

# ACTA

## PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

# 2.

## 2011

APHGAO 81, (043) 49–96. (2011)





# A C T A PHARMACEUTICA H U N G A R I C A

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

*Főszerkesztő:*

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerési Kémiai Intézet  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.  
Tel.: 217-0891;  
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

*Felelős szerkesztő:*

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,  
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7-9.  
Tel.: 217-0927;  
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

*A szerkesztőbizottság tagjai:*

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,  
Tóthfalusi László

*A szerkesztőség címe – Correspondence:*

Acta Pharmaceutica Hungarica  
1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

*A főszerkesztő munkatársa:*

Hankó Zoltán MGYT,  
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.  
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

---

## TARTALOM

<i>Ambrus Rita, Bartos Csilla, Szabóné Révész Piroska: Eljárási paraméterek optimalizálása szónikus kavitáció alkalmazásával, hatóanyag szemcseméret csökkentése céljából</i> . . . . .	51
<i>Csende Ferenc: Tiofén szubsztituált ciklohexánvázis <math>\gamma</math>-oxokarbonsav intramolekuláris ciklizációjának vizsgálata és néhány N-heteroaril izoindol származék előállítása</i> . . . . .	59
<i>Csupor Dezső, Peták Zsolt, Hohmann Judit: Magyarországi Centaurea fajok gyógyászati perspektívája a tudományos adatok tükrében</i> . . . . .	63
<i>Szabó Andrea, Zelkó Romána, Antal István: Reumás megbetegedések kezelése intraartikuláris készítménnyel</i> . . . . .	77
<i>Völgyi Gergely, Baka Edit, Kovács Márta, Takácsné Novák Krisztina: Az egysúlyi oldhatóság meghatározásának helyes gyakorlata II. Ionizálható vegyületek pH-függő oldhatóságának vizsgálata</i> . . . . .	87

## CONTENTS

<i>Ambrus, R., Bartos, Cs., Szabó-Révész, P.:</i> Optimization of technological parameters using acoustic cavitation to reach particle size reduction of pharmacon . . . . .	51
<i>Csende, F.:</i> Investigation of the intramolecular cyclization of the thiophene substituted cyclohexane skeleton $\gamma$ -oxocarboxylic acid and synthesis of some N-heteroaryl isoindole derivatives . . . . .	59
<i>Csupor, D., Peták, Zs., Hohmann J.:</i> Medicinal perspective of Hungarian <i>Centaurea</i> species in the light of scientific evidences . . . . .	63
<i>Szabó, A., Zelkó, R., Antal, I.:</i> Treatment of rheumatic diseases with intraarticular drug delivery systems . . . . .	77
<i>Völgyi, G., Baka, E., Kovács, M., Takács-Novák, K.:</i> Good laboratory practice of equilibrium solubility measurement II. Study of pH-dependent solubility of ionizable compounds . . . . .	87

Acta Pharmaceutica Hungarica: [www.mgyt.hu](http://www.mgyt.hu)

„Acta Pharmaceutica Hungarica” a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata  
Kiadja a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16. Telefon: 235-09-99; E-mail: szerkesztoseg@mgyt.hu

**Felelős kiadó: Prof. Dr. Vincze Zoltán**

Előfizethető: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16., belföldi postautalványon vagy átutalással  
az MGYT átutalási számlájára: OTP VIII. kerületi fiók, Budapest, József krt. 33.

MGYT elszámolási számla sz. 11708001-20530530

Adószám: 19000754-2-42

Előfizetési díj egész évre: 5133 Ft + 257 Ft áfa

Megjelenik negyedévenként. Példányszám: 930 db

Tördelőszerkesztő: *Oláh Csaba*

Sokszorosítás: Print Invest Magyarország Kft., 9027 Győr, Almafa u. 13.

Felelős vezető: Ványik László ügyvezető igazgató

Megrendelés száma: 92 557, 2011. június

**Index: 25 101**

## Eljárási paraméterek optimalizálása szónikus kavitáció alkalmazásával, hatóanyag szemcseméret csökkentése céljából

AMBRUS RITA, BARTOS CSILLA, SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA\*

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai Intézet, Szeged, Eötvös u. 6 – 6720  
Levelezési cím: revesz@pharm.u-szeged.hu

### Summary

Ambrus, R., Bartos, Cs., Szabó-Révész, P.: *Optimization of technological parameters using acoustic cavitation to reach particle size reduction of pharmacon*

The main aspect in the field of pharmaceutical technology is the preformulation of the poorly water soluble drugs. The habit of particles can effect the physico-chemical properties which are important factors by drug administration. In the past years the role of the procedures by acoustic cavitation increased in the field of particle engineering. Application of high power ultrasound by integration and dezintegration can lead to particle size decreasing. Meloxicam as a nonsteroid anti-inflammatory model drug was used to study the effect of power ultrasound on the particle size decreasing. During our work technological parameters, as amplitude, temperature, time, excipients and concentration were optimized based on particle size distribution. Physico-chemical stability tests were also performed (XRPD, DSC, SEM, particle size). With optimized parameters (70% amplitude, 20 min, 47 °C) using excipients, crystalline micronized product was produced.

**Key-words:** meloxicam, particle size decreasing, acoustic cavitation, optimization.

### Összefoglaló

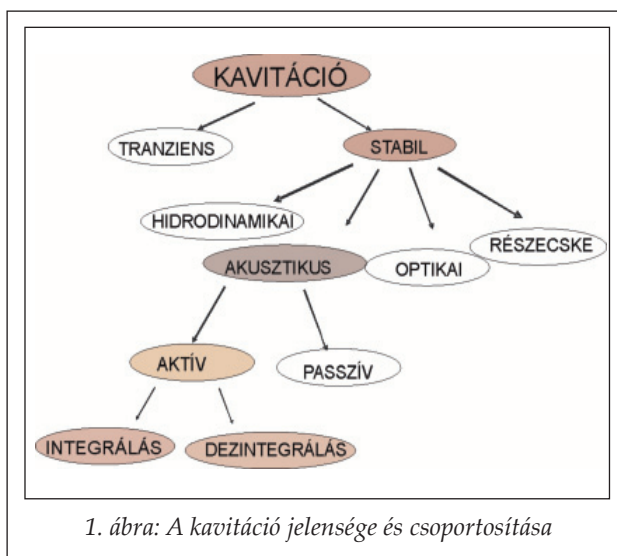
Napjainkban az egyik legnagyobb kihívást a gyógyszertechnológus számára a rossz vízoldékonyságú hatóanyagok preformulálása jelenti. A szemcsék habitusa, morfológiai sajátosságai nagy befolyással vannak a hatóanyagok fizikai-kémiai sajátosságaira, ezen kívül meg kell felelniük egyes formulálási és alkalmazási követelményeknek. Az utóbbi években a szemcseméret csökkentés területén az akusztikus kavitáción alapuló eljárások előretörése figyelhető meg. Aktív ultrahanggal integráláson vagy dezintegráláson alapuló szemcseméret csökkentés érhető el.

Modellanyagként a meloxicámot, nem szteroid gyulladáscsökkentőt választottuk a szónikus kavitáció szemcseméret csökkentésre gyakorolt hatásának tanulmányozása céljából. Vizsgálataink során technológiai paraméterek, mint amplitúdó, hőmérséklet, idő, segédanyag és koncentráció optimalizálását végeztük el. Az eljárási paraméterek optimalizálásánál a minták szemcseméret megoszlását vettük alapul. Munkánk során fizikai-kémiai stabilitási vizsgálatokat (XRPD, DSC, SEM, szemcseméret) végeztünk. Optimalizált paraméterekkel (70% amplitúdó, 20 perc, 47 °C) segédanyag jelenlétében kristályos, mikronizált terméket kaptunk.

**Kulcsszavak:** meloxicám, szemcseméret csökkentés, szónikus kavitáció, optimalizálás.

### 1. A kavitáció jelensége és csoportosítása

A kavitáció (1. ábra) fizikai jelenség, amely akkor következik be, ha egy anyag folyadék fázisból hirtelen gáz fázisba megy át a nyomás esése következtében. Ha a folyadék sebessége hirtelen megnő, akkor az energia-megmaradás törvénye értelmében (Bernoulli törvénye) a nyomása leesik. Ha a keletkező gőzbuborék, az áramlás mentén olyan helyre ér, ahol a nyomás nagyobb az ottani hőmérsékletéhez tartozó telített gőz nyomásnál, akkor a buborék hirtelen összeroskad, az egymásnak csattanó folyadékfelületek erős akusztikus lökeshullámot keltenek, ami egyrészt erős zajjal, rezgéssel, másrészt a környező szilárd testek eróziójával jár [1].



*Tranziens kavitáció* során a kavitációs üreg egy ciklus során megnövekszik, majd hevesen összeomlik. A folyamat során a molekulák széttöredezése is megfigyelhető, a vele szemben elhelyezkedő szilárd falat, így például sejteket, készüléket erőteljesen erodálja [2]. *Stabil kavitáció* akkor történik, ha a buborék számos cikluson keresztül oszcillál, a tőrből való távozás, vagyis felszínre vándorlás, illetve összeomlás nélkül, és a depresszió alatt mérete csökken, majd az ellenkező fázisban újra kitágul, mivel gőzt tartalmaz. Bizonyos esetekben a depressziós akusztikai/mechanikai ciklus alatt tágul, az ellenkező fázisban pedig zsugorodik a buborék, amelynek erőteljes több ezer kelvines hőképződés lehet az eredménye. A stabil kavitációs buborék az oszcilláló akusztikai tér miatt saját frekvenciával rendelkezik, illetve általában további felületi rezgések is kialakulhatnak rajta, amelyek a buborék környezetében erőteljes turbulenciákat indukálnak. Ezeket a turbulenciákat nevezzük mikroáramlásoknak, amelyekre nagy nyíróerő a jellemző [3].

Az ultrahang 16 kHz frekvencia feletti mechanikai hullámokat jelent. Az ultrahangot aktív és passzív tartományra oszthatjuk, vagyis megállapodás szerint az  $1 \text{ W/cm}^2$  vagyis a  $10000 \text{ W/m}^2$  teljesítmény alatt passzív, míg felette aktív ultrahangról beszélünk. A passzív ultrahangot leginkább az anyagtulajdonságok vizsgálatára, míg az aktív ultrahangot az anyag tulajdonságainak megváltoztatására alkalmazzuk. Tipikusan nemlineáris jelenség az állandó folyadékmozgás, amit az intenzív ultrahang okoz. Ennek során a folyadékban szemmel látható keveredés, turbulencia tapasztalható. A keverés mellett megvalósítható a diszpergálás is (pl. emulzió és szuszpenzió előállítás). Az ultrahangot rezgéskeltőkkel állítjuk elő. Legelterjedtebbek az elektromechanikus átalakítók. Az adszorpció miatt az ultrahang intenzitása a távolsággal exponenciálisan csökken. A modern ultrahang-berendezések aktív elemei legtöbbször ólom cirkonát titanát (PZT) kerámiák [4-7].

Munkánk során célul tűztük ki a nagyintenzitású ultrahang alkalmazhatóságának tanulmányozását a gyógyszerformulálás területén, továbbá kísérletes eredményekkel mutatjuk be a szemcseméret csökkentésben betöltött szerepét.

## 2. Aktív ultrahang a gyógyszerészet területén

A nagyintenzitású ultrahang alkalmazása a gyógyszer technológiai preformulációban új irányvonalként jelent meg az utóbbi időben, ahol az

akusztikus kavitáció szemcseméretre és morfológiára gyakorolt hatását mind integráló, mind dezintegráló műveleteknél hasznosíthatjuk [8].

### 2.1. Emulgeálás és szuszpendálás ultrahanggal, szonokémia

Az aktív ultrahang, emulzióképző berendezésben vagy szuszpenziók akusztikai ülepítésére alkalmas szeparáló készülékben és szonokémiai generátorban funkcionálhat a gyógyszerészet területén. Az emulzióképzés elvi sémája alapján az olajos és vizes fázis egymással szembe lép be a rendszerbe, majd a középvonalon, az addigi áramlással merőleges ultrahangsugárban képződik az emulzió. Több ultrahangos emulzió-előállító berendezéssel szemben előnyt jelenthet, hogy az ultrahangsugár hosszabb távon érheti az anyagokat, így sokkal stabilabb emulziók készíthetőek [9]. További felhasználási lehetősége az ultrahangnak az emulziók és szuszpenziók ülepítésének gyorsítása. A technika lényege az, hogy speciálisan tervezett akusztikai kamrában állóhullámot kialakítva történik meg az eltérő fizikai tulajdonságú közegek szétválasztása, a vivőközeghez képest sűrűség, fajsúly, kompresszibilitásbeli különbség, alaki részecskejellemzők stb. alapján. Meghatározható, hogy milyen szemcsekonzentráció szükséges egy adott intenzitás mellett, vagy milyen intenzitás szükséges egy adott szemcsekonzentrációhoz az ultrahangterben, hogy akusztikai állóhullám, vagy akusztikai kavitáció alakulhasson ki. Amennyiben a rendszerben állóhullám kerül kialakításra, akkor a szeparáció és szedimentáció, amikor viszont kavitáció dominál a hangterben, akkor a diszpergálás, az emulgeálás és a szuszpendálás valósítható meg az ultrahang segítségével [10]. A kémia speciális területe a szonokémia, melyben speciális reakciókat, új reakció utakat és reakciótermékeket nyerhetünk ultrahang hatására, és az eljárásokat pedig szonikus reaktorokban folytatjuk. Az ultrahang fő kémiai szerepe a kavitációs buborékon kialakuló katalízis, vagyis a reakciók aktiválási energiájának csökkentése, szonokemikáliák kialakítása, reakciók gyorsítása, reakciópartnerek diszpergálása, diffúziós felület növelése és az enzimaktivitás szabályozása, preparatív termékek előállítása stb. [11].

### 2.2. Ultrahang alkalmazása a szemcsék habitusának változtatása céljából

Az ultrahangos homogenizálás egy mechanikai

I. táblázat

## Az ultrahang szemcseméretre gyakorolt hatása

Anyagok	Módszer	Méret	Eljárás jellemző paraméterei
Cefuroxim [14]	Ultrahangos kristályosítás	80-130 nm (amorf)	Oldószer: acetón Antiszovent: izopropil-éter T: -5 °C; t = 1 perc
Kaolinit [15]	Ultrahang	360 nm	Diszpergálószer: ioncserélt víz T: 20 °C; t = 20 h 20 kHz; 750 W
Glicin [16]	Ultrahangos hűtéses kristályosítás	100 µm	Diszpergálószer: ioncserélt víz 20 kHz
Dipiridamol [17]	Szuperkritikus antiszovent eljárás ultrahanggal kombinálva	300-600 nm	Oldószer: metilén-klorid T: 37 °C Amplitúdó: 20-40%
Nitrendipin [18]	Ultrahangos kristályosítás	209 nm	Oldószer: PEG 200 + acetón (30 mg/ml nitrendipin konc.) Antiszovent: PVA + víz T: 3 °C alatt t = 15 perc; 400 W
Cellulóz [19]	Hidrodinamikai kavitáció kombinálva ultrahanggal	301 nm (amorf és kristályos)	Diszpergálószer: ioncserélt víz 22 kHz
Nátrium-klorid [20]	Szonokristályosítás	1,23 µm	Diszpergálószer: ioncserélt víz T: 5 °C alatt; 20 kHz; 35 W
Ibuprofen [21]	Olvadék-kristályosítás	13,01 µm	Minta: ibuprofen olvadék + ionmentes víz T: 25 °C; t = 2 perc; Amplitúdó: 80%
Meloxikám [22]	Emulzió-diffúzió módszer	165 nm	Oldószer: benzil-alkohol + 3 perc ultrahang + (Tween 80 + víz) + újabb 3perc ultrahang Amplitúdó: 30%; 500 W
Gemfibrozil [23]	Emulzió-diffúzió módszer	2,89 µm	Oldószer: etil-acetát, az oldat 0,5% PVP K-25 oldatba lett csepegtetve t = 7,5 perc; Amplitúdó: 30%

II. táblázat

## Szonikáció során változó paraméterek

Hőmérséklet (°C)	szobahő, jeges hűtés
Amplitúdó (%)	30, 50, 70
Idő (perc)	10, 20, 30

folyamat, amely a részecskeméret csökkentésére, egyenletes méreteloszlás elérésére irányul, javítva ezáltal az egységességet és a stabilitást, növelve a részecskeszámot és a fajlagos felületet, csökkentve a részecskék közötti átlagos távolságot. A részecskék (diszpergált rész) lehetnek szilárd vagy folyékony halmazállapotúak. További nagy előny, hogy a paraméterek (amplitúdó, pulzáció, idő, hőmérséklet) pontosan beállíthatók és ellenőrizhetők, az ultrahangos homogenizálás reprodukálható. Az ultrahangnak két fő része van, a szonotród és az áramlási cella, mindkettő egyszerű geometriai felépítésű, nem rendelkeznek kicsi, rejtett nyílásokkal. Az ultrahangos homogenizálás egyik nagy előnye, hogy kevés a mozgó alkatrész, így megbízhatóbb, kevésbé kopik és a tisztítási idő is rövidebb [12].

A méretcsökkentés, dezintegráció révén, a kavitáció eredménye. Az ultrahangos kavitáció nagy nyíróerőt generál, ami képes szétszakítani a részecske-aggregátumot, legyőzve a részecskék közötti vonzóerőket. Az ultrahangos kezelés által elérhető a részecskék homogén eloszlása is. A részecskeméret akár 500 µm-ről 10 nm-re csökkenthető, ahol a nagy fajlagos felületű részecskék méretének egységességét lehet elérni [13].

Az I. táblázat az ultrahang alkalmazásának lehetőségeit szemlélteti különböző hatóanyagok szemcseméret csökkentése céljából.

## 3. Anyagok és eljárás

Felhasznált anyagok: meloxikám (MEL) – EGIS Gyógyszergyár (Budapest, Magyarország); Tween 80 (Tween) – Hungaropharma (Budapest, Magyarország); Poloxamer 188 (polox) (polietilén-polipropilén glikol) – Fluka (Ljubljana, Szlovénia); Solutol HS 15 – BASF (Ludwigshafen, Németország); PVP K25 (PVP) (polivinilpirrolidon) – ISP Customer Service GmbH (Köln, Németország).

### Ultrahangos eljárás

Az eljárás során a mintákat (vizes szuszpenzió – 300 mg hatóanyag / 30 ml víz) szobahőmérsékleten (25 °C), illetve jeges hűtés (a mintát kezelés közben 18 °C-os jéggel hűtött fürdőbe helyeztük) mellett ultrahangoztuk (Hielscher 200 W Ultrasound system, Németország), az amplitúdót 30 és 70% között változtattuk. A megjelölt paraméterekkel 10, 20, illetve 30 perces szonikációt végeztünk (**II. táblázat**).

## 4. Vizsgálati módszerek

### 4.1. Szemcseméret megoszlás, morfológia

A MEL szemcsék méretét és méreteloszlását Malvern Mastersizer 2000 készülékkel (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) határoztuk meg (Hydro 2000 SM kis térfogatú diszpergáló egység). A hatóanyag és szilárd minta *morfológiai jellemzése* pásztázó elektronmikroszkóppal történt (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Japan). A minta töltődésének megakadályozása céljából arany-palládium bevonó anyagot használtunk 18 mA plazmaáram alkalmazásával. A felvételek 15 kV nagyfeszültség, 10  $\mu$ A elektronáram és 0,1 Pa élővákuum beállításával készültek. A D 0,1, D 0,5, D 0,9 értékeket térfogat szerinti méretanalízissel határoztuk meg. A D 0,1, D 0,5, D 0,9 azok a méretek mikrométerben, amelyeknél a minta 10, 50 illetve 90%-a kisebb [24].

### 4.2. Szerkezeti jellemzők

A termékek *termoanalitikai viselkedését* Mettler Toledo STAR<sup>®</sup> termoanalitikai készülékkel (Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc) határoztuk meg. A DSC (*differenciál pásztázó kalorimetria*) és TG (*termogravimetria*) méréseket argon gáz átáramoltatásával (10 l/óra) végeztük (2–5 mg-os minta, 25–300 °C, 5 °C/perc fűtési sebesség).

A hatóanyag *kristályos jellegét* porröntgen diffraktométerrel határoztuk meg (Miniflex II Rigaku porröntgen diffraktométer, Rigaku Co. Tokyo, Japán). Mérési paraméterek: Cu ( $K\alpha = 1,5405 \text{ \AA}$ ), 30 kV, 15 mA.

## 5. Eredmények értékelése

### 5.1. Eljárási paraméterek és az összetétel optimalizálása

Munkánk során először az eljárás paramétereit vizsgáltuk, változtatva a hőmérsékletet, a szonikáció amplitúdóját, illetve az ultrahangozás idejét.

### III. táblázat

A MEL kiindulási D 0,1, D 0,5, D 0,9 értékei

D 0,1 ( $\mu$ m)	D 0,5 ( $\mu$ m)	D 0,9 ( $\mu$ m)
24,80	85,39	237,92

Ezután segédanyagok alkalmazásával, a minta összetételét optimalizáltuk.

Az összetétel optimalizálásánál különböző stabilizáló segédanyagokat használtunk, mint a PVP K-25 (kristályosodást gátló, stabilizáló szer), Poloxamer 188 (nemionos felületaktív anyag), Tween 80 (nemionos szolubilizáló szer), Solutol HS 15 (nemionos szolubilizáló szer), illetve tanulmányoztuk a ható- és segédanyagok koncentrációjának szemcseméretre gyakorolt hatását. A hatóanyag koncentrációja 1 m/v %, a segédanyagé pedig 0,5 illetve 0,25 m/v % volt. A **III. táblázatban** a MEL kiindulási méretmegoszlása látható, amelyre jellemző a heterodiszperzitás.

30%-os amplitúdóval 10 perces ultrahangozás után megállapítottuk, hogy a szemcseméret a kiindulásihoz képest a felére csökkent. 50%-os amplitúdó esetében a méret tovább csökkent, de az amplitúdó további növelése (70%) jelentős változást nem okozott, a D 0,5 érték körülbelül 26  $\mu$ m maradt (**2. ábra bal**). A kezelés során a minta hőmérséklete kb. 85 °C-ra emelkedett, ami a hatóanyag olvadáspontja (260 °C) alá esik, így az végig szilárd formában volt jelen.

Jéggel történő hűtéssel ( $T_{\text{hűtővíz}} = 18 \text{ °C}$ ) és 30%-os amplitúdóval történő szonikációval ugyanazt a méretet értük el, amit szobahőmérsékleten az 50 és 70%-os amplitúdóval sikerült megvalósítani (26  $\mu$ m). A minta kezelést követő hőmérséklete kb. 47 °C volt, azaz felére csökkent a hűtés nélküli eljáráshoz viszonyítva, ezzel segítve a kisebb méret elérését, mérsékelve a szemcsék közötti kohézió nagyságát. A legjobb eredményt – mind a D 0,1, D 0,5, D 0,9 értékek esetében – a 70%-os amplitúdóval történő kezelés biztosította, a szemcsék átlagosan 22  $\mu$ m-esek lettek (**2. ábra jobb**).

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a kezelési idő 20 illetve 30 percre növelése eredményez-e további szemcseméret csökkenést. 20 perces kezelést követően a méret 14  $\mu$ m-re csökkenthető, a 30 perces szonikáció azonban ezen jelentősen nem változtatott (ábra nem látható).

Az eddigiek alapján tehát a következő eljárási paramétereket választottuk a további vizsgálatokhoz: jeges fürdőt ( $T_{\text{hűtővíz}} = 18 \text{ °C}$ ), 70%-os amplitúdót és 20 perces kezelést. Az összetétel optimalizálása céljából különböző segédanyagok hatását



IV. táblázat

## Segédanyagok MEL szemcseméretére gyakorolt hatása

	-	0,5% PVP	0,5% Tween	0,5% Polox.	0,5% Solutol	0,25% PVP
D 0,1	3,71	0,25	1,27	1,27	0,46	0,75
D 0,5	14,65	4,07	11,79	11,09	7,70	5,60
D 0,9	36,34	20,73	30,03	40,21	25,71	17,11

V. táblázat

## Optimalizált paraméterekkel előállított megfelelő összetételű minta

Szárítás (°C)	Segédanyag	Amp/T (70%)/(°C)	T (Szuszp) (°C)	Idő (perc)	Konc. (mg/30 ml)	Kiindulási méret D 0,5 (µm)
50	0,25% PVP	Jeges fürdő, 18	46,20	20	300	5,60

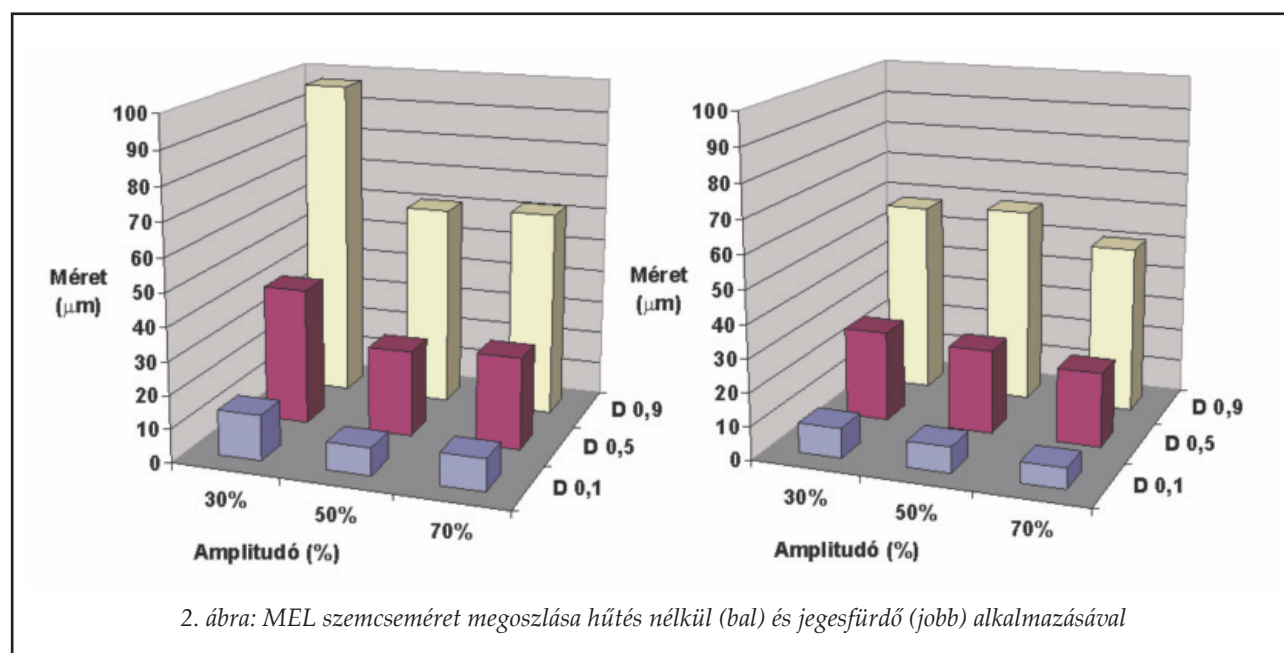
vizsgáltuk a MEL szemcseméret megoszlására. A segédanyagokat, illetve azok koncentrációját korábbi tanulmányok alapján választottuk meg [14-23]. Eredményeinket összevetve a segédanyag nélküli kísérletek eredményeivel (D 0,5: 14 µm), a legkevésbé hatékonyak a Tween 80 bizonyult, ezt követte a Poloxamer és a Solutol (IV. táblázat). A legkisebb szemcseméretet, átlagosan 5 µm-t PVP-vel értük el. Ez az érték a PVP koncentrációjának csökkentésekor sem változott. Látható, hogy a PVP, mint stabilizáló és kristályosodást gátló anyag mindenképpen szükséges az összetételben. A PVP koncentráció csökkentésének jelentősége az esetleges toxicitási problémák megelőzésében rejlik, hiszen különböző beviteli kapuk (pulmonális, nazális) is előtérbe kerülhetnek a kis szemcseméretű termék által, ahol az összetétel sejt toxicitására is kiemelten figyelni kell. Tehát a vizsgált rendszerek közül a 0,25% PVP tartalmú MEL szemcseméret megoszlása bizonyult optimálisnak.

## 5.2. Szilárd fázisú termék jellemzése (SZ-MEL-UH)

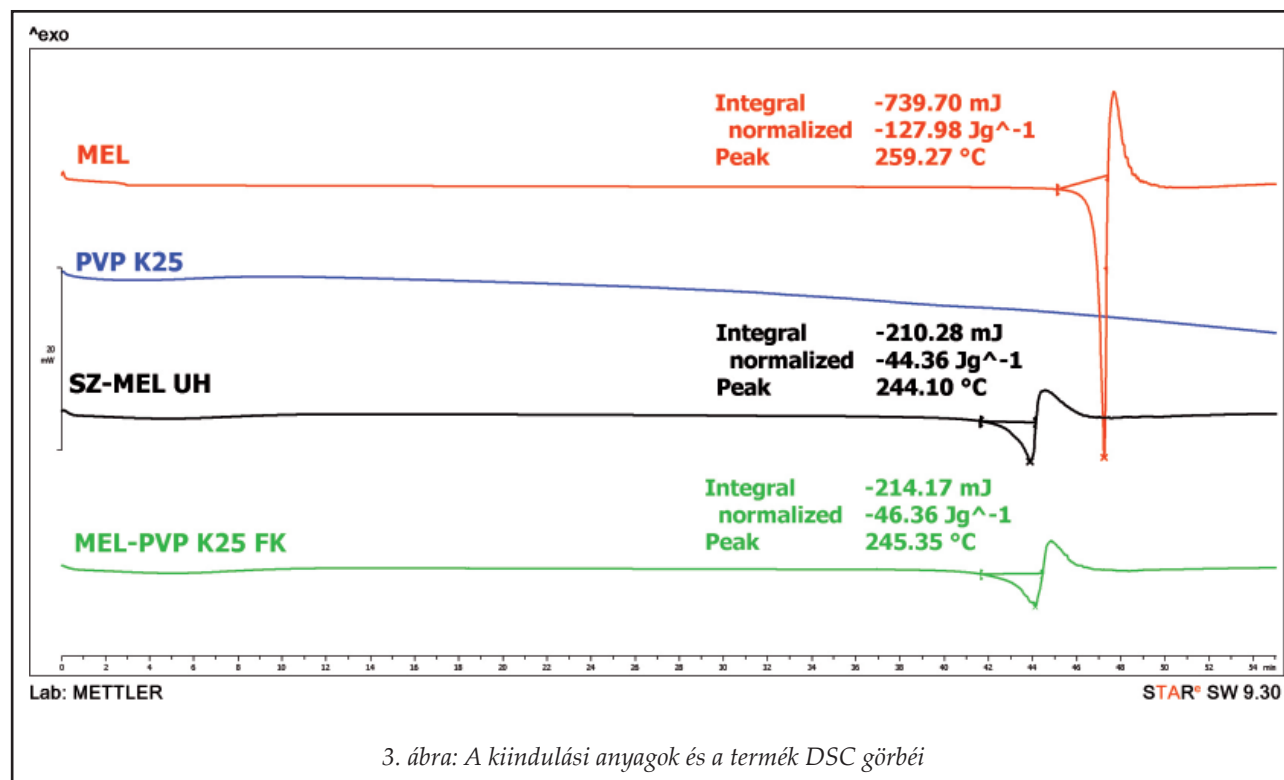
Az előkísérletek alapján az eljárási paraméterek és összetételek optimalizálását követően a kapott szuszpenzióból (V. táblázat) 50 °C-on, nyugvó réteges szárítóban távolítottuk el a vizet (Memmert, Németország) abból a célból, hogy szilárd terméket nyerjünk (SZ-MEL UH). A szárított termék fizikai-kémiai sajátosságait az alábbiak szerint vizsgáltuk. Meg kívánjuk jegyezni, hogy a kezelt minta hőmérséklete nem haladta meg a 46,2 °C-ot, tehát hő hatására bekövetkező bomlás nem történt.

## DSC felvételek

A DSC görbén a MEL-nek 259,27 °C-on jól definiálható olvadáspontja van, amit bomlás követ. A PVP amorf sajátosságú segédanyag, olvadásponttal nem rendelkezik (3. ábra).



2. ábra: MEL szemcseméret megoszlása hűtés nélkül (bal) és jegesfürdő (jobb) alkalmazásával



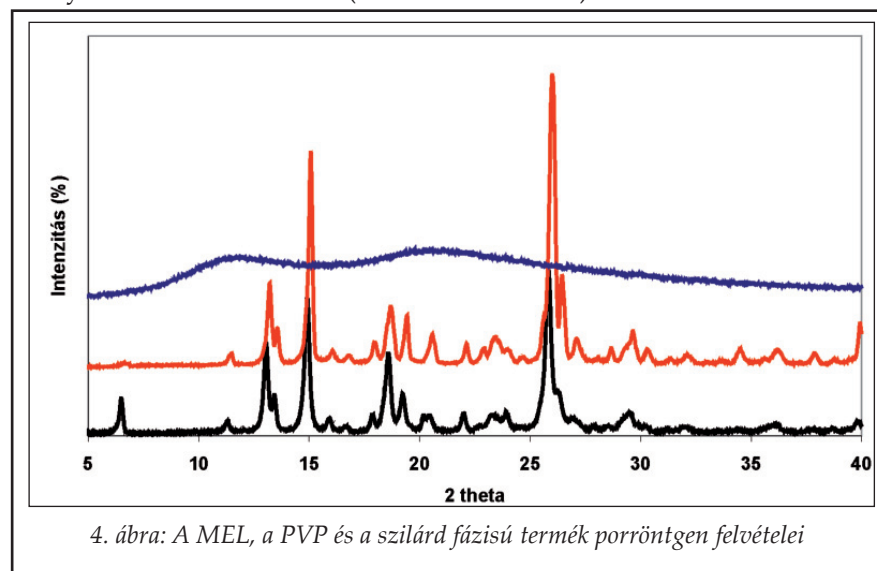
3. ábra: A kiindulási anyagok és a termék DSC görbéi

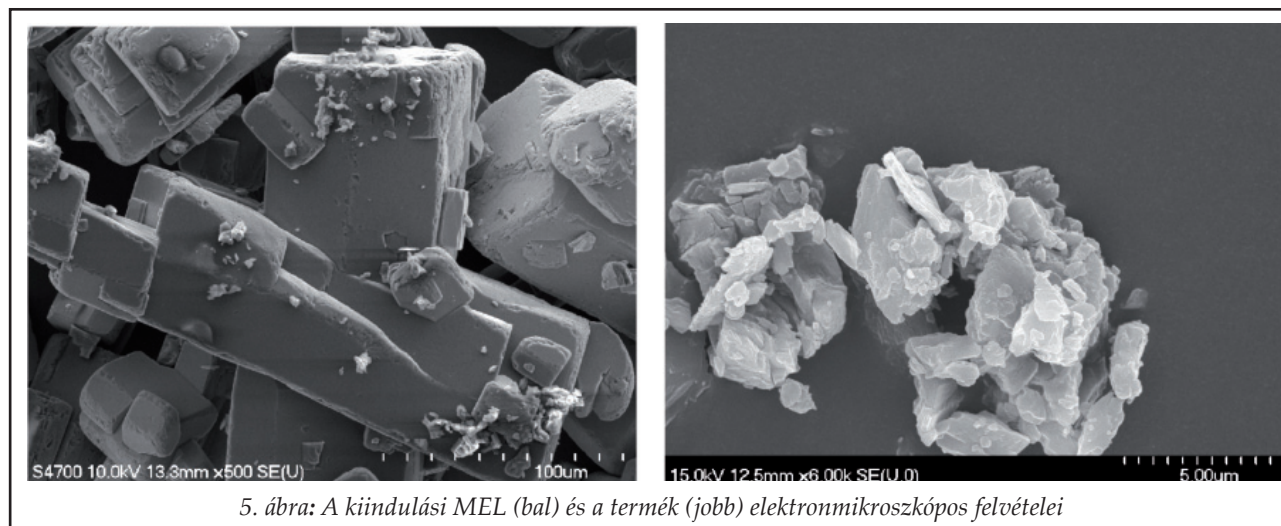
A szilárd fázisú minta (SZ-MEL-UH) görbében is megfigyelhető a hatóanyag kristályok olvadáspontja, amivel a MEL kezelés és szárítás utáni kristályos jellegét bizonyítottuk. A mintában látható olvadáspont-csökkenés (244,10 °C) egyrészt annak köszönhető, hogy a kisebb kristályok megolvadásához kevesebb energiára van szükség, másrészt pedig a PVP az üvegesedési hőmérsékletén ( $T_g = 34$  °C) meglágyul, ilyen körülmények közt a MEL olvadása alacsonyabb hőmérsékleten következik be. Referenciaként a termékkel azonos arányban fizikai keveréket (MEL-PVP K25 FK) ké-

szítettünk, így összevetve a normalizált integrál értékeket az anyagok kristályossági indexét határoztuk meg. A fizikai keverékben levő MEL kristályosságát 100%-nak véve a szilárd fázisú mintában jelen levő hatóanyag kristályossága kismértékben csökkent (96%-ban kristályos frakciót detektáltunk).

#### XRPD eredmények

A porröntgen-diffrakciós vizsgálatok ugyancsak a minta kristályos jellegét bizonyítják, mert a karakterisztikus csúcsok a kiindulási anyagnál és a szilárd fázisú termékben is megjelennek. A MEL-re jellemző csúcsok 13,22, 15,06, 26,46 és 26,67  $2\Theta$  értékeknél olvashatóak le (4. ábra). A PVP amorf sajátosságát bizonyítja, hogy esetében a kristályos anyagra jellemző csúcsok nem jelennek meg a diffraktogramon. Mivel a kiindulási anyagok (MEL és PVP) és a termék (SZ-MEL UH) jellemző csúcsai egybeesnek – azon kívül, hogy mintánk kristályos maradt – az is megállapítható, hogy polimorf módosulat a kezelés hatására nem jött létre.





5. ábra: A kiindulási MEL (bal) és a termék (jobb) elektronmikroszkópos felvételei

VI. táblázat

A kiindulási anyag és a mintákban levő hatóanyagok fajlagos felülete és méreteloszlása

	Spec. fel (m <sup>2</sup> /g)	D 0,1 (µm)	D 0,5 (µm)	D 0,9 (µm)
MEL	0,091	24,80	85,39	237,92
MEL UH	1,923	0,75	5,60	17,11
SZ-MEL UH	0,969	2,57	11,92	53,48

#### Elektronmikroszkópos felvételek

Az elektronmikroszkópos képek alapján látható, hogy a kiindulási MEL kristályai nagy, hexagonális, sima felületű kristályok, míg a MEL-t, PVP-t tartalmazó ultrahanggal kezelt termék kristályai a kezelést követően szabálytalan alakúak, egyenetlen felszínűek, a mérések alapján átlagosan 10 µm-esek (5. ábra).

#### Szemcseméret megoszlás és specifikus felület

A VI. táblázat összehasonlításban mutatja a kiindulási MEL, a szuszpenzióban levő, már ultrahangozott (MEL UH) és az abból nyert szilárd fázisú termék (SZ-MEL UH) szemcseméret megoszlását és a részecskék specifikus felületét. A szemcseméretet egy nagyságrenddel csökkentettük, ez jól látható a D 0,1, D 0,5 és D 0,9 értékek esetében is. A fajlagos felület vizes szuszpenzióban 21-szeresére növelhető. A MEL-nél szárítás hatására a stabilizáló PVP alkalmazása mellett is aggregáció következett be. A szilárd fázisú termék szemcsemérete ennek ellenére is kedvezőbb a kiindulási anyaghoz viszonyítva. Megállapítható, hogy a mikro-szuszpenzió és a szilárd fázisú termék is alkalmas gyógyszerforma fejlesztéséhez.

### 6. Összegés, jövőkép

Dolgozatunk összefoglalót adott a kavitáció jelenség-

géről és csoportosításáról, az ultrahang fizikai alapjairól és alkalmazásának lehetőségeiről a gyógyszerformulálás területén, elsősorban a kristálméret megváltoztatása céljából. Munkánk során az eljárási paramétereket és az összetételt optimalizáltuk. Megállapítottuk, hogy ultrahangozással a meloxicám kristályok mérete a mikrométer tartományba csökkenthető. A termékekben a hatóanyag kristályosságát fizikai-kémiai vizsgálatokkal bizonyítottuk. Az eredmények azt igazolták, hogy a hatóanyag fizikai-kémiai sajátossága, illetve az alkalmazott segédanyagok befolyásolják mind a szemcseméret-csökkenést, mind a szárítás során az aggregáció mértékét. Az aggregáció gátlása céljából célszerűnek tartjuk hordozó segédanyag (pl. manit) alkalmazását is. Terveink között szerepel újabb modellanyagok vizsgálata, a kavitáció szemcseméret-csökkentő hatásának további tanulmányozása, paraméterek, összetételek optimalizálása.

### 7. Köszönetnyilvánítás

A TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005 azonosító számú, „Kutatóegyetemi Kiválósági Központ létrehozása a Szegedi Tudományegyetemen” című projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósul meg.

### IRODALOM

1. Caupin, F., Herbert, E.: Comptes Rendus Physique, 7(9-10), 1000-1017 (2006).
2. Church, C.C., Carstensen, L.E.: Ultrasound Med Biol, 27(10), 1435-1437 (2001).
3. Servant, G., Caltagirone, J. P., Gérard, A., Laborde, J. L., Hita, A.: Ultrason Sonochem, 7(4), 217-227 (2000).
4. Laborde, J.L., Bouyer, C., Caltagirone, J.P., Gérard, A.: Ultrasonics, 36(1-5), 581-587 (1998).

5. Moholkar, V.S., Kumar, S.P., Pandit, A.B.: *Ultrason Sonochem*, 6(1-2), 53-65 (1999).
6. Bunkin, N.F., Kochergin, A.V., Lobeyev, A.V., Ninham, B.W., Vinogradova, O.I.: *Colloid Surface A*, 110(2), 207-212 (1996).
7. Miller, L.D., Thomas, M.R.: *J Acoust Soc Am* 93, 3475-3480 (1993).
8. Franco, F., Cecila, J.A., Pérez-Maqueda, L.A., Pérez-Rodríguez, J.L., Gomes, C.S.F.: *Appl Clay Sci*, 35(1-2), 119-127 (2007).
9. Behrend, O., Ax, K., Schubert, H.: *Ultrason Sonochem*, 7(2), 77-85 (2000).
10. Benes, E., Grösschl, M., Handl, B., Trampler, F., Nowotny, H.: *Das europäische TMR-Netzwerk Ultrasonic Separation of Suspended Particles*. Proc. Joint Symposium AAA and ÖPG TC Acoustics, Graz, Austria. 2, 14-15 (1998).
11. Török, B., Balázsik, K., Felföldi, K., Bartók, M.: *Ultrason Sonochem*, 8(3), 191-200 (2001).
12. Dhumal, S.R., Biradar, V.S., Paradkar, R.A., York, P.: *Int J Pharm*, 368(1-2), 129-137 (2009).
13. Patil, N.M., Pandit, B.A.: *Ultrason Sonochem*, 14(5), 519-530 (2007).
14. Dhumal, S.R., Biradar, V.S., Yamamura, S., Paradkar, R.A., York, P.: *Eur J Pharm Biopharm* 70, 109-115 (2008).
15. Franco, F.L., Pérez-Maqueda, L.A., Pérez-Rodríguez, J.L.: *J Colloid Interf Sci* 274, 107-117 (2004).
16. Louhi-Kultanen, M., Karjalainen, M., Rantanen, J., Huhtanen, M., Kallas, J.: *Int J Pharm* 320, 23-29 (2006).
17. Sanganwar, P.G., Gupta, B.R.: *Powder Technol* 196, 36-49 (2009).
18. Xia, D., Quan, P., Piao, H., Piao, H., Sun, S., Yin, Y., Cui, F.: *Eur J Pharm Sci* 40, 325-334 (2010).
19. Pinjari, V.D., Pandit, B.A.: *Ultrason Sonochem* 17, 845-852 (2010).
20. Abbas, A., Srouf, M., Tang, P., Chiou, H., Hak-Kim Ch., Romagnoli, A.J.: *Chem Eng Sci* 62, 2445-2453 (2007).
21. Manish, M., Harshal, J., Anant, P.: *Eur J Pharm Sci* 25, 41-48 (2005).
22. Ambrus, R., Kocbek, P., Kristl, J., Šibanc, R., Rajkó, R., Révész, P.: *Int J Pharm* 381, 153-159 (2009).
23. Ambrus, R., Amirzadi, N.N., Sipos, P., Révész, P.: *Chem Eng Technol* 33(5), 827-832 (2010).
24. Farkas, B., Révész, P.: *Kistályosítástól a tablettázásig*. Universitas Szeged Kiadó, Szeged 125-145 (2007).

[Érkezett: 2011. május 5.]

---

## Tiofén szubsztituált ciklohexánvázás $\gamma$ -oxokarbonsav intramolekuláris ciklizációjának vizsgálata és néhány *N*-heteroaril izoindol származék előállítása

CSENDE FERENC

„Kabay János” Gyógyszertár, 4080 Hajdúnánás, Bocskai u. 22.  
Levelezési cím: csende@nanaskabel.hu

E közleménnyel Dr. Stájer Géza professzor urat 75. születésnapján köszönti a szerző

### Summary

Csende, F.: *Investigation of the intramolecular cyclization of the thiophene substituted cyclohexane skeleton  $\gamma$ -oxocarboxylic acid and synthesis of some N-heteroaryl isoindole derivatives*

From thiophene and *cis*-hexahydrophthalic anhydride the corresponding  $\gamma$ -oxocarboxylic acid was obtained by the Friedel-Crafts reaction, which resulted in new heterocycles with acetic anhydride, Lavesson reagent or urea by intramolecular cyclization. Saturated *N*-heteroaryl isoindoles were prepared directly by the fusion reaction of heteroaromatic amines with the oxocarboxylic acid.

**Key-words:** Friedel-Crafts reaction,  $\gamma$ -oxocarboxylic acid, thiophene, isomerization, *N*-heteroaryl isoindole

### Összefoglalás

Tiofén és *cis*-hexahidroftálsav anhidrid Friedel-Crafts reakciójával a megfelelő *cis*- $\gamma$ -oxokarbonsavat kaptuk, amelynek intramolekuláris ciklizációja ecetsavanhidriddel, Lavesson-reagenssel, illetve karbamiddal új heterociklusokat eredményezett. Heteroaromás aminokkal végzett ömlesztéses reakciókban az oxokarbonsavból közvetlenül állítottunk elő telített *N*-heteroaril izoindolokat.

**Kulcsszavak:** Friedel-Crafts reakció,  $\gamma$ -oxokarbonsav, tiofén, izomerizáció, *N*-heteroaril izoindol

### Bevezetés

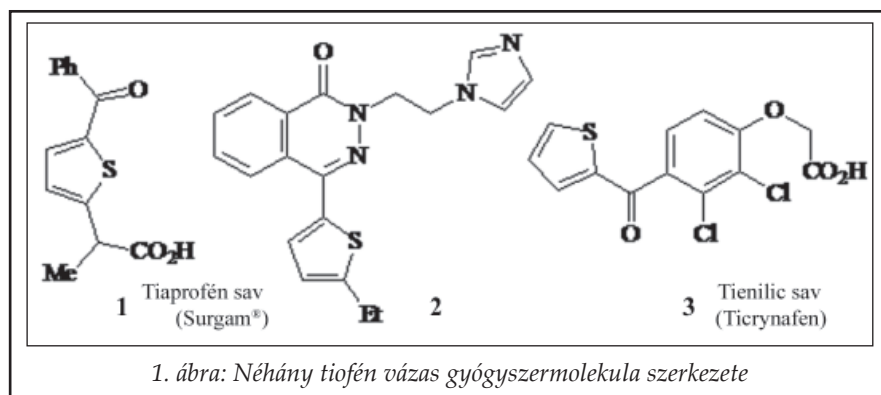
Számos farmakon (bioaktív vegyület) esetében a fenilcsoport cserélhető különböző más bioizosztér aromás gyűrűvel, mint pl. naftalinnal vagy tiofénnel, ezért igen nagyszámú tiofén szubsztituenszt vagy alapvázat tartalmazó molekula rendelkezik valamilyen biológiai hatással, illetve már gyógyszerként van forgalomban [1]. Néhány reprezentatív példa ezek közül az **1. ábrán** látható. Jól ismert az arilpropionsav típusú **1** tiaprofénsav (Surgam®), amely a nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) csoportjába tartozó gyógyszer. Főként az ízületeket és izmokat érintő fájdalmak, gyulladáások (pl. reumatoid arthritisz, oszteoartrózis, lumbágo, fibrozitisz) kezelésére alkalmazzák [2-4]. A 4-tienil-2-imidazoliletil-1(2*H*)-ftalazinon **2** (**1. ábra**) illetve annak a tetrahidro származéka igen hatékony, jól kiegyensúlyozott kettős, tromboxán  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) szintetáz gátló és bronchodilatátor hatással rendelkező vegyületek [5, 6]. A tienilic sav (ticrynafen) **3** vízajtóként bevezetett vegyület, amely egyben húgysavcsökkentő hatással is rendelkezik,

de főként enyhe és közepesen magas vérnyomás kezelésére (esszenciális hipertóniában) alkalmazták [7, 8]. Röviddel bevezetése után, 1982-ben azonban visszavonták a forgalomból egy USA-beli bejelentést követően, mely összefüggésbe hozta a tienilic sav hatását több hepatitiszes esettel [9].

Korábban már számos cikloalkán vázzal kondenzált  $\gamma$ -oxokarbonsavat szintetizáltunk, főként Friedel-Crafts acilezéssel a megfelelő dikarbonsav anhidridekből kiindulva és vizsgáltuk azok reakcióit [10-13]. E reakciók során általában aromás reakciópartnerként a benzolt és annak szubsztituált származékait alkalmaztuk. A fentiek alapján célul tűztük ki, olyan analóg tiofén gyűrűvel szubsztituált telített heterociklusok előállítását, melyek potenciálisan aktívak lehetnek farmakológiai szempontból.

### Eredmények

*cis*-Hexahidroftálsavanhidridet (**4**) 1,2-diklóretánban reagáltatva tiofénnel vízmentes AlCl<sub>3</sub> katalizátor jelenlétében szobahőmérsékleten jó hozam-



gáltattuk apoláros oldószerekben forralva vagy ömlesztéssel jó eredménnyel kapva a megfelelő izoindol származékot, melyek közül néhány figyelemre méltó antiaritmiás hatással rendelkezik [15, 16].

A heteroarilaminok azonban váratlan módon viselkedtek a hasonló körülmények között végzett reakciók során. Néhány esetben 1-5 órás öm-

mal (~84%) diasztereoselektíven állítottuk elő az **5a**  $\gamma$ -oxokarbonsavat (2. ábra). Ebből erősen bázisos közegben 3-4 órán át forralva, majd lehűlés után nátrium sójából sósav oldattal felszabadítva csaknem kvantitatív kitermeléssel kaptuk izomerizációval az **5b** *transz* ketosavat. Ecetsavanhidriddel melegítve (A módszer) az **5a** vegyületet igen jó (85%) hozammal keletkezett a **6a** 3-tiofenil-4,5,6,7-tetrahidro-2-benzofuran-1(3*H*)-on ( $X = O$ ), míg az **5a** ketosavból toluolos oldatban Lawesson reagenssel 2 órányi melegítés után *Noe* és munkatársai módszere alapján [14] (B módszer) kaptuk a **6b** tiolakton ( $X = S$ ) származékot (2. ábra), amelyet oszlopkromatográfiásan tisztítottuk. Fölös mennyiségű karbamiddal kb. 180 °C-on ömlesztve (C módszer) az **5a** kiindulási vegyület a **6c** hexahidroizindolon ( $X = NH$ ) származékot eredményezte 76%-os hozammal kloroformos extrakció után.

Továbbiakban az **5a** tiofenil- $\gamma$ -oxokarbonsav reakcióját vizsgáltuk különböző heterociklusos aminokkal *N*-szubsztituált izoindolonok közvetlen előállítása céljából. Korábban a *cisz*-2-toluoilciklohexán karbonsavat számos alifás és aromás aminnal rea-

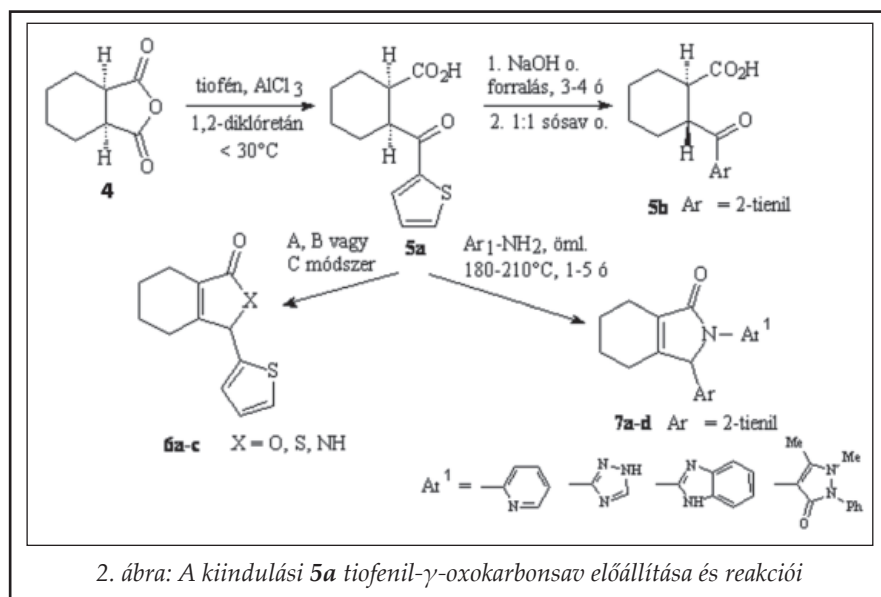
lesztés után közepes vagy jó hozammal (46-79%) keletkezett a megfelelő, részben telített **7a-d** *N*-heteroaril (2-, 3-piridil, 1,2,4-triazolil, 2-benzimidazolil, stb.) izoindol (2. ábra). Más esetben viszont még hosszabb reakció idő után, magasabb hőmérsékleten sem ment végbe a várt ciklokonzenzáció. Így például 2-aminotiazol, 2-aminopirimidin, 6-aminouracil esetén a reakció nem ment végbe. Feltételezésünk szerint ez részben a heteroarilaminok általában csökkent bázicitásával és/vagy az amin-imin tautóméria kialakulásával magyarázható.

### Kísérleti rész

A szintézishez felhasznált vegyületeket a Sigma-Aldrich Kft.-től vásároltuk. A reakciók követéséhez szilikagél vékonyrétegekromatográfiás lemezt ( $F_{254}$ , Merck), míg az oszlopkromatográfiához szilikagél töltetet (Kieselgel 60, Aldrich, szemcseméret 0,063-0,2 mm) használtunk. Az olvadáspontokat Electrothermal készüléken határoztuk meg, az adatok nem korrigáltak. Az infravörös spektrumokat KBr pasztillában Perkin-Elmer 177 spektrométeren, az NMR spektrumokat Bruker Avance DRX 400 készüléken 400 MHz-en ill. 100,62 MHz-en deuterokloroformban ( $CDCl_3$ ), tetrametil-szilán (TMS) belső standard alkalmazásával vetjük fel. A kémiai eltolódásokat ppm-ben ( $\delta$ ) adtuk meg.

### *cisz*-2-(Tiofen-2-ilkarbonil) ciklohexánkarbonsav (**5a**) előállítása

40,50 g (0,304 mol) vízmentes  $AlCl_3$  150 ml 1,2-diklóretános szuszpenziójához 20,97 g



(0,136 mol) 1,2-ciklohexán-dikarbonsav-anhidrid (4) 300 ml 1,2-diklóretános oldatát adjuk, majd 30 perc kevertetés után kb. 1 óra alatt 11,50 g (0,137 mol) tiofén 50 ml 1,2-diklóretános oldatát csepegtetjük hozzá úgy, hogy közben a reakcióelegy hőmérséklete 30 °C alatt maradjon. Szobahőmérsékleten további 2 órán át kevertetjük, majd 250 ml jég-sósav 1:1 elegyébe öntjük óvatosan. A szerves fázist elválasztjuk, vízzel mossuk, vízmentes Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-on szárítjuk, majd bepároljuk. A kapott termék bézs színű por, mennyisége 27,50 g (84,8 %). Op: 173-175 °C (EtOH), IR:  $\nu$  3463, 3094, 2929, 1693, 1653, 1414, 1265, 843, 729 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1,31-1,48 (m, 3H), 1,79-1,85 (m, 2H), 1,93-1,98 (m, 1H), 2,17-2,28 (m, 2H), 2,66 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,1 Hz, J<sub>2</sub> = 3,8 Hz), 3,78 (d, 1H, J = 11,3 Hz), 7,10 (t, 1H, J = 9,6 Hz), 7,59 (d, 1H, J = 11,1 Hz), 7,67 (d, 1H, J = 7,0 Hz) ppm; <sup>13</sup>C-NMR: 22,8; 25,2; 25,8; 29,4; 43,7; 45,7; 128,6; 132,3; 133,8; 180,4; 195,5 ppm.

*transz-2-(Tiofen-2-ilkarbonil)ciklohexánkarbonsav (5b) előállítása*

4,76 g (20 mmol) 5a oxokarbonsavat 1,60 g (40 mmol) NaOH és 20 ml víz elegyében oldunk, majd az elegyet 3-4 órán át forraljuk. Lehűlés után pH ~ 3-ra állítjuk hűtés közben az oldatot 1:1 sósavval, és a kivált anyagot szűrjük, majd átkristályosítjuk. Termelés 4,59 g (96,5 %), op: 183-184°C (EtOH). IR:  $\nu$  3442, 3086, 2938, 1702, 1648, 1416, 1255, 1208, 903, 722 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1,33-1,48 (m, 4H), 1,84-1,87 (m, 2H), 2,11 (m, 1H), 2,19 (d, 1H, J = 9,5Hz), 2,90 (m, 1H), 3,36 (m, 1H), 7,12 (t, 1H, J = 8,7Hz), 7,63 (d, 1H, J = 10,9 Hz), 7,75 (d, 1H, J = 7,8 Hz) ppm; <sup>13</sup>C-NMR: 23,1; 25,3; 25,8; 27,8; 42,8; 44,1; 128,7; 133,1; 134,5; 181,4; 194,9 ppm.

*3-(Tiofen-2-il)-4,5,6,7-tetrahidro-2-benzofurán-1(3H)-on (6a) előállítása*

2,38 g (10 mmol) 5a oxokarbonsavat 20 ml ecetsavanhidridben oldva 3 órán át forralunk, majd az elegyet csökkentett nyomáson bepároljuk és a kapott olajszerű maradékot éterben oldva hűtőben állni hagyjuk. A kivált kristályokat szűrjük, szárítjuk. Termelés 1,90 g (86,3 %), op: 75-77°C (Et<sub>2</sub>O). IR:  $\nu$  2932, 1738, 1675, 1292, 1029, 935, 714 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1,75 (m, 4H), 2,20-2,30 (m, 4 H), 5,96 (s, 1H), 7,00 (m, 1H), 7,10 (m, 1H), 7,35 (d, 1H, J = 7,5 Hz) ppm; <sup>13</sup>C-NMR: 20,6; 21,4; 22,1; 23,9; 77,7; 125,9; 127,7; 127,9; 128,1; 163,2; 173,4 (C=O) ppm.

*3-(Tiofen-2-il)-4,5,6,7-tetrahidro-2-benzotiofén-1(3H)-on (6b) előállítása*

1,13 g (4,76 mmol) 5a oxokarbonsavat oldunk 15 ml absz. toluolban, majd hozzáadunk 1,15 g (2,85 mmol) Lawesson-reagenst és olajfürdőn 2 órán át kb. 105 °C-on tartjuk az elegyet, majd lehűtve szűrjük és az oldatos részt NaHCO<sub>3</sub>-oldattal kétszer mossuk, bepároljuk, végül oszlopkromatográfián tisztítjuk (szilikagél töltet, n-hexán/Et<sub>2</sub>O = 15/1 eluens) a terméket. Termelés 0,38 g (34,2 %), világosbarna olajszerű folyadék. IR:  $\nu$  2932, 2861, 1754, 1679, 1491, 1297, 1025, 700, 631 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1,61-1,78 (m, 4H), 2,05 (m, 1H), 2,16-2,37 (m, 3H), 5,69 (s, 1H), 7,03-7,11 (m, 2H), 7,45 (d, 1H, J = 7, 4Hz) ppm; <sup>13</sup>C-NMR: 21,1; 21,7; 25,2; 28,6; 50,3; 125,3; 126,7; 127,4; 140,8; 154,6, 185,7 (C=O) ppm.

*3-(Tiofen-2-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-izoindol-1-on (6c) előállítása*

2,38 g (10 mmol) 5a oxokarbonsavat elporítunk 1,80 g (30 mmol) karbamiddal, majd olajfürdőn 1 órán át kb. 180 °C-on tartjuk az elegyet. Lehűtve a reakcióelegyet 15 ml vizet adunk hozzá és kloroformmal (3x20 ml) extraháljuk. A szerves fázist 10%-os NaOH oldattal, majd vízzel mossuk, vízmentes Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-on szárítjuk, majd bepároljuk. Termelés 1,68 g (76,6 %), op: 164-166°C (EtOH). IR:  $\nu$  3451, 3195, 2927, 1673, 1434, 1283, 1137, 718 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1,21-1,25 (m, 1H), 1,68 (m, 3H), 2,06-2,11 (m, 2H), 2,25 (s, br, 2H), 5,24 (s, 1H), 6,79 (s, 1H, NH), 6,95-7,00 (m, 2H), 7,26 (m, 1H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR: 20,6; 22,3; 22,6; 23,8; 59,6; 126,2; 126,3; 127,5; 131,4; 141,4; 157,1; 174,8 (C=O) ppm.

*2-(Heteroaril)-3-(tiofen-2-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-izoindol-1-onok (7a-d) előállítása. Általános módszer*

2,38 g (10 mmol) 5a oxokarbonsavat és 12 mmol heteroaril aminnal megömlesztünk 180-210 °C-on és 1-5 órán át ezen a hőmérsékleten tartjuk az elegyet keverés közben. Kihűlés után a terméket kloroformban oldjuk, majd oszlopkromatográfián tisztítjuk.

*2-(Piridin-2-il)-3-(tiofen-2-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-izoindol-1-on 7a*

Termelés 2,32 g (78,5 %), op: 128-130 °C (Et<sub>2</sub>O). IR:  $\nu$  3414, 2926, 1696, 1585, 1470, 1348, 777 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1,73 (m, 4H), 2,14-2,34 (m, 4H), 6,28 (s, 1H), 6,90 (m, 2H) 7,08-7,14 (m, 2H), 7,63 (m, 1H) 8,16

(d, 1H) 8,23 (m, 1H) ppm;  $^{13}\text{C}$ -NMR: 20,7; 22,3; 22,6; 23,9; 61,9; 115,6; 125,6; 127,2; 133,6; 138,1; 148,1; 156,5; 171,0 ppm.

3-(Tiofen-2-il)-2-(1H-1,2,4-triazol-3-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-izoindol-1-on **7b**

Termelés 1,61 g (56,2 %), op: 203-205 °C (EtOH-Et<sub>2</sub>O). IR:  $\nu$  3196, 2938, 1707, 1694, 1530, 1396, 1069, 756 cm<sup>-1</sup>;  $^1\text{H}$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1,76 (m, 4H), 2,16-2,37 (m, 4H), 5,92 (s, 1H), 6,98 (s, 1H), 7,23 (m, 2H), 7,67 (s, 1H), 11,95 (s, br, 1H, NH) ppm;  $^{13}\text{C}$ -NMR: 20,5; 22,1; 22,4; 24,1; 62,9; 126,7; 127,7; 128,5; 130,5; 149,9; 159,5 ppm.

2-(1H-Benzimidazol-2-il)-3-(tiofen-2-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-izoindol-1-on **7c**

Termelés 1,62 g (48,3 %), op: 225-227 °C (EtOH). IR:  $\nu$  3072, 2930, 1699, 1578, 1366, 1274, 785 cm<sup>-1</sup>;  $^1\text{H}$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1,64-1,74 (m, 4H), 2,06-2,19 (m, 4H), 5,85 (s, 1H), 6,86 (m, 1H), 6,95 (m, 3H), 7,12 (m, 2H), 7,62 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 10,76 (s, br, 1H, NH) ppm;  $^{13}\text{C}$ -NMR: 20,6; 21,9; 22,2; 23,5; 63,2; 115,2; 122,3; 125,6; 126,5; 127,3; 132,8; 136,6; 139,1; 148,7; 163,2 ppm.

2-(2-Fenil-1,5-dimetil-3-oxo-2,3-dihidro-1H-pirazol-4-il)-3-(tiofen-2-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-izoindol-1-on **7d**

Termelés 2,77 g (68,4 %), op: 190-192 °C (EtOH-Et<sub>2</sub>O). IR:  $\nu$  3075, 2932, 1701, 1660, 1595, 1497, 1346, 1284, 1111, 758, 713 cm<sup>-1</sup>;  $^1\text{H}$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1,74 (m, 4H), 2,09 (s, 3H), 2,16 (m, 2H), 2,33 (m, 2H), 3,03 (s, 3H), 6,18 (s, 1H), 6,90 (m, 1H), 6,99 (m, 1H), 7,23 (m, 1H), 7,30 (t, 1H, J = 2,3 Hz, J = 2,0 Hz), 7,34 (m, 2H), 7,43 (m, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$ -NMR: 11,9; 20,8; 22,2; 22,5; 23,9; 36,3; 62,0; 77,1; 124,7; 126,1; 127,2; 128,1; 129,5; 131,5; 140,5; 152,6; 156,2 ppm.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok *dr. Miklós Ferencnek* az általa nyújtott szakmai segítségért, *dr. Jekő Józsefnek* IR spektrumok felvételéért, valamint a SZTE Gyógyszerkémiai Intézet NMR laboratórium dolgozóinak az NMR mérések elvégzéséért.

## IRODALOM

1. Press, J. B.: Biologically Active Thiophene Derivatives Revisited: 1983–1988. In: Gronowitz, S. (ed): Chemistry of Heterocyclic Compounds: Thiophene and Its Derivatives, Part Four, Vol. 44. Wiley-Interscience, New York, 1991. pp. 397–502.
2. Plosker, G.L., Wagstaff, A. J.: Drugs, 50, 1050-1075 (1995).
3. Davies, N. M.: Clinical Pharmacokinetics, 31, 331-347 (1996).
4. Droux, S., Gigliotti, G., Joly, P., Perrier, F., Vincent, V., Robson, P. A., Williamson, R. A., Petit, F.: Eur. J. Med. Chem., 32, 159-164 (1997).
5. Yamaguchi, M., Kamei, K., Koga, T., Akima, M., Kuroki, T., Ohi, N.: J. Med. Chem., 36, 4052–4060 (1993).
6. Yamaguchi, M., Koga, T., Kamei, K., Akima, M., Kuroki, T., Hamana, M., Ohi, N.: Chem. Pharm. Bull., 42, 1601-1604 (1994).
7. Thuillier, G., La Forest, J., Carion, B., Bessin, P., Bonnet, J., Thuillier, J.: Eur. J. Med. Chem., 9, 625-633 (1974).
8. Rosendorff, C., S. Afr. Med. J., 57, 1069-1071 (1980).
9. Manier, J. W., Chang, W. W., Kirchner, J. P., Beltaos, E.: Am. J. Gastroenterol., 77, 401–404 (1982).
10. Stájer, G., Csende, F., Bernáth, G., Sohár, P.: Heterocycles, 37, 883-890 (1994).
11. Stájer, G., Csende, F., Bernáth, G., Sohár, P., Szúnyog, J.: Monatsh. Chem., 125, 933-944 (1994).
12. Csende, F., Szabó, Z., Heterocyclic Commun., 2, 453-461 (1996).
13. Miklós, F., Csende, F., Stájer, G., Sohár, P., Sillanpää, R., Bernáth, G., Szúnyog, J.: Acta Chem. Scand., 52, 322-327 (1998).
14. Noe, C. R., Knollmüller, M., Wagner, E., Völlenkle, H.: Chem. Ber., 118, 3299-3310 (1985).
15. Csende, F., Szabó, Z., Stájer, G.: Heterocycles, 36, 1809-1821 (1993).
16. Csende, F., Porkoláb, A., Matiz, K., Szabó, Z., Csorvássy, I., Frank, L.: Sci. Pharm., 67, 149-158 (1999).

[Érkezett: 2011. június 1.]



## Magyarországi *Centaurea* fajok gyógyászati perspektívája a tudományos adatok tükrében

CSUPOR DEZSŐ\*, PETÁK ZSOLT, HOHMANN JUDIT

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Farmakognóziái Intézet, Szeged, Eötvös u. 6. – 6721

\*Levelezési cím: csupor.dezso@farmakognozia.hu

### Summary

Csupor, D., Peták, Zs., Hohmann J.: *Medicinal perspective of Hungarian Centaurea species in the light of scientific evidences*

The genus *Centaurea* comprises 300-350 species, 22 of which are native to Hungary. Several species have been applied in traditional medicine, however, the rationale of their application has been analyzed only in few studies. The decoction of the aerial parts of *Centaurea sadleriana* Janka, a species native to Hungary, has been used in Hungarian folk medicine for the healing of wounds of livestock. Its ethnomedicinal use was reported first by our research group. There is no data available for similar application of other members of the genus native to Hungary.

This paper summarizes the phytochemical and pharmacological data of all Hungarian *Centaurea* species (*C. apiculata*, *C. arenaria*, *C. banatica*, *C. biebersteinii*, *C. calcitrapa*, *C. cyanus*, *C. diffusa*, *C. grinensis*, *C. indurata*, *C. jacea*, *C. macroptilon*, *C. montana*, *C. nigrescens*, *C. pannonica*, *C. phrygia*, *C. rhenana*, *C. sadleriana*, *C. salonitana*, *C. scabiosa*, *C. solstitialis*, *C. stenolepis*, *C. triumfettii*), focusing on compounds and activities relevant to the anticipated wound healing effect. Certain compounds (eg. sesquiterpene lactones, flavonoids, polyacetylenes) are characteristic to the genus, and taking into account that they may play role in the anti-inflammatory and wound healing effect, it is plausible that other *Centaurea* species beyond *C. sadleriana* would have wound healing promoting effect. Since *C. sadleriana* is an endangered species native only to the Carpathian Basin, the investigation of wound healing effect of more prevalent species is scientifically warranted.

**Keywords:** *Centaurea sadleriana*, *Centaurea*, anti-inflammatory, wound healing, COX, 5-LOX

### Összefoglalás

A *Centaurea* nemzetség 300-350 fajt foglal magába, ezek közül 22 honos Magyarországon. Több fajt alkalmaznak a népi gyógyászatban, de a felhasználás racionalitását viszonylag kevés vizsgálatban tanulmányozták. A *Centaurea sadleriana* Janka Magyarországon őshonos, kizárólag a Kárpát-medencében előforduló faj. Föld feletti részéből készített főzetét tradicionálisan alkalmazzák használatok sebeinek gyógyítására a Dél-Alföldön. Ezt a népi gyógynövény-alkalmazást elsőként kutatócsoportunk írta le. A genus más fajainak ilyen jellegű alkalmazása nem ismert.

Jelen közleményben összefoglaljuk a *Centaurea* nemzetség Magyarországon honos fajait ( *C. apiculata*, *C. arenaria*, *C. banatica*, *C. biebersteinii*, *C. calcitrapa*, *C. cyanus*, *C. diffusa*, *C. grinensis*, *C. indurata*, *C. jacea*, *C. macroptilon*, *C. montana*, *C. nigrescens*, *C. pannonica*, *C. phrygia*, *C. rhenana*, *C. sadleriana*, *C. salonitana*, *C. scabiosa*, *C. solstitialis*, *C. stenolepis*, *C. triumfettii*) kapcsolatban rendelkezésre álló fitokémiai és farmakológiai adatokat, a sebgyógyító hatás szempontjából fontos aspektusokra fókuszálva. Bizonyos vegyülettípusok (pl. szeszkviterpén-laktonok, flavonoidok, poli-acetilének) előfordulását a legtöbb fajban leírták, és tekintve, hogy ezeknek szerepe lehet a dokumentált gyulladáscsökkentő, sebgyógyulást gyorsító hatásban, elképzelhető, hogy a rokon fajok is rendelkeznek ilyen biológiai aktivitással. Mivel a *C. sadleriana* csak a Kárpát-medencében honos, védett növény, perspektivikusnak tűnik más, szélesebb körben előforduló *Centaurea* fajok sebgyógyító hatásának vizsgálata a humán gyógyászati alkalmazás reményében.

**Kulcsszavak:** *Centaurea sadleriana*, *Centaurea*, gyulladáscsökkentő, sebgyógyulás, COX, 5-LOX.

### 1. Bevezetés

A tradicionális gyógynövények biológiailag aktív komponenseit gyakran alkalmazzák a gyógyszeriparban gyógyszerek aktív hatóanyagaiként vagy vezérmolekulaként a gyógyszerfejlesztésben. A népi orvoslás számos értékes hatóanyagot szolgáltatott a gyógyászat számára, és ez a folyamat napjainkban is tart. Jóllehet az Európában alkalmazott hagyományos gyógynövények jelentős részét fitokémiaiailag és farmakológiailag is alaposan ta-

nulmányozták, még ma is jelentős azon fajok száma, amelyekkel kapcsolatban nem állnak rendelkezésre tudományos vizsgálati adatok. Ugyanakkor meglehetősen ritka, hogy a XXI. században egy teljesen új, korábban a szakirodalomban nem közölt népi gyógynövény-alkalmazásra derüljön fény.

A hazánkban őshonos *Centaurea sadleriana* Janka kizárólag a Kárpát-medencében előforduló faj, amelynek föld feletti részéből készített főzetet tradicionálisan alkalmaznak használatok sebeinek gyógy-

gyítására a Dél-Alföldön. Ezt a népi gyógynövény-alkalmazást elsőként kutatócsoportunk írta le.

Bár a genus fajai közül számosat alkalmaztak gyógynövényként is, a *Centaurea* nemzetség fajai nem tartoznak az európai népi gyógyászat fontosabb növényei közé. Az imola fajokat leggyakrabban szempanaszok (*C. calcitrapa*, *C. cyanus*), láz (*C. cyanus*, *C. jacea*, *C. solstitialis*), nőgyógyászati problémák (*C. cyanus*), sebek, bőrgyógyászati betegségek (*C. calcitrapa*, *C. cyanus*, *C. jacea*) és emésztési problémák (*C. calcitrapa*, *C. cyanus*) kezelésére használták [1, 2]. Erdélyben a *C. cyanus* vizelethajtó teák komponenseként [3], vizes kivonatát szemgyulladás és fertőzések kezelésére alkalmazták [4]. A hazai tradicionális gyógyászatban leggyakrabban használt faj a *C. cyanus*, valószínűleg a széleskörű elterjedése miatt. Számos hazai faj gyógyászati felhasználását azonban ez idáig nem dokumentálták.

A *Centaurea* nemzetség 300-350 fajt foglal magába, ezek közül 22 honos Magyarországon. A fajok fontos határozójegye a fészekpikkely, több faj között csak ennek alakja alapján lehet különbséget tenni. A faji rangú imolapopulációk ráadásul könnyen kereszteződnek, gyakoriak az intermedier jellegű hibridek. A fészekvirágzatúak családjába tartozó nemzetség tagjai közül Magyarországon területén a következő fajok találhatóak meg:

- *C. apiculata* Ledeb. subsp. *spinulosa* Rochel (tövisek imola)
- *C. arenaria* M. B. ex Willd. (homoki imola)
- *C. banatica* Rochel (bánsági imola)
- *C. biebersteinii* DC. (útszéli imola)
- *C. calcitrapa* L. (úti imola)
- *C. cyanus* L. (kék búzavirág)
- *C. diffusa* Lam. (terpedt imola)
- *C. grinensis* subsp. *fritschii* Hay. (dunántúli imola)
- *C. indurata* Janka (borzas imola)
- *C. jacea* L. (réti imola)
- *C. macroptilon* Borb. (tollas imola)
- *C. montana* L. subsp. *mollis* (W. et K.) Hay. (szirti imola)
- *C. nigrescens* Willd. (feketés imola)
- *C. pannonica* (Heuff.) Simk. (magyar imola)
- *C. phrygia* L. subsp. *pseudophrygia* C. A. Mey. (parókás imola)
- *C. rhenana* Bor. (nyugati imola)
- *C. sadleriana* Janka (budai imola)
- *C. salonitana* Vis. (dalmát imola)
- *C. scabiosa* L. (vastövű imola)
- *C. solstitialis* L. (sáfrányos imola)
- *C. stenolepis* Kern. (pókhálós imola)
- *C. triumfettii* All. (tarka imola)

Közleményünkben a hazánkban honos *Centaurea* fajok tradicionális gyógyászati felhasználásáról, a velük kapcsolatos botanikai, farmakológiai, fitokémiai ismeretekről és adatokról adunk összefoglalást, különös tekintettel a sebgyógyító hatás szempontjából lényeges adatokra.

## 2. Fitokémiai áttekintés

A *Centaurea* nemzetség legjellegzetesebb vegyületei a szeszkviterpén-laktonok. A genusra elsősorban a gvajanolid- és germakranolid típusú vegyületek a jellemzőek, de elemanolidok és eudezmanolidok előfordulásáról is beszámoltak. További fontos és jellegzetes összetevők az acetilének, a flavonoidok és egyéb fenolos komponensek [5]. A hazánkban honos *Centaurea* fajok többségét kevésbé vizsgálták, azonban néhány növényt (pl. *C. calcitrapa*, *C. cyanus*, *C. diffusa*, *C. solstitialis*) fitokémiai megfigyelés részletekkel tanulmányozták.

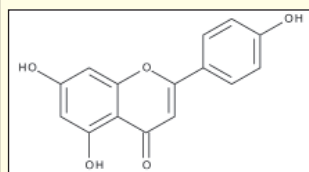
## 3. Farmakológiai áttekintés

A sebgyógyulás meglehetősen komplex folyamat, befolyásolására elvileg több támadásponton is lehetséges. A bőr sérülése esetén a dermális és epidermális szövetek regenerációja gyulladásszerű fázissal kezdődik, melyet egy proliferatív és remodelling fázis követ [6]. Néhány, sebgyógyítás elősegítésére használt gyógynövény (pl. kamilla) gyulladásgátló aktivitással is rendelkezik. A gyulladásszerű fázis csökkenése gyorsíthatja a sebgyógyulást, azonban a gyulladásgátló aktivitás nem előfeltétele a sebgyógyító hatásnak.

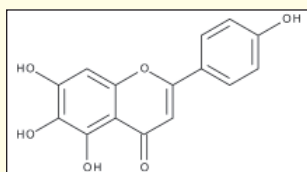
Számos *Centaurea* faj gyulladáscsökkentő hatását dokumentálták különböző kísérleti modellekben. Az alábbiakban bemutatandó hazai fajokon kívül figyelemre méltó antiflogisztikus hatást találtak a *C. hierapolitana*, *C. calolepis*, *C. cadmea* [7] és a *C. chilensis* [8] fajok esetén. A gyulladáscsökkentő hatást *in vitro* és állatkísérletek igazolták, azonban a hatás mechanizmusa nem ismert. Jóllehet a gyulladáscsökkentő hatás tesztelésére alkalmazott COX-1, COX-2 és 5-LOX enzimgátlás mérésén alapuló tesztek ma már elterjedtek, a *Centaurea* fajok hatásosságát ezekben a rendszerekben nem vizsgálták.

A gyulladáscsökkentő hatásért felelős anyagok nem ismertek minden kétséget kizáróan, de a vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy az aktivitásban szerepe lehet a növények szeszkviterpén-lakton- és poliszacharidtartalmának [8-10].

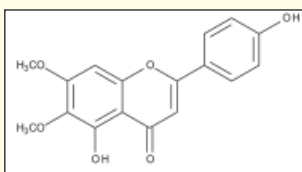
### Flavonoidok



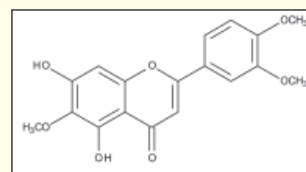
apigenin (1)



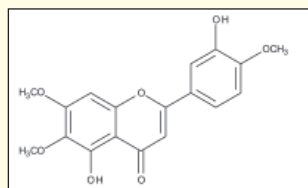
szkutellarin (2)



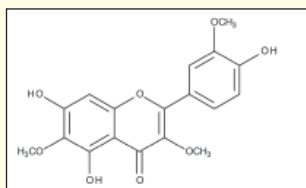
cirzimaritin (3)



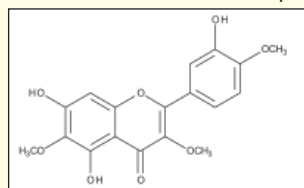
eupatilin (4)



eupatorin (5)

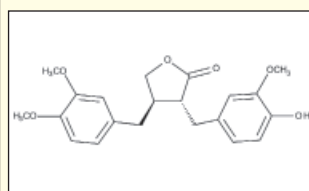


jaceidin (6)

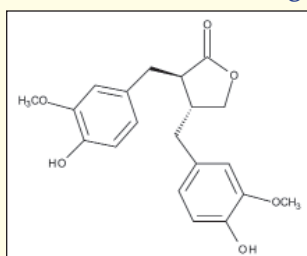


centaureidin (7)

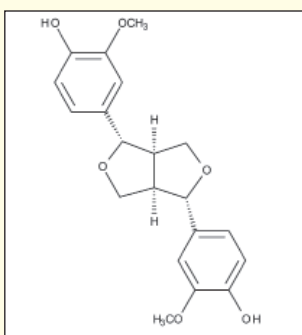
### Lignánok



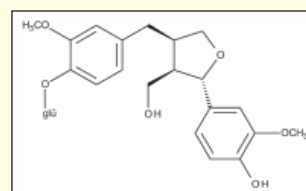
arkcigenin (8)



matairezinol (9)

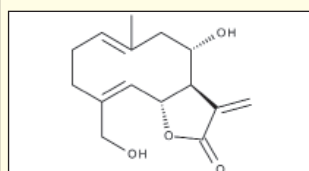


pinorezinol (10)

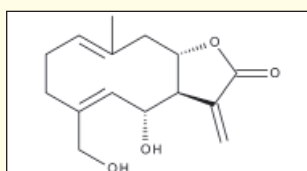


berchemol (11)

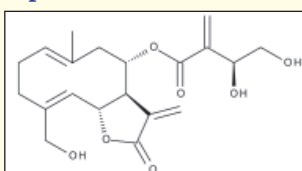
### Szeszkviterpének



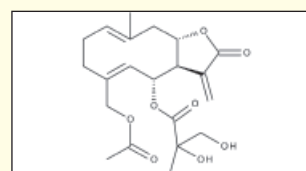
szalonitenolid (12)



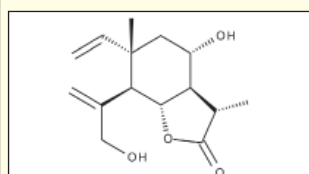
szalonitolid (13)



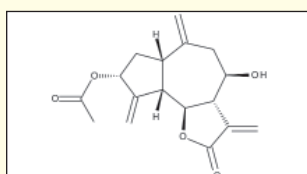
knicin (14)



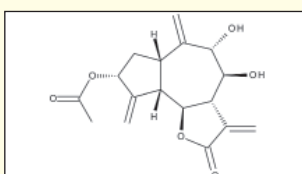
szkabiolid (15)



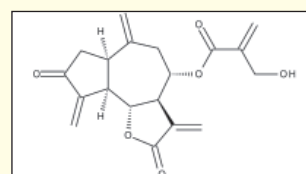
melitenzin (16)



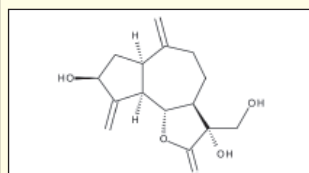
sinaicin (17)



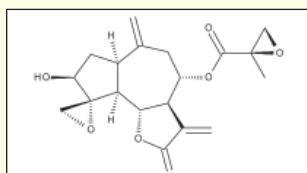
szalograviolid A (18)



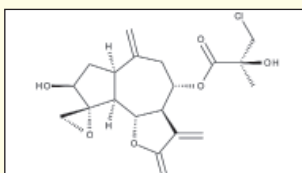
cinaropikrin (19)



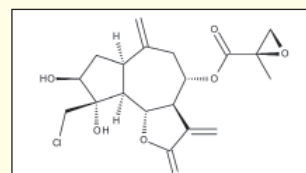
szolsztitalin A (20)



repin (21)

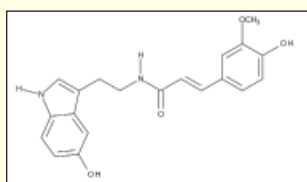


akroptilin (22)

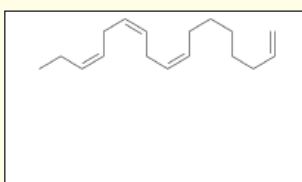


szolsztitiolid (23)

### Egyéb vegyületek



moschamin (24)



apotaxen (25)

1. ábra: Centaurea fajokra jellemző vegyületek

Ezt a feltételezést erősíti, hogy hasonló vegyületeket tartalmazó fajok (pl. a szeszkviterpén-laktonokban gazdag *Matricaria recutita* és *Achillea millefolium*) gyulladáscsökkentő hatása és a vegyületek ciklooxigenáz-gátló aktivitása széles körben ismert és igazolt [11]. A *Centaurea* fajok jellegzetes vegyületei közül a poliacetilének is szerepet játszhatnak a gyulladáscsökkentő hatásban, hiszen egyes ilyen típusú növényi anyagok antiflogisztikus hatása bizonyított [12].

Mindezen túl, a sebgyógyulás gyorsításához hozzájárulhat a növények antibakteriális és antifungális hatása is, amelyet számos itt nem ismertetett [13-16], és több, a közlemény tárgyát képező imola fajnál is leírtak.

#### 4. A hazai fajokkal kapcsolatos vizsgálati adatok

A továbbiakban a hazánkban honos *Centaurea* fajokkal kapcsolatban elérhető botanikai, fitokémiai és farmakológiai ismereteket foglaljuk össze. Több fajjal (*C. apiculata*, *C. banatica*, *C. biebersteinii*, *C. grinensis*, *C. indurata*, *C. macroptilon*, *C. rheanan*, *C. spinulosa*, *C. triumfettii*) kapcsolatban nem állnak rendelkezésre fitokémiai-farmakológiai adatok a szakirodalomban.

##### 4.1. *C. arenaria*

###### 4.1.1. Fitokémiai és farmakológiai vizsgálatok

Hegnauer átfogó kemotaxonomiai munkájában említést tesz a növényből izolált, 102-103 °C olvadáspontú sárga színű alkaloidról, annak szerkezetét azonban nem közölte [5].

A *C. arenaria* fitokémiai jellemzőiről az első átfogó munka az SZTE Farmakognóziái Intézetében készült. Az Intézet kutatócsoportja a *C. arenaria* hatáskövetett frakcionálását végezte el. A növény föld feletti részének *n*-hexánnal, kloroformmal és a vizes metanollal készült kivonatainak antiproliferatív hatását méhnyak adenokarcinóma (HeLa), emlő adenokarcinóma (MCF7) és a bőr epidermoid karcinóma (A431) sejtvonalakon MTT assay segítségével vizsgálták. A kloroformos kivonat jelentős tumorsejt-proliferációt gátló aktivitást mutatott (>85% 10 µg/ml koncentráció esetén), ezért ezzel az extraktummal további részletes fitokémiai vizsgálatot végeztek. A növényből azonosított flavonok (a metoxicsoportot nem tartalmazó apigenin (1), a 3-as helyzetben metoxicsoportot tartalmazó izokempferid, a háromszorosan metoxilezett eupatorin (5), eupatilin (4), és 3'-metil-eupatorin), lignánok (arkcigenin

(8), arkciiin és matairezínol (9)), a szeszkviterpén-laktonok germakranolid sorozatába tartozó knicin (14), szerotonin-konjugátum indol alkaloidok (moschamin (24) és a *cisz*-moschamin), β-amirin és a β-szitoszterin-3-*O*-β-*D*-glükopiranozid biológiai hatását is vizsgálták. A mérsékeltén aktív vegyületek (izokempferid és moschamin (24)) mellett az apigenin (1), eupatorin, arkcigenin (8), arkciiin, matairezínol (9) a knicin (14) jelentősebb daganatellenes hatást mutatott a vizsgált sejtvonalakon. Mivel ez volt az első részletes fitokémiai vizsgálat a növényvel kapcsolatban, az összes itt leírt vegyületet elsőként mutatták ki a fajból [17].

##### 4.2. *C. calcitrapa*

###### 4.2.1. Fitokémiai vizsgálatok

A *C. calcitrapa* jellegzetes komponensei a germakranolid szeszkviterpének, amelyek közül a fő komponensek knicin (=centaurin) (14) (0,06%), továbbá a knicin-4'-acetát (0,006%), egy rokon szeszkviterpén-lakton, a szalonitenolid (12) (0,0008%), a 4,9-dioxo-bizabol-2,7(14),10-trién (0,0004%) és a 4,9-dioxo-bizabol-2,7*E*,10-trién (0,0002%). Flavonjai közül a fő komponens az 5,7-dihidrox-6,3',4'-trimetoxiflavon (0,016%). Egyéb tartalomanyagai: apotaxen (25) (poli-én, 0,002%), szkvalén (0,002%), fitol (0,002%), taraxaszterol (0,016%) [1].

A *Centaurea calcitrapa* föld feletti részéből Marco és mtsai a germakranolidok közé tartozó knicint (14), knicin-4'-acetátot, két új germakranolid-típusú vegyületet, a 11α,13- és 11β,13-dihidroszalonitenolidot (12), továbbá egy elemánolidot, a melitenzint (16) és lignánokat (arkcigenint, pinorezínolt (10) és 7'(S)-hidrox-arkcigenint) mutattak ki. Utóbbi komponenst először ebből a növényből írták le [18].

A *C. calcitrapa* virágzatából vízgőz-desztillációval nyert illóolajból GC és GC-MS módszerrel 66 komponenst azonosítottak. Az illóolaj komponenseinek nagy része zsírsav (32,8%, fő komponens: 9,12-oktadekadiénsav) és szénhidrogén (32,3%, fő komponens: trikozán). A szeszkviterpének részben szénhidrogénként (10,1%, 14 vegyület), részben oxidált származékként (2%, 4 vegyület) voltak meghatározhatók [19].

A *C. calcitrapa* föld feletti részének vízgőz-desztillációval kinyert illóolajából (0,01% kitermelés) GC-FID és GC/MS technikákkal több mint 60 komponenst (az összes összetevő 78%-a) azonosítottak. A fő összetevők β-kariofillén (5,3%), 6,10,14-trimetil-2-pentadekanon (4,7%), (Z)-β-farnezen (4,2%)

és a heptanal (4,2%) voltak. Ezek az eredmények jelentős kvalitatív és kvantitatív különbségeket mutatnak a korábbi, a *Centaurea calcitrapa*ról közölt adatokhoz képest [20].

*Ahmed és mtsai* a növény föld feletti részének vizsgálata során cukrok (szthióz, raffinóz, melibióz, szacharóz, galaktóz és fruktóz) és nitrogéntartalmú vegyületek (kolin, stizolfin) kimutatásáról számoltak be [21].

A növény magolájának zsírsavösszetételére jellemző a magas telítetlenzsírsav-tartalom (65-74% 18:2; telített zsírsavak aránya <10%). Az olajban csak nyomokban találhatóak három telítetlen kötet tartalmazó zsírsavak [22].

A növényből a szkutellarin nevű flavon-glikozidot mutatták ki *Plouvier és mtsai* [23].

A növényből aszpartát-proteinázokat is azonosítottak [24-26]. Az aszpartát-proteinázokat tartalmazó növényeket elterjedten alkalmazzák sajtkészítés során tejoltóként. Bár *Centaurea* fajok ilyen célú felhasználása nem ismert, aktivitásuk jellege és mértéke alapján a *C. calcitrapa* magjainak kivonata [26] vagy a növény sejtenyészetéből kinyert enzimek [27] alkalmasak lehetnek ilyen célú felhasználásra.

#### 4.2.2. Farmakológiai vizsgálatok

A gyógynövény kivonatát váltóláz kezelésére, gyomorhajrára, vízajtóként és néha szemészeti problémák kezelésére is alkalmazzák a népi gyógyászatban. A hatásosság nem igazolt az előbbi indikációkban [1]. Olaszország egyes tájain (Szardínia szigetén) malária kezelésére [28], sőt, dél-olasz albán (Arbëreshë) településeken táplálék-növényként is felhasználják [29].

Egy vizsgálatban 27, olaszországi albánok által fogyasztott táplálék-növény antioxidáns hatását vizsgálták. A növények, köztük a *C. calcitrapa* szabadgyökfogó aktivitását a DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) teszttel, *in vitro* lipidperoxidációt gátló hatását marha agysejteken tanulmányozták, ezen kívül xantin-oxidáz gátló hatást is vizsgálták. Mindkét antioxidáns vizsgálatban markáns hatásnak mutatkozott a *C. calcitrapa* virága [30].

### 4.3. *C. cyanus*

#### 4.3.1. Fitokémiai vizsgálatok

A *C. cyanus* virágdrogját teakeverékek színezésére használják. A drog jellegzetes anyagai az antociánok és a flavonoidok [1]. A fitokémiai vizsgálatok jelentős része a növény pigmentjének elemzésére irányult. A *C. cyanus* kék színéért felelős

pigmentkomplex a cianidin-3-O-(6-O-szukcinil-β-D-glükózil)-5-O-β-D-glükózid (= szukcinilcianin, = centaurocianin) [1]. A kék búzavirágban levő antociánint eredetileg cianidin-3,5-diglükózidként, egyszerűbb nevén cianinként azonosították. *Takeda és mtsai* igazolták, hogy a fő antociánin a növényben nem a cianin, hanem a cianidin-3-O-(6-O-szukcinil-β-D-glükózil)-5-O-β-D-glükózid [31]. Az azonban bizonyítást nyert, hogy a centaurocianin eléggé instabil, és cianinra (= cianidin-3,5-diglükózid) bomlik le [1]. Az antociánin pigment semleges pH-jú közegben bíborszínű, azonban a pH változására meglehetősen érzékeny, színt könnyen elveszti [32].

A centaurocianint és az apigenin-4'-O-(6-O-malonil-β-D-glükózid)ot elsőként *Tamura és mtsai* azonosították a *C. cyanus* kék virágzatának komplex pigmentjéből [33]. A kék búzavirágban a színanyag egy stabil kék komplex pigmentként, protociánin formájában található meg. Rekonstrukciós vizsgálatok során nagy tisztaságú centaurocianint, flavon-glikozidot [apigenin-7-O-glükuronid-4'-O-(6-O-malonil-glükózid)], fémionokat (vasat és magnéziumot) használtak. A vizsgálatok egy további faktor, a kalcium jelenlétének szükségességét mutatták a protociánin kialakulásához. UV-VIS- és CD-spektroszkópiával igazolták, hogy a rekonstruált protociánin megegyezett a természetből származóval [34].

A *C. cyanus* rózsaszín virágaiból színanyagként a pelargonidin-3-(6"-szukcinil-glükózid)-5-glükózidot azonosították [35].

A növény virágzatának fő poliszacharid komponensei a galakturonsav, az arabinóz, a glükóz, a ramnóz és a galaktóz [36].

Hét, Törökországban honos *Centaurea* faj, köztük a *C. cyanus* illóolajának gázkromatográfiával (GC) és gázkromatográfiás-tömegspektrometriával (GC/MS) technikával végzett vizsgálata során 158 különböző komponenst azonosítottak. A *C. cyanus* olajának fő komponense a karvakrol volt [37]. A növény szilárd fázisú mikroextrakcióval kinyert illóolajából transz-β-farnezenként azonosítottak [38].

A növény metanolos kivonatából preparatív HPLC-vel négy indol-alkaloidot izoláltak, a moschamint (**24**), a *cisz*-moschamint, a centciamint és a *cisz*-centciamint [39].

HPTLC-vel a növény kivonatából tiofeneket mutattak ki [40].

A növényt a virágzó periódusában gyűjtve két kumarin típusú komponenst izoláltak: a szkopoletint és az umbelliferont. Ugyanezeket a ve-

gyületeket még a *C. pseudomaculosa* Lam., *C. scabiosa* L. és a *C. solstitialis* L.-ben is kimutatták. Más fajoknál (*C. phrygia* L., *C. pseudophrygia* C. A. Mey, *C. jacea* L., *C. squarrosa* Willd) csak a szkopoletint detektálták [41].

A kék búzavirág virágzó fázisban gyűjtött föld alatti részéből flavonoid-aglikonokat (kvercetin, kempferol, izoramnetin, apigenin (1), luteolin, hiszpidulin) és glikozidjaikat, valamint kávéssavat, klorogénsavat, neoklorogénsavat és izoklorogénsavat izoláltak. Tíz aminosavat ugyancsak azonosítottak a növényben [42].

A *C. cyanus* magjából készült metanolos kivonattól epoxi-lignánokat (laricirezinol-4'-O-β-D-glükopiranozid és berchemol (11)) azonosítottak [43].

A *C. cyanus*, a *C. scabiosa* és a *C. jacea* föld feletti részéből elsőként *Löfgren* azonosított poliacetiléneket. Az általa 1949-ben közölt Centaur X poliinről és Centaur Y nevű poliénről kiderült, hogy több vegyület (Centaur X<sub>1</sub>-X<sub>4</sub> és Y<sub>1</sub>-Y<sub>2</sub>) keveréke. A *C. cyanus* gyökeréből ezen kívül *Bohlmann* további 3 poliint azonosított [5].

#### 4.3.2. Farmakológiai vizsgálatok

A *C. cyanus* virágzatát az Európa számos vidékén szemgyulladások kezelésére használják a népi gyógyászatban. *Garbacki* és *mtsai* számos gyulladássos modellben (karrageenan-, zymosan- és krotonolaj-indukált ödéma, hemolitikus aktivitás gátlása, anafilatoxin aktivitás indukciója) hatásos gyulladáscsökkentőnek találták a növény virágzatából kinyert poliszacharid frakciót [36].

A növény kivonata mérsékelt protozoonellenes (*Plasmodium falciparum* és *Leishmania donovani*) hatást mutatott egy *in vitro* vizsgálatban [44].

#### 4.4. *C. diffusa*

##### 4.4.1. Fitokémiai vizsgálatok

A növény virágzás időszakában, Argentínában begyűjtött föld feletti részének kloroformos kivonatából flavonokat, köztük 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavont, cirzimaritint (3), cirzilíneolt, a monoterpén loliolidot, a germakranolidok közé tartozó szeszkviterpén knicint (14), dihidrosziringenint, 1,2-diangeliloxi-glükózt és 1-(3-metilbutanoiloxi)-2-angeliloxi-glükózt és további 5 szeszkviterpén-laktont azonosították [45]. Ez a vizsgálat volt a növény első részletesebb fitokémiai analízise, korábban csak knicin (14) és taraxaszerol, taraxaszerol-acetát [45], valamint egy poliin (trideka-1,11-dien-3,5,7,9-tetrain) jelenlétéről számoltak be [46].

##### 4.4.2. Farmakológiai vizsgálatok

A *C. diffusa* invazív gyomként jelenik meg azokon a területeken, ahol nem őshonos, így Észak-Amerikában is. Régóta megfigyelt allelopátiás hatását részben jelentős knicintartalmának tulajdonítják. Ezt a feltételezést egy knicinnel végzett csíráztatási vizsgálat eredményei is megerősítették [47]. Exszudátumának vizsgálata során a feltételezett fitotoxin 8-hidrokinolint csak kis mennyiségben tudták kimutatni. Feltételezhető, hogy ennek a vegyületnek sokkal inkább a vas felvételében, mint az allelopátiás hatásában van szerepe [48]. Más elképzelések és bizonyítékok szerint ez a vegyület a talaj baktériumflórájának megváltoztatásával szolgálja a növény terjedését [49].

A növény virágzatának vizes kivonata 12 vizsgált mikroorganizmuson (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Proteus* spp., *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Mycobacterium phlei*, *M. fortuitum*) mérsékelt antibakteriális hatást mutatott [50].

#### 4.5. *C. jacea*

##### 4.5.1. Fitokémia

A *C. jacea* virágzatából azonosított vegyületek között antociánok (centaurocianin), flavonok (apigenin-4'-O-(6-O-malonil-β-D-glükózid)-7-O-β-D-glükuronid, 4',5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavon valamint ennek 7-O-glükózidja) [1, 51].

A növény gyökeréből három flavonoglikozid jelenlétét írták le. Közülük elsőként, 1922-ben a centaureint (5,7,3'-trihidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavon-7-O-β-D-glükózid) azonosították. Ezen kívül még két trihidroxi-flavont, a jaceozidot [52] és a jaceint azonosították a gyökérdrogból [1]. Utóbbi vegyületet a növény leveléből is kimutatták [51].

A *C. jacea* föld feletti részéből vízgőz-desztillációval nyert illóolajban jelentős mennyiségben találhatóak oxigenált szeszkviterpének (43,2%), amelyek között a kariofillén-oxid (23,5%) és a spatulenol (8,9%) a fő komponensek. Ezen kívül az olajban nagy mennyiségű zsírsav (15,5%) is található, amelynek fő komponensei az olajsav (8,9%) és a palmitinsav (6,6%) [53].

A *C. jacea* föld feletti részéből elsőként Centaur X<sub>1</sub>-X<sub>4</sub> poliíneket és Centaur Y<sub>1</sub>-Y<sub>2</sub> poliéneket azonosították [5]. Gyökeréből egy tiofénygyűrűt is tartalmazó acetilénszármazékot is kimutattak [46].

A növény leveléből sziringin nevű fenilpropán-glikozid származékot izoláltak 0,05% mennyiség-

ben. Ezen kívül 0,4% fahéjsav-származék és inozit jelenlétét is kimutatták [5].

#### 4.5.2. Farmakológiai vizsgálatok

A népi gyógyászatban a *C. jacea* virágzatát vérzés-csillapítóként, sömörre bőrbevonóként és vizelet-hajtó hatása miatt alkalmazták. Ezek racionalitását modern vizsgálatok nem támasztják alá [1]. A növény gyökerét *Radix carthami silvestris* néven alkalmazták a gyógyászatban lázcsillapítószerként, de ez a feltételezett hatás nem bizonyított [1].

A virágzat vizes-alkoholos kivonata 5%-os koncentrációban antimikrobás hatást mutatott *Salmonella thymurium* esetén [1]. A föld feletti rész vízgőz-desztillációval nyert illóolajának antimikrobás hatását 3 Gram-negatív, 3 Gram-pozitív baktériumtörzsön és egy gombán vizsgálták. Különösen a Gram-pozitív baktériumok esetén volt tapasztalható markáns antibakteriális hatás [53].

#### 4.6. *C. montana* subsp. *mollis*

##### 4.6.1. Fitokémiai vizsgálatok

A *C. montana*-val ez idáig rendelkezésre álló leg részletesebb fitokémiai vizsgálat több vegyületi-típus képviselőjét azonosította a növényből. A metanolos kivonatából egy flavont (montanozid), hat epoxi-lignánt (berchemol (11), berchemol-4'-O-β-D-glikozid, pinorezinol (10), pinorezinol-4-O-β-D-glükózid, pinorezinol-4,4'-di-O-β-D-glükózid, pinorezinol-4-O-apioz-(1 → 2)-β-D-glükózid), két kinasav-származékot (*transz*-3-O-p-kumaroil-kinasav, *cisz*-3-O-p-kumaroil-kinasav), és 8 indol-alkaloidot (triptamin, *N*-(4-hidroxicinnamoil)-5-hidroxi-triptamin, *cisz*-*N*-(4-hidroxicinnamoil)-5-hidroxi-triptamin, centciamin, *cisz*-centciamin, moschamin, *cisz*-moschamin) és egy dimér indol-alkaloidot, a montamint azonosították [54].

A *C. montana* flavonoidösszetételét tekintve két végletes kemotípus azonosítható: a „komplex” C-glikozidokat (zömében apigeninen, luteolinon, és krizoeriolon alapuló acilált, O-konjugált 6-C-glikozidok) és az O-glikozidokat (általában apigenin és luteolin 7- és 4'-monoizidjai). tartalmazó kemotípusok. A flavonoidösszetételt kevésbé befolyásolják a külső tényezők, ebből arra lehet következtetni, hogy az eltéréseknek alapvetően genetikai háttere van [55].

Löfgren és Johansson 1963-ban a Centaur Z poliin jelenlétéről számolt be a növény gyökeréből [5]. A *C. montana* gyökeréből, föld feletti részéből és virágzatából dán kutatók 35 acetilén-származékot izoláltak és azonosították [56].

#### 4.6.2. Farmakológiai vizsgálatok

A *C. montana* tiszta vegyületeinek (alkaloidok, flavonoidok, lignánok, kinasav-származékok) antioxidáns tulajdonságait DPPH módszerrel vizsgálták, ezen kívül tanulmányozták citotoxicitásvukat és toxicitásvukat is. A növény dimer alkaloidja, a montamin szignifikáns vastagbélrák-ellenes aktivitást mutatott *in vitro* (IC<sub>50</sub>=43,9 μM), míg a monomer moschamin közepes hatásúnak bizonyult (IC<sub>50</sub>=81,0 μM) az MTT-tesztben [54].

#### 4.7. *C. nigrescens*

##### 4.7.1. Fitokémiai vizsgálatok

A *C. nigrescens* Romániában gyűjtött föld feletti részéből vízgőz-desztillációval előállított illóolajban *Formisano* és *mtsai* a következő fő komponenseket azonosították: kariofillén-oxid (9,9%), β-eudezmol (9,5%), spatulenol (7,6%), heptakozán (6,1%) és *p*-vinil-gvajakol (5,5%) [57].

A növényvel kapcsolatban farmakológiai vizsgálati adatok nem érhetőek el a szakirodalomban.

#### 4.8. *C. pannonica*

##### 4.8.1. Fitokémiai vizsgálatok

*Milosevic* és *mtsai* vizsgálata szerint a *C. pannonica* vízgőz-desztillációval nyert illóolajának zömét zsírsavak alkotják (43,7%), amelynek fő komponensei az olajsav (34,0%) és a (*Z,Z*)-9,12-oktadekadiénsav (8,6%) [58].

A *C. pannonica* (Heuffel) Simonkai subsp. *pannonica* Horvátországban begyűjtött föld feletti részéből vízgőz-desztillációval 0,09% illóolaj volt kinyerhető, amelynek fő komponensei a szénhidrogének, zsírsavak és oxigenált szeszkviterpének voltak. A legnagyobb mennyiségben jelen lévő vegyület a palmitinsav, a nonakozán és a kariofillén-oxid volt. A monoterpének alacsony koncentrációban voltak jelen az illóolajban [59].

##### 4.8.2. Farmakológiai vizsgálatok

A *C. pannonica* föld feletti része vízgőz-desztillációval nyert illóolajának antimikrobás hatását 3 Gram-negatív, 3 Gram-pozitív baktériumtörzsön és egy gombán vizsgálták. Különösen a Gram-pozitív baktériumok esetén volt tapasztalható markáns antibakteriális hatás [53].

#### 4.9. *C. phrygia* subsp. *pseudophrygia*

##### 4.9.1. Fitokémiai vizsgálatok

A. *C. phrygia* L. föld feletti részéből 8 flavonoidot

(apigenin (1), jaceidin (6), centaureidin (7), hiszpidulin, jaceozidin, kempferol-3-metil-éter, kempferol-3,6-dimetil-éter és dezmetoxi-centaureidin) azonosítottak. Utóbbi 3 vegyület a nemzetség fajában ritkán fordul elő, így kemotaxonómiai jelentőségük van. Ugyanez érvényes a szintén azonosított arkcin lignánra is. A növényből ezen kívül kilenc poliacetilént, négy tetraén aldehidet és az aploxén nevű poliént is kimutatták [60].

Bolgár kutatók a *C. phrygiából* két szeszkviterpén-laktont, az elemanolidok közé tartozó  $8\alpha$ -(5-hidroxi-angeloil)-11,13-dehidromelitenzint és germakranolid típusú  $8\alpha$ -(5-hidroxi-angeloil)-szalonitenolidot izoláltak és azonosították [61].

#### 4.9. *C. sadleriana*

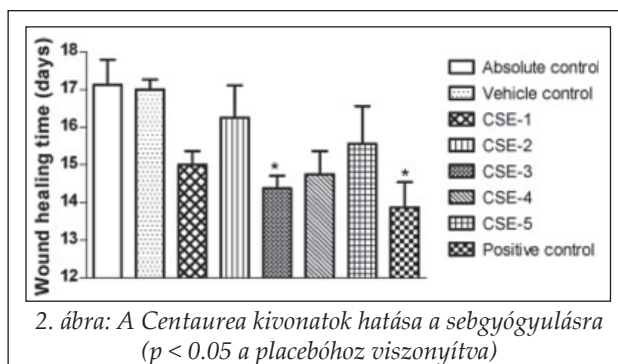
##### 4.9.1. Farmakológiai vizsgálatok

A növény föld feletti részének főzetét juhok sebeinek gyógyítására alkalmazták és alkalmazzák napjainkban is Jakabszállás (Bács-Kiskun megye, Magyarország) környékén. Valószínűleg a felhasználás céljával függhet össze az, hogy a fajt a környéken jakkóróként ismerik. Ezt a tradicionális gyógynövényi felhasználást kutatócsoportunk dokumentálta először [62].

A növényvel végzett előkísérlet során különböző polaritású kivonatok COX-1, COX-2 és 5-LOX gátló aktivitásait teszteltük *in vitro* tesztrendszerben. Míg a vizes és metanolos kivonat nem mutatott aktivitást, a kloroformmal és a hexánnal készült extraktum mindhárom tesztben jelentős gyulladáscsökkentő hatást fejtett ki. A markáns gyulladásgátló aktivitás szerepet játszhat sebgyógyító hatásában, és részben alátámasztotta a növény tradicionális használatát és indokolta további részletesebb vizsgálatát.

A *C. sadleriana* sebgyógyulásra kifejtett hatását állatkísérletben tanulmányoztuk. A vizsgálathoz a növény föld feletti részének különböző polaritású kivonatait készítettük el. A drogot forró vízzel kivonva, majd liofilezve készült a CSE-1 jelzésű kivonat. Egy következő kivonatot metanollal történő perkolálással nyertünk. Ennek egy részét vákuum alatt bepároltuk (CSE-2). A maradék metanolos kivonatot vízzel kiegészítettük, majd *n*-hexánnal (CSE-3), ezt követően kloroformmal (CSE-4) extraháltuk. A kirázás után visszamaradó metanolos extraktum a CSE-5 jelzést kapta.

A sebgyógyulásra kifejtett hatást patkányokon étgetéssel előidézett seben tanulmányoztuk, egy korábban már közölt módszer szerint [63]. A sebet a CSE-1 – 5 kivonatot 2,5%-os koncentráció-



2. ábra: A *Centaurea* kivonatok hatása a sebgyógyulásra ( $p < 0.05$  a placebohoz viszonyítva)

ban tartalmazó géllal, hatóanyagot nem tartalmazó géllal (placebó) és 1% szalicilsavat tartalmazó géllal (pozitív kontroll) kezeltük. A nyolcadik csoport sebeit nem kezeltük (abszolút kontroll). A végpont az állatok hátán található sebek 50%-ának leeséséhez szükséges idő (sebgyógyulási idő) volt. Kezelés nélkül a sebgyógyulás átlagos ideje 17,1 nap volt, placebokezelés esetén 17,0 nap, pozitív kontroll esetén 13,9 nap (2. ábra). A CSE-3 frakció szignifikánsan rövidítette a sebgyógyulás idejét (14,4 nap) a placebohoz képest. A CSE-1, CSE-2, CSE-4 és CSE-5 frakciók esetén mérsékelt, statisztikailag nem szignifikáns kedvező hatás volt tapasztalható. A növényi kivonatok pozitív hatása a vizsgálat teljes időtartama alatt megfigyelhető volt.

A vizsgálatban mindegyik kivonat kedvező hatásának mutatkozott, de csak a CSE-3 hexános extraktum esetén volt szignifikáns hatás. A vizsgálat sajátosságai miatt feltételezhető, hogy a sebgyógyulást elősegítő hatás a gyulladáscsökkentő és a proliferatív fázisok befolyásolásának eredménye. A vizsgálat igazolta a népi gyógyászati alkalmazás racionalitását, és segítségével azonosítható volt, hogy a hatásért elsősorban a kivonat apoláros anyagai tehetők felelőssé [62]. A növény fitokémiai vizsgálata folyamatban van.

#### 4.10. *C. salonitana*

##### 4.10.1. Fitokémiai vizsgálatok

A növény metanolos kivonatából *Daniewski és mtsai* a gvajánvázás szalograviolid A (18) nevű szeszkviterpént azonosítottak. Korábban két germakranolid, a szalonitenolid (12) és a szalonitolid (13) jelenléte volt ismert a *C. salonitanában* [64].

Görögország Gravia régiójában begyűjtött *C. salonitana* metanolos kivonatában négy gvajanolidot, a szalograviolid B-t szalograviolid C-t, akandavanolidot és az aguerin A-t azonosítottak [65].

Egy török közlés szerint a *C. salonitanából* egy új elemanolid-típusú szeszkviterpént, a melitenzin- $8\alpha$ - $\beta$ -*O*-D-glükopiranozidot, valamint egyéb



szeszkviterpén-laktonokat (dehidro-melitenzint, valamint a gvajánvázas 11,13-dihidro-dezacetilcinaropikrint és sinaicint (17)), a vomifoliol nevű ciklohexenont és további vegyületeket (sziringin, 4-hidroxi-fenil-2-etil- $\beta$ -D-glükopiranozid, 4-( $\beta$ -D-glükopiranozil)-benzilalkohol) azonosították [66].

A növény virágzó fenofázisban begyűjtött föld feletti részének vizes kivonatából egy *N*-fenil- $\beta$ -naftilaminként azonosított vegyületet izoláltak. Ezt a vegyületet a *Centaurea* genus fajai közül elsőként a *C. salnitana*ból mutatták ki [67].

A növényvel kapcsolatban farmakológiai vizsgálati adatok nem érhetőek el a szakirodalomban.

#### 4.11. *C. scabiosa*

##### 4.11.1. Fitokémiai vizsgálatok

Hegnauer szerint a növény levele virágzás idején 0,5% alkaloidot tartalmaz. Egy kristályosított alkaloidbázis olvadáspontját 265-265 °C-nek közölték, szerkezetét nem azonosították [5].

A *C. scabiosa* föld feletti részéből elsőként Löfgren 1949-ben azonosította a Centaur  $X_1$ - $X_4$  poliíneket és Centaur  $Y_1$ - $Y_2$  poliéneket [5]. A *C. scabiosa* gyökerét, föld feletti részét és a virágzatát vizsgálva 25 poliacetilént, 4 polialdehidet, egy 1,8,11,14-heptadecatetraént és egy flavont, az apigenint (1) izolálták és azonosították [68].

A növény virágából további poliacetiléneket, 5 homológ, C-14 – C-18 lánchosszúságú izovalerát-tetraén-észtert azonosítottak Christensen és mtsai [69].

A növény leveléből a szkutellarein (2) szkutellarin nevű glikozidját izolálták [70].

Lar'kina és mtsai sósavas  $AlCl_3$  oldatban történő komplexképzésen alapuló kvantitatív flavonoid-meghatározást végeztek a *C. scabiosa* föld feletti részének kivonatából. A gyűjtési helytől függően a rutinban kifejezett összflavonoid-tartalom 1,3-2,0% volt. A maximális flavonoidtartalom a teljes virágzás stádiumában volt tapasztalható a föld feletti részben. A növényi részek közül a legmagasabb flavonoidtartalmat a levelekből lehetett mérni [71].

Ferguson és mtsai írtak le elsőként lignánokat (arkcigenin (8), matairezinol (9), matairezinozid és 7'(S)-hidroxi-arkcigenin) a *C. scabiosaban*. Az összes izolált komponens a lignánok dibenzil-butirolakton csoportjába tartozik. Míg az arkcigenin (8) és matairezinol a *Centaurea* nemzetség számos egyéb fajában is megtalálható, a matairezinozidot és a 7'(S)-hidroxi-arktigenint korábban csak a *C. americanából*, illetve a *C. calcitrapából* izolálták [72].

Suchy és mtsai 1962-ben azonosították a növény föld feletti részéből a szkabiolid (15) nevű ger-

makranolid szeszkviterpénlaktont [5]. Orosz kutatók közleménye szerint a növény szibériai populációjából nem mutatható ki az európai populációkban jelen lévő [73] szkabiolid (15), viszont az ezzel rokon szerkezetű grosshemin azonosítható [74].

A növény leveléből sziringin nevű fenilpropán-glikozid származékot azonosították [75].

A növényből prunazin nevű cianogén glikozidot is kimutattak. A cianogén vegyületek csak sporadikusan fordulnak elő a genusban [76].

##### 4.11.2. Farmakológiai vizsgálatok

Etnofarmakológiai és taxonómiai kutatások alapján 21, Skóciában előforduló növény, köztük a *C. scabiosa* magjának antibakteriális hatását vizsgálták. A vizsgált 11 baktériumtörzs közül a *C. scabiosa* eggyel szemben mutatott specifikus antibakteriális hatást. Az *n*-hexános, diklór-metános és metanolos kivonat közül csak utóbbinál volt megfigyelhető antimikrobás hatás [77].

Antibakteriális, antioxidáns, ekdiszteroid-agonista és -antagonista aktivitást és általános toxicitást állapítottak meg a *C. scabiosa* két fő lignánja, a matairezinol (9) és a matairezinozid esetén [78].

#### 4.12. *C. solstitialis*

##### 4.12.1. Fitokémiai vizsgálatok

Hegnauer átfogó kemotaxonómiai munkájában említést tesz a növényben 0,03-0,05% mennyiségben előforduló alkaloidokról, azok szerkezetét azonban nem közölte [5].

Gonzalez és mtsai 18 gvajanolidvázas szeszkviterpén-laktont izoláltak a növényből, köztük a már ismert, cinaropikrin (19), szolsztitialin A (20), repin (21), szubluteolid, akroptilin (22), janerin vegyületeket, és az elsőként leírt szolsztitiolidot (23) és episzolsztitiolidot [79]. Merrill és mtsai által a növényből legnagyobb mennyiségben kinyert szeszkviterpén-lakton a szolsztitialin A (0,05%) volt [80].

A janerin egy halogéntartalmú származékát, a klorojanerin is azonosították a növényben [10].

A *C. solstitialis* ssp. *schouwi*ból alfajból egy gvajanolid-diol monoacetátot (a szolsztitialin A-val rokon szerkezetű) mutattak ki [81].

Tesevic és mtsai 9 ismert gvajanolidot (szolsztitialin A (20), ennek 13-acetát származéka, liniklorin B, cinaropikrin (19), centaurepenzin, 17-*epi*-centaurepenzin, 19-dezoxi-klorojanerin, 11 $\beta$ ,13-dihidro-dezakil-cinaropikrin és 8-dezakil-centaurepenzin-8-O-(4-hidroxi)-tíglát) azonosított a *C. solsti-*

*tialis* föld feletti részéből, utóbbi négyet a fajból elsőként. Szintén elsőként írták le a sziringarezinolt és az arkcigenint (8) jelenlétét a növényben [82].

A *Centaurea solstitialis* subsp. *schouwii* föld feletti részéből gvajanolidokat: cinaropikrint (19) és aguerin B-t, valamint lignánokat: arkcigenint (8) és matairezinolt (9) találtak. A közleményben korrigálták az aguerin B korábban tévesen közölt szerkezetét [83].

*Cassady és mtsai* a növény alkoholos kivonatából egy új triterpént, a  $3\alpha,16\alpha$ -dihidroxitaraxén-3-acetátot izolálták és azonosították [84]. Ugyanez a kutatócsoport a *C. solstitialis*-ből az  $\alpha$ -metilén-csoportot tartalmazó gvajanolidot, a centaurepenzint is kimutatta [85].

A *C. solstitialis* leveleiből nyert, szilárd fázisú extrakcióval tisztított kivonatának illékony anyagait GC-MS-sel vizsgálták. A kivonat fő komponensei a *transz*- $\beta$ -farnezen, a germakrén D és a biciklogermakrén voltak [86].

A *C. solstitialis* föld feletti részéből nyert illóolajból iráni kutatók GC és GC/MS módszerrel fő komponensként hexadekánsavat (30,8%) és kariofillén-oxidot (25,2%), ezen kívül 16 minor komponenst azonosítottak [87].

#### 4.12.2. Farmakológiai vizsgálatok

A növény kivonata különböző daganatos sejtvonalakon *in vitro* citotoxikusnak bizonyult. Ez volt a kiindulási alapja azoknak a vizsgálatoknak, amelyek a P-388 lymphoid egér leukémia sejtvonalon citotoxikus 3,16-dihidrotaraxén-3-acetát és a 9KB (humán nasopharynx karcinóma) sejteken  $ED_{50} = 1,2 \mu\text{g/ml}$  citotoxicitású centaurepenzin azonosításához vezettek [84, 85].

A *C. solstitialis* fogyasztása lovaknál parkinsonizmushoz hasonló idegrendszeri tüneteket (nigropallidális encephalomalacia) okoz. Az elmúlt 50 évben a nigropallidális encephalomalacia kutatása a Parkinson-kórral kapcsolatos vizsgálatok miatt vált jelentőssé. Korábbi kutatások alapján a növény ezen hatásaért a kivonatában található nitrogéntartalmú neurotoxikus vegyületeket tették felelőssé. A kivonatokból aszparagin- és glutaminsavat, két potenciális neurotoxikus aminosavat, valamint tiramint azonosítottak [88].

*Akbar és mtsai* azt vizsgálták, hogy a nigropallidális encephalomalacia tüneteinek kialakulásával összefügg-e a növényben található repin (21) nevű szeszkviterpén-laktonnal. A vegyület intraperitoneális injekcióként adva patkányokban dózis-függően 8 órán át tartó hipotermiát produkált. Az atropin-szulfát, atropin-metilbromid, propranolol, metergolin,

ketanserin, difenhidramin és apomorfín előkezelés hatását a repin-indukálta hipotermiában kivizsgálták. Az előkezelések közül egyik sem antagonizálta direkt módon a repin hipotermiás hatását. Azonban az atropin-szulfát, metergolin, ketanserin, difenhidramin és apomorfín gyorsította a normál testhőmérséklet visszaállását [89].

A *C. solstitialis* kivonatában található repin (21) hatásának módját PC 12 sejtvonalon tanulmányozták. A következtetések szerint repin által indukált glutationdepláció elsődleges szerepet játszhat a nigropallidális encephalomalacia kialakulásában. Az  $\alpha$ -metilén-butirolakton kettős kötésének telítésével a vegyület toxikus hatása (és ezzel együtt a glutation-depletáló és az intracelluláris dopaminszintet csökkentő aktivitás) megszüntethető [90].

A növény föld feletti részéből készült diklórometános kivonat a foetális patkány agy idegsejtkultúráin szignifikáns neurotoxicitást mutatott. Az aktivitásért felelős anyagokként a szolsztitalin A (20), 13-O-acetil-szolsztitalin A, cinaropikrin (19) és a 3-O-acetil-szolsztitalin A szeszkviterpén-laktonokat azonosították. A bioassay vizsgálatokban a 13-O-acetil-szolsztitalin A és a cinaropikrin mutatott koncentrációfüggő toxicitást [91].

A *C. solstitialis* L. föld feletti részének kloroformos, petroléteres és metanolos kivonatainak citotoxikus hatását különböző agyi eredetű sejteken azt találták, hogy a kloroformos extraktum szignifikáns toxikus hatással rendelkezik. A kivonatokból szolsztitalin A-t (20), szolsztitalin A-13-acetátot, szolsztitalin A-3-acetátot és cinaropikrint (19) azonosítottak. A vegyületek közül a szolsztitalin A-13-acetát és a cinaropikrin toxikus volt a substantia nigra sejtkultúrákra. A közepagy manifesztálódó toxikus hatás hozzájárulhat a nigropallidális encephalomalaciához, amely a lovaknál a növény elfogyasztásának hatására következhet be [92].

Számos *Centaurea* fajt alkalmaznak a török népi gyógyászatban fájdalom csillapítására, és gyulladáshoz vezető tünetekre reumatoid arthritisben, magas lázban és fejfájásban. Egy vizsgálatban a *C. solstitialis* L subsp. *solstitialis* gyökeréből és föld feletti részéből származó kivonat frakcióinak antinociceptív és antipiretikus hatását vizsgálták. Az antipiretikus aktivitás vizsgálatára adjuváns-indukált láz modellt alkalmaztak az egerekben. A növény föld feletti részéből származó etanolos kivonat szignifikáns antinociceptív és antipiretikus aktivitást mutatott. Hatás-orientált vizsgálat segítségével két szeszkviterpén-lakton, szolsztitalin

A-t (20) és acetilszármazékát azonosították aktív komponensként a növényben [93].

A *C. solstitialis* ssp. *solstitialis* virágzatát peptikus fekély kezelésére használják Törökországban. A belőle készült etanolos kivonat antiulcerogén hatást mutatott az etanol-indukálta fekélymodellben patkányokon. Az etanolos kivonatot további frakcionálásnak (*n*-hexánnal, kloroformmal, etil-acétáttal és *n*-butanollal) vetették alá. Mindegyik frakció antiulcerogén aktivitást mutatott, azonban a kloroformos frakció kiemelkedőbb fekélyellenes hatású bizonyult. Bioassay vizsgálatok megerősítettek, hogy a szeszkviterpén laktonok az aktív komponensek. A frakció fő komponensei a klorojanerin és 13-acetil-szolsztitialin A [10].

A klorojanerin, 13-acetil-szolsztitialin A és szolsztitialin A (20) gvajanolid típusú szeszkviterpén-laktonokat egy másik közlemény is antiulcerogén hatású komponensekként jelölte meg a *C. solstitialis* ssp. *solstitialis* föld feletti részéből készült kloroformos kivonatában [94].

Egy vizsgálatban olyan növények *Helicobacter pylori* ellenes hatását tanulmányozták, amelyeket a török népi gyógyászatban gasztrikus betegségek, köztük peptikus fekély kezelésére is használnak. A vizsgálathoz egy standard és 8 izolált *H. pylori* baktériumtörzset használtak agar hígítási eljárást alkalmazva. A *C. solstitialis* ssp. *solstitialis* hajtásainak és virágainak kivonata is aktivitást mutatott a mikroorganizmusok (MIC 1,95-250 µg/ml) ellen [95].

A *C. solstitialis* L. ssp. *solstitialis* föld feletti részéből izolált három szeszkviterpén-laktonnal (centaurepenzin, klorojanerin és 13-acetil-szolsztitialin A) antimikrobiális és antivirális aktivitást tapasztaltak. Az antimikrobiális vizsgálat során *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* és *C. parapsilosis* törzseket használtak. Az antivirális aktivitást Herpes simplex-1 (DNS vírus) és parainfluenza (RNS vírus) segítségével, Vero sejtvonalon tanulmányozták. Referenciaszerként ampicillint, ofloxacint, ketokonazolt, flukonazolt, aciklovirt és oseltamivirt használtak. A 13-acetil-szolsztitialin A jelentős antibakteriális aktivitást mutatott az *E. faecalis* izolált baktériumtörzsel szemben 1 µg/ml-es koncentrációnál, ami az ampicillin hatásos koncentrációjához közeli. Ugyanaz a komponens szignifikáns, az acikloviréhoz közeli aktivitást mutatott a DNS vírussal szemben [96].

Korábbi vizsgálatok igazolták a *Tanacetum parthenium*  $\alpha$ -metilén-butirolakton funkciót tartalmazó szeszkviterpénjének, a partenolidnak sima-

izomgörcs-oldó hatását. Hay és mtsai a *C. solstitialis* két vegyületét, a  $\alpha$ -metilén-butirolakton típusú cinaropikrint (19) és az ilyen funkcióval nem rendelkező szolsztitialin-13-acetátot vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy a görcsoldó hatás feltétele a telítetlen kötés megléte [97].

A növény petroléteres kivonatának szabadgyökfogó hatását DPPH-tesztel vizsgálva mérsékelt aktivitást találtak [98].

#### 4.13. *C. stenolepis*

##### 4.13.1. Fitokémiai vizsgálatok

A *C. stenolepis* Romániában és Bulgáriában begyűjtött herbájából vízgőz-desztillációval nyert illóolaj fő komponensei: kariofillén-oxid (6,9-15,6%), hexahidrofarnesil-aceton (4,4-6,5%), heptakozán (4,9-6,0%) és *p*-vinil gvajakol (4,3-5,0%) [99].

A növényt kapcsolatosan farmakológiai vizsgálati adatok nem érhetőek el a szakirodalomban.

## 5. Következtetések

Bár egyes *Centaurea* fajokat használnak gyulladáscsökkentő hatásuk miatt, a hazai flórában megtalálható fajok közül a *C. sadlerianá*hoz hasonló céllal a nemzetség egyetlen tagját sem alkalmazzák. Az imola fajok egy részét részletes fitokémia és farmakológiai vizsgálatoknak vetették alá. A nemzetség flavonoidjai között többszörösen hidroxilezett és metoxilezett flavon-származékok (aglikonok és glikozidok) egyaránt megtalálhatóak. A szeszkviterpén-laktonok zöme gvajanolidvázas, amelyek között ritka, halogénezett származékok is megtalálhatóak. Kisebb számban germakranolidokat és elemanolidokat is kimutataak a genus tagjaiban. A lignánok szintén nagy változatosságban találhatóak meg a növényekben. A jellegzetes vegyületek közé tartoznak még a poliének és a poliinek. A leggyakrabban leírt hatások a gyulladásgátló, fekélyellenes, antioxidáns, antimikrobás, citotoxikus aktivitások, amelyeket általában a növények kivonatai esetén dokumentáltak. Bár egyes szeszkviterpén-laktonok gyulladáscsökkentő hatása bizonyított, a rendelkezésre álló adatok alapján nem határozható meg, mely vegyülettípusok és milyen módon fejthetnek ki sebgyógyulást elősegítő hatást a *C. sadleriana* esetén. Tekintettel a fajok fitokémiai profiljában megfigyelhető hasonlóságra, az esetleges humán gyógyászati alkalmazás szempontjából kívánatos lenne az elterjedtebb fajok növénykémiai és farmakológiai vizsgálata.

## 6. Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki az Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (OTKA PD71724) támogatásáért és Ludnai Tündének (Kiskunsági Nemzeti Park) a *C. sadleriana* azonosításáért. Köszönet illeti Prof. Dr. Rudolf Bauert és Dr. Ute Widowitzot (Karl-Franzens-Universität Graz, az *in vitro* gyulladáscsökkentési vizsgálatok elvégzéséért és Dr. Blaszó Gábort és Dr. Balogh Ágneszt (Szege-di Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet) az állatkísérletes vizsgálatok elvégzéséért, valamint Boros Klárát (Szege-di Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Farmakognóziái Intézet) a kézirat elkészítésében nyújtott segítségéért. Köszönettel tartozunk Szabó Ferencnének, hogy felhívta figyelmünket a faj korábban le nem írt népi gyógyászati alkalmazására.

## IRODALOM

- Hampe, S., Horz, K.: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis 4, 750-756 (1992)
- Kern, W., Roth, H.J., Schmid, W., List, P.H., Hörhammer, L.: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis 3. Band:784-788, 1972.
- Csedő, K.: Hargita megye gyógy- és fűszernövényei, Marosvásárhely, 1980.
- Szabó, A., Péntek, J.: Ezerjófű - Etnobotanikai útmutató. Kriterion Könyvkiadó, Bukarest, 1976.
- Hegnauer, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, 1964.
- Stadelmann, W.K., Digenis, A.G., Tobin, G.R.: Am. J. Surg. 176, 26S-38S (1998).
- Karamenderes, C., Konyalioglu, S., Khan, S., Khan, I.A.: Phytother Res. 21, 488-491 (2007).
- Negrete, R. E., Backhouse, N., Cajigal, I., Delporte, C., Casels, B. K., Breitmaier, E., Eckhardt, G.: J. Ethnopharmacol 40,149-153 (1993).
- Garbacki, N., Gloaguen, V., Damas, J., Bodart, P., Tits, M., Angenot, L.: J. Ethnopharmacol 68, 235-241 (1999).
- Yesilada, E., Gurbuz, I., Bedir, E., Tatli, I., Khan, W. A.: J. Ethnopharmacol 95, 213-219 (2004).
- Ramadan, M., Goeters, S., Watzer, B., Krause, E., Lohmann, K., Bauer, R., Hempel, B., Imming, P.: J. Nat. Prod. 69, 1041-1045 (2006).
- Redl, K., Breu, W., Davis, B., Bauer, R.: Planta Med. 60, 58-62 (1994).
- Bulent Kose, Y., Iscan, G., Demirci, B., Baser, K. H., Celik, S.: Fitoterapia 78, 253-254 (2007).
- Saroglou, V., Karioti, A., Demetzos, C., Dimas, K., Skaltsa, H.: J. Nat. Prod. 68, 1404-1407 (2005).
- Skaltsa, H., Lazari, D., Panagouleas, C., Georgiadou, E., Garcia, B., Sokovic, M.: Phytochemistry 55, 903-908 (2000).
- Vajs, V., Todorovic, N., Ristic, M., Tesevic, V., Todorovic, B., Janackovic, P., Marin, P., Milosavljevic, S.: Phytochemistry 52, 383-386 (1999).
- Csapi, B., Hajdu, Z., Zupko, I., Berenyi A., Forgo, P., Szabo, P., Hohmann, J.: Phytother Res. 24, 1664-1669 (2010).
- Marco, J. A., Sanz, J. F., Sancenon, F., Susanna, A., Rustaiyan, A., Saberi, M.: Phytochemistry 31, 3527-3530 (1992).
- Senatore, F., Landolfi, S., Celik, S., Bruno, M.: Flavour Fragrance J. 21, 282-285 (2006).
- Dob, T., Dahmane, D., Gauriat-Desrudy, B., Daligault, V.: J. Essent. Oil Res. 21, 216-219 (2009).
- Ahmed, Z.F., Hammouda, F. M., Rizk, A. M., Ismail, S. I.: Planta Med. 18, 227-231 (1970).
- Nolasco, S. M., Wiese, B., Quiroga, O., Vigo, M. S.: Characteristics and Composition of Centaurea-Calci-trapa L and Centaurea-Solstitialis L Seed Oils. Anales De La Asociacion Quimica Argentina 79, 15-19 (1991).
- Karrer W.: Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe. Birkhäuser Verlag, Basel - Boston - Stuttgart, 1981.
- Domingos, A., Cardoso, P. C., Xue, Z., Clemente, A., Brodelius, P. E., Pais, M. S.: Eur J Biochem 267, 6824-6831 (2000).
- Domingos, A., Xue, Z. T., Guruprasad, K., Clemente, A., Blundell, T., Pais, M. S., Brodelius, P.E.: Aspartic Proteinases - Retroviral and Cellular Enzymes 436, 465-472 (1998).
- Salvador, S. M., Novo, C., Domingos, A.: Enzyme Microb. Technol. 38, 893-898 (2006).
- Rossano, R., Piraino, P., D'Ambrosio, A., O'Connell, O. F., Ungaro, N., McSweeney, P. L. H., Riccio, P.: J. Biotechnol. 120, 220-227 (2005).
- Maxia, A., Lancioni, M. C., Balia, A. N., Alborghetti, R., Pieroni, A., Loi, M. C.: Genet. Resour. Crop. Evol. 55, 911-924 (2008).
- Pieroni, A., Nebel, S., Quave, C., Munz, H., Heinrich, M.: J. Ethnopharmacol. 81, 165-185 (2002).
- Pieroni, A., Janiak, V., Durr, C.M., Ludeke, S., Trachsel, E., Heinrich, M.: Phytotherapy Research 16, 467-473 (2002).
- Takeda, K., Tominaga, S.: Botanical Magazine-Tokyo 96, 359-363 (1983).
- Yoshida, K., Mori, M., Kondo, T.: Nat. Prod. Rep. 26, 884-915 (2009).
- Tamura, H., Kondo, T., Kato, Y., Goto, T.: Tetrahedron Lett. 24, 5749-5752 (1983).
- Takeda, K., Osakabe, A., Saito, S., Furuyama, D., Tomita, A., Kojima, Y., Yamadera, M., Sakuta, M.: Phytochemistry 66, 1607-1613 (2005).
- Takeda, K., Kumegawa, C., Harborne, J. B., Self, R.: Phytochemistry 27, 1228-1229 (1988).
- Garbacki, N., Gloaguen, V., Damas, J., Bodart, P., Tits, M., Angenot, L.: J. Ethnopharmacol 68, 235-241 (1999).
- Karamenderes, C., Demirci, B., Baser, K. H. C.: J. Essent. Oil. Res. 20, 342-349 (2008).
- Beck, J. J., Smith, L., Merrill, G. B.: J. Agric. Food Chem. 56, 2759-2764 (2008).
- Sarker, S. D., Laird, A., Nahar, L., Kumarasamy, Y., Jaspars, M.: Phytochemistry 57, 1273-1276 (2001).
- Tosi, B., Bonora, A., Dallolio, G., Bruni, A.: Phytotherapy Research 5, 59-62 (1991).
- Bubenchikova, V. N.: Khimiya Prirodnikh Soedinenii 6, 829-830 (1990).
- Litvinenko, V. I., Bubenchikova, V. N.: 6, 792-795 (1988).
- Shoeb, M., Jaspars, M., MacManus, S. M., Majinda, R. R. T., Sarker, S. D.: Biochem. Syst. Ecol. 32, 1201-1204 (2004).
- Karamenderes, C., Khan, S., Tekvani, B. L., Jacob, M. R., Khan, I. A.: Pharm. Biol. 44, 534-539 (2006).
- Fortuna, A. M., de Riscala, E. C., Catalan, C. A. N., Gedris, T. E., Herz, W.: Syst. Ecol. 30, 805-808 (2002).
- Karrer W.: Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe. Birkhäuser Verlag, Basel - Boston - Stuttgart, 1985.
- Cabral, M. E. S., Fortuna, A. M., de Riscala, E. C., Catalan,

- C. A. N., Sigstad, E. E.: *Allelopathy Journal* 21, 183-190 (2008).
48. Tharayil, N., Bhowmik, P., Alpert, P., Walker, E., Amarasiriwardena, D., Xing, B.: *New Phytol.* 181, 424-434 (2009).
49. Watkins, A. J., Nicol, G. W., Shaw, L. J.: *Soil Biology & Biochemistry* 41, 580-585 (2009).
50. Skliar, M. I., Toribio, M. S., Oriani, D. S.: *Fitoterapia* 76, 737-739 (2005).
51. Rosler, H., Star, A. E., Mabry, T. J.: *Phytochemistry* 10, 450-451 (1971).
52. Wagner, H., Hoer, R., Murakami, T., Farkas, L.: *L. Chem. Ber.* 106, 20-27 (1973).
53. Milosevic, T., Argyropoulou, C., Solujic, S., Murat-Spahic, D., Skaltsa, H.: *Nat. Prod. Commun.* 5, 1663-1668 (2010).
54. Shoeb, M., MacManus, S. M., Jaspars, M., Trevidu, J., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P., Sarker, S. D.: *Tetrahedron* 62, 11172-11177 (2006).
55. Gonnet, J. F.: *Biochem. Syst. Ecol.* 20, 149-161 (1992).
56. Christensen, L. P., Lam, J.: *Phytochemistry* 30, 3289-3292 (1991).
57. Formisano, C., Senatore, F., Bancheva, S., Bruno, M., Maggio, A., Rosselli, S.: *Natural Product Communications* 5, 273-278 (2010).
58. Milosevic, T., Argyropoulou, C., Solujic, S., Murat-Spahic, D., Skaltsa, H.: *Natural Product Communications* 5, 1663-1668 (2010).
59. Formisano, C., Senatore, F., Bancheva, S., Bruno, M., Maggio, A., Rosselli, S.: *Natural Product Communications* 5, 1649-1654 (2010).
60. Christensen, L. P., Lam, J.: *Phytochemistry* 30, 2663-2665 (1991).
61. Tsankova, E., Ognyanov, I.: *Planta Med.* 51, 465-466 (1985).
62. Csupor, D., Blazso, G., Balogh, A., Hohmann, J.: *J. Ethnopharmacol* 127, 193-195 (2010).
63. Blazsó, G., Gábor, M., Schönlaui, F., Rohdewald, P.: *Phytotherapy Research* 18, 579-581 (2004).
64. Daniewski, W. M., Nowak, G., Routsis, E., Rychlewska, U., Szczepanska, B., Skibicki, P.: *Phytochemistry* 31, 2891-2893 (1992).
65. Daniewski, W. M., Nowak, G., Pankowska, E., Georgiadis, T., Routsis, E., Rychlewska, U., Szczepanska, B.: *Sesquiterpene Lactones of Centaurea-Salonitana*. *Phytochemistry* 34, 445-447 (1993).
66. Salan, Ü., Öksüz, S.: *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University* 35-36, 77-82 (2003).
67. Evstratova, R. I., Žapesochnaya, G. G.: *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 582-582 (1977).
68. Andersen, A. B., Lam, J., Wrang, P.: *Phytochemistry* 16, 1829-1831 (1977).
69. Christensen, L. P., Lam, J., Thomasen, T.: *Phytochemistry* 30, 3457-3458 (1991).
70. Marsh, C. A.: *Biochem J.* 59, 58-62 (1955).
71. Lar'kina, M. S., Kadyrova, T. V., Ermilova, E. V., Krasnov, E. A.: *Pharmaceutical Chemistry Journal* 43, 320-323 (2009).
72. Ferguson, C. A., Nahar, L., Finnie, D., Kumarasamy, Y., Reid, R., Mir-Babayev, N. F., Sarker, S. D.: *Syst. Ecol.* 31, 303-305 (2003).
73. Suchy, M., Samek, Z., Herout, V., Sorm, F.: *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 33, 2238-2244 (1968).
74. Krasnov, E. A., Raldugin, V. A., Kadyrova, T. V., Kaminskii, I. P.: *Chemistry of Natural Compounds* 42, 495-496 (2006).
75. Hegnauer, R.: *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Vol 9. Birkhauser, Basel, 1990.
76. Hegnauer, R.: *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Vol 7. Birkhauser, Basel, 1989.
77. Kumarasamy, Y., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S. D.: *J. Ethnopharmacol* 83, 73-77 (2002).
78. Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P. J., Dinan, L. N., Ferguson, C. A., Finnie, D. A., Jaspars, M., Sarker, S. D.: *Pharm. Biol.* 41, 203-206 (2003).
79. Gonzalez, A. G., Velazquez, J. M., Breton, J. L.: *Anales De Quimica Serie C-Quimica Organica Y Bioquimica* 79, 469-470 (1983).
80. Merrill, G. B., Stevens, K. L.: *Phytochemistry* 24, 2013-2018 (1985).
81. Oksuz, S., Clark, R. J., Herz, W.: *Phytochemistry* 33, 1267-1268 (1993).
82. Tesevic, V., Vajs, V., Todorovic, E., Dokovic, D., Marin, P., Milosavljevic, S.: *Journal of the Serbian Chemical Society* 63, 131-135 (1998).
83. Bruno, M., Diaz, J. G., Herz, W.: *Phytochemistry* 30, 4165-4166 (1991).
84. Cassady, J. M., Hokanson, G. C.: *Lloydia-the Journal of Natural Products* 39, 470-470 (1976).
85. Cassady, J. M., Abramson, D., Cowall, P., Chang, C. J., McLaughlin, J. L.: *J. Nat. Prod.* 42, 427-429 (1979).
86. Beck, J. J., Smith, L., Merrill, G. B.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 2759-2764 (2008).
87. Esmaili, A., Rustaiyan, A., Akbari, M. T., Moazami, N., Masoudi, S., Amiri, H.: *J. Essent. Oil Res.* 18, 427-429 (2006).
88. Moret, S., Populin, T., Conte, L. S., Cosens, G.: *Toxicon* 46, 651-657 (2005).
89. Akbar, S., Fries, D. S., Malone, M. H.: *J Ethnopharmacol* 49, 91-99 (1995).
90. Tukov, F. F., Anand, S., Gadepalli, R. S. V. S., Gunatilaka, A. A. L., Matthews, J. C., Rimoldi, J. M.: *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1170-1176 (2004).
91. Wang, Y., Hamburger, M., Cheng, C. H. K., Costall, B., Naylor, R. J., Jenner, P., Hostettmann, K.: *Helv. Chim. Acta.* 74, 117-123 (1991).
92. Cheng, C. H. K., Costall, B., Hamburger, M., Hostettmann, K., Naylor, R. J., Wang, Y., Jenner, P.: *Neuropharmacology* 31, 271-277 (1992).
93. Akkol, E. K., Arif, R., Ergun, F., Yesilada, E.: *J. Ethnopharmacol* 122, 210-215 (2009).
94. Gurbuz, I., Yesilada, E.: *J Ethnopharmacol* 112, 284-291 (2007).
95. Yesilada, E., Gurbuz, I., Shibata, H.: *J. Ethnopharmacol* 66, 289-293 (1999).
96. Oezcelik, B., Guerbuez, I., Karaoglu, T., Yesilada, E.: *Microbiol. Res.* 164, 545-552 (2009).
97. Hay, A. J. B., Hamburger, M., Hostettmann, K., Hoult, J. R. S.: *Br. J. Pharmacol.* 112, 9-12 (1994).
98. Tekeli, Y., Sezgin, M., Aktumsek, A.: *Asian Journal of Chemistry* 20, 4831-4835 (2008).
99. Formisano, C., Senatore, F., Bancheva, S., Bruno, M., Maggio, A., Rosselli, S.: *Natural Product Communications* 5, 273-278 (2010).



## Reumás megbetegedések kezelése intraartikuláris készítménnyel

SZABÓ ANDREA<sup>1</sup>, ZELKÓ ROMÁNA<sup>2</sup>, ANTAL ISTVÁN<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>DocMorris Apotheke Neustadt, Mainz, Németország, Kreyssigstr. 19. – 55118

<sup>2</sup>Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési Intézet, Budapest, Hőgyes Endre u. 9. – 1092

<sup>3</sup>Semmelweis Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerészeti Intézet, Budapest, Hőgyes Endre u. 7. – 1092

\*Levelezési cím: antist@gytk.sote.hu

### Summary

Szabó, A., Zelkó, R., Antal, I.: *Treatment of rheumatic diseases with intraarticular drug delivery systems*

Present work provides an overall study about the types and the medicinal treatment of the rheumatic diseases especially the intraarticular formulations. Due to the localized nature of the joint, intraarticular injections are very favourable drug delivery systems. It has a big advantage over the oral medication; the systemic side effects are kept away. The review shows two types of the rheumatic diseases on the example of the healthy joint: the joint damage (osteoarthritis) and the inflamed joint (rheumatoid arthritis). There are many active ingredients for the treatment of the rheumatic diseases but the number of the intraarticular products is limited. At present are only formulations with hyaluronic acid or glucocorticoid on the market. Several physiological and biopharmaceutical aspects must be considered for the design of intraarticular injections. During and after the production many quality requirements have to be complied. On the market the formulations in solution or in suspension are available, which provide a short-term effect. The aim of the developments is to achieve long-term effect based on nano- or microparticles.

**Key-words:** intraarticular, joint, rheumatic diseases, hyaluronic acid, glucocorticoid.

### Összefoglaló

Jelen tanulmány átfogó áttekintést nyújt a reumás megbetegedések típusairól és gyógyszeres kezeléseiről, nagy hangsúlyt fektetve az intraartikuláris készítményekre. Az ízületek egyrészt természeti adottságuknál fogva igen kedvező beviteli kapunak számítanak, másrészt az intraartikuláris formának nagy előnye az orális gyógyszerformával szemben, hogy elkerülhetők a szisztémás mellékhatások. Az összefoglaló az egészséges ízület példáján mutatja be a reumás ízületi megbetegedések két formáját: a kopásból származó (osteoarthritis) és a gyulladás okozta reumás ízületet (rheumatoid arthritis). Számos hatóanyag áll rendelkezésre a terápiát illetően, ezzel szemben viszont csekély az intraartikuláris készítmények száma. Forgalomban jelenleg csak hialuronsavas és glükokortikoidos változatok találhatók meg. Az intraartikuláris injekciók tervezése során számos fiziológiai és biofarmáciai szempontot szükséges figyelembe venni, valamint előállításuk alatt és után is a számos minőségi követelmény maradéktalan betartására van szükség. Oldatos és szuszpenziós hordozó rendszerek találhatók a gyógyszeres terápiában, amelyekkel azonban csak rövid ideig tartó hatást lehet elérni. A nyújtott hatás elérése érdekében nano- és mikrorészecskéket tartalmazó optimált összetétel kifejlesztése a cél.

**Kulcsszavak:** intraartikuláris, ízület, reumás megbetegedés, hialuronsav, glükokortikoid.

### 1. Bevezetés

Az európai lakosok egyharmada szenved legalább egyszer élete során reumás megbetegedésben, illetve minden ötödik lakos hosszabb ideig tartó ilyen kezelés alatt áll [1]. Ezzel szemben viszont aránytalanul kevés a kezelésekre szánt intraartikuláris készítmények száma. A reumás megbetegedések több formája is ismert, azonban csak kevés esetben van lehetőség a betegség megelőzésére, illetve a teljes gyógyulásra. A sebészeti beavatkozások mellett jelenleg a gyógyszeres terápiás kezelésekre számos szisztémás hatóanyag áll rendelkezésre, viszont egyáltalán nem számottevő a lokálisan alkalmazható hatóanyagok ízületbe injektálható (intraartikuláris) formája. Intraartikuláris készítményekkel az ízületbe történő közvet-

len hatóanyag-bevitel érhető el, amellyel biztosítható a nagy lokális hatóanyag koncentráció és a csekély szisztémás hatás.

### 2. Az egészséges és reumás ízület

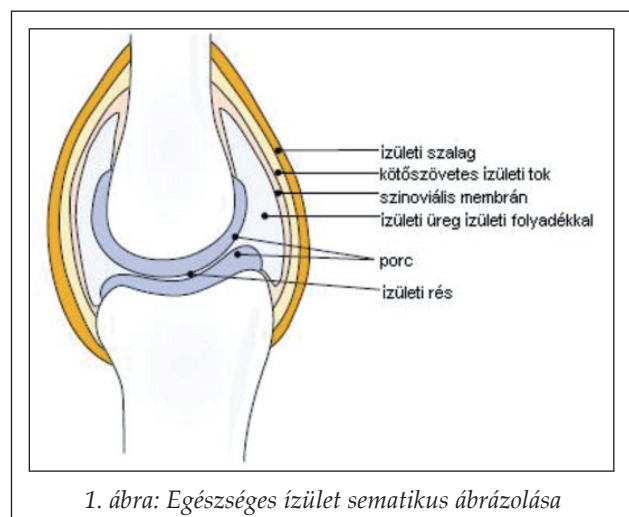
Az emberi ízület a természet egyik legkiválóbban működő egységét képezi. Szerepe a stabilitás megőrzése és a csontváz mozgatása. Rendkívüli teherbírása mellett is precízen funkcionál végig kísérve az ember életét. Ennek azonban titka a folyamatosan megújuló csont, porc és ízületi folyadék. Ahhoz, hogy ízületeink súrlódásmentesen funkcionáljanak, rendkívül sima felületre van szükség. Ezt a porc biztosítja, amely stabilan és elasztikusan fedi be a csontot. Az ízületi folyadék, mint egy kenőanyag gondoskodik a porc tápanyaggal és

## I. táblázat

## Az egészséges szinoviális folyadék összetétele

	Középtérték	Extrém tartomány
<i>Fizikai adatok</i>		
Térfogat (ml/norm. térdízület)	1,1	0,13-4,0
Relatív sűrűség	-	1,008-1,015
Ozmolaritás (mmol/l)	296	292-300
pH	7,434	7,31-7,64
Víz (g/kg)	-	960-988
Száraz anyag (g/kg)	34	12-48
Sejtek (per µl)	-	13-180
<i>Anorganikus anyagok</i>		
Széndioxid (mmol/l)	-	19,3-30,6
Klorid (g/l)	3,81	3,08-4,89
Foszfát	megfelel a szérumban tartalmának	
Kálium (mg/l)	156	-
Nátrium (g/l)	3,13	-
Kalcium (mg/l)	-	48-96
Vas (µg/kg)	290	-
Réz (µg/kg)	275	-
Cink (µg/kg)	176	-
<i>Organikus anyagok</i>		
Glükóz	megfelel a szérumban tartalmának	
Karbamid (mg/l)	150	-
Húgysav (mg/l)	39	-
Összfehérje (g/l)	13,1	10,4-15,8
Albumin (g/l)	8	6-10
Globulin (g/l)	0,5	-
Hialuronsav (g/l)	2,26	1,45-2,94
Kondroitin-szulfát (mg/l)	42	-
Lipidek:		
Koleszterin	71	-
Foszfolipidek	138	130-152

oxigénnel való ellátásáról. Az ízületi folyadékot (szinovia) a szinoviális membrán állítja elő, amely egyben a kötőszövetes ízületi tokot borítja be. A tok megakadályozza, hogy a szinoviális folyadék kilépjen az ízületi üregből. Az ízületi szalag feladata az ízület összetartása (1. ábra) [2].

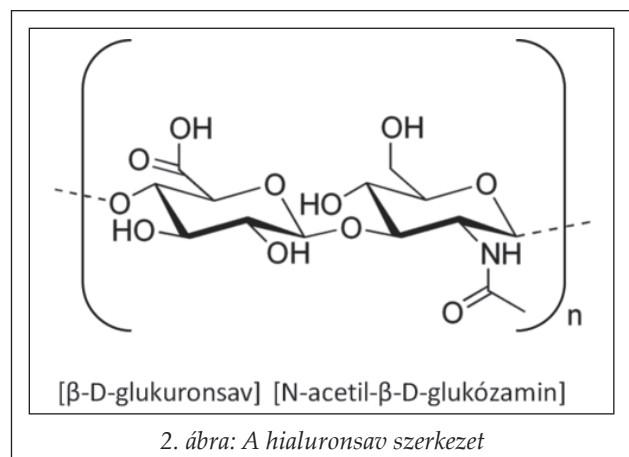


1. ábra: Egészséges ízület sematikus ábrázolása

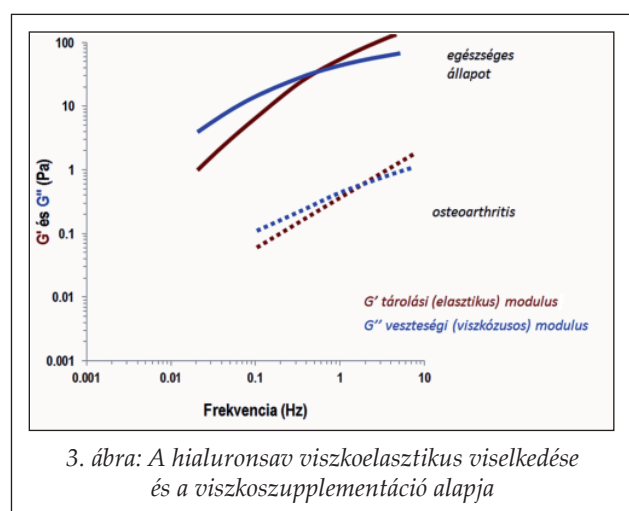
Ahhoz, hogy a porc elegendő tápanyagot és oxigént tudjon az ízületi folyadékból felvenni, elengedhetetlen a mozgatása. Az ezáltal keletkező nyomás hatására a porcból elhasznált ízületi folyadék préselődik ki, amelynek helyére friss kerül. Az így leadott ízületi folyadék a szinoviális membránon keresztül bekerül a véráramba, illetve a vérből friss tápanyag és oxigén érkezik a szinoviába.

Az intraartikuláris készítmények közvetlenül az ízületi folyadékba kerülnek. Emiatt fontos a szinoviális folyadék pontos összetételét ismerünk (I. táblázat) [3]. A szinovia nem más, mint a vér dializátuma [3], így az elektrolitok és a kis molekuláris anyagok összetétele és tartalma is megegyezik a szérumával. Az egészséges ízületben lévő szinoviális folyadék hozzávetőleg 0,5-2 ml-t tesz ki [4, 5]. A szinoviális folyadék folyamatosan és gyorsan (kb. 2 óránként) cserélődik, míg a szinovia egyik legfontosabb komponense a hialuronsav csak minden 38. órában újul meg [5]. Alapvetően a hialuronsav (2. ábra) felelős a





2. ábra: A hialuronsav szerkezet



szinovia viszkoelasztikusságáért, a megfelelő reológiai tulajdonságok biztosítása az alapja a „viszkoszupplementáció” terápiás alkalmazásának (3. ábra) [6, 7]. A viszkoelaszticitás eredménye, hogy az ízület alacsony frekvenciájú mozgása esetén a viszkózus folyadék kenőanyagként működik, míg nagyobb mechanikai igénybevétel esetén rugalmasan képes tárolni a mechanikai energiát.

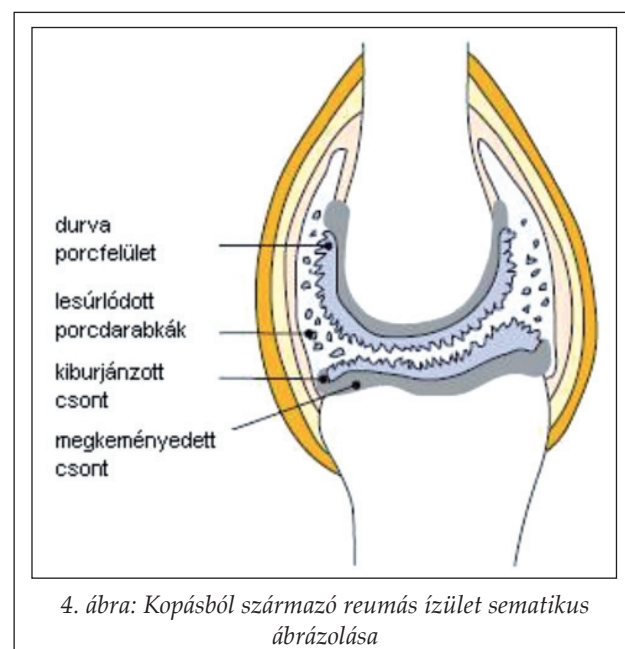
A gyulladt ízületben nagyobb mennyiségű (akár 100 ml) szinoviális folyadék is termelődhet, amelyben a hialuronsav veszt viszkozitásából a koncentrációja és molekuláris tömege csökkenésével [8]. A szinoviális folyadék viszkozitása egy egészséges ízületben meghaladja a 300 mPas-ot, azonban a reumás tünetek fellépése után ez lecsökken 300 mPas alá [4, 9].

A reumás megbetegedések alatt ízületi kopást vagy ízületi gyulladást értünk.

Az ízületi kopásból keletkező megbetegedésekhez az artrózist, az oszteoartrózist és a degenerált ízületi reumát sorolhatjuk [2]. Az artrózist feltehetőleg a tápanyag-szükséglet és -ellátás közötti aránytalanság okozza. Egy másik lehetséges ok,

hogy az ízületi folyadék kevés tápanyaghoz jut, illetve a mozgáshiányból származóan elégtelen a tápanyag cirkuláció. Ha a porc nem kap megfelelő mennyiségű tápanyagot az ízületi folyadékból, a porcsejtek elhalnak. Ennek a következménye, hogy a porc rostokra szakad és veszt sima felületéből. Minden további mozdulattal lemorzsolódik egy darab porc és így a csontot védő burok egyre vékonyabbá válik (4. ábra) [2]. A csont kidudorodásokat képez a porc alatt, amelyek újabb porcdarabkák leválását eredményezik. Az immunrendszer a porcdarabokat az ízületi folyadékban idegen testként kezeli, melyek az így okozott gyulladástól kifolyólag egy védekező reakciót indítanak el. Ennek hatására porcleépítő anyagok kerülnek kibocsátásra, melyek a porcsejtek gyors elhalásához vezetnek. A gyulladástól származó fájdalom miatt a betegek még kevesebbet mozognak, ami még kevesebb tápanyag kibocsátásához vezet. Az így kialakuló circulus vitiosus-t nehéz megfékezni. Az artrózis legtöbbször a teherviselő ízületeket érinti, mint például a csípőízületet (coxarthrosis) illetve a térdízületet (gonarthrosis).

Az ízületi gyulladással reumás megbetegedésekhez soroljuk az artritist. A leggyakrabban előforduló formája a krónikus poliartritisz, amelyet legtöbbször rheumatoid arthritis-nek neveznek. A gyulladás már korán felismerhetővé válik az ízület pirosságáról, melegségéről és duzzadságáról. A megbetegedés kezdetén többször is előfordulhat a magas láz. A gyulladást autoimmun reakciók váltják ki, amelyek hatására az immunrendszer a porcot testidegen anyaggal helyettesíti, illetve akár



meg is támadja. Az autoimmun reakciót kiváltó okok még nem ismertek a tudomány számára, de feltételezhető okai lehetnek például baktériumok, vírusok vagy mechanikai sejtkárosodás. Az immunrendszer aktiválása során a B-limfociták antitesteket termelnek (IgG), amelyek újabb autoantitesteket (reumafaktor) indukálnak. Az IgG és reumafaktor immunkomplexet képeznek, melyeket a granulociták és a szinoviális membrán sejtei fagocitálnak. Ennek hatására citokinek szabadulnak fel, melyek a gyulladással fenntartásáról gondoskodnak. A reumás ízületben megtalálható citokinek három csoportra oszthatjuk [10]:

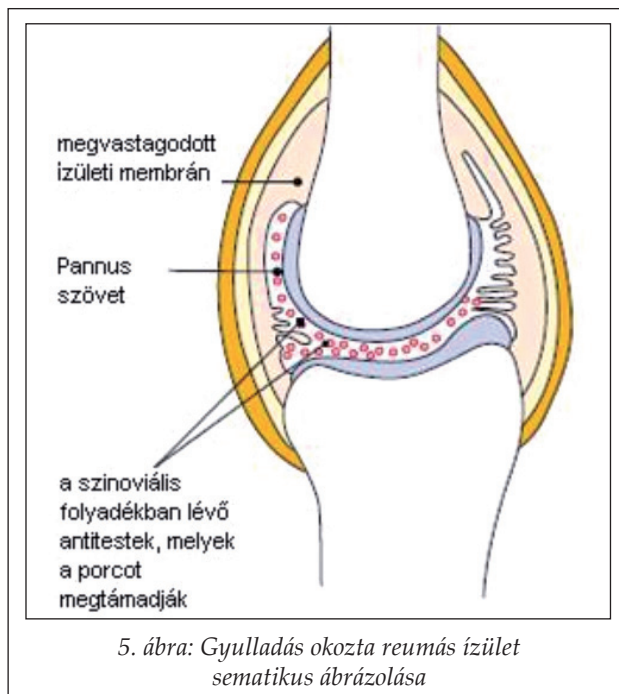
- a proinflammatorikus citokinek, mint az interleukin (IL)-1, -2, -6, -8, -15 és -18 vagy a tumor-nekrózisfaktor-alfa (TNF- $\alpha$ ) szabályozzák az inflammatorikus effektorsejtek (pl. T-sejtek) beáramlását és aktiválását, valamint a kondrociták és a fibroblasztok proliferációját;
- az antiinflammatorikus citokinek, mint az IL-4, -10 és -13 céltudatosan gátolják a proinflammatorikus citokinek;
- az anticitokinféherjék, mint az oldható TNF- $\alpha$ -receptor vagy az IL-1-receptor által szabályozzák a gyulladást, hogy a proinflammatorikus citokinek elfogják.

A rheumatoid arthritis-es betegek ízületében mind a három típusú citokin kimutatható, viszont a megbetegedés során a köztük lévő egyensúly a proinflammatorikus citokinek irányába tolódik el. Az ekkor bekövetkező gyulladás a szinoviális membránról indul el (synovitis), amely először megvastagszik, dudorokat képez és mintegy rostos, szálkás szövet hatol folyamatosan előre (5. ábra) [2]. Az így kialakuló szövetet pannus-nak nevezzük. A pannus-szövetben nagyszámú antitest található, amelyek a porc rombolásához vezetnek. A rheumatoid arthritis az összes ízületben felléphet. Legtöbbször először a kéz- és ujjízületekben alakul ki, de később ugyanúgy elterjedhet a térd- és csípőízületben. A fellépő panaszok különösen az éjjeli és reggeli órákban igen erősek.

A gyulladással reumás megbetegedések további két – ritkábban előforduló – formáját ismerjük: psoriasis arthritis és morbus bechterev. Mind a két esetben autoimmun reakciók váltják ki a megbetegedést.

### 3. Reumás megbetegedések gyógyszeres terápiás kezelése

Az elmúlt évtizedekben eléggé megváltozott a terápiás kezelések és stratégiák száma. A reumás



megbetegedések gyógyszeres kezelése során a beteg rövidebb, esetleg hosszabb időre tünetmentessé válhat. A fájdalom csillapítása a legfontosabb szempont. A gyógyszeres terápiát, konkrétan a hatóanyag csoportokat tekintve, az alábbi lehetőségek állnak rendelkezésre:

- nem szteroid analgetikumok (NSAID);
- nem szteroid antireumatikumok (NSAR);
- glükokortikoidok;
- betegségmódosító szintetikus antireumatikumok (szintetikus DMARD = disease-modifying antirheumatic drug);
- betegségmódosító biológiai eredetű antireumatikumok (biológiai DMARD vagy biológiai anyagok);
- porcleépítést gátló anyagok.

A nem szteroid analgetikumokat (NSAID) további két csoportra oszthatjuk: az opiátok és a nem opiátok. Az előbbibe a tramadol, tilidin, fentanyl, oxikodon, hidromorfon és morfin tartoznak. A nem opiátok csoportjába sorolandó hatóanyagok például a paracetamol és metamizol. Mind az opiátok és a nem opiátok parenterálisan (i.v., i.m., s.c.), illetve szilárd gyógyszerformaként alkalmazhatók a reumás fájdalmak csillapítására. Intraartikuláris formájuk nem található meg a piacon.

A nem szteroid antireumatikumok (NSAR) az ízületben fellépő gyulladást csökkentik, és a fájdalmat csillapítják. Ide tartoznak többek között a következő hatóanyagok: acetilszalicilsav, diklofenák, ibuprofén, indometacin, naproxén, meloxicám és piroxicám. A proinflammatorikus

mediátorok, a prosztaglandin termelését akadályozzák meg. A prosztaglandinnak nemcsak gyulladást okozó hatása van, hanem a gyomorban és vesében egy védekező funkciót is ellát. Ebből kifolyólag a hosszabb ideig történő NSAR kezelés során gyakoriak a gasztrointesztinális, renális, hepaticus és kardiovaszkuláris mellékhatások [11]. A nem szteroid hatóanyagok intraartikuláris formájának kifejlesztése már folyamatban van [12, 13]. A piacon megtalálhatók más módon pl. egyéb parenterális, vagy szilárd és félszilárd összetételeik. A reumás megbetegedésekre használt nem szteroid antireumatikumok topikus készítményeinek terápiás hatékonysága nem kielégítő, mivel csak tüneti kezelésre alkalmasak. A szintén idetartozó szelektív COX-2-gátlók egy ideig forgalomban voltak, viszont a megnövekedett számú kardiovaszkuláris megbetegedések miatt visszavonták őket (Vioxx<sup>®</sup>, Bextra<sup>®</sup>) [14, 15]. Ebbe a csoportba tartozik például a rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib és parecoxib. Jelenleg egy készítmény sincs piacon.

A glükokortikoidok, mint például a prednizon, prednizon, metilprednizon, betametazon vagy dexametazon a reumás gyulladás gyors és hatékony kezelésére alkalmasak. Szabályoznak néhány proinflammatorikus gént, illetve megakadályozzák a proinflammatorikus citokinek szintézisét, valamint a COX-2 indukcióját. Mind szilárd gyógyszeres formában, mind parenterálisan alkalmazhatók. Injekcióként közvetlen az ízületbe való (intraartikuláris) adagolásuk során elkerülhető számos mellékhatásuk, mint például bőr- és izomatropia, Cushing-szindróma, katarakta és a reumatológiában legfontosabb szerepet betöltő, oszteoporózis.

A DMARD-ot az ízületi gyulladással reumás megbetegedések (rheumatoid arthritis) kezelésére használják. Ezek a hatóanyagok általában nem rendelkeznek sem analgetikus sem antiflogisztikus hatással, ezért NSAID-okkal, valamint NSAR-okkal kombinálják őket. A hatóanyagok intraartikuláris alkalmazása a betegek számára még nem hozzáférhető.

Szintetikus DMARD a methotrexát, a leflunomid, az arany vegyületei, chloroquin, hidroxichloroquin, sulfasalazin, ciclosporin, azathioprin valamint D-penicillamin. Nagy hátránya a szintetikus DMARD-oknak, hogy hatásuk, szedésüket követően, több hónapra jelentkezik. Az Európai Reumaellenes Liga (European League Against Rheumatism-EULAR) az első helyen a methotrexátot ajánlja [16]. A methotrexát csökkenti a

limfociták proliferációját, a reumafaktor képzését, valamint a citokinek szintézisét [10]. Előnye a többi DMARD-hoz képest a gyors hatáskifejtés (1-2 hónap). Perorális és intramuszkuláris készítményei vannak forgalomban. A leflunomidot az EULAR a második helyen ajánlja olyan betegek számára, akiknél a methotrexát ellenjavalt. A leflunomid gátolja a pirimidin szintézist, mely nagy szerepet játszik a T-limfociták proliferációjában. Az aranyvegyületek, mint nátriumauriothiomalát (i.m.) és auranofin (p.o.) csökkentik a proinflammatorikus transzkripciósfaktorok aktivitását, így közvetett módon gátolják a gyulladást okozó mediátorok kibocsátását. Az antimaláriás hatóanyagok (chloroquin, hidroxichloroquin) és sulfasalazin csak egyszerűbb tünetek alternatív kezelésére szolgálnak. Hatásuk még nem egészen tisztázott. Az antiflogisztikusan ható immunszuppresszívumot, a ciclosporint az EULAR csak kivételes esetekben ajánlja. Gyulladásgátló hatása az IL-2-szintézis gátlásának köszönhető. Az azathioprin hatása a methotrexatéhoz hasonlít, de kedvezőtlen haszon-kockázat-aránya miatt manapság egyáltalán nem játszik szerepet a reumás megbetegedések gyógyításában. A D-penicillamin a reumafaktorok széthasadását segíti elő, valamint elnyomja a kötőszövet képzését és a proinflammatorikus transzkripciósfaktorok aktiválását. Sok és kellemetlen mellékhatásai miatt csak tartalék gyógyszerként használják.

A biológiai anyagokat, hatásmechanizmusok alapján, további öt csoportra oszthatjuk [17]: TNF- $\alpha$ -gátlók, IL-1-receptorantagonisták, T-sejtek aktiválását gátlók, CD20-antitestek és az IL-6-receptorgátlók. Adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab és infliximab antitestek, amelyek a TNF- $\alpha$ -t gátolják. TNF- $\alpha$  szabályozza az IL-1 és IL-6 termelését és így a fellépő synovitisért és az ízület leépítéséért is felelős. Az etanercept oldható TNF- $\alpha$ -receptorként működik, mely feladata a felesleges TNF- $\alpha$  elfogása. Ezek a hatóanyagok voltak a reumás megbetegedések kezelésének pionír hatóanyagai. A készítmények csak s.c. injekció vagy infúzió formájában találhatók meg a gyógyszerpiacon. Az anakinra egy IL-1-receptorantagonista, amelyet manapság már csak ritkán alkalmaznak a terápiás kezelések során. Az abatacept megakadályozza a T-sejtek aktiválását. Hatékonysága hasonló, mint a TNF- $\alpha$ -gátlóké és a rituximabé (CD20 antitest). A tocilizumab megakadályozza, hogy IL-6 az IL-6-receptorra bekössön. A biológiai szerek hatásmechanizmusából adódóan gyakori mellékhatásként jelentkezik az

injekció helyén fellépő irritáció, valamint a megnövekedett számú infekciós megbetegedés.

A porcleépítést gátló anyagokhoz tartozik például a mukopoliszacharid kénsavészter vagy a D-glukózamin-szulfát. Hatékonyságuk viszont még nem igazolódott. Ezzel szemben az intraartikuláris hialuronsav ízületben elért pozitív hatása már bebizonyosodott. A reumás megbetegedések, legfőképp az ízületi kopásból származóak, a szinoviális folyadék hialuronsav koncentrációjának csökkenésével járnak. Sajnos a gyulladt ízületbe való beinjekciózásuk után gyorsan leépülnek vagy fragmentálódnak [18].

#### 4. Intraartikuláris injekciók

A reumás megbetegedések kezelésére szolgáló orális készítmények (pl.: glükokortikoidok, NSAR) nagy hátránya az, hogy szedésük során kellemetlen szisztémás mellékhatások léphetnek fel. További hatóanyagok pedig rossz biohasznosíthatóságuk miatt csak parenterális formában alkalmazhatók. Az intraartikuláris úton beadott injekciókkal ezek a problémák elkerülhetők. Az ízületek természeti adottságainak köszönhetően tehát igen optimális beviteli kapunak számít az intraartikuláris forma. A legtöbbször a kéz-, térd- és lábízületeket érint a reuma, jó hozzáférhetőségük is az intraartikuláris formának kedveznek. A szinoviális folyadékból csak nagyon kevés hatóanyag jut be a vérkeringésbe, így a szisztémás mellékhatások is elhanyagolhatók.

##### *Követelményei*

A parenterális készítmények, többek között az intraartikulárisak is, a legszigorúbb követelményeket támasztó gyógyszerformák közé tartoznak.

Követelményeket tekintve a következőket kell figyelembe venni:

- sterilitás;
- pirogénmentesség;
- izotónia;
- fiziológiás pH-érték;
- viszkozitás;
- hatóanyagok és segédanyagok összeférhetősége;
- szennyeződés-mentesség;
- csomagolóanyaggal való kompatibilitás;
- tárolás alatti stabilitás.

A parenterális szuszpenziók esetében további követelményeknek kell teljesülniük [19]:

- felrázhatóság/szedimentáció sebessége;

- stabilitás;
- részecskék mérete;
- injekciózhatósága.

Az intraartikuláris készítmények esetében a sterilitás elengedhetetlen. Az oldatos készítmények sterilitása nedves és száraz hővel érhető el, amelyben az összes hatóanyag és segédanyag a folyamat során stabil marad. A többi intraartikuláris gyógyszerforma sterilitását az anyagok megfelelő előkészítésével és az aseptikus körülmények maradéktalan betartásával lehet megteremteni [20]. A steril szűrés nem kivitelezhető a részecskéket tartalmazó, félszilárd és szilárd gyógyszerformáknál.

Izotónia elérése éppen úgy fontos, mint a sterilizálás. A hipotóniás vagy hipertóniás parenterális készítmények szövetkárosodást vagy fájdalmat válthatnak ki [21]. Éppen ezért nagyon fontos egy megfelelő izotóniás érték elérése, amely lehetőség szerint 225 és 430 mOsmol/kg között kell, hogy legyen.

A pH-értéket célszerű a fiziológiás pH-értékre (7,4) beállítani. A fiziológiás értéktől való nagyobb eltérés fájdalmat válthat ki. A kisebb eltérést a szinoviális folyadék képes korrigálni.

A készítmény alkalmazhatóságában rendkívül fontos szerepet játszik a viszkozitás. A nagyobb viszkozitás erős fájdalmat okozhat a betegnek, illetve az optimális injekciózhatóságot megnehezítené, vagy akár teljesen meggátolná.

A készítmények tárolásuk alatt veszíthetnek stabilitásukból. Ebből kifolyólag néhány készítmény száraz por formájában kerül forgalomba, amelyek használatuk előtt oldószerben diszpergálандóak [20]. Néhány termék előretöltött „ready-to-use pre-filled” injekciós tűben található meg a gyógyszerpiacon. A „pre-filled” injekciók alkalmazása során elkerülhető az a kritikus pont, amikor is az ampullából az injekciós tűbe felszívásra kerül a készítmény, mely újabb fertőzési kockázatot rejt magában [22].

Az intraartikuláris szuszpenziók esetében a jó és gyors felrázhatóság, illetve a lassú szedimentáció nagy szerepet játszik a hatóanyag/-ok pontos adagolásában. A fecskendő tűben visszamaradó hatóanyag komoly következményekkel járhat a terápiás kezelés folyamán.

A szuszpenzió stabilitása jó, ha a részecskék újra felrázhatóak és nem agglomerálódnak.

Az intraartikuláris szuszpenziós injekciók részecskéinek optimális méretéről már több tudományos cikk is megjelent. A szuszpendált részek fagocitálásával kapcsolatos eredmények igen különbözőek. Így többek között *Horisawa és mtsai* [23] 265 nm-es polilaktid-glikolsav (PLGA)-alapú

nanoszférák makrofágok általi gyors fagocitálásáról számoltak be. Kísérleteik szerint a 26,5 µm-es PLGA-mikroszférikát a makrofágok csak körülveszik, de nem fagocitálják. Bizonyos esetben a fagocitált nanoszférák képesek a szinovián keresztül a legelső szinoviális szövetekig penetrálni, amelyet *Horisawa és mtsai* pozitív eredményként értékelték. A 400 nm-es PLGA-nanoszférikába zárt vízdoldékony szteroid szintén fagocitálódott, és ezáltal a porc degradációjára pozitív hatással volt [24]. *Butoescu és mtsai* [25] 1 és 10 µm-es mikroszemcsék szinoviocitákkal való biokompatibilitását vizsgálták. A kísérletek igazolták a kiváló biokompatibilitást, illetve a mikroszemcsék fagocitálódását. *Howie és mtsai* [26] vizsgálataik során megállapították, hogy a maximum 5 µm-ig terjedő mikrorészecskék fagocitálódnak, de az annál nagyobbak nem.

Ezekkel ellentétben *Liggins és mtsai* [27] eredményei azt mutatták, hogy a kisméretű PLGA-mikroszférikák (1-20 µm) nagyobb gyulladáshoz vezetnek az ízületben, mint a nagyméretű mikroszemcsék (35-105 µm). Ennek oka a nagy fagocitált frakció. A gyulladáshoz vezető reakció kiváltásánál persze több tényező is befolyásolhatja, mint például a részecskék formája, mérete, koncentrációja és akár a polimer típusa. *Liggins és mtsai* [27] kísérletei szerint a gyulladást a szabálytalan forma is befolyásolta. Véleményük szerint az intraartikuláris készítményekben az optimális forma a szférikus forma. 1-10 µm-es mikroszemcsék esetében a különböző polimerek is különbözőképp befolyásolták a gyulladást [28].

Ugyanakkor *Horisawa és mtsai* [23] arról is beszámoltak, hogy a mikroszférikák szuszpendált formában megmaradnak az ízületi üregben vagy a szinoviális membrán felületére tapadnak. Hasonlóan *Rames és mtsai* [29] és *Nishide és mtsai* [30] publikációikban a nagyobb részecskék (> 20 µm) szinoviális folyadékban való megtartását és biokompatibilitását is bizonyították.

Meg kell tehát jegyezni, hogy a legtöbb irodalom a fagocitózis elkerülését javasolja. Tehát a szemcséknek minimum 5-15 µm között kell lenniük ahhoz, hogy meghaladják a makrofágok méretét, s ezzel megakadályozzák a bekebelezést [26]. Polimer mikroszférikák esetében pedig javasolt a 35-105 µm-es mérettartomány, mivel ezek a szemcsék kevésbé esnek áldozatul a makrofágoknak, tehát nem keletkezik fagocitált maradék, ami önmagában gyulladáskeltő is lehet, ugyanakkor szabályozott hatóanyag felszabadulást biztosítanak heteken keresztül.

### Típusai

Az intraartikuláris injekciós készítményeknek két típusa van, a hatóanyag eloszlása szempontjából: az oldatos (vizes, olajos) és a szuszpenziós forma. Az előzőekhez sorolhatók a vizes oldatok, az emulziók és mikroemulziók, az utóbbiakhoz a nano- és a mikroszemcsék, továbbá a hatóanyag hordozó rendszerek, pl. a liposzómák. Az oldat formájában beadott készítmények hatása rövid ideig tart. Az intraartikuláris összetételek nem maradnak meg az ízületben [31]. Tanulmányok igazolták, hogy NSAID-ok tartózkodási ideje a szinoviális folyadékban 1-5 órát tesz ki [32]. A készítmények hosszabb ideig tartó hatását szuszpenziók segítségével lehet elérni. *Liggins és mtsai* [27] PLA mikroszférikába (35-105 µm) zárt paclitaxellel 30 napig tartó hatást értek el, és mindemellett a PLA mikroszférikák kiváló biokompatibilitásáról is beszámoltak.

Az injektálható szuszpenziók az egyik legösszetettebb gyógyszerformák közé tartoznak, mind stabilitásukat, mind előállíthatóságukat, mind használatukat tekintve [19]. Viszont nagy előnnyel szolgál ez a forma olyan hatóanyagoknál, amelyek az általában vett oldószerekben nem oldódnak, illetve amelyek folyékony formaként hidrolizálódnak vagy oxidálódnak. További előnnyel jár a szabályozott hatóanyag-felszabadulás biztosítása, pl. depóképzéssel [19].

Az intraartikuláris gyógyszerformák ízületben való megtartásáról *Butoescu és mtsai* [33] úgy gondoskodtak, hogy 10 µm-es mikroszférikába zárt dexametazon-acetátot szuperparamagnetikus vasoxid-dal sikeresen kombináltak. Céljuk az volt, hogy a szemcsék mágneses mező hatására tovább maradjanak az ízületi üregben.

A parenterális, többek között az intraartikuláris injekciókban a biztonsággal alkalmazható segédanyagok száma igen nagy. Oldó- vagy diszpergálószerként (szolvens) a víz szolgál. Az izotonizáláshoz legtöbbször nátrium-kloridot, mannitot vagy szorbitot lehet használni. A megfelelő pH-érték nátrium-hidroxiddal, nátrium-hidrogén-foszfáttal, sósavval, foszforsavval vagy citromsavval állítható be. Néhány készítményben még megtalálhatóak más anyagok is: polysorbat 80, mint felületaktív anyag, nátrium-edetát mint stabilizátor, propilén-glikol vagy polietilén-glikol mint koszolvens, és benzilalkohol, metil- vagy propil-4-hidroxibenzoát, illetve cetilpiridinium-klorid, mint tartósítószer [20]. A szuszpenziók stabilizálásához nátrium-karmellóz, hipromellóz vagy zselatin

II. táblázat

Németországban forgalomban lévő intraartikuláris készítmények listája a Rote Liste (2011) alapján

Forgalomban lévő készítmény	Gyógyszerforma	Hatóanyag	Koncentráció* (mg/ml)
ARTROject <sup>®</sup>	oldat	nátrium-hialuronát	5
CELESTAN <sup>®</sup> Depot	szuszpenzió	betametazon	2,7
CELESTAN <sup>®</sup> solubile	oldat	betametazon	4
Curavisc <sup>®</sup>	oldat	hialuronsav	10
Delphicort <sup>®</sup>	szuszpenzió	triamcinolon	25/40
dexa-clinit <sup>®</sup>	oldat	dexametazon	4
Dexa-CT <sup>®</sup>	oldat	dexametazon	4/8
Dexaflam <sup>®</sup> injekt	oldat	dexametazon	4
Dexa HEXAL <sup>®</sup>	oldat	dexametazon	4/8
Dexamethason Abz <sup>®</sup>	oldat	dexametazon	4
Dexamethason-mp <sup>®</sup>	oldat	dexametazon	4
Dexa-ratiopharm <sup>®</sup>	oldat	dexametazon	4/8/10
Diprosone <sup>®</sup> Depot	szuszpenzió	betametazon	2
Fermathron <sup>®</sup>	oldat	nátrium-hialuronát	10
Fortecortin <sup>®</sup> Injekt	oldat	dexametazon	4/8/10
GO-ON <sup>®</sup>	oldat	nátrium-hialuronát	10
Hya-ject <sup>®</sup> / -mini	oldat	nátrium-hialuronát	10
Hya-ject <sup>®</sup> plus	oldat	nátrium-hialuronát	20
Hyalart <sup>®</sup>	oldat	nátrium-hialuronát	10
Hyalubrix <sup>®</sup>	oldat	nátrium-hialuronát	15
Hyaluron HEXAL <sup>®</sup>	oldat	nátrium-hialuronát	10
Lederlon <sup>®</sup>	szuszpenzió	triamcinolon	5/20
Lipotalon <sup>®</sup>	liposzóma	dexametazon	2,5
Monovisc <sup>®</sup>	oldat	nátrium-hialuronát	15-25
Orthovisc <sup>®</sup> / -mini	oldat	nátrium-hialuronát	15
Ostenil <sup>®</sup> / -mini	oldat	nátrium-hialuronát	10
Predni H Injekt <sup>®</sup>	szuszpenzió	prednizolon	10/25/50
Predni Lichtenstein N <sup>®</sup>	szuszpenzió	prednizolon	10/25
Prednigalen <sup>®</sup>	szuszpenzió	prednizolon	10/25/50
Prednisolon <sup>®</sup> Rotexmedica	szuszpenzió	prednizolon	25
Prednisolut <sup>®</sup>	oldat	prednizolon	5/12,5/25/50
Recosyn <sup>®</sup> / -m.d. / -forte	oldat	nátrium-hialuronát	10/20
Supertendin <sup>®</sup>	szuszpenzió	dexametazon; lidokain	5/10; 30/60
Sinovial <sup>®</sup> / -Mini / -HighVisc	oldat	nátrium-hialuronát	8/16
Synvisc <sup>®</sup> / -One	oldat	hialuronsav	8
Triam 40 mg Lichtenstein <sup>®</sup>	szuszpenzió	triamcinolon	40
Triam Hexal <sup>®</sup>	szuszpenzió	triamcinolon	10/40
Triam Injekt <sup>®</sup>	szuszpenzió	triamcinolon	20/40/60
Uni-Injekt <sup>®</sup> /-forte <sup>®</sup>	oldat	nátrium-hialuronát	8/16
Viscoseal <sup>®</sup>	oldat	nátrium-hialuronát	5
Volon A <sup>®</sup>	szuszpenzió	triamcinolon	10/40

\* a hatóanyag sóira vonatkoztatva

## III. táblázat

Magyarországon forgalomban lévő intraartikuláris készítmények listája a GYEMSZI-OGYI gyógyszeradatbázis alapján

Forgalomban lévő készítmények	Gyógyszerforma	Hatóanyag	Koncentráció* (mg/ml)
Depo-Medrol <sup>®</sup>	szuszpenzió	metilprednizolon	40
Dexa-ratiopharm <sup>®</sup>	oldat	dexametazon	4
Diprophos <sup>®</sup>	oldat	betametazon	7
Hyalgan <sup>®</sup>	oldat	nátrium-hialuronát	10
Hydrocortison <sup>®</sup>	szuszpenzió	hidrokortizon; lidokain	25; 5
Kenalog <sup>®</sup>	szuszpenzió	triamcinolon	40
Oradexon <sup>®</sup>	oldat	dexametazon	5

\* a hatóanyag sóira vonatkoztatva

tin alkalmazható. Az üledék gyors és megbízható rediszpergálása elengedhetetlen követelménye a szuszpenzióknak.

A segédanyagokhoz sorolandók a mikroszemcsék hordozó anyagai is, melyek rendkívül nagy szerepet kapnak a hatáskifejtésben. *Butoescu és mtsai* [34] áttekintő közleményében összefoglalásra kerültek a már tesztelt hordozó anyagok. Többek között ilyen anyag a kitozán, albumin, zselatin, PLGA (poli(D,L-laktid-koglikolsav)), PLA (poli(L-tejsav)), PCL (poli(kaprolakton)), kalcium-alginát. A legtöbb publikációban felhasznált és jól bevált polimer a poli(tejsav-glikolsav), a PLGA [23-25, 27]. PLGA nemcsak biológiailag jól lebontható, hanem kiváló biokompatibilis tulajdonsággal is rendelkezik [23, 27].

### 5. A forgalomban lévő intraartikuláris készítmények

Jelenleg Németországban és Magyarországon oldatok és szuszpenziók is megtalálhatók a gyógyszerpiacon. A II. táblázatban a német [35], míg a III. táblázatban a magyar [36] intraartikuláris készítmények kerültek összefoglalásra, illetve összehasonlításra.

A II. és III. táblázatból kiolvasható, hogy milyen hatóanyagok állnak jelenleg a reumás betegek rendelkezésére (a táblázatokban nincsenek feltüntetve azok az intraartikuláris készítmények, melyek diagnosztikai célból kontrasztanyagként szolgálnak illetve homeopátiás készítmények). Szembetűnő a nagyszámú német termék mellett a magyar piacon csekély számban rendelkezésre álló intraartikuláris készítmény. A hatóanyagok nem igen mondhatók változatosnak, mivel csak szteroidok, hialuronsav vagy lidokain jöhet számításba. Mind a két gyógyszerpiacon csak egy-egy kombinációs készítmény található meg. Magyarországon a hidrokortizont kombinálták helyi

érezéstelenítővel, lidokainnal, valamint a németek a dexametazon-lidokain kombinációjának hatásosságáról bizonyosodtak meg. A nátrium-hialuronátot (eddig csak) oldatos formában és különböző koncentrációban hozták forgalomba. Szuszpenziós gyógyszerformaként a magyar piacon a hidrokortizon, metilprednizolon, triamcinolon, valamint a német piacon a betametazon, triamcinolon, prednizolon és dexametazon található meg. Jelenleg egyetlen forgalomban lévő liposzómás intraartikuláris készítmény van, ez a Lipotalon<sup>®</sup>. Hatóanyaga dexametazon-21-palmitát. Segédanyagai: szójababolaj, mint zsíros fázis, tojássárgája foszfolipid, glicerol és víz a vizes fázisban.

### 6. Az intraartikuláris készítmények jövője a kutatásban

Az intraartikuláris kompozíciók igen kecsegtető megoldásnak tűnnek, ha az ízületek könnyű hozzáférhetőségéről (láb-, térd-, kézizületek) és a mellékhatások elkerüléséről van szó. Nagy hátrányuk azonban, hogy az egy-egy ízületen az évenként alkalmazható intraartikuláris kezelések száma igen csekély. Ebből kifolyólag törekedni kell a hatóanyagok ízületben való hosszán tartó hatására, tehát újított hatású készítmények formulálására. Ezek a már szuszpenzióként előállított gyógyszerformáknál részben teljesülnek, azonban a hatóanyagok nano- illetve mikrokapszulázásával a hatáshoz vezető folyamat akár több hétre vagy hónapra is meghosszabbítható lenne. 1986-ban elsőként *Ratcliffe és mtsai* [37] tudósítottak albumint tartalmazó intraartikuláris mikroszféra újított és kontrollált hatóanyag felszabadításáról. Céljuk a gyors clearance elkerülése volt. Továbbá olajos készítmények és hidrogélek formájában is hosszabb ideig tartó hatás érhető el.

Az intraartikuláris készítmények használata során rendkívül nagy a fertőzés veszélye, főképp az

egymás utáni többszöri injekciózás esetében [38]. A „pre-filled”-injekciók alkalmazása során is még fenn áll ez a veszély. Ebből kiindulva érdekessé válik egy antibiotikumot tartalmazó intraartikuláris gyógyszerforma kifejlesztése.

Számos olyan hatóanyag áll rendelkezésünkre, amelyek orális formája nem alkalmazható, nem megfelelő a biohasznosíthatósága, vagy a nagyszámú szisztémás mellékhatása miatt. Ide tartozik néhány hatóanyag a szintetikus és a biológiai DMARD-okból, amelyek intraartikuláris formája megkönnyítené, vagy egyáltalán lehetővé tenné azok alkalmazását.

Ugyanakkor további kombinációs készítmények kifejlesztésére lenne igény, mivel az évenként alkalmazható intraartikuláris injekciók száma igen kevés. Ezúton egy injekciózás alkalmával több hatóanyag is bevitelre kerülne.

#### IRODALOM

1. <http://www.eular.org> EU affaires [2011. 05. 25.] A European League Against Rheumatism honlapja - Rheumatic diseases: a major burden for the European population.
2. Röder, A.: Gelenkrheuma, Ein ratgeber für Betroffene. ALIUD® Pharma GmbH, Laichingen, 2010. pp. 9-12.
3. Zeidler, H.: Synovialflüssigkeit. In: Kulicke W-M. (ed.): Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen. Hüthig und Wepf, Basel, 1986. pp. 405-433.
4. Dewire, P., Einhorn, T.A.: The joint as an organ. In: Moskowitz, R.W., Howell, D.S., Altman, R.D., Buckwalter, J.A., Goldberg, V.M. (eds.): Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical Management. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2001. pp. 49-68.
5. Mason, R.M., Levick, J.R., Coleman, P.J., Scott, D.: Biochemistry of synovium and synovial fluid. In: Archer, C.W., Benjamin, M., Caterson, B., Ralphs, J.R. (eds.): Biology of the Synovial Joint. Harwood Academic, Amsterdam, 1999, pp. 253-264.
6. Balazs, E.A., Gibbs, D.A.: The rheological properties and biological function of hyaluronic acid. In: Balazs, E.A. (ed.): Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix. Academic Press, London-New York, 1970, pp. 1241.
7. Balazs E.A.: Struct Chem 20, 341-349 (2009).
8. Marshall, K.W.: Today's Ther. Trends 15, 99-108 (1997).
9. Simkin, P.A.: Synovial physiology. In: McCarty, D.J. (ed.): Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology. Lea & Febiger, Philadelphia, 1985. pp. 196-209.
10. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M.: Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2001. pp. 243-244.
11. Schett, G.: Internist 49, 263-270 (2008).
12. Elron-Gross, I., Glucksam, Y., Margalit, R.: Int. J. Pharm. 376, 84-91 (2009).
13. Fernandez-Carballido, A., Herrero-Vanrell, R., Molina-Martínez, I.T., Pastoriza, P.: Int. J. Pharm. 279, 33-41 (2004).
14. Topol, E.J.: N. Engl. J. Med. 351, 1707-1709 (2004).
15. Petit-Zeman, S.: Nat. Rev., Drug Discov. 3, 726 (2004).
16. Smolen, J.S et al.: Ann. Rheum. Dis. 69, 964-975 (2010).
17. Heinzl, S.: Pharm. Ztg. 155, 4667-4677 (2010).
18. Wohlrab, W., Neubert, R., Wohlrab, J.: Hyaluronsäure und Haut. Shaker, Aachen, 2004. pp. 5-39.
19. Liebermann, H.A., Rieger, M.M., Banker, G.S.: Pharmaceutical Dosage Forms - Disperse Systems. Dekker, New York, 1996. pp. 285-309.
20. Gerwin, N., Hops, C., Lucke, A.: Advanced Drug Delivery Reviews 58, 226-242 (2006).
21. Bauer, K.H., Frömming, K-H., Führer, C.: Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2002. pp. 238-253.
22. Ayral, X.: Best Pract. Res., Clin. Rheumatol. 15, 609-626 (2001).
23. Horisawa, E., Kubota, K., Tuboi, I., Sato, K., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Kawashima, Y.: Pharm. Res. 19, 132-139 (2002).
24. Horisawa, E., Hirota, T., Kawazoe, S., Yamada, J., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Kawashima, Y.: Pharm. Res. 19, 403-410 (2002).
25. Butoescu, N., Seemayer, C.A., Foti, M., Jordan, O., Doelker, E.: Biomaterials 30, 1772-1780 (2009).
26. Howie, D.W., Manthey, B., Hay, S., Vernon-Roberts, B.: Clin. Orthop. Relat. Res. 292, 352-357 (1993).
27. Liggins, R.T., Cruz, T., Min, W., Liang, L., Hunter, W.L., Burt, H.M.: Inflamm. Res. 53, 363-372 (2004).
28. Ratcliffe, J.H., Hunneyball, I.M., Smith, A., Wilson, C.G., Davis, S.S.: J. Pharm. Pharmacol. 36, 431-436 (1987).
29. Ramesh, D.V., Tabata, Y., Ikada, Y.: J. Bioactive Compat Polymers 14, 137-149 (1999).
30. Nishide, M., Kamei, S., Tabata, Y., Ikada, Y.: J. Bioactive Compat Polymers 14, 385-398 (1999).
31. Bragdon, B., Bertone, A.L., Hardy, J., Simmons, E.J., Weisbrode, S.E.: J. Invest. Surg. 14, 169-182 (2001).
32. Owen, S.G., Francis, H.W., Roberts, M.S.: Br. J. Clin. Pharmacol. 38, 349-355 (1994).
33. Butoescu, N., Jordan, O., Burdet, P., Stadelmann, P., Petri-Fink, A., Hofmann, H., Doelker, E.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 72, 529-538 (2009).
34. Butoescu, N., Jordan, O., Doelker, E.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 73, 205-218 (2009).
35. Rote Liste, Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte), Rote Liste® Service GmbH, Editio Cantor Verlag, Aulendorf (2011).
36. Pharmindex, Zsebkönyv 2009/1, CMPMedica Információs Kft., Budapest (2009).
37. Ratcliffe, J.H., Hunneyball, I.M., Wilson, C.G., Smith, A., Davis, S.S.: J. Pharm. Pharmacol. 39, 290-295 (1986).
38. Albert, C., Brocq, O., Gerard, D., Roux, C., Euller-Ziegler, L.: Joint Bone Spine 73, 205-207 (2006).

[Érkezett: 2011. június 10.]



## Az egyensúlyi oldhatóság meghatározásának helyes gyakorlata II. Ionizálható vegyületek pH-függő oldhatóságának vizsgálata

VÖLGYI GERGELY, BAKA EDIT, KOVÁCS MÁRTA, TAKÁCSNÉ NOVÁK KRISZTINA\*

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, 1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

\*Levelezési cím: novkri@gytk.sote.hu

### Summary

Völgyi, G., Baka, E., Kovács, M., Takács-Novák, K.: *Good laboratory practice of equilibrium solubility measurement II. Study of pH-dependent solubility of ionizable compounds*

In this paper the pH-equilibrium solubility profiles of ionizable drugs are presented. The aim of the present work was to study the validity of the Henderson-Hasselbalch (HH) relationship in the case of structurally diverse weak bases. In the case of monoprotic bases, namely papaverine, promethazine and propafenone the experimental equilibrium solubility data precisely follow the theoretical HH curve until the limit of salt solubility. The common ion effect on salt solubility was found to be significant at low pHs. Deviation from the HH equation in the case of dibasic quetiapine hydrogen fumarate can be easily interpreted with the formation of different salt compositions. The significance of pH control and the effect of the salt form (e.g., fumarate) was also investigated. It is critical that the  $pK_a$  value and the intrinsic solubility are accurately determined when the HH relationship is used to predict the pH-dependent aqueous solubility of drugs.

**Keywords:** pH-dependent solubility; intrinsic solubility; Henderson-Hasselbalch relationship; ionizable drugs; shake-flask method.

### Összefoglalás

Jelen közleményben<sup>1</sup> a szerzők az ionizálható gyógyszer-molekulák pH-függő oldhatóságát vizsgálták, melynek célja eltérő szerkezetű gyenge bázisoknál a Henderson-Hasselbalch (HH) összefüggés érvényességének tanulmányozása volt. Egyértékű bázisoknál (papaverin, prometazin és propafenon) a különböző pH-kon mért egyensúlyi oldhatóság adatok jól követik az elméleti HH görbét egészen a só oldhatóságának maximumáig, majd a sajátion oldhatóságot csökkentő hatása tapasztalható alacsony pH értékeknél. A kétértékű quetiapin bázisnál a HH egyenlettel való eltérések a különböző összetételű sók képződésével jól magyarázhatók. A pH ellenőrzés jelentőségét, valamint a szerves sóképző (pl. fumarát) oldhatóságot befolyásoló hatását szintén vizsgálták. Külön kiemelik, ha a HH összefüggést a gyógyszer-molekulák pH-függő oldhatóságának becslésére kívánjuk alkalmazni, akkor ennek előfeltétele a  $pK_a$  és az intrinszc oldhatóság értékek precíz meghatározása.

**Kulcsszavak:** pH-függő oldhatóság; intrinszc oldhatóság; Henderson-Hasselbalch összefüggés; ionizálható vegyületek; telítésszázalékos módszer.

### Bevezetés

Az *Acta Pharmaceutica Hungarica* előző számában megjelent, Baka Edit: „Az egyensúlyi oldhatóság meghatározásának helyes gyakorlata” című közleményének [1] folytatásaként ez alkalommal az ionizálható gyógyszer-molekulák pH-függő oldhatóság vizsgálata során szerzett tapasztalatainkat foglaljuk össze.

A gyógyszervegyületek döntő hányada savas és/vagy bázikus funkciós csoportot tartalmazó molekula, ezért oldatban a közeg pH-jától függően töltéssel rendelkező ionos, vagy töltéssel nem rendelkező semleges formában fordulnak elő. Az anionos, kationos vagy ikerionos részecskék vízben való oldhatósága nagyobb, mint a semleges részecskéké, így az ionizálható molekulák oldhatósága pH-függést mutat, mely a Henderson-Hasselbalch (HH) egyenlettel írható le [2-3]. Egyértékű savakra (1), egyértékű bázisokra (2), illetve kétcsoportos amfoter molekulákra (3) az oldható-

ság és a pH közötti összefüggés az alábbi egyenletekkel adható meg:

$$\log S = \log S_0 + \log(10^{\text{pH}-\text{p}K_a} + 1) \quad (1)$$

$$\log S = \log S_0 + \log(10^{\text{p}K_a-\text{pH}} + 1) \quad (2)$$

$$\log S = \log S_0 + \log(10^{\text{p}K_{a1}-\text{pH}} + 10^{\text{pH}-\text{p}K_{a2}} + 1) \quad (3)$$

ahol  $S$  a látszólagos oldhatóság (egyensúlyi oldhatóság egy adott pH-n, ahol a molekula ionizált formája is jelen van),  $S_0$  az intrinszc oldhatóság (a nemionizált forma egyensúlyi oldhatósága), míg a  $pK_a$  a molekula disszociációs állandójának negatív logaritmus.

A HH összefüggés alkalmazható egy vegyület adott pH-n érvényes, vízben való oldhatóságának becslésére, ha ismert a vegyület intrinszc oldható-

<sup>1</sup> A közlemény „Baka Edit: Gyógyszerek oldhatóságának meghatározására alkalmas módszerek vizsgálata és fejlesztése (2010)” című PhD dolgozata (témavezető: Takácsné Novák Krisztina) és „Kovács Márta: Ionizálható vegyületek oldhatóságának vizsgálata (2010)” című szakdolgozata (témavezető: Takácsné Novák Krisztina) alapján készült.

sága és  $pK_a$  értéke. A gyógyszerkutatás során főként a szervezet fiziológiás pH értékein (pH 1,5; 5,5; 6,8; 7,4) lévő oldhatósági értékekre vagyunk kíváncsiak [4], melyek kísérletesen megmérhetők, vagy a fenti összefüggésekből kiszámíthatók.

A gyógyszerjelölt molekulák oldhatóságának meghatározása hatósági irányelvek szerint történik [5-6]. Az FDA előírása alapján a gyógyszerjelölt vegyületek egyensúlyi oldhatóságát vizes közegben,  $37 \pm 1$  °C-on, az oldhatóság-pH profil megállapításának céljából 1 és 7,5 közötti pH tartományban kell meghatározni. A pontos oldhatóság-pH profil felvételéhez megfelelő számú pH értéken szükséges az oldhatóság mérése, melyet a vizsgálni kívánt anyag ionizációs tulajdonsága határoz meg. Például, ha egy molekula  $pK_a$  értéke 3 és 5 közötti, akkor az oldhatóságát a következő 5 pH értéken kell mérni:  $pH = pK_a$ ,  $pH = pK_a + 1$ ,  $pH = pK_a - 1$ ,  $pH = 1$  és  $pH = 7,5$ . A mérésekhez az Amerikai Gyógyszerkönyvben hivatalos tompítóoldatokat lehet használni. Amennyiben ezek a tompítóoldatok valamely fizikai vagy kémiai oknál fogva nem megfelelőek, más pufferoldat is alkalmazható. Az EMA irányelv alapján a gyógyszeranyag pH-függő oldhatóságát pH 1 - 6,8 tartományban  $37 \pm 1$  °C-on kell vizsgálni, melynek során a preferált pH értékek a következők: 1,2; 4,5; 6,8. Ezenfelül a vegyület  $pK_a$  értékének megfelelő pH-n is szükséges az egyensúlyi oldhatóság meghatározása, feltéve, ha a vegyület  $pK_a$  értéke az előírt pH-tartományba esik. Mindkét hatósági útmutató a telítékes-rázótölcséres oldhatóság meg-

határozási módszert írja elő referenciaként, de lehetőség van más technika alkalmazására is, ha igazolni tudjuk, hogy az adott módszer alkalmas a vizsgálni kívánt vegyület egyensúlyi oldhatóságának mérésére. A tompítóoldatok pH-jának ellenőrzése az anyag hozzáadása után szintén előírás.

A HH összefüggés érvényességét széles körben vizsgálták, és néhány esetben leírták annak korlátait is [2,4,7-10]. Az oldott anyag molekulái között létrejövő különféle molekuláris kölcsönhatások, mint az aggregáció, vagy a micellaképződés befolyásolhatják az oldhatóságot. Ilyen esetekben általában szokatlanul magas oldhatóság tapasztalható [11]. A vegyületek polimorfiaja szintén hatással van az oldhatóságra. Általánosságban megállapítható, hogy egy adott vegyület legnagyobb és legkisebb oldhatóságú polimorf módosulatának oldhatósági aránya kisebb, mint 2, de néhány esetben jelentősen nagyobb különbséget is megfigyeltek a módosulatok oldhatósága között [12-13].

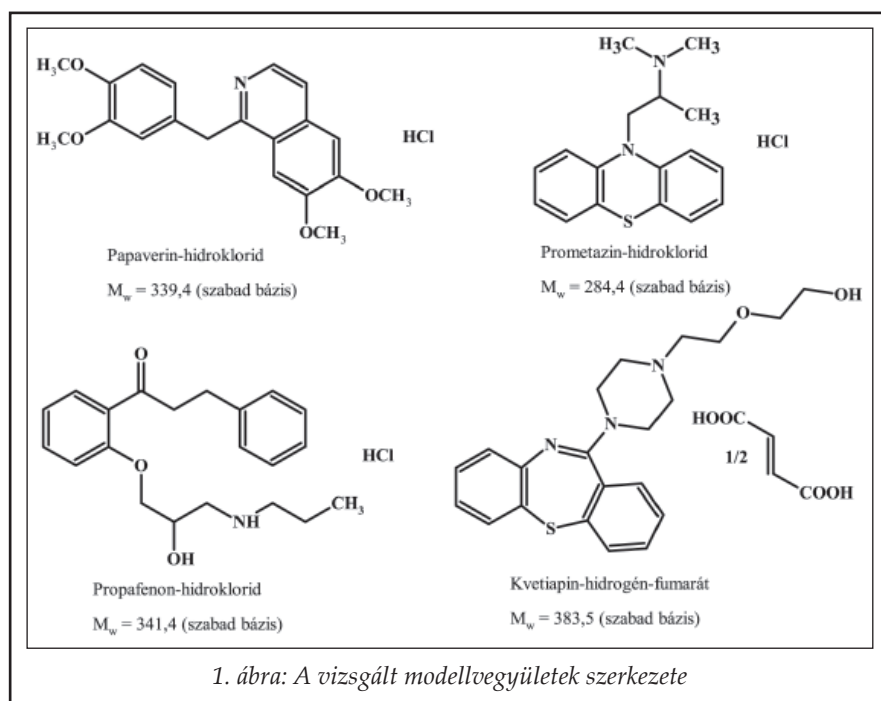
Jelen közleményben eltérő szerkezetű, bázikus karakterű gyógyszermolekulák példáján keresztül ismertetjük az egyensúlyi oldhatóság pH-függését, vizsgáljuk a Henderson-Hasselbalch összefüggés érvényességét, illetve az ettől való eltérések lehetséges okait.

## Kísérleti rész

### Vizsgált vegyületek

Az oldhatóság pH-függésének vizsgálata során kapott eredményeinket az alábbiakban felsorolt 4 szerves bázis példáján keresztül szemlélítjük: papaverin-hidroklorid, prometazin-hidroklorid, propafenon-hidroklorid és kvetiapin-hidrogén-fumarát (1. ábra).

A tompítóoldatok készítéséhez ecetsavat (Reanal), foszforsavat, bórsavat, dinátrium-hidrogén-foszfátot (Sigma), kálium-dihidrogén-foszfátot (Sigma), valamint gyógyszerkönyvi minőségű, frissen kiforralt és lehűtött desztillált vizet használtunk. A Britton-Robinson alapoldat 0,04 M ecetsav, 0,04 M foszforsav és 0,04 M bórsav elegye, melyből 0,2 M nátrium-hidroxid hoz-



1. ábra: A vizsgált modellvegyületek szerkezete

záadásával állítottuk elő a kívánt pH-jú tompítóoldatot. A különböző pH-jú foszfát tompítóoldatokat 1/15 M dinátrium-hidrogén-foszfát és 1/15 M kálium-dihidrogén-foszfát oldatok elegyítésével készítettük.

A potenciometriás titrálásnál alkalmazott kálium-hidroxid (Sigma) és sósav (Sigma) mérőoldatokat kálium-hidrogén-ftalátra (Sigma), illetve trisz-(hidroximetil)-aminometánra (Sigma) faktoroztuk. Az oldatok ionerősségének beállításához kálium-kloridot (Sigma) használtunk.

A vizsgált minták, valamint a felhasznált anyagok analitikai tisztaságúak voltak.

### Műszerek

A vegyületek disszociációs állandóinak meghatározását GLpKa automata  $pK_a$  analizátorral (Sirius Analytical Instruments Ltd., UK) végeztük. A titrálásokhoz kombinált üvegelektrodát használtunk. Az eredményeket RefinementPro™ szoftvert (Sirius Analytical Instruments Ltd., UK) segítségével számítottuk ki.

A telítéses-rázótölcséres oldhatósági vizsgálatokhoz készített tompítóoldatok pH beállítását és az oldatok pH ellenőrzését Radiometer PHM 220 pH mérőhöz kapcsolt kombinált Ag-AgCl üvegelektroddal végeztük. A mérésekhez szükséges konstans hőmérsékletet ( $t = 25,0 \pm 0,5$  °C vagy  $37,0 \pm 0,5$  °C) Lauda termosztáttal biztosítottuk. A fázisok kevertetéséhez Heidolph MR 1000 mágneses keverőt használtunk. A minták koncentrációját spektrofotometriásan Jasco V-550 UV/VIS spektrofotométerrel határoztuk meg.

A potenciometriás oldhatósági vizsgálatokat D-PAS spektrofotométerrel kapcsolt GLpKa titrátorral végeztük. A kiértékelésekhez RefinementPro™ és CheqSol szoftvert (Sirius Analytical Instruments Ltd., UK) alkalmaztunk.

### Módszerek

#### Potenciometriás $pK_a$ meghatározás

Az elektród kalibrálása vizes közegben és metanol/víz elegyben az ún. négyparaméteres kalibráló eljárással (Four Plus™ módszer) történt [14-15].

A kétértékű kvetiapin bázis  $pK_a$  értékeit vizes közegben végzett potenciometriás titrálással határoztuk meg, melynek során a kvetiapin-hidrogénfumarát ~ 1 mM koncentrációjú vizes oldatának 10 ml-ét 0,5 M koncentrációjú sósav mérőoldattal pH 1,8-re állítottuk, és ezt az oldatot titráltuk pH 12,2-

ig 0,5 M koncentrációjú kálium-hidroxid mérőoldattal.

A papaverin, prometazin és propafenon bázisok  $pK_a$  értékeit metanol/víz elegyekben végzett potenciometriás titrálásokkal határoztuk meg alacsony vízdoldhatóságuk miatt. Mindegyik mintát legalább négy különböző szerves oldószer tartalmú metanol/víz elegyben titráltuk, a metanol koncentrációját 14-37 m/m% között változtattuk. A mérés egyéb körülményei megegyeztek az előzőekben leírtakkal. A metanol/víz elegyekben mért  $p_s K_a$  értékekből a vizes közegre vonatkozó  $pK_a$  értékeket Yasuda-Shedlovsky extrapolációval kaptuk [16-17].

A titrálásokat konstans ionerősség ( $I = 0,15$  M KCl) és hőmérséklet ( $t = 25,0 \pm 0,5$  °C vagy  $37,0 \pm 0,5$  °C) mellett végeztük, a titrálóedényekre nitrogén gázt vezettünk. A minták  $pK_a$  értékeit RefinementPro™ 2.2 program felhasználásával, legalább 3 párhuzamos titrálásból számítottuk.

#### Az oldhatóság meghatározása telítéses-rázótölcséres módszerrel

A vegyületek egyensúlyi oldhatóságát széles pH tartományban a telítéses-rázótölcséres módszer új protokolljával határoztuk meg [18], melynek során a vizsgált mintát a megfelelő tompítóoldat 5-10 ml-es térfogatában oldottuk heterogén rendszer (szilárd anyag + oldat) kialakulásáig. A szilárd anyagfelesleget tartalmazó oldatokat 6 órán keresztül mágneses keverővel, termosztált körülmények között, az oldódási egyensúly eléréséig intenzíven kevertettük, majd 18 órás ülepítést követően a tiszta telített oldatból mintát vettünk, és megfelelő hígítás után UV-spektrofotométerrel meghatároztuk a hígított minták abszorbanciáját. Az előzetesen meghatározott fajlagos abszorpciós koeficiensek segítségével kiszámítottuk a telített oldatok koncentrációját. Az egyensúlyi oldhatóságot minden esetben legalább 3 párhuzamos mérés eredményéből számítottuk.

#### Az oldhatóság meghatározása potenciometriás titrálással

A vizsgált vegyületek intrinszc oldhatóságát egy közelmúltban bevezetett, potenciometriás titrálás alapuló módszerrel (CheqSol módszer) is meghatároztuk [19-20]. A mérések során a minták vizes oldatának 10 ml-ét 0,5 M koncentrációjú sósav mérőoldattal az ionizált formát biztosító 2-es pH-ra állítottuk, és ezt az oldatot titráltuk 0,5 M kon-

I. táblázat

A vizsgált vegyületek telítési-rázótöltséres módszerrel és potenciometriás titrálással meghatározott egyensúlyi oldhatóság értékei

Papaverin-hidroklorid	Prometazin-hidroklorid	Propafenon-hidroklorid	Kvetiapin-hidrogén-fumarát
$pK_a = 6,36$	$pK_a = 8,71$	$pK_a = 9,32$	$pK_{a1} = 3,56$ $pK_{a2} = 6,83$
CheqSol $S_0 = 0,0017$ g/100 mL	CheqSol $S_0 = 0,0033$ g/100 mL	CheqSol $S_0 = 0,0004$ g/100 mL	CheqSol $S_0 = 0,0310$ g/100 mL
Rázótöltséres adatok pH                    S [g/100 mL]	Rázótöltséres adatok pH                    S [g/100 mL]	Rázótöltséres adatok pH                    S [g/100 mL]	Rázótöltséres adatok pH                    S [g/100 mL]
0,06                    0,139	1,40                    25,71	2,98                    0,537	1,03                    4,23
1,03                    0,643	3,04                    78,37	5,53                    0,548	1,33                    12,40
1,05                    1,170	5,24                    65,79	6,78                    0,535	1,83                    48,05
2,08                    3,688	6,86                    0,170	7,42                    0,088	3,06                    7,16
2,86                    3,906	6,99                    0,224	8,43                    0,009	3,60                    1,633
3,51                    2,413	7,06                    0,217	9,01                    0,0033	4,21                    0,776
3,74                    1,903	8,50                    0,0124	9,69                    0,0010	4,49                    0,595
4,42                    0,149	8,85                    0,0066	11,66                    0,0008	5,11                    0,574
4,55                    0,106	8,90                    0,0039	11,86                    0,0006	5,81                    0,488
4,70                    0,0692	9,20                    0,0033		6,80                    0,101
6,12                    0,0046	10,78                    0,0031		10,01                    0,057
8,02                    0,0017	10,80                    0,0027		12,02                    0,055
11,71                    0,0017			

centrációnak kálium-hidroxid mérőoldattal a nemionizált szabad bázis oldatból történő kiválasztás. Ezt az enyhe opaleszcenciát a titrálóedénybe vezetett optikai kábel segítségével UV detektor érzékelte. Ebben a kétkomponensű rendszerben ezután sav illetve lúg mérőoldatok adagolásával olyan kis pH változásokat idéztünk elő, amely során a semleges részecske ingadozott az egyensúlyi, telített állapot körül, vagyis olyan folyamatok indultak meg a rendszerben, melyek vagy telítetlen oldat, vagy pedig túltelített oldat képződéséhez vezettek volna. E folyamatokat a pH időbeni változásának követésével, a pH-gradiens (dpH/dt) monitorozásával vizsgáltuk.

A pH változás iránya ugyanis fontos információt szolgáltat az oldat telítettségi szintjéről. A bázikus molekulák túltelített oldatában a nemionizált forma (B) fokozatos kiválasztása az oldatból negatív pH-gradienst eredményez. Ezzel ellentétben, a telítetlen oldatban a nemionizált bázis oldódása miatt a pH-gradiens pozitív. Ha a pH-gradienst ábrázoljuk az idő függvényében, akkor látható, hogy a rendszer az egyensúlyi állapot körül oszcillál. A pH-gradiens változásaiból meghatározható az a pontos pH érték, amelynél a rendszer egyensúlyban lenne, melyből a nemionizált részecske termodinamikai oldhatósága tömeg- és töltésegységek alapján kiszámítható. Ehhez többek között szükség van az oldat térfogatának, a hozzáadott

sav, illetve lúg mérőoldat mennyiségének és koncentrációjának, az oldat ionerősségének és hőmérsékletének, valamint a bemért minta tömegének és  $pK_a$  értékének pontos ismeretére.

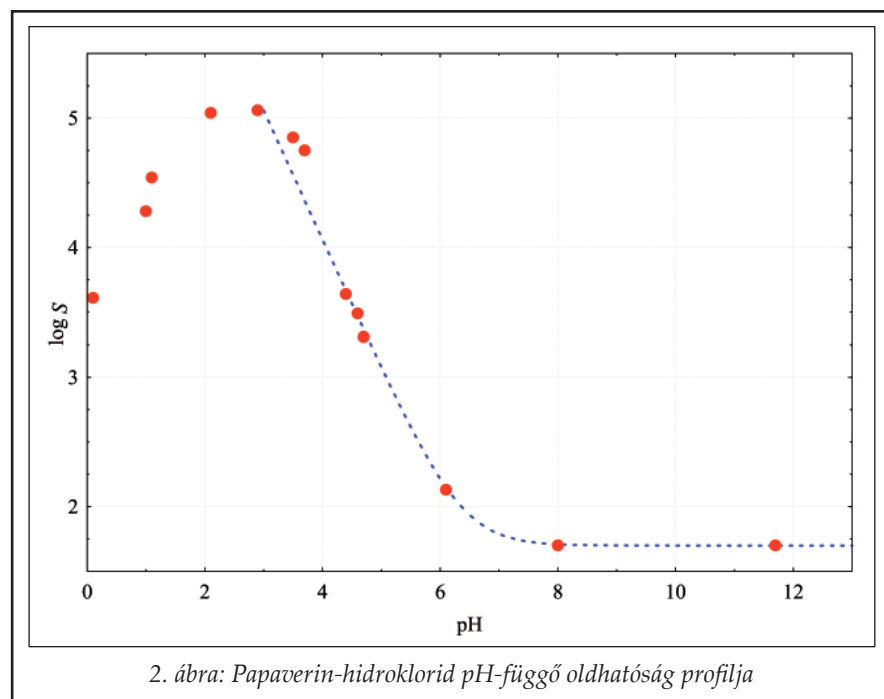
A titrálásokat konstans ionerősség ( $I = 0,15$  M KCl) és hőmérséklet ( $t = 25,0 \pm 0,5$  °C vagy  $37,0 \pm 0,5$  °C) mellett végeztük, a titrálóedényekre nitrogén gázt vezettünk. A minták intrinszc oldhatóságát legalább 3 párhuzamos titrálásból számítottuk.

### Eredmények és értékelésük

Kísérleti munkánk során a vegyületek pontos  $pK_a$  értékeit potenciometriás módszerrel határoztuk meg. A vegyületek  $\log S_0$  mérését két független módszerrel végeztük – a telítési-rázótöltséres módszer új protokolljával, valamint a CheqSol módszerrel – a minél pontosabb meghatározás érdekében.

A telítési-rázótöltséres módszerrel széles pH tartományban (pH: 0-12) mért egyensúlyi oldhatósági eredményeket, valamint a CheqSol módszerrel mért  $\log S_0$  értékeket az I. táblázat összegzi. A két független oldhatóság meghatározási módszerrel kapott intrinszc oldhatóság értékek jó egyezést mutatnak.

Az elméleti HH görbéket a nagy pontossággal meghatározott  $pK_a$  értékekből és a telítési-rázótöltséres módszerrel meghatározott intrinszc old-



hatósági eredményekből generáltuk. A 2-5. **ábrákon** a kék szaggatott vonal jelzi a  $pK_a$  és  $\log S_0$  értékek alapján felvett elméleti HH görbéket, míg a piros pontokkal a telítéss-rázótölcséres módszerrel az egyedi pH értékeken mért egyensúlyi oldhatóság eredményeket jelöltük. A továbbiakban a kísérleti eredmények bemutatására, valamint magyarázatára vegyületenként kerül sor.

#### Papaverin-hidroklorid

A mérésekhez a papaverin bázis ( $pK_a = 6,36$ ) hidroklorid sóját használtunk. A vegyület rázó-tölcséres módszerrel mért intrinsic oldhatósága  $0,0017 \text{ g}/100 \text{ ml}$  ( $\log S_0 [\mu\text{M}] = 1,70$ ), amely tökéletes egyezést mutat a CheqSol módszerrel mért eredménnyel ( $0,0017 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ,  $\log S_0 [\mu\text{M}] = 1,70$ ).

A 2. **ábra** a papaverin oldhatóság-pH profilját ábrázolja. A különböző pH értékeken mért oldhatósági adatok jól illeszkednek a prediktált HH görbére. 8-as pH felett azonos egyensúlyi oldhatósági értékeket mértünk, ami a nemionizált szabad bázis oldhatóságát mutatja. A pH 3 és 8 közötti tartományban a pH csökkentése az oldhatóság folyamatos növekedését eredményezte, amely során a papaverin szabad bázis formája fokozatosan átalakult egyszeresen protonált kationos formává. 3-as pH körül a kationossá protonálódott papaverin kloridsója eléri az oldhatósági maximumát. Egy vegyület maximális oldhatóságát só formájában éri el, melynek értékét az oldhatósági szorzat határozza meg az egyensúlyi oldhatóság – pH profil

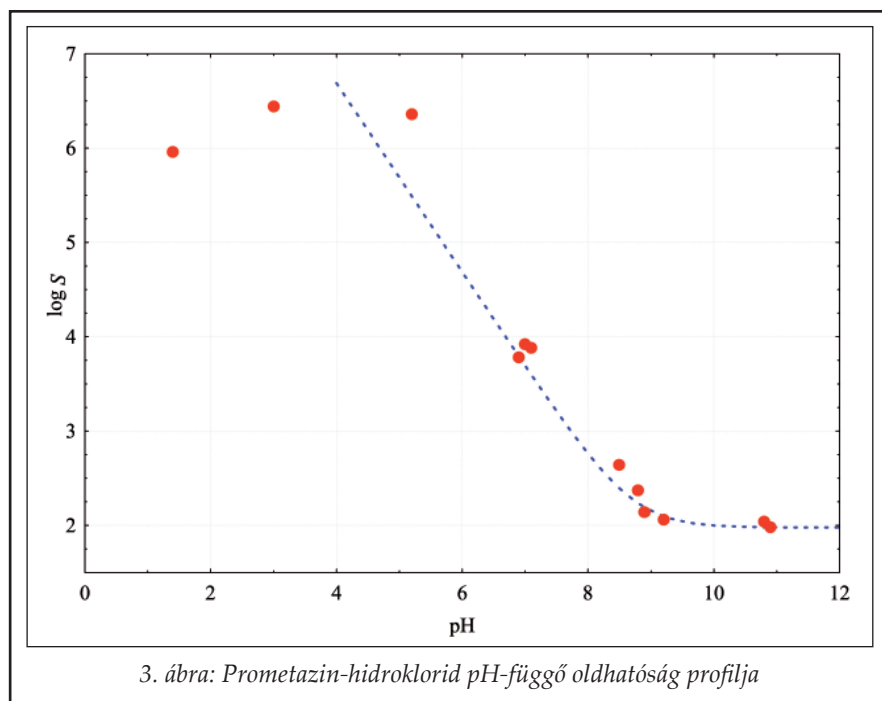
során. pH 2 és 3 közötti tartományban állandó oldhatósági értékeket kaptunk, amely a kloridsó oldhatóságát jelenti. 2-es pH alatt az oldhatóság fokozatos csökkenését tapasztaltuk. Ez a jelenség a sajátion hatás következménye a kloridsó oldhatóságára [21], ugyanis 2-es pH alatt a közeg pH-jának beállítását sósav oldattal végeztük, ezért a kloridion koncentráció ugrásszerű növekedése az oldhatóság csökkenését eredményezte. Ezek a megfigyelések összhangban vannak az irodalomban leírtakkal [22-23].

#### Prometazin-hidroklorid

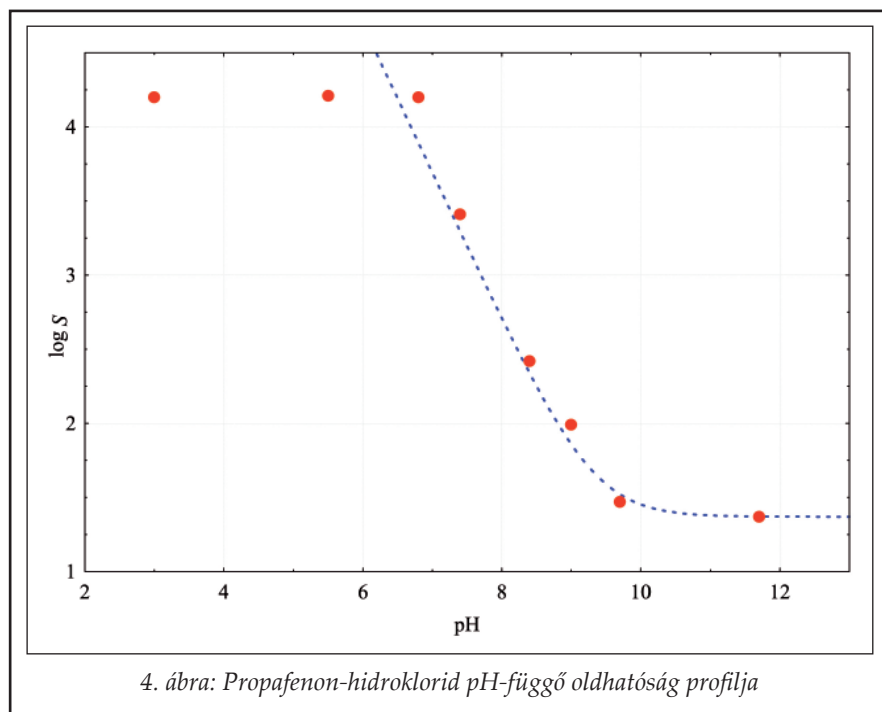
Az oldhatóság mérésekhez az egyértékű gyenge bázis prometazin hidroklorid sóját használtunk. A prometazin alifás terciér nitrogénjének  $pK_a$  értéke  $8,71$ . A vegyület telítéss-rázótölcséres módszerrel mért intrinsic oldhatósága  $0,0027 \text{ g}/100 \text{ ml}$ -nek adódott ( $\log S_0 [\mu\text{M}] = 1,98$ ), ami kiváló egyezést mutat a CheqSol módszerrel mért eredménnyel ( $0,0033 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ,  $\log S_0 [\mu\text{M}] = 2,06$ ).

A prometazin esetében is a kísérleti úton meghatározott oldhatósági eredmények szorosan követik az elméleti görbét (3. **ábra**). A pH 10,5 felett mért oldhatósági értékek közeli egyezést mutattak egymással, ami azt jelenti, hogy ezeken a magas pH értékeken a szabad bázis oldhatóságát mértük. 10-es pH alatt a szabad prometazin bázis fokozatosan átalakul egyszeresen protonált kationos formává, majd 5-ös pH körül a kloridsó oldhatósága eléri a határát, melyet a pH 3 és 5,5 között kialakuló plató is jelez. Alacsonyabb pH értéken (pH 2 alatt) a prometazin esetében is csökkent a só oldhatósága a sajátion hatás következményeként.

A prometazin oldhatóság-pH függését korábban már *Bergström* és munkatársai is vizsgálták, azonban az eredményeik szignifikáns eltérést mutattak a HH összefüggéssel kapott prediktált görbétől [4]. Kísérleti munkájuk során a vegyület miniatűrített rázó-tölcséres módszerrel (*small-scale shake-flask method*) meghatározott intrinsic oldhatósága  $\log S_0 [\mu\text{M}] = 0,3$ -nek adódott. Ez az eredmény két logaritmus egységgel kisebb, mint az általunk mért érték. Feltehetően a HH összefüggéstől való eltérés egyik oka a rossz kiindulási intrinsic



3. ábra: Prometazin-hidroklorid pH-függő oldhatóság profilja



4. ábra: Propafenon-hidroklorid pH-függő oldhatóság profilja

ve a méréseket foszfát tompítóoldat használatával, hasonló csökkenést tapasztaltunk az oldhatósági eredményekben, amely jelezte a vegyület foszfáttal való nagymértékű kölcsönhatását. pH = 3,6-en 0,067 M-os foszfát tompítóoldatban az egyensúlyi oldhatóságot 0,744 g/100 ml-nek mértük, míg 0,15 M-os foszfát tompítóoldatban csak 0,189 g/100 ml-es egyensúlyi oldhatósági eredményt kaptunk.

#### Propafenon-hidroklorid

Az oldhatóság meghatározásokhoz a propafenon hidroklorid sóját használtuk, ami szintén egy egyértékű gyenge bázis sója. A propafenon alifás szekunder nitrogénjének  $pK_a$  értéke 9,32, ezért a vegyület csak pH 11 felett van jelen teljesen nemionizált szabad bázis formában. A propafenon intrinsic oldhatósága 0,0006 g/100 ml ( $\log S_0[\mu\text{M}] = 1,24$ ), ami megfelelő egyezést mutat a CheqSol módszerrel mért értékkel (0,0004 g/100 ml,  $\log S_0[\mu\text{M}] = 1,07$ ).

A kísérleti úton meghatározott oldhatóság értékek a propafenon esetében is jól illeszkednek az elméleti HH görbére (4. ábra). A pH 6,5 alatti konstans oldhatósági adatok ez esetben is a klorid só oldhatóságát mutatják.

A propafenon-hidroklorid a másik olyan vegyület, amelynek oldhatóság pH-függését *Bergström* és munkatársai vizsgálták [4]. A propafenon disszociációs állandójának értéke ( $pK_a = 8,8$ ), amelyet az elméleti HH görbe számításához használtak, irodalmi adat volt, amely fél logaritmus egységgel kisebb, mint az általunk szerves oldószer-víz elegyből történő extrapolációval meghatározott érték. A másik eltérés a vegyület intrinsic oldhatóságában mutatkozott. *Bergström* kutatócsoportja által mért intrinsic oldhatóság  $\log S_0[\mu\text{M}] = 0,8$  volt. Kísérle-

oldhatósági adat. Méréseik során az oldhatóság-pH függvény lineáris szakaszának meredeksége  $-0,7 \log S$  egység/pH egységnek adódott. Ez az érték szintén eltérést mutat az elméleti HH görbétől, amelynek meredeksége egyértékű gyenge bázisok esetében  $-1 \log S$  egység/pH egységként van definiálva. Az eltérések okaként a foszfát ellenion kizósási hatását feltételezték [4]. Ez a jelenség Britton-Robinson tompítóoldat alkalmazása mellett nem volt megfigyelhető. Ugyanakkor megismétel-

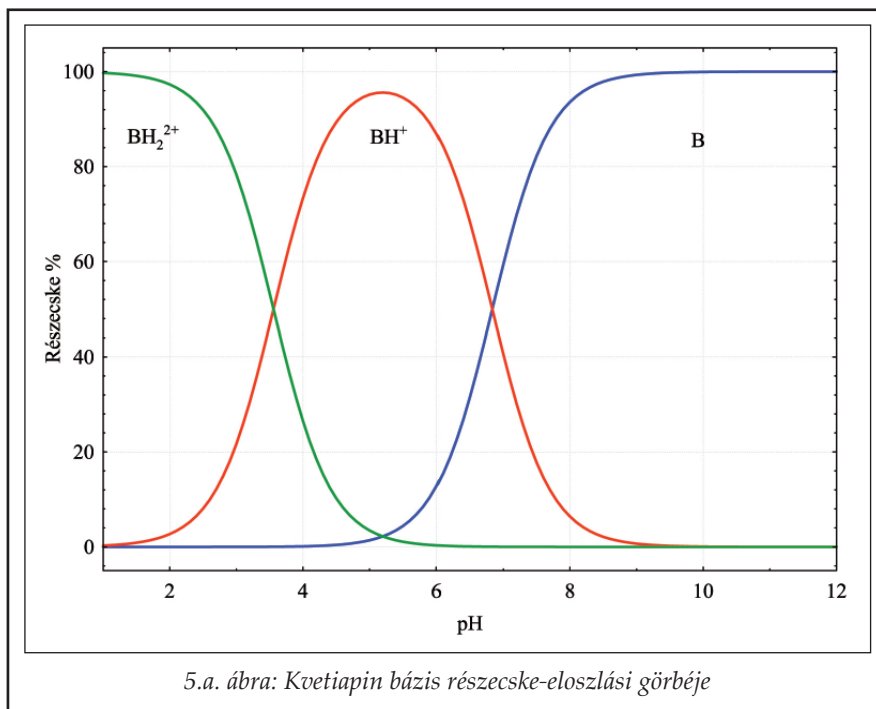
teikben a különböző pH-kon mért egyensúlyi oldhatósági adatpontokra illesztett görbe lineáris szakaszának meredeksége pedig  $-3,3 \log S$  egység/pH egységnek adódott, ami 3-szor meredekebb, mint az egyértékű gyenge bázisok elméleti HH egyenletének meredeksége. Feltételezéseik szerint a HH összefüggéstől való eltérés oka alacsony molekulatömegű aggregátumok képződése lehet, amelyet azonban kísérletileg nem sikerült igazolniuk [4].

#### Kvetiapiin-hidrogén-fumarát

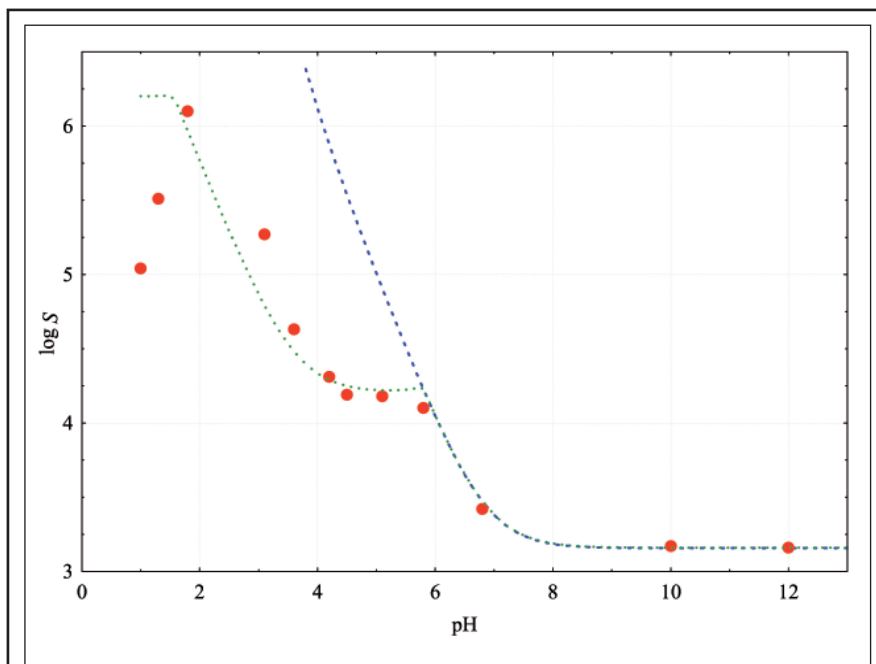
Az oldhatóság vizsgálatokhoz a kvetiapiin-hidrogén-fumarát sót használtuk. A kvetiapiin kétértékű bázis, amelynek  $pK_a$  értékei a következők: 3,56 és 6,83. Különböző pH-jú oldatokban a kvetiapiin molekula 3 protonáltsági formában van jelen: szabad bázisként (B), egyszeresen protonált ( $BH^+$ ), valamint kétszeresen protonált ( $BH_2^{2+}$ ) formában. Az 5.a. ábra a kvetiapiin részecske-eloszlási görbét ábrázolja. A protonált részecskék sztöchiometrikus formában képeznek sókat az anionokkal. A sóképzésben részt vevő kétértékű fumársav  $pK_a$  értékei: 2,8 és 4,0, ezért a fumársav is 3 különböző protonáltsági állapotban van jelen a különböző pH-kon:  $FumH_2$ ,  $FumH$  and  $Fum^{2-}$ .

A kvetiapiin telítéssel-rázótölcséres módszerrel mért intrinszc oldhatósága 0,055 g/100 ml ( $\log S_0[\mu M] = 3,16$ ), ami elfogadható egyezést mutat a CheqSol módszerrel mért eredménnyel (0,031 g/100 ml,  $\log S_0[\mu M] = 2,91$ ).

A kísérleti úton mért pontok jól követik az elméleti HH görbét 6-os pH körüli értékig (5.b. ábra). Ezután az egyszeresen protonált bázis ( $BH^+$ ) oldhatósága eltér a teoretikus HH profiltól, és 4,5-



5.a. ábra: Kvetiapiin bázis részecske-eloszlási görbéje



5.b. ábra: Kvetiapiin-hidrogén-fumarát pH-függő oldhatóság profilja (A kék pontozott vonal jelzi az elméleti HH görbét, a zöld pontozott vonal pedig azt a modellt reprezentálja, amely az egyszeres és a kettős sók oldhatóságát is magában foglalja.)

6 közötti pH tartományban elér egy állandó értéket, ami az 1:1 összetételű fumarát só ( $BH^+FumH$ ) oldhatóságát jelzi. pH 4,5 alatt az egyszeresen protonált forma kétszeresen protonált bázis ( $BH_2^{2+}$ ) formává alakul át, ezáltal az oldhatóság újra elkezd emelkedni. 2-es pH körül a kettős só forma oldhatósága megugrik. Ez nagy valószínű-

séggel a két kloridiont tartalmazó só forma ( $\text{BH}_2^{2+}2\text{Cl}^-$ ), mivel ilyen alacsony pH értéken a fumársav már teljesen disszociálatlan, semleges formában ( $\text{FumH}_2$ ) van jelen az oldatban, ezáltal nem képes a kationos részecskével sót képezni, így itt a sósavból származó kloridion a lehetséges sóképző anion. 2-es pH alatt az oldhatóság jelentősen csökken, ami annak a következménye, hogy a kloridion hatása a kettős klorid só oldhatóságára sokkal erősebb, mint az egy kloridionnal só képző vegyületek (pl.: a papaverin) esetében.

A kvetiapin teljes oldhatóság profilja csak abban az esetben követhető végig, ha az egyértékű és a kétértékű sók eltérő oldhatóságát is figyelembe vesszük.

### Következtetések

#### *A fenti kísérletek fontosabb tapasztalatai*

A vegyületek egyensúlyi oldhatóságának referencia meghatározási módszere a klasszikus telítéss-rázótölcséres eljárás [5-6]. Ha a vegyület oldhatóságának pH-függésére vagyunk kíváncsiak, az oldhatóság mérést el kell végeznünk különböző pH értékeken.

Vizsgálataink alapján megállapítható, ha pontos  $\text{pK}_a$  és  $\log S_0$  értékekből indulunk ki, akkor a bázikus vegyületek oldhatósága a magasabb pH-kon jól illeszkedik az elméleti HH görbére. Az alacsony pH-kon az eltérést a sóképzés okozza. Fontos tapasztalat, hogy a szilárd anyag tompítóoldathoz való adagolása után az oldat pH-ját - a gyógyszergyári irányelveknek megfelelően - ellenőrizni kell [5-6]. Munkánk során szinte minden esetben tapasztaltunk pH változást a minta oldódása során, melyek közül egy extrém példát emelünk ki. A propafenon-hidroklorid 10-es pH-jú Britton-Robinson tompítóoldatban való oldásakor az oldat pH-ja 7,2-re csökkent. A gyógyszergyári gyakorlat során kritérium az inkubálás végén az oldat pH-jának ellenőrzése, igazolása. Ugyanakkor az oldatok pH-ja már a szilárd anyag oldószerebe való beoldása során megváltozik valamilyen mértékben, így szükséges lehet az eredeti pH visszaállítása.

A sóképzés során használt szerves savak (pl.: fumársav, maleinsav) szintén befolyásolhatják az oldhatósági eredményeket abban az esetben, ha a telítéss-rázótölcséres módszert UV-spektroszkópiával együtt alkalmazzuk, mivel magas pH-n a nagy mennyiségben beoldódott szerves savak UV-abszorpciója szignifikáns hibát okoz a koncentrá-

ciómérés során. Ez a magas koncentráció már zavart okozhat a mérendő szerves bázis UV-spektroszkópiás meghatározásakor.

Jelen közleményben 4 bázikus gyógyszervegyület pH-függő egyensúlyi oldhatóságának tanulmányozása során szisztematikus vizsgálatokkal igazoltuk a HH összefüggés alkalmazhatóságát, valamint bemutattuk annak korlátait.

Az egyensúlyi oldhatóság meghatározásokat a lehető legprecízebben végeztük a telítéss-rázótölcséres módszerrel. A mért intrinsic oldhatósági adatok igazolása érdekében, egy független módszerrel (CheqSol) is meghatároztuk a vizsgált vegyületek intrinsic oldhatóságát. Az eredmények között jó egyezést tapasztaltunk. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a különböző pH értékeken meghatározott oldhatósági eredmények egészen a só oldhatóságának maximumáig jól követték a teoretikus HH egyenletet. Megfigyelhető volt továbbá, hogy alacsony pH-kon a sajátion hatás minden esetben jelentősen befolyásolta az oldhatóságot. A kétszeresen protonált bázisok esetében egyértelműen erősebbnek bizonyult a sajátion hatás, mint az egyszeresen protonált bázisoknál. Munkánk során a pH ellenőrzés jelentőségét, valamint az eredeti sóképző szerves sav (pl. fumársav) hatását is vizsgáltuk. A telítéss-rázótölcséres oldhatóság mérések során, valamint az inkubációs folyamat végén elengedhetetlen az oldatok pH ellenőrzése és szükség esetén visszaállítása. Megállapítottuk, hogy a HH egyenlettől való eltérések oka gyakran az alkalmazott mérési módszerek pontatlanságából ered, ezért rendkívül fontos, hogy nagyon pontosan meghatározott  $\text{pK}_a$  és intrinsic oldhatósági értékből induljunk ki, ha a HH összefüggést egy gyógyszermolekula vízben való oldhatóságának előrejelzésére kívánjuk felhasználni.

#### *Útmutató a helyes gyakorlathoz*

Munkánk célja volt, hogy az oldhatóság pH-függésének elméleti áttekintésével és a vizsgált vegyületek kísérleti adataival egy gyakorlati útmutatót adjunk a gyógyszergyárakban alkalmazott oldhatósági mérésekhez.

A következő általános iránymutatás fogalmazható meg:

1. Olyan molekuláknál, amelyek nem tartalmaznak ionizálható funkciós csoportot, az oldhatóság független a pH-tól, ha nem áll fenn aggregáció.
2. Ionizálható vegyületeknél a  $\text{pK}_a$  érték szabja



meg, hogy hol érdemes mérni. Ezért az oldhatóság méréseket a  $pK_a$  meghatározásának meg kell előznie. Általánosan az javasolható, hogy savaknál és bázisoknál legalább három kitüntetett pH-n célszerű mérni. Ezek  $pK_a - 3$ ;  $pK_a$ ;  $pK_a + 3$ . Ez a  $\pm 3$  pH-nyi távolság biztosítja, hogy az adott pH-n a molekula gyakorlatilag már csak egyféle ionizáltsági állapotban legyen jelen. Tovább távolodva a  $pK_a$  értéktől az oldhatóság nem változik, ha egyéb hatások (pl. aggregáció) nem állnak fenn, mindaddig, míg el nem érjük a só oldhatóságát.

- A gyógyszervegyületek túlnyomó többsége bázikus karakterű. Ha egy olyan bázist vizsgálunk, melynek  $pK_a$  értéke  $> 9$ , akkor pH 2 és 6 között nem várható eltérés az oldhatóságban (kivéve sóforma jelenléte), így nincs értelme több pH-n mérni ebben a tartományban. Ha egy bázis  $pK_a$ -ja 3 és 8 között van (pl.: papaverin), akkor használhatók a hatósági útmutatókban leírt pH-k.
- Savi karakterű vegyületeknél, ha a  $pK_a$  érték 4-5 körüli (pl.: aromás, ill. alifás karbonsav), akkor az ionizáció épp a fiziológiailag érdekes pH tartományban befolyásolja az oldhatóságot. Ezen anyagoknál indokolt a több pH-n való mérés. (pl.: pH 1,2; 4,5; 6,8.) Ugyanakkor egy gyenge savi karakterű anyagnál, ha  $pK_a > 9$  (pl.: fenolos hidroxil csoport), nincs értelme 6 alatti pH-kon külön méréseket végezni.
- Amfoter molekula esetén a kérdés bonyolultabb. Itt is megfogalmazható általános szabályként, hogy i.e.p.-3; i.e.p.; i.e.p.+3 értékeknél célszerű a méréseket elvégezni, de precízebb jellemzéshez több ponton is meg kell határozni az oldhatóságot.
- Az erősen savas, pH 1 körüli mérés indokoltnak látszik minden ionizálható anyagnál, különösen a bázisoknál a fellépő sóképződés és a sajátion hatás miatt.
- Vizsgálataink szerint pontos  $pK_a$  és  $\log S_0$  kiindulási adatokkal számított oldhatóság-pH profil (HH összefüggés) jól használható adott pH értékeken a  $\log S$  számítására. Ezzel igen jelentősen lerövidíthető az oldhatóság meghatározás ideje és csökkenthető a költség. Reményeink szerint ezen összefoglaló segítséget

nyújt a gyári gyakorlat számára oldhatósági vizsgálatok tervezéséhez és egyszerűbb, racionálisabb kísérleti eljárások kidolgozásához.

### Köszönetnyilvánítás

Ez a munka az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (pályázat száma: OTKA K 78102) támogatásával valósult meg.

### IRODALOM

- Baka, E.: Acta Pharm. Hung. 81, 18-28 (2011).
- Avdeef, A.: Adv. Drug Deliver. Rev. 59, 568-590 (2007).
- Sugano, K., Okazaki, A., Sugimoto, S., Tavornipas, S., Omura, A., Mano, T.: Drug Metab. Pharmacokinet. 22, 225-254 (2007).
- Bergström, C.A.S., Luthman, K., Artursson, P.: Eur. J. Pharm. Sci. 22, 387-398 (2004).
- Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, FDA, Washington, USA, August 2000.
- Guideline on the investigation of bioequivalence, EMA, London, UK, January 2010
- Li, S., Doyle, P., Metz, S., Royce, A.E., Serajuddin A.T.M.: J. Pharm. Sci. 94, 2224-2231 (2005).
- Chowhan, Z.T.: J. Pharm. Sci. 67, 1257-1260 (1978).
- Ledwidge, M.T., Corrigan, O.I.: Int. J. Pharm. 174, 187-200 (1998).
- Avdeef, A., Berger, C.M., Brownell, C.: Pharm. Res. 17, 85-89 (2000).
- Streng, W.H., Yu, D.H.-S., Zhu, C.: Int. J. Pharm. 135, 43-52 (1996).
- Pudipeddi, M., Serajuddin, A.T.M.: J. Pharm. Sci. 94, 929-939 (2005).
- Llinas, A., Box, K.J., Burley, J.C., Glen, R.C., Goodman, J.M.: J. Appl. Crystallogr. 40, 379-381 (2007).
- Avdeef, A.: Anal. Chim. Acta 148, 237-244 (1983).
- Avdeef, A.: J. Pharm. Sci. 82, 183-190 (1993).
- Völgyi, G., Ruiz, R., Box, K., Comer, J., Bosch, E., Takács-Novák, K.: Anal. Chim. Acta 583, 418-428 (2007).
- Takács-Novák, K., Box, K.J., Avdeef, A.: Int. J. Pharm. 151, 235-248 (1997).
- Baka, E., Comer, J.E.A., Takács-Novák, K.: J. Pharmaceut. Biomed. 46, 335-341(2008).
- Stuart, M., Box, K.: Anal. Chem. 77, 983-990 (2005).
- Box, K.J., Völgyi, G., Baka, E., Stuart, M., Takács-Novák, K., Comer, J.E.A.: J. Pharm. Sci. 95, 1298-1307 (2006).
- Li, S., Wong, S., Sethia, S., Almoazen, H., Joshi, Y.M., Serajuddin, A.T.M.: Pharm. Res. 22, 628-635 (2005).
- Miyazaki, S., Inoue, H., Nadai, T., Arita, T., Nakano, M.: Chem. Pharm. Bull. 27, 1441-1447 (1979).
- Serajuddin, A.T.M., Rosoff, M.: J. Pharm. Sci. 73, 1203-1208 (1984).





