

Kromatográfias és elektroforetikus gyógyszeranalitikai módszerek fejlesztése

Doktori értekezés

Fejős Ida

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Tábi Tamás, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Gáspár Attila, Ph.D., egyetemi docens

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

Budapest
2016

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	7
1.1. Rokon szerkezetű PDE-5 gátló potencianövelő vegyületek folyadékkromatográfiás elválasztása	9
1.1.1. Az erektilis diszfunkció és a PDE-5 gátló hatóanyagok	9
1.1.2. A vizsgált vegyületek	12
1.2. Optikailag aktív vegyületek elválasztása ciklodextrin-alapú kapilláris elektroforézissel	19
1.2.1. Optikai izoméria, kiralitás	19
1.2.2. Ciklodextrinek, mint királis szelektorok	21
1.2.3. Királis kromatográfia	26
1.2.4. Királis kapilláris elektroforézis	28
1.2.5. A vizsgált optikailag aktív vegyületek	38
2. Célkitűzések	43
3. Módszerek	44
3.1. Felhasznált anyagok	44
3.1.1. Standardok	44
3.1.2. Reagensek	44
3.1.3. Ciklodextrinek	45
3.2. Standardok és mintaoldatok készítése	46
3.2.1. Standardok és mintaoldatok PDE-5 inhibitorok HPLC méréséhez	46
3.2.2. Standardok és mintaoldatok CE mérésekhez	47
3.3. Készülékek, elválasztási/mérési körülmények	47
3.4. Számítások	51
3.4.1. Előkísérletek: Sav-bázis tulajdonságok jellemzése	51
3.4.2. Felbontás	52
3.4.3. A látszólagos komplexstabilitási állandó meghatározása	53
3.5. Validálás	54
3.5.1. HPLC módszer validálása	54
3.5.2. CE módszerek validálása	57

4. Eredmények	60
4.1. Rokon szerkezetű PDE-5 gátló potencianövelő vegyületek folyadékkromatográfiás elválasztása	60
4.1.1. Módszerfejlesztés	60
4.1.2. Validálás	65
4.1.3. A komponensek azonosítása, kvalitatív analízis	70
4.1.4. Mennyiségi meghatározás, kvantitatív analízis	72
4.1.5. Rendszeralkalmasság	73
4.1.6. Készítmények vizsgálata	74
4.2. Optikailag aktív vegyületek elválasztása ciklodextrin-alapú kapilláris elektroforézissel	76
4.2.1. Előkísérletek	76
4.2.2. Az enantiomerek/ sztereoizomerek elválasztása	80
4.2.3. Látszólagos komplexstabilitási állandók	85
4.2.4. Az izomerek migrációs sorrendje (EMO)	93
4.2.5. Módszeroptimalizálás	100
5. Megbeszélés	110
6. Következtetések	113
7. Összefoglalás	115
8. Summary	116
9. Irodalomjegyzék	117
10. Saját publikációk jegyzéke	149
11. Köszönetnyilvánítás	150

Rövidítések jegyzéke

ACE: acetildenafil

ACN: acetonitril

BGE: háttérektrólit (background electrolyte)

CAD: kisülékes aeroszol detektor (charged aerosol detection)

CD: ciklodextrin

CE: kapilláris elektroforézis

CEC: kapilláris elektrokratográfia

CE- α -CD: karboxietil-alfa-ciklodextrin nátrium só

CE- β -CD: karboxietil-béta-ciklodextrin nátrium só

CZE: kapilláris zónaelektroforézis

CID-MS: ütközések-indukálta disszociáció révén kapott tömegspektrum

CM- α -CD: karboximetil-alfa-ciklodextrin nátrium só

CM- β -CD: karboximetil-béta-ciklodextrin nátrium só

CM- γ -CD: karboximetil-gamma-ciklodextrin nátrium só

DAD: diódasoros detektor (diode-array detector)

DIME- β -CD: heptakis(2,6-di-O-metil)-béta-ciklodextrin

DMS: dimetilsildenafil

DMSO: dimetil-szulfoxid

DPP-IV: dipeptidil-peptidáz-4

DS: szubsztitúciós fok (degree of substitution)

DSS: 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav

ED: erektilis diszfunkció

EMO: enantiomer migrációs sorrend (enantiomer migration order)

EOF: elektroosmotikus áramlás (electroosmotic flow)

ESI: elektropray ionizáció

FAB: gyorsatom bombázásos ionizáció (fast atom bombardment)

FDA: amerikai gyógyszer- és élelmiszerellenőrző hatóság (Food and Drug Administration)

FT-IR: Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia

GC: gázkromatográfia

GIP: glükóz-függő inzulinotróp polipeptid

GLP-1: glukagon-szerű peptid-1
HE- β -CD: hidroxietil-béta-ciklodextrin
HHS: hidroxihomoszildenafil
HILIC: hidrofil kölcsönhatás kromatográfia (hydrophilic interaction chromatography)
HP- β -CD: 2-hidroxipropil-béta-ciklodextrin
HP- γ -CD: 2-hidroxipropil-gamma-ciklodextrin
HPLC: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HPTLC: nagyhatékonyságú vékonyréteg kromatográfia
HR-MS: nagy felbontású tömegspektrometria (high resolution MS)
HS: homoszildenafil
HTHS: hidroxitiohomoszildenafil
HTV: hidroxitiovardenafil
HV: hidroxivardenafil
ICH: Nemzetközi Harmonizációs Konferencia (International Conference on Harmonisation)
IPA- β -CD: 6-monodezoxi-6-mono(2-hidroxipropilamino)-béta-ciklodextrin hidroklorid
LC: folyadékkromatográfia
LOD: kimutatási határ (limit of detection)
LOQ: meghatározhatósági határ (limit of quantitation)
MA- β -CD: 6-monodezoxi-6-monoamino-béta-ciklodextrin hidroklorid
MEKC: micelláris elektrokinetikus kromatográfia
MeOH: metanol
MES: 2-(*N*-morfolino)etánszulfonsav
MS: tömegspektrometria
MSⁿ: tandem tömegspektrometria
NDV: *N*-dezetilvardenafil
NIR: közeli infravörös spektroszkópia
NMR: mágneses magrezonancia spektroszkópia
PA- β -CD: 6-monodezoxi-6-mono(2-hidroxipropilamino)-béta-ciklodextrin hidroklorid
PDE-5: foszfodiészteráz-5 enzim
Phos- β -CD: foszfátált-béta-ciklodextrin nátrium só

PV: pszeudovardenafil
RAME- β -CD: random metil-béta-ciklodextrin
RAME- γ -CD: random metil-gamma-ciklodextrin
RP-LC: fordított fázisú folyadékkromatográfia
S- α -CD: szulfatált-alfa-ciklodextrin nátrium só
S- β -CD: szulfatált-béta-ciklodextrin nátrium só
S- γ -CD: szulfatált-gamma-ciklodextrin nátrium só
SBE- α -CD: szulfobutiléter-alfa-ciklodextrin nátrium só
SBE- β -CD: szulfobutiléter-béta-ciklodextrin nátrium só
SBE- γ -CD: szulfobutiléter-gamma-ciklodextrin nátrium só
SFC: szuperkritikus fluid kromatográfia
SHP- β -CD: szulfohidroxipropil-béta-ciklodextrin nátrium só
SHP- γ -CD: szulfohidroxipropil-gamma-ciklodextrin nátrium só
SIL: szildenafil
SP- α -CD: szulfopropil-alfa-ciklodextrin nátrium só
SP- β -CD: szulfopropil-béta-ciklodextrin nátrium só
SP- γ -CD: szulfopropil-gamma-ciklodextrin nátrium só
Suc- β -CD: szukcinil-béta-ciklodextrin nátrium só
TAD: tadalafil
TDS: tiodimetilszildenafil
THS: tiohomoszildenafil
TLC: vékonyréteg kromatográfia
TRIME- β -CD: heptakis(2,3,6-tri-O-metil)-béta-ciklodextrin, permetil- β -CD
TRIME- γ -CD: oktakis(2,3,6-tri-O-metil)-gamma-ciklodextrin permetil- γ -CD
Tris: trisz(hidroximetil)aminometán
TOF(-MS): repülési idő analizátor (time of flight)
TS: tioszildenafil
UHPLC: ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
VAR: vardenafil
UV: ultraibolya
UV-VIS: ultraibolya-látható (ultraviolet-visible)

1. Bevezetés

Az utóbbi 40 évben jelentősen megnövekedett az igény a hagyományos gyógyszerek mellett az alternatív terápiák iránt, az étrend-kiegészítők és a gyógynövény alapú készítmények száma évről évre nő. Ez főként annak köszönhető, hogy a szintetikus hatóanyagot tartalmazó készítményekkel szemben a természetes alapú készítményeket tévesen sokkal biztonságosabbnak, egészségesebbnek és mellékhatásuktól mentes alternatívának vélik a fogyasztók. Azonban ezek a készítmények sem ártalmatlanok, sőt, az előnyös tulajdonságaik -mint a könnyű, anoním hozzáférés- mellett a lehetséges kockázatok szinte végtelenek. Gyártásuk és forgalmazásuk kevésbé szabályozott és ellenőrzött, így biztonságosságuk és toxicitásuk is kérdéses: szennyező anyagok (nehézfém, peszticid), hamisítások (a hatékonyság növelése érdekében illegálisan hozzáadott szintetikus vegyületek) gyakran előfordulnak.

A szexuális zavarok –mely gyakran tabu téma- kezelésére alkalmazott étrend-kiegészítők és gyógynövény alapú készítmények száma, és ezzel párhuzamosan azok hamisítása is intenzíven nő. A szexuális teljesítőképesség hatékony növelése érdekében az erektilis diszfunkció kezelésére törzskönyvezett készítmények hatóanyagait, a foszfodiészteráz-5 (PDE-5) enzim gátló szildenafililt (Viagra[®]), vardenafililt (Levitra[®]) és tadalafililt (Cialis[®]), illetve ezek szintetikus módosításával előállított dizájner analógjait adják illegálisan a készítményhez a gyártók. Az étrend-kiegészítők és gyógynövény alapú készítmények foszfodiészteráz-5 enzim gátlókkal történő hamisítása különös veszélyt jelenthet a gyanútlan, alternatív terápiához nyúló betegekre, ahol azok alkalmazása kontraindikált. Továbbá arról sem szabad elfeledkezni, hogy a dizájner analógok ártalmatlansága, biztonságossága és toxicitása nem ismert, így hatásuk megjósolhatatlan. Végezetül fontos szem előtt tartanunk, hogy ezek legtöbbször gyógynövény alapú, komplex készítmények: összetételük, hatásuk és vizsgálatuk is összetett, bonyolult. A PDE-5 inhibitor gyógyszerek és a hamisított készítmények nagy számának és népszerűségének köszönhetően a vizsgáló laboratóriumoknak szüksége van megfelelő, olcsó, egyszerűen kivitelezhető rutin vizsgálati módszerekre, mellyel az étrend-kiegészítő készítmények PDE-5 inhibitorral történő hamisítása kimutatható, és a hozzáadott potencianövelő vegyület azonosítható, mennyisége pedig becsülhető.

Doktori munkám egyik fő célja egy egyszerű, olcsó, MS kompatibilis HPLC-UV módszer fejlesztése volt, mely egyetlen szildenafil külső standardot alkalmazva a PDE-5 inhibitorok és dizájner analógjaik minőségi és mennyiségi meghatározására egyaránt alkalmas gyanús étrend-kiegészítők és gyógynövény alapú készítmények vizsgálata során. Az optimalizált módszer validálására és valós mintákon történő alkalmazására is nagy hangsúlyt kívántunk fektetni.

A disszertáció másik témája az optikailag aktív vegyületek sztereoizomerjeinek elválasztása. A biológiai rendszerek az optikai izomereket sztereospecifikusan ismerik fel, így azok rendkívül hasonló szerkezetük ellenére gyakran igen eltérő élettani hatásúak. A Contergan-botrány (talidomid gyógyszerbotrány) megrendítve a bizalmat a hatóanyagot racém formában tartalmazó gyógyszerek iránt forradalmi változást idézett elő a gyógyszeriparban. Az enantiomertiszta hatóanyagot tartalmazó készítmények bevezetése óta a királis anyagok vizsgálata, az enantiomerek elválasztása és az enantiomerarány meghatározása igen gyakori analitikai feladat. A gyógyszerkönyvi és hatósági előírások megkövetelik a legalább tized százalékban jelenlevő szennyezések meghatározását, beleértve az enantiomer szennyezéseket is. A királis elválasztásokat bonyolulttá teszi, hogy a kölcsönható csoportoknak nemcsak fizikailag és kémiailag kell egymásnak megfelelniük, hanem térbeli elrendezésükben is. A királis tisztaság meghatározására napjainkban a kromatográfia (folyadékkromatográfia (HPLC), gázkromatográfia (GC), szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC)) mellett a kapilláris elektroforézis (CE) nyújtja a legváltozatosabb lehetőségeket. A CE előnye a kiemelkedő hatékonyság, a rövid analízisidő, az egyszerű mintaelőkészítés, a gyors, egyszerű módszerfejlesztés és az automatizálhatóság, melynek köszönhetően kis mennyiségű mintából néhány perc alatt akár 0,1%-nál kevesebb királis szennyező is meghatározható, akár több enantiomer párra, bonyolult mátrixokban is. CE-ben az enantiomerek megkülönböztetéséhez királis szelektorra van szükség, erre a célra a leggyakrabban ciklodextrineket (CD-k) alkalmaznak, mivel relatíve olcsók, és alacsony az UV-elnyelésük, továbbá semleges és töltéssel rendelkező származékaik igen széles választékának köszönhetően egyszerű és gyors módszerfejlesztés érhető el segítségükkel. A ciklodextrinek alapvető tulajdonsága a zárványkomplex képzés, melyhez elengedhetetlen a vendégmolekula pontos szterikus illeszkedése az üregükbe. Ez az üreg a CD számos kiralitáscentruma által kialakított királis

mikrokörnyezetként fogható fel, melynek köszönhetően létrejöhet a sztereoselektív komplexképzés (királis felismerés). Abban az esetben, ha az enantiomerek és a CD között kialakuló nem-kovalens kölcsönhatás különböző mértékben stabilizálja a két enantiomer zárványkomplexét, létrejöhet a királis elválasztás. A CD királis felismerő képessége tovább növelhető különböző semleges, illetve pozitív és negatív töltésű szubsztituensek bevitelével.

A ciklodextrin-alapú kapilláris elektroforézissel rutinszerűen alkalmazható, validált elektroforetikus módszerek kidolgozása lehetséges, mellyel több királis hatóanyag analitikai vizsgálata megvalósítható; a módszerek későbbi gyógyszerkönyvi vizsgálatok alapjául szolgálhatnak. Doktori munkám során ciklodextrin-alapú kapilláris elektroforetikus módszer fejlesztését tűztük ki célul három optikailag aktív vegyület: az antidiabetikus hatású alogliptin enantiomerjeinek, az analgetikus hatású tapentadol, valamint a szexuális diszfunkció kezelésére használt tadalafil sztereoizomerjeinek elválasztására. A módszerfejlesztés során vizsgálni kívántuk a különböző CD származékok királis elválasztó képességét, a vizsgált vegyületek ciklodextrinekkal képzett zárványkomplexeinek stabilitását, valamint az enantiomerek migrációs sorrendjét. Az eredményeket figyelembe véve és a legmegfelelőbb CD-t tartalmazó rendszert kiválasztva a módszer további optimalizálását, és az alogliptin illetve a tapentadol esetében validálását terveztük megvalósítani, a dolgozatban ezt a két témát fejezetenként külön-külön tárgyalom.

1.1. Rokon szerkezetű PDE-5 gátló potencianövelő vegyületek folyadékkromatográfiás elválasztása

1.1.1. Az erektilis diszfunkció és a PDE-5 gátló hatóanyagok

A merevedési zavar, erekciós zavar vagy erektilis diszfunkció (ED) a kielégítő szexuális aktivitáshoz szükséges merevedés elérésének és/vagy fenntartásának elmaradása. Eredete alapján megkülönböztethető szervi, illetve pszichogén eredetű ED. A merevedési zavarok első vonalbeli, nem invazív, perorális gyógyszeres terápiáját a foszfodiészteráz-5 gátlók csoportjába tartozó készítmények jelentik. Hatásmechanizmusukat tekintve a barlangos testekben található ciklikus guanozin-monofoszfát, cGMP-specifikus, 5-ös típusú foszfodiészteráz enzim szelektív és hatásos inhibitorai. Mivel a PDE-5 enzim a cGMP lebontásáért felelős, a cGMP-metabolizmus gátlásának köszönhetően a cGMP szint megnő,

ami a barlangos testek simaizmaikat ellazítja, megnöveli a pénisz véráramát és a barlangos testekben a nyomást. Ezen hatások eredője az erektilis diszfunkció javulása, a szexuális potenciál növekedése [1]. Jelenleg három PDE-5 gátló hatóanyag van forgalomban: a szildenafilfil (Viagra[®]), a vardenafil (Levitra[®]) és a tadalafil (Cialis[®]) [2]. Az első PDE-5 inhibitor hatóanyagot, a szildenafilfil a pulmonáris hipertenzió kezelésére fejlesztették (jelenleg is forgalomban lévő szildenafilfil hatóanyagú készítmény a pulmonáris hipertenzió kezelésére a Revatio[®]), szexuális teljesítménynövelő hatásának felfedezése csak a véletlennek volt köszönhető. A Viagra[®] 1998-as forgalomba hozatala forradalmasította a merevedési zavarok kezelését az egész világon. A betegek igen széles köre számára jól alkalmazható, jól tolerálható, gyors, biztos és tartós hatású gyógyszeres beavatkozásra nyílt lehetőség. Per os alkalmazása után gyorsan felszívódik és 4-5 órán keresztül fejti ki hatását. 25, 50 és 100 mg-os tablettaként van forgalomban.

A Viagra[®] forgalomba hozatalát néhány évvel később, 2003-ban a Levitra[®] és a Cialis[®] követte. Vardenafil (Levitra[®]) esetén a hatás és a hatás időtartama hasonló a szildenafilfilhez. 5 mg, 10 mg és 20 mg hatóanyag tartalmú tabletták vannak forgalomban.

A tadalafil erősen szelektív PDE-5 bénító. A szildenafilfilhez képest lassabban szívódik fel, 2 óra alatt éri el maximális plazmakoncentrációját, de hosszú felezési idejének köszönhetően tág időhatárok között érvényesülhet erekció fokozó hatása, akár 24-36 órán keresztül is hatékony. Elősegítheti a szexuális élet intimitásának megőrzését, a tablettához és időhöz való kötöttség megszüntetését [3]. A tadalafil kétfajta adagolási módszere lehetséges: az egyik szerint a betegek alkalmilag, a szexuális együttlét előtt 6 órával veszik be a gyógyszert, a másik szerint pedig rendszeresen, akár naponta 5-10 mg-ot vagy heti 3 alkalommal meghatározott napokon 10-20 mg-ot. A gyakorlatban mindkét adagolási módszer egyforma hatékonysággal alkalmazható [4, 5]. A tadalafil 10 és 20 mg-os kiszerelésben áll rendelkezésre.

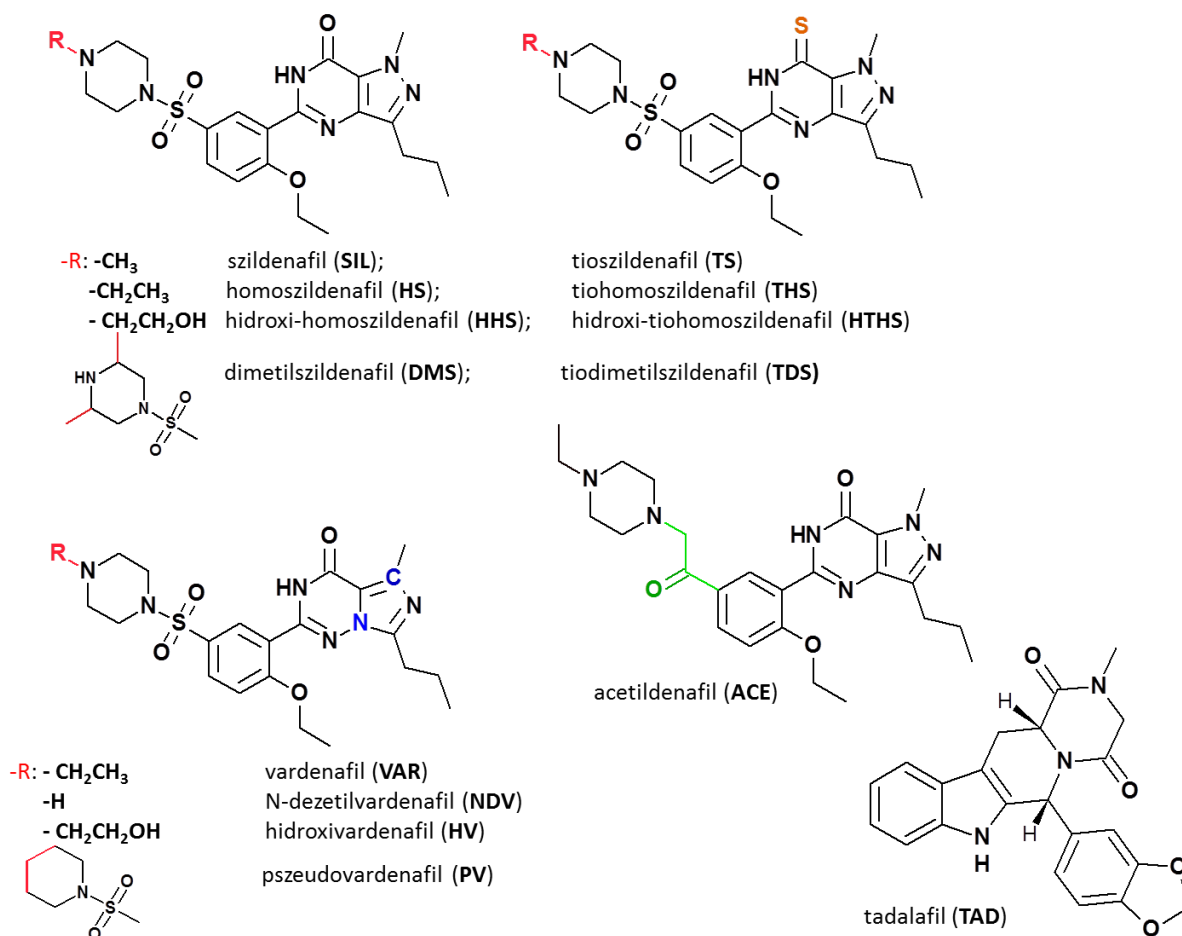
A PDE-5 inhibitorok vényköteles készítmények, mivel jelentős mellékhatásokkal rendelkeznek (hipotenzió, fejfájás, hátfájás, az arc kipirosodása, orrfolyás, látási zavarok) [6], mely mellékhatások fokozódhatnak (jelentős hipotenzió, ájulás) abban az esetben, ha nitrátokkal vagy α -blokkolókkal együtt alkalmazzák őket [7]. Diabétesz, hipotenzió illetve hiperlipidémia esetén alkalmazásuk kontraindikált. Azok a betegek, akik nem szedhetnek, illetve nem kívánnak ilyen gyógyszereket szedni gyakran alternatív gyógymódok felé

fordulnak. A szexuális zavar gyakran tabu téma, mely még inkább megnöveli az alternatív megoldások népszerűségét. Az erektilis diszfunkció „terápiájaként” számos étrend-kiegészítő, természetes, gyógynövény alapú potencianövelő készítmény ismeretes, melyek vény nélkül kaphatóak a gyógyszertárakban, vagy akár anonim megrendelhetőek az interneten. Ezen készítmények száma és a kereslet irántuk egyre nő könnyű hozzáférhetőségük és természetesnek vélt eredetüknek köszönhetően, ugyanis a természetes, gyógynövény alapú készítmények iránt az emberek bizodalma gyakran nagyobb, mint a szintetikus hatóanyag alapú gyógyszerek felé: biztonságosabbnak, mellékhatásoktól mentesnek és egészségesebbnek hiszik őket. Az étrend-kiegészítők gyártása/forgalmazása ugyanakkor a törzskönyvezett gyógyszerekhez képest sokkal kevésbé szabályozott és ellenőrzött. Biztonságosságuk és toxicitásuk kérdéses: szennyező anyagok (nehézfém, peszticid), hamisítások (illegálisan hozzáadott szintetikus vegyületek, pl.: szildenafil, vardenafil, tadalafil) gyakran előfordulnak. Továbbá profit- és hatékonyságnövelés céljából a gyártók nem csak szildenafil, vardenafil vagy tadalafil adnak a készítményhez [2, 8-11], hanem új, gyógyszerhatóanyagként nem elfogadott, a szerkezetek apró módosításával kapott dizájn analógjaikat is [11-23] – esetenként többet is [11, 20, 24] – mely vegyületek száma egyre nő [25-27]. Az első szildenafil analóg vegyületet, a homoszildenafil 2003-ben írták le [12], majd egy évvel később a hidroxihomoszildenafil és az acetildenafil követte [13, 14]. 2004-ben jelentek meg a tio származékok, melyek a szildenafil analógokhoz hasonlóan módosíthatóak, viszont azoknál hatásosabbak [28]. A vardenafil származékok [21, 23, 29-32] a szildenafilhez képest nem rendelkeznek jelentős előnyökkel, viszont a tadalafil hosszú hatástartama és rövid totálszintézise miatt ideálisnak bizonyult az analógok szempontjából is [33]. Az előállításához azonban a 3,4-metiléndioxi-metamfetamin (MDMA, ecstasy) szintéziséhez is használt, ellenőrzött alapanyagra, a piperonalra volna szükség, így a tadalafil származékok [24, 34-40] száma előnyös tulajdonságai ellenére igen csekély [41, 42]. A tadalafil királis molekula, a sztereoizomerek hatékonysága jelentős különbségeket mutat [43]. Így a tadalafil esetén meg kell még említeni, hogy annak optikai izomereivel történő hamisítás is előfordult [37, 40]. Napjainkban több mint 50 PDE-5 inhibitor analóg vegyületet írtak le, melyek nagy része szildenafil származék [15, 44-53], csupán 7 vardenafil és 9 tadalafil analóg ismeretes [26]. Ezek az „egzotikus” analógok az originális gyógyszerkutatók melléktermékeinek is tekinthetőek, az alapvegyület

szerkezetének apró, a hatást kevésbé befolyásoló változtatásával vezethetők le. A szerkezet módosításával azonban változhat a hatás, a mellékhatás és a toxicitás. Az acetildenafil például gyakran látási zavarokat okoz, mivel nem rendelkezik megfelelő PDE-5/PDE-6 szelektivitással. A PDE-6 enzim a retinában helyezkedik el, gátlása látási zavarokhoz vezethet [54-56]. Az étrend-kiegészítők és gyógynövény alapú készítmények PDE-5 gátlókkal történő hamisítása különös veszélyt jelenthet a gyanútlan, alternatív terápiához nyúló, esetleg nitrátokkal vagy α -blokkolókkal kezelt, diabéteszben, hipotenzióban vagy hiperlipidémiában szenvedő betegek esetén, vagyis akiknél a PDE-5 inhibitorok alkalmazása kontraindikált. Továbbá arról sem szabad elfeledkezni, hogy a dizájner analógok ártalmatlanságát, biztonságosságát és toxicitását klinikailag nem vizsgálták, így hatásuk megjósolhatatlan lehet. Végezetül fontos szem előtt tartanunk, hogy ezek legtöbbször gyógynövény alapú, komplex készítmények: összetételük, hatásuk és vizsgálatuk (analitikájuk) is összetett, bonyolult. A PDE-5 inhibitor gyógyszerek és a hamisított készítmények nagy számának és népszerűségének köszönhetően a vizsgáló laboratóriumoknak szüksége van megfelelő, olcsó, egyszerűen kivitelezhető rutin vizsgálati módszerekre, mellyel az étrend-kiegészítő készítmények PDE-5 inhibitorral történő hamisítása kimutatható, és a hozzáadott potencianövelő vegyület azonosítható, mennyisége pedig meghatározható vagy nagy pontossággal becsülhető.

1.1.2. A vizsgált vegyületek

Az általunk vizsgált vegyületek egy része a gyógyászatban is széleskörűen alkalmazott, törzskönyvezett készítmények hatóanyagai voltak: a szildenafil, a vardenafil és a tadalafil. A másik csoportot a hatóságilag nem elfogadott dizájner analógok alkották. Ezen vegyületek kiválasztása az OGYI laboratóriumában előzetesen vizsgált étrend-kiegészítők és gyógynövény alapú készítmények közül PDE-5 gátló analóg vegyületek előfordulása alapján történt. A viszonylag olcsón és egyszerűen hozzáférhető, forgalombahozatali engedéllyel rendelkező gyógyszerek hatóanyagaival szemben a különböző dizájner analógok referencia standardjai nehezen és drágán (vagy egyáltalán nem) szerezhetők be. Így 14 vegyület elválasztása, valamint a szildenafil külső standardra vonatkoztatott minőségi és a mennyiségi elemzés megvalósítása volt a célunk. A 14 általunk vizsgált vegyületet és a nevük dolgozatban használt rövidítését az 1. ábra mutatja be.



1. ábra: Az általunk vizsgált vegyületek szerkezete és elnevezése

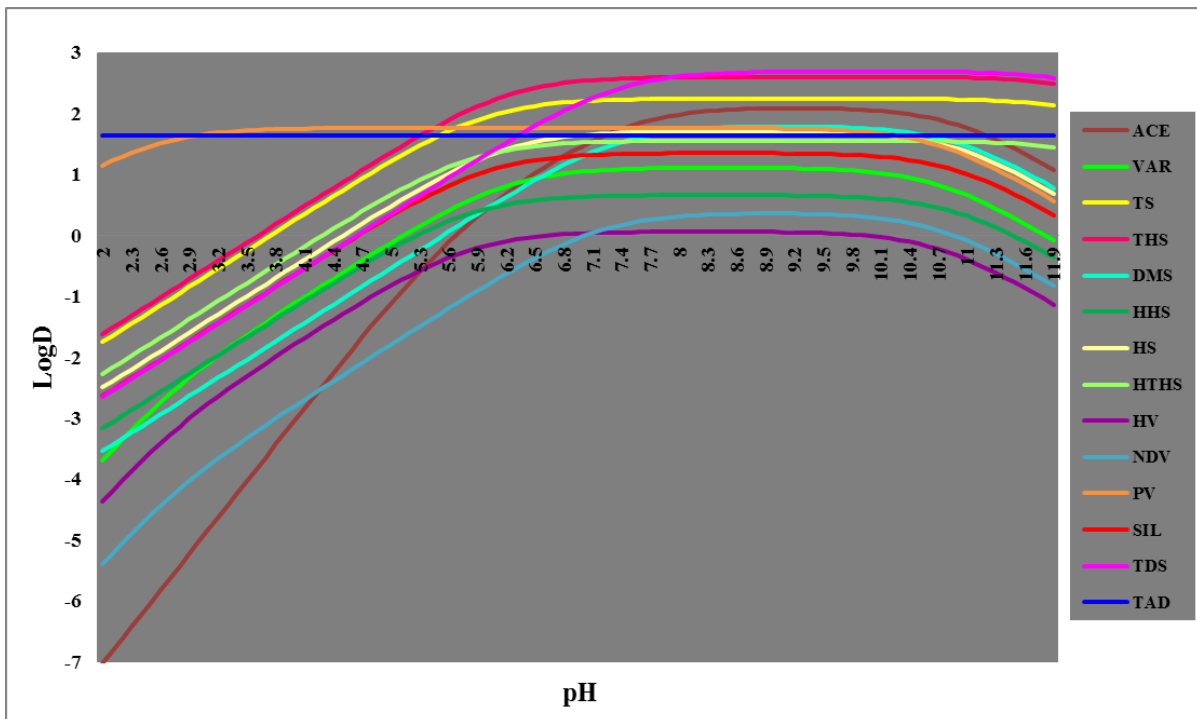
A vizsgált vegyületeket 5 csoportra oszthatjuk: a szildenafil alapváz, a tioszildenafil alapváz, a vardenafil alapváz vegyületek, az acetildenafil és a tadalafil. Az egy csoporton belüli különbségeket a piperazin gyűrűhöz kapcsolódó szubsztituensek adják: metil- (SIL, TS), etil- (HS, THS, VAR), illetve hidroxietil-piperazin (HHS, HTHS, HV) esetén a molekula bázicitását a tercier amin funkciós csoport biztosítja. N-dezetil- (NDV), illetve a dimetil- származékok (DMS, TDS) esetén a piperazin gyűrű nitrogénje szubsztituátlan, itt szekunder amin csoport felelős a bázicitásért. PV esetén a piperazin gyűrűt piperidin helyettesíti, így a többi vardenafil származékhoz képest eggyel kevesebb protonálható csoportot tartalmaz a molekula. Elmondható azonban, hogy az egyes PDE-5 inhibitor vegyületek csoportjai közötti hasonlóság igen nagyfokú. A szildenafil alapváz vegyületek pirazolo-pirimidin szerkezeten elhelyezkedő karbonil csoportjának tionil csoportra történő szubsztitúciójával jutunk el a tioszármazékokhoz. Fontos kiemelni, hogy a

szildenafil alapváz és a tioszildenafil alapváz vegyületek között is található egy-egy molekulapár (HS-DMS, THS-TDS), melyek összegképlete és a kromofór csoportot tartalmazó alapváza (vagyis molekulatömege és UV-spektruma) megegyezik. A harmadik csoportot alkotó vardenafil analógok pirazolo-pirimidin helyett imidazo-triazino alapvázat tartalmaznak, ezzel együtt eggyel több protonálódásra képes csoporttal rendelkeznek. Az illegális készítményekben leggyakrabban előforduló dizájner analóg, az acetildenafil a sildenafil alapváz homoszildenafil szulfonsavamid csoportjának módosításával vezethető le: esetében a piperazin gyűrű másik nitrogénje is középérs bázis lesz. A tadalafil az előzőektől jelentősen eltérő szerkezettel rendelkezik, a vizsgált vegyületek közül az egyedüli, mely nem tartalmaz protonálható csoportot. A gyógyszervegyület fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. ionizációs profil, lipofilitás) meghatározóak mind a farmakokinetika, mind a gyógyszeranalízis területén. Az analitikai módszerek tervezésénél segítséget nyújt a molekula sav-bázis tulajdonságainak, lipofilitásának ismerete. A vegyületek Marvin programmal [57] becsült savi disszociációs állandóit (pK_a), valamint az n -oktanol-víz megoszlási hányados értékeit ($\log P$) az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: A vizsgált vegyületek prediktált savi disszociációs állandói és oktanol-víz megoszlási hányadosai

vegyület neve	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	$\log P$
szildenafil	5,99	10,92		1,35
homoszildenafil	6,21	10,92		1,71
hidroxi-homoszildenafil	5,83	10,92		0,66
dimetilsildenafil	7,34	10,92		1,80
tioszildenafil	5,99	12,45		2,24
tiohomoszildenafil	6,22	12,45		2,60
hidroxi-tiohomoszildenafil	5,83	12,45		1,55
tiodimetilsildenafil	7,34	12,45		2,69
vardenafil	2,48	6,21	10,73	1,11
<i>N</i> -dezetil vardenafil	2,49	7,16	10,73	0,37
hidroxivardenafil	2,48	5,83	10,73	0,06
pszeudovardenafil	2,49	10,73		1,76
acetildenafil	5,63	7,50	10,92	2,10
tadalafil				1,64

Az 1. táblázat adatai, valamint az ionizált formák prediktált megoszlási hányadosainak ismeretében megszerkeszthetők az egyes vegyületekre vonatkozó $\log D$ -pH görbék, melyek segítségével a vizsgált vegyületek pH függő kromatográfiás elválaszthatósága becsülhető (2. ábra). Ahol az egyes $\log D$ -pH görbék metszik egymást, ott a vegyületcsúcsok koelúciója várható az adott pH-n. Abban az esetben viszont, ha a két görbe túl távol fut egymástól, akkor a két vegyületcsúcs is igen nagy retenció különbséggel fog megjelenni a kromatogramon. A görbék lefutása alapján látható, hogy az általunk vizsgált vegyületek elválasztása csupán hidrofóbicitásuk alapján nem lehetséges, mivel nem található olyan pH, ahol a görbék egymáshoz képest megfelelő távolságban futnának. A $\log D$ értékek jelentős eltérése (szélső görbék közti nagy távolság) gradiens módszer alkalmazásának szükségességét vetíti előre.



2. ábra: Az általunk vizsgált PDE-5 inhibitorok és dizájner analógjaik prediktált $\log D$ -pH görbéi

Az illegális szexuális teljesítményfokozó készítmények PDE-5 inhibitor (analóg) tartalmának detektálására, azonosítására több kromatográfiás módszert is leírtak már, köztük vékonyréteg-kromatográfiás (TLC), gázkromatográfiás, de főként fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszereket (RP-LC).

A már ismert analógok gyors, referencia standardok segítségével történő előzetes azonosítására jól alkalmazható a vékonyréteg kromatográfia. Előnye, hogy egyszerű és olcsó technika, azonban a szelektivitása és a belőle nyerhető információtartalom alacsony és a mérésekhez minden esetben szükség van referencia standardokra. A klasszikus vékonyréteg kromatográfias módszerek [58-60] mellett nagyhatékonyságú TLC (HPTLC) [61, 62] és preparatív TLC [35] módszerek is megtalálhatóak az irodalomban.

Gázkromatográfias mérések esetén a vizsgált komponensek illékonysága és termikus stabilitása alapvető kritérium. A PDE-5 inhibitorok (és analógjaik) termikus instabilitása miatt ezek a módszerek nem terjedtek el, ugyanis a mintaelőkészítés kibővül egy származékképzési (szililezési) lépéssel, mely tovább bonyolítja a módszert. Ennek köszönhető, hogy tömegspektrometriás detektálású GC módszert főként a törzskönyvezett PDE-5 inhibitorok vizsgálatára dolgoztak ki [63-66]. Azok az analógok, melyek szulfonamid kötést tartalmaznak vizsgálhatóak savas hidrolízist követően GC-MS módszerrel: ezt alkalmazták a pszeudovardenafil szerkezetének meghatározásakor is [15]. A GC-MS alacsony költségének köszönhetően a PDE-5 inhibitorok vizsgálatára igen széleskörűen alkalmazott, minőségi analízist biztosító LC-MS módszerek alternatív, kiegészítő megoldása lehet.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias módszerek a legfontosabb és leggyakrabban alkalmazott módszerek a gyógyszeranalízisben és a PDE-5 inhibitorok vizsgálata esetén is. A HPLC-UV, diódasoros detektort (DAD) alkalmazva az előzetes vizsgálatok esetén nyújt nagy segítséget. Referencia standardok segítségével ismert analógokból álló UV-spektrumkönyvtár hozható létre, mely a retenciós idők és relatív retenciók segítségével történő minőségi azonosítást segíti és egészíti ki [11, 67]. Hou és munkatársai azt tapasztalták, hogy az általuk vizsgált vegyület (hidroxi-acetildenafil) UV-spektruma az acetildenafilével megegyező, azonban attól eltérő retenciós időt mutatott [51]. Ehhez hasonlóan, ezek a módszerek előzetes méréseként segítenek tájékozódni a szerkezetükben hasonlóságot hordozó új dizájner analógok esetén is. A HPLC-UV tehát jól használható ismert analógok azonosítására, de ismeretlen származékok előzetes becslésére is alkalmas lehet, továbbá a mennyiségi meghatározásokhoz is megbízhatóan alkalmazott módszer. A leggyakrabban alkalmazott állófázisok a C18-módosított fordított fázisú töltetek, míg mozgófázisként acetonitril és (hangyasav vagy ammónium-formiát tartalmú) víz elegyeit

használják leginkább [25, 26]. A HPLC mérések többsége azonban MS detektálást alkalmaz a megbízható minőségi azonosítás érdekében annak nagy érzékenysége és specificitása miatt [2, 9, 58]. LC-MS segítségével a célmolekulák bonyolult mátrixban is egyszerű mintaelőkészítést alkalmazva szelektíven elválaszthatóak, valamint további előnye, hogy online DAD detektorral is kombinálható. Az ismeretlen vegyületek vizsgálata HPLC-MS/MS vagy tandem MS (MS^n) módszerek által létrehozott fragmentációs mintázat segítségével lehetséges [11, 68-71]. Az MS kapcsolás nagy előnye, hogy az elválasztást követően szerkezeti információhoz is juthatunk, mely új analógok szerkezetének meghatározásakor kihasználható. A dizájner analógok nagy számának köszönhetően fontos lehet, hogy rövid időn belül igen sok komponens elválasztható legyen, így a kinetikai hatékonyság növelése érdekében gyakran alkalmaznak gyorskromatográfias megoldásokat igen sokszor héjszerkezetű töltetekkel kombinálva mind UV, mind MS detektálással (UHPLC [72], UHPLC-MS/MS [1, 73, 74]).

A 2. táblázat az általunk vizsgált PDE-5 inhibitor analógok első azonosításakor alkalmazott módszereket foglalja össze időrendben. A PDE-5 gátlók azonosítása, illetve szerkezetének meghatározása történhet kromatográfias rendszerrel nem kapcsolt UV-spektroszkópiával (inkább csak kiegészítő módszerként) [12], vagy tömegspektrométerrel [15], vibrációs spektroszkópiás módszerekkel (IR, NIR, Raman spektroszkópia) [12, 19, 22], vagy mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) segítségével [12, 16, 19, 21, 22].

2. táblázat: Az általunk vizsgált dizájner analógok első azonosításakor alkalmazott módszerek összefoglalása. Az NDV-t először Yuk említi a [23] irodalomban, azonban az analitika nem érhető el hozzá.

Sor-szám	név	első publikáció	termék típusa	azonosításhoz használt technika	hivatkozás
1.	HS	2003	Ital	UV-spektroszkópia, HPLC-DAD, IR, FABMS, NMR	Shin [12] Blok-Tip [13]
2.	HHS	2004	Kapszula	LC-ESI-MS ⁿ , direkt-ESI-MS ⁿ , NMR	Blok-Tip [13]
3.	ACE	2004	Kapszula	LC-ESI-MS ⁿ , direkt-ESI-MS ⁿ , IR, NMR	Blok-Tip [13], Shin [14]
4.	PV	2006	Kapszula	LC-DAD-MS, GC-MS, direkt-MS ⁿ	Reepmeyer [15]
5.	DMS	2007	Kapszula	LC-DAD-MS, CID-MS, GC-MS, NMR	Reepmeyer [16]
6.	TDS	2007	Kapszula	HPLC-DAD, LC-ESI-MS, CID-MS, GC-MS, NMR	Venhuis [17], Reepmeyer [18]
7.	TS	2008	Kapszula	HPLC-DAD, LC-ESI-MS/MS, HR-MS, FT-IR, NMR	Zou [19]
8.	THS	2008	Kapszula	HPLC-DAD, LC-ESI-MS/MS, HR-MS, FT-IR, NMR	Zou [19], Venhuis [20]
9.	HV	2008	Étel	HPLC-DAD, LC-MS, NMR	Choi [21]
10.	HTHS	2009	Kapszula	HPLC-DAD, LC-ESI-MS/MS, HR-MS, FT-IR, NMR	Li [22]
11.	NDV	2010	-	-	Yuk [23]

Annak ellenére, hogy szinte folyamatosan jelennek meg újabb és újabb dizájner analógok különböző gyógyhatású készítményekben [11-24, 30-32, 34-39, 44-53, 75-88], azok egy adagolási egységre vonatkoztatott mennyiségéről viszonylag keveset tudunk, valószínűleg a drága és sokszor nem hozzáférhető standardok miatt. LC-UV és LC-MS módszerekkel egy [8, 75, 77, 80, 89-92], vagy több [9-11, 16, 40, 72, 93] PDE-5 inhibitor vegyület egymás melletti mennyiségi meghatározása lehetséges a megfelelő referencia standardok alkalmazásával. A drága egyéni standardok elkerülése érdekében vannak módszerek, ahol a dizájner analóg mennyiségét a törzskönyvezett alapvegyület UV-válasza alapján becslik [2, 94]. Sok esetben (pl tioszármazékok, acetildenafil esetén) azonban a vegyületek alapváza is igencsak különbözik a forgalomban lévő hatóanyagétól, így az UV-spektrumuk is jelentősen eltérhet. Poplawska és munkatársai egy univerzális detektort, a kisüléssel aeroszol detektort (charged aerosol detection, CAD) alkalmazták [95] növényi étrend-

kiegészítők azonosított és még ismeretlen PDE-5 inhibitor analóg tartalmának vizsgálatára, csak szildenafilfilt és tadalafilt, mint referencia anyagokat alkalmazva. Az általuk kidolgozott módszer hátránya azonban, hogy a komponensek azonosításához egy önálló, off-line analitikai technikára, TOF-MS-re volt szükség.

A mennyiségi meghatározáshoz azonban bizonyos PDE-5 inhibitor kombinációk, illetve bizonyos analógok esetén gyakran szükség van a minta több módszerrel történő vizsgálatára, mely több időt igényel. Olyan módszer azonban, mely a gyanús potenciafokozó készítményekben számos PDE-5 inhibitor egymás melletti rutin minőségi és a mennyiségi elemzést is lehetővé teszi, igen kevés létezik. A munkánkkal egy időben Nickum és Flurer, az FDA kromatográfusai kvalitatív és kvantitatív mérést egyszerre biztosító HPLC-UV módszert dolgoztak ki PDE-5 inhibitorok vizsgálatára [96]. A vizsgált vegyületeket 6 csoportba osztották UV-spektrumuk alapján, tehát a mennyiségi meghatározást 6 alapvegyületre vezették vissza, leredukálva ezzel az alkalmazandó standardok számát.

Célunk volt egy egyszerű, olcsó, MS kompatibilis HPLC-UV módszer fejlesztése, mely alkalmas egyetlen (szildenafilfíl) külső standardot alkalmazva a PDE-5 inhibitorok és dizájner analógiak minőségi és mennyiségi meghatározására gyanús potenciafokozó gyógyszerek és étrend-kiegészítő készítmények vizsgálata során.

1.2. Optikailag aktív vegyületek elválasztása ciklodextrin-alapú kapilláris elektroforézissel

1.2.1. Optikai izoméria, kiralitás

Mintegy két évszázada ismertek olyan vegyületek, amelyek a polarizált fény síkját elforgatják. A jelenséget optikai aktivitásnak, kiralitásnak; a vegyületet pedig optikailag aktívnak, királisnak nevezzük. Az enantiomerek olyan sztereoizomerek (térizomerek), melyek konfigurációja egymással ellentétes, térszerkezetben tükörképi párt alkotó molekulák. Az enantiomerek tulajdonságai akirális környezetben csak az optikai forgatás irányában térnek el egymástól, más fizikai és kémiai tulajdonságukban nem. Egy molekulának csak egy enantiomerje lehetséges, amelynek minden aszimmetria-centruma ellentétes kiralitású, a többi izomer diasztereomerje az illető molekulának. A

diasztereomerek olyan sztereoizomerek, amelyek egymásnak nem tükörképei, és nem is hozhatók fedésbe egymással. A diasztereomerek eltérő fizikai és kémiai tulajdonságaiknak köszönhetően elvileg megkülönböztethetőek, elválaszthatóak. Egy molekulának több (n) aszimmetria-centruma is lehet, ilyenkor a lehetséges sztereoizomerek maximális száma 2^n . A kiralitás jelensége az egész univerzumban fellelhető és a földünkön kialakult életben is meghatározó szerepet tölt be. Az élőlényeket felépítő szerves molekulák jelentős része királis, térszerkezeti homogenitásuk alapvető fontosságú. A biomolekulák homokirális egységekből épülnek fel: a fehérjék aminosav egységei kizárólag L-izomerek, a szénhidrátok és a nukleinsavakat felépítő cukrok pedig D-izomerek.

A szervezet biomolekuláinak szelektivitását egyedi, gyakran királis szerkezetük biztosítja, melynek köszönhetően a szervezettel kölcsönhatásba kerülő enantiomer párok számos esetben eltérő biológiai hatást fejtenek ki [97-99]. A szervezetbe jutó enantiomer pár tagjai különbözhetnek egymástól aktív transzportjukban, a szövetek közötti eloszlásukban, a vér fehérjéihez való kötődésükben, receptorkötődésükben, metabolizmusukban és kiürülésükben, továbbá az is előfordulhat, hogy az egyes sztereoizomerek más receptorhoz kötődnek [97, 100, 101].

Az enantiomerek eltérő biológiai hatásának jelentőségére a hatvanas évek gyógyszerbotránya hívta fel a figyelmet. A német Grünenthal gyógyszergyár 1957 őszétől Contergan[®] néven (hatóanyag: racém talidomid) nyugtató és altató hatású gyógyszert kezdett forgalmazni. A Contergan[®] a kismamák számára egyáltalán nem volt ellenjavalt, a nyugodt alvás érdekében az egyik legfőbb célcsoportja az áldott állapotban lévő anyák voltak. 1958 második felétől jelentősen megnövekedett a súlyos fejlődési rendellenességgel, torzult végtagokkal, illetve halvaszületett csecsemők száma. 1980-ra tisztázták, hogy a hatóanyagoknak csak az egyik enantiomerje (*R*) felelős a nyugtató hatásért, mely ártalmatlan a magzatra nézve. Az *S* enantiomer viszont teratogén hatással rendelkezik, így több ezer magzatban súlyos fejlődési rendellenességet okozott [102-104].

A Contergan-botrány megrendítette a bizalmat a hatóanyagot hagyományos, racém formában tartalmazó gyógyszerek iránt és forradalmi változást idézett elő a gyógyszeriparban. A gyógyszerek bevezetése előtt a királis molekulák enantiomerjeit minden esetben el kell választani, együttesen és külön-külön is meg kell őket vizsgálni kémiai, farmakológiai, farmakokinetikai és toxikológiai szempontok alapján. A gyógyszer

enantiomertiszta bevezetésétől kizárólag abban az esetben lehet eltekinteni, ha a két optikai izomer hatása teljesen azonos [103].

Az eutomer (kívánt hatású enantiomer) és a disztomer (hatástalan vagy káros hatású enantiomer) elválasztása gyakran csak azért szükséges, mert a disztomer nem hat vagy csak kevésbé hat a célmolekulán, ugyanakkor ballasztként növeli a terhelést a szervezet detoxifikáló rendszerei számára. Az általunk vizsgált vegyületek (alogliptin, tapentadol, tadalafil) is ilyen típusú vegyületek. Az enantiomerek elválasztása alapvető, ha az egyik enantiomer nem csak hatástalan, de toxikus is: például bupivakain esetén az *R* enantiomer erősen kardiotoxikus, az *S*-talidomid teratogén hatását már említettük. Speciális esetben előfordulhat az is, hogy mindkét enantiomer hasznos terápiás hatással rendelkezik, de más-más területen: míg az dextropropoxifen analgetikus hatású, addig a levopropoxifen antitusszívum, az enantiomerek elválasztására ebben az esetben is szükség van. Az enantiomerek nemcsak farmakodinámiásan, de farmakokinetikájukban is eltérhetnek, például az *S*-acenokumarol tízszer gyorsabban metabolizálódik, az antikoaguláns hatásért így főként a lassabban metabolizálódó *R*-acenokumarol a felelős [105].

Az enantiomer elválasztás azonban nem könnyű feladat és rendkívüli többletköltséget jelenthet, célravezetőbb a molekulákat irányított, sztereokémiai szempontból szelektív módon előállítani. 1993-ban a szintetikus hatóanyagot tartalmazó gyógyszerek száma 1300 körül volt, közülük kb. 500 tartalmazott királis hatóanyag molekulát, de csak 61 hatóanyaga volt enantiomertiszta formában. Napjainkban a forgalomban lévő gyógyszerek nagy részét az optikailag tiszta hatóanyagot tartalmazó készítmények teszik ki [106, 107].

1.2.2. Ciklodextrinek, mint királis szelektorok

A hatóanyagot enantiomertiszta formában tartalmazó készítmények térhódításának köszönhetően a királis anyagok vizsgálata, az enantiomerek elválasztása igen gyakori feladat. A királis molekulák enantiomerjei akirális környezetben nem különböztethetőek meg egymástól, azonban királis vegyülettel (királis szelektorral) kölcsönhatásba lépve diasztereomer párokat alkotnak (pl. diasztereomer sóképzés, komplexképzés), amelyek eltérő fizikai tulajdonságaik (pl. oldékonyság, kristályforma, stabilitás, kromatográfias retenció, elektroforetikus mozgékonyosság) alapján akirális közegben is megkülönböztethetőek. Le kell azonban szögeznünk, hogy nincs olyan univerzális királis

szelektor, amely minden enantiomer párt el tudna választani, a különböző kiralitáscentrumú molekulák testreszabott segédanyagokat igényelnek. A leggyakrabban alkalmazott szelektorokat az alábbiak szerint csoportosíthatjuk:

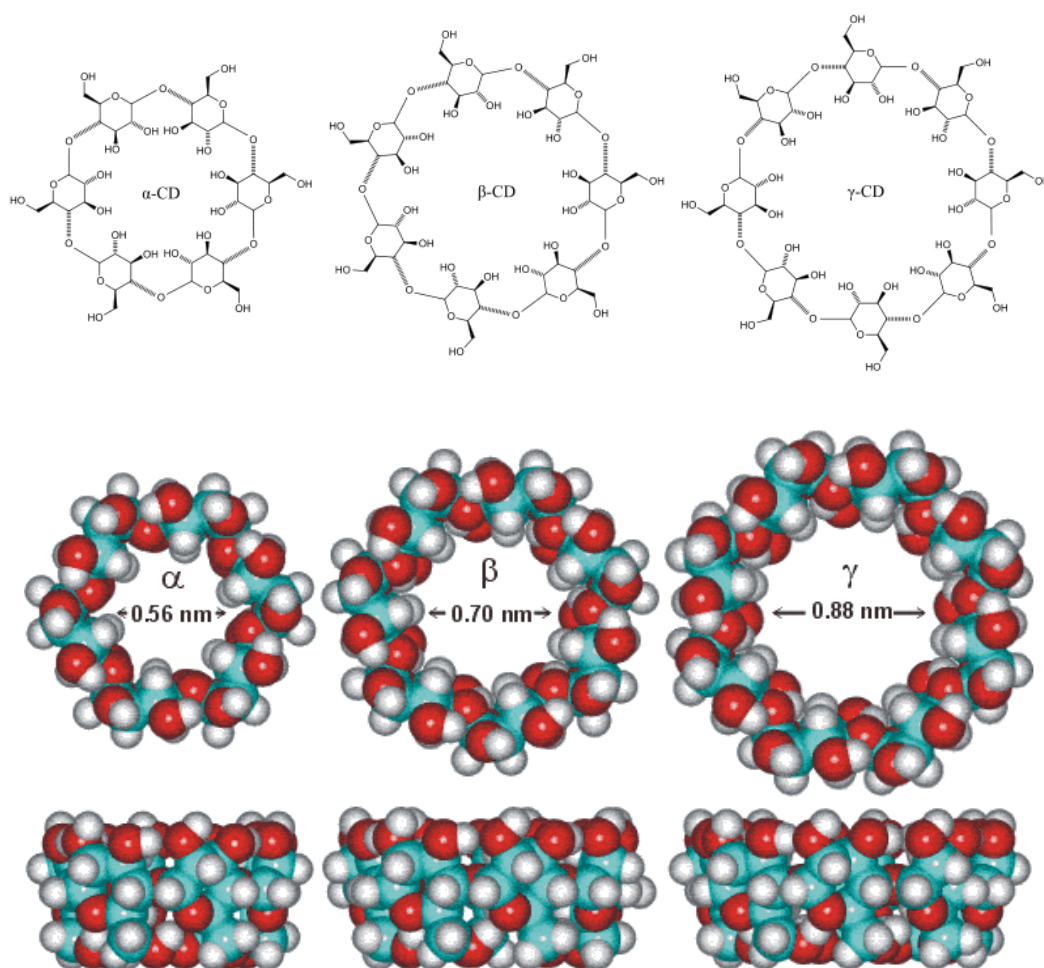
- makrociklusos antibiotikumok [108, 109] (pl. vankomicin, teikoplanin, risztocetin)
- peptidek, polipeptidek, fehérjék [110] (pl. humán szérum albumin)
- oligo- és polinukleotidok [111]
- nem ciklusos oligo- és poliszacharidok [112, 113] (maltóz, dextrans, amilóz, heparin)
- koronaéterek [114] (pl. 18-korona-6)
- micellaképző királis felületaktív anyagok [115] (pl. Cu(II)-*N,N*-dodecil-alaninát)
- királis fém-komplexek [116] (pl. Cu(II)-aszpartám komplexek)
- ciklodextrinek [117, 118] (pl. natív és szubsztituált ciklodextrinek)

UV-sugárzást áteresztő képességük és relatív alacsony árak miatt a ciklodextrinek a legszélesebb körben alkalmazott szelektorok. Származékaik igen bő választéka biztosítja az egyszerű és sokszínű módszerfejlesztést.

A ciklodextrineket először 1891-ben Villiers írta le [119]. Több mint egy évtizeddel később Schardingernek sikerült elkülöníteni egy termofil baktériumot, amely képes volt feloldani a keményítőt és abból kristályos dextrineket képezni. Schardinger még nem ismerte pontos szerkezetüket, de felismerte komplexképző képességüket [120]. Az 1930-as években Freudenberg és munkatársai izolálták először tisztán a három natív CD-t, és igazolták azok gyűrűs szerkezetét [121], azonban az α - és β -CD szerkezetében tévesen 5 ill. 6 glükóz egységet gondoltak. A glükóz egységek pontos számát French és Rundle határozták meg [122]. Az egyik legfontosabb tulajdonságukat, a sztereoszelektivitásukat Cramer írta le 1952-ben [123]. A ciklodextrin kutatás és felhasználás ezek után hatalmas lendületet vett, számos CD származékot állítottak elő a széleskörű felhasználási igények kielégítése érdekében.

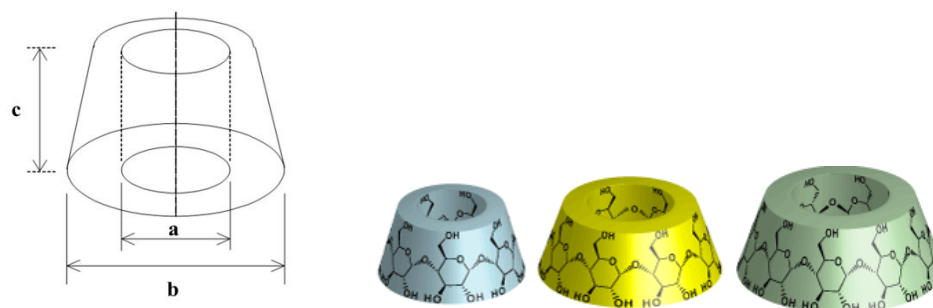
A ciklodextrinek ciklikus, nem-redukáló oligoszacharidok, amelyek α -(1,4)-glikozidos kötésekkel keresztül D-glükopiranoz egységekből épülnek fel [124, 125]. A CD-eket felépítő glükózegységek száma alapján (6, 7, ill. 8 egység esetén) α -, β -, ill. γ -CD-eket különböztetünk meg. A ciklodextrineket alkotó glükopiranoz egységek egy csonkakúp-palást felületén helyezkednek el egy közelítőleg henger alakú üreget körülhatárolva, melynek nagyságát a gyűrűtagszám határozza meg. A molekula belső ürege a

hidrogénatomok és glikozidos oxigénhidak révén enyhén apoláris tulajdonságú. A csonkakúp keskenyebb nyílását primer, a szélesebbet szekunder hidroxicsoportok határolják, amelyek a molekula külső felszínének poláris jellegét biztosítják. A poláris felületi sajátságoknak köszönhetően a CD-k (az intermolekuláris hidrogénhidak kialakulása miatt aggregálódó β -CD kivételével) jól oldódnak vízben. A CD-k vázlatos és háromdimenziós szerkezetét a 3. ábra mutatja be, fontosabb fizikai-kémiai tulajdonságaikat pedig a 3. táblázat foglalja össze [124].



3. ábra: A ciklodextrinek szerkezete és üregméretének összehasonlítása

3. táblázat: A CD-k fizikai-kémiai tulajdonságai és molekuláris méretei [124]



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)	0,18	0,33	0,52
Felvehető vízmolekulák száma az üregben	6	11	17
Kristályvíz tartalom (%)	10,2	13,2-14,5	8,13-17,7
Oldhatóság vízben (g/100 cm ³) (25°C-on)	14,5	1,85	23,2

A ciklodextrinek egy hidrofil külsővel (relatív jó vízoldhatóság), és gyengén hidrofób üreggel rendelkeznek, mely megfelelő környezetet biztosít apoláris vendégmolekulák számára [125, 126]. Különleges sajátosságuk, hogy üregük a hossz tengelyük mentén mindkét végén nyitott, henger alakú, 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 -ciklodextrinek ezzel szemben az aromás és heterociklusos vegyületek iránt legnagyobb az affinitása, míg a γ -CD méreténél fogva makrociklusokkal, szteroidokkal is stabil komplexet képez [127]. A zárványkomplex képződésekor a vendégmolekula és a ciklodextrin gazdamolekula között nem-kovalens kölcsönhatások lépnek fel (hidrogén híd, dipól-dipól kölcsönhatás a hidroxicsoporttal, egyes esetekben elektrosztatikus kölcsönhatás). A ciklodextrin üregében tartózkodó energetikailag kedvezőtlen állapotú

vízmolekuláknak apoláris vendégmolekulával történő helyettesítése a komplexképzés kulcslépése lehet (entrópiás faktor). A ciklodextrinek általában 1:1 sztöchiometriájú komplexeket képeznek, de előfordulhatnak 1:2 vagy 2:1 arányú, valamint egészen speciális összetételű komplexek is [128, 129].

A ciklodextrinek számos kiralitáscentrumot tartalmaznak (glükóz monomerenként ötöt, tehát rendre 30, 35 illetve 40 aszimmetria centrumot tartalmaz az α -CD, β -CD, illetve γ -CD), ezért belső üregük tulajdonképpen egy királis mikrokörnyezet. Az enantiomerek CD-hez történő eltérő kötődése miatt különböző stabilitású diasztereomer komplexpár keletkezhet, melynek a tagjait komplexstabilitási állandókkal tudjuk jellemezni. A kialakuló komplexek stabilitását az üreg mérete, a vendégmolekula üregbeli elhelyezkedése és az esetleges oldalláncokkal kialakuló kölcsönhatások erőssége befolyásolja. Abban az esetben, ha a kialakuló kölcsönhatás különböző mértékben stabilizálja a két enantiomer zárványkomplexét, akkor a komplexképződés sztereoszelektív lesz, a két enantiomer átlagosan eltérő időt tölt a komplexben az elválasztás során, aminek köszönhetően létrejöhét a királis elválasztás.

A CD molekula királis felismerő képessége szubsztituensek bevitelével növelhető. A CD-k glükózegységként egy primer és két szekunder alkoholos hidroxicsoportot tartalmaznak (összesen 18, 21, illetve 24 szabad OH-csoportot az α -CD, β -CD illetve γ -CD esetén), amelyek kitűnő lehetőséget biztosítanak a változatos szerkezetű származékok előállítására [130-132]. A CD származékok egyedi, esetenként szelektív komplexképző tulajdonságokkal és királis felismerő képességgel rendelkeznek. A CD származékok esetében a szubsztitúciós fok (degree of substitution, DS) azt definiálja, hogy CD molekulánként átlagosan hány hidroxicsoporton történt szubsztitúció. Az utóbbi másfél évtizedben a natív CD-k legkülönfélébb származékait állították elő és alkalmazták nagy sikerrel, manapság az irodalomban leírt ciklodextrin származékok száma már több mint 1500.

A ciklodextrinek felhasználása, tekintettel a sokféle származékra és változatos alkalmazási területekre egyre sokrétűbb. A legnagyobb (tonnás) mennyiségben a random metil- β -CD-t (vízbázisú festékek, fakezelő oldatok) és a hidroxipropil- β -CD-t (tisztító- és kozmetikai szerek) használják fel. Ipari szennyvizekből bizonyos komponensek ciklodextrin-gyantákkal eltávolíthatók. Az élelmiszeriparban a különféle aromák főként a β -CD

komplexeit értékesítik, amelyek megnövelt vízdékonysággal és kémiai stabilitással rendelkeznek [133]. A gyógyszeriparban illékony gyógyszermolekulák stabilitásának, vízben rosszul oldódó hatóanyagok oldékonyságának, biohasznosíthatóságának növelésére, peptidaggregáció gátlására, helyi irritációk, mellékhatások elkerülésére, valamint íz- és szagfedésre alkalmazzák a ciklodextrineket és azok származékait [134]. A ciklodextrinbe zárt anyagok tulajdonságai megváltozhatnak: általában elvesztik higroszkópos jellegüket, sok esetben csökken a komplexbe zárt molekula oxidációra, bomlásra, polimerizációra való hajlama.

Egyes CD-k (pl. a natív α -, β - és γ -ciklodextrin, valamint a hidroxipropil- β -CD) már hivatalosak az amerikai, japán vagy európai gyógyszerkönyvekben és az élelmiszeriparban, mint segédanyagok, más ciklodextrinek engedélyeztetése pedig folyamatban van. A ciklodextrinek azonban egyre szélesebb körben tűnnek fel nem csak segédanyagként: például a Sugammadex (Bridion[®]) egy ciklodextrin-alapú, rokurónium-specifikus mesterséges receptor. A készítmény nagy előnye, hogy a rokurónium műtét utáni izomrelaxáns hatását hatékonyan szünteti meg, jelentősen megnövelve az anesztézia biztonságosságát, csökkentve a mellékhatásokat és gazdaságosabbá téve az altatást [135]. Az utóbbi években hatóanyagként történő alkalmazásuk (pl. Niemann-Pick C betegség) is előtérbe került [136]. Célzott hatóanyag bejuttatást elősegítő hordozó rendszerként (kopolimerek, nanorészecskék) történő alkalmazásuk is, népszerű és ígéretes kutatási terület, főleg a kemoterápiás szerek szállítására [137].

Az analitikai kémia a leggyakrabban királis felismerő képességüknek köszönhetően alkalmazza a CD-ket, elsősorban az enantioszelektív kromatográfia és a királis elektorforetikus technikák területén.

1.2.3. Királis kromatográfia

Az enantiomertiszta hatóanyagot tartalmazó készítmények bevezetése óta a királis anyagok vizsgálata, az enantiomerek elválasztása és az enantiomerarány meghatározása igen gyakori gyógyszeripari feladat. A gyógyszerkönyvi és hatósági előírások megkövetelik a tized százalékban jelenlevő szennyezések meghatározását, beleértve az enantiomer szennyezéseket is [138]. Az enantiomer tisztaság gyors és hatékony meghatározására a kromatográfia (gázkromatográfia [139-141], szuperkritikus fluid kromatográfia [142-144])

és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia [112, 145-148]) valamint a kromatográfias és elektromigrációs elvet egyaránt kihasználni képes kapilláris elektroforézis [149] nyújtja a legváltozatosabb lehetőségeket: kis mennyiségű mintából néhány perc alatt akár 0,1%-nál kevesebb királis szennyező is meghatározható, akár több enantiomer párra, bonyolult mátrixokban is.

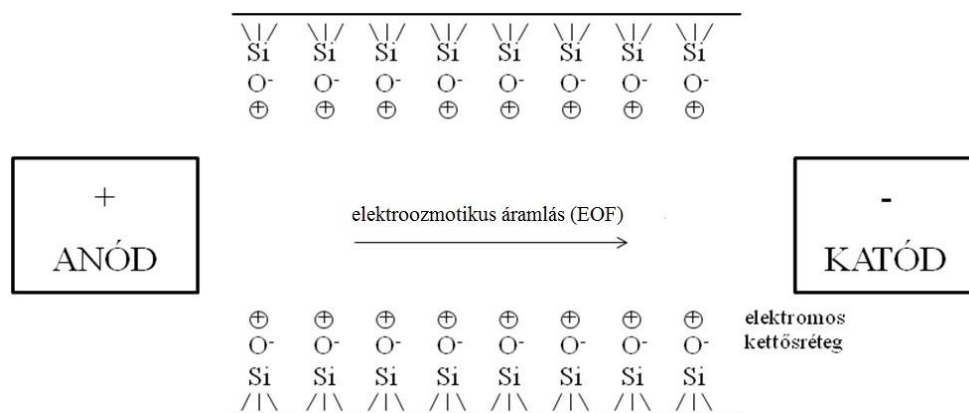
Az enantiomerek a királis szelektorral enantioszelektív kölcsönhatásba lépve eltérő fizikai tulajdonságú (kromatográfias retenció, elektroforetikus mozgékonyaság) diasztereomer párokat alkotnak. Az enantioszelektív kromatográfia két részre osztható: közvetett (indirekt) és közvetlen (direkt) megközelítésre. A közvetett módszernél az enantiomer párt még a kromatografálás (elválasztás) előtt egy stabil kötést (általában kovalens kötést) kialakító királis származékképző reagenssel visszük reakcióba, melynek eredményeként eltérő tulajdonságokkal rendelkező diasztereomer pár keletkezik. Ilyenkor általában nagyobb enantioszelektivitás érhető el (kromofórt/fluorofórt tartalmazó származékképzővel nagyobb detektálási érzékenység is), azonban a diasztereomer származékképzés egy plusz mintaelőkészítési lépést jelent, amely további hibák forrása lehet (reagens tisztaság, mátrix vegyületek kompetíciója, nem ugyanakkora konverzió az enantiomerekre, stb.). Az általánosabban (és általunk is) alkalmazott közvetlen módszernél a királis szelektor csak időleges, az analízis időskáláján pillanatszerűen gyorsan keletkező és disszociáló diasztereomer párt képez a vizsgálandó enantiomerekkel. A szelektor lehet az állófázis része (folyadékkromatográfias rendszereknél [112, 147, 148], kapilláris elektrokromatográfiánál (CEC) [150-152] az esetek nagy részében) vagy mozgófázis-adalék (kapilláris elektroforézisnél [117, 153-155], HPLC esetén ritkán, főként olcsóbb szelektor esetén [156] a nagyobb eluensigény miatt). Az elválasztás HPLC esetén kizárólag az enantiomerek királis szelektorral történő eltérő erősségű kölcsönhatásából ered. A szelektorral erősebben kölcsönható enantiomer több időt tölt a szelektort tartalmazó fázisban, mint a gyengébben kölcsönható izomer, így a két sztereoizomer megoszlása különböző lesz a két fázisban, amely eltérő haladási sebességben (retencióban) nyilvánul meg [157-159]. A királis kromatográfia esetén a különböző vegyületek kiralitáscentrumai testre szabott királis szelektorokat igényelnek, ugyanis a szelektor és mintavegyület kölcsönható atomcsoportjai közötti pontos térbeli megfeleltetés szükséges. Ezt a hárompontos kölcsönhatási modell írja le: ahhoz, hogy a királis felismerés megtörténjen a

szelektornak és a vizsgált izomerek legalább egyikének egy időben és legkevesebb három ponton kell kölcsönhatásba lépni, amiből egy pontnak sztereoszelektívnek kell lennie. Ennek az az oka, hogy csak a minimum három ponton létrejövő kölcsönhatás képes különbséget tenni a csupán térszerkezetükben különböző enantiomer párok között [160, 161].

1.2.4. Királis kapilláris elektroforézis

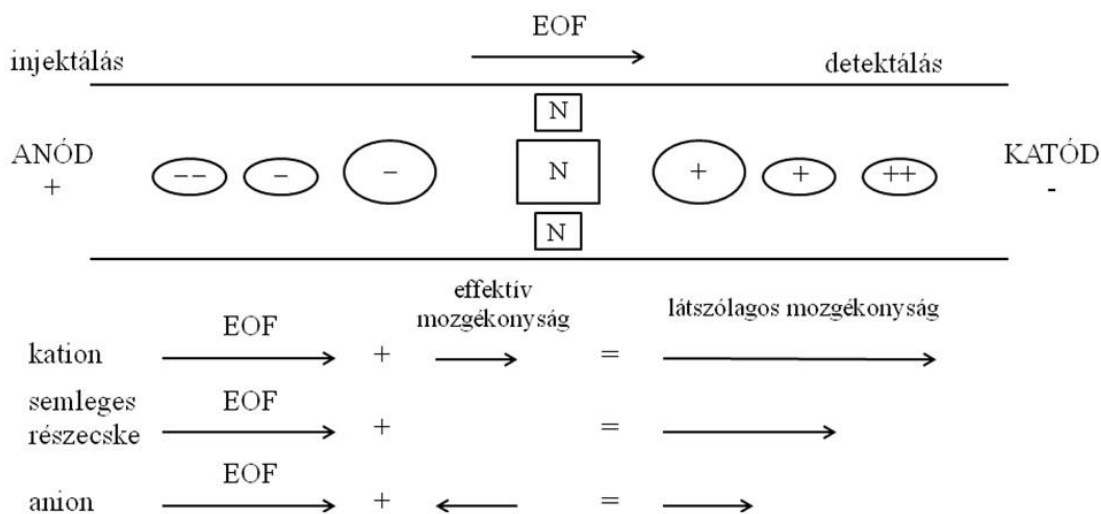
A kromatográfiai technikák mellett a kapilláris elektroforézis napjainkban az egyik leggyorsabban fejlődő elválasztástechnikai módszer. A CE egyedülálló előnyökkel rendelkezik az ionizálható anyagok analízisében, de megfelelő segédanyagokkal (töltéssel rendelkező micellaképző [162] vagy megfelelő királis szelektor [153, 163, 164]) képes semleges anyagok elválasztására is [165].

Elektroforézis (elektromigráció) esetén a töltéssel rendelkező részecskék elektromos térerő hatására az ellentétes polaritású elektród felé vándorolnak, az elválasztás az ionok eltérő elektroforetikus mozgékonyaságán (mobilitás, μ) alapul [166]. A mobilitást leginkább a részecske fajlagos töltése befolyásolja, de függ az ion alakjától, szolvatáltságának mértékétől, a közeg viszkozitásától, relatív permittivitásától, pH-jától és a kapilláris hőmérsékletétől is. A részecskék elektroforetikus mozgékonyaságát jelentősen befolyásolja továbbá az elektrooszmózis, mely az elektromos tér hatására az elektrolitnak a töltéssel rendelkező kapillárisfelület mentén kialakuló elektrooszmotikus áramlását jelenti (electroosmotic flow, EOF, 4. ábra).



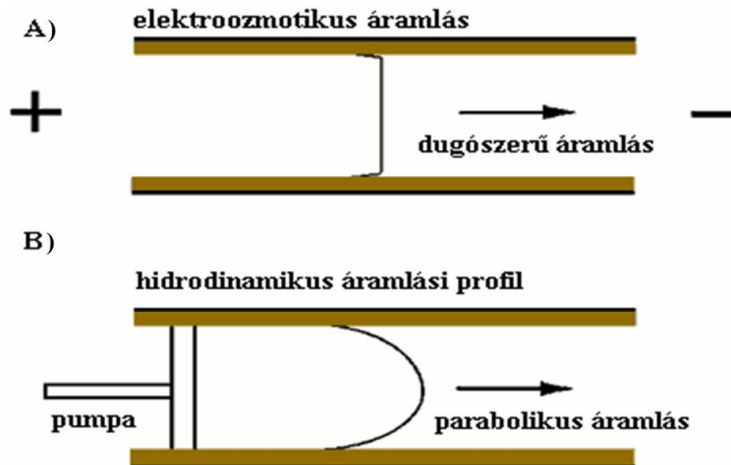
4. ábra: A kapilláris belső felülete és az elektrooszmotikus áramlás (EOF)

A szilanolcsoportok az elektrolit pH-jától függően töltéssel rendelkezhetnek. Előkezeletlen kapilláris esetén 2,5-nél nagyobb pH-n az SiOH csoportokról hidrogénionok disszociálhatnak és az így kialakult negatív töltésű felülethez az oldatból hidratált kationok vonzódnak a kapilláris falához. Ezzel létrejön egy elektromos kettősréteg, amely potenciálkülönbséget, úgynevezett zéta-potenciált eredményez. A hidratált kationok az elektromos tér hatására elmozdulnak a katód irányába, megindítva a kapillárisban lévő teljes folyadéktömeg áramlását. Ez az elektroosmotikus áramlás az anionokat is magával viszi, annak ellenére, hogy azok saját elektroforetikus mobilitásuk alapján az anód felé vándorolnának. Az elektroosmotikus mobilitás függ a háttélelektrolit pH-jától és koncentrációjától (ionerősségtől), valamint az esetleges szerves módosítótól. Annál nagyobb az EOF, minél nagyobb a háttélelektrolit pH-ja, mivel egyre több hidrogénion disszociál a szilanolcsoportokról. 8-nál nagyobb pH-n viszont a további lúgosítás már nincs befolyással az EOF sebességére, hiszen gyakorlatilag az összes szilanolcsoport deprotonált állapotban van. Az EOF mozgékonyasága hozzáadódik a részecske saját effektív mozgékonyaságához, létrehozva a kísérletileg meghatározható látszólagos (apparens) mozgékonyaságot. Ezek alapján az injektált mintazóna elején a (legnagyobb fajlagos töltéssel rendelkező) kationok vándorolnak, őket követik a semleges molekulák (EOF zóna), leghátul pedig a (legnagyobb fajlagos töltéssel rendelkező) anionok migrálnak (5. ábra).



5. ábra: Az elektromos térerő hatása a kationokra, az anionokra és a semleges részecskékre

A CE nagy előnye, hogy az EOF áramlási profilja dugószerű, szemben a nyomás által létrehozott parabolikus (lamináris) áramlási profilt mutató kromatográfias rendszerekkel (pl. HPLC, 6. ábra). Ennek oka, hogy a kapilláris átmérőjéhez képest a kapilláris belsejében lévő kettősréteg igen vékony. A dugószerű áramlási profil esetén nagy a hatékonyság, akár milliós nagyságrendű elméleti tányérszám elérése lehetővé válik, a csúcshéledés minimális.



6. ábra: Áramlási profilok: A) dugószerű és B) parabolikus áramlás

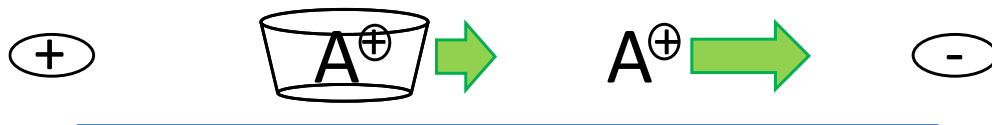
A kapillárisban vándorló ionok „súrlódása” során jelentős mennyiségű hő (Joule-hő) képződik, amely azonban nagy felületen adódik le, ez nagy térerő alkalmazását teszi lehetővé. A nagy elektromos térerő használata rövid analízisidőt, valamint kiemelkedő elválasztási hatékonyságot, és nagy felbontást biztosít. A mind elektrokinetikus, mind hidrodinamikus injektálható kis (1-50 nl) mintatérfogatnak, a széles körben változtatható futtatási paramétereknek és a változatos detektálási módoknak köszönhetően a módszerfejlesztés változatos, gyors és egyszerű. Ez a környezetbarát technika alacsony működtetési költségű (vizes pufferek szerves oldószerek helyett), automatizálható és a vegyületek igen széles körét képes elválasztani (a kis ionoktól a több millió Da molekulatömegű makromolekulákig). A módszer további előnye az egyszerű mintaelőkészítés: akár vérplazma vagy vizelet minták is tisztítás nélkül analizálhatók, mert a kvarc kapilláris minden analízis után hatékonyan regenerálható. Hátránya a legelterjedtebb kromatográfias technikákkal szemben egyrészt a kisebb érzékenység: az optikai úthossz igen rövid, mivel

maga a kapilláris a detektorcella, illetve a kis térfogatú injektálás a mérések ismételtetését és a módszer robusztusságát ronthatja. Az elméletileg elérhető rendkívüli hatékonyságot a mintakomponens és a háttérektrólit azonos töltésű ionjának jelentős mobilitáskülönbsége esetén kialakuló elektromigrációs csúcsdiszperzió [167], vagy a kapillárisfalán történő mintaabszorpció ronthatja, azonban mindkét esetben megoldást nyújthat a megfelelő pufferválasztás [168], illetve második esetben a kapillárisfal dezaktiválása [169].

A kapilláris elektroforézis elméleti alapjait, megvalósítási módjait, valamint a készülék felépítését számos szakirodalmi cikk, könyvfejezet részletezi (például [166]), jelen dolgozatban a terjedelmi korlátok miatt nincs mód ezekre kitérni.

Kezdetben a királis anyagok elválasztását elsősorban HPLC és GC módszerekkel végezték. Ezeknek az elválasztástechnikai módszereknek az optimalizálása nehézkes, a királis állófázisok pedig meglehetősen drágák. Ezzel szemben a királis anyagok kapilláris zóna elektroforézissel (CZE) történő elválasztásánál csupán királis szelektort kell (alacsony koncentrációban) a pufferhez adagolni, mely sokkal egyszerűbb, hatékonyabb és jóval olcsóbb, a módszer optimalizálás pedig sokkal könnyebben, változatosabban és flexibilisebben kivitelezhető többek között a szelektorok minőségének és koncentrációjának változtatásával. Ezeknek az előnyöknek köszönhetően a CE a királis elválasztás dinamikusan fejlődő ágává vált.

A királis állófázist használó kromatográfiás technikákkal szemben a CE-ben a királis felismerés molekuláris szinten és nem az állófázis makroszkópikus szintjén történik. A királis vegyületek enantiomerjeinek töltéssűrűsége megegyezik, így azok elektroforetikusán nem elválaszthatók. Hasonlóan a kromatográfiás megoldásokhoz, itt is szükség van egy királis szelektorra, mellyel kölcsönhatva az enantiomerek sztereoszelektív felismerése következtében (tulajdonképpen kromatográfiás elválasztási elv alapján) történhet meg az enantiomerek elválasztása. Az oldott állapotú királis szelektort pszeudo-állófázisnak is nevezik, mivel az enantiomerek vándorlási sebessége szabad formában és ideiglenesen képződött asszociátumként eltérő (7. ábra). A módszerfejlesztés során tehát a molekuláris szinten történő enantioszelektív felismerést az enantiomerek tényleges mozgékonyágkülönbségévé kell alakítani a királis elválasztás megvalósításához [170].



7. ábra: A vizsgált pozitív töltéssel rendelkező molekula (A) eltérő vándorlási sebessége ideiglenesen képződött CD-analit asszociátumként és szabad formában

A szabad enantiomerek mozgékonyasága megegyezik ($\mu_1 = \mu_2 = \mu_{szabad}$), mivel méretük és töltéssűrűségük is azonos. A sikeres elválasztásuk érdekében az enantiomerek mozgékonyaság különbsége szükséges, ezt az alábbi egyenlettel modellezhetjük 1:1 komplexképzési sztöchiometria esetén [171].

$$\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1 = \frac{\mu_{szabad} + \mu_{kplx2} K_{stab2} [CD]}{1 + K_{stab2} [CD]} - \frac{\mu_{szabad} + \mu_{kplx1} K_{stab1} [CD]}{1 + K_{stab1} [CD]} \quad (1)$$

ahol μ_1 és μ_2 az egyes enantiomerek effektív mozgékonyaságai; K_{stab1} és K_{stab2} a szelektor-enantiomer komplexek komplexstabilitási állandói (M^{-1}); μ_{szabad} és μ_{kplx} a szabad és a szelektorhoz kötött enantiomerek effektív mozgékonyaságai; $[CD]$ a pufferben oldott királis szelektor koncentrációja (M). Az (1) egyenlet alapján az elektroforetikus és a kromatográfias enantiomer elválasztás további különbségei magyarázhatóak, ugyanis a mobilitáskülönbség szerepe kromatográfias elválasztásoknál nem jelenik meg. Az enantiomerek elválasztása az elektroforetikus technikák esetén is leggyakrabban azok királis szelektorhoz történő eltérő kötődési affinitásán alapul ($K_{stab1} \neq K_{stab2}$). CE-ben azonban a komplexek stabilitásbeli különbségén túl az enantiomerek és a szelektor között ideiglenesen képződő diasztereomer asszociátumok határmobilitásának különbsége ($\mu_{kplx1} \neq \mu_{kplx2}$) is okozhat enantiomer elválasztást [172], még akár akkor is, ha a komplexstabilitási állandók megegyeznek ($K_{stab1} = K_{stab2}$). Az első egyenletből következik továbbá az is, hogy a hagyományos kromatográfias technikákkal szemben, ahol a királis szelektor legtöbbször az állófázishoz kötött, a királis CE óriási előnye az elvben korlátlanul növelhető szelektivitás (a látszólagos szelektivitás felülmúlhatja a termodinamikai szelektivitást) [173], illetve hogy elérhető az enantiomerek migrációs sorrendjének (enantiomer migration order, EMO) megváltoztatása a szelektor és az analitok közötti

affinitás megfordítása nélkül is [170]. Az ideális migrációs sorrend beállítása kulcsfontosságú lehet a királis analitikában, különösen, ha nyomnyi mennyiségű királis szennyező esetén történik az enantiomertisztasági vizsgálat, vagy ha a fő komponens zavarja az elválasztást túlterhelés vagy a csúcsok heading/tailing deformációja által. Tailing (uszályosodás) esetén a 0,1% királis szennyező komponens megfelelő, biztonságos meghatározása általában csak akkor lehetséges, ha a minor csúcs migrál előbb (heading esetén pedig pont fordítva) [174]. Az enantiomerek migrációs sorrendjének megfordulása a királis szelektor kémiai vagy szerkezeti módosulása által előidézhető legdrámaibb változás. A szelektor akár legkisebb szerkezeti vagy kémiai módosítása is nagy hatással lehet a királis felismerésre és a migrációs sorrendet megfordíthatja a CD-n lévő szubsztituens típusa, helyzete, a CD üregmérete, valamint a szubsztitúciós fok is [175, 176]. Üregméret-függő sorrend változás esetén a szelektor és az enantiomerek között kialakuló kölcsönhatások azonosak, azonban a kölcsönható csoportok közötti távolság CD-ről CD-re változhat. [176-180]. A gyűrű szubsztituálása is hatással lehet az üregméretre (metil CD származékok esetén) és a szelektor és az analit között kialakuló intermolekuláris kölcsönhatások természetére (töltéssel rendelkező ciklodextrinek esetén ionos kölcsönhatás is létrejöhet), mely ugyancsak az enantiomer-sorrend megváltozásához vezethet [176, 179, 181-186]. Tanaka azt tapasztalta, hogy nem csak a szubsztituens típusa, hanem annak elhelyezkedése is hatással lehet az enantiomerek migrációs sorrendjére [187, 188], ezt acetil és szulfát szubsztituensek esetén Chankvetadze is bizonyította [189, 190]. Ezen túl a szelektor koncentráció változtatásával [191, 192], a pH eltolásával (az analit vagy a szelektor ionizáltságának megváltozásával) [186, 191-193], más mechanizmusú királis szelektorok alkalmazásával [193], az EOF megszüntetésével vagy irányának megváltoztatásával [193] illetve akirális micellaképzők [194] alkalmazásával is elérhető a sorrend megfordítása. A vándorlási sorrend megváltoztatására a királis CE adja a legsokoldalúbb és legkönnyebben elérhető megoldási lehetőségeket [195]. Semleges, illetve ionizálható CD-k alkalmazásával úgy tudunk változtatni az enantiomer sorrenden, ahogy azt a felhasználás megkívánja. Ezt az általunk végzett kísérletek is jól bizonyítják, számos esetben tapasztaltunk különböző mechanizmusú migrációs sorrendváltozást a vizsgált optikailag aktív vegyületek királis kapilláris elektroforetikus vizsgálata esetén.

Az (1) egyenlet egyszerűsíthető további következtetések levonása érdekében. Abban az esetben, ha a komplexek különböző határmobilitásában megmutatkozó, hidratált molekulaméret szerinti szelektivitás ($\mu_{kplx1} / \mu_{kplx2}$) elhanyagolható, a diasztereomer komplexek mozgékonyágát megegyezőnek feltételezve ($\mu_{kplx1} = \mu_{kplx2} = \mu_{kplx}$) a következő egyenlethez jutunk [196]:

$$\Delta\mu = \frac{[CD](\mu_{szabad} - \mu_{kplx})(K_{stab1} - K_{stab2})}{1 + [CD](K_{stab1} + K_{stab2}) + K_{stab1}K_{stab2}[CD]^2} \quad (2)$$

Ahhoz tehát, hogy királis elválasztás történjen, két feltételnek kell teljesülnie:

1. legalább az egyik enantiomer esetén a szabad enantiomer és a komplexált enantiomer mozgékonyága ne legyen azonos ($\mu_{szabad} \neq \mu_{kplx}$)
2. a két enantiomer eltérő kötődési affinitással rendelkezzen, vagyis komplexképzési állandójuk különbözzön ($K_{stab1} \neq K_{stab2}$)

Ekkor teljesül ugyanis az elválasztás során, hogy az enantiomer-CD komplexek mozgékonyágai eltérnek egymástól ($\mu_{kplx1} \neq \mu_{kplx2}$).

A Wren-féle mozgékonyágkülönbség elmélet leírja, hogy egy enantiomer pár maximális elválasztásához szükséges királis szelektor koncentrációja az egyes enantiomer-CD komplexek stabilitási állandójának nagyságától függ. Az elméleti optimális szelektor koncentráció, mellyel az adott körülmények között a legteljesebb elválasztás érhető el, az alábbi egyenlettel számítható [196]:

$$c_{opt} = \frac{1}{\sqrt{K_{stab1} \cdot K_{stab2}}} \quad (3)$$

A királis CE módszerfejlesztésekor számos paramétert szükséges optimalizálni (királis szelektor típusa és koncentrációja, a háttéreltrotit pH-ja, összetevői (pufferalkotó típusa, koncentrációja, ellenion típusa, szerves módosító típusa és koncentrációja, egyéb segédanyagok), az alkalmazott feszültség és kapilláris-hőmérséklet. Az ideális szelektor (és annak optimális koncentrációja) kulcsfontosságú az elválasztás szempontjából.

A leggyakrabban alkalmazott királis szelektorok a ciklodextrinek: alacsony árúak valamint származékaik igen széles választéka miatt. A ciklodextrin származékokat alapvetően kétféleképpen csoportosíthatjuk: a szubsztituensek száma és azok ionizálhatósága alapján. Az előbbi esetben monofunkciós (szubsztitúciós fok = 1) vagy többfunkciós (ezen belül a szubsztituensek elhelyezkedése szerint random vagy izomertiszta) származékokról, míg az

utóbbi esetben semleges vagy ionizálható (ionos) származékokról beszélünk. A véletlenszerűen szubsztituált ciklodextrinek keverékek, sem a módosítás helyzete, sem a szubsztituensek száma nem állandó, csak egy átlagos szubsztitúciós fokkal jellemezhetjük őket. Előállításuk egyszerűbb, így jobban hozzáférhetőek és olcsóbbak, viszont a képződött komplexek csúcsa gyakran torzult és az aktuális gyártási tételtől függő összetétel miatt a reprodukálhatóság kérdéses lehet. A 4. táblázat a CD származékokat csoportosítja ionizálhatóságuk, illetve az általuk kapilláris elektroforézissel elválasztható enantiomerek alapján.

4. táblázat: A CD származékok csoportosítása töltésük, illetve az általuk CE-ben elválasztható enantiomerek alapján

CD töltése	elválasztható enantiomer	CD származékok
Semleges	Ionos	natív α -, β -, γ -CD, metil-, hidroxipropil-CD
Negatív	ionos és semleges	karboxi-alkil-, szulfatált-, szulfoalkil-CD
Pozitív	ionos és semleges	amino-, alkilamino-CD

A CD-alapú királis CE esetén ritkán alkalmaznak natív CD-eket (legtöbbször csak viszonyítási alapként szolgálnak), inkább azok az olcsó, nagyobb szelektivitást biztosító semleges származékait használják: munkánk során többek között számos metilszármazékkal történtek vizsgálatok (permetil- β -CD, permetil- γ -CD, random metil- γ -CD). A metilezés növeli a CD-k vízdékonyságát, valamint szélesítheti enantioszelektivitási spektrumot. A semleges CD származékok másik csoportját a hidroxialkil származékok alkotják, közülük a (2-hidroxi)propilezett származékokat (hidroxipropil- β -CD, hidroxipropil- γ -CD) alkalmazzák legszélesebb körben [197-199]. A HP-CD-k esetén a szubsztituens is tartalmaz királis szénatomot, ami lehetőséget adhat a szelektivitás növelésére, illetve a szelektivitási spektrum szélesítésére. A semleges szelektorok azonban csak az ionos vegyületek elválasztására alkalmasak, mivel CE esetén legalább az egyik kölcsönható molekulának töltéssel kell rendelkeznie ahhoz, hogy a szabad és a komplexált formában lévő enantiomerek mobilitása eltérjen. Abban az esetben, ha az enantiomerek és a ciklodextrin is semlegesek, vándorlási sebességük megegyezik az EOF sebességével, vagyis nem tapasztalható elválasztás, hiába jön létre sztereoselektív komplexképzés. Ez a magyarázata annak, hogy pusztán semleges szelektorokkal semleges

enantiomerek nem választhatók el CE-ben. A semleges enantiomerek elválasztásához nélkülözhetetlen, de gyakran az ionos sztereoizomerek elválasztásakor is előnyös lehet a töltéssel rendelkező ciklodextrinek alkalmazása. A (2) egyenletből következik az is, hogy a szabad és komplexált forma közötti mozgékonyosság különbség a kölcsönhatás erősségétől függ, a nagyobb mozgékonyosság különbség pedig az enantiomerek egyre jobb elválasztását eredményezi. Amennyiben ellentétes töltésű a szelektor és az elválasztandó anyag, ionos kölcsönhatás is erősítheti az interakciót. Ilyen esetben újabb előnye a módszernek, hogy a komplexképzőt kisebb koncentrációban is elegendő alkalmazni [172, 173, 200, 201]. A leggyakrabban használt, rendkívül nagy elválasztó képességű ionos szelektorok a szulfoszubsztituált CD-k. A permanens negatív töltésű csoport kapcsolódhat közvetlenül (szulfát: szulfatált- α -CD, szulfatált- β -CD, szulfatált- γ -CD) [202-206], vagy különböző hosszúságú alkiláncon keresztül (szulfonát: szulfopropil- α -CD, szulfopropil- β -CD, szulfopropil- γ -CD, szulfohidroxipropil- β -CD, szulfohidroxipropil- γ -CD, szulfobutil-éter- α -CD, szulfobutil-éter- β -CD, szulfobutil-éter- γ -CD) [173, 203, 204] a CD-hez. Az ionizálható szelektorok közé tartozó karboxil- vagy foszfátcsoporttal (foszfátalt- β -CD) szubsztituált CD származékok is igen elterjedtek. A karboxil-csoporttal rendelkező származékok közül a karboximetilezett CD-k (főként a karboximetil- β -CD [203, 207-210]) nyertek szélesebb körű alkalmazást, de gyakoriak a karboxietil (karboxietil- α -CD, karboxietil- β -CD) [210, 211] és szukcinil (szukcinil- β -CD) [212] származékok is. A karboxil származékok alacsony pH tartományban (pH~2) semlegesek, ezért pH-tól függően több típusú királis felismerés is megvalósítható segítségükkel. A semleges vagy savas karakterű vegyületek elválasztására jól alkalmazható pozitív töltésű CD-k között aminos- vagy aminosalkil csoportot tartalmazó CD-ket találunk (6-monodezoxi-6-monoamino- β -CD, 6-monodezoxi-6-mono(3-hidroxi)propilamino- β -CD, 6-monodezoxi-6-mono(2-hidroxi)propil-amino- β -CD) [213-217].

Nemcsak a királis szelektor típusa, hanem annak megfelelő koncentrációban történő alkalmazása is elengedhetetlen a kívánt elválasztáshoz. Az ideális CD kiválasztását és annak optimális koncentrációjának becslését segíti a $\Delta\mu$ szimuláció, a két enantiomer mobilitás-különbségének ábrázolása a szelektor-koncentráció függvényében. Az (1) egyenlet alapján számított görbék az átlagos komplexstabilitási állandó nagyságrendje is befolyásolja, az optimális CD koncentrációnál szélsőértéket ad a két enantiomer

mozgékonyaságkülönbsége [196]. Azok a királis szelektorok, melyek nagyobb $\Delta\mu$ különbséget mutatnak az enantiomerek nagyobb mértékű elválasztására lesznek képesek, legnagyobb elválasztás a görbék maximumához tartozó koncentráció mellett érhető el. A szimuláció egyben az enantiomerek migrációs sorrendjének változására is felhívja a figyelmet [196].

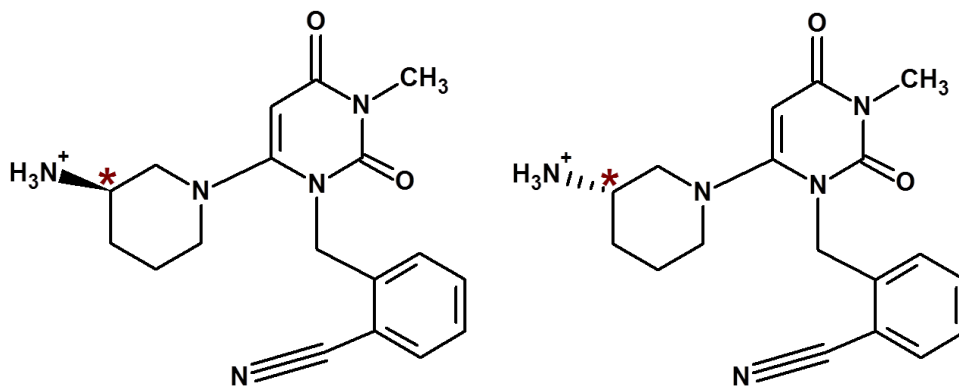
A királis CE hagyományos módjának nevezzük azt az eljárást, amikor mind a kapillárist, mind a bemeneti (inlet) és a kimeneti (outlet) pufferedényeket a királis szelektort tartalmazó pufferral töltjük meg és az elválasztandó sztereoizomerek a látszólagos mozgékonyaságuk hatására vándorolnak a kapilláris bemeneti végétől a kimeneti felé, elhaladva a detektor előtt [170]. A méréseinknél alkalmazott hagyományos technikán túl számos megoldással találkozhatunk a királis CE terén. A hordozó mód (carrier mode) semleges vegyületek kezelt kapillárisokban történő elválasztására alkalmazható, melynél az enantiomerek elválasztásán túl azok szállításáért is a szelektor felelős. További lehetőséget biztosíthat például a Hjertén által bevezetett részlegesen töltött kapilláris technika (partial filling) [218], valamint ennek továbbfejlesztett, az analittal ellentétes töltésű szelektort alkalmazó változata, az ellenáramú mód (counter-current) [173], mellyel megoldható a kapilláris elektroforézis MS kapcsolása [219] vagy akár drága, egzotikus szelektorok alkalmazása is. A nyomást szakaszosan [220, 221], illetve folyamatosan [222] alkalmazó áramlás ellenegyensúlyozott technika (flow counterbalanced) akár mikropreparatív célokra is alkalmas lehet. A királis CE egy speciális esete azon alapul, hogy a királis szelektorok jól kombinálhatóak [223-228] és így az egyes szelektorok elválasztó képessége szinergikusan felerősíthető. A két királis szelektort alkalmazó, duál rendszereket alkalmazzák leggyakrabban, melyek általában egy (a szelektivitásért felelős) semleges és egy (a szelektivitást és mozgékonyaságot egyszerre biztosító) ionos szelektorból állnak. Természetesen minél több paramétert kell optimalizálni, annál bonyolultabb a módszerfejlesztés. Méréseink során általában egyetlen CD-t tartalmazó (hagyományos) módszerek fejlesztése történt, csupán egy esetben (tapentadol) alkalmaztunk duál rendszert a sztereoizomerek elválasztására.

1.2.5. A vizsgált optikailag aktív vegyületek

Alogliptin

A 2-es típusú cukorbetegség egy progresszív inzulin rezisztenciával és a hasnyálmirigy β -sejtjeinek kimerülésével járó krónikus betegség. A kezelés célja a vér glükóz szintjének csökkentése és megfelelő szinten tartása a mikro- és makrovaszkuláris kockázatok elkerülése érdekében. A glukagon-szerű peptid-1 (GLP-1) és a glükóz-függő inzulinotróp polipeptid (GIP) a glükóz homeosztázisban szerepet játszó inkretin hormonok [229, 230], melyeket a dipeptidil-peptidáz-4 enzim (DPP-4) igen gyorsan lebont, így terápiás alkalmazhatóságuk limitált. A DPP-4 enzimet gátló vegyületek megakadályozzák a GLP-1 lebomlását, így a 2-es típusú diabétesz terápiájában hatékonyan alkalmazhatóak.

Az alogliptin (2-[(6-[(3*R*)-3-aminopiperidin-1-il]-3-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2*H*)-il]metil)benzonnitril, *R*-alogliptin benzoát, Nesina[®], Vipidia[®], 8. ábra) egy orálisan alkalmazható, nem-peptidomimetikus kinazonon-alapú kompetitív, reverzibilis, szelektív DPP-4 inhibitor vegyület [231], melyet a 2-es típusú diabétesz kezelésére vezettek be Japánban (2010) [232], az USA-ban és az EU-ban (2013). Az alogliptin monokomponensű készítményként, illetve alfa-glükozidáz inhibitorokkal vagy tiazolidindionokkal kombinációban van forgalomban [233]. Mivel a molekula egy sztereogén centrumot tartalmaz, két enantiomerje létezik, az *R*-izomer (eutomer) mellett az *S*-alogliptin potenciális optikai szennyező, így ennek ellenőrzése szükséges.



8. ábra: Az *R*-alogliptin (eutomer) és az *S*-alogliptin (disztomer, lehetséges királis szennyező) szerkezeti képlete

A DPP-4 inhibitor családból a szitagliptin enantiomerek elválasztására kidolgozott módszer található meg az irodalomban: eddig egy királis RP-HPLC [234] és egy –a kutatócsoportunk által kidolgozott- ciklodextrin-alapú CE módszer [235].

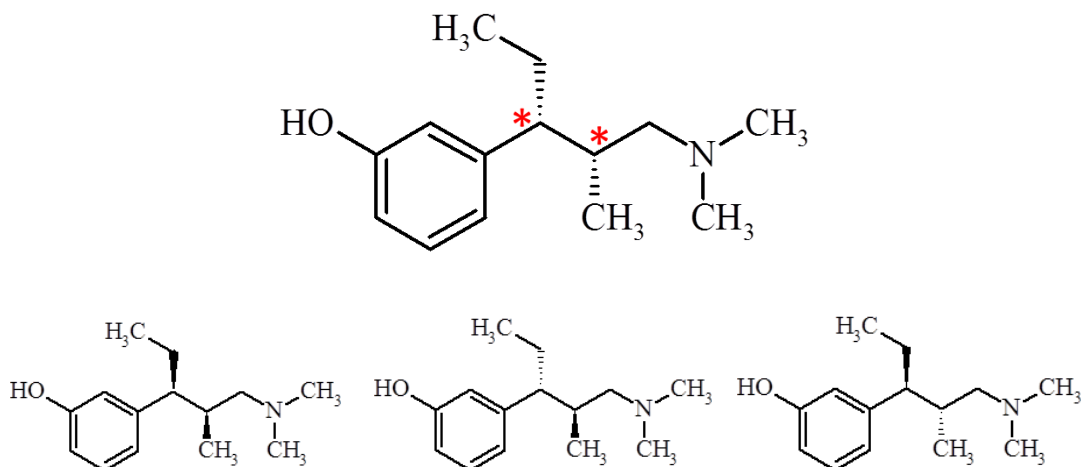
Az alogliptin analitikai vizsgálata korai szakaszban van, eddig csak néhány nem királis RP-HPLC módszert dolgoztak ki az alogliptin szubsztanciára és gyógyszerkészítményekben történő meghatározására [236-238]. Az alogliptin enantiomerek elválasztására előttünk nem írtak le királis módszert, így célunk volt egy ciklodextrin-alapú CE módszer fejlesztése és validálása, mellyel megoldható az alogliptin enantiomerek elválasztása. Módszerünk publikálása után jelent meg egy királis folyadékkromatográfiás módszer [239], mely az általunk fejlesztett eljárás alternatív, kiegészítő megoldása lehet a későbbiekben az alogliptin királis analitikájára.

Tapentadol

A tapentadol (3-[(1*R*,2*R*)-3-(dimetilamino)-1-etil-2-metil-propil]-fenol hidroklorid, *R,R*-tapentadol, Nucynta[®], 9. ábra) az egyik legújabb és ígéretes hatóanyag a neuropátiás fájdalom kezelésében [240]. A hatásmechanizmusát tekintve a központi idegrendszeren keresztüli fájdalomcsillapító hatásának alapja kettős: a μ opioid receptoron agonista hatású és noradrenalin visszavételt gátolja [241]. A tapentadol előnye, hogy kisebb abúzus potenciállal rendelkezik, és hatásos lehet mind neuropátiás, mind nociceptív fájdalmak esetén. A morfinhoz és a morfin analógokhoz hasonlóan 3-(3-hidroxifenil)propilamino szerkezeti elemmel rendelkezik. A tapentadol molekula azonban két kiralitáscentrummal rendelkezik, ennek megfelelően négy sztereoizomerje létezik. Az izomerek közül csak az *R,R* enantiomer van forgalomban [241-243].

A tapentadol tiszta hatóanyagként és gyógyszerformulációkban [243-248], biológiai mintákban [249-251] történő meghatározására HPLC, HPLC-MS/MS és UHPLC-MS/MS módszereket írtak eddig le. A tapentadol sztereoizomerek királis elválasztására egy cellulóz-alapú királis állófázist alkalmazó normál fázisú folyadékkromatográfiás módszer található az irodalomban [252].

Mivel nem található alternatív királis módszer a tapentadol sztereoizomerek elválasztására, célunk volt egy ciklodextrin-alapú királis CE módszer fejlesztése, mellyel a minor királis szennyezők meghatározása is lehetséges.



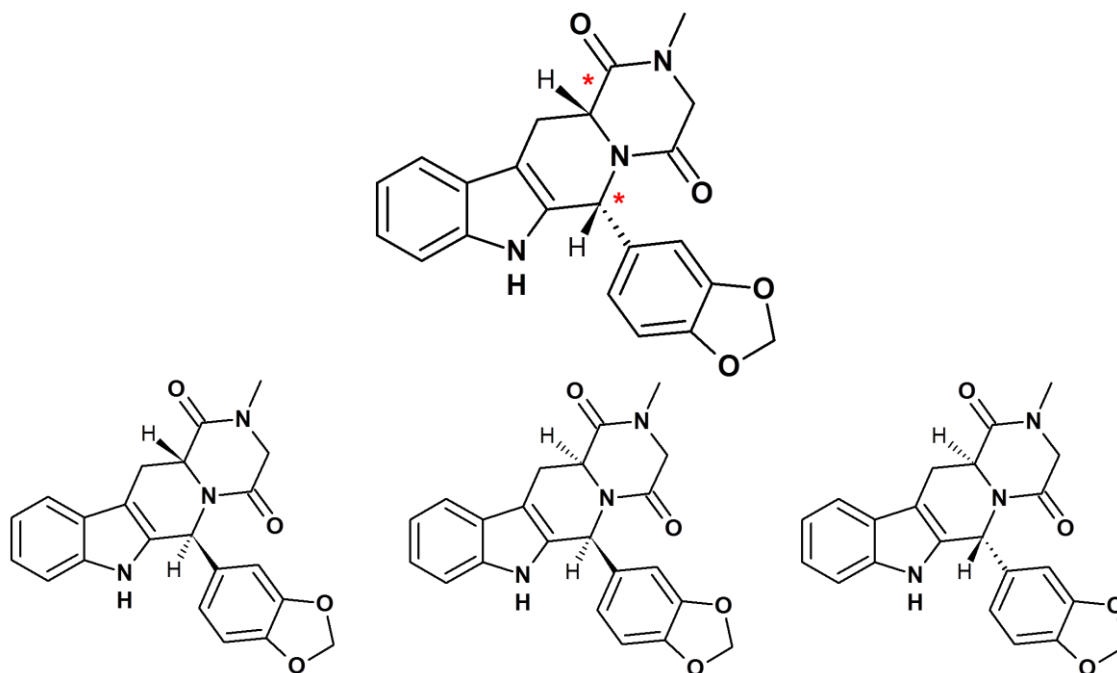
9. ábra: Az eutomer *R,R*-tapentadol, valamint az opcionális királis szennyező *S,S*-, *R,S*-és *S,R*-tapentadol szerkezeti képletei

Tadalafil

A tadalafil ((6*R*,12*aR*)-6-(1,3-benzodioxol-5-il)-2,3,6,7,12,12*a*-hexahidro-2-metil-pirazino[1',2':1,6]pirido[3,4-*b*]indol-1,4-dion, *R,R*-tadalafil, Cialis[®], 10. ábra) egy cGMP specifikus foszfodiészteráz-5 enzim (PDE-5) inhibitor, mely jelentős PDE-5/PDE-1 és PDE-5/PDE-6 szelektivitással rendelkezik. A hatóanyag egyedülálló előnye a többi PDE-5 inhibitorral (szildenafilfil, vardenafil) szemben a hosszú felezési idő. A tadalafilt az erektilis diszfunkció, a pulmonáris arteriális hipertenzió és a jóindulatú prosztata hiperplázia kezelésére alkalmazzák különböző dózisokban. Az erektilis diszfunkciót, illetve a PDE-5 inhibitor vegyületeket részletesen a 1.1. fejezet tárgyalja. A molekula két királis centrummal rendelkezik (C6 és C12*a*), ennek megfelelően négy sztereoizomerje létezik: *R,R*-, *S,S*-, *S,R*- és *R,S*-tadalafil (10. ábra).

A négy sztereoizomer sztereokémiáját rezgési cirkuláris dikroizmus (VCD), elektronikus cirkuláris dikroizmus (ECD) spektroszkópia, valamint optikai rotációs diszperzió segítségével határozták meg [253]. A négy sztereoizomer inhibitor potenciálját összehasonlítva az *R,R* izomer volt a legpotensebb PDE-5 inhibitor, míg az *S,S* enantiomer inaktívnak bizonyult; az *R,S* és a *S,R* köztes inhibitorpotenciállal rendelkezett [43]. A farmakológiai különbségek mellett az *S,S*, *R,S* és *S,R* izomerek biztonságosságáról nincsenek adatok, így alkalmazásuk akár egészségkárosodáshoz is vezethet. Mivel a tadalafil egyre népszerűbb és egyre szélesebb körben alkalmazzák az erektilis diszfunkció

kezelésére, az illegális Cialis [40], valamint a tadalafillel és analógjaival hamisított étrend-kiegészítők száma is egyre nő. Például az *R,R*-tadalafil és a *R,S*-tadalafil (3:1) diasztereomer elegyét találták illegális gyógyszerekben [40]. Ennek megfelelően megbízható és gyors mérést biztosító módszerre van szükség, mellyel megoldható a tadalafil sztereoizomer szennyezés vizsgálata mind a gyártás (minőség ellenőrzés), mind a gyógyszerkészítmények hatóságok általi vizsgálata során.



10. ábra: Az *R,R*-, *S,S*-, *S,R*- és *R,S*-tadalafil szerkezeti képlete

Egy CE módszert írtak le eddig az *R,R*-tadalafil tiszta hatóanyagként történő meghatározására [254]. A tadalafil hatóanyagként és gyógyszerformulációkban [255-262], illetve biológiai mintákban [90, 91, 263-267] történő meghatározására számos HPLC-UV, HPLC-MS módszer található az irodalomban. Leírtak már több gyógyszerkészítményben, illetve gyanús étrend-kiegészítőben más hatóanyagok mellett történő tadalafil-meghatározásokat is [2, 9-11, 40, 69, 72, 93-96, 268-272]. A tadalafil királis analitikáját tekintve az *R,R*- és az *S,S*-tadalafil enantiomerek HPLC elválasztása megvalósított [273, 274]. A négy tadalafil sztereoizomer elválasztására kidolgozott módszer azonban nem található az irodalomban. Célunk volt egy királis CE módszer fejlesztése, mellyel a tadalafil négy sztereoizomerje elválasztható.

Két kiralitáscentrumot tartalmazó vegyületek négy sztereoizomerének elválasztását már megvalósították, pl. fenkamfamin esetén [275]. Eddig azonban négy izomer elválasztására csak ionizálható (töltéssel rendelkező) molekulák esetén találunk példát. Tadalafil esetén a négy semleges izomer elválasztása volt a célunk, mely komoly kihívást jelent CE esetén, ahol az elválasztás a töltés/méret hányados eltérése alapján történik. Mivel a tadalafil nem rendelkezik a 2-12 pH tartományban ionizációra képes savas vagy bázikus funkciócsoporttal, a négy semleges izomer elválasztásához töltéssel rendelkező ciklodextrinekre, mint hordozómolekulákra volt szükség, hogy a szükséges mobilitás különbség létrejöhessen a migráció során [173, 276-279].

Semleges sztereoizomerek elválasztására alkalmazható további technikát jelenthet a töltéssel rendelkező királis micellaképzőt vagy akirális micellaképzőt és töltéssel rendelkező CD-t (vagy más ionos szelektort) egyaránt alkalmazó micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC), viszont ezek bonyolultabb és drágább módszerek [163].

2. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki egyrészt egy egyszerű, gyors, MS kompatibilis HPLC-UV módszer kidolgozását, mellyel a PDE-5 enzimet gátló szildenafilfil, vardenafil, tadalafil, illetve ezek 11 gyakrabban előforduló (az 1. ábrán bemutatott) dizájner analógjai azonosíthatóak és mennyiségük meghatározható egyetlen külső (szildenafilfil) standard segítségével. Célunk volt a kidolgozott módszer validálása és gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata is különböző, könnyen beszerezhető, szexuális diszfunkció kezelésére alkalmazott étrend-kiegészítőkben és gyógynövény alapú készítményekben.

Célul tűztük ki továbbá az alogliptin enantiomerjeinek, illetve a tapentadol és a tadalafil sztereoizomerjeinek elválasztására könnyen alkalmazható, ciklodextrin-alapú kapilláris elektroforetikus módszerek kidolgozását. Mivel a vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságai mind az elektroforetikus viselkedésüket, mind a ciklodextrinokkal szembeni affinitásukat döntően befolyásolják, így célunk volt a vegyületek sav-bázis tulajdonságainak jellemzése is (alogliptin és tapentadol esetén). A módszerfejlesztés következő lépéseként az alogliptin, a tapentadol és a tadalafil izomerek ciklodextrinokkal történő elválaszthatóságát, zárványkomplex-képzési tulajdonságait, CD-komplexeik stabilitását, valamint a sztereoizomerek migrációs sorrendjét terveztük vizsgálni kapilláris elektroforézissel, majd az eredmények alapján célunk volt a legmegfelelőbb CD-alapú rendszerek kiválasztása, a módszeroptimalizálás. Célul tűztük ki továbbá, hogy a kidolgozott módszerek közül az alogliptin enantiomerek és a tapentadol sztereoizomerek elválasztását az Nemzetközi Harmonizációs Konferencia (International Conference on Harmonisation, ICH) irányelveinek megfelelően validáljuk.

3. Módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

3.1.1. Standardok

A HPLC méréseknél alkalmazott szildenafil-citrát, tadalafil és vardenafil-hidroklorid-trihidrát referencia standardok rendre az Intas Pharmaceuticals Ltd. (Ahmedabad, India), az Eli Lilly and Co. (Indianapolis, IN, USA) és a Bayer AG (Leverkusen, Németország) termékei voltak. A homoszildenafil (HS), hidroxi-homoszildenafil (HHS), tioszildenafil (TS), tiohomoszildenafil (THS), *N*-dezetilvardenafil (NDV), pszeudovardenafil (PV) és acetildenafil (ACE)) hitelesített referencia standardokat a Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Kanada), míg hidroxi-tiohomoszildenafil (HTHS), dimetilszildenafil (DMS), hidroxivardenafil (HV) és tiodimetilszildenafil (TDS) standardokat a TLC PharmaChem. Inc. (Vaughan, ON, Kanada) gyártóktól szereztük be.

A tiltott gyógynövény alapú étrend-kiegészítő mintákat a Nemzeti Adó- és Vámhivatal foglalta le és küldte vizsgálatra az Országos Gyógyszerészeti Intézet (jelenleg OGYÉI) laboratóriumába.

A királis CE méréseknél használt *R*-alogliptint Wei Zhou és Wen Hui Hu szintetizálta (Kínai Tudományos Akadémia, Guangzhou, Kína) az irodalomban leírt eljárás szerint [231]. Az *S*-alogliptint *S*-3-aminopiperidin helyett *R*-3-aminopiperidint felhasználva azonos szintetikus lépéseket követve állították elő.

A tapentadol standardokat (*R,R*-, *R,S*-, *S,R*-, *S,S*-tapentadol) a Zentiva Group, a.s. (Prága, Csehország) bocsátotta rendelkezésünkre.

Az *R,R*-tadalafil a Sigma Aldrich terméke volt. A 6-epi-tadalafilt [280] és a 12-epi-tadalafilt ismert eljárások szerint Márványos Ede és Volk Balázs (Egis Gyógyszergyár Zrt.) szintetizálta [281]. A 6*S*,12*aS* disztomert az irodalomban leírt szintézisút csekély módosításával állították elő [43].

3.1.2. Reagensek

A HPLC mérésekhez alkalmazott acetonitril (ACN), metanol (MeOH) (mindkettő gradiens tisztaságú) és analitikai tisztaságú ammónium-acetát a Merck KGaA (Darmstadt, Németország), míg a jégecet a Sigma Aldrich GmbH (Seelze, Németország) termékei voltak.

A CE mérések során a pufferoldatok készítésekor alkalmazott analitikai tisztaságú nátrium-acetát, ecetsav, HCl, NaOH, LiOH, Tris, H₃PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, bórsav és 2-(*N*-morfolino)etánszulfonsav (MES), valamint a szerves módosítóként alkalmazott metanol és acetonitril a Merck KGaA (Darmstadt, Németország) és a Sigma Aldrich GmbH. (Seelze, Németország) gyártóktól származtak, további tisztítás nélkül alkalmaztuk őket.

Az NMR mérések során alkalmazott D₂O (99,9% D atom) és metanol (99,8% D atom) a Merck KGaA (Darmstadt, Németország) terméke volt.

A mérések során felhasznált vizet Millipore Elix3 (Billerica, MA, USA) víztisztító rendszerrel állítottuk elő, fajlagos ellenállása 18 MΩ cm volt 25°C-on.

3.1.3. Ciklodextrinek

A natív ciklodextrinek (α -, β - és γ -CD) és a különböző szubsztitúciós fokú CD származékok: a töltéssel nem rendelkező permetil- β -CD (TRIME- β -CD), permetil- γ -CD (TRIME- γ -CD), random metil- γ -CD DS~12 (RAME- γ -CD), hidroxietil- β -CD DS~3 (HE- β -CD), hidroxipropil- β -CD DS~3 (HP- β -CD) hidroxipropil- γ -CD DS~3,2 (HP- γ -CD), a negatív töltéssel rendelkező karboximetil- α -CD DS~3,5 (CM- α -CD), karboximetil- β -CD DS~3 (CM- β -CD), karboximetil- γ -CD DS~3 (CM- γ -CD), karboxietil- α -CD DS~3 (CE- α -CD), karboxietil- β -CD DS~3 (CE- β -CD), szukcinil- β -CD DS~6 (Succ- β -CD), foszfátált- β -CD DS~4 (Phos- β -CD), szulfátált- α -CD DS~9 (S- α -CD), szulfátált- β -CD DS~11 (S- β -CD), szulfátált- γ -CD DS~11,5 (S- γ -CD), szulfopropil- α -CD DS~2 (SP- α -CD), szulfopropil- β -CD DS~2 és DS~4 (SP- β -CD), szulfopropil - γ -CD DS~2 (SP- γ -CD), szulfohidroxipropil- β -CD DS~2,5 (SHP- β -CD), szulfohidroxipropil- γ -CD DS~3 (SHP- γ -CD), szulfobutil-éter- α -CD DS~4 (SBE- α -CD), szulfobutil-éter- β -CD DS~4, DS~6,3 és DS~10,4 (SBE- β -CD) szulfobutil-éter- γ -CD DS~4 (SBE- γ -CD), a pozitív töltéssel rendelkező 6-monodezoxi-6-monoamino- β -CD DS~1 (MA- β -CD), 6-monodezoxi-6-mono(3-hidroxi)propilamino- β -CD DS~1 (PA- β -CD) és 6-monodezoxi-6-mono(2-hidroxi)propilamino- β -CD DS~1 (IPA- β -CD) a Cyclolab Kft. (Budapest, Magyarország) termékei/preparátumai voltak.

3.2 Standardok és mintaoldatok készítése

3.2.1 Standardok és mintaoldatok PDE-5 inhibitorok HPLC méréséhez

Törzsoldat és standard mintaoldat

A törzsoldat készítését a vizsgált anyagok pontos bemérését követően a B-eluensben (MeOH:ACN 1:1) történő oldással végeztük 1 mg/ml koncentrációban. A validálás során alkalmazott mintaoldatok a törzsoldat B-eluenssel történő megfelelő hígításával készültek.

Külső standard oldat 1 és 2 (kb. 20 µg/ml SIL)

Külső standard törzsoldat: 14,2 mg szildenafil-citrát referenciaanyagot a B-eluenssel 20,0 ml-re oldottunk (0,5 mg/ml SIL). A validálás során végzett stabilitásvizsgálat alapján a törzsoldat 7 napig hűtőszekrényben eltartható volt. A törzsoldat 1,0 ml-ét a B-eluenssel 25,0 ml-re hígítottuk (20 µg/ml SIL külső standard oldat). A külső standard oldatot 2 független bemérésből, 2 párhuzamosban készítettük (külső standard oldat 1 és 2).

Rendszeralkalmassági oldat (kb. 20 µg/ml SIL + kb. 20 µg/ml VAR)

Kb. 12 mg vardenafil-hidroklorid-trihidrát referenciaanyagot a B-eluenssel 20 ml-re oldottunk. Az oldat 1 ml-éhez a külső standard törzsoldat 1 ml-ét mértük, majd az elegyet a B-eluenssel 25 ml-re hígítottuk.

Vizsgálati oldat

A vizsgálati minta előkészítése az alábbi eljárás szerint történt: az adott vizsgálat céljának megfelelően egy adagolási egységet (pl. 1 db elporított tableta, 1 db kapszula töltete stb.) vagy az egyesített, homogenizált adagolási egységek keverékéből 1 adagolási egységnek megfelelő tömegű mintát 50 ml B-eluenssel 30 percig rázógépen 300 fordulat/perc sebességgel rázattunk, majd 5 percig ultrahang fürdőn kezeltünk. A folyadék kb. 5 ml-es részletét 10 percig 4000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk. A tiszta felülúszó 1,0 ml-ét a B-eluenssel 25,0 ml-re hígítottuk. (Amennyiben a vizsgálati oldatban esetlegesen kimutatható hatóanyag becsült koncentrációja kiesik az 1–100 µg/ml linearitási tartományból (lásd módszervalidálás), a vizsgálati oldat töménységét a hígítás megfelelő módosításával állíthatjuk be.)

3.2.2 Standardok és mintaoldatok CE mérésekhez

A standard törzsoldatokat alogliptin (és az előkísérletek során tapentadol) esetében a két enantiomerre, míg tapentadol és tadalafil esetében a négy sztereoizomerre külön-külön készítettük. A 0,5 mg/ml vizes alogliptin és tapentadol törzsoldatok EOF markerként 0,001% (v/v) dimetil-szulfoxidot (DMSO) is tartalmaztak. A tadalafil rossz vízdékonysága miatt 1 mg/ml metanolos törzsoldatot készítettünk. A standard oldatok a sztereoizomerek törzsoldatainak elegyítésével és megfelelő hígításával készültek: ez alogliptin esetén ötszörös vizes (0,1 mg/ml az egyes enantiomerekre), tapentadol esetén 20-szoros pufferes (0,025 mg/ml), tadalafil esetében pedig hatszoros vizes hígítással (0,167 mg/ml) történt. Az enantiomerek (sztereoizomerek) migrációs sorrendjének meghatározása céljából az 1:1 arányú racém oldathoz adtuk az ismert konfigurációjú enantiomert vagy már a standard oldatot a törzsoldatok eltérő arányú elegyítésével állítottuk elő.

3.3. Készülékek, elválasztási/mérési körülmények

A HPLC mérések és a validálás diódasoros detektorral felszerelt (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) Agilent 1200 HPLC rendszeren történt. Az eredmények kiértékeléséhez Chemstation szoftvert használtunk.

Kinetex C18 100 Å 2,6 µm×100 mm×4,6 mm fordított fázisú kolonnát (Phenomenex, Torrance, CA, USA) alkalmaztunk a mérések során. Az oszloptermostát hőmérsékletét 25°C-ra állítottuk be. Mozgófazisként A: 200 mM ammónium-acetát oldatot és B: MeOH és ACN 1:1 arányú keverékét használtuk. Az optimalizált rendszer gradiens programját az 5. táblázat mutatja be.

5. táblázat: A gradiens elúciós program

Idő (perc)	B%
0–9	40 → 50
9–17	50 → 80
17–20	80
20–20,5	80 → 40
20,5–25	40

A mobil fázis lineáris áramlási sebessége 0,5 ml/perc volt, az automata mintaadagoló hőmérséklete 20°C, az injektálás térfogata pedig 5 µl volt. A detektálás hullámhosszát 290 nm-re állítottuk az 4.1.1. fejezetben leírt megfontolások alapján.

A CE méréseket diódasoros detektorral felszerelt ^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) és Agilent 7100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) kapilláris elektroforézis készülékekkel végeztük el. Az eredmények kiértékeléséhez Chemstation szoftvert használtunk. A kezeletlen szilika kapillárisokat az Agilent-től szereztük be. Az alogliptin és a tadalafil esetében minden mérés, míg tapentadol esetén az előkísérletek a 2 enantiomerre és a komplexstabilitási állandók meghatározása 50 µm belső átmérőjű, 48,5 cm teljes, 40 cm effektív hosszúságú kapillárison történtek. Ettől eltérő kapillárisokat a tapentadol módszeroptimalizálásnál és validálásnál (33,5/25 cm) alkalmaztunk. Az új kapillárisok kondicionálása 1 M NaOH-os öblítéssel (30 perc) történt, melyet 0,1 M NaOH-os (30 perc) és vizes (30 perc) mosás követett. A nap elején és a nap végén a kapilláris kondicionálás 1 M NaOH-dal (5 perc), 0,1 M NaOH-dal (15 perc) és vízzel (10 perc) történt. Minden mérés előtt a kapillárist az elválasztandó enantiomerekre kidolgozott módszernek megfelelően prekondicionáltuk: az alogliptin esetében 0,1 M NaOH (5 perc), víz (10 perc) és háttéreltrolit (background electrolyte, BGE) (10 perc); tapentadol esetében víz (1,5 perc), 0,1 M NaOH (1 perc), víz (1 perc) és BGE (2 perc); tadalafil esetében pedig 0,1 M NaOH (3 perc), víz (3 perc) és BGE (5 perc) szerint. A kapilláris hőmérsékletét 15°C és 35°C között változtattuk: az előkísérletek 25°C-on történtek, míg az optimális hőmérséklet alogliptin esetén 16°C, tapentadol esetén 15°C, tadalafil esetén 25°C-nak adódott. Az előkísérletek során 25 kV feszültséget alkalmaztunk (ennek optimalizálása a ±10-30 kV tartományban történt). Az UV detektálás mindegyik vizsgált molekula esetén 200 nm-en történt. A mérések során az áramerősséget és a feszültséget monitoroztuk. A mintát hidrodinamikusan injektáltuk (alogliptin: 30 mbar 4 s; tapentadol mérések két enantiomerre: 30 mbar·4 s, négy sztereoizomerre 25 mbar·5 s; tadalafil 20 mbar·3 s).

A királis kapilláris elektroforetikus mérések során alkalmazott puffereket a 6. táblázat foglalja össze. A táblázatban felsorolt alap háttéreltrolitokhoz különböző koncentrációban ciklodextrineket adtunk (0,1-80 mM koncentráció tartományban).

6. táblázat: A királis CE mérések során alkalmazott pufferek

Alap pufferalkotó és koncentrációja (mM)		pH beállítása	pH	Vizsgált vegyület
30	nátrium acetát	1 M sósav	4,75	alogliptin
30	Tris	cc. foszforsav	7,00	
30 és 6	MES	1 M Tris	5,85	
40	foszforsav	1 M Tris	2,50	
15	NaOH	cc. foszforsav	2,50	
50	Tris	jégecet	4,75	tapentadol
50	bórsav	1 M NaOH	9,00; 9,50	
25, 50; 75; 100; 200; 300	bórsav	1 M NaOH	9,50	
50	bórsav	1 M NaOH	7,00; 7,50; 8,00; 8,50; 9,00; 9,50; 10,00; 10,50	
50	foszforsav	1 M NaOH	2,50	
25 és 75	Tris	jégecet	4,75	tadalafil
50	Tris	jégecet	4,75; 6,50; 7,50; 8,50; 9,50	
50	nátrium-acetát	1 M sósav	4,75	
50	nátrium-acetát	jégecet	4,75	
30	Na ₂ HPO ₄	jégecet	4,75	
30	NaH ₂ PO ₄	jégecet	6,15	
50	bórsav	1 M NaOH	9,60	
50	foszforsav	1 M NaOH	3,00	

A CE-pH titrálás alogliptin esetén 30 mM Tris-HCl - 1 M NaOH-alapú pufferekkel történt pH 6 és 11 között, a pontos pH értéket kalibrált üvegelektrod segítségével határoztuk meg. Három párhuzamos mérést végeztünk. A mérés 25°C-on történt 25 kV feszültséget alkalmazva.

A könnyen és gyorsan kivitelezhető, kis mintamennyiséget igénylő CE-pH titrálás reprodukálhatósága gyengébb, mint a potenciometriás méréseké, így az alogliptin esetén mért protonálódási makroállandót ($\log K$) potenciometriával erősítettük meg. Tapentadol esetén a protonálódási makroállandók meghatározása ugyancsak pH potenciometriával történt Ag/AgCl és pH-üvegelektroddal (kombinált üvegelektroddal) felszerelt GLpKa készülék (Sirius, Forest Row, UK) segítségével. Elektrodkalibrációra a „Four-parameter” technikát alkalmaztuk (Four PlusTM method) [282]. A titrálásokat konstans ionerősség ($I = 0,15$ M KCl) és hőmérséklet ($T = 25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) mellett, nitrogén atmoszférában

végeztük. 10 mL ~1 mM vizes alogliptin, illetve tapentadol hidroklorid oldatot előzetesen 0,5 M HCl-dal pH 2,0-ra savanyítottuk, majd 0,5 M KOH-dal titráltuk pH 12,2-ig. Három párhuzamos mérést végeztünk. A $\log K$ értékeket RefinementProTM szoftver (Sirius, Forest Row, UK) segítségével számítottuk.

A protonálódási makroállandókat tapentadol esetén egy másik módszerrel, ¹H NMR-pH titrálással is meghatároztuk 298 K-en inverz detektálású gradiens mérőfejjel felszerelt 600 MHz-es Varian DDR NMR spektrométer segítségével. H₂O:D₂O=9:1 térfogatarányú elegyét használtuk oldószerként, melynek ionerősségét KCl-dal 0,15 M-ra állítottuk. 1 mM-os tapentadol oldatot készítettünk, melyhez kémiai eltolódás-referenciaként ($\delta = 0,000$ ppm) a 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav nátriumsóját (DSS) adtuk (0,2 mM). HCl és KOH segítségével 22 oldat készült az 5-12 pH tartományban (0,3 pH egységenként). A víznyomás *dpf_{gse}* pulzusszekvenciával történt [283]. A pH mérések 5 ml-es edényekben történtek megfelelő kevertetés mellett, mielőtt a 600 μ L oldatot 5 mm belső átmérőjű NMR csőbe pipettáztuk. A pH mérésekhez Metrohm 6.0234.110 kombinált üvegelektóddal felszerelt Metrohm pH mérőt alkalmaztunk. A kémiai eltolódás-pH adatsorok kiértékelése az OPIUM számítógépes programmal történt [284].

A tapentadol protonálódási mikroállandóinak meghatározása UV-spektrofotometriásan történt [285]. Az UV-spektrofotometria alkalmas a fenolát bázicitásának ($\log k^0$) meghatározására, mivel a tapentadol UV-spektrumát a fenolát csoport protonálódása szelektíven befolyásolja. Az automata UV-pH titrálás D-PAS modullal kiegészített GLpKa készülék (Sirius, Forest Row, UK) segítségével történt. 15 mL 0,3 mM tapentadol hidroklorid vizes oldatát titráltuk 0,5 M KOH-val szűk pH tartományban (pH 7-12,2) hogy elkerüljük a jelentős hígulást. Három párhuzamos mérést végeztünk konstans ionerősség ($I = 0,15$ M KCl) és hőmérséklet ($T = 25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) mellett, nitrogén atmoszférában. A 265–320 nm tartományban felvett abszorbancia értékeket használtuk a kiértékelés során.

A tapentadolra vonatkozó *n*-oktanol/víz megoszlási hányados ($\log P$) meghatározása kétfázisú potenciometriás titrálással történt [286] GLpKa készülék (Sirius, Forest Row, UK) segítségével. 6 ml 1 mM-os vizes tapentadol oldat három részletét titráltuk azonos körülmények között különböző mennyiségű vízzel telített *n*-oktanol tartalom mellett. A vizes-oktanolos fázis arányát ($V_{\text{aq}}/V_{\text{oct}}$) a 6:0.1 - 6:0.2 tartományban változtattuk. A kétfázisú potenciometriás titrálásból látszólagos protonálódási makroállandókat határoztunk

meg, melyekből a $\log P$ értékét a RefinementProTM szoftver (Sirius, Forest Row, UK) segítségével számítottuk.

Tadalafil esetén a ¹H NMR spektrumokat 298 K-en 600 MH-es Varian DDR NMR spektrométeren regisztráltuk. A tadalafil törzsoldatok (1 mg/ml CD₃OD) a négy tadalafil sztereoizomerből külön-külön, valamint racém (*R,R*- és *S,S*-) tadalafilból készültek. A törzsoldatokból valamint a törzsoldatok 5:95 v/v arányú D₂O hígítással készült keverékéből kontroll ¹H spektrumot vettünk fel. Hasonló D₂O tartalmú keverékeket készítettünk, melyek 10-15 mM CD-t is tartalmaztak, ahol a gazdamolekula (egyres esetekben jelentősen) szolubilizálta a vendég molekulát. A racém minta ¹H multiplettjeinek ciklodextrin hatására bekövetkező jelkettőződése esetén az NMR mintához a megfelelő enantiomer törzsoldatának hozzáadásával történt a jelhozzárendelés. A kémiai eltolódások referálása a D₂O-CD₃OD 95:5 v/v% elegy CHD₂OD ¹H jelére (3,35 ppm) történt.

3.4. Számítások

3.4.1. Előkísérletek: Sav-bázis tulajdonságok jellemzése

Alogliptin esetében a protonálódási állandó meghatározására CE-pH titrálást végeztük a 6,0-11,0 pH tartományban. A mérés során regisztrált migrációs időkből az effektív mobilitást az alábbi képlet alapján számoltuk:

$$\mu_{eff} = \frac{l_t l_d}{U} * \left(\frac{1}{t} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (4)$$

ahol l_t a kapilláris teljes hossza, l_d a kapilláris hossza a detektorig, U az alkalmazott feszültség, t és t_{EOF} az alogliptin migrációs ideje és az EOF marker csúcsának megjelenési ideje [287]. Az effektív mobilitás értékeket a pH függvényében ábrázolva titrálási görbét kapunk. Adott pH-n megfigyelhető aktuális elektroforetikus mobilitás a különböző protonáltsági izomerek egyedi mobilitásának móltörttel súlyozott összegével egyezik meg (protonálatlan ($\mu_{Alo} = 0$) és protonált (μ_{AloH^+}) forma). A μ_{eff} - pH adatsorokat kiértékelve megkapjuk a vizsgált vegyület $\log K$ értékét [288]:

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_{Alo} + \mu_{AloH^+} \cdot 10^{\log K - pH}}{1 + 10^{\log K - pH}} \quad (5)$$

Tapentadol esetén a protonálódási makroállandók mellett a csoportspecifikus mikroállandókat is meghatároztuk, $\log k^O$ értékét az alábbi két egyenlet segítségével számítottuk:

$$\alpha_{OH(pH)} = \frac{A_{(O^-)} - A_{(pH)}}{A_{(O^-)} - A_{(OH)}} \quad (6)$$

$$k^O = \frac{\alpha_{OH(pH)}(1 + K_1[H^+] + K_1K_2[H^+]^2) - K_1K_2[H^+]^2}{[H^+]} \quad (7)$$

ahol $A_{(O^-)}$ és $A_{(OH)}$ bázikus (a fenolát csoport teljesen deprotonált) és semleges (a fenolát csoport protonált) körülmények között mért abszorbanciák. Az $A_{(pH)}$ a részlegesen protonált fenolát csoport esetén mért abszorbancia, míg $\alpha_{OH(pH)}$ a fenolátcsoporton protonált részecske móltörtje. A $\log k^O$ értéket felhasználva a többi mikroállandó a következő két egyenlet alapján számítható:

$$K_1 = k^O + k^N \quad (8)$$

$$K_1K_2 = k^Ok^N = k^Nk^O \quad (9)$$

A tautomer arányt (k_z), mely az ikerionos és a töltésmentes forma arányát adja meg, a következő képlet alapján számítottuk:

$$k_z = \frac{k^N}{k^O} = \frac{k^N}{k^O} \quad (10)$$

A fenolát csoport és a bázikus nitrogén közötti kölcsönhatási tényezőt az alábbi egyenlettel számítottuk tapentadol esetén:

$$\Delta \log k_{O-N} = \log k^O - \log k^N = \log k^N - \log k^O \quad (11)$$

3.4.2. Felbontás

Két csúcs elválasztását a felbontási értékkel (R_S) tudjuk jellemezni, az alapvonal elválasztáshoz $R_S > 1,5$ érték szükséges azonos nagyságú csúcsok esetén. Abban az esetben, ha a csúcsok aszimmetrikusak ennél hatékonyabb elválasztásra lehet szükség ($R_S > 2,0$). Az enantiomerek elválasztása esetén a felbontást az alábbi képlet alapján határoztuk meg:

$$R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1} \quad (12)$$

ahol t_1 és t_2 az enantiomerek migrációs idői, w_1 és w_2 az enantiomerek csúcsának extrapolált szélessége az alapvonalon.

Az enantiomerek sikeres elválasztása érdekében az enantiomerek mozgékonyágkülönbsége szükséges (lásd (1) egyenlet) [171]. A $\Delta\mu$ különbséget az (1) egyenlet alapján modelleztük a CD koncentráció függvényében több alogliptin-CD és tadalafil-CD rendszerre az elválasztáshoz szükséges optimális CD koncentráció előrejelzése érdekében.

3.4.3. A látszólagos komplexstabilitási állandó meghatározása

A komplexstabilitási állandók meghatározásának az alapja a komplexképzés hatására történő migrációs idő (pontosabban a (4) egyenlet szerint számított effektív mobilitás) változása, melyet a komplexképző egyre növekvő koncentrációját tartalmazó háttéreléktrólit mellett mérünk. Az analit és a CD szelektor közötti komplexképzésre 1:1 sztöchiometriát feltételezve valamint az egyensúlyi CD koncentrációt és az összes CD koncentrációt azonosnak tekintve a mintakomponens effektív mozgékonyágának a ciklodextrin koncentrációtól való függését a (13) egyenlet mutatja be. A ciklodextrin-analit látszólagos komplexstabilitási állandókat a mért μ_{eff} - $[CD]$ adatsorok alábbi egyenlet szerinti, Microcal Origin (OriginLabs) segítségével történő illesztésével határoztuk meg:

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_{szabad} + \mu_{kplx} K_{stab} [CD]}{1 + K_{stab} [CD]} \quad (13)$$

ahol μ_{szabad} az analit mobilitása ciklodextrin nélkül és az illesztett paraméterek a μ_{kplx} és a K , vagyis a komplex elektroforetikus mobilitása és a látszólagos komplexstabilitási állandó [289, 290]. Királis elválasztás esetén μ_{eff1} , μ_{eff2} , μ_{kplx1} , μ_{kplx2} , K_{stab1} és K_{stab2} paramétereket kapunk külön-külön az elsőként és a másodikként (harmadikként, negyedikként) migráló sztereoizomerre.

3.5. Validálás

3.5.1. HPLC módszer validálása

A módszer validálása az ICH analitikai módszerek validálására vonatkozó irányelveinek alapján történt [291] a specificitás, szelektivitás, precizitás, linearitás, kimutatási határ (limit of detection, LOD), meghatározhatósági határ (limit of quantitation, LOQ), torzítatlanság, robusztusság és stabilitás szempontjából.

Specificitás, szelektivitás (specificity, selectivity)

A specificitást/szelektivitást több módszerrel is vizsgáltuk, melyek alapja a vak illetve a mátrix kromatogramjának összehasonlítása a mind a 14 vegyületet tartalmazó minta kromatogramjával. A kromatogramokon zavaró (interferáló) csúcsokat kerestünk, illetve a vizsgált vegyületek kromatográfiai csúcsainak megfelelő elválását vizsgáltuk.

A szelektivitási kritériumok az alábbiakban foglalhatók össze:

- a) A B-eluentt injektálva (vak minta) kromatogramján nem jelenhet meg a komponensek esetleges detektálását zavaró, idegen csúcs.
- b) Az összes referenciaanyagot tartalmazó keveréket injektálva a komponenseknek egyértelműen el kell különülniük egymástól (lehetőleg alapvonalon való elválás).
- c) 3 különböző, előzetesen vizsgált, a mérendő komponensektől mentes étrendkiegészítő kapszulából a módszerben rögzített mintaelőkészítési eljárással kivonatot készítettünk. Egyik minta kromatogramján sem jelenhet meg a komponensek esetleges detektálását zavaró, idegen csúcs.

Precizitás, ismételhetőség (precision, repeatability)

A 14 vizsgált PDE-5 inhibitor retenciós idejének és csúcs alatti területének relatív szórását (RSD%) vizsgáltuk. A koncentráció értékeket konstans értéken tartva a mérési tartományt felölelő 3-3 szinten (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) 6 párhuzamos mérést végeztünk.

Megjegyzés: a SIL-ra kapott RSD értékeket használtuk a rendszeralkalmassági vizsgálat RSD-követelményeinek megadásához.

Linearitás (linearity), mérési tartomány (range)

A linearitást mind a 14 komponensre az 1 µg/ml - 100 µg/ml koncentráció tartományban vizsgáltuk. A kalibrációs egyenest 7 koncentrációpontban vettük fel. Három párhuzamost injektáltunk minden koncentrációban. A regressziós egyenest a legkisebb négyzetek módszere szerint számítottuk. Az adatokra illesztett egyenes regressziós koefficiens követelménye minden egyes komponensre: $R^2 \geq 0,999$.

Megjegyzés: a regressziós egyeneseknek a SIL regressziós egyeneséhez viszonyított relatív meredekségeit használtuk a korrekciós faktorok kiszámításához.

Kimutatási határ (LOD), meghatározhatósági határ (LOQ)

Minden egyes hatóanyagra meghatároztuk a kimutatási határt és a meghatározhatósági határt. A megfelelő referenciaanyagokból olyan töménységű oldatot készítettünk, amelyeket injektálva a kapott kromatogramon a csúcs magassága nagyságrendileg a zaj 10-szerese körüli értéket ad. A kapott adatokból a jel/zaj (S/N) = 10 megközelítés alapján kiszámoltuk a meghatározási határt, majd a kimutatási határt (S/N = 3).

Torzítatlanság (accuracy)

a) A torzítatlanság meghatározása érdekében a visszanyerhetőséget vizsgáltuk mind a 14 vizsgált vegyületre a mérési tartomány alsó, középső és felső határához közeli három koncentráció szinten (2,5 µg/ml, 25 µg/ml, 75 µg/ml). 20 µg/ml SIL-t használtunk külső standardként. Minden koncentrációban három párhuzamos mérést végeztünk és az átlagos visszanyerhetőségi százalékot határoztuk meg mind a 14 komponensre. A visszanyerhetőség számításához a linearitás vizsgálat során meghatározott korrekciós faktorokat, a SIL külső standard koncentrációját és a vizsgált vegyület csúcsterületét használtuk fel. Követelmény: a várható értékhez képest 90–110%.

b) A mátrixhatások vizsgálatára számos növényi mátrix esetén vizsgáltuk a TAD és a VAR visszanyerhetőségét: növényi mátrixokhoz TAD és VAR standardok ismert mennyiségeit adtuk. A szelektivitás vizsgálat c) pontja szerint készített kivonatokhoz ismert mennyiségű referenciaanyagot mértünk a VAR és a TAD referenciaanyagokból, és a visszanyerést az a) ponthoz hasonló módon vizsgáltuk. A követelmény (figyelembe véve a standardokból készült referenciaoldatokra megadott követelményt): 85–115%.

Robusztusság (robustness)

A robusztusság tesztelése során bizonyítani kell, hogy a kidolgozott módszer a paraméterek kis mértékű, szándékosan előidézett változtatása esetén továbbra is alkalmas a PDE-5 inhibitor vegyületek elválasztására. A szildenafilre vonatkoztatott relatív retenciók és a relatív csúcsterületek, mint válaszfaktorok robusztusságát vizsgáltuk. Három változót (a B-eluens metanol:acetonitril aránya, az A-eluens ammónium-acetát tartalma, és az oszlop hőmérséklete) vizsgáltunk az optimális értékhez képest egy magasabb és egy alacsonyabb szinten. A 7. táblázat a teljes faktoros kísérleti tervet mutatja be, ahol a 2 szinten vizsgált paraméterek:

- ACN/MeOH arány a B-eluensben: 95:105 v/v (-); 105:95 (+);
- Ammónium-acetát koncentrációja az A-eluensben: 190 mM (-); 210 mM (+);
- Oszloptermosztát beállított hőmérséklete: 23°C (-); 27°C (+).

7. táblázat: A robusztusság vizsgálat kísérleti terve

Kísérlet sorszáma	ACN/MeOH	Ammónium-acetát	Hőmérséklet
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	-	-
5	-	+	+
6	-	+	-
7	-	-	+
8	-	-	-

A kísérlet eredményei alapján értékeltük az egyes faktorok hatását a válaszfaktorokra és az azonosított kritikus faktorokra felhívtuk a figyelmet a módszer leírásában.

Stabilitás (stability)

A stabilitás vizsgálata érdekében a törzsoldatokat 7 napig hűtőszekrényben (2–8°C) tároltuk. Az oldatok tisztaságát vizuálisan ellenőriztük illetve a hűtőszekrényben tárolt oldatok kromatogramját a frissen készített törzsoldatokéval hasonlítottuk össze. Hasonló

eljárással vizsgáltuk a 24 óráig szobahőmérsékleten tartott mintaoldatot, ami a 14 vizsgált vegyületet 10 µg/ml koncentrációban tartalmazta.

3.5.2. CE módszerek validálása

Az alogliptin enantiomerek elválasztására kidolgozott kapilláris elektroforetikus módszert is az ICH irányelvek [291] alapján validáltuk: a precizitás, kimutathatósági határ, meghatározhatósági határ, a linearitás és a robusztusság szempontjából.

Precizitás (precision)

Az ismételhetőséget az *R* és *S* enantiomer migrációs idejének, korrigált csúcsterületének (csúcsterület/migrációs idő) és a két enantiomer közötti felbontás relatív standard deviációi alapján vizsgáltuk. A koncentráció értéket konstans értéken tartva három koncentráció szinten (10, 50 és 200 µg/ml az egyes enantiomerekre) 8 párhuzamos mérést végeztünk.

A napok közötti ismételhetőséget (intermediate precision) 8 párhuzamos mérést végezve 3 koncentráció szinten (10, 50, 200 µg/ml) határoztuk meg 3 egymást követő napon. Ugyancsak a migrációs idő, a korrigált csúcs alatti terület és a felbontás RSD%-át vizsgáltuk.

Kimutatási határ (LOD), meghatározhatósági határ (LOQ)

Az alogliptinre vonatkozó kimutatási határt az a mintaoldat koncentráció adta, ahol a jel az alapvonal zaj háromszorosának, míg a meghatározhatósági határ esetén tízszeresének adódott.

Linearitás (linearity), mérési tartomány (range)

A kalibrációs egyenest 11 koncentrációpontban vettük fel a 6 - 250 µg/ml koncentráció tartományban az egyes enantiomerekre. Három párhuzamost injektáltunk minden koncentrációban. A regressziós egyenest a legkisebb négyzetek módszere szerint számítottuk.

A minor enantiomer szennyező meghatározhatóságának jellemzésére a linearitást alacsony minor enantiomer koncentráció esetén is vizsgáltuk nagy feleslegben jelen levő főkomponens mellett. 0,8 mg/ml *R*-alogliptin mellett az *S* enantiomerre vonatkozó

kalibrációs egyenest 11 pontban vettük fel az 5 - 100 $\mu\text{g/ml}$ (0,6 – 12,5% *S*-alogliptinnek megfelelő) tartományban.

Robusztusság (robustness)

A módszer robusztusságának vizsgálatára a Plackett-Burman kísérleti tervet használtuk, hogy a mérések számát minimalizáljuk [292, 293]. Az enantiomerek migrációs ideje, csúcsterülete és az enantiomerek közötti felbontás voltak a vizsgált paraméterek. Hat változó: a CD koncentráció, puffer koncentráció, pH, kapilláris hőmérséklet, feszültség és injektálási nyomás hatását vizsgáltuk az optimális értékhez képes magasabb (+10%) és alacsonyabb (-10%) szinten. A részletes kísérlettervet az alábbi táblázat mutatja be.

8. táblázat: A robusztusság vizsgálat kísérleti terve

Kísérlet sorszáma	[CD] (mM)	[BGE] (mM)	pH	T	U (kV)	P_{inj}
1	5,2	23	4,65	17	17	21
2	5,2	27	4,65	15	19	19
3	5,2	27	4,85	15	17	21
4	4,8	27	4,85	17	17	19
5	5,2	23	4,85	17	19	19
6	4,8	27	4,65	17	19	21
7	4,8	23	4,85	15	19	21
8	4,8	23	4,65	15	17	19

A tapentadol sztereoizomerek elválasztására kidolgozott módszer részleges validálása a precizitás, kimutathatósági határ, meghatározhatósági határ, a linearitás és a torzítatlanság szempontjából történt.

Precizitás, ismételhetőség (precision, repeatability)

Az egy napon belüli (intraday precision, $n = 5$) és napok közti (intermediate precision, $n = 10$) ismételhetőséget $50 \mu\text{g/ml}$ oldatban (minden izomerre) az *S,S-*, *S,R-*, *R,S-*, *R,R-* tapentadol migrációs idejének és korrigált csúcsterületének relatív szórásán keresztül vizsgáltuk.

Kimutatási határ (LOD), meghatározhatósági határ (LOQ)

Mind a négy izomerre a kimutatási határt (jel/zaj = 3) és meghatározhatósági határt vizsgáltuk (jel/zaj = 10).

Linearitás (linearity), mérési tartomány (range)

A regressziós egyenest a $1 - 50 \mu\text{g/ml}$ koncentráció tartományban (6 koncentráció szinten, 5 párhuzamos méréssel) a legkisebb négyzetek módszere szerint számítottuk. Minden koncentráció szinten három párhuzamost injektáltunk.

Torzítatlanság (accuracy)

A visszanyerhetőséget három koncentráció szinten vizsgáltuk (az egyes enantiomerekre $1,0 \mu\text{g/ml}$, $2,5 \mu\text{g/ml}$ és $10 \mu\text{g/ml}$ standard elegy esetén). Három párhuzamos mérést végeztünk.

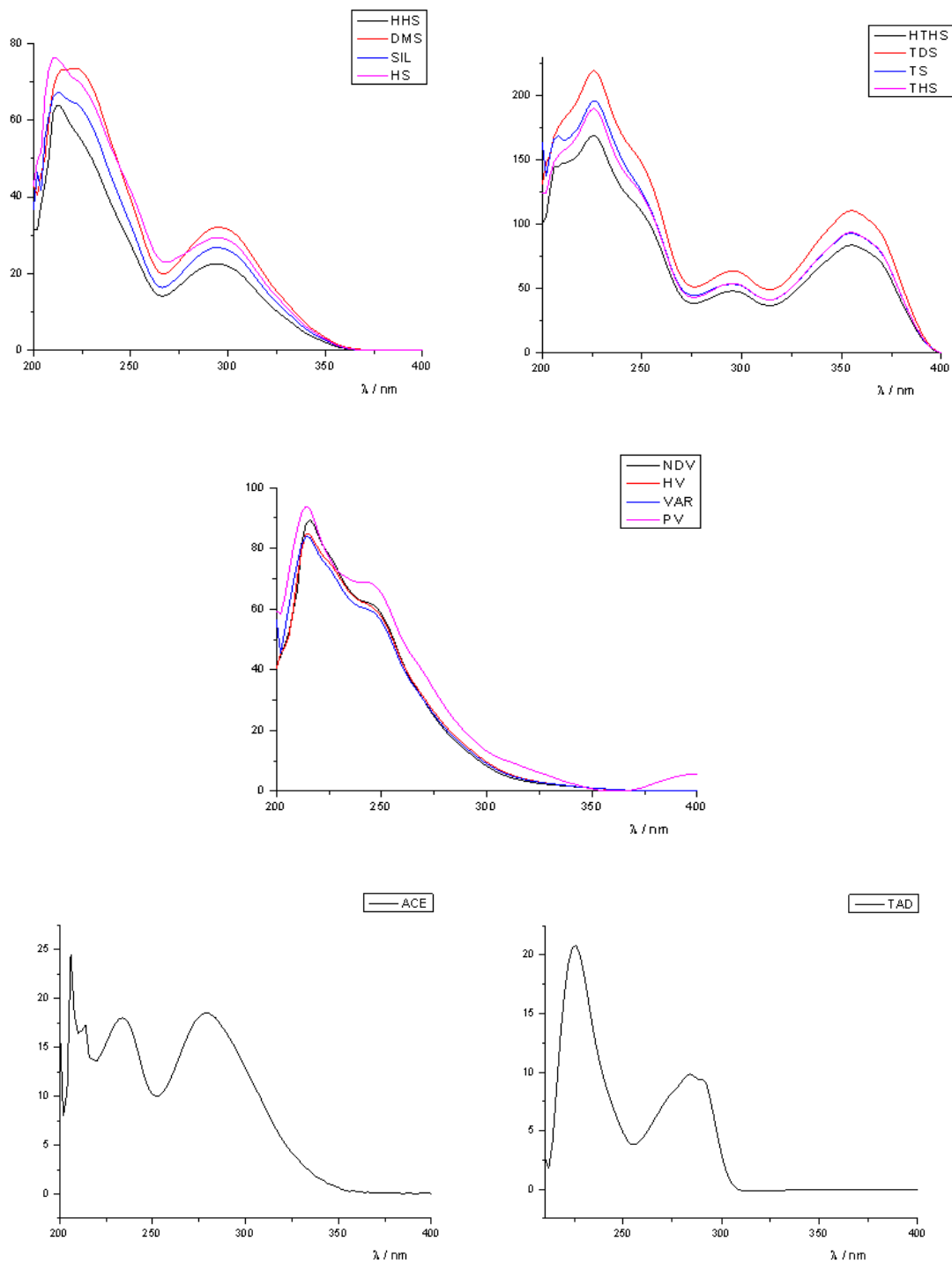
4. Eredmények

4.1. Rokon szerkezetű PDE-5 gátló potencianövelő vegyületek folyadékkromatográfias elválasztása

4.1.1. Módszerfejlesztés

A módszerfejlesztés első lépéseként a vegyületek különféle készítményekből történő extrakcióját vizsgáltuk. A tapasztalataink szerint a legtöbb komponens - a tadalafilt kivéve - metanolban oldódik. A TAD-t viszont az acetonitril jól oldja. Metanol:acetonitril különböző arányú elegyeit vizsgáltuk, és végül az 1:1 v/v arányú elegyünk bizonyult megfelelőnek, így a későbbiekben ezt az elegyet használtuk a minták oldására.

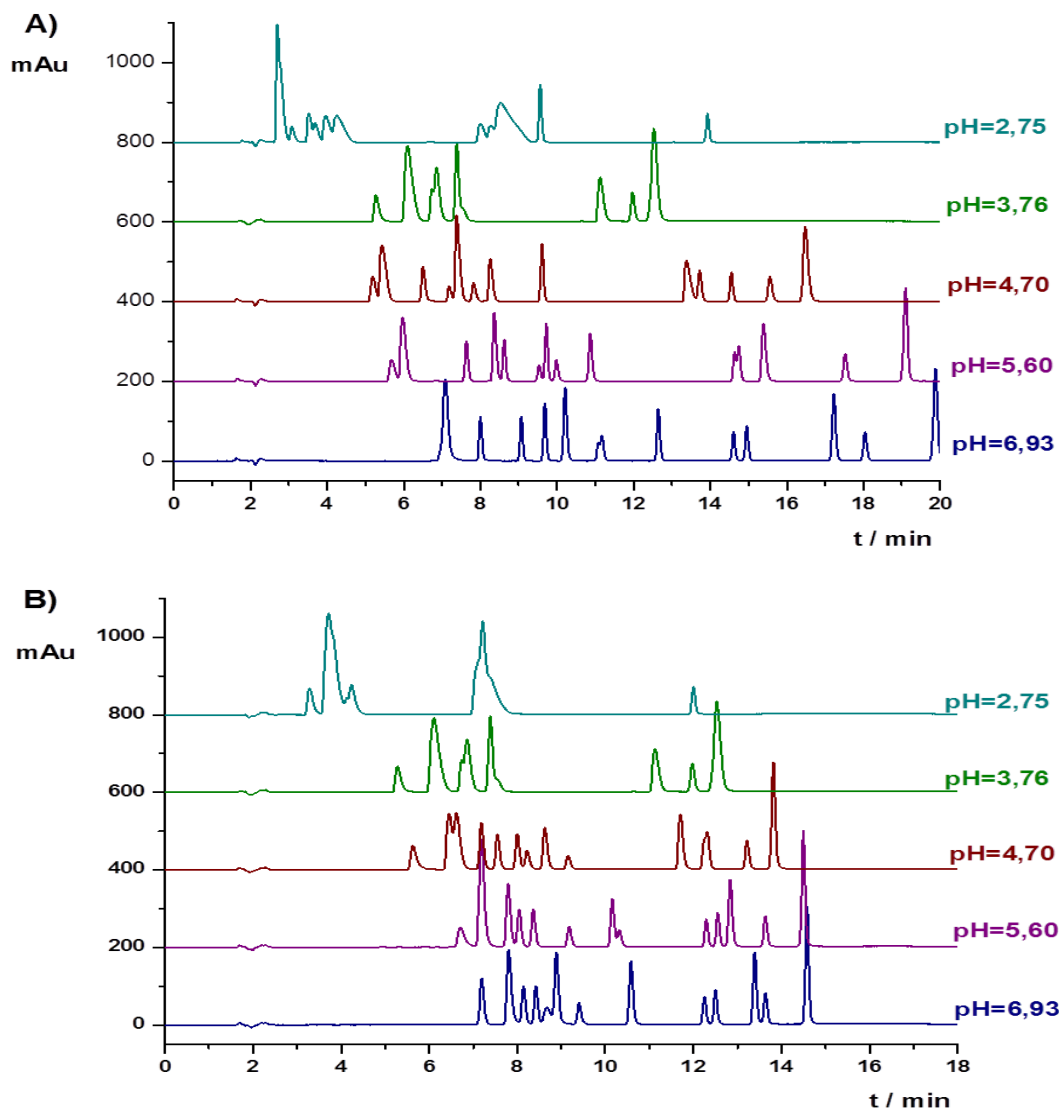
A vegyületek bemutatásánál leírtak szerint a 14 vizsgált vegyület 5 csoportra osztható, melyek UV-spektruma csoporton belül hasonlóságot mutat, különböző csoportok spektruma között viszont jelentős eltérések tapasztalhatóak. A vegyületek UV-spektrumát a 11. ábra mutatja be. Az UV-spektrumbeli különbségek előnyösek az azonosítás szempontjából, azonban megnehezítik a módszer optimális hullámhosszának kiválasztását, mivel az elnyelési maximumok nem esnek egybe. Kompromisszumos megoldásként a detektálási hullámhosszként a 290 nm-t választottuk: itt minden komponens jelentős elnyeléssel bír, és aránylag közel esik az abszorpciós maximumokhoz. A vardenafil analógok nem mutatnak valódi maximumot, de rendelkeznek abszorbanciával. Alacsony PDE-5 inhibitor tartalom esetén a 230 nm hullámhosszon történő detektálás jobb jel/zaj arányt biztosíthat, azonban itt a növényi mátrix elnyelése is jelentősebb lehet, és ez a kromatográfias profil romlásához vezethet.



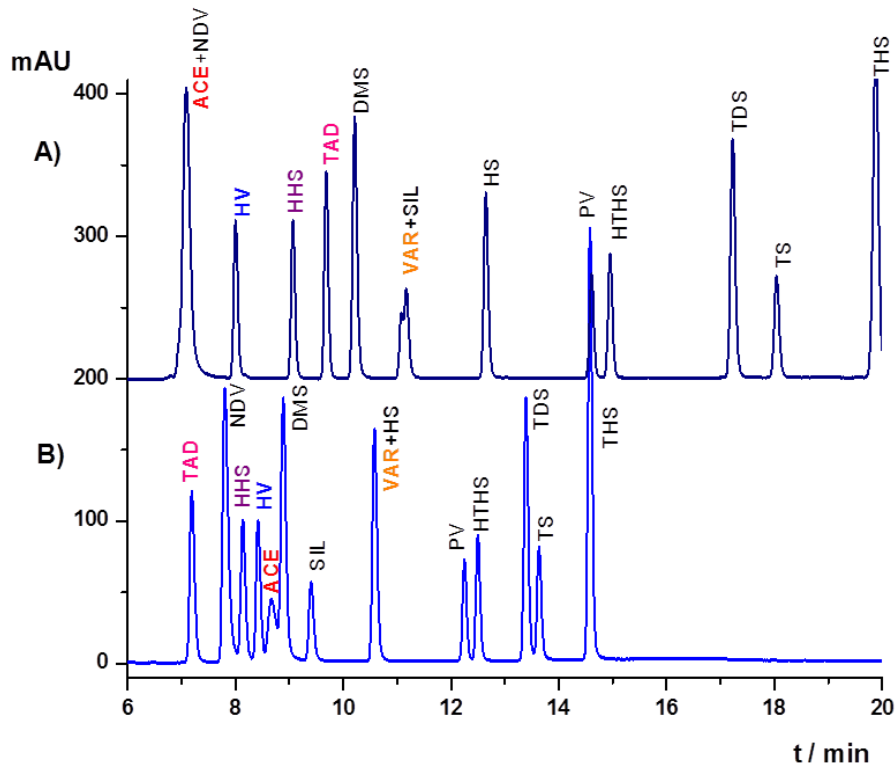
11. ábra: A 14 vizsgált PDE-5 inhibitor UV-spektruma (diódasoros detektorral felszerelt Agilent 1200 HPLC készülékkel mérve, az egyes csúcsokból háttérkorrekcióval nyertük ki UV-spektrumokat)

Az állófázis megválasztása az elválasztás szempontjából sarkalatos, fordított fázisú (Kinetex C18) és HILIC (Kinetex HILIC) oszlopokat teszteltünk először az öt alapvegyület, majd a 14 komponens elválasztására. Végül a C18-as fordított fázisú kolonnát választottuk a megfelelő retenció (ezáltal nagyobb elválasztási képesség) és csúcsalak miatt a további optimalizálásra.

A 14 vegyület elválasztása izokratikus körülmények között nem volt megoldható. Számos, acetonitrilt, metanolt és kombinációjukat, mint szerves fázist tartalmazó gradiens elúciós programot vizsgáltunk. Mivel a tadalafilen kívül az összes vegyület tartalmaz legalább egy bázikus nitrogént, a mozgófázis pH kontrollja szükséges (a becsült pK_a és $\log P$ értékeket az irodalmi áttekintés 1. táblázata tartalmazza). A célunk egy MS kompatibilis rendszer fejlesztése volt, így a pH hatását ammónium-acetátot és ecetsavat tartalmazó rendszerekben (a 2,7-7,0 tartományban) vizsgáltuk. A 12. ábra a 14 komponenst tartalmazó elegy kromatogramjait mutatja be különböző pH-jú A-eluensek esetén acetonitril illetve metanol, mint B-eluens mellett. Látható, hogy a szerves fázistól függetlenül az A-eluens pH-ját növelve a csúcsalak és a felbontás is jelentősen javult. A pH~7 ammónium-acetát puffer esetén sikerült a legtöbb komponenst elválasztani. Ezen a pH-n a bázisok többsége nemionos formában van, így a vegyületek az elválasztáshoz szükséges visszatartással rendelkeznek, és a szelektivitás is megfelelő. A további módszeroptimalizálás 200 mM ammónium-acetát (pH~7) alkalmazása mellett történt. A két pH~7 rendszert vizsgálva, mely B-eluensként csak acetonitrilt, illetve csak metanolt tartalmazott látható, hogy egyik rendszer sem képes mind a 14 komponens elválasztására (13. ábra).



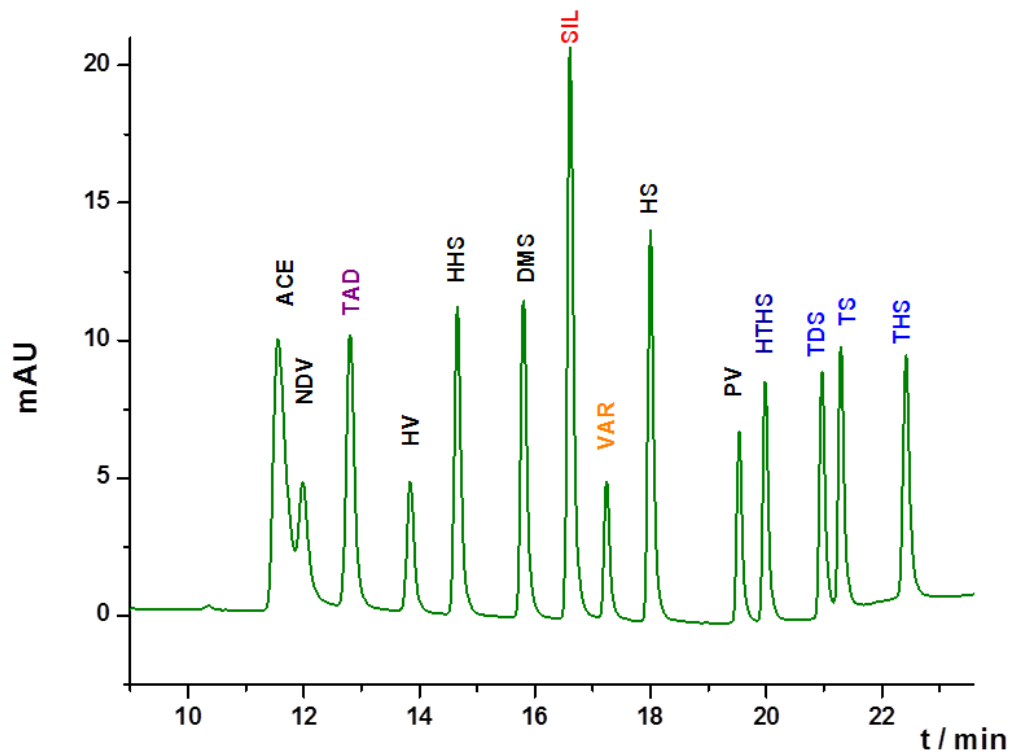
12. ábra: A pH hatása az elválasztásra A) 100% ACN és B) 100% MeOH, mint B-eluent tartalmazó mozgófázis alkalmazása esetén



13. ábra: A vegyületek elúciós sorrendjének változása A) 100% ACN és B) 100% MeOH, mint B-eluens esetén

Acetonitril, mint B-eluens esetén az ACE és az NDV, illetve a SIL és a VAR azonos retenciós idővel eluálódott (koelúció), míg metanol esetén a VAR és a HS nem vált el egymástól. Az elúciós sorrend ugyancsak változott, a változás az ACE és a TAD esetén a legmarkánsabb. A tadalafil esetén az elúciós különbség oka a két oldószerben tapasztalható eltérő oldhatóság lehet. A tiszta szerves oldószerekkel nem volt lehetséges minden vizsgált vegyület elválasztása, így az optimalizálás következő lépéseként B-eluensként különböző arányú MeOH:ACN elegyeket alkalmaztunk. Az 1:1 arányú elegyűk (a Módszerek fejezetben bemutatott 5. táblázat szerinti gradiens program mellett) bizonyult optimálisnak, A-eluensként 200 mM ammónium-acetátot tartalmazó pufferalkotót alkalmazva. A megfelelő csúcsalak eléréséhez szükség van egy minimális ammóniumion koncentrációra. Az A-eluens sókoncentrációját csökkentve az ACE-NDV közötti felbontás jelentősen romlott. A kolonna magas hőmérséklete jelentősen rontotta a 14 komponens elválását, ezért a kolonna termosztálását 25°C-ra állítottuk. 5 µl injektálási térfogat és 0,5 ml/perc áramlási sebesség bizonyult optimálisnak.

A tioszildenafil származékok nagy retenciója miatt a 14 vegyület elválasztása izokratikus körülmények között nem volt megoldható, így számos acetonnitrilt, metanolt illetve kombinációjukat, mint szerves fázist tartalmazó gradiens elúciós programot vizsgáltunk. Egyszerű lineáris gradiens nem volt ideális, mert a tio származékok és a pszeudovardenafil retenciója a többihez képest igen nagyra bizonyult, vagyis ezek a vegyületek jóval később eluálódtak és ez hosszú analízisidőt eredményezett. Ezért a gradiens meredekségét az elúciós program második felében megnöveltük. Az optimalizált rendszer gradiens programja végül az 5. táblázatban (Módszerek fejezet) leírtak szerint alakult. A 14. ábra az optimalizált rendszerrel felvett kromatogramot mutatja be.



14. ábra: Az optimalizált rendszer kromatogramja (Kinetex C18 2,5 μm 100 mm \cdot 3 mm oszlop, A-eluens: 200 mM ammónium-acetát (pH~7), B-eluens: MeOH:ACN 1:1, gradiens elúció (5.táblázat szerint), 0,5 ml/perc, 25°C, 5 μl inj., 290 nm)

4.1.2. Validálás

A módszer validálása az ICH irányelvek alapján történt [291] a specificitás, szelektivitás, precizitás, linearitás, kimutatási határ, meghatározhatósági határ, torzítatlanság, robusztusság és stabilitás szempontjából.

Specificitás, szelektivitás (specificity, selectivity)

A vizsgált vegyületcsúcsok megfelelő elválását vizsgáltuk illetve a kromatogramokon zavaró csúcsokat kerestünk. Az optimalizált rendszerrel a 14 standard megfelelően elvált: mindegyik csúcs egyértelműen elkülöníthető; az ACE/NDV csúcspár kivételével alapvonal elválás tapasztalható. A vak (B-eluens) nem tartalmazott zavaró komponenst. A mátrix-interferencia vizsgálatára 3 különböző, előzetesen vizsgált étrend-kiegészítő kapszulából a módszerben rögzített mintaelőkészítési eljárással kivonatot készítettünk és injektáltuk. Egyik minta kromatogramján sem jelent meg a komponensek esetleges detektálását zavaró, interferáló, idegen csúcs.

Precizitás, ismételtetőség (precision, repeatability)

A 14 vizsgált PDE-5 inhibitor retenciós idejének és csúcs alatti területének relatív standard deviációját a 9. táblázat foglalja össze.

9. táblázat: A csúcsterület és a retenciós idő ismételtetősége (RSD%) n=6

Név	Csúcsterület			Retenciós idő		
	1 ug/ml	10 ug/ml	100 ug/ml	1 ug/ml	10 ug/ml	100 ug/ml
ACE	2,15	0,47	0,88	0,10	0,02	0,31
TAD	0,86	0,25	0,49	0,10	0,01	0,31
HHS	0,7	0,22	0,51	0,06	0,01	0,21
DMS	0,46	0,96	0,48	0,01	0,05	0,09
SIL	0,75	0,19	0,52	0,04	0,01	0,14
HS	0,24	1,07	0,52	0,02	0,04	0,06
NDV	1,34	0,59	0,57	0,03	0,10	0,17
HV	1,39	0,74	0,49	0,02	0,08	0,13
VAR	1,25	0,33	0,14	0,03	0,01	0,12
PV	1,23	0,37	0,51	0,02	0,01	0,09
HTHS	1,18	1,11	0,51	0,01	0,03	0,04
TDS	1,30	0,17	0,51	0,02	0,01	0,08
TS	0,77	1,14	0,55	0,01	0,02	0,04
THS	0,93	0,22	0,50	0,02	0,01	0,09

A csúcsterületre vonatkozó RSD% értékek az ACE kivételével az összes komponens esetében 1% alattinak adódtak. A retenciós idők közül a legmagasabb RSD% értéke 0,31% volt.

A SIL-ra kapott RSD% értékeket használtuk a rendszeralkalmassági vizsgálat RSD-követelményeinek megadásához.

Linearitás (linearity), mérési tartomány (range)

Az 1 µg/ml - 100 µg/ml koncentrációtartományban 7 pontra (1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/ml) felvett kalibrációs egyenesek egyenleteit és a determinációs koefficienseket (R^2) a 10. táblázat foglalja össze a 14 vizsgált komponensre.

10. táblázat: A regressziós egyenesek egyenlete, a determinációs koefficiensek, az LOD és LOQ értékek a 14 komponensre

Név	Egyenes egyenlete	R^2	LOQ (ug/ml)	LOD (ug/ml)
ACE	$y = 18,248x - 25,168$	0,9981	0,060	0,020
TAD	$y = 10,203x - 4,2874$	0,9994	0,050	0,016
HHS	$y = 9,3212x - 2,4598$	0,9997	0,025	0,008
DMS	$y = 9,1972x + 0,4119$	0,9994	0,030	0,010
SIL	$y = 9,193x - 3,6671$	0,9993	0,030	0,010
HS	$y = 10,071x + 0,9192$	0,9993	0,025	0,008
NDV	$y = 4,3081x - 1,0492$	0,9995	0,065	0,022
HV	$y = 4,2432x + 0,0797$	0,9993	0,065	0,022
VAR	$y = 3,7591x - 3,0436$	0,9981	0,065	0,022
PV	$y = 4,7694x - 1,2493$	0,9997	0,065	0,022
HTHS	$y = 6,032x + 0,129$	0,9994	0,060	0,020
TDS	$y = 6,438x - 2,346$	0,9996	0,060	0,020
TS	$y = 6,9632x + 0,1826$	0,9994	0,065	0,022
THS	$y = 7,3974x - 3,2034$	0,9993	0,065	0,022

Az adatokra illesztett egyenesek determinációs koefficiensei minden esetben nagyobbak voltak 0,998-nál. ACE esetében némiképp elmarad a 0,999 követelménytől. Azonban az eltérés csekély mértékét és a reziduumok véletlenszerű eloszlását tekintve a linearitás a módszer érvényessége szempontjából elfogadható.

A regressziós egyeneseknek a SIL regressziós egyeneséhez viszonyított relatív meredekségeit használtuk a kvantitatív mérések alapjául szolgáló korrekciós faktorok számításához.

Kimutatási határ (LOD), meghatározhatósági határ (LOQ)

A vizsgált vegyületekre a meghatározhatósági határ a 0,025-0,065 µg/ml tartományba, míg a kimutatási határ 0,008 és 0,022 µg/ml közé esett. Az egyes komponensekre kapott értékeket a 10. táblázat foglalja össze.

Torzítatlanság (accuracy)

A torzítatlanság meghatározása érdekében a visszanyerhetőséget vizsgáltuk mind a 14 vizsgált vegyületre három koncentrációban, valamint a mátrixhatásokat vizsgáltuk növényi mátrixok ismert mennyiségű TAD és VAR standardok hozzáadása utáni analízisével. A visszanyerési vizsgálatok eredményeit a 11. táblázat összegzi.

11. táblázat: A torzítatlanság vizsgálata a 14 vizsgált komponensre n=3

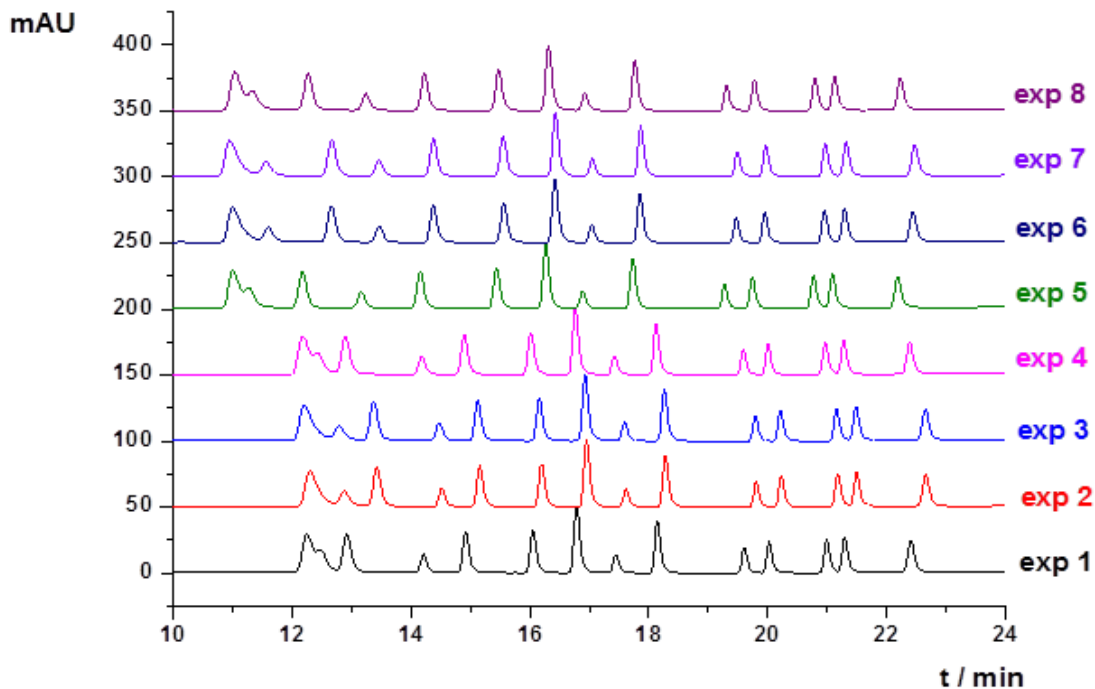
Név	a): visszanyerés (%)			b): visszanyerés (%)		
	2,5 ug/ml	25 ug/ml	75 ug/ml	A minta	B minta	C minta
ACE	94,0	95,4	98,5			
TAD	104,7	103,1	100,1	96,7	95,9	95,7
HHS	107,3	106,5	101,7			
DMS	96,2	96,9	105,6			
SIL	101,5	102,7	100,0			
HS	96,5	95,7	104,1			
NDV	91,1	90,7	100,4			
HV	95,3	95,7	104,8			
VAR	98,7	97,1	96,7	94,0	93,7	95,6
PV	102,9	103,1	98,2			
HHS	90,8	92,6	101,3			
TDS	100,4	101,1	97,8			
TS	90,8	92,6	101,2			
THS	99,9	99,4	96,0			

A torzítatlanság vizsgálatokor kapott visszanyerési értékek minden komponens esetén mindhárom koncentrációban vizsgálva a 90-110% elfogadási tartományon belül estek.

A mátrixhatás vizsgálatokor nem tapasztaltuk a visszanyerési értékek jelentős eltérését, mely növényi mátrixok esetén is bizonyítja a módszer pontosságát és alkalmazhatóságát. A vegyületek szerkezeti rokonsága miatt arra következtethetünk, hogy a többi komponens esetében is megfelelő lenne a visszanyerés.

Robusztusság (robustness)

A robusztusság vizsgálata során befolyásolt három változót (a B-eluens metanol:acetonitril aránya, az A-eluens ammónium-acetát tartalma és az oszlop hőmérséklete) a módszeroptimalizálás során szerzett tapasztalataink alapján választottuk ki. Az optimálishoz képest alacsonyabb és magasabb értékeket a gyakorlati hibalehetőségek mértékének megfelelően választottuk meg (pl. a mozgófázis készítésekor elkövethető reális hiba). A 15. ábra a robusztusság vizsgálat 8 kromatogramját mutatja be (kísérleti elrendezés a Módszerek fejezet 7. táblázata alapján).



15. ábra: A robusztusság vizsgálata során regisztrált kromatogramok

Mind a retenciós időre, mind a csúcsterületre az A-eluens ammónium-acetát tartalmának van a legkisebb, míg a B-eluens metanol:acetonitril arányának a legjelentősebb hatása. A B-mozgófázis ACN:MeOH aránya a választott szinteken jelentősen befolyásolta a vegyületek relatív retencióját, míg a hatása a relatív csúcsterületekre elhanyagolható volt. A zavartűrési vizsgálat értelmében a módszerben ki kell emelni, hogy a B-mozgófázis készítésekor különös figyelmet kell fordítani az ACN:MeOH pontos arányára, a mérés során az oszlop hőmérsékletének állandóságára (lehetőleg oszloptermosztát alkalmazásával).

Statisztikai analízis (varianciaanalízis) alapján a vizsgált paraméterek közül egyik sem rendelkezett szignifikáns hatással sem a retenciós időre, sem a csúcsterületre, így elmondhatjuk, hogy a módszer robusztusnak tekinthető.

Stabilitás (stability)

A törzsoldatokat 7 napig hűtőszekrényben (2–8°C), a mintaoldatot pedig 24 óráig szobahőmérsékleten tároltuk. Az oldatokat tisztának és a kromatogramok összehasonítása alapján stabilnak találtuk.

4.1.3. A komponensek azonosítása, kvalitatív analízis

Célunk a PDE-5 inhibitorok kvalitatív és kvantitatív analízisét egyaránt biztosító, szildenafilfil, mint könnyen beszerezhető külső standardot alkalmazó, egyszerű és olcsó HPLC-UV módszer fejlesztése volt. A módszer alapja, hogy a szildenafilfil külső standardra vonatkoztatott relatív retenciós adatok és a vegyület UV-spektrumának referenciaspektrummal történő összehasonlítása alapján megfelelő információhoz juthatunk a vegyület azonosításához.

Az azonossági követelmények:

- az adott komponens UV-spektruma egyezzen meg a megfelelő referenciaspektrummal;
- az adott komponens relatív retenciója a 12. táblázatban megadott megfelelő értékek közé essen.

12. táblázat: A szildenafilre vonatkoztatott relatív retenciók a 14 vizsgált vegyületre

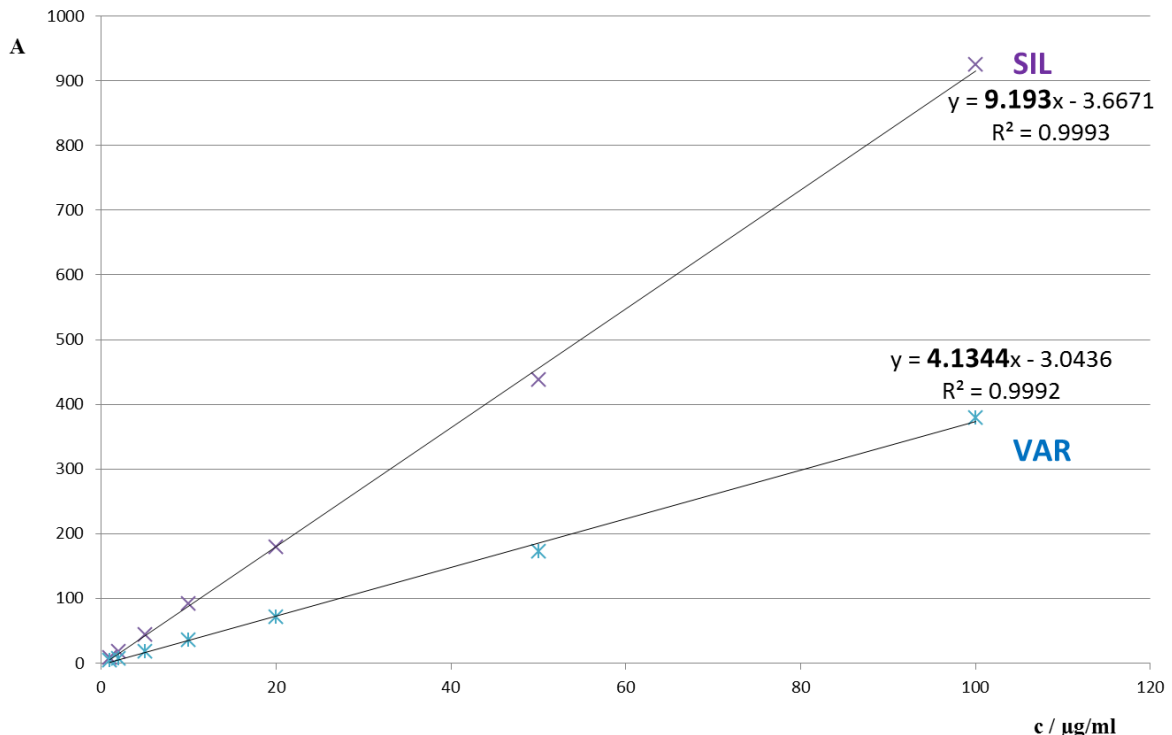
Vegyület neve	Relatív retenció (szildenafilre)	Vegyület neve	Relatív retenció (szildenafilre)
ACE	0,685–0,715	VAR	1,025–1,055
NDV	0,705–0,735	HS	1,065–1,095
TAD	0,755–0,785	PV	1,165–1,195
HV	0,815–0,845	HTHS	1,185–1,215
HHS	0,865–0,895	TDS	1,245–1,275
DMS	0,935–0,965	TS	1,265–1,295
SIL	0,985–1,015	THS	1,335–1,365

Az adott komponens azonosítása csak abban az esetben fogadható el, ha a relatív retencióra és az UV-spektrumra vonatkozó követelményt egyaránt kielégíti. Annak érdekében, hogy azt mondhassuk, hogy a módszerünk megfelelő, szükséges volt bizonyítani, hogy a módszer robusztusságát megfelelően vizsgáltuk és hogy a komponensek azonosításának kritériumai megfelelően megalapozottak.

A robusztusság vizsgálata alapján azt tapasztaltuk, hogy egyes komponensek SIL-re vonatkoztatott relatív retenciója a kísérleti körülmények kis változására érzékenyebben reagál (pl. ACE, NDV, HV), mint másoké (pl. VAR, DMS, HS). Ugyanakkor az lenne az ésszerű, ha minden vegyületre ugyanolyan széles intervallumot használnánk. Kompromisszumként $\pm 0,15$ perc tartomány alkalmaztunk. Annak ellenére, hogy látható néhány esetben az intervallumok átfedése, ez csak a TDS-TS esetén lehet félreérthető, ugyanis a többi esetben az UV-spektrumok jelentősen eltérnek egymástól. Bár a módszer csak a 14 vizsgált célmolekula megfelelő azonosítására alkalmas, bármely új PDE-5 inhibitor alapváza megállapítható a SIL-re vonatkoztatott relatív retenciója és az UV-spektruma segítségével. Amennyiben az UV-spektrum és a relatív retenció alapján az adott komponens mégsem lenne azonosítható egyértelműen, vagy bármilyen egyéb, azonosságot illető kétely merül fel, az eredményeket további, független vizsgálattal is meg kell erősíteni. Mivel módszerünk esetén a mozgófázis MS kompatibilis, a HPLC-UV rendszer direkt MS kapcsolása könnyedén megoldhatja a problémát.

4.1.4. Mennyiségi meghatározás, kvantitatív analízis

HPLC-s kvantitatív meghatározások esetén a komponens mennyiségi becslése a megfelelő referenciaanyag hiányában egy másik külső standarddal is történhet. Ez egy általánosan elfogadott gyakorlat az Európai Gyógyszerkönyvben, főleg rokon vegyületek vizsgálatakor. Ebben az esetben a vegyület csúcsterületét hasonlítjuk össze a külső standard csúcsterületével. A válaszfaktorok szignifikáns különbségeinek kiküszöbölése egy korrekciós faktor alkalmazásával lehetséges. A módszerünkben alkalmazott korrekciós faktorok számítása a validálás során kapott regressziós egyenesek szilidenafilre vonatkoztatott relatív meredekségén alapul, a 16. ábra ezt a VAR példáján keresztül mutatja be. Minden egyes komponensre a linearitás vizsgálatkor kapott regressziós egyenes meredekség értékét (pl. vardenafil esetén 4,1344) elosztottuk a szilidenafil megfelelő adatával ($4,1344/9,193=0,4497$), majd a tört reciprokát vettük (2,2237) és egy tizedesre kerekítettük a későbbi számítások egyszerűsítése végett, így megkaptuk a 13. táblázatban összefoglalt korrekciós faktorokat (vardenafil esetén 2,2).



16. ábra: A vardenafil korrekciós faktorának számításához felhasznált regressziós egyenesek

13. táblázat: A korrekciós faktorok a 14 vizsgált vegyületre

Vegyület neve	Korrekciós faktor	Vegyület neve	Korrekciós faktor
ACE	0,5	VAR	2,1
NDV	2,1	HS	0,9
TAD	0,9	PV	1,9
HV	2,2	HTHS	1,5
HHS	1,0	TDS	1,4
DMS	1,0	TS	1,3
SIL	1,0	THS	1,2

A hatóanyag-tartalmat a vizsgálati minta egy adagolási egységére vonatkoztatva a külső standard oldat koncentrációja, a minta hígítása és a 13. táblázatban megadott korrekciós faktorok (a komponens csúcsterületét a korrekciós faktorial szorozva) alapján számíthatjuk, a Gyógyszerkönyv gyakorlatának megfelelően.

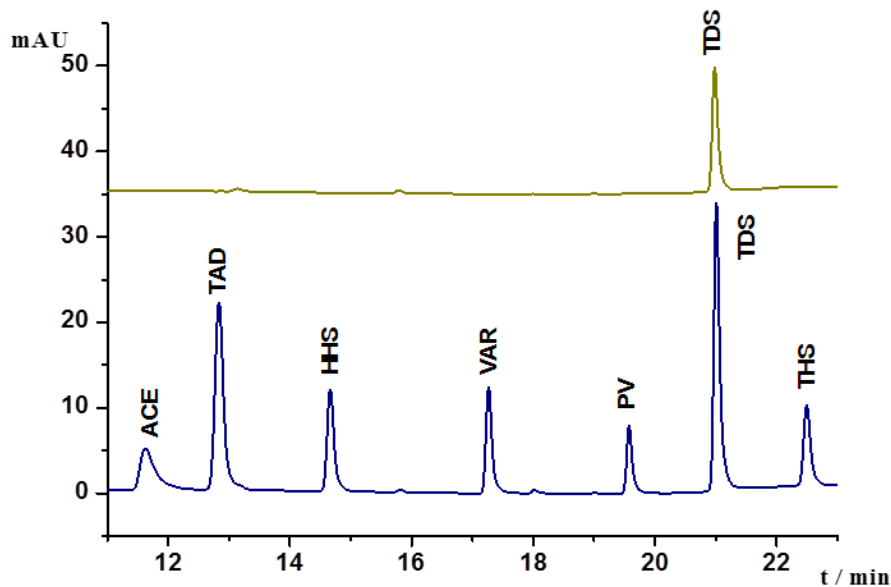
4.1.5. Rendszeralkalmasság

Mivel a PDE-5 inhibitorok azonosítása a SIL-re vonatkoztatott relatív retenciójukon alapul, a rendszer alkalmasságának bizonyítása kulcsfontosságú minden mérés előtt. A rendszeralkalmassági kritériumok a módszervalidálás eredményeinek alapján állapítottak meg:

- ismételhetség: az 1. külső standard oldatot 6-szor egymás után injektálva a SIL csúcs területére vonatkozó RSD% 1,0% alatti; míg a retenciós idő RSD% értéke nem érheti el a 0,5%-ot.
- visszanyerés: a 2. külső standard oldat kromatogramján a SIL csúcsterület-átlag (2 injektálásból) aránya az 1. külső standard oldat esetében számolt csúcsterület-átlaghoz képest 0,98-1,02 közé kell, hogy essen.
- csúcsebontás: a rendszeralkalmassági oldat kromatogramján a SIL és a VAR közötti csúcsebontás legyen legalább 3,25.
- relatív retenció: a rendszeralkalmassági oldat kromatogramján a VAR SIL-ra számolt relatív retenciója 1,025–1,055 közötti értéket vehet fel.

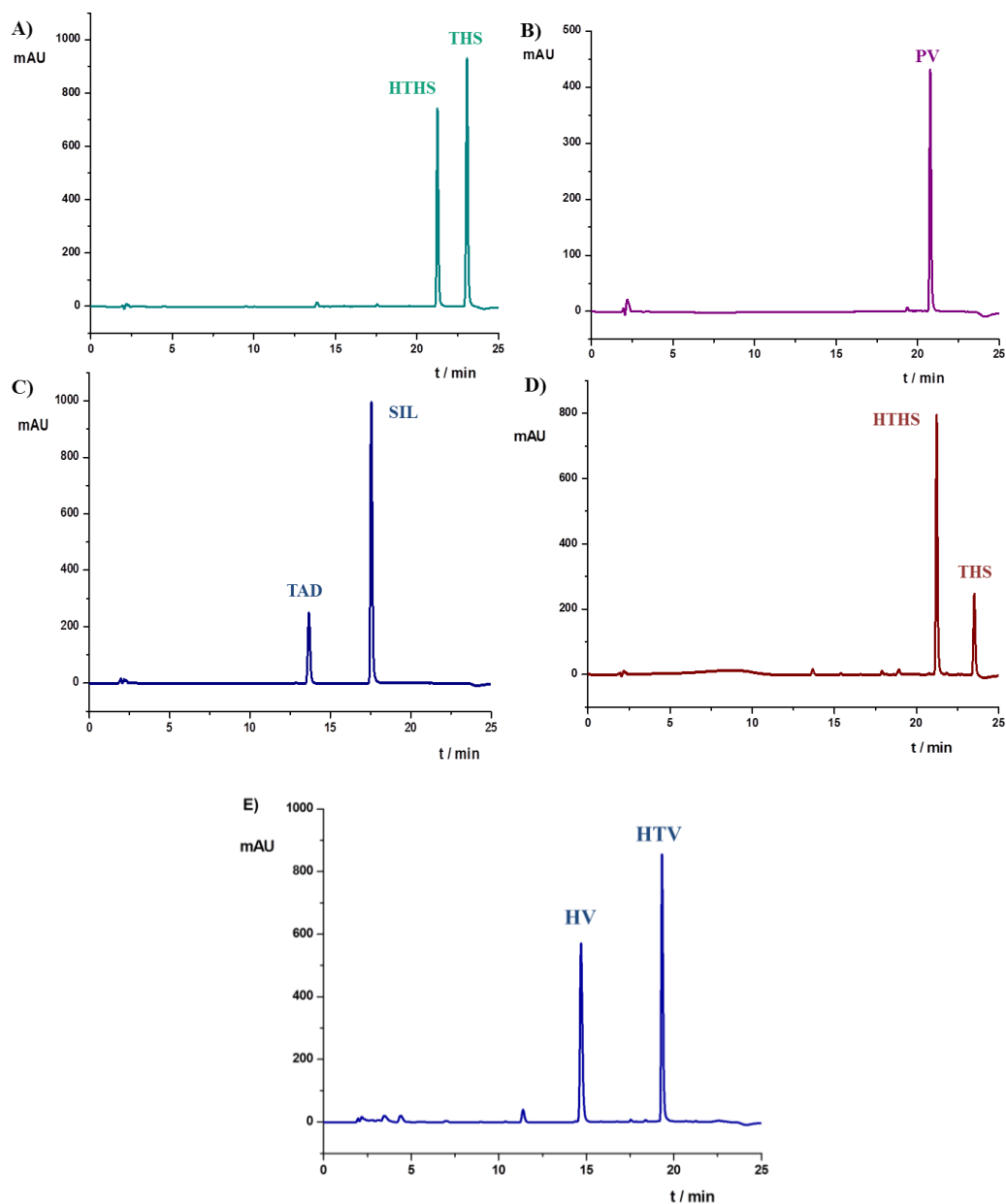
4.1.6. Készítmények vizsgálata

Annak érdekében, hogy a módszer alkalmazhatóságát bizonyítsuk, az alábbi eljárást valódi minták elemzésére alkalmaztuk: különböző, az erektilis diszfunkció kezelésére használt étrend-kiegészítőket és gyógynövény alapú készítményeket vizsgáltunk. Számos mintában találtunk SIL-t, tioszildenafil analógokat (HTHS, TS, THS, TDS), vardenafil analógokat (PV, HV) és tadalafilt. A 17. ábra egy hamisított készítmény megerősítő azonosítását mutatja be.



17. ábra: A hamisított készítmény vizsgálata: a felső kromatogram az eredeti, míg a vizuális szemléltetés kedvéért az alsó kromatogram a vizsgált PDE-5 inhibitor analógok közül 7 random kiválasztott (acetildenafil, tadalafil, hidroxihomoszildenafil, vardenafil, pszeudovardenafil, tiodimetilszildenafil és tiohomoszildenafil) standard hozzáadása után regisztrált gyógynövény alapú készítmény kromatogramja.

A relatív retenció és az UV-spektrum alapján a minőségi azonosítás, a korrekciós faktorok segítségével a mennyiségi elemzés lehetséges: a minta körülbelül 18 mg tiodimetilszildenafil tartalmazott egy dózisban. Az eredményt MS detektálással mint független módszerrel is megerősítettük.



18. ábra: Hamisított gyógynövény alapú készítmények vizsgálata: A), B), C), D) és E) minta

További 5 gyógynövény alapú étrend-kiegészítő vizsgálatok kapott pozitív hamisítási eredményt mutat be a 18. ábra, melyekből a következő komponenseket azonosítottuk: az A) minta 60 mg HTHS-t és 67 mg THS-t tartalmazott kapszulánként; a B) minta 9 mg PV-t kapszulánként; a C) minta 9 mg TAD-t és 33 mg SIL-t kapszulánként, a D) minta 65 mg HTHS-t és 20 mg THS-t kapszulánként; míg az E) minta 18 mg HV-t és egy olyan PDE-5 inhibitor analógot, amit nem tartalmazott a mi standard mintaadatunk. Ennek a

vegyületnek a retenciós ideje nem illett bele egyik általunk vizsgált komponens által kijelölt tartományba sem, azonban az UV-spektruma a vardenafil analógok spektrumához hasonlított. A kromatográfiás módszerünket MS detektálással kiegészítve a komponens hidroxio-tiovardenafilként (HTV) azonosítottuk. A vardenafil, mint alapvegyület korrekciós faktorát (2,1) alkalmazva körülbelül 20 mg HTV-t tartalmazott a készítmény.

A HTV tartalom becslésére egy további számítási módszer is alkalmazható, mely azon alapul, hogy az egyes szerkezeti elemek a korrekciós faktort különböző mértékben befolyásolják. A szildenafil alapvázis vegyületek pirazolo-pirimidin szerkezeten elhelyezkedő karbonil csoportjának tionil csoportra történő szubsztitúciója körülbelül 0,3 korrekciós faktor növekményt jelent a tioszármazékok esetén (SIL-TS, HS-THS esetén). Ez az analógia alapján a hidroxio-tiovardenafil korrekciós faktora levezethető a hidroxiovardenafil korrekciós faktorának (2,2) karbonil-tionil cserére jellemző 0,3-del történő megnövelésével. Az alábbi módszer szerint a vizsgált készítmény körülbelül 23 mg hidroxio-tiovardenafil tartalmazott. A két becslési módszerrel azonos nagyságrendű HTV mennyiséget tudtunk megállapítani.

Az utóbbi eset egyértelműen bizonyítja a módszerünk előnyös alkalmazhatóságát: gyors és robusztus minőségi és hozzávetőleges mennyiségi információt nyerhetünk a PDE-5 inhibitorral hamisított étrend-kiegészítő és növényi alapú készítmények esetén.

4.2. Optikailag aktív vegyületek elválasztása ciklodextrin-alapú kapilláris elektroforézissel

4.2.1. Előkísérletek

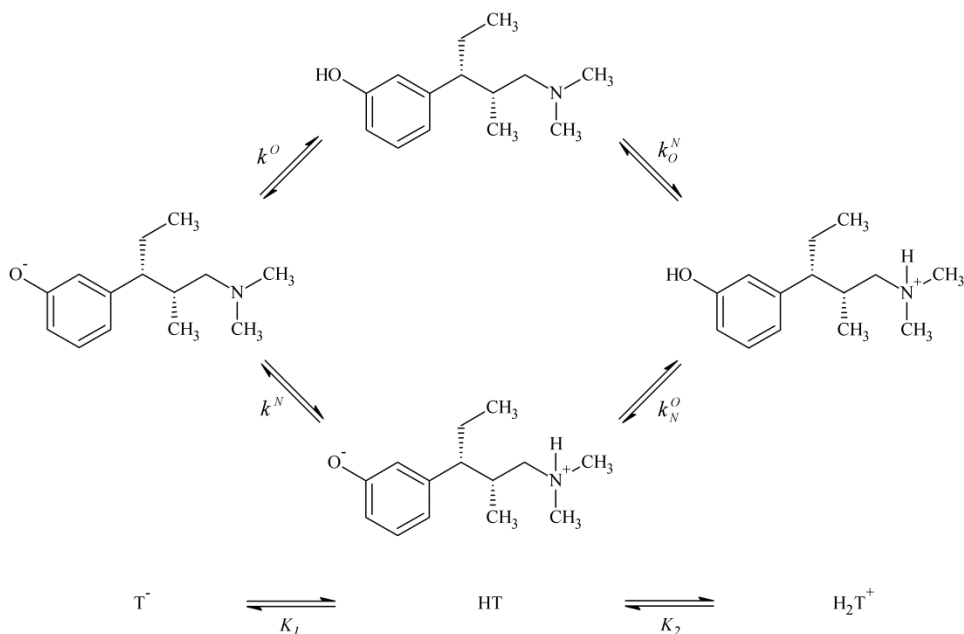
A gyógyszervegyület fizikai-kémiai tulajdonságainak (pl. ionizációs profil, lipofilitás) minél részletesebb ismerete mind a farmakokinetika, mind a gyógyszeranalízis területén hasznos. A savasságot/bázicitást általában a protonálódási makroállandókkal ($\log K$) jellemezzük, mely lehetővé teszi a molekula pH-függő ionizációs állapotának előrejelzését [294, 295]. CE elválasztások esetén alapvető kritérium, hogy vizsgált vegyület – vagy a kölcsönható CD – töltéssel rendelkezzen. A vizsgált vegyület töltése nemcsak elektromigrációs tulajdonságait szabja meg, de hatással lehet a szelektorral történő komplexképzésre is. A háttérelktrolit pH-ja emellett az EOF nagyságát és a CD töltését is befolyásolhatja.

Alogliptin

Ahhoz, hogy semleges ciklodextrinek komplexképzését is jellemezni tudjuk kapilláris elektroforézissel, a primer amin csoportot tartalmazó alogliptinnek protonált formában kell lennie. A módszerfejlesztés előtt tehát érdemes megvizsgálni az alogliptin sav-bázis tulajdonságait. Ennek érdekében CE-pH titrálást végeztünk a 6,0-11,0 pH tartományban. Eredményül a $\log K = 8,34 \pm 0,02$ értéket kaptuk, mely kisebb egy primer aminra vártnál. Ezt a protonálódási állandót pH-potenciometriával is megerősítettük, konstans ionerősség mellett ($I = 0,15 \text{ M}$) a $\log K = 8,50 \pm 0,04$ -nek adódott. Az eredmények értelmében a CE méréseknél alkalmazott háttérelktrolitok pH-ját minimum egy egységgel az alogliptin $\log K$ értékénél kisebbre kell beállítani, ahol az alogliptin dominánsan kationos formában létezik (AloH^+).

Tapentadol

Tapentadol esetén is szükség volt a molekula sav-bázis tulajdonságainak vizsgálatára. A tapentadol egy diprotikus amfoter vegyület (mivel egy savas fenolos hidroxil és egy bázikus terciér alifás amin funkcióval rendelkezik), így a farmakokinetikai abszorpció és disztribúció becslését jelentősen befolyásolja a molekula ionizációs állapota. Mivel egy savas és egy bázikus csoporttal is rendelkezik, a tapentadol (T) négy protonálódási állapotban létezhet a pH függvényében: kationos (H_2T^+), ikerionos (HT^\pm), semleges (töltésmentes) (HT^0) és anionos (T^-) formában (19. ábra).



19. ábra: A tapentadol lehetséges protonáltsági állapotai (kationos (H_2T^+), ikerionos (HT^\pm), semleges (töltésmentes) (HT^0) és anionos (T^-) forma)

Az ionizációs állapotok vizsgálatára a vizes közegű potenciometria abban az esetben alkalmazható, ha az adott pH-tartományban a vegyület oldhatósága eléri a 0,5 mM-t. Tapentadol esetén teljesül ez a kritérium, így a $\log K$ értékek 25,0°C és 0,15 M ionerősség mellett meghatározva a következőeknek adódtak: $\log K_1 = 10,59 \pm 0,01$ és $\log K_2 = 9,44 \pm 0,01$. Ez azt mutatja, hogy fiziológias pH-n a tapentadol főként kationos formában fordul elő. Az eredmény jó összhangban van ($\log K_1 = 10,45$ és $\log K_2 = 9,34$) a Nucynta[®] (IR Janssen Inc.) termék monográfiájában leírtakkal, ahol sem a mérési körülmények, sem a mérési módszer nincs pontosan feltüntetve. A potenciometriás titrálást ¹H NMR-pH titrálással erősítettük meg, ezzel $\log K_1 = 10,62 \pm 0,03$ és $\log K_2 = 9,48 \pm 0,03$ értékek adódtak. Az aminocsoport protonálódásának köszönhetően a tapentadol savas körülmények között (pl. pH 2,5 foszfátpufferben) pozitív töltéssel rendelkezik, míg bázikus körülmények között (pl. pH 9,5 borátpuffer esetén) részben pozitív, így a CE mérések során várhatóan semleges CD-k is vizsgálhatóak lesznek.

A két közeleső protonálódási makroállandó a molekula egészét jellemzi, nem rendelhető egyértelműen a funkciós csoportokhoz. Az egyes protonálható csoportok egyéni bázicitását a protonálódási mikroállandók jellemzik. Tapentadol esetén az UV-spektrum a 265–320 nm tartományban függ a pH-tól, melyet a fenolát csoport protonálódása szelektíven befolyásol,

mivel a tercier amintól elegendően nagy kovalens távolságban helyezkedik el. A k^O mikroállandót az (6) és a (7) egyenlet alapján számítottuk: $\log k^O = 9,94 \pm 0,04$, majd a (8) és a (9) egyenlet alapján kaptuk a $\log k^N = 10,48$, $\log k_N^O = 9,55$ és $\log k_O^N = 10,09$ mikroállandókat. Ezek alapján megállapítható, hogy az amin bázicitása 3,5-szer nagyobb a fenoláténál. Ezt a ^1H NMR-pH titrálás is alátámasztotta: az *N*-metil rezonanciajel kémiai eltolódás-pH profilja esetén nagyobb protonálódás okozta eltolódás-változást tapasztaltunk az első protonálódási lépésnél ($\Delta\delta = 0,454$ ppm), mint a másodiknál ($\Delta\delta = 0,207$ ppm). A tautomer arány, mely az ikerionos és a töltésmentes forma pH-független arányát adja meg, 3,47-nek adódott, tehát a vizes közegben az ikerionos forma dominál. A hasonló sav-bázis funkciókkal és farmakológiai hatással is rendelkező morfinnál ez az arány ellentétes, $k_z = 0,35$ [296]. A kölcsönhatási tényezőkben is enyhe eltérést tapasztaltunk (a $\Delta \log k_{O-N}$ tapentadol esetén 0,39; morfin esetén 0,61), melynek oka a két molekula flexibilitásbeli különbsége lehet. Tapentadol esetén egyféle, míg morfin esetén több úton valósulhat meg az amin- és fenolátcsoport közti kölcsönhatás. A $\Delta \log k$ értékek hasonló összehasonlítását írták le a kétféle kölcsönhatási utat mutató piperazin és az egyféle kapcsolódású etilén esetén, ahol az utóbbi komponens esetén kisebb kölcsönhatási tényezőket kaptak [297], hasonlóan, mint tapentadol esetén.

A tapentadol lipofilitását *n*-oktanol/víz rendszerben történő megoszlással jellemezhetjük: kétfázisú potenciometriás titrálással $\log P_{\text{oct}} = 2,77 \pm 0,01$ értéket kaptunk, ami alátámasztja az orális alkalmazás során tapasztalt gyors és teljes felszívódást a gasztrointesztinális traktusból [298]. Mivel a vegyületek részletes fizikai-kémiai jellemzése jelen dolgozatnak nem célja, csupán a kapilláris elektroforetikus módszer fejlesztése szempontjából tárgyalandó, a mikro- és makroállandók, illetve a lipofilitás részletesebb tárgyalása megtalálható a disszertáció alapját képező közleményünkben [S3].

Tadalafil

A tadalafil nem rendelkezik a 2-12 pH tartományban ionizációra képes savas vagy bázikus funkciós csoporttal. Ebben az esetben ez elektroforetikus elválasztás nehézségét az adta, hogy a molekula semleges, vagyis együtt mozog az elektroozmózissal mind a négy semleges izomer. A semleges sztereoizomerek elválasztásához töltéssel rendelkező

ciklodextrinre volt szükség, hogy az elválasztáshoz szükséges mobilitáskülönbség létrejöjjön a migráció során [173, 276-279].

A tadalafil vízdékonysága (pH-tól függetlenül) igen gyenge, gyakorlatilag vízben (és vizes pufferekben) oldhatatlan vegyület, metanolban mérsékelten oldódik. Ahhoz, hogy a tadalafil CD-vel történő komplexképzése CE-vel vizsgálható legyen, szükség van az oldatkészítés optimalizálására. A standard törzsoldatok készítéséhez a négy sztereoizomert metanolban oldottuk (1 mg/ml külön-külön az egyes sztereoizomerekre). A megfelelő standard oldatok készítésének érdekében a csúcsalakot és az alapvonalat vizsgáltuk 50 mM Tris-ecetsav pH 4,75 háttérelktrolitban. A víztartalom növelésével a csúcsalak és az alapvonal javult, azonban a vegyület oldhatósága a víztartalom növelésének határt szabott. Végül az optimalizált standard oldat mind a négy izomert 166 µg/ml koncentrációban tartalmazta 1:5 metanol:víz elegyben. Az injektálási paraméterek 40 mbar-4 s-ról 20 mbar-3 s-ra történő változtatásával az alapvonal és a csúcsalak ugyancsak javult.

4.2.2. Az enantiomerek/ sztereoizomerek elválasztása

A sikeres királis elválasztás feltétele az enantiomerek sebességkülönbsége [171]. CE-ben az enantiomerek elválasztása a legtöbb esetben a különböző kötődési affinitáson alapul $K_{stab1} \neq K_{stab2}$, azonban az enantiomerek és a királis szelektor között ideiglenesen képződő diasztereomer asszociátumok mobilitás különbsége ($\mu_{kplx1} \neq \mu_{kplx2}$) is okozhatja az enantiomerek elválását még abban a különleges esetben is, ha a komplexstabilitási állandók megegyeznek ($K_{stab1} = K_{stab2}$) [171].

Alogliptin

Az alogliptin enantiomerek elválasztása céljából három natív (α -, β - és γ -CD), öt semleges (TRIME- β -CD, TRIME- γ -CD, RAME- γ -CD, HP- β -CD és HP- γ -CD) és öt negatív töltéssel rendelkező (CM- γ -CD, SP- β -CD, SP- γ -CD, SBE- β -CD és SBE- γ -CD) CD származékot vizsgáltunk. A 0,25-80 mM koncentráció tartományban (a CD oldhatóságától és az elválasztástól függően) több koncentráció szinten vizsgáltuk az enantiomerek elválaszthatóságát 30 mM acetátpuffert (pH 4,75) tartalmazó háttérelktrolitban. Az eredményeket a 14. táblázat foglalja össze.

14. táblázat: Az alogliptin enantiomerek felbontása (R_S) és migrációs sorrendje (EMO) az alkalmazott CD rendszerekkel

CD	DS	R_S	EMO
γ -CD	-	1,56	R; S
SP- β -CD	~2	1,51	S; R
SP- γ -CD	~2	5,16	R; S
SBE- β -CD	~4	2,04	S; R
	~6,3	4,64	S; R
	~10,4	2,12	S; R
SBE- γ -CD	~4	4,75	R; S

A natív ciklodextrinek közül egyedül a γ -CD választotta el az alogliptin enantiomereket ($R_S = 1,56$). A vizsgált ciklodextrin származékok közül a töltéssel nem rendelkező RAME- γ -CD és HP- γ -CD részleges, míg a negatív töltéssel rendelkező SP- β -CD, SP- γ -CD, SBE- β -CD- és SBE- γ -CD alapvonal elválasztást eredményezett. A SP- γ -CD esetén tapasztaltuk a legnagyobb felbontást ($R_S = 5,16$), melyet a SBE- γ -CD ($R_S = 4,75$) követett. A β -ciklodextrin származékok közül a SBE- β -CD ($R_S = 4,64$) mutatta a legjobb elválasztást.

Tapentadol

Az előkísérletek során először a tapentadol enantiomereket vizsgáltuk, majd az ígéretesebb ciklodextrinokkal kiterjesztettük a vizsgálatokat mind a négy sztereoizomerre. Az utóbbi méréseket az Olomouci Egyetem (Palacky University, Olomouc) Analitikai Kémiai Intézetével együttműködésben végeztük.

Az R,R - és S,S -tapentadol elválasztásának vizsgálatára két natív (α - és β -CD), öt semleges (TRIME- α -CD, TRIME- β -CD, RAME- α -CD, RAME- β -CD és HP- β -CD) és tizenkettő negatív töltéssel rendelkező (SBE- α -CD, Sp- α -CD, S- α -CD, CM- α -CD, SBE- β -CD DS~3,9 és DS~6,5, SP- β -CD DS~4 és DS~2, SHP- β -CD, CM- β -CD, CE- β -CD és Phos- β -CD) CD származékot alkalmaztunk a 0,125-30 mM koncentráció tartományban 50 mM Tris-ecetsav (pH 4,75) háttérelktrolitban. A felbontás-értékeket a 15. táblázat foglalja össze.

15. táblázat: A tapentadol enantiomerek felbontása (R_S) és migrációs sorrendje (EMO) az alkalmazott CD rendszerekkel

CD	DS	R_S	EMO
α		1,34	R,R ; S,S
TRIME- α -CD	~18		
RAME- α -CD	~11	1,37	R,R ; S,S
SBE- α -CD	~4	5,17	R,R ; S,S
SP- α -CD	~2	3,02	R,R ; S,S
S-α-CD	~12	16,18	S,S; R,R
CM- α -CD	~3,5	5,16	R,R ; S,S
β			
TRIME- β -CD	~21	1,52	R,R ; S,S
RAME- β -CD	~12		
HP- β -CD	~4,6		
SBE- β -CD	~3,9	0,89	R,R ; S,S
	~6,5	2,64	R,R ; S,S
SP- β -CD	~4	1,70	R,R ; S,S
	~2	1,25	R,R ; S,S
SHP-β-CD	~2,5	0,99	S,S; R,R
CM-β-CD	~3	1,71	S,S; R,R
CE-β-CD	~3	1,23	S,S; R,R
Phos-β-CD	~4	1,74	S,S; R,R

A natív CD-k közül csak az α -CD választotta el (részlegesen, $R_S = 1,34$) az enantiomereket. A semleges CD származékok közül egy α - (RAME- α -CD) és egy β -CD származék (TRIME- β -CD) esetén tapasztaltunk felbontást. A vizsgált töltéssel rendelkező CD származékok közül mind elválasztotta az enantiomereket. A β -CD származékoknál jobb felbontási értékeket adtak az α -CD származékok, amelyekkel minden esetben alapvonalis elválasztást tapasztaltunk: SP- α -CD $R_S = 3,02$; CM- α -CD $R_S = 5,16$; SBE- α -CD $R_S = 5,17$ és a kimagaslóan nagy felbontású S- α -CD $R_S = 16,18$. A szubsztitúciós fok növelésével SBE- β -CD és SP- β -CD esetén is nőtt a felbontás.

A négy sztereoisomer elválaszthatóságát natív (α -CD, β -CD, γ -CD), semleges (HE- β -CD, HP- γ -CD, HP- β -CD) és negatív töltéssel rendelkező (CE- β -CD, CM- β -CD, CM- α -CD, SBE- α -CD, S- α -CD, S- β -CD, S- γ -CD) származékokkal vizsgáltuk savas (pH 2,50 foszfátpuffer) és bázikus (pH 9,5 borátpuffer) körülmények között.

A natív CD-ek közül az α -CD nagy koncentrációban alkalmazva lúgos körülmények között az $R,R/S,S$ - és az $R,S/S,R$ -tapentadol izomereket kis felbontással elválasztotta. A β -CD az $R,R/S,S$ és $S,R/R,S$ diasztereomer párt alapvonalig és az $R,S/S,R$ izomereket részlegesen választotta el savas körülmények között. A β -CD koncentráció növekedésével a felbontás csökkent. A γ -CD esetén csak az $R,R/S,S$ és az $S,R/R,S$ diasztereomer pár vált el, az enantiomerek elválasztása nem volt megvalósítható. A töltéssel nem rendelkező CD származékokat vizsgálva a HE- β -CD esetén az $R,S/S,R$ pár alapvonalig elvált mind a két pH-n, azonban az $S,S/R,R$ -tapentadol enantiomerek nem mutattak felbontást. A HP- β -CD és a HP- γ -CD lúgos körülmények között nem voltak képesek az $R,R/S,S$ -tapentadol elválasztására, és csak részleges elválasztást tapasztaltunk az $R,S/S,R$ pár esetén. Savas körülmények között a HP-CD származékok csak bizonyos enantiomer pár elválasztását tették lehetővé: a HP- β -CD csak az $S,R/R,S$ -tapentadolt ($R_S = 1,63$), a HP- γ -CD pedig csak az $R,R/S,S$ -tapentadolt ($R_S = 4,50$) választotta el. A pH változtatásával a CD töltésállapota nem változik, viszont a tapentadol savas körülmények között protonálódik. A HP-ciklodextrinek a pozitív töltéssel rendelkező tapentadol enantiomereket ismerik fel sztereoszelektíven, míg a semleges tapentadol esetén a szelektivitás nem jön létre vagy kisebb mértékű vagy pedig hasonló. A két semleges HP-CD származékot közös rendszerben alkalmazva megfelelő körülmények között duál rendszer fejleszthető, melyben mind a négy izomer elválasztása megvalósulhat, ugyanis a két CD származék más-más enantiomerpárra mutat enantioszelektivitást. A duál rendszer kidolgozása megtalálható a későbbiekben, a módszer optimalizálás leírásánál.

A karboxietil- és karboximetil-CD származékok pH-tól függően deprotonálódhatnak, így a megfelelő pH tartományban negatív töltéssel rendelkezhetnek, így már nem csak a tapentadol töltése, hanem a CD származékok töltése és így azok enantioszelektivitása is változik a pH függvényében. A lúgos körülmények között negatív töltéssel rendelkező CE- β -CD-t alkalmazva alapvonal elválasztást kaptunk (S,S -, R,R -, R,S -, S,R -tapentadol sorrendben). Savas körülmények között az R,R - és az S,S -tapentadolt csak részlegesen választotta el a CE- β -CD, és a királis szelektor koncentrációt növelve sem értünk el nagyobb felbontást. Az $R,S/S,R$ enantiomer párra alapvonal elválasztást kaptunk CM- β -CD esetén, viszont a négy izomer CM- β -CD-nel történő elválasztásához lúgos BGE alkalmazására volt szükség: pH 9,5 BGE esetén alapvonal elválasztást értünk el (S,S -, R,R -,

R,S-, *S,R*-tapentadol sorrendben). *CM-α-CD* és a *SBE-α-CD* esetén (*R,R*-, *S,S*-, *S,R*-, *R,S*-tapentadol sorrendben) *S-α-CD* esetén (*S,S*, *S,R*, *R,S*, *R,R* migrációs sorrenddel) is alapvonal elválasztást tapasztaltunk lúgos körülmények között. *S-β-CD* és *S-γ-CD* esetén is az *R,S*-/*S,R*- részlegesen, az *R,R*-/*S,S*-tapentadol alapvonalig vált el savas körülmények között, míg lúgos körülmények között lehetséges volt a négy sztereoizomer alapvonal elválasztása (*S-β-CD* esetén *S,S*, *R,R*, *R,S*, *S,R*, míg *S-γ-CD* esetén *S,S*, *R,R*, *S,R*, *R,S*, migrációs sorrenddel).

Tadalafil

A királis elválasztást 22 töltéssel rendelkező *CD* származékkal vizsgáltuk: közülük 7 nem választotta el a négy sztereoizomert (*CM-α-CD*, *CE-α-CD* és a *γ-CD* származékok: *CM-γ-CD*, *S-γ-CD*, *SP-γ-CD*, *SHP-γ-CD*, *SBE-γ-CD*), 4 részleges (a negatív *SP-α-CD* és *CM-β-CD*, a pozitív töltésű *PA-β-CD* és *IPA-β-CD*), míg 11 alapvonal elválasztást eredményezett (a negatív töltéssel rendelkező *S-α-CD*, *SBE-α-CD*, *CE-β-CD*, *Succ-β-CD*, *Phos-β-CD*, *S-β-CD*, *SP-β-CD*, *SHP-β-CD*, *SBE-β-CD* *DS*~4 és *DS*~6,3 és a pozitív töltéssel rendelkező *MA-β-CD*). Az eredményeket a 16. táblázat foglalja össze.

A terápiában alkalmazott *R,R*-tadalafil és az *S,S*-tadalafil enantiomer elválasztását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a legnagyobb felbontást *CM-β-CD* esetén tudtunk elérni ($R_S = 7,73$, annak ellenére, hogy az *R,R/S,R* párra csak részleges elválasztást értünk el $R_S = 0,43$ értékkel). További három negatív töltéssel rendelkező *β-CD* származék esetén (*S-β-CD*, *SP-β-CD* és *SBE-β-CD* *DS*~6.3) kaptunk 7,00 fölötti R_S értékeket. Az *α-CD* származékok közül a *S-α-CD* mutatta a legnagyobb felbontást ($R_S = 5,19$), melyet a *SBE-α-CD* követett ($R_S = 4,26$).

16. táblázat: A tadalafil sztereoizomerek felbontása (R_S) és migrációs sorrendje (EMO) az alkalmazott CD rendszerekkel, ahol az elsőként-másodikként, másodikként-harmadikként, harmadikként-negyedikként, elsőként-negyedikként, elsőként-harmadikként, másodikként-negyedikként migráló sztereoizomerre vonatkozó felbontási értékek vannak feltüntetve

CD	$R_{S\ 1-2}$	$R_{S\ 2-3}$	$R_{S\ 3-4}$	$R_{S\ 1-3}$	$R_{S\ 1-4}$	$R_{S\ 2-4}$	EMO
S-α-CD	5,19	4,82	11,54	10,15	21,79	16,26	R,R ; S,S; R,S; S,R
SP-α-CD	2,33	2,06	0,72	4,16	4,59	2,54	R,S; S,R; R,R ; S,S
SBE-α-CD	2,65	9,56	4,26	12,18	16,25	13,69	R,S ; S,R ; S,S ; R,R
CM-β-CD	7,73	0,43	6,16	7,19	13,69	7,4	S,S; R,R ; S,R; R,S
CE-β-CD	2,48	2,74	1,58	5,15	6,76	4,25	S,S; R,R ; S,R; R,S
Succ-β-CD	3,32	3,08	1,36	6,24	7,44	4,37	S,S; R,R ; S,R; R,S
Phos-β-CD	5,44	10,14	10,27	13,25	30,19	26,58	S,S; R,R ; S,R; R,S
S-β-CD	7,54	7,26	4,09	14,84	18,62	11,2	S,S; S,R; R,R ; R,S
SP-β-CD	7,55	24,38	5,75	31,81	36,95	29,69	S,S; R,R ; S,R; R,S
SHP-β-CD	4,06	4,08	3,15	8,15	11,24	7,2	S,S; R,R ; S,R; R,S
SBE-β-CD	6,25	13,19	2,93	19,19	22,53	16,43	S,S; R,R ; S,R; R,S
	7,14	15,99	3,97	22,26	27,19	20,76	S,S; R,R ; S,R; R,S
MA-β-CD	3,36	4,78	4,4	8,16	12,46	9,12	R,S; S,R; R,R ; S,S
PA-β-CD	1,48	1,98	1,36	3,31	4,67	3,24	R,S; S,R; R,R ; S,S
IPA-β-CD	0,68	2,48	1,68	3,1	4,64	3,87	R,S; S,R; R,R ; S,S

4.2.3. Látszólagos komplexstabilitási állandók

A vizsgált vegyület enantiomerjei és az alkalmazott királis szelektor között létrejövő eltérő kölcsönhatás alapvető a királis elválasztás szempontjából. A számított komplexstabilitási állandók a kölcsönhatás erősségét jellemzik. A ciklodextrinek azonban nem egységes anyagok, azok többféle szubsztitúciós pozíciójú és szubsztitúciós fokú frakciók keverékei, melyek a vizsgált királis vegyülettel eltérő kölcsönhatásokat alakítanak ki. Ebből következik, hogy a számított állandók átlagolt értékek. Mivel a puffer pontos ionerősségét nem számítottuk, a háttéreltrolit viszkozitása sem ismert és a CD egyre növekvő koncentrációban történő alkalmazásával változik (erre vonatkozó korrekciót nem alkalmaztunk), a számított állandók ezért is az adott háttéreltrolitra érvényes, látszólagos értékek. A látszólagos, átlagolt komplexstabilitási állandók azonban segítséget nyújthatnak a megfelelő szelektor kiválasztásában, mely a módszeroptimalizálás egyik kritikus lépése.

A komplexstabilitási állandók meghatározása a korábban bemutatottak alapján történt, egyre növekvő ciklodextrin koncentrációjú háttérelktrolitban futtatva a sztereoizomereket tartalmazó mintákat. Amennyiben nem történik királis felismerés, az izomerek egyszerre érik el a detektort, így egyetlen stabilitási állandó számítható, míg enantioszelektív CD-k esetén a sztereoizomerek elválnak, így a komplexstabilitás az egyes enantiomerekre külön-külön megadható.

Alogliptin

Alogliptin esetén a 0,25-80 mM koncentráció tartományban végeztük a keletkező komplexek stabilitásának vizsgálatát 30 mM acetátpuffert (pH 4,75) tartalmazó háttérelktrolitban. Azokban az esetekben, ahol az alogliptin enantiomerek alapvonal elválasztását tapasztaltuk két alogliptin-CD komplex stabilitási állandóját (K_{stab1} , K_{stab2} az elsőként és másodikként migráló enantiomerre), valamint határmobilitását (μ_{kplx1} , μ_{kplx2}) tudtuk számítani. A mérések eredményét a 17. táblázat foglalja össze.

17. táblázat: Az alogliptin-CD komplexstabilitási állandók, a komplexek határmobilitása valamint az enantiomerek migrációs sorrendje

CD	DS	K_{stab1}	K_{stab2}	μ_{kplx1} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	μ_{kplx2} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	EMO
γ -CD	-	$7 \pm 0,8$	$11 \pm 0,7$	a	a	R; S
SP- β -CD	~2	194 ± 14	206 ± 6	$-7,9 \pm 0,3$	$-8,0 \pm 0,2$	S; R
SP- γ -CD	~2	65 ± 2	84 ± 3	$-2,1 \pm 0,2$	$-2,4 \pm 0,3$	R; S
SBE- β -CD	~4	226 ± 6	240 ± 14	$-7,2 \pm 0,2$	$-6,4 \pm 0,3$	S; R
	~6,3	388 ± 13	411 ± 20	$-17,3 \pm 0,5$	$-18,4 \pm 0,5$	S; R
	~10,4	874 ± 86	911 ± 88	$-25,5 \pm 1,5$	$-26,7 \pm 1,5$	S; R
SBE- γ -CD	~4	167 ± 9	187 ± 15	$-4,8 \pm 0,4$	$-6,2 \pm 0,5$	R; S

a: a határmobilitás számítása nagy hibával terhelt

Az alogliptin affinitása a natív és a semleges CD származékok iránt igen gyenge. A pH 4,75 acetátpufferben az alogliptin pozitív töltéssel rendelkezik, így a negatív töltésű CD-kel az elektrosztatikus kölcsönhatásoknak köszönhetően nagyobb stabilitású komplexet képezhet. A létrejövő anionos diasztereomer komplexek nagyobb mobilitáskülönbsége tovább növelheti az elválasztást. A γ -CD származékokat és a β -CD származékokat összehasonlítva megállapítható, hogy a β -CD származékok látszólagos stabilitása jóval

nagyobb, üregméretük valószínűleg jobban illeszkedik az alogliptin térigényéhez. A SBE- β -CD-k esetén a szubsztitúciós fok növekedésével (DS~4, DS~6,3, DS~10,4) a stabilitás a négyszeresére növekedett.

Tapentadol

Tapentadol-ciklodextrin komplexstabilitási állandókat a hatóanyag (*R,R*-tapentadol) és annak enantiomerje (*S,S*-tapentadol) esetén határoztuk meg hét α - és tizenkét β -CD származék esetén a 0,125-30 mM koncentráció tartományban 50 mM Tris-ecetsav puffert (pH 4,75) alkalmazva. A mérések eredményeként kapott tapentadol-CD komplexstabilitási állandókat (K_{stab1} , K_{stab2} az elsőként és másodikként migráló enantiomerre), valamint komplexek határmobilitását (μ_{kplx} , μ_{kplx2}) a 18. táblázat foglalja össze.

18. táblázat: A tapentadol-CD komplexstabilitási állandók, a komplexek határmobilitása valamint az enantiomerek migrációs sorrendje

CD	DS	K_{stab1}	K_{stab2}	μ_{kplx1} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	μ_{kplx2} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	EMO
α		35 ± 9	40 ± 9	a	a	<i>R,R</i> ; <i>S,S</i>
TRIME- α -CD	~18	<10		a		
RAME- α -CD	~11	60 ± 8	75 ± 8	$6,4 \pm 0,6$	$6,5 \pm 0,5$	<i>R,R</i> ; <i>S,S</i>
SBE- α -CD	~4	370 ± 10	440 ± 10	$-14 \pm 0,2$	$-15 \pm 0,2$	<i>R,R</i> ; <i>S,S</i>
SP- α -CD	~2	210 ± 20	240 ± 20	$-4,7 \pm 0,9$	$-5,0 \pm 0,8$	<i>R,R</i> ; <i>S,S</i>
S-α-CD	~12	550 ± 45	620 ± 55	$-29 \pm 0,9$	-32 ± 1	<i>S,S</i> ; <i>R,R</i>
CM- α -CD	~3,5	480 ± 20	570 ± 20	$-13 \pm 0,2$	$-14 \pm 0,1$	<i>R,R</i> ; <i>S,S</i>
β		355 ± 9		$7,7 \pm 0,08$		
TRIME- β -CD	~21	<10	<10	a	a	<i>R,R</i> ; <i>S,S</i>
RAME- β -CD	~12	350 ± 60		$7,3 \pm 0,4$		
HP- β -CD	~4,6	246 ± 17		$6,4 \pm 0,2$		
SBE- β -CD	~3,9	1750 ± 150	1720 ± 110	$-15 \pm 0,3$	$-15 \pm 0,2$	<i>R,R</i> ; <i>S,S</i>
	~6,5	2470 ± 140	2710 ± 160	$-28 \pm 0,5$	$-29 \pm 0,5$	<i>R,R</i> ; <i>S,S</i>
SP- β -CD	~4	3940 ± 320	4360 ± 350	$-22 \pm 0,2$	$-22 \pm 0,2$	<i>R,R</i> ; <i>S,S</i>
	~2	2330 ± 70	2490 ± 60	$-20 \pm 0,1$	$-20 \pm 0,1$	<i>R,R</i> ; <i>S,S</i>
SHP-β-CD	~2,5	1210 ± 20	1350 ± 70	$-11 \pm 0,08$	$-11 \pm 0,1$	<i>S,S</i> ; <i>R,R</i>
CM-β-CD	~3	7510 ± 460	8140 ± 480	$-17 \pm 0,1$	$-17 \pm 0,1$	<i>S,S</i> ; <i>R,R</i>
CE-β-CD	~3	3810 ± 210	3830 ± 220	$-3,6 \pm 0,1$	$-3,8 \pm 0,1$	<i>S,S</i> ; <i>R,R</i>
Phos-β-CD	~4	6480 ± 200	6740 ± 85	$-23 \pm 0,1$	$-24 \pm 0,1$	<i>S,S</i> ; <i>R,R</i>

a: a határmobilitás számítása nagy hibával terhelt

Az α -CD származékok stabilitása nem érte el a $K = 600 \text{ M}^{-1}$ -t, a β származékoké általában egy nagyságrenddel nagyobbak adódtak. A töltéssel nem rendelkező CD-k csekély affinitást mutattak a kationos tapentadol felé, azonban kiemelkedő stabilitást tapasztaltunk az anionos oldalláncú karboximetil- β -CD és foszfátalt- β -CD esetén. Ez a tapentadol és a királis szelektor oldalláncai között kialakuló elektrosztatikus és hidrogénhidias kölcsönhatásokra utal. Annak ellenére, hogy a tapentadol affinitása a β származékok iránt jóval nagyobb, vagyis azok üregméretébe jobban tud illeszkedni a tapentadol molekula, az α -CD származékok esetén jobb az enantiomerek elválasztása. Valószínűleg nem az üregben, hanem az oldalláncok szintjén létrejövő kölcsönhatások a lényegesek a királis felismerés szempontjából.

A S- α -CD esetében tapasztalható kiugróan nagy felbontás ($R_S = 16,18$) létrejöttében mind a komplexstabilitások különbsége, mind a határmobilitások különbsége meghatározó. A többi szelektor esetén elsősorban stabilitáskülönbség felelős az elválasztásért, mivel határmobilitások értékei szinte azonosak.

CM- β -CD és CM- α -CD esetén eltérő migrációs sorrendet tapasztaltunk, melyet a következő fejezet részletez. Ennek pontosabb megértése érdekében CM- β -CD és CM- α -CD esetén meghatároztuk a négy sztereoizomerre vonatkozó látszólagos komplexstabilitási állandókat a 0,01-20 mM koncentráció tartományban pH 9,5 borátpufferben. Az eredményeket a 19. táblázat foglalja össze.

19. táblázat: A tapentadol-CD komplexstabilitási állandók, a sztereoizomerek migrációs sorrendje, valamint a komplexek határmobilitása

CD	K_{stab1}	K_{stab2}	K_{stab3}	K_{stab4}	EMO
CM- α -CD	490 ± 40	620 ± 40	860 ± 60	1080 ± 90	R,R-, SS-, S,R-, R,S-
CM- β -CD	3400 ± 300	3600 ± 300	18000 ± 1000	35000 ± 3000	S,S-, R,R-, R,S-, S,R-

CD	μ_{kplx1} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)	μ_{kplx2} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)	μ_{kplx3} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)	μ_{kplx4} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)
CM- α -CD	$-16,07 \pm 0,56$	$-16,35 \pm 0,45$	$-17,1 \pm 0,46$	$-17,74 \pm 0,48$
CM- β -CD	$-18,48 \pm 0,62$	$-18,7 \pm 0,72$	$-18,73 \pm 0,42$	$-19,18 \pm 0,39$

CM- β -CD esetén hozzávetőlegesen tízszer akkora volt a komplexek stabilitása, mint CM- α -CD esetén. A *S,R* izomer egy nagyságrenddel nagyobb affinitást mutatott a CM- β -CD iránt, mint a *S,S*-tapentadol. A CM- α -CD esetén a komplexek stabilitáskülönbsége kevésbé jelentős, viszont a határmobilitások eltérése a CD szelektivitását jelentősen növelheti.

Tadalafil

A tadalafil esetében tizenkilenc negatív és három pozitív CD származékot vizsgáltunk a 0,1-20 mM koncentráció tartományban 50 mM Tris-ecetsav (pH 4,75) háttérelktrolitban. A számított komplexstabilitási állandókat (K_{stab1} , K_{stab2} , K_{stab3} , K_{stab4} az elsőként, másodikként, harmadikként és negyedikként migráló enantiomerre) valamint a komplexek határmobilitását (μ_{kplx1} , μ_{kplx2} , μ_{kplx3} , μ_{kplx4}) a 20. és 21. táblázat foglalja össze.

20. táblázat: A tadalafil-CD komplexstabilitási állandók valamint a sztereoizomerek migrációs sorrendje

CD	K_{stab1}	K_{stab2}	K_{stab3}	K_{stab4}	EMO
S-α-CD	210 \pm 80	110 \pm 60	70 \pm 35	105 \pm 45	R,R ; <i>S,S</i> ; <i>R,S</i> ; <i>S,R</i>
SP-α-CD	130 \pm 30	115 \pm 20	120 \pm 30	110 \pm 25	<i>R,S</i> ; <i>S,R</i> ; R,R ; <i>S,S</i>
SBE-α-CD	190 \pm 15	200 \pm 15	275 \pm 15	325 \pm 10	<i>R,S</i> ; <i>S,R</i> ; <i>S,S</i> ; R,R
CM-β-CD	145 \pm 10	265 \pm 10	290 \pm 25	510 \pm 25	<i>S,S</i> ; R,R ; <i>S,R</i> ; <i>R,S</i>
CE-β-CD	340 \pm 100	580 \pm 145	1050 \pm 200	1350 \pm 150	<i>S,S</i> ; R,R ; <i>S,R</i> ; <i>R,S</i>
Succ-β-CD	630 \pm 40	1090 \pm 175	1650 \pm 400	2300 \pm 600	<i>S,S</i> ; R,R ; <i>S,R</i> ; <i>R,S</i>
S-β-CD	110 \pm 45	125 \pm 45	140 \pm 40	150 \pm 55	<i>S,S</i> ; <i>S,R</i> ; R,R ; <i>R,S</i>
SP-β-CD	195 \pm 10	340 \pm 30	890 \pm 50	1250 \pm 50	<i>S,S</i> ; R,R ; <i>S,R</i> ; <i>R,S</i>
SHP-β-CD	250 \pm 30	400 \pm 40	675 \pm 55	1000 \pm 75	<i>S,S</i> ; R,R ; <i>S,R</i> ; <i>R,S</i>
MA-β-CD	535 \pm 30	365 \pm 35	280 \pm 45	210 \pm 55	<i>R,S</i> ; <i>S,R</i> ; R,R ; <i>S,S</i>
PA-β-CD	530 \pm 55	375 \pm 45	255 \pm 10	235 \pm 65	<i>R,S</i> ; <i>S,R</i> ; R,R ; <i>S,S</i>
IPA-β-CD	310 \pm 70	225 \pm 60	150 \pm 40	110 \pm 25	<i>R,S</i> ; <i>S,R</i> ; R,R ; <i>S,S</i>

21. táblázat: A tadalafil-CD komplexek határmobilitása

CD	μ_{kplx1} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	μ_{kplx2} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	μ_{kplx3} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	μ_{kplx4} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
S- α -CD	-3,55 ± 0,45	-4,75 ± 0,60	-6,65 ± 0,65	-7,45 ± 0,30
SP- α -CD	-10,30 ± 0,60	-12,10 ± 0,65	-13,40 ± 0,55	-14,10 ± 0,45
SBE- α -CD	-30,05 ± 0,40	-30,45 ± 0,70	-30,50 ± 0,60	-30,40 ± 0,40
CM- β -CD	-21,45 ± 0,65	-21,45 ± 0,25	-21,25 ± 0,75	-21,50 ± 0,30
CE- β -CD	-9,30 ± 0,55	-9,30 ± 0,65	-9,40 ± 0,45	-9,90 ± 0,30
Succ- β -CD	-12,05 ± 0,25	-12,25 ± 0,45	-12,65 ± 0,55	-12,80 ± 0,55
S- β -CD	-6,10 ± 0,40	-10,50 ± 0,50	-13,85 ± 0,60	-15,44 ± 0,65
SP- β -CD	-35,36 ± 1,71	-29,81 ± 0,84	-26,92 ± 0,71	-26,04 ± 0,44
SHP- β -CD	-14,60 ± 0,75	-14,95 ± 0,50	-15,00 ± 0,35	-15,25 ± 0,25
MA- β -CD	8,30 ± 0,15	8,20 ± 0,25	7,20 ± 0,45	6,35 ± 0,70
PA- β -CD	7,90 ± 0,25	7,70 ± 0,25	6,95 ± 0,10	5,75 ± 0,60
IPA- β -CD	9,00 ± 0,70	9,20 ± 0,60	8,50 ± 0,70	8,25 ± 0,45

Phos- β -CD és SBE- β -CD esetén a komplexstabilitás meghatározása nem volt lehetséges a hosszú analízisidők okozta csúcstorzulások miatt. A β -CD származékok az α -CD származékoknál stabilabb komplexeket képeztek, ez alapján a β -CD származékok üregének mérete a leginkább megfelelő a tadalafil izomerekkel történő komplexképzéshez. A vizsgált körülmények között a legstabilabb komplexet a szukcinil- β -CD alakította ki (K_{stab4} 2300) az utolsóként migráló *R,S* izomerrel (a migrációs sorrendet a későbbiekben részletesen tárgyaljuk). A pozitív töltésű β -CD származékok a negatív töltésűeknél valamivel gyengébb komplexeket képeztek.

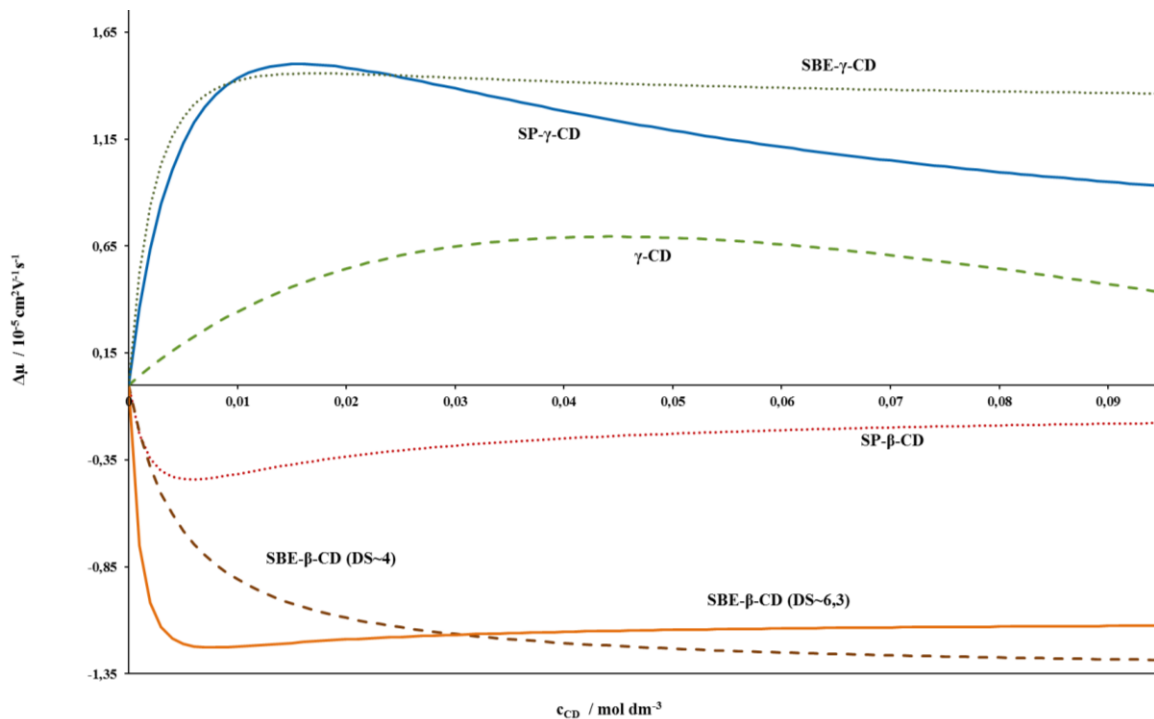
A komplexek határmobilitásai az α -CD származékok közül a S- α -CD, a β származékok közül pedig a CE- β -CD esetében voltak (abszolút értékben) a legkisebbek. Az α származékok esetén a komplexek határmobilitásának növekedése az alábbi sorrendet mutatja: S- α -CD, SP- α -CD, végül a kimagasló SBE- α -CD. A határmobilitás növekedését az üregméret növelésével (S- α -CD helyett S- β -CD), illetve a szubsztituens cseréjével (CE- β -CD helyett CM- β -CD) is el tudtuk érni.

A ciklodextrinek a tadalafil enantiomerek elválasztásának mechanizmusa alapján több csoportba sorolhatók. SBE- α -CD, CM- β -CD, CE- β -CD, Succ- β -CD, SHP- β -CD és IPA- β -CD esetén a sztereoizomerek komplexstabilitási állandóiban jelentős eltérés látható,

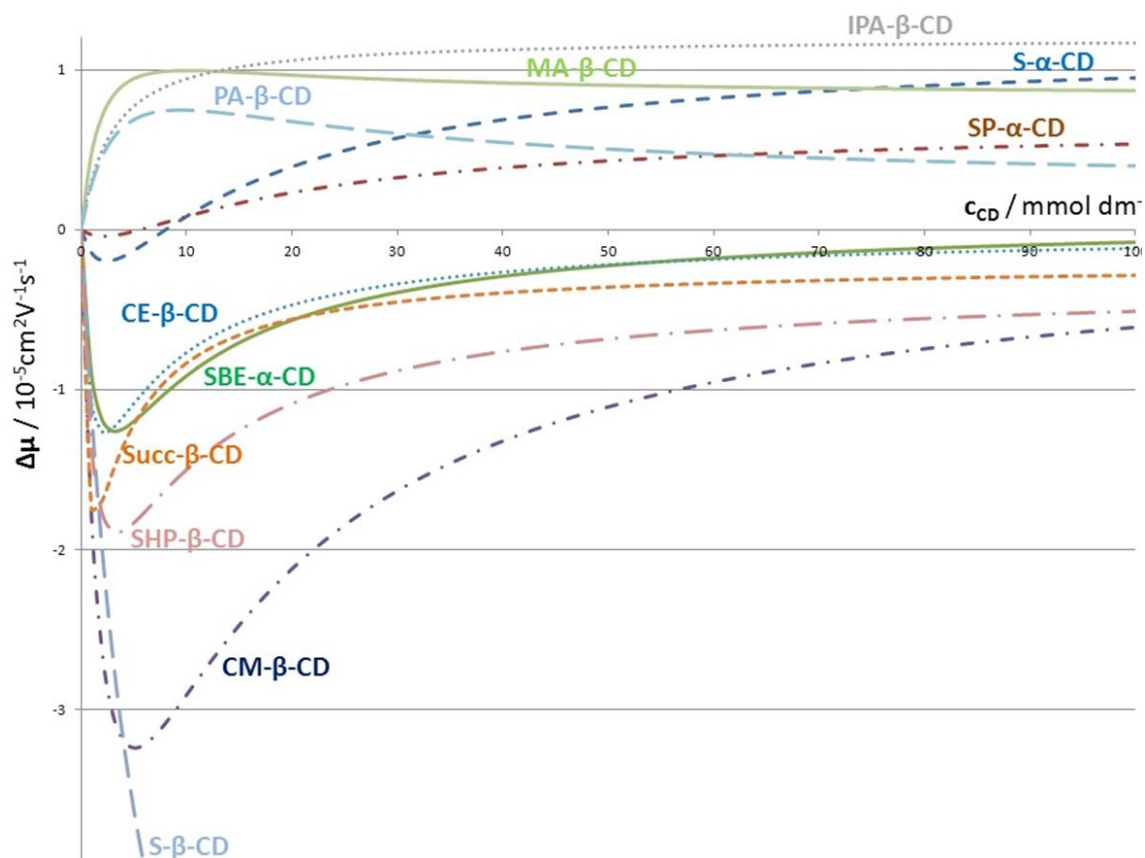
míg a komplexek határmobilitásukban alig különböznek: az elválasztás alapját a képződő komplexek eltérő stabilitása adja. SP- α -CD és S- β -CD esetén a látszólagos komplexstabilitási állandókban nincs jelentős eltérés, azonban a határmobilitások igen különbözöek. A többi CD esetén a két hatás együttesen felelős az elválasztásért.

Az enantiomerek $\Delta\mu$ mobilitás különbségét az *R*- és *S*-alogliptin esetén hat (20. ábra), az *R,R*- és *S,S*-tadalafil esetén tizenkét CD rendszerre (21. ábra) modelleztük az (1) egyenletnek megfelelően.

Azok a CD-k, melyek nagyobb $\Delta\mu$ különbségeket mutatnak, az enantiomerek nagyobb mértékű elválasztására lesznek képesek. Ezek alapján az egyes CD-k által megvalósítható legnagyobb elválasztást a görbék szélsőértékéhez tartozó CD koncentráció mellett érjük el, ami tehát kijelöli az optimális CD koncentrációt. Alogliptin esetén a SBE- β -CD (DS~6,3) görbe maximuma az 5 mM optimális CD koncentrációt jelzi előre, melyet később a méréseink megerősítettek. Továbbá megállapítható, hogy γ -CD esetén relatív nagy szelektorkoncentráció szükséges az enantiomerek elválasztásához.



20. ábra: Az enantiomerek közötti mobilitás különbség ($\Delta\mu$) az *R*- és *S*-alogliptin esetén



21. ábra: A $\Delta\mu$ mobilitáskülönbség *R,R*- és *S,S*-tadalafil esetén

A tadalafil enantiomerekre a legnagyobb $\Delta\mu$ különbségeket CM- β -CD és S- β -CD esetén tapasztaltunk. Az optimális CD koncentráció CM- β -CD esetén a vizsgált koncentrációtartományba esett (5 mM körül), míg S- β -CD esetén további CD koncentrációnövelésre lenne szükség a maximális felbontás eléréséhez. A két CD közti különbség oka az eltérő komplexstabilitásokból (illetve határmobilitásokból) adódik: a CM- β -CD affinitása a tadalafil iránt erősebb, így kisebb CD koncentrációra van szükség az elválasztáshoz.

A $\Delta\mu$ ábrázolás továbbá segít értelmezni az enantiomerek migrációs sorrendjének (EMO) változását, ugyanis pozitív $\Delta\mu$ esetén az (1) egyenletben 2-vel jelölt enantiomer migrál gyorsabban, míg negatív értékek esetén a másik, ezt a következő fejezetben tárgyaljuk részletesen.

4.2.4. Az izomerek migrációs sorrendje (EMO)

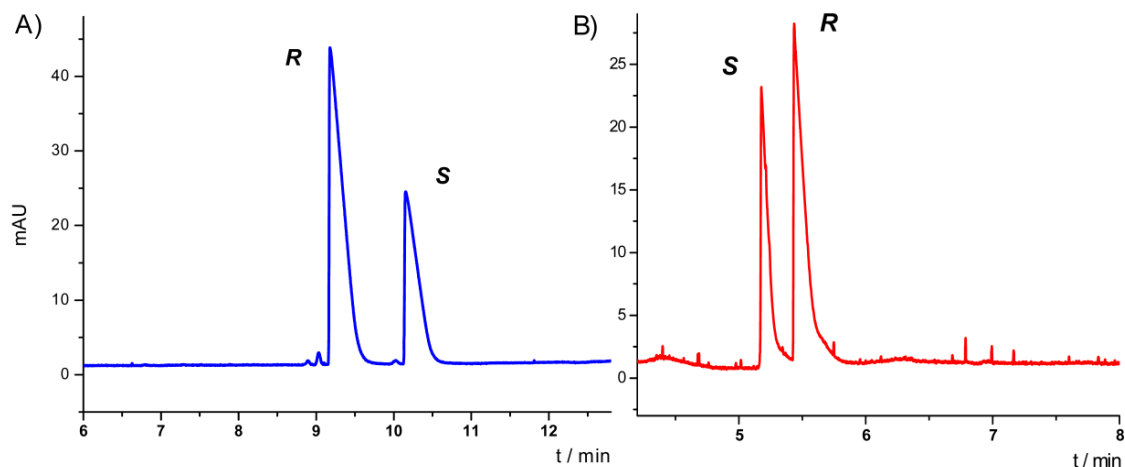
Az enantiomerek migrációs sorrendjének megfordulása a királis szelektor módosítása által előidézhető legdrámaibb változás. A szelektor akár legkisebb szerkezeti módosítása (üregméret, szubsztituens típusa illetve helyzete) is nagy hatással lehet a királis felismerésre és a migrációs sorrendet megfordíthatja [163, 175, 176, 299, 300]. Az elválasztás mellett az enantiomerek migrációs sorrendje igen nagy jelentőséggel bír a királis analízis szempontjából, mivel a főcsúcs zavarhatja a minor komponens vizsgálatát a rendszer túlterhelése illetve a csúcstorzulás esetén [301].

Az enantiomerek (sztereoizomerek) migrációs sorrendjének meghatározása az ismert enantiomer racém mintához történő hozzáadásával vagy az enantiomerek törzsoldatainak különböző arányú összemérésével történt.

Alogliptin

Üregméret-függő EMO változást tapasztaltuk β -CD származékok és γ -CD származékok esetén: az *R* enantiomer gyorsabban vándorol a β -CD származékokkal, míg az *S* enantiomer migrál elsőként γ -CD származékokat alkalmazva az enantiomerekhez történő különböző kötődési affinitásnak köszönhetően. A $\Delta\mu$ görbék (20. ábra) vizualizálják az EMO változást: minden β -CD származék negatív $\Delta\mu$ értékekkel, míg minden γ -CD származék pozitív értékekkel rendelkezik. A 20. ábra jól mutatja, hogy a szulfobutil-éter-CD származékok közül a γ -CD származék esetén az *R*-, *S*-alogliptin a migrációs sorrend, míg az *S*-alogliptin izomer nagyobb határmobilitásának köszönhetően megváltozik a migrációs sorrend β -CD származék esetén: *S*-, *R*-alogliptin (22. ábra).

Annak érdekében, hogy kis mennyiségű disztomer is kimutatható legyen a β -CD származékokat tartalmazó rendszerek ideálisak, ugyanis ekkor teljesül, hogy az *S* enantiomer (potenciális szennyező) éri el a detektort először, az *R* enantiomer előtt. A β -CD származékok közül a legjelentősebb $\Delta\mu$ értékkel a SBE- β -CD (DS~6,3) rendelkezik, így ezt a szelektort választottuk a további módszeroptimalizáláshoz.



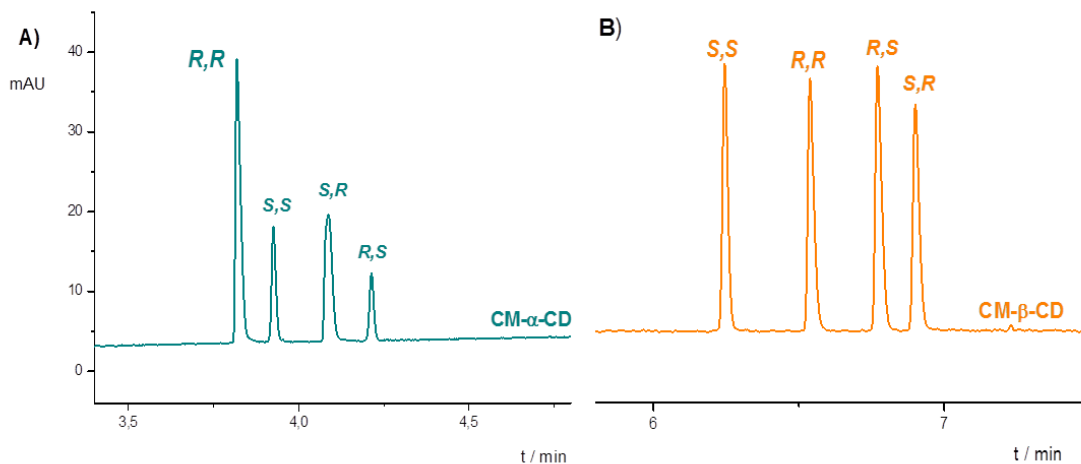
22. ábra: Üregméret-függő migrációs sorrendváltozás az alogliptin enantiomerekre A) 12 mM SBE- γ -CD (DS~4) és B) 3 mM SBE- β -CD (DS~10,4) esetén

Tapentadol

Tapentadol enantiomerek esetén az ideális migrációs sorrend: *S,S*-tapentadol, *R,R*-tapentadol. Ezt a kritériumot a SHP- β -CD, a CE- β -CD, a CM- β -CD és a Phos- β -CD teljesítette, míg a TRIME- β -CD, a SBE- β -CD és a SP- β -CD esetén fordított enantiomer migrációs sorrendet tapasztaltunk. A CD-oldalláncon egy hidroxicsoport változtatásával (SP- β -CD és SHP- β -CD) EMO megfordulása érhető el. Az α -CD származékok közül egyedül a kimagaslóan nagy felbontási értékkel rendelkező S- α -CD volt képes ideális (*S,S*, *R,R*) EMO mellett az enantiomerek elválasztására. Ez a S- α -CD rendszer alkalmas lehet a további módszeroptimalizáláshoz.

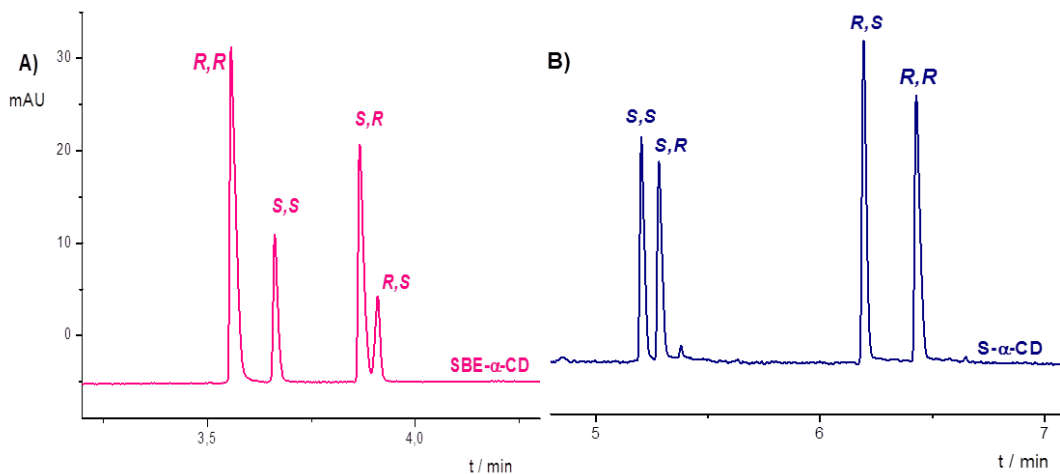
A négy sztereoizomerre vonatkozó migrációs sorrendet a CE- β -CD, CM- β -CD, CM- α -CD, SBE- α -CD, S- α -CD, S- β -CD, S- γ -CD származékokkal vizsgáltuk savas (pH 2,50 foszfátpuffer) és bázikus (pH 9,5 borátpuffer) körülmények között.

CM- β -CD-nel és CE- β -CD-nel is az *S,S*, *R,R*, *R,S*, *S,R* migrációs sorrend adódott. A β -CD származékokkal ellentétben a CM- α -CD (és a SBE- α -CD) esetén a migrációs sorrend mindkét enantiomerpárra megfordult (*R,R*-, *S,S*-, *S,R*-, *R,S*-tapentadol) lúgos körülmények között. A CM- α -CD és CM- β -CD esetén a sorrend változásának oka a CD-k méretbeli különbsége, üregméret-függő migrációs sorrendváltozást jött létre (23. ábra).



23. *ábra:* Üregméret-függő migrációs sorrendváltozás a tapentadol sztereoisomerekre A) 15 mM CM- α -CD és B) 0,7 mM CM- β -CD esetén

Az α -CD származékok között szubsztituensfüggő migrációs változást tapasztaltunk SBE- α -CD (R,R -, S,S -, S,R -, R,S -tapentadol) és S- α -CD (S,S -, S,R -, R,S -, R,R -tapentadol) esetén (24. *ábra*). Ez is megerősíti a 18. táblázat diszkussziójánál leírtakat, miszerint a CD-oldallánccal való kölcsönhatás kulcsfontosságú a tapentadol királis elválasztása során.



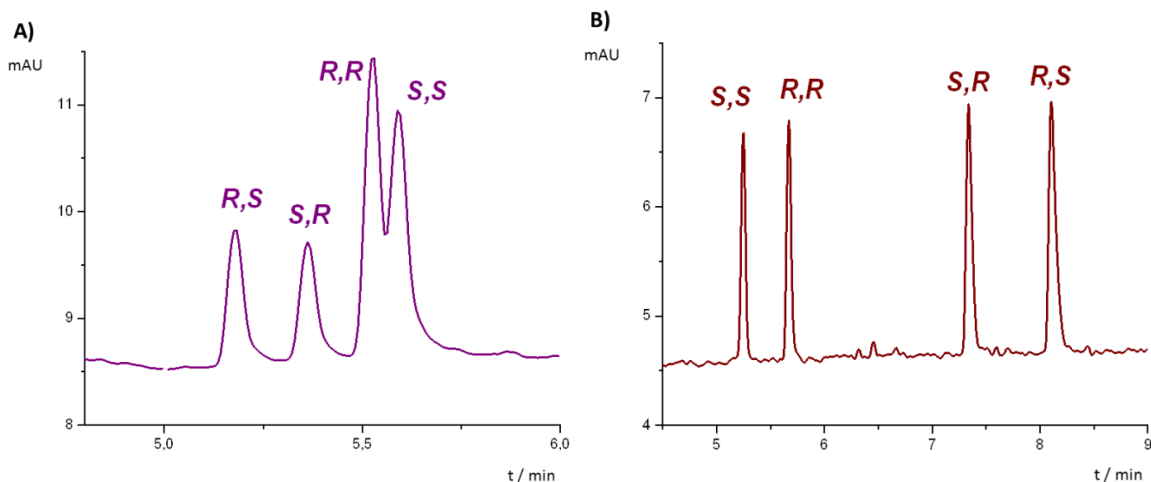
24. *ábra:* CD-szubsztituensfüggő migrációs sorrendváltozás a tapentadol sztereoisomerekre A) 15 mM SBE- α -CD és B) 0,5 mM S- α -CD esetén

A sztereoisomerek elválasztására és a minor királis szennyezők kimutatására az a rendszer az ideális, ahol az eutomer csúcs migrál utolsóként. Több CD esetén is teljesült az ideális *S,S* *R,R* EMO, bár a vizsgált rendszerek közül négy sztereoisomerre egyedül a *S*- α -CD esetén teljesült az (*S,S*, *S,R*, *R,S*, *R,R*) migrációs sorrend lúgos körülmények között, így ezt a rendszert választottuk a további módszeroptimalizáláshoz.

Tadalafil

A CE mérések alapján általánosan elmondható, hogy a negatív CD származékok esetén a nagyobb látszólagos komplexstabilitási állandóval rendelkező izomer migrált utolsóként, míg a pozitív CD származékok esetén a sorrend fordított volt. Nyilvánvaló, hogy ezt a jelenséget tovább finomította a komplexek határmobilitás különbsége.

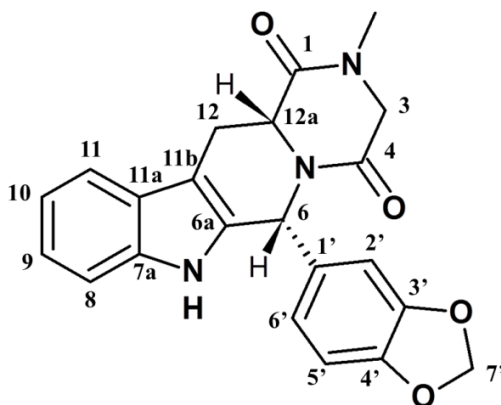
Üregméret-függő migrációs sorrendváltozást tapasztaltunk SP- α -CD és SP- β -CD esetén (25. ábra). 20 mM SP- α -CD –t alkalmazva a leggyorsabban migráló sztereoisomer az *R,S* melyet a *S,R*, *R,R* és a *S,S* izomer követ. 1 mM SP- β -CD esetén a migrációs sorrend megfordul: *S,S*; *R,R*; *S,R* és *R,S* a két CD eltérő királis felismerő képességének köszönhetően.



25. ábra: Üregméret-függő migrációs sorrendváltozás a tadalafil sztereoisomerekre A) 20 mM SP- α -CD és B) 1 mM SP- β -CD esetén

Az elválasztás, valamint az *R,R* és az *S,S* enantiomer SP- α -CD és SP- β -CD esetén tapasztalt üregméret-függő migrációs sorrendváltozás mechanizmusának mélyebb megismerése érdekében ^1H NMR vizsgálatokat végeztünk. Az NMR technikák közül a mag-Overhauser

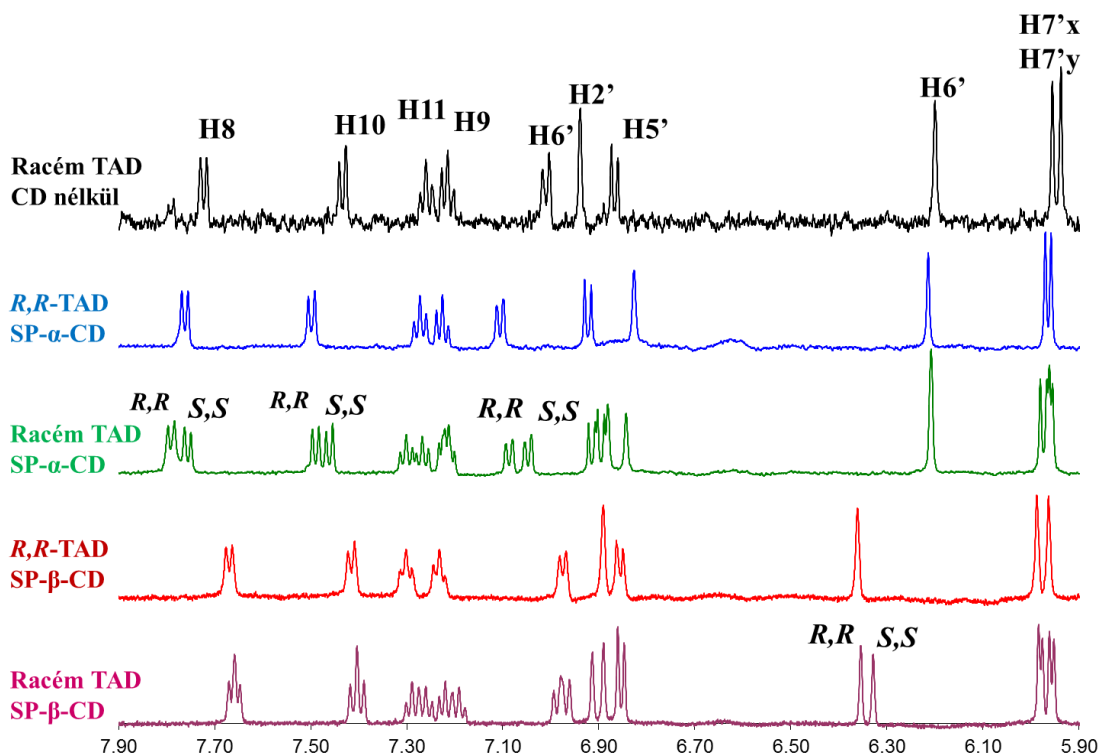
hatáson (NOE) alapuló kísérletek a leggyakrabban alkalmazott NMR-alapú mérések gazdavidék kölcsönhatások szerkezeti jellemzésére [176, 275]. A tadalafil gyenge vízdoldhatósága azonban lehetőségeinket leszűkítette, mert az NMR NOE mérésekhez szükséges koncentrációtartományban és mólarányokban nem lehetett oldatot készíteni. Ezért komplexképződés okozta kémiai eltolódás-változásokat mértünk SP- α -CD és SP- β -CD esetén a migrációs sorrend változás okának atomi szintű megismerése érdekében. A könnyebb követhetőségért az *R,R*-tadalafil számozott szerkezeti képlete a 26. ábrán látható.



26. ábra: Az *R,R*-tadalafil szerkezeti képlete

A tadalafil sztereoizomerek ^1H NMR hozzárendelése CDCl_3 -ban és $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (80:20) elegyben megtalálható az irodalomban [43, 302]. Kiegészítésükként méréseinket (tadalafilre 1 mg/ml) 100% CD_3OD oldatokban végeztük, ahol a ^1H -spektrum jel/zaj aránya előnyösebbnek bizonyult a CD komplexképzés vizsgálatára. A komplexképződés okozta kémiai eltolódás változások (pl. SP- α -CD hozzáadás hatására) azt mutatták, hogy ebben a közegben csak gyenge komplexek jönnek létre. NMR segítségével akkor nyerhető atomi szintű információ a CE-ben megvalósított enantiomer elválasztásokról, ha a két módszer kísérleti paraméterei minél inkább hasonlítanak. Ezek alapján az NMR méréseket $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{OD}$ 95:5 v/v elegyben folytattuk, ahol a szubmillimólos teljes tadalafil koncentráció (sztereoizomerek összege) következtében a legegyszerűbb ^1H NMR spektrumokra kellett támaszkodnunk. A komplexképződés okozta kémiai eltolódás változások ($\Delta\delta = \delta_{\text{komplex}} - \delta_{\text{szabad}}$) alapján a kölcsönhatásban leginkább érintett protonok azonosíthatóak [176, 275]. A CE mérések (20. táblázat) alapján látható, hogy az elválasztás hajtóereje a SP- β -CD esetén a komplexek eltérő stabilitása, míg SP- α -CD esetén eltérő

mobilitásuk. Az eltérő kölcsönhatások vizsgálatára racém, illetve az eutomer *R,R*-tadalafil ^1H NMR spektrumát hasonlítottuk össze CD nélkül és százszoros mólfeleslegű SP- α -CD, illetve SP- β -CD jelenlétében (27. ábra). A kémiai eltolódásokat és a $\Delta\delta$ értékeket a 22. táblázat foglalja össze.



27. ábra: Racém tadalafil valamint az *R,R*-tadalafil ^1H NMR spektruma CD nélkül és kb. százszoros mólarányú SP- α -CD illetve SP- β -CD jelenlétében

22. táblázat: A kémiai eltolódások és a $\Delta\delta$ értékek ppm-ben racém tadalafil esetén CD nélkül, valamint az eutomer, illetve a racemátban mindkét enantiomer esetén SP- α -CD illetve SP- β -CD jelenlétében

		H6	H8	H9	H10	H11	H2'	H5'	H6'	H7'x	H7'y
-	racemát	6,2	7,433	7,214	7,26	7,723	6,939	6,867	7,009	5,955	5,937
SP- α -CD	<i>R,R</i>	6,214	7,498	7,225	7,272	7,762	6,826	6,923	7,105	5,97	5,958
	<i>R,R</i> (rac)	6,207	7,489	7,22	7,267	7,756	6,842	6,914	7,086	5,966	5,954
	<i>S,S</i> (rac)	6,207	7,461	7,213	7,3	7,79	6,881	6,895	7,046	5,961	5,98
	$\Delta\delta$ <i>R,R</i>	0,007	0,056	0,006	0,007	0,033	-0,097	0,047	0,077	0,011	0,017
	$\Delta\delta$ <i>S,S</i>	0,007	0,027	-0,001	0,04	0,067	-0,058	0,028	0,037	0,006	0,043
SP- β -CD	<i>R,R</i>	6,361	7,415	7,231	7,301	7,67	6,891	6,856	6,974	5,987	5,963
	<i>R,R</i> (rac)	6,355	7,411	7,22	7,289	7,664	6,89	6,853	6,976	5,984	5,962
	<i>S,S</i> (rac)	6,329	7,396	7,191	7,26	7,653	6,913	6,853	6,986	5,976	5,952
	$\Delta\delta$ <i>R,R</i>	0,155	-0,022	0,006	0,029	-0,059	-0,049	-0,014	-0,033	0,029	0,025
	$\Delta\delta$ <i>S,S</i>	0,129	-0,037	-0,023	0	-0,07	-0,026	-0,014	-0,023	0,021	0,015

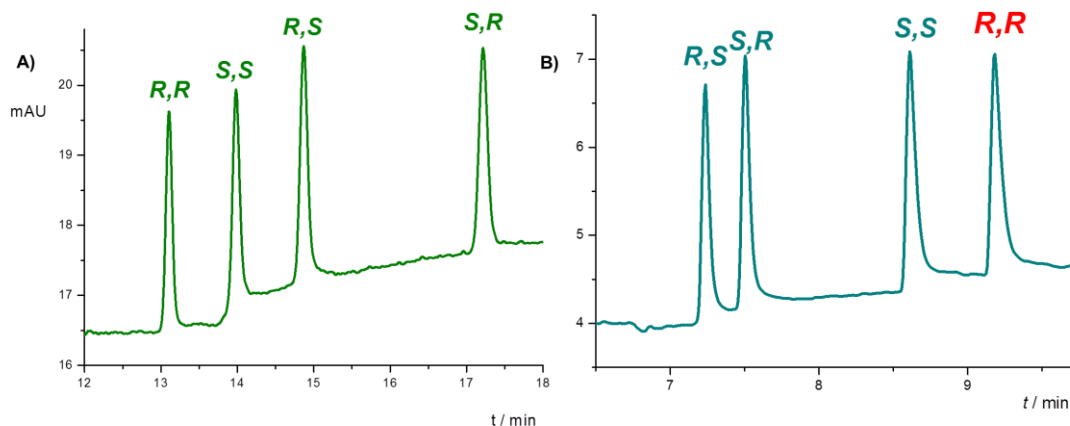
Mivel nem tapasztaltunk jelentős eltérést a kémiai eltolódásokban az eutomert egyedül vagy a racemátot alkalmazva a $\Delta\delta$ -értékek számításához a racemát oldat kémiai eltolódás különbségeit használtuk CD jelenlétében és nélküle.

SP- α -CD esetén jelkettőződést (kb. 0,03 ppm) tapasztaltunk a két fenil gyűrű mind a hét CH protonja esetén, de a H6 metin proton esetén nem. SP- β -CD esetén az enantiomerek aromás protonjainak $\Delta\delta$ értékei kevésbé különböztek, viszont H6 jele királisan felhasad. Továbbá a vizsgált rezonanciák közül ez a proton mutatta a legnagyobb komplexképződés okozta kémiai eltolódás-változást (0,155 és 0,129 ppm az *R,R*- és az *S,S*-tadalafil esetén). Ez egyértelműen arra utal, hogy a SP- α -CD és a SP- β -CD eltérő szerkezetű komplexet alakít ki a tadalafillel. A kölcsönhatások különbözőségét bizonyítja továbbá a komplexképződés okozta kémiai eltolódás különbségek eltérő iránya: SP- α -CD esetén pozitív $\Delta\delta$ értékeket, míg SP- β -CD esetén főként negatív $\Delta\delta$ értékeket kaptunk. A két enantiomer közötti $\Delta\delta$ értékek nagysága is eltérő a két CD rendszerben. A H8, H9 és H10 ellentétes tendenciát mutat az *R,R* és az *S,S*-tadalafil esetén. Azt is érdemes megjegyezni, hogy míg a két rendszerben az elválasztás hajtóereje különböző (K_{stabRR}/K_{stabSS} csak 1,09 SP- α -CD esetén, míg 1,74 SP- β -CD esetén), az aromás protonok királis felhasadása mindkét esetben megfigyelhető. A CD hatására (abszolút értékben) összemérhetők az indol rész $\Delta\delta$ értékei, viszont a H6, H2', H5' és H6' $\Delta\delta$ értékei legalább kétszeresre változnak a SP- β -CD esetén. Feltételezhető tehát, hogy főként a benzodioxol rész felelős a migrációs sorrend üregméret-függő változásáért.

A tadalafil sztereoizomerek szubsztituensfüggő migrációs sorrendváltozása volt tapasztalható S- α -CD és SBE- α -CD esetén: 20 mM S- α -CD esetén: *R,R*; *S,S*; *R,S* és *S,R*; míg 10 mM SBE- α -CD esetén *R,S*; *S,R*; *S,S* és *R,R* volt a sorrend (28. ábra).

A CD-gyűrű szubsztituensének cseréjével a kölcsönhatás a vizsgálandó molekula és a királis szelektor között megváltozott, mely a migrációs sorrend változását vonta maga után. A legtöbb negatív töltésű β -CD származék esetén a migrációs sorrend *S,S*; *R,R*; *S,R*; *R,S*-nek adódott, a legstabilabb komplexet az utolsóként migráló *R,S* izomer adta. Pozitív töltésű β -CD származékok esetén annak ellenére, hogy a migrációs sorrend teljesen megfordult (*R,S*; *S,R*; *R,R*; *S,S*) a CD ellentétes töltésének köszönhetően, a

komplexstabilitás ugyanazt a sorrendet mutatta: *R,S* izomer képezte a legstabilabb komplexet (16. és 20. táblázat).



28. ábra: CD-szubsztituensfüggő migrációs sorrendváltozás a tapentadol sztereoizomerekre A) 20 mM SBE- α -CD és B) 10 mM S- α -CD esetén

A $\Delta\mu$ ábrázolás vizualizálja az *R,R*- és *S,S*-tadalafil üregméret-függő és szubsztituensfüggő migrációs sorrend-változását is. Pozitív $\Delta\mu$ esetén a hatásos *R,R* enantiomer migrál gyorsabban, míg negatív értékek esetén a disztomer *S,S* a mozgékonyabb.

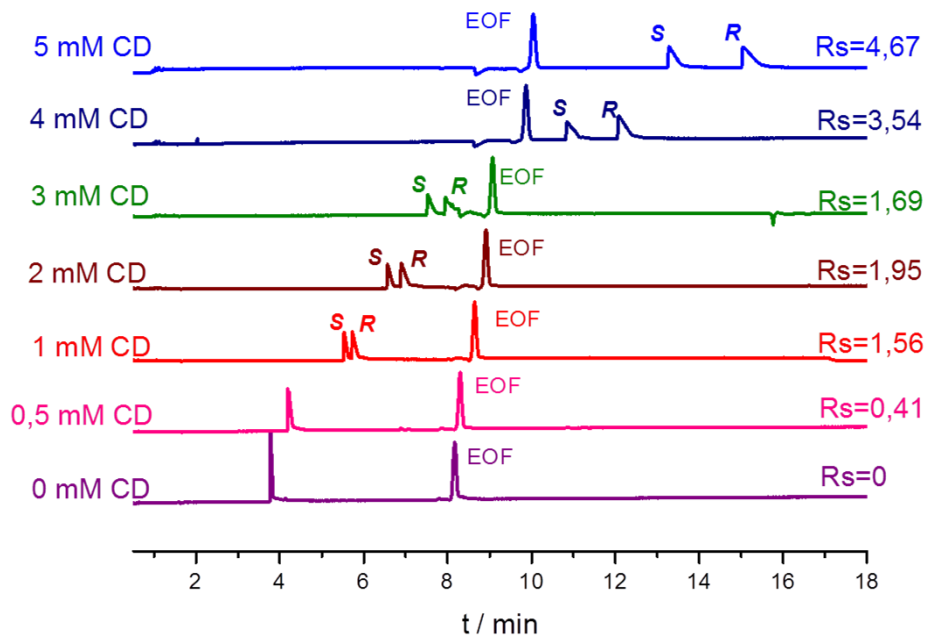
Mivel a főkomponens csúcsa átfedhet a minor komponens(ek)ével, ha nincs megfelelően nagy felbontás vagy a sztereoizomerek migrációs sorrendje nem megfelelő, az EMO alapvető a CE módszerfejlesztés során [193]. Tadalafil esetén tehát az a rendszer optimális a kis mennyiségű királis szennyezők detektálására, ahol az eutomer *R,R*-tadalafil migrál utolsóként. Több CD esetén is teljesült a kívánt EMO, bár a négy sztereoizomerre csak a SBE- α -CD esetében valósítható meg az optimális *R,S*-, *S,R*-, *S,S*-, *R,R*-tadalafil sorrend. Ennek megfelelően a SBE- α -CD-t választottuk a további módszeroptimalizáláshoz.

4.2.5. Módszeroptimalizálás

Alogliptin

Alogliptin esetén a további módszeroptimalizáláshoz a SBE- β -CD-t (DS~6,3) választottuk, a hatékony enantiomer elválasztásnak és az optimális migrációs sorrendnek köszönhetően, továbbá ez a szelektor rendelkezett a legjelentősebb $\Delta\mu$ értékkel (20. ábra). A királis elválasztás optimalizálása érdekében további paramétereket: a CD koncentrációt, a

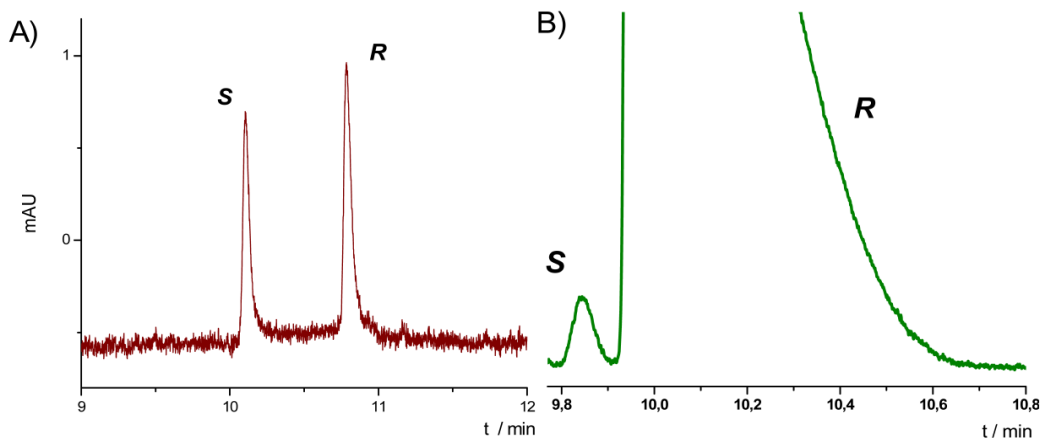
pufferkomponenseket és azok koncentrációját, a pH-t, az alkalmazott feszültséget, a kapilláris hőmérsékletet és az injektálási paramétereket finomítottuk. A CD koncentráció hatását a 0,25 - 10 mM tartományban vizsgáltuk pH 4,75 acetátpufferben (29. ábra). A szelektor koncentrációjának növelésével az enantiomerek elválasztása is javult, mivel az enantiomerek közti mobilitás különbség egyre jelentősebb. Ez azonban együtt járt a csúcsalak torzulásával (uszályosodás, illetve háromszög alakú elektromigrációs diszperzió) és a migrációs idők, így az analízisidő növekedésével. Kompromisszumos megoldásként az 5 mM SBE- β -CD rendszert választottuk.



29. ábra: Az enantiomerek CD koncentrációfüggő felbontása 0-5 mM SBE- β -CD alkalmazásakor

A háttélelektrolit pH-ja befolyásolja a vizsgált protonált amin migrációját és az EOF nagyságát. A BGE összetételének és a pH-jának vizsgálatát különböző pufferekkel végeztük: 5 mM SBE- β -CD-t tartalmazó pH 2,50 (foszfát), pH 4,75 (acetát), pH 5,85 (MES-Tris) és pH 7,00 (foszfát) pufferekkel. A pH növelésével a gyorsabb EOF által csökkent az analízisidő, azonban az alapvonal torzulásával az enantiomerek elválasztása jelentősen romlott. A pH 4,75 acetátpufferben az ellenion hatását is vizsgáltuk: a nátriumionnal jobb jel/zaj arányt és felbontást értünk el, mint Tris esetén. A háttélelektrolit koncentrációját a 15-60 mM tartományban változtatva a 25 mM bizonyult optimálisnak. A

feszültséget növelve (10 és 20 kV között) élesebb csúcsokat és rövidebb analízisidőt kaptunk, azonban a feszültségnövekedés Joule hő termelődéssel járt, mely az enantiomer elválasztás romlásához vezetett. A legjobb eredményeket a 18 kV feszültség szolgáltatta. Az injektálási nyomást 10-50 mbar·4 s között vizsgáltuk és végül a 20 mbar·4 s mellett döntöttünk, mivel ezt tovább csökkentve a csúcsalak javult, de az ismételhetség romlott. A 16°C-os kapilláris hőmérsékleten volt a leginkább ismételhető az elválasztás a 15-35°C tartományban vizsgálva. A háttérelektrolithoz adott szerves módosító javíthatja az enantiomerek elválasztását (kompetitív komplexképzési folyamat révén megváltoztathatják a szelektor-enantiomer komplexek stabilitási állandóit) és a csúcsalakot a kapillárisfallal történő kölcsönhatások, a komplexstabilitási állandók, a viszkozitás illetve a relatív permittivitás módosításán és az apoláris analitok oldékonyságának növelésén keresztül [303]. Esetünkben azonban nem bizonyult előnyösnek sem az acetonitril, sem a metanol az 5-20% v/v koncentráció tartományban alkalmazva, így a szerves módosító alkalmazását elvetettük. A fejlesztett módszer ismételhősége nem bizonyult megfelelőnek, így a prekondicionálási eljárást módosítottuk. 5 percig 0,1 M NaOH-dal, 10 percig vízzel, majd végül 10 percen át a háttérelektrolittal mosva a rendszer alkalmas volt a validálásra. A 30. ábra A) részén látható az optimalizált körülmények között a racemátra felvett elektroferogram (25 mM acetátpuffer pH 4,75, 5 mM SBE- β -CD (DS~6,3), 18 kV, 20 mbar·4 s, 16°C, ahol a felbontás $R_S = 8,39$), valamint a B) részen 0,1% királis szennyező kimutatása.



30. ábra: A) Az optimalizált rendszer elektroferogramja ($R_S = 8,39$); B) 0,1% királis szennyezőt tartalmazó *R*-alogliptin

Az alogliptin enantiomerek elválasztására kidolgozott kapilláris elektroforetikus módszert az ICH irányelvek [291] alapján validáltuk a precizitás, kimutathatósági határ, meghatározhatósági határ, a linearitás és a robusztusság szempontjából.

Precizitás, ismételhetőség (precision, repeatability)

Az 50 µg/ml *R* és *S* enantiomer migrációs idejének relatív standard deviációja 0,93 és 1,18%-nak adódott, míg a korrigált csúcsterületeké 1,08 és 1,14% volt, a két enantiomer közötti felbontás relatív standard deviációja pedig 1,32%. A precizitást további két koncentráció szinten vizsgálva (10 és 200 µg/ml) mindhárom paraméter RSD%-a is 3% alatt maradt. Az ismételhetőséget három koncentráció szinten (10, 50, 200 µg/ml) három egymást követő napon vizsgálva a RSD% értékek nem érték el az 5%-ot.

Kimutatási határ (LOD), meghatározhatósági határ (LOQ)

Mindkét alogliptin enantiomerre vonatkozó 2 µg/ml kimutatási határt állapítottunk meg, míg a meghatározhatósági határ 6 µg/ml-nek bizonyult. Ki kell azonban emelni, hogy érzékeny módszer fejlesztését esetünkben megnehezíti, hogy a molekula gyenge UV-elnyeléssel rendelkezik.

Linearitás (linearity), mérési tartomány (range)

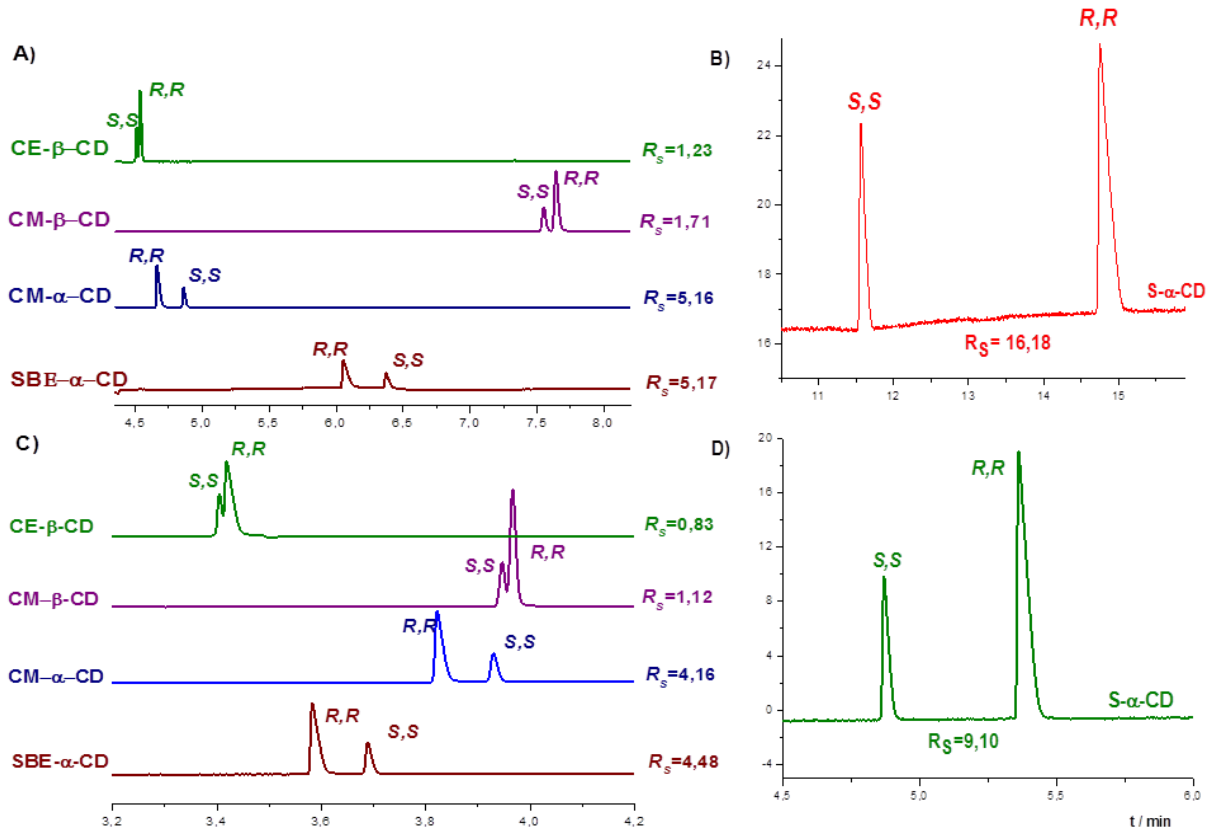
A regressziós egyenest a 6 - 250 µg/ml koncentráció tartományban legkisebb négyzetek módszere szerint számítottuk: $y = 1,1322 x - 0,1416$ az *R* enantiomerre és $y = 0,1200 x - 0,1758$ az *S*-alogliptinre (x a koncentráció µg/ml-ben, az y az enantiomer korrigált csúcsterülete). A determinációs koefficiens (R^2) az *R* enantiomer esetén 0,9997, az *S*-alogliptin esetén 0,9998 volt. A minor enantiomer szennyező meghatározhatóságának vizsgálataként a linearitást kisebb koncentrációtartományban is vizsgáltuk, nagy feleslegben jelen levő major komponens jelenlétében. 0,8 mg/ml *R*-alogliptin mellett az *S* enantiomerre vonatkozó kalibrációs egyenest az 5 - 100 µg/ml (0,6 – 12,5% *S*-alogliptinnek megfelelő) tartományban felvéve $y = 0,0768 x + 0,0366$ adódott, $r = 0,9997$ determinációs együtthatóval.

Robusztusság (robustness)

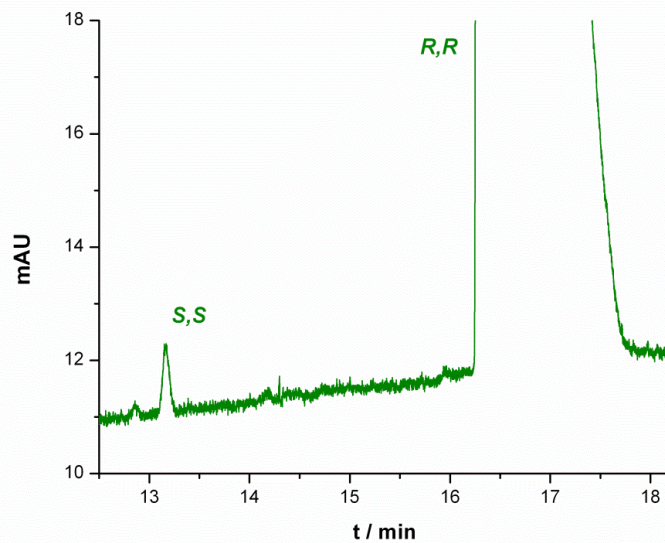
Annak érdekében, hogy a mérések számát minimalizáljuk, a módszer robusztusságának tanulmányozására a Plackett-Burman kísérlettervet alkalmaztuk [292, 293]. A vizsgált paraméterek az enantiomerek migrációs ideje, csúcsterülete és az enantiomerek felbontása voltak. A CD koncentráció, pufferkoncentráció, pH, kapilláris hőmérséklet, feszültség és injektálási nyomás hatását vizsgáltuk az optimális értéknél nagyobb és kisebb beállításnál. Statisztikai analízis alapján a vizsgált kísérleti változók közül egyik sem rendelkezett szignifikáns hatással egyik validálási paraméterre sem, így elmondhatjuk, hogy az optimalizált módszer robusztusnak tekinthető.

Tapentadol

A pH 4,75 BGE mellett az *R,R*- és *S,S*-tapentadol csúcsalakjának és felbontásának változását 50 mM borát (pH 9,00) puffert alkalmazva vizsgáltuk. A pH növelésével gyorsul az EOF, ami rövidebb analízisidőt eredményez, azonban a felbontás jelentős romlásához is vezethet. A pH hatásának vizsgálata céljából öt CD rendszert hasonlítottunk össze pH 4,75 (50 mM Tris-jégecet) és pH 9,00 (50 mM bórsav-NaOH) BGE-t alkalmazva (31. ábra). A mérésekhez kiválasztott ciklodextrinek a CE- β -CD és a CM- β -CD (előnyös *S,S*-, *R,R*-tapentadol EMO, azonban alacsony R_S), a CM- α -CD és a SBE- α -CD (ellentétes EMO, de nagy R_S) és a S- α -CD (előnyös *S,S*-, *R,R*-tapentadol EMO kimagasló felbontással) voltak. Mint ahogy azt vártuk, az analízisidő csökkent, azonban az enantiomerek felbontása is kisebb értékeket szolgáltatott pH 9,00 pufferbebn. EMO változást nem tapasztaltunk, a csúcsalak jelentősen nem változott a pH növelésével.



31. ábra: A pH hatásának vizsgálata: A) CE-β-CD, CM-β-CD, CM-α-CD és SBE-α-CD illetve B) S-α-CD elektroferogramja pH 4,75, míg C) és D) esetben pH 9,0 mellett

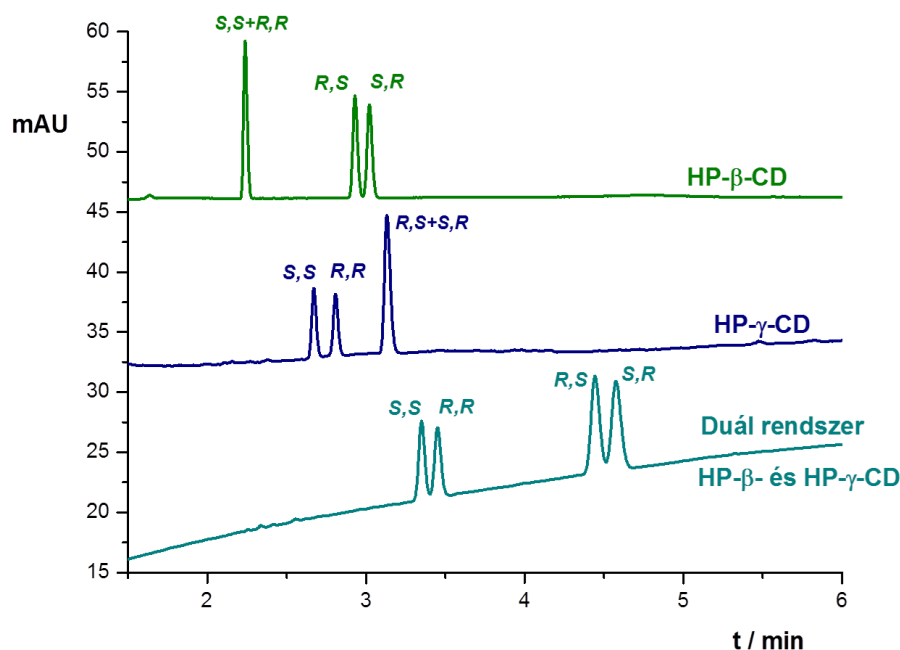


32. ábra: 0,1% királis szennyező kimutatása (12 mM S-α-CD, 50 mM Tris-acetát puffer, pH 4,75)

Az eredmények alapján a SBE- α -CD-t választottuk a két izomerre vonatkozó további módszeroptimalizáláshoz. Mind a pH 4,75, mind a pH 9,0 háttélelektrolitban alkalmas lehet a módszer a disztomer (*S,S*-tapentadol) szennyező kimutatására. A 32. ábrán láthatjuk 0,1% királis szennyező kimutatását 50 mM Tris-acetát puffert (pH 4,75) és 12 mM S- α -CD-t alkalmazva.

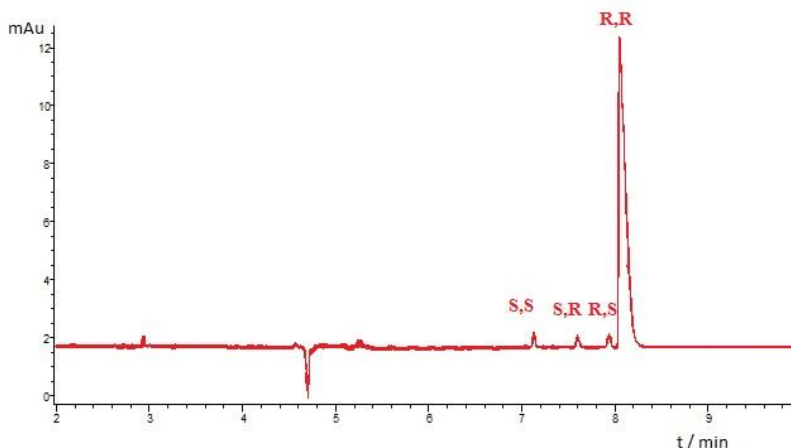
A négy sztereoizomer elválasztására kiterjesztve a vizsgálatokat azt tapasztaltuk, hogy savas körülmények között a hidroxipropil-CD származékok nem mindegyik enantiomerpár elválasztását teszik lehetővé: a HP- β -CD csak az *S,R*- és *R,S*-tapentadolt, míg a HP- γ -CD pedig csak az *R,R*- és *S,S*-tapentadolt választotta el (33. ábra). Ezek a királis szelektorok főként méretükben (illetve szubsztitúciós fokukban) térnek el egymástól, így az enantiomerek elválasztását az üregméret határozza meg. A tipikus duál rendszer CE esetén egy semleges és egy töltéssel rendelkező CD származékból áll [304-308], de elenyésző számú olyan esetet találunk csak, ahol két töltéssel nem rendelkező CD-t használnak az elválasztáshoz. Chinaka és munkatársai [309] alkalmaztak β -CD-t és dimetil- β -CD-t tartalmazó rendszert az amfetamin enantiomerek elválasztására, majd ezt Nhujak és munkatársai [308] egészítették ki elméleti modellekkel a mobilitáskülönbség és az elválasztás szelektivitásának értelmezésével.

A 33. ábra alapján látható, hogy a HP- β -CD-t és a HP- γ -CD-t megfelelő koncentrációban alkalmazva a duál rendszer képes mind a négy sztereoizomer elválasztására. A koncentrációk alapos vizsgálata után az optimálisnak a 4 mM HP- β -CD-t és 35 mM HP- γ -CD-t tartalmazó rendszer bizonyult pH 2,50 foszforsav háttélelektrolitban. A migrációs sorrend (*S,S*-, *R,R*-, *R,S*- és *S,R*-tapentadol) az alkalmazott arányok mellett nem változott.



33. ábra: A csak HP-β-CD-t, csak HP-γ-CD-t valamint a 4 mM HP-β-CD-t és 35 mM HP-γ-CD-t tartalmazó duál rendszer elektroferogramja

A négy sztereoizomerre egyedül a S-α-CD esetén teljesül az ideális S,S-, S,R-, R,S-, R,R-tapentadol migrációs sorrend, így ezt a rendszert választottuk a módszer további optimalizálásához. A S-α-CD koncentráció hatását a 0,5 – 25 mM tartományban vizsgálva optimálisnak az 5 mM S-α-CD koncentráció bizonyult. A BGE koncentrációt (25 mM - 300 mM tartományban) növelve a csúcsterületek és az analízisidő csökkentek, azonban az R,S/R,R izomerek egyre kevésbé váltak el, így a 100 mM borátpuffert találtuk optimálisnak. A pH-t növelve (7,0-10,5 között) az izomerek effektív mobilitása nőtt és a felbontás csökkent. A puffer pH-ját 9,5-re állítva bizonyult a rendszer megfelelőnek a felbontás és az ismételhetőség szempontjából. Ellenionként nátrium, protonált Tris és lítium kationokat alkalmazva az ismételhetőség nátriumion esetén volt a legjobb. Az S,S/S,R és az S,R/R,S pár felbontására a Tris kationjának, míg az S,S/R,R pár felbontására a nátrium- és a lítiumionnak volt előnyös hatása. Az 5 mM S-α-CD-t tartalmazó 100 mM nátrium-borát pH 9,5 puffer rendszer alkalmas lehet 0,15% királis szennyezők meghatározására (34. ábra).



34. ábra: 0,15 % királis szennyezők meghatározása az optimalizált rendszerrel

A kidolgozott módszer részleges validálása a precizitás, kimutathatósági határ, meghatározhatósági határ, a linearitás és a visszanyerhetőség szempontjából történt.

Precizitás, ismételhetőség (precision, repeatability)

Az 50 µg/ml oldat egy napon belüli (intraday precision, n = 5) ismételhetőséget vizsgálva az *S,S*-, *S,R*-, *R,S*-, *R,R*-tapentadol migrációs idejének relatív standard deviációja rendre 0,32; 0,40; 0,38 és 0,34% volt, míg a csúcsterületeké 10,05; 9,03; 9,30 és 10,25%. A napok közti (interday precision, n = 10) ismételhetőség a migrációs időkre 0,66; 0,72; 0,76 és 0,84%-nak, a csúcsterületre 15,31; 13,26; 12,00 és 13,06%-nak adódott.

Kimutatási határ (LOD), meghatározhatósági határ (LOQ)

Mind a négy izomerre vonatkozó kimutatási határt 0,4 µg/ml-nek adódott, míg a meghatározhatósági határ 1 µg/ml-nek bizonyult.

Linearitás (linearity), mérési tartomány (range)

A regressziós egyenest a 1–50 µg/ml koncentráció tartományban (6 koncentráció szinten) a legkisebb négyzetek módszere szerint számítottuk: *S,S*-tapentadol esetén $y = 624,69 x - 0,5503$, determinációs koefficiens értéke (R^2) 0,9989; *S,R*-tapentadol esetén $y = 626,03 x - 0,5914$, $R^2 = 0,9989$; *R,S*-tapentadol esetén $y = 721,31 x - 0,668$, $R^2 = 0,9989$; *R,R*-tapentadol esetén $y = 647,6 x - 0,5975$, $R^2 = 0,999$ (x a koncentráció µg/ml-ben, y a csúcsterület).

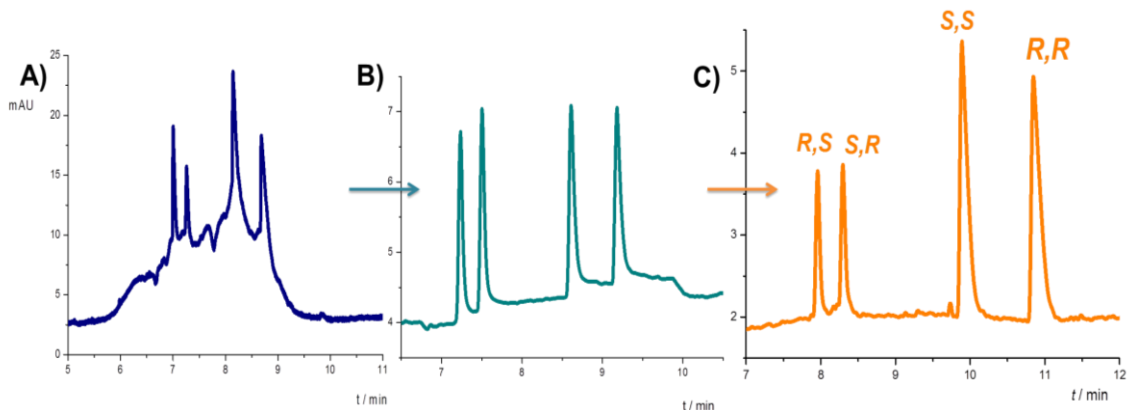
Torzítatlanság (accuracy)

A visszanyerhetőséget három koncentráció szinten vizsgáltuk (1,0 µg/ml, 2,5 µg/ml és 10 µg/ml standard elegy esetén): minden sztereoizomerre legalább 98,8%-os visszanyerhetőséget kaptunk.

Tadalafil

A hatékony enantiomer elválasztásnak és az optimális migrációs sorrendnek köszönhetően a SBE- α -CD rendszer bizonyult ideálisnak a tadalafil sztereoizomerek elválasztására. A királis elválasztás optimalizálása érdekében olyan további paramétereket finomítottunk, mint a CD koncentráció, BGE-összetétel, pH, feszültség és kapilláris hőmérséklet.

A $\Delta\mu$ görbék alapján az optimális CD koncentráció körülbelül 4 mM SBE- α -CD az *R,R*- és az *S,S*-tadalafil elválasztására. A 4 sztereoizomer elválasztására azonban a 7 mM SBE- α -CD előnyösebbnek bizonyult a felbontás, a csúcsalak és az analízisidő szempontjából. Számos puffert vizsgáltunk, végül az analízisidőt és a felbontást szem előtt tartva 75 mM (a 25 - 75 mM tartományban vizsgálva) Tris - ecetsav pH 4,75 BGE bizonyult optimálisnak 25 kV feszültség (10 - 25 kV között vizsgálva) és 25°C (15 - 25°C) mellett. Utolsó lépésként a prekondicionálási eljárás finomításával (3 perc NaOH, 3 perc víz, 5 perc CD nélküli és 5 perc CD-t tartalmazó BGE-vel történő mosás) tudtunk javítani a módszer ismételhetőségén. A módszeroptimalizálás hatását mutatja be a 35. ábra.



35. ábra: A SBE- α -CD rendszer optimalizálásának hatása a csúcsalakra: A) optimalizálás előtti, B) a mintaoldat készítés optimalizálása utáni és C) a mérési körülmények optimalizálása utáni elektroferogram

5. Megbeszélés

A HPLC módszerfejlesztés során szem előtt kellett tartanunk az étrend-kiegészítők és gyógynövény alapú készítmények sokféleségét és komplexitását, továbbá a vizsgált vegyületek eltérő oldhatóságát. A vegyületek különféle készítményekből történő kvantitatív extrakciója egy univerzális oldószerkelet, a metanol:acetonitril 1:1 elegye segítségével volt megoldható. A 14 igen hasonló szerkezettel rendelkező vegyület elválasztása érdekében a kinetikai hatékonyságot maximalizálni kellett, mely héj szerkezetű HPLC töltetek, mint az általunk is választott Kinetex C18 kolonna (illetve gyorskromatográfiás módszerek) segítségével volt lehetséges. A héjszerű töltetek rövid diffúziós úthossza előnyös mind a kinetikai hatékonyság, mind az analízisidő szempontjából, azonban a szemcseméret viszonylag nagy, így 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett is alkalmazható, nem túl nagy nyomásesés mellett. A mozgófázis összetételének optimalizálása során fontos szempont volt a mozgófázis pH kontrollja, ugyanis a bázikus nitrogént tartalmazó vegyületek retenciós tulajdonságait nagymértékben befolyásolja azok protonáltsági állapota. Az MS kompatibilitást is figyelembe véve A-eluensként ammónium-acetát:ecetsav rendszereket, B-eluensként pedig MeOH:ACN különböző arányú kombinációit vizsgáltunk számos gradiens elúciós programot alkalmazva. Gradiens elúciós program alkalmazására azért volt szükség (valamint detektálási hullámhossz megválasztása azért volt nehéz), mert a szerkezetük alapján 14 vizsgált vegyület 5 csoportra osztható, ahol a csoportok UV-spektruma hasonló, viszont a csoportok között jelentős eltérések tapasztalhatóak. Ezek a különbségek és hasonlóságok jól kihasználhatóak a vegyületek azonosítása valamint ismeretlen vegyületek csoportba sorolása során. Az eredmények c. fejezet 14. ábrája az optimalizált rendszerrel regisztrált kromatogramot mutatja be, ahol a SIL a rendszer „közepén” eluálódik. Ez különösen előnyös a kvalitatív és a kvantitatív analízis szempontjából, hiszen a szildenafilfil, mint külső standardot alkalmazzuk. A SIL és a VAR egymás követően jelenik meg a kromatogramon, mely a rendszeralkalmassági vizsgálatok szempontjából fontos: a két vegyület megfelelő felbontása kritérium. A tioszildenafilfil és származékai egy külön csoportot alkotnak a kromatogram végén. Módszerünket az ICH irányelvek szerint validáltuk és sikeresen alkalmaztuk számos gyanús étrend-kiegészítő és gyógynövény-alapú készítmény vizsgálatára. A valódi minták elemzése alátámasztotta, hogy az általunk fejlesztett HPLC-UV módszer a szildenafilfilre vonatkoztatott relatív

retenciók és az UV-spektrumok összehasonlítása segítségével jól használható ismert analógok azonosítására, de ismeretlen származékok szerkezeti-csoportba sorolására, előzetes minőségi és mennyiségi becslésére is alkalmas lehet. Ezt a módszert MS kompatibilitását kihasználva bizonyítottuk is. A módszer további előnye, hogy a kvalitatív meghatározás mellett egyszerre biztosít korrekciós faktorok segítségével kvantitatív meghatározást, ezáltal alkalmazható gyanús készítmények gyors szűrővizsgálatára és egyben PDE-5 inhibitor tartalmának becslésére. A bemutatott módszer korlátairól sem szabad azonban megfeledkezni. A mért PDE-5 inhibitor tartalom csak becslött érték – ami a hamisítás tényének és mértékének megállapításához elégséges – de a pontos PDE-5 inhibitor tartalom meghatározásához további, egyedi referencia standardokat alkalmazó módszerek szükségesek.

Az általunk fejlesztett módszer fő előnye tehát annak egyszerűsége és könnyű gyakorlati alkalmazhatósága. Módszerünk a drága, sokszor nehezen hozzáférhető egyedi standardok helyett egyetlen, könnyen beszerezhető (szildenafil) külső standardot alkalmaz gyanús étrend-kiegészítők és gyógynövény alapú készítmények PDE-5 inhibitor (analóg) tartalmának minőségi és mennyiségi vizsgálatára.

A disszertáció második részében ciklodextrin-alapú királis kapilláris elektroforetikus módszerek fejlesztését valósítottuk meg az antidiabetikus alogliptin, az analgetikus tapentadol, valamint a szexuális potencianövelő tadalafil sztereoiszomerek elválasztására. Számos ciklodextrin (származék) királis elválasztó képességét és komplexstabilitását vizsgáltuk a három optikailag aktív vegyülettel. Általánosan elmondható, hogy semleges CD származékok helyett a töltéssel rendelkező CD származékok alkalmazásával egyaránt növelhető volt az enantioszelektivitás és a komplexstabilitás. A három vizsgált királis vegyületet összehasonlítva az enantiomerek közti legnagyobb felbontást a tapentadol/S- α -CD rendszer esetén értük el, míg a legkiemelkedőbb komplexstabilitást a tapentadol/CM- β -CD esetén tapasztaltuk. Mindhárom vegyület iránt a β -CD származékok affinitása volt a legnagyobb, ezek rendelkeztek tehát a legmegfelelőbb üregmérettel.

Alogliptin esetén üregméret-függő migrációs sorrend változást tapasztaltunk, ahol az enantiomerek migrációs sorrendjét tekintve a β -CD származékok bizonyultak előnyösnek, így közülük a legnagyobb felbontással bíró SBE- β -CD-t választottuk a módszer további módszeroptimalizálásához. A kritikus paraméterek optimalizálása után a módszert az ICH

irányelvek alapján validáltuk. A fejlesztett módszer alkalmas 0,1% királis szennyező *S*-alogliptin kimutatására, így a későbbiekben akár gyógyszerkönyvi módszerré is válhat.

A tapentadol és a tadalafil sztereoizomerek elválasztása során üregméret-függő és szubsztituensfüggő migrációs sorrend változást egyaránt tapasztaltunk. A tapentadol esetén a *S*- α -CD bizonyult ideálisnak a kimagasló enantioszelektivitását és a migrációs sorrendet figyelembe véve, így ezt a CD rendszert optimalizáltuk és részlegesen validáltuk. A fejlesztett módszer 0,1% királis szennyező *S,S*-, *S,R*-, *R,S*-tapentadol kimutatására alkalmas, a későbbiekben rutin királis analitikai mérésre válhat. Továbbá egy az irodalomban is ritka, két semleges CD-ből álló duál rendszert fejlesztettünk a négy tapentadol sztereoizomer elválasztására.

Tadalafil esetén a megfelelő migrációs sorrenddel és nagy sztereoselektivitással rendelkező SBE- α -CD-t tartalmazó rendszer bizonyult alkalmasnak a tadalafil sztereoizomerek elválasztására, az optimalizált módszer a későbbiekben az eutomer optikai szennyezőinek meghatározására alkalmazható rutin módszer alapját képezheti.

Munkánk során a szelektor-analít kölcsönhatások, a sztereoizomer elválasztások és az enantiomer migrációs sorrend változások mechanizmusának tanulmányozása mellett királis kapilláris elektroforetikus módszereket dolgoztunk ki, melyek alkalmasak minor enantiomer szennyezők meghatározására, melynek köszönhetően a későbbiekben gyógyszerkönyvi vagy vizsgáló laboratóriumok rutin királis analitikai módszerei lehetnek.

6. Következtetések

Munkánk eredményeként egy validált RP-HPLC-UV módszert fejlesztettünk, mellyel a szildenafil, vardenafil, tadalafil és ezek 11 dizájner analógja szimultán elválasztható. A módszer nem igényel bonyolult mintaelőkészítést, egyszerűen és olcsón alkalmazható a PDE-5 inhibitorok és dizájner analógjaik minőségi és mennyiségi meghatározására egyaránt. A fejlesztett módszer további előnye, hogy csak egyetlen standard beszerzését igényli: a viszonylag könnyen és olcsón hozzáférhető törzskönyvezett készítmény hatóanyagát, a szildenafil, melyet külső standardként alkalmazunk. A komponensek azonosítása szildenafilre vonatkoztatott relatív retenciók adatok és a vegyület UV-spektrumának referencia spektrummal történő összehasonlítása alapján történik, továbbá a módszer lehetőséget ad ismeretlen PDE-5 inhibitor analógok előzetes minőségi meghatározására különböző komplex növényi mátrixokban. Abban az esetben, ha a kvalitatív analízissel kapcsolatban bármilyen kétely merülne fel, a módszer MS kompatibilitása kihasználható.

A PDE-5 inhibitor tartalom becslése a Gyógyszerkönyvben megszokott gondolatmenet szerint történik: a korrekciós faktorok, a SIL külső standard koncentrációja és a minta hígítása alapján könnyen számítható. A módszert számos gyanús étrend-kiegészítő és gyógynövény alapú készítmény vizsgálatára a gyakorlatban is sikeresen alkalmaztuk. Ez is bizonyítja, hogy a fejlesztett módszer segítségével gyors és robusztus minőségi és hozzávetőleges mennyiségi információt nyerhetünk a PDE-5 inhibitorot tartalmazó hamisított étrend-kiegészítők és gyógynövény alapú készítmények esetén. A bemutatott módszer ezen túl lehetőséget ad különböző gyártók által előállított PDE-5 inhibitor hatóanyagot tartalmazó törzskönyvezett gyanús potenciafokozó gyógyszerek gyors és egyszerű vizsgálatára is, mellyel az interneten rendelt gyógyszerek igen gyakori hamisítása kiszűrhető. Ezeknek az előnyöknek köszönhetően a módszer hatósági vizsgálat laboratóriumok alapmódszere lehet a beérkezett gyanús készítmények hamisításának gyors kiszűrésére és egyben a PDE-5 inhibitor tartalmának nagyságrendi becslésére.

Munkánk során valamennyi elektroforetikus vizsgált vegyület rendelkezik egy (alogliptin) vagy több (tapentadol, tadalafil) kiralitáscentrummal, ezért több optikai izomerjük létezik, melyek biológiai aktivitása eltérő. A többi sztereoizomerhez képest az *R*-alogliptin, az *R,R*-tapentadol és az *R,R*-tadalafil hatékonyabbnak bizonyult, a

készítményeknek is ezeket az izomereket kell tartalmaznia enantiomertiszta formában, ugyanis a törzskönyvezési eljárás során ma már alapvető kritérium az izomertiszta hatóanyagok forgalmazása és a lehetséges enantiomer-szennyezők vizsgálata. Mind a királis analízisekben, mind a zárványkomplexek stabilitásának vizsgálatában a kapilláris elektroforézis egy egyszerű, olcsó, gyors és széles körben alkalmazott technika.

Az alogliptin analitikája még korai fázisban van, munkánkat megelőzően még nem írtak le módszert az alogliptin királis vizsgálatára. Az alogliptin enantiomerek ciklodextrin komplexképzéséről irodalmi adat még nem elérhető, az enantiomerek elválasztására is elsőként dolgoztunk ki egy optimalizált, validált módszert. A szulfobutiléter-béta-CD-t, mint királis szelektort tartalmazó rendszerrel (5 mM SBE- β -CD, 25 mM acetátpuffer pH 4,75,) 0,1% királis szennyező *S*-alogliptin kimutatható volt. Módszerünk publikálása után jelent meg egy királis folyadékkromatográfiás módszer [239], mely az általunk fejlesztett eljárás alternatív, kiegészítő megoldása lehet az alogliptin királis analitikájára.

A tapentadol sztereoizomerek királis elválasztására eddig egy cellulóz-alapú királis állófázist alkalmazó normál fázisú folyadékkromatográfiás módszert írtak le [252]. Tapentadol esetén elsőként oldottuk meg a sztereoizomerek ciklodextrin-alapú királis kapilláris elektroforetikus vizsgálatát. Az optimalizált és részlegesen validált módszerrel (5 mM S- α -CD 100 mM nátrium-borát puffer pH 9,5) a négy sztereoizomer elválasztható, és 0,15% királis szennyező meghatározható.

A tadalafil királis analitikáját tekintve az *R,R*- és az *S,S*-tadalafil enantiomerek HPLC elválasztása megvalósított [273, 274], a négy tadalafil sztereoizomer elválasztását viszont még nem írták le. Tadalafil esetén hangsúlyozandó, hogy először sikerül megoldani négy semleges sztereoizomer elválasztását, mely CE esetén komoly kihívást jelent, ahol az elválasztás a különböző töltés/méret alapján történik.

Királis kapilláris elektroforetikus vizsgálataink segítségével lehetségessé vált a királis szelektor-analít kölcsönhatás, a sztereoizomer elválasztás és az enantiomer migrációs sorrend változás mechanizmusának mélyebb megismerése. A kidolgozott módszerek alkalmasak minor sztereoizomer szennyezők meghatározására, így a későbbiekben gyógyszerkönyvi vagy vizsgáló laboratóriumok rutin királis analitikai módszerei lehetnek.

7. Összefoglalás

Az erektilis diszfunkció kezelésére leggyakrabban a foszfodiészteráz-5 enzimet gátló szildenafilfilt (Viagra[®]), vardenafil (Levitra[®]) és tadalafil (Cialis[®]) alkalmazzák. Ezek azonban vényköteles készítmények komponensei, így a betegek könnyebben hozzáférhető, alternatív megoldásokat keresnek. A szexuális teljesítményfokozóként hirdetett étrend-kiegészítők és gyógynövény alapú készítmények gyártása és forgalmazása kevésbé szabályozott és ellenőrzött, gyakran tartalmaznak nem megengedett potenciafokozó hatóanyagot, ezért vizsgálatuk egyre kiemeltebb feladattá válik. Munkánk eredményeként egy validált, MS kompatibilis RP-HPLC-UV módszert fejlesztettünk, mellyel 14 PDE-5 inhibitor szimultán elválasztható. A módszer alkalmas gyanús készítmények gyors szűrővizsgálatára szildenafilfil külső standard alkalmazásával. A minőségi elemzés a szildenafilfilre vonatkoztatott relatív retenciókon és az UV-spektrumokon alapul, továbbá a módszer lehetőséget ad ismeretlen PDE-5 inhibitor analógok előzetes minőségi meghatározására különböző komplex növényi mátrixokban, míg a mennyiségük a könnyen becsülhető korrekciós faktorok segítségével. A validált módszert sikeresen alkalmaztuk számos készítmény vizsgálatára és bemutattuk, hogy ellenőrző laboratóriumokban rutinszerűen alkalmazható.

A törzskönyvezési eljárás során ma már alapvető kritérium az izomertiszta hatóanyagok forgalmazása és a lehetséges királis szennyezők azonosítása, ezért elengedhetetlen, hogy érzékeny módszerek álljanak rendelkezésre a hatóanyagok királis tisztaságának vizsgálatára. Munkánk során három optikailag aktív hatóanyag, az alogliptin, a tapentadol és a tadalafil sztereoizomerjeinek királis elválasztására ciklodextrin-alapú kapilláris elektroforetikus módszerek kidolgozását tűztük ki célul és valósítottuk meg. Számos ciklodextrin enantioseparációs képességét, valamint komplexképző sajátságát vizsgáltuk kapilláris elektroforézissel a három királis vegyület esetén. Az így kapott eredményeket és az izomerek migrációs sorrendjét is figyelembe véve a legígéretesebb rendszereket optimalizáltuk. Végül az új módszereket alogliptin és tapentadol esetében az ICH irányelveknek megfelelően validáltuk. A kidolgozott módszerek alkalmasak minor enantiomer szennyező kimutatására, melynek köszönhetően a későbbiekben gyógyszerkönyvi módszerek vagy vizsgáló laboratóriumok rutin királis analitikai módszerei lehetnek.

8. Summary

The phosphodiesterase type 5 enzyme inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil are widely used for the treatment of erectile dysfunction. PDE-5 inhibitors are prescription drugs, consequently their availability is strictly controlled. As a result, several over-the-counter alternatives, such as dietary supplements and various natural remedies are frequently applied. Consequently, illicit herbal dietary supplements adulterated with PDE-5 inhibitors or their analogs have appeared on the market offering an easy and anonymous substitution. Therefore official control laboratories require simple, easy-to-use, inexpensive routine methods to screen and determine the illicit adulterants in these products.

A validated HPLC-UV method is elaborated for the simultaneous separation of sildenafil, vardenafil, tadalafil and their 11 unapproved designer analogs. The optimized method allows for the first time a rapid screening and determination of PDE-5 inhibitor content of illegal erectile dysfunction products, utilizing only sildenafil as an available external standard for the qualitative and quantitative analysis. The identification is based on relative retentions and UV spectra, furthermore, it is possible to perform a tentative preliminary identification of unknown substances in complex herbal matrices with our method using MS coupling. The quantification is easily achievable by applying the correction factors, the SIL external standard concentration and sample dilution. The optimized and validated method has been successfully applied to the analysis of real samples. Due to the easy use of the developed method, it could serve as a routine procedure in control laboratories.

Nowadays, the focus of interest is on the development of enantioselective syntheses according to quality-by-design principles and sensitive methods to control the occurrence of enantiomeric contamination as required by Pharmacopeias and regulatory authorities. Our aim was to develop cyclodextrin-based capillary electrophoretic methods for the separation of alogliptin, tapentadol and tadalafil stereoisomers. The enantioseparation and the complexation behavior of various cyclodextrins were investigated in the case of these chiral drugs. Based on our results and the enantiomer migration order, the most promising systems were selected for further optimization. In the case of alogliptin and tapentadol the method was validated according to ICH guidelines. As the optimized methods were capable to achieve high enantioresolution and to detect trace amounts of chiral impurities, they could serve as routine chiral analytical procedures in control laboratories.

9. Irodalomjegyzék

- [1] Proença P, Mustra C, Marcos M, Franco JM, Corte-Real F, Vieira DN. (2013) Validated UPLC-MS/MS assay for the determination of synthetic phosphodiesterase type-5 inhibitors in postmortem blood samples. *J Forensic Leg Med*, 20: 655-658.
- [2] Gratz SR, Flurer CL, Wolnik KA. (2004) Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC-ESI-MS and LC-UV. *J Pharm Biomed Anal*, 36: 525-533.
- [3] Brock GB, McMahon CG, Chen KK, Costigan T, Shen W, Watkins V, Whitaker S. (2002) Efficacy and safety of tadalafil for the treatment of erectile dysfunction: Results of integrated analyses. *J Urol*, 168: 1332-1336.
- [4] Porst H, Giuliano F, Glina S, Ralph D, Casabé AR, Elion-Mboussa A, Whitaker JS. (2006) Evaluation of the Efficacy and Safety of Once-a-Day Dosing of Tadalafil 5 mg and 10 mg in the Treatment of Erectile Dysfunction: Results of a Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Eur Urol*, 50: 351-359.
- [5] Costa P, Buvat J, Holmes S, Weitckus S, Petto H, Hamidi K, Varanese L. (2006) Predictors of tadalafil efficacy in men with erectile dysfunction: The SURE study comparing two dosing regimens. *J Sex Med*, 3: 1050-1058.
- [6] Shindel AW. (2009) 2009 update on phosphodiesterase type 5 inhibitor therapy part 2: Updates on optimal utilization for sexual concerns and rare toxicities in this class (CME). *J Sex Med*, 6: 2352-2364.
- [7] Gur S, Kadowitz PJ, Gokce A, Sikka SC, Lokman U, Hellstrom WJG. (2013) Update on drug interactions with phosphodiesterase-5 inhibitors prescribed as first-line therapy for patients with erectile dysfunction or pulmonary hypertension. *Curr Drug Metabol*, 14: 265-269.
- [8] Tseng MC, Lin JH. (2002) Determination of sildenafil citrate adulterated in a dietary supplement capsule by LC/MS/MS. *J Food Drug Anal*, 10: 112-119.
- [9] Zhu X, Xiao S, Chen B, Zhang F, Yao S, Wan Z, Han H. (2005) Simultaneous determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high-performance liquid

- chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1066: 89-95.
- [10] Savaliya AA, Shah RP, Prasad B, Singh S. (2010) Screening of Indian aphrodisiac ayurvedic/herbal healthcare products for adulteration with sildenafil, tadalafil and/or vardenafil using LC/PDA and extracted ion LC–MS/TOF. *J Pharm Biomed Anal*, 52: 406-409.
- [11] Zou P, Oh SSY, Hou P, Low MY, Koh HL. (2006) Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1104: 113-122.
- [12] Shin MH, Hong MK, Kim WS, Lee YJ, Jeoung YC. (2003) Identification of a new analogue of sildenafil added illegally to a functional food marketed for penile erectile dysfunction. *Food Addit Contam*, 20: 793-796.
- [13] Blok-Tip L, Zomer B, Bakker F, Hartog K, Hamzink M, Ten Hove J, de Kaste D. (2004) Structure elucidation of sildenafil analogues in herbal products. *Food Addit Contam*, 21: 737-748.
- [14] Shin C, Hong M, Kim D, Lim Y. (2004) Structure determination of a sildenafil analogue contained in commercial herb drinks. *Magn Reson Chem*, 42: 1060-1062.
- [15] Reepmeyer JC, Woodruff JT. (2007) Use of liquid chromatography–mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal*, 44: 887-893.
- [16] Reepmeyer JC, Woodruff JT, d’Avignon DA. (2007) Structure elucidation of a novel analogue of sildenafil detected as an adulterant in an herbal dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal*, 43: 1615-1621.
- [17] Venhuis BJ, Barends D, Zwaagstra M, de Kaste D. (2007) Recent developments in counterfeits and imitations of Viagra, Cialis and Levitra. A 2005-2006 update. RIVM Report 370030001. 2007

- [18] Reepmeyer JC, d'Avignon DA. (2009) Structure elucidation of thioketone analogues of sildenafil detected as adulterants in herbal aphrodisiacs. *J Pharm Biomed Anal*, 49: 145-150.
- [19] Zou P, Hou P, Oh SSY, Chong Y, Bloodworth BC, Low MY, Koh HL. (2008) Isolation and identification of thiohomosildenafil and thiosildenafil in health supplements. *J Pharm Biomed Anal*, 47: 279-284.
- [20] Venhuis B, Zomer G, de Kaste D. (2008) Structure elucidation of a novel synthetic thiono analogue of sildenafil detected in an alleged herbal aphrodisiac. *J Pharm Biomed Anal*, 46: 814-817.
- [21] Choi DM, Park S, Yoon TH, Jeong HK, Pyo JS, Park J, Kwon SW. (2008) Determination of analogs of sildenafil and vardenafil in foods by column liquid chromatography with a photodiode array detector, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectrometry. *J AOAC Int*, 91: 580-588.
- [22] Li L, Low MY, Aliwarga F, Teo J, Ge XW, Zeng Y, Koh HL. (2009) Isolation and identification of hydroxythiohomosildenafil in herbal dietary supplements sold as sexual performance enhancement products. *Food Addit Contam*, 26: 145-151.
- [23] Yuk S. Combating illegal foods and drugs containing unauthorized substances. (2010) in 4th Seminar of European Customs Chemists, Helsinki, Finland..
- [24] Zou P, Hou P, Low MY, Koh HL. (2006) Structural elucidation of a tadalafil analogue found as an adulterant of a herbal product. *Food Addit Contam*, 23: 446-451.
- [25] Singh S, Prasad B, Savaliya AA, Shah RP, Gohil VM, Kaur A. (2009) Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs. *Trends Analyt Chem*, 28: 13-28.
- [26] Patel DN, Li L, Kee CL, Ge X, Low MY, Koh HL. (2014) Screening of synthetic PDE-5 inhibitors and their analogues as adulterants: Analytical techniques and challenges. *J Pharm Biomed Anal*, 87: 176-190.
- [27] Venhuis BJ, de Kaste D. (2012) Towards a decade of detecting new analogues of sildenafil, tadalafil and vardenafil in food supplements: A history, analytical aspects and health risks. *J Pharm Biomed Anal*, 69: 196-208.

- [28] Cho EY, Chung S, Kim J, Kim D, Jin C. (2003) Effects of a new selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, KJH-1002, on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue. *J Appl Pharm*, 11: 232-237.
- [29] Reepmeyer JC, Woodruff JT. (2006) Use of liquid chromatography–mass spectrometry and a hydrolytic technique for the detection and structure elucidation of a novel synthetic vardenafil designer drug added illegally to a “natural” herbal dietary supplement. *J Chromatogr A*, 1125: 67-75.
- [30] Lam YH, Poon WT, Lai CK, Chan AYW, Mak TWL. (2008) Identification of a novel vardenafil analogue in herbal product. *J Pharm Biomed Anal*, 46: 804-807.
- [31] Lee HM, Kim CS, Jang YM, Kwon SW, Lee BJ. (2011) Separation and structural elucidation of a novel analogue of vardenafil included as an adulterant in a dietary supplement by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*, 54: 491-496.
- [32] 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.
- [33] Beghyn T, Hounsou C, Deprez BP. (2007) PDE5 inhibitors: An original access to novel potent arylated analogues of tadalafil. *Bioorg Med Chem Lett*, 17: 789-792.
- [34] Zou P, Hou P, Oh SSY, Low MY, Koh HL. (2006) Electrospray tandem mass spectrometric investigations of tadalafil and its analogue [4]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 20: 3488-3490.
- [35] Hasegawa T, Saijo M, Ishii T, Nagata T, Haishima Y, Kawahara N, Goda Y. (2008) Structural elucidation of a tadalafil analogue found in a dietary supplement. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 49: 311-315.
- [36] Hasegawa T, Takahashi K, Saijo M, Ishii T, Nagata T, Kurihara M, Kawahara N. (2009) Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and n-octylntadalafil found in a dietary supplement. *Chem Pharm Bull*, 57: 185-189.
- [37] Kurita H, Mizuno K, Kuromi K, Suzuki N, Ueno C, Kamimura M, Yamamoto M. (2008) Identification of aminotadalafil and its stereoisomers contained in health foods using chiral liquid chromatography-mass spectrometry. *J Health Sci*, 54: 310.

- [38] Lee ES, Kim JW, Lee JH, Han KM, Cho S, Hwang I, Kim J. (2013) Identification of a new tadalafil analogue found in a dietary supplement. *Food Addit Contam: Part A*, 30: 621-626.
- [39] Toomey VM, Litzau JJ, Flurer CL. (2012) Isolation and structural characterization of two tadalafil analogs found in dietary supplements. *J Pharm Biomed Anal*, 59: 50-57.
- [40] Venhuis BJ, Zomer G, Vredenburg MJ, de Kaste D. (2010) The identification of (-)-trans-tadalafil, tadalafil, and sildenafil in counterfeit Cialis® and the optical purity of tadalafil stereoisomers. *J Pharm Biomed Anal*, 51: 723-727.
- [41] Van Deursen MM, Lock ERA, Poortman-Van Der Meer AJ. (2006) Organic impurity profiling of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) tablets seized in the Netherlands. *Science and Justice - J Forensic Sci Soc*, 46: 135-152.
- [42] Bohn M, Bohn G, Blaschke G. (1993) Synthesis markers in illegally manufactured 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine. *Int J Legal Med*, 106: 19-23.
- [43] Daugan A, Grondin P, Ruault C, Le Monnier de Gouville AC, Coste H, Linget JM, Labaudinière R. (2003) The discovery of tadalafil: A novel and highly selective PDE5 inhibitor. 2: 2,3,6,7,12,12a-Hexahydropyrazino[1',2' :1,6]pyrido[3,4-b]indole-1,4-dione analogues. *J Med Chem*, 46: 4533-4542.
- [44] Lai K, Liu Y, Tseng M, Lin JH. (2006) Isolation and identification of a sildenafil analogue illegally added in dietary supplements. *J Food Drug Anal*, 14: 19-23.
- [45] Kee CL, Ge X, Low MY, Koh HL. (2013) Structural elucidation of a new sildenafil analogue using high-resolution Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 27: 1380-1384.
- [46] Kee CL, Ge X, Koh HL, Low MY. (2012) Isolation and characterization of propoxyphenyl linked sildenafil and thiosildenafil analogues in health supplements. *J Pharm Biomed Anal*, 70: 265-272.
- [47] Wollein U, Eisenreich W, Schramek N. (2011) Identification of novel sildenafil analogues in an adulterated herbal food supplement. *J Pharm Biomed Anal*, 56: 705-712.

- [48] Vaysse J, Gilard V, Balayssac S, Zedde C, Martino R, Malet-Martino M. (2012) Identification of a novel sildenafil analogue in an adulterated herbal supplement. *J Pharm Biomed Anal*, 59: 58-66.
- [49] Lin MC, Liu YC, Lin YL, Lin JH. (2008) Isolation and identification of a novel sildenafil analogue adulterated in dietary supplements. *J Food Drug Anal*, 16: 15-20.
- [50] Ge X, Li L, Koh HL, Low MY. (2011) Identification of a new sildenafil analogue in a health supplement. *J Pharm Biomed Anal*, 56: 491-496.
- [51] Hou P, Zou P, Low MY, Chan E, Koh HL. (2006) Structural identification of a new acetildenafil analogue from pre-mixed bulk powder intended as a dietary supplement. *Food Addit Contam*, 23: 870-875.
- [52] Göker H, Coşkun M, Alp M. (2010) Isolation and identification of a new acetildenafil analogue used to adulterate a dietary supplement: Dimethylacetildenafil. *Turk J Chem*, 34: 157-163.
- [53] Lai KC, Liu YC, Liao YC, Lin YL, Tsai LY, Lin JH, Lo CF. (2010) Isolation and identification of three thio-sildenafil analogues in dietary supplements. *J Food Drug Anal*, 18: 269-278.
- [54] Pissarnitski D. (2006) Phosphodiesterase 5 (PDE 5) inhibitors for the treatment of male erectile disorder: Attaining selectivity versus PDE6. *Med Res Rev*, 26: 369-395.
- [55] Boyce EG, Umland EM. (2001) Sildenafil citrate: A therapeutic update. *Clin Ther*, 23: 2-23.
- [56] Allerton CMN, Barber CG, Beaumont KC, Brown DG, Cole SM, Ellis D, Summerhill NW. (2006) A novel series of potent and selective PDE5 inhibitors with potential for high and dose-independent oral bioavailability. *J Med Chem*, 49: 3581-3594.
- [57] Szegezdi J, Csizmadia F. A method for calculating the pK values of small and large molecules, in 233rd ACS National Meeting, Chicago, USA CINF41, 2007.
- [58] Cai Y, Cai TG, Shi Y, Cheng XL, Ma LY, Ma SC, Feng W. (2010) Simultaneous determination of eight PDE5-IS potentially adulterated in herbal dietary

- supplements with TLC and HPLC-PDA-MS methods. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 33: 1287-1306.
- [59] Moriyasu T, Shigeoka S, Kishimoto K, Ishikawa F, Nakajima J, Kamimura H, Yasuda I. (2001) Identification system for Sildenafil in health foods. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 121: 765-769.
- [60] Mikami E, Ohno T, Matsumoto H. (2002) Simultaneous identification/determination system for phentolamine and sildenafil as adulterants in soft drinks advertising roborant nutrition. *Forensic Sci Int*, 130: 140-146.
- [61] Abourashed EA, Abdel-Kader MS, Habib AAM. (2005) HPTLC determination of sildenafil in pharmaceutical products and aphrodisiac herbal preparations. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 18: 372-376.
- [62] Reddy TS, Reddy AS, Devi PS. (2006) Quantitative determination of sildenafil citrate in herbal medicinal formulations by high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 19: 427-431.
- [63] Saisho K, Scott KS, Morimoto S, Nakahara Y. (2001) Hair analysis for pharmaceutical drugs. II. Effective extraction and determination of sildenafil (Vigra®) and its N-desmethyl metabolite in rat and human hair by GC-MS. *Biol Pharm Bull*, 24: 1384-1388.
- [64] Man CN, Nor NM, Lajis R, Harn GL. (2009) Identification of sildenafil, tadalafil and vardenafil by gas chromatography-mass spectrometry on short capillary column. *J Chromatogr A*, 1216: 8426-8430.
- [65] Papoutsis I, Nikolaou P, Athanaselis S, Alevizopoulos G, Pistos C, Paraskevopoulou C, Spiliopoulou C. (2011) Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometric method for the determination of sildenafil and desmethylsildenafil in whole blood. *J Sep Sci*, 34: 3037-3042.
- [66] Strano-Rossi S, Anzillotti L, de la Torre X, Botrè F. (2010) A gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil and their metabolites in human urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 24: 1697-1706.

- [67] Liu SY, Woo SO, Koh HL. (2001) HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. *J Pharm Biomed Anal*, 24: 983-992.
- [68] Lee ES, Lee JH, Han KM, Kim JW, Hwang IS, Cho S, Kim J. (2013) Simultaneous determination of 38 phosphodiesterase-5 inhibitors in illicit erectile dysfunction products by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 83: 171-178.
- [69] Zhang Y, Huang Z, Ding L, Yan H, Wang M, Zhu S. (2010) Simultaneous determination of yohimbine, sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*, 33: 2109-2114.
- [70] Lee H, Lee BJ. (2011) A novel approach to simultaneous screening and confirmation of regulated pharmaceutical compounds in dietary supplements by LC/MS/MS with an information-dependent acquisition method. *Food Addit Contam - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 28: 396-407.
- [71] Lebel P, Gagnon J, Furtos A, Waldron KC. (2014) A rapid, quantitative liquid chromatography-mass spectrometry screening method for 71 active and 11 natural erectile dysfunction ingredients present in potentially adulterated or counterfeit products. *J Chromatogr A*, 1343: 143-151.
- [72] Sacré PY, Deconinck E, Chiap P, Crommen J, Mansion F, Rozet E, De Beer JO. (2011) Development and validation of a ultra-high-performance liquid chromatography-UV method for the detection and quantification of erectile dysfunction drugs and some of their analogues found in counterfeit medicines. *J Chromatogr A*, 1218: 6439-6447.
- [73] Ren Y, Wu C, Zhang J. (2012) Simultaneous screening and determination of 18 illegal adulterants in herbal medicines and health foods for male sexual potency by ultra-fast liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*, 35: 2847-2857.
- [74] Damiano F, Silva C, Gregori A, Vacondio F, Mor M, Menozzi M, Di Giorgio D. (2014) Analysis of illicit dietary supplements sold in the Italian market:

- Identification of a sildenafil thioderivative as adulterant using UPLC–TOF/MS and GC/MS. *Science & Justice*, 54: 228-237.
- [75] Reepmeyer JC, Woodruff JT. (2007) Use of liquid chromatography-mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal*, 44: 887-893.
- [76] Park H, Jeong H, Chang M, Im M, Jeong J, Choi D, Han S. (2007) Structure determination of new analogues of vardenafil and sildenafil in dietary supplements. *Food Addit Contam*, 24: 122-129.
- [77] Kumasaka K, Kawahara N, Doi K, Kojima T, Goda Y. (2008) Determination of (R)-xanthoantrafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, in a dietary supplement promoted for sexual enhancement. *Chem Pharm Bull*, 56: 227-230.
- [78] Zou P, Hou P, Oh SSY, Ge X, Bloodworth BC, Low MY, Koh HL. (2008) Identification of benzamidenafil, a new class of phosphodiesterase-5 inhibitor, as an adulterant in a dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal*, 47: 255-259.
- [79] Ge X, Low MY, Zou P, Lin L, Yin SOS, Bloodworth BC, Koh HL. (2008) Structural elucidation of a PDE-5 inhibitor detected as an adulterant in a health supplement. *J Pharm Biomed Anal*, 48: 1070-1075.
- [80] Venhuis B, Zomer G, Hamzink M, Meiring H, Aubin Y, de Kaste D. (2011) The identification of a nitrosated prodrug of the PDE-5 inhibitor aildenafil in a dietary supplement: a Viagra with a pop. *J Pharm Biomed Anal*, 54: 735-741.
- [81] Gratz SR, Gamble BM, Flurer RA. (2006) Accurate mass measurement using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for structure elucidation of designer drug analogs of tadalafil, vardenafil and sildenafil in herbal and pharmaceutical matrices. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 20: 2317-2327.
- [82] Uchiyama N, Saisho K, Kikura-Hanajiri R, Haishima Y, Goda Y. (2008) Determination of a new type of phosphodiesterase-5 inhibitor, thioquinapiperifil, in a dietary supplement promoted for sexual enhancement. *Chem Pharm Bull*, 56: 1331-1334.

- [83] Häberli A, Girard P, Low MY, Ge X. (2010) Isolation and structure elucidation of an interaction product of aminotadalafil found in an illegal health food product. *J Pharm Biomed Anal*, 53: 24-28.
- [84] Demizu Y, Wakana D, Kamakura H, Kurihara M, Okuda H, Goda Y. (2011) Identification of mutaprodenafil in a dietary supplement and its subsequent synthesis. *Chem Pharm Bull*, 59: 1314-1316.
- [85] Lee HM, Kim CS, Jang YM, Kwon SW, Lee BJ. (2011) Separation and structural elucidation of a novel analogue of vardenafil included as an adulterant in a dietary supplement by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*, 54: 491-496.
- [86] Balayssac S, Gilard V, Zedde C, Martino R, Malet-Martino M. (2012) Analysis of herbal dietary supplements for sexual performance enhancement: First characterization of propoxyphenyl-thiohydroxyhomosildenafil and identification of sildenafil, thiosildenafil, phentolamine and tetrahydropalmatine as adulterants. *J Pharm Biomed Anal*, 63: 135-150.
- [87] Jung J, Choi S, Cho SH, Ghim JL, Hwang A, Kim U, Lim HS. (2010) Tolerability and pharmacokinetics of avanafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor: A single- and multiple-dose, double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-escalation study in healthy Korean male volunteers. *Clin Ther*, 32: 1178-1187.
- [88] Toque HA, Teixeira CE, Lorenzetti R, Okuyama CE, Antunes E, De Nucci G. (2008) Pharmacological characterization of a novel phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor lodenafil carbonate on human and rabbit corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol*, 591: 189-195.
- [89] Daraghme N, Al-Omari M, Badwan A, Jaber A. (2001) Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC. *J Pharm Biomed Anal*, 25: 483-492.
- [90] Ramakrishna N, Vishwottam K, Puran S, Koteswara M, Manoj S, Santosh M, Sumatha B. (2004) Quantitation of tadalafil in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *J Chromatogr B*, 809: 243-249.

- [91] Cheng CL, Chou CH. (2005) Determination of tadalafil in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J Chromatogr B*, 822: 278-284.
- [92] Wang J, Jiang Y, Wang Y, Zhao X, Cui Y, Gu J. (2007) Liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to determine the pharmacokinetics of aildenafil in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*, 44: 231-235.
- [93] De Orsi D, Pellegrini M, Marchei E, Nebuloni P, Gallinella B, Scaravelli G, Pichini S. (2009) High performance liquid chromatography-diode array and electrospray-mass spectrometry analysis of vardenafil, sildenafil, tadalafil, testosterone and local anesthetics in cosmetic creams sold on the Internet web sites. *J Pharm Biomed Anal*, 50: 362-369.
- [94] Venhuis BJ, Blok-Tip L, de Kaste D. (2008) Designer drugs in herbal aphrodisiacs. *Forensic Sci Int*, 177: e25-e27.
- [95] Poplawska M, Blazewicz A, Bukowinska K, Fijalek Z. (2013) Application of high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection for universal quantitation of undeclared phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal dietary supplements. *J Pharm Biomed Anal*, 84: 232-243.
- [96] Nickum EA, Flurer CL. (2014) Determination of Phosphodiesterase-5 Inhibitors and Analogs Using High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *J Chromatogr Sci*, 53:38-46
- [97] Batra S, Seth M, Bhaduri A. Chirality and future drug design, in *Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques*. Springer, Birkhäuser Basel, 1993: 191-248.
- [98] Simonyi M, Maksay G. (1996) Stereochemical aspects of drug action. II. Optical isomerism. *The Practise of Medicinal Chemistry*, 413-435.
- [99] Islam MR, Mahdi JG, Bowen ID. (1997) Pharmacological importance of stereochemical resolution of enantiomeric drugs. *Drug Safety*, 17: 149-165.
- [100] Portoghese PS, Poupaert JH, Larson DL, Groutas WC, Meitzner GD, Swenson DC, Duax WL. (1982) Synthesis, X-ray crystallographic determination, and opioid activity of erythro-5-methylmethadone enantiomers. Evidence which suggests that μ

- and δ opioid receptors possess different stereochemical requirements. *J Med Chem*, 25: 684-688.
- [101] Waelbroeck M, Lazareno S, Pfaff O, Friebe T, Tastenoy M, Mutschler E, Lambrecht G. (1996) Stereoselective recognition of the enantiomers of phenglutarimide and of six related compounds by four muscarinic receptor subtypes. *Br J Pharmacol*, 119: 1319-1330.
- [102] Winter W, Frankus E. (1992) Thalidomide enantiomers. *The Lancet*, 339: 365.
- [103] Fabro S, Smith RL, Williams R. (1967) Toxicity and teratogenicity of optical isomers of thalidomide. *Nature*, 215: 296-297.
- [104] Grünenthal_GmbH. (2007) The thalidomide tragedy - offprint extract from the German jubilee publication. *Unser Weg 1946-2006: 60 Jahre Grünenthal GmbH*.
- [105] Hermans J, Thijssen H. (1993) Human liver microsomal metabolism of the enantiomers of warfarin and acenocoumarol: P450 isozyme diversity determines the differences in their pharmacokinetics. *Br J Pharmacol*, 110: 482-490.
- [106] Aigner EJ, Leone AD, Falconer RL. (1998) Concentrations and enantiomeric ratios of organochlorine pesticides in soils from the US corn belt. *Environ Sci Technol*, 32: 1162-1168.
- [107] Caner H, Groner E, Levy L, Agranat I. (2004) Trends in the development of chiral drugs. *Drug discovery today*, 9: 105-110.
- [108] Dixit S, Park JH. (2014) Application of antibiotics as chiral selectors for capillary electrophoretic enantioseparation of pharmaceuticals: A review. *Biomed Chromatogr*, 28: 10-26.
- [109] Ilisz I, Pataj Z, Aranyi A, Péter A. (2012) Macrocyclic antibiotic selectors in direct HPLC enantioseparations. *Separation and Purification Reviews*, 41: 207-249.
- [110] Bluhm L, Huang J, Li T. (2005) Recent advances in peptide chiral selectors for electrophoresis and liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem*, 382: 592-598.
- [111] Tohala L, Oukacine F, Ravelet C, Peyrin E. (2015) Chiral Resolution Capabilities of DNA Oligonucleotides. *Anal Chem*. 87: 5491-5495
- [112] Chankvetadze B. Enantioseparations by high-performance liquid chromatography using polysaccharide-based chiral stationary phases: An overview, *Methods in Molecular Biology*, Springer, 2013, 970: 81-111.

- [113] Nishi H, Kuwahara Y. (2001) Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing noncyclic mono-, oligo- and polysaccharides as chiral selectors. *J Biochem Biophys Methods*, 48: 89-102.
- [114] Paik MJ, Kang JS, Huang BS, Carey JR, Lee W. (2013) Development and application of chiral crown ethers as selectors for chiral separation in high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Chromatogr A*, 1274: 1-5.
- [115] Otsuka K, Terabe S. (2000) Enantiomer separation of drugs by micellar electrokinetic chromatography using chiral surfactants. *J Chromatogr A*, 875: 163-178.
- [116] Schmid MG, Gübitz G. (2011) Enantioseparation by chromatographic and electromigration techniques using ligand-exchange as chiral separation principle. *Anal Bioanal Chem*, 400: 2305-2316.
- [117] Escuder-Gilabert L, Martín-Biosca Y, Medina-Hernández MJ, Sagrado S. (2014) Cyclodextrins in capillary electrophoresis: Recent developments and new trends. *J Chromatogr A*, 1357: 2-23.
- [118] Xiao Y, Ng SC, Tan TTY, Wang Y. (2012) Recent development of cyclodextrin chiral stationary phases and their applications in chromatography. *J Chromatogr A*, 1269: 52-68.
- [119] Villiers A. (1891) Sur la transformation de la fécule en dextrine par le ferment butyrique. *Compt. Rend. Fr. Acad. Sci*, 112: 435-438.
- [120] Schardinger F. (1911) Bildung kristallisierter polysaccharide (dextrine) aus stärkekleister durch microben. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II*, 29: 188-197.
- [121] Freudenberg K, Meyer-Delius M. (1938) Über die Schardinger-Dextrine aus Stärke. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 71: 1596-1600.
- [122] French D, Rundle R. (1942) The Molecular Weights of the Schardinger Alpha and Beta Dextrins. *J Am Chem Soc*, 64: 1651-1653.
- [123] Cramer F. (1952) Occlusion compounds of cyclodextrin. *Angew Chem Int Ed*, 64: 136.
- [124] Szejtli J. *Cyclodextrins and their inclusion complexes*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982.

- [125] Szejtli J. (1998) Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev*, 98: 1743-1754.
- [126] Bender ML, Komiyama M. *Cyclodextrin chemistry*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1978.
- [127] Liu L, Guo QX. (2002) The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 42: 1-14.
- [128] El-Barghouthi MI, Masoud NA, Al-Kafawein JK, Abdoh AA. (2006) Inclusion complexation of Itraconazole with β - and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrins in aqueous solutions. *Russian J Phys Chem A*, 80: 1050-1055.
- [129] Meindersma GW, Van Schoonhoven T, Kuzmanovic B, De Haan AB. (2006) Extraction of toluene, o-xylene from heptane and benzyl alcohol from toluene with aqueous cyclodextrins. *Chem. Eng. Process: Process Intensification*, 45: 175-183.
- [130] Takeichi T, Toriyama H, Shimura S, Takayama Y, Morikawa M. (1995) Cyclodextrin carbamates as novel chiral stationary phases for capillary gas chromatography. *J High Resolut Chromatogr*, 18: 179-189.
- [131] Shi X, Wang M, Chen G, Fu R, Gu J. (2001) Synthesis and properties of new cyclodextrin phenyl carbamates as capillary gas chromatography stationary phases. *Anal Chim Acta*, 445: 221-228.
- [132] *Cyclobond Handbook. A guide to using cyclodextrin bonded phases for chiral LC separations*. Advanced Separation Technologies, Whippany, New Jersey, 2005
- [133] Kant A, Linforth RST, Hort J, Taylor AJ. (2004) Effect of β -Cyclodextrin on Aroma Release and Flavor Perception. *J Agric Food Chem*, 52: 2028-2035.
- [134] Loftsson T, Duchene D. (2007) Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm*, 329: 1-11.
- [135] Bom A, Bradley M, Cameron K, Clark JK, van Egmond J, Feilden H, Rees DC. (2002) A Novel Concept of Reversing Neuromuscular Block: Chemical Encapsulation of Rocuronium Bromide by a Cyclodextrin-Based Synthetic Host. *Angew Chem*, 114: 275-280.
- [136] Camargo F, Erickson RP, Garver WS, Hossain GS, Carbone PN, Heidenreich RA, Blanchard J. (2001) Cyclodextrins in the treatment of a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Life sci*, 70: 131-142.

- [137] Agüeros M, Espuelas S, Esparza I, Calleja P, Peñuelas I, Ponchel G, Irache JM. (2011) Cyclodextrin-poly (anhydride) nanoparticles as new vehicles for oral drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 8: 721-734.
- [138] ICH-Guideline Q3A (R2): Impurities in new drug substances. ICH Steering Committee, Step, 2006.
- [139] Beesley T, Majors RE. (2012) The state of the art in chiral capillary gas chromatography. *LC GC Eur*, 25: 232-239.
- [140] He L, Beesley TE. (2005) Applications of enantiomeric gas chromatography: A review. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 28: 1075-1114.
- [141] Schurig V. (2002) Chiral separations using gas chromatography. *Trends Analyt Chem*, 21: 647-661.
- [142] De Klerck K, Mangelings D, Vander Heyden Y. (2012) Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal*, 69: 77-92.
- [143] Płotka JM, Biziuk M, Morrison C, Namieśnik J. (2014) Pharmaceutical and forensic drug applications of chiral supercritical fluid chromatography. *Trends Analyt Chem*, 56: 74-89.
- [144] West C. (2014) Enantioselective separations with supercritical fluids - review. *Current Anal Chem*, 10: 99-120.
- [145] Cavazzini A, Marchetti N, Guzzinati R, Pierini M, Ciogli A, Kotoni D, Gasparini F. (2014) Enantioseparation by ultra-high-performance liquid chromatography. *Trends Analyt Chem*, 63: 95-103.
- [146] Cavazzini A, Pasti L, Massi A, Marchetti N, Dondi F. (2011) Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: A review. *Anal Chim Acta*, 706: 205-222.
- [147] Gübitz G. (1990) Separation of drug enantiomers by HPLC using chiral stationary phases - A selective review. *Chromatographia*, 30: 555-564.
- [148] Ilisz I, Aranyi A, Pataj Z, Péter A. Enantioseparations by high-performance liquid chromatography using macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases: An overview, *Methods in Molecular Biology*, Springer, 2013, 137-163.

- [149] Chankvetadze B, Blaschke G. (2001) Enantioseparations in capillary electromigration techniques: recent developments and future trends. *J Chromatogr A*, 906: 309-363.
- [150] Wistuba D, Czesla H, Roeder M, Schurig V. (1998) Enantiomer separation by pressure-supported electrochromatography using capillaries packed with a permethyl- β -cyclodextrin stationary phase. *J Chromatogr A*, 815: 183-188.
- [151] Wistuba D, Schurig V. (1999) Enantiomer separation by pressure-supported electrochromatography using capillaries packed with Chirasil-Dex polymer-coated silica. *Electrophoresis*, 20: 2779-2785.
- [152] Yuan R, Ding G. Enantioseparations in capillary electrochromatography using sulfated poly β -cyclodextrin-modified silica-based monolith as stationary phase. *Methods in Molecular Biology*, Springer, 2013, 489-503.
- [153] Scriba GK, Jáč P. Enantioseparations by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors. *Methods in molecular biology*, Springer, 2013, 970: 271-287.
- [154] Scriba GKE. Differentiation of enantiomers by capillary electrophoresis, in *Topics in Current Chemistry*, V. Schurig, 2013. 209-276.
- [155] Stavrou IJ, Mavroudi MC, Kapnissi-Christodoulou CP. (2015) Chiral selectors in CE: Recent developments and applications (2012-mid 2014). *Electrophoresis*, 36: 101-123.
- [156] Zou Y, Wang L, Liu Q, Liu H, Li F. (2015) Enantioseparations of 11 Amino Alcohols Using Di-n-amyl L-Tartrate–Boric Acid Complex as Chiral Mobile Phase Additive by RP-HPLC. *Chromatographia*, 78: 753-761.
- [157] Armstrong DW, DeMond W. (1984) Cyclodextrin bonded phases for the liquid chromatographic separation of optical, geometrical, and structural isomers. *J Chromatogr Sci*, 22: 411-415.
- [158] Armstrong DW, DeMond W, Alak A, Hinze WL, Riehl TE, Bui KH. (1985) Liquid chromatographic separation of diastereomers and structural isomers on cyclodextrin-bonded phases. *Anal Chem*, 57: 234-237.
- [159] Mitchell CR, Armstrong DW. Cyclodextrin-based chiral stationary phases for liquid chromatography, in *Chiral Separations*. Springer, 2004: 61-112.

- [160] Dalgliesh C. (1952) The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms. *J. Chem. Soc.*,756: 3940-3942.
- [161] Pirkle WH, Pochapsky TC. (1989) Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatography separation of enantiomers. *Chem Rev*, 89: 347-362.
- [162] Silva M. (2013) Micellar electrokinetic chromatography: A review of methodological and instrumental innovations focusing on practical aspects. *Electrophoresis*, 34: 141-158.
- [163] Chankvetadze B, Endresz G, Blaschke G. (1996) Charged cyclodextrin derivatives as chiral selectors in capillary electrophoresis. *Chem Soc Rev*, 25: 141-153.
- [164] Chankvetadze B. (1997) Separation selectivity in chiral capillary electrophoresis with charged selectors I. *J Chromatogr A*, 792: 269-295.
- [165] Terabe S. (1989) Electrokinetic chromatography: An interface between electrophoresis and chromatography. *TrAC Trends in Anal Chem*, 8: 129-134.
- [166] Gáspár A. *Kapilláris zónaelektroforézis*. Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, 2000.
- [167] Mikkers F, Everaerts F, Verheggen TP. (1979) Concentration distributions in free zone electrophoresis. *J Chromatogr A*, 169: 1-10.
- [168] Williams RL, Vigh G. (1996) Maximization of separation efficiency in capillary electrophoretic chiral separations by means of mobility-matching background electrolytes. *J Chromatogr A*, 730: 273-278.
- [169] Hjerten S. (1985) High-performance electrophoresis: Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *J Chromatogr A*, 347: 191-198.
- [170] Chankvetadze B. (2007) Enantioseparations by using capillary electrophoretic techniques: the story of 20 and a few more years. *J Chromatogr A*, 1168: 45-70.
- [171] Chankvetadze B, Linder W, Schriba GKE. (2004) Enantiomer separations in capillary electrophoresis in the case of equal binding constants of the enantiomers with a chiral selector: Commentary on the feasibility of the concept. *Anal Chem*, 76: 4256-4260.
- [172] Chankvetadze B. (2009) Separation of enantiomers with charged chiral selectors in CE. *Electrophoresis*, 30: S211-S221.

- [173] Chankvetadze B, Endresz G, Blaschke G. (1994) About some aspects of the use of charged cyclodextrins for capillary electrophoresis enantioseparation. *Electrophoresis*, 15: 804-807.
- [174] Fillet M, Bechet I, Chiap P, Hubert P, Crommen J. (1995) Enantiomeric purity determination of propranolol by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 717: 203-209.
- [175] Chankvetadze B. (2002) Enantiomer migration order in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 23: 4022-4035.
- [176] 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.
- [177] Chankvetadze B, Fillet M, Burjanadze N, Bergenthal D, Bergander C, Luftmann H, Blaschke G. (1999) Enantioseparation of aminoglutethimide with cyclodextrins in capillary electrophoresis and studies of selector-selectand interactions using NMR spectroscopy and electrospray ionization mass spectrometry. *Enantiomer*, 5: 313-322.
- [178] Sidamonidze N, Süß F, Poppitz W, Scriba GK. (2001) Influence of the amino acid sequence and nature of the cyclodextrin on the separation of small peptide enantiomers by capillary electrophoresis using α -, β -, and γ -cyclodextrin and the corresponding hydroxypropyl derivatives. *J Sep Sci*, 24: 777-783.
- [179] Chankvetadze B, Fillet M, Burjanadze N, Bergenthal D, Bergander C, Luftmann H, Blaschke G. (2000) Enantioseparation of aminoglutethimide with cyclodextrins in capillary electrophoresis and studies of selector-selectand interactions using NMR spectroscopy and electrospray ionization mass spectrometry. *Enantiomer*, 5: 313-22.
- [180] Chankvetadze B, Burjanadze N, Breitreutz J, Bergander K, Bergenthal D, Kataeva O, Blaschke G. (2002) Mechanistic study on the opposite migration order of the enantiomers of ketamine with α - and β -cyclodextrin in capillary electrophoresis. *J Sep Sci*, 25: 1155-1166.
- [181] Chankvetadze B, Kartoza I, Burjanadze N, Bergenthal D, Luftmann H, Blaschke G. (2001) Enantioseparation of chiral phenothiazine derivatives in capillary

- electrophoresis using cyclodextrin type chiral selectors. *Chromatographia*, 53: S290-S295.
- [182] Chankvetadze B, Schulte G, Bergenthal D, Blaschke G. (1998) Comparative capillary electrophoresis and NMR studies of enantioseparation of dimethindene with cyclodextrins. *J Chromatogr A*, 798: 315-323.
- [183] Chankvetadze B, Pintore G, Burjanadze N, Bergenthal D, Bergander K, Breitzkreuz J, Blaschke G. (2000) Mechanistic study of opposite migration order of dimethindene enantiomers in capillary electrophoresis in the presence of native β -cyclodextrin and heptakis (2, 3, 6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin. *J Chromatogr A*, 875: 455-469.
- [184] Chankvetadze B, Burjanadze N, Santi M, Massolini G, Blaschke G. (2002) Enantioseparation of tetramisole by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography and application of these techniques to enantiomeric purity determination of a veterinary drug formulation of L-levamisole. *J Sep Sci*, 25: 733-740.
- [185] Servais AC, Rousseau A, Fillet M, Lomsadze K, Salgado A, Crommen J, Chankvetadze B. (2010) Capillary electrophoretic and nuclear magnetic resonance studies on the opposite affinity pattern of propranolol enantiomers towards various cyclodextrins. *J Sep Sci*, 33: 1617-1624.
- [186] Chankvetadze B, Schulte G, Blaschke G. (1996) Reversal of enantiomer elution order in capillary electrophoresis using charged and neutral cyclodextrins. *J Chromatogr A*, 732: 183-187.
- [187] Tanaka M, Asano S, Yoshinaga M, Kawaguchi Y, Tetsumi T, Shono T. (1991) Separation of racemates by capillary zone electrophoresis based on complexation with cyclodextrins. *Fresenius J Anal Chem*, 339: 63-64.
- [188] Tanaka M, Yoshinaga M, Asano S, Yamashoji Y, Kawaguchi Y. (1992) Enantiomeric separation of dansylamino acids by capillary zone electrophoresis based on complexation with cyclodextrins. *Fresenius J Anal Chem*, 343: 896-900.
- [189] Chankvetadze B, Burjanadze N, Maynard DM, Bergander K, Bergenthal D, Blaschke G. (2002) Comparative enantioseparations with native β -cyclodextrin and

- heptakis-(2-O-methyl-3, 6-di-O-sulfo)- β -cyclodextrin in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 23: 3027-3034.
- [190] Chankvetadze B, Lomsadze K, Burjanadze N, Breitkreutz J, Pintore G, Chessa M, Blaschke G. (2003) Comparative enantioseparations with native β -cyclodextrin, randomly acetylated β -cyclodextrin and heptakis-(2, 3-di-O-acetyl)- β -cyclodextrin in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 24: 1083-1091.
- [191] Hammitzsch-Wiedemann M, Scriba GKE. (2009) Mathematical approach by a selectivity model for rationalization of pH- and selector concentration-dependent reversal of the enantiomer migration order in capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 81: 8765-8773.
- [192] Krajian H, Mofaddel N, Villemin D, Desbène PL. (2009) A new example of reversal of the order of migration of enantiomers, as a function of cyclodextrin concentration and pH, by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis: Enantioseparation of 6,6-binaphthyl-2,2-diol. *Anal Bioanal Chem*, 394: 2193-2201.
- [193] Schmitt T, Engelhardt H. (1995) Optimization of enantiomeric separations in capillary electrophoresis by reversal of the migration order and using different derivatized cyclodextrins. *J Chromatogr A*, 697: 561-570.
- [194] Rundlett KL, Armstrong DW. (1995) Effect of micelles and mixed micelles on efficiency and selectivity of antibiotic-based capillary electrophoretic enantioseparations. *Anal Chem*, 67: 2088-2095.
- [195] Chankvetadze B. *Capillary electrophoresis in chiral analysis*. John Wiley & Sons. 1997
- [196] Wren SAC, Rowe RC. (1992) Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis. I. Initial evaluation of a model. *J Chromatogr*, 603: 235-241.
- [197] Fu XY, Sun CR, Lu JD, Chen YZ. (1997) Effects of the substitution degree and position of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on chiral separation of drugs: By capillary electrophoresis. *Kao Teng Hsueh Hsiao Hua Heush Hsueh Pao/ Chemical Journal of Chinese Universities*, 18: 1957-1959.
- [198] Zhou S, Ouyang J, Baeyens WRG, Zhao H, Yang Y. (2006) Chiral separation of four fluoroquinolone compounds using capillary electrophoresis with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector. *J Chromatogr A*, 1130: 296-301.

- [199] Koppenhoefer B, Epperlein U, Xiaofeng Z, Bingcheng L. (1997) Separation of enantiomers of drugs by capillary electrophoresis. Part 4: Hydroxypropyl- γ -cyclodextrin as chiral solvating agent. *Electrophoresis*, 18: 924-930.
- [200] 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.
- [201] Williams BA, 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.
- [202] Stalcup AM, Gahm KH. (1996) Application of sulfated cyclodextrins to chiral separations by capillary zone electrophoresis. *Anal Chem*, 68: 1360-1368.
- [203] Chankvetadze B, Endresz G, Blaschke G. (1995) Capillary electrophoresis enantioseparation of noncharged and anionic chiral compounds using anionic cyclodextrin derivatives as chiral selectors. *J Capillary Electrophor*, 2: 235-240.
- [204] Morin P, Dreux M, Usse S, Viaud MC, Guillaumet G. (1999) Comparison of sulfobutylether- and sulfated- β -cyclodextrins as additives for the chiral separation of basic spirobenzopyrans by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 20: 2630-2637.
- [205] Wu YS, Lee HK, Li SFY. (2000) Simultaneous chiral separation of triadimefon and triadimenol by sulfated β -cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 21: 1611-1619.
- [206] Zuo L, Zhao Y, Ji F, Zhao M, Jiang Z, Sun T, Guo X. (2014) Determination of the enantiomeric and diastereomeric impurities of RS-glycopyrrolate by capillary electrophoresis using sulfated- β -cyclodextrin as chiral selectors. *Electrophoresis*, 35: 3339-3344.
- [207] Qi Y, Zhang X. (2014) Determination of enantiomeric impurity of levamlodipine besylate bulk drug by capillary electrophoresis using carboxymethyl- β -Cyclodextrin. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70: 1633-1637.
- [208] Wang W, Fu XY, Chen YZ. (1999) Carboxymethyl- β -Cyclodextrin for Chiral Separation of Basic Drugs by Capillary Electrophoresis. *Chin Chem Lett*, 10: 831-832.

- [209] Wang W, Lu J, Fu X, Chen Y. (2001) Carboxymethyl- β -cyclodextrin for chiral separation of basic drugs by capillary electrophoresis. *Anal Lett*, 34: 569-578.
- [210] Ren X, Su X, Huang A, Sun Y, Sun Z. (2000) Selectivity difference between carboxyethyl- β -cyclodextrin and carboxymethyl- β -cyclodextrin in enantioseparations of drugs by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 51: 634-637.
- [211] Mikuš P, Kubačák P, Valášková I, Havránek E. (2006) Comparison of capillary zone electrophoresis and isotachopheresis determination of dimethindene enantiomers in pharmaceuticals using charged carboxyethyl- β -cyclodextrin as a chiral selector. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 28: 595-599.
- [212] Kim H, Choi Y, Lim J, Paik SR, Jung S. (2009) Chiral separation of catechin by capillary electrophoresis using mono-, di-, tri-succinyl- β -cyclodextrin as chiral selectors. *Chirality*, 21: 937-942.
- [213] Wang F, Khaledi MG. (1998) Nonaqueous capillary electrophoresis chiral separations with quaternary ammonium β -cyclodextrin. *J Chromatogr A*, 817: 121-128.
- [214] Tang W, Muderawan IW, Ng SC, Chan HSO. (2005) Synthesis and application of mono-6-ammonium-6-deoxy- β -cyclodextrin chloride as chiral selector for capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1094: 187-191.
- [215] Németh K, Domonkos C, Sarnyai V, Szemán J, Jicsinszky L, Szente L, Visy J. (2014) Cationic permethylated 6-monoamino-6-monodeoxy- β -cyclodextrin as chiral selector of dansylated amino acids in capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal*, 99: 16-21.
- [216] Fradi I, Servais AC, Pedrini M, Chiap P, Iványi R, Crommen J, Fillet M. (2006) Enantiomeric separation of acidic compounds using single-isomer amino cyclodextrin derivatives in nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 27: 3434-3442.
- [217] Rousseau A, Chiap P, Ivanyi R, Crommen J, Fillet M, Servais AC. (2008) Validation of a nonaqueous capillary electrophoretic method for the enantiomeric purity determination of R-flurbiprofen using a single-isomer amino cyclodextrin derivative. *J Chromatogr A*, 1204: 219-225.

- [218] Valtcheva L, Mohammad J, Pettersson G, Hjertén S. (1993) Chiral separation of β -blockers by high-performance capillary electrophoresis based on non-immobilized cellulase as enantioselective protein. *J Chromatogr A*, 638: 263-267.
- [219] Shamsi SA. (2002) Chiral capillary electrophoresis-mass spectrometry: Modes and applications. *Electrophoresis*, 23: 4036-4051.
- [220] Zhao J, Hooker T, Jorgenson JW. (1999) Synchronous cyclic capillary electrophoresis using conventional capillaries: System design and preliminary results. *J Microcolumn Sep*, 11: 431-437.
- [221] Culbertson CT, Jorgenson JW. (1994) Flow counterbalanced capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 66: 955-962.
- [222] Chankvetadze B, Burjanadze N, Bergenthal D, Blaschke G. (1999) Potential of flow-counterbalanced capillary electrophoresis for analytical and micropreparative separations. *Electrophoresis*, 20: 2680-2685.
- [223] Fillet M, Chankvetadze B, Crommen J, Blaschke G. (1999) Designed combination of chiral selectors for adjustment of enantioseparation selectivity in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 20: 2691-7.
- [224] Fillet M, Hubert P, Crommen J. (2000) Enantiomeric separations of drugs using mixtures of charged and neutral cyclodextrins. *J Chromatogr A*, 875: 123-134.
- [225] Chen J, Du Y, Zhu F, Chen B, Zhang Q, Du S, Li P. (2015) Study of the enantioseparation capability of chiral dual system based on chondroitin sulfate C in CE. *Electrophoresis*, 36: 607-614.
- [226] Guan J, Li H, Yan F, Shi S, Wang S. (2014) Optimization and validation of a novel CE method for the enantioseparation of pantoprazole and related benzimidazole using a dual chiral selector system. *Electrophoresis*, 35: 2800-2806.
- [227] Rogez-Florent T, Foulon C, Six P, Goossens L, Danel C, Goossens JF. (2014) Optimization of the enantioseparation of a diaryl-pyrazole sulfonamide derivative by capillary electrophoresis in a dual CD mode using experimental design. *Electrophoresis*, 35: 2765-2771.
- [228] Servais AC, Fillet M. Application of dual cyclodextrin systems in capillary electrophoresis enantioseparations, in *Methods in Molecular Biology*, Springer, 2013. 289-295.

- [229] Neumiller JJ. (2009) Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors. *J Am Pharm Assoc*, 49 Suppl 1: S16-29.
- [230] Drucker DJ. (2003) Therapeutic potential of dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs*, 12: 87-100.
- [231] Feng J, Zhang Z, Wallace MB, Stafford JA, Kaldor SW, Kassel DB, Gwaltney II SL. (2008) Discovery of alogliptin: A potent, selective, bioavailable, and efficacious inhibitor of dipeptidyl peptidase IV. *J Med Chem*, 51: 4357.
- [232] Lee B, Shi L, Kassel DB, Asakawa T, Takeuchi K, Christopher RJ. (2008) Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy profiles of alogliptin, a novel inhibitor of dipeptidyl peptidase-4, in rats, dogs, and monkeys. *Eur J Pharmacol*, 589: 306-14.
- [233] Agrawal R, Bahare RS, Jain P, Dikshit SN, Ganguly S. (2012) Novel Serine Protease Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor: Alogliptin. *Mini Rev Med Chem*, 12: 1345-1358.
- [234] Nageswara Rao R, Sravan B, Ramakrishna K, Saida S, Padiya R. (2013) Precolumn o-Phthalaldehyde-N-acetyl-L-cysteine derivatization followed by RP-HPLC separation and fluorescence detection of sitagliptin enantiomers in rat plasma. *Chirality*. 25:883-9
- [235] Sohajda T, Hu WH, Zeng LL, Li H, Szente L, Noszal B, Beni S. (2011) Evaluation of the interaction between sitagliptin and cyclodextrin derivatives by capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Electrophoresis*, 32: 2648-54.
- [236] El-Bagary RI, Elkady EF, Ayoub BM. (2012) Liquid chromatographic determination of alogliptin in bulk and in its pharmaceutical preparation. *Int J Biomed Sci*, 8: 215-218.
- [237] Zhou Y, Zhou W, Sun L, Zou Q, Wei P, Ouyang P. (2014) Characterization of process-related impurities including forced degradation products of alogliptin benzoate and the development of the corresponding reversed-phase high-performance liquid chromatography method. *J Sep Sci*, 37: 1248-1255.

- [238] Zhang K, Ma P, Jing W, Zhang X. (2015) A developed HPLC method for the determination of Alogliptin Benzoate and its potential impurities in bulk drug and tablets. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*.10:152-158.
- [239] Srinivasa Rao G, Mallesh K, Vijay Kumar G, Surekha C, Venugopala Rao B. (2014) A validated chiral HPLC method for the enantiomeric purity of alogliptin benzoate. *Der Pharma Chemica*, 6: 234-239.
- [240] Nightingale S. (2012) The neuropathic pain market. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11: 101-102.
- [241] Tzschentke TM, Christoph T, Kögel B, Schiene K, Hennies HH, Englberger W, DeVry J. (2007) (-)-(1R,2R)-3-(3-dimethylamino-1-ethyl-2-methyl-propyl)-phenol hydrochloride (Tapentadol HCl): A novel μ -opioid receptor agonist/norepinephrine reuptake inhibitor with broad-spectrum analgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther*, 323: 265-276.
- [242] Ravikumar K, Sridhar B, Pradhan N, Khunt M. (2011) Four stereoisomers of the novel μ -opioid receptor agonist tapenta-dol hydro-chloride. *Acta Crystallogr C*, 67: o71-o76.
- [243] Ramanaih G, Ramachandran D, Srinivas G, Jayapal G, Rao P, Srilakshmi V. (2012) Development and validation of stability indicating RP-LC method for simultaneous estimation of tapentadol and paracetamol in bulk and its pharmaceutical formulations. *Drug Invention Today*, 4: 391-396.
- [244] Asha S, Deepa Ramani N, Agarwal NK. (2012) Method development and validation of tapentadol hydrochloride by RP-HPLC in pure and tablet dosage form. *J Chem Pharm Sci*, 5: 178-180.
- [245] Kayesh R, Hasan S, Sultan Z. (2013) A novel RP-HPLC method for quantification of tapentadol HCl in pharmaceutical formulations. *Der Pharma Chemica*, 5: 94-100.
- [246] Sherikar OD, Mehta PJ. (2012) Development and validation of RP- HPLC, UV-spectrometric and spectrophotometric method for estimation of tapentadol hydrochloride in bulk and in laboratory sample of tablet dosage form. *J Chem Pharm Res*, 4: 4134-4140.
- [247] Mohammed Ishaq B, Vanitha Prakash K, Krishna Mohan G. (2014) Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of tapentadol and

- paracetamol in bulk drug and its pharmaceutical dosage form. *Res J Pharm Technol*, 7: 208-212.
- [248] Lakshminarayana MV, Krishnaiah A, Suneetha G. (2015) Development and validation of HPLC method for estimation of tapentadol and its process-related impurities. *Der Pharmacia Lettre*, 7: 238-257.
- [249] Hillewaert V, Pusecker K, Sips L, Verhaeghe T, de Vries R, Langhans M, Timmerman P. (2015) Determination of tapentadol and tapentadol-O-glucuronide in human serum samples by UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B*, 981-982: 40-47.
- [250] Giorgi M, Meizler A, Mills PC. (2012) Quantification of tapentadol in canine plasma by HPLC with spectrofluorimetric detection: Development and validation of a new methodology. *J Pharm Biomed Anal*, 67–68: 148-153.
- [251] Coulter C, Taruc M, Tuyay J, Moore C. (2010) Determination of tapentadol and its metabolite N-desmethyltapentadol in urine and oral fluid using liquid chromatography with tandem mass spectral detection. *J Anal Toxicol*, 34: 458-463.
- [252] Douša M, Lehnert P, Adamusová H, Bosáková Z. (2013) Fundamental study of enantioselective HPLC separation of tapentadol enantiomers using cellulose-based chiral stationary phase in normal phase mode. *J Pharm Biomed Anal*, 74: 111-116.
- [253] Qiu S, De Gussem E, Abbaspour Tehrani K, Sergeyev S, Bultinck P, Herrebout W. (2013) Stereochemistry of the tadalafil diastereoisomers: A critical assessment of vibrational circular dichroism, electronic circular dichroism, and optical rotatory dispersion. *J Med Chem*, 56: 8903-8914.
- [254] Ali, I., Aboul-Enein, H.Y. (2004) Validated method for tadalafil analysis in pharmaceutical preparations by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 60: 187-191.
- [255] Aboul-Enein HY, Ali I. (2005) Determination of tadalafil in pharmaceutical preparation by HPLC using monolithic silica column. *Talanta*, 65: 276-280.
- [256] Raul SK, Ravi kumar BVV, Pattnaik AK. (2012) A RP-HPLC method development and validation for the estimation of Tadalafil in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Res J Pharm Technol*, 5: 1573-1576.

- [257] Samala A, Pawar S, Manala S, Chada S, Nageshwar M. (2013) RP-HPLC method development and validation of tadalafil in tablet dosage form. *J Chem Pharm Res*, 5: 315-318.
- [258] Bojanapu A, Subramaniam AT, Munusamy J, Dhanapal K, Chennakesavalu J, Sellappan M, Jayaprakash V. (2015) Validation and method development of tadalafil in bulk and tablet dosage form by RP-HPLC. *Drug Research*, 65: 82-85.
- [259] Unnisa A, Babu Y, Suggu SK, Chaitanya S. (2014) RP-HPLC-PDA method development and validation for the analysis of Tadalafil in bulk, pharmaceutical dosage forms and in-vitro dissolution samples. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4: 072-076.
- [260] Barot TG, Patel PK. (2010) Determination of tadalafil in pure powder and tablet dosage form by high-performance liquid chromatography. *J AOAC Int*, 93: 516-522.
- [261] Rao DVS, Radhakrishnanand P, Himabindu V. (2008) Stress degradation studies on tadalafil and development of a validated stability-indicating LC assay for bulk drug and pharmaceutical dosage form. *Chromatographia*, 67: 183-188.
- [262] Mohammad Y, Pragati Kumar B, Sreenivas R, Gupta R. (2010) A simple and sensitive reverse phase high performance liquid chromatographic method for the estimation of Tadalafil in bulk and tablet dosage form. *J Chem Pharm Sci*, 3: 258-261.
- [263] Rabbaa-Khabbaz L, Daoud RA. (2006) A sensitive and simple high performance liquid chromatographic method for quantification of tadalafil in human serum. *Journal of Applied Research*, 6: 170-175.
- [264] Shakya AK, Abu-awwad ANA, Arafat TA, Melhim M. (2007) Validated liquid chromatographic-ultraviolet method for the quantitation of tadalafil in human plasma using liquid-liquid extraction. *J Chromatogr B*, 852: 403-408.
- [265] Ma B, Shang X, Zhang Q, Li J, Liu Y, Cao X, Xu Q. (2013) Rapid analysis of tadalafil in human blood plasma and seminal plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 77: 149-157.

- [266] Farthing CA, Farthing DE, Koka S, Larus T, Fakhry I, Xi L, Gehr TWB. (2010) A simple and sensitive HPLC fluorescence method for determination of tadalafil in mouse plasma. *J Chromatogr B*, 878: 2891-2895.
- [267] Mehanna MM, Motawaa AM, Samaha MW. (2012) Quantitation of transdermal tadalafil in human skin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J AOAC Int*, 95: 1064-1068.
- [268] Yang YJ, Song DM, Jiang WM, Xiang BR. (2010) Rapid resolution RP-HPLC-DAD method for simultaneous determination of sildenafil, vardenafil, and tadalafil in pharmaceutical preparations and counterfeit drugs. *Anal Lett*, 43: 373-380.
- [269] Patel JK, Patel NK. (2014) Stability-indicating RP-HPLC method for the determination of Ambrisentan and Tadalafil in pharmaceutical dosage form. *Scientia Pharmaceutica*, 82: 749-763.
- [270] Kannappan N, Yada D, Yada D, Shashikanth MR. (2010) Method development and validation of stability indicating methods for assay of Tadalafil and Sildenafil citrate by HPLC. *International Journal of ChemTech Research*, 2: 329-333.
- [271] Giri AD, Bhusari VK, Dhaneshwar SR. (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.
- [272] Park M, Ahn S. (2012) Quantitative analysis of sildenafil and tadalafil in various fake drugs recently distributed in Korea. *Journal of forensic sciences*, 57: 1637-1640.
- [273] Gao W, Zhang Z, Li Z, Liang G. (2007) Chiral separation of two pairs of enantiomers of tadalafil by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci*, 45: 540-543.
- [274] Madhavi A, Reddy GS, Suryanarayana MV, Naidu A. (2008) Chiral separation of (R,R)-tadalafil and its enantiomer in bulk drug samples and pharmaceutical dosage forms by chiral RP-LC. *Chromatographia*, 67: 633-638.
- [275] Thunhorst M, Otte Y, Jefferies TM, Branch SK, Holzgrabe U. (1998) Effect of various cyclodextrin derivatives on the resolution of fencamfamine isomers with capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance. *J Chromatogr A*, 818: 239-249.

- [276] Calvet C, Cuberes R, Pérez-Maseda C, Frigola J. (2002) Enantioseparation of novel COX-2 anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis using single and dual cyclodextrin systems. *Electrophoresis*, 23: 1702-1708.
- [277] Surapaneni S, Ruterbories K, Lindstrom T. (1997) Chiral separation of neutral species by capillary electrophoresis evaluation of a theoretical model. *J Chromatogr A*, 761: 249-257.
- [278] Lee D, Shamsi SA. (2002) Chiral separation of anionic and neutral compounds using a hepta-substituted cationic β -cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 23: 1314-1319.
- [279] Abushoffa AM, Burjanadze N, Blaschke G, Crommen J, Chankvetadze B. (2002) Comparative study on the enantioseparation of glutethimide using dual cyclodextrin systems and cyclodextrin modified MEKC in capillary electrophoresis. *J Sep Sci*, 25: 10-16.
- [280] Daugan ACM. Tetracyclic derivatives; process of preparation and use. Google Patents. 1999.
- [281] Shi XX, Liu SL, Xu W, Xu YL. (2008) Highly stereoselective Pictet-Spengler reaction of d-tryptophan methyl ester with piperonal: convenient syntheses of Cialis (Tadalafil), 12a-epi-Cialis, and their deuterated analogues. *Tetrahedron Asymmetry*, 19: 435-442.
- [282] Avdeef A. (1978) Accurate measurements of the concentration of hydrogen ions with a glass electrode: Calibrations using the prideaux and other universal buffer solutions and a computer-controlled automatic titrator. *Anal Chem*, 50: 2137-2142.
- [283] Hwang TL, Shaka AJ. (1995) Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J Magn Reson A*, 112: 275-279.
- [284] Kyvala M, Lukes I. OPIUM computer program in Chemometrics'95 1995: Pardubice. Book of abstracts 63.
- [285] Tam KY, Takács-Novák K. (2001) Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: A validation study. *Anal Chim Acta*, 434: 157-167.

- [286] Takács-Novák K, Avdeef A. (1996) Interlaboratory study of log P determination by shake-flask and potentiometric methods. *J Pharm Biomed Anal*, 14: 1405-1413.
- [287] Wallingford RA, Ewing AG. (1989) Capillary electrophoresis. *Advances in Chromatography*, 29: 1-76.
- [288] King EJ. *Acid-Base Equilibria*. 1965, Oxford: Pergamon.
- [289] Bowser MT, Chen DDY. (1998) Monte Carlo simulation of error propagation in the determination of binding constants from rectangular hyperbolae. 1. Ligand concentration range and binding constant. *J Phys Chem A*, 102: 8063-8071.
- [290] Bowser MT, Chen DDY. (1999) Monte Carlo simulation of error propagation in the determination of binding constants from rectangular hyperbolae. 2. Effect of the maximum-response range. *J Phys Chem A*, 103: 197-202.
- [291] ICH-Guideline Q2(R1). *Validation of analytical procedures: Text and Methodology*. ICH Steering Committee, 2005, 1-13.
- [292] Liu M, Zheng Y, Ji Y, Zhang C. (2011) Development and validation of a capillary electrophoresis method for the enantiomeric purity determination of RS86017 using experimental design. *J Pharm Biomed Anal*, 55: 93-100.
- [293] Jimidar M, Niemeijer N, Peeters R, Hoogmartens J. (1998) Robustness testing of a liquid chromatography method for the determination of vorozole and its related compounds in oral tablets. *J Pharm Biomed Anal*, 18: 479-485.
- [294] Avdeef A. *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability and Charge State*.:Wiley New York, 2012.
- [295] Takács-Novák K. *Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development*. Physicochemical profiling in drug research and development, IAPC Publishing, Zagreb, 2012.
- [296] Mazák K, Noszál B. (2012) Lipophilicity of morphine microspecies and their contribution to the lipophilicity profile. *Eur J Pharm Sci*, 45: 205-210.
- [297] Santos MA, Esteves MA, Vaz MC, Da Silva JJR, Noszál B, Farkas E. (1997) Microscopic acid-base equilibria of a synthetic hydroxamate siderophore analog, piperazine-1,4-bis(N-methylacetohydroxamic acid). *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2*, 1977-1983.
- [298] FDA. *Full Prescribing Information of Nucynta*. 2010 [cited 2013. 09. 03.].

- [299] Sohajda T, Szakacs Z, Szente L, Noszal B, Beni S. (2012) Chiral recognition of imperanene enantiomers by various cyclodextrins: a capillary electrophoresis and NMR spectroscopy study. *Electrophoresis*, 33: 1458-64.
- [300] Lomsadze K, Vega ED, Salgado A, Crego AL, Scriba GK, Marina ML, Chankvetadze B. (2012) Separation of enantiomers of norephedrine by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors: Comparative CE and NMR studies. *Electrophoresis*, 33: 1637-1647.
- [301] Beni S, Sohajda T, Neumajer G, Ivanyi R, Szente L, Noszal B. (2010) Separation and characterization of modified pregabalins in terms of cyclodextrin complexation, using capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance. *J Pharm Biomed Anal*, 51: 842-52.
- [302] Trefi S, Routaboul C, Hamieh S, Gilard V, Malet-Martino M, Martino R. (2008) Analysis of illegally manufactured formulations of tadalafil (Cialis®) by ¹H NMR, 2D DOSY ¹H NMR and Raman spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*, 47: 103-113.
- [303] Wren SA, Rowe RC. (1992) Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis: II. The role of organic solvent. *J Chromatogr A*, 609: 363-367.
- [304] Marina M, Benito I, Diez-Masa J, González M. (1996) Separation of chiral polychlorinated biphenyls by micellar electrokinetic chromatography using β - and γ -cyclodextrin mixtures in the separation buffer. *J Chromatogr A*, 752: 265-270.
- [305] Matthijs N, Van Hemelryck S, Maftouh M, Massart DL, Vander Heyden Y. (2004) Electrophoretic separation strategy for chiral pharmaceuticals using highly-sulfated and neutral cyclodextrins based dual selector systems. *Anal Chim Acta*, 525: 247-263.
- [306] Mechref Y, El Rassi Z. (1996) Capillary electrophoresis of herbicides. 1. Precolumn derivatization of chiral and achiral phenoxy acid herbicides with a fluorescent tag for electrophoretic separation in the presence of cyclodextrins and micellar phases. *Anal Chem*, 68: 1771-1777.
- [307] Németh K, Varga E, Iványi R, Szemán J, Visy J, Jicsinszky L, Péter A. (2010) Separation of cis- β -lactam enantiomers by capillary electrophoresis using cyclodextrin derivatives. *J Pharm Biomed Anal*, 53: 382-388.

- [308] Nhujak T, Sastravaha C, Palanuvej C, Petsom A. (2005) Chiral separation in capillary electrophoresis using dual neutral cyclodextrins: Theoretical models of electrophoretic mobility difference and separation selectivity. *Electrophoresis*, 26: 3814-3823.
- [309] Chinaka S, Tanaka S, Takayama N, Komai K, Ohshima T, Ueda K. (2000) Simultaneous chiral analysis of methamphetamine and related compounds by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B*, 749: 111-118.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

[S1] Fejős I, Urbancsok Zs, Zhou W, Sohajda T, Hu WH, Sente L, Béni Sz. (2014) Separation of alogliptin enantiomers in cyclodextrin-modified capillary electrophoresis: a validated method, *Electrophoresis*, 35: 2885-2891.

[S2] Fejős I, Kzsoki A, Sohajda T, Márványos E, Volk B, Sente L, Béni Sz. (2014) Interactions of non-charged tadalafil stereoisomers with cyclodextrins: Capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance studies. *J Chromatogr A*, 1363: 348-355.

[S3] Fejős I, He Y, Völgyi G, Kzsoki A, Sun J, Chen W, Sohajda T, Sente L, Jiang X, Béni Sz. (2014) Tapentadol enantiomers: Synthesis, physico-chemical characterization and cyclodextrin interactions. *J Pharm Biomed Anal*, 88: 594–601.

[S4] Znalezniona J, Fejős I, Ševčík J, Douša M, Béni Sz, Maier V. (2014) Enantiomeric separation of tapentadol by capillary electrophoresis—Study of chiral selectivity manipulation by various types of cyclodextrins. *J Pharm Biomed Anal*, 105: 10–16.

[S5] Fejős I, Neumajer G, Béni Sz, Jankovics P. (2014) Qualitative and quantitative analysis of PDE-5 inhibitors in counterfeit medicines and dietary supplements by HPLC–UV using sildenafil as a sole reference, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 98: 327-333.

Egyéb közlemény

[S6] Sohajda T, Varga E, Iványi R, Fejős I, Sente L, Noszál B, Béni Sz. (2010) Separation of vinca alkaloid enantiomers by capillary electrophoresis applying cyclodextrin derivatives and characterization of cyclodextrin complexes by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J Pharm Biomed Anal*, 53: 1258-1266.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Noszál Béla volt tanszékvezető egyetemi tanárnak, valamint Dr. Horváth Péter jelenlegi tanszékvezető egyetemi docensnek, hogy munkámat diákkörös hallgató korom óta a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézetében végezhettem.

Megkülönböztetett köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Béni Szabolcs egyetemi docenst, aki feltárta előttem a kutatómunka szépségeit, támogatott doktorandusz éveim alatt és akitől a munkám során felmerülő problémákra mindig segítséget kaptam.

Külön köszönet illeti Dr. Jankovics Pétert és Neumajer Gábort (Országos Gyógyszerészeti Intézet) a HPLC mérésekben nyújtott segítségéért és a hasznos konzultációkért.

Szeretném megköszönni Dr. Szakács Zoltánnak (Richter Gedeon Nyrt.) a kapilláris elektroforetikus és NMR mérésekkel kapcsolatos konzultációkat.

Köszönettel tartozom Dr. Sente Lajosnak és Dr. Sohajda Tamásnak (Cyclolab Kutató és Fejlesztő Kft.) a ciklodextrin-komplexek vizsgálatában nyújtott tanácsaikért, segítségükért, valamint a Cyclolab Kft-nek, hogy rendelkezésre bocsátotta a vizsgálatokhoz szükséges ciklodextrineket.

Köszönöm Joanna Znalezió-nak, Juraj Ševčík-nek, Michal Douša-nak és Vítězslav Maier-nek a 4 tapentadol sztereoizomerre kiterjesztett vizsgálatokban nyújtott segítséget.

Szeretném megköszönni a közös munkát Kazsoki Adriennek, tudományos diákköri hallgatónak (Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet) a tapentadol és a tadalafil sztereoizomerek elválasztásában, Urbancsok Zsuzsannának (tudományos diákköri hallgató, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet) pedig az alogliptin enantiomerek elválasztásában. Köszönettel tartozom Dr. Völgyi Gergelynek a vegyületek fizikai-kémiai jellemzésében nyújtott segítségét.

Köszönöm továbbá Wei Zhou-nak és Wen Hui Hu-nak (Kínai Tudományos Akadémia, Guangzhou, Kína) az alogliptin enantiomerek, valamint Márványos Edének és Volk Baláznak (Egis Gyógyszergyár Zrt.) a tadalafil sztereoizomerek szintézisét és rendelkezésre bocsátását.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet és az Országos Gyógyszerészeti Intézet HPLC laboratórium valamennyi munkatársának a baráti, inspiráló atmoszférát.

Végezetül külön köszönet illeti családomat türelmükért és állandó támogatásukért.