

**Mesterséges és természetes ellenanyagokon alapuló analitikai
módszerek antiepileptikumok meghatározására**

Bereczki Andrea

tézisfüzet

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Általános és Analitikai Kémiai Tanszék

2003

Bevezetés

Doktori munkám során molekuláris felismerésen alapuló analitikai módszereket dolgoztam ki antiepileptikumok meghatározására. Munkám első részében a természetes eredetű ellenanyagokat használtam e célra, míg a második részben mesterségesen, polimerizációval állítottam elő molekuláris felismerésre képes anyagokat. Mivel az epilepszia az egyik leggyakoribb idegrendszeri betegség, a lakosságnak mintegy 0,5%-a szenved epilepsziában, fontos a gyógykezelése, mely a rohamjelenségek és a kiváltó körülmények részletes elemzése alapján, tervszerűen, szervezeten és folyamatos ellenőrzéssel kell, hogy végbemenjen.

Immunanalitikai mérések

Áramló oldatos, fluoreszcens detektáláson alapuló immunanalitikai eljárást dolgoztam ki fenitoin meghatározására humán szérumból. A versengő immunmérés eljáráson alapuló immunreakció egy keverőhurokban, az áramló oldatos rendszerben ment végbe. A mérés során az ellenanyaghoz kötött és nem kötött fenitoin gélkromatográfiás elválasztását követően, ami a nagy méretkülönbségük alapján valósult meg, a fluoreszcensen jelölt komponenseket detektáltam. A rendszer működését befolyásoló paraméterek optimálását követően (gélkromatográfiás töltet, eluens, oszlophossz, áramlási sebesség, inkubálási idő) bizonyítottam a módszer analitikai alkalmazhatóságát a fenitoin meghatározására humán szérumból. Az eljárás klinikai alkalmazhatóságának vizsgálatára összehasonlító méréseket végeztem egy már referenciának számító klinikai módszerrel.

Annak igazolására, hogy az általam kidolgozott eljárás könnyen adaptálható kis molekulatömegű gyógyszermolekulák meghatározására, a fenobarbitál szérumból történő meghatározására is vizsgáltam a rendszer alkalmazhatóságát. A rendszer működési paramétereinek minimális optimálását követően (inkubálási idő) validáltam a módszert fenobarbitál meghatározására, majd összehasonlítottam két klinikai referencia módszerrel.

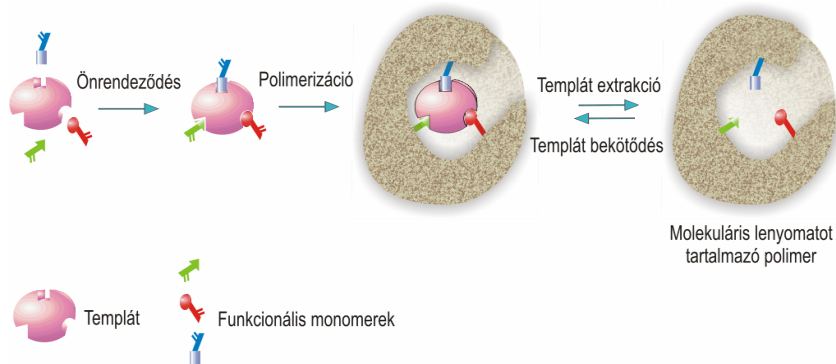
A kidolgozott immunanalitikai eljárások egyszerűek, költség hatékonyak, relatív gyorsak és nem igényelnek nagy műszerezettséget. A fenti előnyök következtében a

módszer potenciális alternatívája lehet a klinikai praktikumban, a kis gyógyszermolekulák mérésére használt egyéb módszereknek.

Molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek

Doktori munkám második részében új típusú anyagokkal, molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerekkel dolgoztam. Ezek az anyagok az antitestekhez hasonló erősséggel és szelektivitással képesek megkötni egy adott célvegyületet, működésük az ellenanyagokhoz hasonlóan molekuláris felismerésen alapul.

A nem kovalens molekuláris lenyomatképzési eljárás három fő lépésből áll (ábra). Az első lépés során a *templát (fenitoin)* és a *monomer önrendeződése* történik, majd ezt követi a *polimerizáció* és végül a *templát extrakciója* a polimerből. A templátnak a polimer mátrixból való eltávolítása után a polimerben megüresedett felismerő helyek maradnak vissza, melyek specifikusak a mintamolekulára. A felismerő helyek formája, térállása, valamint a rajtuk lévő funkciós csoportok szelektív kötőhelyeket eredményeznek, amiket a polimer váz stabilizál, és ezáltal lehetővé válik a templát szelektív bekötődése.



A polimerizációs körülmények optimalizálását követően (funkcionális monomer, polimerizációs oldószer) a fenitoin szelektív dúsítására alkalmas molekuláris lenyomatot tartalmazó polimert metakrilamid funkcionális monomer segítségével állítottam elő. Az előállított polimer alkalmas volt a fenitoin szelektív megkötésére. A polimer kötési sajátságait, szelektivitását és működési mechanizmusát a fenitoin metabolitjának, szerkezeti analógjainak, valamint hasonló lipofilitású, de

szerkezetileg eltérő anyagoknak a segítségével vizsgáltam. Meghatároztam a polimerben kialakult szelektív kötőhelyek számát és erősségét. Teszteltem a polimer kötési sajátságait különböző oldószerekben, és vizsgáltam az oldószer víztartalmának hatását is a szelektív felismerésre. Az eredmények azt igazolták, hogy a megfelelő oldószer kiválasztása esetén lehetővé válik a mintamátrix egyéb komponenseinek eltávolítása a fenitoin szelektív dúsítása mellett. A polimer felhasználásával kidolgoztam és validáltam egy szilárd fázisú extrakciós mintaelőkészítést fenitoin humán plazmából történő meghatározására. Ezzel a munkával elsőként dolgoztam ki validált analitikai eljárást molekuláris lenyomatot tartalmazó polimer alkalmazásával.

TÉZISEK

1. Kidolgoztam egy gélkromatográfiás elválasztáson alapuló áramló oldatos immunanalitikai eljárást fenitoin meghatározására humán szérumból. Bizonyítottam a módszer analitikai alkalmazhatóságát és összehasonlítottam egy klinikai referencia módszerrel (^{125}I RIA RK 41 radioimmunoassay).
2. Bizonyítottam, hogy az általam kidolgozott eljárás minimális optimalizálással általánosan alkalmazható kis molekulatömegű (<1000 Da) gyógyszermolekulák meghatározására. Ennek alátámasztására validált módszert dolgoztam ki fenobarbitál meghatározására.
3. Elsőként állítottam elő a fenitoin szelektív dúsítására alkalmas molekuláris lenyomatot tartalmazó polimert.
4. Megállapítottam, hogy az általam előállított fenitoin lenyomatot tartalmazó polimer kétféle különböző kötéseerősségű hellyel rendelkezik. A nagyobb kötéseerősségű helyek affinitási konstansa 5675 M^{-1} volt, míg a kicsi kötéseerősségű helyek affinitási konstansa $257,8 \text{ M}^{-1}$.
5. A fenitoinnal rokonszerkezetű molekulák, illetve a fenitoinhoz hasonló hidrofobicitású, de eltérő szerkezetű molekulák adszorpcióját összehasonlítva megállapítottam, hogy a szelektív kötődést (1) nem a hidrofób jelleg, hanem a fenitoin molekula specifikus felépítése okozza (2) a szerkezeten belül elsősorban a hidantoin gyűrű jelenléte és a molekula geometriája felel a szelektivitásért.
6. A polimer különböző oldószerekben való kötési sajátosságainak tesztelését követően, az eredmények alapján, az előállított polimer felhasználásával kidolgoztam és validáltam egy szilárd fázisú extrakciós mintaelőkészítést fenitoin humán plazmából történő meghatározására. Ezzel a munkával elsőként dolgoztam ki validált analitikai eljárást molekuláris lenyomatot tartalmazó polimer alkalmazásával.

A doktori disszertáció alapját képező közlemények:

- 1. Andrea Bereczki**, Viola Horváth: “Novel type of flow injection immunoassay for determination of phenytoin from serum” *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 391, 9-17.
- 2. Andrea Bereczki**, Viola Horváth, George Horvai: “Immunoassay based determination of phenobarbital using size exclusion chromatography”, *J. Chromatogr. B*, **2000**, 749, 215-223.
- 3. F. Lanza**, A.J. Hall, B. Sellergren, **A. Bereczki**, G. Horvai, S. Bayoudh, P.A.G. Cormack, D. Sherrington: “Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytoin and nifedipine”, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 435, 91-106.
- 4. Andrea Bereczki**, Antal Tolokán, George Horvai, Viola Horváth, Francesca Lanza, Andrew John Hall, Borje Sellergren: ”Determination of phenytoin by molecularly imprinted solid phase extraction”, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 930, 31-38.

Egyéb közlemény:

- 1. Róbert E. Gyurcsányi**, **Andrea Bereczki**, Géza Nagy, Michael R. Neuman, Ernő Lindner: “Amperometric microcells for alkaline phosphatase assay”, *Analyst*, **2002**, 127, 235-240