

# Enantiomereválasztás ciklodextrin alapú királis szelektorokkal

## DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

### **Készítette:**

Fodor Gábor

### **Témavezetők:**

Dr. Péter Antal  
egyetemi tanár

Dr. Ilisz István  
habil. egyetemi adjunktus



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék  
Kémia Doktori Iskola  
**2013**

# 1. Bevezetés

A királis hatóanyagok iránt az 1980-as években nőtt meg számottevően az érdeklődés. Ez a nagy érdeklődés az izomerek eltérő élettani hatásának tudható be, amit napjainkig számos gyógyszerkészítménynél bizonyítottak. Ilyen volt az 1950-es években forgalomba hozott, majd az okozott súlyos fejlődési rendellenességek (phomo...) miatt rövid időn belül forgalomból kivont Talidomid (Contergan), amelyről az 1980-as években kiderült, hogy a racém formában gyártott szernek az egyik enantiomere okozta a szörnyű mellékhatásokat. Az eset után az amerikai élelmiszereket és gyógyszereket felügyelő hatóság, az FDA kötelezte a gyógyszergyártókat, hogy állítsák elő és vizsgálják meg a farmakológiai hatását bármely királis anyag mindkét enantiomerjének, mielőtt az a gyógyszerpiacra kerülne. Ugyanakkor az FDA azt is ajánlotta, hogy ne legyen tiltva a racém gyógyszerek forgalmazása, de a végső engedélyeztetés egy komplex információhalmazon alapuljon, amely tartalmazza mindkét enantiomer, illetve a keverékük farmakokinetikai és farmakodinamikai jellemzőit, valamint a meghatározásukra szolgáló analitikai módszereket is.

Az emberi szervezetben lejátszódó fizikai és kémiai folyamatok során a bejuttatott gyógyszermolekula aszimmetrikus biológiai makromolekulákkal (fehérjék, polinukleotidok, glikopeptidok) kerül kölcsönhatásba. Ez a királis környezet képes megkülönböztetni az enantiomereket, azaz a királis gyógyszermolekulákat a biológiai rendszerek sztereospecifikusan ismerik fel, vagyis a sztereoizomerek különféle élettani hatással rendelkez(het)nek.

Ilyen lehet pl:

- azonos farmakológiai hatás, de nagyobb toxicitás,
- más farmakológiai hatás vagy
- antagonizmus.

Ennek következményeként a gyógyszerhatóanyag enantiomerek megkülönböztetése és elválasztása elengedhetetlen feladat, melyre napjainkban a folyadékkromatográfia mellett a kapilláris elektroforézis az egyik leggyakrabban alkalmazott analitikai módszer.

## 2. Célkitűzés

Munkám során célul tűztük ki kapilláris elektroforézis és új fejlesztésű királis kolonnákon folyadékkromatográfias módszerek fejlesztését különböző biológiai és gyógyszeripari szempontból fontos enantiomerek elválasztására.

Vizsgálni kívántuk:

- a)  $\beta$ -metil-szubsztituált aminosav enantiomerek elválasztását kapilláris elektroforézises (CE) technikával (különböző ciklodextrin alapú királis szelektorok alkalmazásával),
- b)  $\beta$ -szubsztituált triptofán analóg enantiomerek elválasztását CE technikával (különböző ciklodextrin alapú királis szelektorok alkalmazásával),
- c)  $\beta$ -laktám enantiomerek elválasztását fordított fázisú körülmények között, újonnan fejlesztett ciklodextrin alapú állófázisokon, valamint
- d) szerkezetileg különböző molekulák elválasztását újonnan fejlesztett ciklodextrin alapú állófázisokon.

További célunk volt, hogy közvetlen királis folyadékkromatográfias és kapilláris zónaelektroforézisen alapuló elválasztások során, a vizsgált vegyületek és a királis szelektorok szerkezetének ismeretében az elválasztási körülmények változtatásának hatását feltérképezzük. A nyert adatokból kiindulva értelmezni kívántuk az eluens minőségének és összetételének, a hőmérsékletnek és a vizsgált vegyületek szerkezetének hatását a királis megkülönböztetési folyamatokra.

### 3. Alkalmazott vizsgálati módszerek

#### 3.1. Alkalmazott berendezések

A pH mérése Thermo Orion 420 pH mérő (Orion, USA) készüléken történt.

A kapilláris elektroforézises méréseket HP<sup>3</sup>CE készüléken végeztük (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), a detektáláshoz diódasoros detektort, az adat feldolgozáshoz pedig Chemstation szoftvert használtunk.

A folyadékkromatográfiás mérésekhez 2 fajta rendszert alkalmaztunk:

1. DIONEX Ultimate 3000 és
2. Agilent 1100-as típusú folyadékkromatográfiás rendszer.

(Mindkét rendszer kvaterner pumpából, automata mintaadagolóból és diódasoros detektorból és vákuumos gázmentesítőből állt).

#### 3.2. Alkalmazott ciklodextrinek

A CE mérések során az alkalmazott ciklodextrinek (CD-k) a következők voltak: természetes  $\alpha$ -CD, szulfopropil- $\alpha$ -CD (SP2- $\alpha$ -CD: szubsztitúciós fok=2),  $\beta$ -CD-szulfát szubsztitúciós fok=12), szulfopropil- $\beta$ -CD (SP2- $\beta$ -CD: szubsztitúciós fok=2 és SP4- $\beta$ -CD: szubsztitúciós fok=4), valamint szulfopropil- $\gamma$ -CD (SP2- $\gamma$ -CD: szubsztitúciós fok=2) (Cyclolab R&D Ltd. Budapest, Magyarország).

#### 3.3. Alkalmazott oszlopok

Az alkalmazott királis állófázisok a következők voltak: **PMBCD** (permetil- $\beta$ -CD, **Quest 1**), **HPBCD** (hidroxipropil- $\beta$ -CD, **Quest 2**), **BCD** ( $\beta$ -CD, **Quest 3**) 250x4,0 mm, 5  $\mu$ m szemcseátmérő (Chiroquest, Budapest, Magyarország).

#### 3.4. Vizsgált anyagok

- $\beta$ -metil-szubsztituált aminosavak
- $\beta$ -szubsztituált triptofán analógok
- $\beta$ -laktámok
- szerkezetileg különböző molekulák

## 4. Eredmények

Munkánk során kapilláris elektroforézises és új módszerrel szintetizált királis kolonnákon folyadékkromatográfias módszereket fejlesztettünk különböző biológiai és gyógyszeripari szempontból fontos vegyületek elválasztására. Közvetlen királis folyadékkromatográfias és kapilláris zónaelektroforézisen alapuló elválasztások során különféle paraméterek változtatásának hatását térképeztük fel, és a nyert adatokból kiindulva értelmeztük az eluens, illetve a háttéreltrolit minőségének és összetételének, a hőmérsékletnek és a vizsgált vegyületek szerkezetének hatását a királis megkülönböztetési folyamatokra.

1.  $\beta$ -metil-szubsztituált aminosavak enantiomerjeinek elválasztására CE módszert dolgoztunk ki. Királis adalékként  $\alpha$ -CD, SP2- $\alpha$ -CD, SP2- $\beta$ -CD, SP4- $\beta$ -CD és  $\beta$ -CD-szulfát szelektorokat használtunk.

Az SP2- $\alpha$ -CD alkalmazásával elért eredmények pH függése azt mutatta, hogy a vándorlási idő a pH növelésével eleinte csökken, majd további növeléssel nő, ellenben a szelektivitás és a felbontás folytonosan csökken a pH növelésével (kivéve a *treo*- $\beta$ -MeTyr és *treo*- $\beta$ -MeTic borátpufferben). Ez azzal magyarázható, hogy a protonálódás és a komplexképződés is pH függő. A háttéreltrolit pH-ja mellett az elválasztás erősen függ a mintamolekula szerkezetétől. A két gyűrűvel rendelkező molekulák visszatartása sokkal nagyobb, mint az egy gyűrűt tartalmazóké. A két gyűrűvel rendelkező molekulák jobban illeszkedtek az SP2- $\alpha$ -CD üregébe, de a hosszabb migrációs idő ellenére az  $\alpha$  és  $R_s$  értéke a  $\beta$ -MeTic esetén jóval kisebb volt, mint a  $\beta$ -MePhe,  $\beta$ -MeTyr vagy  $\beta$ -MeTrp esetén. Az *eritro*- és a *treo*- $\beta$ -MeTic konformációsán erősen gátolt, szerkezete rögzített, a két enantiomerrel képzett komplex stabilitása valószínűleg hasonló, így a királis megkülönböztetés vagy csak kicsiny mértékben vagy nem is jött létre.

SP2- $\beta$ -CD és SP4- $\beta$ -CD szelektor jelenlétében végzett méréseknél megfigyelhető, hogy a legtöbb esetben a várakozásoknak megfelelően a vándorlási idők nőttek SP4- $\beta$ -CD jelenlétében (kivéve *eritro*- $\beta$ -MeTyr és *eritro*- $\beta$ -MeTrp borátpufferben, az *eritro*- $\beta$ -MeTic acetátpufferben és *treo*- $\beta$ -MeTrp acetát- és foszfátpufferben). Összehasonlítva az SP2- $\beta$ -CD szelektorral a legtöbb esetben megnőtt az  $\alpha$  és  $R_s$  értéke, különösképpen a  $\beta$ -MeTic analógoknál. Habár az SP4- $\beta$ -CD alkalmazásával a legtöbb esetben jobb elválasztást értünk el, mégsem volt annyira hatékony, mint az SP2- $\alpha$ -CD, ami azt jelzi, hogy a vizsgált minták valószínűleg jobban illeszkedtek az SP2- $\alpha$ -CD üregében (kivéve a *treo*- $\beta$ -MeTyr és az *eritro*-

és *treo*- $\beta$ -MeTic enantiomereket). A sztérikus hatások fontosságát a királis felismerésben a konformációsán erősen gátolt  $\beta$ -MeTic analógok különleges viselkedése mutatta. Az *eritro*- és *treo*- $\beta$ -MePhe,  $\beta$ -MeTyr és  $\beta$ -MeTrp esetében SP4- $\beta$ -CD alkalmazásával sikeresen elválasztható a négy sztereoizomer acetát- vagy borátpuffer rendszert használva, míg az *eritro*- és *treo*- $\beta$ -MeTic enantiomerjeit acetátpuffer jelenlétében sikerült elválasztani.

2. Új, közvetlen CE módszert dolgoztunk ki a  $\beta$ -alkil és aril-szubsztituált Trp analóg enantiomerek elválasztására. Összehasonlítva a  $\beta$ -Me-szubsztituált aminosavakkal ahol a szulfatált  $\beta$ -ciklodextrinek, SP2- $\beta$ -CD és SP4- $\beta$ -CD a legtöbb esetben sikeresen alkalmazhatók voltak a  $\beta$ -MePhe,  $\beta$ -MeTyr és  $\beta$ -MeTrp enantiomerek elválasztására, míg a  $\beta$ -MeTic esetében a  $\beta$ -CD-szulfát bizonyult hatásosnak, addig a  $\beta$ -alkil és aril-szubsztituált Trp analógokra ( $\beta$ -2-PrTrp,  $\beta$ -3-PentTrp,  $\beta$ -PhTrp és a  $\beta$ -diOMePhTrp) az SP2- $\alpha$ -CD volt a leghatékonyabb szelektor. A vándorlást, szelektivitást és a felbontást vizsgálva optimalizáltuk az elválasztást a háttéreltrotit, a pH és az alkalmazott feszültség változtatásával.

A  $\beta$ -szubsztituált Trp analógokra az SP2- $\alpha$ -CD királis szelektorral kapott redukált vándorlási idők, szelektivitás és felbontás értékeket a háttéreltrotit pH-ja és a mintamolekula szerkezete erősen befolyásolta. Azon  $\beta$ -szubsztituált Trp analógok esetén, melyek  $\beta$ -pozícióban aromás oldallánccal rendelkeznek, nagyobb a vándorlási idő, mint az alifás oldalláncúaknál (kivétel a *treo*- $\beta$ -2-PrTrp). Ugyanakkor az alifás oldalláncúaknál a szénatomszám növekedésével nő a vándorlási idő, az *eritro*- és *treo*-diasztereomereknél pedig a mintamolekula természetétől és a háttéreltrotit pH-jától függően változik. Egyes esetekben a nagyobb vándorlási idő ellenére kisebb szelektivitást és felbontást értünk el ( $\beta$ -3-PentTrp,  $\beta$ -MeTrp).

Az elválasztás hatékonyságával kapcsolatban elmondható, hogy a szelektivitás és a felbontás sokkal kisebb az SP2- $\beta$ -CD szelektor esetében mindhárom puffer rendszerben, mint SP2- $\alpha$ -CD-t alkalmazva, ami a rosszabb illeszkedésnek és a zárványkomplex kisebb stabilitásának tudható be. Az enantiomerek vándorlási sorrendjét tiszta vagy dúsított enantiomerek racemáthoz való adagolásával határoztuk meg, amihez az egyes enantiomereket enzimatis emésztés útján nyertük. A vándorlási sorrendet vizsgálva azt találtuk, hogy az *eritro*- és *treo*-diasztereomerek különböző sorrendben vándorolnak a különböző háttéreltrotitokban. A legtöbb aminosavnál a háttéreltrotit változtatása a diasztereomerek vándorlási sorrendjének változását eredményezte, míg az enantiomerek vándorlási sorrendjére nem volt hatással. Megállapítottuk, hogy a vándorlási sorrendre semmilyen általános érvényű szabály nem adható meg.

3. Három különböző, „újszerű” (új kötési technikával készült) természetes  $\beta$ -CD (**BCD**), hidroxipropil- $\beta$ -CD (**HPBCD**) és permetil- $\beta$ -CD (**PMBCD**) állófázison  $\beta$ -laktám enantiomerek elválasztására dolgoztunk ki HPLC-s módszereket. Megállapítottuk, hogy a  $\beta$ -laktám molekulák szerkezete, a  $\beta$ -laktám gyűrűhöz kapcsolt alifás és aromás részek mérete, a kettőskötés jelenléte és helyzete valamint az aromás gyűrűn lévő szubsztituensek minősége (polaritása) és helyzete mind hatással van a zárványkomplex kialakulására, és ezáltal jelentősen befolyásolja a királis felismerést.

Az elválasztást **PMBCD** oszlopon vizsgálva, először az eluens minőségi és mennyiségi összetételét optimalizáltuk. A  $\beta$ -laktámok szerkezetének hatását tanulmányozva az elválasztásra a **PMBCD** szelektoron a szubsztituált gyűrű méretének növekedésével nő a  $\beta$ -laktámok visszatartása és javul az enantioszelektivitás is, míg a **BCD** és a **HPBCD** állófázisok kevésbé bizonyultak hatékonyak. A **PMBCD** állófázison a kettőskötés jelenléte a kondenzált gyűrűs szerkezetű komponenseknél minden esetben javítja a felbontást és csökkenti a visszatartást. A kettőskötés jótékony hatása azonban nem jelentkezik a **HPBCD** és a **BCD** állófázisokon.

**PMBCD** állófázison, ha a fenilgyűrű metil- vagy halogén-csoporttal *para*-helyzetben volt szubsztituálva, akkor az az elválasztásra kedvezőtlenül hat (kivétel a **27** komponens), míg szubsztituens hiányában kiváló elválasztás érhető el. Ugyanakkor **HPBCD** és **BCD** oszlopok a *para*-helyzetben szubsztituált analógokra viszonylag jó szelektivitást mutattak (kivétel a **27** komponens), vagyis a **PMBCD** illetve **HPBCD** és natív **BCD** alapú állófázis eltérő kölcsönhatást mutat a *para*-helyzetben szubsztituált molekulákra, ez a kölcsönhatás azonban a szubsztituens méretétől is függ. A *para*-helyzetben halogénatommal szubsztituált komponenseknél megfigyelhető, hogy a retenciós idő a F, Cl, Br sorrendben növekszik mindhárom állófázison. A F, Cl, Br sorban a molekula mérete növekszik, a polaritása csökken, egyre apolárisabbá válik.

A 19  $\beta$ -laktám komponensből 17-et sikeresen választottunk el a három „újszerű”  $\beta$ -CD alapú királis állófázison. A három állófázis közül a **PMBCD** alapú bizonyult a leghatékonyabbnak.

4. Szerkezetileg igen különböző molekulák enantiomerjeinek elválasztását a fent említett három különböző **BCD**, **HPBCD** és **PMBCD** állófázison vizsgáltuk. A szerkezetileg igen eltérő 14 molekula jó viszonyítási alapot nyújtott az oszlopok hatékonyságának jellemzésére.

A három kumarin analógnál a retenciós faktor, a szelektivitás és a felbontás értékeket vizsgálva nem találtunk egyértelmű kapcsolatot közöttük. A **(31)** komponens esetén a legkisebb retenciónál kaptuk a legnagyobb felbontást, míg a **(29)** analóg esetén a legnagyobb retenciós faktornál adódott a legnagyobb felbontás. Ez is azt mutatja, hogy az enantiomerek elválasztása CD alapú állófázisokon igen összetett, a stabil zárványkomplex létrejötte nem mindig elégséges feltétele az enantioszelektivitásnak.

A *Dns*-aminosavak esetén az aromás *Dns* rész lehet a felelős elsődlegesen a visszatartásért. A legjobb felbontást **PMBCD** oszlopon érték el a *Dns*-Phe esetén, a *Dns*-Leu a **BCD** oszlopon igen jó felbontással volt elválasztható, míg a *Dns*-Met csak részleges elválasztást mutatott a **BCD** és a **PMBCD** oszlopokon.

A propionsav analógoknál a fenilgyűrűn elhelyezkedő szubsztituens hatását figyelhettük meg. A retenciós faktor mindhárom molekula esetén a **BCD** és **HPBCD** oszlopokon volt a legnagyobb annak ellenére, hogy a **PMBCD** szelektor rendelkezik a legnagyobb üregmérettel. A nagy visszatartás ellenére a királis megkülönböztetés azonban kevésbé hatásos a **BCD** és **HPBCD** szelektorokon. Valószínűsítettük, hogy a metil szubsztituált analóg metilcsoportja a **PMBCD** királis állófázis metilezett peremével hidrofób kölcsönhatást alakíthat ki, javítva a szelektivitást. A három propionsav analóg közül valószínűleg a trikloro-szubsztituált analóg illeszkedik legjobban a **PMBCD** királis szelektor üregébe, stabilis komplexet és nagy  $R_S$  értéket eredményezve, míg a **BCD** és a **HPBCD** szelektorok esetén a nagy retenciós faktor ellenére sem érték el jó elválasztást.

A tropánsav és a terbutalin alifás illetve aromás hidroxilcsoporttal rendelkezik, amelyen keresztül H-hidas kölcsönhatást indukál a CD peremén elhelyezkedő szabad hidroxilcsoportokkal. A kromatográfiai körülmények optimalizálásával a **HPBCD** oszlop bizonyult a leghatékonyabbnak, valószínűleg a CD peremén és a tropánsav illetve a terbutalin molekulákon lévő hidroxilcsoportok H-hidas kölcsönhatása révén.

A perimetrinsav enantiomerek aromás gyűrű hiányában más mechanizmus szerint válhatnak el  $\beta$ -CD-alapú királis állófázisokon. A ciklopropil gyűrű túl kicsi ahhoz, hogy szorosán illeszkedjen a CD üregébe, ennek ellenére **PMBCD** oszlopon viszonylag nagy  $R_S$  értéket kaptunk mind a *cisz*- és mind a *transz*-perimetrinsavra. Ez az eredmény alátámasztja azt a felvetést, amit már korábban említettünk a propionsavak esetében: a királis elválasztásban fontos szerepet játszanak a CD peremén elhelyezkedő szubsztituensek, amelyek kölcsönhatásba lépnek az enantiomerekkel.



A 14 vizsgált komponensből **BCD** oszlopon kettő, **HPBCD** oszlopon négy és **PMBCD** oszlopon kilenc esetben sikerült alapvonal elválasztást elérnünk. A visszatartás, a legtöbb esetben a **BCD** és a **HPBCD** oszlopon volt a legnagyobb.

Megállapítottuk, hogy a molekula és az állófázis kémiai szerkezete megszabja a lehetséges kölcsönhatások milyenségét és mértékét, így a molekulaszervezet ismeretében javaslatot tehetünk a megfelelő állófázis kiválasztására. Az általunk vizsgált három különböző királis állófázis jól kiegészíti egymást. Ha az egyik állófázison legalább részleges elválasztást sikerült elérni, minden valószínűség szerint a másik két állófázis valamelyikével az elválasztás sikeresnek bizonyulhat. A három állófázison az elválasztás mechanizmusa is eltérhet, amit az eltérő elúciós sorrendek alátámasztanak.

## 5. Közlemények listája

### 5.1. Az értekezés alapját képező közlemények

1. István Ilisz, **Gábor Fodor**, Róbert Iványi, Lajos Sente, Géza Tóth, Antal Péter  
*Enantioseparation of  $\beta$ -methyl substituted amino acids with cyclodextrins by capillary zone electrophoresis*  
J. Chromatogr. B, 875 (2008) 273-279. **Impakt faktor: 2,500**
2. István Ilisz, **Gábor Fodor**, Róbert Berkecz, Róbert Iványi, Lajos Sente, Antal Péter  
*Enantioseparation of  $\beta$ -substituted tryptophan analogues with modified cyclodextrins by capillary zone electrophoresis*  
J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 3360-3365. **Impakt faktor: 4,101**
3. **Gábor Fodor**, István Ilisz, Júlianna Szemán, Róbert Iványi, Lajos Sente, Gábor Varga, Enikő Forró, Ferenc Fülöp, Antal Péter  
*HPLC Enantioseparation of  $\beta$ -Lactam Stereoisomers Using  $\beta$ -Cyclodextrin-Based Chiral Stationary Phases*  
Chromatographia 71 (2010) S29-S34. **Impakt faktor: 1,075**

4. Gábor Varga, **Gábor Fodor**, István Ilisz, Júlianna Szemán, Júlia Visy, Lajos Szente, Antal Péter

*Comparison of Separation Performances of Novel  $\beta$ -Cyclodextrin-Based Chiral Stationary Phases in High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparation*

J. Pharm. Biomed. Anal. 70 (2012) 71-76.

**Impakt faktor: 2,976**

**Összes impakt faktor: 10,652**

## 5.2. *Poszterek*

- 2007 István Ilisz, **Gábor Fodor**, Róbert Iványi, Géza Tóth, Antal Péter  
Enantioseparation of  $\beta$ -methyl substituted amino acids with cyclodextrins by capillary zone electrophoresis  
*31st International Symposium on High Performance Liquid Phase separations and related techniques, june 17-21, Gent, Belgium, 2007*
- 2009 **Gábor Fodor**, István Ilisz, Júlianna Szemán, Róbert Iványi, Lajos Szente, Gábor Varga, Enikő Forró, Ferenc Fülöp, Antal Péter  
HPLC Enantioseparation of  $\beta$ -Lactam Stereoisomers Using Cyclodextrins-Based Chiral Stationary Phase  
*8th Balaton Symposium on High Performance Separation Methods, 2-4. September, Siófok, Hungary, 2009*
- 2011 István Ilisz, **Gábor Fodor**, Zoltán Pataj, István Szatmári, Ferenc Fülöp, Lajos Szente, Antal Péter  
Capillary Electrophoretic Enantioseparation of Aminonaphthol Analogs  
*36<sup>th</sup> International Symposium on High performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 19-23 June, Budapest, Hungary, 2011*
- 2011 Julianna Szemán, Júlia Visy, Éva Jámber, **Gábor Fodor**, Róbert Ohmacht, Gábor Varga  
Cyclodextrin Based Cation-Exchanger Chiral Columns

*36<sup>th</sup> International Symposium on High performance Liquid Phase  
Separations and Related Techniques, 19-23 June, Budapest, Hungary,  
2011*