

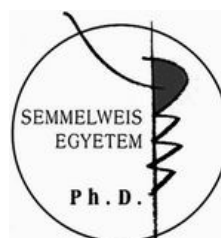
# **Biológiailag aktív vegyületek ciklodextrin komplexei: stabilitást és enantiomer elválasztást befolyásoló tényezők vizsgálata**

Doktori tézisek

*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.

Budapest

2012

## 1 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 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. Bár a gazda- és vendégmolekula között csak másodrendű kémiai kötések jönnek létre, a ciklodextrin üregének nagy elektronsűrűsége megváltoztathatja a bezárt vendégmolekula elektronátmeneteit, 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 változatos felhasználásokat

tesz lehetővé többek között a gyógyszer- és élelmiszeriparban, illetve az analitikában.

Doktori munkám során CD komplexek stabilitásának vizsgálatát, illetve a CD alapú királis elválasztási problémák minél sikeresebb megoldását és az elválasztás háttérében álló molekuláris kölcsönhatások megértését tűztük ki fő célul. Ehhez vendégmolekulaként az aszpartámot (Asm), a pregabalin tozilezett és danzilezett származékát (Tos-Preg, Dns-preg), három vinka alkaloidot (vinkamin, vinpocetin, vinkadiformin), az imperanént (Ipn), a szitagliptint (Sgli) és a dapoxetint (Dpx) választottuk ki. A tudományos szempontok és a gyakorlati igények figyelembe vételével az enantiomerpárok eddig még kapilláris elektroforézissel, illetve több esetben egyáltalán nem megvalósított enantiomer szelektív analízisét végeztük el és tanulmányoztuk (az aszpartám kivételével). Fontos részt képvisel emellett az egyes módszerek optimalizálása a felbontást legnagyobb mértékben befolyásoló paraméterek függvényében, illetve egy módszer ICH irányelveknek megfelelő validálása is. Nagy hangsúlyt fektettünk a komplexek kapilláris elektroforézistől független módszerrel (NMR spektroszkópiával) történő tanulmányozására, mellyel számos esetben komplex stabilitást, valamint a legtöbb vegyületnél a komplexek sztöchiometriájának és térszerkezetének vizsgálatát végeztük el.

## 2 Célkitűzés

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 szervezetbeni 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 CE- 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 mágneses magrezonancia spektroszkópiával is.

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, CD komplex képzés 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.

### 3 Módszerek

#### 3.1 Protonálódási állandók meghatározása

A protonálódási állandók 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.

Az aszpartám protonálódási állandóit egycsöves  $^1\text{H}$  NMR-pH titrálással, *in situ* pH méréssel, a szitagliptin állandóit egyedi minták módszerével 0,15 M ionerősség mellett (NaCl),  $25,0 \pm 0,1$  °C hőmérsékleten határoztuk meg. A titrálásokat  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9/1 arányú oldószerben végeztük, referenciaként DSS-t ( $\delta=0,000$  ppm), az aszpartámnál *in situ* pH indikátorként klórecetsavat (ClAc), ecetsavat, imidazolt és Trist alkalmazva. Az egyes spektrumokhoz tartozó aktuális pH-t a megfelelő indikátor molekula aktuális kémiai eltolódásából számítottuk. A vízjel elnyomására előtelítő (*presaturation*), illetve *dpfgse\_water* pulzust alkalmaztunk. Az NMR-pH adatsorok együttes kiértékelése az OPIUM programmal történt, a spektrumok feldolgozására a Mestre-C programot valamint a MestreNova 5.3.1-4825 szoftvert használtuk.

A vegyületek protonálódási állandóinak pontos meghatározását kapilláris elektroforézissel a két pregabalin származék illetve a szitagliptin esetében végeztük el. Kísérleteinket egy diódasoros detektorral felszerelt  $^{3\text{D}}\text{CE}$  készüléken végeztük, adatainkat a HP $^{3\text{D}}$  CE Chemstation szoftverrel dolgoztuk fel. Méréseinkhez valamennyi esetben kezeletlen szilika kapillárist használtunk (50  $\mu\text{m}$  belső átmérő, 64,5 cm teljes hossz, 56 cm effektív hossz). A tálcát és a kapillárist 25 °C-ra termosztáltuk, a mérések során +30 kV feszültséget alkalmaztunk. A mintákat hidrodinamikai injektálást (50 mbar, 4 mp) alkalmazva juttattuk a kapillárisba. Minden esetben három párhuzamos mérést végeztünk, EOF markerként DMSO-t használtunk.

A protonálódási állandók számítására a migrációs időkből effektív mozgékonyságot ( $\mu_i^{\text{eff}}$ ) számítottunk:

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

amit a pH függvényében ábrázolva jutottunk titrálási görbékhez ( $l_{eff}$ ,  $l_t$ ,  $U$ ,  $t_i$  és  $t_{EOF}$  rendre a kapilláris effektív és teljes hosszát, az alkalmazott feszültséget, valamint a vizsgált vegyület és az EOF marker migrációs időit jelölik). A görbe pontjait a következő egyenlet segítségével illesztettük:

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_{A^-} + \mu_{HA} \cdot 10^{pK_s - pH}}{1 + 10^{pK_s - pH}}$$

Az illesztéshez a  $\mu_{eff}$ -pH adatsorokból az OPIUM program segítségével kalkuláltuk a protonálódási állandókat és az egyes protonáltsági izomerek határmozgékonyságait.

### 3.2 Komplex stabilitás és királis elválasztás vizsgálata

A kapilláris 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 a 3.1 fejezetben leírtakkal analóg hőmérsékleten, azonos feszültség és injektálás mellett, ugyanazon készüléken végeztük egyforma kapillárisokat alkalmazva. A detektálás három hullámhosszon, 200, 215 és 230 nm-en történt. EOF markerként valamennyi esetben DMSO-t használtunk.

A komplex stabilitási vizsgálatokat CE-vel vizsgáltuk általában egy, amfoter részecskék esetén több pH értéken, a stabilitási vizsgálatokhoz valamennyi vegyület esetében nagyszámú ciklodextrint (17-29) alkalmazva. 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 mozgékonyaságból és az aktuális CD koncentrációból x-reciprok módszerrel, grafikus úton számítottuk ki az egyes stabilitási állandókat.

A királis elválasztás jellemzésére a felbontási értéket ( $R_s$ ) használtuk, melyet a következő egyenletnek megfelelően számítottunk:

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

ahol  $t_1$  és  $t_2$  az enantiomerek migrációs időt, míg  $w_1$  és  $w_2$  az enantiomerek csúcsának extrapolált szélessége az alapvonalnál.

Az enantiomerek azonosítása minden esetben a racém mintához adott izomertiszta anyaggal történt.

### 3.3 Sztöchiometria és térszerkezet vizsgálata

A stabilitási állandó meghatározása mellett az NMR spektroszkópia kiválóan alkalmas a zárványkomplexek átlagos sztöchiometriájának meghatározására is. Ennek megállapítására Job módszere kézenfekvően alkalmazható, melyet  $^1\text{H}$  NMR, a szitagliptin esetében  $^1\text{H}$  és  $^{19}\text{F}$  NMR titrálással végeztünk. Méréseinket  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9/1 elegyben hajtottuk végre, a vízjel elnyomására 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. A  $^{19}\text{F}$  méréseket (referencia: NaF,  $\delta=-122,0$  ppm) Varian Mercury Plus spektrométeren (400 MHz) végeztük a Semmelweis Egyetem Szerves Kémiai Intézetében.

A zárványkomplex szerkezetének meghatározására 2D ROESY spektroszkópiát alkalmaztunk. Ilyen vizsgálatokat az aszpartám, a pregabalin származékok, a vinka alkaloidok, az imperanén és a szitagliptin komplexeinek esetében végeztünk, az oldószer valamennyi esetben  $\text{D}_2\text{O}$  volt.

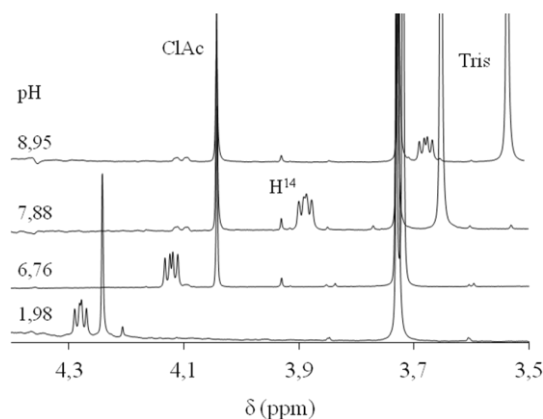
## 4 Eredmények

### 4.1 Protonálódási állandók meghatározása

Az aszpartám egy karboxil és egy primer amino csoporttal rendelkezik, így két protonálódási lépcsőt kell a titrálás során meghatározni. Az egycsöves titrálás során alkalmazott *in situ* pH-mérésnek előfeltétele, hogy a megfelelő indikátor molekula  $\delta_{\text{Ind}}$  és  $\delta_{\text{HInd}}$  határeltolódásai, valamint  $\log K_{\text{Ind}}$  protonálódási állandója pontosan ismertek legyenek, ugyanis csak ezen paraméterek ismeretében számítható a titrálás tetszőleges pontján felvett NMR spektrumhoz tartozó pH:

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

A számos magra meghatározott NMR-pH adatsorok alapján az aszpartám amino csoportjának protonálódási állandója  $\log K_1 = 7,83 \pm 0,02$ , míg a karboxilát csoporté  $\log K_2 = 2,96 \pm 0,03$ . A protonálódásra legérzékenyebben  $\text{H}^{14}$  proton kémiai eltoldódás-változását szemléltető, különböző pH-kon felvett spektrumsorozat az 1. ábrán látható.



1. ábra. Az Asm  $\text{H}^{14}$  protonjának pH-függő kémiai eltoldódás-változását szemléltető spektrumsorozat.

A szitagliptin esetében a sav-bázis tulajdonságokat mind kapilláris elektroforézissel, mind mágneses magrezonancia spektroszkópiával jellemeztük. A CE-pH titrálás alapján a Sgli aminocsoportjának savi disszociációs állandója  $\text{p}K_s = 7,61$ , NMR-pH titrálással az állandó  $\text{p}K_s = 8,03$ -nak adódott.



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-amino csoporttal rendelkezik. Tos-preg esetében  $pK_s=4,75$ , Dns-preg esetében  $pK_{s1}=3,47$  és  $pK_{s1}=4,67$  állandókat számítottunk.

#### 4.2 Komplex stabilitás és enantiomer elválasztás vizsgálata

A komplexek stabilitását valamennyi vegyület esetében számos ciklodextrinnel vizsgáltuk. Az 1. táblázatban az egyes vendégmolekulák legstabilabb CD komplexei és azok átlagos stabilitási állandói vannak feltüntetve.

1. táblázat. A vizsgált vegyületek legstabilabb CD komplexei.

Vendég	CD származék	Stabilitás ( $M^{-1}$ )
Asm	acetyl- $\beta$ -CD (Ac- $\beta$ -CD)	$K=333$ , pH=9,0
Tos-preg	szulfobutil- $\beta$ -CD (SB- $\beta$ -CD)	$K_S=946$ , $K_R=1014$ , pH=2,5
Dns-preg	szulfopropil- $\beta$ -CD (SP- $\beta$ -CD)	$K=1290$ , pH=2,5
Vinkamin	szulfobutil- $\gamma$ -CD (SB- $\gamma$ -CD)	$K_1=1600$ , $K_2=2800$ , pH=2,5
Vinpocetin	szulfobutil- $\gamma$ -CD	$K_1=8500$ , $K_2=9500$ , pH=2,5
Vinkadiformin	szulfobutil- $\gamma$ -CD	$K_1=4300$ , $K_2=7500$ , pH=2,5
Ipn	szulfopropil- $\beta$ -CD	$K_S=1600$ , $K_R=1990$ , pH=9,0
Sgli	szulfobutil- $\alpha$ -CD	$K_S=312$ , $K_R=320$ , pH=6,0
Dpx	szulfobutil- $\beta$ -CD	$K_S=610$ , $K_R=690$ , pH=5,5

Királis szelektorként az aszpartám kivételével valamennyi vizsgált vegyületnél alkalmaztuk a ciklodextrineket az enantiomerek elválasztására. Az

elválasztásokat számos paraméter, így ciklodextrin típus és koncentráció, puffer alapanyag és koncentráció, pH, kapilláris hőmérséklet, alkalmazott feszültség és hozzáadott szerves adalékanyag függvényében optimalizáltuk. A paraméterek optimalizálását általában egyváltozós módszerrel, a Dpx esetében ortogonális kísérlettervezés módszerével végeztük el. Amennyiben egy ciklodextrint tartalmazó rendszerrel nem sikerült megfelelő felbontást elérni, behatóan tanulmányoztuk a duál CD rendszerek alkalmazhatóságát. A 2. táblázatban az egyes vizsgált vegyületeknél megvalósított optimalizált elválasztást és annak paramétereit mutatjuk be.

2. táblázat. Vizsgálataink során kidolgozott optimalizált elválasztások felbontási értékei és a módszerek körülményei.

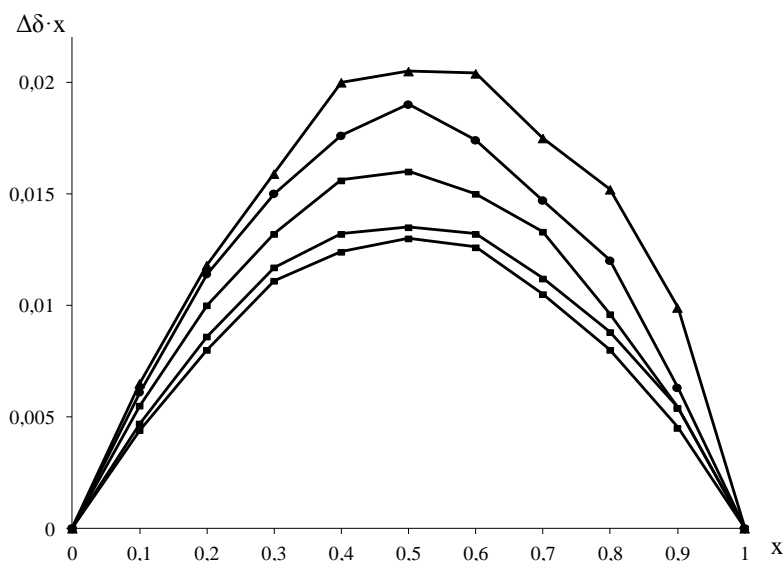
<b>Vendég</b>	<b>CD származék</b>	<b>Felbontás (<math>R_s</math>)</b>	<b>Körülmények</b>
Tos-preg	propilamino- $\beta$ -CD (PA- $\beta$ -CD)	$R_s=2,76$	pH=6,8, +17,5 kV, 25 °C, 100 mM foszfát puffer, 3,4 mM PA- $\beta$ -CD
Dns-preg	PA- $\beta$ -CD	$R_s=4,35$	pH=7,1, +17,5 kV, 25 °C, 100 mM foszfát puffer, 3,2 mM PA- $\beta$ -CD
Vinkamin	SB- $\gamma$ -CD	$R_s=7,78$	pH=2,5, +20 kV, 25 °C, 42 mM foszfát puffer, 1 mM SB- $\gamma$ -CD
Vinpocetin	SB- $\gamma$ -CD	$R_s=4,08$	pH=2,5, +20 kV, 25 °C, 42 mM foszfát puffer, 1 mM SB- $\gamma$ -CD
Vinkadiformin	karboximetil- $\gamma$ -CD (CM- $\gamma$ -CD)	$R_s=25,1$	pH=2,5, +20 kV, 25 °C, 42 mM foszfát puffer, 8 mM CM- $\gamma$ -CD
Ipn	SB- $\gamma$ -CD és PA- $\beta$ -CD (duál CD rendszer)	$R_s=4,47$	pH=9,0, +30 kV, 25 °C, 75 mM borát puffer, 12,5 mM SB- $\gamma$ -CD,

			10 mM PA- $\beta$ -CD
Sgli	SB- $\beta$ -CD és $\beta$ -CD (duál CD rendszer)	$R_S=2,24$	pH=4,4, +30 kV, 10 °C, 40 mM foszfát puffer, 5 mM SB- $\beta$ -CD, 5 mM $\beta$ -CD
Dpx	metil- $\gamma$ -CD (RAMEG-CD)	$R_S=7,01$	pH=4,5, +15 kV, 15 °C, 70 mM foszfát puffer, 3 mM RAMEG-CD, 20 V/V% MeOH

A Dpx enantiomerjeinek elválasztására kidolgozott módszert a Nemzetközi Harmonizációs Konferencia (International Conference of Harmonization) analitikai módszerekre vonatkozó irányelve alapján validáltuk, 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).

### 4.3 A komplexek sztöchiometriájának és térszerkezetének vizsgálata

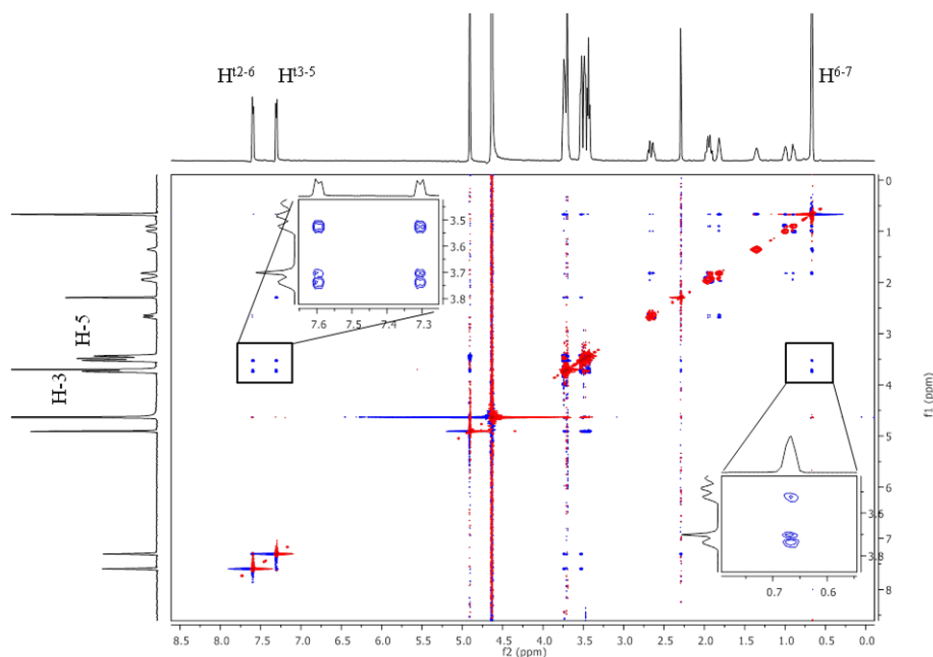
A komplexek átlagos sztöchiometriájának direkt meghatározására Job módszerét alkalmazva  $^1\text{H}$  NMR titrálásokat végeztünk az aszpartám és a dapoxetin kivételével valamennyi vegyületnél. A szitagliptin esetében, lévén a vegyület fluor atomokat is tartalmaz, lehetőség nyílt ezt  $^{19}\text{F}$  NMR titrálással is kiegészíteni. A mérések kiértékelése során a móltörttel súlyozott kémiai eltoldódásokat a móltört függvényében ábrázolva szerkesztettük meg a Job görbéket (2. ábra).



2. ábra. A Tos-preg (négyzet) és Dns-preg (háromszög)  $\beta$ -CD-nel (kör) végzett  $^1\text{H}$  NMR titrálásai alapján szerkesztett Job görbék.

A görbék maximuma a komplexképzésben részt vevő gazda/vendég arányának megfelelő helyen található, 1:1 arány esetén 0,5-nél. Adataink elemzése alapján kijelenthető, hogy a komplexek valamennyi esetben átlagosan 1:1 sztöchiometriájúak voltak.

A zárványkomplexek háromdimenziós szerkezetét 2D NMR spektroszkópiával, ROESY szekvenciát alkalmazva határoztuk meg. Ezzel a technikával az egymás térközelségében lévő magokról kaphatunk információt, ezért a módszer alkalmas az intermolekuláris keresztcsúcsok segítségével a vendégmolekula behatolási irányának, mélységének és a feltételezhetően kölcsönható csoportoknak a megállapítására. A ciklodextrin komplexek szempontjából elsődleges jelentősége a CD üreg belsejében található H-3 és H-5 protonoknak van. ROESY kísérleteket a Dpx kivételével valamennyi vizsgált molekulán végeztünk, számos esetben több, különböző CD komplexet is vizsgálva. A 3. ábra egy reprezentatív ROESY spektrumot mutat be Tos-preg/ $\beta$ -CD mintán, melyen a számos intramolekuláris keresztcsúcs mellett a komplex térszerkezetének megállapítását segítő intermolekuláris keresztcsúcsok kiemelve láthatók.



3. ábra. A Tos-preg/ $\beta$ -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- $\beta$ -CD, mindkét pregabalin származék  $\beta$ -,  $\gamma$ - és PA- $\beta$ -CD, a Sgli  $\beta$ - és SB- $\beta$ -CD, illetve az Ipn  $\beta$ -/hidroxipropil(HP)- $\beta$ - és SB- $\gamma$ -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- $\beta$ -CD/HP- $\gamma$ -CD, vinkadiformin-HP- $\beta$ -CD/HP- $\gamma$ -CD, vinkadiformin-RAMEB-CD/RAMEG-CD (üregméret-függő) valamint a vinpocetin-HP- $\beta$ -CD/RAMEB-CD (szubsztituens-függő) komplexek térszerkezetét vizsgáltuk.

## 5 Következtetések

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

A protonálódási állandók vizsgálata során meghatároztuk a Tos-preg és Dns-preg pregabalin származékok protonálódási állandóit CE-pH titrálással, valamint két független módszerrel, CE-pH és  $^1\text{H}$  NMR-pH titrálással a szitagliptin amino csoportjának protonálódási állandóját.

Behatóan tanulmányoztuk valamennyi vegyület CD komplexeinek stabilitását kapilláris elektroforézissel, az aszpartám és a vinka alkaloidok vizsgálatánál NMR spektroszkópiával is. Az aszpartám esetében három pH értéken vizsgáltuk a komplexek stabilitását (lúgos pH-n elsőként), és sikerült a korábban publikáltaknál jelentősen stabilabb (Asm-Ac- $\beta$ -CD) komplexet jellemezni. A pregabalin származékok töltésfüggő komplex stabilitási vizsgálatát elsőként, négy pH értéken végeztük el, valamennyi esetben kiemelkedő stabilitású komplexeket sikerült felfedezni. 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 nagy 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- $\beta$ -CD-nel. Hatékonyan, korábban nem vizsgált CD-vel is megvalósítottuk mindhárom vinka alkaloid királis elválasztását behatóan tanulmányozva a kísérletek során felfedezett üregméret- és szubsztituens-függő enantiomer sorrend megfordulásokat. Az imperanén

enantiomerjeit, miután az egy ciklodextrint tartalmazó rendszerekkel nem értünk el megfelelő eredményt, 12,5 mM SB- $\gamma$ -CD-t és 10,0 mM PA- $\beta$ -CD-t tartalmazó duál CD rendszert alkalmazva választottuk el. Szitagliptin esetében az előzetes kísérletek után szintén duál CD rendszert használva (5 mM SB- $\beta$ -CD és 5 mM  $\beta$ -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 ortogonális kísérlettervezés módszerével optimalizáltuk hat alapvető fontosságú elválasztási paraméterre. 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  $^1\text{H}$  NMR kísérlettel, Job módszerét alkalmazva igazoltuk. A vizsgálatot legtöbb vegyület esetében több, az elválasztás vagy komplexképzés szempontjából releváns CD-nel is elvégeztük. Szitagliptin esetében a vegyület fluortartalmának köszönhetően ezt lehetőség volt  $^{19}\text{F}$  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 komplexek kivételével térszerkezeti vizsgálatokat végeztünk 2D ROESY NMR spektroszkópiával. Ezen vizsgálatok során feltérképeztük a kialakuló komplexek 3D szerkezetét az elválasztás és komplexképzés szempontjából fontos ciklodextrinekkal. Korábban az Asm, a vinpocetin valamint a danzil csoport ciklodextrin komplexeinek térszerkezetét igazolták.

## 5 Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Sohajda T**, Béni Sz, Varga E, Iványi R, Rácz Á, Sente L, Noszál B. (2009) Characterization of aspartame-cyclodextrin complexation. *J Pharm Biomed Anal*, 50: 737-745. IF: 2,453
2. Béni Sz, **Sohajda T**, Neumajer G, Iványi R, Sente 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. IF: 2,733
3. **Sohajda T**, Varga E, Béni Sz, Iványi R, Fejős I, Sente 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. IF: 2,733
4. **Sohajda T**, Hu WH, Zeng LL, Li H, Sente 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. IF: 3,569\*
5. **Sohajda T**, Szakács Z, Sente L, Noszál B, Béni Sz. (2012) Chiral recognition of imperanene enantiomers by various cyclodextrins: A capillary electrophoresis and NMR spectroscopy study. *Electrophoresis*, (közlésre elfogadva). IF: 3,569\*
6. Neumajer G, **Sohajda T**, Darcsi A, Tóth G, Sente 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. IF: 2,733\*



## **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 tanársegédet, barátomat, aki feltárta előttem a kutatómunka szépségeit, és akivel az első perctől kezdve hatékonyan tudtam együtt dolgozni. Külön köszönet azért, hogy a közös munka során mindig értékes tanácsokkal látott el és mindig készen állt segíteni.

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 (Cyclolab Kft.) és Dr. Iványi Róbertnek a ciklodextrin komplexek vizsgálatában nyújtott tanácsukat, 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.