

# DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

## A hőmérséklet hatásának tanulmányozása egy királis gyógyszermolekula analitikájában: HPLC és NMR technikák alkalmazása

Gerencsérné Berta Renáta

Témavezető: Dr. Gazdag Mária, PhD.

ELTE konzulens: Perl Miklósné Dr. Molnár Ibolya, egyetemi tanár, professzor emerita



Doktori iskola: ELTE Kémia Doktori Iskola  
Iskolavezető: Dr. Inzelt György, egyetemi tanár

Program: Analitikai, kolloid- és környezetkémia, elektrokémia  
Programvezető: Dr. Záray Gyula, egyetemi tanár



Richter Gedeon Nyrt.  
Budapest  
2014



## 1. Bevezetés, célkitűzések

A gyógyszergyártásban, gyógyszerkutatásban nagy igény mutatkozik a folyamatok felgyorsítására. Ezért szükség van olyan hatékony analitikai, elválasztástechnikai módszerek kidolgozására, melyek a lehető leggyorsabban megadják a választ a feltett kérdésekre mind a kutatás-fejlesztés, mind a gyógyszerellenőrzés során. Emiatt megnőtt a jelentősége a gyors kromatográfia alkalmazásának, melynek egyik ígéretes képviselője az emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfia (HTLC).

A HTLC technika a hőmérséklet emelésével teszi lehetővé az analízis idő csökkentését, ezért olyan anyagok elválasztására alkalmas, melyek hőstabilak, a vizsgálat során nem bomlanak. A technika alkalmazhatóságának határt szab továbbá a készülék és az állófázis hőmérséklettűrő képessége. Míg a szilikagél alapú állófázisok kémiai és termikus stabilitása behatárolt, addig a napjainkban megjelenő, új generációjú állófázisok (grafitizált szén és az ultra stabil fém-oxid alapú (pl. alumínium-oxid, cirkónium-dioxid)) között egyre több alkalmazható széles hőmérséklet-tartományban. Az emelt hőmérsékleten használt készülékek nélkülözhetetlen tartozéka az állandó hőmérsékletet biztosító oszloptermostát, fontos a mozgófázis előfűtése az oszlopra kerülés előtt (a csúcskiszélesedés elkerülésére) és az oszlopról távozó oldószer lehűtése a detektor hőmérsékletére (alapvonal zaj elkerülésére). A manapság rendelkezésünkre álló készülékeknél az oszloptermostát önálló vagy beépített egységként, optimalizált paraméterekkel használható.

A folyadékkromatográfia elméleti feltételei a HTLC technikában is változtatások nélkül alkalmazhatók. A visszatartási tényező változása a hőmérséklettel információt ad a mozgó- és az állófázis között lejátszódó egyensúlyi folyamatok termodinamikai paramétereiről mind az akirális, mind a királis rendszerekben. A királis elválasztásokban azonban a gazda-vendég molekula kölcsönhatása miatt az elválasztás mechanizmusa összetettebb folyamat, ezért nehéz előre jelezni, hogy az enantiomerek elválasztására melyik királis szelektor alkalmas. Ehhez nyújthat segítséget az NMR technika.

Doktori munkámban célom volt a hőmérséklet hatásának tanulmányozása egy szteroid hatóanyag, a Levonorgestrel akirális és királis HPLC analízise során.

A hatóanyag akirális szennyezéseinek széles polaritása miatt a szilikagél alapú állófázison történő elválasztás hosszú analízis időt eredményez. Feladatul tűztem ki, hogy *akirális* rendszerben egy korszerű, emelt hőmérsékletre kifejlesztett, nem szilikagél alapú állófázist válasszak, ahol vizsgáltam a kromatográfias paraméterek, körülmények (hőmérséklet,

mozgófázis szerves összetevő minősége és mennyisége, áramlási sebesség) hatását a modell vegyületek viselkedésén keresztül.

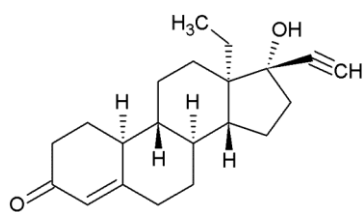
A királis gyógyszer hatóanyagokban – mint a Levonorgestrel is – szükséges és kötelező az előforduló enantiomer szennyezés pontos mennyiségi meghatározása. Az irodalmi adatokat és a Richterben végzett korábbi tapasztalatokat figyelembe véve, a Norgestrel enantiomerek folyadékromatográfiás elválasztásakor kiterjesztett hőmérséklet-tartományban vizsgáltam a mozgófázisban alkalmazott különböző natív-ciklodextrinek hatását, valamint néhány kísérletet is végeztem a permetilezett ciklodextrin származékok mozgó- és állófázisban való alkalmazására.

Célul tűztük ki a királis elválasztás mechanizmusának mélyebb megértését NMR spektroszkópiai módszerek alkalmazásával: a racém Norgestrel  $^1\text{H}$  NMR titrálásával az enantiomerek stabilitási állandóját határoztuk meg (natív vagy permetilezett) ciklodextrinekhez, valamint ezen állandók hőmérsékletfüggését a HPLC-vel kapott termodinamikai paraméterek független alátámasztására; Job módszerrel a képződő komplex(ek) sztöchiometriáját vizsgáltuk, 2D NOESY (ROESY) felvételekkel pedig a kötődésért felelős szteroid molekularészletet próbáltuk azonosítani.

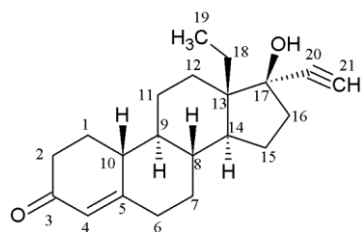
Kísérleti munkám során a HPLC méréseket, azok kiértékelését, a következtetések megállapítását magam végeztem, míg az NMR mérések, azok kiértékelése és értelmezése a Szerkezetkutató Osztály munkatársával, Dr. Szakács Zoltánnal együttműködve készültek. A disszertációban így a saját eredményeim bemutatásánál egyes számot, míg az NMR-s együttműködés eredményeinek leírásánál többes számot használok.

## **2. Kísérleti módszerek**

Kísérleteink során a Richter Gedeon által gyártott és forgalmazott szteroid hatóanyagot, a Norgestrelt használtuk. Királis kísérleteinkhez a racém Norgestrelt vizsgáltuk, azaz a *d*- és az *l*-Norgestrel 1:1 arányú keverékét (1. ábra), míg az akirális vizsgálataink során a Levonorgestrelt és célzottan kiválasztott szennyezéseit alkalmaztuk (2. ábra).



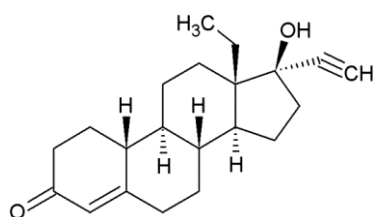
*l*-Norgestrel



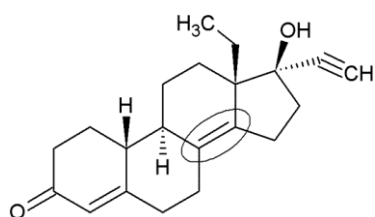
*d*-Norgestrel

(Levonorgestrel)

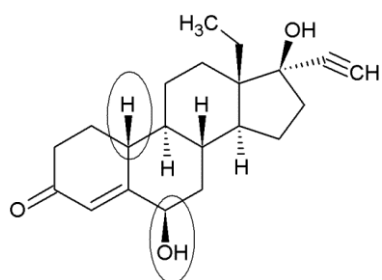
1. ábra *d*- és *l*-Norgestrel szerkezeti képlete



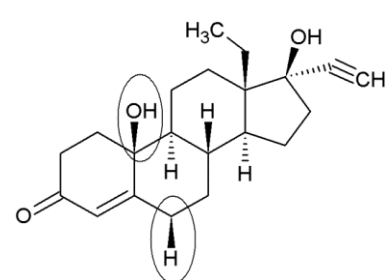
Levonorgestrel



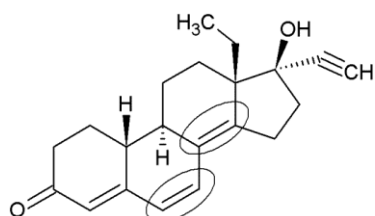
$\Delta^{(8,14)}$ -Levonorgestrel



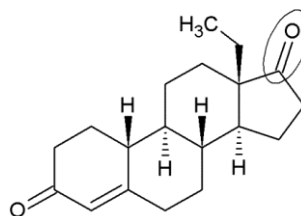
6 $\beta$ -OH-Levonorgestrel



10 $\beta$ -OH-Levonorgestrel



Levonorgestrel-ABC-trien



Levodion

2. ábra A Levonorgestrel és szennyezéseinek szerkezeti képlete, a főkomponenstől való eltéréseket kiemeléssel jelölve

A felhasznált oldószerek, vegyszerek nagy tisztaságúak voltak. Az alkalmazott analitikai módszerek:

- **akirális HPLC** analízis során Agilent 1100 HPLC készüléket használtam izokratikus módban. A méréseket Discovery Zr-CarbonC<sub>18</sub> állófázison végeztem, az állandó hőmérsékletet a Polaratherm Series 9000 termosztáttal kontrolláltam, mely a mozgófázis előfűtését (50–150°C) és a detektor előtti hűtését (40°C) is biztosította. Mozgófázisként metanol-víz és acetonitril-víz különböző arányú elegyét alkalmaztam.

- **királis HPLC** kutatásaimat akirális Luna C<sub>18</sub> (2) és királis Nucleodex PM- $\alpha$ -, PM- $\beta$ -, PM- $\gamma$ -ciklodextrin állófázisokon végeztem különböző összetételű metanol-víz mozgófázisban Agilent 1100 HPLC készüléken. Királis szelektorként natív- és permetilezett ciklodextrineket használtam.
- **NMR spektroszkópiai** méréseket végeztünk a királis HPLC elválasztás mélyebb megértésére és alátámasztására, melyhez a spektrumokat Varian NMR System típusú spektrométeren regisztráltuk 499,9 vagy 799,7 MHz proton mérési frekvencián a HPLC mozgófázisnak megfelelő összetételű deuterált oldószerkeverékben különböző hőmérsékleteken.
- **Coulometriás Karl Fischer titrálással** határoztuk meg a HPLC és az NMR mérésekhez használt ciklodextrinek víztartalmát a pontos koncentráció számításához.

### 3. Eredmények

A Levonorgestrel hatóanyag és szennyezéseinek elválasztására emelt hőmérsékleten gyors és nagy áteresztőképességű rendszert dolgoztam ki korszerű, cirkónium-dioxid alapú állófázison a kromatográfiai körülmények (hőmérséklet, szerves komponens minősége és mennyisége, áramlási sebesség) változtatásával. Eredményeim igazolták, hogy a mozgófázisban használt metanol és acetonitril szerves oldószerek eltérő kölcsönhatásából és tulajdonságából adódó szelektivitási különbségek jól érvényesülnek magasabb hőmérséklet-tartományban is. Megállapítottam, hogy a folyadékkromatográfia elméleti feltételei (van Deemter, van't Hoff egyenlet) kiterjesztett (50–150°C) hőmérséklet-tartományban is biztonsággal alkalmazhatók. A Levonorgestrel és 5 szennyezése 2,0–2,5 perc analízis idő alatt elválaszthatók egymástól, ezért a kidolgozott módszer alkalmas lehet a jövőben Levonorgestrel hatóanyag tisztaságvizsgálatára és gyógyszerkészítményekben történő szelektív és gyors hatóanyag-tartalom mérésére is.

A Norgestrel enantiomerek folyadékkromatográfiai elválasztásakor a mozgófázisban alkalmazott  $\alpha$ -ciklodextrin királis szelektor nem eredményezett retenciós idő változást a ciklodextrin nélküli rendszerben kapott retenciós időhöz viszonyítva, melyre az NMR technikával, a megfelelő jelek (H4 olefin-, H19 acetilén- és H21 metilénjel) titrálási görbéinek kiértékelésével kaptunk magyarázatot. A kis stabilitási állandó ( $K < 5$ ) igen kis stabilitású komplex képződésére utal, ami nem elegendő az enantiomerek folyadékkromatográfiai felismeréséhez és elválasztásához.

A  $\beta$ -ciklodextrin királis szelektor alkalmazása a HPLC elválasztásokban jelentősebb, királis felismerés nélküli retenciós idő csökkenést eredményezett a ciklodextrin nélküli rendszerben kapott retenciós időhöz viszonyítva, mely gyenge zárványkomplex kialakulására utal. Az  $^1\text{H}$  NMR titrálások során jel kettőződést tapasztaltunk mindhárom vizsgált jelen, de a különböző hőmérsékleten (25, 40, 50°C) kapott becsült stabilitási állandók értékei kicsik ( $K < 70$ ) a sikeres HPLC elválasztáshoz. Job módszerét alkalmazva vizsgáltuk a képződő komplex sztöchiometriáját és elsőként sikerült valószínűsíteni a 2:1 arányú komplex képződését  $\beta$ -ciklodextrinnel az 1:1 arányú komplex keletkezése mellett.

A natív ciklodextrinek közül a nagyobb üregméretű  $\gamma$ -ciklodextrin megfelelő volt a Norgestrel enantiomerek elválasztásához. A különböző kromatográfias paraméterek változtatásának hatását vizsgálva megállapítottam, hogy a mozgófázis alacsonyabb szerves összetétele, a nagyobb  $\gamma$ -ciklodextrin koncentráció és az alacsonyabb hőmérséklet kedvez az enantiomerek egymás melletti megkülönböztetésének. Enantiomer-specifikus stabilitási állandókat ( $K_d$ ,  $K_l$ ) és királis szelektivitás ( $\alpha_c$ ) értékeket számoltunk és adtunk meg a HPLC elválasztások és az  $^1\text{H}$  NMR titrálások különböző hőmérsékleten kapott eredményeiből. A két független technikával kapott eredmények, különösen az  $\alpha_c$  királis szelektivitás értékek nagyon jó egyezést mutatnak. Megállapítottuk, hogy különböző hőmérsékleten mind a  $K$  stabilitási állandóknak, mind az  $\alpha_c$  hányadosoknak megfelelő határérték ( $K > 200$ ,  $\alpha_c > 1,1$ ) felett kell lennie a kromatográfias elválasztás előrejelzéséhez. A HPLC adatok és az  $^1\text{H}$  NMR titrálások Job módszere szerinti sztöchiometriai tanulmányozása alapján az 1:1 arányú zárványkomplex képződését állapítottuk meg. Valamint a *d*-Norgestrel/ $\gamma$ -ciklodextrin komplex szerkezetéről 2D NOESY és ROESY spektrumok segítségével kaptunk információt.

A mozgófázisban alkalmazott permetilezett ciklodextrinokkal kapott HPLC eredmények alapján megállapítottam, hogy mindhárom származék és a Norgestrel között létrejön a kapcsolat, jelentős mértékű retenciós idő csökkenést mértem a szelektor nélküli rendszerhez képest, de királis felismerés a két enantiomer között nem jött létre. Mind a HPLC, mind az NMR mérési adatokból stabilitási állandókat számítottunk. A HPLC mérésekből számolt nem enantiomer specifikus stabilitási állandók egy nagyságrenddel nagyobb értéket eredményeztek az NMR számítási adatokhoz képest. Ebből arra következtethetünk, hogy a folyadékromatográfias vizsgálatok adataiból számított stabilitási állandók a királis szelektorok állófázishoz való erős kötődését számszerűsíthetik inkább, mint a királis szelektor/Norgestrel komplex kialakulását. Az NMR számításokból kapott értékek, tisztán, az oldatfázisban lejátszódó királis szelektor/Norgestrel komplexek kialakulására jellemzőek, melyek igen gyenge kötődést mutatnak. A permetilezett ciklodextrin állófázisokon végzett

előkísérletekből megállapítottam, hogy a legkisebb üregméretű permetilezett- $\alpha$ -ciklodextrinnel esély látszik arra, hogy a Norgestrel enantiomerek megfelelő módszerfejlesztéssel elválaszthatók legyenek. A HPLC és az NMR vizsgálatokból azt is megállapítottuk, hogy a natív ciklodextrinekkal szemben, az enantiomerek elúciós sorrendjében csere történik, vagyis a gyógyászatilag nem kedvező királis szennyezés eluálódik elsőként, ami a pontos mennyiségi meghatározás szempontjából fontos.

#### 4. Tézisek, új tudományos eredmények

1. Korszerű, emelt hőmérsékletre kifejlesztett cirkónium-dioxid alapú állófázison elsőként dolgoztam ki egy igen gyors elválasztási rendszert (2–2,5 perces analízis idő) a Levonorgestrel és 5 szennyezésének elválasztására a kromatográfiai paraméterek, körülmények (hőmérséklet, mozgófázis szerves összetevő minősége és mennyisége, áramlási sebesség) változtatásával [1,3]. A javasolt módszer megfelelő továbbfejlesztéssel alkalmas lehet a jövőben a Levonorgestrel hatóanyag tisztaságvizsgálatára és gyógyszer-készítményekben történő szelektív és gyors hatóanyag-tartalom mérésére is.
2. Eredményeimmel igazoltam, hogy a mozgófázisban használt metanol és acetonitril szerves oldószerek eltérő kölcsönhatásából és tulajdonságából adódó szelektivitási különbségek jól érvényesülnek magasabb hőmérséklet-tartományban is. Elsőként állapítottam meg a Levonorgestrel és szennyezéseinek vizsgálata alapján, hogy a folyadékkromatográfiai elméleti összefüggések (van Deemter, van't Hoff egyenletek) emelt hőmérsékleten (50–150°C) is biztonságosan alkalmazhatók metanolos mozgófázisban [1,3]. Megállapítottam és igazoltam, hogy emelt hőmérséklet-tartományban is érvényesek a hasonló szerkezeti tulajdonságok, a retenciós paraméterek és a termodinamikai állandók közötti összefüggések Levonorgestrelre és hasonló szerkezetű szennyezéseire, valamint a retenciós idők előre jelezhetők.
3. NMR technikával, a racém Norgestrel megfelelő jelein (H4 olefin-, H19 acetilén- és H21 metilénjel) elsőként mértünk és kötődési vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a különböző hőmérsékleteken alkalmazott  $\alpha$ - és  $\beta$ -ciklodextrin királis szelektorokkal kis stabilitási állandójú komplexek képződnek. A kapott adatok magyarázatot adtak arra, hogy a folyadékkromatográfiában a Norgestrel enantiomerek miért nem választhatók el egymástól [2].



4. Az irodalomban elsőként sikerült valószínűsíteni a 2:1 arányú komplex képződését  $\beta$ -ciklodextrin és Norgestrel között az 1:1 arányú komplex keletkezése mellett, Job módszere szerinti sztöchiometriai vizsgálattal [2].
5. Elsőként számoltunk és adtunk meg különböző hőmérsékleteken enantiomer-specifikus stabilitási állandókat ( $K_d$ ,  $K_l$ ) és királis szelektivitás ( $\alpha_c$ ) értékeket a  $\gamma$ -ciklodextrin királis szelektorrall történő HPLC elválasztások és az  $^1\text{H}$  NMR titrálások eredményeiből [2]. A két független technikával kapott eredmények, különösen az  $\alpha_c$  királis szelektivitás értékek, nagyon jó egyezést mutatnak. Megállapítottuk, hogy különböző hőmérsékleteken mind a  $K$  stabilitási állandóknak, mind az  $\alpha_c$  hányadosuknak megfelelő határérték ( $K > 200$ ,  $\alpha_c > 1,1$ ) felett kell lennie a sikeres kromatográfias elválasztás előrejelzéséhez.

## 5. Publikációs lista

*Közlemények az értekezés témájában:*

[1] Berta Renáta, Babják Mónika, Gazdag Mária: A hőmérséklet szerepe a folyadékkromatográfias elválasztásokban, *Magyar Kémikusok Egyesülete Richter gyári csoportjának centenáriumi kiadványa*, (2007) 56.

[2] Renáta Berta, Zoltán Szakács, Mónika Babják, Mária Gazdag: The Role of Temperature in Enantioseparation of Norgestrel with Native Cyclodextrins: a Combined HPLC and NMR Study, *Chromatographia* **71** (2010) 35.

[3] Renáta Berta, Mónika Babják, Mária Gazdag: A study of some practical aspects of high temperature liquid chromatography in pharmaceutical applications, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **54** (2011) 458.

*Előadások az értekezés témájában:*

1. Berta Renáta, Babják Mónika, Gazdag Mária: A hőmérséklet szerepe a folyadékkromatográfias elválasztásokban, *Centenáriumi Vegyészkonferencia*, Sopron 2007. május 29 – június 1.
2. Berta Renáta, Babják Mónika, Gazdag Mária: Királis elválasztási lehetőségek vizsgálata különböző ciklodextrinekkal magas hőmérsékletű folyadékkromatográfias technikával, *Kémiai Előadói Napok*, Szeged, 2008. október 27 – 29.

3. Berta Renáta, Babják Mónika, Gazdag Mária: Az emelt hőmérséklet hatásának tanulmányozása és gyógyszeranalitikai alkalmazási lehetőségei a gyors folyadékkromatográfiás elválasztásokban, *Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2008*, Sárvár, 2008. november 5 – 7.
4. Berta Renáta, Dr. Szakács Zoltán: „Társ-kapcsolt” HPLC – NMR: az enantiomerek elválasztásának szépségei és mélységei az elválasztástechnika és szerkezetkutatás együttműködésének tükrében, *Elválasztástudományi Anket 2010*, Budapest, 2010. március 18.
5. Berta Renáta: Az emelt hőmérséklet elválasztásra gyakorolt hatásának gyakorlati megközelítése egy gyógyszerhatóanyag vizsgálata kapcsán, *XXXVI. Gyógyszeranalitikai Továbbképző Tanfolyam*, Siófok, 2010. április 8 – 10.

*Poszterek az értekezés témájában:*

1. Berta Renáta: Királis elválasztások tanulmányozása nagy hőmérsékletű folyadékkromatográfiával, *ELTE Kémiai Intézet Tudományos Nap*, Budapest, 2007. november 9.
2. Berta Renáta, Babják Mónika, Gazdag Mária: Királis elválasztási lehetőségek és mechanizmusok vizsgálata különböző ciklodextrinekkel egy királis gyógyszermolekula kapcsán, *Elválasztástudományi Vándorgyűlés*, Sárvár, 2008. november 5 – 7.
3. Renáta Berta, Mónika Babják, Mária Gazdag: Study of the Theoretical and Practical Aspects of the Elevated Temperature for Fast HPLC Separation, *34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Dresden, Germany, 2009. június 28 – július 2.
4. Berta R., Szakács Z., Babják M., Gazdag M.: The Role of Temperature in Enantioseparation of Norgestrel with Native Cyclodextrins: a Combined HPLC and NMR Study, *8th Balaton Symposium on High-performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Science*, Siófok, Hungary, 2009. szeptember 2 – 4.

*Az értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk*

*Közlemények:*

1. T. Marek, R. Berta, C. Schür, S. Tautz, P. Kiesel, S. Kunsági-Máté, H.P. Strunk  
Photolithography and epitaxial lift-off technique: A new preparation method for the  
transmission electron microscopy in: Physik Mikrostrukturierter Halbleiter, Band 10,  
2<sup>nd</sup> Symposium on Non-Stoichiometric III-V Compounds;  
eds. T. Marek, S. Malzer, P. Kiesel; *Verlag Lehrstuhl für Mikrocharakterisierung*, p.  
103-108, **1999**, Erlangen
2. Berta R.: A víz modellezése, *A kémia tanítása folyóirat* IX. évf., (2003. szeptember)  
20., Mozaik Kiadó

*Előadások:*

1. Berta Renáta: Terheléses stabilitásvizsgálatok szerepe a gyógyszerhatóanyagok  
vizsgálatában, *Fiatal analitikusok 20. előadói napja*, MKE, Budapest, 2005.  
november
2. Gerencsérné Berta Renáta, Lőw Miklós: ELTE-s diplomával a Richterben, *Alkímia  
Ma, Az anyagról mai szemmel, a régiek megszállottságával*, Budapest, 2007.  
december 13.

*Poszter:*

1. Renata Berta: Photolithography and epitaxial lift-off technique in specimen separation  
for the transmission electron microscopy, *IV. Multinational Congress on Electron  
Microscopy*, Veszprém, September 5-8, 1999