

Kromatográfiás és elektroforetikus gyógyszeranalitikai módszerek fejlesztése

Doktori tézisek

Fejős Ida

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



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

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

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

Budapest
2016

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 törzkönyvezett 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 vizsgáló 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 sildenafilil 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) alkalmazzák, 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 sztérikus illeszkedése az üregükbe. Ez az üreg a CD számos kiralitáscentruma által kialakított királis mikrokönyezetként fogható fel, melynek köszönhetően létrejöhet a sztereoszelektív 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.

Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki egyrészt egy egyszerű, gyors, MS kompatibilis HPLC-UV módszer kidolgozását, mellyel a PDE-5 enzimet gátló szildenafil, vardenafil, tadalafil, illetve ezek 11 gyakrabban előforduló (az 1. ábrán bemutatott) dizájner analógjai azonosíthatóak és mennyiségük meghatározható egyetlen külső (szildenafil) 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 ciklodextrinekkal 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 ciklodextrinekkal 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.

Módszerek

A PDE-5 inhibitor vegyületek elválasztására HPLC-UV módszert fejlesztését valósítottuk meg, az MS kompatibilitást szem előtt tartva. Az optimalizált módszer validálása az ICH analitikai módszerek validálására vonatkozó irányelvek alapján történt a specificitás, szelektivitás, precizitás, linearitás, kimutatási határ (limit of detection, LOD), meghatározhatósági határ (limit of quantitation, LOQ), torzítatlanság, robusztusság és stabilitás szempontjából. A gyanús készítményekben a PDE-5 inhibitor minőségi azonosítása a szildenafilre vonatkoztatott relatív retenciók és az UV-spektrumok alapján történt, míg mennyiségük a szildenafilre vonatkoztatott relatív érzékenységekből származtatott korrekciós faktorok, a sildenafil külső standard koncentrációja és a minta hígítása alapján volt számítható.

A királis kapilláris elektroforetikus módszerek fejlesztése esetén első lépésként az alogliptin és a tapentadol sav-bázis tulajdonságait vizsgáltuk. A protonálódási makroállandók meghatározására alogliptin esetén CE-pH titrálást és potenciometriát, míg tapentadol esetén ^1H NMR-pH titrálást és potenciometriát alkalmaztunk.

Számos semleges, pozitív és negatív töltéssel rendelkező α - β - és γ -CD származék királis elválasztó képességét vizsgáltuk a három optikailag aktív vegyület esetén. Amennyiben az enantiomerek elváltak, a felbontást az alábbi képlet alapján határoztuk meg:

$$R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1} \quad (1)$$

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 migrációs különbsége szükséges.

$$\begin{aligned} \Delta\mu &= \mu_2 - \mu_1 \\ &= \frac{\mu_{szabad} + \mu_{kplx 2} K_{stab 2} [\text{CD}]}{1 + K_{stab 2} [\text{CD}]} - \frac{\mu_{szabad} + \mu_{kplx 1} K_{stab 1} [\text{CD}]}{1 + K_{stab 1} [\text{CD}]} \end{aligned} \quad (2)$$

ahol μ_1 és μ_2 az egyes enantiomerek effektív mozgékonyágai; $K_{stab 1}$ és $K_{stab 2}$ a szelektor-enantiomer komplexek komplexstabilitási állandói (M^{-1}); μ_{szabad} és μ_{kplx} a szabad és a szelektorhoz kötött enantiomerek effektív mozgékonyágai; $[\text{CD}]$ a pufferben oldott királis szelektor koncentrációja (M). A $\Delta\mu$ mobilitás különbséget a (2) egyenlet alapján modelleztük a CD koncentráció függvényében több alogliptin-CD és tadalafil-CD rendszerre az elválasztáshoz szükséges optimális CD koncentráció előrejelzése érdekében.

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 ciklodextrin-analit látszólagos komplexstabilitási állandókat a mért μ_{eff} - $[CD]$ adatsorok alábbi egyenlet szerinti, Microcal Origin (OriginLabs) segítségével történő illesztésével határoztuk meg:

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_{szabad} + \mu_{kplx} K_{stab} [CD]}{1 + K_{stab} [CD]} \quad (3)$$

ahol az illesztett paraméterek a μ_{kplx} és a K_{stab} . 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 migráló sztereoizomerre.

Az alogliptin enantiomerek elválasztására kidolgozott kapilláris elektroforetikus módszert is az ICH irányelvek alapján validáltuk: a precizitás, kimutathatósági határ, meghatározhatósági határ, a linearitás és a robusztusság szempontjából, míg a tapentadol sztereoizomerek elválasztására kidolgozott módszer részleges validálása a precizitás, kimutathatósági határ, meghatározhatósági határ, a linearitás és a torzítatlanság szempontjából történt.

Eredmények

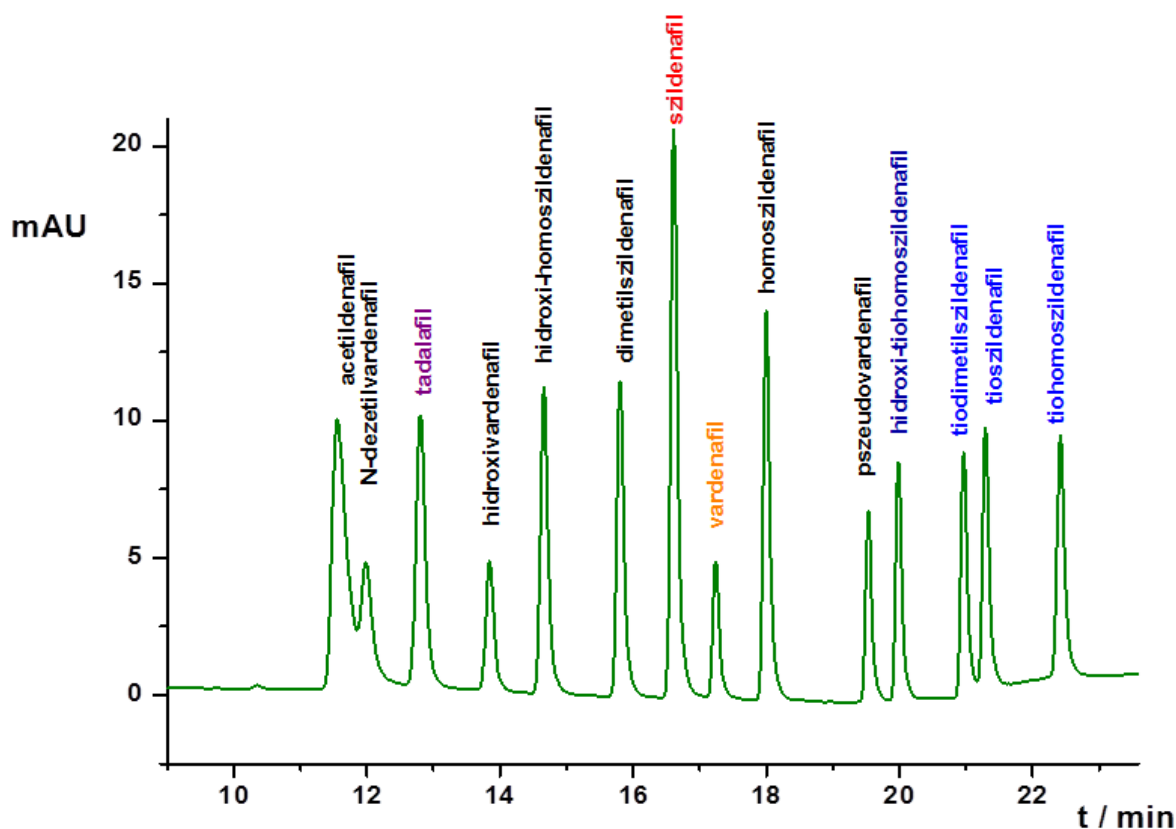
Rokon szerkezetű PDE-5 gátló potencianövelő vegyületek folyadékkromatográfiás elválasztása

A módszerfejlesztés első lépéseként metanol:acetonitril különböző arányú elegyeit vizsgáltuk a PDE-5 inhibitor vegyületek készítményekből történő extrakciója szempontjából, és végül az 1:1 v/v arányú elegyük bizonyult megfelelőnek. Szerkezetük és UV elnyelésük szempontjából a vegyületek 5 csoportra oszthatóak. Detektálási hullámhosszként a 290 nm-t választottuk: itt minden komponens jelentős elnyeléssel bír, és aránylag közel esik az abszorpciós maximumokhoz. Az állófázis megválasztása az elválasztás szempontjából sarkalatos, héj szerkezetű C18-as fordított fázisú kolonnát választottuk a megfelelő retenció és csúcsalak miatt a további módszeroptimalizálásra. Mivel a tadalafilen kívül az összes vegyület tartalmaz legalább egy bázikus nitrogént, a mozgófázis pH kontrollja szükséges. Célunk egy MS-kompatibilis rendszer fejlesztése volt, így a pH hatását ammónium-acetátot és ecetsavat tartalmazó rendszerekben vizsgáltuk. Optimálisnak a 200 mM ammónium-acetát (pH~7) rendszer bizonyult. A pH~7 rendszerek, melyek B-eluensként csak acetonitrilt illetve csak metanolt tartalmaztak nem voltak képesek a 14 komponens elválasztására, így különböző

arányú metanol:acetonitril elegyeket vizsgáltuk az elválasztás szempontjából. Az 1:1 arányú elegyűk az 1. táblázat szerinti gradiens program mellett bizonyult optimálisnak A-eluensként 200 mM ammónium-acetátot tartalmazó pufferalkotót alkalmazva 25°C-os oszlophőmérséklet, 5 µl injektálási térfogat és 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett (1. ábra).

1. táblázat: Az alkalmazott 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

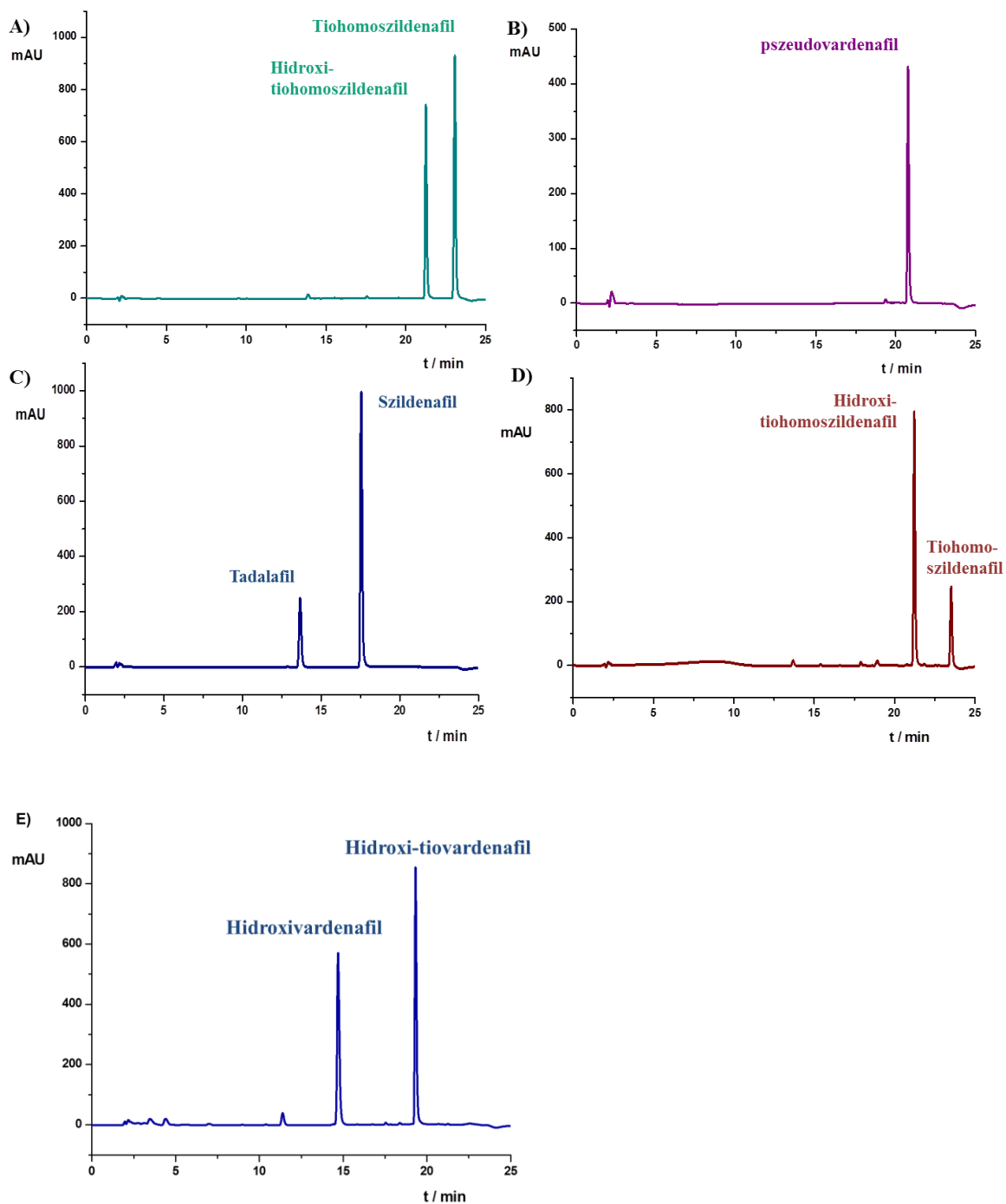


1. ábra: Az optimalizált rendszer kromatogramja (Kinetex C18 2,5 µm·100 mm·3 mm oszlop, A-eluens: 200 mM ammónium-acetát (pH~7), B-eluens: metanol:acetonitril 1:1 (v/v), gradiens elúció (1.táblázat), 0,5 ml/perc, 25°C, 5 µl inj., 290 nm)

A szildenafil a rendszer közepén eluálódik, ami előnyös a kvalitatív és a kvantitatív analízis szempontjából, mivel a szildenafilt használjuk, mint külső standardot. A szildenafil és a vardenafil egymás után jelenik meg a kromatogramon, a két vegyület megfelelő felbontása a rendszeralkalmassági vizsgálatok szempontjából fontos. Célunk a PDE-5 inhibitorok kvalitatív és kvantitatív analízisét egyaránt biztosító módszer fejlesztése volt, ahol az azonosítás alapja a szildenafil külső standardra vonatkoztatott relatív retenciós adatok és a vegyület UV-spektrumának referencia spektrummal történő összehasonlítása. Az adott komponens azonosítása azonban csak abban az esetben fogadható el, ha a relatív retencióra és az UV-spektrumra vonatkozó követelményt is kielégíti. 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 lehetséges szignifikáns különbségeinek kiküszöbölése pedig egy korrekciós faktor alkalmazásával lehetséges. A módszerünkben alkalmazott korrekciós faktorok számítása a validálás során kapott regressziós egyenesek szildenafilre vonatkoztatott relatív meredekségén alapul. A hatóanyag-tartalmat a vizsgálati minta egy adagolási egységére vonatkoztatva a külső standard oldat koncentrációja, a minta hígítása és a korrekciós faktorok alapján számíthatjuk.

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 vizsgálatunk. Számos mintában találtunk szildenafil, tioszildenafil analógokat, vardenafil analógokat és tadalafilt (2. ábra).

Az E) minta 18 mg hidroxivardenafil és egy olyan PDE-5 inhibitor analógot tartalmaz, amit nem tartalmazott a mi standard mintaoldatunk. 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 kromatográfias módszerünket MS detektálással kiegészítve a komponenst hidroxio-wardenafilként azonosítottuk. A vardenafil, mint alapvegyület korrekciós faktorát (2,1) alkalmazva körülbelül 20 mg HTV-t tartalmazott a készítmény. 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.



2. ábra: Hamisított gyógynövény-alapú készítmények vizsgálata: A) minta 60 mg hidroxio-tiohomoszildenafil és 67 mg tiohomoszildenafil kapszulánként; B) minta 9 mg pszeudovardenafil kapszulánként; C) minta 9 mg tadalafil és 33 mg szildenafil kapszulánként, D) minta 65 mg hidroxio-tiohomoszildenafil és 20 mg tiohomoszildenafil kapszulánként; E) minta 18 mg hidroxivardenafil és 20 mg hidroxi-tiovardenafil

Optikailag aktív vegyületek elválasztása ciklodextrin-alapú kapilláris elektroforézissel

A módszerfejlesztés első lépéseként a molekulák elválasztás szempontjából releváns fizikai-kémiai tulajdonságait vizsgáltuk. A CE-pH titrálást eredményeként a primer amin csoportot tartalmazó alogliptin esetén $\log K = 8,34 \pm 0,02$ értéket kaptuk, melyet potenciometriával erősítettünk meg ($\log K = 8,50 \pm 0,04$). Az eredmények értelmében a CE méréseknél alkalmazott háttérelktrolitok pH-ját minimum egy egységgel az alogliptin $\log K$ értékétől kisebbre kell, hogy beállítsuk, ahol az alogliptin dominánsan kationos formában létezik. Tapentadol esetén is szükség volt a molekula sav-bázis tulajdonságainak vizsgálatára: a molekula egy savas fenolos hidroxil és egy bázikus tercier alifás amin funkciós csoporttal rendelkezik. A potenciometriás titrálást ($\log K_1 = 10,59 \pm 0,01$ és $\log K_2 = 9,44 \pm 0,01$) $^1\text{H NMR-pH}$ titrálással erősítettük meg ($\log K_1 = 10,62 \pm 0,03$ és $\log K_2 = 9,48 \pm 0,03$). Az amino-csoport protonálódásának köszönhetően a tapentadol savas körülmények között (pl. pH 2,5) pozitív töltéssel rendelkezik, míg bázikus körülmények között (pl. pH 9,5) részben pozitív, így a CE mérések során semleges CD-k is vizsgálhatóak lesznek. 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 elektroosmotikus áramlással mind a négy semleges izomer. A semleges sztereoizomerek elválasztásához töltéssel rendelkező ciklodextrinre volt szükség, hogy az elválasztáshoz szükséges mobilitáskülönbség létrejöjjön a migráció során. A tadalafil vízdékonysága igen gyenge, gyakorlatilag vízben oldhatatlan vegyület. Ahhoz, hogy a tadalafil CD-vel történő komplexképzése CE-vel vizsgálható legyen, szükség volt az oldatkészítés optimalizálására.

A módszerfejlesztés következő lépéseként a különböző ciklodextrinek királis elválasztó képességét vizsgáltuk. Az alogliptin enantiomerek elválasztása céljából három natív, öt semleges és öt negatív töltéssel rendelkező CD származékot vizsgáltunk a 0,25-80 mM koncentráció tartományban több koncentrációsinten 30 mM acetátpuffer (pH 4,75) mellett. A vizsgált ciklodextrin származékok közül hat részlegesen vagy alapvonalig választotta el az enantiomereket. A szulfopropil- γ -CD esetén tapasztaltuk a legnagyobb felbontást ($R_S = 5,16$), melyet a szulfobutil-éter- γ -CD ($R_S = 4,75$) követett. A β -ciklodextrin származékok közül a szulfobutil-éter- β -CD ($R_S = 4,64$) mutatta a legjobb elválasztást.

Az *R,R*- és *S,S*-tapentadol elválasztásának vizsgálatára két natív, öt semleges és tizenkettő negatív töltéssel rendelkező CD származékot alkalmaztunk a 0,125-30 mM koncentráció tartományban 50 mM Tris-ecetsav (pH 4,75) háttérelktrolitban. A semleges CD származékok

közül egy α - és egy β -CD származék esetén tapasztaltunk felbontást, míg a vizsgált töltéssel rendelkező CD származékok közül mind elválasztotta az enantiomereket, szulfatált- α -CD esetén kimagasló felbontást kaptunk ($R_S = 16,18$). A négy sztereoizomer elválaszthatóságát vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy savas (pH 2,50 foszfátpuffer) körülmények között a hidroxipropil-CD származékok csak bizonyos enantiomer pár elválasztását tették lehetővé: a hidroxipropil- β -CD csak az S,R - és R,S -tapentadolt ($R_S = 1,63$), a hidroxipropil- γ -CD pedig csak az R,R - és S,S -tapentadolt ($R_S = 4,50$) választotta el. A két semleges hidroxipropil-CD származékot közös rendszerben alkalmazva megfelelő körülmények között (4 mM hidroxipropil- β -CD és 35 mM hidroxipropil- γ -CD) duál rendszer fejleszthető, melyben mind a négy izomer elválasztása megvalósulhat. Szulfatált- α -CD esetén (S,S , S,R , R,S , R,R migrációs sorrenddel) alapvonal elválasztást tapasztaltunk lúgos körülmények (pH 9,5 borátpuffer) között.

Tadalafil esetén a királis elválasztást 22 töltéssel rendelkező CD származékkal vizsgáltuk: közülük 4 részleges, míg 11 alapvonal elválasztást eredményezett. A terápiában alkalmazott R,R -tadalafil és az S,S -tadalafil enantiomer elválasztását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy négy negatív töltéssel rendelkező β -CD származék esetén kaptunk 7,00 fölötti R_S értékeket. Az α -CD származékok közül a szulfatált- α -CD mutatta a legnagyobb felbontást ($R_S = 5,19$), melyet a szulfobutil-éter- α -CD követett ($R_S = 4,26$).

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, segítséget nyújthatnak a megfelelő szelektor kiválasztásában, mely a módszeroptimalizálás egyik kritikus lépése. Azokban az esetekben, ahol az enantiomerek alapvonal elválasztását tapasztaltuk két analit-CD komplex stabilitási állandót (K_{stab1} , K_{stab2} az elsőként és másodikként migráló enantiomerre), valamint határmobilitást (μ_{kplx1} , μ_{kplx2}) tudtuk számítani.

Alogliptin esetén a 0,25-80 mM koncentráció tartományban végeztük a keletkező komplexek stabilitásának vizsgálatát 30 mM acetátpuffert (pH 4,75) tartalmazó háttéreltrotit mellett (2. táblázat). 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-vel 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.

2. táblázat: Alogliptin-CD látszólagos komplexstabilitási állandók, a komplexek határmobilitása valamint az enantiomerek migrációs sorrendje (EMO)

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

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 (pH 4,75) háttérelktrolitban (3. táblázat).

3. táblázat: Tapentadol-CD látszólagos komplexstabilitási állandók, a komplexek határmobilitása valamint az enantiomerek migrációs sorrendje (EMO)

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	R,R ; S,S
TRIME- α -CD	~18	<10		a		
RAME- α -CD	~11	60 ± 8	75 ± 8	$6,4 \pm 0,6$	$6,5 \pm 0,5$	R,R ; S,S
SBE- α -CD	~4	370 ± 10	440 ± 10	$-14 \pm 0,2$	$-15 \pm 0,2$	R,R ; S,S
SP- α -CD	~2	210 ± 20	240 ± 20	$-4,7 \pm 0,9$	$-5,0 \pm 0,8$	R,R ; S,S
S- α -CD	~12	550 ± 45	620 ± 55	$-29 \pm 0,9$	-32 ± 1	S,S; R,R
CM- α -CD	~3,5	480 ± 20	570 ± 20	$-13 \pm 0,2$	$-14 \pm 0,1$	R,R ; S,S
β		355 ± 9		$7,7 \pm 0,08$		
TRIME- β -CD	~21	<10	<10	a	a	R,R ; S,S
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	$-15 \pm 0,3$	$-15 \pm 0,2$	R,R ; S,S
	~6,5	2470 ± 140	2710 ± 160	$-28 \pm 0,5$	$-29 \pm 0,5$	R,R ; S,S
SP- β -CD	~4	3940 ± 320	4360 ± 350	$-22 \pm 0,2$	$-22 \pm 0,2$	R,R ; S,S
	~2	2330 ± 70	2490 ± 60	$-20 \pm 0,1$	$-20 \pm 0,1$	R,R ; S,S
SHP- β -CD	~2,5	1210 ± 20	1350 ± 70	$-11 \pm 0,08$	$-11 \pm 0,1$	S,S; R,R
CM- β -CD	~3	7510 ± 460	8140 ± 480	$-17 \pm 0,1$	$-17 \pm 0,1$	S,S; R,R
CE- β -CD	~3	3810 ± 210	3830 ± 220	$-3,6 \pm 0,1$	$-3,8 \pm 0,1$	S,S; R,R
Phos- β -CD	~4	6480 ± 200	6740 ± 85	$-23 \pm 0,1$	$-24 \pm 0,1$	S,S; R,R

a: a határmobilitás számítása nagy hibával terhelt

A töltéssel nem rendelkező CD-k csekély affinitást mutattak a kationos tapentadol felé, azonban kiemelkedő stabilitást tapasztaltunk az anionos oldalláncú karboximetil- β -CD és foszfatált- β -CD esetén. Annak ellenére, hogy a tapentadol affinitása a β -CD származékok iránt jóval nagyobb, vagyis azok üregméretébe jobban tud illeszkedni a tapentadol, az α -CD származékok esetén jobb az enantiomerek elválasztása. Valószínűleg nem az üregben, hanem az oldalláncokkal létrejövő kölcsönhatások a szelektívek. A szulfatált- 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.

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 (4. táblázat).

4. táblázat: Tadalafil-CD látszólagos komplexstabilitási állandók, valamint az enantiomerek migrációs sorrendje (EMO)

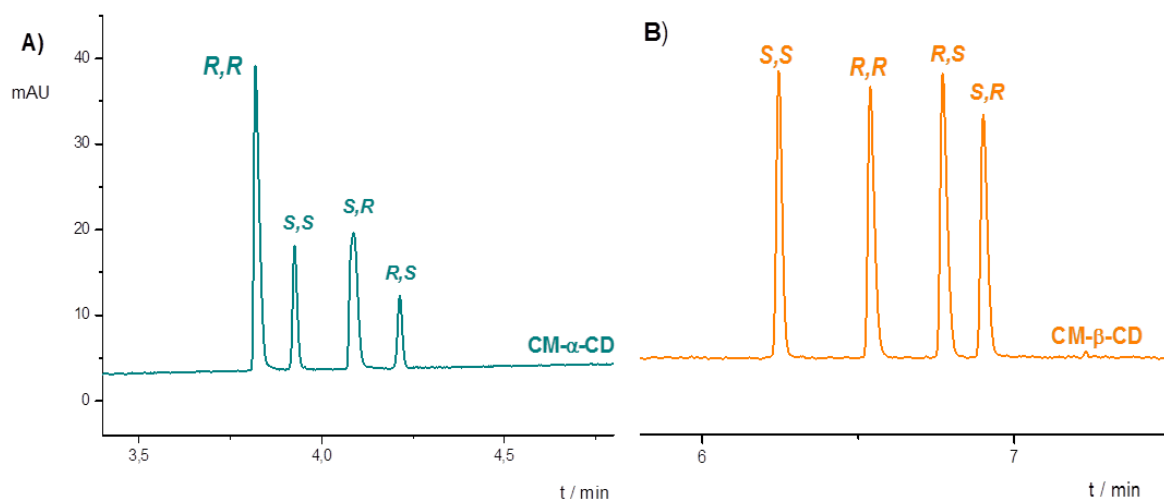
CD	K_{stab1}	K_{stab2}	K_{stab3}	K_{stab4}	EMO
S- α -CD	210 \pm 80	110 \pm 60	70 \pm 35	105 \pm 45	R,R ; S,S; R,S; S,R
SP- α -CD	130 \pm 30	115 \pm 20	120 \pm 30	110 \pm 25	R,S; S,R; R,R ; S,S
SBE-α-CD	190 \pm 15	200 \pm 15	275 \pm 15	325 \pm 10	R,S; S,R; S,S; R,R
CM- β -CD	145 \pm 10	265 \pm 10	290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

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 pozitív töltésű β -CD származékok a negatív töltésűeknél valamivel gyengébb komplexeket képeztek.

Az elválasztás mellett az enantiomerek migrációs sorrendje (EMO) igen nagy jelentőséggel bír a királis analízis szempontjából, mivel a főcsúcs zavarhatja a minor komponens vizsgálatát a rendszer túlterhelése illetve a csúcstorzulás esetén.

Alogliptin esetén üregméret-függő migrációs sorrend 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. Annak érdekében, hogy kis mennyiségű disztomer is kimutatható legyen a β -CD származékokat tartalmazó rendszerek ideálisak, ugyanis ekkor teljesül, hogy az *S* enantiomer éri el először a detektort, az *R* enantiomer előtt. A szulfobutil-éter- β -CD-t (DS~6,3) választottuk a további módszeroptimalizáláshoz.

Tapentadol esetén a karboximetil- α -CD és karboximetil- β -CD esetén a sorrend változásának oka a CD-k méretbeli különbsége, üregméret-függő migrációs sorrendváltozást jött létre (3. ábra).



3. ábra: Üregméret-függő migrációs sorrendváltozás a tapentadol sztereoizomerekre A) 15 mM karboximetil- α -CD és B) 0,7 mM karboximetil- β -CD esetén

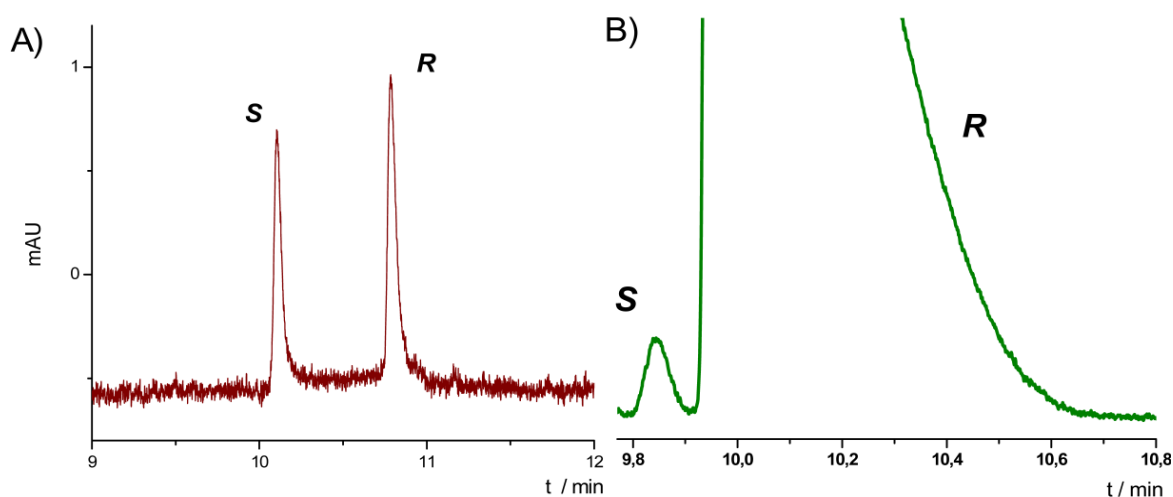
Az α -CD származékok között szubsztituensfüggő migrációs változást tapasztaltunk szulfobutil-éter- α -CD (*R,R*-, *S,S*-, *S,R*-, *R,S*-tapentadol) és szulfatált- α -CD (*S,S*-, *S,R*-, *R,S*-, *R,R*-tapentadol) esetén. A sztereoizomerek elválasztására és a minor királis szennyezők kimutatására az a rendszer az ideális, ahol az eutomer csúcs migrál utolsóként. Ez egyedül a szulfatált- α -CD esetén teljesült, így ezt a rendszert választottuk a további módszeroptimalizáláshoz.

Tadalafil esetén üregméret-függő migrációs sorrendváltozást tapasztaltunk szulfopropil- α -CD és szulfopropil- β -CD esetén, melynek mélyebb megismerése érdekében ^1H NMR

vizsgálatokat is végeztünk. A sztereoizomerek szubsztituensfüggő migrációs sorrendváltozása volt tapasztalható szulfatált- α -CD és szulfobutil-éter- α -CD esetén. Tadalafil esetén az az ideális rendszer a kis mennyiségű királis szennyezők detektálására, ahol az eutomer R,R -tadalafil migrál utolsóként, ennek megfelelően a szulfobutil-éter- α -CD-t választottuk a további módszeroptimalizáláshoz.

A királis elválasztás optimalizálása érdekében további paramétereket: a CD koncentrációt, a puffer komponenseket és azok koncentrációját, a pH-t, az alkalmazott feszültséget, a kapilláris hőmérsékletet és az injektálási paramétereket finomítottuk mindhárom vizsgált vegyület esetén.

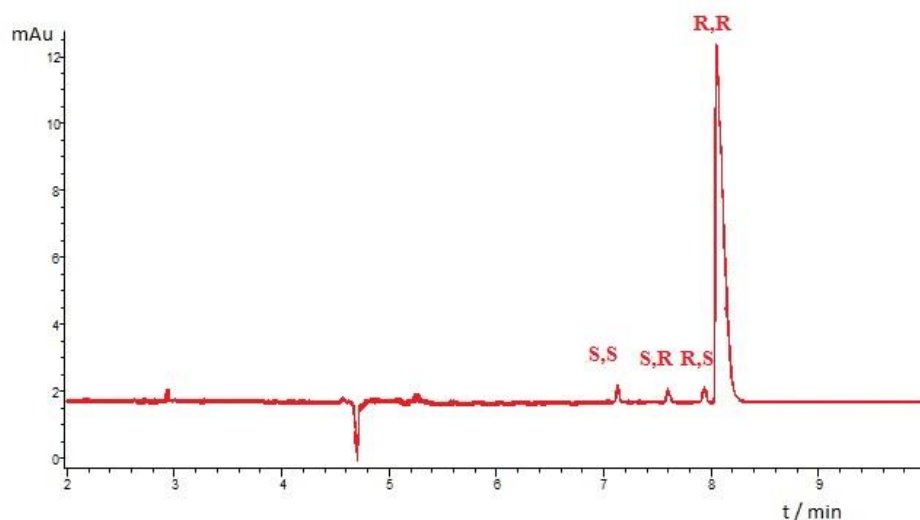
Alogliptin esetén a 4. ábrán látható az optimalizált körülmények között felvett elektroferogram (25 mM acetátpuffer pH 4,75, 5 mM szulfobutil-éter- β -CD (DS~6,3), 18 kV, 20 mbar-4 s, 16°C, ahol a felbontás $R_S = 8,39$), valamint a 0,1% királis szennyező kimutatása.



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

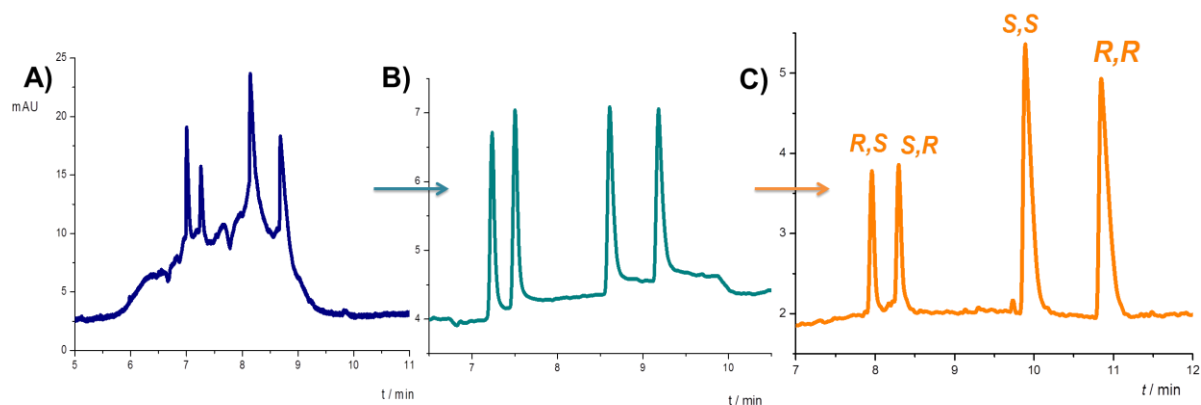
Az alogliptin enantiomerek elválasztására kidolgozott kapilláris elektroforetikus módszert validáltuk, és a precizitás, a kimutathatósági határ, a meghatározhatósági határ, a linearitás és a robusztusság szempontjából.

Az 5 mM szulfatált- α -CD-t tartalmazó 100 mM nátrium-borát pH 9,5 puffer rendszer alkalmas lehet az R,R -tapentadol 0,15 % királis szennyezőinek meghatározására (5. ábra). A kidolgozott módszert részlegesen validáltuk.



5. ábra: 0,15 % királis szennyezők meghatározása a tapentadol királis elválasztására optimalizált rendszerrel

A 4 tadalafil sztereoizomer elválasztására a 7 mM szulfobutil-éter- α -CD rendszer 75 mM Tris - ecetsav pH 4,75 pufferrel bizonyult optimálisnak 25 kV és 25°C mellett. A módszeroptimalizálás hatását mutatja be a 6. ábra.



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

Következtetések

A szexuális teljesítményfokozóként hirdetett étrend-kiegészítők és gyógynövény alapú készítmények vizsgálata egyre kiemeltebb fontosságú feladattá válik, mivel ezek a készítmények gyakran tartalmaznak nem megengedett potenciafokozó szintetikus (ható)anyagot. 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. 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 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 készítmények esetén. Ezeknek az előnyöknek köszönhetően a módszer hatósági vizsgáló laboratóriumok alapmódszere lehet a beérkezett gyanús készítmények hamisításának gyors kiszűrésére és egyben a PDE-5 inhibitor tartalmának nagyságrendi becslésére.

Munkánk során valamennyi elektroforetikusán 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. Ciklodextrin-alapú királis kapilláris elektroforetikus módszerek fejlesztését valósítottuk meg az antidiabetikus alogliptin, az analgetikus tapentadol, valamint a szexuális potencianövelő tadalafil sztereoizomerek elválasztására. Számos ciklodextrin (származék) királis elválasztó képességét és komplexstabilitását vizsgáltuk a három optikailag aktív vegyület esetén. Általánosan elmondható, semleges CD származékok helyett töltéssel rendelkező CD származékok

alkalmazásával nőtt az enantioszelektivitás és a komplexstabilitás. A három vizsgált királis vegyületet összehasonlítva az enantiomerek közti legnagyobb felbontást a tapentadol/szulfatált- α -CD rendszer esetén érték el, míg a legkiemelkedőbb komplexstabilitást a tapentadol/karboximetil- β -CD esetén tapasztaltuk. Továbbá elmondható, hogy 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 szulfobutil-éter- β -CD-t választottuk a módszer további optimalizálásához. A kritikus paraméterek optimalizálása után 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 szulfatált- α -CD bizonyult ideálisnak a kimagasló enantioszelektivitást és a migrációs sorrendet figyelembe véve, így ezt a CD rendszert optimalizáltuk és részlegesen validáltuk. Módszerünk 0,1% királis szennyező *S,S*-, *S,R*-, *R,S*-tapentadol kimutatására alkalmas, a későbbiekben rutin királis analitikai módszerré válhat.

Tadalafil esetén a megfelelő migrációs sorrenddel és nagy sztereoselektivitással rendelkező szulfobutil-éter- 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.

Az alogliptin enantiomerek ciklodextrin komplexképzését elsőként vizsgáltuk, az enantiomerek elválasztására pedig elsőként dolgoztunk ki egy optimalizált, validált módszert. Tapentadol esetén elsőként valósítottunk meg a sztereoizomerek ciklodextrin-alapú királis kapilláris elektroforetikus vizsgálatát. Tadalafil esetén a négy semleges sztereoizomer elválasztása volt a célunk, mely komoly kihívást jelent CE esetén, ahol az elválasztás a különböző töltés/méret alapján történik. A tadalafil négy sztereoizomerének királis elválasztását először valósítottuk meg.

Méréseink a szelektor-analít kölcsönhatás, a sztereoizomer elválasztás és az enantiomer migrációs sorrend változás mechanizmusának mélyebb megismerését tették lehetővé, valamint a kidolgozott módszerek alkalmasak minor enantiomer szennyezők meghatározására, melynek köszönhetően a későbbiekben gyógyszerkönyvi vagy vizsgáló laboratóriumok rutin királis analitikai módszerei lehetnek.

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] Znaleznia 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.

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 docent, 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 Znaleziona-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 Balázsnak (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.