

A dapoxetin gyógyszerkémiái jellemzése, ciklodextrin-komplexeinek egyensúlyi és szerkezeti vizsgálata

Doktori értekezés

Darcsi András

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Béni Szabolcs, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Tétényi Péter, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Tircsó Gyula, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás, D.Sc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Perjési Pál, C.Sc., egyetemi tanár
Dr. Krajsovsky Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2017

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1 BEVEZETÉS.....	8
1.1 A KORAI MAGÖMLÉS GYÓGYSZERES KEZELÉSE	9
1.2 A DAPOXETIN JELLEMZÉSE	11
1.2.1 A dapoxetin farmakológiája	11
1.2.2 A dapoxetin irodalmi szintézise	13
1.3 HATÓANYAG SZENNYEZŐK, BOMLÁSTERMÉKEK	14
1.3.1 A dapoxetin gyártási szennyezői.....	16
1.3.2 A dapoxetin bomlástermékei.....	18
1.4 CIKLODEXTRINEK	19
1.4.1 A ciklodextrinek szerkezete, tulajdonságaik.....	19
1.4.2 A ciklodextrinek zárványkomplex képzése.....	20
1.4.3 A ciklodextrinek felhasználása.....	22
1.4.4 A ciklodextrin-komplexek analitikája.....	23
1.4.4.1 A komplexképződés egyensúlyi leírása.....	23
1.4.4.2 A komplexek sztöchiometriájának meghatározása.....	24
1.4.4.3 A komplexstabilitási állandók meghatározása NMR titrálással	25
1.4.4.4 A CD-komplexek szerkezeti jellemzése NMR módszerekkel.....	27
1.4.4.5 Cirkuláris dikroizmus elméleti alapjai.....	29
1.4.4.6 Fázis-oldhatóság vizsgálat.....	30
1.4.4.7 Királis kapilláris elektroforézis (CE) alapjai.....	31
2 CÉLKITŰZÉSEK.....	32
3 MÓDSZEREK	33
3.1 FELHASZNÁLT VEGYSZEREK	33
3.2 DAPOXETIN ÉS METABOLITJAINAK ELŐÁLLÍTÁSA	33
3.3 ANALITIKAI MÓDSZEREK.....	41
3.3.1 Fázis-oldhatóság vizsgálatok.....	41
3.3.2 Tömegspektrometriás mérések.....	41
3.3.3 NMR mérések és kiértékelésük.....	41
3.3.3.1 Sztöchiometria meghatározása	42
3.3.3.2 ¹ H NMR titrálások.....	42
3.3.3.3 NOE mérések.....	44

3.3.4	Cirkuláris dikroizmus és UV spektroszkópiás mérések	45
3.3.5	Molekulamodellés.....	46
3.3.6	Kapilláris elektroforézis vizsgálatok.....	46
4	EREDMÉNYEK	48
4.1	A DAPOXETIN ÚJ GYÁRTÁSI SZENNYEZŐJE	48
4.1.1	Szintézis és izolálás.....	48
4.1.2	Szerkezetfejtés.....	48
4.2	A DAPOXETIN ÚJ BOMLÁSTERMÉKEI	52
4.2.1	Izolálás	52
4.2.2	Szerkezetfejtés és a bomlási reakcióút bizonyítása.....	52
4.3	A DAPOXETIN CIKLODEXTRINEKKEL KIALAKÍTOTT KÖLCSÖNHATÁSÁNAK JELLEMZÉSE.....	60
4.3.1	Fázis-oldhatósági vizsgálatok	60
4.3.2	Tömegspektrometriás vizsgálatok.....	63
4.3.3	A dapoxetin natív CD-kel képzett komplexeinek NMR vizsgálata	64
4.3.3.1	<i>Komplekxképződés γ-CD-vel.....</i>	<i>64</i>
4.3.3.2	<i>Komplekxképződés β-CD-vel</i>	<i>72</i>
4.3.4	Cirkuláris dikroizmus és UV spektrofotometriás mérések	78
4.3.4.1	<i>A dapoxetin UV és cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás tulajdonságai. 78</i>	
4.3.4.2	<i>A dapoxetin β- és γ-CD-vel kialakított kölcsönhatásának vizsgálata</i>	<i>79</i>
4.3.5	Molekulamodellés.....	85
4.3.5.1	<i>Kölcsönhatási energiák számítása</i>	<i>85</i>
4.3.5.2	<i>A ciklodextrin komplexek háromdimenziós szerkezetei.....</i>	<i>86</i>
4.3.6	ODMCM- γ -CD-vel való kölcsönhatás vizsgálata.....	88
4.3.6.1	<i>Az ODMCM-γ-CD sav-bázis tulajdonságai</i>	<i>88</i>
4.3.6.2	<i>Kapilláris elektroforetikus vizsgálatok.....</i>	<i>89</i>
4.3.6.3	<i>NMR vizsgálatok</i>	<i>90</i>
5	MEGBESZÉLÉS	94
5.1	A DAPOXETIN GYÁRTÁSI SZENNYEZŐJE	94
5.2	A DAPOXETIN BOMLÁSTERMÉKEI.....	97
5.3	A DAPOXETIN KÖLCSÖNHATÁSA CIKLODEXTRINEKKEL.....	99
6	KÖVETKEZTETÉSEK.....	102
7	ÖSSZEFOGLALÁS.....	104

8 SUMMARY	105
9 IRODALOMJEGYZÉK	106
10 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	120
11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	122

Rövidítések jegyzéke

1D: egydimenziós

2D: kétdimenziós

AcOH: ecetsav

APT: csatolt proton teszt (*Attached Proton Test*)

CD: ciklodextrin

CD₃COOD: deuterált ecetsav

CD₃OD: deuterált metanol

CDCl₃: deuterált kloroform

CE: kapilláris elektroforézis

CH₂Cl₂: diklórmétán

CHCl₃: kloroform

CHD₂OD: részlegesen deuterált metanol

CiD: cirkuláris dikroizmus

COSY: korrelációs spektroszkópia (*CORrelation SpectroscopY*)

CYP: citokróm P450 (izoenzim család)

D₂O: deutérium-oxid

dezmetil-Dpx: dezmetil-dapoxetin

DIAD: diizopropil-azodikarboxilát

didezmetil-Dpx: didezmetil-dapoxetin

DMAP: 4-dimetilamino-piridin

DMF: *N,N*-dimetilformamid

DOSY: diffúziókontrollált spektroszkópia (*Diffusion-Ordered SpectroscopY*)

Dpx: dapoxetin

Dpx-*N*-oxid: dapoxetin-*N*-oxid

DS: szubsztitúciós fok (*Degree of Substitution*)

DSS: 3-trimetilszilil-1-propánszulfonsav (*4,4-Dimethyl-4-Silapentane-1-Sulfonic acid*)

E-CON: 1-(2E)-cinnamil-oxi-naftalin

EOF: elektroozmotikus áramlás (*ElectroOsmotic Flow*)

ESI: elektropray ionizáció (*ElectroSpray Ionisation*)

Et₂O: dietil-éter

EtOAc: etil-acetát

FMO1: flavin-monooxigenáz 1 enzim

G: vendégmolekula (*guest*)

GABA: γ -amino-vajsav

HMBC: többkötéses heteronukleáris korreláció (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*)

HPLC: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (*High-Performance Liquid Chromatography*)

HPTLC: nagyhatékonyságú vékonyréteg kromatográfia (*High-Performance Thin Layer Chromatography*)

HRMS: nagyfelbontású tömegspektrometria (*High Resolution MS*)

HSQC: heteronukleáris egykvantum korreláció (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*)

IC₅₀: a maximális gátló koncentráció 50%-a (*half maximal Inhibitory Concentration*)

ICH: Nemzetközi Egységesítési Konferencia (*International Conference on Harmonization*)

LC: folyadékkromatográfia (*Liquid Chromatography*)

LiAlH₄: lítium-alumínium-hidrid

MAO: monoamin-oxidáz enzim

mCBA: meta-klórbenzoesav

mCPBA: *meta*-klórperbenzoesav

MeOH: metanol

MS: tömegspektrometria (*Mass Spectrometry*)

MsCl: mezil-klorid

Na(CN)BH₃: nátrium-ciano-borohidrid

NaH: nátrium-hidrid

NaOD: deuterált nátrium-hidroxid

NMR: mágneses magrezonancia (*Nuclear Magnetic Resonance*)

NO: nitrogén-monoxid

NOE: mag Overhauser-hatás (*Nuclear Overhauser Effect*)

NOESY: mag Overhauser-hatás spektroszkópia (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)

ODMCM- γ -CD: oktakis-(2,3-di-*O*-metil-6-*O*-karboximetil)- γ -ciklodextrin

Pd/C: palládium aktív szénen (katalizátor, 5% vagy 10% Pd tartalommal)

PDE-5: foszfodiészteráz-5 enzim

RAME- γ -CD: random metilezett γ -ciklodextrin

ROESY: forgó koordinátarendszerű mag Overhauser-hatás spektroszkópia (*Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy*)

rt: szobahőmérséklet (*room temperature*)

S₀: intrinsic oldhatóság (*intrinsic Solubility*)

S_EAr: aromás elektrofil szubsztitúció

S_N2: bimolekuláris nukleofil szubsztitúció

SNRI: szelektív noradrenalin visszavétel gátlók (*Serotonin–Norepinephrine Reuptake Inhibitors*)

SSRI: szelektív szerotonin visszavétel gátlók (*Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*)

TCA: triciklusos antidepresszáns (*TriCyclic Antidepressant*)

Tf₂O: trifluormetánszulfonsav-anhidrid

THF: tetrahydrofurán

TMS: tetrametil-szilán

TOCSY: teljes korrelációs spektroszkópia (*T*Otal *C*orrelation *S*pectroscopY)

TOF-MS: repülési idő analizátorral rendelkező tömegspektrométer (*T*ime of *F*light)

UV: ultraibolya

UV-Vis: ultraibolya-látható (*U*ltraviolet-*V*isible)

VRK: vékonyréteg kromatográfia (*T*LC: *T*hin-*L*ayer *C*hromatography)

Z-CON: 1-(2Z)-cinnamil-oxi-naftalin

1 Bevezetés

A 1990-es évek végén a szexuális zavarok hatékony gyógyszeres terápiájában elsőként az erektilis diszfunkció kezelésére használt foszfodiészteráz-5 (PDE-5) enzim gátlókat törzskönyvezték [1]. A korai magömlés az erektilis diszfunkció mellett a leggyakoribb szexuális rendellenesség, ami egyes becslések szerint a férfiak 30%-át érinti világszerte [2]. Magas gyakorisága és a férfiak életminőségére kifejtett kedvezőtlen hatása ellenére csak az utóbbi időben fordítottak kellő figyelmet a megfelelő terápiás stratégiák kidolgozására. Az utóbbi 20-30 évben a korai magömlés terápiás megközelítése paradigmaváltáson ment át, mivel a nem gyógyszeres pszichológiai és viselkedés terápia mellett megjelent a gyógyszeres kezelés is [3, 4]. A farmakoterápiás célpontok főleg a magömlés kontrollálásában részt vevő neurotranszmittereket és receptorokat foglalják magukba úgymint a szerotonin, dopamin, oxitocin, noradrenalin, γ -amino-vajsav (GABA) és a nitrogén-monoxid (NO) mediált jelátviteli utakat [5]. A kezelés főbb gyógyszerei a helyi érzéstelenítők (lidokain, benzokain), a szelektív szerotonin visszavétel gátlók (SSRI), az opioid fájdalomcsillapítók (tramadol), a PDE-5 gátlók és az alfa-adrenerg receptor blokkolók közül kerültek ki [6].

A dapoxetin (Dpx) az első SSRI hatóanyag, amelyet specifikusan a korai magömlés kezelésére fejlesztettek ki. 2009-ben törzskönyvezték, jelenleg a világ több mint 40 országában elérhető, 2013-óta Magyarországon is forgalomban van az eutomer (S)-dapoxetin Priligy[®] néven.

Tekintettel arra, hogy a dapoxetin még egyik gyógyszerkönyvben sem hivatalos, és generikus gyártása csak a 2020-as években várható, kevés adattal rendelkezünk a hatóanyag kémiai és analitikai tulajdonságairól. Már tudományos diákköri munkám során elkezdtünk foglalkozni a hatóanyag kémiai jellemzésével, melynek első lépéseként előállítottuk a racém hatóanyagot. Az (S)-dapoxetin királis tisztaságának meghatározására elsőként valósítottunk meg egy rutinszerűen alkalmazható, validált királis kapilláris zónaelektroforézis módszert ciklodextrinek felhasználásával [7]. Mindez doktori munkám alapjául szolgált.

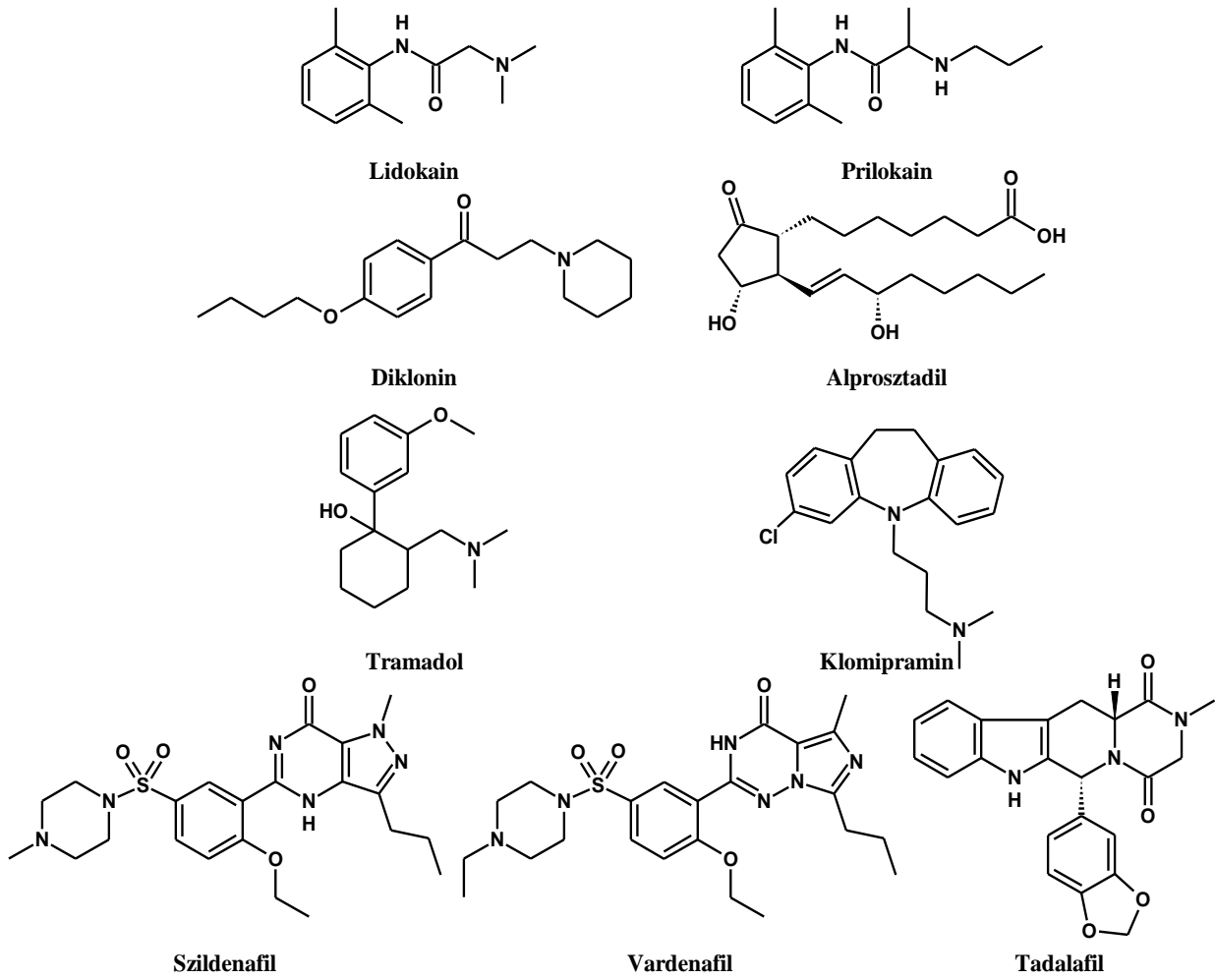
1.1 A korai magömlés gyógyszeres kezelése

A magömlést összetett perifériás és központi idegrendszeri folyamatok koordinálják melyek szerotonin, dopamin, oxitocin, noradrenalin, GABA és a nitrogén-monoxid (NO) mediált jelátviteli utakhoz kötődnek [5].

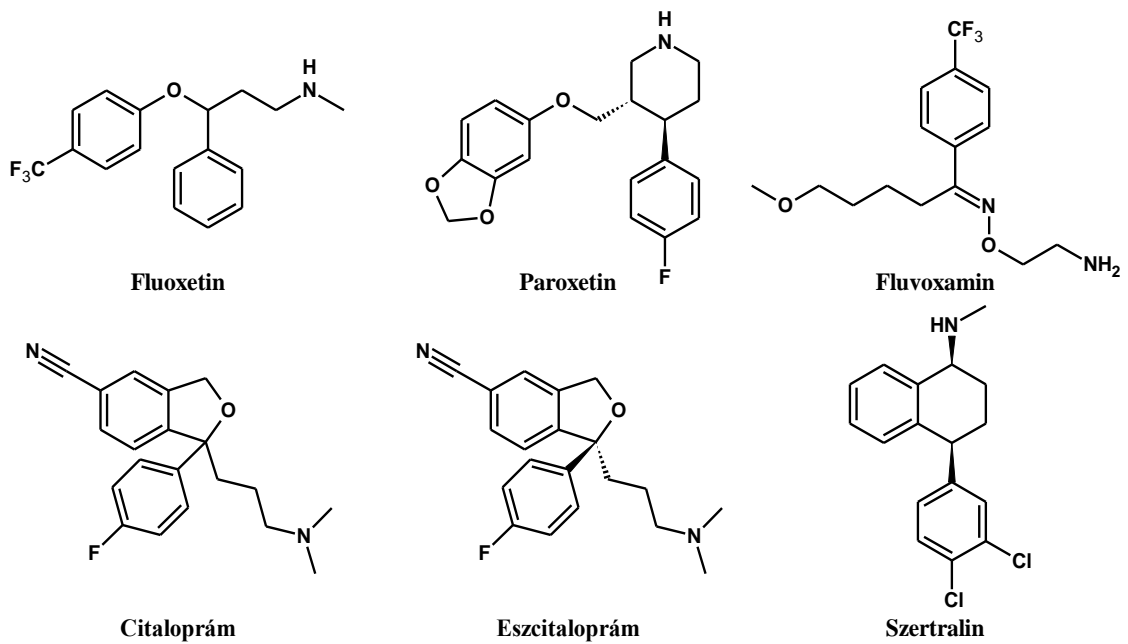
Lokális alkalmazásra Koreában törzskönyvezték a tradicionális gyógynövények keverékéből álló „*SS krém*”-et („Severance Secret cream”), mely helyi érzéstelenítő, és vazóaktív hatással rendelkezik. Leggyakrabban a lidokain és prilokain hatóanyagot tartalmazó aeroszolt, sprayt, krémet [8, 9] és a vazodilatátorral kombinált diklonin/alprostadil helyi érzéstelenítő hatású krémeket használnak. Szisztémásan a tramadolt, egy a noradrenalin és a szerotonin visszavételét is gátló centrális hatású opioid fájdalomcsillapítót, a klomipramin triciklusos antidepresszánst (TCA), az erektilis diszfunkció kezelésére törzskönyvezett PDE-5 gátlókat és az SSRI szereket használnak (1. ábra) [6].

1981-ben Ahlenius elsőként írta le a depresszió SSRI-vel történő kezelése során a kezdeti fázisban gyakori mellékhatásként jelentkező késleltetett magömlést [10]. Azonban a depresszió SSRI-vel történő kezelésénél a megfelelő vérszint eléréséhez folyamatos, naponkénti adagolásuk szükséges, mely a korai magömlés kezelésekor számos nemkívánt mellékhatást eredményez, mint a szájszárazság, aluszékonyság, hányinger, libidócsökkentés és merevedési zavar [11]. Leggyakrabban a 1. ábrán feltüntetett SSRI szereket használnak [12, 13].

A mellékhatások csökkentése érdekében olyan SSRI szerkezetek kifejlesztése volt a cél, amelyek farmakokinetikai paramétereinek köszönhetően (gyorsan felszívódik és eléri a terápiás plazmakoncentrációt, majd gyorsan eliminálódik a szervezetből) csökkentik a lehetséges mellékhatások kialakulásának valószínűségét.



SSRI hatóanyagok

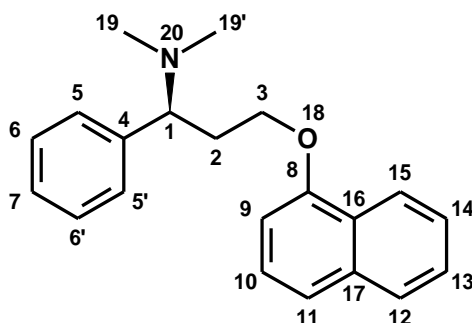


1. ábra. A korai magömlés kezelésére leggyakrabban használt hatóanyagok [6]

1.2 A dapoxetin jellemzése

1.2.1 A dapoxetin farmakológiája

A korai magömlés magas előfordulási gyakorisága és az életminőségre kifejtett kedvezőtlen hatása ellenére csak 2009-ben jelent meg az első hatóanyag, mely a betegség célzott kezelésére használható. A dapoxetin (Dpx), (dimetil[3-(naft-1-iloxi)-1-fenilpropil]amin hidroklorid, Priligy®) egy új, gyors hatású, hatékony szerotonin visszavétel gátló (SSRI), mely egyedi fizikai-kémiai és farmakokinetikai sajátosságokkal rendelkezik, így alkalmas a korai magömlés terápiájára (2. ábra) [14]. Királis molekula, a törzskönyvezett *S* enantiomer 3,5-ször hatásosabb, mint az *R* izomer [15].



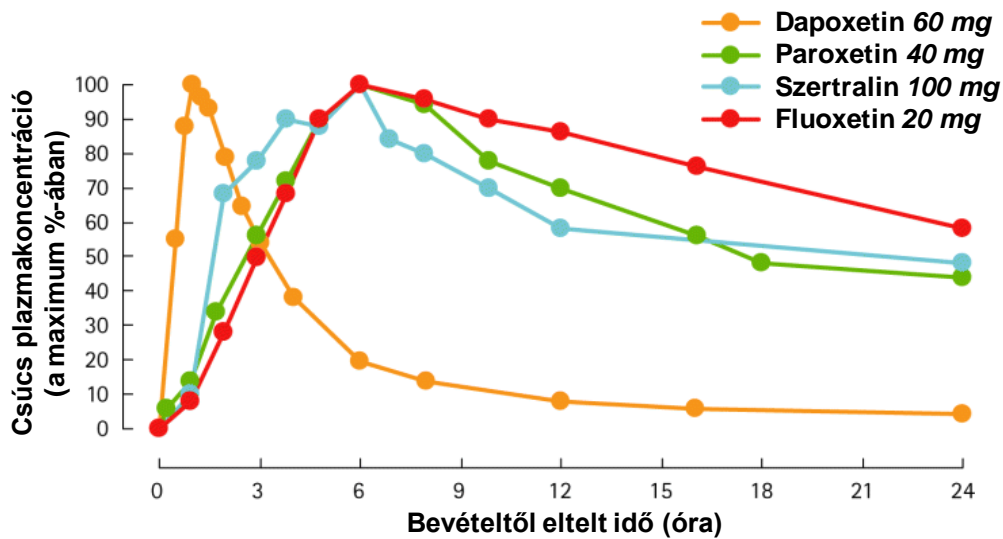
2. ábra. Az (*S*)-Dpx bázis szerkezete és a dolgozatban alkalmazott számozása.

Az ejakulációt elsődlegesen a szimpatikus idegrendszer szabályozza. Az ejakuláció jelútvonala a gerincvelő reflexközpontjából ered, az agytörzs közvetítésével, amire számos agyi mag (*nucleus preopticus medialis* és *nucleus paraventricularis*) hatással van [16].

Korai magömlés esetén a Dpx hatásmechanizmusa feltételezhetően a neuronok szerotonin-visszavételének gátlásához és a neurotranszmitterek pre- és posztzinaptikus receptorokon kifejtett hatásának következményes potencírozásához köthető [17]. Patkányokban a Dpx supraspinalis szinten gátolja az ejakulációs reflexet a lateralis paragigantocellularis magban (LPGi). A postganglionáris szimpatikus rostok, amelyek a *vesicula seminalis*-t, a *vas deferens*-t, a prosztatát, a bulbourethralis izmokat és a hólyagnyakat idegzik be, koordináltan váltják ki az összehúzódásokat, ami az ejakulációt eredményezi. A Dpx módosítja ezt az ejakulációs reflexet [18].

Teljes biológiai hasznosíthatósága 42% (15-76%). Az átlagos SSRI-vel szemben – melyek a csúcs plazmakoncentrációt kb. 4-12 óra alatt érik el, és biológiai felezési idejük hosszú (12-48 óra) – a Dpx egy gyorsan ható vegyület, mely a csúcs

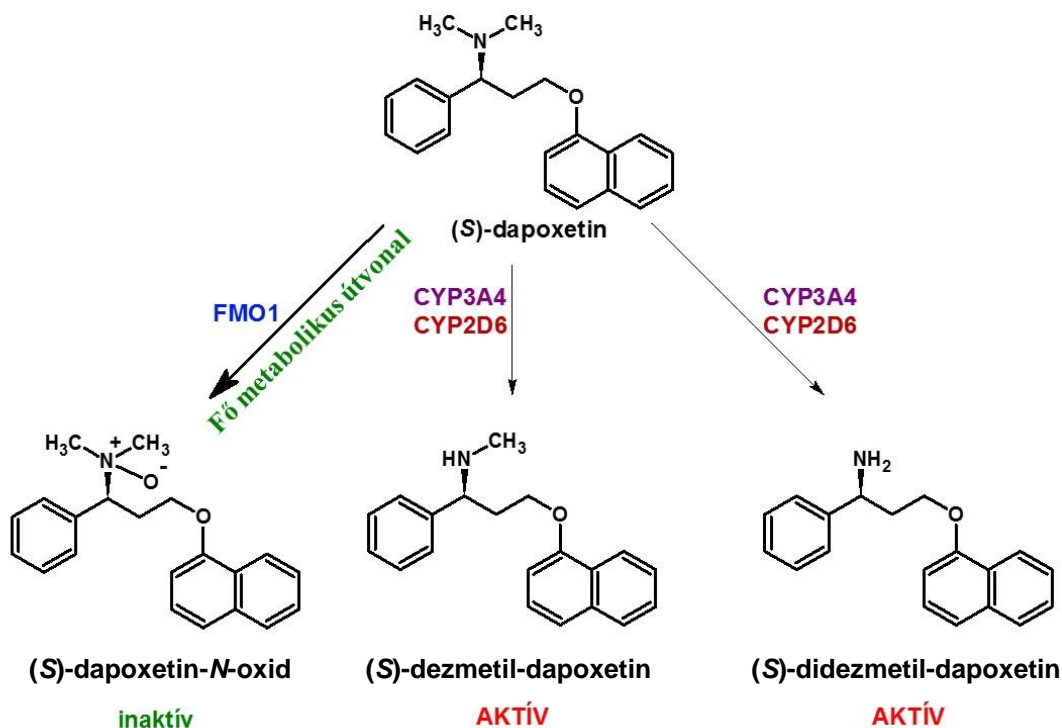
plazmakoncentrációját 1-2 órán belül éri el és 24 óra elteltével koncentrációja ennek kb. 5 %-ára csökken le (3. ábra) [19].



3. ábra. A dapoxetin plazmakoncentrációjának alakulása összehasonlítva más SSRI hatóanyagú készítményekkel [19]

Ezek az egyedi farmakokinetikai tulajdonságok teszik lehetővé, hogy a hatóanyag szükséglethez igazíthatóan legyen adagolható [14]. A Dpx több mint 99%-ban kötődik a plazmaproteinekhez, gyors megoszlás jellemezi, disztribúciós térfogata 162 liter [20].

A májban és a vesében intenzíven metabolizálódik, főleg a CYP2D6, CYP3A4 valamint a flavin-monooxigenáz (FMO1) enzimeken keresztül. A metabolizmus során *N*-oxidáció, *N*-demetiláció, naftil-hidroxiláció, glükuronidáció és szulfatálás megy végbe. A keringő plazmában a Dpx és a dapoxetin-*N*-oxid (Dpx-*N*-oxid) van jelen nagy koncentrációban. A Dpx-*N*-oxid ($IC_{50} = 282$ nM) *in vitro* kísérletekben inaktívnak bizonyult. További metabolitjai, beleértve a dezmetil- (dezmetil-Dpx) és a didezmetil-dapoxetint (didezmetil-Dpx), az összes, keringésben jelenlévő anyagnak kevesebb, mint 3%-át adják (4. ábra) [20].



4. ábra. Az (S)-dapoxetin fázis-I. metabolizmusa.

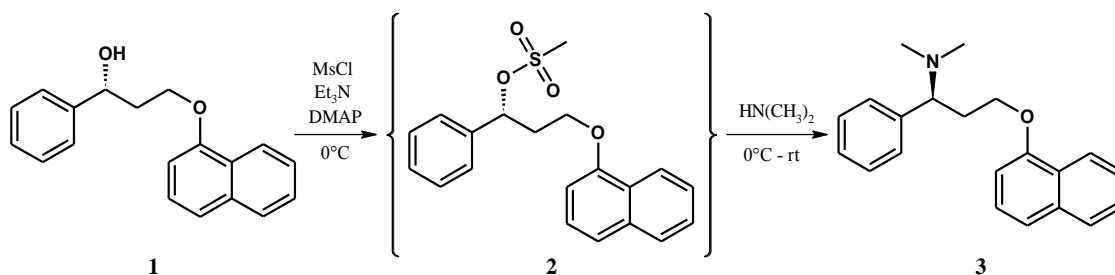
A dezmetil-Dpx ($IC_{50} < 1,0$ nM) *in vitro* vizsgálatban ugyanolyan hatásosnak bizonyult, mint a Dpx (IC_{50} -e 1,12 nM), a didezmethyl-Dpx ($IC_{50} = 2,0$ nM) hatékonysága hozzávetőlegesen 50%-a volt az anyavegyületnek. A Dpx metabolitjai elsődlegesen a vizelettel ürülnek ki, konjugált formában. Változatlan Dpx-t nem mutattak ki a vizeletben. Akkumulációja minimális, felezési ideje 19 óra. Alkalmazásakor leggyakrabban hasmenést, szédülést, hányingert, fejfájást figyeltek meg. Ellenjavallt közép- vagy súlyos vese és/vagy májkárosodásban, CYP3A4 gátlók (ketokonazol, ritonavir, telitromicin), tioridazin, MAO gátlók, szerotonin és noradrenalin visszavétel gátlók (SSRI, SNRI,) valamint orbáncfű használata esetén [20].

1.2.2 A dapoxetin irodalmi szintézise

A Dpx irodalmi szintéziseiben racém és enantiomertiszta módszerek egyaránt megtalálhatók [21]. Mivel a hatásosabb *S* izomer (eutomer) került törzskönyvezésre, a nem sztereoszelektív szintézis utak esetén rezolválással különítik el a kevésbé hatékony *R* izomert (disztomer) az *S*-től. Az utóbbi években viszont a költséghatékonyabb sztereoszelektív szintézismódszerek fejlesztése vált meghatározóvá [22-30]. Ezen módszerek általános jellemzői a természetes eredetű kiindulási anyagok használata (pl.

fahéjalkohol, tartarát), vagy a benzilhelyzetű szénatomon lévő királis amin vagy alkoholos funkcióscsoportnak a sztereoselektív kialakítása már a szintézis kezdeti szakaszában [31-34].

Leggyakrabban a királis benzilhelyzetű alkoholos funkcióscsoport kialakítására kerül sor **(1)**, melyet (a jó távozó csoportot képző) mezil-kloriddal egy reakciólépésben *in situ* észterestítenek, és tovább is alakítják dimetil-aminnal, a mezilát **(2)** izolálása nélkül a végtermék (*S*)-Dpx-né **(3)** (5. ábra).

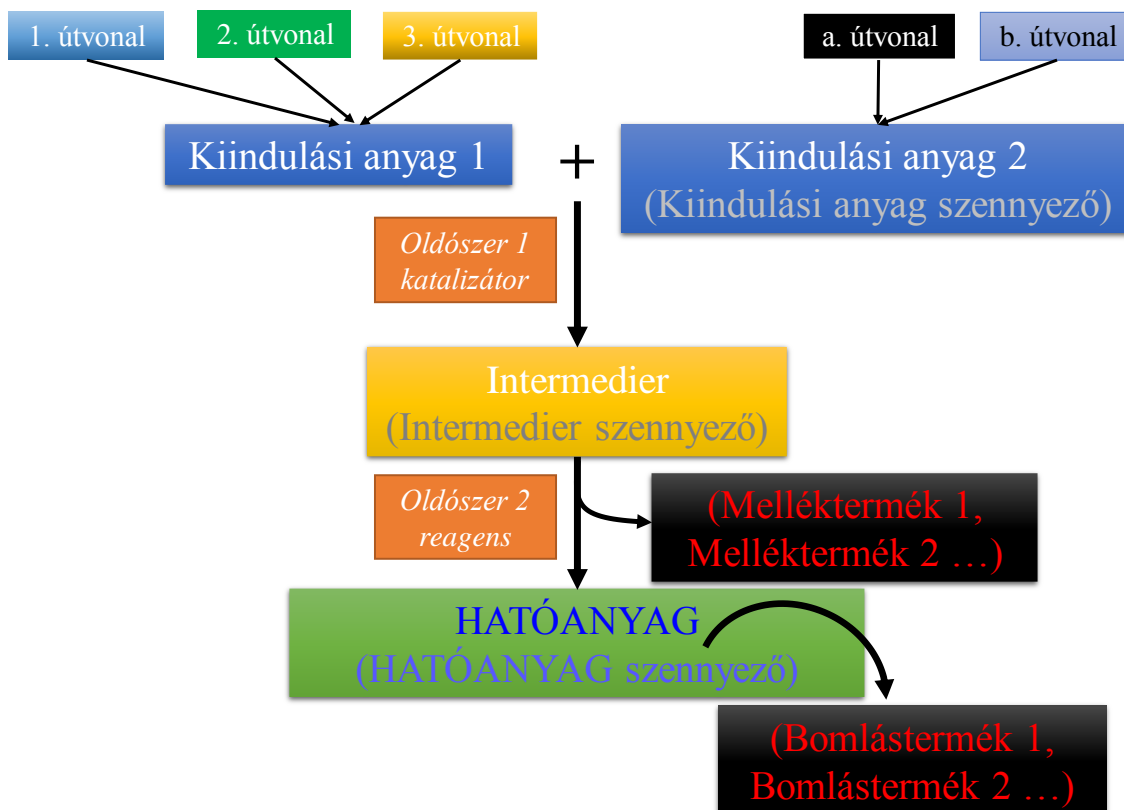


5. ábra. A dapoxetin szintézisében gyakran alkalmazott utolsó reakciólépés

A mezilátot ezidáig egy közleményben jellemezték ^1H és ^{13}C NMR adatok alapján, bár az izolálás módja hiányzik [35]. Egy másik kutatócsoport egy új, enantiomerszelektív Dpx szintézis kidolgozása során szintén sikertelenül próbálkozott a mezilát izolálásával. Instabilitási problémák miatt a vegyület elbomlott, és a bomlástermék szerkezetét nem tudták meghatározni [23].

1.3 Hatóanyag szennyezők, bomlástermékek

A különféle szennyezők ellenőrzése a gyógyszeripari termékekben elsődleges cél a gyógyszerfejlesztés során. Mivel a hatóanyagban jelenlévő szennyezők jelentősen befolyásolják a gyógyszerek minőségét és biztonságos alkalmazhatóságát, szigorú nemzetközi szabályozást alkottak a Nemzetközi Egységesítési Konferencia (International Harmonization Conference, ICH) által kidolgozott Q3A(R), Q3B(R) és Q3C irányelvek formájában [36-38]. A szennyezők forrásait és típusait a hatóanyagelőállítás folyamatában elhelyezve vázlatosan a 6. ábra szemlélteti [39].



6. ábra. A hatóanyag szintézis folyamatának általános vázlatja [39]

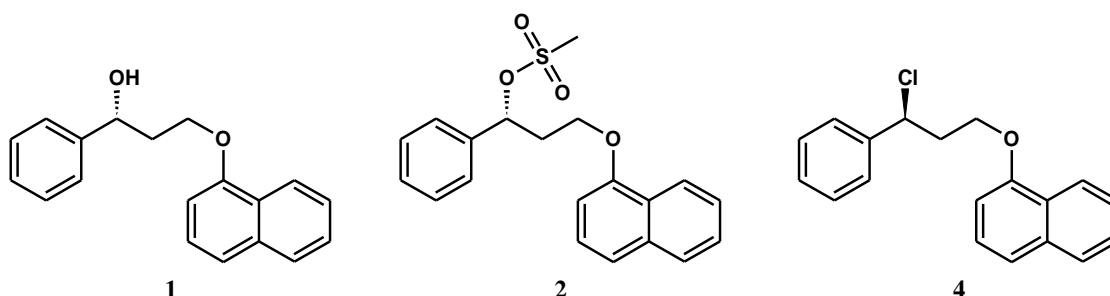
Bár a hatóanyag bomlástermékeinek analitikája elsődleges fontosságú, de az előállítás során keletkező egyéb szennyezőket és bomlástermékeket szintén ellenőrizni kell. Szennyezők lehetnek a kiindulási anyagok, izomerek, intermedierek, reagensek, oldószer, katalizátorok és a mellékreakciók termékei. Ezen potenciális szennyezők vizsgálatával meghatározhatjuk a gyártási eljárás kritikus pontjait, mely által megvalósíthatóvá válhat azok eltávolítása vagy a megengedett határérték alatt tartása. A szakirodalomban számos tanulmány jelent meg, melyek ezen szennyezők vizsgálatával és a különböző analitikai eljárások módszertani fejlesztéseivel foglalkoznak [40, 41]. Ezek középpontjában főként a hatóanyaghoz hasonló kémiai szerkezetű szennyezők (rokon szennyezők), oldószer maradványai [42, 43] és a katalizátorok állnak [44]. Továbbá a hatóanyag különböző fizikai tulajdonságokkal rendelkező (gyakran a gyógyszer technológiai formuláció során keletkező) polimorf formáit is tekinthetjük szennyezőknek, melyek ellenőrzését egyaránt biztosítani szükséges [45, 46]. A szennyezők egy másik, kiemelten fontos csoportjába tartoznak a genotoxikus hatású, különösen mérgező vegyületek. Ezen szennyezők olyan analitikai módszerek meglétét és fejlesztését követelik meg, melyek még alacsonyabb kimutatási határral rendelkezve

alkalmasak a köztitermékekből és a hatóanyagból, mint végtermékből való kimutatásukra és tartalmi meghatározásukra. A szakirodalomban meglehetősen kevésbé hangsúlyos a hatóanyag előállításához szükséges kiindulási anyagok szennyezésvizsgálata, bár ahogy azt a 6. ábra is mutatja, a kiindulási anyagok szennyezői is hozzájárulhatnak a hatóanyag szennyezőinek képződéséhez, ezért ezeket ugyancsak ismernünk kell [41].

A hatóanyagok stabilitásvizsgálatai és a gyártási szennyezőinek azonosítása illetve tartalmi meghatározása között szoros kapcsolat van [47]. A bomlástermékek a hatóanyagok különböző hatásokra (hőhatás, oldószerek beleértve azok kémhatását), oxidálószerre, más kémiai reagensek, nedvesség, fény stb.) bekövetkező átalakulási termékeinek tekinthetők. A definíció alapján jelentős átfedés van a gyártási szennyezők és a bomlástermékek között. Ez okból az ICH irányelvek a hatóanyagban lévő gyártási szennyezőket a bomlástermékek kategóriájába sorolják [47].

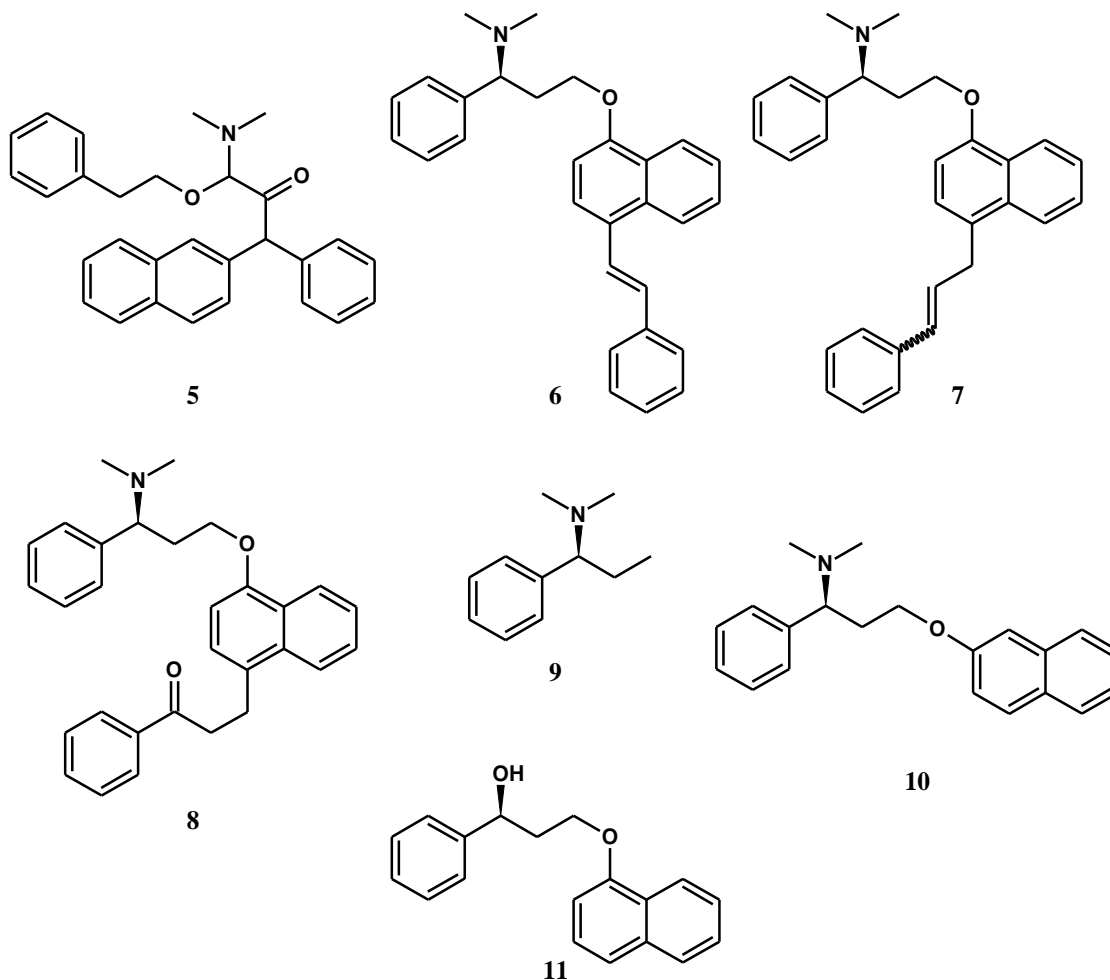
1.3.1 A dapoxetin gyártási szennyezői

A Dpx gyártási szennyezőiről kevés irodalmi adatot találunk. Az egyetlen közlemény, szintén a leggyakrabban alkalmazott mezilátképzésen keresztüli *in situ* nukleofil szubsztitúció során keletkező gyártási szennyezőket írja le (7. ábra) [35].



7. ábra. A Dpx irodalomban közölt lehetséges gyártási szennyezői

Ide sorolják a kiindulási alkoholt (1), a belőle képződő mezilátot (2), valamint feltételezik egy klórozott származék (4) képződését is, amely a mezilátképzési reakciónál gyakran bekövetkező, jól ismert *mono*-klórozási mellékreakció [48-50].

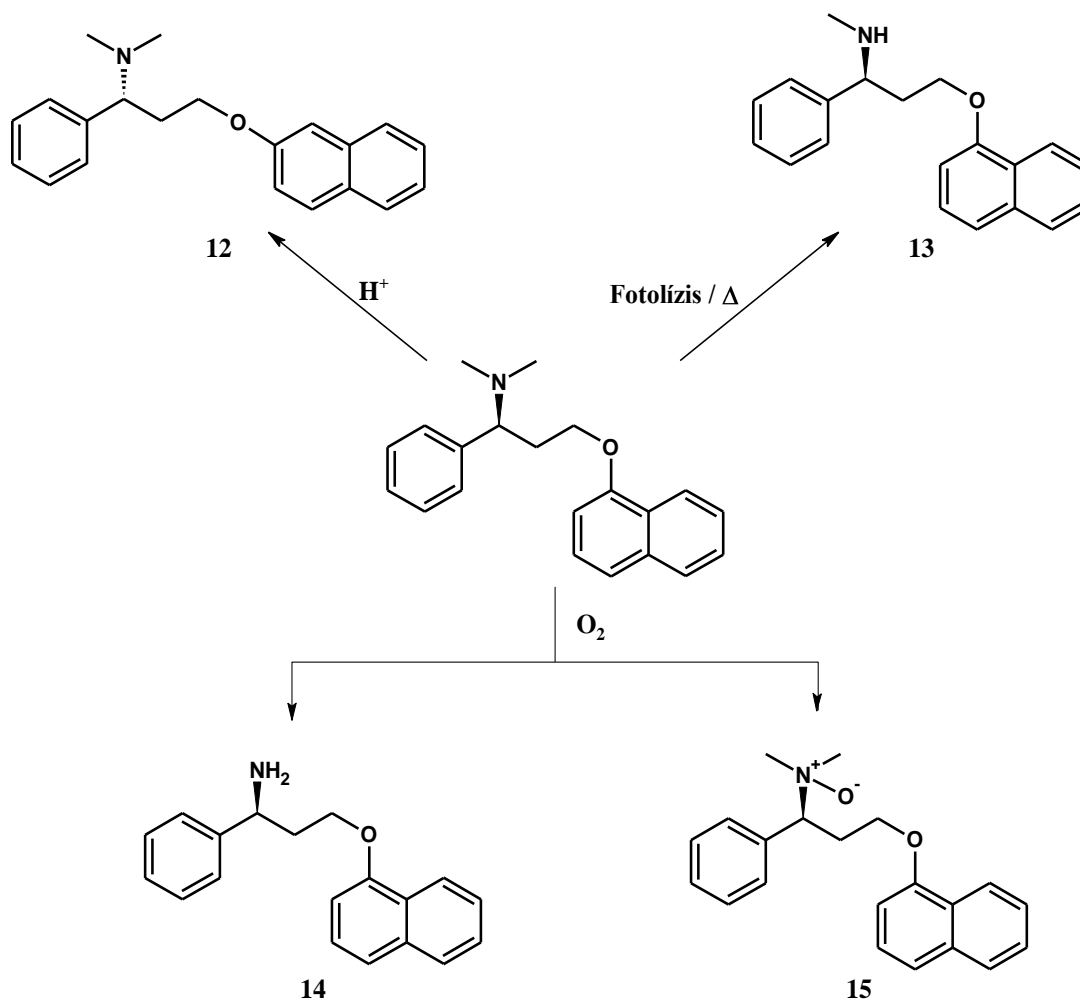


8. ábra. A kereskedelmi forgalomban lévő Dpx gyártási szennyezők kémiai szerkezete

Több analitikai standard gyártónál is elérhető a Dpx és különböző metabolitjai valamint gyártási szennyezői, bomlástermékei, közülük néhány izotópjelzett formában is. A legszélesebb választékkal a kanadai székhelyű TCI Pharma rendelkezik, ahol olyan rokon szerkezetű szennyezők is megtalálhatók, melyek képződését a szakirodalom ez idáig nem írta le. A 8. ábrán található szennyezők kémiai szerkezetét nagyrészt az aromás naftilgyűrűt érintő változások jellemzik: aromás elektrofil szubsztitúció (*orto*-pozícióban (**5**), *para*-pozícióban (**6**, **7**, **8**), az éter kötés vándorlása α -helyzetről β -helyzetbe (**10**). Ezen kémiai átalakulások mellett megjelenik egy, az éteres kötés hasadásából származó termék (**9**), és megkülönböztethető a kiindulási *R*-alkohol ellentétes konfigurációjú királis szennyezője (**11**) és geometriai *E/Z* izomerek egyaránt (**6**, **7**).

1.3.2 A dapoxetin bomlástermékei

Az ICH irányelvek szerint a hatóanyagok szennyező profiljának leírása magában foglalja a stabilitási vizsgálatok kidolgozását valamint a szennyezők azonosítását és karakterizálását. A Dpx és kombinációs készítményei esetén az irodalomban egyaránt megtalálhatók UV-Vis spektrofotometriás [51], HPLC [52, 53], királis HPLC [54], királis CE [7] és HPTLC [55-57] módszerek. Néhány stabilitásvizsgálati módszert is közöltek a hatóanyag és a gyógyszerkészítmények esetén a Dpx tartalmi meghatározására [58, 59]. Ezek közül egyetlen közlemény foglalkozik a képződő bomlástermékek HPLC-MS/MS azonosításával tömegük és fragmentációjuk alapján [60]. A Dpx-t hidrolitikus, oxidatív, fotolitikus és termikus stressz körülményeknek vetették alá mely során hat bomlástermék keletkezését írták le. Ezek közül négyet jellemeztek HPLC-MS és tandem MS technikával. Az általuk azonosított bomlástermékek a 9. ábrán láthatók, ezek egy része megegyezik a metabolitokkal.



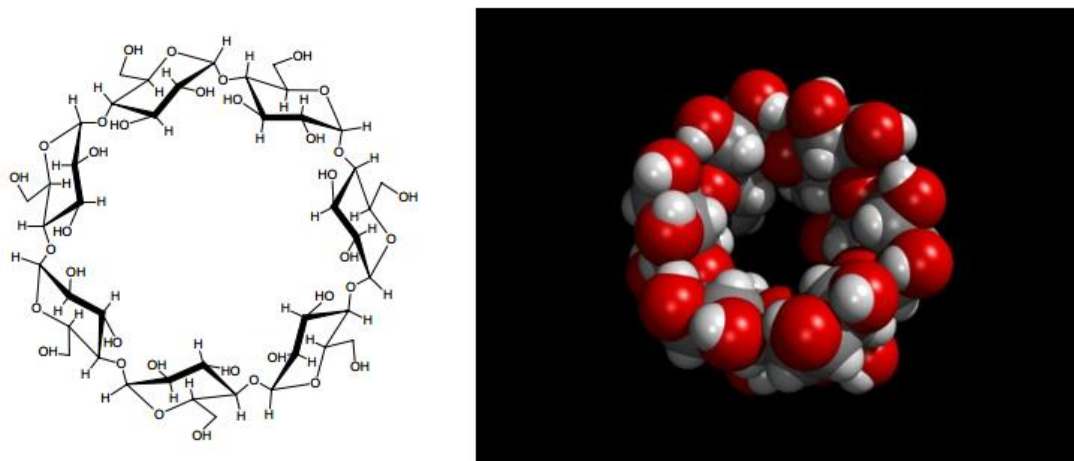
9. ábra. A Dpx stressz-körülmények során képződő bomlástermékei [60]

A didezmetil-Dpx (**14**) és a Dpx-*N*-oxid (**15**) oxidatív körülmények között képződött. Emellett két másik, szintén oxidációs termék szerkezetét nem sikerült pontosan meghatározniuk. Bázikus pH-n végzett hidrolízis esetén a Dpx stabilnak bizonyult, míg semleges pH értéken dezmetil-Dpx-né (**13**), savas pH-n pedig *R* izomerré (**12**) alakult az étercsoport β -helyzetbe kerülésével együtt. Hő hatására szilárd formában stabil maradt, oldatban viszont dezmetil-Dpx-né bomlott. A fotolízis során szintén dezmetil-Dpx képződött.

1.4 Ciklodextrinek

1.4.1 A ciklodextrinek szerkezete, tulajdonságaik

A ciklodextrinek (CD) ciklikus, nem redukáló oligoszacharidok, amelyek α -(1,4)-glikozidos kötések keresztül α -D-glükózból épülnek fel (10. ábra). A cukoregységek száma alapján (6, 7 és 8 egység) α -, β - és γ -CD-ket különböztetünk meg.

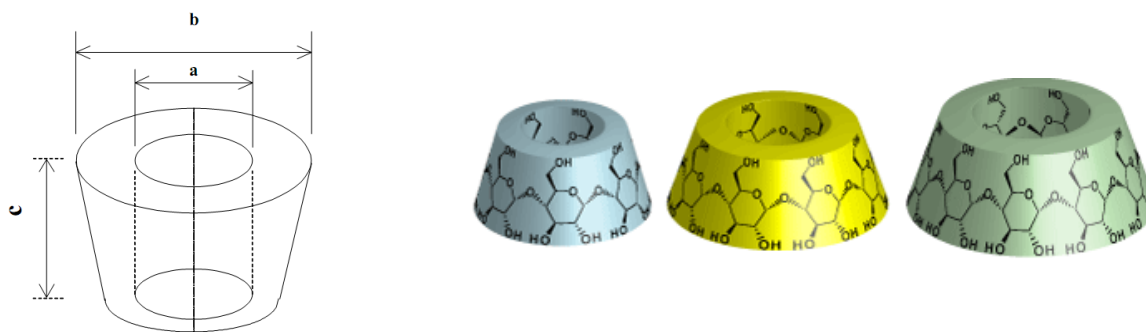


10. ábra. A natív β -CD kémiai szerkezeti képlete és 3D kalottmodelje felülnézetből (Forrás: <http://my.fit.edu/~nesnas/cycl.jpg>)

A CD-ket alkotó glükopiranoz egységek egy csonkakúp felületén helyezkednek el, henger alakú üreget határolva, melynek nagyságát a gyűrűtagszám határozza meg. A molekula belső ürege a hidrogénatomok és a glikozidos oxigénhidak miatt enyhén apoláris tulajdonságú. A csonkakúp keskenyebb nyílását primer, a szélesebbet szekunder hidroxilcsoportok határolják, amelyek a molekula külső felszínének poláris jellegét biztosítják. A poláris felületi sajátságoknak köszönhetően a CD-k jól oldódnak vízben

(kivéve az intramolekuláris hidrogénhidakat képző β -CD-ket). A CD-k vázlatos szerkezetét a 10. ábra mutatja be, fontosabb tulajdonságaikat pedig a 1. táblázat foglalja össze [61, 62].

1. táblázat. A natív CD-k főbb jellemzői [63]



Jellemző	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)	0,174	0,262	0,427
Felvehető vízmolekulák száma	6–7,5	11–12	13–17
Kristályvíz tartalom (%)	10–12,7	13,2–14,5	8,1–17,7
Oldhatóság vízben 25°C-on (g/100 cm ³)	14,5	1,85	23,2

1.4.2 A ciklodextrinek zárványkomplex képzése

A CD-k apoláris ürege megfelelő környezetet biztosíthat apoláris jellegű molekularészeket tartalmazó vendégmolekulák számára vizes közegben [64, 65]. Különleges sajátosságuk, hogy apoláris üregük a hossz tengelyük mentén mindkét végén nyitott, melybe számos eltérő kémiai szerkezetű, az adott üregnek megfelelő alakú és méretű molekulákat képesek befogadni. Az α -CD általában a kis molekulatömegű, főként alifás oldalláncot tartalmazó vendégmolekulák befogadására alkalmas, a β -CD-nek ezzel szemben az aromás és heterociklusos vegyületek iránt legnagyobb az affinitása, míg a γ -CD méreténél fogva makrociklusokkal, szteroidokkal is stabil komplexet képez [66]. A

zárványkomplex képződésekor a CD üregének megfelelő vendégmolekula és a CD, mint gazdamolekula között nem-kovalens kölcsönhatások jönnek létre (hidrogénhíd, dipól-dipól, egyes esetekben elektrosztatikus kölcsönhatás). A CD-k üregében tartózkodó energetikailag kedvezőtlenebb állapotú vízmolekuláknak apoláris vendégmolekulával történő helyettesítése a komplexképzés kulcslépése és hajtóereje [66]. A CD-k általában 1:1 sztöchiometriájú komplexeket képeznek, de előfordulhatnak 1:2 vagy 2:1 arányú, valamint egészen változatos összetételű komplexek is [67-69].

A CD komplexek létrejöttének számos előnyös következménye lehet. A komplexképződés hatására megnőhet az egyébként vízben rosszul oldódó vegyületek oldhatósága. Megváltozhatnak a gazda- és vendégmolekula egyes spektrális tulajdonságai, mely jelenség számos analitikai módszer alapját képezi. Ilyen változás az elnyelési maximum helyének eltolódása az UV aktív molekulák esetén, az NMR aktív magok kémiai eltolódásának megváltozása NMR spektrumban, vagy az erős indukált Cotton effektus kialakulása a cirkuláris dikroizmus spektrumon [70, 71]. A CD komplex hidrofilitása nagyobb lesz, mint a szabad vendégmolekulának, emiatt változik a kromatográfiás viselkedés, a töltéssűrűség megváltozása pedig az elektroforetikus mobilitást befolyásolja. A legtöbb esetben a komplexképződés stabilizálja a vendégmolekulát (védi a bomlástól, külső behatásoktól), mely megváltozott reakcióképeséget eredményezhet. Előfordul azonban, hogy a CD, mint katalizátor felgyorsít egyes kémiai reakciókat [72]. Illékony és oxidábilis anyagok esetén csökkenhet a vendégmolekula diffúziója, párolgása, szublimációja [73].

A CD-k számos kiralitáscentrumot tartalmaznak, ezért belső üregük királis mikrokozmoszként funkcionálhat. Az enantiomerek eltérő CD kötődése miatt különböző stabilitású diasztereomer komplexpár keletkezhet, melyek fizikai és kémiai tulajdonságai eltérnek egymástól, és így az elválasztásukra is lehetőség nyílik [74].

A CD-k glükózegységenként egy primer és két szekunder alkoholos hidroxilcsoportot tartalmaznak, amelyek kitűnő lehetőséget nyújtanak a legkülönbözőbb származékok (pl. metil-, acetyl-, hidroxipropil-, fenil- stb.) előállítására [75, 76]. Napjainkban számos hidrofil, hidrofób és ionizálható csoporttal rendelkező származékot használnak a különböző fizikai-kémiai tulajdonságok és zárványkomplex képző igények kielégítésére. A CD-származékok esetében a szubsztitúciós fok (*degree of substitution*, DS) azt fejezi ki, hogy egész CD molekulánként átlagosan hány hidroxilcsoporton történt szubsztitúció.

Csoportosításuk a szubsztituensek száma (mono- vagy többfunkciós), elhelyezkedése (random vagy izomertiszta) és azok ionizálhatósága (semleges vagy ionizálható) alapján történik. Ionizálható szubsztituens bevitelével állandó vagy pH-függő töltéssel láthatjuk el a CD-t. 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 a két natív ciklodextrinnel (β - és γ -CD) és egy új izomertiszta karboximetil- γ -CD származékkal végeztünk vizsgálatokat. Ezen szintetikus izomertiszta CD-származékok előállításának és felhasználásának szerepe egyre hangsúlyosabb, hiszen kiküszöbölik a hagyományos szintéziseknél sarzsonként, gyártókként változó DS értékből fakadó különbségeket.

1.4.3 A ciklodextrinek felhasználása

A CD-k felhasználása – tekintettel a változatos szerkezetekre és a különféle alkalmazási területekre – napjainkban egyre sokrétűbb [61, 77]. Az ipar legnagyobb mennyiségben a random metil- β -CD-t és a hidroxipropil- β -CD-t használja fel főként a festékiparban vízbázisú festékek valamint különféle tisztító és kozmetikai szerek előállítására [78]. Bizonyos komponenseket ipari szennyvizekből CD gyantákkal távolítanak el, az élelmiszeriparban pedig különféle aromák vízdoldhatóbb és stabilabb β -CD komplexeit alkalmazzák [79].

A gyógyszeriparban főként a kedvezőtlen farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkező hatóanyagok molekuláris kapszulázására alkalmazzák a CD-eket. A CD komplexben lévő hatóanyag számos előnyös tulajdonságra tehet szert: javulhat oldhatósága, biológiai hasznosulása, kémiai stabilitása; gátolhatják peptidek aggregációját, helyi irritációk, egyéb mellékhatások kialakulását, valamint a gyógyszerek íz- és szagfedésére is alkalmasak lehetnek [61, 80]. Néhány CD (a natív α -, β -, és γ -CD valamint a hidroxipropil- β -CD) már hivatalos az európai, amerikai és japán gyógyszerkönyvben, az élelmiszeriparban pedig segédanyagként kerülnek felhasználásra. Újabban pedig hatóanyagként is megjelentek a gyógyításban, a Sugammadex (Bridion[®]) néven az anesztéziában [81] és a Niemann-Pick C betegség kezelésében [82].

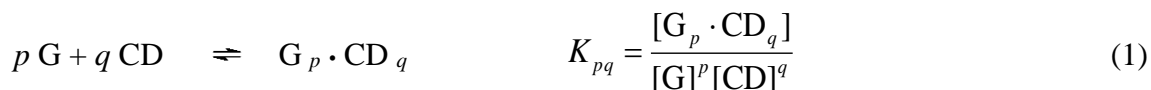
Az analitikai kémia területén a CD-eket királis felismerőképességüknek köszönhetően elsősorban az enantioszelektív kromatográfiában és a királis elektroforetikus technikákban használják.

1.4.4 A ciklodextrin-komplexek analitikája

A CD-k zárványkomplex-képzése kismolekulákkal olyan folyamat, amely fizikai-kémiai paraméterekkel történő jellemzése elméleti és gyakorlati (analitikai és gyógyszerformulálási) szempontból egyaránt fontos.

1.4.4.1 A komplexképződés egyensúlyi leírása

A G vendégmolekula és a CD egyensúlyi reakciójában létrejövő szupramolekuláris komplex kialakulását az alábbi egyensúlyi reakció és egyenlet írja le általánosan,



ahol p és q az összetevők sztöchiometriai együtthatói [62]. A K stabilitási (képződési, kötődési, asszociációs) állandó a komplexkémiai gyakorlatban a termodinamikai aktivitások helyett az egyensúlyi koncentrációkkal definiált látszólagos állandó, amely adott körülmények (oldószer(elegy), pH, ionerősség, hőmérséklet) között érvényes.

Az egyes komponensek analitikai (totál) koncentrációja és az oldatban jelenlevő részecskefajták egyensúlyi koncentrációi között az anyagmérleg-egyenletek teremtenek kapcsolatot, az alábbi módon:

$$c_G = [G] + [G \cdot CD] + [G \cdot CD_2] + 2[G_2 \cdot CD] + \dots \\ = [G] \{1 + [CD](K_{11} + K_{12}[CD] + 2K_{21}[G]) + \dots\} \quad (2)$$

$$c_{CD} = [CD] + [G \cdot CD] + 2[G \cdot CD_2] + [G_2 \cdot CD] + \dots \\ = [CD] \{1 + [G](K_{11} + 2K_{12}[CD] + K_{21}[G]) + \dots\} \quad (3)$$

A komplexstabilitás kvantitatív vizsgálatára azok a módszerek alkalmasak, melyekben a komplexképződés foka egyértelmű kapcsolatba hozható egy mérhető fizikai-kémiai paraméter változásával (spektrometriás titrálásoknál) vagy koncentrációváltozással (potenciometriás titrálás vagy fázis-oldhatósági vizsgálat során) [83]. A stabilitási állandók meghatározása csak egyensúlyi modell ismeretében, vagy annak feltételezésével lehetséges, ezért a sztöchiometria vizsgálatával kezdjük a kísérleti módszerek áttekintését.

1.4.4.2 A komplexek sztöchiometriájának meghatározása

A CD és egy vendégmolekula komplexképzési reakciójában oldatfázisban leggyakrabban 1:1 molarányú zárványkomplex alakul ki, de ismertek $G \cdot CD_2$ [62, 84] és $G_2 \cdot CD$ [61] összetételű komplexek is. A koncentrációviszonyoktól függően előfordulhat, hogy akár többféle komplex egyidejű jelenlétével is számolni kell az egyensúlyi elegyben. A komplexek közvetlen és gyors azonosítása tömeg/töltés arányuk mérésén keresztül a kíméletes ionizációt megvalósító elektropray ionizációs tömegspektrometriával (ESI-MS) lehetséges [85]. Adott ESI-MS mérési körülmények között a különböző összetételű CD-komplexek disszociáció nélkül kerülhetnek az oldatfázisból a nagyvákuumba, ahol tömeg/töltés arányuk alapján lehetőség nyílhat közvetlen detektálásukra [86]. Figyelembe véve az ESI-MS detektálási körülményeit, fontos független módszerrel is megbizonyosodni arról, hogy a gázfázisban detektált komplex valóban jelen volt-e az oldatban és nem a deszolvatáció során keletkezett a tömegspektrométerben. A potenciometriás vagy spektroszkópiás titrálás és a fázis-oldhatósági vizsgálat indirekt bizonyítékot szolgáltat a feltételezett sztöchiometria helyességére. A továbbiakban a munkánk során is használt mágneses magrezonancia spektroszkópiás módszereket mutatom be.

Egy NMR-aktív mag (pl. 1H vagy ^{13}C) mért kémiai eltolódását (δ) a következő egyenlet írja le:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_0} \cdot 10^6 \quad (4)$$

ahol ν a kiválasztott magnak, ν_{ref} egy (nullának választott) referenciaanyag ugyanolyan atommagjának a rezonanciafrekvenciája [Hz], ν_0 a spektrométer mérési alappfrekvenciája [MHz]. A komplexképződés hatásainak vizsgálatához jelölje δ_G^i a vendégmolekula i . magjának kémiai eltolódását CD távollétében. Ha a vendégmolekula CD hozzáadására zárványkomplexet képez, megváltozik az i . mag kémiai környezete és így a lokális elektronsűrűsége, spektrumjele tehát (valamilyen mértékben) eltolódik. A megváltozott $\delta^{G,i}$ kémiai eltolódás két "határérték", a δ_G^i és az 1:1 komplexekre jellemző $\delta_{G,CD}^i$ móltörttekkel súlyozott összege:

$$\delta^{G,i} = x_G \delta_G^i + x_{G,CD} \delta_{G,CD}^i \quad (5)$$

A kémiai eltolódás megváltozását a $\Delta\delta^{G,i} = \delta^{G,i} - \delta_G^i$ komplexképződési eltolódásnak nevezhetjük [70, 87, 88] határértéke $\Delta\delta_\infty^{G,i} = \delta_{G\cdot CD}^i - \delta_G^i$ a teljes (100%) komplexképződésnek megfelelő jel-eltolódást számszerűsíti. A kémiai eltolódások (5) egyenlet szerinti átlagolódása akkor következik be, ha a komplexképződés, mint pszeudo-elsőrendű reakció pillanatszerű gyorsasággal végbemegy a "kémiai eltolódás időskálán"

$k \gg \Delta\delta_\infty^{G,i} \cdot \nu_0$ [89]. Azokban az esetekben amikor 1:1-től eltérő sztöchiometriájú részecskefajták is keletkeznek az egyensúlyi elegyben a (5) egyenlet további tagokkal bővül. Ezzel analóg definíciók ($\delta_{CD}^j, \delta_{G\cdot CD}^j, \Delta\delta^{CD,j}, \Delta\delta_\infty^{CD,j}$) vezethetők be a CD spinjei jel-eltolódásának leírására is.

Az NMR titrálásokat többféle kísérletterv szerint végezhetjük [89]. A sztöchiometria vizsgálatára még ma is leggyakrabban Job módszerét alkalmazzák [90, 91], melynek alapja a mérhető $\Delta\delta^{G,i}$ változó és a komplex koncentrációja (móltörtje) közti egyenes arányosság ami az (5) egyenletből levezethető. Ennek meghatározásához olyan oldatsorozatot készítünk, amelyben a vendég- és gazdamolekulák analitikai koncentrációjának összege ($c_{CD} + c_G$) minden esetben állandó, de a móltörtjük változik kis lépésekben 0 és 1 között. Ha az $x_G \cdot \Delta\delta^{G,i}$ értékeket x_G függvényében ábrázoljuk szélsőértéket kapunk a $G_p \cdot CD_q$ komplexnek megfelelő $x_G = p/(p+q)$ abszcisszánál. Olyan esetekben, amikor több komplex együttes képződésével kell számolni, a módszer csak a legnagyobb koncentrációban jelen levő(k)re adja meg az átlagos összetételt és a szélsőérték helyzetének bizonytalansága is nagyobb lesz [92].

Az NMR spektroszkópiával végzett sztöchiometria-meghatározás egyik nagy előnye, hogy a Job analízist a vendégmolekula több megfigyelt (vagy akár mindegyik) szénkötésű protonjára is elvégezhetjük, így több független adatsorból vonhatunk le következtetéseket, és erősíthetjük meg a komplex(ek) sztöchiometriáját. A módszer további előnye, hogy a másik reakciópartner (pl. CD-k) oldaláról is vizsgálhatjuk a komplexképződést, ekkor az $x_{CD} \cdot \Delta\delta^{CD,i}$ szorzatokat ábrázoljuk x_{CD} függvényében és a szélsőérték abszcisszája a CD-re vonatkozó átlagos összetételt adja meg.

1.4.4.3 A komplexstabilitási állandók meghatározása NMR titrálással

A komplexstabilitás vizsgálatára használt módszerek közül legsokoldalúbban az NMR-spektroszkópia alkalmazható [89], hiszen a vendégmolekula spinjeinek kémiai

eltolódásán túl relaxációs tulajdonságaik vagy a diffúziós együttható CD jelenlétében bekövetkező változása is nyomon követhető modern NMR pulzusprogramok (DOSY) használatával. Az esetek döntő többségében mégis a kémiai eltolódásváltozásából történik a stabilitási állandók kiszámítása, mivel ez a legegyszerűbben és legpontosabban mérhető spektrumparaméter, bizonytalansága a nagyterű (> 400 MHz) szupravezető mágneseken mindössze $\pm 0,005$ ppm [89] vagy még ennél is kisebb hibaérték. A modernebb műszerek növekvő térerejének köszönhető érzékenységnövekedés - amely hűtött elektronikájú mérőfejjel (*cryoprobe*) még tovább fokozható - nemcsak az ^1H NMR titrálások gyorsabb és/vagy kisebb koncentrációnál való elvégzését teszi lehetővé, hanem akár ^{13}C magok kémiai eltolódásának követését is [83].

Az NMR titrálás során leggyakrabban a vendégmolekula koncentrációját tartjuk állandó értéken (esetleges aggregációjának elkerülése érdekében) és emellett fokozatosan növeljük a CD koncentrációját (mólarányát) egészen a CD oldhatósága vagy az NMR dinamikus tartománya szabta határig (a vendégmolekula jeleinek detektálhatósága a megnövekedett CD-jelek mellett). Értékeléskor minden titrálási pontban regisztráljuk a vendégmolekula szénkötésű protonjainak $\delta^{G,i}$ kémiai eltolódását, illetve számítjuk annak $\Delta\delta^{G,i}$ megváltozását. Az így kapott $\Delta\delta^{G,i}$ versus c_{CD} adatsorok (titrálási görbék) mindegyike az alábbi modellfüggvénnyel illeszthető, ha kizárólag 1:1 komplex képződik az oldatban:

$$\Delta\delta^{G,i} = \delta^{G,i} - \delta_G^i = \frac{\Delta\delta_\infty^{G,i} K[\text{CD}]}{1 + K[\text{CD}]} \quad (6)$$

Ha a CD nagy feleslegben van jelen, alkalmazhatjuk a $[\text{CD}] \cong c_{\text{CD}}$ közelítést, általános esetben a $[\text{CD}]$ a (2) és (3) anyagmérleg-egyenletek megoldásával számítható ki. Az 1:1 komplexképzés speciális esetére $[\text{CD}]$ analitikusan is kifejezhető az összkoncentrációkkal [70], de számításához szükség lesz a K stabilitási állandóra (vagy az iterációk kezdetén legalább a becslésére) is:

$$\Delta\delta^{G,i} = \delta^{G,i} - \delta_G^i = \frac{\Delta\delta_\infty^{G,i} \left\{ c_G + c_{\text{CD}} + K^{-1} - \sqrt{(c_G + c_{\text{CD}} + K^{-1})^2 - 4c_G c_{\text{CD}}} \right\}}{2c_G} \quad (7)$$

$\Delta\delta_\infty^{G,i}$ értéke elvileg leolvasható a telítési görbe "platójaként", de ennek eléréséhez szükséges nagy CD-koncentrációkig a gyakorlatban nem igazán tudunk eljutni. Ilyen esetekben a K állandó és a $\Delta\delta_\infty^{G,i}$ határeltolódás értékét legpontosabban nemlineáris

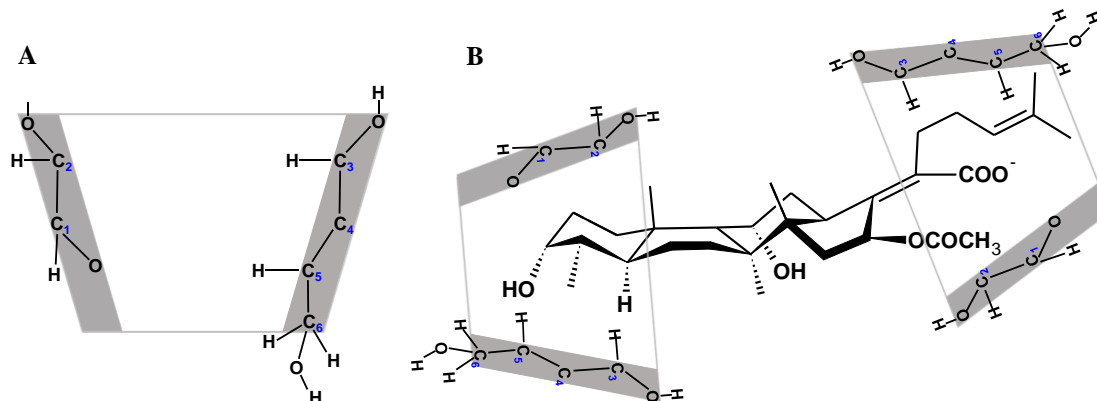
paraméterbecsléssel adhatjuk meg titrálási görbéből [89]. A különböző i magok titrálási görbéből kapott egyensúlyi állandók gyakran kismértékben eltérnek (abban az esetben ha ez jelentős, megkérdőjelezheti a feltételezett 1:1 sztöchiometria helyességét [93]), de a titrálási görbék szimultán regressziójával pontosabb és kisebb szórású állandót kaphatunk. Azokban az esetekben, amikor az oldatban egyidejűleg 1:1 és 1:2 komplexek vannak jelen, a komplexek stabilitási állandóinak együttes meghatározására csak több mag adatsorának szimultán illesztésével van lehetőség ("globális analízis" [83]), ami további matematikai-statisztikai problémákat is felvet [94-96]. A (6) egyenlet különböző linearizált formái csak megfelelő súlyozással adnak K -ra torzítatlan eredményt [89], viszont ha a transzformált pontok egy egyenesre esnek az az 1:1 sztöchiometria érvényességét mutathatja [86]. Általában 10 és 10^4 közé eső stabilitási állandót lehet NMR titrálással meghatározni, valamint a maximális pontosság elérésére célszerű olyan CD koncentrációtartományt választani, ahol a komplex móltörtje $0,2$ és $0,8$ közé esik [89]. Az irodalomban fentiekkel analóg módon a CD, illetve mindkét reakciópartner kémiai eltolódásainak változásából is találunk példát egyensúlyi állandó(k) számítására [83].

1.4.4.4 A CD-komplexek szerkezeti jellemzése NMR módszerekkel

A CD-komplexek atomi felbontású szerkezetét szilárd fázisban egykristály-röntgendiffrakcióval [97], oldatfázisban NMR spektroszkópiával lehet jellemezni [93, 97], de molekulamodellézést (kvantumkémiai módszereket) is egyre gyakrabban alkalmaznak erre a célra [95, 98].

^1H NMR esetén a szerkezeti információ legegyszerűbb forrását a reakciópartnerek különböző konstitúciós helyzetű protonjainak $\Delta\delta$ komplexképződési eltolódásai (vagy $\Delta\delta_\infty$ határeltolódásai) adják meg. A natív CD-kben H3 és H5 az apoláris üregben, a többi metinproton viszont a kónusz külső felén helyezkedik el (11.a. ábra). A H3 és H5 jelentős kémiai eltolódás csökkenése bizonyítja a vendégmolekula π -elektronokban gazdag részletének a CD üregbe kerülését, tehát az inklúziós komplex létrejöttét [93, 99]. Hasonlóan, a vendégmolekula egyes protonjai esetén ha a többinél nagyobb (abszolút értékű) $\Delta\delta$ mérhető, ez az érintett molekularészlet kiemelt szerepére utal a komplexképzésben [100]. Bár a szakirodalomban számos szerző ebből a molekularészlet CD üregébe illeszkedésére is következtet [68, 95], mégis óvatosan kell eljárni a

következtetések levonása során, mivel a kémiai eltolódás közvetett okokból is megváltozhat, ami például a vendégmolekula térszerkezet-változása miatt is bekövetkezhet.



11. ábra. a) A natív CD-k metinprotonjainak sematikus elhelyezkedése; b) Kálium-helvolát (szteroid) és β -CD 1:2 komplexére ROESY térközelségek alapján ajánlott szerkezeti modell [84]

A $\Delta\delta$ értékkel szemben sokkal bizonyosabb szerkezeti következtetések vonhatók le az ún. mag Overhauser hatás (NOE) mérésével [101], amelyből protonok térközelségére nyerhetünk információt, kalibrálás után akár kvantitatív módon is. A mérés során egy kiválasztott proton populációjának (spektrumjelének) változtatása a hozzá térben közeli protonok jelen is intenzitásváltozást okoz dipoláris keresztrelaxáció útján. Ez az effektus rövid hatótávolságú ($< 5 \text{ \AA}$), és a protonok távolságának hatodik hatványával fordítottan arányos. Az *intramolekuláris* NOE a CD spinjei között külön a CD (komplexbeli) geometriájáról, a vendégmolekula protonjai között pedig külön utóbbinak a (komplexbeli) térszerkezetéről ad tájékoztatást. Rendkívül értékesek az *intermolekuláris* NOE keresztcsúcsok, amelyek molekula térközelségeket, mint (fél)kvantitatív kényszerfeltételeket rögzítenek a CD és vendégmolekula egyes protonjai között, így lehetővé téve részletes geometriai modell megalkotását is. A CD H3 és H5 protonjainak dipoláris keresztcsúcsaival például azonosíthatjuk, hogy a komplexképzésben részt vevő vendégmolekulának pontosan mely molekularészlete, milyen „mélyen” és akár melyik irányból került a CD üregébe (lásd pl. 11.b. ábra).

A NOE mérésére szolgáló különféle pulzusprogramok [101] közti döntést befolyásolja a szupramolekuláris komplex „forgásának” korrelációs ideje (τ_c). Ez azt jelenti, hogy 500-600 MHz-es protonfrekvenciájú (ω) készüléken pozitív NOE-t (gyors mozgás, $\omega\tau_c \gg 1$) kb. 1 kDa alatti, negatívát ($\omega\tau_c \ll 1$) pedig csak jóval 5 kDa fölötti móltömegű

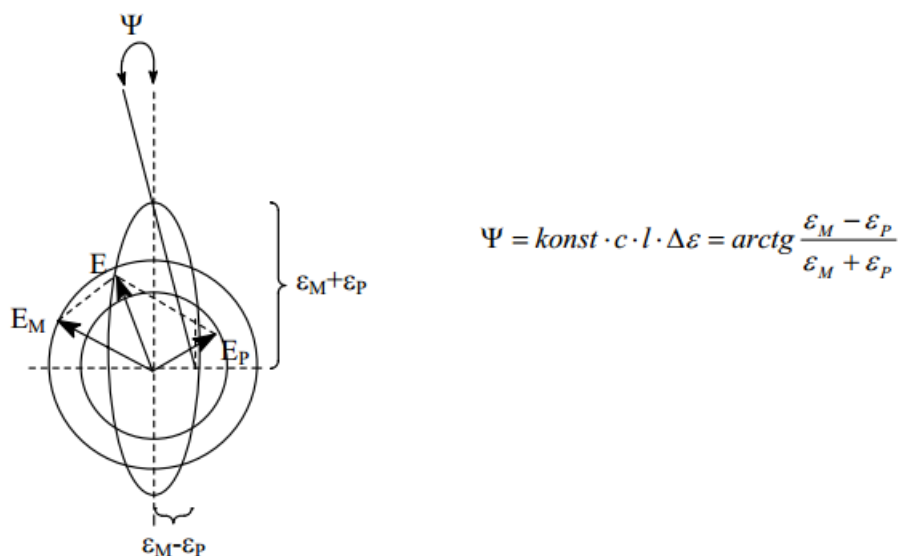
vegyületekre várhatunk. Mivel az 1:1 CD-komplexek móltömege általában az átmeneti tartományba esik, itt a NOE előjelet vált, ezért az 1D vagy 2D NOESY spektrumok alig tartalmaznak intermolekuláris keresztesúcsokat. Ilyen esetben a forgó koordináta-rendszerben értelmezett Overhauser spektroszkópiát (ROESY) érdemes használni, mivel a keverési idő (*mixing time*) alatt nem a z tengely mentén, hanem egy x,y -komponenseket is tartalmazó effektív tengely mentén (és a spektrométer ω_0 -tól eltérő ω_{eff} frekvenciánál) történik a keresztrelaxáció, így ROESY 1D és 2D spektrum felvételekor gyakorlatilag tetszőleges molekulaméretre detektálhatunk mag Overhauser növekményeket. A τ_c az oldat viszkozitásával szintén befolyásolható, növelésével lassítható a molekuláris forgás.

A bemutatott $\Delta\delta$ vagy NOE alapú szerkezetvizsgálatok alapfeltétele, hogy a CD jól megkülönböztethető, éles jeleket adjon. A natív vagy perszubsztituált CD-k a szimmetria miatt néhány egyszerű jelcsoportot adnak, amelyek egyértelműen szénkötésű protonokhoz rendelhetők [93]. Az izomertiszta, monoszubsztituált CD-k jelhozrendelése a szimmetria megszűnése miatt sokkal bonyolultabb, de bizonyos esetekben megfelelő mérési körülmények között, kombinált mérés technikák által elvégezhető, és intermolekuláris NOE vizsgálatok útján részletes 3D térszerkezeti modell megalkotása is lehetséges [98]. Mivel a random szubsztituált CD-származékok (CD-izomerkeverékek) igen sokféle kémiai környezetű metilén- és metinprotont tartalmaznak, így a 3-4, valamint a 4,5-5 ppm tartományokban zsúfolódó, átfedő, széles multiplettjeikre mutató intermolekuláris NOE-k csak a komplexek durvább „felbontású”, közelítő szerkezeti leírását teszik lehetővé [68].

1.4.4.5 Cirkuláris dikroizmus elméleti alapjai

Királis molekulák esetén optikailag aktív közegben a jobbra és balra cirkuláló fénykomponenseknek nemcsak a terjedési sebessége tér el, hanem azok abszorbanciája is. Ezt a jelenséget cirkuláris dikroizmusnak nevezzük, amelynek oka a fénykomponensek és az anyag között kialakuló diasztereomer kölcsönhatás. Ebben az esetben az elektromos térerősség vektorok eredői nem egy egyenesre esnek, hanem ellipszist írnak le. A létrejövő elliptikusan polarizált fény az ellipszis tengelyeivel jellemezhető, amelyek az abszorbanciák összegével, illetve különbségével egyenlők ($\epsilon_M + \epsilon_P$ és $\epsilon_M - \epsilon_P$) (12. ábra). Az ellipticitást (Ψ [fok]) a kis és nagy tengely hányadosának arcus tangenséből kapjuk

meg, amely arányos a koncentrációval (c [g/ml]), az abszorbancia különbséggel ($\Delta\varepsilon$) és a rétegvastagsággal (l [dm]) (12. ábra).



12. ábra. Az optikailag aktív közegben elliptikusan polarizált fény és az ellipticitás

A detektálható ellipticitáshoz nem elegendő, ha a molekula királis (optikailag aktív), egyúttal a mérési tartományba eső abszorpcióval rendelkező csoport megléte is elengedhetetlen. Centrális kiralitás esetén akkor a legintenzívebb a cirkuláris dikroizmus jel, ha a kiralitáscentrum a kromofór csoport része. Akkor is mérhető ellipticitás, ha nem királis a kromofór, viszont a kiralitáscentrum elég közel helyezkedik el a kromofórhoz, így az királisan „zavarja”, perturbálja. Ilyen esetekben királisan perturbált kromofór csoportokról beszélünk [102-105].

Emellett a cirkuláris dikroizmus méréssel a zárványkomplexek stabilitási állandói is meghatározhatók, valamint szerkezeti információt is szolgáltat, pl. a CD-k molekulakomplexei esetében is [106, 107].

1.4.4.6 Fázis-oldhatóság vizsgálat

Az egyik legszéleskörűben alkalmazott módszer CD komplexek stabilitási állandóinak meghatározására a Higuchi és Connors által kidolgozott fázis-oldhatósági vizsgálat [83]. Ennek során feleslegben, azonos mennyiségű szilárd vendégmolekulát juttatunk különböző koncentrációjú, azonos térfogatú CD oldatokba. Az egyensúly beállta után az a vendégmolekula CD hatására bekövetkező oldhatóság-növekedését határozzuk meg spektrofotometriásan, melyet ábrázolunk a CD koncentrációjának függvényében. A

kapott függvény információt nyújt a komplex sztöchiometriájáról, meredekségéből és tengelymetszetének értékéből (S_0 -intrinsic oldhatóság) a stabilitási állandó kiszámítható [83, 108, 109]. További előnye, hogy a tengelymetszet megadja a vendégmolekula intrinsic oldhatóságát (S_0) komplexképzőt nem tartalmazó oldószerben.

1.4.4.7 Királis kapilláris elektroforézis (CE) alapjai

Az elektroforézis technika lényege, hogy az ionizált részecskék az elektromos térerő hatására az ellentétes polaritású elektród felé mozdulnak el, az elválasztás a részecskék eltérő elektroforetikus mozgékonyágán (mobilitás, μ) alapul [110]. A királis anyagok kapilláris elektroforézissel történő elválasztásánál királis szelektort kell a pufferhez adagolni. A királis vegyületek enantiomerjeinek töltéssűrűsége megegyezik, így azok elektroforetikusan nem lennének elválaszthatók. Ezért szükséges egy királis szelektor, mellyel az enantiomerek sztereoselektív kölcsönhatásba lépnek és ennek következtében történhet meg az enantiomer elválasztás. Az oldott királis szelektort pseudo-állófázisnak is nevezik, mivel az enantiomerek vándorlási sebessége különböző szabadon és ideiglenesen képződött asszociátumként.

Az enantiomerek mozgékonyág különbsége ($\Delta\mu$) az alábbi egyenlettel számítható ki [111]:

$$\Delta\mu = \mu_R - \mu_S = \frac{\mu_{szabad} + \mu_{kplxR} K_R C}{1 + K_R C} - \frac{\mu_{szabad} + \mu_{kplxS} K_S C}{1 + K_S C} \quad (8)$$

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

A szabad enantiomerek mozgékonyága megegyezik ($\mu_R = \mu_S = \mu_{szabad}$). Az enantiomer elválasztáshoz szükséges, hogy a két enantiomer komplexének mozgékonyága eltérő legyen ($\mu_{kplxR} \neq \mu_{kplxS}$). Abban az esetben, ha az enantiomerek mind szabad, mind komplexált formában semlegesek, vándorlási sebességük megegyezik az elektroozmotikus áramlás (EOF) sebességével, vagyis nem tapasztalható elválás függetlenül a két enantiomer komplexstabilitási állandója közötti különbségtől. A szabad és komplexált forma közötti mozgékonyág különbség a kölcsönhatás erősségétől függ. Amennyiben ellentétes töltésű a szelektor és az elválasztandó anyag, ionos kölcsönhatás is erősítheti az interakciót [112, 113].

2 Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki a Dpx kémiai és analitikai jellemzését különös tekintettel a hatóanyag szintézisének, bomlási tulajdonságainak illetve ciklodextrinekkel kialakított kölcsönhatásainak a vizsgálatára.

Célként fogalmazzuk meg a Dpx szintézise során keletkező melléktermék izolálását, szerkezetmeghatározását és képződésének kémiai magyarázatát, amely nagymértékben hozzájárulhat a hatóanyag szintézisének optimalizálásához, a kritikus paraméterek monitorozásához, a gyártási szennyezőprofil bővítéséhez. Megfelelő analitikai módszerek felhasználásával ezen szennyezők kimutatása és mennyiségi meghatározása biztosítja a gyógyszerkészítmény megfelelő minőségét és a kezelés biztonságát.

A hatóanyagok bomlástermékeinek meghatározása és képződésük magyarázata hozzájárulhat a gyógyszerkészítmény stabilitási problémáinak megoldásához, így eltarthatóságának és biztonságos alkalmazhatóságának fenntartásához. További célunk volt tehát a Dpx ezidáig alig tanulmányozott bomlásának vizsgálata, a bomlástermékek szerkezetmeghatározása, illetve keletkezésük magyarázata. Mivel a kémiai bomlási folyamatok a hatóanyag *in vivo* metabolizmusával is gyakran párhuzamba állíthatók, így az újonnan azonosított bomlástermékek toxikológiai kérdéseire és kimutatási illetve meghatározhatósági lehetőségeinek fontosságára is felhívhatják a figyelmünket.

Célunk volt továbbá a Dpx natív CD-vel kialakított komplexeinek részletes tanulmányozása ortogonális analitikai technikák (NMR, cirkuláris dikroizmus/UV spektroszkópia, tömegspektrometria és fázis-oldhatósági vizsgálatok) segítségével. Ezen eredmények felhasználásával terveztük egy új, izomertiszta per-karboximetil- γ -CD-származék pH-függő királis elválasztóképességének vizsgálatát zónaelektroforézissel, melyben a Dpx-t és aktív metabolitjait modellvegyületként használtuk fel.

3 Módszerek

Ebben a fejezetben a felhasznált vegyületek és az alkalmazott analitikai módszerek bemutatása mellett a vegyületek szintézisét is ismertetem.

3.1 Felhasznált vegyszerek

A szintézishez használt reagens minőségű vegyszereket a Sigma-Aldrich-től rendeltük, és további tisztítás nélkül használtuk. A nyerstermékek tisztítására standard flash oszlopkromatográfiát (Kieselgel 60, Merck, 40-63 μm), valamint pereparatív VRK-t (Kieselgel 60 F₂₅₄ rétegvastagság: 1 mm, méret: 10/20 x 20 cm) alkalmaztunk. A reakciók menetét és az oszlopkromatográfiásan gyűjtött frakciók egységességét VRK-val (Silica gel 60 F₂₅₄ alumíniumlemezen, Merck) követtük.

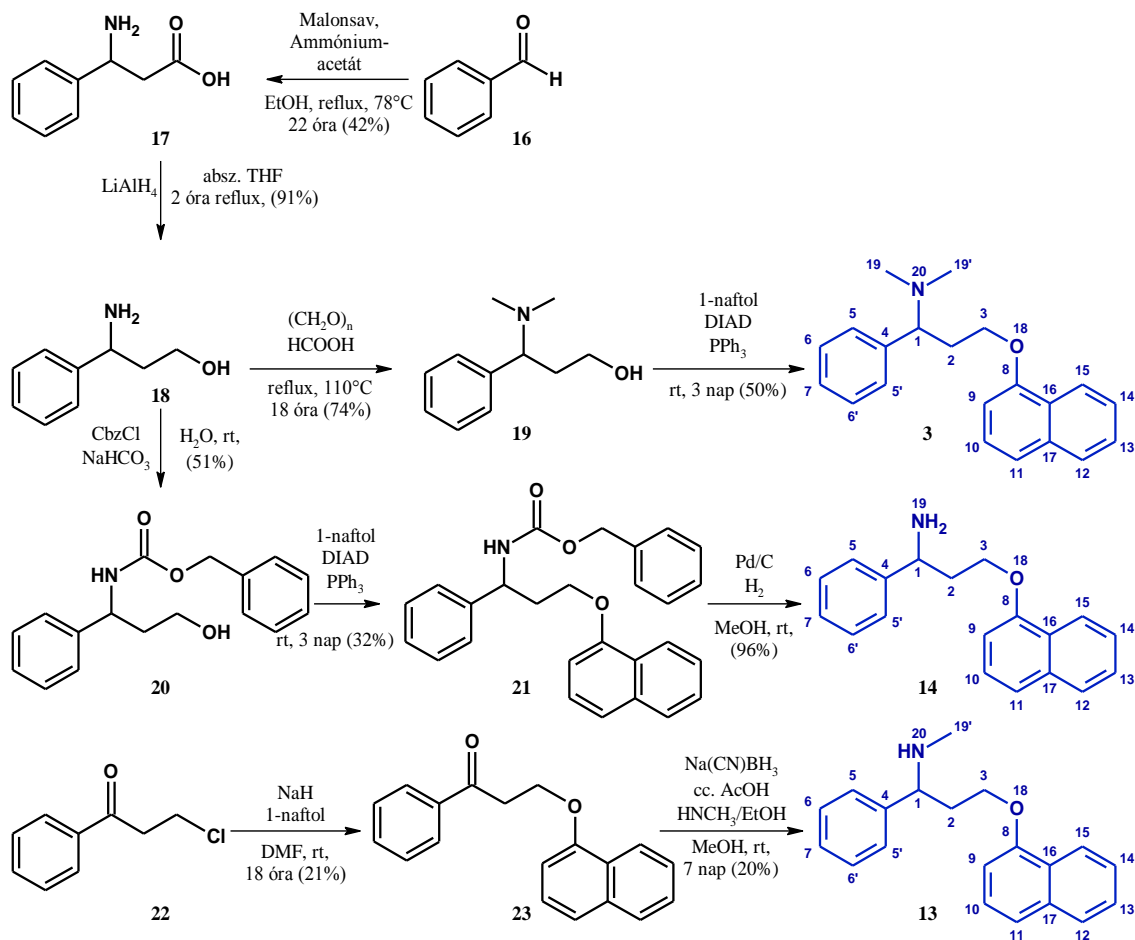
Az analitikai és LC-MS mérésekhez HPLC minőségű metanolt (Merck, Darmstadt, Németország) használtunk. A méréseink során a Millipore Milli-Q Direct 8 (fajlagos vezetőképesség: 1,1 $\mu\text{S cm}^{-1}$) víztisztítóval előállított vizet használtuk.

Az NMR mérésekhez nehézvizet (VWR International Kft.), CD₃OD-t, CDCl₃-ot (Sigma-Aldrich és VWR International Kft.) és CD₃COOD-t (Cambridge Isotope Laboratories Inc.) használtunk, melyeknél a deutériumtartalom minden esetben 99,8% feletti volt.

A felhasznált ciklodextrinek (β -, γ -, RAME- γ -, és ODMCM- γ -CD) analitikai tisztaságúak, voltak melyeket a Cyclolab Kft-től (Budapest, Magyarország) kaptunk.

3.2 Dapoxetin és metabolitjainak előállítása

Az analitikai vizsgálatainkhoz az általunk előállított racém és enantiomertiszta Dpx-t illetve a racém Dpx metabolitokat használtuk fel. Az enantiomertiszta Dpx előállításához kereskedelemben kapható enantiomertiszta kiindulási vegyületet használtunk fel. A vegyületek szintézisét a 13. ábrán foglaltam össze.



13. ábra. A dapoxetin és aktív metabolitjai előállításának összefoglalása és a dolgozatban használt számozásuk

3-amino-3-fenilpropionsav (17)

Etanolban (100 ml) oldottunk malonsavat (60,4 mmol), ammónium-acetátot (80,4 mmol) és benzaldehidet (**16**) (60,0 mmol) majd a reakcióelegyet 22 órán át forraltuk. Fehér csapadékos oldat keletkezett, melyet hűtés után szűrtünk, majd etanollal (25 ml) és Et₂O-rel (20 ml) mostunk. Levegőn való szárítás után 4,2 g, (42 %) fehér kristályt (**17**) kaptunk (13. ábra).

¹H NMR (600 MHz, D₂O), δ(ppm): 7,34–7,40 (m, 5H, C₆H₅), 4,54 (m, 1H, ArCH), 2,81 (m, 1H, ArCHCH₂), 2,71 (m, 1H, ArCHCH₂).

¹³C NMR (150 MHz, D₂O), δ(ppm): 40,41; 52,69; 126,87; 129,21; 129,24; 135,96; 177,19;

3-amino-3-fenilpropán-1-ol (18)

Nitrogén-atmoszféra alatt bemértünk 3-amino-3-fenilpropionsavat (**17**) (5,6 mmol) és vízmentes THF-t (20 ml). A keletkező szuszpenziót 0°C-ra hűtöttük, majd intenzív

kevertetés közben részletekben LiAlH_4 -et (18,4 mmol) adtunk hozzá. 2 órán át tartó forralás után a reakció végbemenetelét VRK-val ellenőriztük. Hűtést követően a reagens hidrid feleslegét cseppenként adagolt vízzel bontottuk el. Az intenzív gázfejlődést követően szürke szuszpenzió keletkezett, amit celiten szűrtünk és EtOAc-tal mostunk. A szerves fázist Na_2SO_4 -on szárítottuk, majd bepároltuk. A nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk MeOH-t használva eluensként, így 0,785 g, (91 %) sárga olajszerű anyagot (**18**) kaptunk, mely később kristályosodott (13. ábra).

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 7,37–7,22 (m, 5H, C_6H_5), 4,11 (t, 1H, $J = 5,59$ Hz, ArCH), 3,78 (t, 2H, $J = 5,39$ Hz, ArCHCH₂CH₂), 2,77 (s, 3H, NH₂ és OH), 1,92–1,85 (m, 2H, ArCHCH₂)

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 146,0; 128,5; 127,0; 125,6; 61,7; 56,0; 39,6;

3-(*N,N*-dimetilamino)-3-fenilpropán-1-ol (19**)**

Bemértünk 3-amino-3-fenilpropán-1-olt (**18**) (23 mmol), hangyasavat (4 ml) és formaldehidben (25 ml) oldottuk. A reakcióelegyet 18 órán át forraltuk, majd lehűlés után 2 M HCl-dal a pH 1-re állítottuk, mely során sárga csapadék vált ki. A csapadékos oldatot Et₂O (2 x 5 ml) extraháltuk, a vizes fázis pH értékét 2 M NaOH-dal pH 14-re állítottuk, mely során ismét sárga csapadékleválást tapasztaltunk, a szuszpenziós oldatot EtOAc-tal (3 x 6 ml) extraháltuk. Az egyesített szerves fázist Na_2SO_4 -on szárítottuk, majd bepároltuk. A kapott nyersterméket EtOAc:MeOH (9:1) eluenssel oszlopkromatográfiásan tisztítottuk és végül 1,92 g, (74 %) sárga olajszerű anyagot (**19**) kaptunk (13. ábra).

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 7,38–7,17 (m, 5H, C_6H_5); 3,86–3,80 (m, 2H, ArCHCH₂CH₂); 3,74 (dd, 1H, $J = 10,49$ Hz, $J = 3,77$ Hz, ArCH); 2,47–2,34 (m, 1H, ArCHCH₂); 2,18 (s, 6H, N(CH₃)₂); 1,71–1,62 (m, 1H, ArCHCH₂);

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 136,1; 128,8; 127,9; 127,4; 70,1; 63,4; 41,0; 32,1;

***N,N*-dimetil[3-(naft-1-iloxi)-1-fenilpropil]amin (**3**) ((*R/S*)-Dapoxetin)**

Nitrogén-atmoszféra alatt bemértünk 3-(*N,N*-dimetilamino)-3-fenilpropán-1-olt (**19**) (5,6 mmol), 1-naftolt (11,8 mmol) és vízmentes THF-ban (80 ml) oldottuk. Az oldatot 0°C-ra hűtöttük és hozzáadtuk a trifenil-foszfánt (11,7 mmol) és DIAD-ot (11,2 mmol). A reakcióelegyet nitrogén-atmoszféra alatt, szobahőmérsékleten 3 napig kevertettük. A nyersterméket szilikagéllel oszlopkromatográfiásan tisztítottuk. A tisztítást EtOAc

eluenssel kezdtük, majd a MeOH térfogatarányát folyamatosan növeltük 10 % MeOH/EtOAc eluens összetételig. Nem értünk el megfelelő tisztaságot, így újabb oszlopkromatográfiás tisztítást végeztünk 5 % MeOH/CH₂Cl₂ eluenssel. Végül 0,85 g, (50 %) szintelen, olajszerű terméket (**3**) kaptunk (13. ábra).

HRMS (ESI): C₂₁H₂₄NO [M+H]⁺ számított: 306,1852 mért: 306,1842.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃), δ(ppm): 8,23 (dm, 1H, *J* = 6,9 Hz, H15); 7,77 (dm, 1H, *J* = 6,9 Hz, H12); 7,47 (m, 1H, H13); 7,46 (m, 1H, H14); 7,37 (d, 1H, *J* = 8,26 Hz, H11); 7,31 (m, 2H, H6 és H6'); 7,28 (m, 1H, H10); 7,27 (m, 2H, H5 és H5'); 7,26 (m, 1H, H7); 6,64 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, H9); 4,06 (m, 1H, H3); 3,90 (m, 1H, H3); 3,60 (dd, 1H, *J* = 9,3; 5,4 Hz, H1); 2,63 (m, 1H, H2); 2,27 (m, 1H, H2); 2,25 (s, 6H, H19 és H19').

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃), δ(ppm): 155,3 (C8); 140,2 (C4); 135,1 (C17); 129,3 (C5 és C5'); 128,9 (C6 és C6'); 128,1 (C12), 128,0 (C7); 127,0 (C13); 126,5 (C10); 126,3 (C16); 125,7 (C14); 122,7 (C15); 120,7 (C11); 105,2 (C9); 68,3 (C1); 66,3 (C3); 43,5 (C19 és C19'); 33,7 (C2).

Az enantiomertiszta (*S*)-Dpx-t a bevezető rész 5. ábráján bemutatott reakcióútvonal alapján állítottuk elő a kereskedelemben beszerezhető enantiomertiszta (*R*)-3-klór-1-fenil-propán-1-ol felhasználásával [26].

(S)-Dpx szintézise

(R)-3-(1-naftiloxi)-1-fenil-propán-1-ol (**1**)

Nitrogén-atmoszféra alatt NaH-et (2,9 mmol) szuszpendáltunk vízmentes DMF-ben (2,3 ml). A fehér szuszpenziót 0°C-ra hűtöttük, majd heves pezsgés kíséretében cseppenként hozzáadtunk vízmentes DMF-ben (2,3 ml) oldott 1-naftolt (2,9 mmol). A keletkező zöld szuszpenzióhoz 2 óra elteltével hozzáadtunk vízmentes DMF-ben (4,6 ml) oldott (*R*)-3-klór-1-fenil-propán-1-olt (3,1 mmol). A sötétbarna szuszpenziós oldatot egy éjszakán át szobahőmérsékleten kevertettük, a reakció végbemenetelét VRK-val ellenőriztük (*n*-hexán:EtOAc 9:1 eluenssel, kiindulási anyag *R_f*=0,21; termék *R_f*=0,14). 10 ml vízre öntöttük, majd rázótlcsérbe mostuk és EtOAc-tal (3 x 25 ml) extraháltuk. Az egyesített szerves fázist vízzel mostuk (30 ml), NaOH-oldattal (2 x 20 ml, 1 M) extraháltuk, majd a szerves fázist vízzel (2 x 30 ml) mostuk, Na₂SO₄-on szárítottuk, szűrtük, bepároltuk. 0,84 g nyerste termékhez jutottunk, melyet oszlopkromatográfiával

tisztítottunk *n*-hexán:EtOAc (9:1) eluenssel, így 0,58 g, (70,2 %) barna olajszerű anyagot (**1**) kaptunk.

HRMS (ESI): C₂₁H₂₃NO₂ [M+Na]⁺ számított: 301,1199 mért: 301,1204

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz), δ (ppm): 8,29–8,24 (m, 1H); 7,85–7,80 (m, 1H); 7,54–7,48 (m, 2H); 7,47–7,42 (m, 3H); 7,41–7,35 (m, 3H); 7,31 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H); 6,81 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H); 5,14 (dd, *J* = 8,2; 4,9 Hz, 1H, ArCH), 4,38–4,33 (m, 1H, ArCHCH₂CH₂), 4,23–4,18 (m, 1H, ArCHCH₂CH₂); 2,46–2,39 (m, 1H, ArCHCH₂); 2,37–2,30 (m, 1H, ArCHCH₂).

¹³C NMR (CDCl₃, 151 MHz), δ (ppm): 154,57; 144,30; 134,63; 128,74; 127,84; 127,67; 126,54; 126,00; 125,96; 125,71; 125,40; 121,96; 120,55; 104,93; 72,28; 65,51; 38,65.

(S)-*N,N*-dimetil[3-(naft-1-iloxi)-1-fenilpropil]amin (3**) ((S)-Dapoxetin)**

Nitrogén-atmoszféra alatt bemért (*R*)-3-(1-naftiloxi)-1-fenil-propán-1-ol (**1**) (2,6 mmol), Et₃N (4,5 mmol) és DMAP katalizátor (8,2 μmol) THF-os (10 ml) oldatához 0°C-on részletekben hozzáadtuk a MsCl-t (3,8 mmol), és 2 órán át kevertettük, majd dimetilamin gázt buborékolattunk át ugyanezen a hőmérsékleten 3 órán át. Szobahőmérsékleten kevertettük tovább 11 órán át. A reakcióhoz, végbemenetele után (VRK-val ellenőriztük, CH₂Cl₂:MeOH (10:1) eleggyel) dimetil-amin oldatot (25 ml, 40 %-os) adtunk és 1 órán át kevertettük. Víztmentes Na₂SO₄-on szárítottuk, szűrtük, és bepároltuk. A kapott 1,25 g nyersanyagot szilikagéllal oszlopkromatográfiásan tisztítottuk CH₂Cl₂:MeOH (10:1) eluenssel, míg végül 0,37 g, (46 %) tiszta végtermékhez (**3**) jutottunk. A szerkezetigazoláshoz használt HRMS és NMR adatok megegyeznek a racém Dpx adataival. Az enantiomertisztaságot a kutatócsoportunkban korábban kifejlesztett validált királis kapilláris elektroforézisen alapuló eljárással ellenőriztük RAME-γ-CD-vel [7].

A dezmetil-metabolitok esetén csak a racém formát állítottuk elő (13. ábra). A fő metabolit Dpx-*N*-oxid szintézisét (*S*)-Dpx-ből kiindulva valósítottuk meg, melyet az eredmények fejezetben ismertetünk (19. ábra).

Didezmetil-dapoxetin szintézise

Benzil-*N*-(3-hidroxi-1-fenilpropil)karbamát (20**)**

Bemértünk 3-amino-3-fenilpropán-1-olt (**18**) (3,0 mmol), vizet (3,5 ml) és Na₂CO₃-ot (3,0 mmol). A keletkezett szuszpenziót 0°C-ra hűtöttük, majd benzil-oxi-karbonil-kloridot (3,0 mmol) adtunk hozzá, és szobahőmérsékleten 16 órát kevertettük. A reakció

végbemenetelét VRK-val ellenőriztük (MeOH eluenssel), majd a reakcióelegyet rázótlöcsérbe mostuk és CH₂Cl₂-nal (3 x 20 ml) extraháltuk. Az egyesített szerves fázist Na₂SO₄-on szárítottuk, és bepároltuk. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottunk *n*-hexán:EtOAc (1:1) eluenssel. Végül 0,562 g, (51 %) fehér kristályos anyaghoz (**20**) jutottunk.

HRMS (ESI): C₁₇H₂₀NO₃ [M+H]⁺ számított: 286,1438 mért: 286,1431

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz), δ (ppm): 7,34–7,26 (m, 10H, Ar); 5,84 (d, 1H, NH, *J* = 7,89 Hz); 5,18–5,06 (m, 2H, BnCH₂); 4,95 (m, 1H, ArCH); 3,74–3,68 (m, 2H, ArCHCH₂CH₂); 3,32 (s, 1H, OH); 2,08–2,01 (m, 1H, ArCHCH₂); 1,91–1,83 (m, 1H, ArCHCH₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 151 MHz), δ (ppm): 156,3 (C=O); 141,6; 136,1; 128,5; 128,3; 127,9; 127,9; 127,2; 126,1 (12C, Ar); 66,7; 58,8; 52,4; 38,6;

Benzil-*N*-[3-(naft-1-iloxi)-1-fenilpropil]karbamát (21)

Inert nitrogén-atmoszféra alatt bemértünk benzil-*N*-(3-hidroxi-1-fenilpropil)karbamátot (**20**) (1,5 mmol), vízmentes THF-t (20 ml), és 1-naftolt (2,3 mmol). 0°C-ra hűtés után hozzáadtuk a trifenil-foszfánt (2,3 mmol) és a DIAD reagenst (4,6 mmol). Nitrogén-atmoszféra alatt szobahőmérsékleten kevertettük 3 napig. Bepároltuk, a nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk CH₂Cl₂ eluenssel. Így 0,150 g, (32 %) barna kristályos anyagot (**21**) kaptunk.

HRMS (ESI): C₂₇H₂₅NO₃ [M+Na]⁺ számított: 434,1727 mért: 434,1739

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz), δ (ppm): 8,22 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 7,78 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 7,51–7,27 (m, 14H); 6,69 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H); 5,62–5,59 (s, 1H); 5,18–5,01 (m, 3H, ArCH; BnCH₂); 4,20–4,05 (m, 2H, ArCHCH₂CH₂); 2,50–2,39 (m, 2H, ArCHCH₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 151 MHz), δ (ppm): 155,9; 154,5; 141,8; 136,7; 134,7; 129,0 (2C); 128,7; 128,3; 127,8; 127,7; 126,6; 126,0; 125,8; 125,6; 122,1; 120,8; 104,9; 67,0; 65,3; 53,7; 36,2;

3-(naft-1-iloxi)-1-fenilpropán-1-amin (14) (didezmetil-Dpx)

Nitrogén-atmoszféra alatt bemértünk 10 % Pd/C (32 mg) katalizátort és 5 ml MeOH-t. A katalizátort H₂-gázzal telítettük, majd csepegtetőtlöcsérből hozzáadtunk 0,35 mmol **21**-et. Hidrogén-atmoszféra alatt kevertettük 1 napig, majd celiten szűrtük, bepároltuk. A

nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk CH₂Cl₂:MeOH (20:1) eluent használva 0,093 mg, (96 %) barnás olajszerű anyagot (**14**) kaptunk.

HRMS (ESI): C₁₉H₂₀NO [M+H]⁺ számított: 278,1539 mért: 278,1542

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz), δ (ppm): 8,27 (dm, *J* = 7,4 Hz, 1H, H15); 7,80 (dm, *J* = 7,4 Hz, 1H, H12); 7,49 (m, 2H, H14 és H13); 7,41 (t, *J* = 8,2 Hz, 1H, H7); 7,39 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H5/5'); 7,34 (m, 3H, H6/6' és H10); 7,26 (m, 1H, H11); 6,75 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H9); 4,36 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H, H1); 4,22 (ddd, *J* = 9,4; 6,4; 5,3 Hz, 1H, H3); 4,09 (ddd, *J* = 9,4; 7,2; 5,3 Hz, 1H, H3'); 2,34 (dtd, *J* = 14,3; 7,2; 5,3 Hz, 1H, H2); 2,26 (dtd, *J* = 14,3; 6,6; 5,2 Hz, 1H, H2').

¹³C NMR (CDCl₃, 151 MHz), δ (ppm): 154,7 (C8); 146,1 (C4); 134,6 (C17); 128,8 (C6/6'); 127,6 (C12); 127,3 (C11); 126,50 (C13); 126,49 (C5/5'); 126,0 (C10); 125,8 (C16); 125,3 (C14); 122,1 (C15); 120,3 (C7); 104,7 (C9); 65,7 (C3); 53,8 (C1); 39,1 (C2).

Dezmetil-dapoxetin szintézise

3-(naft-1-iloxi)-1-fenilpropán-1-on (23)

Nitrogén-atmoszféra alatt NaH-et (5,9 mmol) szuszpendáltunk vízmentes DMF-ben (4,6 ml). A fehér szuszpenziót 0°C-ra hűtöttük, majd heves pezsgés kíséretében cseppenként hozzáadtunk vízmentes DMF-ben (4,6 ml) oldott 1-naftolt (5,9 mmol). A keletkező zöld szuszpenzióhoz 2 óra elteltével hozzáadtunk vízmentes DMF-ben (4,6 ml) oldott 3-kloro-1-fenilpropán-1-ont (**22**) (5,9 mmol). A sötétbarna szuszpenziós oldatot 18 órán át szobahőmérsékleten kevertettük, a reakció végbemenetelét VRK-val ellenőriztük (CH₂Cl₂ eluens). Víz (20 ml) hozzácsepegtetése után fehér csapadék vált le, további víz (60 ml) hozzáadásával a szuszpenziót rázótlcsérbe mostuk, és EtOAc-tal (2 x 50 ml) extraháltuk. Az egyesített szerves fázist vízzel (60 ml) mostuk, NaOH-dal (2 x 40 ml, 1 M) extraháltuk, majd a szerves fázist vízzel (2 x 60 ml) mostuk, Na₂SO₄-on szárítottuk, szűrtük, bepároltuk. 1,460 g nyerstermékhez jutottunk, melyet oszlopkromatográfiával tisztítottunk *n*-hexán:EtOAc (9:1) eluenssel. Így 0,350 g, (21 %) barna olajszerű anyagot (**23**) kaptunk.

HRMS (ESI): C₁₉H₁₇O₂ [M+H]⁺ számított: 277,1223 mért: 277,1228

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz), δ (ppm): 8,15–6,89 (m, 12H, Ar), 4,63–4,60 (t, 2H, ArCHCH₂CH₂) 3,63–3,60 (t, 2H, ArCHCH₂).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 151 MHz), δ (ppm): 197,74; 154,3; 136,78; 134,4; 133,33; 128,64; 128,14; 127,37; 126,29; 125,81; 125,5; 125,06; 121,89; 120,4; 104,8; 63,62; 38,08.

Metil[3-(naft-1-iloxi)-1-fenilpropil]amin (13) (Dezmetil-dapoxetin)

3-(naftalén-1-iloxi)-1-fenilpropán-1-ont (**23**) (2,5 mmol) oldottunk MeOH-ban (15,0 ml), majd cc. AcOH-at (1,0 ml) és 33,3 m/m%-os etanolos metil-amint (2,4 ml) mértünk a reakcióelegyhez. Szobahőmérsékleten 20 perc kevertetés után több részletben hozzáadtuk a $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ -et (11,6 mmol), majd a reakcióelegyet 7 napig szobahőmérsékleten kevertettük. Telített NaHCO_3 -ot (25 ml) adtunk hozzá és CH_2Cl_2 -nal (3 x 35 ml) extraháltuk, az egyesített szerves fázist Na_2SO_4 -on szárítottuk, szűrtük, bepároltuk. A kapott nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk CH_2Cl_2 :MeOH (9:1) eluenssel. Így 0,075 g (20 %) barna kristályos anyagot (**13**) kaptunk.

HRMS (ESI): $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ számított: 292,1646 mért: 292,1680

^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz), δ (ppm): 8,19 (m, 1H, H15); 7,71 (m, 1H, H12); 7,40 (m, 2H, H14 és H13); 7,32 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H11); 7,26 (m, 4H, H5/5'/6/6'); 7,23 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, H10); 7,18 (m, 1H, H7); 6,75 (dd, $J = 7,6$; 0,9 Hz, 1H, H9); 4,05 (dt, $J = 9,5$; 5,5 Hz, 1H, H3); 3,90 (ddd, $J = 9,6$; 8,1; 5,1 Hz, 1H, H3'); 3,83 (dd, $J = 7,9$; 6,1 Hz, 1H, H1); 2,37 (ddt, $J = 13,9$; 8,2; 5,8 Hz, 1H, H2); 2,26 (s, 3H, H19) 2,12 (ddt, $J = 13,5$; 8,0; 5,3 Hz, 1H, H2').

^{13}C NMR (CDCl_3 , 151 MHz), δ (ppm): 154,6 (C8); 146,7 (C4); 134,6 (C17); 128,7 (C6/6'); 127,5 (C12); 127,5 (C7); 127,4 (C5/5'); 126,4 (C13); 126,0 (C10); 125,7 (C16); 125,2 (C14); 122,1 (C15); 120,2 (C11); 104,7 (C9); 65,4 (C3); 62,8 (C1); 37,2 (C2); 34,4 (C19').

3.3 Analitikai módszerek

3.3.1 Fázis-oldhatóság vizsgálatok

A β -, γ - és RAME- γ -CD Dpx bázisra kifejtett oldhatóságnövelő hatását Higuchi és Connors módszerével vizsgáltuk [83]. A mérésekhez 7,4-es pH-jú foszfát puffert használtunk. Feleslegben vett Dpx (1,5 mg) különböző CD koncentrációjú (1-50 mM-ig, kivéve a β -CD: 0-10 mM) 1,0 ml-es szuszpenzióit $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ -on rázattuk. Az egyensúly beállta után a mintákat centrifugáltuk, majd a Dpx koncentrációját 291 nm-en spektrofotometriásan határoztuk meg Jasco-V550 készüléken.

3.3.2 Tömegspektrometriás mérések

Az MS méréseket Agilent 1260 Infinity HPLC rendszerhez kapcsolt, repülési idő analizátorral rendelkező (TOF) spektrométeren végeztük, elektropray ionizációt (ESI) alkalmazva, pozitív ion detektálási módban. Izokratikus mozgófázist alkalmaztunk, mely 0,1 % vizes hangyasavoldatot és szerves fázisként metanolt vagy acetonitrilt tartalmazott, legalább 50:50 % arányban 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett. A mérés során a tömegkalibrációhoz 121.050873 és 922.009798 m/z közötti tartományban lévő referenciatömegeket használtunk. A tömegspektrumok kiértékelését Agilent MassHunter B.02.00 szoftverrel végeztük el.

3.3.3 NMR mérések és kiértékelésük

Az NMR mérések többségét a Semmelweis Egyetem 600 MHz-es Varian DDR NMR spektrométerén (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 5 mm IDPFG mérőfejjel végeztük el. A mintákat deuterált oldószerekben oldottuk és 5 mm átmérőjű standard NMR csövekbe helyeztük. Az adatgyűjtés VnmrJ 3.2C szoftverrel történt, a ChemPack 5.1-ben szereplő standard pulzusprogramok használatával. Az előállított vegyületek, valamint a Dpx és a CD komplexek teljes ^1H és ^{13}C jelhozzárendelését (teljes asszignáció esetén) egy- és kétdimenziós homo- és heteronukleáris kísérletek (1D ^1H , ^{13}C , 1D TOCSY, ^1H - ^1H gCOSY, zTOCSY, ^1H - ^{13}C gHSQCAD ($^1J_{\text{CH}} = 140$ Hz), ^1H - ^{13}C gHMBCAD ($^nJ_{\text{CH}} = 8$ Hz)) alapján végeztük el. Az ^1H és ^{13}C kémiai eltolódás skálát TMS belső standardot tartalmazó oldószer esetén 0,00 ppm-re, illetve a CDCl_3 és CD_3OD (TMS mentes) oldószer esetén az ^1H kémiai eltolódás skálát a nyomokban jelenlévő

CHCl₃-ra (¹H: 7,21 ppm) és CHD₂OD multipliettjére (¹H: 3,34 ppm), míg a ¹³C skálát a megfelelő oldószer ¹³C jelére (CDCl₃, ¹³C: 77,16 ppm; CD₃OD, ¹³C: 49,00 ppm-re) kalibráltuk. A CD-vel végzett titrálásoknál (sztöchiometria és komplexstabilitási állandó meghatározás) DSS mentes D₂O-ban 20 μM-nyi koncentrációban hozzáadott MeOH-t használtunk referenciaként (3,32 ppm), hiszen a DSS nemkívánt kölcsönhatásba lép a CD-vel [70].

3.3.3.1 Sztöchiometria meghatározása

A Dpx β-, és γ-CD-vel képzett komplexeinek sztöchiometriáját Job-módszere [89, 90] szerinti ¹H NMR titrálással határoztuk meg – a Dpx bázis rossz vízoldhatósága miatt – nem pufferelt savas (40 mM CD₃COOD) D₂O-os oldatokkal 25 °C-on. A két komponens teljes moláris koncentrációját állandó, $c_{CD} + c_{Dpx} = 3$ mM-os értéken tartottuk, de a Dpx móltörtjét $x_{Dpx} = c_{Dpx} / (c_{Dpx} + c_{CD})$ folyamatosan változtattuk 0,1 egységnyi lépésekkel 0,0-tól 1,0 értékig. Néhány, jól leolvasható (*i* darab) Dpx ¹H mag kémia eltolódását $\delta^{Dpx,i}$ leolvastuk, és a szabad komponens kémiai eltolódásához δ_{Dpx}^i képest e magok komplexképzés során mutatott monoton elmozdulásából $\Delta \delta^{Dpx,i} = \delta^{Dpx,i} - \delta_{Dpx}^i$ kiszámítottuk a kémiai eltolódásváltozásuk abszolút értékét $|\Delta \delta^{Dpx,i}|$, melyet a Job függvények megszerkesztéséhez használtunk fel. Hasonló módon számítottuk, és ábráztuk a CD-k néhány választott protonját is.

3.3.3.2 ¹H NMR titrálások

Mivel Job-módszere nem feltétlenül biztosítja a legjobb kísérlettervet a stabilitási állandó megadására [89], ezért ennek minél pontosabb meghatározására egy külön titrálást terveztünk hasonló körülmények között (10 mM CD₃COOD oldat NaOD-dal pH* 5,2-re állított pufferoldatban (pH* jelölés arra vonatkozik, hogy a pH-t D₂O-ban mértük, de az elektródot előzetesen a megfelelő standardok H₂O-s oldatával kalibráltuk), 25 °C-on), de ez esetben a c_{Dpx} -t állandó értéken tartottuk növekvő CD koncentrációt mellett. Az oldatok elkészítése során 1 mM-os Dpx törzsoldatban oldottuk az analitikai pontossággal kimért CD-eket (β-CD: 0,1-től 12,0 mM-ig; γ-CD: 0,1-től 25,0 mM-ig), majd NMR csövekbe juttattuk és az egyensúly beálltaig 24 órán át állni hagytuk a ¹H NMR méréseket megelőzően.

A Job-mérések eredményei alapján esetünkben a számítási eljárás egy olyan összetett rendszert feltételez, ahol a $D_{px} \cdot CD$ és $2D_{px} \cdot CD$ részecskék együttesen vannak jelen az egyensúlyi oldatban. A $2D_{px} \cdot CD$ részecskék kialakulásának második lépése az alábbi egyenlettel és K_{21} egyensúlyi állandóval jellemezhető:



A számításhoz $[CD]$ és $[D_{px}]$ egyensúlyi koncentrációit minden titrálási pontban a c_{CD} és $c_{D_{px}}$ összkoncentrációkból számítottuk a tömeghatás törvénye alapján, az alábbi egyenletek szerint:

$$c_{CD} = [CD] + [D_{px} \cdot CD] + [2D_{px} \cdot CD] = \frac{[CD] (1 + K_{11}[D_{px}] + K_{11}K_{21}[D_{px}]^2)}{[CD] (1 + K_{11}[D_{px}] + K_{11}K_{21}[D_{px}]^2)} \quad (10)$$

$$c_{D_{px}} = [D_{px}] + [D_{px} \cdot CD] + 2[2D_{px} \cdot CD] = \frac{[D_{px}] (1 + K_{11}[CD] + 2K_{11}K_{21}[CD][D_{px}])}{[D_{px}] (1 + K_{11}[CD] + 2K_{11}K_{21}[CD][D_{px}])} \quad (11)$$

A komplexképzésre kinetikai szempontból „gyors csere” jellemező a kémiai eltolódás időskálán 600 és 800 MHz-en egyaránt [89]. Ilyen körülmények között az adott magok mért kémiai eltolódása ($\delta^{D_{px},i}$) minden titrálási pontban a különböző részecskék ($\delta_{D_{px}}^i$, $\delta_{D_{px} \cdot CD}^i$, $\delta_{2D_{px} \cdot CD}^i$) egyedi kémiai eltolódásának móltörttekkel súlyozott átlaga:

$$\delta^{D_{px},i} = \chi_{D_{px}} \delta_{D_{px}}^i + \chi_{D_{px} \cdot CD} \delta_{D_{px} \cdot CD}^i + 2\chi_{2D_{px} \cdot CD} \delta_{2D_{px} \cdot CD}^i = \frac{\delta_{D_{px}}^i + [CD](\delta_{D_{px} \cdot CD}^i K_{11} + \delta_{2D_{px} \cdot CD}^i 2K_{11}K_{21}[D_{px}])}{1 + [CD](K_{11} + 2K_{11}K_{21}[D_{px}])} \quad (12)$$

ahol χ jelöli a moláris frakciót a D_{px} összkoncentrációjára vonatkozóan. A CD protonok esetén hasonló összefüggés figyelhető a j -edik CD proton kémiai eltolódása ($\delta^{CD,j}$) esetén is:

$$\delta^{CD,j} = \chi_{CD} \delta_{CD}^j + \chi_{D_{px} \cdot CD} \delta_{D_{px} \cdot CD}^j + \chi_{2D_{px} \cdot CD} \delta_{2D_{px} \cdot CD}^j = \frac{\delta_{CD}^j + \delta_{D_{px} \cdot CD}^j K_{11}[D_{px}] + \delta_{2D_{px} \cdot CD}^j K_{11}K_{21}[D_{px}]^2}{1 + K_{11}[D_{px}] + K_{11}K_{21}[D_{px}]^2} \quad (13)$$

A $\delta_{D_{px}}^i$ és δ_{CD}^j szabad komponensek kémiai eltolódása könnyedén meghatározhatók a D_{px} - és a CD-törzsoldat spektrumából, másrészt a komplexekre jellemző egyedi kémiai eltolódások iterációval számíthatók az egyensúlyi állandókkal együtt a kísérletes titrálási adatsorok (12) és (13) egyenleteket felhasználó számítógépes illesztésén keresztül [69,

84, 96, 114]. Míg ez az illesztés az 1:1-es komplexeknél általában egyszerű, addig magasabb sztöchiometria esetén nehéz, sőt akár lehetetlenné is válhat (nincs konvergencia), kivéve, ha a kezdeti paraméterek kellően közelítik a valós megoldást [84, 96]. A kiértékelési nehézségek forrásaként a spektrális és egyensúlyi paraméterek erős matematikai korrelációját azonosították [84], melyek elkerülhetők nagyszámú titrálási pont felvételével és a titrálási adatsorok egyidejű illesztésével a lehető legnagyobb számú vendég (és gazda) proton adatsorának bevonása mellett [84, 114]. Az értékelést így globális analízissel, mint kemometriai módszerrel végeztük el, mely többváltozós statisztikai módszerként bemeneti értéként tartalmazza a c_{Dpx} és c_{CD} teljes koncentrációját az egyes titrálási pontokban, a szabad részecskék kémiai eltolódását és a komplexképzésre leginkább érzékeny Dpx és CD protonok komplexképződés indukálta kémiai eltolódásváltozásait. Az egyensúlyi állandók meghatározása érdekében az adathalmazokat a (12)-es és (13)-as egyenletekre a legkisebb négyzetek módszerével illesztettük. Ehhez az OPIUM számítógépes programot (M. Kyvala, Ivan Lukes, 1995; elérhető: <http://www.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html>) használtuk. A kiértékelés során az egyes magok esetén mért komplexspecifikus kémiai eltolódásokat is bevontuk a számításba. A legmegfelelőbb egyensúlyi modell kiválasztása számos sztöchiometriai modell (1:1, 2:1, 1:2 stb.) vizsgálata, valamint kemometriai szempontok és kémiai megfontolások alapján történt. Az eredményül kapott komplexstabilitási állandókból a részecske-eloszlás görbék megszerkesztéséhez a Hyss programot használtuk, az illesztett NMR titrálási görbéket Microsoft Excelben ábráztuk [115].

3.3.3.3 NOE mérések

A komplexképzés térszerkezeti viszonyainak megállapításához nukleáris Overhauser-effektuson (NOE) alapuló méréseket végeztünk két mintáról: 1,5 mM β -CD/1,5 mM Dpx és 2,1 mM γ -CD/0,9 mM Dpx koncentrációarányú, savas (40 mM CD_3COOD) D_2O -os oldatokban. A NOE két, egymással térben elég közel lévő ($<5 \text{ \AA}$), nem ekvivalens magspinek keresztrelaxációban való megnyilvánulása, melynek intenzitása r^{-6} -nal arányos, ahol r a protonok átlagos távolságát jelöli [93, 116].

Mivel a CD komplexek oldatbeli mozgását jellemző τ_c korrelációs idő 600 MHz-en a NOE-t rendkívül rosszul detektálhatóvá (akár zérussá) teszi, a NOE keresztcsúcsokat ROESY mérésekkel kerestük. A 2D ROESY spektrumok 512 inkrementummal

készültek, 0,3 s-os keverési idővel, 2,2 kHz-es spinlock alkalmazásával.

A 600 MHz-en egymást átfedő NOE jelek elkülönítéséhez, szelektív 1D NOESY méréseket indítottunk ugyanezen mintákról a Richter Gedeon Nyrt. 800 MHz-es hármaszonanciára alkalmas $^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ krio mérőfejjel felszerelt Varian típusú NMR spektrométerén. A magasabb frekvencián a NOE-k a negatív tartományba esnek ami így tisztább spektrumot ad, a megfelelő 1D ROESY mérésekhez képest. Elvégeztük minden CD proton jelének szelektív inverzióját 50 Hz széles q3 pulzusok 72 ms-ig tartó alkalmazásával. Mivel 800 MHz-en a T_1 relaxációs idők hosszabbakká válnak, ezért a keverési időt 400-tól 900 ms-ig terjedő tartományban alkalmaztuk. Korábbi megfigyelésekhez hasonlóan a NOE-t $t_{\text{mix}} = 0,6$ s (β -CD esetén) és 0,9 s (γ -CD esetén) keverési idők alkalmazásával vizsgáltuk, és értelmeztük [116].

Az ODMCM- γ -CD és a racém Dpx kölcsönhatását ^1H , és 2D ROESY NMR mérésekkel is vizsgáltuk. Az oldatokat a CE mérésben használt oldatokkal megegyezően készítettük el deuterált oldószer alkalmazásával. 20 mM KH_2PO_4 -ot oldottunk D_2O -ban, az oldatot két részre osztottuk, majd $\text{pH}^* 2,5$ -re és $\text{pH}^* 7,0$ -ra állítottuk be 20 m/m% DCl és 1 M NaOD felhasználásával. Az oldatokban 4 mM-nyi mennyiségben oldottuk az ODMCM- γ -CD-t, majd a pH-t újból beállítottuk, és ezekben az oldatokban oldottuk a racém Dpx-t (~1:4 Dpx : ODMCM- γ -CD arányban oldódott). Az ^1H NMR spektrumban az enantiomerek jelhozrendelését a racém oldathoz utólagosan adott (*S*)-Dpx segítségével végeztük el.

3.3.4 Cirkuláris dikroizmus és UV spektroszkópiás mérések

A cirkuláris dikroizmus és UV abszorpciós spektrumokat termosztált körülmények között ($25 \pm 0,2$ °C) JASCO J-715 spektropolariméterrel regisztráltuk. Minden spektrumot folyamatos pásztázási módban 190–350 nm-es tartományban, 100 nm/perc sebességgel, 0,2 nm-es lépésekben, 1 s-os válaszadási idővel, négyszeres spektrum akkumulációval, 1 nm sávszélességgel és 1 cm-es úthosszal rendelkező kvarc küvettában (Hellma, USA) vettünk fel. A (*S*)-Dpx és a (*S*)-Dpx-CD komplexek spektrumait vak oldattal korrigáltuk. A titrálás során CD törzsoldatokat (β -CD: 15 mM; γ -CD: 70 mM) adagoltunk a Dpx vizes oldatához (1,8 ml: 23 és 30 μM). A cirkuláris dikroizmus mérése során az ellipticitást ($^{\circ}$) millifok egységekben mértük, majd átalakítottuk moláris cirkuláris dikroizmus abszorpciós együtthatóvá ($\Delta\epsilon: \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a $\Delta\epsilon = \Theta/(33982cl)$ egyenlet alapján, ahol ‘c’ a Dpx moláris koncentrációja és ‘l’ az optikai úthossz cm-ben kifejezve.

3.3.5 Molekulamodellezés

A számításokat a SYBYL 7.2 programmal végeztük [117]. A kiindulási CD modellek (β -CD: 3CGT; γ -CD: 1P2G) a Brookhaven fehérje adatbázisból (PDB) származnak [118-120]. A szerkezetek optimalizálásához MMFF94 erőteret használtunk [117]. A kiindulási szerkezetek geometria-optimalizálását BFGS algoritmussal végeztük, az optimum feltételeként az energiagradiens vektor normájának (RMS gradiens) a $< 0,01$ értéket szabtuk meg. A dielektromos állandónak a víz megfelelő értékét állítottuk be távolságfüggően ($\epsilon = 78,3$). A nem-kovalens kölcsönhatásokat $8,0 \text{ \AA}$ hatótávolsáig vettük figyelembe. A hidrogén-híd képző atomok esetében a Van der Waals sugarakra $0,7$ -es szorzótényezőt alkalmaztunk. A molekuladinamikai számítások esetében a részecskeszám, a térfogat, és a hőmérséklet ($T = 298 \text{ K}$) állandó volt (NVT, kanonikus környezet). A szimuláció időtartama a CD komplexek esetében 1000 fs , a Dpx esetén 5000 fs volt ($1,0 \text{ fs}$ lépésközzel és $5,0 \text{ fs}$ -kénti mintavétellel). Az így kapott szerkezeteket az egyes komplexekre – amelyek a vendégmolekula és a CD különböző konformációit ill. azokon belül a vendégmolekula különböző térbeli orientációs lehetőségeit reprezentálják – és a vendégmolekulát nem tartalmazó CD-kre (minden esetben 201 szerkezetet) a kiindulási szerkezetekkel azonos feltételek szerint újra optimalizáltuk. Az optimalizálást elvégeztük a Dpx 1001 db konformerére is. Az optimalizált szerkezetek energiaértékei alapján a kölcsönhatási energiák számításához a legalacsonyabb energiájúakat vettük figyelembe. A grafikus megjelenítéshez UCSF Chimera szoftvert használtunk [121].

3.3.6 Kapilláris elektroforézis vizsgálatok

A CE méréseket diódasoros detektorral felszerelt Agilent 7000 (Agilent Technologies, Waldbornn, Németország) kapilláris elektroforézis készülékkel végeztük el, az eredmények kiértékeléséhez Chemstation szoftvert használtunk. Az elválasztáshoz kezeletlen szilika kapillárist ($50 \mu\text{m}$ belső átmérőjű, $58,5 \text{ cm}$ teljes és 50 cm effektív hossz; Agilent) használtunk. Az új kapillárisok kondicionálását 1 M NaOH - (30 perc), majd $0,1 \text{ M NaOH}$ -oldattal (30 perc) végeztük el. Minden egyes mérés előtt prekondicionálásként $0,1 \text{ M NaOH}$ -oldattal (2 perc), vízzel (2 perc) végül pedig a megfelelő háttérelktrólittal (3 perc) mostuk a kapillárist. A kapilláris hőmérsékletét $20 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra állítottuk be. A mérések során 30 kV feszültséget alkalmaztunk, a jeleket

200 nm-es hullámhosszon detektáltuk. A mintákat hidrodinamikus injektálási módban (40 mbar \times 3 s) juttattuk a kapillárisba. Futató pufferként 20 mM-os foszfát-puffereket alkalmaztunk, pH 2,5-ön (készült: 20 mM foszforsav- (85 %) és 1 M-os NaOH-oldattal) és pH 7,0-en (20 mM Na₂HPO₄ oldat foszforsavoldat (85 %) hozzáadásával). A háttéreelektrolit 1–10 mM-os koncentrációban tartalmazott ODMCM- γ -CD-t. Az oldat pH-ját a megfelelő mennyiségű CD hozzáadása után ismét be kellett állítani. A racém Dpx és dezmetil-metabolitjai felhasználásával 1 mg/ml-es metanolos törzsoldatokat készítettünk, melyet vízzel ötszörösére hígítottunk, és így használtuk fel a CE mérések során.

A csúcsfelbontást (R_s) az alábbi képlet alapján számítottuk:

$$R_s = \frac{2(t_R - t_S)}{w_R + w_S} \quad (14)$$

ahol t_R és t_S az enantiomerek migrációs idői, w_R és w_S az enantiomerek csúcsának extrapolált szélessége az alapvonalon.

4 Eredmények

4.1 A dapoxetin új gyártási szennyezője

A szakirodalomban a Dpx szintézisének utolsó lépését általában a bevezetőben említett mezilátképzési reakción (5. ábra) keresztül valósítják meg. A reakciólépés nagy előnye, hogy az *N*-dezmetil-származékok előállítására is alkalmas, hiszen ugyanazon reakciókörülmények – között dimetil-amin helyett metil-amint vagy ammóniát alkalmazva – a megfelelő dezmetil vegyületekhez juthatunk. Kezdeti célunk volt tehát a mezilát (2), mint közös intermedier izolálása, és a felvázolt reakció szerint a dezmetil-metabolitok előállítása.

4.1.1 Szintézis és izolálás

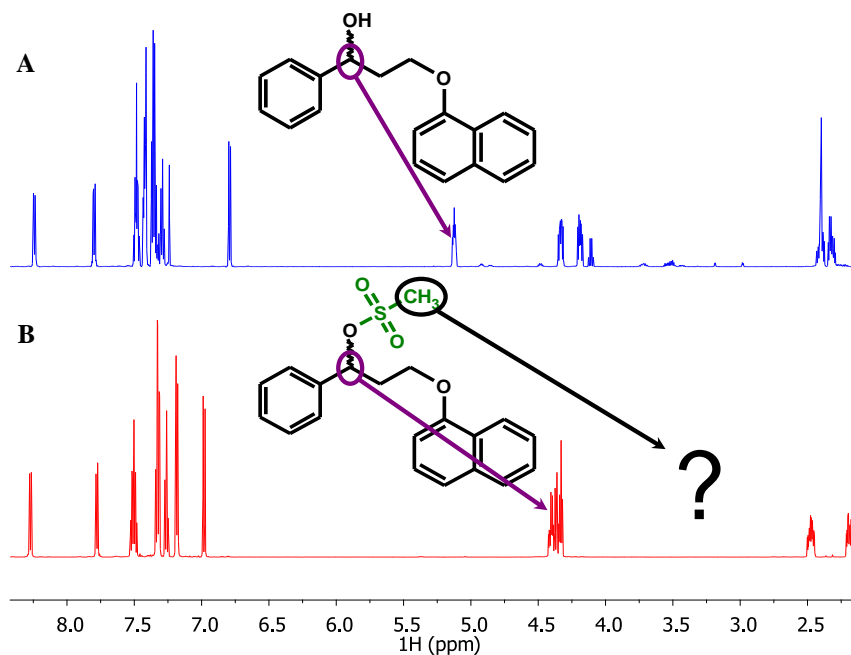
Nitrogén-atmoszféra alatt bemért 3-(1-naftiloxi)-1-fenil-propán-1-ol (1) (1,9 mmol), Et₃N (2,9 mmol) és DMAP katalizátor (8,2 μmol) CH₂Cl₂-os (8 ml) oldatához 0°C-on hozzáadtuk részletekben a MsCl-t (2,5 mmol) és 2 órán át kevertettük ugyanezen a hőmérsékleten, majd – az intermedier izolálása miatt az irodalomtól eltérően – szobahőmérsékleten, további 19 órán át. A reakció végbemenetelét VRK-val ellenőriztük (*n*-hexán:EtOAc (9:1) eleggyel). A kiindulási alkoholhoz (1) képest a VRK-n jól megfigyelhetően egy sokkal apolárisabb terméket kaptunk magas retenciós értékkel (kiindulási anyag $R_f = 0,12$; termék $R_f = 0,64$). A reakcióhoz további CH₂Cl₂-t (30 ml) adtunk, és extraháltuk HCl-oldattal (2 x 20 ml, 0,5 M), majd telített NaHCO₃-oldattal (2 x 20 ml) és vízzel (2 x 20 ml) mostuk. Vízmentes Na₂SO₄-on szárítottuk, szűrtük, és bepároltuk. A kapott 0,65 g nyersanyagot szilikagéllen oszlopkromatográfiásan tisztítottuk *n*-hexán:CH₂Cl₂ (9:1) eluenssel, míg végül 0,34 g (67,3 %) tiszta végtermékhez jutottunk, amiről MS és NMR spektrumokat készítettünk.

4.1.2 Szerkezetfejtés

A nagyfelbontású TOF-MS mérés eredménye alapján ($m/z = 261,1282$) a vegyület molekulaképlete [M] = C₁₉H₁₆O-nak feleltethető meg. Ennek tömege megegyezik a Dpx illetve metabolitjai fő fragmensionjának tömegével, mely egy alkil-amino/aminocsoport semleges vesztesével magyarázható. [122, 123]. Az MS adatokból arra

következtethetünk, hogy a kiindulási alkohol (**1**) C1 szénatomján történhetett változás. Bár a tervezett mezilát (**2**) molekulaionját nem detektáltuk, mégsem zárhattuk ki a metilszulfonil-csoport ionforrásban történő disszociációját, hiszen ekkor szintén $[M]^+ = C_{19}H_{17}O$ összegképeletű, pozitív módban jól detektálható fragmension keletkezne.

A pontos szerkezet megfejtéséhez ezért NMR vizsgálatokat végeztünk. Az izolált vegyület 1H NMR spektrumában a mezilát karakterisztikus metil-jele (s, 3H) nem jelent meg (14. ábra). A képződött vegyület 1H spektrumát összevettük a kiindulási alkoholéval, (**1**) (14. ábra) és megállapítottuk, hogy az alifás tartományban a metinproton kémiai eltolódása 0,84 ppm-mel lecsökkent. Ezt a változást az elektronszívó hidroxilcsoport hiánya okozhatta. A kiindulási alkohol (**1**) tehát egyértelműen átalakult a reakcióban, de nem a tervezett meziláttá (**2**).

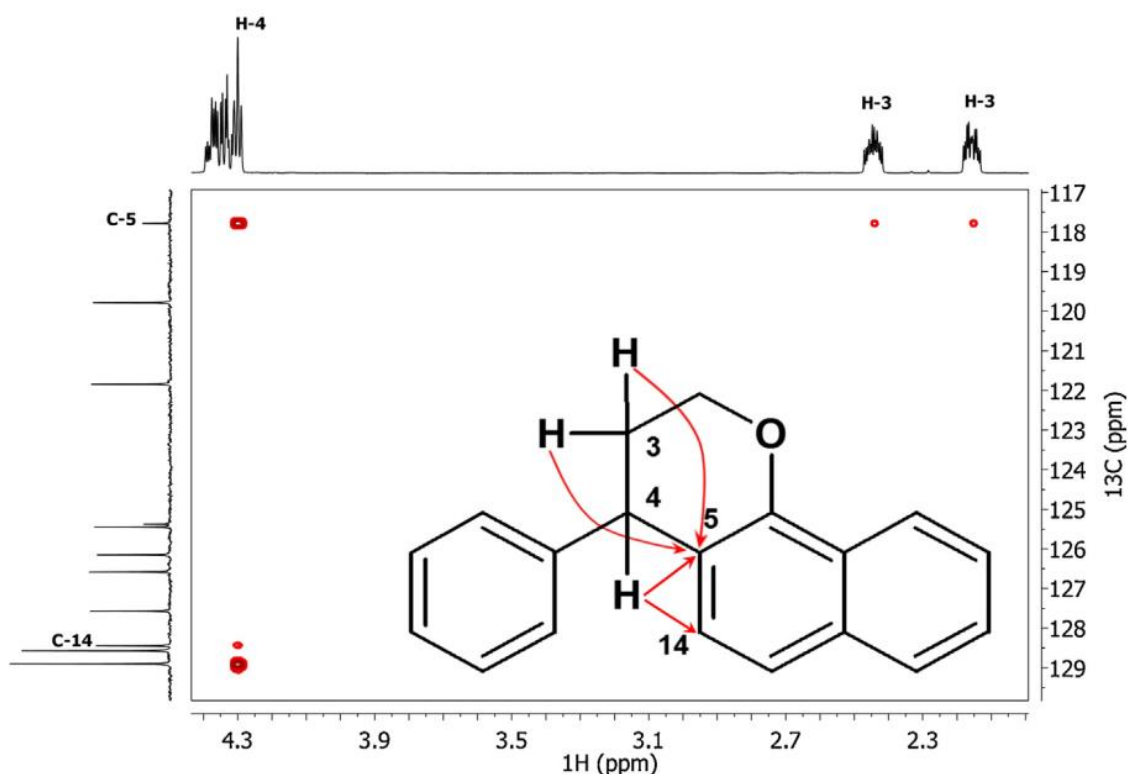


14. ábra. A A) kiindulási alkohol (**1**) és a B) mezilezési reakció termékének 1H -NMR spektruma

Az 1H spektrum aromás tartományában szintén eltérést találtunk, mivel – a mezilát alapvázát feltételezve – 12 aromás hidrogén helyett csak 11 aromás jelet láthattunk. Ez az aromás molekularészek érintettségét jelenti a szerkezeti átalakulásban. Az APT spektrum segítségével egy aromás CH hiányát és 117,78 ppm-nél egy új aromás kvaterner szén jelét detektáltuk. NMR méréseink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy ezen szerkezeti változások egy gyűrűzárási reakcióval lehetnek összhangban, mely során

egy új szén-szén kötés alakul ki az alifás oldalláncban lévő metin és a naftilgyűrű *orto*-helyzetű szene között.

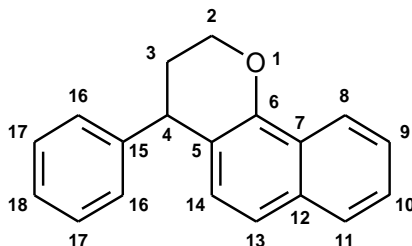
A gyűrűzárt termék szerkezetét HMBC-spektrummal igazoltuk (15. ábra), ahol intenzív, több kötésen keresztüli ^1H - ^{13}C korreláció figyelhető meg az alifás H-3 metilénhidrogének és a naftilgyűrű C-5-ös ($^3J_{\text{C,H}}$) helyzetű szénatomja között, illetve két- és három kötésen keresztüli korreláció figyelhető meg az alifás H-4 metinproton és a naftilgyűrű C-5-ös ($^2J_{\text{C,H}}$) és C-14-es ($^3J_{\text{C,H}}$) szene között.



15. ábra. ^1H - ^{13}C gbsHMBCAD spektrumrészlet, mely a 4-fenil-2*H*,3*H*,4*H*-nafto[1,2*b*]pirán szerkezetfejtése szempontjából legfontosabb, több kötésen keresztüli korrelációkat mutatja be.

Az elvégzett kétdimenziós mérések segítségével egyértelműen bizonyítottuk, hogy a képződött termék a 4-fenil-2*H*,3*H*,4*H*-nafto[1,2*b*]pirán (**24**), melynek teljes proton és szén jelhozzárendelése az 2. táblázatban látható.

2. táblázat. A dapoxetin gyártási szennyezője, a 4-fenil-2*H*,3*H*,4*H*-nafto[1,2*b*]pirán (**24**) számozása és teljes ¹H és ¹³C NMR jelhozzárendelése CDCl₃ oldószerben, 600 MHz-en (m: multiplett; d: dublett; t: triplett).



Sorszám	¹ H, δ (ppm, multiplicitás)	¹³ C, δ (ppm)	APT
2	4,39–4,35 (m, 1H)	63,95	CH ₂
	4,35–4,32 (m, 1H)		
3	2,47–2,41 (m, 1H)	31,97	CH ₂
	2,18–2,12 (m, 1H)		
4	4,30 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H)	41,05	CH
5	-	117,78	C
6	-	150,50	C
7	-	125,37	C
8	8,28–8,19 (m, 1H)	121,85	CH
9	7,50–7,44 (m, 1H)	125,44	CH
10	7,50–7,44 (m, 1H)	126,15	CH
11	7,78–7,71 (m, 1H)	127,57	CH
12	-	133,61	C
13	7,28 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	119,79	CH
14	6,95 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	128,45	CH
15	-	146,04	C
16	7,15 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H)	128,90	2CH
17	7,29 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H)	128,57	2CH
18	7,22 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H)	126,58	CH

4.2 A dapoxetin új bomlástermékei

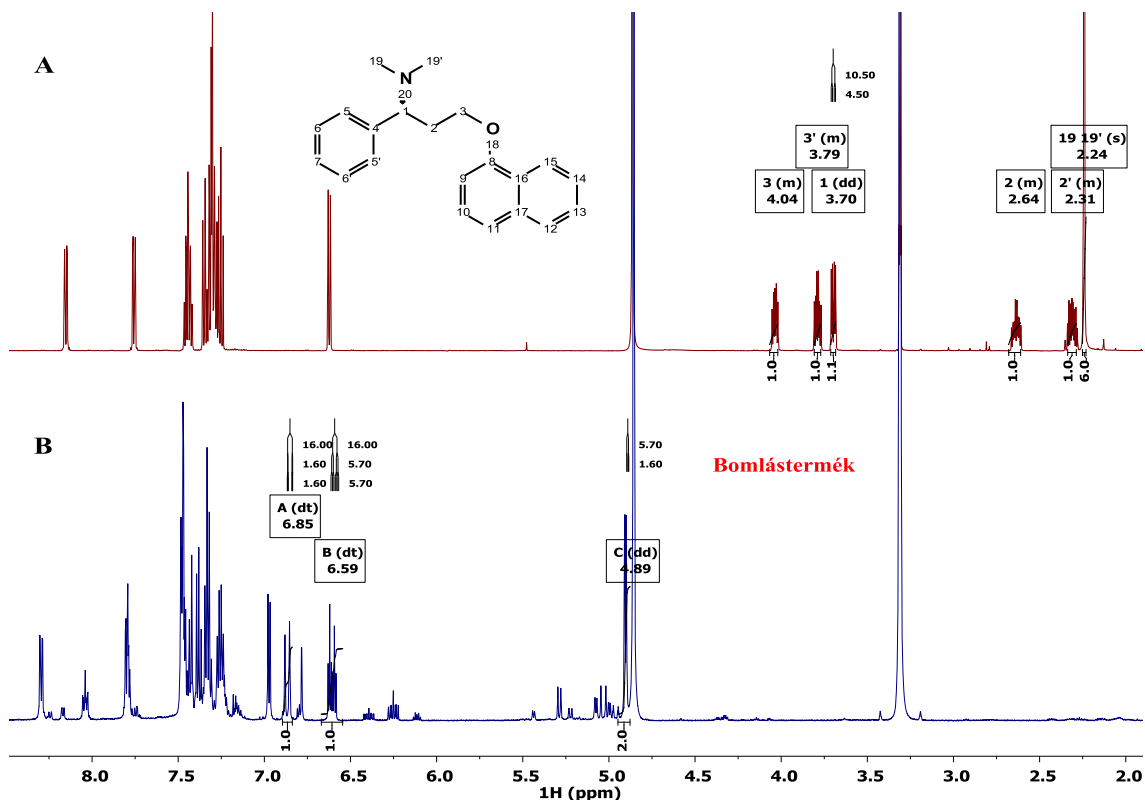
4.2.1 Izolálás

A 3.1.1 fejezetben ismertetett módon előállított szintelen, olajszerű Dpx bázist néhány héten át szabad levegőn és szobahőmérsékleten tároltuk. A tisztaság ellenőrzését VRK vizsgálattal végeztük el (CH₂Cl₂:MeOH; 10:1 eluenssel). A rétegen a Dpx foltja mellett néhány új, UV fényben jól látható bomlástermék sávja jelent meg, ahol a főtermék *R_f* értéke 0,9-nek adódott. Az oszlopkromatográfiás tisztítás után (CH₂Cl₂:MeOH; 10:1 eluenssel) ennek a bomlásterméknek, mint egy, a tárolás során is keletkező szennyezőnek az analitikai jellemzését tűztük ki célul.

4.2.2 Szerkezetfejtés és a bomlási reakcióút bizonyítása

A tisztítás után TOF-MS méréseket végeztünk a vegyület pontos tömegének és elemi összetételének a megállapítására. A pozitív ionizációs módban felvett nagyfelbontású MS spektrum alapján a fajlagos tömeg $[M+H]^+ = 261,1274$ m/z-nek adódott, ami az $[M] = C_{19}H_{16}O$ molekula összegképletének volt megfeleltethető. Ez az összegképlet megegyezik a Dpx és dezmetil-metabolitjainak valamint a Dpx-*N*-oxid [14] jellemző fragmensionjának összegképletével, ami a dimetil-aminocsoport semleges vesztésével jön létre az ionizáció során [122, 123]. Az MS adatok alapján a Dpx 1-es pozíciója mindenképpen részt vesz az bomlástermék kialakulásában, de nem zárhattuk ki a $[M]^+ = C_{19}H_{17}O$ összegképlettel rendelkező, így könnyen kimutatható benzilkationt sem, amely a dimetil-amin ionforrásban történő disszociációjakor keletkezhet mérési műtermékként. A Dpx MS spektrumát összehasonlítva az ismeretlen vegyület spektrumával további megállapításokat tehetünk: a szennyező spektrumából hiányzott a Dpx molekulaionjának megfeleltethető csúcs $[M+H]^+ = 306,1842$ m/z értékénél, és a korábban említett, közös $[M+H]^+ = 261,1274$ fragmensionként jelentkező csúcs intenzitása is sokkal alacsonyabb volt a Dpx ugyanezen fragmensének intenzitásához képest. A dimetil-aminocsoport hiányának bizonyítására, és a bomlástermék szerkezetének megfejtéséhez NMR méréseket végeztünk.

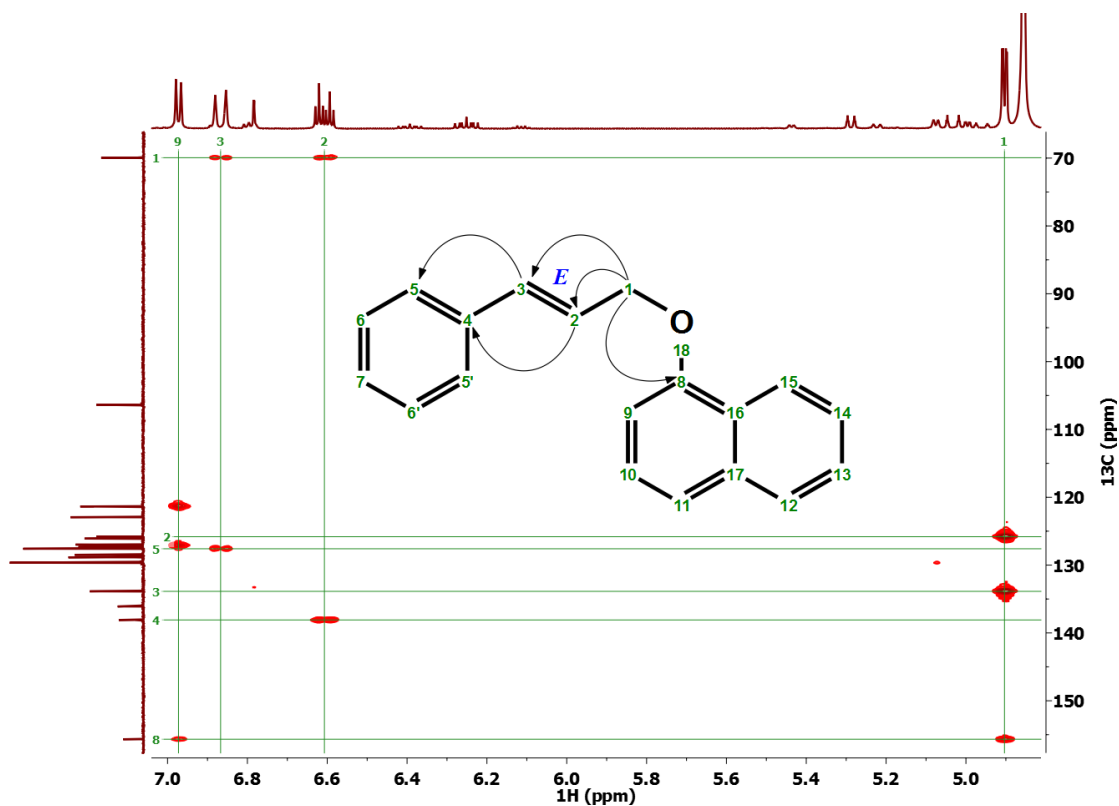
Az izolált vegyület ¹H NMR spektruma megerősítette a dimetil-aminocsoport hiányát, mivel – a Dpx ¹H NMR spektrumával összehasonlítva – nem tartalmazott *N*-metil jelet, mely Dpx esetén 2,24 ppm-nél 6H intenzitású szingulettként jelentkezett (16. ábra).



16. ábra. A Dpx (A) és izolált fő bomlástermékének (B) ^1H NMR spektruma MeOD- d_4 -ben felvéve

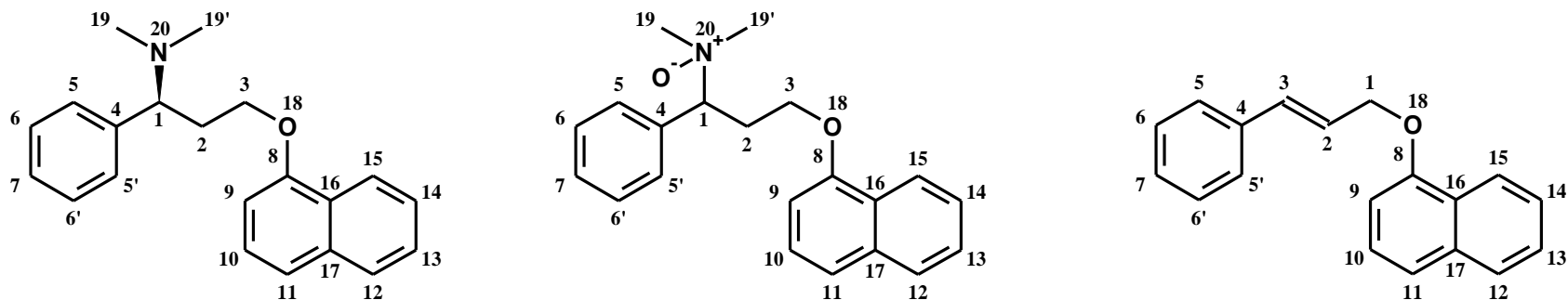
Ezen kívül további jelentős eltérések figyelhetők meg a bomlástermék ^1H NMR spektrumában: a Dpx H1 jelének (3,70 ppm) hiányát, valamint a két diasztereotóp metilén csoport eltűnését, és egy új, nem diasztereotóp metilén csoport megjelenését 4,89 ppm-nél. Az új CH_2 -csoport magas kémiai eltolódása feltehetően az aromás rendszerhez való közelségnek köszönhető. Az új vegyület spektrumának aromás tartományában 14 db protont találunk szemben a Dpx 12 db aromás jelével, ami az aromás részek átalakulásban való érintettségére utalhat. A két új aromás proton 6,85 ppm (dt) és 6,59 ppm-nél (dt) jelentkezett a spektrumban, legnagyobb $^3J_{\text{H,H}}$ csatolási állandójuk egyaránt 16 Hz. Mindkét proton csatol továbbá a magas eltolódású metilén csoporttal 1,6 Hz ($^4J_{\text{H,H}}$) és 5,7 Hz ($^3J_{\text{H,H}}$) csatolási állandóval. A háromtagú spinrendszert a csatolási állandókon túl a COSY spektrum is megerősítette. Ezek a spektrális változások egy olyan eliminációs reakcióval lehetnek összhangban, amely során egy új szén-szén kettős kötés keletkezik a Dpx C-1 és C-2-es szenei között, a 16 Hz-es csatolási állandó alapján *transz* geometriával. A feltételezett eliminációs szerkezet megerősítésére HSQC és HMBC méréseket végeztünk. A HSQC spektrumban szintén 14 aromás CH egységet detektáltunk, a HMBC spektrumban pedig korrelációkat mutattunk ki az éteres metilén és a láncban újonnan megjelenő C-3 ($^3J_{\text{C,H}}$) és C-2 ($^2J_{\text{C,H}}$) szenek között, valamint ezen új

CH jelek korrelációit a fenilgyűrű C-5 (${}^3J_{C-5,H-3}$) és C-4-es (${}^3J_{C-4,H-2}$) szeneivel, megerősítve ezzel egy új kettős kötés kialakulását az alifás szénláncban (17. ábra).



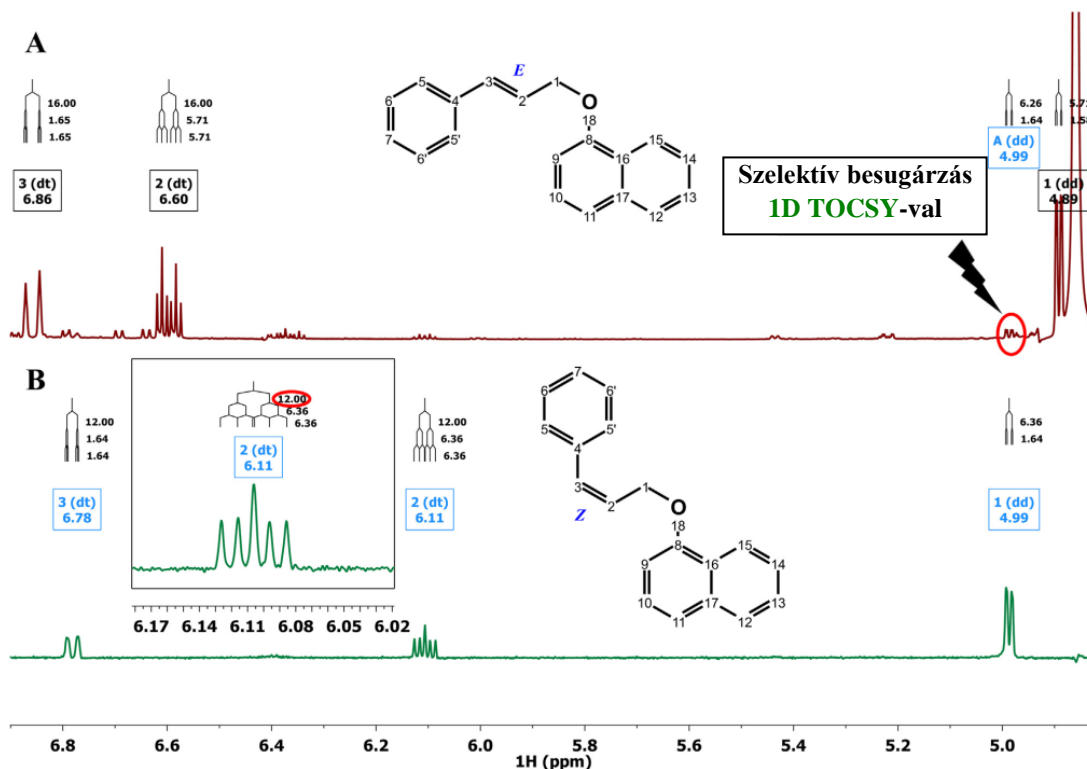
17. ábra. ${}^1\text{H}$ – ${}^{13}\text{C}$ gbsHMBCAD spektrumrészlet, amely a bomlástermék szerkezetfejtése szempontjából legfontosabb, több kötésen keresztüli korrelációkat mutatja be.

Az elvégzett kétdimenziós mérések segítségével egyértelműen bizonyítottuk, hogy a képződött termék az 1-(2*E*)-cinnamil-oxi-naftalin (*E*-CON, **25**), melynek teljes proton és szén jelhozzárendelése a 3. táblázatban látható.

3. táblázat. A dapoxetin és bomlástermékeinek a dapoxetin-*N*-oxidnak és az *E*-CON-nak a teljes ¹H és ¹³C jelhozzárendelése 600 MHz-en CD₃OD oldószerben.

Sorszám	Dapoxetin bázis (3)		Dapoxetin- <i>N</i> -oxid (15)		1-(2 <i>E</i>)-Cinnamil-oxi-naftalin (<i>E</i> -CON, 25)	
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	3,70 (dd, $J = 10,5; 4,5$ Hz, 1H)	69,23	4,68 (dd, $J = 11,6; 3,1$ Hz, 1H)	81,92	4,89 (dd, $J = 5,7; 1,6$ Hz, 2H)	69,94
2	2,64 (m, 1H)	33,73	3,22 (m, 1H)	29,67	6,59 (dt, $J = 16,0; 5,7$ Hz, 1H)	125,82
3	2,31 (m, 1H)	66,55	2,77 (m, 1H)	66,34	6,85 (dt, $J = 16,0; 1,6$ Hz, 1H)	133,87
	4,04 (m, 1H)		4,17 (m, 1H)			
4	3,79 (m, 1H)	139,66	3,83 (m, 1H)	135,23	-	138,09
	-		-			
5, 5'	7,30 (m, 2H)	130,02	7,62 (m, 2H)	131,86	7,47 (m, 2H)	127,59
6, 6'	7,31 (m, 2H)	129,44	7,43 (m, 2H)	130,01	7,33 (m, 2H)	129,65
7	7,27 (m, 1H)	128,84	7,44 (m, 1H)	130,99	7,24 (m, 1H)	128,86
8	-	155,71	-	155,45	-	155,67
9	6,62 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H)	105,63	6,65 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H)	105,60	6,96 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H)	106,37
10	7,25 (dd, $J = 8,2; 7,6$ Hz, 1H)	126,93	7,25 (dd, $J = 8,3; 7,6$ Hz, 1H)	126,85	7,37 (dd, $J = 8,3; 7,5$ Hz, 1H)	126,98
11	7,35 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	121,11	7,35 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H)	121,36	7,43 (dd, $J = 8,3; 1,0$ Hz, 1H)	121,35
12	7,76 (dm, $J = 7,7$ Hz, 1H)	128,45	7,75 (dm, $J = 8,1$ Hz, 1H)	128,37	7,80 (dm, $J = 7,5$ Hz, 1H)	128,48
13	7,45 (m, 1H)	122,83	7,45 (m, 1H)	127,32	7,45 (m, 1H)	126,10
14	7,43 (m, 1H)	126,01	7,40 (m, 1H)	126,04	7,47 (m, 1H)	127,32
15	8,15 (dm, $J = 7,9$ Hz, 1H)	127,28	8,02 (dm, $J = 8,3$ Hz, 1H)	122,93	8,29 (dm, $J = 7,8$ Hz, 1H)	122,94
16	-	126,91	-	126,77	-	127,12
17	-	135,98	-	135,92	-	136,10
19	2,24 (s, 6H)	43,03	3,19 (s, 3H)	58,99	-	-
19'	-	43,03	3,03 (s, 3H)	55,40	-	-

Az *E*-CON szerkezetének megfejtése után feltételeztük a *Z* geometriai izomer kialakulását is, ami képződhet az *E*-CON-nal való egyensúlyi reakcióban, vagy ha az eliminációs reakció az alifás lánc kedvezőtlenebb konformációjában valósul meg. Az ^1H NMR és HSQC spektrumon sikerült azonosítani a kis mennyiségben jelen lévő *Z* izomert is. Az ^1H NMR spektrumban 4,99 ppm-nél jelentkezik a minor izomer karakterisztikus metilénjele, amely mind multiplicitásában (dd), mind csatolási állandóiban (6,4 és 1,6 Hz) összevethető volt az *E*-CON 4,89 ppm-nél található jelével (18. ábra). A spinrendszer további protonjának feltérképezésére és a sztereoizoméra igazolására 1D TOCSY kísérletet végeztünk a 4,99 ppm-nél található metilénsoport szelektív besugárzásával (18. ábra). A TOCSY spektrumon a H-3 és H-2 közötti $^3J_{\text{H,H}}$ csatolási állandó értéke – az *E*-CON-nál mérthez képest alacsonyabbnak – 12 Hz-nek adódott, ami a *cisz* geometriát egyértelműen bizonyította (18. ábra).



18. ábra. Az *E*-CON ^1H NMR spektrumának részlete (A), valamint a *Z*-CON H-1 protonjának szelektív besugárzásával nyert 1D TOCSY spektruma (B) kiemelve a geometria meghatározása szempontjából fontos *Z*-CON H-2-es protonja a csatolási állandókkal.

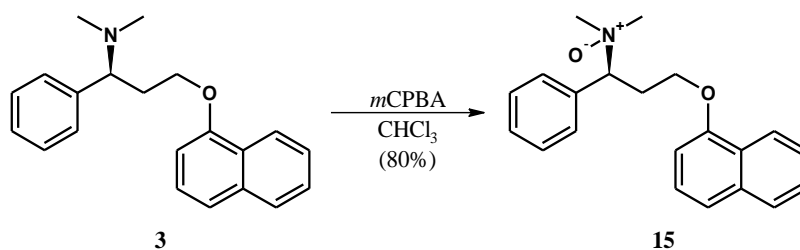
A szerkezetek megfejtése után a bomlási reakció magyarázatát és kísérletes alátámasztását kívántuk elvégezni.

Az leggyakoribb amin-eliminációs reakciók Hofmann illetve Cope eliminációként ismertek a szakirodalomban [124, 125]. A klasszikus körülmények között végzett

Hofmann elimináció során az aminokat először kvaterner ammónium-jodid sóvá alakítják metil-jodiddal végzett „kimerítő metilezés”-sel, majd E2 eliminációs mechanizmus szerinti reakcióban ezüst-oxiddal történő hevítés során alkén és tercier amin termékek keletkeznek [124]. A Cope elimináció pedig tercier aminokból előállított *N*-oxidok regioselektív *syn* eliminációs reakciója (E_i), amiben – általában melegítés hatására – alkén és hidroxil-amin képződik [125]. A tercier amin oxidálásához leggyakrabban *meta*-klórperbenzoesavat (*m*CPBA) használnak. A Cope elimináció végbemehet hőközlés nélkül is, akár szilárd fázisban szobahőmérsékleten, vagy THF-os illetve DMSO-os oldatban egyaránt [126]. A tercier amin funkcióval rendelkező Dpx esetén a Hofmann eliminációval (a szerkezeti feltételek és a reakciókörülmények hiánya miatt) nem számolhattunk, viszont a Cope elimináció megvalósulhat a Dpx levegőn való oxidációja során Dpx-*N*-oxid képződésén keresztül a dimetil-hidroxil-amin szobahőmérsékleten bekövetkező spontán eliminációjával.

A feltételezett bomlási útvonal bizonyításához az irodalomban általánosan használt *m*CPBA segítségével első alkalommal állítottuk elő a Dpx-*N*-oxidot, és jellemeztük NMR-rel (3. táblázat).

Dapoxetin-N-oxid (15) szintézise



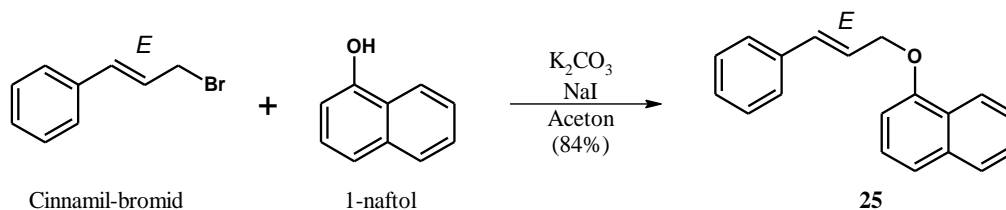
19. ábra. A Dpx-*N*-oxid szintézise

(*S*)-Dpx-t (62 μ mol) oldottunk CHCl_3 -ban (2 ml), majd 0°C -ra hűtöttük és lassan, cseppenként hozzáadtuk az *m*CPBA (99 μ mol) CHCl_3 -os (3 ml) oldatát. A reakcióelegyet 24 órán át szobahőmérsékleten kevertettük, majd az reakció végbemenetelét VRK-val, CH_2Cl_2 :MeOH (10:1) eluensben futtatva ellenőriztük ($R_{fDpx} = 0,0$; $R_{fDpx-N-oxid} = 0,1$; $R_{fmCBA} = 0,5$). A nyers keveréket 0,5 ml-re bepároltuk, majd preparatív VRK-val tisztítottuk CH_2Cl_2 :MeOH (10:1) eluens alkalmazásával. Az elkülönülő két fő terméket ($R_{fDpx-N-oxid} = 0,2$; $R_{fmCBA} = 0,6$) a rétegről lekapartuk és a szilikagélről zsugorüvegszűrőn át CHCl_3 -mal lemostuk. Bepárlás után 16,8 mg (80 %) kékes színű olajos anyagot (**15**) kaptunk (19. ábra). A részletes ^1H és ^{13}C NMR adatokat a 3. táblázat tartalmazza.

HRMS (ESI): $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ számított: 322,1880 mért: 322,1885

A fő bomlásterméket (*E*-CON) egy független reakció úton szintén előállítottuk a szintetizált és az izolált *E*-CON spektrumainak összehasonlításához, a szerkezetfejtés független megerősítéséhez és standardként való felhasználáshoz.

1-(E)-cinnamil-oxi-naftalin (E-CON, 25) szintézise



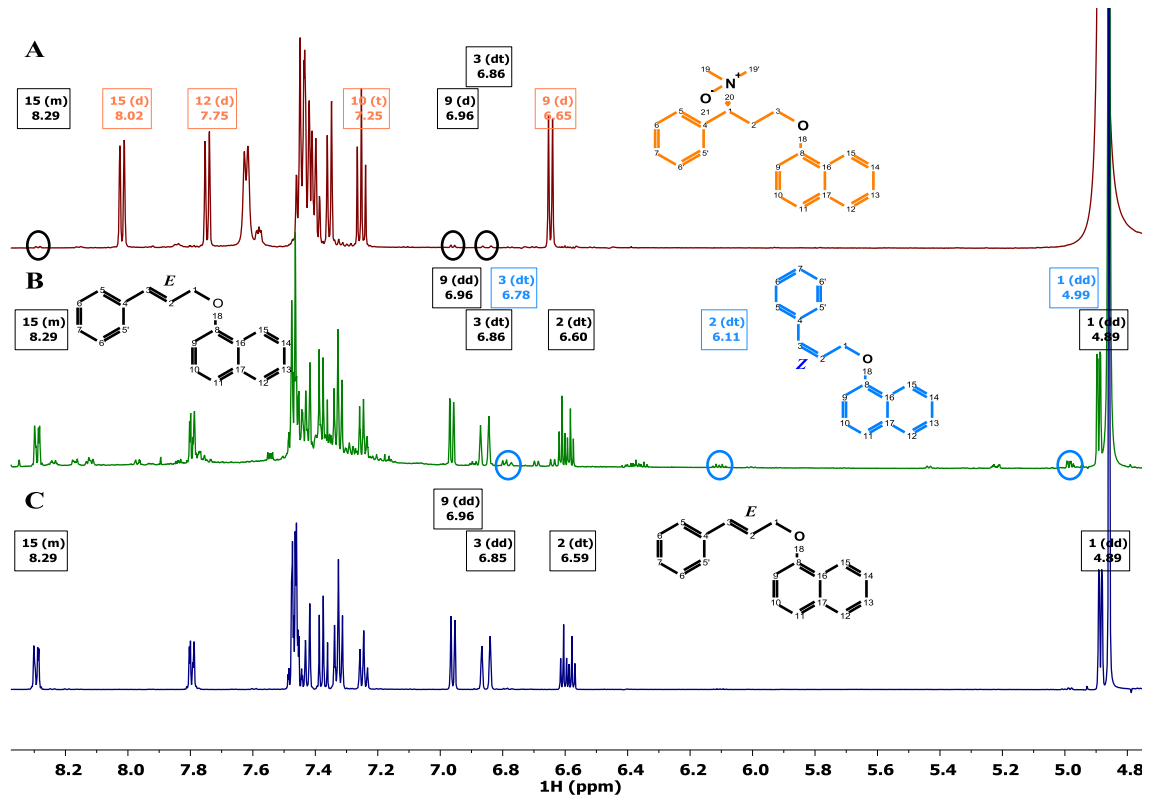
20. ábra. Az *E*-CON szintézise

1-naftolt (3,0 mmol), cinnamil-bromidot (3,6 mmol), vízmentes K_2CO_3 -ot (9,0 g) és NaI-ot (0,24 g) forraltunk 8 órán át vízmentes acetonban nitrogén-atmoszféra alatt. A reakcióelegyet lehűtöttük, megszürtük, és az oldatot bepároltuk. A reakció feldolgozása során a nyersterméket CH_2Cl_2 -nal (2 x 25ml) és vízzel (2 x 25ml) rázótolcsérben extraháltuk, majd az egyesített szerves fázist vízmentes MgSO_4 -on szárítottuk, szűrtük, és bepároltuk. A szilikagélen *n*-hexán: CH_2Cl_2 (9:1) eluenssel végzett oszlopkromatográfiás tisztítás után 0,66 g (84 %) fehér kristályos anyaghoz (**25**) jutottunk (20. ábra).

HRMS (ESI): $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ számított: 261,1274 mért: 261,1269

Az izolált *E*-CON-nal megegyező ^1H és ^{13}C NMR kémiai eltolódásokat a 3. táblázat tartalmazza.

A 21. A ábrán a frissen előállított Dpx-*N*-oxid ^1H NMR spektrumának részlete látható, míg a 21. B ábra a néhány napig szobahőmérsékleten tárolt minta spektrumát mutatja. Jól látható, hogy a tárolás során a Dpx-*N*-oxid teljesen átalakult *E*-CON-ná, és a kis mennyiségű *Z*-CON geometriai izomer jelenléte is igazolható volt (kék körök). A keletkező bomlástermék spektruma teljesen megegyezett a szintetizált *E*-CON spektrumával (21. C ábra).



21. ábra. (A) A frissen szintetizált Dpx-*N*-oxid ^1H NMR spektrumának részlete, (B) a két hét levegőn és szobahőmérsékleten való tárolás utáni spektrum, mely egyértelműen jelzi a Dpx-*N*-oxid *E*-CON-ná és kis mennyiségben *Z*-CON-ná alakulását (kék körök). (C) a szintetizált *E*-CON ^1H NMR spektruma.

A Dpx-*N*-oxid szerkezeti instabilitását egyértelműen alátámasztja az, hogy már a frissen szintetizált minta ^1H NMR-spektrumán is megjelennek a bomlástermék *E*-CON karakterisztikus jelei (21. A ábrán fekete körök).

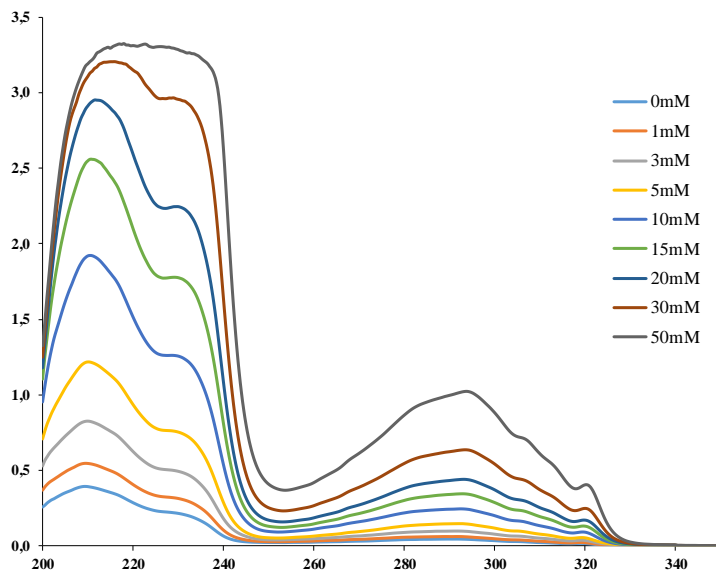
4.3 A dapoxetin ciklodextrinekkel kialakított kölcsönhatásának jellemzése

A dapoxetin és ciklodextrinek kölcsönhatása a szakirodalomban igen kevésbé ismert, mindössze két királis elválasztástechnikai példát találunk. Srinivasan és munkatársai enantioszelektív Dpx szintézisek követésére β -CD alapú Chiradex HR Lichrocart 250-4 királis HPLC oszlopot használtak [31, 32]. Ide sorolható továbbá a kutatócsoportunkban 2012-ben kidolgozott RAME- γ -CD-alapú királis CE módszer is, ahol $R_s = 7$ felbontási értéket sikerült elérni a Dpx enantiomerjeinek elválasztása során [7]. A Dpx natív β - és γ -CD-vel kialakított zárványkomplex-képzését már akkor sikerült kimutatnunk, de azóta sem történtek a komplexképzés egyensúlyi és szerkezeti részleteit feltáró vizsgálatok. Tekintettel arra, hogy a Dpx CD komplexei számos előnyös tulajdonsággal rendelkezhetnek (magnövekedett oldhatóság, kémiai stabilitás, biohasznosíthatóság), a továbbiakban a Dpx CD-vel kialakított komplexképzésének vizsgálatával folytattuk munkánkat.

Figyelembe véve a Dpx szerkezetét, a CD-k vendégmolekulát befogadó üregének méretét és korábbi CE vizsgálataink eredményeit, döntően a natív β - és γ -CD-t, valamint a királis elválasztást legsikeresebben megvalósító RAME- γ -CD-t (csak fázis-oldhatósághoz) választottuk ki a vizsgálatainkhoz.

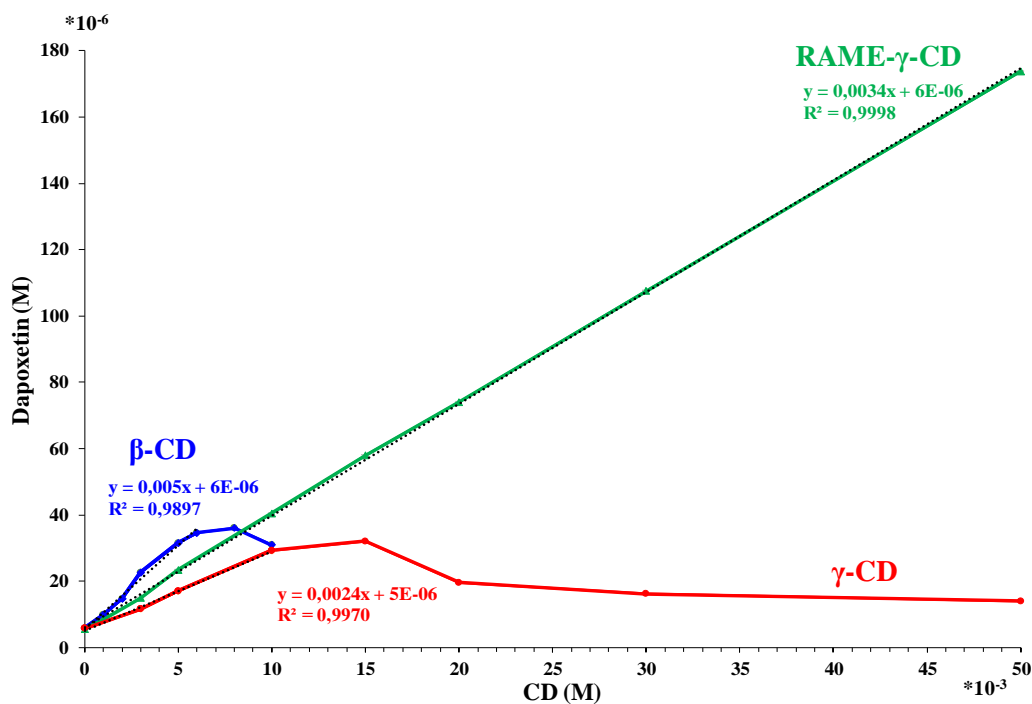
4.3.1 Fázis-oldhatósági vizsgálatok

A CD-k Dpx-re gyakorolt szolubilizáció-növelő hatását Higuchi és Connors módszerével vizsgáltuk (lásd: 3.2.1 fejezet). A 22. ábrán bemutatott UV-spektrumok jól illusztrálják a növekvő CD-koncentráció hatására bekövetkező oldhatóságnövekedést.



22. ábra. Különböző koncentrációjú RAME- γ -CD- hatása a Dpx oldhatóságára

A szolubilizált Dpx koncentrációjának abszorbancia adatokból történő meghatározásához kalibrációs egyenesre volt szükség. Az ehhez szükséges kalibráló oldatok pH 7,4-en nem készíthetők el a Dpx rossz oldhatósága miatt. A kalibrálás egyenest ezért a Dpx metanolos oldataival készítettük. A kalibrációs egyenes segítségével a pH 7,4-es közegben mért abszorbancia adatokat moláris koncentrációkra számoltuk át, és a 23. ábrán látható fázis-oldhatósági diagramokat szerkesztettük meg mindhárom vizsgált CD-re.



23. ábra. A Dpx fázis-oldhatósági diagrammjai natív β - és γ -CD, valamint RAME- γ -CD esetén pH 7,4-en

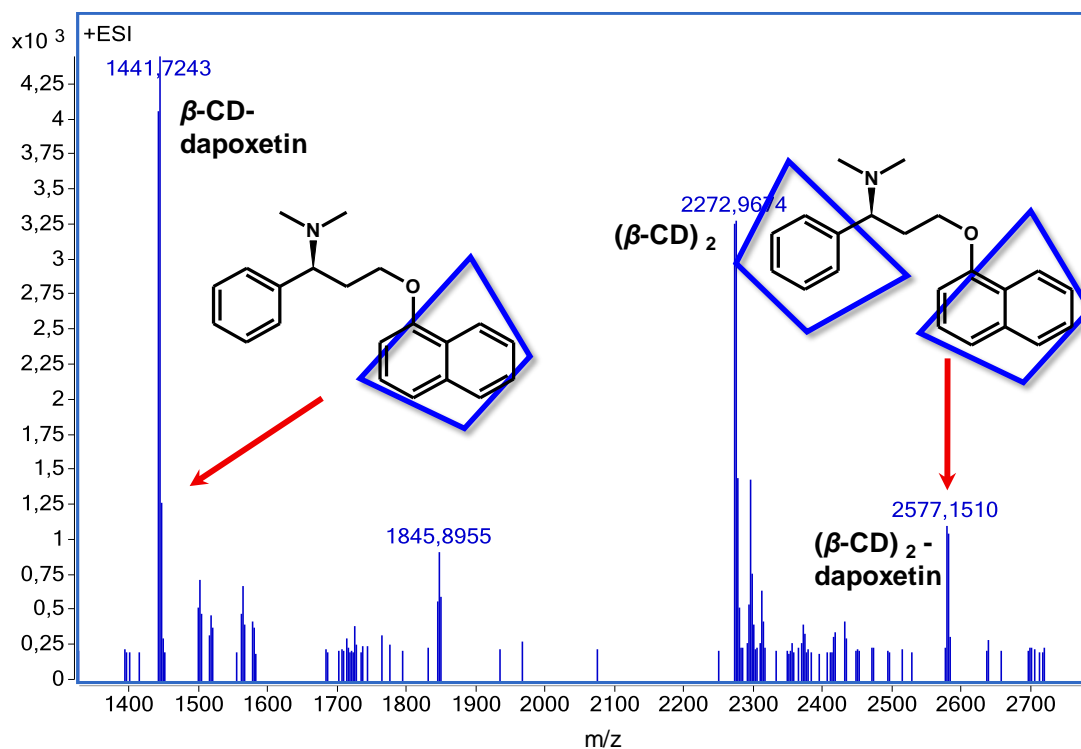
A natív CD-k használatakor a Dpx oldhatóságának monoton növekedése egy meghatározott koncentráció érték felett megszűnt, mert az oldatból a megkezdődött Dpx-CD komplex kiválása. Ez a jelenség gyakran megfigyelhető a szubsztituálatlan CD-k zárványkomplexei esetén [127]. Az oldhatóság a szubsztituált RAME- γ -CD esetén több, mint harmincszoros volt és lineáris (ún. A_L -típusú görbe) a vizsgált koncentrációtartományban. A natív CD-k esetén B_S -típusú görbéket kaptunk, melyek a maximumuknál a β -CD esetén hatszoros, a γ -CD esetén pedig ötszörös oldhatóság-növekedést mutattak. Az A_L -típusú görbe meredeksége és a B_S -típusú görbék kezdeti lineáris szakaszának meredeksége egyaránt kisebb mint egy, ami mindhárom esetben 1:1-es sztöchiometriára utalt [83]. A Dpx 1:1 sztöchiometriájú CD komplexeinek stabilitási állandóját (K_{11}) a következő egyenlet segítségével számíthatjuk ki a fázis-oldhatósági diagramból [83]:

$$K_{11} = \frac{\text{tg}\alpha}{c_{\text{Dpx}_0}(1 - \text{tg}\alpha)} \quad (15)$$

ahol c_{Dpx_0} a tengelymetszeten leolvasható Dpx intrinsic oldhatósága pH 7,4-en, $\text{tg}\alpha$ pedig az egyenlet meredeksége. A legmagasabb stabilitási állandóval a β -CD komplexek rendelkeztek ($K_{11}=886 \text{ M}^{-1}$), majd ezt követte a RAME- γ -CD ($K_{11}=594 \text{ M}^{-1}$) és a γ -CD ($K_{11}=420 \text{ M}^{-1}$) komplexeinek stabilitási állandó értékei, melyek jól egyeznek a hidrofób, aromás gyűrű(ke)t tartalmazó vendégmolekulák CD-kel képzett komplexeire közölt korábbi adatokkal. Azonban a fázis-oldhatóságból számított K_{11} értékek általában látszólagosak, mivel a vendégmolekula oldhatóságát számos tényező befolyásolja a zárványkomplekképzés mellett, úgymint a rosszul oldódó vendégmolekulák önasszociációja, a CD/vendégmolekula komplexek aggregációja illetve más, nem komplexképzésen alapuló kölcsönhatások, esetleg micellaképződés [127]. A RAME- γ -CD esetén a K_{11} látszólagosságához még az is hozzájárul, hogy a RAME- γ -CD különböző metilezettségi fokú és szerkezetű CD-k keveréke. Ezért a stabilitási állandó pontosabb meghatározásához és a komplexképzés részletesebb tanulmányozásához MS, NMR, cirkuláris dikroizmus és UV spektroszkópiái vizsgálatokat végeztünk a natív CD-k esetén.

4.3.2 Tömegspektrometriás vizsgálatok

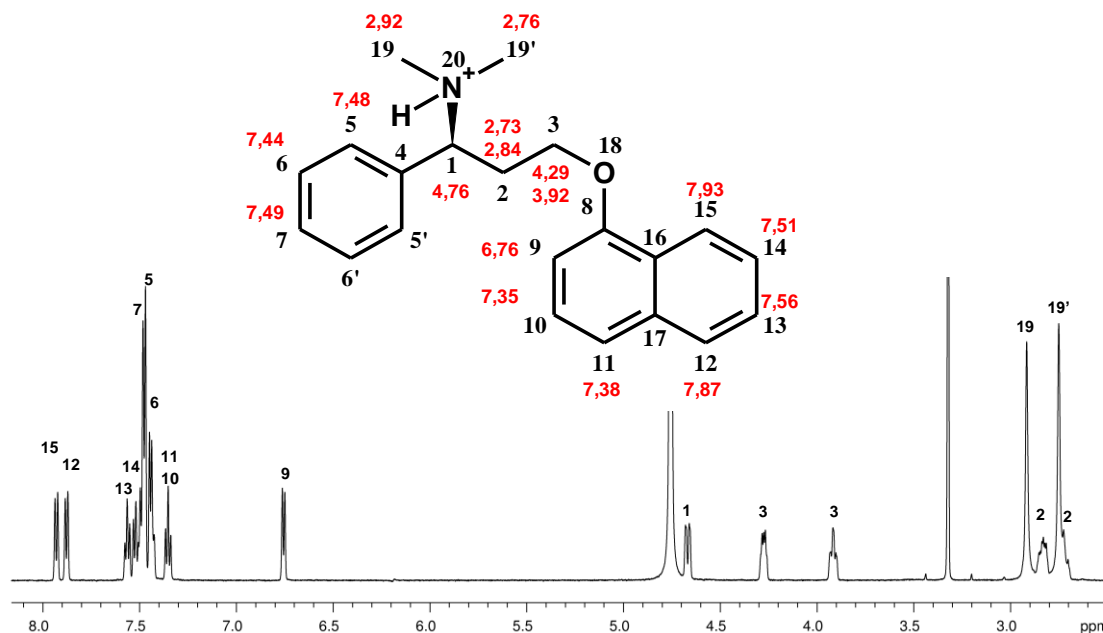
A Dpx-CD komplex sztöchiometriájának további vizsgálatára először ESI-MS méréseket végeztünk. A számunkra fontos 1200-2800 m/z spektrumtartományban az legintenzívebb 1:1 sztöchiometriájú komplex (1441,7243 m/z) csúcsa mellett a 1:2 komplex (2577,1510 m/z) fajlagos tömege is megtalálható, ami feltételezi, hogy a fenil- és a naftilgyűrű is képezhet komplexet egy-egy CD molekulával (24. ábra).



24. ábra. A Dpx-β-CD oldat pozitív módban felvett tömegspektrumának 1200-2800 m/z tartománya. Annak megerősítésére, hogy az ESI-MS körülmények között, gázfázisban detektált 1:2 sztöchiometriájú komplex valós, oldatfázisban is létező részecske (és nem a deszolvatáció során keletkezett), független módszerként oldatfázisú NMR vizsgálatokat végeztünk.

4.3.3 A dapoxetin natív CD-kel képzett komplexeinek NMR vizsgálata

Az NMR vizsgálatokat a Dpx ^1H NMR spektrumának jelhozzárendelésével kezdtük enyhén savas, D_2O -s oldatban metanolt alkalmazva referenciaként (3,32 ppm).



25. ábra. 3 mM-os Dpx oldat ^1H NMR spektruma és jelhozzárendelése savas D_2O -ban (40 mM CD_3COOD -at tartalmazó), 25°C -on, 600 MHz-en

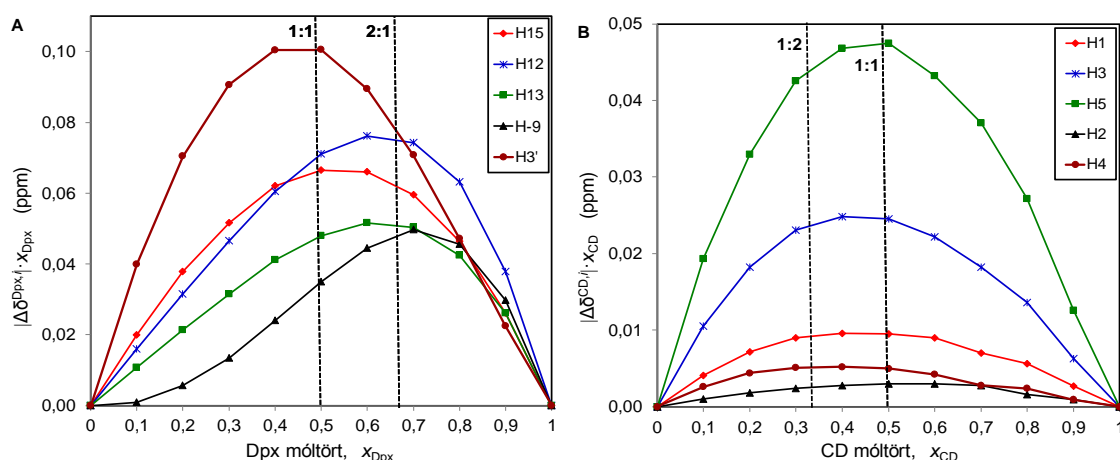
A Dpx ^1H NMR spektruma és homo-, illetve heteronukleáris 2D NMR mérésekkel megerősített jelhozzárendelése a 25. ábrán látható. A naftilgyűrű aromás protonjai (H9, H12 és H15), az alifás H1 metinproton, valamint a H19 és H19' metil protonok kémiai eltolódása CD-k jelenlétében is könnyen leolvasható. Tekintettel arra, hogy a fenil- és a naftil molekularészek ^1H NMR jelei a molekula különböző, CD-vel esetlegesen kölcsönható részein képesek „érzéklni” a kémiai környezet változását ezért a fenilgyűrű H5, H6 és H7 protonjainak kémiai eltolódását az erősen átfedő multiplettek miatt a jóval időigényesebb zTOCSY és/vagy HSQC mérésekkel határoztuk meg minden titrálási pontban.

4.3.3.1 Komplexképződés γ -CD-vel

A komplexképzés jellemzését γ -CD esetén a komplex sztöchiometriájának vizsgálatával kezdtük Job módszere szerint (26. ábra) [90]. A Dpx H3' és H15 protonjainak görbén az $x_{\text{Dpx}} = 0,5$ értéknél találunk maximumot, ami az 1:1 gazda : vendég összetételű komplex képződésére utal. A Dpx H9 protonjának görbéje viszont $x_{\text{Dpx}} = 0,67$ -es móltörtnél rendelkezik maximummal, ami a $2\text{Dpx} \cdot \text{CD}$ komplexre jellemző szélsőérték. A köztes

tartományban maximummal rendelkező H12 és H13 protonok szintén ezt erősítik meg. A kémiai eltolódás ilyen jellegű változásának magyarázatára egy olyan modell szolgálhat, amit kétféle komplexrészecske {Dpx·CD és 2Dpx·CD} együttes jelenléte hozhat létre. Ezen eredmények tehát nem erősítik meg az ESI-MS mérések alapján kezdetben feltételezett {Dpx·CD, Dpx·2CD} egyensúlyi rendszert, mely a tömegspektrométer nagyvákuumában jellemző.

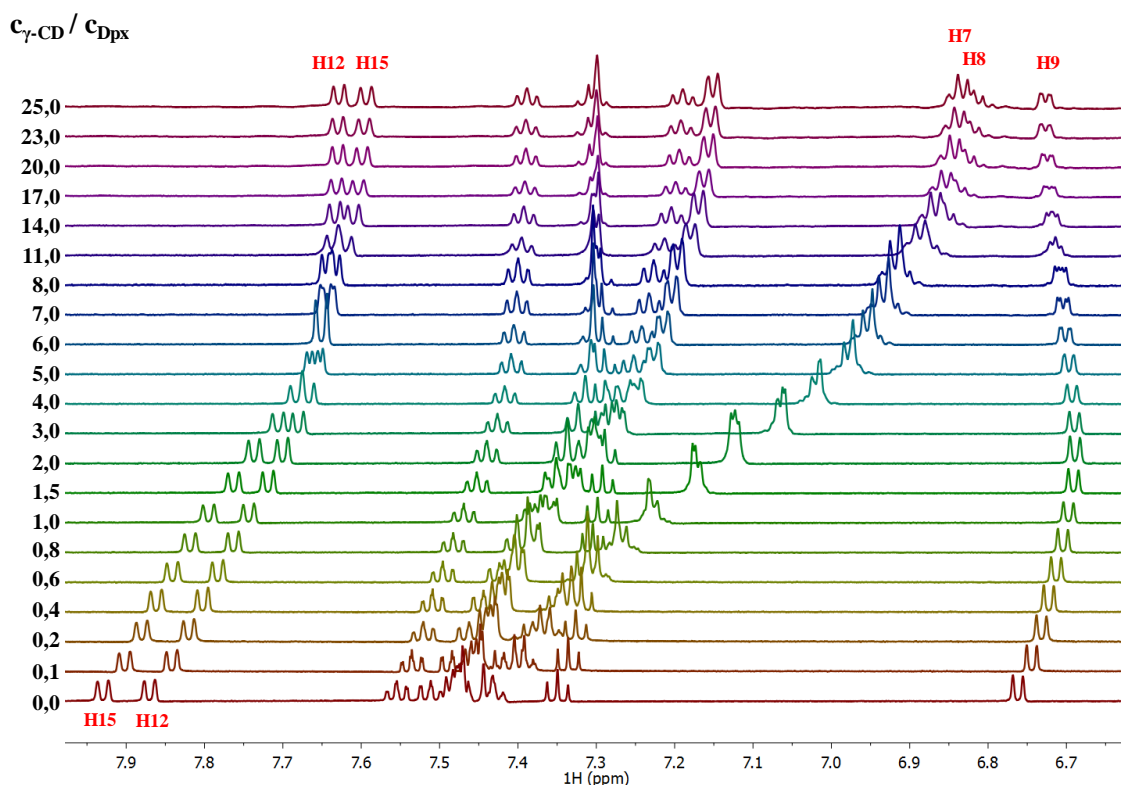
A {Dpx·CD és 2Dpx·CD} együttes jelenlétét feltételező egyensúlyi rendszert a komplementer módon megszerkesztett CD protonok Job görbéi is alátámasztják, ahol szintén szélsőérték maximumot találunk a $0,33 < x_{CD} < 0,50$ tartományban.



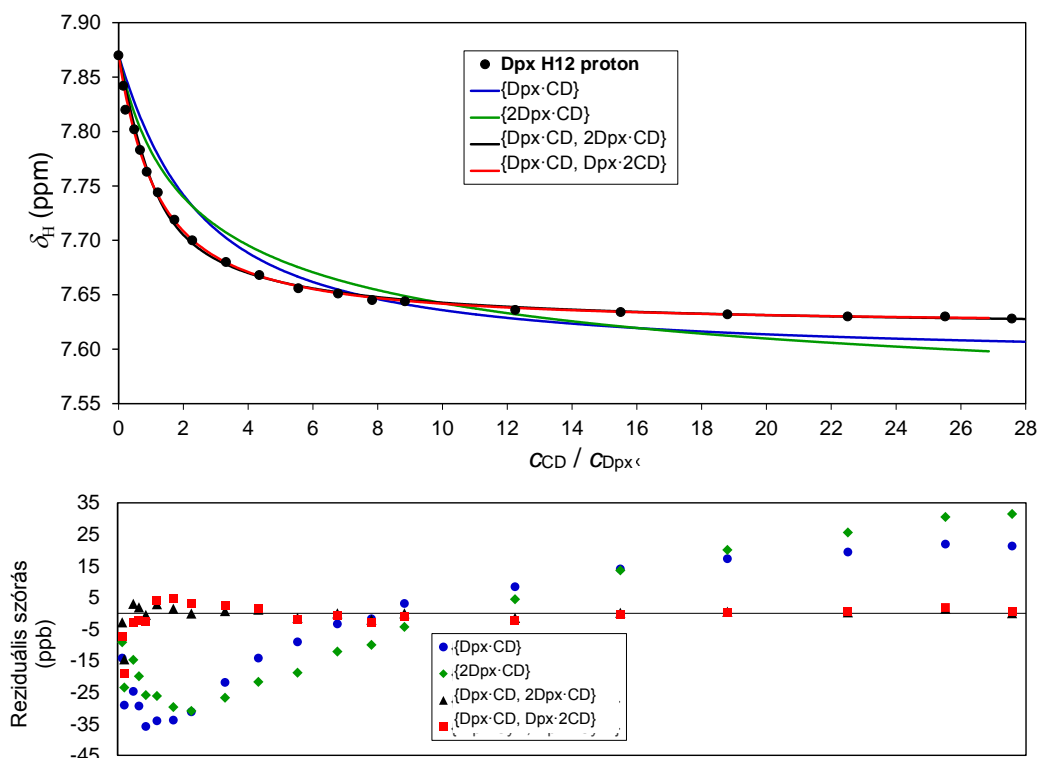
26. ábra. A Dpx (A) és a γ -CD (B) néhány protonjának jellegzetes Job görbéi

A sztöchiometria meghatározására irányuló méréseink után ^1H NMR titrálást végeztünk el annak érdekében, hogy a Dpx γ -CD rendszerben jelenlévő részecskék stabilitási állandóit meghatározzuk, és ezáltal a vizes közegben uralkodó sztöchiometriát is pontosíthassuk. A Dpx aromás protonjainak kémiai eltolódásváltozását γ -CD-vel történő titrálás során a 27. ábra szemlélteti.

A minél megbízhatóbb stabilitási állandó meghatározásának érdekében a lehető legtöbb, a többváltozós értékelésbe bevonható proton kémiai eltolódásváltozását igyekeztük követni. A Dpx H3, H2, H2', H6, H7, H12, H13, H14, H15 protonjait és a γ -CD H3' protonját vontuk be az kiértékelésbe. Kezdetben, a kiértékelésből mindkét molekula esetén kihagytuk az átfedő tartományban nagy bizonytalansággal leolvasható protonok titrálási adatsorát valamint a nem monoton görbét mutató (27. ábra, H9) és a komplexképzésre szinte érzéketlen protonok adatsorait.



27. ábra. A Dpx ^1H NMR spektrumának aromás tartománya különböző $\gamma\text{-CD}/\text{Dpx}$ koncentrációarányoknál. A legnagyobb kémiai eltolódásváltozást mutató Dpx H12 proton tirtálási görbáját és négy különböző (a későbbiekben részletezendő) egyensúlyi modell: $\{\text{Dpx}\cdot\text{CD}\}$; $\{2\text{Dpx}\cdot\text{CD}\}$; $\{\text{Dpx}\cdot\text{CD}, 2\text{Dpx}\cdot\text{CD}\}$; $\{\text{Dpx}\cdot\text{CD}, \text{Dpx}\cdot 2\text{CD}\}$ alapján történő kiértékelését a 28. ábra mutatja be. Az illesztett görbék alapján megállapítható, hogy ez az adatsor nem írható le megfelelően a csupán egy részecskét feltételező $\{\text{Dpx}\cdot\text{CD}\}$ vagy $\{2\text{Dpx}\cdot\text{CD}\}$ egyensúlyi modellekkel. Amennyiben a Job görbék elemzésén alapuló kétféle komplex részecske $\{\text{Dpx}\cdot\text{CD}, 2\text{Dpx}\cdot\text{CD}\}$ együttes jelenlétét feltételezve illesztjük a mért adatsorokat, szinte tökéletes illeszkedést kaptunk. Az illeszkedés jóságát a 4. táblázatban bemutatott statisztikai mutatók is meggyőzően alátámasztották. A megfelelő modell kiválasztása a 4. táblázatban bemutatott stabilitási állandók és statisztikai jellemzők együttes figyelembevételével történt az alábbi megfontolások szerint.



28. ábra. A Dpx H12 proton kémiai eltolódásváltozása a γ -CD-vel való titrálás során és az OPIUM programmal illesztett négyféle egyensúlyi modell (folytonos vonalak), illetve a megfelelő illesztett görbék reziduális szórása

4. táblázat. A Dpx/ γ -CD rendszer NMR titrálásának OPIUM programmal történt kiértékelésének eredményei, melynél az egyensúlyi modellek rangsorát két, az illeszkedés jóságát mutató kritérium alapján adtuk meg (mindkét statisztikai indikátor alacsonyabb értéke jelzi a globálisan jobban illeszkedő modelleket)

Egyensúlyi modell	Az iterált egyensúlyi állandó(k)	Hamilton-féle R faktor	Akaike-féle információs kritérium	
{Dpx-CD, 2Dpx-CD}	$\log K_{11}$	$2,82 \pm 0,04$	0,0733	824,97
	$\log (K_{11}K_{21})$	$5,47 \pm 0,09$		
{Dpx-CD, Dpx-2CD}	$\log K_{11}$	$3,63 \pm 0,09$	0,0871	914,30
	$\log (K_{11}K_{12})$	$6,0 \pm 0,1$		
{Dpx-CD}	$\log K_{11}$	$2,78 \pm 0,01$	0,2053	1332,37
{2Dpx-CD}	$\log K_{21}$	$5,48 \pm 0,01$	0,2191	1366,07
{Dpx-2CD}	$\log K_{12}$	$6,12 \pm 0,05$	0,5249	1820,49

A Hamilton-féle R faktor definíciója:
$$R = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (y_{\text{kísérleti},k} - y_{\text{számított},k})^2}{\sum_{k=1}^n y_{\text{kísérleti},k}^2}}$$

Akaike-féle információs kritérium definíciója:
$$\text{AIC} = n \ln \left(\frac{\sum_{k=1}^n (y_{\text{kísérleti},k} - y_{\text{számított},k})^2}{n} \right) + 2m$$

ahol y_k a mért vagy a modell által számított kémiai eltolódás a k -edik titrálási pontban, n az adatpontok száma és m a becsült paraméterek száma [128].

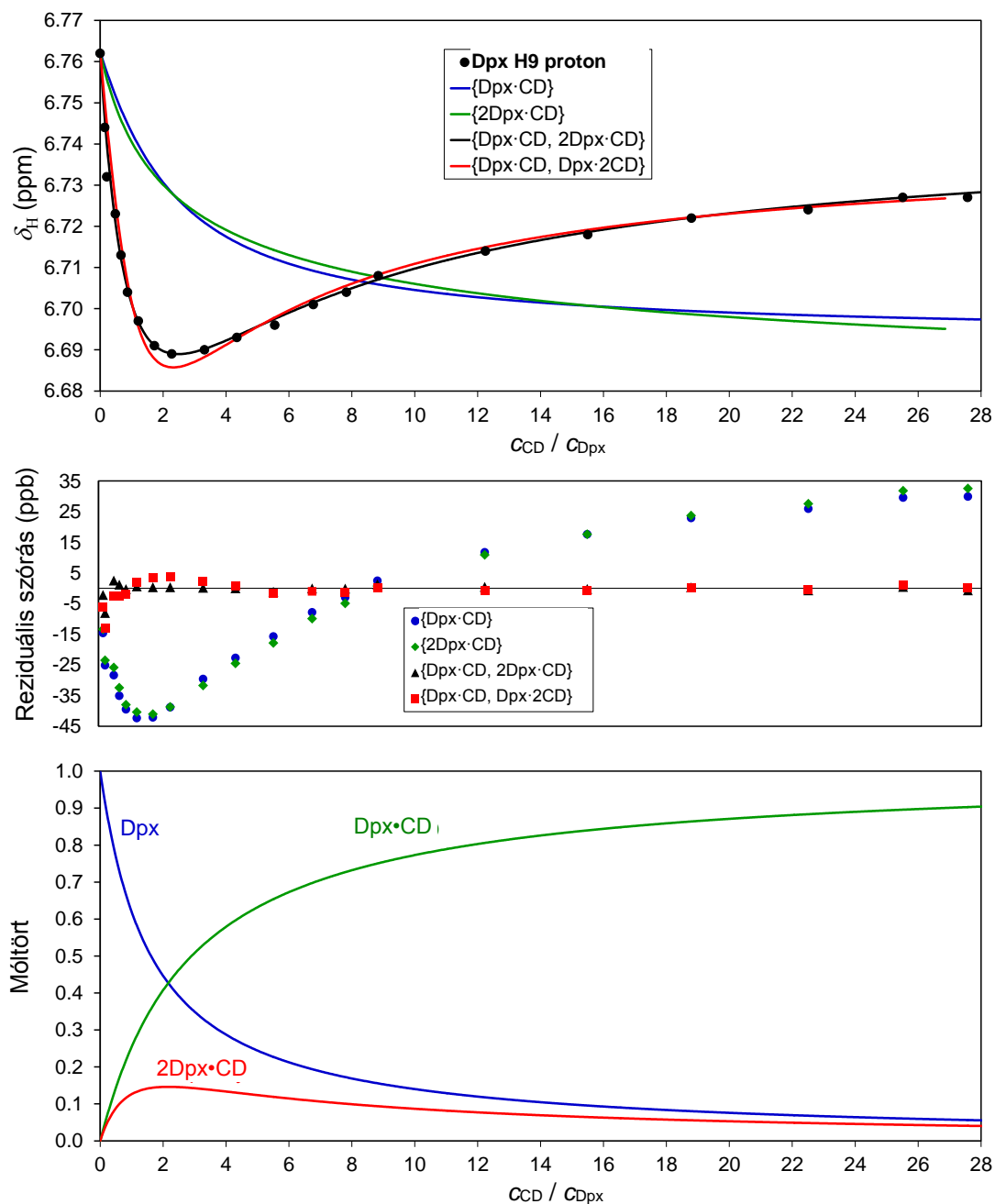
Az irodalomban találunk példákat olyan vendégmolekula-CD komplexekre, ahol a vendégmolekula térben távoli hidrofób molekularészletei külön-külön komplexálódnak két ciklodextrinnel [129]. Mivel a Dpx is rendelkezik két komplexképzésre alkalmas (egymástól egy flexibilis alifás láncsal elválasztott) aromás molekularészlettel, csupán szerkezeti megfontolások alapján illesztettük a $\{Dpx \cdot 2CD\}$ és a $\{Dpx \cdot CD, Dpx \cdot 2CD\}$ modelleket, bár az MS mérésekkel szemben ezt az oldatfázisra jellemző Job mérések nem támasztották alá. Míg az előbbi egyrészesekés $\{Dpx \cdot 2CD\}$ modell nem volt összeegyeztethető a kísérleti adatokkal, addig a hipotetikus $\{Dpx \cdot CD, Dpx \cdot 2CD\}$ modell esetében meglepő módon jó illesztést sikerült elérni, a Hamilton-féle R faktor és az Akaike-féle információs kritérium értékének enyhe romlása mellett (4. táblázat). A Dpx H1, H3, H3', H13, H15 és a CD H3' protonok szimultán illesztett görbéiből is ugyanerre a következtetésre juthatunk. Fontos megjegyeznünk, hogy a Dpx H2, H2', H5, H6, H7 és H14-es protonjaira mind a négy egyensúlyi modell egyaránt jól illeszthető, így a helyes modell kiválasztása kevésbé lett volna megbízható, ha csak ezeket a protonokat követjük a titrálás során. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a szakirodalomban is megfogalmazott megállapítással [69, 84, 96], miszerint az egyensúlyi rendszereket kiértékelő programok nem használhatók univerzálisan minden egyensúlyi kémiai probléma megoldására, mert bizonyos esetekben (majdnem) ugyanolyan jó illeszkedéseket lehet elérni egy kémiailag valószínűtlen modell alkalmazásával is.

Egyetlen γ -CD gazdamolekulának két vendégmolekulával való komplexképzése igazán ritka a szakirodalomban [67-69, 130, 131]. Esetünkben a szokatlan, $\{Dpx \cdot CD, 2Dpx \cdot CD\}$ sztöchiometriát a következő megállapításokkal indokoltuk:

Bár az egyrészesekés $\{Dpx \cdot CD\}$ vagy $\{2Dpx \cdot CD\}$ modellek a legtöbb proton esetén nem írják le megfelelően a kísérleti adatokat, az ezekből számított K_{11} és K_{21} állandók jó egyezést mutatnak a legjobbnak számító kétrészesekés modellel (lásd 4. táblázat). Ezzel szemben a $\{Dpx \cdot CD, Dpx \cdot 2CD\}$ rendszer esetén a K_{11} "matematikailag" 6,5-szeresére növekedett, egy egyidejűleg jelenlévő Dpx·2CD komplex 'hozzáadása' után, ami szerkezeti szempontból valószínűtlen (vö. propranolol [132]).

Az eddig még nem tárgyalt H9 proton nem monoton ("kétfázisú") lefutású titrálási görbét mutat, amit természetesen nem lehet illeszteni egy egyszerű 1:1 modellt feltételezve (29. ábra kék és zöld görbék). A $\{Dpx \cdot CD, 2Dpx \cdot CD\}$ egyensúlyi modellel számított részecskeeloszlási diagramon láthatjuk (28. ábra), hogy a 2Dpx·CD komplex csúcskoncentrációjának elérésekor 16%-ban van jelen az oldatban $c_{CD} \approx 2$ mM-nál,

szintén ugyanott, ahol a H9 titrálási adatsorának minimuma található. Mivel H9 titrálási adatsora (szándékosan) kimaradt a globális analízisből, ezért egy külön illesztést végeztünk a legjobb modellre kapott K_{11} és K_{21} rögzített értékeivel és iterálandó paraméterként a $\delta_{\text{Dpx}\cdot\text{CD}}^{\text{H9}}$ és $\delta_{2\text{Dpx}\cdot\text{CD}}^{\text{H9}}$ felhasználásával. Így a $\{\text{Dpx}\cdot\text{CD}, 2\text{Dpx}\cdot\text{CD}\}$ modell esetén szinte tökéletes illeszkedést sikerült elérni. A hipotetikus $\{\text{Dpx}\cdot\text{CD}, \text{Dpx}\cdot 2\text{CD}\}$ modell szintén leírta a minimumértéket, de az illeszkedés romlott.



29. ábra. A Dpx H9 protonjának titrálási görbéje γ -CD-vel. Az kísérleti adatsor négy egyensúlyi modellel történt illesztése és a mért kémiai eltolódásoknak az illesztett görbétől mért átlagos eltérése (reziduuma), valamint alul a megfelelő részecskeeloszlás diagram

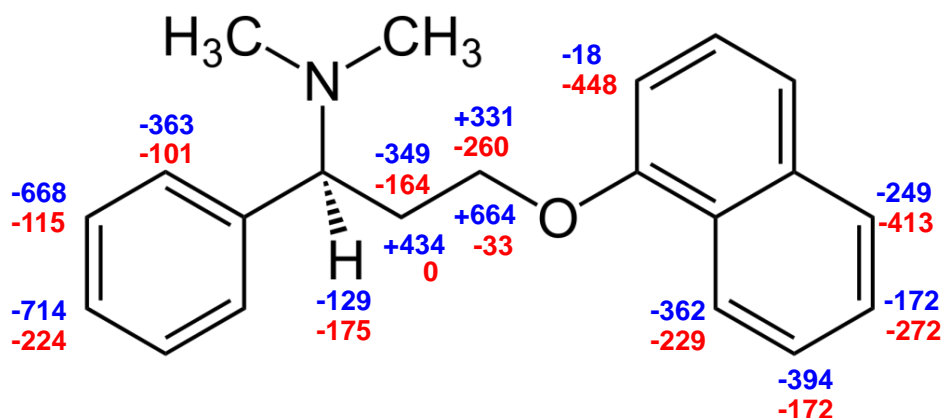
A kísérletekkel alátámasztott {Dpx·CD, 2Dpx·CD} modellnek megfelelő egyensúlyi állandókat a 4. táblázat tartalmazza, míg az egyes protonokra jellemző komplexképzés hatására bekövetkező kémiai eltolódásváltozásokat ($\Delta\delta^i$) a Dpx·CD és a 2Dpx·CD komplexek esetén a 30. ábra foglalja össze.

Kék értékek ppb-ben:

$$\Delta\delta_{\text{Dpx}\cdot\text{CD}}^i = \delta_{\text{Dpx}\cdot\text{CD}}^i - \delta_{\text{Dpx}}^i$$

Vörös értékek ppb-ben:

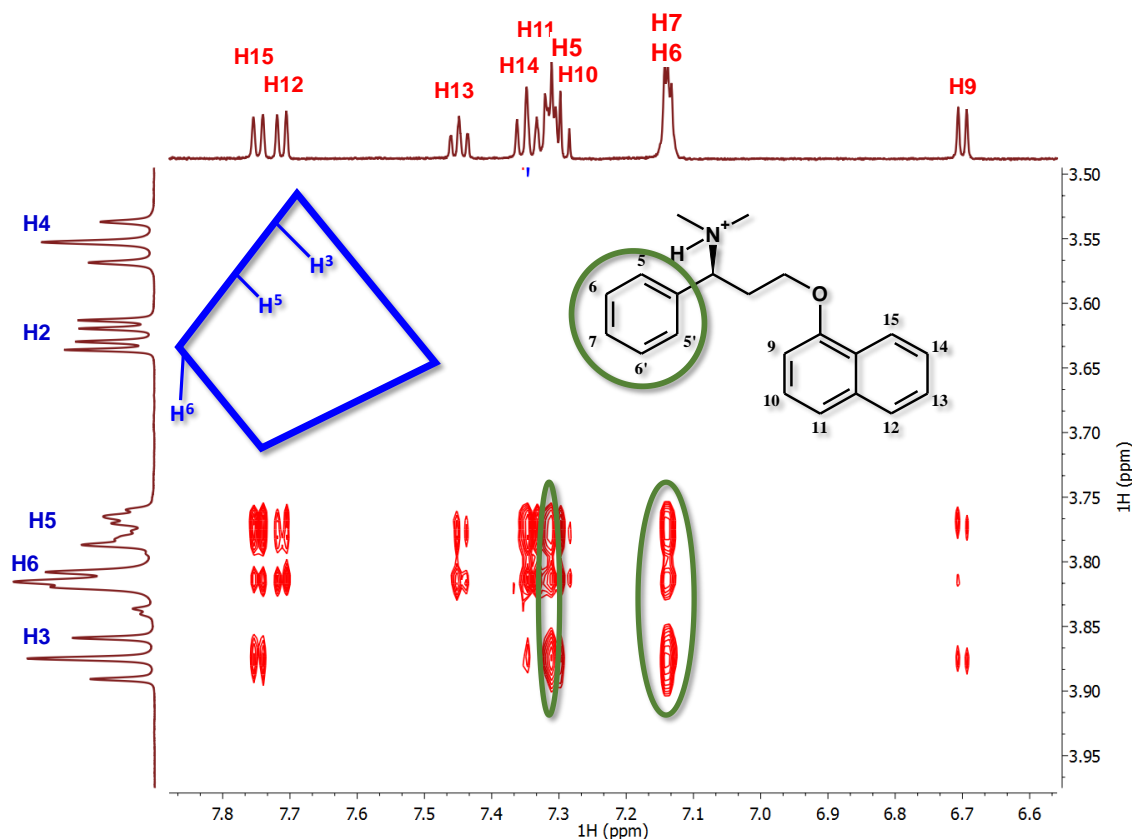
$$\Delta\delta_{2\text{Dpx}\cdot\text{CD}}^i = \delta_{2\text{Dpx}\cdot\text{CD}}^i - \delta_{\text{Dpx}}^i$$



30. ábra. A Dpx protonjainak komplexképzés hatására bekövetkező kémiai eltolódásváltozásai ($\Delta\delta^i$) a Dpx· γ -CD (kék) és 2Dpx· γ -CD komplexekben (vörös) szabad Dpx-hez képest. (Az adatokat OPIUM-programmal számítottuk).

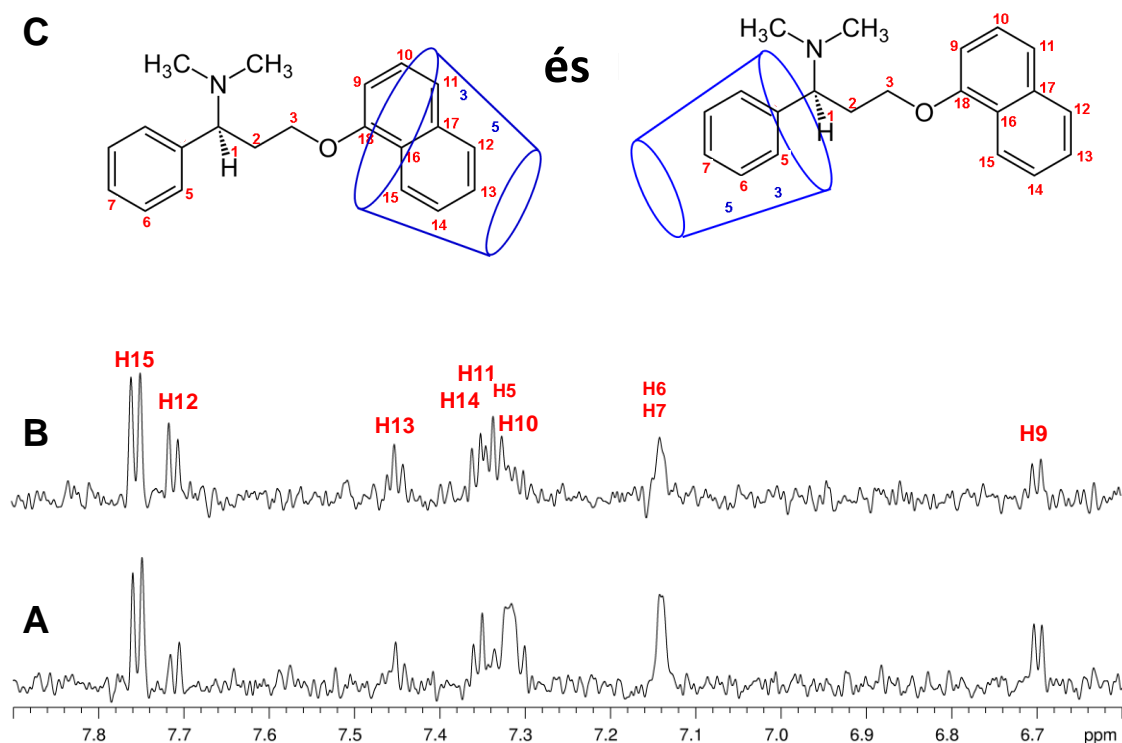
A $\Delta\delta^i$ értékek a lokális elektronsűrűség változásait tükrözik a komplexképződési folyamat során. A Dpx aromás protonjai esetén megfigyelt negatív előjel összhangban van azzal a hipotézissel, hogy mindkét aromás gyűrű a γ -CD üregében van. A γ -CD H3, H5 és (kisebb mértékben) a H6 protonjai nagy kémiai eltolódás csökkenést (*upfield complexation-induced shift*) mutatnak a többi proton $\Delta\delta$ értékeihez képest. Ez a gyűrűáram hatásának és/vagy a komplexálódó vendégmolekula hidrofób hatásának köszönhető [69]. Azonban a $\Delta\delta_i$ csupán az elektronsűrűség változást jelzik a megfelelő pozíciókban, így nem mindig jelent egyértelmű segítséget a kialakuló komplexek geometriájának a meghatározásában. Erre a célra a dipoláris kereszt-relaxációkon alapuló (NOE) nyújtó mérésekre van szükség. A Dpx- γ -CD rendszer geometriai jellemzésére 2D ROESY méréseket végeztünk.

A 2D ROESY spektrumban (31. ábra) a γ -CD belső üregében található H3 és H5 protonok egyaránt mutatnak NOE keresztcsúcsokat a naftil- és fenil-molekularészletek aromás protonjaival.



31. ábra. A 0,9 mM-os Dpx-t (vízszintes tengelyen jelhozzárendeléssel) és 2,1 mM-os γ -CD-t (függőleges tengelyen jelhozzárendeléssel) tartalmazó oldat 2D ROESY spektrumának részlete

A spektrum 7,3 ppm környékén még 600 MHz-en is meglehetősen zsúfolt volt, ezért a NOE jelek megfigyeléséhez a jobb felbontású szelektív 1D NOESY spektrumokat vettünk fel 800 MHz-en. A γ -CD H2, H4 illetve H6 protonjainak invertálását követően nem detektáltunk szignifikáns NOE-eket a Dpx protonok esetén, így tehát a Dpx molekula külsőszférás komplexképzésről [68] ez esetben nem beszélhetünk. A γ -CD belső ürege felé mutató H3 és H5 protonjainak invertálásakor viszont a Dpx mindkét aromás gyűrűjének a protonjai megjelentek a spektrumban (32. ábra).



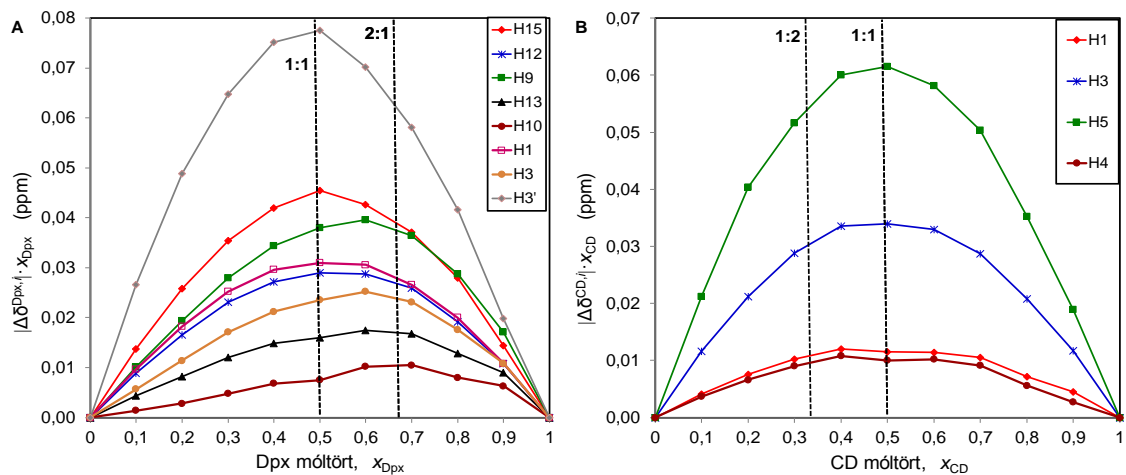
32. ábra. A 0,9 mM-os Dpx és 2,1 mM γ -CD koncentrációjú oldat 1D NOESY spektrumainak részlete (aromás tartomány) 800 MHz-en, 0,9 s keverési idővel. (A) a γ -CD H3; (B) és a γ -CD H5 protonjának invertálásával készült spektrum. (C) A komplexképzés során kölcsönható molekularészletek, mely során a CD komplexálja vagy a Dpx fenil- vagy a naftilgyűrűjét, míg a 2Dpx·CD esetén két Dpx molekula tartózkodik a vendégmolekula ugyanazon üregében

A NOE-k alapján a Dpx naftilgyűrűjének mélyebb beékelődésére következtethetünk a CD szekunder nyílása felől, hasonlóan a fenilgyűrűhöz. Ezen eredményeknek egyik lehetséges magyarázata az aromás gyűrűk egyidejű illeszkedése a CD belső üregébe. A számított részecskeeloszlás alapján az 1D NOESY méréshez használt mintában az összes Dpx 44%-a Dpx·CD, 15%-a 2Dpx·CD formában van jelen, melyben a megfigyelt NOE-k kialakulásához az 1:1 komplex kétféle izomere (vagy a fenil- vagy a naftilgyűrű komplexálódása) egyaránt hozzájárul.

4.3.3.2 Komplexképződés β -CD-vel

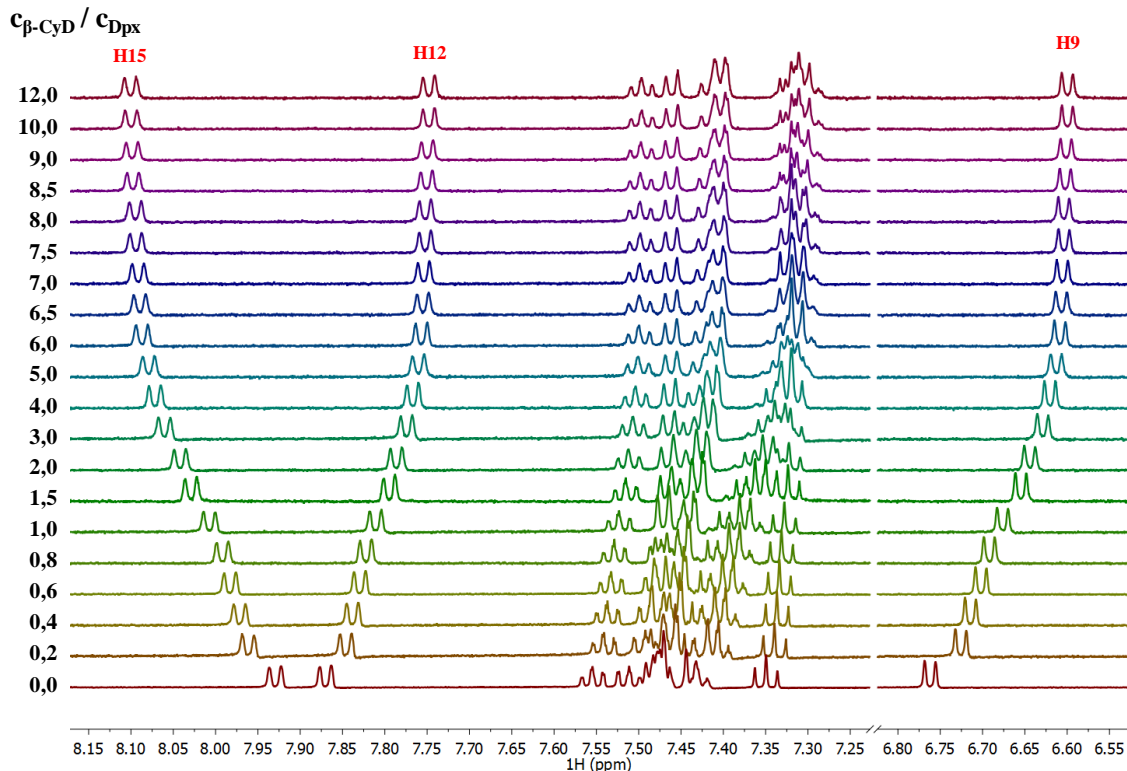
A kisebb üregmérettel rendelkező β -CD és Dpx között létrejött zárványkomplex jellemzését szintén a komplex sztöchiometriájának meghatározásával kezdtük. A 33. ábrán feltüntetett Job görbék szélsőértékei alapján megállapítható, hogy a Dpx β -CD egyensúlyi rendszerben sokkal dominánsabb az 1:1-es sztöchiometria, mint a nagyobb

üregmérettel rendelkező γ -CD-t tartalmazó rendszer esetén.. A Dpx H3, H9, H10 és H13 protonjainak Job görbéin egyaránt $x_{Dpx} \approx 0,6$ -os érték felé tolódó maximumot találunk, ami a $2Dpx \cdot CD$ részecske jelenlétére utal.



33. ábra. A Dpx (A) és a β -CD (B) néhány protonjának jellegzetes Job görbéi

A sztöchiometria meghatározása után a stabilitási állandók számításához 1H NMR titrálást végeztünk (34. ábra). A minél megbízhatóbb stabilitási állandók meghatározása érdekében, a többváltozós értékeléshez hét Dpx proton és öt β -CD proton kémiai eltolódását követtük 19 különböző gazda/vendég koncentrációarányánál.



34. ábra. A Dpx 1H NMR spektrumának aromás tartománya különböző β -CD/Dpx koncentrációarányoknál

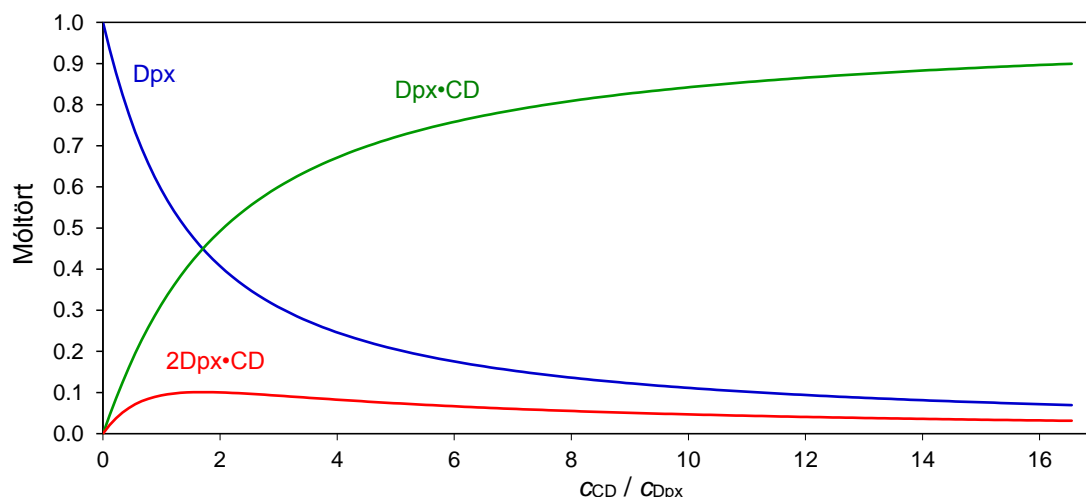
A titrálási adatsorok különböző egyensúlyi modellekkel történő illesztésének eredményeit az 5. táblázat foglalja össze. Ebben az esetben is azt tapasztaltuk, hogy a kísérleti adatsorok globálisan legjobb illesztése a $\{D_{px}\cdot CD, 2D_{px}\cdot CD\}$ modell alkalmazásakor valósult meg, mivel – ha csekély mértékben is – az illeszkedés jobb volt, mint a hipotetikus $\{D_{px}\cdot CD, D_{px}\cdot 2CD\}$ modell esetén.

5. táblázat. A D_{px}/β -CD rendszer NMR titrálásának OPIUM programmal történt kiértékelésének eredményei, melynél az egyensúlyi modellek rangsorát két, az illeszkedés jóságát mutató kritérium alapján adtuk meg (mindkét statisztikai indikátor alacsonyabb értéke jelzi a globálisan jobban illeszkedő modelleket, definíciójukat lásd a 4. táblázatban)

Egyensúlyi modell	Az iterált egyensúlyi állandó(k) \pm szórásuk	Hamilton- féle R faktor	Akaike-féle információs kritérium	
$\{D_{px}\cdot CD, 2D_{px}\cdot CD\}$	$\log K_{11}$	$2,96 \pm 0,09$	0,0473	482,08
	$\log (K_{11}K_{21})$	$5,40 \pm 0,25$		
$\{D_{px}\cdot CD, D_{px}\cdot 2CD\}$	$\log K_{11}$	$3,4 \pm 0,1$	0,0516	521,24
	$\log (K_{11}K_{12})$	$5,7 \pm 0,3$		
$\{D_{px}\cdot CD\}$	$\log K_{11}$	$3,06 \pm 0,01$	0,0668	613,15
$\{2D_{px}\cdot CD\}$	$\log K_{21}$	$5,62 \pm 0,02$	0,0893	745,75
$\{D_{px}\cdot 2CD\}$	$\log K_{12}$	$7,31 \pm 0,09$	0,1846	1076,7

A csupán egyféle részecskét feltételező $\{D_{px}\cdot CD\}$ vagy $\{2D_{px}\cdot CD\}$ modellek esetén a görbeillesztés rendre romlott, a $\{D_{px}\cdot 2CD\}$ modell használata pedig számos proton esetében igen rosszul modellezte a kísérleti adatsorokat. A D_{px} H1, H2', H12 és H15 protonjainak, és a CD H1-es és H5-ös protonjainak illesztett adatsorai esetén nem mutatható ki számottevő különbség a $\{D_{px}\cdot CD\}$, a $\{D_{px}\cdot CD, 2D_{px}\cdot CD\}$ és a $\{D_{px}\cdot CD, D_{px}\cdot 2CD\}$ egyensúlyi modellek között.

A kétféle részecskét feltételező modellek esetén viszont szignifikánsan jobb illeszkedést kaptunk (a többi proton adatsorát is figyelembe véve) a mért adatpontokra. A kemometriai mutatók ez esetben is a $\{D_{px}\cdot CD, 2D_{px}\cdot CD\}$ modellt részesítették (csekély) előnyben a $\{D_{px}\cdot CD, D_{px}\cdot 2CD\}$ modellel szemben. Figyelembe véve a Job mérések sztöchiometriára vonatkozó eredményeit, az előzőleg is kiválasztott $\{D_{px}\cdot CD, 2D_{px}\cdot CD\}$ modellt találtuk a legmegfelelőbbnek a D_{px} β -CD-vel való komplexképzésének egyensúlyi jellemzésére. Az így meghatározott egyensúlyi állandók értékeit az 5. táblázat tartalmazza, míg a $\{D_{px}\cdot CD, 2D_{px}\cdot CD\}$ egyensúlyi modellel számított részecskeeloszlás diagrammot a 35. ábrán mutatjuk be.



35. ábra. A Dpx β -CD-komplexek HysS programmal számított részecskeeloszlás görbéi, amelyhez az NMR titrálás adatsorainak OPIUM programmal meghatározott stabilitási állandóit használtuk fel

Az CD komplexek üregméretfüggő sztöchiometriájára az irodalomban is találunk példákat: a metoprolol 2:1-es komplexet képez γ -CD-vel és 1:1-es komplexet β -CD-vel [69], feniraminok esetén pedig a karboximetilezett β -CD-vel keletkeznek 2:1 és 1:1-es sztöchiometriájú komplexek keverékei [67].

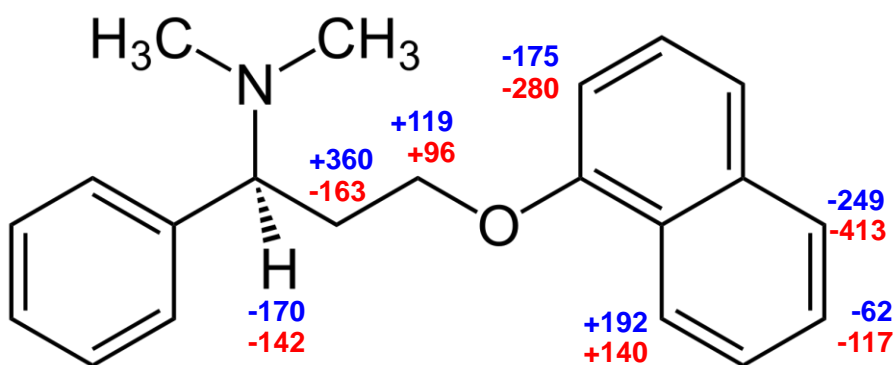
Mivel a β -CD ürege kisebb méretű a γ -CD-nél, ezért a $2Dpx \cdot \beta$ -CD komplex keletkezésének lehetősége vizsgálataink egyik váratlan eredménye volt. A feltételezett sztöchiometria mellett a $Dpx \cdot CD$ és $2Dpx \cdot CD$ komplexek szerkezetének jellemzését a Dpx kémiai eltolódásváltozásainak vizsgálatával kezdtük (36. ábra).

Kék értékek ppb-ben:

$$\Delta\delta_{Dpx \cdot CD}^i = \delta_{Dpx \cdot CD}^i - \delta_{Dpx}^i$$

Vörös értékek ppb-ben:

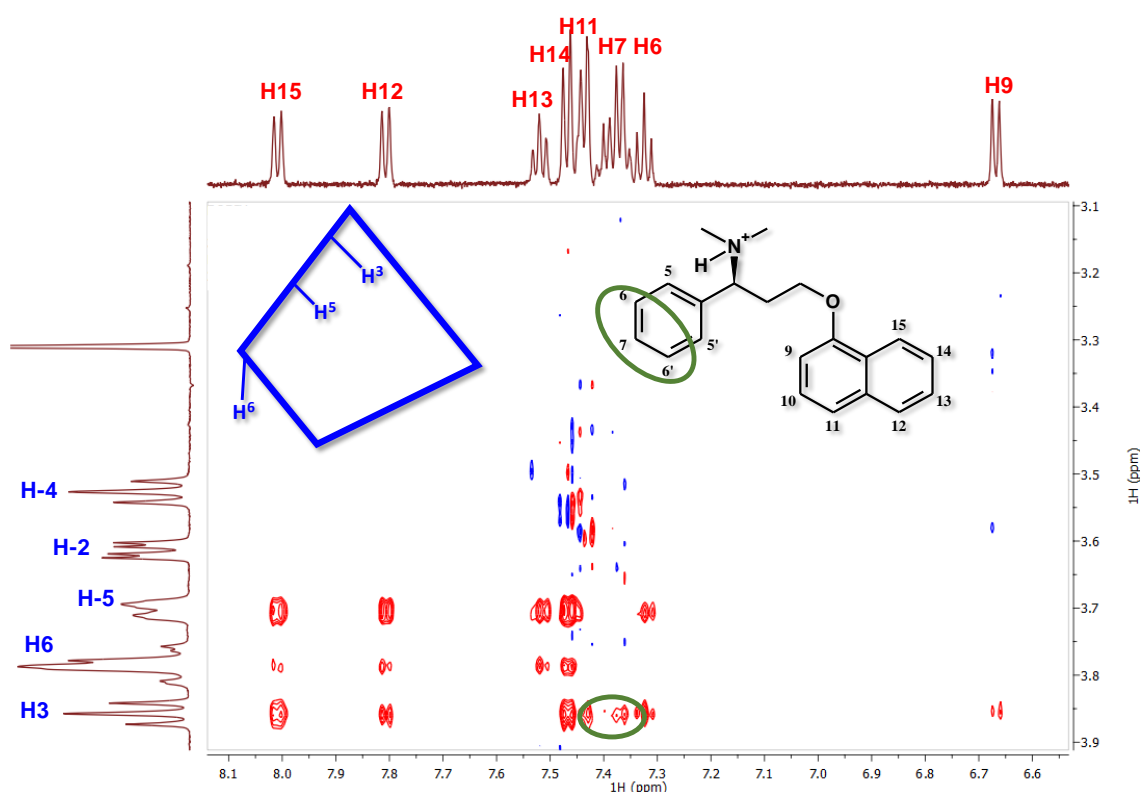
$$\Delta\delta_{2Dpx \cdot CD}^i = \delta_{2Dpx \cdot CD}^i - \delta_{Dpx}^i$$



36. ábra. A Dpx protonjainak komplexképzés hatására bekövetkező kémiai eltolódásváltozásai ($\Delta\delta^i$) a $Dpx \cdot \beta$ -CD (kék) és $2Dpx \cdot \beta$ -CD (vörös) komplexekben szabad Dpx-hez képest. (Az adatokat OPIUM-programmal számítottuk)

A γ -CD-hez hasonlóan a legnagyobb változásokat ez esetben is a propillánc H2-es protonja esetében kaptuk, míg szinte minden naftil-proton $\Delta\delta$ értékei a γ -CD-nél tapasztaltak felének adódtak. Mivel a fenil-protonok jelei 7,4 ppm-nél még 600 MHz-en is jelentős átfedést mutattak a többi aromás proton jelével, a titrálás során ezeket a jeleket nem tudtuk követni. A β -CD esetében a komplexképzés indukálta kémiai eltolódás csökkenés (*upfield shift*) háromszor nagyobb mértékű volt a belső H3, H5 protonok és a primer nyíláshoz közeli H6 proton esetén a CD üregén kívül elhelyezkedő H4-hez képest. Ez a Dpx hidrofób részeinek a β -CD üregbe kerülését jelzi.

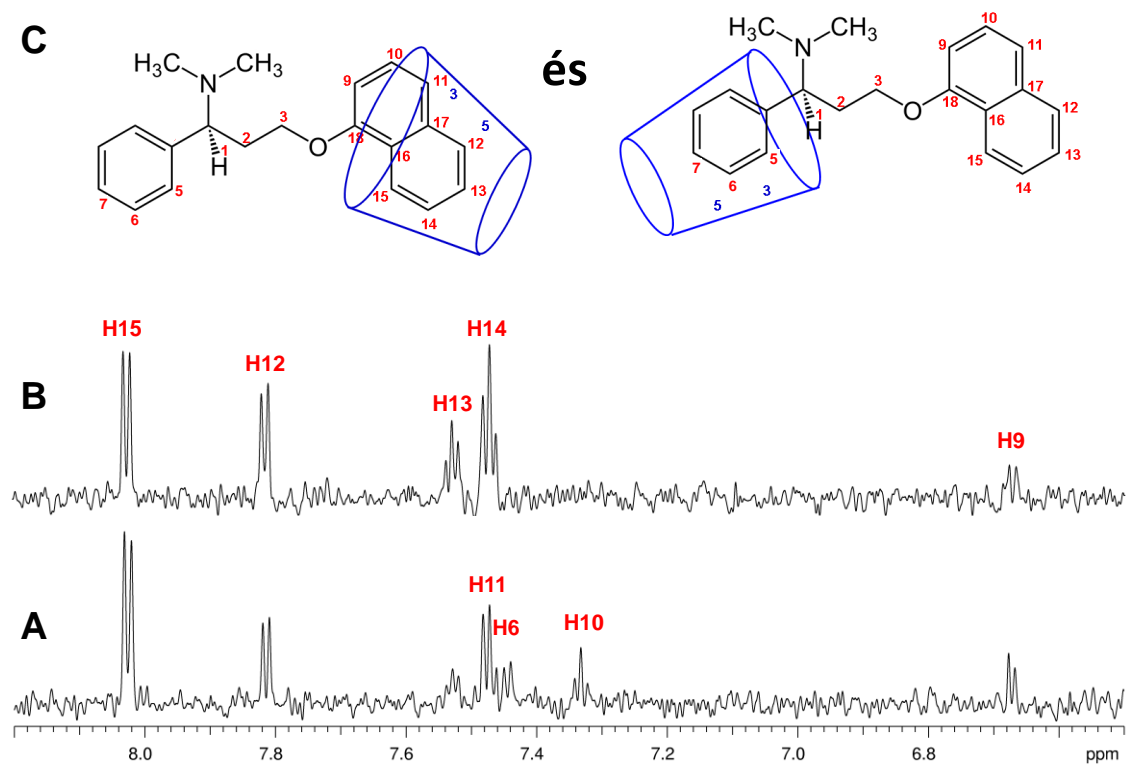
A komplexképzés geometriájára vonatkozó további (atomi szintű) információk megszerzéséhez NOE kísérleteket végeztünk. A 2D ROESY 37. ábrán bemutatott spektrumrészlete megerősíti, hogy kizárólag a β -CD belső H3 és H5 (gyengén a H6) ad intermolekuláris keresztcsúcsokat a Dpx naftilgyűrűjének aromás protonjaival, megerősítve a naftilgyűrű bekerülését a CD üregébe.



37. ábra. A 1,5 mM-os Dpx-t (vízszintes tengelyen jelhozzárendeléssel) és 1,5 mM-os β -CD-t (függőleges tengelyen jelhozzárendeléssel) tartalmazó oldat 2D ROESY spektrumának részlete

A 7,3-7,5 ppm közötti zsúfolt spektrális régió nem tette lehetővé, hogy megbízható következtetéseket vonjunk le a fenilgyűrű komplexképzésben való részvételére vonatkozóan. Ezért a NOE jelek megfigyeléséhez a jobb felbontású szelektív 1D NOESY

kísérletet 800 MHz-es készüléken végeztük el (38. ábra), ahol gyenge NOE kölcsönhatást sikerült kimutatnunk a Dpx H6 és a β -CD belső H3-as protonjai között.



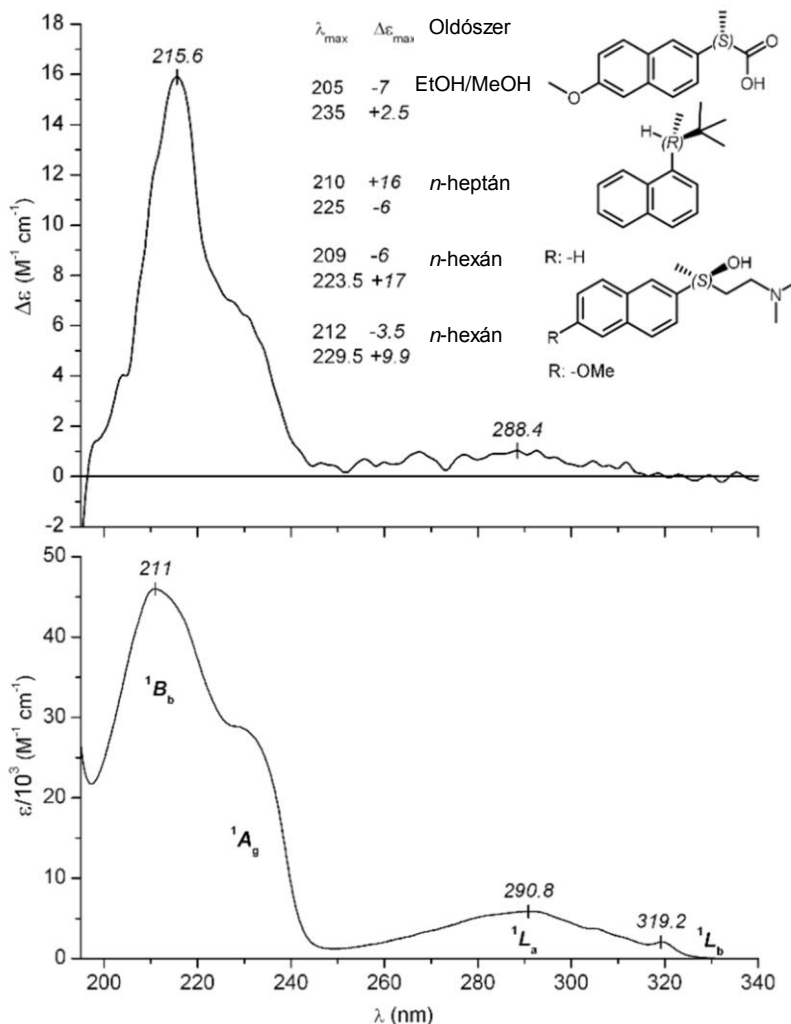
38. ábra. A 1,5 mM-os Dpx és 1,5 mM β -CD koncentrációjú oldat 1D NOESY spektrumainak részlete (aromás tartomány) 800 MHz-en, 0,9 s keverési idővel. (A) a β -CD H3; (B) és a β -CD H5 protonjának invertálásával készült spektrum. (C) A komplexképzés során kölcsönható molekularészek, mely során a β -CD vagy a Dpx fenil- vagy a naftilgyűrűjét komplexálja, míg a 2Dpx-CD esetén két Dpx molekula tartózkodik a vendégmolekula ugyanazon üregében

Az erős NOE-k a naftilgyűrű β -CD üregébe történő mély beékelődését jelzik. Míg a Dpx H12, H13, H14 és H15 protonjai a CD H5 protonjának jelével mutatnak erős NOE-kat, addig a Dpx naftilgyűrűjének H11 és H10 protonjai a CD H3-as protonjának jelével adtak téren keresztüli korrelációt. A számított részecskeeloszlás alapján az 1D NOESY méréshez használt mintában az összes Dpx 37%-a Dpx-CD és csupán 15%-a van 2Dpx-CD formában, ezért a γ -CD-esetén a NOE mérések alapján az aromás gyűrűk komplexálódására levonható következtetések itt is érvényesek. Az alifás protonok esetén az általunk elvégzett NOE kísérletek egyikében sem találtunk dipoláris korrelációkat a CD protonjaival.

4.3.4 Cirkuláris dikroizmus és UV spektrofotometriás mérések

4.3.4.1 A dapoxetin UV és cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás tulajdonságai

A Dpx UV spektrumára főleg a naftalingyűrű $\pi\text{-}\pi^*$ átmenetei jellemzők. (39. ábra).



39. ábra. Az (S)-Dpx vizes oldatának (pH ~ 4) cirkuláris dikroizmus (felső) és UV abszorpciós (alsó) spektruma 25°C-on, a megfelelő $\pi\text{-}\pi^*$ gerjesztések szimmetria megnevezéseivel. Felül: az irodalomban közölt α -, β -szubsztituált királis naftilszármazékok, fentről lefelé haladva az (S)-naproxén [133], az (R)-2,2-dimetil-3 α -naftilbután [134], az (S)-4-dimetilamino-2-(naft-2-il)-bután-2-ol [135], és az (S)-4-dimetilamino-2-(6-metoxinaft-2-il)-bután-2-ol $\Delta\epsilon_{\text{max}}$ értékeivel. [135].

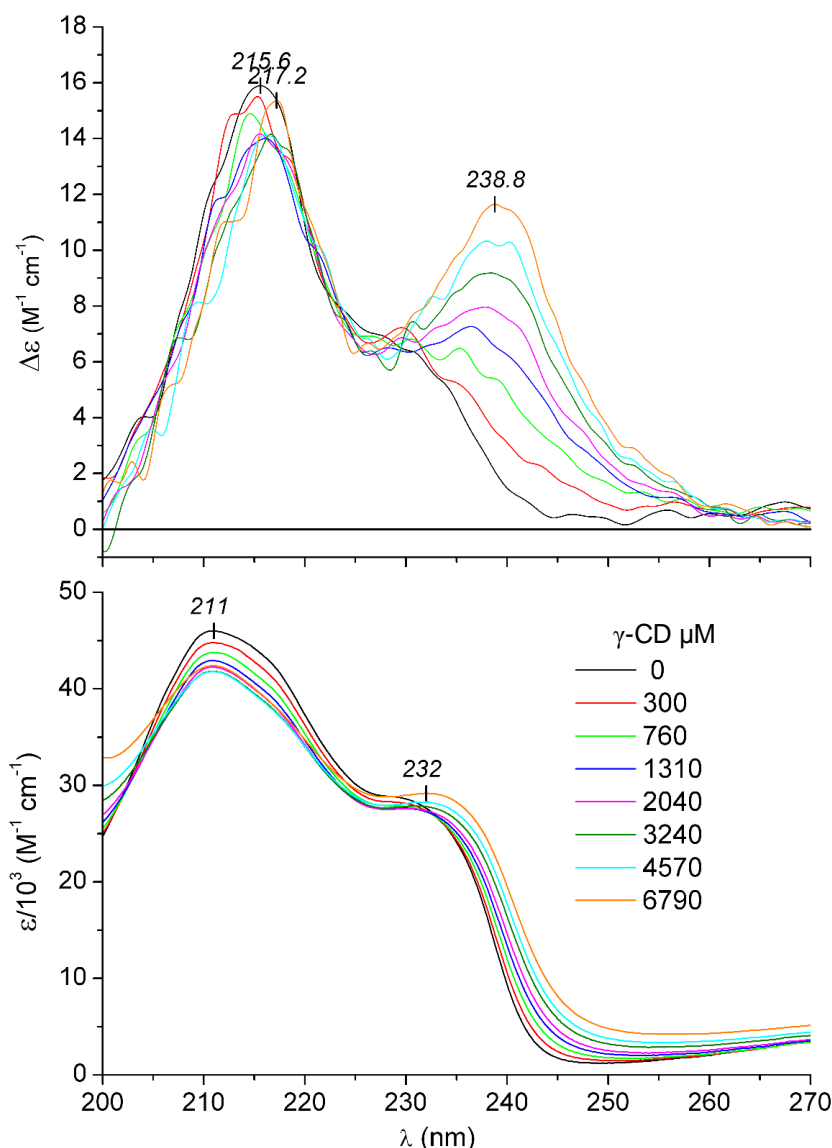
Az UV spektrumban 250 nm felett megjelenő két erősen átfedő, hosszú hullámhosszú sávot a szimmetriatiltott 1L_b és 1L_a átmenetekhez rendeltük. A 319 nm-nél lévő alacsonyabb energiájú csúcs tartozik az 1L_b -hez, míg a 291 nm-nél lévő szélesebb sáv az 1L_a átmenethez. Az α -naftol irodalomban ismertett spektrális adatai alapján a megfelelő átmeneti dipólmomentumok polarizáltak a naftilgyűrű rövid (1L_a) és hossz tengelye (1L_b) mentén. [136, 137].

Ezekhez a gyenge sávokhoz képest viszont egy sokkal intenzívebb abszorpciós csúcs figyelhető meg a spektrum rövid hullámhosszú oldalán ($\lambda_{\max}=211$ nm) egy 230 nm-nél lévő váll által közrefogva (39. ábra). Egy ilyen váll, vagy egy határozott abszorpciós maximum egy α -helyzetben [138, 139] lévő elektronküldő csoportra jellemző, és karakterisztikus a hasonlóan szubsztituált naftil-származékok esetén is. Mindkét átmenet elektromos dipól megengedett és polarizált a naftilrész hossz tengelye mentén [136, 138]. Itt meg kell jegyeznünk, hogy a Dpx UV spektrumához a fenilgyűrű hozzájárulása elhanyagolható, a dipól tiltott, alacsony intenzitású 1L_b és 1L_a átmenetei miatt [140].

A szabad Dpx CiD spektrumának lefutása és a CiD sávok helyzete hasonlít a Dpx UV spektrumához (39. ábra). Az 1L_b és 1L_a átmenetek aszimmetrikus zavarása (perturbációja) jelentkezik egy gyenge, pozitív jel megjelenésével 250 és 330 nm között. A nagy energiájú átmeneteket tartalmazó spektrális régióban egy pozitív csúcs (1B_b , $\lambda_{\max}=216$ nm) és egy azonos előjelű részben felbontott sávot láthatunk ($\lambda_{\max}\approx 233$ nm). A 216 nm-en lévő moláris cirkuláris dikroizmus abszorpciós együttható ($\Delta\epsilon_{\max}$) értéke összehasonlítható, vagy nagyobb, mint a naproxén irodalomban megtalálható adata [141], vagy más, a kiralitáscentrumhoz közvetlenül α - vagy β -pozícióban kapcsolódó naftilszármazék esetén leírtak [133, 142] (39. ábra). Ezekkel a vegyületekkel összehasonlítva a Dpx szerkezetét, ez utóbbi esetén a kiralitáscentrumot négy szigmatkötés választja el a naftilegységtől. Ebből arra következtethetnénk, hogy ez az oldallánc különféle konformációkat vehet fel, így különböző kiroptikai hozzájárulásokat okozva, melyek nagyrészt kioltják egymást, és egy sokkal alacsonyabb $\Delta\epsilon_{\max}$ értéket eredményeznek. Ezzel szemben a viszonylag intenzív 1B_b CiD jel olyan konformációs részecskék gyakoriságára utal, melyeknek döntő hozzájárulása van a forgatóképességhez.

4.3.4.2 A dapoxetin β - és γ -CD-vel kialakított kölcsönhatásának vizsgálata

A Dpx/CD kölcsönhatásának vizsgálatához CiD/UV spektroszkópiás titrálást végeztünk tömény β - és γ -CD törzsoldatok vizes (S)-Dpx oldathoz való adagolásával. A γ -CD koncentráció növekedésének hatására a 211 nm-nél lévő ϵ_{\max} értéke fokozatos csökkenést mutatott (40. ábra).

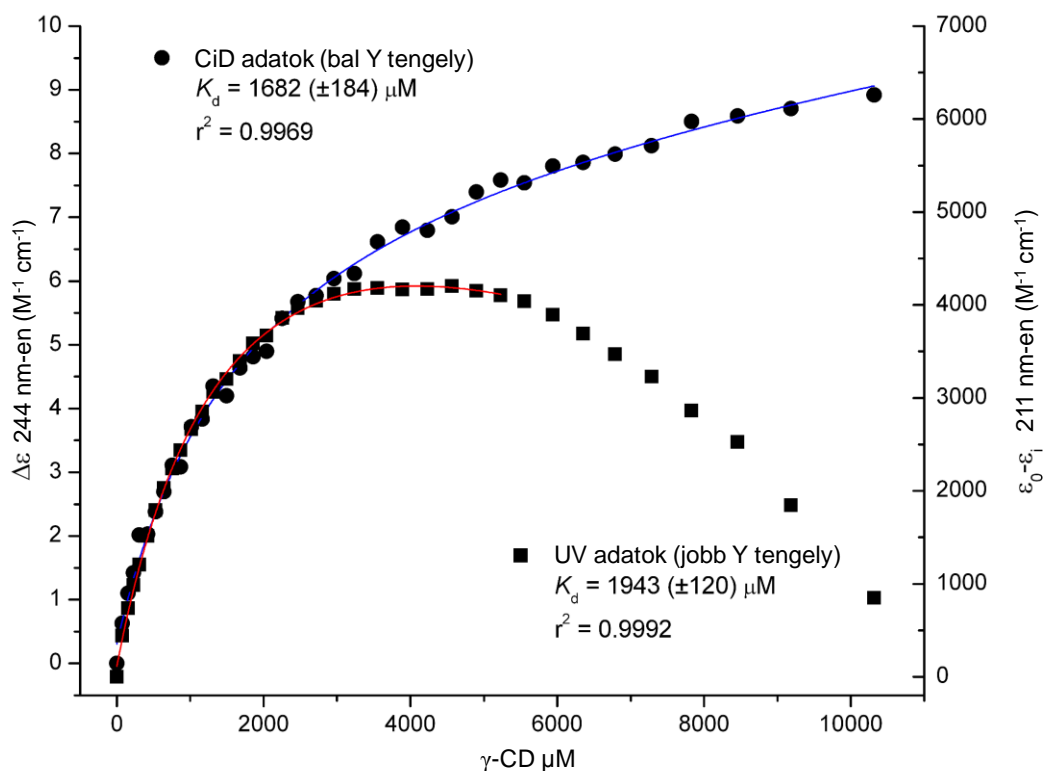


40. ábra. 30 μM -os (S)-Dpx oldat (pH~4) γ -CD-vel való titrálása során bekövetkező CiD és UV spektrum változása

A hipokrómia kialakulásával egyidejűleg az alacsony energiájú váll fokozatos vöröseltolódást szenved, ami végül egy határozott csúcs kialakulását eredményezi 232 nm-es λ_{max} -nál. A 211 nm-nél lévő legintenzívebb UV sáv spektrális helyzete a titrálás során változatlan marad. Az abszorpciós spektrumban 233 nm-nél egy izobesztikus pontot találunk, ami a szabad és a CD-hez kötött Dpx közötti egyensúlyt jelzi (40. ábra). A β -CD-s titrálás spektrumai a γ -CD-hez hasonló, bár kevésbé kifejezett változásokat mutatnak, a γ -CD-hez képest lényegesen gyengébb hipokrómiával (az ϵ_{max} csökkenése 2500 vs. 4200 $M^{-1} cm^{-1}$).

Naftolok és naftil-aminok irodalomban közölt UV spektroszkópiás adatai alapján ismert [134, 139], hogy ha az α -pozíció egy elektronküldő csoportot tartalmaz, akkor az a 1B_b sávnak a kiindulási naftalin molekulához képest két összetevőre való hasadását eredményezi, melyekhez egy alacsonyabb 1A_g és egy magasabb 1B_b energiaállapot rendelhető [135, 136]. Ez a szubsztituens nemkötő elektronpárjainak és az aromás rendszer π -elektronrendszerének kölcsönhatása során jön létre. Egy esetleges hidrogénkötés azonban jelentősen csökkentheti a szubsztituens elektrondonor képességet, mely az 1A_g sáv alacsonyabb hullámhosszak felé történő eltolódásában jelentkezik [134]. A Dpx alkoxicsoportjának vízmolekulákkal való intermolekuláris hidrogénkötése miatt ez a sáv vállként figyelhető meg a szabad Dpx vizes oldatban mért UV spektrumán (39. ábra). Aprotikus oldószerben (dioxánban vagy acetonitrilben) viszont jelentős batokróm elmozdulást mutat, és egy határozott csúcsként jelenik meg. Ezzel megegyező módon a CD-k jelenlétében tapasztalt vöröseltolódás diagnosztikus jel a Dpx naftilcsoportjának a CD apoláris üregébe való bekerülésére.

A fent összefoglalt spektroszkópiai változások a Dpx/CD zárványkomplexek kialakulását bizonyítják. Az UV hipokrómia – összhangban az NMR titrálás eredményeivel – egy gazda és két vendégmolekula kölcsönhatását feltételezi. A CD üregében elhelyezkedő két Dpx naftil-naftil- vagy fenil-naftilgyűrűinek térbeli közelsége esetén kedvező dipól-dipól kölcsönhatások jönnek létre a π - π^* átmeneti momentumok között, melynek eredményeképpen az adott abszorpciós sávban a kromofórok intermolekuláris elhelyezkedésétől függően hipo- vagy hiperkróm hatás jön létre [143]. A nagy moláris feleslegben alkalmazott γ -CD esetén megfigyelhető hiperkróm eltolódás megszűnése majd a megjelenő hipokrómia eltolódás kísérleti tényként szól az $2Dpx \cdot CD$ sztöchiometria mellett. Ahogyan azt a 41. ábra mutatja, 5 mM-os CD koncentráció felett ϵ_{max} értéke emelkedni kezd, majd a titrálás végén visszatér a kezdeti értékéhez.

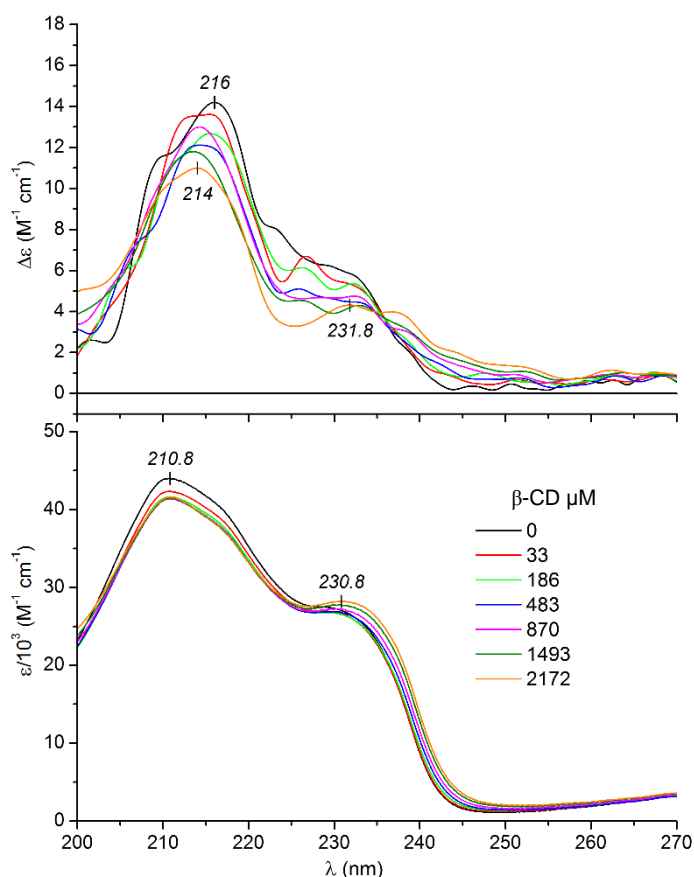


41. ábra. A 30 μM Dpx oldat $\gamma\text{-CD}$ koncentrációjának függvényében ábrázolt CiD és UV abszorbancia változások. $\Delta\epsilon$: a Dpx moláris cirkuláris dikroizmus abszorpciós együtthatója. ϵ_0 : a Dpx moláris abszorpciós együtthatója CD-mentes oldatban. ϵ_1 : a számított ϵ értékei növekvő $\gamma\text{-CD}$ koncentrációknál. A folytonos vonalak a Prism 6 szoftverrel illesztett nemlineáris függvények eredményei. A disszociációs állandó (K_d) értékét az ábrán tüntettük fel.

Ezek a spektrális változások a nagy feleslegben lévő $\gamma\text{-CD}$ jelenlétében disszociáló $2\text{Dpx}\cdot\text{CD}$ komplexek koncentrációjának csökkenésével és az 1:1-es részekék koncentrációjának egyidejű növekedésével magyarázhatók, amely hatások végül a szabad Dpx UV spektrumához hasonló spektrumot eredményeznek. A fenilgyűrűt nem tartalmazó (\pm)-naproxén esetén $\gamma\text{-CD}$ -hez való 2:1-es ($2\text{Nap} : 1\text{CD}$) kötődést ^{13}C NMR spektroszkópia alapján sikerült bizonyítani [144], viszont a Dpx-hez még inkább hasonló, α -szubsztituált naftilcsoportot tartalmazó β -blokkoló – (\pm)-propranolol abszorpciós spektruma nem mutatott semmilyen érzékelhető változást β - vagy $\gamma\text{-CD}$ jelenlétében. Ez a Dpx fenilgyűrűjének szerepét erősíti meg az $2\text{Dpx}\cdot\text{CD}$ komplexek stabilizálásában. A CD-k aszimmetrikus belső üregüknek (mint királis mikrokozmoszoknak) köszönhetően CiD jeleket indukálhatnak a komplexált akirális vendégmolekulák abszorpciós régiójában [145, 146], vagy módosíthatják a királis molekulák eredeti CiD spektrumait [147, 148]. A Dpx ez utóbbi csoportba tartozik, mivel egy határozott CiD sáv fokozatos kialakulását mutatja a vöröseltolódott $^1\text{A}_g$ átmenetnél 240 nm-en (38. ábra). A Dpx CD-

komplekképzésének hatására bekövetkező abszorpciós spektrum változásait felhasználhatjuk a stabilitási állandó meghatározására is (41. ábra). A CiD és UV spektroszkópiai adatokból számított állandók értéke jó egyezést mutatnak a fázis-oldhatósági és az NMR titrálás során meghatározott állandókkal (6. táblázat).

Úgy tűnik, a β -CD esetében a kisebb üregméret módosítja a Dpx molekulák kötődését. Jóllehet a gyenge hipokromia 2:1 komplexek jelenlétére is utal, a 1B_b CiD csúcs λ_{\max} értéke kéeltolódást mutat, és a vöröseltolódott 1A_g CiD sáv $\Delta\varepsilon_{\max}$ értéke elmarad a γ -CD-nél tapasztalthoz képest (40. ábra). A 220-240 nm közötti hullámhossz tartományban a vibrációs finomszerkezet található, ami a naftilgyűrű β -CD üregébe való szoros, térben korlátozott illeszkedésének a következménye lehet. Előfordulhat, hogy a 2:1 komplexekben a második Dpx molekula nagyobb része a β -CD üregének bejárata környékén helyezkedik el, nagyrészt a vizes fázisban.



42. ábra. 23 μM -os Dpx oldat (pH~4) γ -CD-vel való titrálása során bekövetkező CiD és UV spektrum változása

A különféle technikákkal meghatározott Dpx/CD komplexek stabilitási állandóit 6. táblázatban foglaltuk össze.

6. táblázat. A Dpx/CD komplexek egyensúlyi állandóinak értékei [M^{-1} egységben, (1) és (9) egyenletekkel számított], vizes oldatban 25 °C-on mérve, különböző mérés technikák használatával

Komplex	Egyensúlyi állandók				
		Fázis-oldhatóság	1H NMR	UV	CiD
Dpx· β -CD	K_{11}	886	915	–	–
2Dpx· β -CD	K_{21}	–	276	–	–
Dpx· γ -CD	K_{11}	420	661	515	595
2Dpx· γ -CD	K_{21}	–	447	–	–
Dpx·RAME- γ -CD	K_{11}	594	–	–	–

4.3.5 Molekulamodellözés

Az NMR és CiD/UV spektroszkópiái módszerekkel meghatározott komplex sztöchiometria, valamint a térközelségi (NOE) méréseken alapuló komplex szerkezetek háromdimenziós szemléltetésére (főként a szokatlan 2Dpx·CD részecske esetén), illetve a különféle molekularészek inklúziójával kialakuló komplexek kölcsönhatási energiákon alapuló stabilitásának közelítő becslésére molekulamodellözést végeztünk.

4.3.5.1 Kölcsönhatási energiák számítása

A kölcsönhatási energiákat (7. táblázat) úgy számíthatjuk ki, hogy az adott komplexek energiájából kivonjuk a szabad Dpx és CD energiájának az összegét (2:1 komplexek esetében a Dpx energiájának a kétszeresét kell figyelembe venni):

$$E_{\text{kölcsönhatási}} = E_{\text{komplex}} - (E_{\text{CD}} + E_{\text{Dpx}}) \quad (1:1 \text{ komplexek}) \quad (16)$$

$$E_{\text{kölcsönhatási}} = E_{\text{komplex}} - (E_{\text{CD}} + 2E_{\text{Dpx}}) \quad (2:1 \text{ komplexek}) \quad (17)$$

Eredményeink alapján a β - és γ -CD apoláris üregébe való illeszkedés szempontjából az 1:1 komplexekben kedvezményezett a naftilcsoport. Ugyanez a tendencia figyelhető meg az 2:1 komplexek esetében, mivel azok az orientációk kedvezményezettek, ahol legalább az egyik Dpx a naftilgyűrűjével vesz részt a gazda-vendég kölcsönhatások kialakításában. Ezen túlmenően a γ -CD esetében a nagyobb gyűrűméret lehetővé teszi, hogy mindkét Dpx molekula naftilgyűrűje bekerüljön a CD üregébe. Amennyiben a komplexképződést több lépésben jellemezzük, nyilvánvaló megállapítás az, hogy az 1:1 komplexek képződése szabad gazda és vendégmolekulákból minden esetben nagyobb energiacsökkenést eredményez, mint az 1:1 \rightarrow 2:1 komplexképződési lépés (amit az 1:1 és 2:1 komplexek kölcsönhatási energiái közötti különbség számszerűsít).

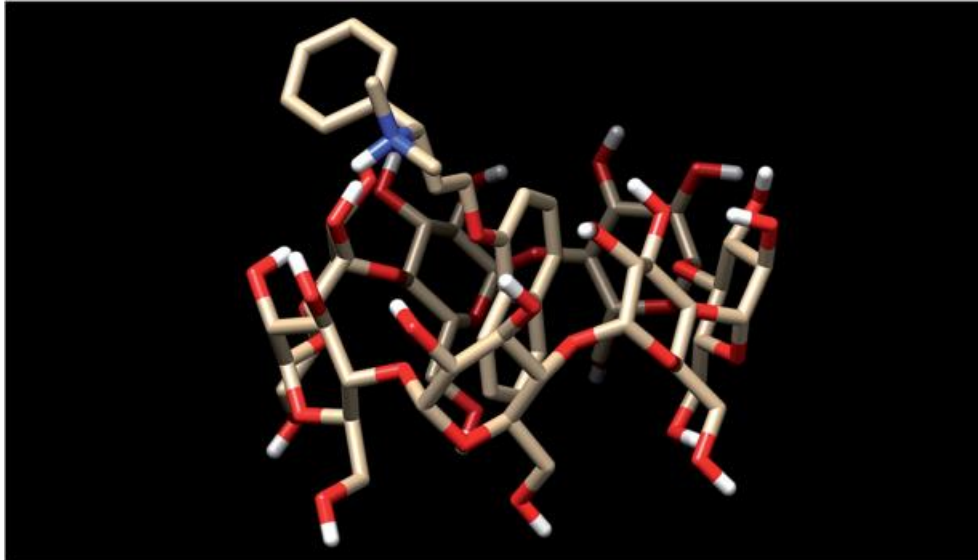
7. táblázat. A különböző Dpx/CD komplexekre számított kölcsönhatási energiák [kcal/mol] összefoglalása

CD : Dpx	2 : 1	2 : 1	2 : 1	1 : 1	1 : 1
komplekxképző rész [*]	(naf, naf)	(fen, naf)	(fen, fen)	(naf)	(fen)
β -CD	-18.6441	-22.8121	-16.6543	-17.4424	-16.4024
γ -CD	-24.6823	-20.9274	-18.6062	-17.0864	-12.5464

^{*}A Dpx komplexképzésben résztvevő molekularészei – naf: naftilgyűrű, fen: fenilgyűrű

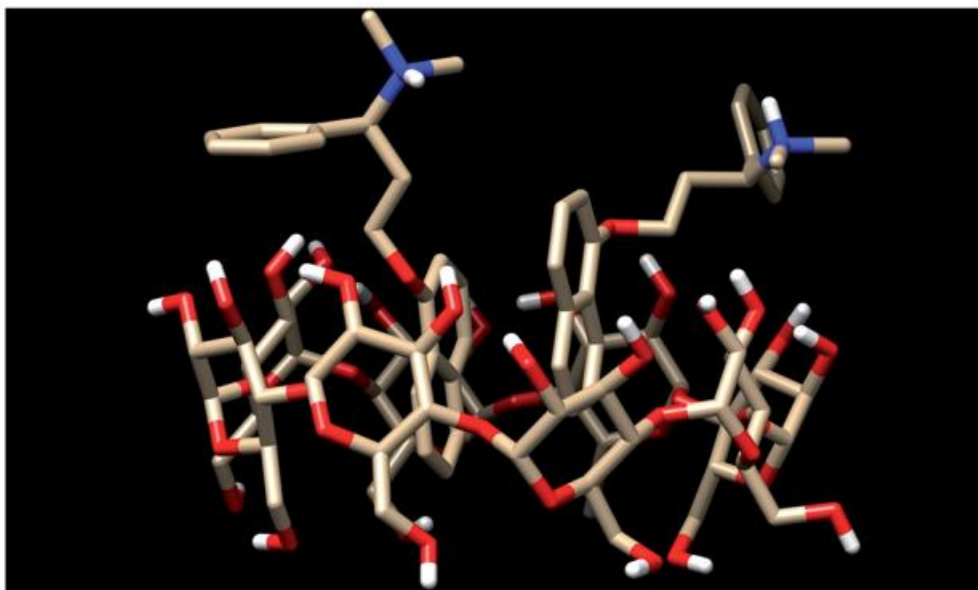
4.3.5.2 A ciklodextrin komplexek háromdimenziós szerkezetei

Az Dpx β -CD és γ -CD 1:1 komplexei esetén egyaránt a naftilgyűrűnek az inklúziója a kedvezőbb (43. ábra).



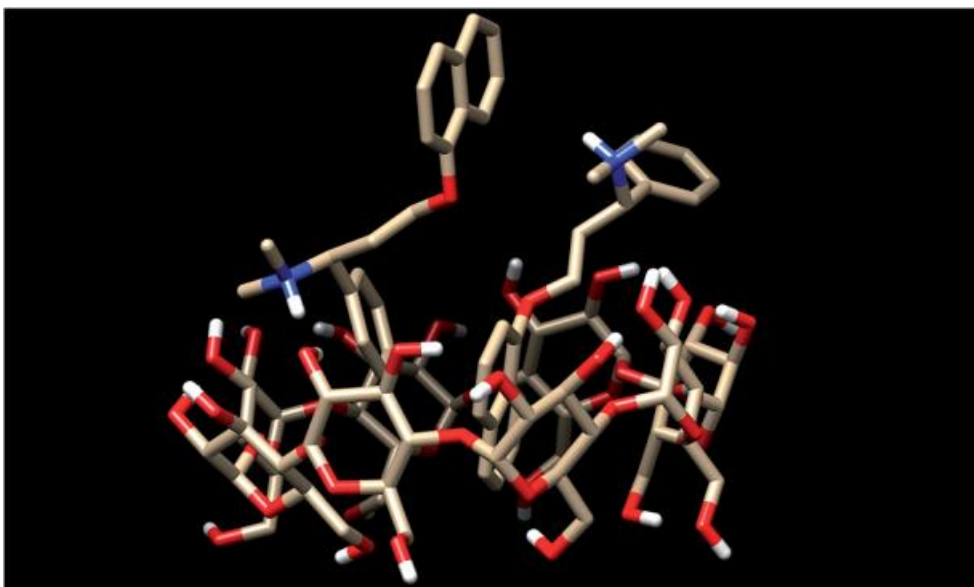
43. ábra. A Dpx- β -CD komplex legalacsonyabb energiájú szerkezetét ábrázoló molekulamodellje

A 2Dpx- γ -CD komplex esetén mindkét Dpx molekula naftilgyűrűje a CD üregében helyezkedik el (44. ábra), egymástól körülbelül 4 Å távolságra, csaknem párhuzamos elrendezésben. Ugyanez a folyamat figyelhető meg az azonos sztöchiometriájú β -CD-vel képzett komplexek esetén is azzal az eltéréssel, hogy a második naftilgyűrű döntően a β -CD üregén kívül tartózkodik.



44. ábra. A 2Dpx- γ -CD komplex molekulamodellezéssel optimalizált szerkezete, melyben a két naftilgyűrű kerül a CD üregébe.

Abban az esetben amikor az egyik Dpx molekula naftil- majd a másik Dpx molekula fenilgyűrűje együtt kerül a γ -CD üregébe, egy kevésbé szoros illeszkedést kapunk (45. ábra). Ugyanez figyelhető meg az ezzel azonos β -CD komplexek esetén is azzal a különbséggel, hogy a fenilgyűrű többnyire az ürege kívül tartózkodik, ami összhangban van az NMR kísérletek során megfigyelt NOE mérésekkel.



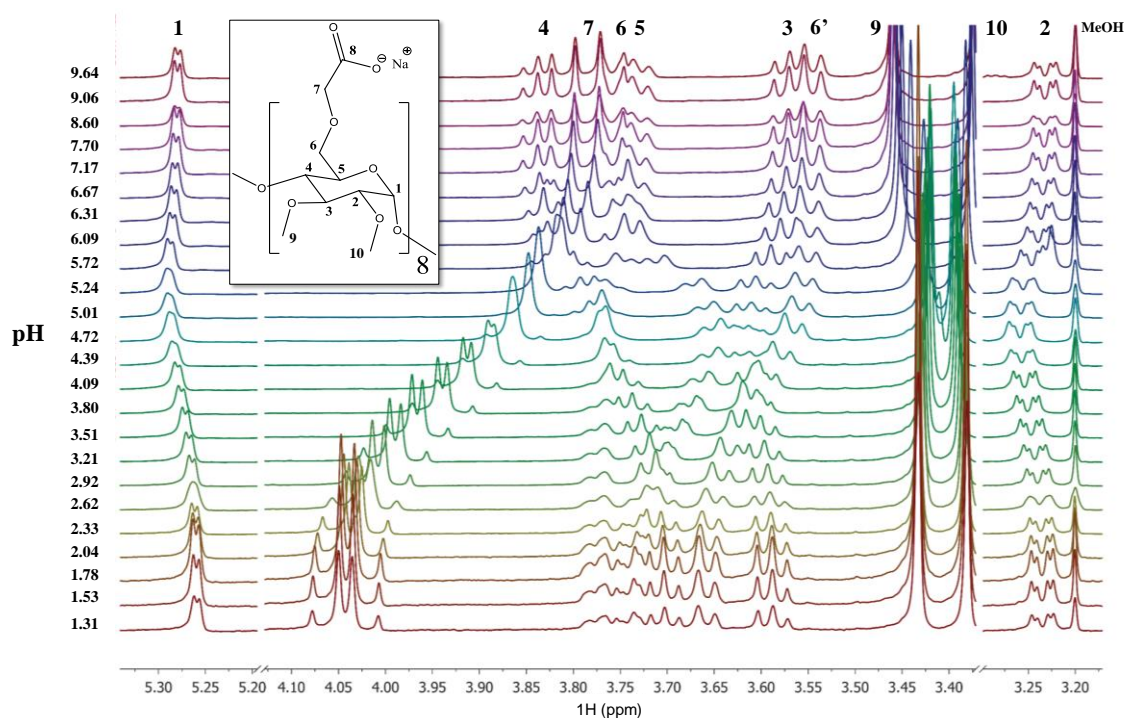
45. ábra. A 2Dpx· γ -CD komplex molekulamodellezéssel optimalizált szerkezete, ahol a két különböző aromás gyűrű kerül a CD üregébe.

4.3.6 ODMCM- γ -CD-vel való kölcsönhatás vizsgálata

Az Dpx és aktív metabolitjainak – mint különböző rendű aminocsoportot és komplexképzésre alkalmas aromás molekularészeket tartalmazó modellvegyületek – enantiomer elválasztását egy új, eddig még nem vizsgált szelektorral, az izomertiszta perszubsztituált oktakis-(2,3-di-*O*-metil-6-*O*-karboximetil)- γ -ciklodextrinnel (ODMCM- γ -CD) valósítottuk meg. Ez a királis szelektor a CD gyűrű szekunder oldalán teljesen metilezett, és a primer oldalon ionizálható karboximetil-csoportokat hordoz (sematikus szerkezetet lásd a 46. ábrán)

4.3.6.1 Az ODMCM- γ -CD sav-bázis tulajdonságai

Tekintettel arra, hogy az új CD-származék komplexképzésben és enantiomer elválasztásban fontos szerepet játszó sav-bázis sajátosságai nem voltak ismertek, először az ODMCM- γ -CD NMR-pH titrálását végeztük el. A nyolc karboximetil-szubsztituent tartalmazó ODMCM- γ -CD a pH-tól függően többféle töltéssel rendelkező részecskéként lehet jelen az oldatban, a töltésmentestől egészen az oktaanionos formáig. A 46. ábra az ^1H NMR-pH titrálás során felvett spektrumsorozat szénkötésű protonjainak pH-függő kémiai eltolódásváltozását ábrázolja a pH 1,31 – 9,64 tartományban.



46. ábra. Az ODMCM- γ -CD pH-függő NMR spektrumai 25°C-on, 600 MHz-en.

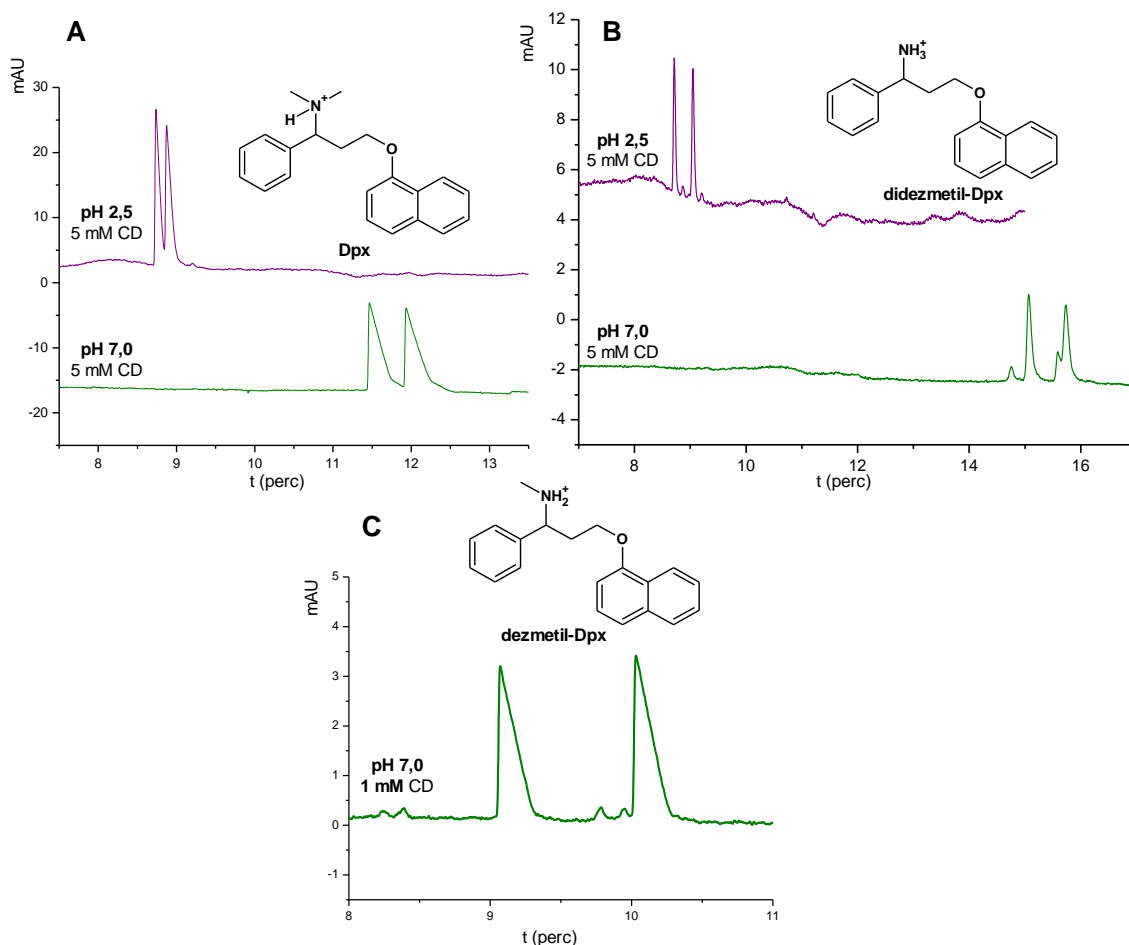
A protonálódó csoporthoz legközelebbi H-7-es protonokon jelentős (>0,25 ppm), pH-függő kémiai eltolódásváltozás figyelhető meg. A lúgos oldatok savval történő titrálása során a kémiai eltolódásváltozásából a lokális elektronsűrűség változásaira és így a karboxilátcsoport protonálódására következtethetünk. Néhány proton esetében a megfigyelt „*wrong way*” ^1H kémiai eltolódásváltozás szerkezeti átalakulásra utalhat (pl. a protonok újraeloszlása a karboxilátcsoportok között) [149]. Még a karboxilcsoporttól több mint tíz szigma kötésre elhelyezkedő metoxicsoportok kémiai eltolódása is tükrözi a protonálódási folyamatokat. A CD H7 protonjainak ^1H NMR titrálási görbéiből látható, hogy a nyolc karboxilcsoport átfedő protonálódási lépcsői pH 2,04–7,70-ig tartó tartományban találhatóak, tehát míg pH 7,0-en az ODMCM- γ -CD túlnyomórészt oktaanionos formában van jelen, addig pH 2,5-ön minimális negatív töltése van. Az ODMCM- γ -CD sav-bázis tulajdonságainak részletesebb jellemzésére a jövőben független kísérletet tervezünk.

4.3.6.2 Kapilláris elektroforetikus vizsgálatok

A Dpx, a dezmetil-Dpx és a didezmetil-Dpx enantiomerek elválasztását két pH-n végeztük el (pH 2,5 és pH 7,0) különböző ODMCM- γ -CD koncentráció mellett. A vizsgált optikailag aktív vegyületek mindkét pH-n pozitív töltéssel rendelkeznek. Az ODMCM- γ -CD pH 2,5-ön közel semlegesnek tekinthető, míg pH 7,0-en deprotonált, és ionos kölcsönhatások kialakítására képes a pozitív töltéssel rendelkező vendégmolekulákkal. A 7. táblázat összegzi a királis felbontásokat (R_s) a két pH-n, 1-5-10 mM ODMCM- γ -CD koncentráció mellett, míg a 47. ábra szemléltetésként a két pH értéken, 5 mM (1 mM) CD koncentrációnál regisztrált elektroferogramokat mutatja be:

7. táblázat. A Dpx és dezmetil-metabolitjainak 2,50 és 7,00 pH-jú háttérelktrolitban meghatározott királis felbontási értékei ODMCM- γ -CD szelektor alkalmazásával (*a*: nem lehet meghatározni, lásd a szövegben)

Vegyületek	pH = 2,50			pH = 7,00		
	1 mM	5 mM	10 mM	1 mM	5 mM	10 mM
Dpx	–	1,19	1,76	1,03	1,70	2,48
Dezmetil-Dpx	–	0,80	1,00	4,40	<i>a</i>	<i>a</i>
Didezmetil-Dpx	0,96	4,61	6,53	4,31	3,89	<i>a</i>



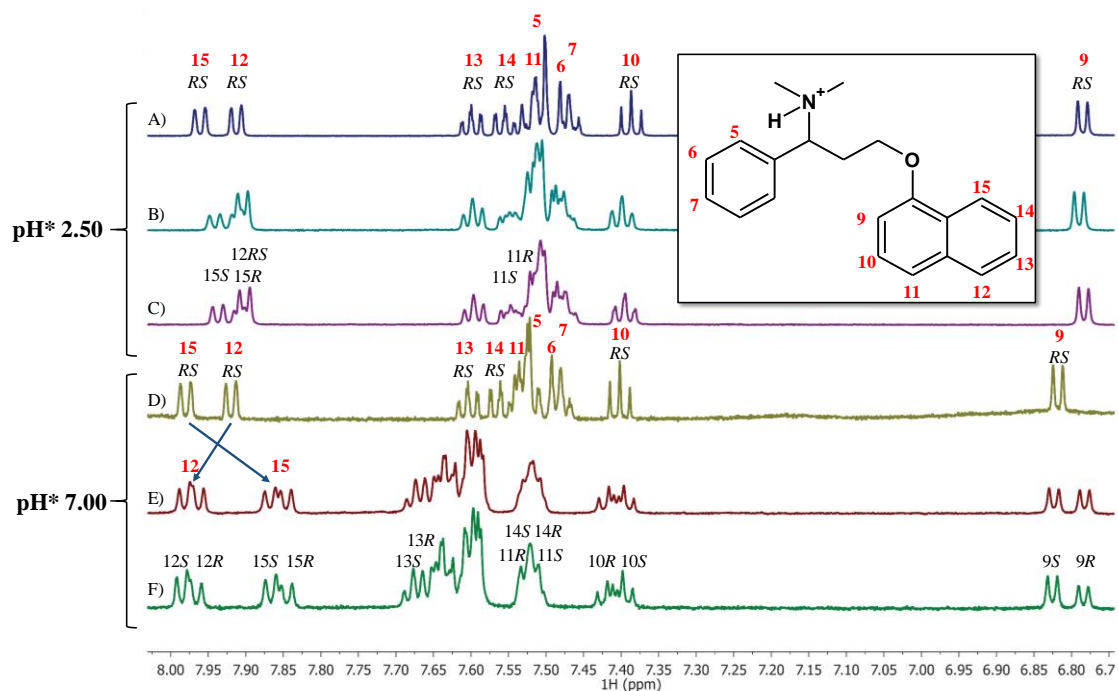
47. ábra. A Dpx (A), a didezmetil-Dpx (B) és a dezmetil-Dpx (C) enantiomerek elválasztását bemutató elektroferogramok ODMCM- γ -CD királis szelektorral (58.5/50 cm, 50 μ m kapilláris, 20 mM H_3PO_4 -NaOH pH 2,5, és 20 mM NaH_2PO_4 -NaOH pH 7,0 pufferek, 5 mM/1mM ODMCM, 30 kV; 20 °C; 200 nm)

Összehasonlítva a pH 2,5-ön és a pH 7,0-en regisztrált elektroferogramokat látható, hogy a királis szelektor hatására bekövetkező migrációs idő változás pH 7,0-en jelentősebb. Egyes elektroferogramok kiértékelése a csúcstorzulások és a hosszú analízisidők (több mint 60 perc) miatt nem volt lehetséges. Didezmetil- és dezmetil-Dpx esetén pH 7,0-en már 1 mM-os CD koncentrációnál megfelelő enantiomerelválasztást sikerült elérni (47. ábra B, C; 7. táblázat)

4.3.6.3 NMR vizsgálatok

Az ODMCM- γ -CD enantiomer elválasztásának molekuláris szintű megismeréséhez NMR vizsgálatokat is végeztünk. Az ODMCM- γ -CD enantioszelektivitását két pH értéken vizsgáltuk (pH* 2,5 és 7,0;), a CE mérésekhez hasonló körülmények között, D_2O -os oldatokban. Az ^1H NMR spektrumokban megfigyelhető a komplexképzés indukálta kémiai eltolódásváltozás mindkét pH értéken a két enantiomerre. A 48. ábra a racém Dpx

^1H NMR spektrumának aromás részletét mutatja be a királis szelektor nélkül, illetve az ODMCM hozzáadása után, ahol a jelkettőződés a Dpx enantiomerjeinek ciklodextrinnel képzett diasztereomer komplexképzésére utal. A dezmetil-metabolitok NMR mérései esetén hasonló jelenséget tapasztaltunk.

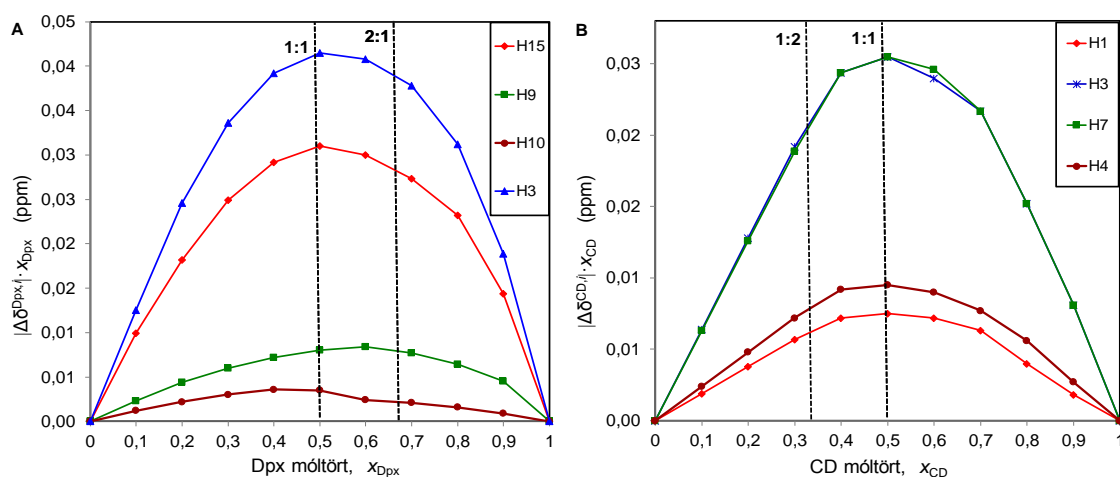


48. ábra. A) A racém Dpx, B) racém Dpx, ODMCM- γ -CD (1:4 molarány) és a C) racém Dpx, ODMCM- γ -CD rendszer ^1H NMR spektrumainak részlete (*S*)-Dpx hozzáadása után pH 2,5-nél; D) racém Dpx, E) racém Dpx, ODMCM- γ -CD; 1:4 molarány F) racém Dpx, ODMCM- γ -CD rendszer (*S*)-Dpx hozzáadása után pH 7,0-nél;

Az egyes enantiomerek (diasztereomer komplexek) jelhozrendelését enantiomertiszta (*S*)-Dpx hozzáadásával sikerült megvalósítani. A két pH értéken felvett ^1H NMR spektrum között jellegzetes különbségek voltak megfigyelhetők. Míg pH 2,5-ön (ahol a Dpx monokationos formában van jelen, és az ODMCM- γ -CD gyakorlatilag semleges) csak a naftilgyűrű H15 protonja mutatott számottevő jelkettőződést, addig pH 7,0-en (ahol a Dpx monokationos és az ODMCM- γ -CD polianionos formában van jelen) a naftilgyűrű H9, H10, H11, H12, H13, H14 és H15 protonjai esetén is jelentős jelkettőződést tapasztaltunk (48. ábra). Az eredményekből látható, hogy a komplexképzés indukálta kémiai eltolódásváltozás sokkal kifejezettebb pH 7,0-en, mint pH 2,5-ön. A kémiai eltolódás csökkenését főleg a H15 ($\Delta\delta > 0,1$ ppm) és a H14 ($\Delta\delta = 0,05$ ppm) protonok esetén tapasztaltuk, valamint a H12 és H13 esetén az eltolódások növekedését figyelhetük meg (48. ábra). A $\Delta\delta$ értékekből és a felhasadó jelek számából is látható, hogy

az ODMCM- γ -CD a Dpx enantiomerjeivel enantioszelektív kölcsönhatásba lép mindkét pH értéken, de különösen pH 7-en. Ezek az eredmények összhangban vannak a királis CE méréseinkkel is.

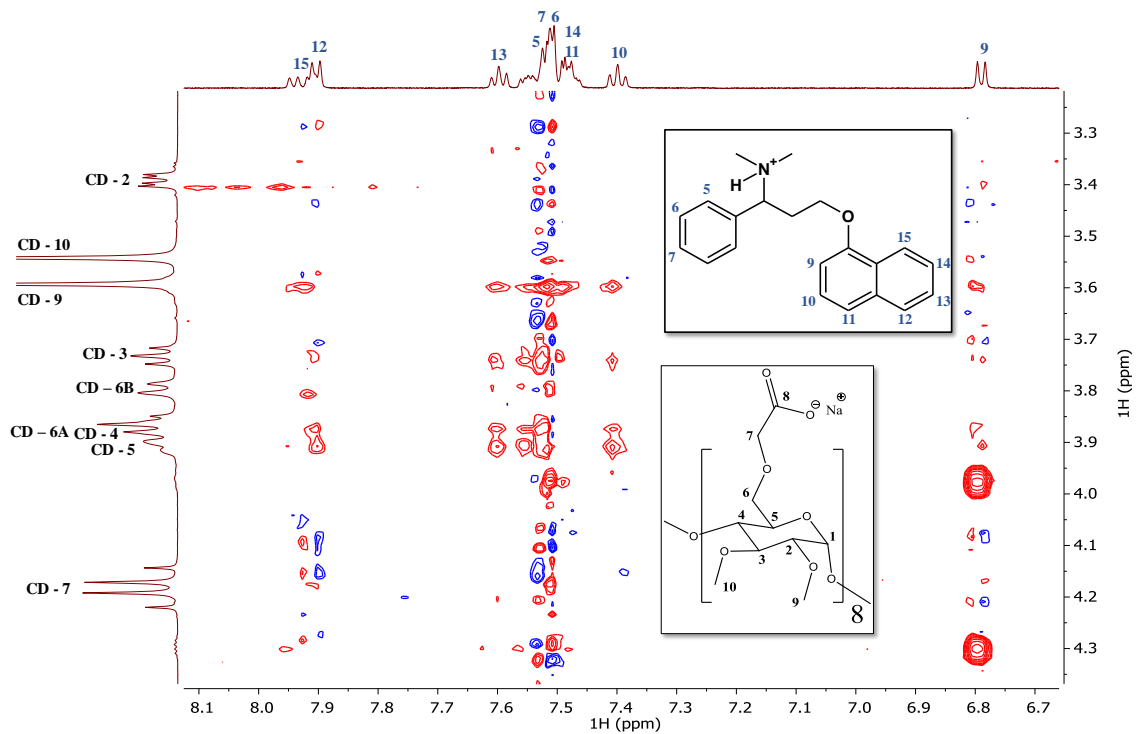
NMR méréseinket a sztöchiometria Job módszer szerinti meghatározásával folytattuk két pH értéken, annak eldöntésére, hogy a Dpx ODMCM- γ -CD komplexek sztöchiometriája mutat-e pH-függést. pH 2,5-ös értéken a növekvő CD arány ellenére is szinte elhanyagolható kémiai eltolódásváltozást tapasztaltunk. A Dpx H9 protonja csak ppb-ben mérhető változást mutatott, ahol a Job görbe maximuma a 0,5-ös móltörtnél 1:1-es sztöchiometriát jelzett. A 49. ábra a pH 7,0-es közegben mért adatok alapján szerkesztett Job görbék mutatja be. A natív γ -CD-vel összevetve az ODMCM- γ -CD protonjai egyértelműen 1:1-es sztöchiometriát mutatnak. A Dpx protonjai közül is szinte valamennyi 1:1-es sztöchiometriára utal, kivéve a H9-es proton Job görbáját, melynek maximuma 0,6 felé tolódott, így a natív γ -CD-hez hasonlóan ez a 2Dpx·ODMCM- γ -CD komplexek csekély mértékű keletkezését jelzi.



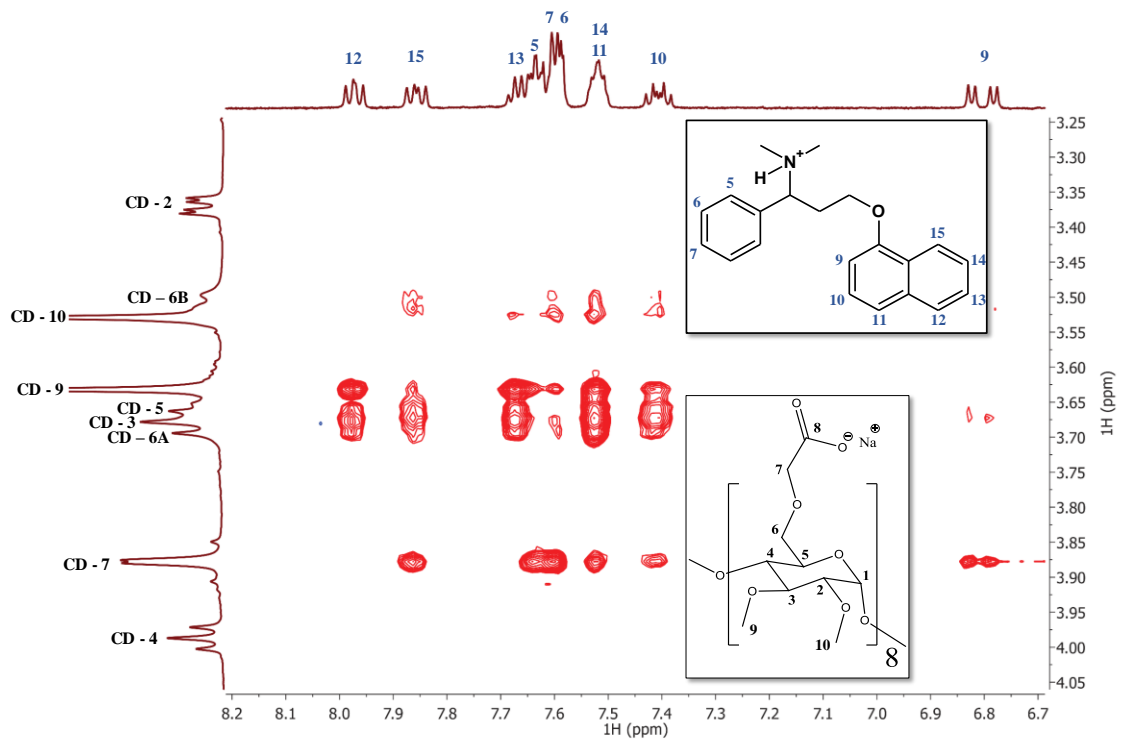
49. ábra. A Dpx (A) és ODMCM- γ -CD (B) ^1H NMR mérés alapján számított Job görbéi pH 7-es közegben.

A Job mérések után a komplexképzés geometriájának, meghatározásához 2D ROESY méréseket végeztünk el mind a két vizsgált pH értéken. A 50. ábra a pH 2,5-ön mért ROESY spektrum egy részletét ábrázolja. Ahogy az a Job mérések során is látható volt, a komplexképzés sokkal kevésbé kifejezett pH 2,5-ön. Ezt a csaknem zajhatáron lévő NOE korrelációk intenzitása is alátámasztja (50. ábra). A komplexképzésben egyértelműen az aromás részek játszanak szerepet, amit a CD üregében lévő H3 és H5 protonokkal adott gyenge keresztkorrelációik jeleznek. Ezzel szemben a 51. ábrán, a pH 7-en felvett spektrumon sokkal intenzívebb intermolekuláris keresztcsúcsokat

detektáltunk, így sokkal részletesebb képet kaptunk a komplexképzés geometriájára vonatkozóan, melyet a megbeszélések fejezetben tárgyalunk részletesen.



50. ábra. A Dpx/ODMCM- γ -CD 2D ROESY NMR spektrumának részlete pH 2,5-ös oldatban, 25°C-on.

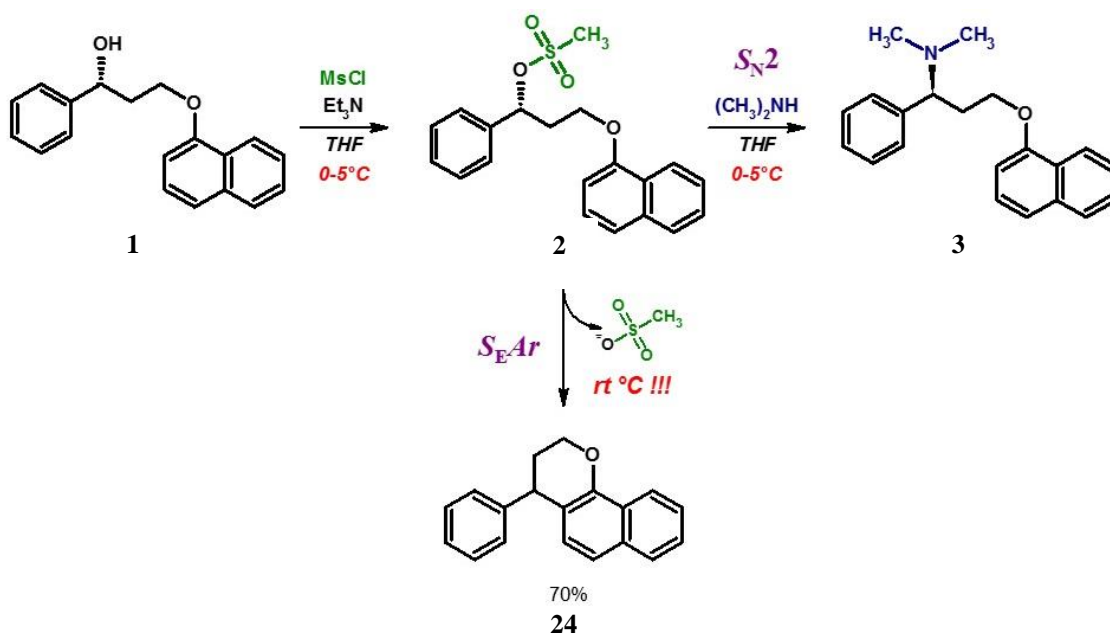


51. ábra. A Dpx/ODMCM- γ -CD 2D ROESY NMR spektrumának részlete pH 7,0-es oldatban, 25°C-on.

5 Megbeszélés

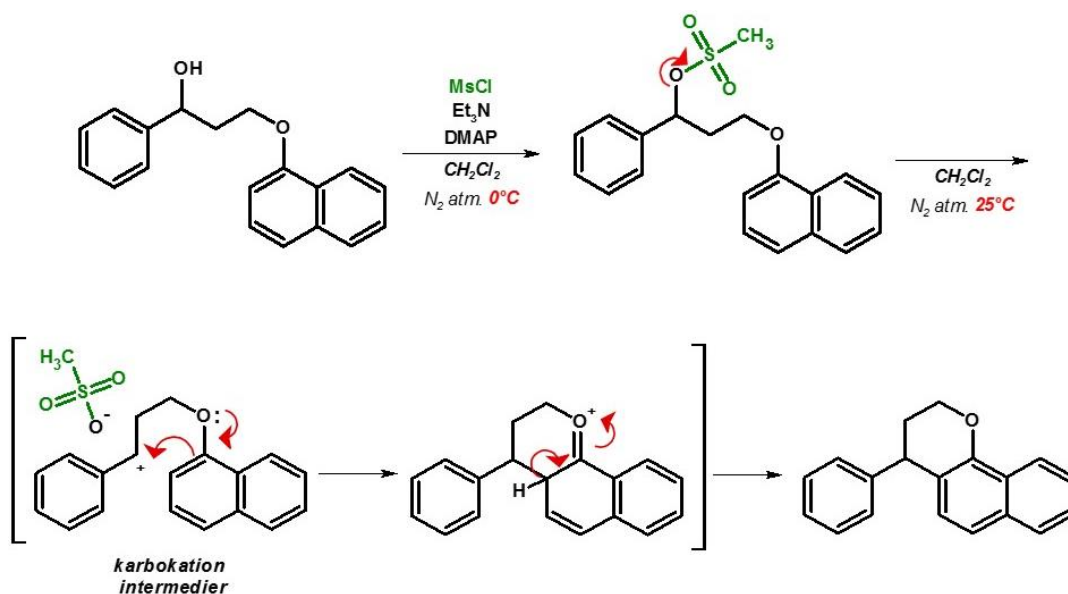
5.1 A dapoxetin gyártási szennyezője

A dapoxetin szintézisekor a mezilát intermedier (2) előállítása kritikus lépésnek bizonyult. Rohith és munkatársai 2013 januárjában megjelent közleményükben már jellemezték a mezilátot (2), ahol ^1H NMR spektrumot is bemutatnak, bár az izolálás lépéseit nem írják le [35]. A mezilát izolálásával előttünk egy másik kutatócsoport is próbálkozott, szintén sikertelenül. 2013 augusztusában megjelent közleményükben instabilitási problémákkal magyarázzák, hogy nem tudták meghatározni az izolált termék szerkezetét [23]. Így független irodalmi előzmények is alátámasztják saját tapasztalatainkat, miszerint a mezilát intermedier (2) előállítása kritikus lépés a hatóanyag előállítása során. A bomlástermék szerkezetének megfejtésével magyarázatot adhatunk a reakció mechanizmusára, és felhívhatjuk a figyelmet a kritikus kísérleti paraméterek fontosságára is. Megállapítottuk, hogy a gyűrűzárt termék keletkezése függ a reakcióelegy hőmérsékletétől. Tapasztalataink alapján a Dpx szintézisekor az *in situ* keletkező mezilátot 0–5°C-on tartva és dimetil-aminnal szobahőmérsékleten reagáltatva jó hozammal (70–80%) előállítható a hatóanyag (52. ábra). A 0°C-on végzett Dpx szintézis sikeréből kiindulva ezt a megállapítást Khatik és munkatársai is megteszik, bár ők a reakció alacsony hozamának fő okaként a dimetil-amin illékonyágát emelték ki [23]. A 0–5°C-on végzett Dpx szintézis reakcióelegyéből vett mintából HPLC-vel a Dpx fő csúcsa mellett a szennyező gyűrűzárt melléktermék kis mennyisége ez esetben is kimutatható volt.



52. ábra. A hőmérséklet hatása a mezilát átalakulására

A mezilát alacsony hőmérsékleten képződik, és a hőmérséklettől valamint a nukleofil reakciópartner jelenlététől függően különböző reakciómechanizmus szerint megy végbe az átalakulása eltérő terméket eredményezve. Amennyiben alacsony (0–5°C) hőmérsékletre melegítjük a reakcióelegyet, majd dimetil-aminnal, mint erős nukleofillel reagáltatjuk, a mezilát döntően S_N2 mechanizmus szerint, a kiralitáscentrum inverziójával Dpx-é alakul. Erős nukleofil reakciópartner (dimetil-amin) hiányában viszont a hőmérséklet emelkedése hatására intramolekuláris S_EAr mechanizmusú gyűrűzárási reakció megy végbe, egy naftopiránszarmazék keletkezésével az alábbi mechanizmus szerint (53. ábra):

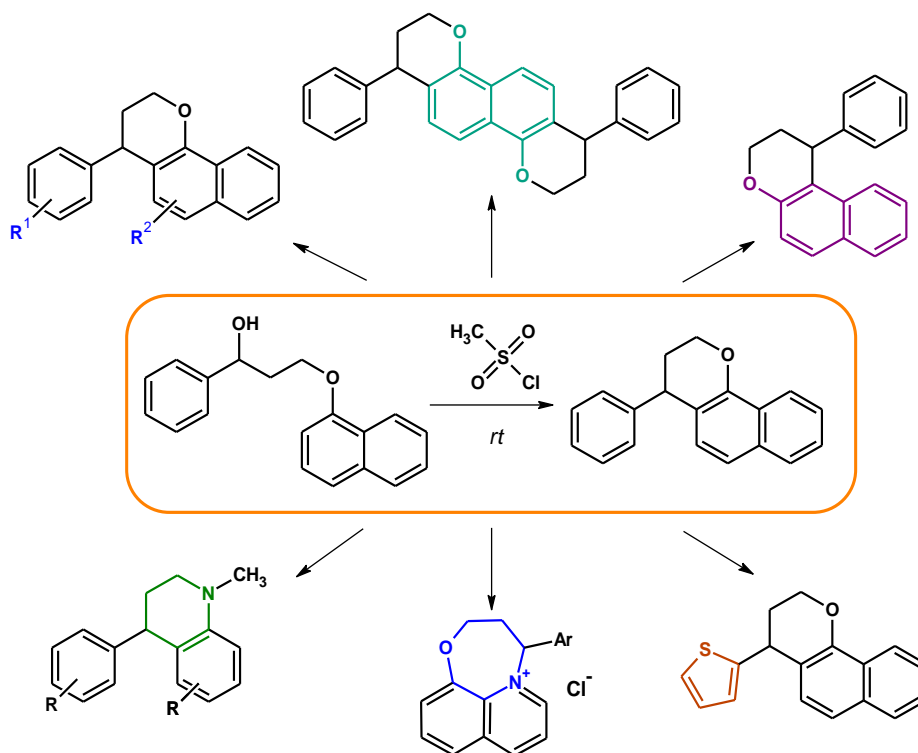


53. ábra. A gyártási szennyező keletkezésének javasolt reakciómechanizmusa

A reakciómechanizmus során a naftilgyűrű 2-es (β) szénatomjának – az oxigén nemkötő elektronpárjának mezomer effektusa miatt – megnő a nukleofil reaktivitása, és így készségesen reagál a mezilát távozása után az oldalláncban keletkező szekunder karbokationnal. A képződő nagyenergiájú piránium intermedier protonvesztéssel rearomatizálódik, így szolgáltatva a neutrális 4-fenil-naftopirán származékot. Az optikailag aktív alkohollal (**1**) végrehajtott reakcióban a gyűrűzárt termék racemát lett, melyet cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával bizonyítottunk. Így az izolált végtermék optikai aktivitásának elvesztése a javasolt karbokationos reakciómechanizmust támasztotta alá.

A szakirodalomban a kondenzált aromás pirán származékokat Friedel–Crafts-féle intramolekuláris alkilezési reakciókkal állítják elő, átmenetifém vagy nemesfém katalízissal [150]. A fémkatalízis használatának hátrányai legtöbbször a katalizátor ára, a termék fémion szennyezésének lehetősége, és a használt katalizátor megsemmisítésének vagy visszanyerésének a költsége. A nem-fémion katalizált reakciók között a sokszor extrém reakciókörülmények (Tf_2O , -78°C [151]) okoznak gondot és az alacsonyabb hozam. Egy 2015-ös szabadalomban enyhe körülmények között, de aranysó (1 mol% AuCl_3 ; CH_2Cl_2 ; 25°C ; 98 %) katalízissal állították elő az általunk is izolált 4-fenilnaftopirán származékot. Itt a szerzők ugyan előnyként említik a magas konverziót, de drága katalizátort használnak [152]. Az általunk leírt reakcióval ez a szintézis alternatív és olcsóbb módon megvalósítható, és további lehetőségeit is tanulmányozhatjuk változatos szerkezetű, új szintetikus vegyületek előállítására.

Ez irányú vizsgálatainkat kiterjesztettük, és az egyes molekularészek (pl. szubsztituált aromás/heteroaromás gyűrűk, valamint tioéter és aromás tercier amin) változtatásával sikerült több esetben is megvalósítani az analóg, új molekulák előállítását (54. ábra).

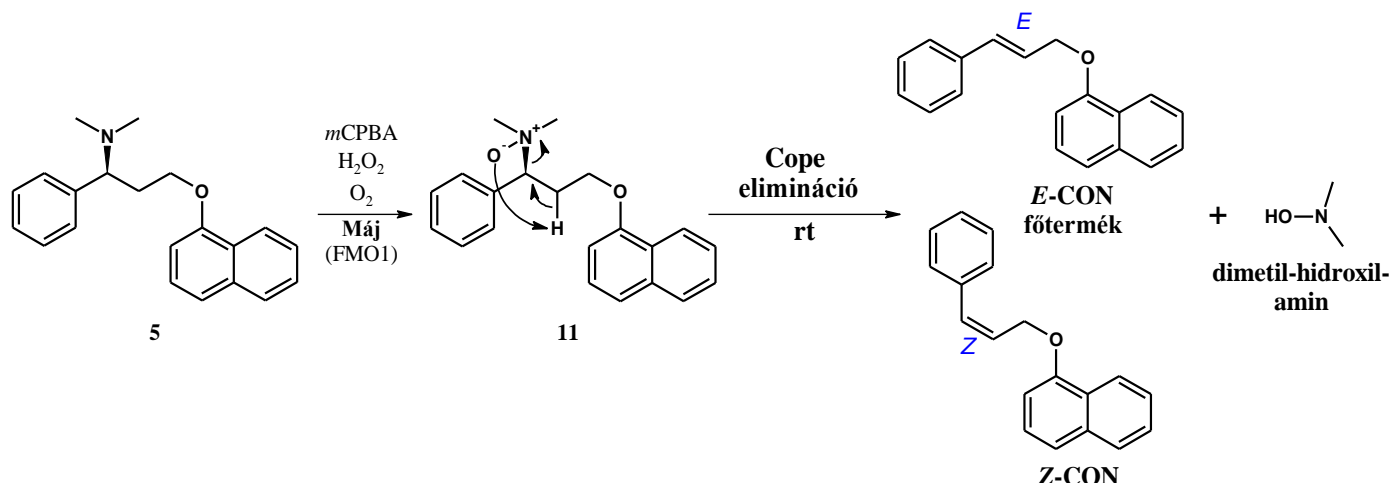


54. ábra. Az általunk vizsgált reakció szerves kémiai felhasználásának lehetőségei változatos szerkezetű vegyületcsaládok szintézisében.

Vizsgálataink ezen részét az értekezésben nem tárgyaljuk a téma szerteágazósága illetve terjedeleme miatt.

5.2 A dapoxetin bomlástermékei

Munkánk során bemutattuk, hogy a Dpx-ből szabad levegőn tárolva Dpx-*N*-oxid keletkezik. A benzilhelyzetben lévő dimetil-amino-*N*-oxid jó távozó csoport, és kilépésével a keletkező *E/Z*-CON-ban kiterjedtebb konjugáció létrejötte okozhatja a Dpx-*N*-oxid fokozott kémiai instabilitását. A Hofmann eliminációtól eltérően a Cope eliminációban a bázis (O^- -ion) a távozó csoport része, így a protont a szomszédos metilénsoportról szakítja le, konformációtól függően a megfelelő geometriai izomerek keletkezésével (55. ábra). A szomszédos szénatom hidrogénjével létrejövő intramolekuláris öttagú gyűrűs átmeneti állapot a magyarázata annak is, hogy a Dpx gyártási szennyezőjét nem azonosíthattuk a hatóanyag bomlástermékei között, hiszen ehhez a benzilhelyzettől távoli naftilgyűrű 2-es szénének *N*-oxiddal való deprotonálódására lenne szükség, ami nem valósulhat meg.



55. ábra. A Dpx bomlásának javasolt mechanizmusa, és a keletkező bomlástermékek szerkezete

Hasonló módon a kiterjedtebb konjugációra való törekvés eredményezheti az eliminációt a tercier aminocsoportot tartalmazó tolperizon [153] és a kvaterner aminocsoportot tartalmazó atrakurium esetén is [154]. Az atrakuriumból *in vivo* májmetabolizmus során Hofmann eliminációval keletkezik a laudanozin és a kvaterner monoakrilát [154]. A Cope elimináció szintén végbemehet fiziológias körülmények között, hidroxil-aminokat és olefineket eredményezve [155-157]. Az *in vivo* Cope eliminációt egy leukotrién A4 hidroxiláz gátló vegyület patkányban vizsgált metabolizmusa során szintén leírták [158]. A szerzők kiemelik, hogy a keletkező hidroxil-amint és akrilát metabolitokat fokozott reaktivitásuk miatt nem sikerült izolálniuk a biomátrixból, de NMR-rel azonosították az *N*-oxidból diklórmetánban keletkező bomlástermékeket.

Vizsgálataink alapján a Dpx humán metabolizmusának fő metabolitja a Dpx-*N*-oxid nagy valószínűséggel – Cope elimináción keresztül – fiziológias körülmények között is bomolhat *E/Z*-CON és dimetil-hidroxil-amin képződésével. Ezen eredményeink hozzájárulnak a Dpx metabolizmusának még teljesebb megértéséhez és a gyógyszerbiztonság növeléséhez.

A Dpx bázis alacsony oldhatósága miatt az utóbbi időben előtérbe kerültek olyan „*prodrug*”-képzési lehetőségek, ahol az oldhatóságát sóképzéssel növelik meg a benzilhelyzetű tercier nitrogén alkilfoszfátokkal történő kvaternerezésével [159]. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a benzilhelyzetű tercier amin kvaternerezése fokozhatja az oldható Dpx *prodrug*ok kémiai instabilitását, hasonlóan a kvaterner amin atrakurium esetén leírt *in vivo* Hofmann eliminációs reakcióhoz [154]. Megfelelő, hatékony és biztonságos alternatívát jelenthet viszont az általunk vizsgált CD-

kel történő komplexképzés és gyógyszerformulálás, mely során a Dpx oldhatóságát, biológiai hasznosulását és kémiai stabilitását egyaránt növelni lehet.

5.3 A dapoxetin kölcsönhatása ciklodextrinekkel

A Dpx CD-vel végbemenő komplexképzésének fontos megállapítása, hogy a nagy belső üreggel rendelkező natív γ -CD két Dpx molekula egy-egy aromás gyűrűjének a befogadására is képes. Ezt bizonyítják a CD belső protonjai és a Dpx fenil- ill. naftilgyűrűjének protonjai között észlelt intermolekuláris NOE-k. A CiD mérés során egyidejűleg regisztrált UV spektrumok maximumának nem szigorúan monoton lefutása és a molekuladinamikai számítások is a „kevert” kötődési mód létrejöttét támasztották alá, mely kevésbé zsúfolt geometriájú 1:1-es komplexekkel van dinamikus egyensúlyban. A részecskeeloszlás grafikonokon látható (29. ábra), hogy valamennyi vizsgált oldatban legnagyobb mennyiségben a Dpx·CD komplex található meg. Itt a mért NOE-k, a protonok komplexképzés indukálta kémiai eltolódásváltozása és a molekulamodellezés főleg a naftilgyűrű CD üregébe kerülését bizonyítják.

A vizsgált CD-k közül a β -CD-vel alakul ki a legstabilabb 1:1-es komplex. Ez esetben a naftilgyűrű komplexképzésben betöltött szerepét és a kisebb üregméretű β -CD-hez sztereikusan szorosabb illeszkedését szintén alátámasztják a mért NOE-k, a CiD/UV titrálási eredmények, és a molekulamodellezés. A kisebb üregméret ellenére az ^1H NMR-rel meghatározott Job görbék és az illesztett titrálási adatsorok ez esetben is egyértelműen bizonyítják a 2Dpx·CD komplexek egyidejű keletkezését. Ez esetben a NOE-k és a CiD/UV mérések viszont kevésbé jelentős változásokat mutatnak. A Dpx többféle geometriájú komplexei alakulhattak ki a naftilgyűrűt tartalmazó 1:1-es komplex mellett. Az ^1H NMR titrálási adatok kemometriai kiértékelése egyértelműen rávilágított arra, hogy a hipotetikus (és kémiai evidenciák alapján is hitelesnek gondolt) {Dpx·CD, Dpx·2CD} modell hasonlóan jól magyarázta a kísérleti adatokat, mint a legjobb {Dpx·CD, 2Dpx·CD} modell, kivéve az „illeszkedés jóságát” és a reziduális szórásokat. Ilyen esetekben független kísérleti bizonyítékok alapján kell döntenünk, mivel a kemometriai mutatók bizonytalanná tehetik a valódi egyensúlyi modell kiválasztását.

A natív CD-vel végzett kísérleteink után egy új, izomertiszta persubsztituált CD-származékkal az ODMCM- γ -CD-vel folytattuk a vizsgálatinkat, mely nyolc karboxilátcsoportjának köszönhetően széles pH-tartományban rendelkezik negatív töltéssel. A Dpx és dezmetil-metabolitjai primer, szekunder és terciér aminként

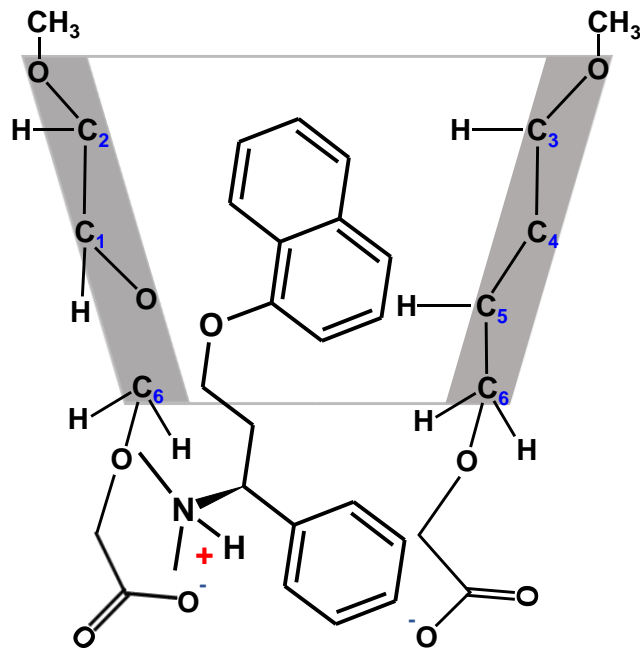
különböző bázicitással, valamint a CD apoláris üregével zárványkomplexet képző aromás gyűrűkkel rendelkeznek, ezért racemátjaik megfelelő modellvegyületeknek bizonyultak ODMCM- γ -CD királis elválasztóképességének tanulmányozásához. Vizsgálatainkat pH 2,5 és 7,0-es pufferben végeztük el.

Minden Dpx származék királis szelektorkoncentráció-függő enantiomer elválasztást mutatott pH 2,5 pufferben. A Dpx, és a dezmetil-Dpx enantiomerek 5 mM ODMCM- γ -CD mellett, míg a didezmetil-Dpx enantiomerek már 1 mM CD koncentráció alkalmazása esetén is elváltak. Míg a primer amin didezmetil-Dpx enantiomerek alapvonal elválása tapasztalható már 1 mM királis szelektor mellett, addig a szekunder amin dezmetil-Dpx magasabb ODMCM- γ -CD koncentráció mellett is csak részlegesen választható el. Az ODMCM- γ -CD koncentrációt növelve a háttérelktrolitban a migrációs idők is növekedtek, mutatva a kölcsönhatást a pozitív töltéssel rendelkező vendégmolekulák és a semlegesnek tekinthető CD között.

A pH 7,0 pufferekben az aminok protonáltak, tehát pozitív töltéssel rendelkeznek, és jól elválaszthatók az ellentétes töltéssel rendelkező ODMCM- γ -CD szelektorral, a gazda és a vendégmolekula között kialakuló ionos kölcsönhatásoknak köszönhetően. A CD koncentrációt növelve a királis felbontás is növekedett. Dpx esetén a pH 2,5 és a pH 7,0 elektroferogramokat összehasonlítva a királis szelektor hatására bekövetkező migrációs idő eltolódás pH 7,0 pufferben jelentősebb, sőt egyes elektroferogramok kiértékelése nem is lehetséges a csúcstorzulások és az extrém hosszú analízisidők miatt. Ezzel ellentétben, pH 2,5 háttérelktrolitok esetén a migrációs idők jóval rövidebbek, ezáltal rövidebb analízis idők és jobb csúcsalak érhető el. Ez is alátámasztja, hogy a háttérelktrolit pH-jának finomhangolása kulcsfontosságú lehet különböző rendű aminok elválasztására királis kapilláris elektroforetikus módszerek kidolgozásakor.

A natív γ -CD 2:1-es sztöchiometriájával szemben az ODMCM- γ -CD kifejezettebb 1:1-es komplexképzését minden bizonnyal a metoxicsoportok és a karboxilcsoportok bevitel okozza. A különböző ionizáltsági állapotban lévő karboxilcsoportok egymással kölcsönhatva (ionos kölcsönhatás, karbonilcsoport nemkötő elektronpárjainak kölcsönhatása, valamint az általuk „protonszivacs”-ként ionos és/vagy hidrogén-híd kötéssel megkötött H⁺-ionok) –csökkenthetik az üregméretet a primer nyílásnál, míg a metoxicsoportok a szekunder nyílásánál. Az 1:1-es sztöchiometria kialakulását emellett a CD szubsztituensek Dpx-nel való specifikus (orientáló) kölcsönhatásai is okozhatják.

A 2D ROESY NMR méréseket az elektroforézis körülményeinek megfelelő két pH értéken végeztük, és igen eltérő eredményeket kaptunk. A mérések alapján pH 2,5-ön egyértelműen a naftilgyűrű helyezkedik el a CD üregében. pH 7,0-en a sokkal intenzívebb keresztcsúcsok alapján részletes információt kaphatunk a komplex szerkezetéről. A naftilgyűrű szintén a CD üregében foglal helyet, viszont a pH-változás hatására a komplex geometriájának egyértelmű változása is igazolható. A fenilgyűrű H5, H6 és H7 protonjainak intenzív keresztcsúcsai figyelhetők meg a CD karboximetil-csoportjainak H-7 metilénjeivel (51. ábra), ami pH 2,5-ön nem kimutatható (50. ábra). A Dpx semleges pH értéken nagyrészt pozitív töltésű, így egy erős elektrosztatikus kölcsönhatás jön létre a negatív töltésű CD molekulákkal. Az elektrosztatikus vonzás miatt a Dpx pozitív töltésű ammónium-csoportja a negatív töltésű karboxilát-csoportokkal lép kölcsönhatásba, ami a fenilcsoportot is a primer nyílás közelébe orientálja (56. ábra).



56. ábra. A Dpx/ODMCM- γ -CD komplex feltételezett szerkezete a 2D ROESY NMR mérések alapján, pH 7,0 értéken

6 Következtetések

Doktori munkám során a korai magömlés kezelésére használt dapoxetin hatóanyag gyártási szennyezőjét, egyik új bomlási útvonalát és ciklodextrinekkel kialakított molekuláris kölcsönhatásait vizsgáltuk.

A Dpx szintézisében általunk leírt mellékreakció reakciókörülményei, mechanizmusa és pontos szerkezeti feltételei ezidáig ismeretlenek voltak a szakirodalomban, így szintetikus kémiai alkalmazhatóságának kiterjesztésére is lehetőség nyílik új vegyületek szintézisében. Ez irányú kutatásaink jelenleg is folynak. A benzilhelyzetű karbokationos reakció lehetőséget ad intermolekuláris aromás elektrofil szubsztitúció útján kondenzált rendszerek szintézisére. Tapasztalataink alapján az elektronban gazdag aromás molekuláris rész (pl. naftilgyűrű) nukleofilitásának célszerű minél nagyobbak lennie (elektronküldő szubsztituensek bevitele), hogy a mezilátképzés során a mezil-kloridból keletkező kloridion nukleofilitásával ne legyen összemérhető erősségű. Ellenkező esetben a benzilhelyzetbe épülő kloridion kompetíciója és ezáltal a *mono*-klór-származékok kialakulása elkerülhetetlen. Az irodalomban eddig átmeneti-/nemesfém katalízissal [152], vagy fémkatalízis nélkül, de extrém reakciókörülmények között valósították meg az ilyen típusú szubsztitúciós reakciókat. Ezek költséghatékony és enyhe körülmények között is megvalósítható alternatívája lehet az általunk ismerttetett módszer.

A Dpx bomlásának vizsgálatakor izolált bomlástermékek alapján kiderült, hogy a Dpx-*N*-oxid már szobahőmérsékleten is könnyen bomló, instabil vegyület, mely az emberi szervezetben a fázis I. metabolizmus során is nagy mennyiségben keletkezik. Ezért feltételezhetjük, hogy az *N*-oxid *in vivo* Cope eliminációja esetén a dolgozatban bemutatott bomlástermékek a metabolizmus során is kialakulhatnak. Mindezen eredményeink hozzájárulnak a hatóanyag metabolit profiljának bővítéséhez, valamint felhívják a figyelmet a benzilhelyzetű *N*-oxidok (metabolitok, egyéb vegyületek) eliminációjának lehetőségére, ahol az eliminációs termék szempontjából kedvező lehet a kiterjedtebb konjugáció létrejötte. A terciér nitrogénatom kvaternerezésén alapuló oldhatóságnövelést célzó „*prodrug*”-képzési módszer szabadalma nemrég jelent meg [159]. A kvaterner nitrogénszármazékok az *N*-oxidokhoz hasonlóan jó távozó csoportoknak számítanak, az így megvalósuló eliminációs reakciót Hofmann eliminációként ismerjük. Kvaternerezett nitrogénszármazékok esetén is ismert az *in vivo*

Hofmann elimináció, hasonlóan a Cope eliminációhoz [154]. Bár a kvaternerezett Dpx származékok oldhatósága sokkal jobb, de munkánk felhívja a figyelmet a kémiai instabilitás problémájára és az ugyanezen bomlástermékek keletkezésével (kiv. hidroxil-dimetil-amin helyett trimetil-amin) járó Hofmann elimináció lehetőségére is.

A gyártási szennyező naftopirán származék és a bomlástermék *E*-CON publikálásuk óta már több, – Dpx szennyezőt és bomlásterméket analitikai standardként – forgalmazó cég kínálatában is szerepel (Roark Standarts Ltd., TLC Pharmaceutical Standards Ltd., Sinco Pharmachem Inc., Clearsynth, stb.).

A Dpx bázis oldhatóságát CD-kel történő komplexképzéssel növeltük. Független kísérleti módszerekkel jellemeztük a Dpx natív β - és γ -CD-kel képzett komplexeit, valamint vizsgáltuk két szubsztituált CD-származék, a RAME- γ -CD, és az izomertiszta perszubsztituált ODMCM- γ -CD-kel képzett zárványkomplexeket is. A NMR Job méréseken alapuló váratlan 2Dxp·CD sztöchiometriájú komplexek kialakulását sikerült a titrálás kemometriai módszerekkel is bizonyítanunk, majd ezt CiD/UV spektroszkópiával és molekulamodellezéssel alátámasztanunk. Bár a fázis-oldhatósági vizsgálat az csak az 1:1 sztöchiometriát, a tömegspektroszkópiás mérések az {Dxp·CD, Dxp·2CD} egyensúlyi rendszert valószínűsítették, a döntő bizonyítékot az NMR mérések kiértékelése szolgáltatta. Az NMR Job mérés és titrálás esetünkben is bizonyította, hogy a lehető legtöbb mag kémiai eltolódásváltozásának követésével, és értékelésbe való bevonásával kaphatjuk a legmegbízhatóbb eredményt.

Az új, izomertiszta ODMCM- γ -CD-vel és a racém Dpx-nel és dezmetil-metabolitjaival, mint modellvegyületekkel végzett NMR és CE vizsgálataink bizonyították a pH-függő komplexálódást. A pH a komplexek geometriáját is befolyásolta, a gazda - vendég között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatás orientáló hatásának köszönhetően.

Mіндеzen munka jelentősen hozzájárulhat a Dpx hatóság által is megkövetelt tisztaságának, szennyezésprofiljának, kémiai és metabolikus stabilitásának és ezekkel összefüggésben lévő toxikológiai vonatkozásainak mélyebb megértéséhez, a kezelés során a betegbiztonság növeléséhez. A gyógyszer technológiai fejlesztésben a stabilitás- és oldhatóságnövelés a ciklodextrinokkal történő formulálás lehetőségét is felveti. Az izomertiszta ODMCM- γ -CD királis analitikai alkalmazhatóságát is igazolja más, a Dpx-hez és dezmetil-metabolitjaihoz hasonló szerkezeti feltételekkel rendelkező, különböző rendű aminocsoportokat tartalmazó molekulák racemátjainak elválasztásában.

7 Összefoglalás

A korai magömlés célzott kezelésére a Magyarországon 2013-ban törzskönyvezett Priligy® hatóanyagát, a dapoxetint (Dpx) vizsgáltuk a szintézise illetve bomlása során keletkező szennyezőinek felderítése, valamint a ciklodextrinokkal kialakított kölcsönhatásának egyensúlyi és szerkezeti jellemzése céljából.

A Dpx szintézisének utolsó lépéseként leggyakrabban alkalmazott mezilátképzés során keletkező gyártási szennyező szerkezetét elsőként határoztuk meg NMR spektroszkópia segítségével. Sikertült ezzel bizonyítanunk a benzilhelyzetben *in situ* keletkező mezilát köztitermék rendkívüli instabilitását, és karbokation intermedieren keresztüli intramolekuláris aromás elektrofil szubsztitúcióban mutatott, fokozott reaktivitását. Ezt feltehetően a hőmérséklet emelkedése növeli, ezért kritikus paraméternek tekinthető ebben a gyártási lépésben. A dapoxetin bázis esetén elsőként bizonyítottuk két új bomlástermék, a geometriai izomer *E*- és *Z*-cinnamil-oxi-naftalin megjelenését és feltételeztük a hidroxidimetil-amin keletkezését. Képződésüket dapoxetin-*N*-oxidból – a hatóanyag levegőn végbemenő oxidációs bomlástermékéből és egyben fő humán metabolitjából – Cope elimináció mechanizmusával sikerült bizonyítanunk.

Vizsgáltuk a dapoxetin komplexeit a natív β -, γ -CD-vel, a random szubsztituált RAME- γ -CD-vel és aktív metabolitjaival együtt egy új, izomertiszta per-karboximetil- γ -ciklodextrin (ODMCM- γ -CD) származékkal. A semleges dapoxetin oldhatóságát a β -CD hatszorosára, a γ -CD ötszörösére növelte, míg a RAME- γ -CD-vel több mint harmincszoros oldhatóságnövekedést sikerült elérnünk. A natív CD-vel képzett komplexek sztöchiometriáját és szerkezetét részletesen jellemeztük NMR és CiD/UV spektroszkópiával. A zárványkomplexek között ritkának számító 2Dpx·CD és Dpx·CD összetételű részecskék együttes jelenlétét mind az ^1H NMR titrálás során regisztrált kémiai eltolódásváltozások, a NOE mérések, cirkuláris dikroizmus/UV adatok és a molekulamodellzés is egybehangzóan megerősítette. A komplexek stabilitási állandóit több, független technika segítségével határoztuk meg.

Az izomertiszta ODMCM- γ -CD-t, mint királis szelektort elsőként alkalmaztuk kapilláris elektroforézisben, a modellvegyületként alkalmazott racém Dpx és dezmetil-metabolitjainak enantiomerjeit sikerrel elválasztottuk. A Dpx ODMCM- γ -CD komplexről megállapítottuk, hogy pH-függő szerkezettel rendelkezik, melyben a gazdamolekula töltése irányítja a Dpx inklúzióját.

8 Summary

Dapoxetine, the first compound developed for the treatment of premature ejaculation is in clinical use since 2013 in Hungary. This thesis covers the elaboration of a new process-related impurity, degradation products of dapoxetine and the structural and equilibrium studies of its cyclodextrin complexes.

The commonly applied mesylation step in the synthetic scheme of dapoxetin can result in the formation of a new process-related impurity. The structure of this compound was confirmed by NMR for the first time. The increased reactivity of the mesylate has also been confirmed in electrophilic aromatic substitution through a carbocation intermediate. As the reactivity of the intermediate increased by elevating temperature, this parameter was declared as a critical point in the synthetic procedure. The structures of three new degradation products (*E* and *Z* isomers of cinnamyloxynaphtalenes and dimethyl hydroxylamine) of dapoxetine base were also identified and their formation was proposed (and synthetically confirmed) via Cope elimination of dapoxetin-*N*-oxide, the major oxidative and metabolic degradation product of dapoxetine.

Inclusion complex formation of dapoxetine with β -, γ -, randomly methylated γ - and percarboxymethylated γ -CDs were studied. The solubility of dapoxetine increased by a factor of five, six and over thirty, applying γ -, β - and RAME- γ -CD, respectively. The complex stoichiometries and structures were investigated by NMR and UV/Vis spectroscopies. The co-existence of the uncommon species 2Dpx·CD and Dpx·CD was unequivocally proven by ^1H NMR titration, NOE measurements and circular dichroism data. Molecular modeling provided a further independent evidence for the formation of 2:1 guest:host complex.

The new percarboxymethylated γ -CD (ODMCM- γ -CD) was successfully applied as a background electrolyte additive in chiral capillary electrophoresis resolving both enantiomers of dapoxetine and its desmethyl derivatives. Dapoxetine showed a pH-dependent inclusion structure with ODMCM- γ -CD in which the negatively charged substituents dictate the mode of inclusion.

9 Irodalomjegyzék

1. Corbin J D. (2004) Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 16: 4-7.
2. Goldstein I. (2003) Premature to early ejaculation: a sampling of manuscripts regarding the most common male sexual dysfunction published in the *IJIR: The Journal of Sexual Medicine*. *Int J Impot Res*, 15: 307-308.
3. Semans J H. (1956) Premature ejaculation: a new approach. *South Med J*, 49: 353-358.
4. St Lawrence J S, Madakasira S. (1992) Evaluation and treatment of premature ejaculation: a critical review. *Int J Psychiatry Med*, 22: 77-97.
5. Dean R C, Lue T F. (2005) Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. *Urol Clin North Am*, 32: 379-400.
6. Castiglione F, Albersen M, Hedlund P, Gratzke C, Salonia A, Giuliano F. (2016) Current Pharmacological Management of Premature Ejaculation: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol*, 69: 904-916.
7. Neumajer G, Sohajda T, Darcsi A, Tóth G, Szente L, Noszál B, Béni S. (2012) Chiral recognition of dapoxetine enantiomers with methylated-gamma-cyclodextrin: A validated capillary electrophoresis method. *J Pharm Biomed Anal*, 62: 42-47.
8. Atikeler M K, Gecit I, Senol F A. (2002) Optimum usage of prilocaine-lidocaine cream in premature ejaculation. *Andrologia*, 34: 356-359.
9. Busato W, Galindo C C. (2004) Topical anaesthetic use for treating premature ejaculation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *BJU International*, 93: 1018-1021.
10. Ahlenius S, Larsson K, Svensson L, Hjorth S, Carlsson A, Lindberg P, Wikstrom H, Sanchez D, Arvidsson L E, Hacksell U, Nilsson J L. (1981) Effects of a new type of 5-HT receptor agonist on male rat sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav*, 15: 785-792.
11. Montague D K, Jarow J, Broderick G A, Dmochowski R R, Heaton J P, Lue T F, Nehra A, Sharlip I D. (2004) AUA guideline on the pharmacologic management of premature ejaculation. *J Urol*, 172: 290-294.

12. Montejo A L, Llorca G, Izquierdo J A, Rico-Villademoros F. (2001) Incidence of sexual dysfunction associated with antidepressant agents: a prospective multicenter study of 1022 outpatients. Spanish Working Group for the Study of Psychotropic-Related Sexual Dysfunction. *J Clin Psychiatry*, 62: 10-21.
13. Montejo-González A, Llorca G, Izquierdo J A, Ledesma A, Bousoño M, Calcedo A, Carrasco J L, Ciudad J, Daniel E, de la Gandara J, Derecho J, Franco M, Gomez M J, Macias J A, Martin T, Perez V, Sanchez J M, Sanchez S, Vicens E. (1997) SSRI-induced sexual dysfunction: Fluoxetine, paroxetine, sertraline, and fluvoxamine in a prospective, multicenter, and descriptive clinical study of 344 patients. *J Sex Marital Ther*, 23: 176-194.
14. Modi N B, Dresser M J, 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. *J Clin Pharmacol*, 46: 301-309.
15. Robertson D W, Thompson D C, Wong D T. 1-phenyl-3-naphthalenyloxypropanamines and their use as selective serotonin reuptake inhibitors. US5135947A, 1992.
16. Giuliano F, Clement P. (2005) Neuroanatomy and Physiology of Ejaculation. *Annu Rev Sex Res*, 16: 190-216.
17. Clément P, Laurin M, Compagnie S, Facchinetti P, Bernabé J, Alexandre L, Giuliano F. (2012) Effect of Dapoxetine on Ejaculatory Performance and Related Brain Neuronal Activity in Rapid Ejaculator Rats. *J Sex Med* 9: 2562-2573.
18. Clement P, Bernabe J, Gengo P, Denys P, Laurin M, Alexandre L, Giuliano F. (2007) Supraspinal site of action for the inhibition of ejaculatory reflex by dapoxetine. *Eur Urol*, 51: 825-832.
19. Andersson K-E, Mulhall J P, Wyllie M G. (2006) Pharmacokinetic and pharmacodynamic features of dapoxetine, a novel drug for 'on-demand' treatment of premature ejaculation. *BJU International*, 97: 311-315.
20. McMahon C G, McMahon C N, Leow L J. (2006) New agents in the treatment of premature ejaculation. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2: 489-503.
21. Jiang Q-h, Xu Y-x, Yang Y, Mu H-p, Wan R. (2013) The progress in the synthetic methods of dapoxetine. *Chin. J. Med. Chem.*, 23: 417-421.

22. You P, Qiu J, Su E, Wei D. (2013) Carica papaya Lipase Catalysed Resolution of β -Amino Esters for the Highly Enantioselective Synthesis of (S)-Dapoxetine. *Eur. J. Org. Chem.*, 2013: 557-565.
23. Khatik G L, Sharma R, Kumar V, Chouhan M, Nair V A. (2013) Stereoselective synthesis of (S)-dapoxetine: A chiral auxiliary mediated approach. *Tetrahedron Lett.*, 54: 5991-5993.
24. Kim S J, Jeon T H, Min I S, Kim I S, Jung Y H. (2012) Asymmetric total synthesis of (S)-dapoxetine. *Tetrahedron Lett.*, 53: 3680-3682.
25. 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.
26. Mahale R D, Chaskar S P, Patil K E, Maikap G C, Gurjar M K. (2012) Corey–Itsuno Reduction of Ketones: A Development of Safe and Inexpensive Process for Synthesis of Some API Intermediates. *Org Process Res Dev*, 16: 710-713.
27. Hessler F, Korotvička A, Nečas D, Valterová I, Kotora M. (2014) Syntheses of a Flobufen Metabolite and Dapoxetine Based on Enantioselective Allylation of Aromatic Aldehydes. *Eur. J. Org. Chem.*, 2014: 2543-2548.
28. Sasikumar M, Nikalje M D. (2012) Simple and Efficient Synthesis of (S)-Dapoxetine. *Synth. Commun.*, 42: 3061-3067.
29. Ye J, Wang C, Chen L, Wu X, Zhou L, Sun J. (2016) Chiral Lewis Base-Catalyzed, Enantioselective Reduction of Unprotected β -Enamino Esters with Trichlorosilane. *Adv. Synth. Catal.*, 358: 1042-1047.
30. Zhu Y, Liu Z, Li H, Ye D, Zhou W. (2015) A novel and practical asymmetric synthesis of dapoxetine hydrochloride. *Beilstein J Org Chem*, 11: 2641-2645.
31. Venkatesan K, Srinivasan K V. (2008) A stereoselective synthesis of (S)-dapoxetine starting from trans-cinnamyl alcohol. *ARKIVOC*: 302-310.
32. Siddiqui S A, Srinivasan K V. (2007) Enantioselective synthesis of (S)-dapoxetine. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18: 2099-2103.
33. Yang J W, Stadler M, List B. (2007) Practical Proline-catalyzed asymmetric Mannich reaction of aldehydes with N-Boc-imines. *Nat. Protocols*, 2: 1937-1942.

34. Kang S, Lee H K. (2010) Highly efficient, enantioselective syntheses of (S)-(+)- and (R)-(-)-dapoxetine starting with 3-phenyl-1-propanol. *J Org Chem*, 75: 237-240.
35. Rohith T, Ananda S. (2013) Development and validation of high performance liquid chromatography method for the determination of process related impurities in dapoxetine hydrochloride. *IJRPC*, 3: 74-82.
36. ICH. (2000) Draft Revised Guidance on Impurities in New Drug Substances. Q3A(R). *Federal Register*, 65: 5.
37. ICH. (2016) Q3C and Q3C(M): Impurities: Guideline for Residual Solvents. *Federal Register*.
38. ICH. (2003) Q3B(R): Impurities in New Drug Products. *Federal Register*.
39. Argentine M D, Owens P K, Olsen B A. (2007) Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances. *Adv Drug Deliv Rev*, 59: 12-28.
40. Ahuja S. *Impurities Evaluation of Pharmaceuticals*, Marcel Dekker, New York, 1998.
41. Görög S. *Identification and Determination of Impurities in Drugs*, Elsevier Science Publishing Company, Amsterdam, 2000.
42. Klick S, Skold A. (2004) Validation of a generic analytical procedure for determination of residual solvents in drug substances. *J Pharm Biomed Anal*, 36: 401-409.
43. Otero R, Carrera G, Dulsat J F, Fabregas J L, Claramunt J. (2004) Static headspace gas chromatographic method for quantitative determination of residual solvents in pharmaceutical drug substances according to european pharmacopoeia requirements. *J Chromatogr A*, 1057: 193-201.
44. Lewen N, Mathew S, Schenkenberger M, Raglione T. (2004) A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds. *J Pharm Biomed Anal*, 35: 739-752.
45. ICH. (1999) Q6A: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. *Federal Register*.
46. Byrn S, Bates S, Ivanisevic I. (2005) Regulatory aspects of X-ray powder diffraction part II. *Am. Pharm. Rev.*, 8: 137-141.

47. Carstensen J T. Drug Stability, Marcel Dekker, New York, 1995.
48. Meyers A I, Collington E W. (1971) Facile and specific conversion of allylic alcohols to allylic chlorides without rearrangement. *J. Org. Chem.*, 36: 3044-3045.
49. Sanda K, Rigal L, Delmas M, Gaset A. (1992) The Vilsmeier Reaction: A New Synthetic Method for 5-(Chloromethyl)-2-furaldehyde. *Synthesis*, 1992: 541-542.
50. Evans M E, Long L, Parrish F W. (1968) Reaction of carbohydrates with methylsulfonyl chloride in N,N-dimethylformamide. Preparation of some methyl 6-chloro-6-deoxyglycosides. *J. Org. Chem.*, 33: 1074-1076.
51. Albin Pt, Haribabu Y, Eapen SC, Kutty SV, Kumar P, Nithyamol P. (2013) Validated spectrophotometric methods for simultaneous estimation of sildenafil citrate and dapoxetine HCl in tablet dosage form. *Pharma Innov.*, 2: 40-45.
52. P. Mehta, Sahoo U. (2011) Development and validation of RP-HPLC method for the determination of dapoxetine hydrochloride in pharmaceutical formulation using an experimental design. *Int J Pharm Sci Res*, 6: 76-82.
53. Giri AD, Bhusari VK, SR. D. (2012) Validated HPLC method for simultaneous quantitation of tadalafil and dapoxetine hydrochloride in bulk drug and formulation. *Int J Pharm Pharm Sci.*, 4: 654-658.
54. Ananda S, Rohith T. (2012) A validated chiral liquid chromatographic method for the enantiomeric separation of dapoxetine hydrochloride. *Int J Adv Res Pharm Bio Sci*, 1: 311-319.
55. Abirami G, Vetrichelvan T, Madanmohan M. (2014) Development and validation of dapoxetine in pure and solid dosage form by HPTLC method. *Int J Pharm Dev Technol*, 4: 86-89.
56. Chapla B, Amin G, Pandya A, Kakadiya J, Shah N. (2012) Simultaneous estimation and validation of vardenafil and dapoxetine hydrochloride in pharmaceutical formulation by thin layer chromatographic densitometric method. *Int Res J Pharm*, 3: 480-483.
57. Pandya A, Gunjan A, Bhavin C, Patel N. (2012) Development and validation of high performance thin layer chromatography method for simultaneous estimation of sildenafil citrate and dapoxetine hydrochloride in their combined tablet dosage form. *Int J Pharm Res Bio-Science*, 1: 236-246.

58. Liew K B, Peh K K. (2014) Stability indicating HPLC-UV method for determination of dapoxetine HCl in pharmaceutical product. *Acta Pol Pharm Res*, 71: 393–400.
59. Patil R, Deshmukh T, Patil V. (2014) Stability indicating HPLC method for dapoxetine HCl in bulk and in formulation. *Int J Pharm Pharm Sci.*, 6: 687-690.
60. Mayuri P, Deshpande K, Mohanraj K. (2015) Impurity profile of dapoxetine hydrochloride after stress degradation, using isocratic LC-UV and LC-MS/MS studies. *Pharmanest*, 6: 2997-3004.
61. Szejtli J. *Cyclodextrins and their inclusion complexes*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982.
62. Connors K A. (1997) The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev.*, 97: 1325-1358.
63. Szejtli J. *Cyclodextrin technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988.
64. Szejtli J. (1998) Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.*, 98: 1743-1754.
65. Bender M, Komiyama M. *Cyclodextrin chemistry*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1978.
66. Liu L, Guo Q-X. (2002) The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 42: 1-14.
67. Dignam C F, Randall L A, Blacken R D, Cunningham P R, Lester S-K G, Brown M J, French S C, Aniagyei S E, Wenzel T J. (2006) Carboxymethylated cyclodextrin derivatives as chiral NMR discriminating agents. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17: 1199-1208.
68. Hazekamp A, Verpoorte R. (2006) Structure elucidation of the tetrahydrocannabinol complex with randomly methylated beta-cyclodextrin. *Eur J Pharm Sci*, 29: 340-347.
69. Ikeda Y, Hirayama F, Arima H, Uekama K, Yoshitake Y, Harano K. (2004) NMR spectroscopic characterization of metoprolol/cyclodextrin complexes in aqueous solution: cavity size dependency. *J Pharm Sci*, 93: 1659-1671.
70. Tarkanyi 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 alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins. *J Chromatogr A*, 961: 257-276.
71. Krois D, Brinker U H. (1998) Induced Circular Dichroism and UV–Vis Absorption Spectroscopy of Cyclodextrin Inclusion Complexes: Structural Elucidation of Supramolecular Azi-adamantane (Spiro[adamantane-2,3'-diazirine]). *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 11627-11632.
 72. Easton C. (2006) Cyclodextrin-based catalysts and molecular reactors. *Rev Pure Appl Chem*, 77: 1865-1871.
 73. Szejtli J, Szenté L, Bánky E. (1979) Molecular encapsulation of volatile, easily oxidizable labile flavor substances by cyclodextrins. *Acta Chim Hung*, 101: 27-46.
 74. Kuhn R, Stoecklin F, Erni F. (1992) Chiral separations by host-guest complexation with cyclodextrin and crown ether in capillary zone electrophoresis. *Chromatographia*, 33: 32-36.
 75. Boger J, Corcoran R J, Lehn J-M. (1978) Cyclodextrin chemistry. Selective modification of all primary hydroxyl groups of α - and β -cyclodextrins. *Helv. Chim. Acta*, 61: 2190-2218.
 76. Bricout H, Hapiot F, Ponchel A, Tilloy S, Monflier E. (2009) Chemically modified cyclodextrins: an attractive class of supramolecular hosts for the development of aqueous biphasic catalytic processes. *Sustainability*, 1: 924-945.
 77. Szejtli J, Osa T. *Comprehensive supramolecular chemistry*, 3: Elsevier Science, Oxford, 1996.
 78. Buschmann H J, Schollmeyer E. (2002) Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. *J Cosmet Sci*, 53: 185-191.
 79. Kant A, Linforth R S, Hort J, Taylor A J. (2004) Effect of beta-cyclodextrin on aroma release and flavor perception. *J Agric Food Chem*, 52: 2028-2035.
 80. Loftsson T, Duchene D. (2007) Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm*, 329: 1-11.
 81. Bom A, Bradley M, Cameron K, Clark J K, Van Egmond J, Feilden H, MacLean E J, Muir A W, Palin R, Rees D C, Zhang M Q. (2002) A novel concept of reversing neuromuscular block: chemical encapsulation of rocuronium bromide by a cyclodextrin-based synthetic host. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41: 266-270.

82. Camargo F, Erickson R P, Garver W S, Hossain G S, Carbone P N, Heidenreich R A, Blanchard J. (2001) Cyclodextrins in the treatment of a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Life Sci*, 70: 131-142.
83. Higuchi T, Connors K. (1965) Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, 4: 117-122.
84. Al-Soufi W, Cabrer P R, Jover A, Budal R M, Tato J V. (2003) Determination of second-order association constants by global analysis of ¹H and ¹³C NMR chemical shifts. Application to the complexation of sodium fusidate and potassium helvolate by beta- and gamma-cyclodextrin. *Steroids*, 68: 43-53.
85. Béni S, 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.
86. Chankvetadze B, Pintore G, Burjanadze N, Bergenthal D, Bergander K, Breitzkreuz J, Muhlenbrock C, Blaschke G. (2000) Mechanistic study of opposite migration order of dimethindene enantiomers in capillary electrophoresis in the presence of native beta-cyclodextrin and heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)-beta-cyclodextrin. *J Chromatogr A*, 875: 455-469.
87. Owens P K, Fell A F, Coleman M W, Berridge J C. (1998) Effect of charged and uncharged chiral additives on the resolution of amlodipine enantiomers in liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 797: 187-195.
88. Owens P K, Fell A F, Coleman M W, Kinns M, Berridge J C. (1997) Use of ¹H-NMR spectroscopy to determine the enantioselective mechanism of neutral and anionic cyclodextrins in capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal*, 15: 1603-1619.
89. Fielding L. (2000) Determination of Association Constants (K_a) from Solution NMR Data. *Tetrahedron*, 56: 6151-6170.
90. Job P. (1928) Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Ann. Chim.*, 9: 113-203.
91. Renny J S, Tomasevich L L, Tallmadge E H, Collum D B. (2013) Method of continuous variations: applications of job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52: 11998-12013.

92. Gil V M S, Oliveira N C. (1990) On the use of the method of continuous variations. *J. Chem. Educ.*, 67: 473.
93. Schneider H J, Hacket F, Rudiger V, Ikeda H. (1998) NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Chem Rev*, 98: 1755-1786.
94. Dodziuk H, Ejchart A, Lukin O, Vysotsky M O. (1999) ¹H and ¹³C NMR and Molecular Dynamics Study of Chiral Recognition of Camphor Enantiomers by α -Cyclodextrin. *J. Org. Chem.*, 64: 1503-1507.
95. Fernandes C M, Carvalho R A, Pereira da Costa S, Veiga F J. (2003) Multimodal molecular encapsulation of nicardipine hydrochloride by beta-cyclodextrin, hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and triacetyl-beta-cyclodextrin in solution. Structural studies by ¹H NMR and ROESY experiments. *Eur J Pharm Sci*, 18: 285-296.
96. Dodziuk H, Nowinski K S, Kozminski W, Dolgonos G. (2003) On the impossibility of determination of stepwise binding constants for the 1 : 2 complex of (+)-camphor with alpha-cyclodextrin. *Org Biomol Chem*, 1: 581-584.
97. 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.
98. Tarkanyi G, Nemeth K, Mizsei R, Toke O, Visy J, Simonyi M, Jicsinszky L, Szeman J, Szente L. (2013) Structure and stability of warfarin-sodium inclusion complexes formed with permethylated monoamino-beta-cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal*, 72: 292-298.
99. Zoppi A, Quevedo M A, Longhi M R. (2008) Specific binding capacity of beta-cyclodextrin with cis and trans enalapril: physicochemical characterization and structural studies by molecular modeling. *Bioorg Med Chem*, 16: 8403-8412.
100. Bielejewska A, Koźbiał M, Nowakowski R, Duszczyk K, Sybilska D. (1995) Studies on the behaviour of α -, β - and γ -cyclodextrins and some derivatives under reversed-phase liquid Chromatographic conditions. *Anal Chim Acta*, 300: 201-206.
101. Brand T, Cabrita E J, Berger S. (2005) Intermolecular interaction as investigated by NOE and diffusion studies. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.*, 46: 159-196.
102. Tóth G, Balázs B. *A szerves vegyületek szerkezetfelfedezése*, Műegyetemi Kiadó, Budapest, 2005.

103. Hollósi M, Laczkó I, Majer Z. A sztereokémia és a kiroptikai spektroszkópia alapjai, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2004.
104. Nógrádi M. Bevezetés a sztereokémiába, Műszaki Kiadó, Budapest, 1975.
105. Berova N, Nakanishi K, Woody R W. Circular dichroism. Principles and applications, Wiley-VCH, New York, 2000.
106. Marconi G, Monti S, Manoli F, Degli Esposti A, Mayer B. (2004) A circular dichroism and structural study of the inclusion complex artemisinin- β -cyclodextrin. *Chem Phys Lett*, 383: 566-571.
107. Bakirci H, Zhang X, Nau W M. (2005) Induced Circular Dichroism and Structural Assignment of the Cyclodextrin Inclusion Complexes of Bicyclic Azoalkanes. *J. Org. Chem.*, 70: 39-46.
108. Chen C-Y, Chen F-A, Wu A-B, Hsu H-C, Kang J-J, Cheng H-W. (1996) Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility, photostability and in-vitro permeability of alkannin/shikonin enantiomers. *Int. J. Pharm.*, 141: 171-178.
109. Rossel C v P, Sepúlveda Carreño J, Rodríguez-Baeza M, Alderete J B. (2000) Inclusion complex of the antiviral drug acyclovir with cyclodextrin in aqueous solution and in solid phase. *Quím. Nova*, 23: 749-752.
110. Gáspár A. Kapilláris zónaelektroforézis, Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, 2000.
111. Wren S A C, Rowe R C. (1992) Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis: I. Initial evaluation of a model. *J Chromatogr A*, 603: 235-241.
112. 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.
113. Williams B A, Vigh G. (1997) Dry look at the CHARM (charged resolving agent migration) model of enantiomer separations by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 777: 295-309.
114. Székely G, Csordás B, Farkas V, Kupai J, Pogány P, Sánta Z, Szakács Z, Tóth T, Hollósi M, Nyitrai J, Huszthy P. (2012) Synthesis and Preliminary Structural and Binding Characterization of New Enantiopure Crown Ethers Containing an Alkyl Diarylphosphinate or a Proton-Ionizable Diarylphosphinic Acid Unit. *Eur. J. Org. Chem.*, 2012: 3396-3407.

115. Alderighi L, Gans P, Ienco A, Peters D, Sabatini A, Vacca A. (1999) Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coord. Chem. Rev.*, 184: 311-318.
116. Jones C R, Butts C P, Harvey J N. (2011) Accuracy in determining interproton distances using Nuclear Overhauser Effect data from a flexible molecule. *Beilstein J. Org. Chem.*, 7: 145-150.
117. Halgren T A. (1999) MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *J. Comput. Chem.*, 20: 730-748.
118. Berman H M, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat T N, Weissig H, Shindyalov I N, Bourne P E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, 28: 235-242.
119. Schmidt A K, Cottaz S, Driguez H, Schulz G E. (1998) Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a derivative of its main product beta-cyclodextrin. *Biochemistry*, 37: 5909-5915.
120. Pinotsis N, Leonidas D D, Chrysina E D, Oikonomakos N G, Mavridis I M. (2003) The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. *Protein Sci*, 12: 1914-1924.
121. Pettersen E F, Goddard T D, Huang C C, Couch G S, Greenblatt D M, Meng E C, Ferrin T E. (2004) UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25: 1605-1612.
122. Kim T K, Kim I S, Hong S H, Choi Y K, Kim H, Yoo H H. (2013) Determination of dapoxetine in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 926: 42-46.
123. Li L, Low M-Y, Ge X, Bloodworth B C, Koh H-L. (2009) Isolation and structural elucidation of dapoxetine as an adulterant in a health supplement used for sexual performance enhancement. *J Pharm Biomed Anal*, 50: 724-728.
124. Von H, Aug W. (1851) Beiträge zur Kenntniss der flüchtigen organischen Basen. *Justus Liebigs Ann Chem.*, 78: 253-286.
125. Cope A C, Trumbull E R. Olefins from Amines: The Hofmann Elimination Reaction and Amine Oxide Pyrolysis. in *Organic Reactions*. 2004, John Wiley & Sons, Inc.

126. Cram D J, Sahyun M R V. (1962) Room Temperature Wolff-Kishner Reduction and Cope Elimination Reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 84: 1734-1735.
127. Loftsson T, Hreinsdóttir D, Másson M. (2007) The complexation efficiency. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.*, 57: 545-552.
128. Meloun M, Pluhařová M. (2000) Thermodynamic dissociation constants of codeine, ethylmorphine and homatropine by regression analysis of potentiometric titration data. *Anal Chim Acta*, 416: 55-68.
129. Jover A, Budal R M, Al-Soufi W, Meijide F, Vazquez Tato J, Yunes R A. (2003) Spectra and structure of complexes formed by sodium fusidate and potassium helvolate with beta- and gamma-cyclodextrin. *Steroids*, 68: 55-64.
130. Uyar T, El-Shafei A, Wang X, Hacaloglu J, Tonelli A E. (2006) The Solid Channel Structure Inclusion Complex Formed Between Guest Styrene and Host γ -Cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.*, 55: 109-121.
131. Higashi K, Tozuka Y, Moribe K, Yamamoto K. Salicylic Acid/β-Cyclodextrin 2:1 and 4:1 Complex Formation by Sealed-Heating Method. *J. Pharm. Sci.*, 99: 4192-4200.
132. Castronuovo G, Niccoli M. (2006) Thermodynamics of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrins with propranolol in aqueous solution at 298 K. *Bioorg Med Chem*, 14: 3883-3887.
133. Azzolina O, Collina S, Brusotti G, Rossi D, Callegari A, Linati L, Barbieri A, Ghislandi V. (2002) Chemical and biological profile of racemic and optically active dialkylaminoalkylnaphthalenes with analgesic activity. *Tetrahedron: Asymmetry*, 13: 1073-1081.
134. Baba H, Suzuki S. (1961) Electronic Spectra of Substituted Aromatic Hydrocarbons. II. Naphthols and Naphthylamines. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 34: 82-88.
135. Suzuki S, Fujii T. (1976) Interpretation of electronic spectra by configuration analysis MO theoretical interpretation of the spectral changes caused by substitution in naphthalene. *J. Mol. Spectrosc.*, 61: 350-359.
136. Suzuki S, Fujii T, Baba H. (1973) Interpretation of electronic spectra by configuration analysis. *J. Mol. Spectrosc.*, 47: 243-251.
137. Tanizaki Y, Kubodera S-i. (1967) Dichroism analysis. *J. Mol. Spectrosc.*, 24: 1-18.

138. Whipple M R, Vasak M, Michl J. (1978) Magnetic circular dichroism of cyclic π -electron systems. 8. Derivatives of naphthalene. *J. Am. Chem. Soc.*, 100: 6844-6852.
139. László D, Henry G. (1926) The Absorption Spectra of Some Naphthalene Derivatives in Vapour and Solution. *Proc R Soc Lond A*, 111: 355-379.
140. Johnson W C, Fontana L P, Smith H E. (1987) Optically active amines. 32. Far ultraviolet circular dichroism observations on the substituted benzene chromophore. *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 3361-3366.
141. Wenzel S, Buss V. (1992) Circular dichroism and electronic structure calculations on naproxen. *J. Phys. Org. Chem.*, 5: 748-754.
142. Salvadori P, Piccolo O, Bertucci C, Menicagli R, Lardicci L. (1980) Circular dichroism spectra of a single chirally perturbed naphthalene chromophore. *J. Am. Chem. Soc.*, 102: 6859-6860.
143. Weissbluth M. (1971) Hypochromism. *Q Rev Biophys*, 4: 1-34.
144. Bettinetti G, Melani F, Mura P, Monnanni R, Giordano F. (1991) Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of naproxen interaction with cyclodextrins in solution. *J. Pharm. Sci.*, 80: 1162-1170.
145. Wenzel S, Brinschwitz T, Lenzmann F, Buss V. (1995) DODC aggregation in β -cyclodextrin followed by temperature-dependent visible absorption and CD spectroscopy and singular value decomposition. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 22: 277-284.
146. Kano K, Tatsumi M, Hashimoto S. (1991) Cyclodextrin-induced conformational enantiomerism of dinaphthylmethanes. *J. Org. Chem.*, 56: 6579-6585.
147. Shi J-H, Zhou Y-f. (2011) Inclusion interaction of chloramphenicol and heptakis (2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin: phase solubility and spectroscopic methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 83: 570-574.
148. Stadler-Szőke Á, Vikmon M, Szejtli J, Kajtár M. (1985) Fendiline- β -Cyclodextrin inclusion complex. *J Incl Phenom*, 3: 71-84.
149. Szakács Z, Béni S, Noszál B. (2008) Resolution of carboxylate protonation microequilibria of NTA, EDTA and related complexones. *Talanta*, 74: 666-674.
150. Xie K, Wang S, Li P, Li X, Yang Z, An X, Guo C-C, Tan Z. (2010) Synthesis of tetralin and chromane derivatives via In-catalyzed intramolecular hydroarylation. *Tetrahedron Lett.*, 51: 4466-4469.

151. Volonterio A, Zanda M. (2005) Synthesis of 1-aryl-tetralins and 4-aryl-benzopyrans by sulfoxide-mediated benzylic carbocation cyclizations. *Tetrahedron Lett.*, 46: 8723-8726.
152. Pandurang V C, Dattatray A D, Sudalai A. Process for the production of 4-substituted chromanes via gold catalysis. WO 2013088455 A1, 2015.
153. Orgován G, Tihanyi K, Noszál B. (2009) NMR analysis, protonation equilibria and decomposition kinetics of tolperisone. *J Pharm Biomed Anal*, 50: 718-723.
154. Stiller R L, Ryan Cook D, Chakravorti S. (1985) In vitro degradation of atracurium in human plasma. *Br J Anaesth.*, 57: 1085-1088.
155. Lindeke B. (1982) The Non- and Postenzymatic Chemistry of N-Oxygenated Molecules. *Drug Metab Rev.*, 13: 71-121.
156. Hawes E M, Jaworski T J, Midha K K, McKay G, Hubbard J W, Korchinski E D. In vivo metabolism of N-oxides. in *N-Oxidation of Drugs: Biochemistry, pharmacology, toxicology*, P. Hlavica and L.A. Damani, Editors. 1991, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 263-286.
157. Cashman J R, Proudfoot J, Pate D W, Hogberg T. (1988) Stereoselective N-oxygenation of zimeldine and homozimeldine by the flavin-containing monooxygenase. *Drug Metab Dispos*, 16: 616-622.
158. Yuan J H, Birkmeier J, Yang D C, Hribar J D, Liu N, Bible R, Hajdu E, Rock M, Schoenhard G. (1996) Isolation and identification of metabolites of leukotriene A₄ hydrolase inhibitor SC-57461 in rats. *Drug Metab Dispos*, 24: 1124-1133.
159. Hong S H, Kim H M, Kim J S, Kim T K, Lee B Y, Lee J A, Lee S M, Oh J H, Park M, Ryu K H. (S)-N,N-dimethyl-3-(naphthalen-1-yloxy)-1-phenylpropan-1-amine derivatives, pharmaceutical compositions containing the derivatives and manufacturing methods thereof. WO 2012036529 A3, 2012.

10 Saját publikációk jegyzéke

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. Darcsi A, Rácz Á, Béni S. (2017) Identification and characterization of a new dapoxetine impurity by NMR: Transformation of *N*-oxide by Cope elimination. *J Pharm Biomed Anal*, 134: 187-194.
2. Darcsi A, Szakács Z, Zsila F, Tóth G, Rácz A, Béni S. (2016) NMR, CD and UV spectroscopic studies reveal uncommon binding modes of dapoxetine to native cyclodextrins. *RSC Adv*, 6: 102315-102328.
3. Darcsi A, Tóth G, Kökösi J, Béni S. (2014) Structure elucidation of a process-related impurity of dapoxetine. *J Pharm Biomed Anal*, 96: 272-277.
4. Benkovics G, Fejős I, Darcsi A, Varga E, Malanga M, Fenyvesi É, Sohajda T, Sente L, Béni S, Szemán J. (2016) Single-isomer carboxymethyl- γ -cyclodextrin as chiral resolving agent for capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1467: 445-453.

II. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

5. Neumajer G, Sohajda T, Darcsi A, Tóth G, Sente L, Noszál B, Béni S. (2012) Chiral recognition of dapoxetine enantiomers with methylated- γ -cyclodextrin: A validated capillary electrophoresis method. *J Pharm Biomed Anal*, 62: 42-47.
6. Jankovics P, Lohner S, Darcsi A, Németh-Palotás J, Béni S. (2013) Detection and structure elucidation of hydroxythiovaridenafil as an adulterant in a herbal dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal*, 74: 83-91.
7. Gampe N, Darcsi A, Lohner S, Béni S, Kursinszki L. (2016) Characterization and identification of isoflavonoid glycosides in the root of Spiny restharrow (*Ononis spinosa* L.) by HPLC-QTOF-MS, HPLC-MS/MS and NMR. *J Pharm Biomed Anal*, 123: 74-81.
8. Benkovics G, Hodek O, Havlikova M, Bosakova Z, Coufal P, Malanga M, Fenyvesi É, Darcsi A, Béni S, Jindrich J. (2016) Supramolecular structures based on regioisomers of cinnamyl- α -cyclodextrins – new media for capillary separation techniques. *Beilstein J Org Chem*, 12: 97–109.

9. Fejős I, Varga E, Benkovics G, Darcsi A, Malanga M, Fenyvesi É, Sohajda T, Szenté L, Béni S. (2016) Comparative evaluation of the chiral recognition potential of single-isomer sulfated beta-cyclodextrin synthesis intermediates in non-aqueous capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1467: 454-462.
10. Móricz Á, Ott P G, Häbe T T, Darcsi A, Böszörményi A, Alberti Á, Krüzselyi D, Csontos P, Béni S, Morlock G E. (2016) Effect-Directed Discovery of Bioactive Compounds Followed by Highly Targeted Characterization, Isolation and Identification, Exemplarily Shown for *Solidago virgaurea*. *Anal Chem*, 88: 8202-8209.
11. Malanga M, Darcsi A, Bálint M, Benkovics G, Sohajda T, Béni S. (2016) New synthetic strategies for xanthene-dye-appended cyclodextrins. *Beilstein J Org Chem*, 12: 537-548.
12. Könye R, Ress Á E, Sólyomváry A, Tóth G, Darcsi A, Komjáti B, Horváth P, Noszál B, Molnár-Perl I, Béni S, Boldizsár I. (2016) Enzyme-hydrolyzed fruit of *Jurinea mollis*: a Rich source of (-)-(8R, 8'R)-Arctigenin. *Nat Prod Commun* 11: 1459-1462.

11 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Noszál Béla korábbi tanszékvezető egyetemi tanárnak, és Dr. Horváth Péter jelenlegi tanszékvezető egyetemi docensnek, hogy munkámat a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézetében végezhettem.

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Béni Szabolcs tanszékvezető egyetemi docensnek, diákkörös hallgató korom óta nyújtott töretlen szakmai támogatásáért és doktori munkám irányításáért.

Megkülönböztetett köszönet illeti Dr. Szakács Zoltánt (Richter Gedeon Nyrt.) a ciklodextrin-komplexek egyensúlyi kémiájának vizsgálatában nyújtott segítségével. Köszönetet illeti Dr. Szántay Csabát és Dr. Greiner Istvánt (Richter Gedeon Nyrt.), hogy lehetőséget biztosítottak a 800 MHz-es NMR mérések elvégzésére.

Köszönöm Dr. Kökösi Józsefnek, a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet volt tudományos főmunkatársának előremutató szakmai tanácsait és a szintetikus munkában nyújtott nélkülözhetetlen segítségét. Szintén köszönöm Dr. Neumajer Gábornak a szintetikus munkában nyújtott önzetlen segítségét.

Köszönet illeti Dr. Rácz Ákos egyetemi tanársegédet a ciklodextrin-komplexek kölcsönhatási energiáinak számításáért és a molekulamodellizés elvégzéséért, valamint a szintetikus munkámban nyújtott értékes szakmai tanácsaiért. Köszönöm Dr. Tóth Gergő egyetemi tanársegédnek a HPLC-MS, és az NMR Job mérésekben nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Sente Lajos és Dr. Sohajda Tamás a Cyclolab Kutató és Fejlesztő Kft. korábbi és jelenlegi igazgatójának a vizsgálatainkhoz szükséges ciklodextrinekért. Köszönöm Benkovics Gábornak a Cyclolab Kft. jelenlegi vendégkutatójának az izomertiszta ODMCM- γ -CD szintéziséért. Köszönöm Dr. Fejős Ida volt doktorandusztársamnak a kapilláris elektroforetikus munkában nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Zsila Ferencnek az MTA Anyag- és Környezetkémiai Intézetének tudományos főmunkatársának a ciklodextrin-komplexek esetén a cirkuláris dikroizmus mérések elvégzéséért és értékeléséért, valamint a publikáció előkészítésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet és a Farmakognóziái Intézet valamennyi munkatársának az inspiráló, baráti környezetet.

Végezetül külön köszönet illeti családomat türelmükért és állandó támogatásukért.