrációs sorrend üregméret függő változása következik be a Dns-preg permetilezett CD származékokkal történő elválasztásakor: az α - és γ -származék esetében az (*S*), míg β -származék alkalmazásakor az (*R*) enantiomer halad gyorsabban.



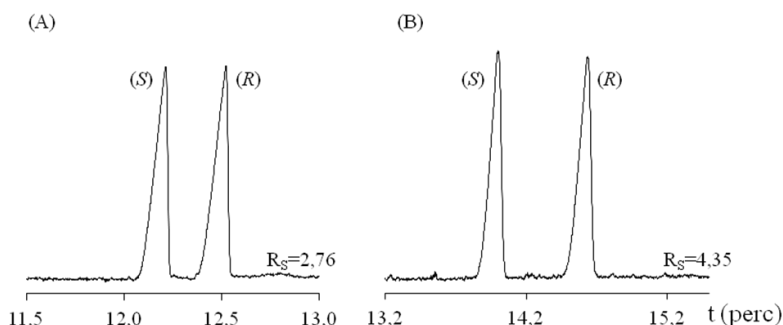
26. ábra. A pH hatása az elválasztás felbontására és az enantiomerek sorrendjére a DIMEB-CD-Dns-preg rendszerek (Wren képlete szerint számolt optimális CD koncentrációt alkalmazva) példáján bemutatva.

Optimalizálás egyváltozós módszerrel. A 10-13. táblázatok eredményeit összefoglalva megállapítható, hogy a pH=7,2 háttéreléktronitban alkalmazott PA- β -CD az egyetlen olyan rendszer, amely mindkét pregabalin-származék esetében jelentős hatékonyságú elválasztást produkált. További előnye ennek a rendszernek, hogy a CD mindkét enantiomerrel magas stabilitású komplexet képez, így alacsony CD koncentrációt alkalmazva megoldható az izomerek gazdaságos elválasztása. Ennek megfelelően ezt a rendszert választottuk ki további elválasztási paraméterek minor változtatásainak tanulmányozására. Az optimalizálás során a pH, a puffer és szelektor koncentráció és az alkalmazott feszültség változtatásának a felbontásra gyakorolt hatását vizsgáltuk egyváltozós módszerrel. A módszer alapja, hogy a fentiek közül

egyszerre csak egy paramétert változtatunk megkeresve annak optimális értékét, majd azt a következő kísérletek során ezen az értéken tartva a következő paramétert vizsgáljuk. A módszer előnye, hogy egyszerű, mind tervezése, mind kiértékelése könnyen megvalósítható. Hátránya, hogy sok mérést igényel és a paraméterek egymásra kifejtett hatása nem tanulmányozható a módszer segítségével. Az optimalizálás során az egyes paramétereket az alábbiaknak megfelelően vizsgáltuk mindkét származék esetében:

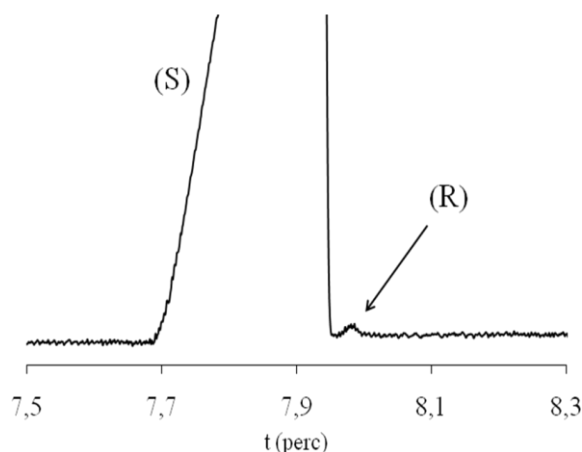
- CD koncentráció: 2,0-4,0 mM között 0,2 mM-os lépésekkel,
- pH: 6,20-8,40 között 0,3 egység lépésekkel,
- puffer koncentráció: 20-120 mM között 10 mM-os lépésekkel,
- alkalmazott feszültség: 15-30 kV között 2,5 kV-os lépésekkel.

Az optimalizálás eredményeképpen a Tos-preg enantiomerek elválasztására leginkább alkalmas rendszer a pH=6,80-ra beállított 100 mM foszfát puffer, mely 3,4 mM PA- β -CD-t tartalmaz ($R_S=2,76$), míg a Dns-preg izomereket legeredményesebben pH=7,10, 100 mM foszfát pufferben, 3,2 mM PA- β -CD mellett lehetett elválasztani ($R_S=4,35$). Az elválasztáshoz mindkét esetben +17,5 kV feszültséget alkalmaztunk. Az optimalizált rendszerek okozta királis elválasztásokat az 27. ábra szemlélteti.



27. ábra. A Tos-preg (A) és Dns-preg (B) enantiomerek optimalizált elválasztása PA- β -CD-nel.

Az optimalizált rendszer hatékonyságát bizonyítja, hogy segítségével 0,1% enantiomer-szennyezés is meghatározhatóvá vált (28. ábra).



28. ábra. (R)-Tos-preg nyomszennyezés detektálása az optimalizált PA- β -CD alapú rendszerrel 1:1000 enantiomer arány mellett.

6.2.1.3 Vinka alkaloidok

A vinka alkaloidok CD komplexeit erősen savas, pH=2,5 tartományban vizsgáltuk, ahol mindhárom molekula pozitív ionként van jelen, mivel mindegyik vegyület tartalmaz egy bázikus tercier aminocsoportot. Irodalmi adatok szerint a vinpocetin protonálódási állandójának logaritmus 7,31 [64]. A vizsgálatok során α -, β - és γ -CD natív, karboximetilezett (DS~3), hidroxipropilezett (DS~3), és random metilezett (DS~12) származékát, valamint SB- β - és SB- γ -CD-ket (DS~4) használtunk fel. A vizsgálatok során a vinka alkaloidok számos sztereoizomere közül kizárólag az eutomert és annak enantiomerjét alkalmaztuk.

A komplex stabilitást és az elválasztás hatékonyságát a korábbiakban bemutatottakkal analóg módon számítottuk és jellemeztük K (M^{-1}) illetve R_S értékekkel. Az átlagos komplex stabilitási állandók számításakor azzal a feltételezéssel éltünk, hogy a kialakuló komplexek 1:1 sztöchiometriájúak, melyet a vinpocetin- β -CD és SB- β -CD komplexekre már igazoltak [84, 85], illetve számos más komplex esetében a későbbiekben mi is igazoltunk. Az elválasztás hatékonyságát ez esetben is a Wren képlete alapján számolt optimális CD koncentrációnál határoztuk meg. A 14 kiválasztott ciklodextrin vinka alkaloidokkal képzett átlagos komplex stabilitási állandóit és az optimális koncentrációnál tapasztalható elválasztási hatékonyságot az 14. táblázat tartalmazza.

14. táblázat. A vinka alkaloid-CD komplexek CE kísérletek alapján meghatározott átlagos komplex stabilitási állandói (K) és az elválasztás hatékonysága (R_S). (K_1 az elől, míg K_2 a hátul migráló enantiomert jelöli).

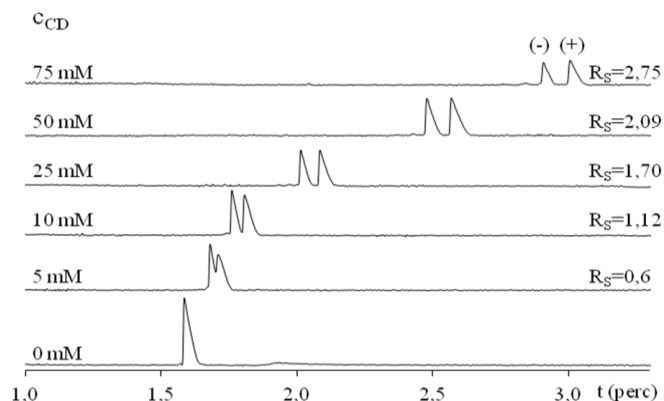
| Alkaloid | CD | — | HP | RAME | SB | CM |
|---------------|--------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Vinpocetin | α -CD | $K_1=33,7$ (3)* | $K_1= 36$ (1) | $K_1=115$ (2) | — | $K_1=41$ (5) |
| | | $K_2=33,7$ (3) | $K_2= 38$ (1) | $K_2=115$ (2) | — | $K_2=41$ (5) |
| | | | $R_S= 1,16$ | | — | |
| | β -CD | $K_1 < 0,5$ | $K_1=13$ (1) | $K_1=35$ (1) | $K_1=1130$ (2) | $K_1=162,0$ (1) |
| | | $K_2 < 0,5$ | $K_2=14$ (2) | $K_2=52$ (1) | $K_2=1130$ (2) | $K_2=163,7$ (1) |
| | | | $R_S= 1,51$ | $R_S= 2,84$ | | $R_S= 1,01$ |
| | γ -CD | $K_1=7$ (2) | $K_1=6,2$ (2) | $K_1=7,1$ (2) | $K_1=8500$ (5) | $K_1=127$ (1) |
| | | $K_2=13$ (1) | $K_2=6,9$ (4) | $K_2=8,8$ (3) | $K_2=9500$ (4) | $K_2=137$ (1) |
| | | | $R_S= 1,84$ | $R_S= 0,91$ | $R_S= 0,91$ | $R_S= 4,08$ |
| Vinkamin | α -CD | $K_1=9,0$ (2) | $K_1=6$ (2) | $K_1=41$ (1) | — | $K_1=32$ (1) |
| | | $K_2=11,3$ (1) | $K_2=9$ (3) | $K_2=49$ (1) | — | $K_2=40$ (1) |
| | | | $R_S= 0,97$ | $R_S= 1,78$ | $R_S= 1,11$ | — |
| | β -CD | $K_1 < 0,5$ | $K_1=7$ (1) | $K_1=14$ (1) | $K_1=880$ (4) | $K_1=191$ (1) |
| | | $K_2 < 0,5$ | $K_2=7$ (1) | $K_2=14$ (1) | $K_2=1110$ (5) | $K_2=198$ (1) |
| | | | | | $R_S= 3,86$ | $R_S= 2,05$ |
| | γ -CD | $K_1= 8$ (1) | $K_1 < 0,5$ | $K_1 < 0,5$ | $K_1=1600$ (4) | $K_1=275$ (3) |
| | | $K_2= 8$ (1) | $K_2 < 0,5$ | $K_2 < 0,5$ | $K_2=2800$ (6) | $K_2=292$ (2) |
| | | | | | $R_S= 7,84$ | $R_S= 3,39$ |
| Vinkadiformin | α -CD | $K_1=18,2$ (2) | $K_1= 35$ (1) | $K_1=72$ (1) | — | $K_1=21$ (5) |
| | | $K_2=18,2$ (2) | $K_2= 35$ (1) | $K_2=72$ (1) | — | $K_2=26$ (6) |
| | | | | | — | $R_S= 3,3$ |
| | β -CD | $K_1 < 0,5$ | $K_1=27$ (2) | $K_1=16$ (1) | $K_1=1360$ (2) | $K_1=72$ (1) |
| | | $K_2 < 0,5$ | $K_2=28$ (1) | $K_2=23$ (1) | $K_2=1360$ (2) | $K_2=79$ (1) |
| | | | $R_S= 0,5$ | $R_S= 2,09$ | | $R_S= 4,05$ |
| | γ -CD | $K_1=20$ (1) | $K_1=12,7$ (4) | $K_1=10,2$ (2) | $K_1=4300$ (1) | $K_1=94$ (2) |
| | | $K_2=38$ (1) | $K_2=51$ (1) | $K_2=21,2$ (5) | $K_2=7500$ (1) | $K_2=128$ (1) |
| | | | $R_S= 2,22$ | $R_S= 8,54$ | $R_S= 4,08$ | $R_S= 5,39$ |

* A stabilitási állandók esetén zárójelben az utolsó értékes jegy szórása áll.

A natív CD-kel esetén tapasztalt átlagos stabilitási állandók alapján a vinpocetin és vinkamin az α -CD, míg a vinkadiformin a γ -CD üregének méretét preferálja. A natív CD-k származékai esetén az alacsony stabilitási állandók majd minden esetben növekedtek, ez legjelentősebben a permanens negatív töltésű SB-CD származékok esetén volt észrevehető. Ekkor a feltehetően ionos kölcsönhatásokkal stabilizált komplex átlagos stabilitási állandója a semleges CD-kel meghatározott értéknek gyakran több, mint százszorosára nőtt. A CM-CD származékok ezen a pH-n már részben protonáltak és szubsztitúciós fokuk is alacsonyabb a szulfobutilezett származékokénál, így ionos kölcsönhatások kialakulására kevesebb lehetőség adódik. Ennek ellenére a CM-CD komplexek a natív, HP- és RAME-CD származékokkal összehasonlítva jelentősen stabilabbak. Ez utóbbi tendencia a β - és γ -származékok esetében figyelhető meg, az α -származékokra nem minden esetben áll fenn. A semleges származékokat összevetve a random metil szubsztitúció a kedvezőbb a vinkadiformintól eltekintve, ahol a HP- β - és HP- γ -CD komplexek stabilabbak, mint a megfelelő random metilezett származékok asszociátumai. A korábban publikált eredményekkel összevetve [85, 86] a vinpocetin β - és HP- β -CD komplexek általunk meghatározott stabilitása jelentősen alacsonyabb ($K=75 \text{ M}^{-1}$ vs. $K<0,5 \text{ M}^{-1}$, ill. $K=286 \text{ M}^{-1}$ vs. $K=14 \text{ M}^{-1}$), míg az SB- β -CD-re meghatározott állandó szignifikánsan magasabb ($K=340 \text{ M}^{-1}$ vs. $K=1130 \text{ M}^{-1}$) a publikálnál. Ezen eltéréseket a kísérleti körülmények (pH, puffer koncentráció, hőmérséklet) és az alkalmazott módszerek (CE vs. oldékonyság vizsgálat) különbözősége vagy a szubsztituált származékok esetében az eltérő szubsztitúciós fok és tisztaság okozhatta.

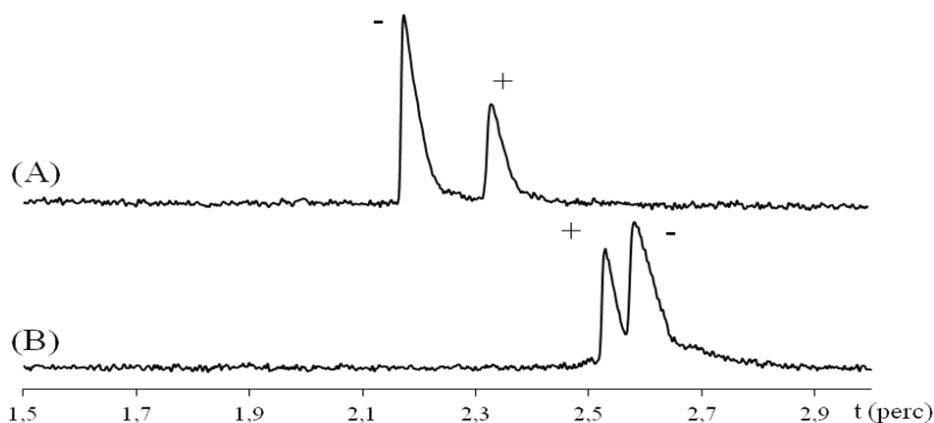
A vizsgálatok során alkalmazott ciklodextrinek közül számos mutatott enantioszelektivitást a vinka alkaloid származékok iránt. A leghatékonyabb szeparációt az ionizálható CM- és SB-CD-kel sikerült elérni. A legmagasabb R_S értékeket vinpocetin esetében SB- γ - ($R_S=4,08$) és CM- γ -CD-t ($R_S=3,81$) vinkamin esetében SB- γ -CD-t ($R_S=7,84$), vinkadiformin esetében pedig CM- γ -CD-t ($R_S=25,1$) alkalmazva sikerült elérni. A natív CD-k közül egyedül a γ -CD tudta a vinpocetin és vinkadiformin enantiomereket elválasztani, vinkaminra egyik natív szelektor sem volt szelektív. A vinpocetin és a vinkadiformin enantiomereket valamennyi γ -CD származék, a vinkamin izomereit pedig valamennyi α -CD származék elválasztotta. A komplexek számos esetben alacsony stabilitást mutattak, ennek megfelelően (Wren elméletét igazolva) az

elválasztás felbontása a szelektor koncentrációjának növekedésével egyre javult (29. ábra), azt mutatva, hogy az optimális CD koncentrációt még nem sikerült elérni [163].



29. ábra. Az elválasztási hatékonyság változása a CD koncentráció függvényében vinkadiformin-RAMEB-CD rendszerben.

Sok esetben a ciklodextrin kis szerkezeti vagy kémiai változása is nagyban befolyásolhatja a királis felismerést, és megfordíthatja az enantiomerek iránti affinitást. Vizsgálataink során három esetben tapasztaltunk üregméretfüggő, egy esetben pedig szubsztituensfüggő migrációs sorrend változást. A vándorlási sorrend üregméretfüggő változása figyelhető meg a vinpocetin-HP- β -/HP- γ -CD, a vinkadiformin-HP- β -/HP- γ -CD és vinkadiformin-RAMEB-/RAMEG-CD rendszerekben, melyek közül az utóbbit az 30. ábra szemlélteti. Az elválasztást savas pH-n végezve a vinkadiformin enantiomerek pozitív töltésű részecskéként vannak jelen az oldatban. A semleges metil CD-vel képzett komplex fajlagos töltésüket csökkenti, így lassítja őket. Az 30. ábra (A) esetében a RAMEB-CD-nel a (+)-enantiomer képezi a stabilabb komplexet, annak lassul jobban a migrációs ideje, RAMEG-CD-t alkalmazva (B) már ez a komplex a kevésbé stabil, így ez éri el előbb a detektort.



30. ábra. A vinkadifformin enantiomerek üregméret-függő megfordulása 75 mM RAMEB-CD (A), ill. 50 mM RAMEG-CD (B) alkalmazásakor.

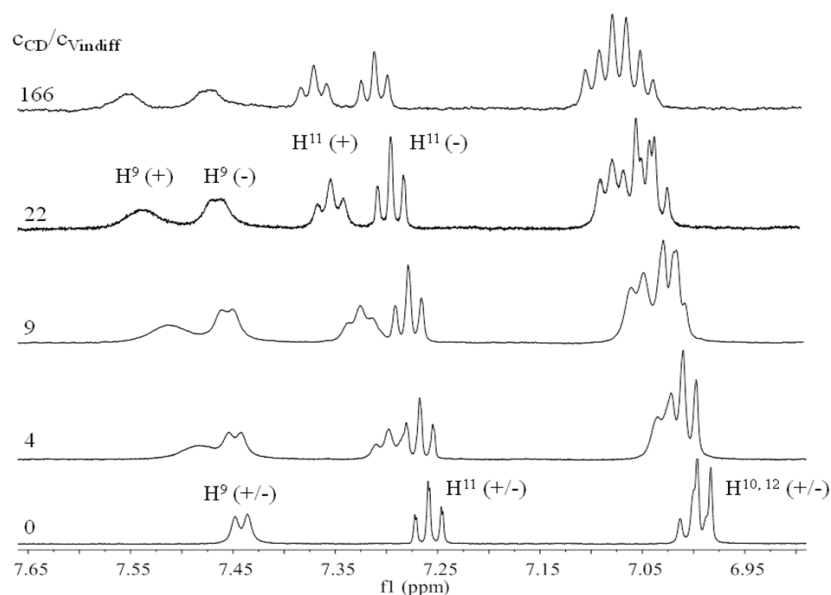
Az enantiomerek sorrendjének szubsztituens-függő megfordulása vinpocetin- γ -/HP- γ -CD rendszerekben következett be. γ -CD-t alkalmazva (-), (+) volt a migrációs sorrend, mely HP- γ -CD-t alkalmazva megfordult, vagyis az előbbivel a (+), az utóbbival a (-) enantiomer képezett stabilabb komplexet.

Bizonyos látszólagos komplex stabilitási tartományon belül ($10 < K < 10^4$) az NMR is alkalmas technika a zárványkomplexek stabilitásának vizsgálatára, mint azt az 6.2.1.1 fejezetben bemutattuk. Hasonló vizsgálatot néhány vinka alkaloid-CD komplex esetében is elvégeztünk az eredmények összehasonlítása végett. A vizsgálathoz olyan rendszereket választottunk ki, ahol a stabilitási állandók a fent megadott tartományba esnek, és viszonylag nagy a különbség a diasztereomer asszociátumok stabilitása között. Ennek megfelelően a vinkadifformin enantiomerek HP- γ - és CM- γ -CD komplexeinek stabilitását határoztunk meg. A méréseket $pD=2,5$ -n végeztünk H_2O/D_2O 9/1 elegyben, referenciaként MeOH-t alkalmazva ($\delta=3,300$ ppm). A stabilitási állandókat az 6.2.1.1 fejezetben bemutatottak alapján az OPIUM program segítségével számítottuk ki. Az NMR-titrálások alapján kalkulált stabilitási állandókat a 15. táblázat foglalja össze.

15. táblázat. A vinkadifformin-CD komplexek NMR-titrálással meghatározott stabilitási állandói.

| Alkaloid | CD származék | K (+) | K (-) |
|----------------|------------------|---------|---------|
| Vinkadifformin | HP- γ -CD | 74 (9) | 10 (1) |
| Vinkadifformin | CM- γ -CD | 85 (5) | 19 (4) |

A táblázatból kitűnik, hogy az így meghatározott állandók jobban eltérnek egymástól, mint azt a CE mérések alapján számítottuk. Az eltérések lehetséges okait az 6.2.1.1 fejezetben tárgyaltuk. Az állandók ilyen mértékű eltérésének hatására az NMR spektrumokon is egyre kifejezettebben elkülönülnek egymástól a diasztereomer komplexek jelei, amely jelenséget a racém vinkadiformin különböző CD/alkaloid arányú mintáinak spektrumán szemléltetjük (31. ábra).



31. ábra. A racém vinkadiformin ^1H NMR-titrálása HP- γ -CD-nel.

6.2.1.4 Imperanén

Az imperanén CD komplexképzését és enantiomerjeinek királis elválasztását az előzetes vizsgálatok alapján megállapított pH=9,0 értéken, 75 mM borát pufferben végeztük, amely körülmények között a vegyület részleges negatív töltéssel rendelkezik. A komplexképző és elválasztási tulajdonságokat 27 különböző CD származékkal vizsgáltuk.

Komplexképzés és elválasztás vizsgálata CE-vel. Az Ipn-CD komplexek stabilitását a korábbiakkal megegyező módon, x-reciprok módszerrel kalkuláltuk a számítás során feltételezve, hogy a komplex 1:1 sztöchiometriájú. Az átlagos stabilitási állandók meghatározása után a királis elválasztást a Wren képlete alapján számított optimális CD koncentrációnál vizsgáltuk. Az így meghatározott átlagos komplex stabilitási állandókat (K) és a felbontási értékeket (R_S) az 16. táblázat tartalmazza.

16. táblázat. Az Ipn enantiomerek komplex stabilitási állandói és a királis elválasztás hatékonysága.

| CD származék | Stabilitási állandó, felbontási érték |
|------------------------|---|
| α -CD | $K < 5$ |
| β -CD | $K < 5$ |
| γ -CD | $K < 5$ |
| HP- α -CD DS~3 | $K_S = 36 (2)^* K_R = 32 (3)$ $R_S = 0,53$ |
| HP- β -CD DS~3 | $K_S = 34 (5) K_R = 13 (4)$ $R_S = 0,61$ |
| HP- β -CD DS~4,6 | $K = 190 (3)$ |
| HP- β -CD DS~6,3 | $K_S = 36 (4) K_R = 4 (1)$ $R_S = 0,57$ |
| HP- γ -CD DS~3 | $K = 39 (4)$ |
| TRIMEA-CD | $K = 27 (4)$ |
| TRIMEB-CD | $K = 32 (3)$ |
| DIMEB-CD | $K = 23 (4)$ |
| RAMEB-CD | $K = 6 (2)$ |
| Ac- β -CD DS~7 | $K = 46 (5)$ |
| MA- β -CD | $K = 26 (4)$ |
| PA- β -CD | $K = 49 (1)$ |
| Suc- β -CD DS~6 | $K < 5$ |
| CM- β -CD DS~3 | $K = 14 (2)$ |
| CM- γ -CD | $K = 7 (1)$ |
| CE- β -CD | $K < 5$ |
| SP- α -CD DS~2 | $K = 85 (4)$ |
| SP- β -CD DS~4 | $K_S = 1600 (2) K_R = 1990 (3)$ $R_S = 0,62$ |
| SP- γ -CD DS~2 | $K = 168 (1)$ |
| SHP- β -CD DS~3 | $K = 710 (5)$ |
| SHP- γ -CD DS~3 | $K = 91 (1)$ |
| SB- α -CD DS~4 | $K_S = 113 (2) K_R = 107 (2)$ $R_S = 0,57$ |
| SB- β -CD DS~4 | $K = 2500 (6)$ |
| SB- γ -CD DS~4 | $K_S = 290 (2) K_R = 330 (4)$ $R_S = 1,26$ |

* A stabilitási állandó után zárójelben az utolsó értékes jegy bizonytalansága áll.

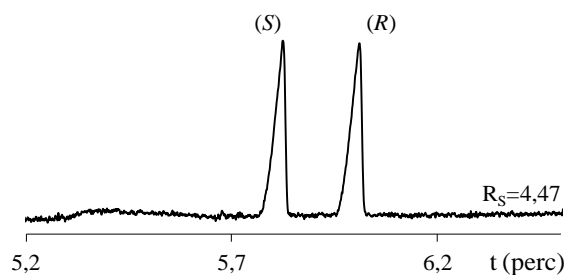
A táblázatból látható, hogy a legtöbb, ezen a pH-n semleges és számos negatív töltésű CD affinitása igen gyenge a vegyülethez, a stabilitási állandók nem érik el a 100-t. Semleges CD-k közül a HP- β -CD ($\sim 4,6$) stabilitása számottevő, negatívok közül a SP- β -CD, SHP- β -CD, SB- β -CD és SB- γ -CD kiemelkedőek. A királis elválasztás szempontjából az alkalmazott rendszerek nem érnek el átütő eredményt: mindössze hat CD rendelkezik enantioszelektív felismeréssel, ezek közül pedig csak SB- γ -CD-t alkalmazva sikerült alapvonal elválasztást elérni. Az enantiomereket ebben az esetben is izomertiszta anyag hozzáadásával azonosítottuk. Az SP- β -CD és az SB- γ -CD erősebben hat kölcsön az (*R*) izomerrel, a többi négy esetben az (*S*) enantiomer komplexe a stabilabb. Ennek megfelelően az SB- α -CD/SB- γ -CD esetben ismét egy üregméretfüggő migrációs sorrend megfordulást fedezhettünk fel.

Duál CD rendszerek alkalmazása. Mivel az egy CD-t tartalmazó rendszerekkel kielégítő elválasztást nem sikerült elérni, behatóan tanulmányoztuk a duál CD rendszerek hatását. A duál CD rendszerek kedvező esetben egy ionos és egy semleges, ellentétes királis felismerésű ciklodextrint tartalmaznak. Kézenfekvő volt tehát ionos CD-ként az önmagában is legjobb elválasztást produkáló, a semleges származékokkal ellentétes királis felismerésű SB- γ -CD-t alkalmazni. A megfelelő rendszer kiválasztása során ehhez párként számos semleges (HP- α -CD, HP- β -CD ~ 3 , HP- β -CD $\sim 4,6$, HP- β -CD $\sim 6,3$), és ionos (SHP- β -CD ~ 3 , SB- β -CD ~ 4 , SB- α -CD ~ 4 , PA- β -CD) származékot próbáltunk ki, melyek nem mindegyike okozott önmagában elválasztást. A felsoroltak közül a HP- α -, HP- β - (~ 3 ; $\sim 6,3$) és SB- α -CD-k királis felismerése ellentétes a SB- γ -CD-vel. Bár a PA- β -CD önmagában nem okozott elválasztást, de kationos ciklodextrinként befolyásolhatja az Ipn-SB- γ -CD kölcsönhatást, így esetlegesen javítva a felbontást. Az 17. táblázatban a duál CD rendszerként letesztelt nyolc CD-párt soroltuk fel. Minden pár esetén több, a stabilitási állandók nagyságrendjének megfelelően kiválasztott koncentráción teszteltük a rendszereket. A táblázatban látható felbontási értékek az elért legjobb elválasztáshoz tartoznak (a CD-k után zárójelben az ekkor alkalmazott szelektor koncentráció van feltüntetve).

17. táblázat. Az Ipn-duál CD rendszerek elválasztási hatékonysága.

| CD – 1 | CD – 2 | Felbontási érték |
|--|---|------------------|
| SB- γ -CD (5 mM) | HP- α -CD (30 mM) | 1,45 |
| SB- γ -CD (5 mM) | HP- β -CD DS~3 (50 mM) | 0,69 |
| SB- γ -CD (7,5 mM) | HP- β -CD DS~4,6 (30 mM) | 1,73 |
| SB- γ -CD (5 mM) | HP- β -CD DS~6,3 (50 mM) | 2,22 |
| SB-γ-CD (12,5 mM) | PA-β-CD (10 mM) | 4,47 |
| SB- γ -CD (10 mM) | SB- α -CD (5 mM) | 1,72 |
| SB- γ -CD (7,5 mM) | SB- β -CD (5 mM) | 0,88 |
| SB- γ -CD (12,5 mM) | SHP- β -CD (10 mM) | 1,04 |

Az alkalmazott duál CD rendszerek közül az optimalizált SB- γ -CD/PA- β -CD rendszerrel kiemelkedően jó ($R_S=4,47$) felbontást sikerült elérni (32. ábra). A háttéreltrolit ekkor 12,5 mM SB- γ -CD-t és 10,0 mM PA- β -CD-t tartalmazott.

**32. ábra.** Az Ipn enantiomerek optimalizált elválasztása 12,5 mM SB- γ -CD-t és 10,0 mM PA- β -CD-t tartalmazó duál CD rendszerrel.

6.2.1.5 Szigliptin

A szigliptin enantiomerek komplexképző tulajdonságait és királis elválasztását az előzetesen NMR-rel és CE-vel meghatározott savi disszociációs állandók alapján kiválasztott pH=6,0 értéken vizsgáltuk kapilláris elektroforézissel 29 különböző ciklodextrint alkalmazva. Ezen a pH-n a szigliptin primer amino funkciója protonált állapotban van, így a vegyület pozitív töltése révén alkalmas a CE vizsgálatra. Az átlagos komplex stabilitási állandók számítását ezúttal is x-reciprok módszerrel végeztük, az elválasztás felbontását pedig az ezek alapján Wren képlete szerint meghatározott optimális CD koncentrációnál tanulmányoztuk. A meghatározott átlagos komplex stabilitási állandókat és felbontási értékeket a 18. táblázat tartalmazza.

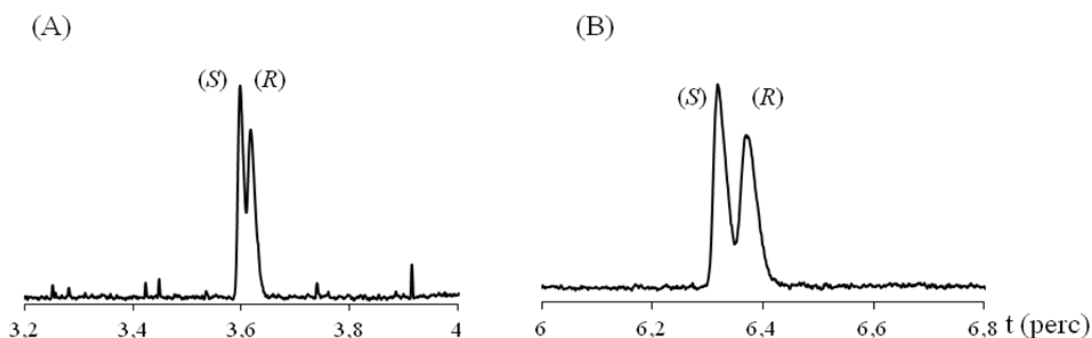
18. táblázat. A szitagliptin-CD komplexek stabilitási állandói (K) és az enantiomerek királis elválasztásának hatékonyságát jellemző felbontási értékek (R_S).

| Ciklodextrin | Stabilitás (K [M^{-1}]) | R_S | Ciklodextrin | Stabilitás (K [M^{-1}]) | R_S |
|------------------------|-----------------------------------|-------|-----------------------|-----------------------------------|-------|
| α -CD | 47 (7)* | | Suc- β -CD DS~4 | 39 (6) | |
| β -CD | 62 (4) | | CM- β -CD DS~3 | < 5 | |
| γ -CD | 10 (2) | | CM- γ -CD DS~3 | S: 120 (3) R: 125 (4) | 0,50 |
| HP- α -CD | 16 (2) | | CE- β -CD | S: 119 (4) R: 124 (8) | 0,74 |
| HP- β -CD DS~3 | 7 (1) | | SP- α -CD DS~2 | S: 48 (2) R: 50 (1) | 0,81 |
| HP- β -CD DS~4,6 | 31 (6) | | SP- β -CD DS~4 | < 5 | |
| HP- β -CD DS~6,3 | 66 (9) | | SP- γ -CD DS~2 | 51 (5) | |
| HP- γ -CD DS~3 | < 5 | | P- β -CD DS~4 | 285 (3) | |
| TRIMEA-CD | 50 (3) | | SHP- β -CD | S: 49 (2) R: 52 (3) | 0,42 |
| TRIMEB-CD | < 5 | | SHP- γ -CD | 22 (9) | |
| TRIMEG-CD | < 5 | | SB- α -CD | S: 312 (4) R: 320 (8) | 0,77 |
| DIMEB-CD | 40,9 (6) | | SB- β -CD DS~4 | S: 105 (8) R: 115 (8) | 1,02 |
| RAMEB- β -CD | 29 (3) | | SB- β -CD DS~7 | < 5 | |
| Ac- β -CD DS~7 | 56 (9) | | SB- γ -CD DS~4 | 114 (9) | |
| MA- β -CD | < 5 | | | | |

* A stabilitási állandók után zárójelben található számok az utolsó értékes jegy szórását jelölik.

A táblázatból kitűnik, hogy a SgIi affinitása a legtöbb CD felé az Ipn-hez hasonlóan alacsonynak mondható. A semleges CD-k egyikével sem képez $100 M^{-1}$ -nál stabilabb komplexet, a pozitív CD-nel pedig gyakorlatilag nem képez komplexet. Viszonylag

erősebb kölcsönhatásokat alakít ki a negatív CD-ekkel, közülük is a P- β -CD és SB- α -CD komplexe a legstabilabb. Míg királis elválasztást semleges és pozitív töltésű szelektorokkal nem sikerült elérni, a negatív CD-k közül hat, a CM- γ -CD, CE- β -CD, SP- α -CD, SHP- β -CD, SB- α -CD és SB- β -CD (DS~4) ismerte fel szelektíven a Sgli enantiomereket. A legjobb elválasztást az 5 mM SB- β -CD-t tartalmazó háttérelktrólittal sikerült elérni ($R_S=1,02$), azonban ez az eredmény messze nem kielégítő. Az CE- β -CD és SB- β -CD optimális (Wren képletével számolt) koncentrációjánál felvett elektroferogramokat a 33. ábra szemlélteti.

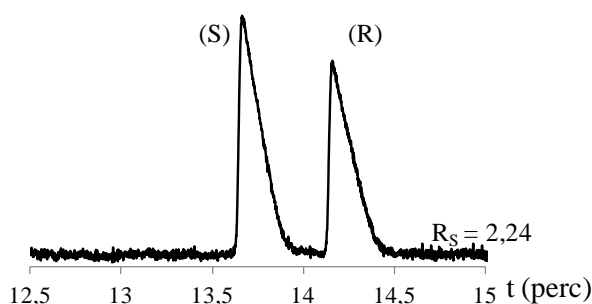


33. ábra. Az Sgli enantiomerjeinek királis elválasztása 10 mM CE- β -CD (A) és 5 mM SB- β -CD (B) jelenlétében.

Az enantiomerek sorrendjének megállapítása izomertiszta (S)-Sgli hozzáadásával történt. Mind a 18. táblázatból, mind a 33. ábráról látszik (a Sgli pozitív töltését figyelembe véve), hogy királis felismerés esetén valamennyi CD az (R)-enantiomerrel képezte a stabilabb komplexet. Mivel az egy ciklodextrint tartalmazó rendszerekkel megfelelő elválasztást nem sikerült elérni, behatóan tanulmányoztuk a duál CD rendszerek alkalmasságát a felbontás javítására.

Az előzetes kísérletekkel összhangban a duál CD kísérletekhez 12 pár ciklodextrint választottunk ki. Semleges CD-ket tekintve olyanokat szelektáltunk, amelyek a Sgli-vel stabilabb komplexet képeztek, így a β -, HP- β - (DS~6,3) és DIMEB-CD-ket. Az anionos CD-k közül azt a négyet választottuk, amelyek a legjobb felbontást mutatták önálló rendszerben, tehát a CE- β -, SP- α -, SB- α - és SB- β -CD-ket. Az így kiválasztott CD-ek valamennyi lehetséges kombinációjával végeztünk méréseket és bár az esetek többségében az egy CD-vel elért felbontást javult, átütő eredményt nem sikerült elérni. A legjobb felbontást az 5 mM SB- β -CD-t és 5 mM natív β -CD-t tartalmazó rendszer eredményezte, amely már alapvonal elválasztásnak bizonyult ($R_S=1,51$). A még jobb

elválasztás elérése érdekében a rendszert három paraméter, a pH, a puffer koncentráció és a hőmérséklet függvényében optimalizáltuk (a CD koncentrációk optimalizálása a rendszer fejlesztése során már megtörtént). A megfelelő paraméterek kiválasztásához egyváltozós módszert alkalmaztunk. A BGE pH-ját 3,90 és 6,17 között kb. 0,25 egység lépésenként, a foszfát puffer koncentrációját 10 és 50 mM között 10 mM egységenként változtattuk, míg a hőmérséklet hatását 10 és 45 °C között 5 °C egységeket változtatva vizsgáltuk. A paraméterek hatásának tanulmányozása után a pH=4,4 40 mM foszfát puffer bizonyult optimális háttéreltrolitnak, a kapilláris hőmérsékletét pedig 10 °C-on tartottuk az elektroforézis alatt. Ilyen körülmények között $R_S=2,24$ felbontási értéket sikerült elérni, melyet a 34. ábra mutat be.



34. ábra. A Sgli enantiomerek elválasztása optimalizált duál-CD rendszerrel (5 mM SB- β -CD, 5 mM natív β -CD, pH=4,4, 40 mM foszfát puffer, 10 °C).

6.2.1.6 Dapoxetin

A dapoxetin CD komplexeinek vizsgálatát az előzetes kísérletek alapján 50 mM acetát pufferben (pH=5,50) kezdtük meg. Ilyen körülmények között a Dpx protonált formában, pozitív ionként van jelen az oldatban. A mérések során 22 CD komplexképző tulajdonságait és királis elválasztási potenciálját vizsgáltuk meg a Dpx enantiomerekre a korábban bemutatott módszereknek megfelelően. A kísérletek alapján meghatározott átlagos komplex stabilitási állandókat és felbontási értékeket a 19. táblázat tartalmazza.

19. táblázat. A Dpx enantiomerek CD komplexeinek stabilitási állandói (K) és a királis elválasztások felbontási értékei (R_S) a Wren képlete szerinti optimális szelektor koncentrációnál.

| CD származék | Stabilitási állandó, felbontási érték |
|------------------|--|
| α -CD | $K < 5$ |
| β -CD | $K = 379$ (9) |
| γ -CD | $K = 225$ (6) |
| HP- α -CD | $K = 40$ (3) |

| | |
|------------------------|---|
| HP- β -CD DS~3 | $K = 193$ (2) |
| HP- β -CD DS~4,6 | $K = 360$ (2) |
| HP- β -CD DS~6,3 | $K = 330$ (4) |
| HP- γ -CD | $K_S = 240$ (4) $K_R = 290$ (5) $R_S = 0,50$ |
| TRIMEB-CD | $K_S = 95$ (4) $K_R = 118$ (3) $R_S = 1,54$ |
| TRIMEG-CD | $K = 73$ (7) |
| DIMEB-CD | $K = 340$ (4) |
| RAMEB-CD | $K = 510$ (1) |
| RAMEG-CD | $K_S = 360$ (2) $K_R = 590$ (8) $R_S = 3,32$ |
| CM- β -CD DS~3 | $K < 5$ |
| CM- γ -CD | $K_S = 54$ (5) $K_R = 61$ (3) $R_S = 1,38$ |
| CE- β -CD | $K < 5$ |
| SP- α -CD DS~2 | $K < 5$ |
| SP- β -CD DS~4 | $K_S = 280$ (6) $K_R = 310$ (8) $R_S = 1,01$ |
| SP- γ -CD DS~2 | $K < 5$ |
| SHP- γ -CD DS~3 | $K < 5$ |
| SB- α -CD DS~4 | $K = 28$ (1) |
| SB- β -CD DS~4 | $K_S = 610$ (1) $K_R = 690$ (2) $R_S = 0,62$ |

* A stabilitási állandók után zárójelben található számok az utolsó értékes jegy szórását jelölik.

A táblázat alapján levonható az érdekes következtetés, mely szerint a pozitív töltésű Dpx általánosan sokkal nagyobb affinitást mutat a semleges, mint az ellentétes töltésű negatív CD-k felé. Ennek ellenére legstabilabb komplexet a negatív töltésű SB- β -CD-vel képezi, de jelentős stabilitású emellett a natív β -, γ -, a legtöbb HP-CD, az SP- β -, RAMEG-, RAMEB- és DIMEB-CD komplexe is. Az alkalmazott CD-k viszonylag kis hányadánál, hat származéknál tapasztaltunk királis felismerést. Ezek közül a HP- γ -, SP- β - és SB- β -CD esetén részleges, míg TRIMEB-, RAMEG- és CM- γ -CD esetén alapvonal-elválasztás volt tapasztalható. A leghatékonyabb az enantiomereket $R_S=3,32$ felbontással elválasztó random metilezett γ -CD volt 3 mM-os koncentrációban. A csúcok azonosítását ez esetben is izomertizta anyag hozzáadásával végeztük. Minden

királis elválasztás esetén az (*S*) enantiomer migrált elől, mely alapján a vegyület töltésének ismeretében kimondhatjuk, hogy az (*R*) forma komplexe a stabilabb. A következőkben az elválasztás hatékonyságának növelése végett számos paraméter hatását tanulmányoztuk.

Optimalizálás. Egy elválasztástechnikai módszer fejlesztése során a legjelentősebb kísérleti paraméterek optimalizálása alapvető fontosságú. Erre az irodalomban számos módszer létezik, melyek közül a talán legegyszerűbb, egyváltozós módszert annak előnyeivel és hátrányaival már bemutattuk. A királis elválasztás paramétereinek optimalizálását a Dpx enantiomerek esetében az *ortogonális kísérlettervezés* segítségével végeztük el. A módszer során több alapvető elválasztási paraméter hatását is vizsgáljuk a felbontásra, valamint lehetőségünk van ezek interakcióit is tanulmányozni [258-260]. További előnye a technikának az egyváltozós módszerrel szemben, hogy nem szükséges olyan nagyszámú kísérletet elvégezni, valamint, hogy segítségével az elválasztás szempontjából lényeges és kevésbé lényeges paraméterek jól megkülönböztethetők, esetleges sorrend állítható fel. Az optimalizálás során hat paramétert, a hőmérsékletet (°C), az alkalmazott feszültséget (kV), a ciklodextrin és a puffer koncentrációt (mM), a hozzáadott szerves módosító koncentrációját (V/V%), valamint a pH-t vettük figyelembe. Valamennyi változót 3-3 értéken tanulmányoztuk az elválasztás során, melyeket az előzetes kísérletek alapján határoztunk meg. Ezen változókból egy standard ortogonális táblát készítettünk, mely 18 kísérletben tartalmazza az egyes paraméterek szisztematikusan párosított értékeit (20. táblázat). A kiértékelés során az egyes kísérletekben mért felbontási értékeket elemeztük. A felbontási értékek segítségével megállapítható, hogy mely paraméterek befolyásolják jelentősen az elválasztást és melyek kevésbé. A táblázatban szereplő K1, K2, K3 értékek azt az átlagos felbontási értéket jelzik, melyet az adott paraméter adott értékénél a mérések során elértünk. Tehát például a hőmérséklet oszlop K1 értéke a legalacsonyabb hőmérsékleten, 15 °C-on lefuttatott valamennyi mérés során elért átlagos felbontást jelenti. A táblázatban *R*-rel a három K érték közül a legnagyobb és legkisebb különbséget adtuk meg ($K_{\max}-K_{\min}$) minden paraméterre. Minél magasabb *R* értéke, annál nagyobb befolyással bír az adott tényező az elválasztás hatékonyságára nézve. A mérések kielemezésével felállítható a sorrend a vizsgált paraméterek felbontásra gyakorolt befolyása között.

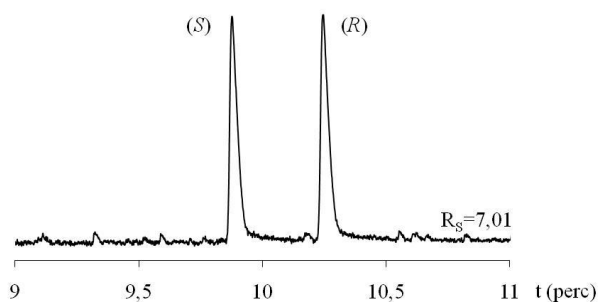
A hőmérsékleti értékek kiválasztása során az előzetes kísérletben alkalmazott 25 °C mellett 15 és 35 °C-on végeztünk méréseket. Az alkalmazott feszültséget 15-20-25 kV-nak választottuk meg. A legjobb elválasztást a RAMEG-CD-nel 3 mM koncentráció mellett érték el, ezen érték mellé az 1, ill. 5 mM koncentrációt választottuk a vizsgálathoz. Szerves additív hozzáadása a háttérelktrolithoz jelentősen befolyásolhatja az elválasztás hatékonyságát a viszkozitás és a zárványkomplex stabilitásának megváltoztatása révén [164, 260]. Az előzetes kísérletek során két szerves adalék, a metanol és az acetonitril hozzáadásának hatását vizsgáltuk. A két anyag közül az előbbi javította az elválasztási hatékonyságot, míg az acetonitril kedvezőtlen hatással volt a csúcsalakra, így a továbbiakban a metanol optimális koncentrációját is kerestük. A MeOH koncentrációjának hatását 0-10-20 V/V% mellett tanulmányoztuk. A korábban alkalmazott 50 mM-os puffer koncentráció és pH=5,5 mellett 30 és 70 mM-os pufferekkel, illetve pH=4,5 és pH=6,5 közegben is dolgoztunk. Az egyes kísérletek paramétereit illetve a számított felbontási értékeket a 20. táblázat foglalja össze.

20. táblázat. Az ortogonális kísérlettervezés paramétereit és a felbontási értékeket a Dpx enantiomerek elválasztása során.

| Kísérlet | T (°C) | U (kV) | c _{CD} (mM) | c _{org} (V/V%) | c _{BGE} (mM) | pH | R _s |
|----------|--------|--------|----------------------|-------------------------|-----------------------|-----|----------------|
| 1 | 15 | 15 | 1 | 0 | 30 | 4,5 | 4,92 |
| 2 | 15 | 20 | 3 | 10 | 50 | 5,5 | 5,74 |
| 3 | 15 | 25 | 5 | 20 | 70 | 6,5 | 6,45 |
| 4 | 25 | 15 | 1 | 10 | 50 | 6,5 | 4,46 |
| 5 | 25 | 20 | 3 | 20 | 70 | 4,5 | 5,81 |
| 6 | 25 | 25 | 5 | 0 | 30 | 5,5 | 4,01 |
| 7 | 35 | 15 | 3 | 0 | 70 | 5,5 | 3,68 |
| 8 | 35 | 20 | 5 | 10 | 30 | 6,5 | 2,35 |
| 9 | 35 | 25 | 1 | 20 | 50 | 4,5 | 2,39 |
| 10 | 15 | 15 | 5 | 20 | 50 | 5,5 | 4,61 |
| 11 | 15 | 20 | 1 | 0 | 70 | 6,5 | 4,31 |
| 12 | 15 | 25 | 3 | 10 | 30 | 4,5 | 4,27 |
| 13 | 25 | 15 | 3 | 20 | 30 | 6,5 | 2,55 |
| 14 | 25 | 20 | 5 | 0 | 50 | 4,5 | 3,26 |

| | | | | | | | |
|----------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|------|
| 15 | 25 | 25 | 1 | 10 | 70 | 5,5 | 2,74 |
| 16 | 35 | 15 | 5 | 10 | 70 | 4,5 | 3,03 |
| 17 | 35 | 20 | 1 | 20 | 30 | 5,5 | 1,21 |
| 18 | 35 | 25 | 3 | 0 | 50 | 6,5 | 2,16 |
| K1 | 5,05 | 3,88 | 3,34 | 3,72 | 3,22 | 3,95 | |
| K2 | 3,81 | 3,78 | 4,04 | 3,77 | 3,77 | 3,67 | |
| K3 | 2,47 | 3,67 | 3,95 | 3,84 | 4,34 | 3,71 | |
| R | 2,58 | 0,21 | 0,7 | 0,12 | 1,12 | 0,28 | |
| Optimum | 15 °C | 15 kV | 3 mM | 20% | 70 mM | 4,5 | |

Amint a táblázat adataiból kitűnik az elválasztáshoz a legmegfelelőbb rendszer a 20 V/V% MeOH tartalmú 70 mM acetát puffer (pH=4,5), mely 3 mM szelektort tartalmaz. A mérés során 15 kV feszültséget célszerű alkalmazni a kapilláris hőmérsékletét 15 °C-n tartva. Az ilyen paraméterek mellett felvett optimális elválasztást a 35. ábra mutatja.



35. ábra. A Dpx enantiomerek elválasztása optimális paraméterek mellett.

Az eredmények rávilágítanak arra is, mely paraméterek játszottak nagyobb szerepet az elválasztás nagymértékű ($R_s=7,01$) javulásában. A paraméterek közül ez alapján a legjelentősebb hatással a kapilláris hőmérséklete, majd a puffer és CD koncentráció változása bír, míg a pH, az alkalmazott feszültség és a szerves adalék koncentrációja kevés befolyást gyakoroltak a hatékonyságra ebben a tartományban. A mérési eredményeken variancia analízist végezve (21. táblázat) belátható, hogy mindezek ellenére egy paraméter sincs szignifikáns hatással az elválasztás hatékonyságára. A táblázatban szereplő SSD értékek az egyes adatok átlagtól való eltérésének négyzetösszegét jelölik. SSD belső alatt azt értjük, hogy egy adott paraméter bizonyos

értéke (pl. 3 mM CD koncentráció) mellett regisztrált felbontások mennyivel térnek el (négyzetesen) az ennél az értéknél átlagosan tapasztalhatótól, vagyis ez a csoporton belüli eltérés négyzetösszege. SSD külső alatt az egyes értékek (pl. 20 kV feszültség) alkalmazása mellett számított átlagos felbontás teljes átlagtól való eltérésének négyzetösszegét értjük. F értékét az (5.4) egyenlet alapján számítottuk:

$$F = \frac{\frac{SSD_{\text{külső}}}{szf_1}}{\frac{SSD_{\text{belső}}}{szf_2}} \quad (5.4)$$

szf_1 és szf_2 az F-próba két szabadsági foka, rendre 2 és 12.

21. táblázat. A kísérleti paraméterek variancia analízise (ANOVA táblázat).

| Paraméter | SSD (belső) | SSD (külső) | F* | Hatás |
|--------------|-------------|-------------|-------|------------------|
| Hőmérséklet | 14,782 | 3,330 | 1,351 | nem szignifikáns |
| Feszültség | 34,633 | 0,021 | 0,004 | nem szignifikáns |
| CD konc. | 33,023 | 0,289 | 0,053 | nem szignifikáns |
| MeOH konc. | 34,720 | 0,007 | 0,001 | nem szignifikáns |
| Puffer konc. | 31,007 | 0,625 | 0,121 | nem szignifikáns |
| pH | 34,487 | 0,045 | 0,008 | nem szignifikáns |

* $P < 0,05$ esetén a szignifikancia szint kritikus értéke 3,89 (a szabadsági fokok 2 és 12).

Validálás. Az optimalizált módszert a Nemzetközi Harmonizációs Konferencia (International Conference of Harmonization, ICH) analitikai módszerek validálására vonatkozó irányelve alapján validáltuk [264, E6], vizsgálva a módszer ismételhetőségét (repeatability), pontosságát (precision), linearitási tartományát (linearity range), helyesség (accuracy), kimutatási és mennyiségi meghatározhatósági határát (limit of detection, limit of quantification) valamint robusztusságát (robustness).

A migrációs idők, a csúcsterületek és az elválasztás felbontásának ismételhetőségét egy nyolc párhuzamosból álló mérésorozattal vizsgáltuk. A mérés során mindkét izomer koncentrációja 90 $\mu\text{g/ml}$ volt. A migrációs idők szórása 2,63 és 2,67%, a csúcsterületeké 3,72 és 4,06% volt rendre az (*R*) és (*S*) enantiomerekre, míg a felbontás szórása 3,74%-nak adódott. Ezek alapján a módszer ismételhetősége és precizitása is megfelelő.

A mérés linearitási tartományát a racém minta tíz különböző koncentrációban (1-1000 µg/ml) felvett elektroferogramjából számítottuk a csúcs alatti területek felhasználásával. A linearitási tartományt az alapján állapítjuk meg, hogy az ismert Dpx koncentráció a csúcs alatti területtel milyen koncentráció tartományban változik egyenesen arányosan. A detektálást a jobb jel/zaj arány végett 215 nm-en végezve a módszer 2-1000 µg/ml közötti koncentrációban lineárisnak bizonyult racém mintára. A kalibrációs egyenes korrelációs koefficiense (r^2) az *S*-enantiomerre 0,999, az *R*-izomerre 0,998 fölöttinek adódott. A csúcs alatti területet a koncentráció függvényében ábrázolva egyenesek illeszthetők a mérési pontokra, melyek egyenletei a két enantiomerre $y_S=0,3773x+4,0137$, valamint $y_R=0,4069x+4,0362$, ahol x a racém minta koncentrációját (µg/ml), y az enantiomer jelének csúcs alatti területét jelenti az elektroferogramon.

A linearitási tartomány vizsgálata során meghatároztuk az enantiomerek kimutathatóságának (LOD, 3/1 jel/zaj) és meghatározhatóságának (LOQ, 10/1 jel/zaj) határát is. Méréseink alapján az LOD mindkét enantiomerre 1,5 µg/ml, míg az LOQ értéke 5,0 µg/ml-nek adódott.

A mérés helyességét az alapján validáltuk, hogy milyen arányú a visszanyerés, ha a racém mintához (250 µg/ml) a racém komponensek ismert koncentrációjú (10, 25, ill. 50 µg/ml) oldatát adjuk. A visszanyerési érték (recovery) mindkét enantiomerre 95% fölötti volt (S: 95,58%, R: 96,68%), mindkét esetben 3% alatti szórással (S: 2,50%, R: 1,60%).

Robosztusság tesztelése során bizonyítani kell, hogy a kidolgozott módszer a paraméterek kismértékű, szándékosan előidézett változtatása esetén továbbra is alkalmas az enantiomerek elválasztására. Amennyiben a paraméterek ilyen változtatása jelentősen befolyásolja a felbontást, változtatni kell a módszeren, vagy a kísérleti protokollt szigorúan kell érvényesíteni a végrehajtás során. A robusztusság vizsgálatát 100 µg/ml koncentrációjú racém mintán végeztük el, a kísérleti paramétereket a korábban megállapított optimális értékek közelében tartva. Olyan statisztikai módszereket, mint a Plackett-Burman vagy a részleges faktoriális kísérlettervezés gyakran alkalmaznak a kísérletek számának minimalizálására [261]. A módszer robusztusságát Plackett-Burman kísérletterv alapján vizsgáltuk. Mivel a paraméterek értékeit csak kismértékben változtattuk, a köztük lévő kölcsönhatások változásait

elhanyagolhatóknak tekintettük [262, 263]. A kísérlet során a hat, korábban optimalizált változót vizsgáltuk, válaszként a csúcs alatti területeket, a migrációs időket és az elválasztás felbontását követve nyomon. A vizsgált változókat a kísérlet során egy, az optimálistól magasabb (+) és egy alacsonyabb (-) értéken alkalmaztuk. A hat változó tehát ezúttal is a hőmérséklet, az alkalmazott feszültség, a CD, MeOH és puffer koncentráció valamint a BGE pH-ja voltak. Ezekon kívül bevezettünk további két, véletlenszerű faktort (Vél-1, Vél-2), melyek a kísérleti hiba becslésére szolgálnak. Ezek képzeletbeli változók, melyek megváltozása a módszer paramétereiben nem jelent változást. A robusztusság vizsgálatokor alkalmazott Plackett-Burman kísérlettervet a 22. táblázat szemlélteti.

22. táblázat. A Dpx enantiomerek elválasztására optimalizált módszer robusztusságát vizsgáló Plackett-Burman táblázat.

| Kísérlet | 1 ^a | 2 ^b | 3 ^c | 4 ^d | 5 ^e | 6 ^f | Vél-1 | Vél-2 |
|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|-------|
| 1 | 3,2 | 72 | 4,4 | 22 | 14 | 14 | -1 | 1 |
| 2 | 2,8 | 68 | 4,4 | 22 | 16 | 16 | -1 | 1 |
| 3 | 2,8 | 68 | 4,4 | 18 | 14 | 14 | -1 | -1 |
| 4 | 3,2 | 72 | 4,6 | 18 | 16 | 16 | -1 | 1 |
| 5 | 3,2 | 68 | 4,6 | 18 | 14 | 14 | 1 | 1 |
| 6 | 2,8 | 68 | 4,6 | 22 | 16 | 14 | 1 | 1 |
| 7 | 3,2 | 68 | 4,4 | 18 | 16 | 16 | 1 | -1 |
| 8 | 3,2 | 68 | 4,6 | 22 | 14 | 16 | -1 | -1 |
| 9 | 2,8 | 72 | 4,4 | 18 | 14 | 16 | 1 | 1 |
| 10 | 2,8 | 72 | 4,6 | 22 | 14 | 16 | 1 | -1 |
| 11 | 3,2 | 72 | 4,4 | 22 | 16 | 14 | 1 | -1 |
| 12 | 2,8 | 72 | 4,6 | 18 | 16 | 14 | -1 | -1 |

^a CD koncentráció (mM), ^b BGE koncentráció (mM), ^c pH

^d MeOH koncentráció (V/V%), ^e hőmérséklet (°C), ^f feszültség (kV)

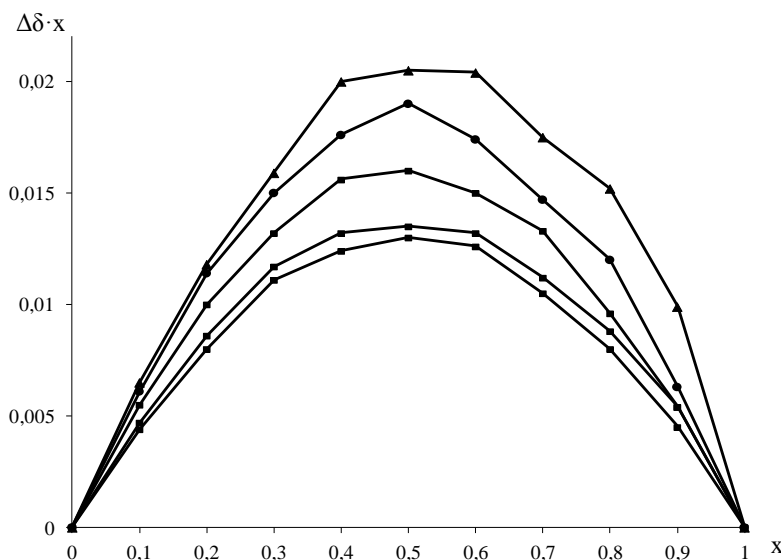
Válaszként ebben a kísérletben is a csúcs alatti területeket, a migrációs időket és a felbontási értéket regisztráltuk. Adatainkon ezután statisztikai analízist végezve vizsgáltuk, van-e valamely paraméter eltéréseinek szignifikáns hatása az elválasztás jellemző értékeire. A kiértékelés alapján megállapítottuk, hogy egyik paraméter

kismértékű változtatása sincs szignifikáns hatással a csúcs alatti területekre, migrációs időkre és az elválasztás felbontására, így a módszerről kijelenthető, hogy kellő robusztussággal bír.

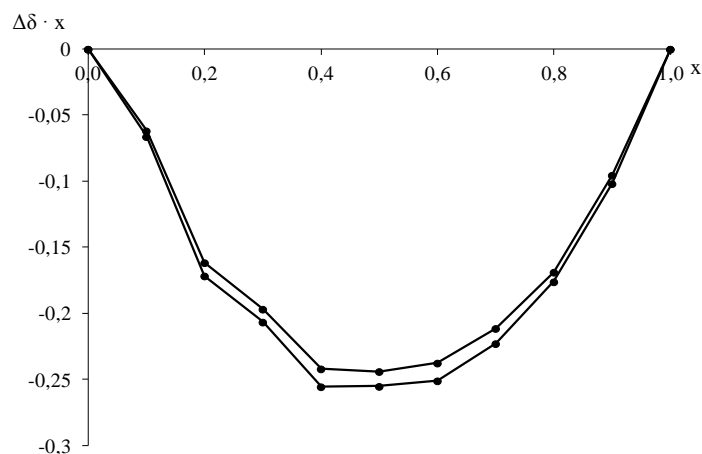
6.2.2 A komplexek sztöchiometriájának vizsgálata

A zárványkomplexek sztöchiometriáját a stabilitási állandók mind kapilláris elektroforézissel, mind NMR-rel történő kalkulálásakor 1:1 arányúnak tekintettük. Ezt a feltételezést indirekten igazolja CE esetén a mérési pontokra illesztett egyenesek nagy korrelációs koefficiense, NMR kísérletekben a titrálási pontokra a stabilitási állandók segítségével szerkesztett görbék jó illeszkedése. A komplexek átlagos sztöchiometriájának direkt meghatározására, illetve számításaink helyességének alátámasztására Job módszerét alkalmazva ^1H NMR titrálásokat végeztünk az aszpartám és a dapoxetin kivételével valamennyi vegyületnél. A szitagliptin esetében, lévén a vegyület fluor atomokat is tartalmaz, lehetőség nyílt ezt ^{19}F NMR titrálással is kiegészíteni.

A módszert a 3.4.4.2 fejezetben leírtak szerint végeztük el, majd a móltörttel súlyozott kémiai eltoldódásokat a móltört függvényében ábrázolva szerkesztettük meg a Job görbéket (36-37. ábra).



36. ábra. A Tos-preg (H^2 , H^3 , H^{16} - négyzet) és Dns-preg (H^4 - háromszög) β -CD-nel (H^3 - kör) végzett ^1H NMR titrálásai alapján szerkesztett Job görbék.



37. ábra. A szitagliptin β -CD-nel végzett ^{19}F NMR titrálása alapján szerkesztett Job görbék (F^6 , F^{12}).

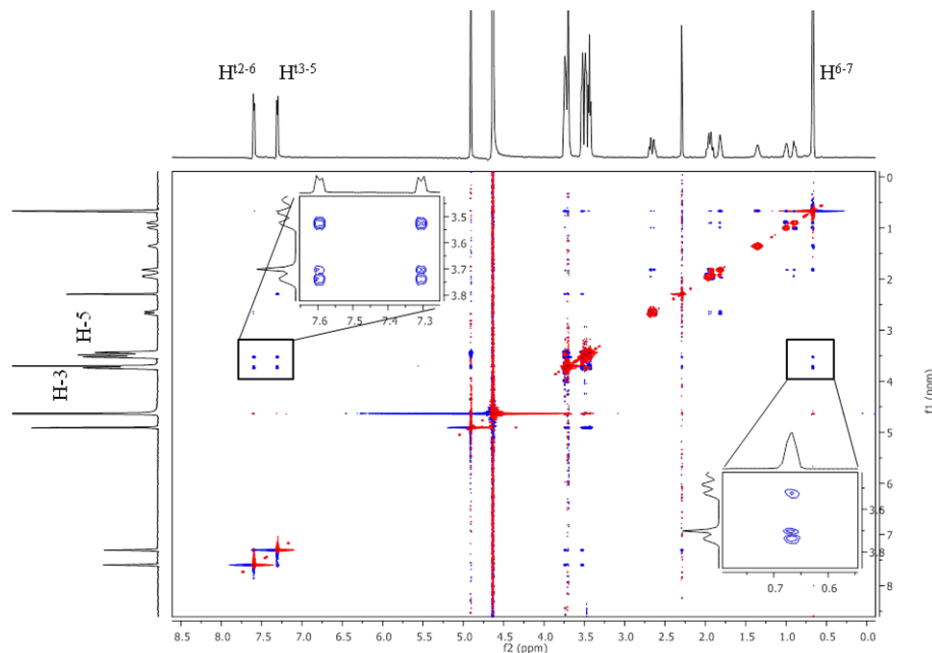
A fent bemutatott görbékkel analóg módon vizsgáltuk még a vinpocetin/RAMEB-CD, vinkadiformin/HP- γ -CD, szitagliptin/SB- β -CD valamint az Ipn/HP- β -CD és SB- γ -CD komplexek sztöchiometriáját. Adataink elemzése alapján kijelenthető, hogy a komplexek valamennyi esetben átlagosan 1:1 sztöchiometriájúak, így a számítások során az alkalmazott képleteket jogosan alkalmaztuk.

6.2.3 A komplexek térszerkezetének vizsgálata

A zárványkomplexek háromdimenziós szerkezetét 2D NMR spektroszkópiával, ROESY szekvenciát alkalmazva határoztuk meg. Mivel a technika segítségével az egymás térközelségében lévő magokról kaphatunk információt, a módszer alkalmas az intramolekuláris keresztcsúcsok segítségével a molekulák szerkezetének, míg CD zárványkomplexek esetén az intermolekuláris keresztcsúcsok segítségével a vendégmolekula behatolási irányának, mélységének és a feltételezhetően kölcsönható csoportoknak a megállapítására. A ciklodextrin komplexek szempontjából elsődleges jelentősége az üreg belsejében található H-3 és H-5 hidrogénatomoknak van, de fontos információt szolgáltathatnak a gyűrűalkotó cukrok oldallánc-protonjai által adott keresztcsúcsok is.

ROESY kísérleteket a Dpx kivételével valamennyi vizsgált molekulán végeztünk, számos esetben több, különböző CD komplexet is vizsgálva. A 38. ábra egy reprezentatív ROESY spektrumot mutat be Tos-preg/ β -CD mintán, melyen a számos

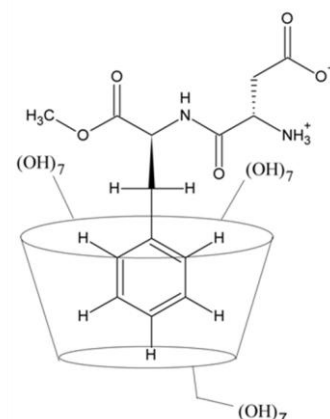
intramolekuláris keresztcsúcs mellett a komplex térszerkezetének megállapítását segítő intermolekuláris keresztcsúcsok kiemelve láthatók.



38. ábra. A Tos-preg/ β -CD komplex (5-5 mM) 2D ROESY spektruma (D_2O , 300 ms keverési idő), melyen felfedezhetők a belső CD protonok (H-3 és H-5) a Tos-preg aromás (H^{2-6} , H^{3-5}) és dimetil (H^{6-7}) protonjaival adott keresztcsúcsai.

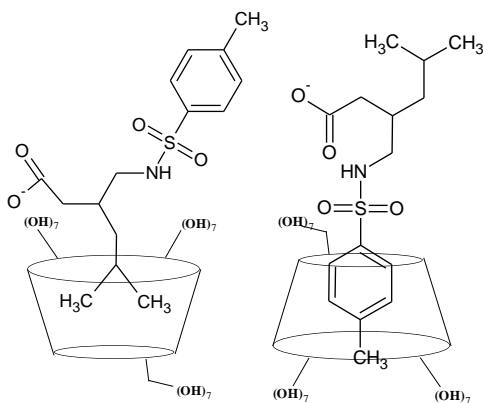
Hasonló spektrumok alapján derítettük fel az Asm- β -CD, mindkét pregabalin-származék β -, γ - és PA- β -CD, a Sgli β -CD/SB- β -CD, illetve az Ipn β -/HP- β - és SB- γ -CD komplexeinek térszerkezetét. A vinka alkaloidok esetében azt is vizsgáltuk, vajon az üregméret és szubsztituens-függő enantiomer sorrend megfordulások mögött a kialakuló komplexek eltérő szerkezete áll-e, így a vinpocetin-HP- β -CD/HP- γ -CD, vinkadiformin-HP- β -CD/HP- γ -CD, vinkadiformin-RAMEB-CD/RAMEG-CD (üregméretfüggő) valamint a vinpocetin-HP- β -CD/RAMEB-CD (szubsztituens függő) komplexek térszerkezetét vizsgáltuk.

Az NMR spektrumok alapján megállapítottuk, hogy az Asm az aromás gyűrűjével illeszkedik a β -CD üregébe a szekunder, szélesebb nyílás felől (39. ábra). Erre a megállapításra az Asm H^{2-6} , H^{3-5} valamint H^4 protonjainak a H-3 és H-5 CD protonokkal adott keresztcsúcsainak intenzitásából tudunk következtetni. Ezen megállapítások az irodalomban leírtakkal összhangban vannak.



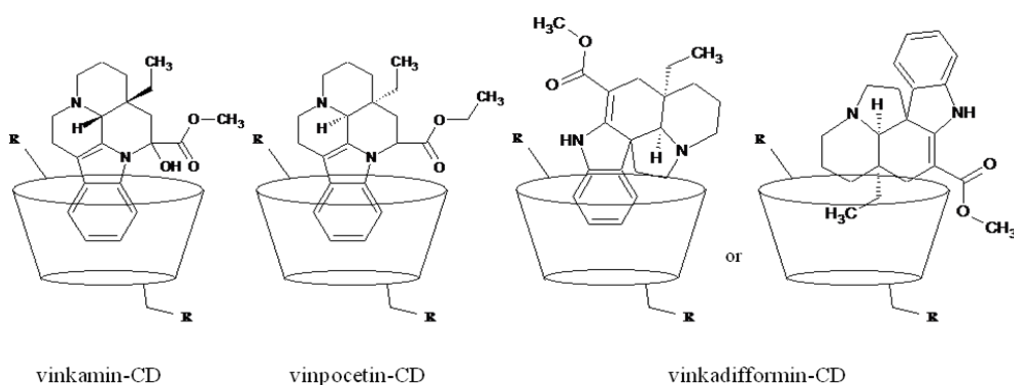
39. ábra. Az Asm- β -CD komplex szerkezete a ROESY adatok alapján.

A pregabalin-származékok komplexképzésének érdekes, de nem egyedi jelenséggel találkozhattunk: a korábban megállapított 1:1 átlagos sztöchiometria ellenére a keresztcsúcsok alapján két lehetséges szerkezet is megvalósulhat a komplexképzés során: vagy az aromás (tozil vagy danzil) molekularész illeszkedik az üregbe (előbbi a kisebb, utóbbi a nagyobb nyíláson át), vagy a pregabalin izobutils csoportja hatol az üregbe a tágasabb nyílás felől. A korábbi Job kísérletek alapján ez a két, eltérő szerkezetű komplex egyensúlyban van egymással, az NMR időskálán gyors kicserélődésben léteznek. Egy sor, változó keverési idővel (100-300 ms között, 50 ms léptékkel) elvégzett kísérlet alapján megállapítható volt, hogy a két lehetséges szerkezet közül az aromás molekularészek illeszkedése a preferált. A Tos-preg származékok zárványkomplexének ROESY adatok alapján megállapított két lehetséges szerkezetét a 40. ábra szemlélteti.



40. ábra. A Tos-preg-CD komplexek két lehetséges térszerkezetének sematikus ábrázolása.

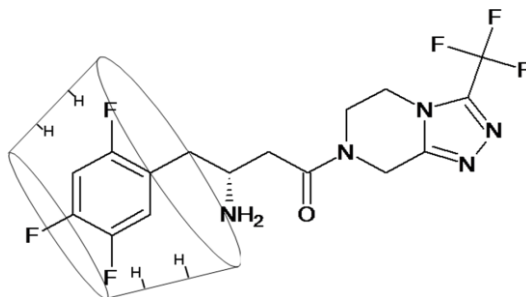
A vinka alkaloidokkal végzett kísérletek a vinpocetin esetében azt igazolták, hogy az alkaloid aromás gyűrűje hatol be a CD üregébe a szélesebb nyílás felől, mely a korábban publikált adatokkal egyezik [84, 85]. A vinpocetin egyes CD származékokkal képezett komplexei között jelentős különbséget nem sikerült kimutatni, a keresztcsúcsoknak kizárólag az intenzitásában voltak különbségek (azonos paraméterek mellett vizsgálva), a jellegében nem. Ezek alapján azt lehet következtetésként levonni, hogy az illeszkedés módja minden esetben azonos, eltérés esetleg a mélységében lehetséges. A vinkadiformin esetében a pregabalinnál bemutatottaknak megfelelően két, eltérő szerkezetű komplex alakulhat ki: vagy az aromás gyűrű, vagy az etil oldallánc illeszkedik a CD üregébe a szélesebb nyílás felől. Az intermolekuláris keresztcsúcsok alapján CD származéktól függetlenül mindkét forma létezik, azok előfordulásának aránya azonban eltérő. A vinkadiformin HP- β -/HP- γ -CD komplexeinek vizsgálatából a csúcsok intenzitása alapján kiderült, hogy a β -származék esetében a két forma előfordulási valószínűsége összemérhető (az alkil láncé preferált), míg a nagyobb üregméret esetében az aromás gyűrű illeszkedése erősen dominál. Az alkil molekularész kifejezettebb részvétele a komplexképzésben magyarázhatja a migrációs sorrendben bekövetkező változásokat. Hasonló következtetés vonható le a vegyület RAMEB-/RAMEG-CD komplexeinek vizsgálatából, ahol a nagyobb üregméretű gazdamolekulánál a két forma jelenléte összemérhető, míg a β -származéknál az aromás illeszkedés dominanciája jelentős. A vinka alkaloidok ciklodextrin komplexeinek feltételezett szerkezetét a 41. ábra mutatja be.



41. ábra. A vinka-alkaloid-CD komplexek szerkezete a ROESY adatok alapján.

A Sgli CD komplexeinek térszerkezetét β -CD és SB- β -CD származékokkal vizsgáltuk. Keresztcsúcsokat mindkét esetben az aromás vendég és belső üregbeli CD

protonok között lehetett felfedezni. A legintenzívebbnek a H¹³ és H¹⁶ Sgli és H-3, ill. H-5 CD protonok közötti keresztcsúcsok bizonyultak. Kevésbé intenzív keresztcsúcs jelent meg a H¹⁰ szitagliptin és H-3 ciklodextrin protonok között, mely értékes információkat szolgáltatott az illeszkedés irányáról és megerősítette az aromás gyűrű szerepét a komplexképződésben. Mindezek alapján a Sgli a 42. ábrának megfelelő módon, a trifluoraromás gyűrűvel illeszkedik a CD üregébe a tágabb nyílás irányából.



42. ábra. A Sgli molekula illeszkedése a ciklodextrin üregébe a ROESY adatok alapján.

Az imperanén CD komplexei közül a β -, HP- β - és SB- β -CD komplexeinek 2D ROESY spektrumait tanulmányoztuk. A spektrumokon valamennyi esetben alacsony intenzitású keresztcsúcsok figyelhetők meg, melyek alapján megállapítható az aromás gyűrű illeszkedése a CD-k üregébe, azonban az illeszkedés iránya, illetve, hogy a két aromás gyűrű közül melyik vesz részt a komplexképzésben, nem igazolható.

7. Következtetések

Doktori munkám során kilenc vegyület ciklodextrin komplexeinek beható jellemzését, ezek közül nyolc enantiomerjeinek királis elválasztását végeztük el.

A protonálódási állandók vizsgálata során meghatároztuk az általunk előállított Tos-preg és Dns-preg pregabalin-származékok protonálódási állandóit CE-pH titrálással, valamint két független módszerrel, CE-pH és ^1H NMR-pH titrálással a szitagliptin aminos csoportjának protonálódási állandóját. Ezen, eddig nem publikált eredmények alapján választottuk ki a későbbi vizsgálatok során alkalmazott pH értékeket.

Behatóan tanulmányoztuk valamennyi vegyület CD komplexeinek stabilitását kapilláris elektroforézissel, az aszpartám és a vinka alkaloidok vizsgálatánál néhány esetben NMR-rel is. Az aszpartám esetében három pH értéken vizsgáltuk a komplexek stabilitását (lúgos pH-n elsőként), és sikerült a korábban publikáltaknál jelentősen stabilabb, Asm-Ac- β -CD komplexet jellemezni. A pregabalin-származékok töltésfüggő komplex stabilitási vizsgálatát elsőként, négy pH értéken végeztük el, valamennyi esetben kiemelkedő stabilitású komplexeket sikerült detektálni. A vinka alkaloidok komplexeit a korábban publikáltaknál jóval több CD-nel vizsgáltuk, jelentős stabilitású komplexeket felfedezve. A szitagliptin, imperanén és dapoxetin CD komplexeit elsőként vizsgáltuk, mindhárom esetben számos olyan gazdamolekulát találtunk, amellyel jelentős stabilitású komplexet képeztek a vegyületek.

Az aszpartám kivételével valamennyi esetben megvalósítottuk a vegyületek enantiomerjeinek királis elválasztását kapilláris elektroforézissel, a vinka alkaloidok kivételével minden esetben elsőként. A pregabalin-származékok elválasztását mind a négy pH értéken megvalósítottuk, majd pH=7,2-n az elválasztást számos paraméter hatását vizsgálva egyváltozós módszerrel optimalizáltuk PA- β -CD-nel. Hatékonyan, korábban nem vizsgált CD-vel is megvalósítottuk mindhárom vinka alkaloid királis elválasztását behatóan tanulmányozva a kísérletek során felfedezett üregméret- és szubsztituensfüggő enantiomer-sorrend megfordulásokat. Az imperanén enantiomerjeit, miután az egyféle ciklodextrint tartalmazó rendszerekkel nem értünk el megfelelő eredményt, 12,5 mM SB- γ -CD-t és 10,0 mM PA- β -CD-t tartalmazó duál CD rendszert alkalmazva választottuk el. Szitagliptin esetében az előzetes kísérletek után szintén duál CD rendszert használva (5 mM SB- β -CD és 5 mM β -CD) értünk el megfelelő elválasztást, melyet egyváltozós módszert alkalmazva a pH, puffer koncentráció és

hőmérséklet függvényében optimalizáltunk. A dapoxetin enantiomereit RAMEG-CD-t alkalmazva szeparáltuk, majd az elválasztást hat alapvető fontosságú elválasztási paraméterre az ortogonális kísérlettervezés segítségével optimalizáltuk. Az így kidolgozott módszert a továbbiakban az ICH irányelveknek megfelelően validáltuk.

A stabilitási állandók meghatározása során a komplexek 1:1 sztöchiometriája indirekten bizonyításra került, ezt az Asm és a Dpx kivételével valamennyi esetben ^1H NMR kísérlettel, Job módszerét alkalmazva igazoltuk. Ezt a legtöbb vegyület esetében több, az elválasztás vagy komplexképzés szempontjából releváns CD-nel is elvégeztük. Szitagliptin esetében a vegyület fluortartalmának köszönhetően ezt lehetőség volt ^{19}F NMR titrálással is alátámasztani. A sztöchiometria meghatározása korábban csak az Asm és a vinka alkaloidok egyes CD komplexeinek esetében került publikálásra.

A komplexek jellemzésének kiegészítésére a Dpx kivételével térszerkezeti vizsgálatokat végeztünk 2D ROESY NMR spektroszkópiával. Ezen vizsgálatok során feltérképeztük a kialakuló komplexek 3D szerkezetét az elválasztás és komplexképzés szempontjából fontos ciklodextrinokkal. Korábban az Asm, a vinpocetin valamint a danzilcsoport ciklodextrin komplexeinek térszerkezetét igazolták.

8. Összefoglalás

Doktori munkám során számos gyógyszerhatóanyag és gyógyszer szerű vegyület, így az aszpartám, a pregabalin, három vinka alkaloid, az imperanén, a szitagliptin és a dapoxetin ciklodextrin komplexeit vizsgáltuk mágneses magrezonancia spektroszkópiával kiegészített kapilláris elektroforézissel.

A ciklodextrinek mind a gyógyszeriparban, mind az analitikában kiemelkedő jelentőséggel bíró vegyületek. Az iparban hagyományosan, mint oldékonyságot és stabilitást növelő segédanyagok szerepelnek, az analitikai kémiában, mint zárványkomplex képző királis szelektorok vannak jelen.

Munkánk első lépéseként jellemeztük a vizsgált vegyületek sav-bázis tulajdonságait kapilláris elektroforézis vagy NMR titrálás segítségével.

Nagyszámú ciklodextrinnel valamennyi vegyület CD komplexeinek átlagos komplex stabilitását meghatároztuk, az aszpartám és a pregabalin-származékok esetében több pH értéken is. Megvalósítottuk - az aszpartám kivételével - valamennyi vegyület enantiomerjeinek királis elválasztását. A pregabalin, a szitagliptin és a dapoxetin izomerek elválasztását egyváltozós módszerrel vagy ortogonális kísérlettervezés segítségével optimalizáltunk. A pregabalin-származékok esetén a pH-függő királis elválasztást, míg az imperanén és szitagliptin esetében a duál CD rendszerek alkalmazhatóságát tanulmányoztuk behatóan. A dapoxetin elválasztását az ICH irányelveknek megfelelően validáltuk.

A zárványkomplexek sztöchiometriáját ^1H NMR titrálással Job módszerével, szitagliptin esetében ^{19}F NMR titrálással is megállapítottuk. A szupramolekulák térszerkezetét 2D ROESY NMR spektroszkópiával vizsgáltuk.

9. Summary

In this work the behavior of several drugs and drug-like analytes, as aspartame, two pregabalin derivatives, three vinca alkaloids, sitagliptin, imperanene and dapoxetine are reported in terms of cyclodextrin complexation. The experiments were carried out with capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Cyclodextrins are widely used oligosaccharides by both pharmaceutical industry (as stabilizers and solubility enhancers) and analytical chemistry (as chiral selectors). Due to their favorable structure they form inclusion complexes with a great variety of organic molecules.

First, the acid-base profiling of the analytes were carried out. The dissociation constants of aspartame, pregabalin derivatives and sitagliptin were determined with either CE-pH or NMR-pH titration or both.

Averaged stability constants of the analyte-CD complexes were determined using numerous CDs with capillary electrophoresis. The stabilities of some analyte-CD complexes were also determined with NMR titration.

Enantioseparation of the analytes were carried out in all cases, except aspartame. The separations were optimized in terms of several crucial enantioseparating parameters in all cases. The optimized separation of dapoxetine isomers was validated according to the ICH guidelines.

The averaged stoichiometry of inclusion complexes were determined in case of pregabalin, vinca alkaloid, sitagliptin and imperanene complexes with the continuous variation method using ^1H NMR titration and for sitagliptin also ^{19}F NMR titration.

The structures of the complexes were determined by 2D ROESY NMR experiments.

10. Irodalomjegyzék

1. Furka Á. Szerves kémia. Tankönyvkiadó, Budapest, 1988.
2. Kajtár M. Változatok négy elemre. Gondolat, Budapest, 1984.
3. Richardson GM, Pasteur L, van 't Hoff J, Le Bel JA, Wislicenus J. The foundations of stereo chemistry. Memoirs by Pasteur, van't Hoff, Lebel and Wislicenus., American Book Co., New York, 1901.
4. Nógrádi M. Bevezetés a sztereokémiába. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1975.
5. Cahn RS, Ingold CK, Prelog V. (1966) Specification of molecular chirality. *Angew Chem Int Ed Engl*, 5: 385-415.
6. Pihlaja K, Kleinpeter E. Carbon-13 NMR chemical shifts in structural and stereochemical analysis. Wiley-VCH, New York, 1994.
7. Chankvetadze B, Pintore G, Burjanadze N, Bergenthal D, Bergander K, Breitkreuz J, Mühlenbrock C, Blaschke G. (2000) Mechanistic study of opposite migration order of dimethindene enantiomers in capillary electrophoresis in the presence of native β -cyclodextrin and heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin. *J Chromatogr A*, 875: 455-469.
8. Scriba GKE. (2002) Selected fundamental aspects of chiral electromigration techniques and their application to pharmaceutical and biomedical analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 27: 373-399.
9. Pócsfalvi G, Lipták M, Huszthy P, Bradshaw JS, Izatt RM, Vékey K. (1996) A new method for the characterization of chiral host-guest complexation in fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Chem*, 68: 792-795.
10. Batra S, Seth M, Bhaduri AP. (1993) Chirality and future drug design. *Prog Drug Res*, 41: 191-248.
11. Simonyi M, Maksay G, Wermuth CG (szerk). Stereochemical aspects of drug action II: optical isomerism, the practice of medicinal chemistry, Academic Press Ltd. London, pp. 413-435, 1996.
12. Yao TW, Zeng S, Wang TW, Chen SQ. (2001) Phenotype analysis of cytochrome P450 2C19 in Chinese subjects with mephenytoin S/R enantiomeric ratio in urine measured by chiral GC, *Biomed Chromatogr*, 15: 9-13.
13. Agrawal YK, Bhatt HG, Raval HG, Oza PM, Gogoi PJ. (2007) Chirality – A new era of therapeutics. *Mini Rev Med Chem*, 7: 451-460.

14. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration`s Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs, Fed. Regist., 1992, 57/2 May, 102.
15. Grünenthal GmbH. The thalidomide tragedy - offprint extract from the German jubilee publication. Unser Weg 1946-2006: 60 Jahre Grünenthal GmbH, 2007.
16. Kollár L. (2002) Tükörképi molekulák. Élet és Tudomány, 2: 41-43.
17. Chankvetadze B, Blaschke GJ, (2001) Enantioseparations in capillary electromigration techniques: recent developments and future trends. J Chromatogr A, 906: 309-363.
18. Blaschke GJ, Chankvetadze B. (2000) Enantiomer separation of drugs by capillary electromigration techniques. J Chromatogr A, 875: 3-25.
19. Bidleman TF, Falconer RL. (1999) Peer reviewed: using enantiomers to trace pesticide emissions. Environ Sci Technol, 206A-209A.
20. König WA, Fricke C, Saritas Y, Momeni B, Hochenfeld G. (1997) Adulteration or natural variability? Enantioselective gas chromatography in purity control of essential oils. J High Res Chromatogr, 20: 55-61.
21. Armstrong DW, Rundlett KL, Nair UB, Reidl GL. (1996) Enantioresolution of Amphetamine, Methamphetamine, and Deprenyl (Selegiline) by LC, GC and CE. Current Sep, 15: 57-61.
22. Chinaka S, Tanaka S, Takayama N, Komai K, Ohshima T, Ueda KJ. (2000) Simultaneous chiral analysis of methamphetamine and related compounds by capillary electrophoresis. J Chromatogr B, 749: 111-118.
23. Lai G, Nicholson G, Bayer E. (1988) Immobilisation of Chirasil-Val on glass capillaries. Chromatographia, 26: 229-233.
24. Aumatell A, Guttman AJ. (1995) Ultra Fast Chiral Separation of Basic Drugs by Capillary. Electrophoresis. J Chromatogr A, 717: 229-234.
25. <http://chirbase.u-3mrs.fr>
26. Armstrong DW, DeMond W. (1984) Cyclodextrin bonded phases for the liquid chromatographic separation of optical, geometrical, and structural isomers. J Chrom Sci, 22: 411-415.
27. Schurig VJ. (2001) Separation of enantiomers by gas chromatography. J Chromatogr A, 906: 275-299.

28. Nussbaum MA. (1999) When a truck becomes a motorcycle: the impact of sample load on a chiral capillary electrophoresis separation using mixtures of neutral and sulfated cyclodextrins. *Electrophoresis*, 20: 2664-2669.
29. Verleysen K, Sandra P. (1998) Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 19: 2798-2833.
30. Schmitt T, Engelhardt H. (1993) Charged and uncharged cyclodextrins as chiral selectors in capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 37: 475-481.
31. Perry JA, Rateike JD, Szczerba TJ. (1987) Eluting trace components before major constituents. I. Sensitivity enhancement in analytical determinations of optical purity. *J Chromatogr A*, 389: 57-64.
32. Q3A Guideline for Industry, Impurities in New Drug Substances, ICH Steering Committee at Step 4 of ICH Process, 1995.
33. Zaugg S, Thormann W. (2000) Enantioselective determination of drugs in body fluids by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 875: 27-41.
34. Csapó J, Henics Z. (1991) Quantitative determination of bacterial protein from the diaminopimelic acid and Dalanine content of rumen liquor and intestines. *Acta Agronomica Hungarica*, 40: 159-173.
35. Csapó J, Csapó-Kiss Zs, Költő L, Pap I. Age determination of fossil bone samples based on the ratio of amino acid racemization. *Archeometry* 90, Birkhauser Verlag, Basel, 627-635, 1990.
36. Hutt LD, Glavin DP, Bada JL, Mathies RA. (1999) Microfabricated capillary electrophoresis amino acid chirality analyzer for extraterrestrial exploration. *Anal Chem*, 71: 4000-4006.
37. Magnuson BA, Burdock GA, Doull J, Kroes RM, Marsh GM, Pariza MW, Spencer PS, Waddell WJ, Walker R, Williams GM. (2007) Aspartame: A Safety Evaluation Based on Current Use Levels, Regulations, and Toxicological and Epidemiological Studies. *Crit Rev Toxicol*, 37: 629-727.
38. Kholeif S, Anderegg G. (1997) Equilibrium studies of aspartame and some of its degradation products with hydrogen(I) and copper(II) under physiological conditions using potentiometric pH measurements. *Inorg Chim Acta*, 257: 225-230.

39. Sabbah S, Süß F, Scriba GKE. (2001) pH-dependence of complexation constants and complex mobility in capillary electrophoresis separations of dipeptide enantiomers. *Electrophoresis*, 22: 3163-3170.
40. Maheswaran MM, Divakar S. (1991) Studies on the structure of the inclusion compound of β -cyclodextrin with aspartame. *Ind J Chem*, 30A: 30-34.
41. Takahashi S, Suzuki E, Amino Y, Nagashima N, Nishimura Y, Tsuboi M. (1986) Raman and solid state NMR study on an inclusion compound of aspartame with cyclodextrin. *Bull Chem Soc Jap*, 59: 93-96.
42. Moelands D, Karnik NA, Prankerd RJ, Sloan KB, Stone HW, Perrin JH. (1992) Microcalorimetric study of the interactions of aspartame with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: The anomalous heat of dilution of the latter. *Int J Pharm*, 86: 263-265.
43. Prankerd RJ, Soten HW, Sloan KB, Perrin JH. (1992) Degradation of aspartame in acidic aqueous media and its stabilization by complexation with cyclodextrins or modified cyclodextrins. *Int J Pharm*, 88: 189-99.
44. Sabbah S, Scriba GKE. (2001) Separation of dipeptide and tripeptide enantiomers in capillary electrophoresis using carboxymethyl- β -cyclodextrin and succinyl- β -cyclodextrin: Influence of the amino acid sequence, nature of the cyclodextrin and pH. *Electrophoresis*, 22: 1385-1393.
45. Garbow JR, Likos JJ, Schroeder SA. (2001) Structure, dynamics, and stability of β -cyclodextrin inclusion complexes of aspartame and neotame. *J Agr Food Chem*, 49: 2053-2060.
46. Süß F, Sanger-van de Griend CE, Scriba GKE. (2003) Migration order of dipeptide and tripeptide enantiomers in the presence of single isomer and randomly sulfated cyclodextrins as a function of pH. *Electrophoresis*, 24: 1069-1076.
47. Kahle C, Deubner R, Schollmayer C, Scheiber J, Baumann K, Holzgrabe U. (2004) Determination of binding constants of cyclodextrin inclusion complexes with amino acids and dipeptides by potentiometric titration. *Chirality*, 16: 509-515.
48. Waibel B, Scheiber J, Meier C, Hammitzsch M, Baumann K, Scriba GKE, Holzgrabe U. (2007) Comparison of cyclodextrin-dipeptide inclusion complexes

- in the absence and presence of urea by means of capillary electrophoresis, nuclear magnetic resonance and molecular modeling. *Eur J Org Chem*, 18: 2921-2930.
49. Freynhagen R, Strojek K, Griesing T, Whalen E, Balkenohl M. (2005) Efficacy of pregabalin in neuropathic pain evaluated in a 12-week, randomised, double-blind, multicentre, placebo-controlled trial of flexible- and fixed-dose regimens. *Pain*, 115: 254-263.
 50. Dworkin RH, Corbin AE, Young JP, Sharma U, LaMoreaux L, Bockbrader H, Garofalo EA, Poole RM. (2003) Pregabalin for the treatment of postherpetic neuralgia: A randomized, placebo-controlled trial. *Neurology*, 60: 1274-1283.
 51. Crofford LJ, Rowbotham MC, Mease PJ, Russell IJ, Dworkin RH, Corbin AE, Young JP Jr, LaMoreaux LK, Martin SA, Sharma U. (2005) Pregabalin for the treatment of fibromyalgia syndrome. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 52: 1264-1273.
 52. Bandelow B, Wedekind D, Leon T. (2007) Pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder: a novel pharmacologic intervention. *Expert Rev Neurother*, 7: 769-781.
 53. Lin S, Brower PL, Winkle DD. (1996) Chiral HPLC separations for process development of S-(+)-isobutyl GABA, a potential anti-epileptic agent. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 19: 2699-2708.
 54. Silverman RB. (2008) From basic science to blockbuster drug: The discovery of Lyrica. *Angew Chem Int Ed*, 47: 3500-3504.
 55. Mandal U, Sarkar AK, Gowda KW, Agarwal S, Bose A, Bhaumik U, Ghosh D, Pal TK. (2008) Determination of pregabalin in human plasma using LC-MS-MS. *Chromatographia*, 67: 237-243.
 56. Vermeij TAC, Edelbroek PM. (2004) Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection. *J Chromatogr B*, 810: 297-303.
 57. Berry D, Millington C. (2005) Analysis of pregabalin at therapeutic concentrations in human plasma/serum by reversed-phase HPLC. *Ther Drug Monit*, 27: 451-456.

58. Jadhav AS, Pathare DB, Shingare MS. (2007) Validated enantioselective LC method, with precolumn derivatization with Marfey's reagent, for analysis of the antiepileptic drug pregabalin in bulk drug samples. *Chromatographia*, 65: 253-256.
59. Zhang Y, Holliman C, Tang D, Fast D, Michael S. (2008) Development and validation of a direct enantiomeric separation of pregabalin to support isolated perfused rat kidney studies. *J Chromatogr B*, 875: 148-153.
60. Chen X, Zhang D, Deng J, Fu X. (2008) Determination of optical impurity of pregabalin by HPLC with pre-column chiral derivatization. *J Chrom Sci*, 46: 42-44.
61. Trojanek J, Strouf C, Holubek J, Cekan J. (1961) Structure of Vincamine. *Tetrahedron Lett*, 702-706.
62. Lőrincz C, Kárpáti E, Szporny L, Szász K, Kisfaludy L. (1973) Alkaloid esters. *Ger Offen 2253750*. *Chem. Abstr.* 79, 42726c.
63. Czibula L, Nemes A, Visky Gy, Farkas M, Szombathelyi Zs, Kárpáti E, Sohár P, Kessel M, Kreidl J. (1993) Syntheses and cardiovascular activity of stereoisomers and derivatives of eburnane alkaloids. *Liebigs Ann Chem*, 3: 221-229.
64. Polgár M, Vereczkey L, Nyári L. (1985) Pharmacokinetics of vinpocetine and its metabolite, apovincaminic acid, in plasma and cerebrospinal fluid after intravenous infusion. *J Pharm Biomed Anal*, 3: 131-139.
65. Kárpáti E, Szporny L. (1976) General and cerebral haemodynamic activity of ethyl apovincamate. *Arzneim-Forsch*, 26: 1908-1912.
66. Weinshaar RE, Bristol JA, Hansch C (szerk.). *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Pergamon Press, Oxford, 501-514, 1990.
67. Szakáll S, Boros I, Balkay L. (1998) Cerebral effects of a single dose of intravenous vinpocetine in chronic stroke patients: a PET study. *J Neuroimaging*, 8: 197-204.
68. Summary of Product Characteristics - Országos Gyógyszerészeti Intézet OGYI-T-6418/01-02 (2009).
69. DeNoble VJ. (1987) Vinpocetine enhances retrieval of a step-through passive avoidance response in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 26: 183-186.

70. Urenjak J, Obrenovitch TP. (1996) Pharmacological modulation of voltage-gated Na⁺ channels: a rational and effective strategy against ischemic brain damage. *Pharmacol Rev*, 48: 21-67.
71. Molnár P, Erdő SL. (1995) Vinpocetine is as potent as phenytoin to block voltage-gated Na⁺ channels in rat cortical neurons. *Eur J Pharmacol*, 273: 303-306.
72. Hagiwara M, Endo T, Hidaka H. (1984) Effects of vinpocetine on cyclic nucleotide metabolism in vascular smooth muscle. *Biochem Pharmacol*, 33: 4553-4557.
73. Beavo JA. (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*, 75: 725-748.
74. Dézsi L, Kis-Varga I, Nagy L, Komlódi Zs, Kárpáti E. (2002) Neuroprotective effects of vinpocetine in vivo and in vitro. Apovincaminic acid derivatives as potential therapeutic tools in ischemic stroke. *Acta Pharm Hung*, 2: 84-91.
75. Moldvai I, Szántay Cs Jr., Rissanen K, Szántay Cs. (1992) Synthesis of vinca alkaloids LX. A simple transformation of apovincamine into vincamine. *Tetrahedron*, 48: 4999-5008.
76. Fitos I, Visy J, Simonyi M, Hermansson J. (1992) Chiral high-performance liquid chromatographic separations of vinca alkaloid analogues on α 1-acid glycoprotein and human serum albumin columns. *J Chromatogr A*, 609: 163-171.
77. Chu I, Bodnar JA, White EL, Bowman RN. (1996) Quantification of vincristine and vinblastine in *Catharanthus roseus* plants by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A*, 755: 281-288.
78. Unger M, Stöckigt D, Belder D, Stöckigt J. (1997) General approach for the analysis of various alkaloid classes using capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 767: 263-276.
79. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE, Sannes E. (1998) Strategies for the capillary electrophoretic separation of indole alkaloids in *Psilocybe semilanceata*. *Electrophoresis*, 19: 27-30.
80. Unger M. (1998) Capillary zone electrophoresis of alkaloids - influence of structure on electrophoretic mobility. *J Chromatogr A*, 807: 81-87.
81. Stöckigt J, Sheludko Y, Unger M, Gerasimenko I, Warzecha H, Stöckigt D. (2002) High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and

- capillary electrophoretic-electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *J Chromatogr A*, 967: 85-113.
82. Barthe L, Ribet JP, Péliou M, Degude MJ, Fahy J, Duflos A. (2002) Optimization of the separation of Vinca alkaloids by nonaqueous capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 968: 241-250.
 83. Mazák K, Szakács Z, Nemes A, Noszál B. (2000) Capillary electrophoresis separation of vinpocetine and related compounds: prediction of electrophoretic mobilities in partly aqueous media. *Electrophoresis*, 21: 2417-2423.
 84. Kata M, Selmeczi B. (1987) Increasing the solubility of drugs through cyclodextrin complexation. *J Incl Phenom Macro*, 5: 39-43.
 85. Ribeiro LSS, Carvalho RA, Ferreira DC, Veiga FJB. (2005) Multicomponent complex formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies. *Eur J Pharm Sci*, 24: 1-13.
 86. Nie S, Fan X, Peng Y, Yang X, Wang C, Pan W. (2007) In vitro and in vivo studies on the complexes of vinpocetine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Arch Pharm Res*, 30: 991-1001.
 87. Matsunaga K, Shibuya M, Ohizumi Y. (1995) Imperanene, a novel phenolic compound with platelet aggregation inhibitory activity from *Imperata cylindrica*. *J Nat Prod*, 58: 138-139.
 88. Takara K, Iwasaki H, Ujihara K, Wada K. (2008) Human tyrosinase inhibitor in rum distillate wastewater. *J Oleo Sci*, 57: 191-196.
 89. Baigent C, Sudlow C, Collins R, Peto R. (2002) Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Brit Med J*, 324: 71-86.
 90. Maeda K, Fukuda M. (1996) Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J Pharm Exp Thera*, 276: 765-769.
 91. No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY. (1999) Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci*, 65: 241-246.

92. Katagiri T, Okubo T, Oyobikawa M, Futaki K, Shaku M, Kawai M. Novel melanogenic enzymes inhibitor for controlling hiperpigmentation. Paper No. 7, 20th IFSCC Congress, Cannes, 1998.
93. Bernard P, Berthon JY. (2000) Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. *Int J Cosme Sci*, 22: 219-226.
94. Shattuck JC, Shreve CM, Solomon SE. (2001) Enantioselective synthesis of imperanene, a platelet aggregation inhibitor. *Org Lett*, 3: 3021-3023.
95. Doyle MP, Hu W, Valenzuela MV. (2002) Total synthesis of (S)-(+)-imperanene. Effective use of regio- and enantioselective intramolecular carbon-hydrogen insertion reactions catalyzed by chiral dirhodium(II) carboxamidates. *J Org Chem*, 67: 2954-2959.
96. Eklund PC, Riska AI, Sjöholm RE. (2002) Synthesis of R-(-)-imperanene from the natural lignan hydroxymatairesinol. *J Org Chem*, 67: 7544-7546.
97. Davies HML, Jin Q. (2003) Intermolecular C-H activation at benzylic positions: Synthesis of (+)-imperanene and (-)- α -conidendrin. *Tetrahedron Asymmetr*, 14: 941-949.
98. Carr JA, Bisht KS. (2004) Enantioselective synthesis of imperanene via enzymatic asymmetrization of an intermediary 1,3-diol. *Org Lett*, 6: 3297-3300.
99. Takashima Y, Kobayashi Y. (2009) Synthesis of (S)-imperanene by using allylic substitution. *J Org Chem*, 74: 5920-5926.
100. Kim D, Wang L, Beconi M, Eiermann GJ, Fisher MH, He H, Hickey GJ, Kowalchick JE, Leiting B, Lyons K, Marsilio F, McCann ME, Patel RA, Petrov A, Scapin G, Patel SB, Roy RS, Wu JK, Wyvratt MJ, Zhang BB, Zhu L, Thornberry NA, Weber AE. (2005) (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem*, 48: 141-151.
101. Villhauer EB, Coppola GM, Hughes TW. (2001). DPP-IV inhibition and therapeutic potential. *Annu Rep Med Chem*, 36: 191-200.
102. Drucker DJ. (2003) Therapeutic potential of dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs*, 12: 87-100.

103. Ahren B, Schmitz O. (2004) GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Horm Metab Res*, 36: 867-876.
104. Weber AE, (2004) Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of diabetes. *J Med Chem*, 47: 4135-4141.
105. Ahren B, Simonsson E, Larsson H, Landin-Olsson M, Torgeirsson H, Jansson PA, Sandqvist M, Bavenholm P, Efendic S, Eriksson JW, Dickinson S, Holmes D. (2002) Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 25: 869–875.
106. Ahren B, Landin-Olsson M, Jansson PA, Svensson M, Holmes D, Schweizer A. (2004) Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 2078–2084.
107. Green BD, Flatt PR, Bailey C. (2006) Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: A newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res*, 3: 159-165.
108. Rosenstock J, Brazg R, Andryuk PJ, Lu K, Stein P. (2006) Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing pioglitazone therapy in patients with type 2 diabetes: a 24-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Clin Ther*, 28: 1556-1568.
109. Bergmana A, Ebela D, Liua F, Stonea J, Wang a, Zenga W, Chena L, Dilzerb S, Lasseterb K, Hermana G, Wagnera J, Krishnaa R. (2007) Absolute bioavailability of sitagliptin, an oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in healthy volunteers. *Biopharm Drug Dispos*, 28: 315–322.
110. Zeng W, Xu Y, Constanzer M, Woolf EJ. (2010) Determination of sitagliptinin human plasma using protein precipitation and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Tachnol Biomeg Life Sci*, 878: 1817-1823.
111. Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, Komarneni P, Aleti R, Boggavarapu R. (2008) Sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, in human plasma using liquid-liquid extraction. *Biomed Chromatogr*, 22: 214–222.
112. Clausen MA, Dziadul B, Cappuccio KL, Kaba M, Starbuck C, Hsiao Y, Dowling TM. (2006) Identification of ammonium chloride as an effective promoter of the

- asymmetric hydrogenation of a β -enamine amide. *Org Process Res Dev*, 10: 723-726.
113. Steinhuebel D, Sun Y, Matsumura K, Sayo N, Saito T. (2009) Direct asymmetric reductive amination. *J Am Chem Soc*, 131: 11316-11317.
 114. Hansen KB, Hsiao Y, Xu F, Rivera N, Clausen A, Kubryk M, Krska S, Rosner T, Simmons B, Balsells J, Ikemoto N, Sun Y, Spindler F, Malan C, Grabowski EJJ, Armstrong JD. (2009) Highly efficient asymmetric synthesis of sitagliptin. *J Am Chem Soc*, 131: 8798-8804.
 115. Zeng LL, Ding YJ, Zhang GC, Song HR, Hu WH. (2009) A practical synthesis of trifluorophenyl R-amino acid: The key precursor for the new anti-diabetic drug sitagliptin. *Chinese Chem Lett*, 20: 1397-1399.
 116. Savile CK, Janey JM, Mundorff EC, Moore JC, Tam S, Jarvis WR, Colbeck JC, Krebber A, Fleitz FJ, Brands J, Devine PN, Huisman GW, Hughes GJ. (2010) Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. *Science*, 329: 305-309.
 117. Modi NB, Dresser MJ, Simon M, Lin D, Desai D, Gupta S. (2006) Single- and multiple-dose pharmacokinetics of dapoxetine hydrochloride, a novel agent for the treatment of premature ejaculation. Single- and multiple dose pharmacokinetics of dapoxetine hydrochloride, a novel agent for the treatment of premature ejaculation. *J Clin Pharmacol*, 46: 301-309.
 118. Wheeler WJ, O'Bannon DD. (1992) A chiral synthesis of dapoxetine hydrochloride, a serotonin reuptake inhibitor, and its ^{14}C isotopomer. *J Label Compds Radiopharm*, 31: 305-315.
 119. Sorbera LA, Castaner J, Castaner RM. (2004) Dapoxetine hydrochloride. *Drugs Fut*, 29: 1201-1205.
 120. Torre O, Gotor-Fernández V, Gotor V. (2006) Lipase-catalyzed resolution of chiral 1,3-amino alcohols: application in the asymmetric synthesis of (S)-dapoxetine. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17: 860-866.
 121. Siddiqui SA, Srinivasan KV. (2007) Enantioselective synthesis of (S)-dapoxetine. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18: 2099-2103.

122. Chincholkar PM, Kale AS, Gumaste VK, Deshmukh ARAS. (2009) An efficient formal synthesis of (S)-dapoxetine from enantiopure 3-hydroxy azetidin-2-one. *Tetrahedron*, 65: 2605-2609.
123. Rodríguez-Mata M, García-Urdiales E, Gotor-Fernández V, Gotor V. (2010) Stereoselective chemoenzymatic preparation of β -amino esters: molecular modelling considerations in lipase-mediated processes and application to the synthesis of (S)-dapoxetine. *Adv Synth Catal*, 352: 395-406.
124. Kang S, Lee HK. (2010) Highly efficient, Enantioselective syntheses of (S)-(+)- and (R)-(-)-dapoxetine starting with 3-phenyl-1-propanol. *J Org Chem*, 75: 237-240.
125. Liu KKC, Sakya SM, O'Donnell CJ, Flick AC, Li J. (2011) Synthetic approaches to the 2009 new drugs. *Bioorg Med Chem*, 19: 1136-1154.
126. Jorgenson JW, Lukacs KD. (1981) High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. *J Chromatogr A*, 218: 209-216.
127. Jorgenson JW, Lukacs KD. (1981) Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal Chem*, 53: 1298-1302.
128. Jorgenson JW, Lukacs KD. (1983) Capillary zone electrophoresis. *Science*, 222: 266-272.
129. Lelievre F, Yan C, Zare RN, Gareil P. (1996) Capillary electrochromatography: Operating characteristics and enantiomeric separations. *J Chromatogr A*, 723: 145-156.
130. Francotte E, Brandel L, Jung M. (1997) Influence of the degree of substitution cyclodextrin sulfobutyl ether derivatives on enantioselective separations by electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A*, 792: 379-384.
131. Vistuba D, Schurig V. (1999) Enantiomer separation by pressure-supported electrochromatography using capillaries packed with Chirasil-Dex polymer-coated silica. *Electrophoresis*, 20: 2779-2785.
132. Gáspár A. *Kapilláris zónaelektroforézis*, Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, 2000.
133. Hjerten S. (1985) High-performance electrophoresis. Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *J Chromatogr*, 347: 191-198.

134. Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen TPEM. (1979) Concentration distributions in free zone electrophoresis. *J Chromatogr*, 169: 11-20.
135. Williams RL, Vigh Gy. (1996) Maximization of separation efficiency in capillary electrophoretic chiral separations by means of mobility-matching background electrolytes. *J Chromatogr*, 730: 273-278.
136. Wren SAC, Rowe RC. (1992) Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis: I. Initial evaluation of a model. *J Chromatogr*, 603: 235-241.
137. Chankvetadze B, Burjanadze N, Bergenthal D, Blaschke G. (1999) Potential of flow-counterbalanced capillary electrophoresis for analytical and micropreparative separations. *Electrophoresis*, 20: 2680-2685.
138. Zhu W, Vigh Gy. (2000) Experimental verification of a predicted, hitherto unseen separation selectivity pattern in the nonaqueous capillary electrophoretic separation of weak base enantiomers by octakis (2,3-diacetyl-6-sulfato)-gamma-cyclodextrin. *Electrophoresis*, 21: 2016-2024.
139. Desiderio C, Fanali S. (1995) Use of negatively charged sulfobutyl ether- β -cyclodextrin for enantiomeric separation by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 716: 183-196.
140. Williams BA, Vigh Gy. (1997) Dry look at the CHARM (charged resolving agent migration) model of enantiomer separations by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 777: 295-309.
141. Chankvetadze B. (2002) Enantiomer migration order in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 23: 4022-4035.
142. Chankvetadze B. (2004) Combined approach using capillary electrophoresis and NMR spectroscopy for an understanding of enantioselective recognition mechanisms by cyclodextrins. *Chem Soc Rev*, 33: 337-347.
143. Chankvetadze B, Fillet M, Burjanadze N, Bergenthal D, Bergander C, Luftmann H, Crommen J, Blaschke G. (2000) Enantioseparation of aminoglutethimide with cyclodextrins in capillary electrophoresis and studies of selector-selectand interactions using NMR spectroscopy and electrospray ionization mass spectrometry. *Enantiomer*, 5: 313-322.
144. Sidamonidze N, Süß F, Poppitz W, Scriba GKE. (2001) Influence of the amino acid sequence and nature of the cyclodextrin on the separation of small peptide

- enantiomers by capillary electrophoresis using α -, β -, and γ -cyclodextrin and the corresponding hydroxypropyl derivatives. *J Sep Sci*, 24: 777–783.
145. Chankvetadze B, Kartoza I, Burjanadze N, Bergenthal D, Luftmann H, Blaschke G. (2001) *Chromatographia*, 53: S290-S295.
 146. Chankvetadze B, Pintore G, Burjanadze N, Bergenthal D, Luftmann H, Blaschke G. (1998) Enantioseparation of chiral phenothiazine derivatives in capillary electrophoresis using cyclodextrin type chiral selectors. *Electrophoresis*, 19: 2101–2108.
 147. Chankvetadze B, Schulte G, Bergenthal D, Blaschke G. (1998) Comparative capillary electrophoresis and NMR studies of enantioseparation of dimethindene with cyclodextrins. *J Chromatogr A*, 798: 315–323.
 148. Chankvetadze B, Burjanadze N, Breikreutz J, Bergander K, Bergenthal D, Kataeva O, Fröhlich R, Luftmann H, Blaschke G. (2002) Mechanistic study on the opposite migration order of the enantiomers of ketamine with α - and β -cyclodextrin in capillary electrophoresis. *J Sep Sci*, 25: 1155-1166.
 149. Chankvetadze B, Burjanadze N, Santi M, Massolini G, Blaschke G. (2002) Enantioseparation of tetramisole by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography and application of these techniques to enantiomeric purity determination of a veterinary drug formulation of L-levamisole. *J Sep Sci*, 25: 733–740.
 150. Castro-Puyana M, Lomsadze K, Crego AL, Marina ML, Chankvetadze B. (2007) Separation of enantiomers of deprenyl with various CDs in CE and the effect of enantiomer migration order on enantiomeric impurity determination of selegiline in active ingredients and tablets. *Electrophoresis*, 28: 388–394.
 151. Servais AC, Rousseau A, Fillet M, Lomsadze K, Salgado A, Crommen J, Chankvetadze B. (2010) Capillary electrophoretic and nuclear magnetic resonance studies on the opposite affinity pattern of propranolol enantiomers towards various cyclodextrins. *J Sep Sci*, 33: 1617-1624.
 152. Tanaka M, Asano S, Yoshinago M, Kawaguchi Y, Tetsumi T, Shono T. (1991) Separation of racemates by capillary zone electrophoresis based on complexation with cyclodextrins. *Fresenius' J Anal Chem*, 339: 63-64.

153. Tanaka M, Yoshinaga M, Asano S, Yamashoji Y, Kawaguchi Y. (1992) Enantiomeric separation of dansylamino acids by capillary zone electrophoresis based on complexation with cyclodextrins. *Fresenius' J Anal Chem*, 343: 896-900.
154. Chankvetadze B, Burjanadze N, Blaschke G. (2002). Enantioseparation of chiral vasodilator drug isoxsuprine in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal*, 27: 153–159.
155. Chankvetadze B, Lomsadze K, Burjanadze N, Breitzkreutz J, Pintore G, Chessa M, Bergander K, Blaschke G. (2003) Comparative enantioseparations with native beta-cyclodextrin, randomly acetylated beta-cyclodextrin and heptakis-(2,3-di-O-acetyl)-beta-cyclodextrin in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 24: 1083-1091.
156. Schmitt T, Engelhardt H. (1995) Optimization of enantiomeric separations in capillary electrophoresis by reversal of the migration order and using different derivatized cyclodextrins. *J Chromatogr A*, 697: 561-570.
157. Altria KD, Harkin P, Hindson MG. (1996) Quantitative determination of tryptophan enantiomers by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B, Biomed Appl*, 686: 103-110.
158. Sanger-van de Griend CE, Groningsson K. (1996) Validation of a capillary electrophoresis method for the enantiomeric purity testing of ropivacaine, a new local anaesthetic compound. *J Pharm Biomed Anal*, 14: 295-304.
159. de Boer T, Ensing K. (1998) Determination of the enantiomeric purity of (-) terbutaline by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors in a polyethylene glycol gel. *J Pharm Biomed Anal*, 17: 1047-1056.
160. Sarac S, Chankvetadze B, Blaschke G. (2000) Enantioseparation of 3,4-dihydroxyphenylalanine and 2-hydrazino-2-methyl-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid by capillary electrophoresis using cyclodextrins. *J Chromatogr A*, 875: 379-387.
161. Chankvetadze B. *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley and Sons, Chichester, 1997.
162. Rundlett KL, Armstrong DW. (1995) Effect of micelles and mixed micelles on efficiency and selectivity of antibiotic-based capillary electrophoretic enantioseparations. *Anal Chem*, 67: 2088-2095.

163. Wren SAC, Rowe RC. (1992) Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis. II. The role of organic solvent. *J Chromatogr A*, 609: 363-367.
164. Fanali S. (1991) Use of cyclodextrins in capillary zone electrophoresis. Resolution of terbutaline and propranolol enantiomers. *J Chromatogr*, 545: 437-441.
165. Fergusson PD, Goodall DM, Loran JS. (1996) Systematic approach to the treatment of enantiomeric separations in capillary electrophoresis and liquid chromatography III. A binding constant-retention factor relationship and effects of acetonitrile on the chiral separation of tioconazole. *J Chromatogr A*, 745: 25-35.
166. Chankvetadze B, Endresz G, Blaschke G. (1994) About some aspects of the use of charged cyclodextrins for capillary electrophoresis enantioseparation. *Electrophoresis*, 15: 804-807.
167. Zhao J, Hooker T, Jorgenson JW. (1999) Synchronous cyclic capillary electrophoresis using conventional capillaries: System design and preliminary results. *J Microcol Sep*, 11: 431-437.
168. Terabe S. (1989) Electrokinetic chromatography: An interface between electrophoresis and chromatography. *Trends Anal Chem*, 8: 129-134.
169. Chankvetadze B. (1999) Recent trends in enantioseparations using capillary electromigration techniques. *Trends Anal Chem*, 18: 485-498.
170. Fillet M, Hubert P, Crommen J. (2000) Enantiomeric separations of drugs using mixtures of charged and neutral cyclodextrins. *J Chromatogr A*, 875: 123-134.
171. Bender LM, Komiyama M. *Cyclodextrin Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, 1978.
172. Szejtli J. (1998) Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev*, 98: 1743-1753.
173. Sabadinib E, Cosgrovea T, Egídiob FC. (2006) Solubility of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) in H₂O and D₂O: a comparative study. *Carbohydr Res*, 341: 270-274.
174. Szejtli J. *Cyclodextrins and their inclusion complexes*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982.
175. *Cyclobond Handbook: A guide to using cyclodextrin bonded phases for chiral LC Separations*, Advanced Separation Technologies, Whippany, New Jersey, 2005

176. Takeichi T, Toriyama H, Shimura S, Takayama Y, Morikawa M. (1995) Cyclodextrin carbamates as novel chiral stationary phases for capillary gas chromatography. *J High Resolut Chromatogr*, 18: 179-189.
177. Shi XY, Wang M, Chen GR, Fu RN, Gu JL. (2001) Synthesis and properties of new cyclodextrin phenyl carbamates as capillary gas chromatography stationary phases. *Anal Chim Acta*, 445: 221-228.
178. Villiers ACR. (1891) Sur la fermentation de la féculé par l'action du ferment butyriqué. *Acad Sci*, 112: 536-538.
179. Schardinger F. (1911) Bildung kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Stärkekleister durch Microben. *Zentralbl Bakteriol*, 29: 188-197.
180. Freudenberg K, Mayer-Delius M. (1938) Über Schardinger-Dextrine aus Stärke. *Chem Ber*, 71: 1596-1600.
181. French D, Rundle RE. (1942) The molecular weights of the Schardinger alpha and beta dextrins. *J Am Chem Soc*, 64: 1651-1653.
182. Szejtli J, Osa T. *Comprehensive Supramolecular Chemistry Vol. 3: Cyclodextrins*. Elsevier Science, Oxford, 1996.
183. Buschmann HJ, Schollmeyer E. (2002) Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *J Cosmet Sci*, 53: 185-191.
184. Szejtli J, Szenté L. (2005) Elimination of bitter tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur J Pharm Biopharm*, 61: 115-125.
185. French D. (1957) The Schardinger dextrins. *Adv Carbohyd Chem*, 12: 189-260.
186. Irie T, Uekama K. (1997) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci*, 86: 147-62.
187. Loftsson T, Duchene D. (2007) Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm*, 329: 1-11.
188. Loftsson T, Brewster ME, Másson M. (2004) Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. *Am J Drug Deliv*, 2: 261-275.
189. Loftsson T, Jarho P, Jarvine T. (2005) Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2: 335-351.
190. Szejtli J. (2004) Past, present and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem*, 76: 1825-1845.

191. Bom A, Bradley M, Cameron K, Clark JK, Van Egmond J, Feilden H, MacLean EJ, Muir AW, Palin R, Rees DC, Zhang MQ. (1998) A novel concept of reversing neuromuscular block: Chemical encapsulation of rocuronium bromide by a cyclodextrin-based synthetic host. *Angew Chem Int Ed*, 41: 265-270.
192. Agüeros M, Espuelas S, Esparza I, Calleja P, Peñuelas I, Ponchel G, Irache JM. (2011) Cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles as new vehicles for oral drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 8: 721-734.
193. Camargo F, Erickson RP, Garver WS, Hossain GS, Carbone PN, Heidenreich RA, Blanchard J. (2001) Cyclodextrins in the treatment of a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Life Sci*, 70: 131-142.
194. Ortiz M, Fragoso A, O'Sullivan CK. (2011) Detection of antigliadin autoantibodies in celiac patient samples using a cyclodextrin-based supramolecular biosensor. *Anal Chem*, 83: 2931-2938.
195. Connors KA. (1997) The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem Rev*, 97: 1325–1357.
196. Liu L, Guo QX. (2002) The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *J Incl Phenom Macro*, 42: 1-14.
197. Charumanee S, Titwan A, Sirithunyalug J, Weiss-Greiler P, Wolschann P, Viernstein H, Okonogi S. (2006) Thermodynamics of the encapsulation by cyclodextrins. *J Chem Technol Biot*, 81: 523-529.
198. Gelb RI, Schwartz LM, Cardelino B, Fuhrman HS, Johnson RF, Laufer DA. (1981) Binding mechanisms in cyclohexaamylose complexes. *J Am Chem Soc*, 103: 1750-1757.
199. Buvári-Barcza Á, Barcza L. (1996) Solubility characteristics of β -cyclodextrin inclusion complexes. *J Incl Phenom Macro*, 26: 303-309.
200. Fenyvesi É, Vikmon M, Szemán J, Redenti E, Delcanale M, Ventura P, Szejtli J. (1999) Interaction of hydroxy acids with β -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macro*, 33: 339-344.
201. Krois D, Brinker U. (1998) Induced circular dichroism and UV-Vis absorption spectroscopy of cyclodextrin inclusion complexes: structural elucidation of supramolecular azi-adamantane (spiro[adamantane2.3'diazirine]). *J Am Chem Soc*, 120: 11627-11632.

202. Tárkányi G. (2002) Quantitative approach for the screening of cyclodextrins by nuclear magnetic resonance spectroscopy in support of chiral separations in liquid chromatography and capillary electrophoresis. Enantioseparation of norgestrel with α -, β - and γ -cyclodextrins. *J Chromatogr A*, 961: 257-276.
203. Easton CJ. (2006) Cyclodextrin-based catalysts and molecular reactors. *Pure Appl Chem*, 77: 1865-1871.
204. Szejtli J, Szente L, Bánky E. (1979) Molecular encapsulation of volatile, easily oxidizable labile flavor substances by cyclodextrins. *Acta Chim Hung*, 101: 27-46.
205. Matsui Y, Mochida K. (1979) Binding forces contributing to the association of cyclodextrin with alcohol in aqueous solution. *Bull Chem Soc Jap*, 52: 2808-2814.
206. Khomutov SM, Sidorov IA, Dovbnya DV, Donova MV. (2002) Estimation of cyclodextrin affinity to steroids. *J Pharm Pharmacol*, 54:617-622.
207. Fernandes CM, Carvalho RA, Costa SP, Veiga FJB. (2003) Multimodal molecular encapsulation of nicardipine hydrochloride by β -cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin and triacetyl- β -cyclodextrin in solution. Structural studies by ^1H -NMR and ROESY experiments. *Eur J Pharm Sci*, 18: 285-296.
208. Béni Sz, Szakács Z, Csernák O, Barcza L, Noszál B. (2007) Cyclodextrin/imatinib complexation: binding mode and charge dependent stabilities. *Eur J Pharm Sci*, 30: 167-174.
209. Boudeville P, Burgot JL. (1995) A new pH-metric methodology for the determination of thermodynamic inclusion constants of guest/cyclodextrin complexes. *J Pharm Sci*, 84: 1083-1089.
210. Taneri F, Guneri T, Aigner Z, Kata M. (2003) Influence of cyclodextrin complexation on the physicochemical and biopharmaceutical properties of ketoconazole. *J Incl Phenom Macro*, 47: 15-23.
211. Stodeman M, Wadso I. (1995) Scope of microcalorimetry in the area of macrocyclic chemistry. *Pure Appl Chem*, 67: 1059-1068.
212. Plätzer M, Schwarz MA, Neubert RHH. (1999) Determination of formation constants of cyclodextrin inclusion complexes using affinity capillary electrophoresis. *J Macro Sep*, 11: 215-222.

213. Gyimesi J, Szökő É, Magyar K, Barcza L. (1996) Determination of drug-cyclodextrin binding constants by capillary zone electrophoresis. *J Incl Phenom Macro*, 25: 253-256.
214. Armstrong DW, Nome F, Spino LA, Golden TD. (1986) Efficient detection and evaluation of cyclodextrin multiple complex formation. *J Am Chem Soc*, 108: 1418-1421.
215. Lamcharfi E, Chulion S, Kerbal A, Kunesch G, Libot F, Virelizier H. (1996) Electrospray ionization mass spectrometry supramolecular chemistry: Characterization of noncovalent cyclodextrin complexes. *J Mass Spectrom*, 31: 982–986.
216. Kempen EC, Brodbelt JS. (2000) A method for the determination of binding constants by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 72: 5411–5416.
217. Bersier PM, Bersier J, Klingert B. (1991) Electrochemistry of cyclodextrins and cyclodextrin inclusion complexes. *Electroanal*, 3: 443-455.
218. Wallingford RA, Ewing AG. (1989) Capillary electrophoresis. *Adv Chromatogr*, 29: 1-76.
219. Schneider H-J, Hacket F, Rüdiger V. (1998) NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chem Rev*, 98: 1755–1785.
220. Schneider H-J, Kramer R, Simova S, Schneider U. (1988) Solvent and salt effects on binding constants of organic substrates in macrocyclic host compounds. A general equation measuring hydrophobic binding contributions. *J Am Chem Soc*, 110: 6442–6448.
221. Gutowsky HS, Saika A. (1953) Dissociation, chemical exchange and the proton magnetic resonance in some aqueous electrolytes. *J Chem Phys*, 21: 1688–1694.
222. Connors KA. *Binding Constants*. Wiley, New York, 1987.
223. Fielding L. (2000) Determination of association constants (K_a) from solution NMR data. *Tetrahedron*, 56: 6151–6170.
224. Job P. (1928) Recherches sur la formation de complexes minéraux en solution, et sur leur stabilité. *Ann Chim*, 9: 113-203.
225. Neuhaus D, Williamson MP. *The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis*. Wiley, New York, 2000

226. Hwang TL, Shaka AJ. (1992) Cross-relaxation without TOCSY: transverse rotating-frame Overhauser effect spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 114: 3157–3159.
227. Chang CA, Wu Q, Armstrong DW. (1986) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of substituted phenolic compounds with a β -cyclodextrin bonded phase column. *J Chromatogr*, 354: 454-458.
228. Chang CA, Wu Q, Tan L. (1986) Normal-phase high-performance liquid chromatographic separations of positional isomers of substituted benzoic acids with amine and β -cyclodextrin bonded-phase columns. *J Chromatogr*, 361: 199-207.
229. Armstrong DW, Jin HL. (1989) Evaluation of the liquid chromatographic separation of monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides, deoxysaccharides and sugar alcohols with stable cyclodextrin bonded phase columns. *J Chromatogr*, 462: 219-232.
230. Chang SC, Reid GL, Chang S, Chang CD, Armstrong DW. (1993) Cyclodextrin-bonded chiral stationary phases. *Trends Anal Chem*, 12: 144-153.
231. Fanali S, Bocek P. (1990) Enantiomer resolution by using capillary zone electrophoresis: resolution of racemic tryptophan and determination of the enantiomer composition of commercial pharmaceutical epinephrine. *Electrophoresis*, 11: 757-760.
232. Sabbah S, Suss F, Scriba GKE. (2001) pH-dependence of complexation constants and complex mobility in capillary electrophoresis separations of dipeptide enantiomers. *Electrophoresis*, 22: 3163-3170.
233. Nardi A, Eliseev A, Bocek P, Fanal, S. (1993) Use of charged and neutral cyclodextrins in capillary zone electrophoresis: enantiomeric resolution of some 2-hydroxy acids. *J Chromatogr A*, 638: 247-253.
234. Koppenhoefer B, Epperlein U, Zhu X, Lin B. (1997) Separation of enantiomers of drugs by capillary electrophoresis. Part 4: hydroxypropyl- γ -cyclodextrin as chiral solvating agent. *Electrophoresis*, 18: 924-930.
235. Fillet M, Bechet I, Chiap P, Hubert Ph, Crommen J. (1995) Enantiomeric purity determination of propranolol by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 717: 203-209.

236. Sabbah S, Scriba GKE. (2001) Separation of dipeptide and tripeptide enantiomers in capillary electrophoresis using carboxymethyl-beta-cyclodextrin and succinyl-beta-cyclodextrin: influence of the amino acid sequence, nature of the cyclodextrin and pH. *Electrophoresis*, 22: 1385-1393.
237. Chankvetadze B, Endresz G, Blaschke G. (1995) Capillary electrophoresis enantioseparation of noncharged and anionic chiral compounds using anionic cyclodextrin derivatives as chiral selectors. *J Capillary Electrophor*, 2: 235-240.
238. Stalcup AM, Gahm KH. (1996) Application of sulfated cyclodextrins to chiral separations by capillary zone electrophoresis. *Anal Chem*, 68: 1360-1368.
239. Gahm KH, Chang LW, Armstrong DW. (1997) Chiral separation of monoterpenes using mixtures of sulfated β -cyclodextrins and α -cyclodextrin as chiral additives in the reversed-polarity capillary electrophoresis mode. *J Chromatogr A*, 759: 149-155.
240. Lurie IS, Odeneal NG, McKibben TD, Casale JF. (1998) Effects of various anionic chiral selectors on the capillary electrophoresis separation of chiral phenethylamines and achiral neutral impurities present in illicit methamphetamine. *Electrophoresis*, 19: 2918-2925.
241. Schulte G, Chankvetadze B, Blaschke G. (1997) Enantioseparation in capillary electrophoresis using 2-hydroxypropyltrimethylammonium salt of β -cyclodextrin as a chiral selector. *J Chromatogr A*, 771: 259-266.
242. Tanaka Y, Terabe SJ. (1997) Enantiomer separation of acidic racemates by capillary electrophoresis using cationic and amphoteric β -cyclodextrins as chiral selectors. *J Chromatogr A*, 781: 151-160.
243. Wren SAC, Rowe RC. (1993) Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis. III. Application to β -blockers. *J Chromatogr*, 635: 113-118.
244. Noszál B, Burger K. (szerk.). Acid-base properties of bioligands. *Biocoordination chemistry: coordination equilibria in biologically active systems*. Ellis Horwood, Chichester, pp. 18–55, 1990.
245. Irving HM, Miles MG, Pettit LD. (1967) A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode. *Anal Chim Acta*, 38: 475–488.

246. Albert A, Serjeant EP. The determination of ionization constants. Chapman and Hall, London, 1984.
247. Sohár P. Mágneses magrezonancia spektroszkópia. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 40–44, 1976.
248. Grunwald E, Loewenstein A, Meiboom S. (1957) Application of nuclear magnetic resonance to the study of acid-base equilibria. *J Chem Phys*, 27: 641–642.
249. Szakács Z, Hägele G, Tyka R. (2004) $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ NMR pH indicator series to eliminate the glass electrode in NMR spectroscopic pK_a determinations. *Anal Chim Acta*, 522: 247–258.
250. Moon RB, Richards JH. (1973) Determination of intracellular pH by ^{31}P magnetic resonance. *J Biol Chem*, 248: 7276–7278.
251. Orgován G, Noszál B. (2011) Electrodeless, accurate pH determination in highly basic media using a new set of ^1H NMR pH indicators. *J Pharm Biomed Anal*, 54: 958-964.
252. Wishart DS, Sykes BD. (1994) Chemical shifts as a tool for structure determination. *Methods Enzymol*, 239: 363–392.
253. Deng X, Mani NS. (2006) A facile, environmentally benign sulfonamide synthesis in water. *Green Chem*, 8: 835–838.
254. Szakács Z, Béni Sz, Varga T, Órfi L, Kéri Gy, Noszál B. (2005) Acid–base profiling of imatinib (Gleevec) and its fragments. *J Med Chem*, 48: 249-255.
255. Kyvala M, Lukes I. OPIUM computer program, 1995.
<http://www.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html>.
256. Rizzi AM, Kremser L. (1999) $\text{pK}(a)$ shift-associated effects in enantioseparations by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 20: 2715-2722.
257. Andersson K-E, Mulhall JP, Wyllie MG. (2005) Pharmacokinetic and pharmacodynamic features of dapoxetine, a novel drug for 'on demand' treatment of premature ejaculation. *BJU Int*, 97: 311-315.
258. Fanali S, Furlanetto S, Aturki Z, Pinzauti S. (1998) Experimental design methodologies to optimize the CE separation of epinephrine enantiomers. *Chromatographia*, 48: 395–401.

259. He Y, Kee Lee H. (1998) Orthogonal array design experiments for optimizing the separation of various pesticides by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A*, 793: 331-340.
260. Liu M, Zheng Y, Ji Y, Zhang C. (2011) Development and validation of a capillary electrophoresis method for the enantiomeric purity determination of RS86017 using experimental design. *J Pharm Biomed Anal*, 55: 93-100.
261. Fan XM, Ji YB, Zhu DN. (2010) An integrated approach based on experimental designs for fingerprint development of the complex herbal prescription Sheng-Mai-San by MEKC. *Chromatographia*, 71: 667–677.
262. Furlanetto S, Orlandini S, Porta EL, Coran S, Pinzauti S. (2002) Optimization and validation of a CZE method for rifloxacin hydrochloride determination in coated tablets. *J Pharm Biomed Anal*, 28: 1161–1171.
263. Jimidar M, Niemeijer N, Peeters R, Hoogmartens J. (1998) Robustness testing of a liquid chromatography method for the determination of vorozole and its related compounds in oral tablets. *J Pharm Biomed Anal*, 18: 479–485.
264. ICH Harmonised Tripartite Guideline - Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 1–13, 2005.

11. Az értekezés alapját képező saját közlemények

- E1. **Sohajda T**, Béni Sz, Varga E, Iványi R, Rácz Á, Szente L, Noszál B. (2009) Characterization of aspartame-cyclodextrin complexation. *J Pharm Biomed Anal*, 50: 737-745.
- E2. Béni Sz, **Sohajda T**, Neumajer G, Iványi R, Szente L, Noszál B. (2010) Separation and characterization of modified pregabalins in terms of cyclodextrin complexation, using capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance. *J Pharm Biomed Anal*, 51: 842-852.
- E3. **Sohajda T**, Varga E, Béni Sz, Iványi R, Fejős I, Szente L, Noszál B. (2010) Separation of vinca alkaloid enantiomers by capillary electrophoresis applying cyclodextrin derivatives and characterization of cyclodextrin complexes by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*, 53: 1258-1266.
- E4. **Sohajda T**, Hu WH, Zeng LL, Li H, Szente L, Noszál B, Béni Sz. (2011) Evaluation of the interaction between sitagliptin and cyclodextrin derivatives by capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Electrophoresis*, 32: 2648-2654.
- E5. **Sohajda T**, Szakács Z, Szente L, Noszál B, Béni Sz. (2012) Chiral recognition of imperanene enantiomers by various cyclodextrins: A capillary electrophoresis and NMR spectroscopy study. *Electrophoresis*, (*közlésre elfogadva*).
- E6. Neumajer G, **Sohajda T**, Darcsi A, Tóth G, Szente L, Noszál B, Béni Sz. (2012) Chiral recognition of dapoxetine enantiomers with methylated-gamma-cyclodextrin: a validated capillary electrophoresis method. *J Pharm Biomed Anal*, 62:42-47.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Noszál Béla tanszékvezető egyetemi tanárnak, diákkörös hallgató korom óta nyújtott töretlen szakmai támogatásáért és doktori munkám irányításáért.

Megkülönböztetett köszönet illeti Dr. Béni Szabolcs egyetemi adjunktust, barátomat, aki feltárta előttem a kutatómunka szépségeit, és akitől a munkám során felmerülő problémákra mindig önzetlen segítséget kaptam.

Köszönet illeti dr. Neumajer Gábor doktorandusz társamat a pregabalin származékainak előállításáért, valamint Darcsi András tudományos diákköri hallgatót (Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet) a racém dapoxetin szintéziséért.

Köszönöm Dr. Szakács Zoltánnak (Richter Nyrt.) kutatómunkám során nyújtott segítségét és a közlemények megírásával kapcsolatos hasznos tanácsait.

Köszönöm Dr. Sente Lajosnak és Dr. Iványi Róbertnek (Cyclolab Kft.) a ciklodextrin komplexek vizsgálatában nyújtott tanácsaikat, segítségüket, valamint a Cyclolab Kft.-nek, hogy rendelkezésre bocsátotta a vizsgálatokhoz szükséges ciklodextrineket.

Külön köszönet illeti Varga Erzsébet doktoranduszt (Cyclolab Kft.) és Fejős Ida tudományos diákköri hallgatót (Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet) a vinka alkaloidok ciklodextrin komplexeinek kapilláris elektroforézissel történt vizsgálatában nyújtott segítségükért.

Köszönöm Dr. Kovács Zsuzsanna egyetemi tanársegédnek a kapilláris elektroforézis kísérletekben nyújtott segítségét.

Köszönöm továbbá Yuichi Kobayashi-nak és munkatársainak az imperanén, Wen Hui Hu-nak és munkatársainak a szitagliptin és Vicente Gotor Fernándeznek az enantiomertiszta dapoxetin szintézisét és rendelkezésre bocsátását.

Köszönöm az ELTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén oktató kollégáimnak és a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet valamennyi munkatársának a baráti, inspiráló atmoszférát.

Végezetül külön köszönet illeti szüleimet és barátnőmet türelmükért és állandó támogatásukért.