



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Tudományos diákköri dolgozat

Gyógyszermolekula-ciklodextrin komplexek vizsgálata automatizált analitikai módszerek segítségével



RICHTER GEDEON

Készítette: Dargó Gergő

Témavezető: Dr. Balogh György Tibor

Richter Gedeon Nyrt., osztályvezető
címzetes egyetemi docens

2015.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Balogh György Tibornak, aki mindig szívesen válaszolt kérdéseimre, tanácsai, útmutatása nélkülözhetetlenek voltak a dolgozat elkészüléséhez. Továbbá szeretném megköszönni Dr. Sente Lajos professzornak, valamint a Cyclolab, Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Kft.-nek, hogy rendelkezésünkre bocsátották a mérések elvégzéséhez szükséges ciklodextrineket.

Ezenkívül szeretném megköszönni a Richter Gedeon Nyrt.-nek, hogy lehetővé tették, hogy a Szintézistámogató Laboratóriumban dolgozhassak. Végül, de nem utolsósorban a Szintézistámogató Laboratórium minden munkatársának tartozom hálával a segítségért és támogatásért, amelyet munkám során nyújtottak.

Tartalom

1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi rész.....	5
2.1. Gyógyszerek felszívódása a gasztrointesztinális rendszerben.....	5
2.2. Ciklodextrinek	7
2.3. A komplexképzés vizsgálatának módszerei	8
2.3.1. A komplexképzés vizsgálata UV-pH titrálás alapján.....	9
2.3.2. A komplexképzés vizsgálata UV-vis spektrumok alapján.....	13
2.3.3. A komplexképzés vizsgálata oldhatóság alapján	15
3. Célkitűzés.....	18
4. Kísérleti rész.....	19
4.1. A vizsgált vegyületek, és az elvégzett vizsgálatok	19
4.2. Használt módszerek, mintaelőkészítés	20
4.2.1. UV-pH titrálás	20
4.2.2. UV-vis spektroszkópia	22
4.2.3. Oldhatóság mérése	22
4.3. Eredmények	23
4.4. A CD-el való komplexképzés szűrések eredményei	23
4.4.1. Különböző CD-származékok mellett mért eredmények	26
4.4.2. Komplexstabilitási állandó számolása a pK_a -változásokból	28
4.4.3. UV-vis spektroszkópia mérések eredményei	33
4.5. Az oldhatósági vizsgálatok eredményei	34
5. Összefoglalás.....	39
6. Irodalomjegyzék.....	40
7. Függelék	42

1. Bevezetés

A szervezetbe kerülő, a gasztrointesztinális rendszeren végighaladó gyógyszerek biohasznosulását nagyban befolyásolja azok felszívódása, amely fizikai-kémiai értelemben első sorban oldhatóságuktól és permeabilitásuktól függ. Ennek megfelelően a rossz oldhatóságú és/vagy gyenge penetrációs képességű vegyületek körében rendre alacsony biohasznosulású vegyületekkel találkozhatunk, így a hatóanyag formulálásakor a biohasznosulás és így ezen fizikai-kémiai sajátságok javítására van szükség. Az ily módon fejlesztett, az alampolekulánál fokozottabb biohasznosulást mutató készítményből kisebb dózis bevétele is elegendő, ami szervezetünket is kevésbé terheli.

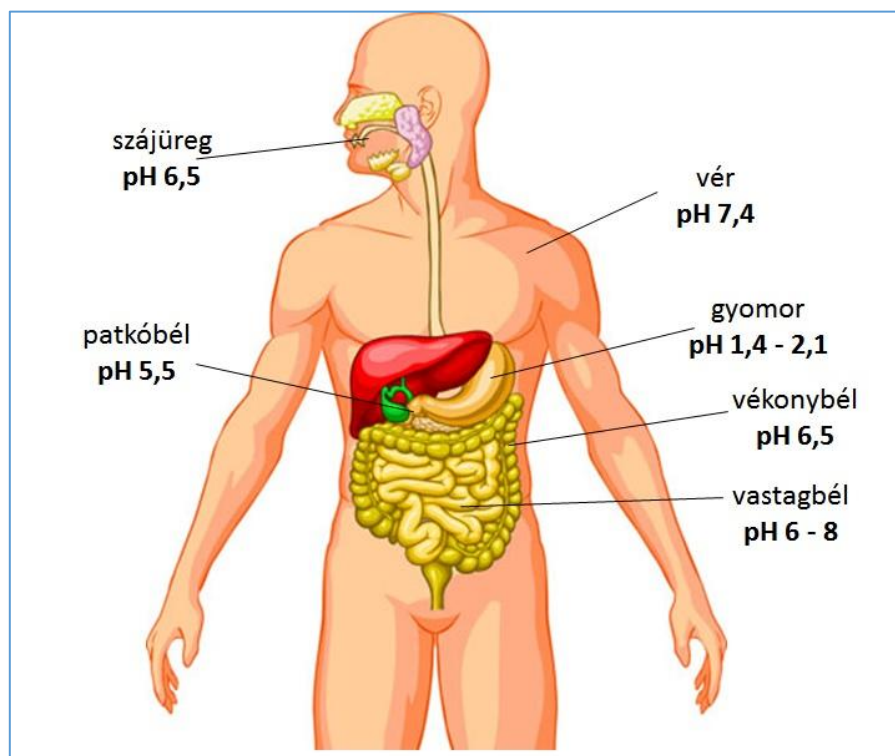
Ciklodextrinek, mint formulációs segédanyagok alkalmazásával a vegyületek oldhatósága, illetve permeabilitása is növelhető. A vízben jól oldható ciklodextrinek komplexképzés során segítik a gyógyszermolekulák oldatban tartását a gasztrointesztinális rendszer vizes közegében, elősegítik azok átjutását a biológiai membránokon keresztül. Figyelembe kell vennünk azonban, hogy az egyes molekulák nem mindegyik ciklodextrin származékkal képesek komplexképzésre, illetve a komplexképzésre képes ciklodextrinek is eltérő erősségű, sztöchiometriai viszonyú zárvány-komplexekeket fognak létrehozni. Formuláció során pedig azt a ciklodextrint érdemes a vegyülethez választani, amellyel stabil komplex kialakítására képes.

Ezek alapján célul tűztük ki egy olyan automatizált módszer kialakítását a komplexképzés vizsgálatára, melynek segítségével a különböző gyógyszerjelölt vegyületek esetében ki lehet választani azt a ciklodextrin származékot, amellyel a legstabilabb komplexet képezi. Az így választott ciklodextrinnel történő formuláció során kapott készítmény várhatóan kedvező biohasznosulású lesz. Munkánk során a komplexstabilitást vizsgáló módszerek közül a gyógyszervegyület, illetve a ciklodextrinnel képzett komplexének fizikai-kémiai sajátságainak megváltozásán alapuló módszereket használtuk.

2. Irodalmi rész

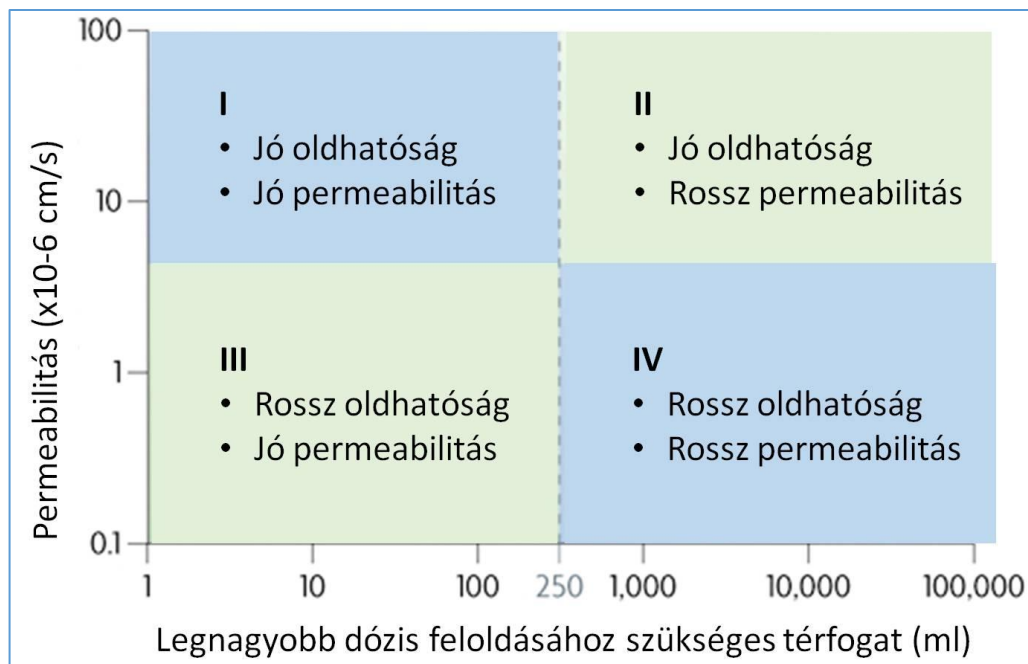
2.1. Gyógyszerek felszívódása a gasztrointesztinális rendszerben

A gyógyszerek emberi szervezetbe történő bejuttatásának két általános módja az enterális módon, a tápcsatornán keresztül történő, illetve a parenterális úton, a tápcsatornát megkerülő adagolás. Enterális úton a gyógyszer a gasztrointesztinális (GI) rendszeren keresztül fog haladni, egészen addig, amíg el nem éri felszívódásának helyét. Ebben az esetben a gyógyszermolekulának olyan fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie, hogy oldódni tudjon a gasztrointesztinális rendszer változó pH értékű vizes közegében [1], valamint a biológiai membránokon is képesnek kell lennie átjutni a megfelelő mértékű felszívódás érdekében. A teljes beadott mennyiségből ugyanis csak az ily módon, a vérkeringést is elérő, felszívódó gyógyszerhányad lesz képes hatást kifejteni a szervezetben. Fentiek alapján a GI rendszeren végighaladó gyógyszerek biohasznosulása első sorban oldhatóságuktól és permeabilitásuktól függ. Emiatt már a gyógyszerkutatás korai fázisában fontos ezen paraméterekről információt nyernünk a gyógyszer-jelölt molekulák esetében.



1. ábra A GI rendszer felszívódás szempontjából fontos szakaszainak kémhatása [2]

A gyógyszermolekulákat az oldhatóságuk és permeabilitásuk alapján kialakított osztályozási rendszer, a Biopharmaceutics Classification System (BCS) négy osztályába sorolhatjuk [3].



2. ábra A BCS osztályozási rendszer [4]

A BCS I osztályban az amfifil vegyületek találhatók melyek jó oldhatóságuk, nagy permeabilitásuk következtében ideálisak *per os* felszívódás szempontjából. A BCS II. osztályban lipofil vegyületek találhatók, ezek felszívódása különböző formulációs technológiákkal javítható a megfelelő *per os* felszívódás eléréséhez. A BCS III. osztályban hidrofil vegyületeket találhatók, amelyek esetén a prodrug stratégia alkalmazása segítheti az alacsony permeabilitás növelését. A BCS IV. osztályban találhatók a gyógyszerkutatók számára legtöbb problémát okozó, „rizikófil” vegyületek, permeabilitásuk és oldhatóságuk is rossz, esetükben az *in vitro/in vivo* mérések eredményei csak kis mértékben, vagy egyáltalán nem korrelálnak, így terápiás alkalmazásuk nehezen tervezhető [3].

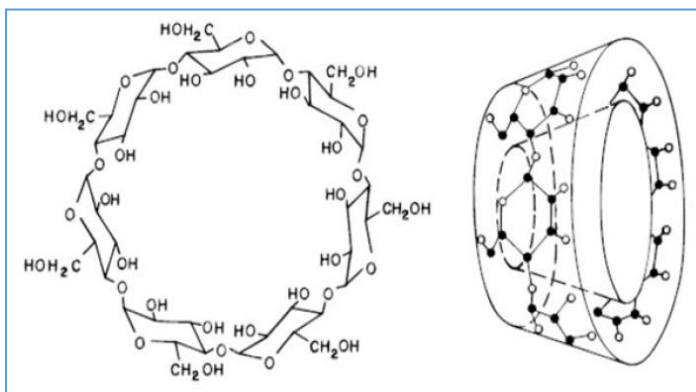
Megfigyelhető, hogy az egyes osztályok esetén az abszorpciós rátát más-más paraméterek fogják limitálni (3. ábra) [5], úgy, mint a gyomor ürülése, az oldhatóság, vagy a permeabilitás, illetve ezek kombinációja. Ciklodextrinek (CD-ek) alkalmazásával lehetőség van a gyógyszermolekulák oldhatóságának növelésére, ezért első megközelítésben azt mondhatjuk, hogy a BCS II., illetve a IV. osztályokba sorolható anyagok biohasznosulásának növelésére láthatunk esélyt alkalmazásukkal.

Paraméterek	I. osztály	II. osztály	III. osztály	IV. osztály
Vizes oldhatóság	Fokozott	Rossz	Fokozott	Rossz
Permeabilitás	Magas	Magas	Alacsony	Alacsony
In vitro/in vivo korreláció	Lehet jó	Jó	Rossz	Rossz
Abszorpció rátát befolyásolja	Gyomor ürülése	Oldhatóság	Permeabilitás	Oldhatóság és permeabilitás
Ciklodextrinek alkalmazásának hatása a biohasznosulásra	Csökkentheti	Növelheti	Csökkentheti	Növelheti

3. ábra CD-ek alkalmazásának hatása az eltérő BCS osztályokban [5]

2.2. Ciklodextrinek

A CD-ek alfa-D-glükopiranoz egységekből 1-4 kapcsolódással kialakuló ciklikus oligo-szacharidok, melyeket keményítóből enzimés átalakítással nyernek [6]. A gyűrűk tagszáma 6, 7, 8, 9 lehet, a növekvő tagszám szerint elnevezésük α -, β -, γ -, illetve δ -CD-ek. A hengeres alakú molekulákban a henger peremén találhatóak a glükóz egységek hidroxilcsoportjai, az üreg belsejében pedig a hidrogének, illetve a glikozil-kötésű oxigének [7]. Ennek következtében a henger belseje apoláris,



4. ábra β -ciklodextrin (96 jpharmsci)

míg pereme és külseje poláris jellegű, így vízben jól oldódnak, belső üregükben pedig különböző apoláris csoportot tartalmazó molekulákkal, mint vendégmolekulákkal képesek reverzibilis, nem kovalens zárvány-komplexek létrehozására. Az üreg átmérője a gyűrűtagszámmal változik, így eltérő méretű molekulákat, molekularészeket képesek az egyes CD típusok komplexálni. Az hidroxilcsoportok különböző módosításával tovább növelhető a CD-ek vizes oldhatósága, így származékaikat is előszeretettel alkalmazzák a gyógyszeriparban [8].

Az irodalomban számos példát találhatunk olyan gyógyszerekre, amelyek biohasznosulása növelhető CD-ek alkalmazásával [9]. Az 5. ábra néhány olyan példát mutat

Hatóanyag	CD	Formulálás	Vizsgált faj	F _{rel}
Albendazole	HP β CD	Per os oldat	Bárány, egér	$\leq 2,5$
Carbamazepine	DM β CD	Per os por, oldat vagy tabletta	Nyúl, kutya, patkány	$\leq 5,6$
Cinnarizine	β CD, SBE β CD, HP β CD	Per os oldat, tabletta, port tart. kapszula	Kutya	≤ 48
Digoxin	γ CD	Tabletta	Kutya	5,4
17 β -Estradiol	HP β CD	Szublingvális tabletta	Ember	5,8
Glibenclamide	β CD, SBE β CD	port tart. kapszula	Kutya, patkány	$\leq 6,2$
Nifedipine	β CD, HP β CD	port tart. kapszula	Nyúl, kutya	$\leq 2,9$
Spironolactone	β CD, γ CD, DM β CD, SBE β CD, HP β CD	Per os por és oldat	Patkány, kutya	$\leq 3,6$

5. ábra A biohasznosulás növekedése ciklodextrinek hatására [5]

be, ahol a CD-ek okozta biohasznosulás növekedést, a relatív biohasznosulást vizsgálták. A relatív biohasznosulás értékét a CD-t tartalmazó készítmény esetén mért, a plazma koncentráció időbeli függését leíró görbe alatti terület (AUC) és a CD-t nem tartalmazó készítményhez tartozó görbe alatti terület hányadosából kapunk [5]. Látható, hogy ciklodextrinek alkalmazásával néhányszorosra, egyes esetekben egészen több tízszeresre is sikerült növelni a hatóanyag biohasznosulását.

2.3. A komplexképzés vizsgálatának módszerei

Ahhoz, hogy a CD-ek felszívódásra, biohasznosulásra gyakorolt hatását vizsgálni tudjuk, a CD vegyületekkel való komplexképzésének vizsgálatára van szükség. A komplexképzés vizsgálatára alkalmas módszereket két fő csoportba sorolhatjuk. [10] Az első a szabad és a komplexált hatóanyag-forma elválasztásán alapuló módszerek. Ide tartoznak a különböző kromatográfiai módszerek, az affinitás kapilláris elektroforézis, a dialízis, és tömegspektrometria módszerek. A másik csoportban azok a módszerek találhatók, melyek a gyógyszervegyület, vagy a CD valamilyen fizikai-kémiai sajátosságának megváltozását veszik alapul. Ilyen módszerek a fázis-oldhatóságon, UV-vis spektroszkópián, potenciometrián, NMR-en, konduktometrián, hidrolízis kinetikán, illetve a permeabilitás vizsgálatán alapuló módszerek. Az itt felsorolt módszerek közül munkánk során az UV-vis spektroszkópiát,

illetve a proton-disszociáción keresztül megvalósuló kromofór jelleg megváltozásán alapuló UV-pH titrálást, az fázis-oldhatóságot vizsgáló módszereket használtuk.

2.3.1. A komplexképzés vizsgálata UV-pH titrálás alapján

Az UV-pH titrálással az olyan proton-disszociációra képes vegyületek esetében, melyek UV-vis spektruma pH-függést mutat, a mért spektrumokból a két szélső (teljesen ionizált és teljesen neutrális forma) és egy átmeneti pH-n vett abszorbanciából a Henderson-Hasselbalch egyenletet felhasználva kiszámolható a vegyület pK_a -értéke [11]. Az egyenlet a legegyszerűbb, gyenge monoprotikus savakra vonatkoztatott esetben a következőképpen vezethető le [12]:



ahol a disszociációs állandó:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (2)$$

Mindkét oldal tízes alapú logaritmusát véve:

$$\log K_a = \log \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = \log [H^+] + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (3)$$

A definíció szerint pedig a $pK_a = -\log K_a$, illetve $pH = -\log [H^+]$, ezért a (3) egyenlet átírható a következő formába:

$$pK_a = pH + \log \frac{[HA]}{[A^-]} \quad (4)$$

A (4)-es egyenlet, a Handerson-Hasselbalch egyenlet. Belátható, hogy az egyenletet bázisokra is hasonlóképpen levezethető, és a savi illetve bázikus disszociációs állandó közti kapcsolatot kihasználva a Henderson-Hasselbalch egyenlet a savas vagy bázikus jellegtől függetlenül általános formába írható:

$$pK_a = pH + \log \frac{[proton\ donor]}{[proton\ akceptor]} \quad (5)$$

Az egyenlet UV-pH titrálás esetén átalakítható oly módon, hogy a koncentrációk hányadosának helyére a mért spektrofotometrius adatokból, az abszorbancia-változásokból származtatható mennyiségeket írunk [13].

A vizsgált vegyület adott disszociációs csoportjához tartozó pK_a -értékkel azonos pH-tól megfelelő távolságra (kb. 1,5 pH egység és annál nagyobb távolság esetén) a savi, illetve bázikus jellegnek megfelelően a pH egyik irányában elindulva a vegyület teljesen semleges, míg a másik irányban teljesen ionos formában lesz jelen. Ezen két pH esetében – monoprotikus sav esetében felírva – a két oldatra a koncentrációk, és a mért abszorbanciák kapcsolata, a Lambert Beer-törvénynek megfelelően a következő:

$$\text{Neutrális forma:} \quad A_{HA} = \varepsilon_{HA} \cdot b \cdot C_T \quad (6)$$

$$\text{Ionos forma:} \quad A_{A^-} = \varepsilon_{A^-} \cdot b \cdot C_T \quad (7)$$

Az egyenletekben A_{HA} és A_{A^-} a mért abszorbanciákat, ε_{HA} és ε_{A^-} az adott formákhoz tartozó moláris abszorpciós koefficienseket adott λ hullámhosszon, b az optikai úthosszt, C_T pedig az oldatban lévő teljes vegyület koncentrációt jelöli, melyre pH-tól függetlenül igaz, hogy az ionos és neutrális forma koncentrációjának összegeként adható meg:

$$C_T = C_{HA} + C_{A^-} \quad (8)$$

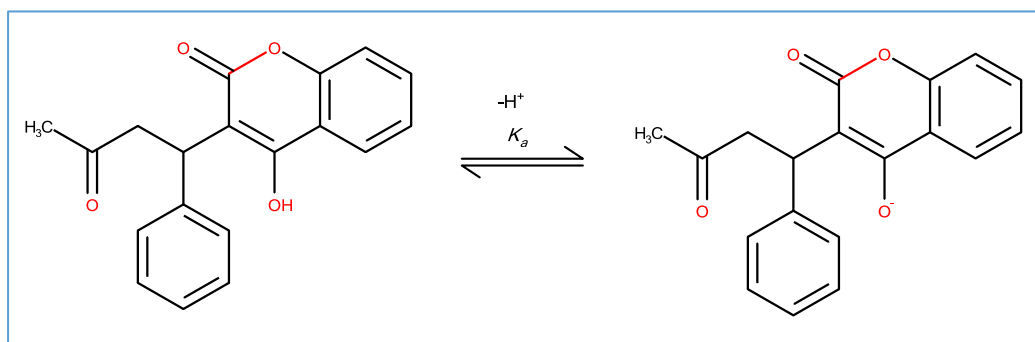
Egy bármilyen, a két szélső, ionos, illetve neutrális pH-értékek közötti pH-érték esetében az abszorbancia a következőképpen fejezhető ki:

$$A_{\text{átmeneti}} = \varepsilon_{HA} \cdot b \cdot C_{HA} + \varepsilon_{A^-} \cdot b \cdot C_{A^-} \quad (9)$$

A (6)-(9) egyenleteket összevonva a következő, a Henderson-Hasselbalch egyenlettel analóg összefüggés írható fel:

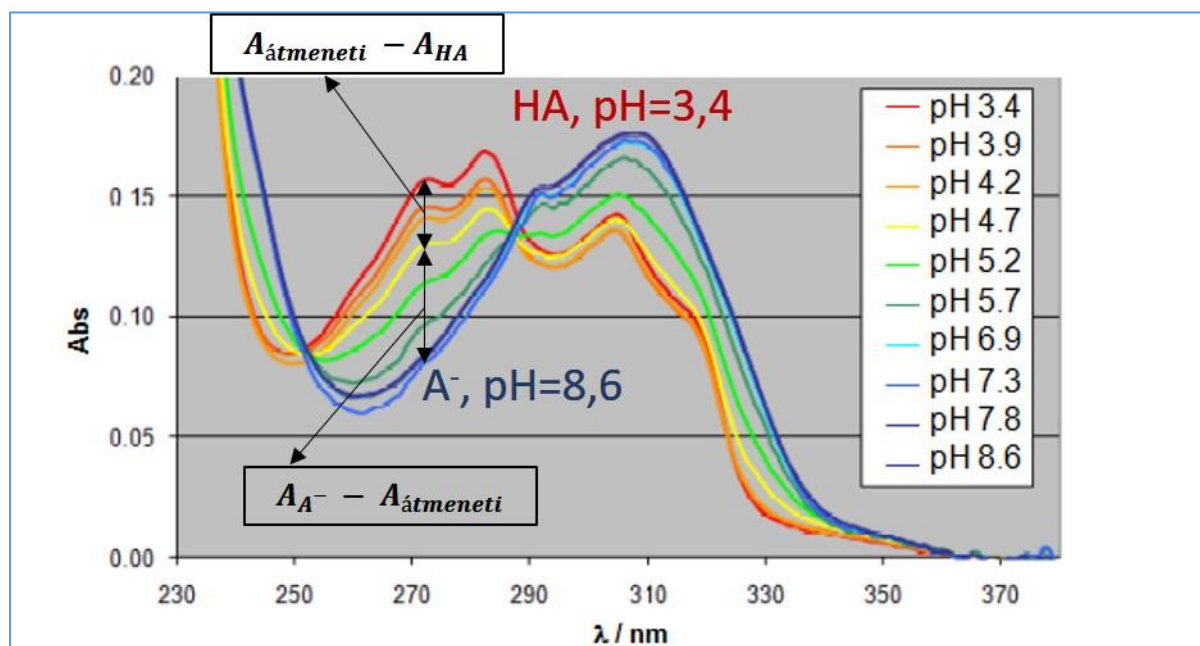
$$\log \left(\frac{A_{\text{átmeneti}} - A_{HA}}{A_{A^-} - A_{\text{átmeneti}}} \right) = \text{pH} - \text{p}K_a \quad (10)$$

A warfarin ($pK_a=4,82$) esetében például a következő proton-disszociációs folyamat játszódik le:



6. ábra A warfarin proton-disszociációs egyensúlya

A warfarinhoz tartozó UV spektrum, a pK_a számoláshoz szükséges abszorbancia-változások jelölésével a következő:



7. ábra A warfarin UV-spektrumának pH-függése [19]

Az egyenletből ezek után több módszerrel is, már akár egy darab átmeneti pH érték és a három szükséges abszorbancia-értékből számolható a pK_a [13], de napjainkban a mérés automatizálása következtében, kifejezetten erre a célra írt programok is léteznek, melyek több átmeneti pH és egy hullámhossz intervallumhoz tartozó abszorbancia-értékek sokaságának mátrixából képesek meglehetősen nagy pontossággal kiszámolni az adott vegyület pK_a értékét (pl.: RefinementPro, SiriusT3 Refine). Továbbá az izobesztikus keresztpontok – ahol az abszorbancia független a pH-tól – felhasználhatók az adatok normálására, így az abszorbancia mérése során keletkező zajból adódó hibák is csökkenthetőek.

Ezzel a módszerrel különböző CD-koncentrációk mellett mérve számolhatók az egyes látszólagos pK_a -értékek is, a komplexált forma egyensúlyának, valamint az abból kapott stabilitási állandónak a felhasználásával:



$$K_a^c = \frac{[H^+] + [A^- \cdot CD]}{[HA \cdot CD]} \quad (12)$$

A (2) és (12) egyenletek többszöri transzformációjával a következő egyenlethez jutunk [14]:

$$\frac{K'_a}{K_a} = 1 + \frac{(K_{11b} - K_{11a})[CD]}{1 + K_{11a}[CD]} \quad (13)$$

Az egyenlet átírható az ún. dupla reciprokos, más néven Benesi-Hildebrandt, vagy Lineweaver-Burk formába:

$$\frac{K_a}{K'_a - K_a} = \frac{1}{(K_{11b} - K_{11a}) \cdot [CD]} + \frac{K_{11a}}{(K_{11b} - K_{11a})} \quad (14)$$

Itt K'_a jelöli a vegyület látszólagos pK_a -értékeit, amelyeket úgy mértünk, hogy különböző mennyiségű CD is jelen volt, K_{11a} most a vegyület neutrális formájához tartozó komplexstabilitási állandót, K_{11b} pedig a vegyület ionos formájához tartozó komplexstabilitási állandót jelöli.

Az egyenletekben a CD koncentrációja: $[CD] \approx CD_T$, ha teljesül az, hogy $CD_T \gg C_T$, azaz a CD-t jelentős feleslegben adjuk hozzá a komplexálandó vegyülethez.

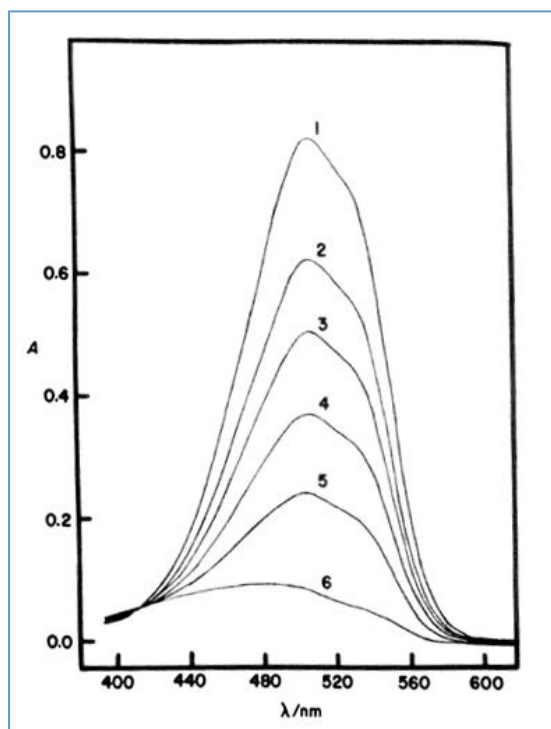
A kapott K_a és K'_a értékek segítségével tehát a Benesi-Hildebrandt egyenletből $y = \frac{K_a}{K'_a - K_a}$ tagot $x = \frac{1}{[CD]}$ függvényében ábrázolva a neutrális és ionos formákhoz tartozó komplexstabilitási állandók kiszámolhatók a mérési pontokra illesztett egyenes meredekségének és tengelymetszetének ismeretében. (Chirality 2004)

Ionos forma:
$$K_{11a} = \frac{y\text{-tengely metszet}}{\text{meredekség}} \quad (15)$$

Neutrális forma:
$$K_{11b} = \frac{1 + y\text{-tengely metszet}}{\text{meredekség}} \quad (16)$$

2.3.2. A komplexképzés vizsgálata UV-vis spektrumok alapján

A komplexképző hatás vizsgálatára a vegyületek UV-vis spektrumának a komplexálódás hatására bekövetkező változását is követhetjük egy egyszerű UV- 96-lyukú mérőlemez-olvasóval (reader), vagy az UV-pH titrátor által felvett UV-vis spektrumot felhasználva. Ebben az esetben megmérjük az oldat spektrumát CD jelenléte nélkül, majd fokozatosan emelve a hozzáadott CD mennyiségét is felvesszük a spektrumokat. Ezután a Lambert-Beer törvény szerint felírhatók a CD-t nem tartalmazó, illetve tartalmazó mintákra az egyes abszorbancia értékek, amelyek segítségével az abszorbancia-változás is felírható a komplexstabilitási állandót tartalmazó formában. 1:1 sztöchiometria esetén [15]:



8. ábra Metil-narancs és aCD spektruma [15]

$$A_0 = \varepsilon_D \cdot b \cdot D_T \quad (17)$$

$$A_D = \varepsilon_D \cdot b \cdot D_T + \varepsilon_{CD} \cdot b \cdot CD_T + \Delta\varepsilon_{11} \cdot b \cdot [D \cdot CD] \quad (18)$$

Itt D_T a vizsgált vegyület koncentrációját, CD_T a ciklodextrin koncentrációját, $\varepsilon_D, \varepsilon_{CD}$ a hozzájuk tartozó moláris abszorpciós koefficienseket jelölik λ hullámhosszon. $[D \cdot CD]$ az általuk képzett komplex koncentrációját jelöli, $\Delta\varepsilon_{11} = \varepsilon_{11} - \varepsilon_D - \varepsilon_{CD}$ a komplex és a vendég, illetve gazdamolekula moláris abszorpciós koefficiens különbségét jelöli, b pedig az optikai úthossz.

Ekkor, mivel $\varepsilon_{CD} \approx 0$, és $K_{11} \approx \frac{[D \cdot CD]}{[D] \cdot [CD]}$ felírható, hogy:

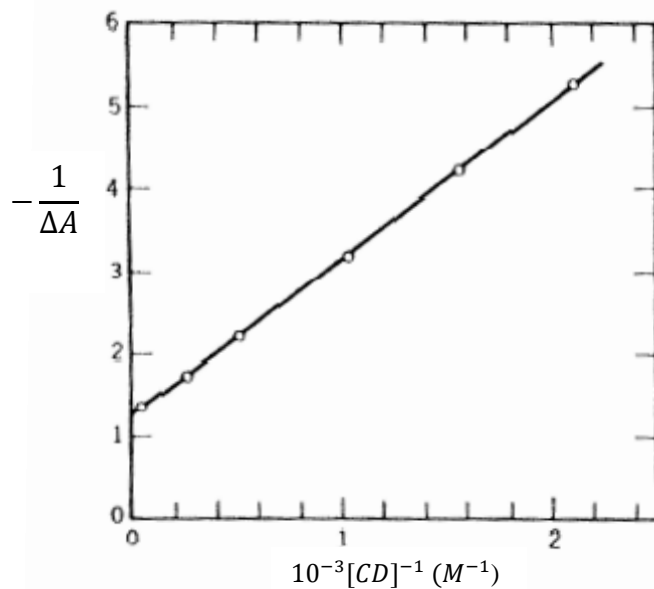
$$\Delta A = K_{11} \cdot \Delta\varepsilon_{11} \cdot [D] \cdot [CD] \quad (19)$$

Az egyenletet linearizálva jutunk a Benesi-Hildebrandt függvényhez:

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{D_T K_{11} \Delta\varepsilon_{11} [CD]} + \frac{1}{D_T \Delta\varepsilon_{11}} \quad (20)$$

A (20)-as egyenlet segítségével az abszorbanciák reciprokát a CD-koncentráció függvényében ábrázolva számolható a stabilitási állandó értéke.

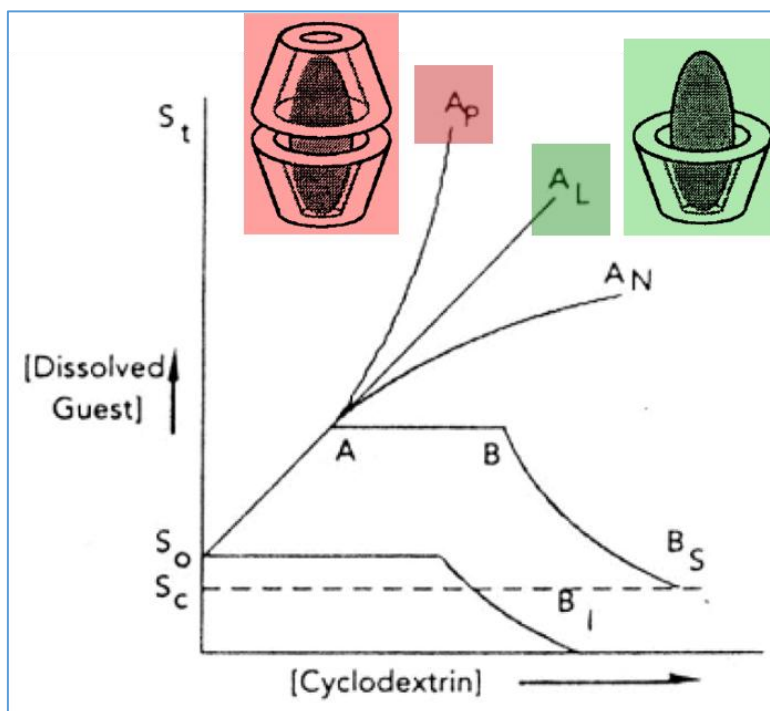
$$K_{11} = \frac{\text{y-tengely metszet}}{\text{meredekség}} \quad (21)$$



9. ábra A Benesi-Hildebrandt egyenlet linearizált formája grafikusán ábrázolva (Metil-narancs- aCD komplex spektruma alapján (8.ábra)) [15]

2.3.3. A komplexképzés vizsgálata oldhatóság alapján

Különböző mennyiségű CD-t az oldatba adagolva mérni tudjuk a vegyület oldhatóságának megváltozását, ami a CD mennyiség függvényében különböző alakú fázis-oldékonysági izotermákat ad [16].



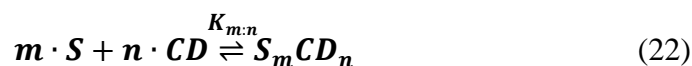
10. ábra Oldhatósági fázisdiagram típusok [17]

Az "A"-típusú izotermákat (10. ábra) abban az esetben kapjuk, ha a komplex jól oldódik, így csak oldott formában lesz jelen az oldatban. "AN"-típusú izotermát kapunk, ha a keletkező komplex a vendégmolekulával 1:1 arányú komplexet képez. Kellően kis hozzáadott CD mennyiség mellett kezdetben minden "A" típusú izoterma ilyen. Nagyobb mennyiségű CD hozzáadása után az izoterma megtarthatja linearitását, amely arra utal, hogy továbbra is csak 1:1 arányú komplexek képződnek, vagy lefelé, illetve felfelé eltérhet az egyenestől. "AP" esetben arra lehet következtetni, hogy a sztöchiometria úgy változik, hogy egy molekulát több CD is komplexál, tehát a komplexek sztöchiometriai aránya 1:2, 2:3, stb. változik. Ennél is bonyolultabb rendszerre utal az "AN"-típusú izoterma, amelyből arra lehet következtetni, hogy egy CD több vendégmolekulát is komplexál, a komplex sztöchiometriai aránya 1:1-ről 2:1-re változik.

Limitáltan oldódó komplex esetében "B"-típusú lesz az izoterma. (10. ábra) "BI"-típus esetén csak oldhatatlan komplex képződik, a többi ilyen esetben a vendégmolekula oldhatósága (S_T) először nőni kezd a vizes oldhatósági értékhez képest (S_0), majd egy

bizonyos ponton ("A" pont) a komplex oldhatósága eléri maximumát. Innen tovább növelve a rendszerben a CD mennyiséget a vendégmolekula oldhatósága nem nő tovább, hanem megindul a komplex kiválása az oldatból ("B_S"-típusú izoterma). Eközben az oldott vendégmolekula mennyisége állandó szinten marad a szilárd fázis folyamatos beoldódásának következtében. "B" pont elérése jelzi, hogy minden kezdetben szilárd molekula beoldódott, komplexálta a CD, az inentől kezdve hozzáadott CD mennyiség a vendégmolekula oldatból való eltűnését fogja jelenteni a komplex kicsapódása által, majd közeledni kezdünk a zárványkomplex inherens oldhatósági értékéhez (S_C).

Az oldhatósági izotermák alapján a komplex stabilitási állandója a két leggyakoribb "A_L", és "A_P" esetben a következő módon számolható ki a komplexképződés egyenletéből:



Ekkor
$$K_{m:n} = \frac{[S_m CD_n]}{[S]^m \cdot [CD]^n} \quad (23)$$

A szabad vegyület koncentrációja az oldatban $[S]$ mindig konstans, mivel a komplexálódó molekula „helyére” az szilárd fázisból mindig újabb molekula tud beoldódni, így egyszerűsítve ezzel az oldatban lévő kezdeti mennyiséggel helyettesíthető:

$$[S] = s_0 \quad (24)$$

A komplex koncentrációja az oldatban:

$$[S_m CD_n] = \frac{S_T - s_0}{m} \quad (25)$$

Itt S_T az oldott vegyület teljes koncentrációja, a komplexált és szabad molekulák összkoncentrációja.

A gazdamolekula koncentrációja a következő képpen írható fel:

$$[CD] = CD_T - n \cdot [S_m CD_n] \quad (26)$$

A (22)-(26) egyenletek alapján a teljes oldott vegyület koncentráció az 1:1 sztöchiometriájú esetben a következőképpen írható fel:

$$S_t = s_0 + \frac{K_{1:1}s_0CD_t}{1+K_{1:1}s_0} \quad (27)$$

Az így kapott egyenletet ábrázolva a metszéspont: s_0 , a meredekség pedig:

$$\text{slope} = \frac{K_{1:1}s_0}{1+K_{1:1}s_0} \quad (28)$$

Ezt átalakítva a komplexstabilitási állandó:

$$K_{1:1} = \frac{\text{slope}}{s_0 \cdot (1 - \text{slope})} \quad (29)$$

A másik, gyakoribb eset, amikor felfelé görbülő az illesztett polinom, ami arra utal, hogy egy molekulát több CD is komplexálni fog, két stabilitási állandóval kell számolnunk:

$$K_{1:1} = \frac{[S \cdot CD]}{[S] \cdot [CD]} \quad (30)$$

$$K_{1:2} = \frac{[S \cdot CD_2]}{[S \cdot CD] \cdot [CD]} \quad (31)$$

Ekkor a teljes oldott anyagmennyiség:

$$S_T = s_0 + [S \cdot CD] + [S \cdot CD_2] \quad (32)$$

A teljes oldott CD mennyiség pedig:

$$CD_T = [CD] + [S \cdot CD] + 2 \cdot [S \cdot CD_2] \quad (33)$$

A (29)-(33) egyenleteket kombinálva a következő összefüggést kapjuk:

$$S_T = \frac{CD_T[K_{1:1} \cdot s_0 + K_{1:1} \cdot K_{1:2} \cdot s_0 \cdot [CD]]}{1 + K_{1:1} \cdot s_0 + 2 \cdot K_{1:1} \cdot K_{1:2} \cdot s_0 \cdot [CD]} + s_0 \quad (34)$$

Az oldhatóságot a CD-koncentráció függvényében ábrázolva tehát egy olyan görbét kapunk, mely s_0 -nál metszi az y-tengelyt, meredeksége pedig a növekvő CD-koncentráció függvényében nő, ami a görbe egyenestől felfelé való elhajlását fogja okozni.

A (30)-(32) egyenleteket kombinálva egy egyszerűbb összefüggéshez jutunk:

$$S_T = s_0 + K_{1:1} \cdot s_0 \cdot [CD] + K_{1:1} \cdot K_{1:2} \cdot s_0 \cdot [CD]^2 \quad (35)$$

Ha teljesül az a feltétel, hogy még csak kis mértékű komplexálódás történt, akkor a $CD_T = [CD]$ egyszerűsítés mellett, az egyenlet linearizálható:

$$\frac{S_T - s_0}{CD_T} = K_{1:1} \cdot s_0 + K_{1:1} \cdot K_{1:2} \cdot s_0 \cdot CD_T \quad (36)$$

Az ily módon kapott egyenes meredekségének és metszéspontjának ismeretében a komplexstabilitási együtthatók számolhatók. Ez a közelítés azonban csak az "A_p" görbe első szakaszára ad reális értékeket, a további szakaszra akkor kapunk helyes eredményt, ha [CD] értékét a (32)-(33) egyenletekből fejezzük ki, azt feltételezve, hogy csak S · CD, vagy csak S · CD₂ van jelen az oldatban. A bonyolultabb, S · CD-t, S · CD₂-t vagy akár S · CD₃-at tartalmazó rendszerek esetében csak sokkal komplexebb egyenletek segítségével számolható a stabilitási állandó [16].

3. Célkitűzés

Kísérleteink során CD-ek komplexképzését vizsgáltuk különböző analitikai módszerek segítségével. Célul tűztük ki egy olyan automatizált módszer, illetve mérési kaszkád kialakítását, melynek segítségével a különböző gyógyszerjelölt vegyületek esetében ki lehet választani azt a ciklodextrin származékot, amellyel a legstabilabb komplexet képes létrehozni. Ezek mellett azt is meg kívántuk vizsgálni, hogy a komplexstabilitási állandók a különböző módszerek által meghatározva milyen összefüggésben állnak egymással.

4. Kísérleti rész

4.1. A vizsgált vegyületek, és az elvégzett vizsgálatok

A kísérletek elején a Szintézistámogató Laboratórium referencia vegyülettárából kiválasztottunk kb. 25 db vegyületet a BCS II., illetve BCS IV.-osztályokba sorolt vegyületek közül, illetve néhány jól mérhető próbavegyületet (Benzokain, Papaverin, Nitrazepám, Kodein, Szulfadimidin). Az anyagok, illetve a titrátor által használt KCl, K_2HPO_4 , és 0,5 M HCl, 0,5 M KOH-oldatok a Sigma Aldrich Kft.-től származtak. A felhasznált CD-ek a Cyclolab, Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Kft.-től származtak. Az NLB-puffer a Sirius-Analytical Kft.-től származott. A vegyületek oldásához használt DMSO a Merck Kft.-től származott. A pufferek, oldatok készítéshez a desztillált vizet a Millipore Milli-Q[®] víztisztító berendezésből nyertük.

Ezen kiválasztott vegyületekkel kezdtük meg vizsgálatainkat. Elsődleges szűrésnéként az UV-pH mérést használtuk, majd az ebből kapott eredmények alapján választottunk 3 mintavegyületet (Aszemizol, Klozapin, Diazepám), amelyekkel a komplexálódást különböző módon vizsgáló módszereket hasonlítottuk össze. Megvizsgáltuk az egyes CD-származékokkal történő komplexképzési hajlandóságot, UV-pH-titrálással a növekvő mennyiségű OHP β CD-el való komplexálódást vizsgáltunk, a pK_a -változások, illetve az UV-vis spektrum kiértékelésével, illetve fázisoldhatóság-mérés segítségével.

A mérések során használt CD-ek és néhány jellemző adatuk:

Ciklodextrin	Rövidítése	Molekulatömeg	Üregátmérő (Å)	Vizes oldhatóság (g/100 ml, 25°C)
α -CD	aCD	972	4,7-5,3	14,5
β -CD	bCD	1135	6,0-6,5	1,85
γ -CD	gCD	1297	7,5-8,3	23,2
2-Hidroxi-propil β -CD	OHP β CD	1408		>60
Random metil β -CD	RamebCD	1303		>50
szulfobutil-éter β -CD	SulBubCD	2179		>50
2-Hidroxi-propil γ -CD	OHP γ CD	1576		>50

11. ábra A mérésekhez használt CD-ek néhány jellemző adata [20]

A részletes vizsgálatokhoz azért az OHP β CD-t választottuk, mert a gyógyszeripari, illetve a klinikai gyakorlatban is ez az egyik leggyakrabban használt CD-származék a gyógyszermolekulák formulálásakor.

4.2. Használt módszerek, mintaelőkészítés

4.2.1. UV-pH titrálás

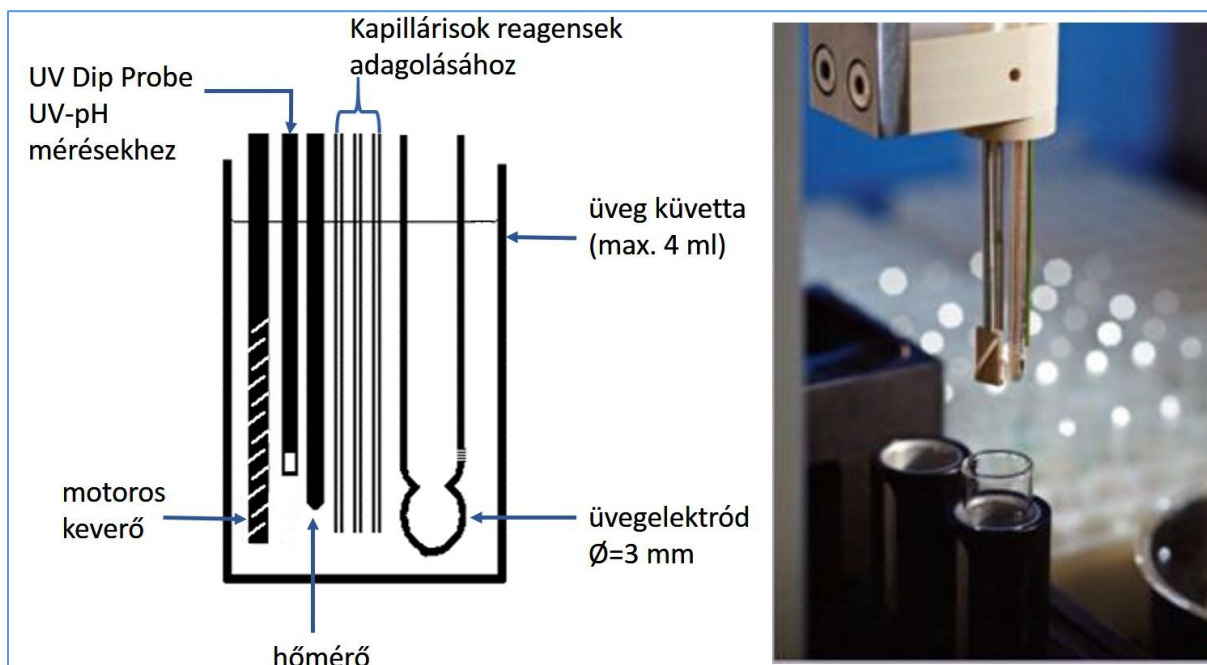
Az UV-pH mérések során a pK_a értékek komplexálódás hatására történő változásának vizsgálatok mérésünkhöz a Sirius Analytical Inc. cég SiriusT3™ készülékét használtuk, a készüléket normál (két küvetta) UV-pH, illetve a gyorsított UV-pH mérési módban (Fast UV-pH) alkalmaztuk.



12. ábra A mérésekhez használt SiriusT3™ UV-pH titrátor [18]

A Sirius T3 készülék gyorsított mérési módjában (Fast UV-pH) a sorozatok esetén a vizes közegben mérhető pK_a-értékek meghatározására a vizsgált anyagok 10 mM-os koncentrációjú DMSO-törzsoldataiból 5 μ l-t pipettáztunk a titráló küvettaiba, melyekhez 1,2 ml ISA-vizet (0,15 M KCl-oldat), illetve 25 μ l puffert (neutral linear buffer:NLB) adagol a készülék a titrálás megkezdése előtt. A NLB-puffer a teljes mérési pH-tartományon belül pontos mérési spektrumok felvételét segíti elő a pH stabilizálása által. A CD-es komplexképzés vizsgálatára a látszólagos pK_a-értékek meghatározásakor az 5 μ l 10 mM koncentrációjú mintákhoz 300 μ l 20 mg/ml koncentrációjú CD-oldatot adtunk, melyet a

készülék ISA-vízzel egészített ki 1,2 ml-re, majd 25 μ l puffert adagolt hozzá, így azonos kezdeti anyagkoncentrációval dolgoztunk, mint a hatóanyagok saját pK_a -értékeinek mérésekor. A méréseket β CD és OHPr β CD jelenlétében végeztük. Néhány előzetes próbamérés alapján azt tapasztaltuk, hogy a 300 μ l 20 mg/ml koncentrációjú CD-oldat mellett a komplexálódásnak köszönhetően a gyógyszervegyületek pK_a értékében már a mérés várható hibájánál ($SD_{pK_a} < 0.05$) szignifikánsan nagyobb változást tapasztalunk, ha komplexálódás történik, így ezzel a módszerrel szűrés jelleggel azonosíthatók a CD-ekkel komplexálódásra hajlamos anyagok. A pK_a -érték változást mutató anyagok közül kiválasztottuk az Astemizol, Klozapin, és Diazepám gyógyszereket, és ezekkel elvégeztük a gyorsított UV-pH méréseket mind a hét CD származék mellett is, 300 μ l 20 mg/ml koncentrációjú CD-oldatokkal.



13. ábra A SiriusT3TM berendezés titráló cellája [18]

Részletesebb, pontosabb eredményekhez juthatunk a készülék normál UV-pH mérési módját használva, amely minden anyaghoz külön-külön referencia spektrumot is felvesz (a gyors mérés csak a mérési sorozat elején egyet), illetve ez a módszer több időt hagy az egyes mérési pontokon a pH stabilizálódására. Ezzel a mérési módszerrel a három kiválasztott anyag vizsgálatát végeztük el OHPr β CD-el, különböző CD-koncentrációk mellett mérve: a titrálás kezdetén 50 μ l, 150 μ l, 300 μ l, illetve 600 μ l 20 mg/ml koncentrációjú CD-es ISA-vizet adagoltunk a referencia és a mérő küvettába is, majd azt egészítette ki a gép 1,2 ml-re. A mintabekészítés még annyiban különbözött a gyors UV-pH mérésektől, hogy ebben az

esetben a 25 µl puffer (itt most 25 mg K_2HPO_4 / 10 ml ISA-víz) előzetesen lett hozzáadva a rendszerhez.

4.2.2. UV-vis spektroszkópia

A komplexálódási folyamatokat az UV-vis spektrumok változásán keresztül két féle módon is próbáltuk követni, vizsgálatainkban a Thermo Electron Corporation Multiskan Spectrum plate(96-lyukú mérőlemez)-olvasó készülékével, illetve a Sirius Analytical Inc. cég SiriusT3™ készülékével készített mérésekből kinyert spektrumot is használtuk.

Az UV-vis plate-olvasóval történő vizsgálathoz CD-es puffereket készítettünk pH 1,5-12,0-es tartományban fél pH egység lépésközzel, a különböző pufferekből plate-ekre pipettáztunk, majd a pufferekhez adtuk a vizsgált anyagok DMSO-törzsoldatából. Ezután az UV-vis spektrumok kb. fél óra alatt mérőlemezenként 4-5 anyagra felvehető volt a kívánt pH tartományon, a megadott diszkrét pH-pontokban.

A SiriusT3™ titrátorhoz kapcsolt UV-vis spektrofotométer egység segítségével pH 2,0-12,0-es tartományon, a szükséges spektrum anyagoként fél óra alatt (az előzetes szűrésre használt gyorsított módszer esetén csak 10 perc alatt) vehető fel.

Mivel a pufferek elkészítése rendkívül időigényes volt, illetve pH stabilitásuk nem minden esetben volt megfelelő (a plate-ekre átpipettázva a lyukak nagy fajlagos felülete miatt főleg a bázikus pH-jú puffereket nem lehetett védeni a gyors karbonátosodástól), illetve a mintaelőkészítés is jóval lassabb volt. Emiatt a próbamérések után úgy döntöttünk, hogy az automata titrátorral végezzük a további méréseket, és az onnan exportált UV-spektrumokkal dolgoztunk. Az ily módon kapott adatoknál az UV-vis spektrum felvételével egy időben a gép az oldat pH-értékét is megmérte, így sokkal pontosabb pH-értéket kaptunk, amely kb. 0,1 egység hibával reprodukálható volt.

4.2.3. Oldhatóság mérése

Az oldhatóság mérések során a három kiválasztott vegyület esetében a molekula neutrális formájának oldhatóságát vizsgáltuk, az Asztemizol ($pK_{a1}=5,81$; $pK_{a2}=8,51$) és a Klozapin ($pK_{a1}=3,99$; $pK_{a2}=7,66$) esetében pH 7,4-es, és pH 11,0-ás pufferekben, a Diazepám ($pK_a=3,41$) esetén pH 7,4-es pH-es pufferben. A vizsgálathoz 96-lyukú mérőlemezen a két pufferben 100 µM koncentrációjú oldatokat készítettünk 10 mM-os DMSO törzsoldatból,

majd 4 órán keresztül, szobahőmérsékleten rázattuk (300 rpm). Ezután az oldatokat leszűrtük, majd 160 µl szűrlethez 40 µl ACN-t adtunk az anyag oldatban tartásának segítésére, és HPLC-DAD technika segítségével vizsgáltuk a beoldódott anyag mennyiségét. A mérés kiértékelését az előzetesen 0,5 µM, 5 µM és 100 µM koncentrációjú oldatokból HPLC-vel felvett kalibrációs sor segítségével végeztük. A vizsgálatokat elvégeztük növekvő koncentrációkban OHPrbCD-t tartalmazó pufferekben is (100 µM, 500 µM, 5 mM, 10 mM).

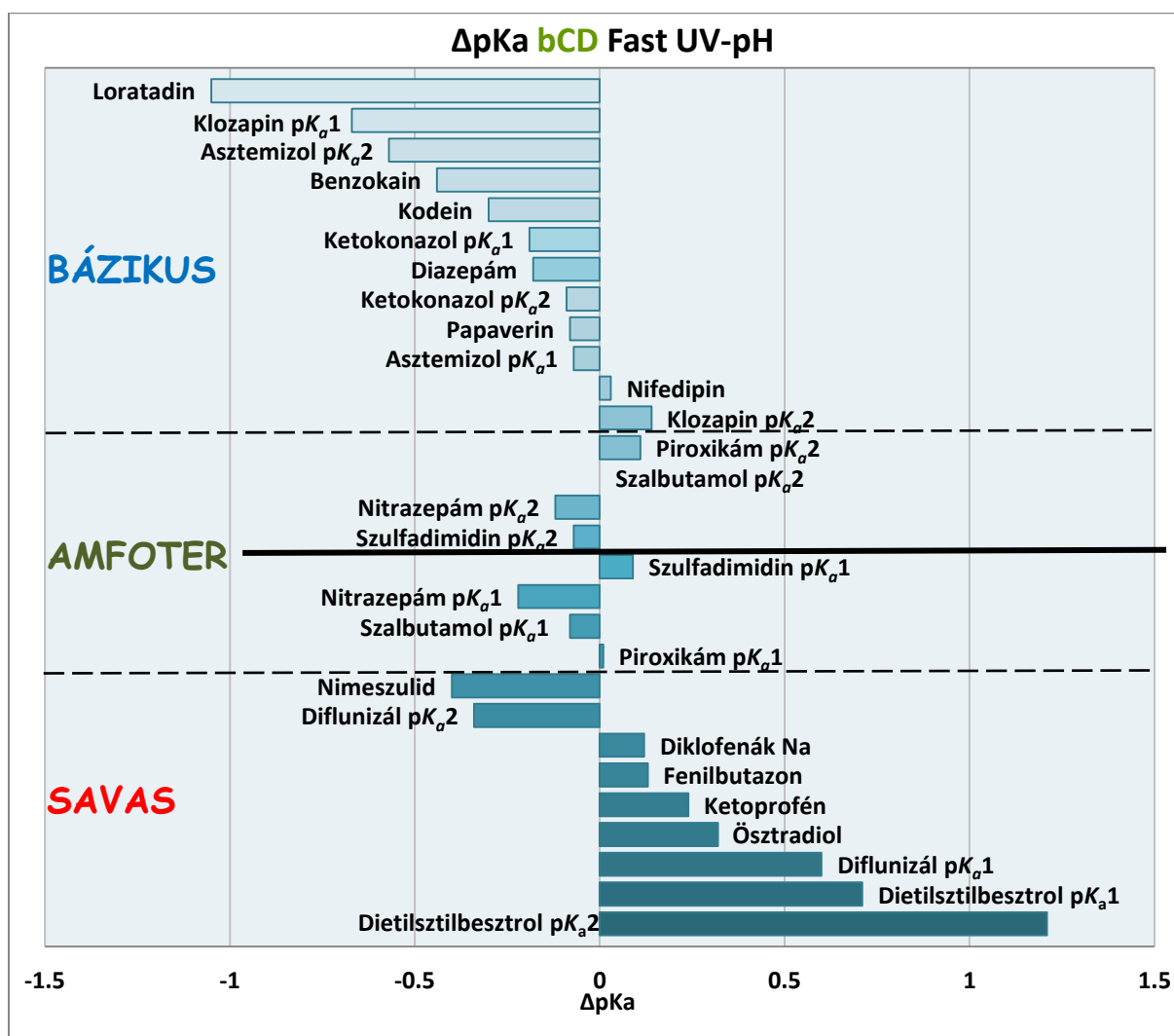
4.3. Eredmények

4.4. A CD-el való komplexképzés szűrések eredményei

Anyag neve	vizes pK_a		300 µl bCD	ΔpK_a	300 µl OHPrbCD	ΔpK_a
	Fast UV	két küvettás UV-pH				
Glíbenklamid	-	5,38	-	-	5,33	-0,05
Flufenaminsav	-	3,93	-	-	4,10	0,17
Dietilsztilbesztról pK_{a2}	10,31	10,32	11,52	1,21	10,57	0,26
Dietilsztilbesztról pK_{a1}	9,57	9,60	10,28	0,71	9,78	0,21
Diflunizál pK_{a1}	2,58	-	3,18	0,60	3,17	0,59
Ösztradiol	10,33	-	10,65	0,32	10,32	-0,01
Ketoprofén	4,00	4,00	4,24	0,24	4,31	0,31
Fenilbutazon	4,33	-	4,46	0,13	4,48	0,15
Diklofenák Na	3,97	-	4,09	0,12	4,17	0,20
Nimeszulid	6,49	6,47	6,09	-0,40	6,14	-0,35
Piroxikám pK_{a1}	5,31	-	5,32	0,01	5,33	0,02
Diflunizál pK_{a2}	12,85	-	12,51	-0,34	12,96	0,11
Szalbutamol pK_{a1}	10,15	-	10,07	-0,08	10,24	0,09
Nitrazepám pK_{a1}	10,51	-	10,29	-0,22	10,43	-0,08
Szulfadimidin pK_{a1}	7,51	7,49	7,60	0,09	7,58	0,07
Szulfadimidin pK_{a2}	2,31	2,46	2,24	-0,07	2,28	-0,03
Nitrazepam pK_{a2}	2,94	3,08	2,82	-0,12	2,83	-0,11
Szalbutamol pK_{a2}	9,08	-	9,08	0,00	9,14	0,06
Piroxikám pK_{a2}	1,88	-	1,99	0,11	1,93	0,05
Klozapin pK_{a2}	7,66	-	7,80	0,14	7,68	0,02
Nifedipin	2,33	2,33	2,34	0,01	2,36	0,03
Asztemizol pK_{a1}	-	5,81	5,75	-0,06	5,76	-0,05
Papaverin	6,47	6,42	6,39	-0,08	6,47	0,00
Ketokonazol pK_{a2}	6,18	-	6,09	-0,09	6,05	-0,13
Diazepám	3,41	-	3,23	-0,18	3,26	-0,15
Ketokonazol pK_{a1}	3,28	-	3,09	-0,19	3,15	-0,13
Kodein	8,24	-	7,94	-0,30	8,23	-0,01
Benzokain	2,54	-	2,10	-0,44	2,13	-0,41
Asztemizole pK_{a2}	-	8,53	7,97	-0,56	8,08	-0,45
Klozapin pK_{a1}	3,99	-	3,32	-0,67	3,45	-0,54
Loratadin	5,26	-	4,21	-1,05	4,14	-1,12
Dipiridamol	6,20	-	-	-	6,13	-0,07

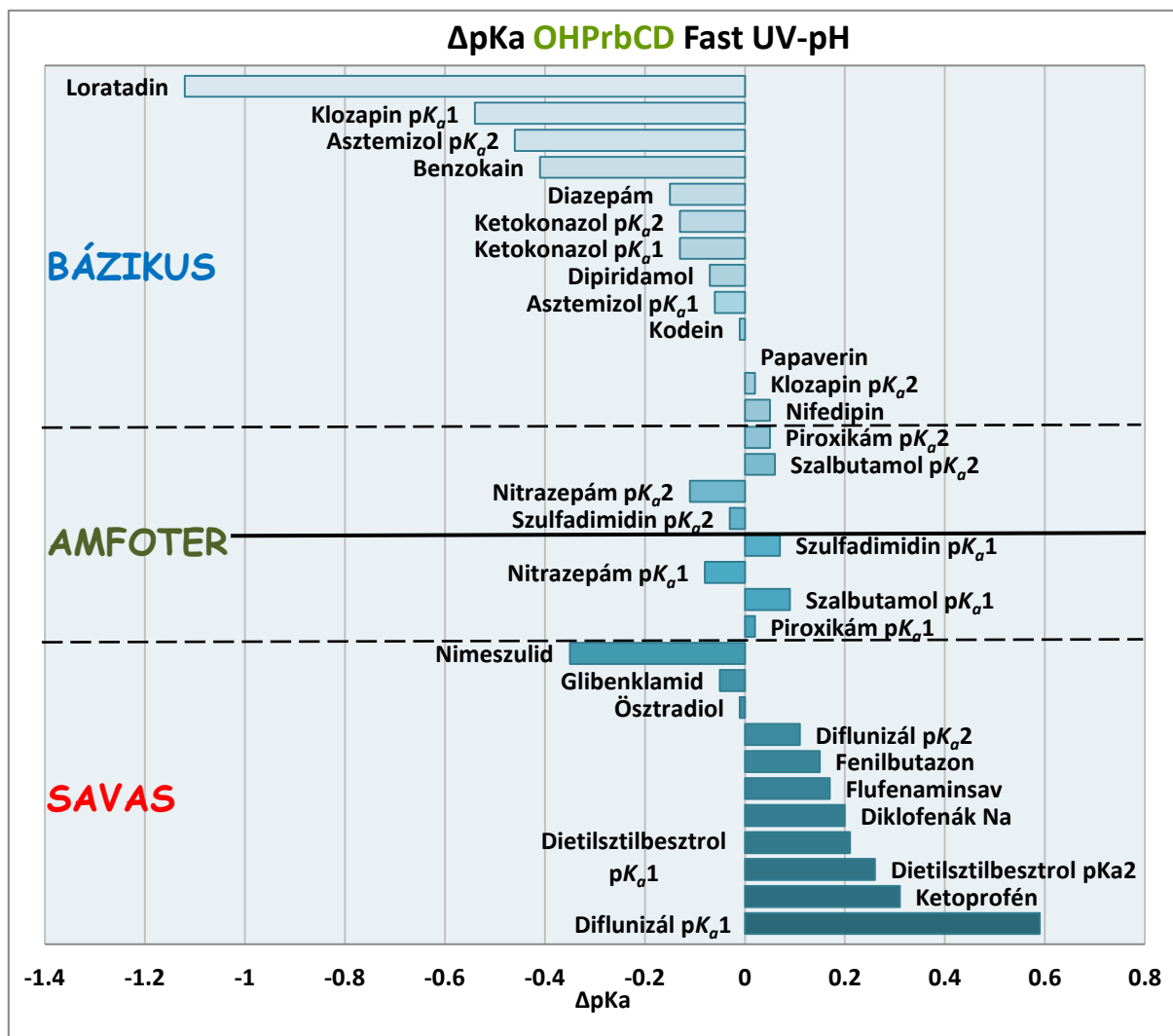
14. ábra pK_a -változások összefoglaló táblázata

Az eredmények alapján látható, hogy a vegyületek többségénél jelentős pK_a -változás tapasztalható, amit a CD-ekkel képzett komplexek kialakulásával azonosítottunk, így elkülöníthetők azok a vegyületek, melyeknél esély van az oldhatóság növelésére az adott CD alkalmazásával. Minél nagyobb a változás annál, nagyobb stabilitású komplex jelenléte feltételezhető. Több pK_a -értékkel rendelkező anyagok esetében az is megfigyelhető, hogy az egyes pK_a -értékeket eltérő mértékben változtatta meg a CD jelenléte, ez alapján arra is lehet következtetni, hogy a CD-el kialakuló komplex a vendégmolekula mely szerkezeti részét érinti. Az eredmények kiértékeléskor a 0,1-nél nagyobb pK_a -változást mutató anyagokat ítéltük a CD-el ténylegesen zárvány-komplexet képzőnek, mivel a titrator várható mérési hibánál ez az eltérés már szignifikánsan nagyobb. Néhány helyen vizes közegben oldhatósági problémák miatt csak a két küvettás méréssel volt meghatározható a valódi pK_a , így a kiértékelésnél az ezzel a módszerrel kapott értékeket használtuk (Asztemizol, Flufenaminsav, Glibenklamid).



15. ábra pK_a -változás bCD mellett

Az eredményeket diagramon ábrázolva az is megfigyelhető, hogy a vegyületek bázikus, illetve savak jellegének megfelelően néhány kivételtől eltekintve a CD a látszólagos pK_a -t a bázisok esetében csökkentik, míg savak esetében növelik. Ez megegyezik a várt hatással, hogy a komplexképződés a vegyület proton-disszociációját visszaszorítja, így annak savas/bázikus jellege is csökken. A trendtől eltérő esetekben feltételezhető, hogy a CD komplexképző hatásán kívül más ok, pl. szterikus gátlás is fellép a disszociábilis protont tartalmazó csoporttal, így ennek hatása jelenik meg az eredményben. Az irodalom is megemlíti néhány hasonló esetet. [21]



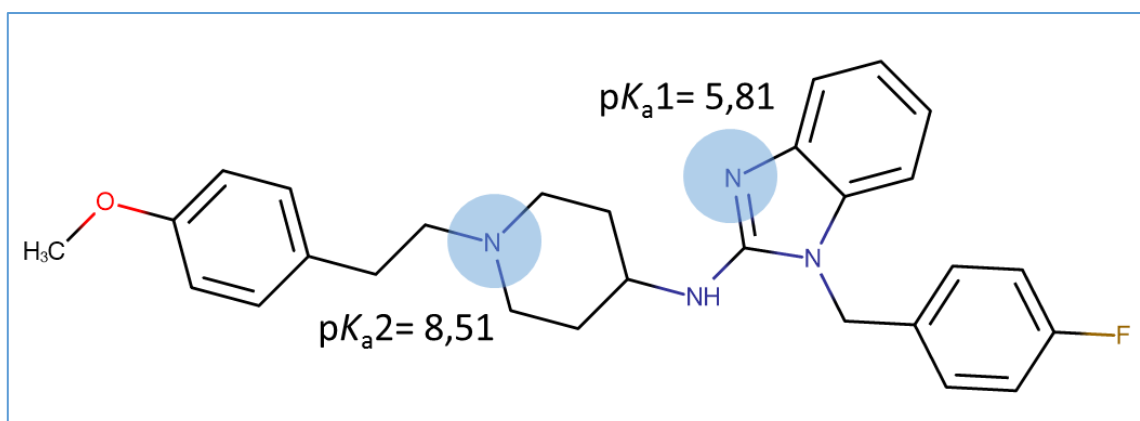
16. ábra pK_a -változás OHPbCD mellett

4.4.1. Különböző CD-származékok mellett mért eredmények

Asztemizol	pK_{a1}	SD	ΔpK_a	pK_{a2}	SD	ΔpK_a
vizes	5,81	0,02	-	8,53	0,04	-
aCD	5,8	0,01	-0,01	8,35	0,05	-0,18
bCD	5,66	0,02	-0,15	7,87	0,02	-0,66
gCD	5,77	0,02	-0,04	8,24	0,10	-0,29
OHPrbCD	5,63	0,00	-0,18	7,89	0,01	-0,64
OHPrgCD	5,76	0,01	-0,05	8,36	0,03	-0,17
RamebCD	5,52	0,00	-0,29	7,86	0,01	-0,67
SulBubCD	5,91	0,01	0,1	8,36	0,01	-0,17

17. ábra Asztemizol pK_a -változása különböző CD-ek mellett

Az Asztemizol (18. ábra) esetében látható, hogy a különböző CD-származékok mindegyike főleg a pK_{a2} eltolódását fogja okozni, míg a pK_{a1} csak kisebb mértékben változik, így feltételezhető, hogy a molekula parametoxifenil-etilpiperidin része, amelyen a pK_{a2} -értékhez tartozó nitrogén található a CD-ek belső üregében helyezkedik el a komplexálódás során, míg a benzimidazol-gyűrűt tartalmazó rész kívül marad.



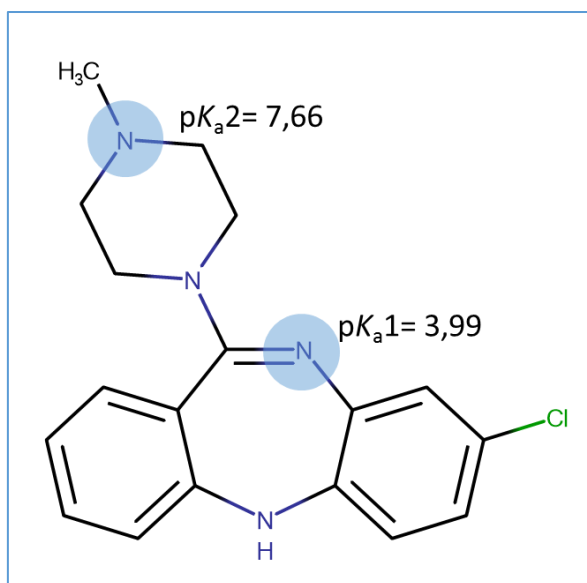
18. ábra Az Asztemizol molekula képlete

A legnagyobb hatást a bCD, OHPrbCD, illetve a RamebCD okozta, így formuláláskor ezek közül érdemes választani a vegyület mellé, ezekkel valószínűsíthető jó stabilitású komplex kialakítása. A SulBubCD esetében megfigyelhető még, hogy a pK_{a1} a várt trenddel ellentétesen mozdult el, ez valószínűleg a benzimidazol-gyűrű és a szulfobutil-éterlánc közti sztérikus gátlásra vezethető vissza, mint az irodalmi példák hasonló eseteiben. [21]

Klozapin						
	pK_{a1}	SD	ΔpK_a	pK_{a2}	SD	ΔpK_a
vizes	4,01	0,026	-	7,65	0,035	-
aCD	3,51	0,046	-0,5	7,81	0,027	0,16
bCD	3,36	0,060	-0,65	7,81	0,016	0,16
gCD	3,94	0,025	-0,07	7,67	0,015	0,02
OHPrbCD	3,54	0,061	-0,47	7,66	0,009	0,01
OHPrbCD	3,96	0,019	-0,05	7,63	0,015	-0,02
RamebCD	3,24	0,062	-0,77	7,69	0,023	0,04
SulBubCD	3,24	0,047	-0,77	7,99	0,037	0,34

19. ábra Klozapin pK_a -értékeinek változása különböző CD-ek mellett

A Klozapin (20. ábra) esetében is megfigyelhető, hogy a két pK_a -érték közül a komplexálódás csak az egyikre (pK_{a1}) van jelentős hatással és a második eltolódása – ahol van egyáltalán – ismét a várt iránnyal ellentétes. Ez alapján feltételezhető, hogy a CD-ek üregébe a dibenzodiazepin triciklus fog kerülni. Az is megfigyelhető, hogy a gCD és származéka egyáltalán nem komplexálja a molekulát a mérési eredmények alapján.



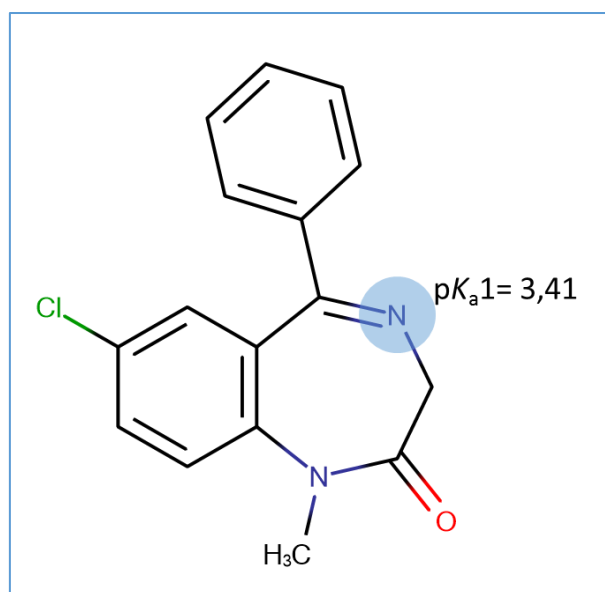
20. ábra A Klozapin molekula képlete

Ebben az esetben a formulálást valamelyik bCD-származékkal érdemes végezni, az apolárisan módosított láncú CD-eknél (RamebCD, SulBubCD) valószínűsíthetjük a legerősebb komplexek kialakulását, amely feltételezhetően a CD-ek apoláros metil, illetve butil láncai és a vegyület dibenzodiazepin része között létrejövő kölcsönhatásából ered.

Diazepám	pK_{a1}	SD	ΔpK_a
vizes	3,41	0,017	-
aCD	3,4	0,020	-0,01
bCD	3,27	0,036	-0,14
gCD	3,36	0,025	-0,05
OHPrbCD	3,28	0,048	-0,13
OHPrgCD	3,39	0,019	-0,02
RamebCD	nem mérhető		-
SulBubCD	3,21	0,051	-0,2

21. ábra Diazepám pK_a -értékének változása különböző CD-ek mellett

A Diazepám esetében tapasztaltuk a legkisebb változásokat, az aCD, gCD és származékaival egyáltalán nem látható komplexálódásra utaló jel, a bCD, illetve származékai kis változást mutattak. Ez az eredmény igen érdekes, ha összehasonlítjuk a Klozapinnál kapott eredménnyel: a hasonló szerkezeti körbe tartozó két vegyület komplexképzési hajlandósága teljesen különböző. A legjobb eredményeket a SulBubCD jelenlétében adta, amelyet itt is az apoláris CD-oldalláncok és a benzolgyűrűk kölcsönhatásával lehet indokolni.



22. ábra A Diazepám molekula képlete

4.4.2. Komplexstabilitási állandó számolása a pK_a -változásokból

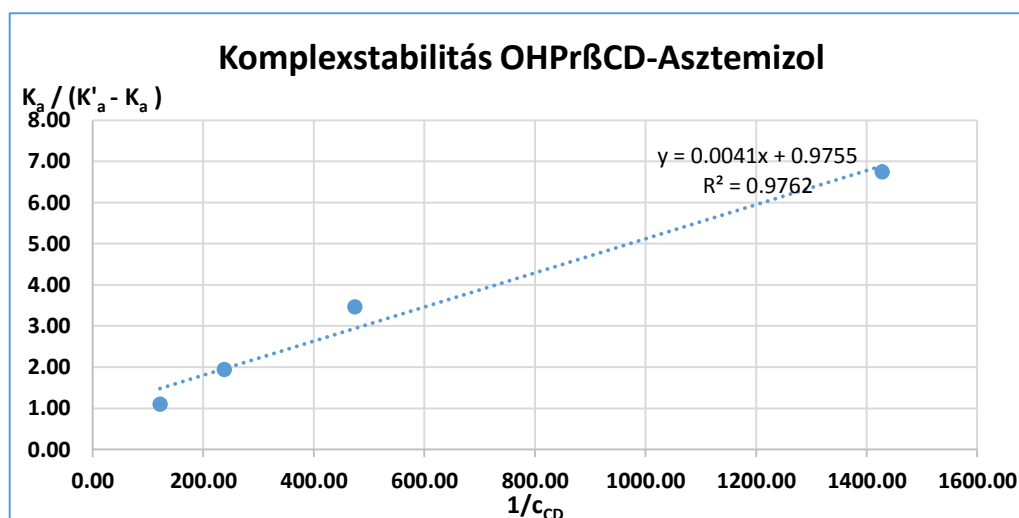
A növekvő OHPrbCD-koncentrációk mellett kapott látszólagos pK_a -értékek alapján a (14)-(16) egyenletek segítségével kiszámolhatók a neutrális, illetve ionos, továbbá egyszeresen és kétszeresen protonált formákra a komplexstabilitási együtthatók az egyes mintavegyületekhez.

Asztemizol

A pK_{a1} érték megváltozását vizsgálva a vegyület egyszeresen protonált, illetve kétszeresen protonált formájának stabilitási együtthatói vizsgálhatók, a neutrális forma elhanyagolható, mivel ezen a pH tartományon nincs jelen.

Asztemizol pK_{a1}	vizes	5,81	0,04			
V (μ L) 20 mg/ml CD oldat	c CD (mM)	pK_{a1}	SD	ΔpK_a	$1/c_{CD}(M^{-1})$	$K_a / (K'_a - K_a)$
600	8,22	5,53	0,00	-0,28	121,59	1,10
300	4,21	5,63	0,01	-0,18	237,69	1,95
150	2,11	5,70	0,01	-0,11	473,85	3,47
50	0,70	5,75	0,02	-0,06	1427,63	6,75
meredekség		0,0041		K_{11a}	1	
metszéspont		0,9755		K_{11b}	477	

23. ábra Asztemizol komplexstabilitási együtthatói a pK_{a1} -érték változásából



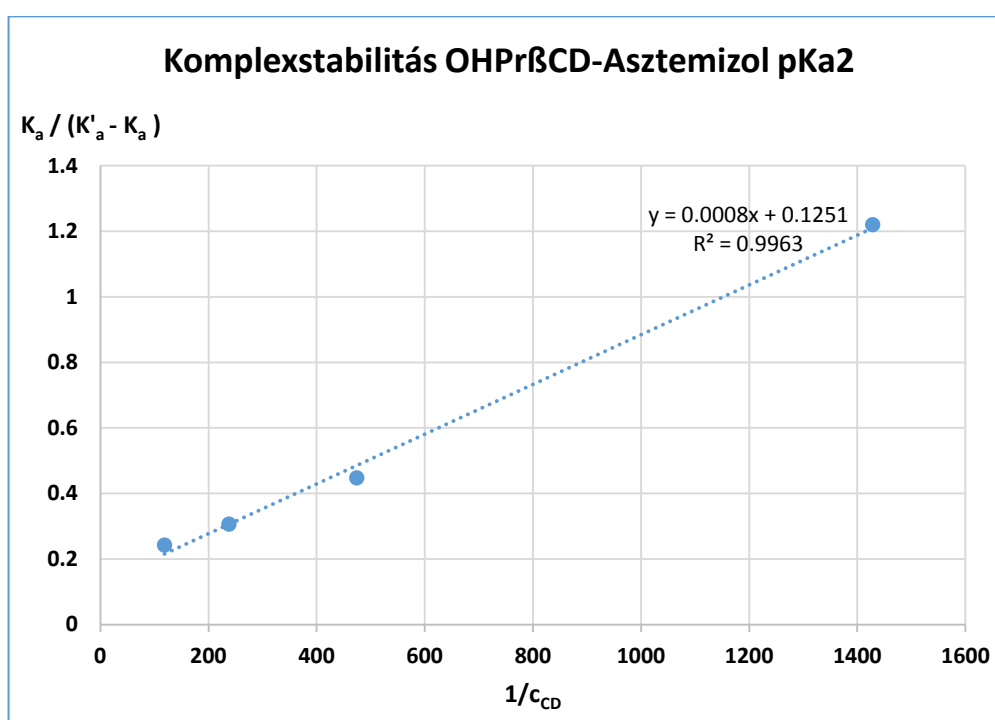
24. ábra Asztemizol komplexstabilitása a pK_{a1} -érték változásából

A pontokra jó közelítéssel egyenes illeszthető, melynek paramétereiből a stabilitási állandó kiszámolható. A kapott eredmény alapján elmondható, hogy az egyszeresen protonált formához tartozó K_{11b} érték nagyságrendekkel nagyobb, mint az egyszeresen ionos forma K_{11a} állandója, a kevesebb töltéssel rendelkező molekulát a CD jobban komplexálja.

A pK_{a2} érték változásaiból számolva a vegyület neutrális és egyszeresen protonált, ionos formájának stabilitása hasonlítható össze, ebben a tartományban a kétszeresen protonált forma jelenléte csekély.

Asztemizol pK_{a2}	vizes	8,53	0,04			
V (μ L) 20 mg/ml CD oldat	c CD (mM)	pKa	SD	ΔpK_a	$1/c_{CD}(M^{-1})$	$K_a/(K'_a - K_a)$
600	8,42	7,80	0,02	-0,73	118,55	0,24
300	7,00	7,89	0,02	-0,64	237,84	0,31
150	5,59	8,04	0,03	-0,49	474,17	0,45
50	4,20	8,27	0,03	-0,26	1428,56	1,22
meredekség		0,0008		K11a	0	
metszéspont		0,1251		K11b	1482	

25. ábra Asztemizol komplexstabilitási együtthatói a pK_{a2} -érték változásából



26. ábra Asztemizol komplexstabilitása a pK_{a2} -érték változásából

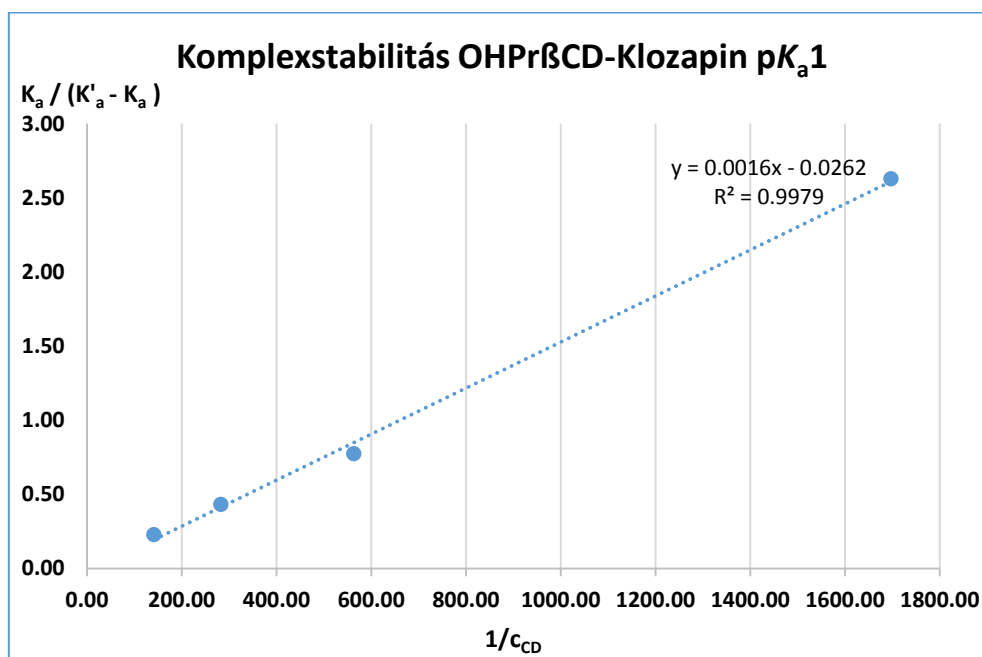
Ebben az esetben a két stabilitási együttható az ionos, illetve a neutrális formához tartozik. Látható, hogy a két forma közül a neutrális formához tartozó érték nagy, míg az ionoshoz tartozó nulla. Ez egyezik azzal a megfigyeléssel, hogy a CD apoláris belső gyűrűje a vegyületek neutrális formájával szeret inkább komplexet képezni, mintsem a töltéssel rendelkező ionos formával.

Klozapin

A Klozapin esetében ezzel a módszerrel csak a dibenzodiazepin szerkezeti részhez tartozó pK_{a1} érték megváltozását tudtuk vizsgálni, mivel a másik pK_a -érték a komplexálódás hatására nem változott, így nem lett volna mire egyenest illeszteni. Ebben az esetben tehát a vegyület egyszeresen protonált, illetve kétszeresen protonált formájának stabilitási együtthatói hasonlíthatók össze.

Klozapin pK_{a1}	vizes	3,96	0,01			
V (μ L) 20 mg/ml CD oldat	c CD (mM)	pK_{a1}	SD	ΔpK_a	$1/cCD(M^{-1})$	$K_a / (K'_a - K_a)$
600	7,09	3,23	0,05	-0,73	141,09	0,23
300	3,54	3,44	0,05	-0,52	282,48	0,43
150	1,78	3,60	0,04	-0,36	563,10	0,77
50	0,59	3,82	0,02	-0,14	1697,14	2,63
meredekség		0,0016		K_{11a}	0	
metszéspont		-0,0262		K_{11b}	627	

27. ábra Klozapin komplexstabilitási együtthatói a pK_{a1} -érték változásából



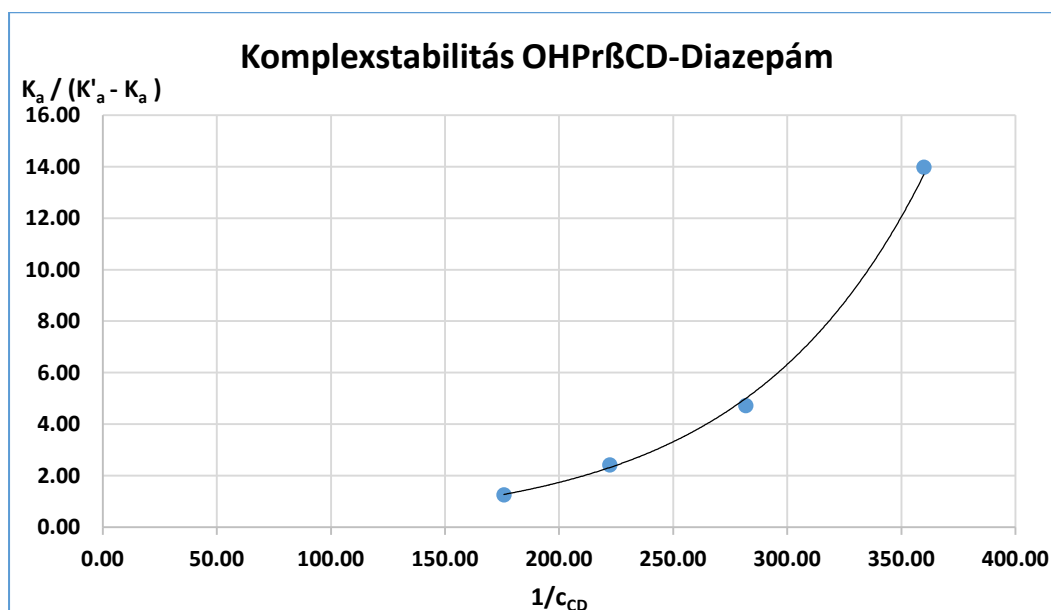
28. ábra Klozapin komplexstabilitása a pK_{a1} -érték változásából

Az eredmény ebben az esetben is azt tükrözi, hogy a CD a vegyület egyszeresen protonált formájával stabilabb komplex képzésére képes, mint a kétszeresen protonált formával.

Diazepám

Diazepám pK_a1	vizes	3,42	0,01			
$V (\mu\text{L})$ 20 mg/ml CD oldat	$c_{CD} (\text{mM})$	pK_a	SD	ΔpK_a	$1/c_{CD} (\text{M}^{-1})$	$K_a / (K'_a - K_a)$
600	5,69	3,17	0,04	-0,25	175,85	1,26
300	4,50	3,27	0,03	-0,15	222,22	2,42
150	3,55	3,34	0,03	-0,08	281,84	4,73
50	2,78	3,39	0,01	-0,03	359,90	13,98

29. ábra Diazepám pK_a -változása OHPrbCD mellett

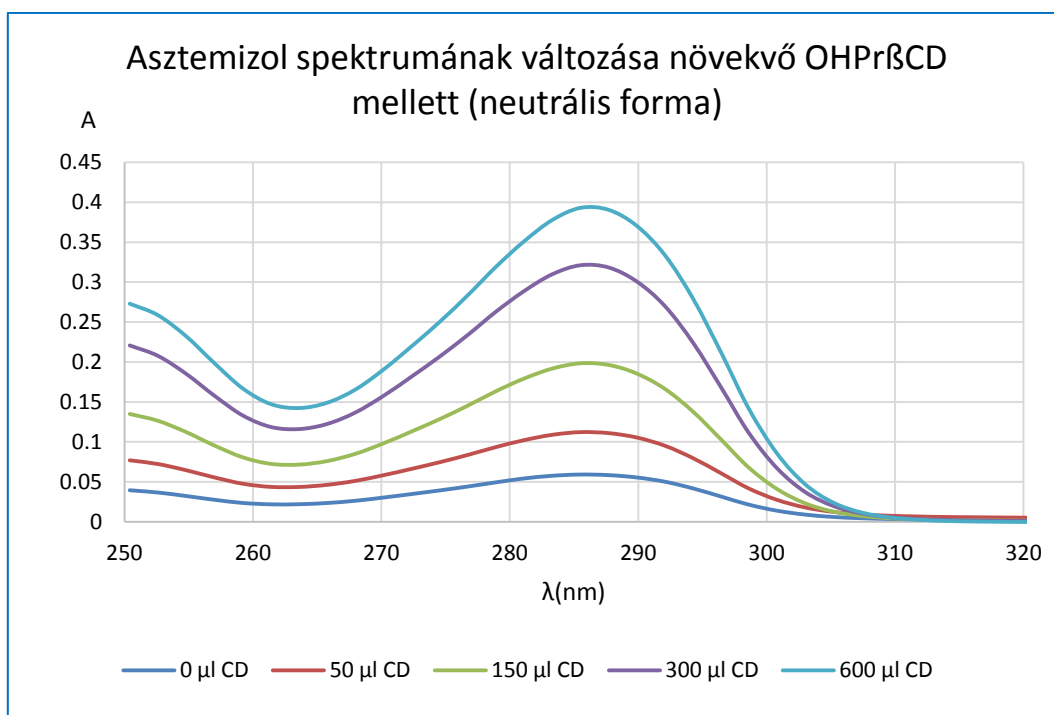


30. ábra Diazepám komplexstabilitási diagramja

A Diazepám esetében az eddigiektől eltérően nem tudunk komplexstabilitási együtthatót számolni módszerünkkel. A pK_a -változások alapján a (14)-es egyenlet szerint ábrázolva az adatok nem lineáris képet mutatnak, exponenciális jellegű görbét kaptunk. Ez arra utalhat, hogy a CD a vegyülettel nem 1:1 arányú komplexet képez. Az ilyen esetekben az egyensúly bonyolultabb, kiértékeléséhez komplexebb egyenletek megoldását igényli, az eredmények feldolgozása még folyamatban van.

4.4.3. UV-vis spektroszkópia mérések eredményei

Asztemizol



31. ábra Asztemizol neutrális formájának UV-spektruma pH=10,0

Az Asztemizol pH=10,0-ás puffer oldatban és a feletti pH-n szinte teljesen neutrális formában található az oldatban. A növekvő mennyiségű OHPβCD adagolása mellett a kis mértékű abszorbancia-változásokat a 31. ábra mutatja. Az adatokból a (20)-(21) egyenletek szerint kiszámolható a CD-Asztemizol komplex stabilitási állandója:

V_{CD}	$c_{CD}(mM)$	$1/c_{CD}(M^{-1})$	$1/\Delta A$	ΔA	$A(285nm)$
0	0.00	-	-	0.000	0.059
50	0.57	1747.63	18.79	0.053	0.112
150	1.72	582.09	7.17	0.139	0.198
300	3.43	291.26	3.82	0.262	0.321
600	6.87	145.48	2.99	0.334	0.393
meredekség			0.0100		
metszet			1.2614		
$K_{1:1}$			126		

32. ábra Az Asztemizol neutrális formájának stabilitási állandója

Az állandó a pK_a -változások alapján kapott értékkel összehasonlítva az ezzel a módszerrel számolt érték egy nagyságrenddel eltér, ami rámutat, hogy a két módszer által

hordozott információ, illetve ezek az adott komplexálódási folyamatra vonatkozó érzékenysége nem feltétlenül azonos.

Ez utóbbi módszer használata ellen szól, hogy más pH-értékeken az adatok nem mutatták az abszorbancia-függést, így ez a módszer gyakorlati okokra visszavezethetően is csak korlátozottan használható. Ugyanez volt megfigyelhető a Klozapin és a Diazepám esetében is, csak a mérési hibából adódó abszorbancia-különbségeket tapasztaltunk. Ezekre néhány példa a függelékben található (41-47. ábra). Az eltérő pH-n mért spektrumokat egymásra fektetve látható, hogy az abszorbanciának pH-függése van (ld. Függelék 48-50. ábra), amely magyarázattal szolgáltat a tapasztaltakra: a CD ezt a pH-függést befolyásolja, így az ebből kapott a látszólagos pK_a -értékekkel a komplexálódás akkor is nyomon követhető, amikor az abszorbancia nem függ a CD mennyiségtől.

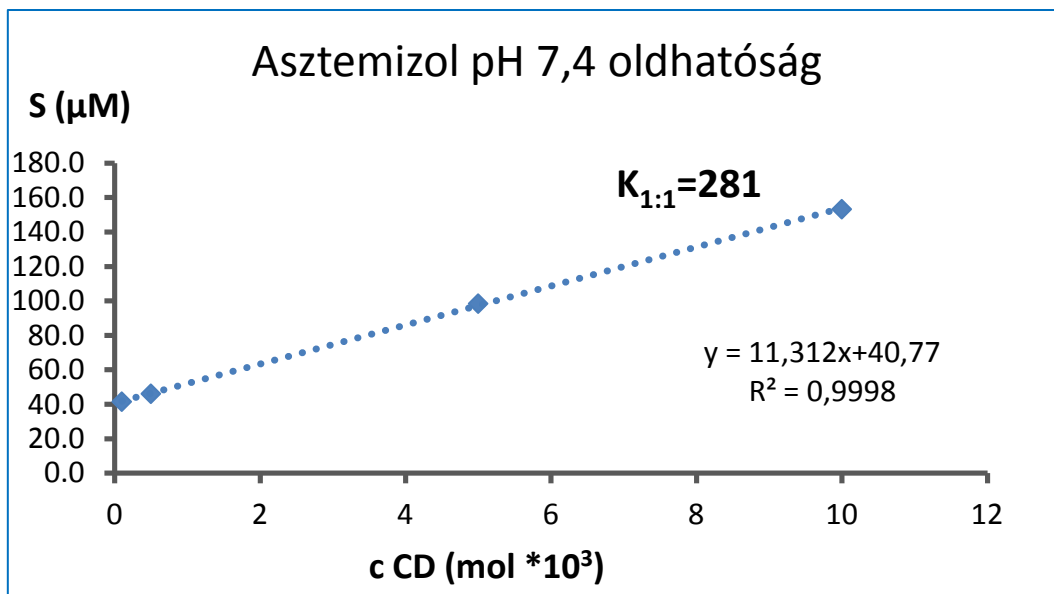
4.5. Az oldhatósági vizsgálatok eredményei

Az oldhatósági mérések során a növekvő koncentrációban OHPrbCD-t tartalmazó pufferekben való oldhatósági eredményekből a (27)-(29) egyenleteket felhasználva számoltuk ki a komplexstabilitási állandókat.

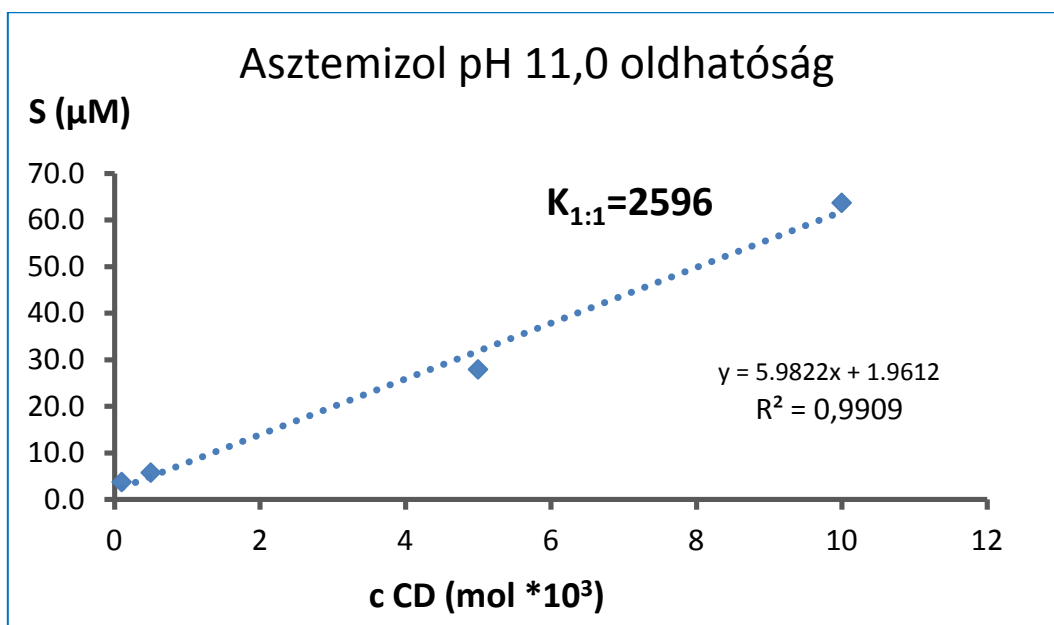
Asztemizol

	OHPrbCD	c_{CD} (mM)	S(μ M)
Protonált forma (pH 7.4)	vizes	0	60.0
	100 μ M	0.1	41.6
	500 μ M	0.5	46.2
	5 mM	5	98.5
	10 mM	10	153.3
Neutrális forma (pH 11)	vizes	0	1.6
	100 μ M	0.1	3.8
	500 μ M	0.5	5.8
	5 mM	5	27.9
	10 mM	10	63.7
Stabilitási állandók			
	Protonált forma		Neutrális forma
Metszet	4.08E-05		1.96E-06
Meredekség	0.0113		0.0051
K 1:1	281	K 1:1	2596

33. ábra Asztemizol: oldhatósági eredmények



34. ábra Asztemizol oldhatósága pH 7,4-es



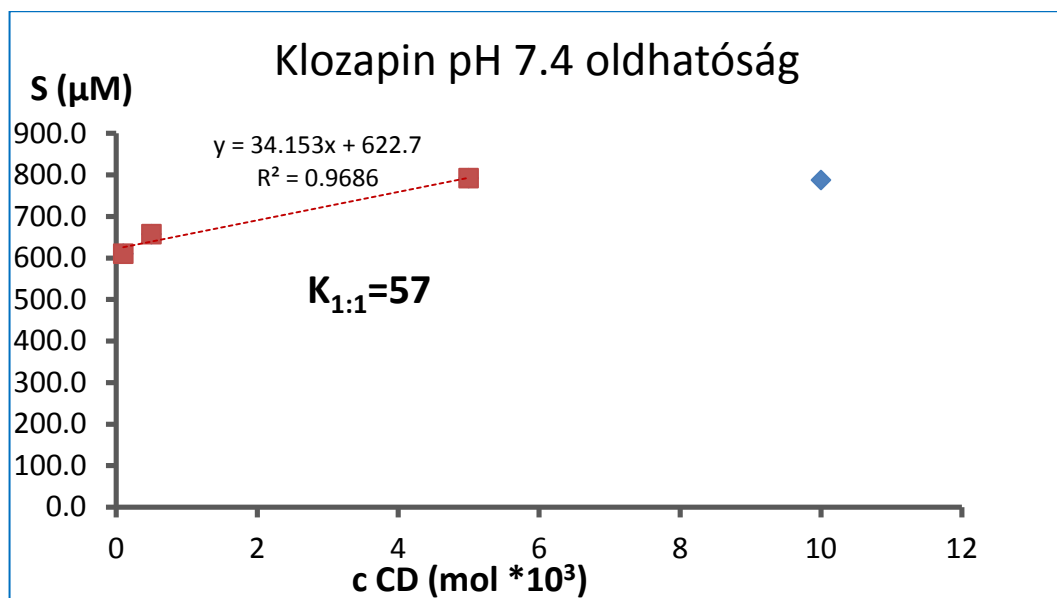
35. ábra Asztemizol oldhatósága pH 11,0-án

Az eredményekből látható, hogy a protonált forma esetében sokkal kisebb a stabilitási állandó értéke, mint a neutrális forma esetében, ez megint azt bizonyítja, hogy a CD a neutrális formájú molekulát preferálja a komplexképzés során. A stabilitási állandókra kapott értékek nagyságrendileg megegyeznek a UV-pH titrálásból számolt értékekkel.

Klozapin

	OHP r bCD	c _{CD} (mM)	S(μM)
Protonált forma (pH 7.4)	vizes	0	677,5
	100 uM	0,1	610,1
	500 uM	0,5	657,2
	5 mM	5	792,0
	10 mM	10	787,5
Neutrális forma (pH 11)	vizes	0	371,7
	100 uM	0,1	385,1
	500 uM	0,5	404,3
	5 mM	5	757,9
	10 mM	10	790,4
Stabilitási állandók			
Protonált forma		Neutrális forma	
Metszet	0,0006	Metszet	0,0004
Meredekség	0,0342	Meredekség	0,0771
K 1:1	57	K 1:1	225

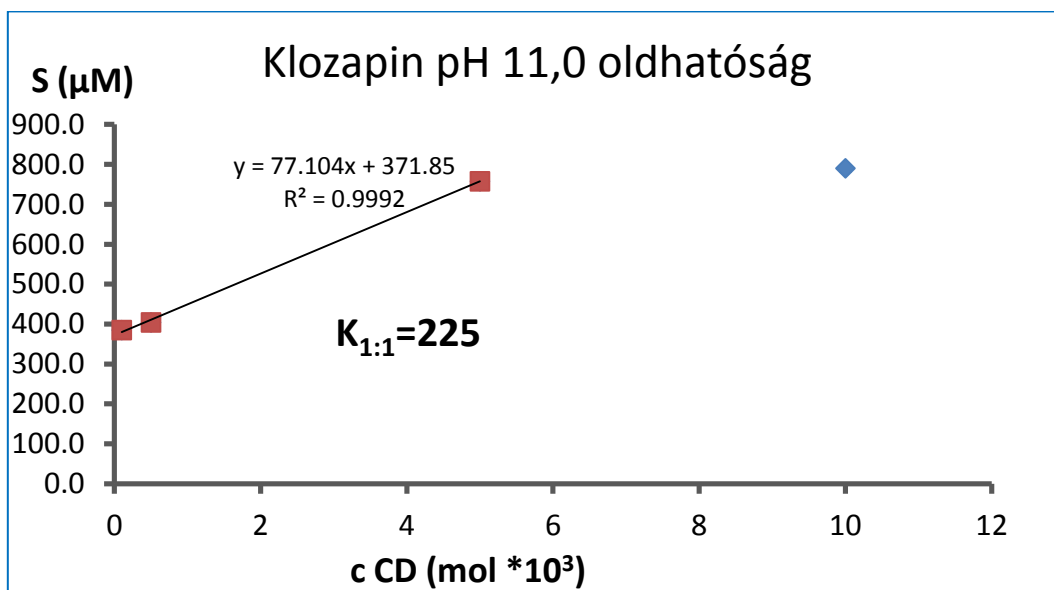
36. ábra Klozapin: oldhatósági eredmények



37. ábra Klozapin oldhatósága pH 7,4-en

A Klozapin esetében látható, hogy a legnagyobb CD koncentrációhoz tartozó pont nem esik rá az első három pontra illeszthető egyenesre. A diagram alapján valószínűsíthető, hogy a Klozapin a 2.3.3. fejezetben ismertetett B_S-típusú fázis-oldékonysági izotermával

rendelkezik, így csak az első A_L -típusú izotermával egybeeső tartományon lévő pontokból adható meg komplexstabilitási együttható.



38. ábra Klozapin oldhatósága pH 11,0-án

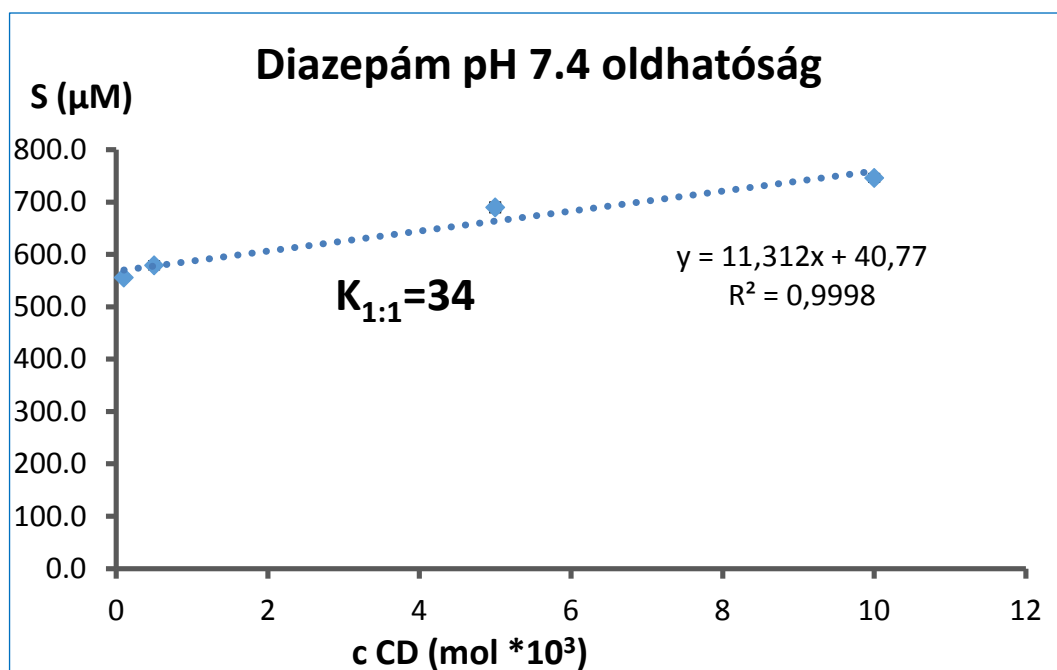
A stabilitási állandók alapján látható, hogy itt is a neutrális forma a kedvezményezett a komplexálódás szempontjából. A protonált formához tartozó eredmény eltér az UV-pH titrálás során kapott eredménytől, de mivel ott pK_a -változás hiányába nem tudtuk megvizsgálni a neutrális formát, nehéz lenne további következtetéseket tenni. Ez a példa azt is jól tükrözi, hogy nem lehet egyetlen olyan univerzális módszert találni a komplexképzés vizsgálatára, amellyel bármely anyag esetében bizonyosan el tudjuk dönteni, hogy történt-e komplexálódás. Érdemes tehát a módszereket egymás mellett használni, és a különböző módszerekkel kapott eredményekből együtt levonni a konklúziót.

Diazepám

	OHP r bCD	c _{CD} (mM)	S(μM)
Neutrális forma (pH 7.4)	vizes	0	689,1
	100 μM	0,1	555,9
	500 μM	0,5	579,2
	5 mM	5	689,9
	10 mM	10	746,2
Stabilitási állandó			
Protonált forma			
	Metszet	0,000568413	
	Meredekség	0,019072303	
	K 1:1	34	

39. ábra Diazepám oldhatósági eredmények

A Diazepám esetében a neutrális formára vonatkozó oldhatósági méréseket végeztük el, az ebből számolt stabilitási állandó meglehetősen kicsinek adódott. A protonált forma vizsgálatát épp ezért már el sem végeztük, hiszen az eddigiek ismeretében nagyobb relevanciával rendelkező neutrális forma ilyen kis értéke mellett számottevő adat nem lett volna várható. A neutrális forma esetében kapott adat egybevágg azzal az eredménnyel, hogy a három mintavegyület közül a Diazepám esetében volt a legkisebb a pK_a -változás növekvő CD-koncentráció hatására, itt várjuk a leggyengébb komplex képződését, és ezáltal az oldhatóság is itt javul a legkisebb mértékben.



40. ábra Diazepám oldhatósága pH 7,4-en

5. Összefoglalás

Tudományos diákköri kutatómunkám során gyógyszervegyületek ciklodextrinekkel képzett komplexképzését vizsgáltuk, olyan automatizál analitikai módszerekkel, melyek a vegyületek fizikai-kémiai sajátosságainak megváltozását követték nyomon.

Elmondhatjuk, hogy UV-pH titrálást használva sikerült egy olyan gyorsított szűrési módszert létrehozni, mely segítségével megállapítható, hogy az egyes ciklodextrin-származékok közül melyek lesznek azok, amelyekkel a vegyület komplexképzési hajlandóságot mutat. Az így kiválasztott vegyületekkel további analitikai módszerek segítségével a ciklodextrin és vendégmolekula között kialakuló zárványkomplex stabilitásának vizsgálatát is elvégeztük.

Ezen vizsgálatok eredményei megerősítettek bennünket abban a CD-eknél leírt általános megfigyelésben, hogy az ionizálható gyógyszervegyületekkel végbemenő komplexálódás során az egyes CD származékok elsősorban a vendégmolekulák neutrális formáját preferálják, míg az adott fiziológiás körülmények között egyszeres, vagy többszörös (pK_a érték(ek) alapján meghatározott) ionos állapotban jelenlévő vegyületekkel kisebb stabilitású komplexek kialakítása valószínűsíthető. Megfigyeltük továbbá azt is, hogy az egymástól független módszerekkel kapott stabilitási állandók értékében akár nagyságrendnyi különbségek is adódhatnak, amelyből az következik, hogy a módszerek nem feltétlenül azonos fizikai-kémiai, kölcsönhatásbeli információt hordoznak. Az eredmények alapján azt is láthattuk, hogy a komplexstabilitás részletes vizsgálatakor nem találunk egy univerzális módszert, amely minden esetben alkalmazható. A módszerek csak egymást kiegészítve adnak átfogó képet a komplexképzési folyamatokról, némely esetekben pedig egyes módszerek elméleti okokból sem használhatók.

Az itt kapott eredmények ösztönzésül szolgálnak arra, hogy a munkánkban bemutatott vegyületkörből további gyógyszerek komplexálódási folyamatait is részletesen vizsgáljuk az egyes CD származékokkal. Terveink között szerepel továbbá egy új, a komplexstabilitási állandó meghatározására eddig nem használt módszer, a permeabilitás mérésén alapuló PAMPA módszer kiterjesztése CD – hatóanyag komplexálódás leírására.

6. Irodalomjegyzék

- [1] **N. Rouge**, "Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 136., pp. 117-139., 1996.
- [2] <http://www.acidaid.info/ph-balance.html>.
- [3] **Gordon L. Amidon**, "A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo bioavailability," vol. 12, 1995.
- [4] „Prodrugs: design and clinical applications,” *Nature*, %1. kötet 7, pp. 255-270, 2008.
- [5] **Thorsteinn Loftsson**, "Role of Cyclodextrins in Improving Oral Drug Delivery," vol. 2, 2004.
- [6] **A. Biwer**, "Enzymatic production of cyclodextrins," vol. 59, 2002.
- [7] **Lajos Szente**, "Cyclodextrins in Analytical Chemistry: Host-Guest Type Molecular Recognition," vol. 85, 2013.
- [8] **Lajos Szente**, "Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development," vol. 36, 1999.
- [9] CycloLab, "Approved Pharmaceutical Products Containing Cyclodextrins," vol. 27, 2013.
- [10] **Zhi Chen**, "High-Throughput Phase-Distribution Method to Determine Drug-Cyclodextrin Binding Constants," vol. 98, 2009.
- [11] **A. Avdeef**, "Absorption and Drug Development," Wiley-Interscience, 2003.
- [12] http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Acids_and_Bases/Buffers/Henderson-Hasselbalch_Approximation.
- [13] **Vidal Salgado**, „Spectrophotometric Determination of the pKa, Isosbestic Point and Equation of Absorbance vs. pH for a Universal pH Indicator,” *American Journal of Analytical Chemistry*, kötet 5, pp. 1290-1301., 2014.
- [14] **Kenneth A. Connors**, "Effect of cycloamylases on Apparent Dissociation Constants of Carboxylic Acids and Phenols: Equilibrium Analytical Selectivity Induced by Complex Formation," vol. 65, no. 3, 1976.
- [15] **Kenneth A. Connors**, *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley-Interscience, 1987.
- [16] **Kenneth A. Connors**, T. Higuchi, „Phase-Solubility Techniques,” *Advances in*

Analytical Chemistry and Instrumentation, John Wiley & Sons, INC, 1965.

[17] <http://www.kfki.hu/~cheminfo/hun/eloado/cd/ciklo1.html>.

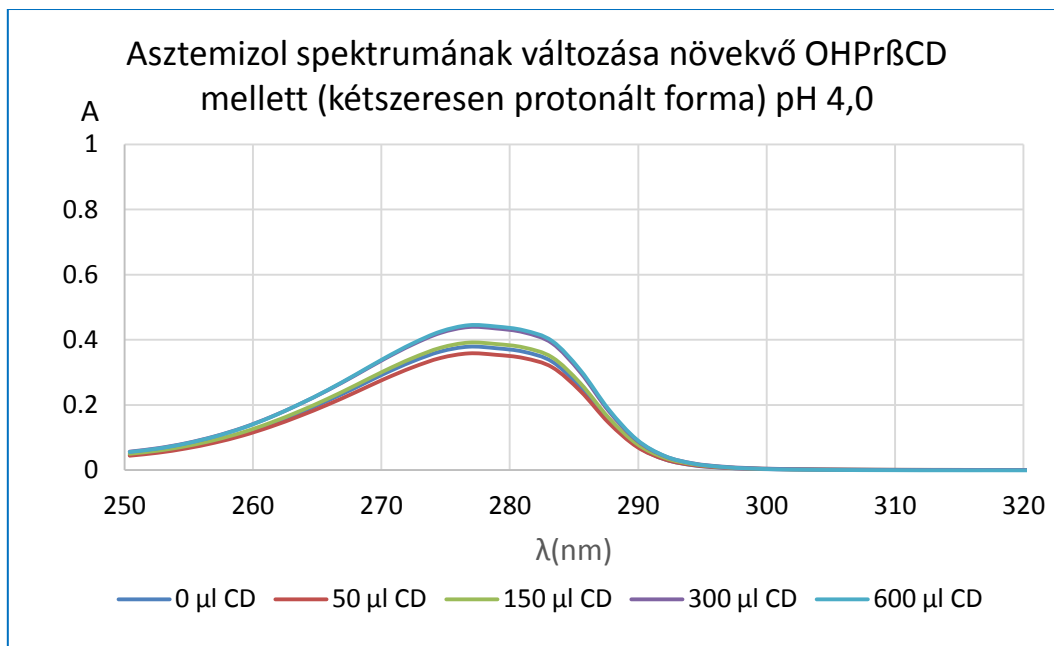
[18] <http://www.sirius-analytical.com/>.

[19] <http://www.chemagine.co.uk/resources/pka.htm>.

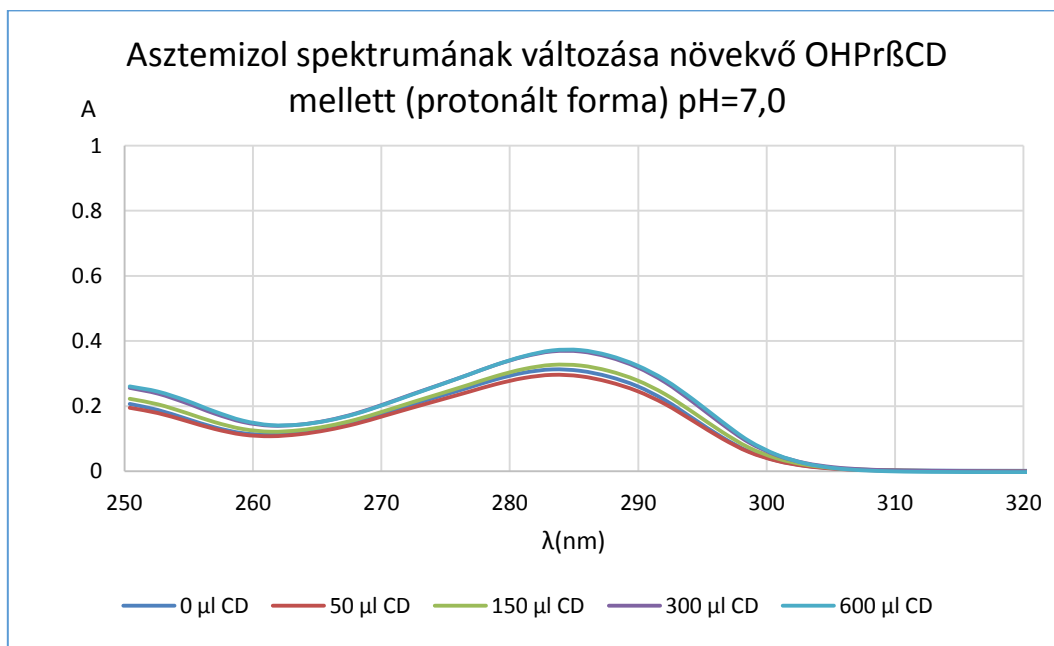
[20] **T. Loftsson, M. E. Brewster**, *Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996

[21] **A. A. Dahab, D. El-Hag**, *Rapid analysis of NSAIDs binding to β -cyclodextrin using the simultaneous measurement of absorption and circular dichroism with a novel multi-cell low-volume device*, Anal Bioanal Chem, 2012

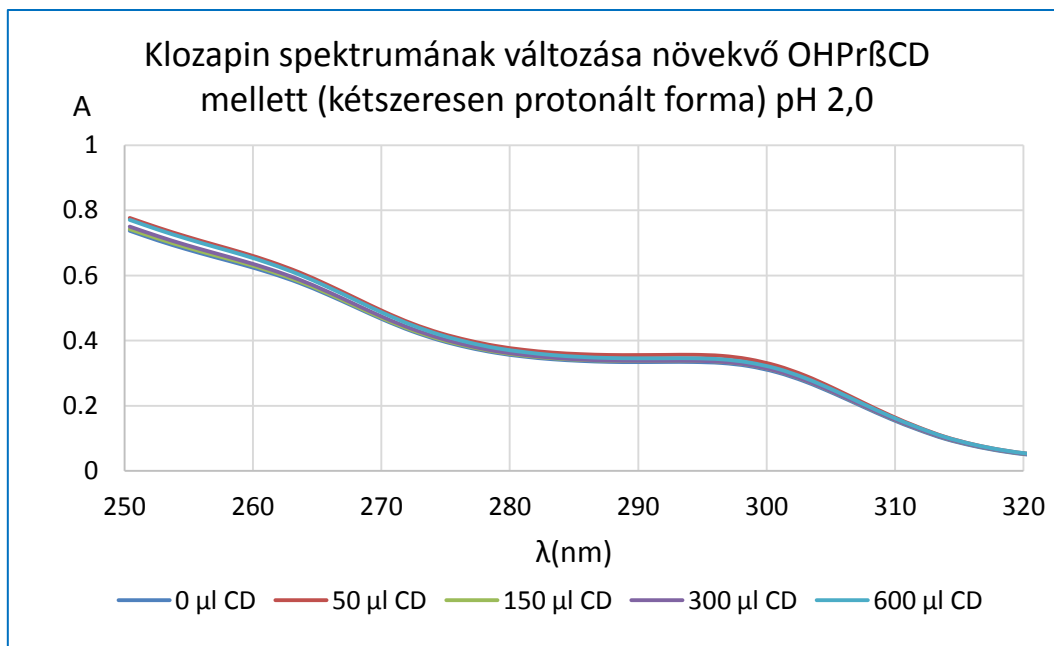
7. Függelék



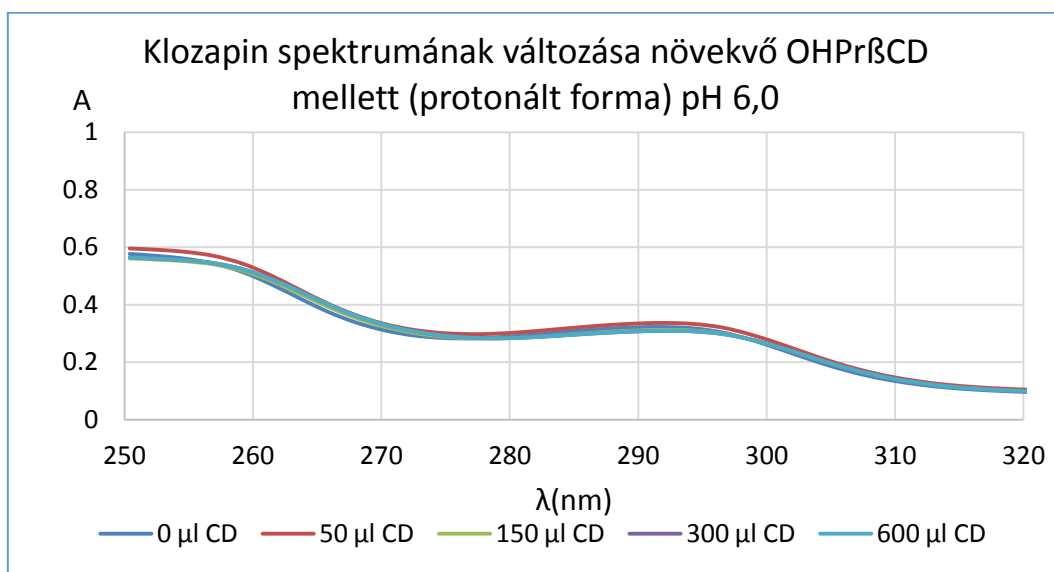
41. ábra Asztemizol: kétszeresen protonált forma abszorbancia-változása



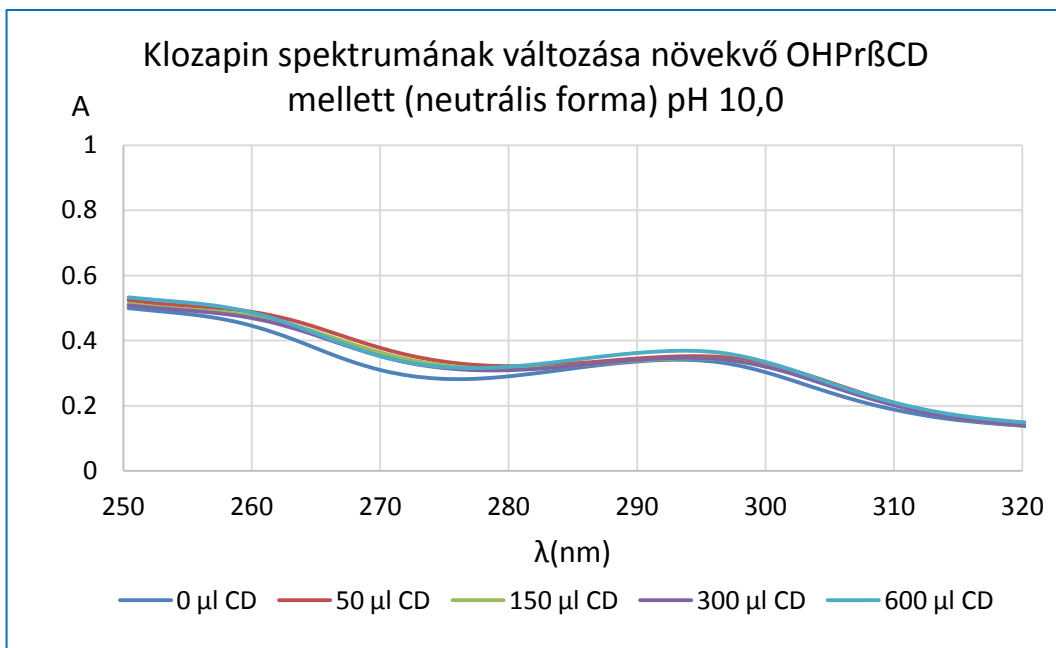
42. ábra Asztemizol: protonált forma abszorbancia-változása



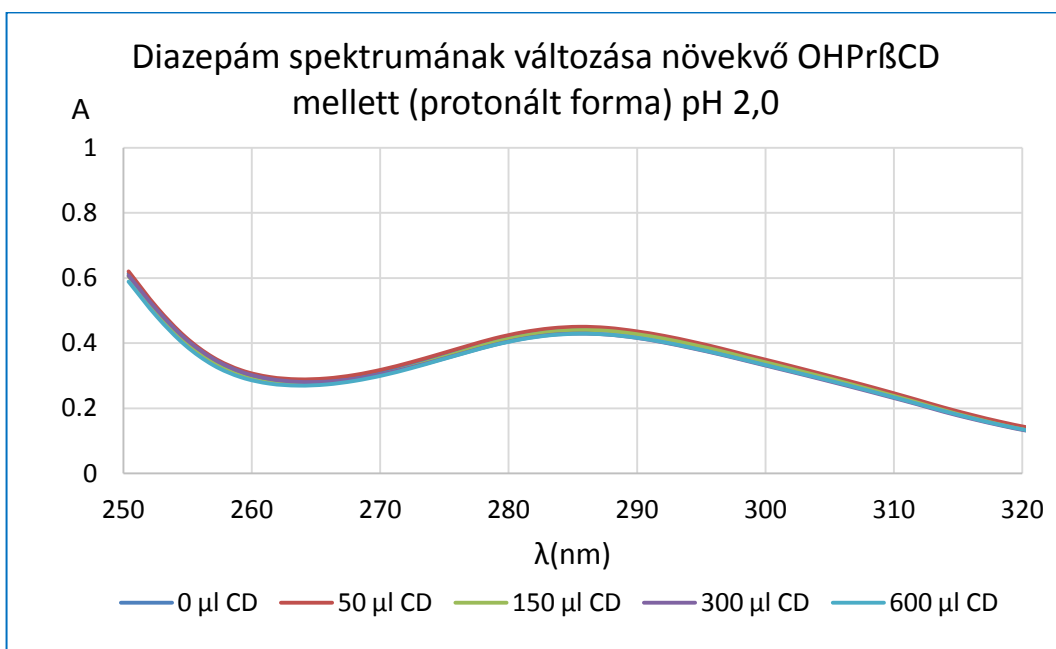
43. ábra Klozapin: kétszeresen protonált forma abszorbancia-változása



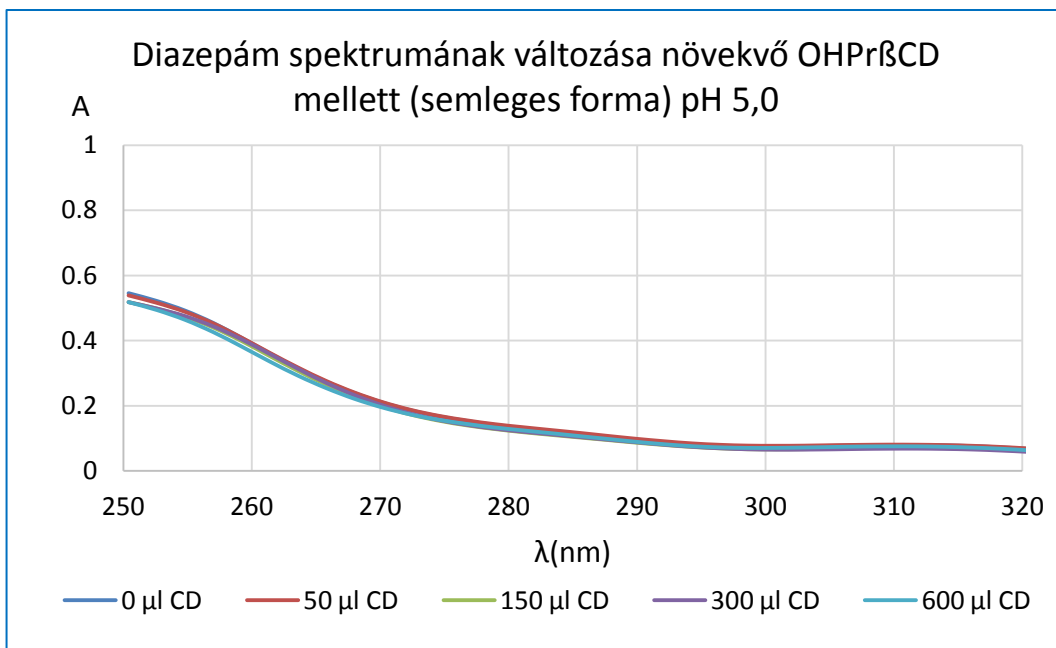
44. ábra Klozapin: protonált forma abszorbancia-változása



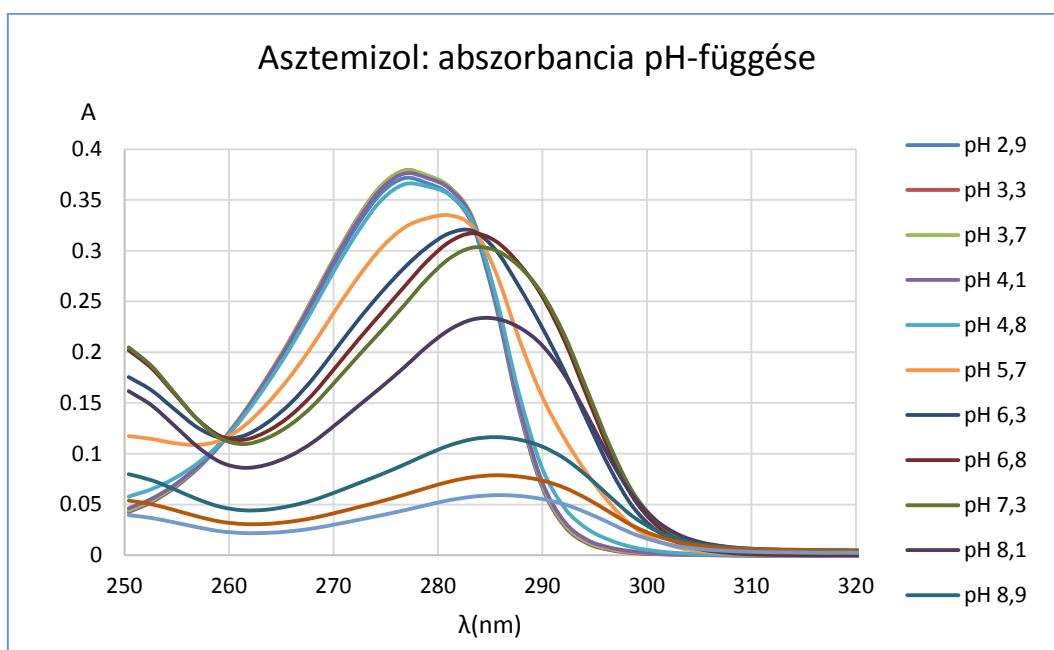
45. ábra Klozapin: neutrális forma abszorbancia-változása



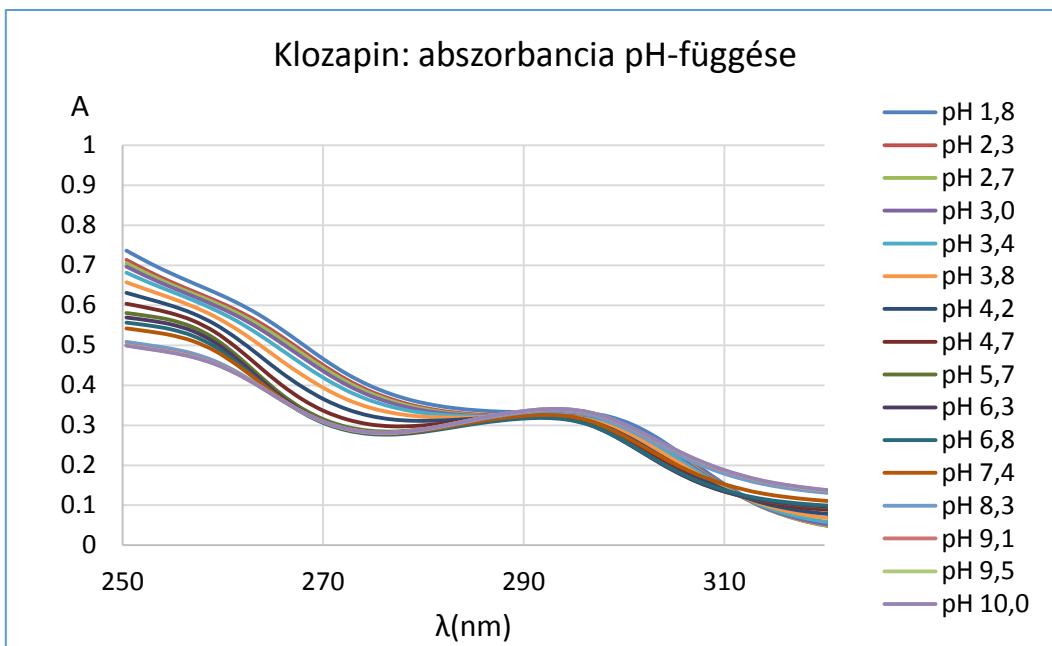
46. ábra Diazepám: protonált forma abszorbancia-változása



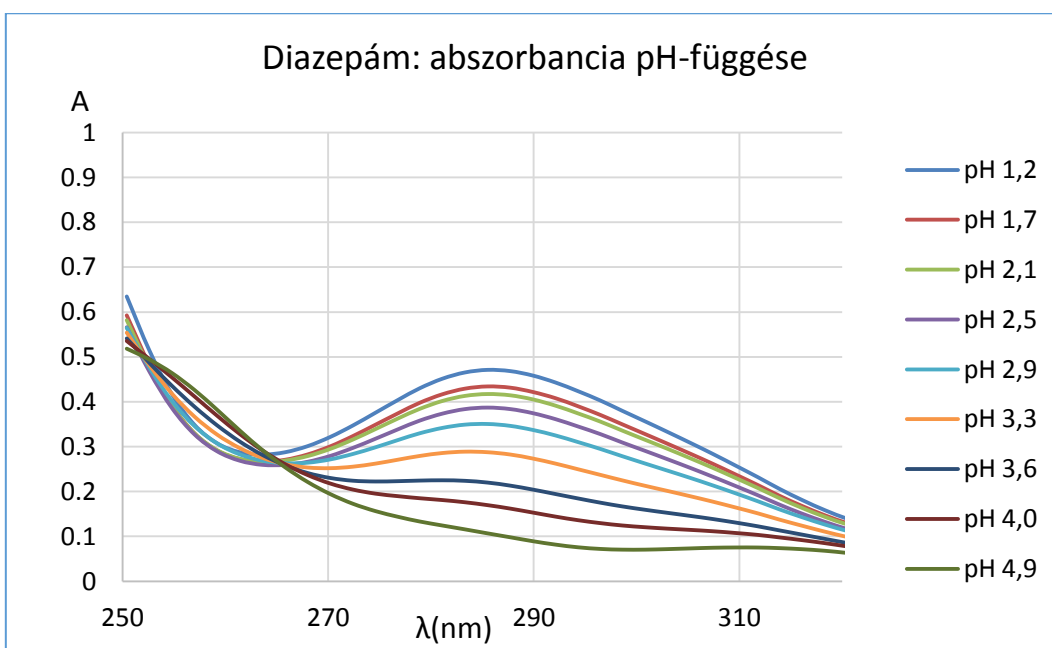
47. ábra Diazepám: semleges forma abszorbancia-változása



48. ábra Asztemizol spektrumának pH-függése



49. ábra Klozapin spektrumának pH-függése



50. ábra Diazepám spektrumának pH-függése