

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**CINKÓNA ÉS POLISZACHARID ALAPÚ KIRÁLIS ÁLLÓFÁZISOK
KÖLCSÖNHATÁSAINAK VIZSGÁLATA**

Készítette:

Bajtai Attila

Témavezető:

Prof. Dr. Ilisz István

intézetvezető egyetemi tanár



Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszeranalitikai Intézet

Kémia Doktori Iskola

2021

1. BEVEZETÉS

Az élő rendszerek működésének megismerése és magyarázata évezredek múlta nyúló természetes emberi igény. Ennek része az emberi élet minőségét és tartalmát korlátozó megbetegedések mélyebb megértése. A patológiás állapotok tüneteinek csökkentése és az ellenük való küzdelem a gyógyszerkutatás egyik legjelentősebb motivációja. Emellett a gyógyszerkutatás értékteremtő folyamat, amely egyben a tudományos megismerés útja is. Eredményességéhez nélkülözhetetlen a legkülönbözőbb kutatási területek, mint a biológia, kémia és az orvostudományok folyamatosan fejlődő ismereteinek magas szintű integrálása. Így a gyógyszerfejlesztés egyszerre számos kutató összehangolt közös erőfeszítésén alapul. Ennek a folyamatnak része az analitikai kémia, melynek eredményeire a felfedező kutatástól a pre- és klinikai fejlesztésen át egészen a törzskönyvezésig szükség van. Mivel az élő szervezeteket felépítő molekulák királis rendszert alkotnak, pl.: aminosavak, fehérjék, cukrok, enzimek, polinukleotidok, így kiemelt figyelemmel kell vizsgálni a velük kölcsönhatásba kerülő szintén királis komponenseket.

A gyógyszerfejlesztés során nélkülözhetetlen, hogy a végtermékben található összes királis komponens hatását alaposan megvizsgálják és mennyiségüket az évről-évre szigorodó hatásági követelményeknek megfelelően szabályozzák. Emellett királis molekulák esetén kiemelt fontosságú, hogy mind az alapanyagok, mind a gyártás köztitermékei megfelelő tisztasággal rendelkezzenek és ezt folyamatos ellenőrzés támassza alá. Ez a több mint 50 éves múlta visszatekintő elvárás kutatók generációit ösztönözte a lehető leghatékonyabb módszerek kifejlesztésére, ami a királis kromatográfiás technikák széleskörű elterjedéséhez vezetett.

A gyógyszeripar mellett számos más, az emberi életminőséget befolyásoló terület, mint az élelmiszeripar, kozmetikai ipar vagy a növényvédelem is felhasználja a királis kromatográfia eredményeit, ezért fontos, hogy a jövő perspektívái stabil alapokra épüljenek.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkám során célul tűztem ki folyadékkromatográfias módszerek fejlesztését biológiai és gyógyszeripari szempontból fontos vegyületek sztereoiszomerjeinek elválasztására, valamint eltérő működési mechanizmusú királis kolonnák elválasztóképességének tanulmányozását változatos szerkezetű molekulákkal.

Vizsgálni kívántam:

- biológiailag aktív dipeptidek elválasztását cinkóna alkaloid alapú állófázisokon nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC),
- bázikus és amfolit indol analógok elválasztását cinkóna alkaloid alapú ikerionos, valamint módosított poliszacharid alapú állófázisokon HPLC és szuperkritikus folyadékkromatográfia (SFC) alkalmazásával,
- 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-vázás és 1-naftol vegyületek és szerkezeti analógjaik elválasztását módosított poliszacharid alapú állófázisokon HPLC és SFC technikával.

A vizsgált vegyületek kromatográfias paramétereinek meghatározásán keresztül értelmezni kívántam az eluensösszetétel és a poláris módosító (alkohol) minőségének és mennyiségének hatását az elválasztásra. A vegyületek szerkezetének rendszerezett változtatásával következtetéseket kívántam levonni a vizsgált vegyület és a királis szelektor között kialakuló kölcsönhatásokra. Az ioncserélő állófázisok esetén a mozgófázis sav- és bázistartalmának változtatásával az ellenion koncentráció elválasztásra gyakorolt hatását kívántam tanulmányozni. Emellett céлом volt a hőmérséklet kromatográfias paraméterekre gyakorolt hatásának tanulmányozásával az elválasztási mechanizmus termodinamikai hátterének mélyebb megismerése.

3. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A vizsgált vegyületek biológiai jelentőséggel rendelkező anyagok, melyek együttműködő partnereink laboratóriumaiban készültek. Munkám során HPLC tisztaságú oldószereket használtam.

A kromatográfiás elválasztásokat két eltérő típusú állófáziscsaláddal hajtottam végre.

Cinkóna alkaloid alapú királis ioncserélő állófázisként a Chiral Technologies Europe (CTE, Illkirch, Franciaország), által forgalmazott *Chiralpak QN-AX*, *Chiralpak QD-AX*, *Chiralpak ZWIX(+)*, *Chiralpak ZWIX(-)* kolonnákat használtam. A kolonnák fizikai paraméterei azonosak: 150 mm × 3,0 mm, a szemcseátmérő 3 μm.

A módosított poliszacharid alapú királis állófázisok közül vizsgáltam a szintén CTE által forgalmazott *Chiralpak IA*, *Chiralpak IB*, *Chiralpak IC*, *Chiralpak ID*, *Chiralpak IE*, *Chiralpak IF* és *Chiralpak IG* kolonnákat. Ezek fizikai paraméterei egyaránt azonosak: 250 mm × 4,6 mm, szemcseátmérő: 5 μm.

Kutatási eredményeimet három kromatográfiás rendszer használatával értem el:

Az I. rendszer egy 1100-as sorozatszámú Agilent Technologies (Waldbronn, Németország) HPLC volt, amelyet egy oldószér gázmentesítő, pumpa, automata mintaadagoló, kolonna termosztát, egy ötcsatornás UV-Vis-detektor és egy ESA Biosciences Inc. koronakisülési detektor (Corona CAD, Chelmsford, MA, USA) alkotott. Az adatok gyűjtéséhez és kiértékeléséhez ChemStation adatfeldolgozó szoftvert használtam.

A II. rendszer Waters 1525 bináris HPLC pumpát, Waters kolonna termosztátot, Waters 2487 kétcsatornás UV-Vis-detektort, Waters 717 plus automata mintaadagolót és Empower 2 adatfeldolgozó szoftvert tartalmazott (Waters, Milford, MA, USA).

A III. rendszer egy Waters Acquity UPC² (Waters Corporation, Milford, MA, USA) kromatográfiás rendszer volt, mellyel az SFC méréseket végeztem. Ezt a rendszert egy oldószér gázmentesítő, pumpa, automata

mintaadagoló, kolonna termosztát, fotodióda soros detektor, egy szén-dioxid nyomásszabályzó és az Empower 2 adatfeldolgozó szoftver alkotja.

A hőmérsékletfüggés vizsgálata során vagy az említett kromatográfiás rendszerek termosztátját, vagy egy Alpha RA 8 (Lauda, Németország) folyadék termosztátot használtam.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

T1. Kísérletileg igazoltam, hogy HPLC és SFC technikát használva poliszacharid alapú állófázisokkal, a mozgófázis alkoholtartalmának csökkentése a vizsgált vegyületeknél minden esetben a visszatartás növekedését okozta, azonban az enantioszelektivitás számos esetben eltérően változott.

A módosított poliszacharid alapú állófázisokat normál fázisú és szubkritikus körülmények között használva megvizsgáltam az eluensben található alkohol mennyiségének hatását az elválasztásra. Megfigyeltem, hogy az eluens alkoholtartalmának csökkentésével párhuzamosan apolárisabbá váló mozgófázis mind a HPLC, mind az SFC technika esetén növelte a komponensek visszatartását. Ezzel szemben a HPLC technika esetén alig változott vagy nőtt, míg SFC körülmények között jellemzően csekély változással vagy maximum görbével írható le a szelektivitás. Ezt a kromatográfias viselkedést a mozgófázisok hatására eltérő szelektor térszerkezetek kialakulásával magyaráztam.

T2. A HPLC és SFC technika esetén egyaránt igazoltam, hogy ikerionos állófázisok használatakor a bázikus vegyületekhez képest az amfolit vegyületek visszatartása kevésbé függ a hozzáadott módosítók mennyiségétől.

A vizsgált vegyületek cinkóna alkaloid alapú ioncserélő állófázisokkal való elválasztásakor a kromatográfias rendszerben található ionok mennyisége meghatározta az enantiomerek visszatartását. A sav és bázis módosítók koncentrációjának változtatásával kimutattam, hogy a vizsgált komponensek szerkezetétől függetlenül a HPLC és az SFC technika használatakor, a sztöchiometrikus helyettesítési modellel leírható a vegyületek kromatográfias viselkedése. A modell alapján bázikus és amfolit vegyületeket vizsgálva mono- és ikerionos állófázisokkal megállapítottam, hogy az amfolit vegyületek és az ikerionos szelektor között kialakuló kettős ionpár kölcsönhatás felelős a stabilabb megkötődésért.

T3. Igazoltam, hogy a cinkóna alkaloid alapú kolonnák nemcsak enantiomerek, hanem diasztereomer vegyületek elválasztására is hatékonyan alkalmazhatók.

HPLC technikával sikeresen elválasztottam számos változatos összetételű és szerkezetű amfolit dipeptid enantiomert poláris-ionos mozgófázist és cinkóna alkaloid alapú kolonnát használva. Az így kapott eredmények alapján megállapítottam, hogy a dipeptidek terminálisai közelében található aromás oldalláncok H-híddal, π - π kölcsönhatások kialakításával és sztérikus hatások révén meghatározó szerepet töltenek be az elválasztás során. Emellett a kisméretű alifás oldalláncot tartalmazó dipeptidek szerkezetükből adódó flexibilitás megkönnyíti a szelektorhoz való kapcsolódást. Ezeknek a kölcsönhatásoknak a figyelembevételével sikerült dipeptid vegyületek diasztereomerjeinek elválasztását megvalósítanom, ami az ikerionos állófázisok felhasználási körének jelentős bővítését hordozza magában.

T4. A HPLC és az SFC technika vizsgálata alapján megállapítottam, hogy a királis felismerés folyamatára egyaránt meghatározó hatással van a poliszacharid alaplánc szerkezete, illetve a hozzá kapcsolt módosítók minősége és térállása.

A poliszacharid alapú állófázisokon vizsgált poláris amfolit indol vegyületek normál fázisú HPLC technika esetén nem rendelkeztek visszatartással, azonban szubkritikus körülmények között sikeresen elválaszthatók voltak. Így a két technika használata során a királis felismerésért felelős kölcsönhatások a kromatográfiás körülmények függvényében különböztek. Az eltérő kromatográfiás sajátságok egyik oka lehet az SFC esetén *in situ* képződő alkoxikarbonsav jelenléte az eluensben, illetve a szelektor felszínén feltételezhetően kialakuló alkohol felhalmozódás és polaritásváltozás. Összességében az SFC technika többször eredményezett sikeres elválasztást, mint a HPLC, azonban a HPLC technika használatával is számos esetben elérhető volt az alapvonalra történő elválasztás.

T5. SFC technikát használva megállapítottam, hogy a poliszacharid alapú kolonnák alkalmazásakor a hőmérséklet-változtatás ellentétes hatást fejthet ki a szelektivitásra a szelektorhoz kapcsolt módosítók minőségétől függően.

Poliszacharid alapú állófázisokat használva szubkritikus körülmények között a hőmérséklet növelés hatására az 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-származékok visszatartása minden esetben csökkent. Az amilóz alapú *trisz*-(3,5-dimetilfenil-karbamát) módosítót tartalmazó *Chiralpak IA* kolonna használata esetén megfigyeltem, hogy a szelektivitás a hőmérséklet növeléssel ellentétesen változott. Ezzel ellentétben a szintén amilóz alapú *trisz*-(3,5-diklórfenil-karbamát) módosítót tartalmazó *Chiralpak IE* kolonnát használva a hőmérséklettel párhuzamosan változott a szelektivitás. A látszólagos termodinamikai értékeket kiszámolva megállapítottam, hogy a *Chiralpak IA* kolonna esetén entalpiavezérelt, míg a *Chiralpak IE* kolonna esetén entrópiavezérelt volt a vizsgált vegyületek elválasztása. Így kimutattam, hogy a poliszacharid alapú szelektoron található metilcsoportok klórra cserélésével, jelentősen megváltoztathatók a királis elválasztás energetikai folyamatai.

5. KÖZLEMÉNYEK ÉS KONFERENCIARÉSZVÉTELEK

Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosítóm: 10058359

Az értekezés alapját képező közlemények

1. **A. Bajtai**, Gy. Lajkó, I. Szatmári, F. Fülöp, W. Lindner, I. Ilisz, A. Péter
Dedicated comparisons of diverse polysaccharide- and zwitterionic Cinchona alkaloid-based chiral stationary phases probed with basic and ampholytic indole analogs in liquid and subcritical fluid chromatography mode
Journal of Chromatography A, 1563, (2018) 180-190
Impakt faktor₍₂₀₁₈₎: **3,858** (besorolás: Q1)
2. **A. Bajtai**, Gy. Lajkó, G. Némethi, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter, I. Ilisz
High-performance liquid chromatographic and subcritical fluid chromatographic separation of α -arylated β -carboline, N-alkylated tetrahydroisoquinolines and their bioisosteres on polysaccharide-based chiral stationary phases
Journal of Separation Science, 42, (2019) 2779-2787
Impakt faktor₍₂₀₁₉₎: **2,878** (besorolás: Q2)
3. **A. Bajtai**, I. Ilisz, D.H.O. Howan, G. K. Tóth, G.K.E. Scriba, W. Lindner, A. Péter
Enantioselective resolution of biologically active dipeptide analogs by high-performance liquid chromatography applying Cinchona alkaloid-based ion-exchanger chiral stationary phases
Journal of Chromatography A, 1611, (2020) 1-12
Impakt faktor₍₂₀₁₉₎: **4,049** (besorolás: Q1)

Összesített impakt faktor: **10,785**

Az értekezés témájához kapcsolódó fel nem használt közlemények

1. **A. Bajtai**, B. Fekete, M. Palkó, F. Fülöp, W. Lindner, M. Kohout, I. Ilisz, A. Péter
Comparative study on the liquid chromatographic enantioseparation of cyclic β -amino acids and the related cyclic β -aminohydroxamic acids on Cinchona alkaloid-based zwitterionic chiral stationary phases
Journal of Separation Science, 41, (2017) 1216-1223
Impakt faktor₍₂₀₁₇₎: **2,415** (besorolás: Q2)
2. I. Ilisz, **A. Bajtai**, W. Lindner, A. Péter
Liquid chromatographic enantiomer separations applying chiral ion-exchangers based on Cinchona alkaloids
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 159, (2018) 127-152
Impakt faktor₍₂₀₁₈₎: **2,983** (besorolás: Q1)
3. T. Orosz, **A. Bajtai**, T.M. Le, D. Tanács, Zs. Szakonyi, F. Fülöp, A. Péter, I. Ilisz
Chiral high-performance liquid and supercritical fluid chromatographic enantioseparations of limonene-based bicyclic aminoalcohols and aminodiols on polysaccharide-based chiral stationary phases
Biomedical Chromatography, 43, (2019) 1-11
Impakt faktor₍₂₀₁₉₎: **1,728** (besorolás: Q2)
4. I. Ilisz, **A. Bajtai**, A. Péter, W. Lindner
Chiral Separations: Cinchona Alkaloid-Based Zwitterionic Chiral Stationary Phases Applied for Liquid Chromatographic Enantiomer Separations: An Overview
Chiral Separations-Methods and Protocols
Szerkesztő: G.K.E. Scriba, 2019, Humana Press, New York, NY, USA, Könyvfejezet

5. I. Ilisz, **A. Bajtai**, I. Szatmári, F. Fülöp, W. Lindner, A. Péter
Enantioseparation of β -carboline, tetrahydroisoquinoline and benzazepine analogues of pharmaceutical importance: Utilization of chiral stationary phases based on polysaccharides and sulfonic acid modified Cinchona alkaloids in high-performance liquid and subcritical fluid chromatography
Journal of Chromatography A, 1615, (2020) 1-10
Impakt faktor₍₂₀₁₉₎: **4,049** (besorolás: Q1)
6. **A. Bajtai**, I. Ilisz, A. Péter, W. Lindner
Liquid chromatographic resolution of natural and racemic Cinchona alkaloid analogues using strong cation- and zwitterion ion-exchange type stationary phases. Qualitative evaluation of stationary phase characteristics and mobile phase effects on stereoselectivity and retention
Journal of Chromatography A, 1609, (2020) 1-13
Impakt faktor₍₂₀₁₉₎: **4,049** (besorolás: Q1)
7. **A. Bajtai**, I. Ilisz, R. Berkecz, F. Fülöp, W. Lindner, A. Péter
Polysaccharide-based chiral stationary phases as efficient tools for diastereo- and enantioseparation of natural and synthetic Cinchona alkaloid analogs
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 193, (2021) 113724
Impakt faktor₍₂₀₁₉₎: 3,209 (besorolás: Q1)

Összes közlemény impakt faktora: **29,218**

Előadások

1. I. Ilisz, A. Péter, T. Orosz, **A. Bajtai**, Gy. Lajkó
Enantiomeric Separations by Ion Exchanger-Based Chiral Stationary Phases
11th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods
2017. szeptember 6-8. Siófok, Magyarország.

2. T. Orosz, E. Forró, F. Fülöp, W. Lindner, Gy. Lajkó, **A. Bajtai**, A. Péter, I. Ilisz
Enantioseparation of cyclic β -amino acids on ion-exchanger-based chiral stationary phases
23rd International Symposium on Analytical and Environmental Problems
2017. október 9-10. Szeged, Magyarország.
3. **A. Bajtai**, Gy. Lajkó, I. Szatmári, F. Fülöp, W. Lindner, I. Ilisz, A. Péter
Comparative study for the characterization of enantiorecognitions obtained by supercritical fluid chromatography and high-performance liquid chromatography
Applications of Supercritical Fluids
2018. május 17. Budapest, Magyarország.
4. **A. Bajtai**, D. Tanács, T. Orosz, Gy. Lajkó, I. Szatmári, F. Fülöp, W. Lindner, I. Ilisz, A. Péter
Enantiomer separation of chiral tetrahydroisoquinoline analogs by supercritical fluid chromatography and high-performance liquid chromatography
24th International Symposium on Analytical and Environmental Problems
2018. október 9. Szeged, Magyarország.
5. I. Ilisz, **A. Bajtai**, A. Péter
Királis szelektorok alkalmazási lehetőségei enantiomerek elválasztására a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiában
Elválasztástudományi vándorgyűlés 2018
2018. november 8-10. Tapolca, Magyarország.
6. **A. Bajtai**, D. Tanács, E. Forró, F. Fülöp, W. Lindner, A. Péter, I. Ilisz
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of some amino compounds with pharmaceutical relevance on ion-exchanger-based chiral stationary phases

26th International Symposium on Analytical and Environmental Problems

2020. november 23. Szeged, Magyarország.

Poszterek

1. I. Ilisz, **A. Bajtai**, Zs. Szakonyi, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter
HPLC enantioseparation of carbocyclic β -amino acids possessing limonene skeleton on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases

45th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques

2017. június 18-22. Prága, Csehország.

2. **A. Bajtai**, B. Fekete, M. Palkó, F. Fülöp, W. Lindner, A. Péter, I. Ilisz
Application of Cinchona alkaloid-based chiral zwitterionic stationary phases for the enantioseparation of cyclic β -aminohydroxamic acids
11th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods
2017. szeptember 6-8. Siófok, Magyarország.

3. T. Orosz, G. Németi, **A. Bajtai**, Zs. Szakonyi, F. Fülöp, I. Ilisz, A. Péter
Chiral high-performance liquid and supercritical fluid chromatographic enantioseparations of limonene-based bicyclic aminoalcohols and aminodiols on polysaccharide chiral stationary phases

24th International Symposium on Analytical and Environmental Problems

2018. október 8-9. Szeged, Magyarország.

4. **A. Bajtai**, Gy. Lajkó, D. Tanács, I. Szatmári, F. Fülöp, W. Lindner, I. Ilisz, A. Péter
Királis elválasztási mechanizmusok vizsgálata poliszacharid és ikerionos állófázisokon **Elválasztástudományi vándorgyűlés 2018**
2018. november 8-10. Tapolca, Magyarország.

5. T. Orosz, **A. Bajtai**, G. Németi, Zs. Szakonyi, F. Fülöp, I. Ilisz, A. Péter
Új, limonén alapú biciklusos aminoalkoholok és aminodiolok elválasztása királis folyadékkromatográfiával és szuperkritikus fluid kromatográfiával
Elválasztástudományi vándorgyűlés 2018
2018. november 8-10. Tapolca, Magyarország.
6. I. Ilisz, **A. Bajtai**, I. Szatmári, F. Fülöp, W. Lindner, A. Péter
Chiral high-performance liquid and subcritical fluid chromatography study of some pharmaceutically important β -carboline tetrahydroisoquinoline and benzazepine analogs **48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques**
2019. június 16-20. Milánó, Olaszország.
7. A. Péter, **A. Bajtai**, G. Tóth, W. Lindner, G.K.E. Scriba, I. Ilisz
Comparative study of enantioseparations of natural and unnatural dipeptides on Cinchona alkaloid based chiral stationary phases
48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques
2019. június 16-20. Milánó, Olaszország.
8. **A. Bajtai**, A. Péter, W. Lindner, I. Ilisz
Application of Polysaccharide-based Chiral Stationary Phases for the Enantioseparation of Natural and Synthetic Cinchona Alkaloid Analogues
12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods
2019. szeptember 11-13. Siófok, Magyarország.