

Summary in Dutch

Nederlandse samenvatting

Chiraal onderscheid door middel van fosforescentie

Het woord chiraliteit komt van het Griekse woord voor hand. Het benadrukt dat onze linkerhand en rechterhand spiegelbeelden van elkaar zijn, maar niet zo gedraaid kunnen worden dat ze volledig over elkaar vallen. Moleculen kunnen ook chiraal zijn en de twee spiegelbeelden van dergelijke verbindingen worden enantiomeren genoemd. Levende systemen bestaan uit een groot aantal chirale verbindingen, die slechts in één enantiomere vorm voorkomen. In een dergelijke chirale omgeving kunnen de biologische activiteiten van twee enantiomeren sterk verschillen. Daarom is chirale analyse zeer belangrijk in een groot aantal gebieden zoals de klinische chemie, de farmaceutische industrie, het milieu, de landbouw en de voedingsindustrie.

De ontwikkeling van chirale analysemethoden is zeer uitdagend omdat enantiomeren dezelfde chemische en fysische eigenschappen hebben in een niet-chirale omgeving. Ze verschillen alleen in hun interacties met andere chirale verbindingen en met gepolariseerd licht. Chirale scheidingen in capillaire elektroforese (CE) en vloeistofchromatografie zijn vaak gebaseerd op het verschil in complexering van twee enantiomeren met andere chirale verbindingen, die daarom ook wel chirale selectoren worden genoemd. Een enantioselectieve detectiemethode kan daarentegen de afzonderlijke concentraties van twee enantiomeren vaststellen zonder een scheiding toe te passen. De chiroptische detectietechnieken polarimetrie en circulair dichroïsme zijn gebaseerd op het verschil in interactie van de twee enantiomeren met gepolariseerd licht. Helaas hebben deze twee chiroptische detectietechnieken een lage gevoeligheid, waardoor ze moeilijk te koppelen zijn met scheidingstechnieken op de microschaal waarbij de optische weglengte vaak slechts 50 of 75 μm is.

Dit proefschrift richt zich op het gebruik van chirale selectoren om enantioselectieve detectie te realiseren door middel van kamertemperatuur fosforescentie in de vloeibare fase. Dit doel van het onderzoek wordt kort uiteengezet in **hoofdstuk 1**. In tegenstelling tot chiroptische detectietechnieken is het verschil in fosforescentie signaal voor twee enantiomeren niet gebaseerd op hun interactie met gepolariseerd licht, maar op hun interactie met een chirale selector. Twee verschillende chirale selectoren zijn gebruikt in dit proefschrift: cyclodextrines en eiwitten. De inclusie van fosforescerende enantiomeren in cyclodextrines kan leiden tot verschillende fosforescentie levensduren. De koppeling van deze nieuwe enantioselectieve tijdsopgeloste fosforescentie detectiemethode aan chirale CE scheidingen wordt beschreven in hoofdstukken 3 en 4, waarbij directe en indirecte excitatie van een analiet worden vergeleken. Daarnaast beschrijven hoofdstukken 5 en 6 het gebruik van twee andere indirecte fosforescentie detectietechnieken in chirale CE gebaseerd op respectievelijk energieoverdracht naar een fosforescerende acceptor en dynamische uitdoving van een fosforofoor. In hoofdstukken 7, 8 en 9 wordt de interactie van de enantiomeren van drie verschillende medicijnen met het transport eiwit humaan serum albumine besproken.

Fosforescentie is net als fluorescentie een vorm van luminescentie, oftewel het uitzenden van licht door een aangeslagen molecuul die terugkeert naar de grondtoestand. Bij fosforescentie is er echter sprake van een verboden overgang, waardoor de snelheidsconstante van het stralingsverval laag is. De resulterende lange levensduren maken fosforescentie gevoeliger voor uitdoving dan fluorescentie. Om fosforescentie in vloeibare oplossingen bij kamertemperatuur te kunnen waarnemen moet eerst de aanwezige zuurstof worden verwijderd, omdat zuurstof deze vorm van luminescentie zeer efficiënt uitdooft. De grote gevoeligheid voor de directe omgeving van de chromofoor maakt fosforescentie zeer geschikt om stereoselectieve interacties van enantiomeren met chirale selectoren te bestuderen. **Hoofdstuk 2** introduceert naast deze algemene theorie over fosforescentie ook de concepten chiraliteit, cyclodextrines en het transporteiwit humaan serum albumine.

Hoofdstuk 3 beschrijft de koppeling van enantioselectieve fosforescentie detectie aan een chirale CE scheiding voor de analyse van (\pm)-kamferchinson (CQ). Zowel de chirale scheiding als de enantioselectieve detectie is gebaseerd op het verschil in interactie van de CQ enantiomeren met α -cyclodextrine (α -CD). In aanwezigheid van negatief geladen carboxymethyl- β -cyclodextrine (CM- β -CD) bij pH 9 wordt de CE scheiding veroorzaakt door het verschil in associatie van de CQ enantiomeren met α -CD. Daarnaast wordt (+)-CQ beter tegen uitdoving van de fosforescentie beschermd dan (-)-CQ na complexering met α -CD. Het resulterende verschil in fosforescentie levensduur wordt gebruikt om de twee CQ enantiomeren spectroscopisch van elkaar te onderscheiden. In aanwezigheid van alleen α -CD wordt een levensduurverschil van een factor vier waargenomen. Voor de levensduurbepalingen is een detectiesysteem gebouwd dat gedurende de scheiding in het capillair de vervalcurven van de fosforescentie van de CQ enantiomeren meet. Voor excitatie van CQ is een lichtemitterende diode van 465 nm gebruikt. Het verschil in fosforescentie levensduur is weliswaar minder in de aanwezigheid van CM- β -CD, maar nog steeds voldoende voor het enantioselectieve onderscheid. De ijklijnen voor beide enantiomeren zijn lineair na correctie voor triplet-triplet annihilatie. De methode is gebruikt om de enantioselectieve onzuiverheid in commerciële standaarden van (+)-CQ en (-)-CQ te bepalen.

De gevoeligheid van de enantioselectieve fosforescentie detectie van CQ wordt beperkt door de lage extinctiecoëfficiënt van deze verbinding. **Hoofdstuk 4** richt zich daarom op de verbetering van de gevoeligheid door middel van indirecte excitatie gebaseerd op de energieoverdracht van een donor met een hoge extinctiecoëfficiënt naar de acceptor CQ. De geselecteerde donor 2,6-naftaleendisulfonaat (2,6-NS) wordt hierbij aan de scheidingsbuffer toegevoegd. Voor de excitatie van deze donor wordt het detectiesysteem aangepast met een gepulste vaste stof laser van 266 nm. De triplet-triplet energieoverdracht is gebaseerd op het zogenaamde Dexter mechanisme, waarbij een botsing tussen de donor en de acceptor vereist is. Hoewel inclusie van de acceptor in cyclodextrines de toegankelijkheid voor botsingen met de donor vermindert, blijkt deze Dexter energieoverdracht erg efficiënt te zijn. Vergeleken met directe excitatie is de detectielimiet twee ordes van grootte beter en de laagste

concentratie waarbij de karakteristieke levensduren van (+)-CQ en (-)-CQ bepaald kunnen worden één orde van grootte lager. Het verschil tussen de levensduren van de twee enantiomeren na indirecte excitatie is kleiner dan met directe excitatie. Dit komt waarschijnlijk doordat de energieoverdracht van 2,6-NS naar het open 1:1 complex van CQ met CM- β -CD efficiënter is dan die naar het meer gesloten 2:1 complex met α -CD. De ijklijnen voor beide enantiomeren zijn lineair na correctie voor de donor levensduur. De methode is gebruikt om de hoeveelheid CQ te bepalen die uit een uitgehard tandhars lekt.

Ook directe kamertemperatuur fosforescentie detectie van het antidepressivum bupropion (BUP) heeft een lage gevoeligheid. In tegenstelling tot (\pm)-CQ wordt de lage gevoeligheid voor BUP niet veroorzaakt door de extinctiecoëfficiënt van deze verbinding, maar door zijn lage fosforescentie opbrengst. Ook in deze situatie kan Dexter energieoverdracht gebruikt worden om de gevoeligheid te verhogen zoals beschreven in **hoofdstuk 5**. Hierbij treedt echter het te bepalen BUP als donor op en wordt een acceptor aan de scheidingsbuffer toegevoegd. Biacetyl heeft eenzelfde chromofore groep als (\pm)-CQ en blijkt een geschikte acceptor met een lage absorptie bij 266 nm en een hoge fosforescentie opbrengst. De optimale gevoeligheid van directe fosforescentie detectie tijdens een chirale CE scheiding van BUP wordt verkregen bij pH 3 met gesulfateerd- α -CD als chirale selector. Deze gevoeligheid verbetert een factor 40 indien gebruik gemaakt wordt van de Dexter energieoverdracht naar biacetyl. Ook al resulteert het gebruik van gesulfateerd- α -CD in een hoge resolutie voor de chirale scheiding van de twee enantiomeren, in geen van beide detectiemodi wordt een enantioselectief fosforescentie signaal waargenomen. Uit tijdsopgeloste uitdovingsexperimenten blijkt dat de fosforescentie emissie (en waarschijnlijk ook de energieoverdracht) afkomstig is van BUP vrij in oplossing, waarbij beide enantiomeren dezelfde eigenschappen hebben. De methode is gebruikt voor de analyse van een farmaceutische formulering van racemisch BUP en urinemonsters waaraan racemisch BUP is toegevoegd.

Naast het gebruik van Dexter energieoverdracht voor het verbeteren van de detectiegevoeligheid voor zwak fosforescerende verbindingen is er nog een andere vorm van indirecte fosforescentie detectie gebaseerd op fosforescentie uitdoving. In deze detectiemodus wordt een sterk fosforescerende verbinding aan de scheidingsbuffer toegevoegd voor een hoog fosforescentie achtergrondsignaal. De detectie vindt plaats door de dynamische uitdoving van dit achtergrondsignaal met als grote voordeel dat ook niet-fosforescerende verbindingen bepaald kunnen worden mits deze uitdoving veroorzaken. In **hoofdstuk 6** is fosforescentie uitdoving gebruikt als detectiemethode voor het optimaliseren van de chirale CE scheiding van methotrexaat (MTX) dat veel gebruikt wordt voor de behandeling van verschillende soorten kanker. Hierbij is 4-broom-1-naftaleensulfonaat (BrNS) geselecteerd om het fosforescentie achtergrondsignaal te creëren. De chirale scheiding is uitgevoerd bij pH 7 door middel van 2-hydroxypropyl- β -CD. Onder deze omstandigheden wordt geen enantioselectiviteit waargenomen in de uitdoving van BrNS door L-MTX of D-MTX. De

methode is gebruikt om de verontreiniging van D-MTX in een standaard en een farmaceutische formulering van L-MTX te bepalen en voor de analyse van cel extracten waaraan L-MTX is toegevoegd teneinde de potentiële toepasbaarheid van de methode te testen.

Hoofdstuk 7 bestudeert de binding van het antihistaminicum broomfeniramine (BPA) aan humaan serum albumine (HSA) door middel van de uitdoving van de fluorescentie en fosforescentie emissie van de enige tryptofaan in dit transport eiwit. Analyse van het fluorescentie verval bij verschillende emissiegolflengten laat drie tryptofaan levensduren met verschillende fluorescentie spectra zien. Dit geeft aan dat er zeer waarschijnlijk meerdere HSA conformeren aanwezig zijn in oplossing. De afname van de fluorescentie intensiteit na toevoeging van racemisch BPA wordt voornamelijk veroorzaakt door statische uitdoving van de conformeren met de langste fluorescentie levensduur. De interpretatie van de fluorescentie uitdoving dient dan ook gebaseerd te worden op de zogenaamde aangepaste Stern-Volmer vergelijking. Om intense tryptofaan fosforescentie te verkrijgen wordt niet alleen zuurstof verwijderd, maar ook jodide toegevoegd aan de HSA oplossingen. Tijdsopgeloste fluorescentiemetingen geven aan dat jodide zowel statische als dynamische fluorescentie uitdoving veroorzaakt van de HSA conformeren met de langste fluorescentie levensduur. Voornamelijk deze conformeren zal dus bijdragen aan het fosforescentie signaal. Tijdsopgeloste fosforescentie metingen geven twee levensduren, waarbij de langste levensduur de grootste amplitude heeft en het meest bijdraagt aan het totale fosforescentie signaal. De fosforescentie uitdoving van HSA door toevoeging van racemisch BPA blijkt bij pH 7 voornamelijk gedomineerd te worden door een levensduurafname en is dus dynamisch van aard. Bij pH 9 is de reductie in fosforescentie voornamelijk statisch van aard en levensduurafname speelt slechts een marginale rol. Dit verschil kan mogelijk toegeschreven worden aan het feit dat bij pH 7 de alkylamino staart van BPA volledig geprotoneerd is. Bij pH 9 is het BPA molecuul meer in zijn neutrale vorm waardoor het beter bindt aan HSA.

De HSA-binding van de afzonderlijke enantiomeren van de ontstekingsremmer naproxen (NPX) is onderzocht door middel van fluorescentie en fosforescentie spectroscopie zoals beschreven in **hoofdstuk 8**. De fluorescentie excitatie en emissie spectra van (*S*)-NPX en (*R*)-NPX verschillen van vorm in de aanwezigheid van HSA. Dit geeft aan dat de twee NPX enantiomeren gebonden aan het eiwit een verschillende omgeving ervaren. Selectieve excitatie van NPX in de aanwezigheid van HSA en jodide laat zien dat eiwitbinding een toename in de NPX fluorescentie intensiteit veroorzaakt, terwijl de NPX fosforescentie intensiteit juist wat afneemt. Naast de invloed van de binding op de NPX luminescentie, veroorzaakt de toevoeging van NPX een afname in de fosforescentie van HSA. Experimenten met het aminozuur L-tryptofaan vrij in oplossing geven aan dat het uitdovingsmechanisme gebaseerd is op Dexter energieoverdracht. Voor de dynamische HSA fosforescentie uitdoving worden niet-lineaire Stern-Volmer plots gevonden. Dit wordt toegeschreven aan het feit dat Dexter energieoverdracht alleen kan plaatsvinden als de donor en acceptor zich op zeer korte

afstand van elkaar bevinden. Bij lage concentraties is NPX geheel gebonden aan HSA, maar niet dicht genoeg bij de tryptofaan van dit eiwit waardoor er geen uitdoving plaatsvindt. Bij concentraties boven de stoichiometrische verhouding 1:1 komt NPX vrij in oplossing en kan het tryptofaan dicht genoeg naderen om dynamische uitdoving te veroorzaken. De bindingsconstanten berekend uit de HSA fosforescentie Stern-Volmer plots zijn gelijkwaardig aan die uit de NPX fluorescentie plots en niet significant verschillend voor beide enantiomeren van NPX.

In **hoofdstuk 9** wordt de HSA-binding van de ontstekingsremmer flurbiprofen (FBP) en zijn methylester (FBPMe) bestudeerd door middel van fluorescentie en fosforescentie metingen. Om een sterk fosforescentie signaal te verkrijgen, wordt ook hier gebruik gemaakt van het zware atoom effect van jodide. Toenemende concentraties jodide laten een afname van de HSA fluorescentie intensiteit zien en een toename van de HSA fosforescentie intensiteit door een grotere overgangswaarschijnlijkheid van de aangeslagen singulet naar de triplet toestand. De maximale fosforescentie intensiteit wordt gevonden bij een KI concentratie van 0.2 M. De FBP en FBPMe enantiomeren hebben geen invloed op de HSA fluorescentie door een gebrek aan spectrale overlap tussen de fluorescentie van de donor (HSA) en de absorptie van de acceptor (FBP of FBPMe). De fosforescentie van HSA overlapt echter wel met de singulet-triplet absorptie van deze liganden en daarom kan fosforescentie uitdoving door Dexter energieoverdracht gebruikt worden om de stereoselectiviteit van de binding te bestuderen. De niet-lineaire Stern-Volmer plots gebaseerd op de langste fosforescentie levensduur geven aan dat (*R*)-FBP een sterkere dynamische uitdoving van de HSA fosforescentie veroorzaakt dan (*S*)-FBP. Voor de methylesters wordt het tegenovergestelde waargenomen: (*S*)-FBPMe veroorzaakt een sterkere dynamische uitdoving dan (*R*)-FBPMe. Het vergelijken van de fosforescentie uitdoving door deze methylesters bij HSA concentraties van 5 en 10 μM geeft duidelijk aan dat de uitdoving samenhangt met de HSA concentratie. De bimoleculaire snelheidsconstanten voor de fosforescentie uitdoving verschillen tussen de *S*-enantiomeren en *R*-enantiomeren, maar worden niet beïnvloed door de methylering.

Tot slot worden in **hoofdstuk 10** een aantal conclusies samengevat en perspectieven geschetst. De resultaten in dit proefschrift laten zien dat enantioselectieve fosforescentie meer aandacht verdient met name voor het bestuderen van stereoselectieve dynamische processen op de micro- en milliseconde tijdsschaal.