

# ACTA

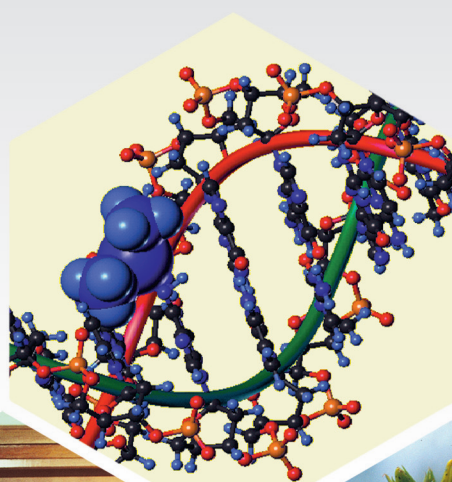
# PHARMACEUTICA HUNGARICA

# 1.

# 2010

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

APHGAO 80, (01) 01-56. (2010)





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

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

*Főszerkesztő:*

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi 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>Antus Sándor: Biológiai aktív vegyületek kutatása a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén 1992-2009 között; III. rész</i> .....	3
<i>Marosi Attila, Szalay Zsófia és Demeter Ádám: Szilárdfázisú NMR spektroszkópia és gyógyszerészeti alkalmazása</i> .....	18
<i>Inotai András, Rojkovich Bernadette, Mészáros Ágnes: Orális nem-szteroid gyulladásgátló gyógyszerek felhasználásának vizsgálata a Budai Irgalmasrendi Kórház II. Reumatológia Osztályának reumatoid arthritises betegek között</i> .....	47

## CONTENTS

<i>Antus, S.</i> : Investigation of biologically active compounds at the Department of Organic Chemistry of University of Debrecen between 1992-2009., part III.....	3
<i>Marosi, A., Szalay, Zs., Demeter, Á.</i> : Solid-state NMR Spectroscopy and Its Pharmaceutical Use . . .	18
<i>Inotai, A., Rojkovich, B., Mészáros, Á.</i> : The assessment of oral NSAID use in patients with rheumatoid arthritis in Hungary – a cross sectional non interventional study . . . . .	47

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. Klebovich Imre**

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: Arrabonaprint & Partners Zrt. (Felelős vezető: Ványik László)

**Index: 25 101**

## Biológiailag aktív vegyületek kutatása a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén 1992-2009 között III. rész<sup>1</sup>

ANTUS SÁNDOR

*Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszék, 4010 Debrecen, Pf. 20  
és MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoport, 4010 Debrecen, Pf. 59*

*E közleménnyel Lempert Károly akadémikust 85. születésnapján köszönti a szerző*

### Summary

Antus, S.: *Investigation of biologically active compounds at the Department of Organic Chemistry of University of Debrecen 1992-2009., part III.*

*The author briefly reviews the beginning of the carbohydrate chemistry in Hungary with special regard to the results achieved at the Department of Organic Chemistry of University of Debrecen and summarizes the most important synthetic and pharmaceutical results obtained in this field between 1992-2009, part III*

### Összefoglalás

*A szerző röviden ismerteti a magyarországi szénhidrátkémiai kutatások kezdeteit különös tekintettel a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén végzett kutatásokra, és összefoglalja e területen 1992-2009 között elért legjelentősebb szintetikus és farmakológiai eredményeket.*

### Bevezető

A magyarországi szénhidrátkémia – eltekintve *Than Károly* (1834-1908) a cukrok glicerinnél történő előállítására irányuló kísérleteitől [1] – már egy évszázadot is meghaladó múltra tekinthet vissza. A szakma tekintélyes folyóiratában 1907-ben jelent meg ugyanis a selmecbányai Bányászati és Erdészeti Főiskola Erdészeti Vegytani Tanszékén dolgozó *dr. Zemplén Géza* (1883-1956) adjunktusnak „A káliumpermanganát hatása cellulózra” című közleménye [2]. Munkájának tudományos értékét minősíti, hogy *Than Károly*, a Magyar Tudományos Akadémia (MTA) alelnöke felkérte, hogy eredményeiről az Akadémia III. osztályának ülésén is számoljon be, *Darányi Ignác* (1849-1927) földművelésügyi miniszter pedig 4 hónapos tanulmányútra küldte, hogy „tanulmányozza a német- és a franciaországi elsőrangú kémiai intézetekben az erdészeti, vagy azt támogató általános és különleges vizsgálatok módszereit” [3]. E négy hónapból 1907 november és december havát az 1902-ben Nobel-díjjal kitüntetett *Emil Fischer* laboratóriumában Berlinben töltötte.

Hazatérése után a „Fából készített cukor és alkohol” című pályázatával [4] nemcsak elnyerte az 1908. évi Deák Ferenc-díjat (500 pengő), hanem a földművelésügyi miniszter tanulmányainak folytatására 2 évre újra Berlinbe küldte azzal a kötelezettséggel, hogy „tanulmányainak befejezése után legalább 10 évig az Erdészeti Főiskolán marad, ha megüresedés esetén az Erdészeti Vegytani Tanszék ellátását a miniszter reábízná”. *Zemplén Géza* életének erről a szakaszáról a Pázmány Péter Tudományegyetemre (mai Eötvös Loránd Tudományegyetem) „A szénhidrátok, fehérjék és enzimek kémiaja” magántanári képesítés elnyerésére 1911. október 11-én benyújtott önéletrajzában így számolt be [5]: „A földművelésügyi miniszter 1908 őszén ismét részesített abban a szerencsében, hogy két évre külföldre mehessek. Ezt a két évet Berlinben töltöttem, a nagy tanár mellett. Az első évben az egyetem organikus kémiai laboratóriumában végeztem önálló vizsgálatokat a szénhidrátok, fehérjék és enzimek köréből, és olyan szerencsével dolgoztam, hogy a második évben Emil Fischer saját laboratóriumában ajánlott fel számomra dolgozó helyet. Itt még több alkalmam nyílt az organikus anyagok vizsgálatában mélyebbre hatolni.” E kutatásaiból a kor legrangosabb folyóirataiban 9 közleménye jelent meg [6]. Ezek sorát a cellobióz oszazonjának enzimekkel szembeni viselkedésével foglalkozó nyitotta meg, majd az aminosavak ké-

<sup>1</sup>A dolgozat első részében [Acta Pharm. Hung. 79, 95-103 (2009)] a tanszék történetéről és az alkaloidkémiai, a másodikban [Acta Pharm. Hung. 79, 143-167 (2009)] a flavonoidkémiai kutatásokról számoltam be. A IV.-ben pedig a szerkezetvizsgáló módszerek alkalmazásával elért eredményeket ismertetem.

miája területén végzett munkájáról és végül a cellobiózzal kapcsolatos további eredményeiről számolt be.

Berlinből 1910. év végén tért haza és a vállalt kötelezettségének eleget téve kutatásait Selmezbányán folytatta, melyek 1913-tól kezdődően a József Nádor Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetemen (a mai Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem), az egyetemi tanári kinevezését követően hazánk első Szerves Kémiai Tanszékén, a szénhidrát-tartalmú természetes vegyületek kémiája területén teljesebben ki. A nemzetközileg is elismert munkásságából e helyütt is kiemelendő, hogy a katalitikus mennyiségű nátrium-metilát hatására lejátszódó átészterestési folyamatot Zemplén-féle dezacetilezésként (elszappanosításként) idézik az irodalomban [7]. Megfigyelte továbbá azt is, hogy a peracetilezett cukorszármazékok közül az aldózok az oximjaikon keresztül a megfelelő aldonsavnitri-lekké alakíthatók, melyekből nátrium-metiláttal az egy szénatommal szegényebb aldózok keletkeztek. Ez a Zemplén-féle lebontás néven ismertté vált átalakítás [8] a műszeres szerkezetfelderítő módszerek térhódításáig elsősorban a redukáló oligosza-charidok egyértelmű szintetikus szerkezet meghatározásában volt nélkülözhetetlen.

Zemplén Géza akadémikus ma is élő „tudományos iskolát” teremtett. Tanítványai révén a szénhidrátkémiai kutatások biológiai jelentőségük okán is rendkívül kiszélesedtek és már az 1950-es évek végén az egyik legintenzívebben művelt területévé váltak a természetes anyagok hazai kutatásának [9].

E közleménysorozat előző részeiben már ismerttettem [10], hogy a tanszéken a szénhidrátkémiai kutatások *Bognár Rezső* (1913-1990) akadémikus debreceni professzori kinevezését (1950) követően mélyültek el. Igen jelentős eredmények születtek az *N*-, *O*-glikozidok és a heterociklusos *C*-glikozil származékok szintézise és átalakítása területén, és új távlatokat nyitott meg a acetohalogén-cukrok előállításában az aszimmetrikus dihalogén-dimetiléterek szénhidrátkémiai alkalmazása is [9,11]. E kutatások az Antibiotikum-kémiai Kutatócsoport létrejöttével (1961) a tanszéken nemcsak lényegesen bővültek, hanem erősen biológiai hatás orientálttá is váltak. A kutatások ugyanis elsősorban a szénhidrát-tartalmú antibiotikumok szintézise területén koncentráálódtak [12].

Az a felismerés [13], hogy az élő szervezetekben a szénhidrátok a korábban már széles körben tanulmányozott vázanyag, illetve (tartalék) tápanyag szerepén túlmenően a sejtek felületén a gli-

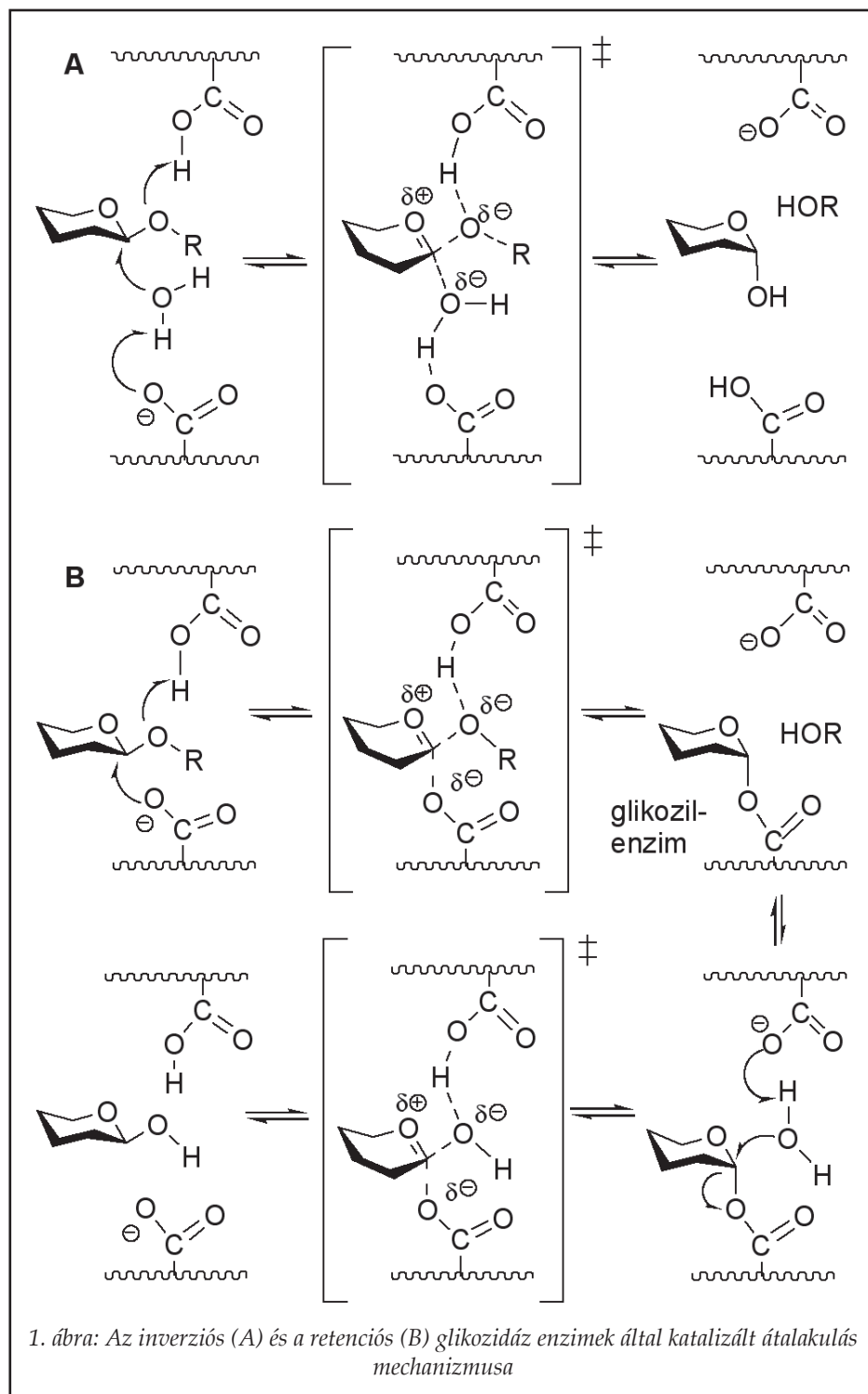
kolipidek és glikoproteinek részvételével lejátszódó normális és patológiás folyamatokban (pl. a sejtadhézió, a sejtosztódás gátlása, vírusok, baktériumok és a toxinok megkötése a sejteken, majd az immunválasz kialakulása, valamint az ivarsejtek egymásra találása stb.) a szénhidrát-szénhidrát és a szénhidrát-fehérje kölcsönhatásoknak meghatározó szerepük van, az 1980-as évektől kezdődően világszerte növekvő befolyást gyakorolt a szénhidrátkémiai kutatások irányára. Egyre inkább világgóssá vált, hogy e jelenségek alaposabb megértéséhez – és ezáltal a szénhidrátok szélesebb körű gyógyászati felhasználáshoz is – a kulcsfontosságú képviselőik molekuláris biológiai szerepét kell mélyebben megismerni. E vizsgálathoz szükséges változatos szerkezetű szénhidrátszármazékokat többnyire nagyobb mennyiségben a természetes forrásokból csak nehezen tudták izolálni, ezért a kémiai szintézisüket és a hatás-szerkezet összefüggések részletesebb vizsgálatához a hatásukban analóg vegyületekét (a mimetikumokét) is meg kell oldani.

Ez az igény váltotta ki a szénhidrát alapú gyógyszerhatóanyagok kifejlesztésére irányuló kutatások előtérbe kerülését a tanszéken is, és ezért az elmúlt 20 évben elsősorban olyan szénhidrát származékok előállítására törekedtünk, melyek biológiai vizsgálata nemcsak hozzájárult glikobiológiai kérdések tisztázásához, hanem hatásuk alapján valamilyen gyógyászati alkalmazás lehetősége is kirajzolódott.

## 2. Eredményeink a szénhidrátkémia területén

A biológiailag jelentős szénhidrátszármazékok szintézisének és lebontásának a glikozidos kötés(ek) kialakulása és hasadása a glikozil-transzferáz és glikozid-hidroláz (glikozidáz) enzimek katalízisével valósul meg. Hatásuk szelektív gátlása, esetleg megszüntetése alapkutatói és gyógyszerkémiai jelentőséggel is bír. Általánosan elfogadott, hogy a glikozidképződés [pl. cukor gyűrű kapcsolása egy másik cukorhoz, aminosavhoz, alkoholos (fenolos) hidroxilcsoportot tartalmazó vegyülethez], és a hidrolízis is oxokarbénium-ion jellegű átmeneti állapotokon keresztül valósul meg. Az 1. ábrán bemutatott módon ún. inverziós enzimekkel (A) egy, a retenciókkal (B) pedig – a köztitermék képződése miatt – két átmeneti állapot alakul ki [14].

A glikozidázgátlók hatásuk alapján reverzibilis vagy irreverzibilis inhibitorok lehetnek. Az előbbie-ek egyik csoportját az ún. szubsztrátum analóg szerkezetű vegyületek képezik, melyek az enzim

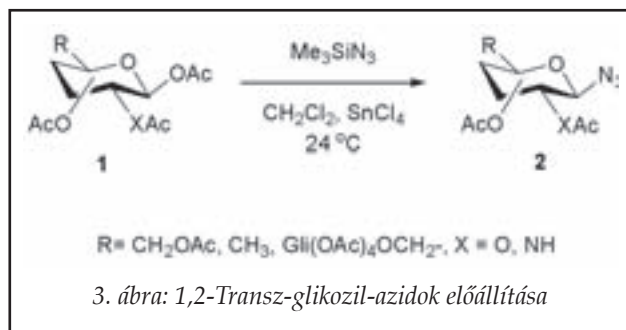
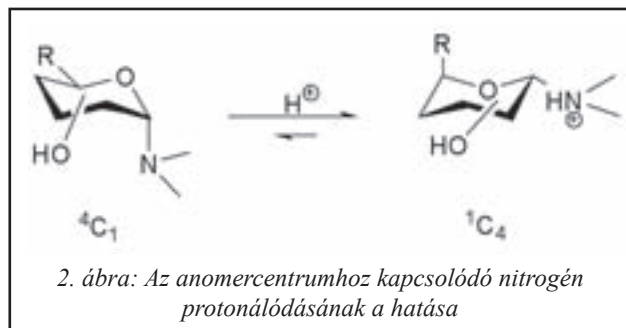


teni és neves külföldi egyetemek (prof. dr. J-P. Praly és prof. dr. G. Descotes / Lyon Franciaország; prof. dr. N. G. Oikonomakos / Athén, Görögország) közötti eredményes együttműködésnek. E kutatások gyökerei az 1992-t is megelőző évekre nyúlnak vissza. Ezek közül az ún. inverz anomer effektus tanulmányozására és az anomer centrum bifunkcionalizálására irányuló vizsgálatok néhány fontos eredményét említem meg, mivel nagyrészt ezek alapozták meg a glikozidáz gátlókkal kapcsolatos szénhidrátkémiai kutatásainkat.

A 2. ábrán bemutatott ún. inverz anomer effektus (a piranozidok anomer centrumához kapcsolódó axiális nitrogén protonálódása a gyűrű konformáció változását kényszeríti ki és az ammóniumcsoport ekvatoriális helyzetbe kerül) kísérletes úton történő tanulmányozása kapcsán az 1,2-transz-glikozil-azidok szintézisét illetően jelentős előre lépést jelentett a trimetilszilil-azid bevezetése [15]. Ez a kereskedelemben is kapható reagens kiváló sztereoselektív azid-donornak bizonyult és a könnyen hozzáférhető peracetilezett szénhidrátokból (1) nemcsak a megfelelő 1,2-transz glikozil-azidok (2) magas hozamú előállítását tette lehetővé (3. ábra), hanem az azid csoport egyszerű továbbalakításával különféle nitrogéntartalmú glikozidok szintézisét is. Így például az acetiléndikarbonsavészterekkel (3) a megfelelő 1,2,3-triazol diészterekét (2+3 → 4), melyek pedig kiváló szelektív glikozil donornak bizonyultak nemcsak oligoszacharidok, hanem az antraciklin

természetes szubsztrátumánál erősebben kötődnek az enzim aktív centrumához. A másik csoportba az átmeneti állapotszerű vegyületek tartoznak. Ezek a glikoziliumionnal mutatott szerkezeti hasonlóságuk okán esetenként még erősebb kötődésre (gátlásra) is képesek.

Az ilyen típusú glikozidázgátlók szintézisére irányuló tanszéki kutatások szép példája, a debre-



típusú antibiotikumok, mint például a karminomycin (6) szintézisénel is (4. ábra) [16].

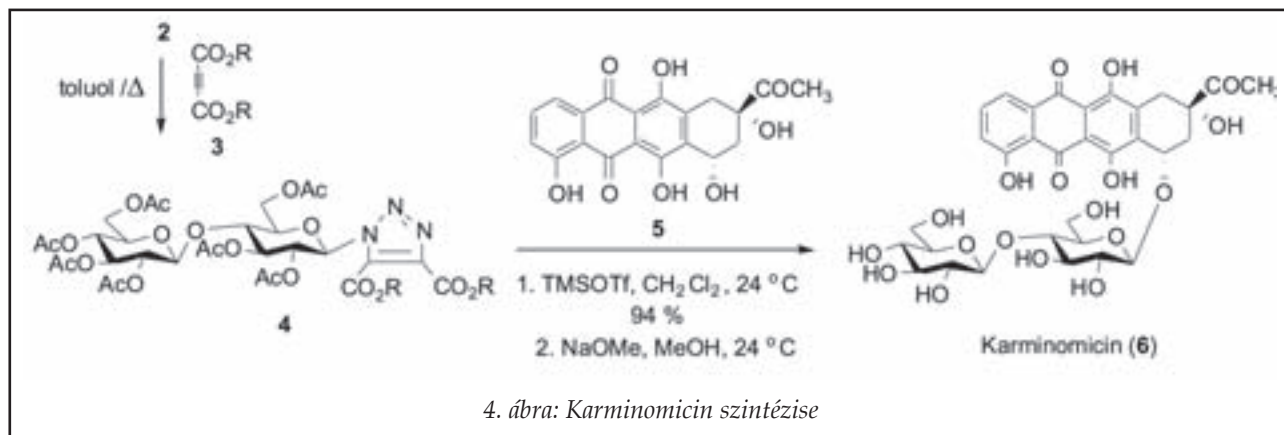
Az inverz anomer effektus részletesebb vizsgálata, valamint a glikoproteinekben előforduló szénhidrát-aminosav kapcsolódások modellezése kapcsán az anomer  $\alpha$ -aminosav-prekursorok előállításának igénye az anomer centrumon bifunkciós monoszacharid származékok előállítását és sajátágaik tanulmányozását helyezte a kutatások középpontjába. E területen szerteágazó és eredményes kutatás bontakozott ki [17], melynek farmakológiai irányultsága 1997-től kezdődően a glikogén foszforiláz (GP) enzim inhibitorainak szintézise és szerkezet-hatás összefüggések feltárása felé fordult.

Ez a dimér szerkezetű és két azonos 97,5 kDa tömegű alegységből álló enzim főként a májban, izomban és az agyban ún. inaktív formákban

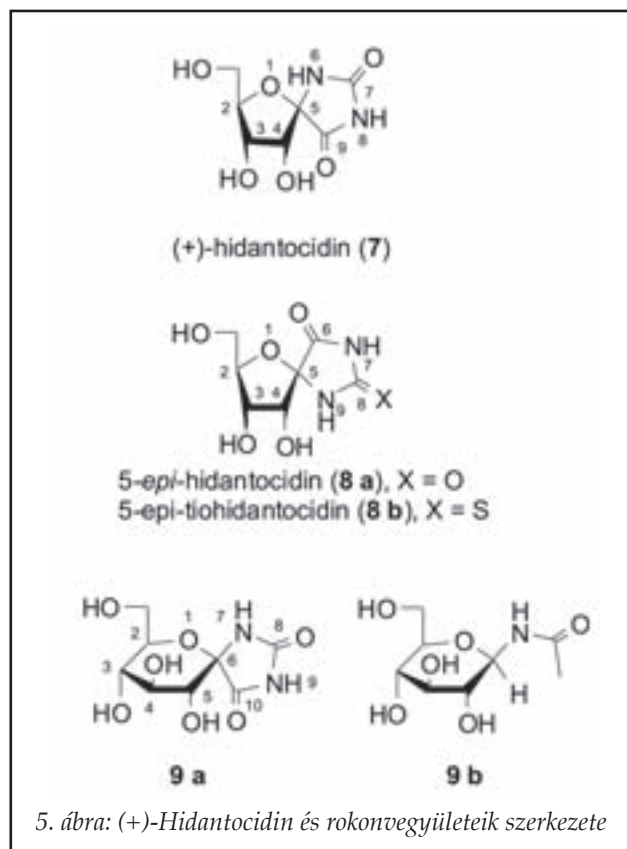
(GPb) fordul elő. Aminosav szekvenciájuk és röntgenkristallográfiával meghatározott térszerkezetük is ismeretes. A nyúl vázizomból (rabbit muscle GP, RMGP) és az emberi májból (human liver GP, HLGP) származóak 72%-os homológiát mutatnak, katalitikus helyük szerkezete pedig azonos. A könnyebb hozzáférés okán, az előbbi forrást használják általában az enzimológiai kísérletekhez. Mint ismeretes, a májban lévő a foszforilációját követően aktiválódik (GP<sub>a</sub>) és katalizálja a glikogén lebontását glükóz-1-foszfáttá. Ez a vegyület a glikolízis révén nemcsak energiát szolgáltat, hanem a májban glükózzá is átalakul, amely az inzulinnal szinergizmusban szabályozza a glikogén szintézisét és lebontását és végül így a vércukorszintet is.

Mint hogy korunk egyik legsúlyosabb betegségeinek, a 2-es típusú cukorbetegségnek (non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) a kiváltó okai és kialakulásának pontos biokémiai háttere még csak részben ismert, de minden tünete a magas vércukorszintre vezethető vissza, ezért a májban lévő GP enzim szelektív gátlása megoldást jelenthet e súlyos betegség hatékony kezelésében.

A fentebb említett széles körű tudományos együttműködés a természetes eredetű, nem toxikus herbicid, a (+)-hidantocidin (7) kapcsán bontakozott ki (5. ábra) [18]. A hatás-szerkezet összefüggések vizsgálata során kiderült, hogy a lehetséges 15 sztereoizomerje közül a C-5 epimerje (8a) [19] is hatásos és ezt a C-8 helyzetű tiokarbonil csoport bevezetése (8a  $\rightarrow$  8b) még számottevően fokozta [20]. 1995-ben ezek az eredmények keltették fel Fleet (Oxford) és Oikonomakos (Athén) professzorok érdeklődését is, akik már néhány éve antidiabetikumok kutatása területén eredményesen együttműködve szénhidrátok és a GP enzim kölcsönhatását vizsgálták. Molekulamodellézési





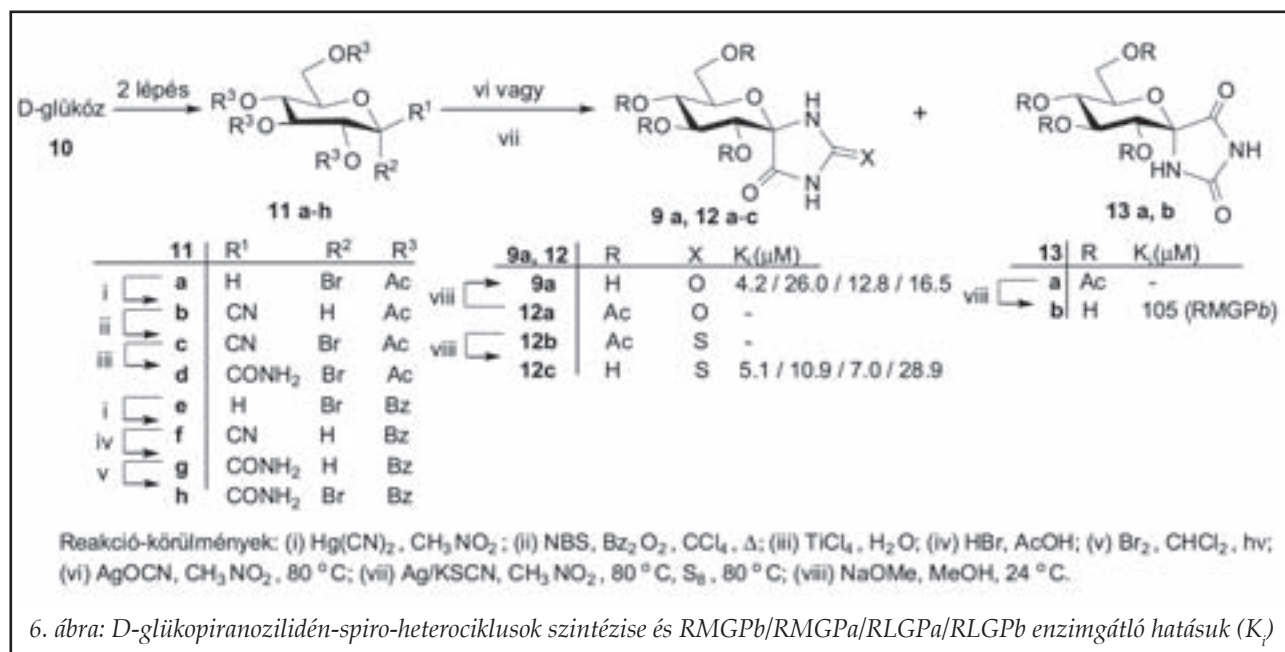


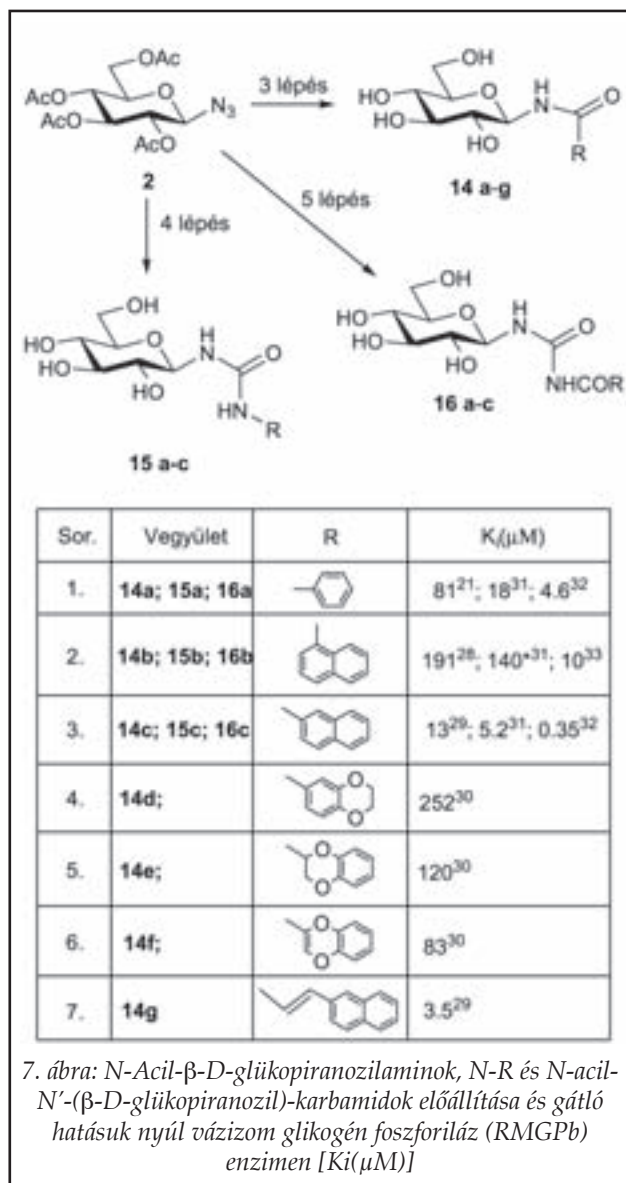
vizsgálataik arra utaltak, hogy a (+)-hidantocidin (7) D-glikopiranozilidén analógja (9a) erősebben kötődik az enzim aktív centrumához, mint a hatékony inhibitoraként ( $K_i = 32 \mu\text{M}$ ) már ismert *N*-acetil- $\beta$ -D-glikopiranozilamin (9b) [21]. E feltételezésük igazolására előállították e vegyületet (9a), amely a nyúl vázizom glikogén foszforilázt

(RMGPb) valóban a 9b glükozilaminnál hatékonyabban [ $K_i = 3.1 \mu\text{M}$ ] gátolta [22]. Szerencsére a szintézisük alacsony (< 1%) összhozama miatt a kezükben lévő csekély anyagmennyiség a részletesebb farmakológiai vizsgálatokat már nem tette lehetővé és így egy hatékonyabb és az aldózok szélesebb körében is alkalmazható szintézis megvalósításával lehetőség kínálkozott „a stafétabot” átvételére ezen a gyógyszerkutatás szempontjából is nagy érdeklődésre számot tartó területen.

Somsák és Szilágyi professzorok próbálkozása sikerrel járt, és az aldózokból (D-glükóz, galaktóz, arabinóz és xilóz) kiindulva a glikopiranozilidén-spiro-hidantoinok és tiohidantoinok magasabb összhozamú ( $\approx 2\%$ ), hétlépéses szintézisét oldották meg [23]. A D-glükózból (10) kiinduló szintézist a 6. ábrán szemléltetem.

Az irodalomból már jól ismert módon a D-glükózból (10) 2 lépésben 80%-os hozammal nyerhető  $\alpha$ -acetobrom-glükózt (11a)  $\text{Hg}(\text{CN})_2$ -dal nitrometánban szerény hozammal (11%) peracetyl- $\beta$ -D-glikopiranozil-cianiddá (11b) alakították. Ennek széntetrakloridban NBS-sel végzett bromozásakor már magas hozammal (83%) a kívánt  $\alpha$ -brom származék (11c) keletkezett, melyből ezt követően  $\text{TiCl}_4$ -dal katalizált részleges hidrolízissel magas hozammal (68%) jutottak az anomer centrum konfigurációjának megőrzése mellett a 11d formamid származékhoz. A szintézis következő lépésében e vegyület gyűrűzárását ezüst-cianáttal, illetve ezüst (vagy kálium)-tiocianáttal vízmentes nitrometánban valósították meg. Érdekes módon, míg az ezüst-cianáttal kiváltott reakcióban a 12a és 13a





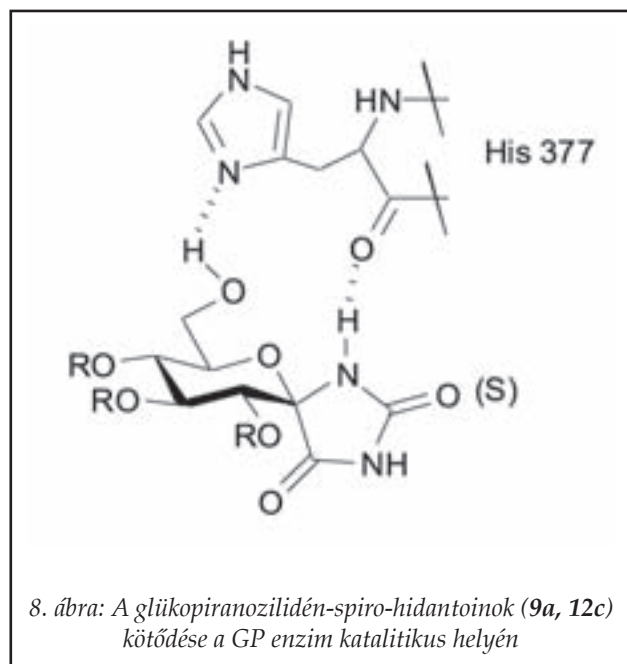
spiro-hidantoinok 10:1 arányú keveréke keletkezett, addig tiocianát anionnal a **11d** bróm-amidból csak a **12b** tiohidantoidint kapták meg. E reakció alaposabb vizsgálata során arra is fény derült, hogy ez az érdekes sztereokémiai különbség a gyűrűzárási reakciók eltérő mechanizmusára vezethető vissza [24]. Megállapították, hogy a **12a**, **13a** peracetyl-spiro-hidantoinok a megfelelő C-1 cianoglükózil gyökön, mint közbelső terméken keresztül keletkeztek, a tiocianáttal kiváltott átalakulás (**11d**  $\rightarrow$  **12b**) pedig bimolekuláris nukleofil szubsztitúcióval játszódott le. A szintézis záró lépésében az acetyl védőcsoportokat Zemplén-féle dezacetylizéssel [7] eltávolítva magas hozammal (78%) jutottak a farmakológiai vizsgálatokhoz szükséges vegyületekhez (**9a**, **12c**, **13b**). A nyúl izomból (májából) nyert glikogén foszforiláz en-

zim inaktív [RM(L)Gb] és aktív (RM(L)GPa) formáján mért gátlási értékek ( $K_i$ ) (lásd 6. ábra) arról tanúskodtak, hogy a D-glükopiranozilidén-spirohidantoin (**9a**) és a **12c** tio analógja mikromólos tartományban közel azonos mértékben hatékony GP inhibitorok. Az anomer glükopiranozil-spirohidantoin (**13b**) illeszkedése pedig az enzim aktív centrumához – teljes összhangban a **9a**-nak az RMGb enzimmel alkotott komplexének röntgenkristallográfiai adataival [25] – már számottevően lazább [**13b**:  $K_i(\mu\text{M}) = 105$ ]. Minthogy a **9a** hidantoin és a **12c** tio-analóg közel azonos mértékű gátlást mutatott, ezért az alaposabb farmakológiai vizsgálatokhoz ez utóbbi molekula szintézisének léptéknövelését és optimalizálását oldották meg. E választást a tiocianátos gyűrűzárást nagy mértékű sztereoselektivitása (**11d**  $\rightarrow$  **12b**) is indokolta.

A szintézis magas hozamú, nagy léptékben is biztonságos megvalósítását az acetyl védőcsoportoknak benzoilokra való cseréje tette lehetővé. Ezek jelenlétében jelentősen fokozódott az egyes intermedierek kristályosodási készsége, és így a kromatográfiás tisztítások helyett egyszerű átkristályosítást lehetett használni. Emellett az  $\alpha$ -brómperbenzoil-D-glükózból (**11e**) a szintézis kulcsvegyületéhez (**11f**) is számottevően magasabb hozammal (11%  $\rightarrow$  58%) jutottak, melynek jégecetes HBr-el végzett részleges hidrolízisével a **11g** amidot 94%-os nyeredéssel kapták meg. Ezt elemi brómmal reagáltatva a **11h**  $\alpha$ -bróm-amid (79%) keletkezett, melynek tiocianátos gyűrűzárását (79%) követő Zemplén-féle elszappanosítása (92%) vezetett a kívánt célvegyülethez (**12c**). A hétlépéses szintézis hozama így mintegy 15-szörösére (kb. 30%) növekedett [26].

Ezt követően a hatás-szerkezet összefüggések vizsgálata kapcsán az elmúlt tíz évben nagyszámú N-acetyl- $\beta$ -D-glükopiranozilamin, N-szubsztituált-N'- $\beta$ -D-glükopiranozil-karbamid és C- $\beta$ -D-glükopiranozil-heterociklusos származék előállítására került sor, melyek GP enzimgátló hatását behatóan tanulmányozták. Minthogy a közelmúltban e kutatások részleteiről több összefoglaló közlemény is megjelent [27] és e beszámoló keretei pedig nem teszik lehetővé ezek ismertetését, ezért az alábbiakban csak a szövetszelektívebb inhibitortervezés szempontjából legfontosabb eredményeket foglaltam össze.

A 7-9. ábrákon a vizsgálatok néhány részletét tüntettem fel. A „vezérmolekula” (**9a**) hidantoin gyűrűjét a C-8, N-9 vagy az N-9, C-10 kötések mentén felnyitjuk és az anomer centrum bifunk-



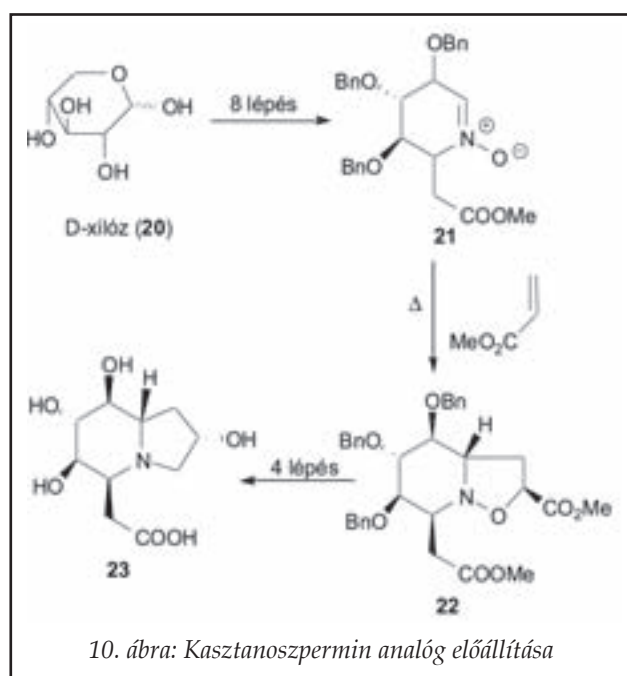
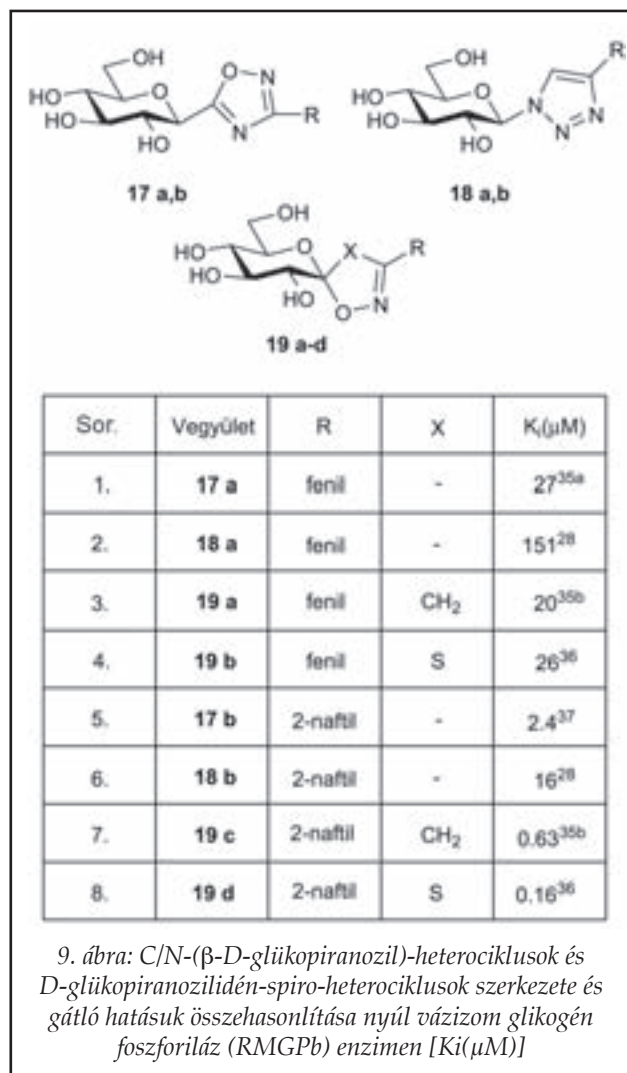
cionalitását megszüntetjük, akkor *N*-acil- $\beta$ -D-glükopiranozilamin, illetve *N*-szubsztituált-*N'*-( $\beta$ -D-glükopiranozil)-karbamid származékokat kapunk. Ezeket a könnyen hozzáférhető peracetylizett 1,2-*transz*- $\beta$ -D-glükózil-azidból (2) magas hozammal állították elő (7. ábra). Kézenfekvőnek látszott az a feltételezés is, hogy ezek a 9a hidantoin meglehetősen merev gyűrűrendszerénél konformatíve sokkal mozgékonyabb molekulák (14a-g, 15a-c, 16a-c) szintén hatékony inhibitorai a GP enzimnek, hiszen a 8. ábrán feltüntetett módon az esetükben is kialakulhatnak a szoros illeszkedéshez szükséges hidrogén hidak. A 14a és 14b *N*-acil- $\beta$ -D-glükózilaminok (7. ábra 1 és 2. sora) inhibíciós állandóinak ( $K_i$ ) összehasonlítása is egyértelműen azt mutatta, hogy az R csoport térkitöltésének növelése jelentősen csökkentette a gátló hatást [21, 28]. Meglepő módon azonban a 2-naftil származék (14c) [29] erős gátlást ( $K_i = 13\mu\text{M}$ ) mutatott. Ez a 10  $\pi$  elektronos aromás gyűrűrendszer különleges szerepére irányította a figyelmet, melynek fontosságát a 14d-f 1,4-benzodioxán-karboxamidok sorozata (4-6. sorok) is egyértelműen igazolt [30]. A  $\beta$ -D-glükopiranozil és a 2-naftil farmakoforok közötti távolság fontosságára utalt, hogy a 10  $\pi$  elektronos homoaromás farmakofort *E* geometriájú etilén egységgel kiterjesztve (14g, 7. sor) a hatás számottevően megerősödött, ugyanakkor e vegyület NHCOCH=CH négyatomos kötőelemét a háromatomos NHCONH egységgel helyettesítve (14g  $\rightarrow$  15c, 7. és 3. sorok) a hatás már kissé csökkent [31]. A 14a-c *N*-acil- $\beta$ -D-glükopiranozilaminok inhibíciós ál-

landóinak összevetése a 15a-c *N*-szubsztituált-karbamidokéval is a kötőelem hosszúságának a fontosságát hangsúlyozta. Az utóbbi vegyületek ugyanis a hatékonyabb inhibitorok. Az *N*-acil-*N'*- $\beta$ -D-glükopiranozil-karbamidok (16a-c) enzimgátló hatásának vizsgálata is értékes eredményhez vezetett. E négytagú kötőelemet tartalmazó vegyületek közül ismét a 2-naftilszármazék (16c) [32] mutatott kimagasló aktivitást ( $K_i=0.35$ , v.ö. 14c, 15c és 14g  $K_i$  értékével). A 2-naftilcsoport és a kötőelem különleges szerepéről tanúskodtak a C-( $\beta$ -D-glükopiranozil)-heterociklusok (17a,b) a C-4-szubsztituált-*N*- $\beta$ -glükopiranozil-1,2,3-triazolok (18a,b), és a D-glükopiranozilidén-spiroheterociklusok (19a-d) körében kapott enzimkinetikai adatok is [28, 35-37] (9. ábra). Ezek azt mutatták, hogy az anomer centrumhoz kapcsolódó nitrogén atomot nem tartalmazó spiro-biciklusos szerkezet is meghatározó eleme lehet a gátló hatásnak, valamint az öttagú heterociklus és az enzim katalitikus helyének közelében lévő His 377 aminosav karbonilcsoportja közötti hidrogénhidak, vagy(és) a karbonil (tiokarbonil) csoport(ok) jelenléte (lásd 8. ábra) sem feltétlen szükséges(ek). Ugyanakkor az anomer centrumtól két kötés távolságra lévő nagyméretű megfelelően orientált hidrofób 2-naftilcsoport jelenléte igen előnyös (9. ábra 7. és 8. sor). A 19c spirooxazolin és a 19d spiro-oxatiazolin származékok a 16c acil-karbamidhoz hasonlóan szintén nanomólos gátlást mutattak [35b, 36].

Ezen eredmények alapján talán joggal reméljük, hogy a máj-szelektív GP inhibitor tervezés újabb fázisát hamarosan elérjük és a leghatékonyabb vegyületek toxikológiai vizsgálatai pedig mielőbb kijelölik azt az utat, melyen a fentebb ismertetett eredményes felfedező kutatáson alapuló foszforiláz gátló antidiabetikum kifejlesztése megkezdődhet.

Glikozidáz enzim-gátló szénhidrátszármazékok kutatása a tanszéken az Antibiotikum-Kémiai Kutatócsoportban is folyt. Ezek közül a tumor- és vírusellenes polihidroxiindolizidin származékok előállítását említtem meg. D-xilózból (20) kiindulva nyolc lépéses szintézissel elsőként állították elő a 21 királis gyűrűs nitront, melyből 1,3-dipoláris cikloaddícióval magas sztereoselektivitással a 22 dikarbonsav-észter származékot kapták meg. Ennek négy lépéses átalakítása vezetett a tumor- és vírusgátló hatású 23 kasztanoszpermin analóg-hoz [38].

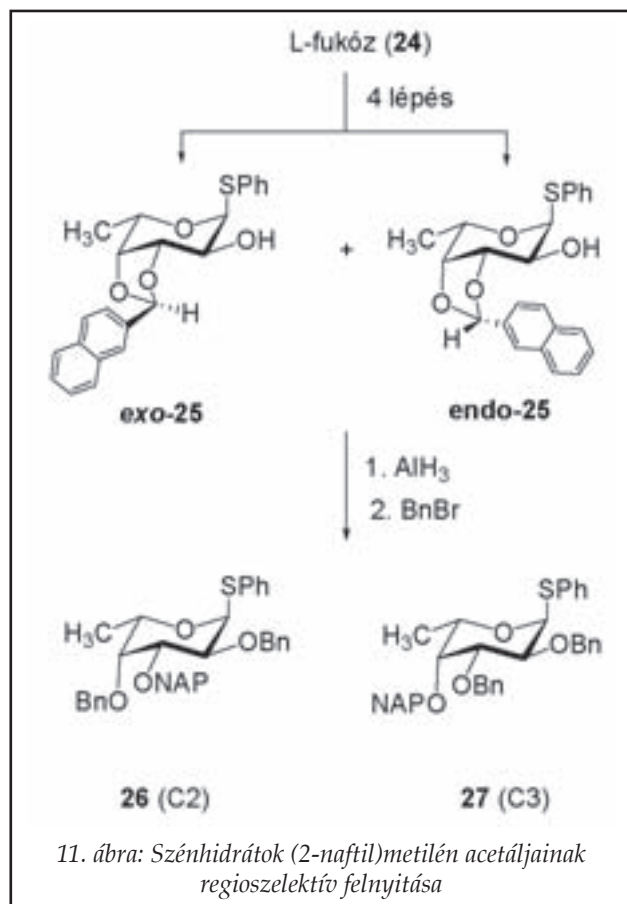
A fentebb vázolt kutatásaink sok szállal kötődtek az Egyetem (korábban Kossuth Lajos Tudományegyetem) Biokémiai Tanszékén folyó szén-



hidrátkémiai kutatásokhoz is. Az 1970-ben *Nánási Pál* (1923- ) professzor vezetésével megalakult tanszéken ugyanis növényi eredetű glikozidok bioszintézisének vizsgálatával és a glikozidázok hatásmechanizmusával [39], a 80-as évektől kezdődően pedig *Lipták András* (1935- ) akadémikus nemzetközileg is elismert munkássága révén a biológiailag aktív oligoszacharidok kémiai szintézisével [9, 40] foglalkoztak. E területeken folyó kutatások hathatós támogatására 1996-ban az MTA *Lipták András* akadémikus irányításával Szénhidrátkémiai Akadémiai Kutatócsoportot hozott létre, amely 2005 óta vezetésemmel a tanszékünkön dolgozik.

A szénhidrátok és származékaik szintézisének a legnehezebb feladat a megfelelő védőcsoport stratégia és kapcsolási módszer megválasztása, illetve az adott célvegyülethez legjobban használható kidolgozása. Az elmúlt két évtizedben ezen a területen a Kutatócsoportban hatalmas ismeretanyag gyűlt össze, különösen a benzilidén-acetál és -ketál típusú védőcsoportok kialakítását és regio-, vagy (és) sztereoselektív felnyitását illetően [41]. Szintetikus szempontból jelentős előrelépést jelentett, hogy a közelmúltban sikerült e sztereoselektív védőcsoport stratégiát a szénhidrátok dioxán- és dioxolán-típusú (2-naftil)metilén acetáljaira is kiterjeszteni (11. ábra) [42].

Például az L-fukózból (24) könnyen nyerhető dioxolán acetálok (*exo*-25 és *endo*-25) regioszelektív gyűrűfelnyitásával keletkező 26 és 27 (2-naftil) metil éterek szintetikus jelentőségét az adta meg, hogy a p-metoxibenzil-étereknél kevésbé savérzékenyek, de hidrogenolízissal benzil-éterek, vagy -észterek mellett is lehasíthatók, DDQ-val (2,3-diklór -5,6-diciano-1,4-benzokinon) pedig könnyen eltávolíthatók acetyl, pivaloil, ftálamido, benzil és benzilidén csoportok jelenlétében is. Ezt az előnyös sajátosságukat használtuk ki a *Dictyostelium discoideum* talajlakó nyálkagomba glikoprotein szénhidrát részének egyértelmű szerkezetigazolásánál [43]. A 12. ábrán vázolt 3+2 blokk-szintézisekkel a három lehetséges regioizomert (28-30) állítottuk elő. A szintézis kulcs lépésében az O-(2-naftil) metil (NAP) csoportokat viselő donorokból (C1-C3) és BA akceptorokból nyert triszacharidokat (CBA) kapcsoltuk a ED glikozil donorral, majd a megfelelő védőcsoport manipuláció után jutottunk a kívánt célvegyületekhez (28-30). E vegyületek összehasonlítása *West* és munkatársai által közöltekkel [44] nemcsak a C és D cukoregység összekapcsolódásának egyértelmű meghatározását teszi lehetővé, hanem utat nyit a glikozilezési



folyamat biológiájának alaposabb tanulmányozása előtt is.

A 90-es évek végén vált ismertté, hogy szénhidrát-fehérje adhézió alapuló fontos biológiai folyamatokban a szénhidrátok karboxil vagy szulfátészter csoportjai és a fehérjék bázikus csoportjai között kialakuló ionos kölcsönhatásoknak meghatározó szerepük van.

Ilyen szénhidrát származék a szialil Lewis X (31) (13. ábra), amely gyulladásozó folyamatokban (pl. *Helicobacter pylori* által okozott gyomor és nyombél fekély kialakulásában) játszik meghatározó szerepet. Hatásának eddig feltárt molekuláris háttere alapján joggal feltételezhető, hogy a mimetikumai potenciális gyógyszerek lehetnek ilyen típusú megbetegedések kezelésében.

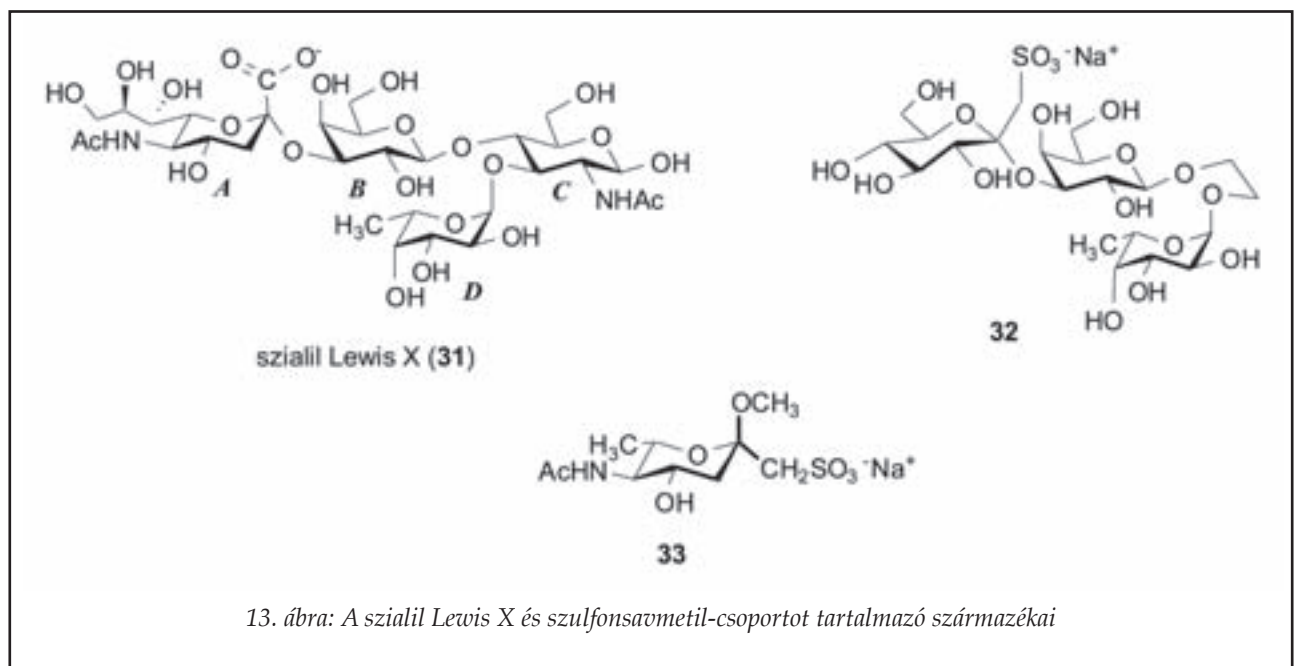
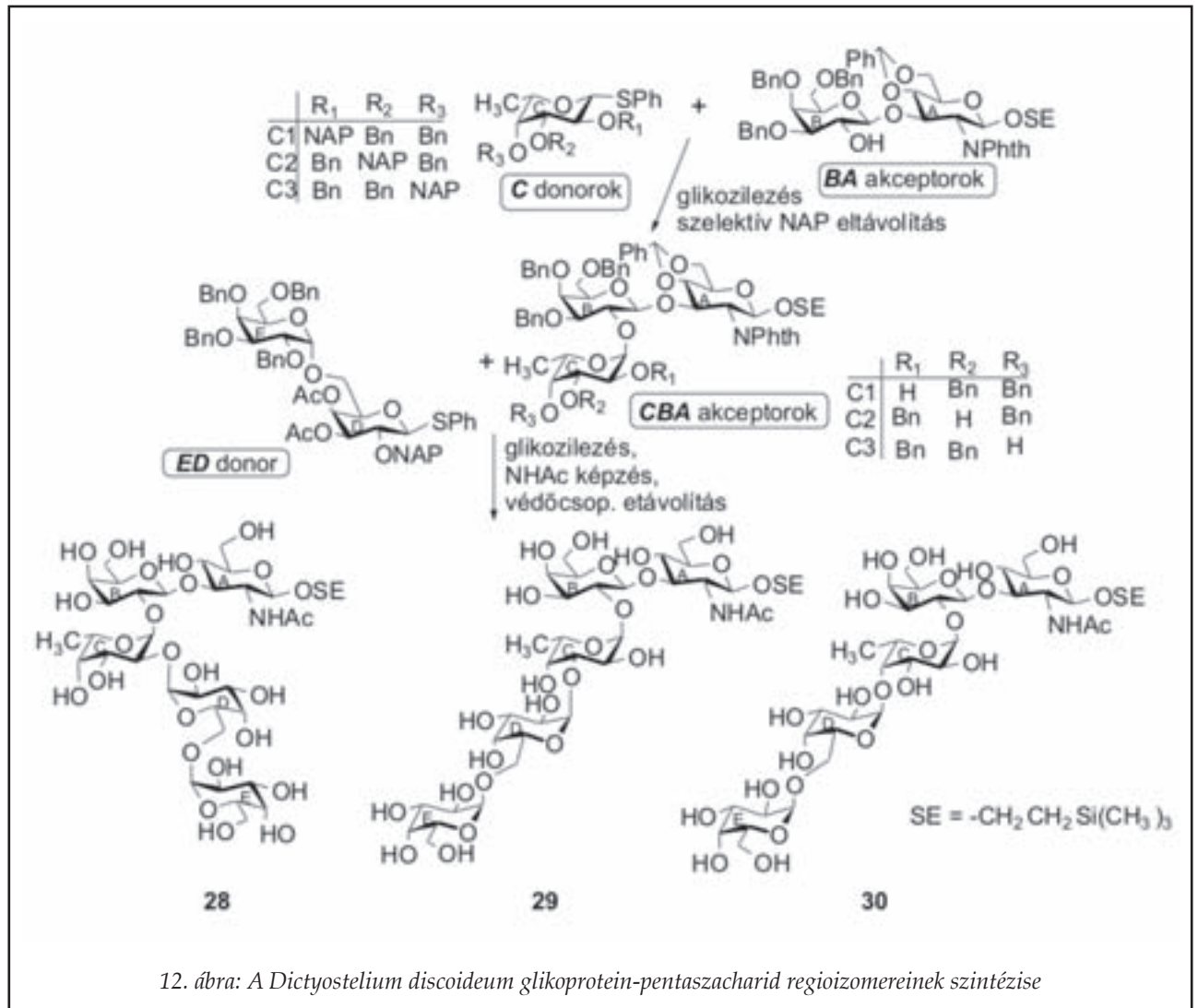
Ebben a reményben először a szialil Lewis X pszeudotetraszacharid-mimetikumának (32) a szintézisét oldották meg [45]. E vegyületben a szialil Lewis X (31) A-részét szulfonsavmetil-csoportot viselő heptulóz, a glükózamin-egységet (C) pedig az etilén-glikol hídmolekula helyettesítette. Emellett számos cukor C-szulfonsav származék sztereoselektív szintézisét is megvalósították, így például a N-acetil-neuraminsav analógját (33) is [46].

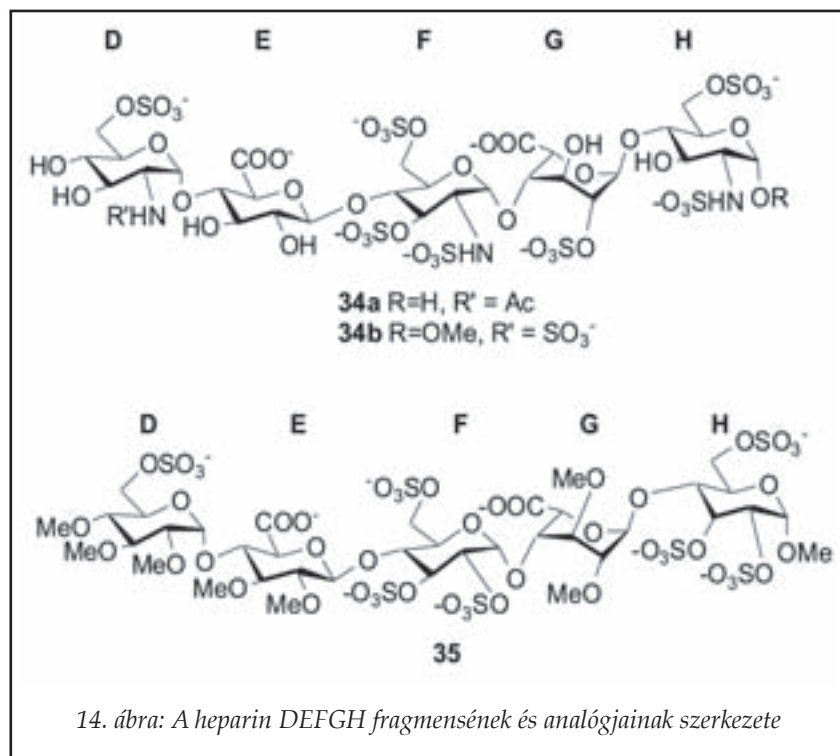
E mimetikumok szintézise során szerzett ta-

paszlatatok alapján kezdődtek meg a heparin anti-trombinkötő-pentaszacharid részének (34a) szulfonsav-mimetikumainak szintézisére irányuló kutatások is. A heparin a gyógyászatban legelterjedtebben használt véralvadásgátló, glükózamin és hexuronsav (D-glükuronsav és L-iduronsav) egységekből felépülő polianionos lineáris poliszacharid, amely a sejtek felületén és az extracelluláris mátrixban proteoglikánok formájában fordul elő, és a fehérjékhez kötődve szabályozza azok biológiai működését. A kötődésért szulfátészter- és karboxilcsoportjai, valamint az aminosavak bázikus csoportjai között kialakuló erős ionos kötések a felelősek. Az 1980-as években a DEFGH egységekből álló pentaszacharidként (34a) azonosították azon minimális részét (14. ábra), amely az anti-trombin III fehérje (AT-III) aktiválásával a véralvadásgátló hatását kifejti [47]. Arixtra néven a francia és holland kutatók által 55 lépéses kémiai szintézissel előállított analógja (34b) [48] véralvadásgátló gyógyszerként 2001 óta már forgalomban van. A nem glikozaminoglikán típusú Idraparinux (35) antikoagulánsról pedig a közelmúltban közölték [49], hogy az aktivitása és felezési ideje nagyobb a természetes pentaszacharidénál (34a) és így a heparinnál hatékonyabb véralvadásgátló.

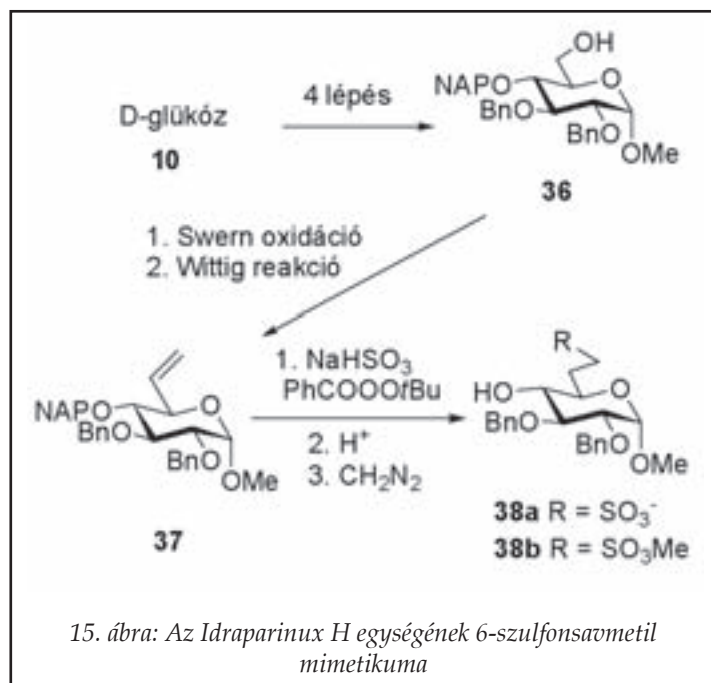
Ezen előzmények alapján kézenfekvő volt olyan oligoszacharidok szintézisét is megkísérelni, melyekben az Idraparinux (35) D és F glükózegységeiben lévő szulfátészter csoportok helyett egyenként, a bioizoszter metánszulfonsav csoportok vannak. Eddig a DEF-, EF- és GH-fragmentumok szulfonátometil analógjainak szintézisét sikerült megvalósítani [50]. A legnehezebb szintetikus feladat a különböző helyzetben szulfonometilezett H és F egységek glikozil akceptorként történő előállítása volt. A 15. ábrán a H egységnek megfelelő szulfonometilezett akceptor (38) előállítását mutatom be, melynek során a már fentebb is említett NAP-védőcsoport stratégiát sikerrel alkalmaztuk. D-glükózból (10) kiindulva három lépésben a 36 6-hidroxi- $\alpha$ -metil-glükozidot állítottuk elő, melyből Swern oxidációt követő Wittig reakcióval jutottunk a NAP csoporttal védett 6,7-telítetlen heptozidhoz (37). Ebből nátrium-hidrogénszulfid regio szelektív gyökös addíciójával a 2-naftilmetil (NAP) csoport hasítását követően jutottunk a 38a szulfonsav nátrium sójához, melyből két lépésben a kívánt szulfonsav észtert (38b) kaptuk meg.

A sejt felszíni szénhidrátbázisú antigének szintézisére irányuló korábbi kutatások [51] a tanszéken is eredményesen folytatódtak. 2006-ban a *Mycobacterium avium* komplex 19-es szerovariánsának sejt-





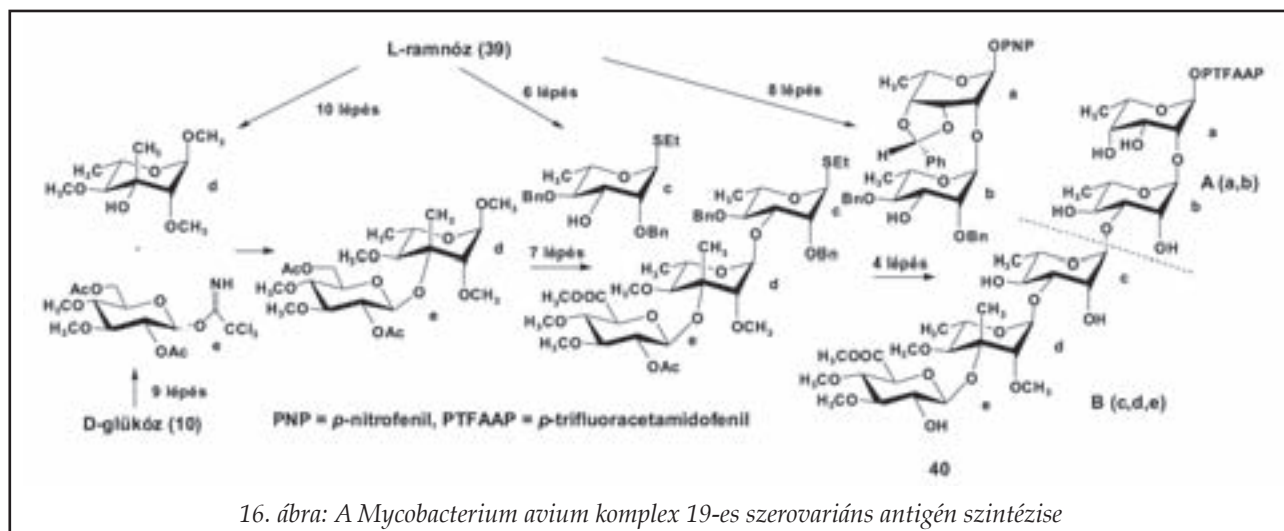
felszíni pentaszacharid antigénjét (40) sikerült előállítani [52]. Ez a pentaszacharid két részből áll: az invariáns diszacharidból (A) és az immunválasz kiváltásáért felelős terminális triszacharidból (B). Az utóbbi egy különleges szerkezetű molekula, mivel a glükuronsav része egy olyan 3-C-metil- $\alpha$ -L-hexopiranozid származékhoz kapcsolódik, amelynek a C-4 konfigurációját (6-dezoxi-manno, vagy -talo) az antigén szerkezetfelderítésekor nem



határozták meg [53]. D-glükózból (10) és L-rhamnózból (39) kiinduló szerkezetbizonyító szintézisünk kulcs intermedierjeit a 16. ábrán foglaltam össze. E szintézis nemcsak egyértelműen bizonyította, hogy az antigén B részében lévő középső szénhidrát egység 6-dezoxi-manno konfigurációjú, hanem a szénhidrátok körében első példája is volt a *tercier* hidroxil csoport glikozilezésének. Minthogy a *Mycobacteriumok* súlyos fertőzéseket okoznak a legyengült immunrendszerű szervátültetett, vagy a HIV fertőzött betegeknél, és a kimutatásuk, valamint a szerodiagnózisuk terápiás szempontból már tünetmentes időszakban is igen fontos, így a szintetikus antigénekből előállított glikokonjugátumoknak nagy gyógyászati jelentőségük lehet.

Számos gyógynövény, mint például az *Echinacea purpurea* (lángvörös kasvirág) immunstimuláló és antimetasztatikus hatásáért a szöveteiben található arabinogalaktánok (AGPs) a felelősek. Szerkezetfelderítésük kapcsán számos arabinofuranozil elágazást hordozó arabinogalaktán származékot állítottak már elő és a biológiai hatásukat is tanulmányozták [54]. E kutatás folytatásaként a közelmúltban a 3,6 elágazású arabinogalaktánok szintézisével foglalkoztunk és 3-aminopropil kapcsolóelemet hordozó 41 tetra- és 42 hexaszacharidot állítottuk elő (17. ábra) [55].

Az elmúlt 20 évben a szénhidrátkémia területén elért eredményeink is talán meggyőzően igazolják, hogy a *Bognár* akadémikus által örökül hagyott „Zemplén iskola” tovább él és virágzik. Meggyőződésem, hogy a fentebb ismertetett kutatások – hasonlóan e közleménysorozat első és második részében közöltekkel – nemcsak jó lehetőséget adtak a hallgatóknak a szintetikus szerves kémia elmélyültebb művelésére, hanem számottevően hozzájárultak a sztereokémiai, elválasztástechnikai és spektrometria(szkópi)ai ismereteik gazdagodásához is. E kutatások alaptudományi jellegük mellett többnyire biológiailag aktív vegyületek előállítására és hatásuk szerkezeti feltételeinek meghatározására irányultak, ezáltal a fiatal munkatársaink talán megélhették a felfedező gyógyszerkutatás örömeit is.

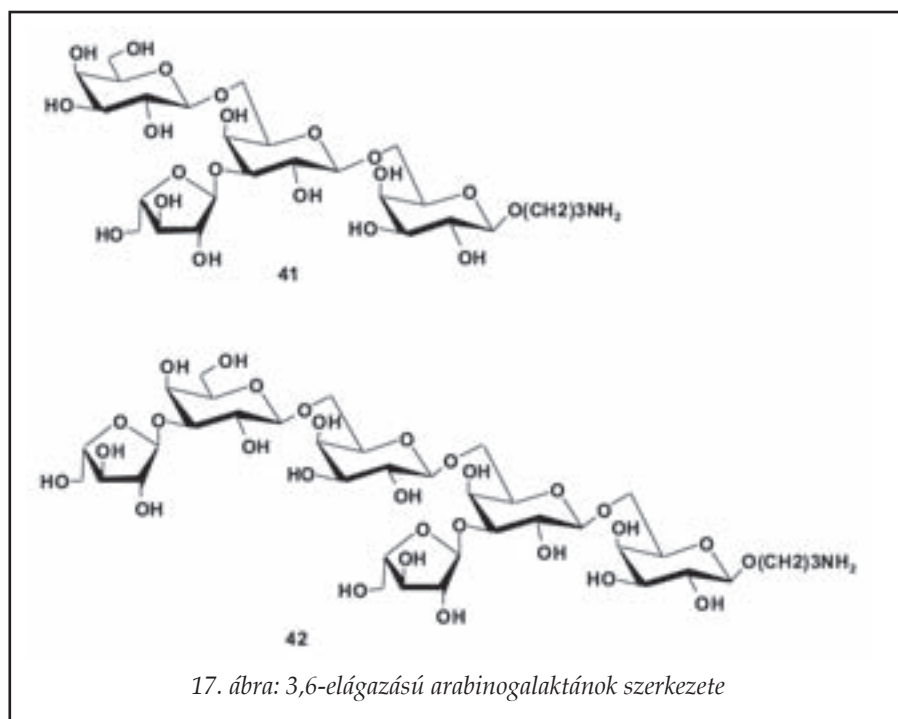


### 3. Köszönetnyilvánítás

E helyütt is köszönetemet fejezem ki a tanszék és a kutatócsoport szénhidrátkémiai eredményeit bemutató közlemények szerzőinek az értékes és áldozatos munkájukért, mellyel e területen, a már korábban megszerzett nemzetközi elismertség megőrzését lehetővé tették. Őszinte hálámat és köszönetemet kifejezem ki *Lipták András* akadémikusnak, aki a szénhidrátkémiaiba bevezetett és tudásának legjavával nemcsak a kutató, hanem a tanszék- és kutatócsoportvezetői munkámat is folyamatosan segítette és a mindennapi munkánkban nélkülözhetetlen szakmai háttérrel is biztosítja.

Köszönettel tartozom *Herczegh Pál*, *Somsák László*, *Szilágyi László* és *Sztaricskai Ferenc* egyetemi tanároknak, néhai *Györgydeák Zoltán* docensnek, *dr. Borbás Anikó* és *dr. Fekete Anikó* tudományos főmunkatársaknak, *Jánossy Lóránt*, *Tóth Sándorné* és *Kóder Lászlóné* vegyésztechnikusoknak az áldozatos munkájukért, mellyel nagyszámú hallgató érdeklődését felkeltve a debreceni szénhidrátkémia nemzetközi hírnevét öregbítették. A munkánkhoz nélkülözhetetlen farmakológiai vizsgálatokért *Gergely Pál* akadémikusnak és *dr. Docsa Tibor* tudományos munkatársnak (DE, OEC) mondom köszönetet. Hálával tartozom *Szabó Edit* adminisztrátornak és *Tótiné Dienes Veronika* ügyvivő szakértőnek, hogy a tanszék és a kutatócsoport sokirányú ügyintézését lelkiismeretesen végezve az oktató-kutató munkánkat hatékonyan segítették. Köszönetet mondom *dr. Borbás Anikó* és *dr. Fekete Anikó* tudományos főmunkatársaknak és *Herczeg Mihály* doktoranduszának e közlemény összeállításában nyújtott hathatós segítségükért.

A kutatásainkat az OTKA támogatta [T-19339 (1996-1999), T-32124 (2000-2003), T-43550 (2003-2006), T-46081 (2004-2007), T-049436 (2005-2009), NK-48798 (2005-2009), NI-61336 (2006-2010), K-62802 (2006-2011), CK-77712 (2009-2012), PD-730646 (2008-2011)], melyért e helyütt is az őszinte köszönetünket fejezzük ki.





## IRODALOM

1. Beck, M.: Than Károly élete és munkássága. Magyar Tudománytörténeti Intézet, Piliscsaba, 2008. 192. old.
2. Zemplén, G.: A káliumpermanganát hatása a cellulózra. Erdész. Kisérlet. 9, 113-117 (1907).
3. Móra, L.: Zemplén Géza a hazai tudományos szerves kémia megalapítója, BME Központi Könyvtár, Budapest, 1971. 83. old.
4. Pályamunka az 1908 évi Deák Ferenc díj elnyerésére. Zemplén G.: Fából készített cukor és alkohol. Pátria Nyomda. Budapest, 1910. 1-100 old.
5. Bölcsészettudományi Kar Dékáni Hivatalához címzett beadvány. Ikt. sz. 5551/911-12. ELTE levéltár.
6. a) Fischer, E., Zemplén, G.: Verhalten der Cellobiose und ihres Osons gegen einige Enzyme. Liebigs Ann. Chem. 365, 1-6 (1909);  
b) Fischer, E., Zemplén, G.: Neue Synthese der inaktiven  $\alpha,\delta$ -Diaminovaleriansäure und des Prolins. Ber. Dtsch. Chem. Gesellsch. 42, 1022-1026 (1909);  
c) Fischer, E., Zemplén, G.: Synthese der beiden optisch-aktiven Proline. Ber. Dtsch. Chem. Gesellsch. 42, 2989-2997 (1909);  
d) Zemplén, G., Pringsheim, H.: Studien über die Polysaccharide spaltenden Fermente in Pilzpressäften, Z. Physiol. Chem. 62, 368-385 (1909);  
e) Fischer, E., Zemplén, G.: Neue Synthese von Amino-oxyssäuren und von Piperidin-Derivaten. Ber. Dtsch. Chem. Gesellsch. 42, 4878-4892 (1909);  
f) Fischer, E., Zemplén, G.: Verhalten der Cellobiose gegen einige Enzyme. Liebigs Ann. Chem., 372, 254-256 (1910.);  
g) Fischer, E., Zemplén, G.: Über  $\epsilon$ -Amino- $\alpha$ -guanidocaprinsäure. Ber. Dtsch. Chem. Gesellsch. 43, 934-936 (1910);  
h) Fischer, E., Zemplén, G.: Nachtrag zu den Mitteilungen über  $\epsilon$ -Amino- $\alpha$ -guanidocaprinsäure und über neue Synthese von Amino-oxyssäuren und von Piperidinderivaten. Ber. Dtsch. Chem. Gesellsch. 43, 2189-2192 (1910);  
i) Fischer, E., Zemplén, G.: Einige Derivate der Cellobiose. Ber. Dtsch. Chem. Gesellsch. 43, 2536-2543 (1910).
7. Zemplén, G., Kunz, A.: Über die Natriumverbindungen der Glucose und die Verseifung der acylierten Zucker, Ber. Dtsch. Chem. Gesellsch. 56, 1705-1710 (1923).
8. Zemplén, G.: Abbau der reduzierenden Biosen. Direkte Konstitutions-Ermittlung der Cellobiose. Ber. Dtsch. Chem. Gesellsch. 59, 1254-1266 (1926).
9. Lipták, A., Pintér, I., Somsák, L.: Szénhidrátkémiai kutatások Magyarországon. Magy. Kém. Foly. 108, 467-491 (2002).
10. Antus, S.: Biológiaiailag aktív vegyületek kutatása a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén 1992-2009. közölt I és II. Acta Pharm. Hung. 79, 95-103 és 143-167 (2009).
11. Kutatási eredmények 1950-1973. Jubileumi kötet Bognár Rezső hatvanadik születésnapjára (szerk. Gaál György) Alföldi Nyomda, Debrecen, 1973. 11-216. old.
12. a) Sztaricskai, F., Pelyvás, I., Bognár, R.: Új reakciók a dezoxi-aminocukrok és szénhidrátartalmú antibiotikumok kémiájában. Magy. Kém. Lapja. 41, 147-161 (1986).  
b) Pelyvás, I. F., Monneret, C., Herczegh, P.: Synthetic Aspects of Aminodeoxy Sugars of Antibiotics, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1988. 1-244. old.
- c) Sztaricskai, F.: Bognár Rezső (1913-1990) emlékezete nyolcvanötödik születésnapján. Debreceni Szemle 2, 257-272 (1998).
- d) Sztaricskai, F.: Antibiotikum-kémiai kutatások a Debreceni Egyetemen. Debreceni Szemle 2, 229-250 (1999).
13. Lehmann, J.: Kohlenhydrat-Chemie und Biologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996.
14. Zechel, D.L., Withers, S.G.: Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a Finely Tuned Catalyst. Acc. Chem. Res. 33, 11-18 (2000).
15. a) Györgydeák, Z., Paulsen, H.: Synthese von  $\beta$ -D-Mannopyranosylaziden. Liebigs Ann. Chem. 1987-1991 (1977);  
b) Györgydeák, Z., Szilágyi, L.: Darstellung und Konformation der 1,2-cis-Pentopyranosylazide. Liebigs Ann. Chem. 1393-1397 (1986);  
c) Szilágyi, L., Györgydeák, Z.: A  $^{13}\text{C}$ -NMR Investigation of Glycosyl Azides and Other Azido Sugars: Stereochemical Influences on the One-bond  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Coupling Constants. Carbohydr. Res., 143, 21-41 (1985).
16. Pető, Cs., Batta, Gy., Györgydeák, Z., Sztaricskai, F.: Glycoside Synthesis with Anomeric 1-N-Glycobiosyl-1,2,3-Triazoles. J. Carbohydr. Chem., 15, 456-483 (1996).
17. a) Somsák, L., Ferrier R.-J.: Radical-Mediated Brominations at Ring Positions of Carbohydrates. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 49, 37-92 (1991);  
b) Somsák, L., Sós, E.E., Györgydeák, Z., Praly, J-P., Descotes, G.: Synthesis and Some Transformation of 1-azido-glycosyl cyanides - precursors of anomeric  $\alpha$ -amino acids. Tetrahedron 52, 9121-9136 (1996);  
c) Somsák, L.: Carbanionic Reactivity of the Anomeric Center in Carbohydrates: Chem. Rev. 101, 81-135 (2001);  
d) Czifrák, K., Szilágyi, P., Somsák, L.: Anomeric  $\alpha$ -azido acid (2-azido-2-deoxy-hept-2-ulopyranosonic acid) derivatives en route to peptides incorporating sugar amino acids. Tetrahedron: Asymmetry, 16, 127-141 (2005).
18. Nakajima, M., Itoi K., Takamatsu, Y., Kinoshita, T., Okazaki, T., Kawakubo, K., Shindo, M., Honma, T., Tohjamori, M., Haneishi, T. I.: Hydantocidin: A new compound with herbicidal activity from *Streptomyces hygrosopicus*. J. Antibiot. 44, 293-300 (1991).
19. Nakajima, N., Matsumoto, M. Kirihara, M., Hashimoto, M., Katoh, T., Tereshima, S.: Novel synthesis of (+)-hydantocidin based on the plausible biosynthetic pathway. Tetrahedron, 52, 1177-1194 (1996).
20. Sano, H., Mio, S., Kitagawa, J., Shindou, M., Honma, T., Sugai, S.: Synthesis of spirothiohydantoin analogues of hydantocidin. Tetrahedron, 51, 12567-12572 (1995).
21. Watson, K.A., Mitchell, E.P., Johnson, L.N., Cruciani, G., Son, J.C., Bichard, C.J.F., Fleet, G.W.J., Oikonomakos, N.G., Kontou, M., Zographos, S.E.: Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: from crystallographic analysis to drug prediction using GRID force-field and GOLPE variable selection, Acta Chryst. Sect. D, 51, 458-472 (1995).
22. Bichard, C.J.F., Mitchell, E.P., Wormald, M.R., Watson, K.A., Johnson, L.N., Zographos, S.E., Koutra, D.D., Oikonomakos, N.G., Fleet, G.W.J.: Potent inhibition of glycogen phosphorylase by a spirohydantoin of glucopyranose: First pyranose analogues of hydantocidin. Tetrahedron Lett. 36, 2145-2148 (1995).
23. a) Ősz, E., Sós, E., Somsák, L., Szilágyi, L., Dinya, Z.: A Straightforward Route to Hydantocidin Analogues with Pyranose Ring Structure. Tetrahedron, 53, 5813-5824 (1997);

- b) Ősz, E., Somsák, L., Szilágyi, L., Kovács, L., Docsa, T., Tóth, B., Gergely, P.: Efficient inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by a new glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 1385-1390 (1999).
24. Somsák, L., Kovács, L., Tóth, M., Ősz, E., Szilágyi, L., Györgydeák, Z., Docsa, T., Tóth, B., Gergely, P.: Synthesis of and a Comparative Study on the Inhibition of Muscle and Liver Glycogen Phosphorylases by Epimeric Pairs of D-Glucopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoin and N-(D-Glucopyranosyl) Amides. *J. Med. Chem.* 44, 2843-2848 (2001).
25. Gregoriou, M., Noble, M.E.M., Watson, K.A., Garman, E.F., Krülle, T.M., Fuente, C., Fleet, G.W.J., Oikonomakos, N.G., Johnson, L.N.: The structure of a glycogen phosphorylase glucopyranose spirohydantoin complex at 1.8 Å resolution and 100 K: The role of the water structure and its contribution on binding. *Protein Sci.* 7, 915-927 (1998).
26. a) Somsák, L., Nagy, V., Docsa, T., Tóth, B., Gergely, P.: Gram-scale Synthesis of a Glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin and its Effect on Hepatic Glycogen Metabolism Studied in vitro and in vivo. *Tetrahedron: Asymm.* 11, 405-408 (2000);  
b) Somsák, L., Nagy, V.: Scalable Preparation of a Glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin: One of the Best Inhibitors of Glycogen Phosphorylases. *Tetrahedron: Asymm.* 11, 1719-1727 (2000).
27. a) Somsák, L., Nagy, V., Hadady, Zs., Docsa, T., Gergely, P.: Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: Recent developments. *Curr. Pharm. Design.* 15, 2933-2983 (2003);  
b) Oikonomakos, N.G., Somsák, L.: Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, 9, 379-395 (2008);  
c) Somsák, L., Nagy, V., Hadady, Zs., Felföldi, N., Docsa, T., Gergely, P.: In *Frontiers in Medicinal Chemistry: Reitz, A.B., Koráik, C.P., Choudhary, Rahman, M.I., A. Eds.: Bentham, 2005, 253-272. old.*,  
d) Somsák, L., Bokor, E., Czifrák, K., Kónya, B., Kun, S., Tóth, M.: A glikogén foszforiláz glükózanalóg gátlószerei, mint potenciális antidiabetikumok. *Magy. Kém. Foly. megjelenés alatt.*
28. Chrysina, E.D., Bokor, E., Alexacou, K.-M., Charavgi, M.-D., Oikonomakos, G.N., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Oikonomakos, N.G., Somsák, L.: L. Amide-1,2,3-triazole bioisosterism: the glycogen phosphorylase case. *Tetrahedron Asymm.* 20, 733-740 (2009).
29. Györgydeák, Z., Hadady, Z., Felföldi, N., Krakomperger, A., Nagy, V., Tóth, M., Brunyánszky, A., Docsa, T., Gergely, P., Somsák, L.: Synthesis of N-(β-D-glucopyranosyl)- and N-(2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 4861-4870 (2004).
30. Czákó, Z., Juhász, L., Kenéz, Á., Czifrák, K., Somsák, L., Docsa, T., Gergely, P., Antus, S.: Synthesis and glycogen phosphorylase inhibitory activity of N-(β-D-glucopyranosyl)amides possessing 1,4-benzodioxane moiety. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 6738-6741 (2009).
31. Felföldi, N.: A glikogén foszforiláz új glükózanalóg inhibitorainak előállítása. Doktori(PhD) értekezés. Debreceni Egyetem. 2009
32. Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák, L., Nagy, V., Praly, J.-P., Docsa, T., Tóth, B., Gergely, P.: Binding of N-acetyl-N'-β-D-glucopyranosyl urea and N-benzoyl-N'-β-D-glucopyranosyl urea to glycogen phosphorylase b. Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696 (2002).
33. Nagy, V.: Glikogén-foszforiláz inhibitorok előállítása. Doktori(PhD) értekezés. Debreceni Egyetem – Université de Lyon. 2003
34. Bentlifa, M., Vidal, S., Gueyrard, D., Goekjian, P.G., Msaddek, M., Praly, J.-P.: 1,3-Dipolar cycloaddition reactions on carbohydrate-based templates: synthesis of spiroisoxazolines and 1,2,4-oxadiazoles as glycogen phosphorylase inhibitors. *Tetrahedron Lett.* 47, 6143-6147 (2006).
35. Bentlifa, M., Hayes, J.M., Vidal, S., Gueyrard, D., Goekjian, P.G., Praly, J.-P., Kizilis, G., Tiraidis, C., Ilaexacou, K.-M., Chrysina, E.D., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Archontis, G., Oikonomakos, N.G.: Glucose-based Spiro-isoxazolines: A New Family of Potent Glycogen Phosphorylase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 7368-7380 (2009).
36. a) Somsák, L., Nagy, V., Vidal, S., Czifrák, K., Berzsényi, E., Praly, J.-P.: Novel design principle validated: glucopyranosylidene-spiro-oxathiazole as new nanomolar inhibitor of glycogen phosphorylase, potential antidiabetic agent *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 5680-5683 (2008);  
b) Nagy, V., Vidal, S., Bentlifa, M., Berzsényi, E., Teilhet, C., Czifrák, K., Batta, G., Docsa, T., Gergely, P., Somsák, L., Praly, J.-P.: Glucose-based spiro-heterocycles as potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 5696-5707 (2009).
37. Tóth, M., Kun, S., Bokor, E., Bentlifa, M., Tallec, G., Vidal, S., Docsa, T., Gergely, P., Somsák, L., Praly, J.-P.: Synthesis and structure-activity relationships of C-glycosylated oxadiazoles as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 4773-4785 (2009).
38. Herczegh, P., Kovács, L., Szilágyi, L., Varga, T., Dinya, Z., Sztaricskai, F.: Cycloaddition reactions of carbohydrate derivatives. Part IV. Synthesis of a tetrahydroxyindolizidine through a cyclic nitron prepared from D-xylose, *Tetrahedron Lett.* 34, 1211-1214 (1993).
39. Lipták, A.: Nánási Pál. A Debreceni Kossuth Lajos Tudományegyetem Tanárainak Munkássága 15. KLTE Könyvtára. Debrecen, 1993. 1-49. old.
40. a) Lipták, A., Borbás, A., Bajza, I.: Synthesis of Carbohydrate Containing Surface Antigens of *Mycobacteria*. *Med. Res. Reviews.* 14, 307-351 (1994)  
b) Bajza, I.; Borbás, A.; Hajkó, J.; Lagas, R.; Szabovik, G.; Varga, Zs.; Lipták, A.: Glikolipid és glikopeptidolipid típusú mycobakteriális antigének kémiaja. *Magyar Kémikusok Lapja*, 51, 464-475 (1996).
41. Bajza, I., Borbás, A., Lipták, A.: Protecting group manipulations in carbohydrate synthesis in *Comprehensive Glycoscience I-IV*, J. P. Kamerling, Elsevier Science 2007, Volume I. pp 203-259;
42. a) Borbás, A., Szabó, Z.B., Szilágyi, L., Bényei, Lipták, A.: Stereoselective (2-naphthyl)methylation of sugar hydroxyls by the hydrogenolysis of diastereoisomeric dioxolane-type (2-naphthyl)methylene acetals. *Carbohydr. Res.* 337, 1941-1951 (2002);  
b) Szabó, Z. B., Borbás, A., Bajza, I., Lipták, A.: Synthesis of fully protected α-L-fucopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranosides with a single free hydroxy group at position 2', 3' or 4' using O-(2-naphthyl)methyl (NAP) ethers as a temporary protective group: *Tetrahedron: Asymm.*, 16, 83-95 (2005).
43. Szabó, Z.B., Herczeg, M., Fekete, A., Batta, Gy., Borbás, A., Lipták, A., Antus, S.: Synthesis of three regioisomers of

- the pentasaccharide part of the Skp1 glycoprotein of *Dictyostelium discoideum*. *Tetrahedron: Asymm.*, 20, 808-820 (2009).
44. Teng-umnuay, P., Morris, H.R.; Dell, A., Panico, M., Paxton, T., West, C.M.: The Cytoplasmic F-box Binding Protein SKP1 Contains a Novel Pentasaccharide Linked to Hydroxyproline in *Dictyostelium*, *J. Biol. Chem.*, 273, 18242-18249 (1998).
45. a) Borbás, A., Szabovik, G., Antal, Zs., Herczegh, P., Agócs, A., Lipták, A.: Sulfonmethyl analogues of aldose-2-ulosonic acids. Synthesis of a new sialyl Lewis X analogue. *Tetrahedron Lett.* 40, 3639-3642 (1999);  
b) Borbás, A., Szabovik, G., Antal, Zs., Fehér, K., Csávás, M., Szilágyi, L., Herczegh, P., Lipták, A.: Sulfonic acid analogues of the sialyl Lewis X tetrasaccharide. *Tetrahedron: Asymm.*, 11, 549-566 (2000).
46. Szabó, Z.B., Borbás, A., Bajza, I., Lipták, A., Antus, S.: First synthesis of sulfonic acid analogues of *N*-acetylneuraminic acid. *Tetrahedron Lett.* 49, 1196-1198 (2008).
47. Thunberg, L.; Backström, G.; Lindahl, U.: Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin, *Carbohydr. Res.*, 100, 393 (1982).
48. van Boeckel, C. A. A., Petitou M.: The unique antithrombin III binding domain of heparin: A lead to new synthetic antithrombotics. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 32, 1671-1690 (1993).
49. Petitou, M., van Boeckel, C. A.: A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angew. Chem., Int. Ed.* 43, 3118-3133 (2004).
50. Herczeg, M., Lázár, L., Borbás, A., Antus, S., Lipták, A.: Toward synthesis of the isosteric sulfonate analogues of the AT-III binding domain of heparin. *Org. Lett.* 11, 2619-2622 (2009).
51. a) Borbás, A., Lipták, A.: A new approach to the chemical synthesis of the trisaccharide, and the terminal di- and monosaccharide units of the major, serologically active glycolipid from *Mycobacterium leprae*. *Carbohydr. Res.* 241, 99-116 (1993);  
b) Bajza, I., Kerekyártó, J., Hajkó, J., Szilágyi, L., Lipták, A.: Chemical synthesis of the pyruvic acetal-containing trisaccharide unit of the species-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* serovar 8. *Carbohydr. Res.* 253, 111-120 (1994).
52. Fekete, A., Gyergyói, K., Kövér, K.E., Bajza, I., Lipták A.: Preparation of the pentasaccharide hapten of the GLP of *Mycobacterium avium* serovar 19 by achieving the glycosylation of a tertiary hydroxyl group; *Carbohydr. Res.* 341, 1312-1321 (2006).
53. Chatterjee, D., Bozic, C., Aspinall, G.O., Brennan, P.J.: Glucuronic acid- and branched sugar-containing glycolipid antigens of *Mycobacterium avium*. *J. Biol. Chem.* 263, 4092-4097 (1988).
54. a) Csávás, M., Borbás, A., Jánosy, L., Batta, G., Lipták, A.: Synthesis of the  $\alpha$ -L-Araf-(1-2)- $\beta$ -D-Galp-(1-6)- $\beta$ -D-Galp-(1-6)-[ $\alpha$ -L-Araf-(1-2)]- $\beta$ -D-Galp-(1-6)-D-Gal hexasaccharide as a possible repeating unit of the cell-cultured exudates of *Echinacea purpurea* arabinogalactan. *Carbohydr. Res.* 336, 107-115 (2001),  
b) Csávás, M., Borbás, A., Szilágyi, L., Lipták, A.: Successful combination of (methoxydimethyl)methyl (MIP) and (2-naphthyl)methyl (NAP) ethers for the synthesis of arabinogalactan-type oligosaccharides. *Synlett*, 887-890 (2002),  
c) Csávás, M., Borbás, A., Jánosy, L., Lipták, A.: Synthesis of an arabinogalactan-type octa- and two isomeric nonasaccharides. Suitable tuning of protecting groups. *Tetrahedron Lett.* 44, 631-635 (2003),  
d) Classen, B., Csávás, M., Borbás, A., Dingermann, T., Zündorf, I.: Monoclonal antibodies against an arabinogalactan-protein from pressed juice of *Echinacea purpurea*, *Planta Medica*, 70, 861-865 (2004).
55. Fekete, A., Borbás, A., Antus, S., Lipták, A.: Synthesis of 3,6-branched arabinogalactan-type tetra- and hexasaccharides for characterization of monoclonal antibodies. *Carbohydr. Res.*, 344, 1434-1441 (2009).

[Érkezett. 2010. március 18.]

# Szilárdfázisú NMR spektroszkópia és gyógyszerészeti alkalmazása

MAROSI ATTILA<sup>1</sup>, SZALAY ZSÓFIA<sup>2</sup> ÉS DEMETER ÁDÁM<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Budapest, Hőgyes Endre u. 9. – 1092

<sup>2</sup>Richter Gedeon NyRt., Hatóanyag Morfológiai Osztály, Budapest, Gyömrői út 19-21. – 1103

\*Levelező szerző: e-mail: a.demeter@richter.hu

## Summary

Marosi, A., Szalay, Zs., Demeter, Á.: **Solid-state NMR Spectroscopy and Its Pharmaceutical Use**

Liquid-state NMR spectroscopy has become an essential analytical tool in almost all fields of chemical research. However, the scope of NMR spectroscopy is not confined to the analysis of fluids. The progress in the investigation of solid samples is remarkably fast and solid-state NMR has developed to a high performance method.

The majority of drug substances and products manufactured in the pharmaceutical industry are formulated in solid state, their analysis gains the increasing potential of solid-state NMR spectroscopy. The aim of this work is to survey the basics of solid-state NMR and to highlight some pharmaceutical applications focusing on polymorphism.

**Keywords:** solid-state NMR, cross polarization, MAS, polymorphism, amorphous materials.

## Összefoglalás

Napjainkra az NMR spektroszkópia a kémiai kutatás szinte minden területén nélkülözhetetlen analitikai eszközzé vált. Bár oldatfázisú minták szerkezetvizsgálata a leginkább elterjedt, a módszer alkalmazási területe korántsem korlátozódik a folyadékok analizésére. A szilárd minták vizsgálata rendkívül gyorsan fejlődik, és a szilárdfázisú NMR spektroszkópia mára komoly teljesítőképességű módszerré vált.

A gyógyszerhatóanyagok és készítmények döntő többsége szilárd formában kerül kiszerelésre, melyek analizésében a szilárdfázisú NMR vizsgálatok egyre fontosabb szerepet kapnak. Jelen közlemény célja, hogy áttekintse a szilárdfázisú NMR spektroszkópia elméleti alapjait, és ízelítőt adjon a technika gyógyszeripari alkalmazási lehetőségeiből, különös tekintettel a polimorfia kutatására.

**Kulcsszavak:** szilárdfázisú NMR, keresztpolarizáció, MAS, polimorfia, amorf anyagok.

## 1. Bevezetés

Ha NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spektroszkópiáról beszélünk, általában a folyadékfázisú vizsgálatok jutnak az eszünkbe. Nem véletlenül, hiszen a mágneses magrezonancia spektroszkópia napjainkra vitathatatlanul az oldatfázisú szerkezetkutatás leghatékonyabb eszközévé vált. A módszer kis szerves molekulák és biopolimerek szerkezet-meghatározásában egyaránt hatékony, sztereo-kémiai és dinamikai vizsgálatok kiváló eszköze, továbbá számos kapcsolt módszere ismert analitikai feladatok megoldására (pl. LC-NMR, CE-NMR, LC-MS-NMR). Így válhatott a fizika, a szerves, fizikai és analitikai kémia, a biokémia és az orvostudomány egyik alapvető vizsgálati módszerévé, melyet számos, az adott tudományterülethez kapcsolódó Nobel-díj is fémjelez (Bloch, Purcell: 1952, fizikai; Ernst: 1991, kémiai; Wütrich: 2002, kémiai; Lauterbur, Mansfield: 2003, orvosi [1]).

Kevésbé általánosan ismert, hogy az NMR a szilárd anyagok vizsgálatában is hatékony, pedig a

folyadék- és szilárdfázisú NMR (solid-state NMR, rövidítve ssNMR) vizsgálatok egyidősek. Amikor 1945-ben Bloch és Purcell (egymástól függetlenül) végrehajtották az első magrezonancia kísérleteket, Bloch és munkatársai a víz [2], míg Purcell és munkatársai szilárd paraffin [3] protonrezonanciáját detektálták. Egy évvel a kémiai eltolódás első detektálása előtt (Knight, 1949) [4], Pake egykristályokon és pormintákon végzett mérések során felfedezte a dipoláris csatolás anizotrópiáját [5]. Hét évvel a Fourier-transzformációs NMR elvének felvetése után (Fellgett, 1951) [4], Andrew és munkatársai publikálták a Magic Angle Spinning technikát [6], amely megteremtette a mai nagyfelbontású ssNMR spektroszkópia lehetőségét. Az ssNMR mégis hosszú éveken keresztül specializálódott kutatócsoportok „játékszere” maradt, az összetettebb spektrális kölcsönhatások és a mérés technika nehézségei miatt. Széleskörű elterjedésének az elmúlt egy-két évtizedben lehetünk szemtanúi, a technológiai és mérés technikai fejlesztéseknek köszönhetően.

A legtöbb gyógyszerhatóanyag és készítmény szilárd formában kerül kiszerezésre, ezek szilárdfázisú analitikája – és ezen belül az ssNMR – egyre fontosabb szerephez jut. A hatóanyagok szilárdfázisú fizikai-kémiai jellemzői meghatározhatják többek között a formulációs sajátosságokat, hatással lehetnek a kompatibilitásra, a hatóanyagok és szilárd gyógyszerformák fizikai és kémiai stabilitására, a kioldódásra és a biohasznosulásra. Az ssNMR napjainkra mindenképpen egyenrangú társa és nélkülözhetetlen kiegészítője lett a hagyományos szilárdfázisú analitikai módszereknek – termogravimetria (TG), differenciális pásztázó kalorimetria (DSC), röntgen pordiffrakció (XRPD), infravörös (FT-IR, NIR) illetve Raman spektroszkópia.

Jelen közlemény célja, hogy áttekintse a szilárdfázisú NMR spektroszkópia elméleti alapjait, gyógyszeripari szemszögből tárgyalja jelentőségét, és valós kutatási-fejlesztési példákon keresztül mutassa be a technika alkalmazási lehetőségeit. A közleményben bemutatott példák elsődlegesen a polimorfia kutatáshoz kapcsolódnak, tekintettel annak gyógyszeripari jelentőségére. A terület iránt érdeklődő olvasó számára további tájékozódás céljára a következő összefoglaló műveket ajánljuk [7–13].

## 2. Kísérleti rész

Az ssNMR alapvető jelenségeit a SIMPSON számítógépes programmal [14] szimulált spektrumokkal szemléltettük. A szimulációk általános paramétereit a következők voltak: szimulált pontok száma: 8192, nullapont-feltöltés: 8192, súlyozás:  $lb = 50$  Hz. A proton rezonanciafrekvencia 600 MHz, a  $^{13}\text{C}$  rezonanciafrekvencia 150 MHz, a protonok kémiai eltolódása 5 ppm, a  $^{13}\text{C}$  atomoké 40, 80 ill. 175 ppm volt a különböző szimulációkban (ld. a megfelelő ábraalírásokat). A szimulált kristályorientációk száma a vizsgált kölcsönhatás összetettségétől függően 4180, 28656 illetve 832039 volt.

A szilárdfázisú NMR méréseket a Richter Gedeon NyRt. Varian NMR System 600 MHz-es (14,1 T) készülékén mértük. A mérésekhez 3,2 ill. 1,6 mm  $\text{ZrO}_2$  rotorokat használtunk. A  $B_1$  tér erőssége a CP alatt 62,5 kHz, a SPINAL lecsatolás teljesítménye 76,3 kHz volt. A mérések során a kémiai eltolódások meghatározásához a következő külső referenciákat alkalmaztuk: az adamantán metilén jelét ( $^{13}\text{C}$ , 38,5 ppm, ill.  $^1\text{H}$ , 1,85 ppm [15]), a folyékony nitrometán nitrocsoportjának jelét ( $^{15}\text{N}$ , 0,0 ppm), a  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  foszfát jelét ( $^{31}\text{P}$ , 0,0 ppm) és a NaCl jelét ( $^{23}\text{Na}$ , 0,0 ppm).

## 3. A szilárdfázisú NMR spektroszkópia elméleti alapjai

Az NMR spektroszkópiával kapcsolatos általános elméleti alapokat ismertnek tekintjük, itt csak a szilárdfázisú mérések szempontjából legfontosabb és az oldatfázisban tapasztaltaktól eltérő kölcsönhatásokra és jellemzőkre térünk ki: a relaxációs viszonyokra, az NMR kölcsönhatások anizotrópiájára és a kristályszerkezetből adódó esetleges jel-többszöröződésekre.

Szilárd fázisban a  $T_2$  transzverzális (spin-spin) relaxációs idő lényegesen rövidebb, a  $T_1$  longitudinális (spin-rács) relaxációs idő lényegesen hosszabb, mint oldatokban, ahol ez a kettő kis szerves molekulák esetében általában azonos nagyságrendbe esik. A hosszú  $T_1$  miatt két mérés között akár több percet is várni kell. A rövid  $T_2$  jelkiszéledéshez vezet, illetve extrém esetben az adott mag detektálása csak speciális esetben lehetséges (pl.  $^{33}\text{S}$ ,  $^{39}\text{K}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ ).

Talán a legalapvetőbb jelenség az ssNMR spektroszkópiával kapcsolatban, hogy a spektrális kölcsönhatások (a *dipoláris csatolás*, a *kémiai eltolódás* és a *kvadrupol csatolás*) irányfüggést mutatnak (anizotrópia). Az NMR kölcsönhatások anizotrópiája folyadékfázisban nem jelentkezik – kivéve a nagy viszkozitású, vagy részlegesen rendezett oldatokat, (pl. folyadékkristályok) – mivel a molekulák gyors mozgása következtében az anizotrópia kiátlagolódik. Szilárd fázisban a molekulák helyzete a kristályrácsban rögzített, ami a mágneses kölcsönhatások anizotrópiáját mérhetővé teszi.

Az egyes kölcsönhatások irányfüggését tenzor segítségével lehet megadni. Szemléletesen egy anizotróp kölcsönhatás jellemezhető egy ellipszoiddal is, amelynek három tengelye megfelel a tenzor három sajátértékének. Attól függően, hogy az ellipszoid hogyan áll a külső mágneses térhez viszonyítva, eltérő rezonanciafrekvenciát detektálunk. Pormintákban statisztikailag mindenféle orientációjú kristály előfordul, amelyek rezonanciafrekvenciája emiatt különböző. Ezért porminták spektrumában a jelek többszáz kHz, ill. több ezer ppm szélesek is lehetnek, vagyis a fenti három kölcsönhatás anizotrópiája jelentősen rontja a mért spektrumok felbontását. Ugyanakkor ezek a kölcsönhatások fontos szerkezeti információt hordoznak a vizsgált mintáról, amelyek bizonyos speciális technikákkal szintén hozzáférhetőek.

Szilárd fázisban egyes intramolekuláris mozgások (pl. fenilcsoport forgása) energiagátja magasabb, mint oldatfázisban. Emiatt az oldatban

egyébként kémiaiailag ekvivalens magok szilárd fázisban nem feltétlenül lesznek azok (pl. egy fenilcsoport szimmetrikus szénatomjai külön jelet adnak). Egyes csoportok viszont szilárd fázisban is szabadon forognak, ezért a kémiai ekvivalencia megmarad (pl. metilcsoport hidrogénjei). A spektrumban látható jelek számát a kristályszerkezet is befolyásolja: amennyiben például az anyag elemi cellájában szimmetria szempontból kétféle elrendeződésű molekula fordul elő, úgy a molekula atomjai két jelsorozatot adnak a spektrumban.

### 3.1. Dipoláris csatolás

A dipoláris csatolás közvetlen téren keresztüli kölcsönhatás, amely két NMR-aktív mag között lép fel, pl.  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$ , vagy  $^1\text{H}$  és  $^1\text{H}$  atommagok között (heteronukleáris ill. homonukleáris dipoláris csatolás). A két csatoló magot szokás  $I$ -vel és  $S$ -sel jelölni. Az  $I$  spin által keltett mágneses tér  $B_0$ -lal parallel vagy antiparallel beállításától függően csökkenti, vagy növeli a hozzá térben közel lévő, vele dipolárisan csatoló  $S$  spin körüli lokális mágneses teret. Az  $I$  és  $S$  spinek lehetséges spinbeállításától függően eltérő energiájú állapotok jönnek létre, így az  $S$  magnak többféle rezonanciafrekvenciája lehet ( $1/2$  spinű magok esetén 2). A kölcsönhatást a dipoláris csatolás erősségével jellemezhetjük, amely a következő Hamilton operátorral írható fel ([16] alapján):

$$H_{IS} = -\frac{d_{IS}}{2}(3\cos^2\theta - 1)\left(2I_z S_z - \frac{1}{2}[I^+ S^- + I^- S^+]\right) \quad (1)$$

ahol  $\theta$  a két kölcsönható mag közötti vektor és a külső mágneses tér indukcióvektora ( $B_0$ ) által bezárt szög,  $I_z$  és  $S_z$  az  $I$  és  $S$  mag spinimpulzusmomentum operátorának a  $z$  irányú komponensei,  $I^+$ ,  $I^-$ ,  $S^+$ ,  $S^-$  pedig a két mag gerjesztő operátorai. A dipoláris csatolási állandót,  $d_{IS}$ -t a következő képlettel definiáljuk:

$$d_{IS} = \frac{\mu_0 \hbar \gamma_I \gamma_S}{4\pi r^3} \quad (2)$$

ahol  $\mu_0$  a vákum permittivitása,  $\hbar$  a redukált Planck-állandó,  $\gamma_I$  és  $\gamma_S$  a két mag giromágneses hányadosa és  $r$  a két csatoló mag távolsága. A 2. egyenlet alapján tehát a csatolási állandó egyenesen arányos a csatoló magok giromágneses hányadosaival és fordítottan arányos a köztük levő távolság harmadik hatványával.

A dipoláris csatolás nagyságát a  $d_{IS}$  csatolási állandón kívül a csatoló magok orientációja is befo-

lyásolja, ezt írja le a  $\cos^2\theta$ -t tartalmazó tag az 1. egyenletben. Folyadékfázisban a molekulák gyors mozgása miatt ez a tag nullára átlagolódik, így a kölcsönhatás Hamilton operátora is nulla minden egyes atompárra.

Az 1. ábrán egy izolált  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  spinpár számított  $^{13}\text{C}$  porspektruma, az ún. Pake-dublett látható, ami két széles jelből áll, amelyek egymás tükörképei. A dublett két ága annak felel meg, amikor a két spin azonos, ill. ellentétes beállású, ezt fejezi ki az 1. egyenletben látható  $I_z S_z$  tag. Az egyes ágak legnagyobb intenzitású széle az olyan  $I$ - $S$  vektoroknak felel meg, amelyek a külső mágneses térre merőlegesek, ezek fordulnak elő statisztikailag a legnagyobb számban. A kis intenzitású, másik szélső eset a külső mágneses térrel párhuzamos vektoroknak felel meg, ezek statisztikailag a legtrikábbak. A dublett két maximális intenzitású pontja közötti távolság a dipoláris csatolási állandó,  $d_{IS}$ . 1. egyenletből látható, hogy amikor az  $I$ - $S$  vektor éppen

$$\arccos\left(\frac{1}{\sqrt{3}}\right) = \arctan\sqrt{2} = 54,74^\circ \text{ -ot}$$

(ún. mágikus szöget) zár be a külső mágneses térrel, a dipoláris csatolás értéke zérus lesz. Ebben a speciális esetben a mag rezonanciafrekvenciája nem módosul az izotróp kémiai eltolódáshoz képest. Az 1. ábrán az izotróp eltolódás a szimmetrikus Pake-dublett közepén olvasható le, ahol a dublett két ága metszi egymást. Itt tehát azoknak a kristályoknak a magjai adnak jelet, amelyek  $I$ - $S$  vektora és  $B_0$  által bezárt szög éppen a mágikus szög.

#### 3.1.1. Heteronukleáris dipoláris csatolás

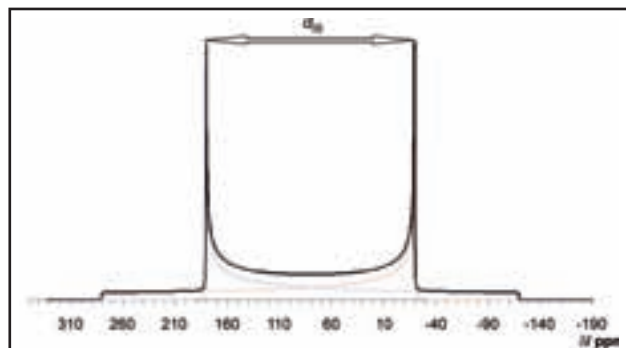
Két különböző atommag, (például  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$ ) rezonanciafrekvenciája között az eltérő giromágneses állandók miatt általában nagy a különbség. Emiatt az 1. egyenletben szereplő

$$[I^+ S^- + I^- S^+]$$

flip-flop tag elhanyagolható, így a heteronukleáris dipoláris csatolást leíró Hamilton-operátor egyszerűsödik:

$$H_{IS} = -d_{IS}(3\cos^2\theta - 1)I_z S_z \quad (3)$$

A  $d_{IS}$  átlagos nagysága egy kötésben lévő  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  csatoló párra (azaz kb. 1 Å távolságra) nagyjából 30 kHz [17]. A magok távolságának növekedésével a csatolási állandó értéke drasztikusan csökken, például 2 Å távolságban 4 kHz, 4 Å-nél 500 Hz, 10 Å-nél már csak 30 Hz.



1. ábra: A dipoláris csatolás következtében kialakuló jellegzetes jelalak (ún. Pake-dublett), porminta statikus  $^{13}\text{C}$  spektrumával szimulálva izolált  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  spinpár esetén. Az izotróp kémiai eltolódás 80 ppm, a csatolási állandó  $d_{\text{IS}} = 30$  kHz. A teljes jel (fekete) a Pake-dublett, amely a piros és kék színekkel ábrázolt két ágból tevődik össze.

### 3.1.2. Homonukleáris dipoláris csatolás

A homonukleáris dipoláris csatolásnak a szilárdfázisú  $^1\text{H}$  NMR spektrumoknál van jelentős hatása, itt megszokott akár a 100 kHz nagyságrendű csatolási állandó is. Ráadásul a mintában a protonok gyakori előfordulása miatt ún. csatolási hálózatok jönnek létre, ezért szilárd szerves minták  $^1\text{H}$  NMR spektruma legtöbb esetben egyetlen, kb. 50–100 kHz szélességű jelből áll. Ennek a lecsatolása rádiófrekvenciás pulzusokkal és egyéb mérés technikai megoldásokkal is nagy nehézségekbe ütközik, emiatt a protonspektrumok felbontása messze elmarad a folyadékfázisban megszokottól.

$^{13}\text{C}$  spektrumokban a homonukleáris dipoláris csatolás értéke a közvetlen kémiai kötésben levő  $^{13}\text{C}$  atomok esetén is legfeljebb 5 kHz [17]. Ráadásul a  $^{13}\text{C}$  ritka atommag (természetes gyakorisága 1% körüli), ezért a  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  dipoláris csatolás valószínűsége nagyon kicsi, kivéve a  $^{13}\text{C}$  izotópdúsított minták esetét. E két ok miatt  $^{13}\text{C}$  spektrumokban a homonukleáris  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  dipoláris csatolás hatása általában elhanyagolható.

### 3.2. Kémiai eltolódás

Mint minden mágneses kölcsönhatás, a kémiai eltolódás is irányfüggő. A kémiai eltolódás anizotrópiája miatt az ssNMR spektrumokban akár több ezer ppm széles jelek is lehetnek (pl. a  $\text{PbFCl}$   $^{207}\text{Pb}$  spektruma egy kb. 5000 ppm széles jelet mutat [18]).

A kémiai eltolódás anizotrópiája (CSA, chemical shift anisotropy) egyenes következménye annak, hogy a molekulákban az elektroneloszlás az egyes atommagok körül nem gömbszimmetrikus. Az

elektronsűrűség rezonanciafrekvenciát módosító hatása ezért az elektronfelhő (és így az egész molekula)  $B_0$ -hoz képesti orientációjának függvénye.

A kémiai eltolódást a következő Hamilton operátorral adhatjuk meg ([16] és [19] alapján):

$$H_{\text{CS}} = \gamma B_0 \left[ \delta_{\text{iso}} + \frac{1}{2} \delta_{\text{CS}} (3 \cos^2 \theta - 1) - \eta_{\text{CS}} \sin^2 \theta \cos 2\phi \right] I_z \quad (4)$$

ahol a  $\theta$  és  $\phi$  ún. Euler-szögek a  $B_0$  által rögzített referencia koordináta-rendszer és a kémiai eltolódási tenzort reprezentáló ellipszoid három fő-tengelyének viszonyát definiálják;  $\delta_{\text{iso}}$  az izotróp kémiai eltolódás,  $I_z$  a mag spinimpulzus-momentum operátorának  $z$  irányú komponense.  $\delta_{\text{CS}}$  a kémiai eltolódás anizotrópiájának mértékét jellemzi (ppm-ben), míg  $\eta_{\text{CS}}$  az ún. aszimmetria paraméter.

A kémiai eltolódást leíró tenzor sajátértékei  $\delta_{11}$ ,  $\delta_{22}$  és  $\delta_{33}$ . Az izotróp kémiai eltolódás,  $\delta_{\text{iso}}$  ebben az esetben a következőképpen írható fel:

$$\delta_{\text{iso}} = \frac{1}{3} (\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33}) \quad (5)$$

A kémiai eltolódás anizotrópiája ( $\delta_{\text{CS}}$ ) és az aszimmetria paraméter ( $\eta_{\text{CS}}$ ) pedig a következő összefüggésekkel definiálhatók:

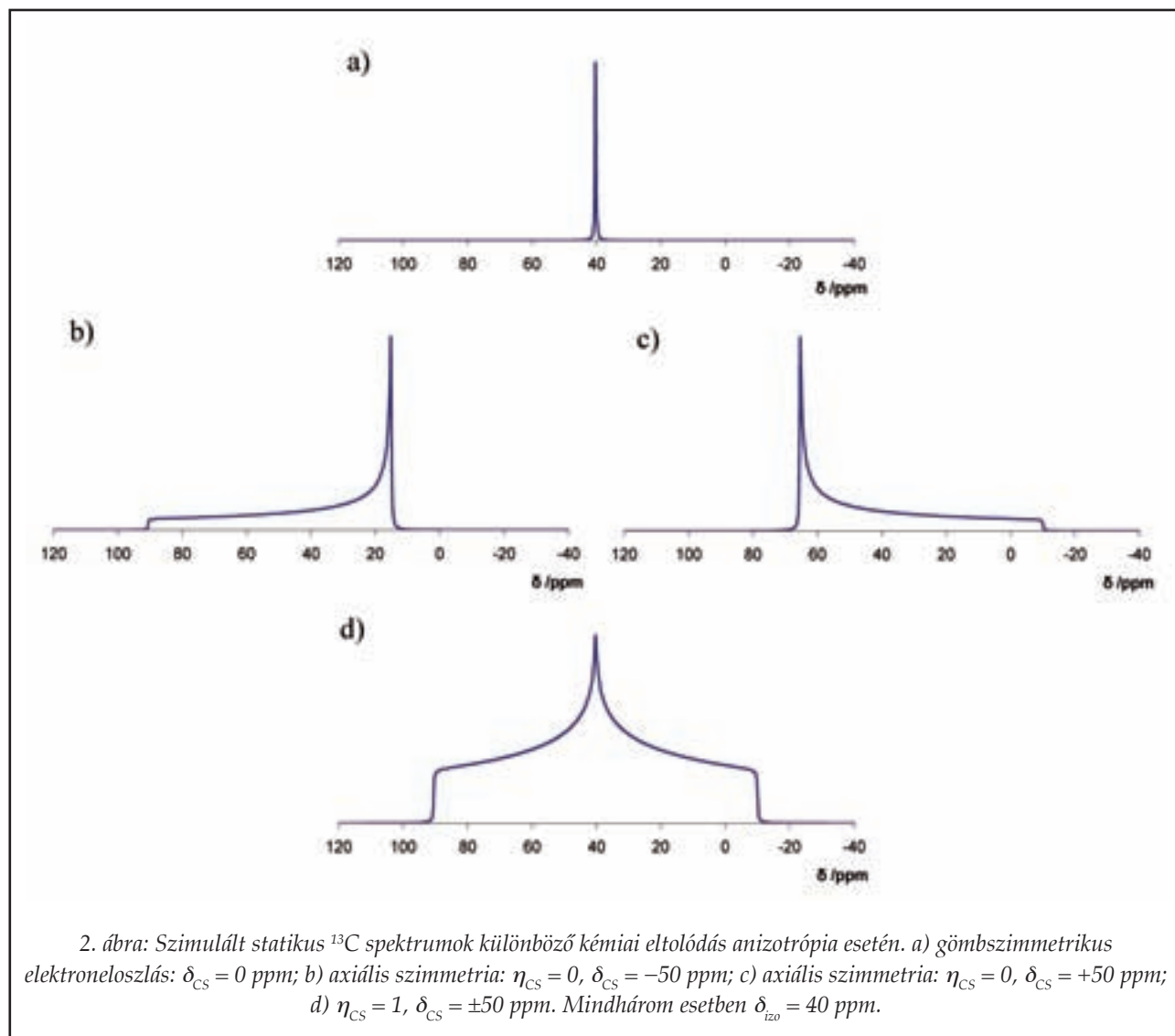
$$\delta_{\text{CS}} = \delta_{11} - \delta_{\text{iso}} \quad (6)$$

$$\eta_{\text{CS}} = \frac{\delta_{33} - \delta_{22}}{\delta_{\text{CS}}} \quad (7)$$

ahol  $|\delta_{11} - \delta_{\text{iso}}| \geq |\delta_{22} - \delta_{\text{iso}}| \geq |\delta_{33} - \delta_{\text{iso}}|$  [20].

A mért kémiai eltolódás tehát attól is függ, hogy az adott kristály milyen irányban áll  $B_0$ -hoz képest. Polikristályos mintákban statisztikusan mindenféle kristályorientáció megvalósul, így a jel alakja a 4. egyenlet szerint, a  $\delta_{\text{iso}}$ ,  $\delta_{\text{CS}}$  és  $\eta_{\text{CS}}$  paraméterektől függően, a lehetséges kémiai eltolódások burkológörbéje lesz. A 2. ábra különböző  $\delta_{\text{CS}}$  és  $\eta_{\text{CS}}$  értékpárokkal szimulált jelalakokat mutat (egyéb kölcsönhatásokat elhanyagolva).

Gömbszimmetrikus elektroneloszlás esetén igen kismértékű anizotrópiát tapasztalunk ( $\delta_{\text{CS}} \approx 0$ ) és a spektrum egyetlen éles jelet tartalmaz (például a 2. ábra a) részén).



Axiális szimmetria esetén ( $\eta_{\text{CS}} = 0$ ,  $\delta_{\text{CS}} \neq 0$ ) a **0. egyenlet** egyszerűsödik és a kémiai eltolódás orientációját csak a dipoláris csatolásnál is látott ( $3\cos^2\theta - 1$ ) tag írja le. Ekkor két eset lehetséges  $\delta_{\text{CS}}$  előjelének függvényében (2. ábra b), c) része), és a jel a Pake-dublett valamelyik ágához hasonló. A  $\delta_{\text{CS}} > 0$  esetben a tenzor egy olyan ellipszoiddal írható le, amelynek két tengelye azonos, a harmadik pedig hosszabb náluk.  $\delta_{\text{CS}} < 0$  esetben a harmadik tengely rövidebb a másik kettőnél. A jel maximuma akkor van, amikor  $B_0$  vektor az ellipszoid két azonos tengelye által kifeszített síkban van, a minimuma, pedig akkor, amikor  $B_0$  erre a síkra merőleges.

Speciális esetnek tekinthető, amikor  $\eta_{\text{CS}} = 1$  (2. ábra d) része). Ekkor az izotróp kémiai eltolódás a jel maximumára esik.

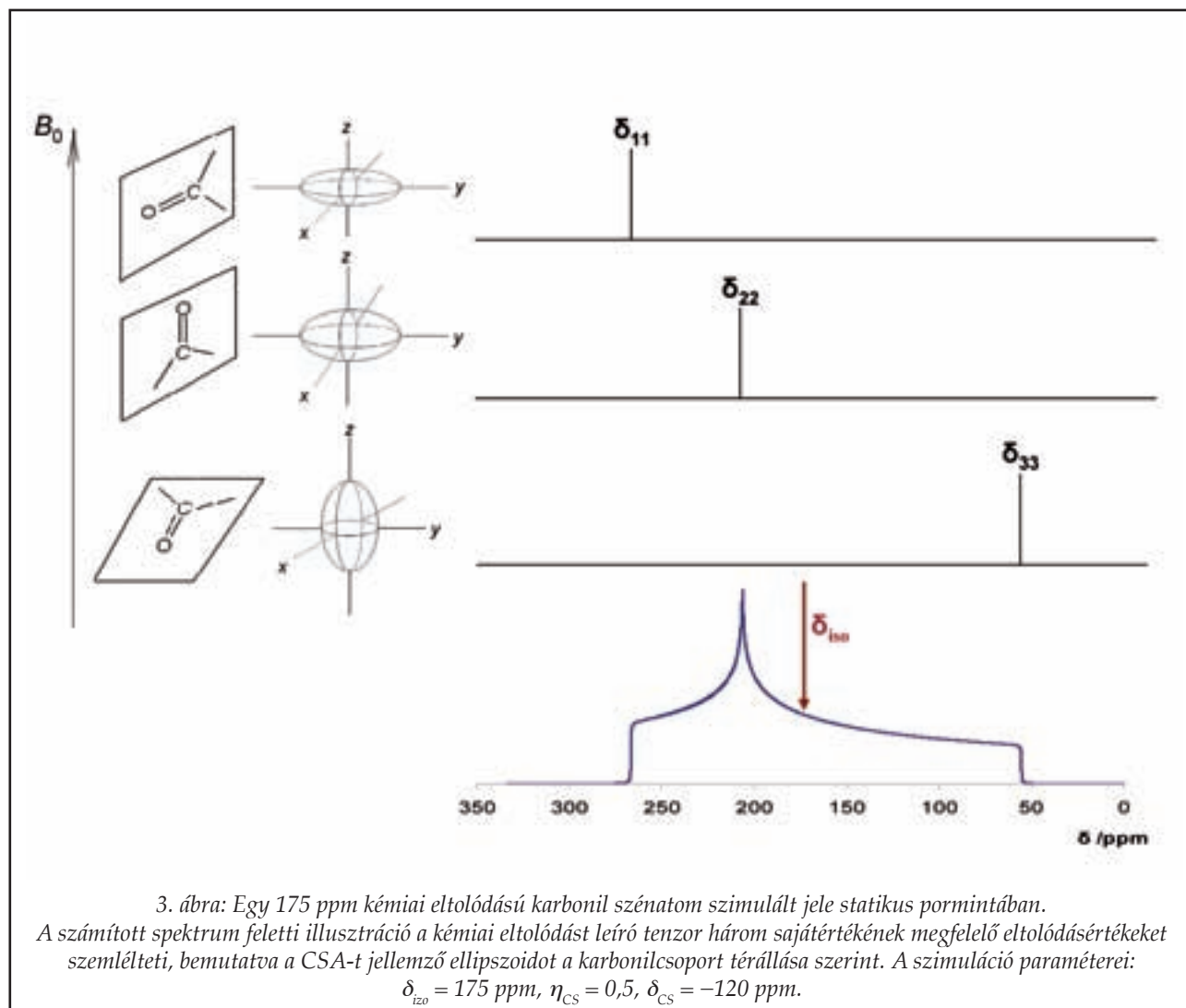
A kémiai eltolódás anizotrópiája akkor eredményezi a legbonyolultabb jelet, ha az árnyékolási tenzort leíró ellipszoidnak nincs két egyenlő hosz-

szú tengelye, amely esetet egy karbonil szénatom jelével szemléltetünk (3. ábra) [21]. A kémiai eltolódás akkor a legnagyobb, ha az elektronfelhő legkisebb kiterjedésű része helyezkedik el párhuzamosan  $B_0$ -lal (a 3. ábra ezt az esetet  $\delta_{11}$ -gyel jelöli), míg a legkisebb, ha a karbonil szénatom körüli elektronfelhőt demonstráló térbeli ellipszoid leghosszabb testátlója párhuzamos  $B_0$  irányával ( $\delta_{33}$ ). A harmadik kitüntetett eltolódásérték az, ahol a CSA jel maximuma van ( $\delta_{22}$ ), ami általában nem egyezik meg az izotróp kémiai eltolódással. Ez az érték többféle orientációban is előfordulhat, ezek közül a legnevezetesebb az, amikor az ellipszoid közepes hosszúságú, harmadik tengelye áll párhuzamosan  $B_0$ -lal.

### 3.3. Kvadrupol csatolás

Az  $1/2$ -nél nagyobb spinű atommagok – kvadrupolmagok – esetén az eddig tárgyalt kölcsönhatások





mellett fellép az ún. kvadrupól kölcsönhatás is, amelyet a mag elektromos kvadrupól momentuma (magi jellemző) és a mag körüli lokális elektromos térgradiens (molekuláris jellemző) kölcsönhatása hoz létre. A kvadrupól kölcsönhatás erőssége nagymértékben függ a molekuláris- és kristályszimmetriától, valamint a molekuláris mozgásoktól. A NaCl  $^{23}\text{Na}$  spektruma például a gömbszimmetrikus elektronfelhővel rendelkező lapon centrált köbös szimmetriájú kristályok miatt egyetlen éles  $^{23}\text{Na}$  jelet tartalmaz. A kvadrupól kölcsönhatás meggyorsítja a kvadrupól magok relaxációját, ami gyorsabb mérést, de egyben hamarabb lecsengő FID-et is eredményez. Ennek következtében a kvadrupól magok jelei akár MHz szélesek is lehetnek. A kölcsönhatás Hamilton-operátora [22] alapján a következő alakra hozható:

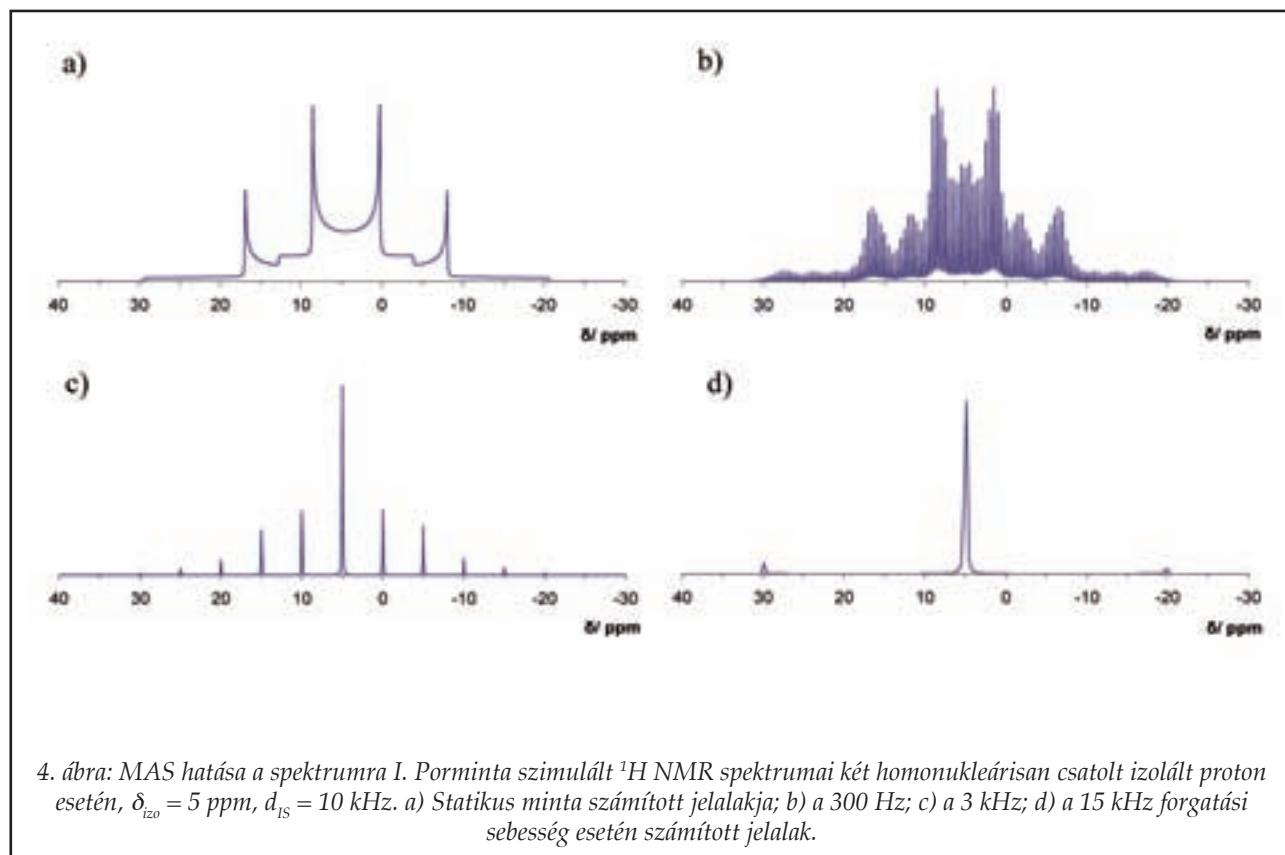
$$H_Q = \frac{3eQq}{4} (3\cos^2\theta - 1 - \eta_Q \sin^2\theta \cos 2\varphi) (3I_z^2 - I(I+1)) \quad (8)$$

ahol  $\theta$  és  $\varphi$  az Euler-szögek (ld. CSA-nál),  $\eta_Q$  a kölcsönhatás aszimmetria-paramétere;  $I_z$  a mag spinimpulzus-momentumának  $z$  irányú komponense és  $I$  a mag spinkvantumszáma. Az  $\omega_Q$  kvadrupól frekvenciát a következő képlettel definiáljuk ([19, 22] alapján):

$$\omega_Q = \frac{3\pi C_Q}{2I(2I-1)} = \frac{3e^2}{h} \frac{qQ}{2I(2I-1)} \quad (9)$$

ahol  $I$  a mag spinkvantumszáma,  $C_Q$  a kvadrupól csatolási állandó;  $\hbar$  a redukált Planck-állandó,  $e$  a proton töltése,  $q$  az elektromos tér gradiens nagyságát jellemző faktor és  $Q$  a kvadrupól momentum (a giromágneses hányadoshoz hasonlóan az adott atommagra jellemző mennyiség).

A kvadrupól csatolás irányfüggő, ugyanaz az anizotróp tag jelenik meg benne, mint a CSA esetében. Egyféle kémiai környezetben található deutérium



atommagot tartalmazó pormintában tehát az 1. ábrán bemutatott Pake-dublett-hoz hasonló jelet mérhetünk, ha  $\eta_Q = 0$ . Itt a két maximális intenzitású ág távolsága  $\omega_Q$ . Ugyanúgy,  $B_0$ -hoz képest a mágikus szögben a kölcsönhatás elsőrendű tagja zérus.  $\eta_Q > 0$  esetben még komplikáltabb jelet kapunk, illetve tovább bonyolíthatja a spektrumot a *másodrendű kvadrupól csatolás*, amelynek részleteire itt nem térünk ki.

#### 4. A szilárdfázisú NMR mérés technikai alapjai

A 3. pontban ismertetett kölcsönhatások anizotrópiája miatt komoly kihívást jelent nagyfelbontású ssNMR spektrumot felvenni szilárdfázisú mintákról. Az elmúlt évtizedek során rengeteg ötletes mérési módszert sikerült kifejleszteni, továbbá a műszertechnológiai fejlesztéseknek köszönhetően napjainkra az ssNMR már rutinszerűen kivitelezhető. Ebben a részben a nagyfelbontású szilárdfázisú NMR mérés technikai alapokat, a legfontosabb módszereket mutatjuk be röviden és megemlítünk néhány speciális kísérletet is.

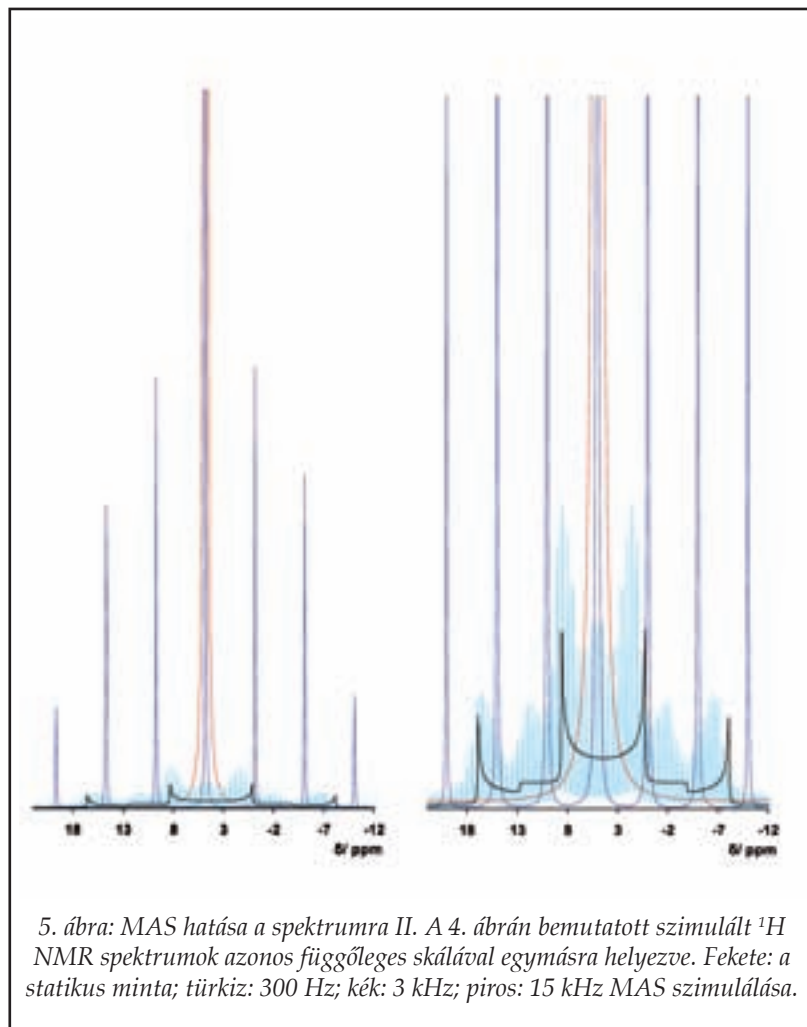
##### 4.1. Forgatás mágikus szög körül (MAS)

Az előzőekben tárgyalt NMR kölcsönhatásokat leíró Hamilton-operátorokban minden esetben elő-

fordul a  $(3\cos^2\theta - 1)$  tag. Ezzel arányos a dipoláris csatolás, a kémiai eltolódás anizotrópiája, és az elsőrendű kvadrupól kölcsönhatás is. Megállapítottuk azt is, hogy ha a  $\theta$  szög éppen  $57,74^\circ$ , az ún. *mágikus szög*, akkor a dipoláris csatolás értéke zérus, továbbá axiális szimmetria esetén a CSA is zérus.

Polikristályos minták gyors forgatásával elérhető, hogy az átlagos CSA olyan ellipszoidnak tűnik, amelynek egyik tengelye a forgatás tengelyével esik egybe. Amennyiben a forgatás tengelye a  $B_0$  külső mágneses térhez képest éppen  $57,74^\circ$ , úgy a CSA a mágikus szög körüli gyors forgatással kiátlagolható. Ez a technika az ún. *Magic Angle Spinning (MAS)*, amely az ötvenes évek végén került bevezetésre és forradalmasította a szilárdfázisú NMR spektroszkópiát [6]. A MAS technikával elméletileg minden elsőrendű NMR kölcsönhatás anizotrópiája megszüntethető, feltéve, hogy a forgatás sebessége nagyobb, mint az adott kölcsönhatás irányfüggésének mértéke (azaz a jel szélessége).

A MAS hatását a spektrumra a 4. és 5. ábrán szemléltetjük egy egymással dipolárisan csatolt  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  spinpár jelen. Kis forgatási sebességek esetén az álló mintának megfelelő jel, mint burkológörbe alatt ún. *forgási oldalsávok* jelennek meg a forgatási frekvencia egész számú többszöröseinél (4. ábra). A forgatási sebesség növelésével a forgási oldalsávok



száma csökken és az izotróp jel intenzitása fokozatosan nő. Az 5. ábrán megfigyelhető, hogy statikus minta esetén az összes jelintenzitás széles tartományra terül szét, míg MAS esetén a forgatási sebességet növelve az intenzitás egyre inkább az izotróp eltolódásnak megfelelő csúcsba összpontosul. Az izotróp kémiai eltolódáshoz tartozó jel könnyen megkülönböztethető a forgási oldalsávoktól, mivel eltérő forgatási sebességnél felvett spektrumokban a forgási oldalsávok helye megváltozik, az izotróp eltolódású csúcsé viszont nem.

A MAS kiválóan alkalmazható a kémiai eltolódás anizotrópiájának megszüntetésére, az általában erősebb dipoláris ill. kvadrupol csatolásoknál azonban hatékonysága az adott kölcsönhatás erőségétől függ. Ennek elsősorban mérés technikai okai vannak: a mai mérőfejekkel elérhető maximális forgatási sebesség 70–100 kHz, aminek a mérőrotor anyagának mechanikai szilárdsága szab határt. Ez a forgatási sebesség az egykötéses  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  dipoláris csatolást (kb. 30 kHz) képes hatékonyan kiátlagolni. Ezzel szemben az  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$

dipoláris csatolást, ami több, mint száz kHz széles jeleket eredményez, ekkora sebességű MAS nem tud megfelelően átlagolni. Protonspektrumokban ultragyors MAS-sal is legfeljebb a jelszélesség csökkenthető, nagyfelbontású protonspektrum felvétele általában nem lehetséges. Mindazonáltal a gyors forgással kombinált mérési módszerek nagyon dinamikusan fejlődnek.

A MAS technikából kiindulva a nyolcvanas évek végén kifejlesztették az ún. DOR (*double rotation*) [23–25] illetve DAS (*dynamic angle spinning*) [26] technikákat, amelyek segítségével a rotor a mérőfejen egy időben vagy szekvenciálisan több tengely körül is forgatható. Így a másodrendű kvadrupól csatolás is kiátlagolható, amire a hagyományos MAS nem képes. Ezek a mérési módszerek a speciális mérőfejek miatt nem terjedtek el széles körben.

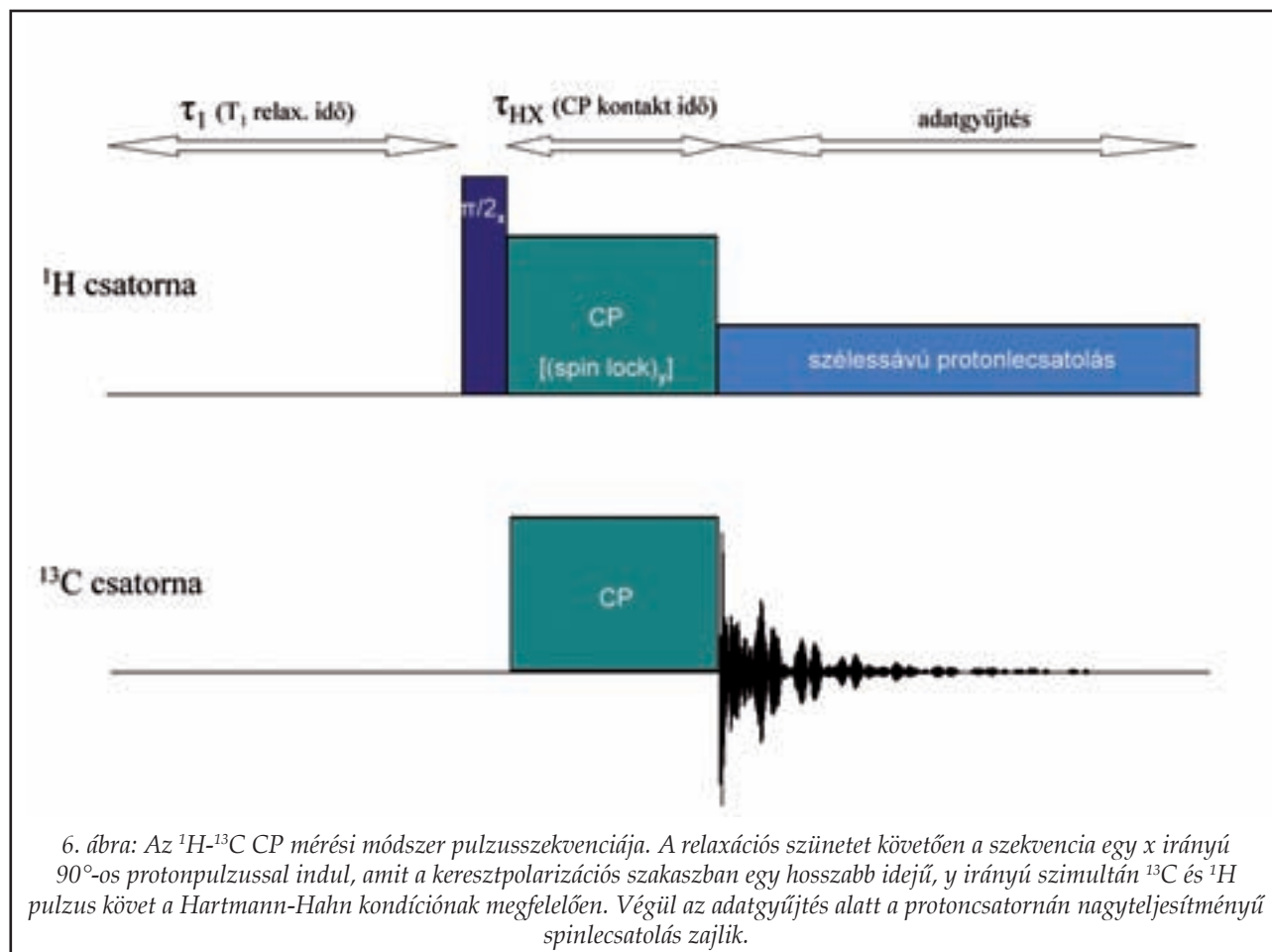
#### 4.2. Szélessávú protonlecsatolás

Az előző részben leírtak alapján a MAS csak nagy (> 30 kHz) forgatási sebességnél képes az  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  dipoláris csatolások megszüntetésére. A

protonoktól származó heteronukleáris dipoláris csatolás jelszélesítő hatása viszont hatékonyan megszüntethető szélessávú, nagyteljesítményű (kW) protonlecsatolással. Ez a hatás legegyszerűbben CW (folytonos hullámú) gerjesztéssel [27] érhető el, de bonyolultabb pulzussorozatok alkalmazásával (TPPM [28], SPINAL [29]) még jobb felbontású spektrumot kapunk [19, 30, 31]. Protonlecsatolással a dipoláris mellett a skaláris  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  csatolások is megszűnnek, hasonlóan folyadékfázishoz. A lecsatolás nem érinti a CSA-t és az egyéb magokkal (pl.  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) fellépő csatolásokat, így ezek továbbra is kiszélesítik vagy felhasítják a jeleket a spektrumban. Nagyteljesítményű protonlecsatolás és MAS együttes alkalmazásával nagyfelbontású spektrumot kapunk.

#### 4.3. Keresztpolarizáció (CP)

Nagyfelbontású  $^1\text{H}$  NMR spektrumok direkt felvétele szilárdfázisban jelentős nehézségekbe ütközik, ezért szerves minták ssNMR mérésénél leg-



gyakrabban  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$  magokat detektálunk. Azonban a  $^{13}\text{C}$  és  $^{15}\text{N}$  magok detektálását megnehezíti ezen magok kis természetes előfordulása és giromágneses hányadosa, ezért kisebb abszolút érzékenysége.

A szilárdfázisú NMR spektroszkópiában a jelintenzitás növelésének legfontosabb módja az ún. *keresztpolarizáció*, CP (cross polarization). A CP kísérlet azon alapul, hogy a nagyobb mágnesezettségű „gyakori” (nagyobb természetes előfordulású) magot – általában a protonokat – gerjesztjük (polarizáljuk), majd a polarizációt a mérni kívánt „ritka” magra visszük át, a két mag közötti dipoláris csatolásokon keresztül. Heteronukleáris dipoláris csatolásnál az ún. *flip-flop átmenetek* a két mag közötti jelentős energiakülönbség miatt ritkán valósulnak meg spontán, ezért a polarizáció átvitelét rádiófrekvenciás terek alkalmazásával tesszük lehetővé. Az  $I$  („gyakori” mag, pl.  $^1\text{H}$ ) és  $S$  („ritka” mag, pl.  $^{13}\text{C}$ ) spinek közötti polarizáció átvitel megteremtésére a legalkalmasabb a Hartmann és Hahn által 1962-ben publikált módszer [32]. Ennek során a rendszert az  $I$  és  $S$  magnak megfelelő rezonanciafrekvencián, megfelelő

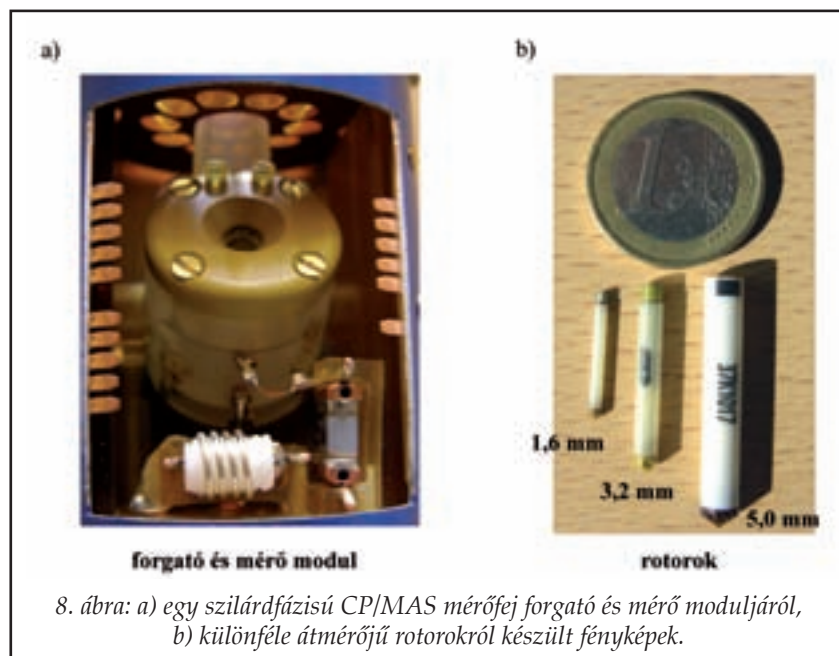
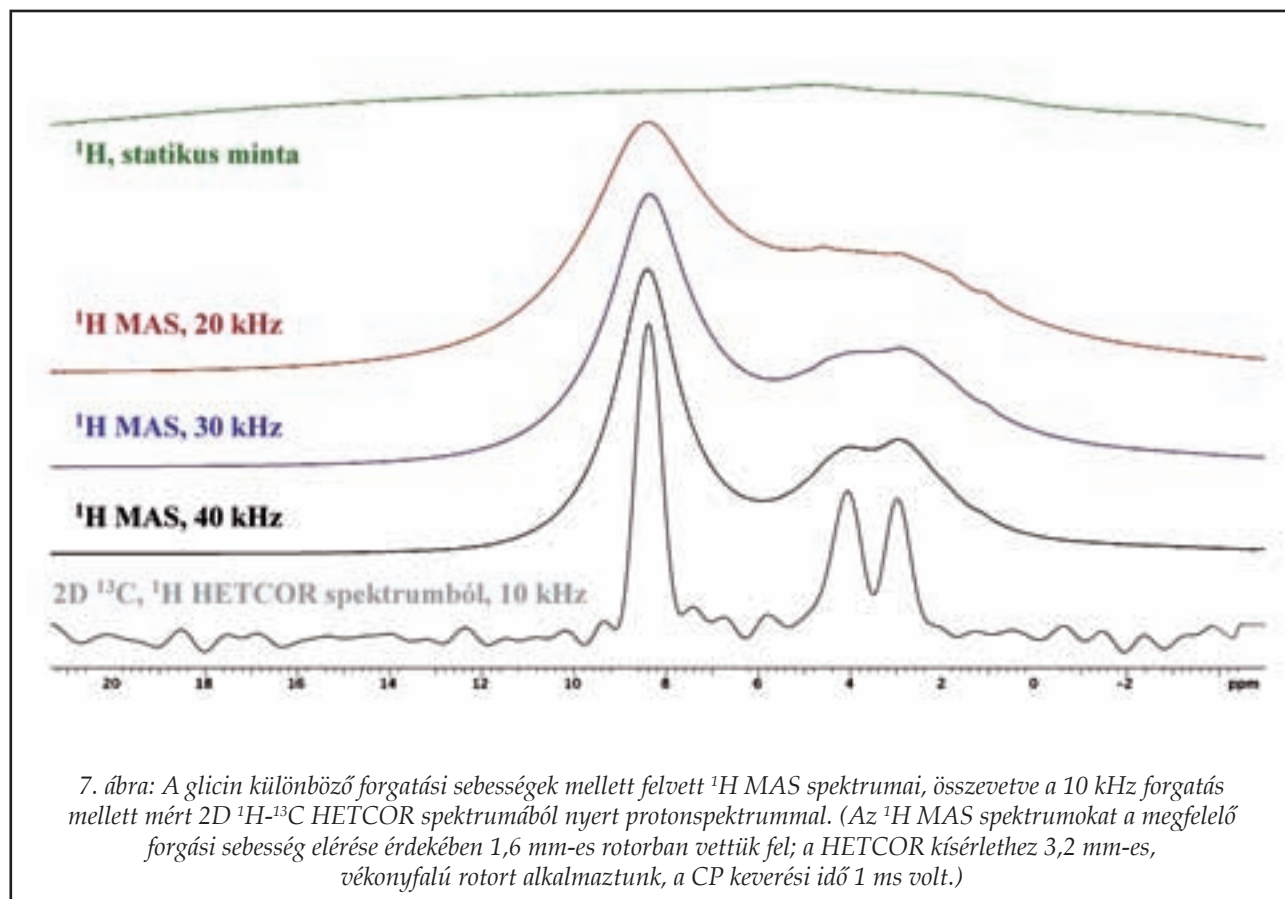
amplitúdójú rádiófrekvenciás térrel szimultán besugározzuk. Ennek hatására megindul egy precesszió a  $B_1$  rádiófrekvenciás tér által meghatározott tengely körül mind az  $I$ , mind az  $S$  magok esetén, aminek a frekvenciáját az alkalmazott  $B_1$  tér amplitúdója határozza meg. A polarizáció átvitel akkor a leghatékonyabb, ha a két mag mágnesezettségének  $B_1$  körüli forgási frekvenciája azonos, azaz teljesül az ún. *Hartmann-Hahn feltétel* [33]:

$$\gamma_I B_{1I} = \gamma_S B_{1S} \quad (10)$$

ahol  $\gamma_I$  az  $I$ ,  $\gamma_S$  az  $S$  mag giromágneses hányadosa, míg  $B_{1I}$  és  $B_{1S}$  a két csatornán alkalmazott rádiófrekvenciás tér amplitúdója. Amennyiben a mintát eközben MAS technikával forgatjuk (CP/MAS kísérlet), a keresztpolarizáció optimuma a forgási sebességtől is függ az alábbiak szerint:

$$\gamma_I B_{1I} - \gamma_S B_{1S} = n\omega_r \quad (11)$$

ahol  $\omega_r$  a MAS forgási sebesség,  $n = 1, 2$ .



(*spin-lock*) [34]. Ezzel együtt a „ritka” S magot is folyamatosan besugározzuk a Hartmann-Hahn feltételnek megfelelő amplitúdójú RF térrel. Végül az S spineket detektáljuk, mialatt az I spinekre szélessávú protonlecsatolást alkalmazunk. A keresztpolarizációs fázisban a keverési idő (*mixing time*) vagy más néven *kontakt idő* (*contact time*) alatt az I és S spinek között megtörténik a mágnesszettség cseréje. Az S mag jelének intenzitása az idővel eleinte nő, majd a relaxáció miatt csökken.

Keresztpolarizáció csak egymással dipolárisan csatolt magok között jöhet létre. Azt, hogy egy adott S magra a keverési idő alatt mekkora mágnesszettség kerül át,

A CP kísérlet pulzusszekvenciáját a 6. ábra mutatja. Először az I magnak megfelelő (proton) csatornán  $x$  irányban kiadott  $90^\circ$ -os pulzus az  $^1\text{H}$  mágnesszettséget a  $B_0$ -nak megfelelő  $z$  irányból az  $xy$  síkba viszi. Ezután a mágnesszettséget egy rá merőleges  $y$  irányú pulzussal egy helyben tartjuk

nagymértékben befolyásolja a heteronukleáris dipoláris csatolási állandó nagysága, amely erősen távolságfüggő. Tehát egy kvaterner szénatomon, mely a protonoktól relatíve távol helyezkedik el, ugyanazon mágnesszettség kiépülése jóval hosszabb időt igényel, mint egy protonhoz közvetle-

nül kapcsolódón. Az elméletileg elérhető maximális érzékenység-növekedést az *I* és *S* mag giromágneses állandójának hányadosa szabja meg ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  esetében négyszeres növekedés).

A CP gerjesztés nem kvantitatív, mert adott keverési idő alatt különböző mértékű mágnesezettség-átvitel történik az egyes magokra. Óriási előnye viszont a CP kísérletnek, hogy az akvizíciók előtt elegendő az *I* mag  $T_1$  relaxációs idejét kivárni, amelyről a mágnesezettség átvitele történt, és ez általában jóval rövidebb, mint az *S* magé [17].

A különböző rendű szénatomok relaxációjában jelentkező különbségek kihasználásával lehetőség van a kvaterner szénatomok egyszerű megkülönböztetésére. A CP/MAS mérés adatgyűjtése alatt, adott ideig megszakítva a protonlecsatolást (CP/MAS with *interrupted decoupling*) [35], a protonokkal közvetlenül csatoló  $^{13}\text{C}$  magok jelei eltűnnek a spektrumból a közvetlen dipoláris csatolás miatti fázisvesztés (*dipolar dephasing*) következtében. A kísérlet gyógyszerészeti alkalmazására több példa is található a szakirodalomban [36, 37]. A szilárdfázisú  $^{13}\text{C}$  spektroszkópiában a megszakított protonlecsatolás mellett alkalmazzák még többek között a CPPI (*cross-polarization polarization-inversion*) [38, 39] SPE (*single pulse excitation*) és APT (*attached proton test*) technikákat, amelyek mind hasonló, ún. *editált spektrumokat* eredményeznek és segítenek a különböző rendű szénatomok elkülönítésében.

#### 4.4. $^1\text{H}$ NMR lehetőségei szilárd fázisban

Az eddig tárgyalt mérési módszerek nem alkalmasak nagyfelbontású  $^1\text{H}$  NMR felvételek készítésére. Még a legmodernebb ultragyors MAS technológiákkal sem átlagolható ki a homonukleáris dipoláris csatolás, általában nem érhető el érdemben használható proton felbontás [19, 40].

Speciális pulzusszekvenciákkal megoldható bizonyos mértékű homonukleáris dipoláris lecsatolás is. Ilyen például a WAHUA [41] és a hasonló szekvenciákból álló, de robosztusabb lecsatoló szuperciklusok, mint az MREV-8 [42, 43] a BR-24 [44] vagy a CORY-24 [45], valamint a *Lee-Goldburg lecsatolás* és variánsai (pl. *FSLG*, *frequency-shifted Lee-Goldburg*) [46-49]. Különösen kis féltérték-szélesség érhető el az ún. *CT CRAMPS* (*constant time combined rotation and multipulse spectroscopy*) protonspektrumokban [50].

A 7. ábra a glicin különböző forgatási sebességénél felvett  $^1\text{H}$  MAS spektrumait mutatja, összevetve az anyag 10 kHz forgatás mellett megmért két-

dimenziós  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HETCOR spektrumából nyerhető proton spektrummal. Még 40 kHz forgatási sebesség mellett sem lehetett olyan felbontást elérni, mint a HETCOR spektrum esetében, aminél FSLG proton lecsatolást alkalmaztunk.

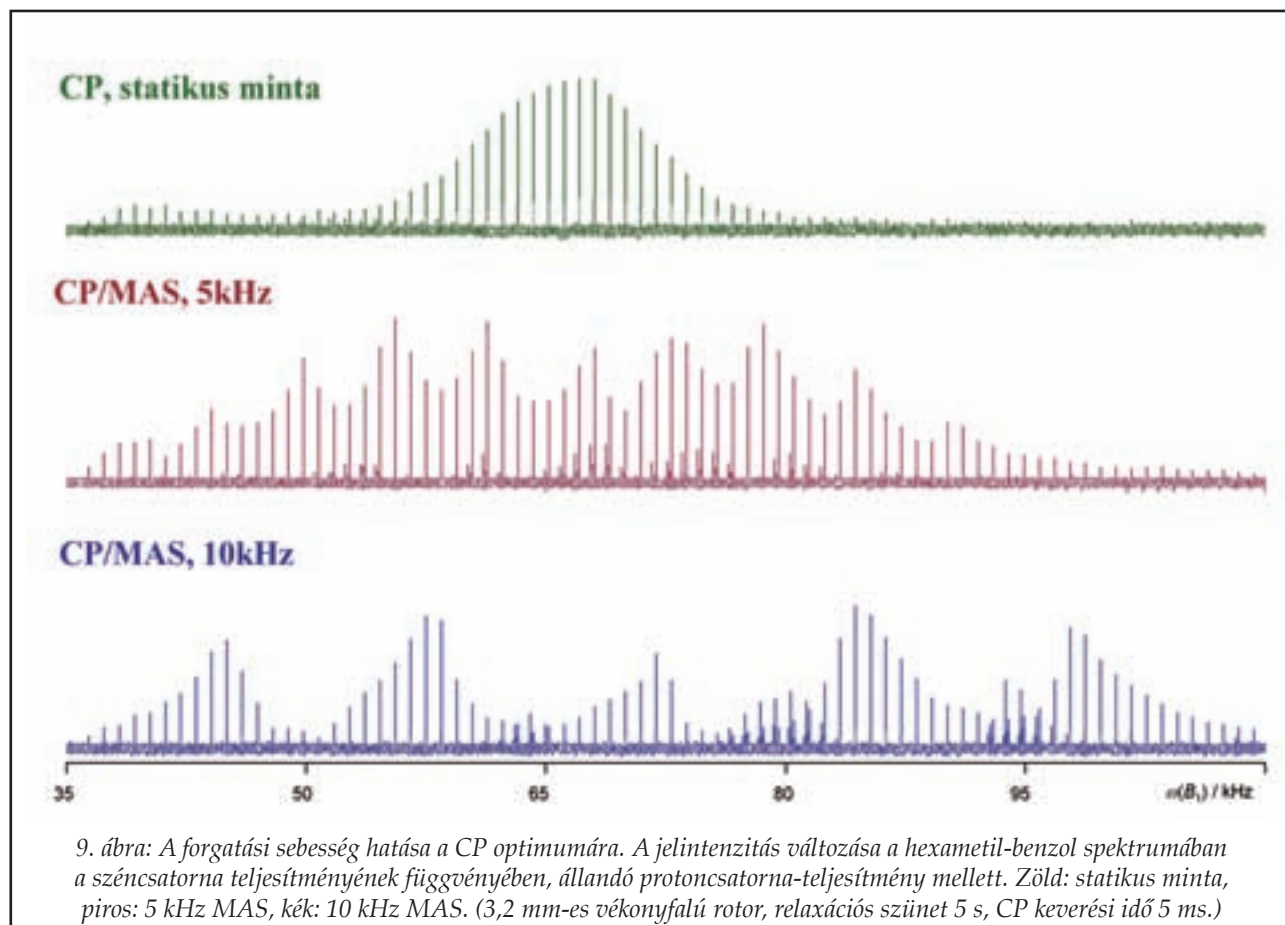
További alternatív módszert jelentenek az  $^1\text{H}$  magok mérésére a kétdimenziós SQ-DQ MAS (*single quantum-double quantum MAS*) kísérletek [19, 51]. Ezek a kísérletek a dipoláris csatolást kihasználva ún. *kettőskvantum koherenciát* létesítenek, amelyeket utána detektálható *egykvantum koherenciává* alakítanak. A heteronukleáris 2D HETCOR kísérlettől eltérően ezek homonukleáris 2D mérések, a spektrumokban a proton-proton korrelációk adnak keresztcsúcsokat, amelyek az egyes protonok térbeli közelségét mutatják. A kísérlettel az egyes protonok pontos távolsága is meghatározható. A módszert többek között gyógyszerészeti problémák megoldására is sikerrel alkalmazzák [52].

#### 5. A szilárdfázisú NMR mérések gyakorlata

Porminták vizsgálatához a kellően elporított anyagot megfelelő felszereléssel a speciális mintatartóba (*rotor*) juttatjuk. A rotor teste általában kerámia anyagból (pl.  $\text{ZrO}_2$ ) készül, átmérője a kb. 14 mm-től az egészen apró, 1–1,5 milliméterig terjedhet. A rotor átmérőjének csökkenésével a megengedhető maximális forgatási frekvencia nő (14 mm – 4,5 kHz; 1,2 mm – 60 kHz), ami az anizotróp hatások kiátlagolását segíti, azonban a rotorba tölthető kevesebb anyagmennyiség az érzékenység csökkenését eredményezi. A rotor testét speciális műanyag (pl. Kelf) kupakok zárják, melyek egyike a forgatáshoz szükséges propeller formájú kiképezést kap. A rotornak bírnia kell a nagysebességű forgatás következtében fellépő erőket és stabil forgási frekvenciát kell biztosítania. Ehhez elengedhetetlen a rotor homogén megtöltése. A 8. ábrán egy szilárdfázisú mérésekre alkalmas CP/MAS mérőfej forgató és mérő egységének, valamint háromféle átmérőjű rotornak a képe látható (mind-egyiket más mérőfejhez lehet használni).

A mintaváltás a készülék típusától függően sűrített levegő segítségével felülről, vagy a mágnes alatt történik. A rotor forgatását levegő vagy  $\text{N}_2$  hajtógáz biztosítja, amely részben a rotor körüli légpárnát biztosítja, részben megforgatja a rotort.

A jó méréshez rendkívül fontos a mágikus szög pontos beállítása, amelyhez KBr-dal töltött rotort használunk. A  $^{79}\text{Br}$  spektrumban látható forgási oldalsávok számát és intenzitását kell maximalizál-



nunk a mintatartó külső mágneses térhez viszonyított szögének apró módosításaival, általában 3–5 kHz forgási sebesség mellett.

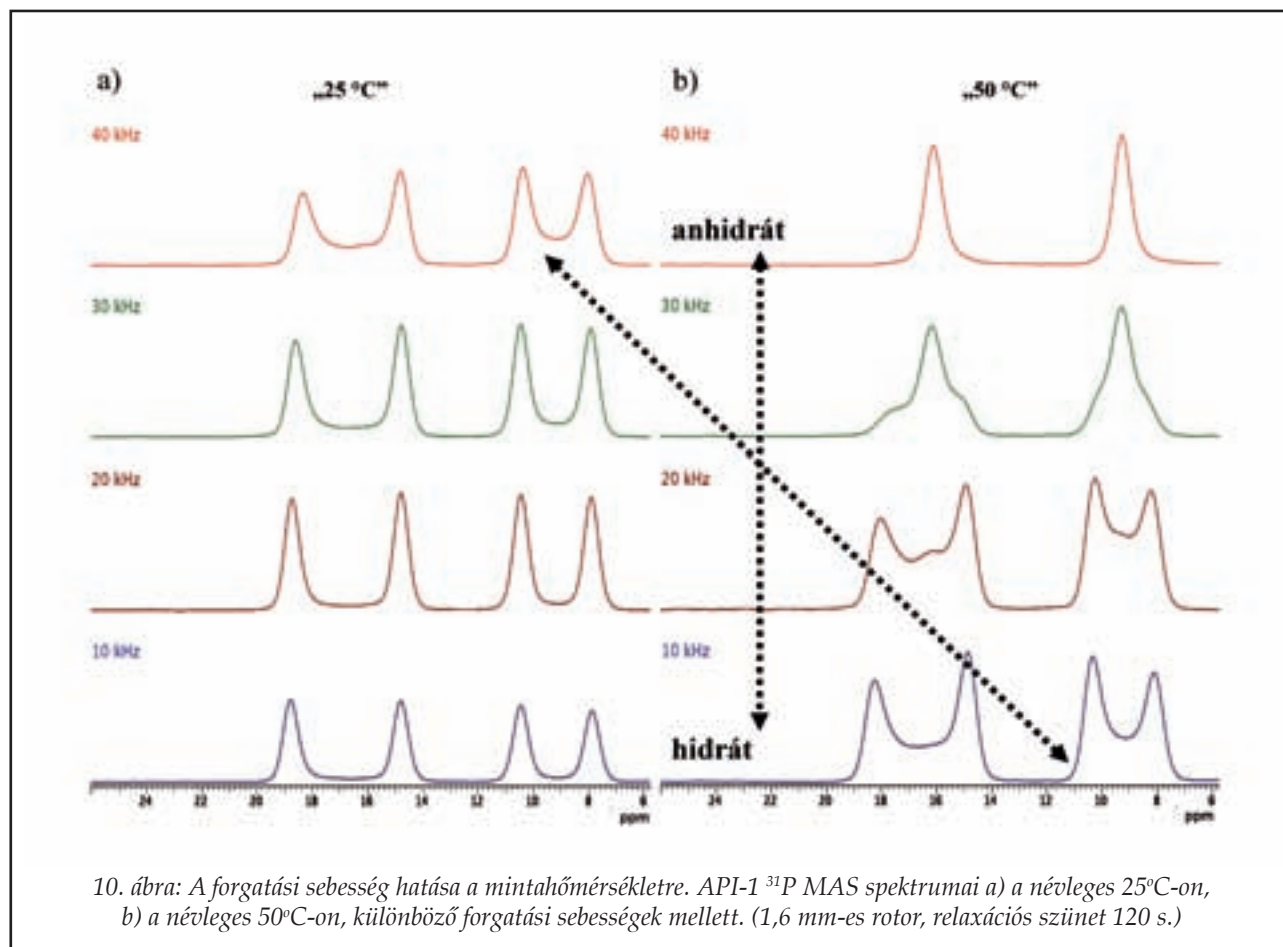
Az  $^1\text{H}$  és a  $^{13}\text{C}$  90°-os pulzushosszt általában adamantánon szokás kalibrálni. Az adamantán gömbszerű molekulákból áll, amelyek között gyenge kölcsönhatások hatnak, így ezek a kristályban a rácspontokban szabadon forognak. Emiatt az adamantán viszonylag keskeny jelet ad, amely már 5 kHz-es forgatásnál is kellő felbontással mérhető. Szintén az adamantánt használjuk másodlagos (külső)  $^{13}\text{C}$  referenciáként (a 29,46 ppm eltolódású metin vagy a 38,5 ppm eltolódású metilén jelét). Szakirodalmi adatok szerint az adamantánra  $\pm 0,03$  ppm pontossággal lehet referenciázni [53].  $^{13}\text{C}$  esetében az  $\alpha$ -glicin karbonil jelét (176,5 ppm, [34, 54]) is szokás referenciának használni.

A CP kalibrálásához a proton- és a széncsatorna amplitudóját kell beállítani a Hartmann-Hahn feltétel teljesüléséhez [33] az adott forgási frekvenciának megfelelően (ld. 11. egyenlet). Ezt többnyire glicin vagy hexametil-benzol spektrum jelintenzitásának optimalizálásával tesszük meg. Általában a széncsatorna teljesítményét optimaljuk, adott

erősségű protonpulzushoz. A CP optimumát befolyásolja a minta forgatásának sebessége is, ez jól megfigyelhető a 9. ábrán, amely állandó proton teljesítmény (62,5 kHz) és különböző széncsatorna-teljesítmények mellett mért jelintenzitást mutatja három különböző forgatási sebesség mellett. A CP paraméterek optimalizálását követően az adatgyűjtés alatti nagyteljesítményű protonlecsatolás (jellemzően TPPM [28], vagy SPINAL [29]) kalibrálását végezzük el, leginkább az  $\alpha$ -glicin metilén jelére optimalva, a jelszélesség csökkentése céljából.

A mérési alapparaméterek optimalizálását követően, már a mintára specifikus paraméterek meghatározása következhet (CP keverési idő, relaxációs szünet), mely után mérhetjük a  $^{13}\text{C}$  CP/MAS spektrumot.

MAS alkalmazása során, a minta nagysebességű forgatásának hatására, annak hőmérséklete akár több tíz fokkal is emelkedhet. A forgatás hatását demonstrálja a minta hőmérsékletére a 10. ábra, ahol az látható, hogy 25 °C-os mérőfej-hőmérséklet esetén 40 kHz-es forgatásnál API-1 hatóanyagnak közel azonos spektrumához jutunk, mint a névleges 50 °C-on, 10 kHz forgatás mellett. „50 °C-on”, nagyobb forgatási sebességnél a valós



mintahőmérséklet még tovább emelkedik és polimorf átalakulás következik be. Ezért a különböző forgási sebességek esetén a rotorban uralkodó valós hőmérséklet meghatározása csak kalibráció útján lehetséges. A kalibrálásra legelterjedtebben az ólom-nitrát  $^{207}\text{Pb}$ -jelét használják [55]. Ennek a kémiai eltolódása a hőmérséklet változására igen érzékeny, ezért „belső hőmérőként” alkalmazható. Kémiai eltolódása mellett a jel intenzitása és alakja is jellegzetesen változik [56, 57].

## 6. A szilárdfázisú NMR gyógyszerészeti jelentősége

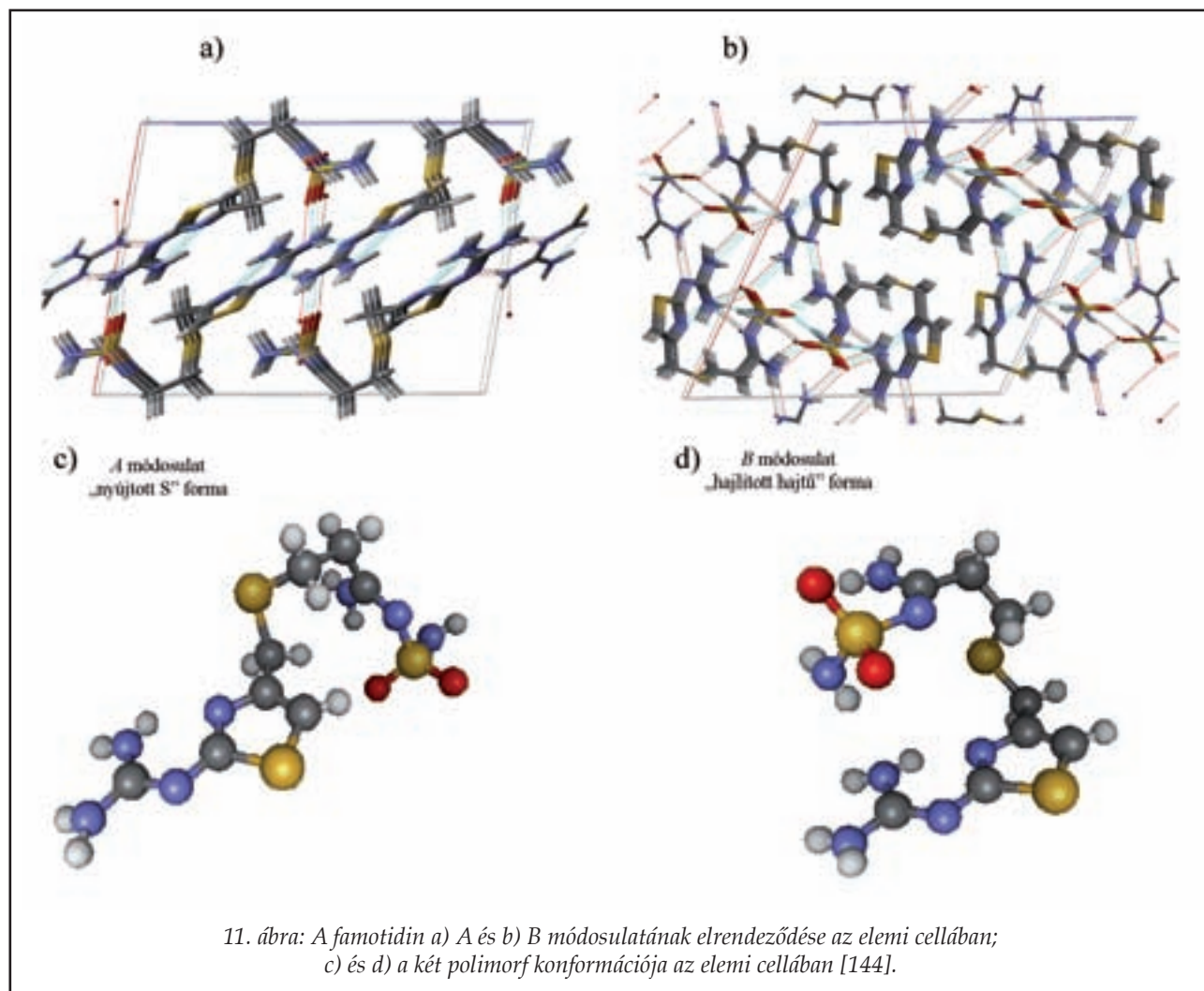
A gyógyszeripari kutatás-fejlesztési folyamatban az ssNMR számos ponton nyerhet alkalmazást, például szilárdfázisú szintézisek támogatásában [58–62], illetve membránrendszerek/liposzómák [63–68], membránfehérjék [69–73], anizotróp rendszerek, felületek [74], sejtek [75] és szövetek [76–78] vizsgálatában. A hatóanyagok és készítmények szilárdfázisú vizsgálatában azonban mind minőségbiztosítási, mind iparjogvédelmi szempontból kiemelkedő jelentőségű a polimorfia kérdése,

amely területen manapság az ssNMR gyógyszeripari térnyerése talán a legszembetűnőbb. Ez nem is véletlen, hiszen egyrészt megfelelő kísérletek alkalmazásával a folyadékfázisú NMR spektroszkópiához mérhető szerkezeti és dinamikai információhoz juthatunk, ugyanakkor a spektrum „ujjlenyomatként” is jellemzi az adott módosulatot. Azonban hangsúlyozni kívánjuk, hogy ez a terület mindenképpen különböző szilárdfázisú analitikai technikák komplex alkalmazását kívánja meg, melyek közül az ssNMR egy speciális, koránt sem rutin technikát képvisel.

### 6.1. Polimorfia és szerepe a gyógyszeriparban

A polimorfia a szilárd anyagok arra való képessége, hogy a körülményektől függően, különböző kristályos fázisokat alkossanak, eltérő kristályszerkezettel kristályosodjanak [79]. Kémiai elemek esetén (pl. grafit és gyémánt) a jelenséget *allotropiának* is nevezik [80, 81]. Molekularácsos vegyületek *polimorf* módosulatai alatt általánosságban azonos kémiai összetételű és szerkezeti képletű (azonos konstitúció és konfiguráció) vegyületek





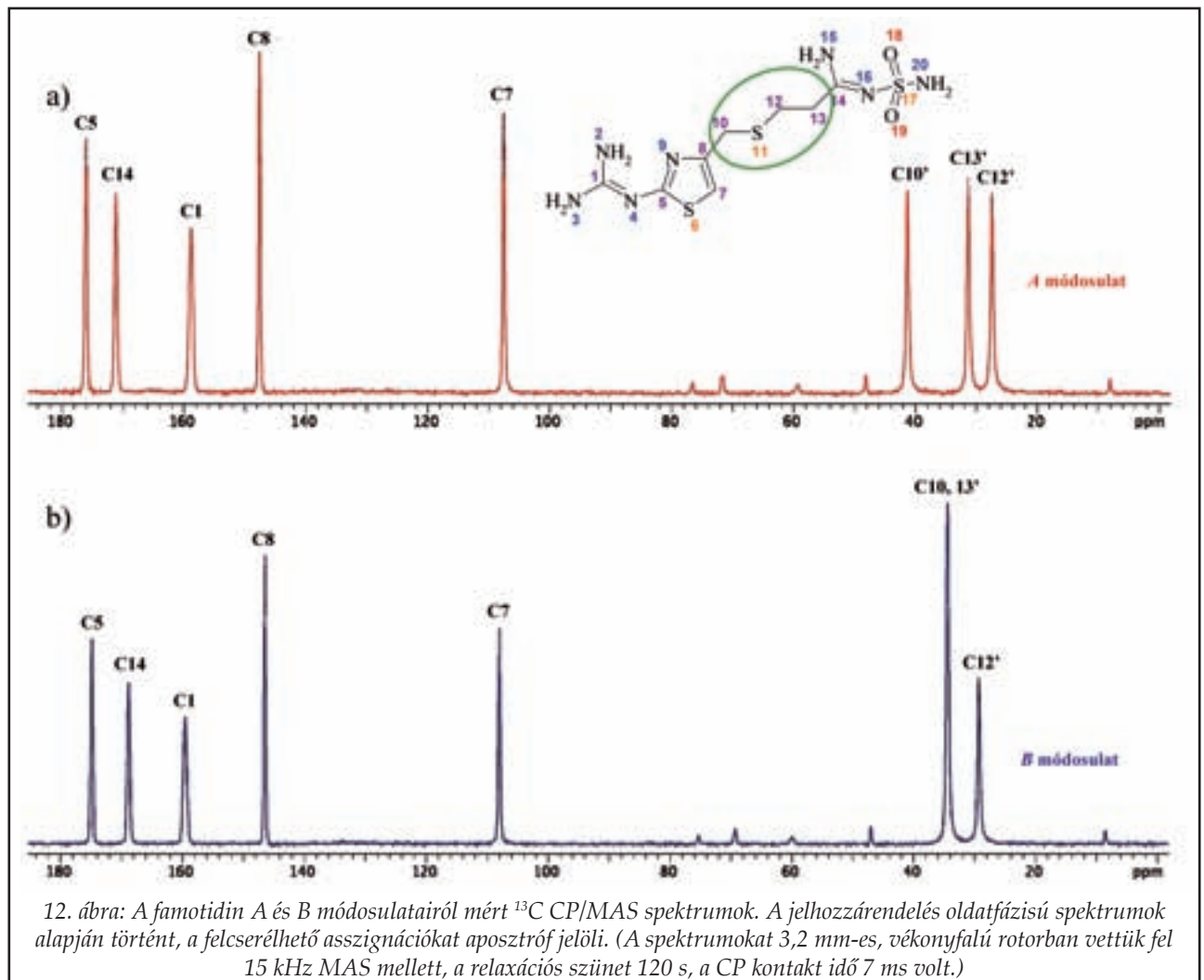
eltérő kristályszerkezetű formáit értjük. Egy vegyület különböző mennyiségű/minőségű oldószerrel együtt kristályosodó szolvát/hidrát formáit korábban *pseudopolimorf* formáknak is nevezték [82, 83], és az elnevezés még manapság is néha előfordul [84, 85]. A szakirodalomban azonban egyre inkább előtérbe kerül a *szolvatomorf* és *szolvatomorfia* elnevezések használata [86–88]. Egy adott szolvatomorf formának is lehetnek különféle polimorf módosulatai (pl. egy vegyületnek eltérő kristályszerkezetű monohidrát formái is létezhetnek).

A polimorf módosulatok különbözhetnek egyrészt a molekulák elemi cellában történő elhelyezkedésében, ilyenkor ún. *illeszkedési polimorfia*ról beszélünk, vagy a molekulák konformációjában – *konformációs polimorfia* [89, 90].

Egy adott hőmérsékleten (és nyomáson) termodinamikailag mindig csak egy polimorf módosulat lehet stabil, a többi forma metastabil állapotban van. Ha egy polimorf módosulat minden hőmér-

séketlen stabilabb egy másikonál (vagy mindegyikénél), *monotrópiáról* beszélünk. Ha viszont egy adott hőmérséklet alatt az egyik, a fölött a másik forma a stabilisabb, akkor a két módosulat *enantiotróp* viszonyban áll [91]. Ebben az esetben az ún. *átalakulási hőmérsékleten* a két módosulat reverzibilisen egymásba alakulhat. Monotróp esetben az instabil módosulat átalakulása irreverzibilis [92, 93]. Az átalakulás azonban lehet kinetikailag gátolt, így esetenként a metastabil formák is hosszú ideig eltarthatók, mint például a gyémánt, amely a grafittal monotrópia viszonyában áll, mégsem alakul át grafitná szokványos körülmények között.

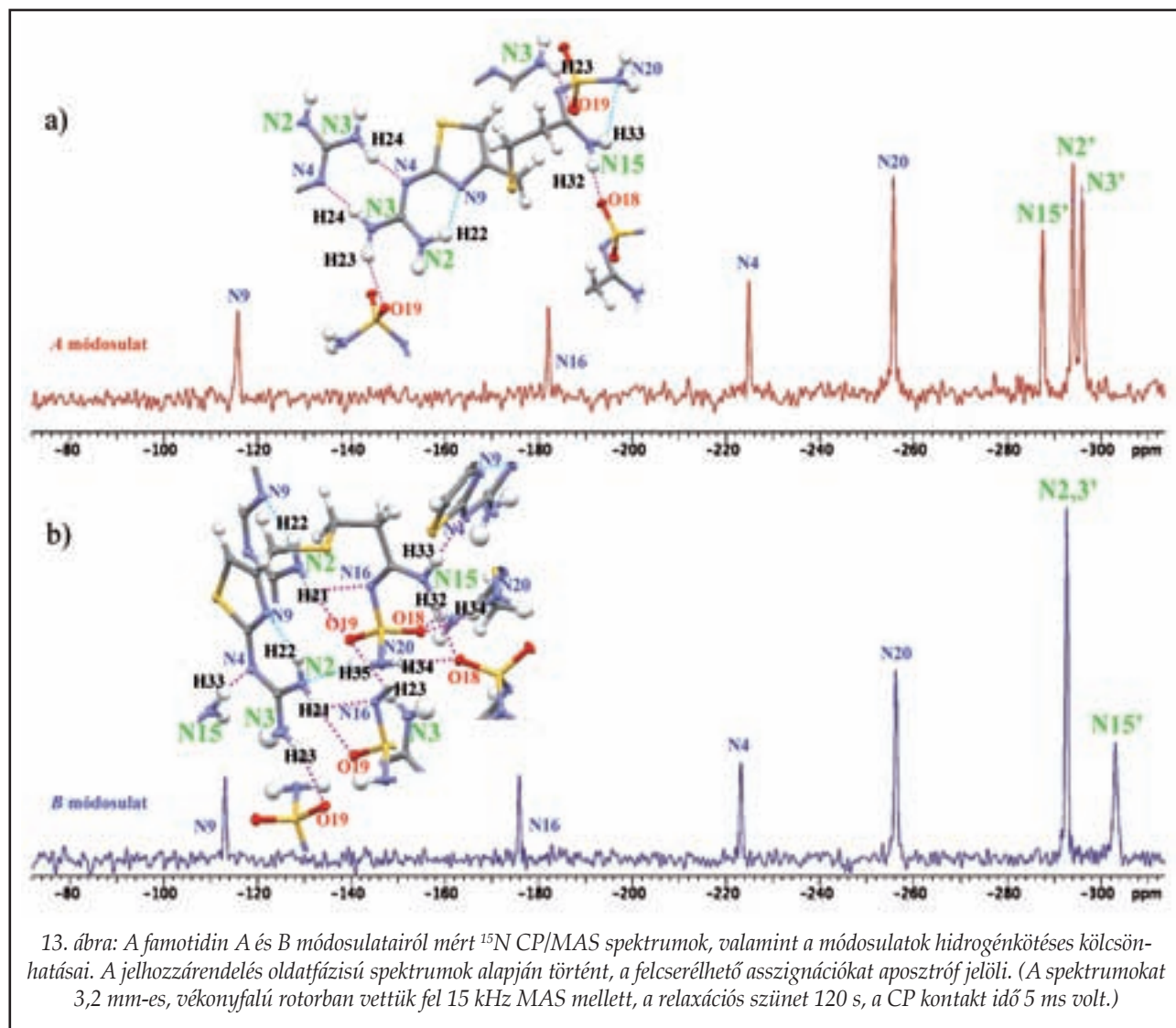
A polimorf módosulatok szinte minden fizikai-kémiai tulajdonsága eltérő, ezek közül a gyógyszeripar szempontjából a legkritikusabb az oldhatóság, aminek gyakran meghatározó szerepe van a hatóanyag felszívódásában [94, 95] és biológiai hozzáférhetőségében [96–98]. Hasonlóan fontos a polimorfia gyógyszer technológiai szem-



pontból is [99], a módosulatok sűrűségének és keménységének különbségei, a szemcsék habitusa és szemcseméret például nagymértékben befolyásolhatják a tablettázhatóságot. A gyógyszerkészítmények kioldódási sebességét is jelentősen befolyásolhatja a polimorfia [100]. Amennyiben a gyártás során a hatóanyag kristályosításakor nem megfelelően szabályozottak a körülmények, előfordulhat, hogy nem a megfelelő (törzskönyvezett) polimorf forma, esetleg eltérő habitusú, szemcseméretű anyag fog kikristályosodni. Előfordulhat polimorf átalakulás a formulálás során is, de még kellemetlenebb lehet, ha ez a tárolás során zajlik le. Mindezek alapján egyértelmű, hogy a jelenségnek gyógyszeripari szempontból megfelelő minőségügyi kontrollja szükséges, mely korszerű szilárdfázisú analitikai hátteret követel meg.

A polimorfia gyógyszeripari jelentőségének másik rendkívül fontos aspektusát az adja, hogy a polimorf módosulatok fent részletezett jellemzői-

nek eltérései, különböző szempontok szerint vett előnyös tulajdonságaik alapján termékszabadalommal védhetőek. Mindez a polimorfia területén jelentkező kiélezett iparági versenyhelyzetet eredményezte. A különböző vegyületek új módosulatainak előállítása és termékszabaddalmi védelme lehetőséget teremthet más szabadalmak megkerülésére, így a generikus gyártók az originátor forgalmazott módosulatótól független, új készítménnyel léphetnek piacra, mint például a Richter Gedeon NyRt. a famotidin esetében [101]. A másik oldalról az originális gyártóknak éppen azért ajánlatos a lehető legtöbb módosulatót előállítani és terméktartalmát megszerezni, hogy ezt megakadályozzák, továbbá hogy termékük életciklusát ezen keresztül is meghosszabbítsák. Az egyre szaporodó bitorlási perekben a konkurens gyártók a legkorszerűbb analitikai technikák sorát vetik be, köztük a készítmények analízisében rendkívül hatékony szilárdfázisú NMR spektroszkópiát is.



Mindezek alapján belátható, hogy gyógyszerellenőrzés során a polimorfia illetve a polimorf átalakulások minél körültekintőbb vizsgálata szükséges minőségügyi és iparjogvédelmi szempontok mentén. A polimorfia minőségügyi kontrolljára vonatkozóan a kezdeti ajánlásoknak megfelelően [102] az utóbbi években több irányelv és döntési szempont került bevezetésre [103, 104]. Számos egyéb módszer mellett a szilárdfázisú NMR spektroszkópia kitűnő lehetőséget jelent a polimorf módosulatok vizsgálatára, a következőkben erre mutatunk be néhány példát.

#### 6.2. Szilárdfázisú NMR spektroszkópia alkalmazása hatóanyagok és formulált készítmények polimorfia vizsgálatában

Szerves anyagok különböző polimorf módosulatai, szolvátjai, és amorf formája szilárdfázisú

NMR spektroszkópiával, egyszerű  $^{13}\text{C}$  CP/MAS kísérlettel általában kitűnően azonosíthatóak és megkülönböztethetők egymástól. Az egyes szénatomok jelei is általában hozzárendelhetők (pl. ismert oldatfázisú asszignációkból kiindulva, valamint speciális ssNMR mérések segítségével), amely a szerkezeti információk értelmezésének kiindulópontja.

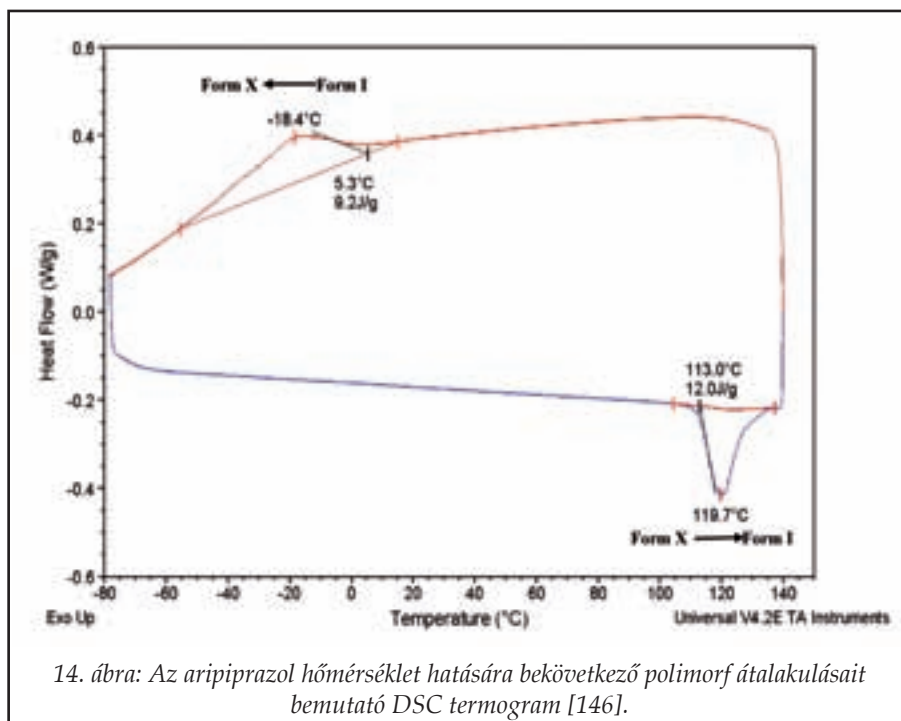
Az ssNMR formulált készítmények vizsgálatára is kiválóan alkalmas. Porok, granulátumok, pelleték [105, 106], porított tabletták, de akár megfelelő méretben előállított tabletták egészben történő mérése is megoldható [107]; továbbá kenőcsök, kenőcs- és kúpalapanyagok [108–110], gélek [111–115] is vizsgálhatóak. Mindez lehetőséget ad a formulálás [116] és a tárolás [117] során bekövetkező esetleges polimorf átalakulások, hatóanyag – segédanyag [118–134] és segédanyag – segédanyag interakciók [135–139], kompatibilitás vizsgálatára.

A hatóanyag amorf formában történő előállítására egyre nagyobb jelentőséggel bír, főleg rosszul oldódó hatóanyagok esetében [140], ezért az amorf formák jellemzése és készítményben való vizsgálata is növekvő hangsúlyt kap. Az amorf, vagy kevésbé kristályos módosulatok jellemzően nem vizsgálhatók XRPD technikával. Egy készítményben történő jellemzés szempontjából a Raman spektroszkópia mellett az ssNMR tűnik a leghatékonyabb módszernek.

Az ssNMR egyik előnye, hogy számos, a gyógyszerhatóanyagok analízise szempontjából fontos, NMR aktív atommag ( $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{35}\text{Cl}$  stb.) mérhető, mely nyilvánvalóan a módszer szelektivitása, a szerkezeti aspektusok vizsgálata szempontjából előnyös. A különféle segédanyagok általában a hatóanyaghoz képest sokszoros mennyiségben találhatók meg a készítményekben, ezért pl.  $^{13}\text{C}$  spektrumokban bizonyos spektrális tartományokban elfedhetik az hatóanyag csúcsait. A hatóanyagban megtalálható, de a segédanyagokból hiányzó atommagok szelektív detektálásával megszabadulhatunk utóbbiak zavaró jeleitől. Ilyen esetekben tehát maga a detektált mag biztosítja a hatóanyag szelektív vizsgálatát a formulált készítményben. Azonban általánosságban kijelenthető, hogy még  $^{13}\text{C}$  detektálás esetén is a  $^{13}\text{C}$  ssNMR spektrumban, a segédanyagok jelei általában egy szűk spektrális tartományra korlátozódnak (leggyakrabban 60–110 ppm, pl. laktóz), így a hatóanyagok jelei az alifás, aromás, és karbonil tartományban jól detektálhatók.

### 6.3. Kvantitatív analitikai alkalmazások

Az oldatfázisú NMR közismerten kiválóan alkalmas kvantitatív vizsgálatokra is, mivel a jelintenzitás, megfelelő mérési paraméterek mellett, arányos a gerjesztett magok számával. A szilárdfázisú NMR spektroszkópia esetében szintén van erre lehetőség, elsődlegesen közvetlen egypulzusos detektálással nyert spektrumok felvételével, jellemzően nagy érzékenységgel magok (pl.  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) esetében. Mindez azonban sokkal nehezebb fel-



14. ábra: Az aripiprazol hőmérséklet hatására bekövetkező polimorf átalakulásait bemutató DSC termogram [146].

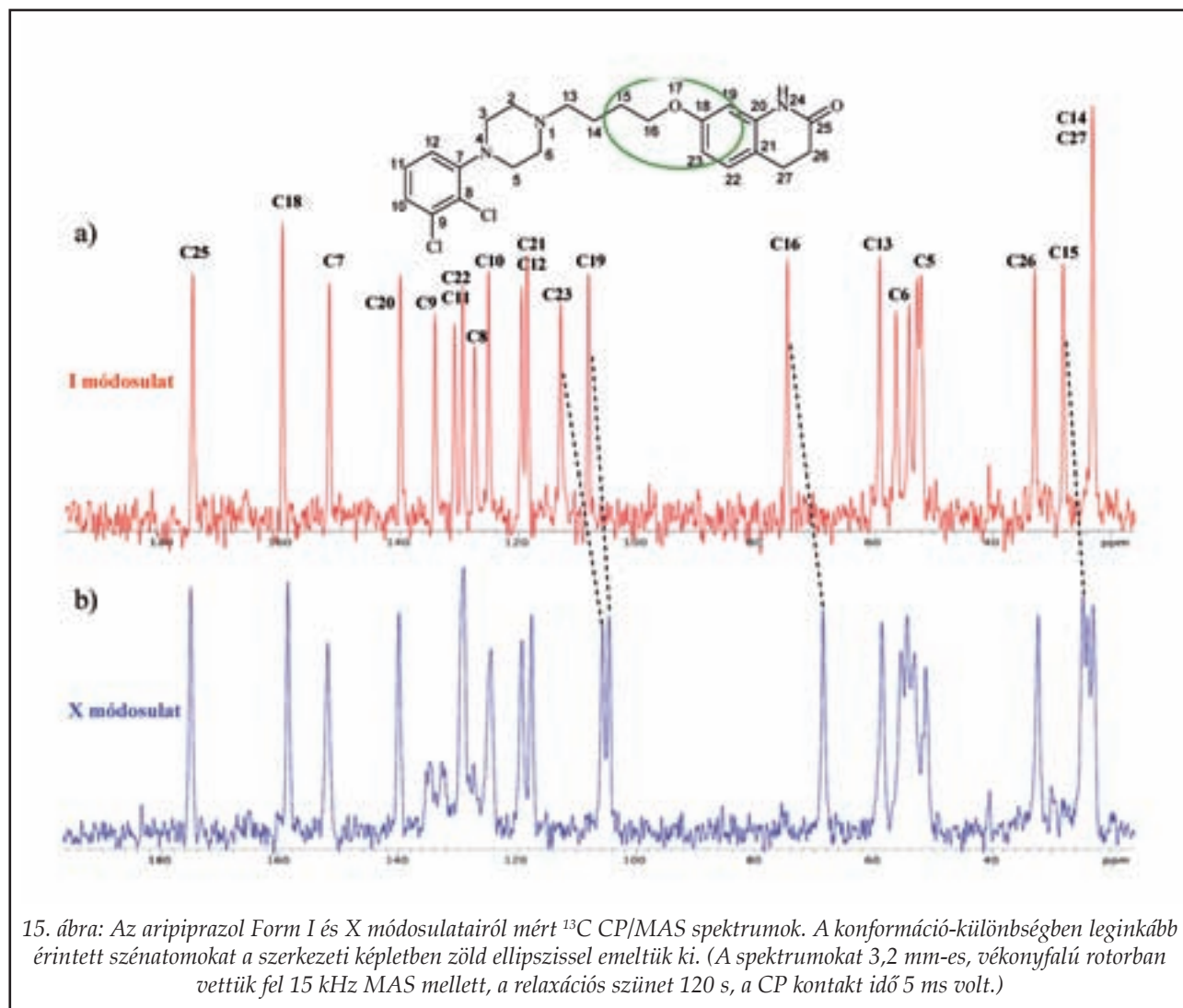
adat az egyébként leggyakrabban alkalmazott  $^{13}\text{C}$  CP/MAS kísérletnél, mivel itt a jelintenzitás nem arányos a koncentrációval. Ennek elsődleges oka, hogy a CP felépülése különbözik az egyes szénmagokon. Ezért CP/MAS módszerrel mennyiségi meghatározás csak kalibráció után végezhető.

Intenzitási referenciára a szakirodalomban több módszert is leírtak, lehetséges belső, illetve külső standardok alkalmazása. Belső standard lehet a készítményben szereplő valamelyik segédanyag egyik jele, például a magnézium-sztearát 34,2 ppm-es metilénjele [107]. Külső standard esetén kalibrációs sort kell készíteni a vizsgált anyag mintájával [142]. Lehetséges mesterségesen generált jel (az ún. *ERETIC* pulzus) alkalmazása, ez egyszerre tekinthető belső és külső referenciának, és számos előnye van [57, 141, 142], főleg az abszolút mennyiségi vizsgálatokban. A megfelelő pontossághoz szükséges lehet a rotorban levő anyagmennyiség kalibrálása és azt is figyelembe kell venni, hogy a mintának nem minden része járul hozzá egyenlő mértékben az analitikai válaszjelhez [57, 141].

A kvantitatív szilárdfázisú NMR spektroszkópia alternatívát nyújthat szilárdfázisú készítmények roncsolásmentes tartalmi meghatározásához is [142].

### 6.4. Néhány példa a szilárdfázisú NMR alkalmazására a polimorfiakutatásban

Az alábbiakban bemutatásra kerülő példák az



ssNMR gyógyszeripari alkalmazását szemléltetik a polimorfizmus, illetve szilárdfázisú analitikában.

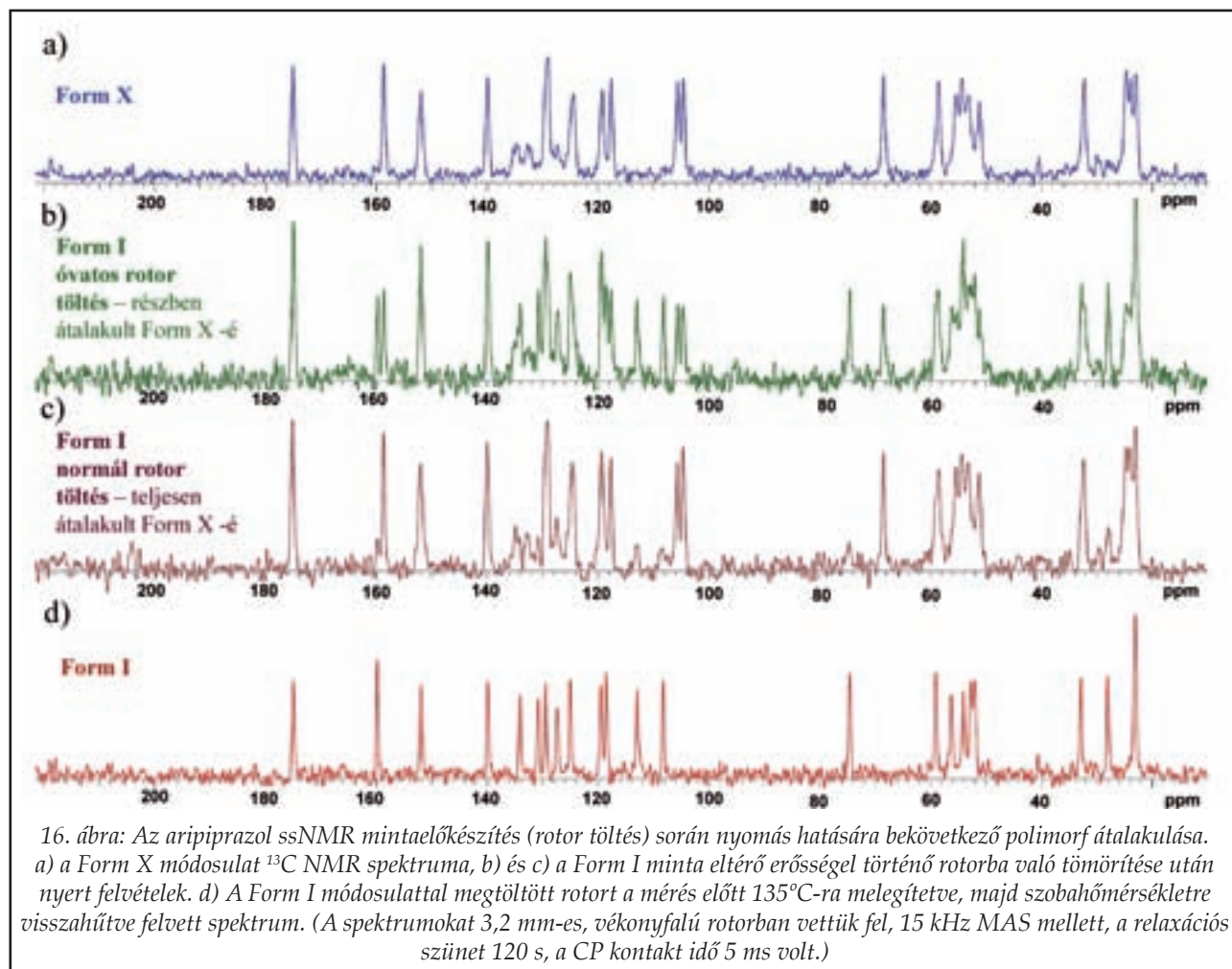
#### 6.4.1. Famotidin konformációs polimorfija, a polimorf módosulatok azonosítása

A famotidin polimorfijáról elsőként a Richter Geodeon NyRt. szabadalma számolt be [101]. A vegyület termodinamikailag stabil A módosulata hasáb alakú, a kinetikailag stabil B módosulat tűszerű kristályokat képez. A módosulatok részletesebb jellemzését Hegedűs és munkatársai közölték [143], míg a kristályszerkezetüket Ferenczy és társai publikálták [144].

A famotidin A és B módosulata konformációs polimorfia viszonyában állnak egymással. A módosulatok elemi celláját, illetve azok kristályaiban a molekulák konformációját és elrendeződését a 11. ábra mutatja. Az A módosulat ún. nyújtott S, a

B módosulat ún. hajlott hajtű konformációt mutat. A 12. és 13. ábrák a famotidin két módosulatának 15 kHz-es forgatási sebesség mellett mért  $^{13}\text{C}$  ill.  $^{15}\text{N}$  CP/MAS spektrumait mutatják be. Mindkét detektált mag esetében a két forma egyértelműen megkülönböztethető az izotróp kémiai eltolódások eltérései alapján. A  $^{13}\text{C}$  spektrumokban a legnagyobb spektrális különbségek az alifás tartományban tapasztalhatók: a 12. ábrán megfigyelhető, hogy B forma  $^{13}\text{C}$  spektrumában két alifás szénatom véletlen izokronia miatt egy közös csúcsot ad. A jelenség jól értelmezhető, hiszen a legnagyobb eltéréseket mutató csúcsok (az ábrán látható szerkezeti képletben zöld ellipszoiddal jelölt) C10, C12, C13 alifás szénatomok jelei, amelyek meghatározóak a két forma közötti konformációs különbség szempontjából.

A  $^{15}\text{N}$  spektrumokban a legnagyobb eltéréseket a guanidino- és savamidin-részletek  $\text{NH}_2$  csoportjai okozzák (N2, N3 és N15), pl. B módosulat  $^{15}\text{N}$



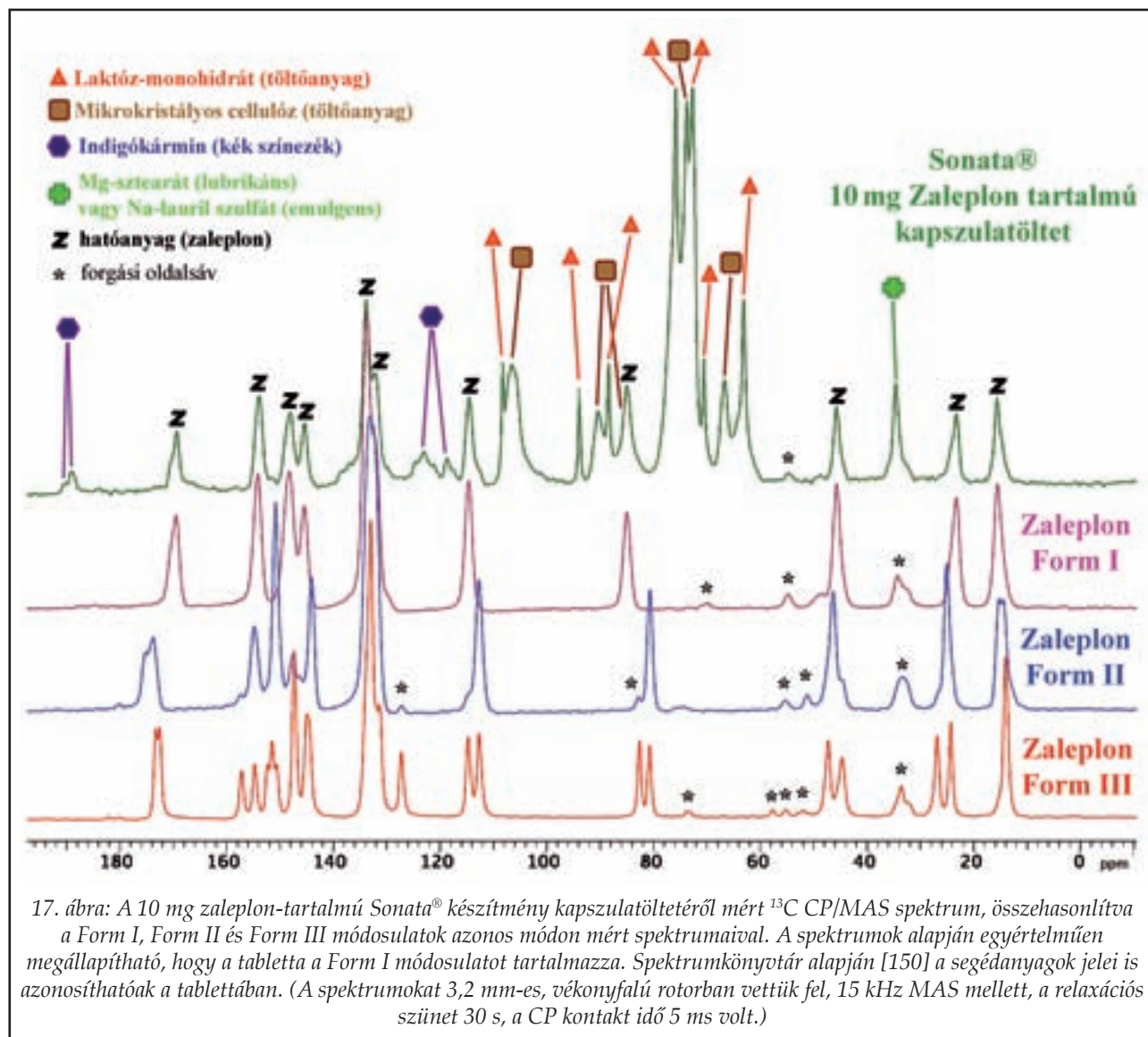
spektrumában a  $^{13}\text{C}$  spektrumokhoz hasonlóan szintén egyel kevesebb jel van, mint amennyi a szerkezet alapján várható lenne: a  $-293\text{ ppm}$  eltolódású jel két  $^{15}\text{N}$  mag közös csúcsa. A spektrális eltérések jól összhangban vannak A és B módosulatoknak a röntgenkristallográfiás szerkezetből meghatározható eltérő hidrogénkötéses kapcsolataival (ld. 13. ábra). A fentiek alapján jól látszik, hogy a szilárdfázisú NMR spektrumok közötti különbségek elsődlegesen a módosulatok lokális szerkezeti különbségeire érzékenyek.

#### 6.4.2. Aripiprazol konformációs polimorfája és polimorf átalakulása

Az aripiprazol két polimorf módosulata, a Form I és Form X, egymással konformációs polimorfia viszonyában állnak, és enantiotróp rendszert képeznek [145]. A két módosulat közötti különbséget elsődlegesen az alifás lánc eltérő konformációja okozza, amelyben a diéderes szögek a két módosulatban jelentős eltérést mutatnak. Az N1-C13-

C14-C15 diéderes szög az X módosulatban  $170,6^\circ$ , míg az I-ben  $-60,2^\circ$ . A C14-C15-C16-O17 diéderes szög az X módosulatban  $174,4^\circ$ , míg az I formában  $63,2^\circ$ . A polimorf rendszer DSC termogramja szerint (14. ábra), a Form X módosulat hő hatására kb.  $120^\circ\text{C}$ -on átalakul Form I-gyé, ami  $0^\circ\text{C}$  alá hűtve visszaalakítható a kiindulási Form X módosulattá [146]. A Form I módosulat szobahőmérsékleten hosszú ideig eltartható, mert kinetikailag stabilis. A két polimorf szilárdfázisú  $^{13}\text{C}$  NMR spektroszkópiával kiválóan megkülönböztethető. A módosulatok  $^{13}\text{C}$  CP/MAS spektrumain (15. ábra) az is jól megfigyelhető, hogy a legnagyobb spektrális eltérések éppen a konformációs különbségben leginkább érintett alifás szén magok jelei esetén tapasztalhatók.

Az aripiprazol más szempontból is figyelemre méltó molekula. Irodalmi adatok [145] és saját tapasztalatok [146] alapján ismeretes, hogy a Form I  $\rightarrow$  Form X polimorf átalakulás nyomás hatására is bekövetkezhethet. Ilyen rendszerek ssNMR vizsgálata különös körülményt igényel, hiszen a MAS for-

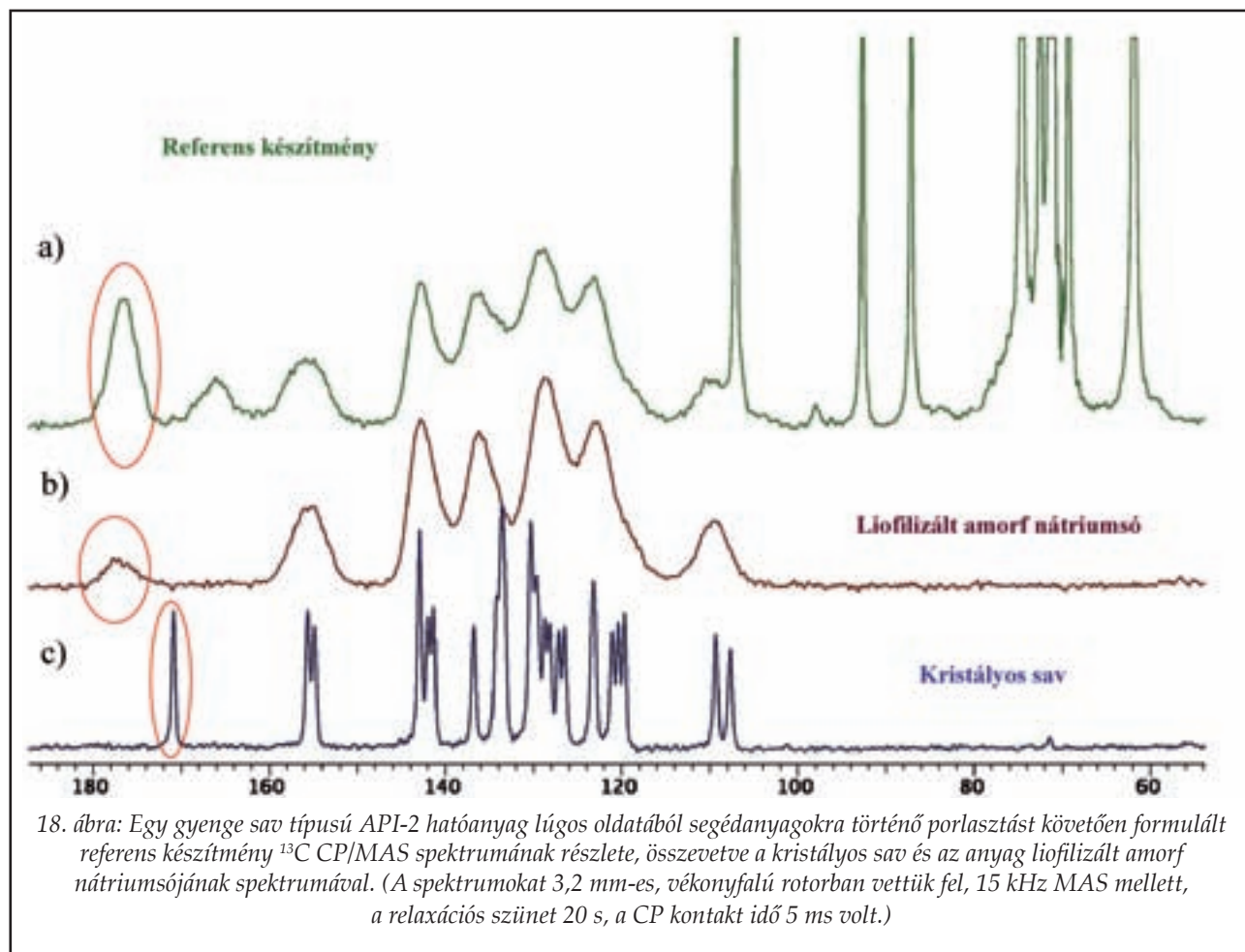


gatás során jelentős mechanikai erőhatások érik a mintát. MAS forgatás hatására történő polimorf átalakulást leírtak a szakirodalomban egy hidrát  $\rightarrow$  anhidrát átalakulásban [147]. Az aripiprazol esetében azonban a mintaelőkészítés okozott ilyen változást. A rotor normál töltése esetén a mintát enyhe nyomással tömörítjük, hogy maximalizáljuk az érzékenységet, illetve, hogy a megfelelő forgáshoz szükséges homogén rotor töltetet biztosítsuk. A 16. ábra mutatja, hogy normál rotor töltés esetén a Form I módosulat teljesen átalakult Form X-szé, és még különösen óvatos rotor töltés esetén is csak a két polimorf keverékét sikerült megmérni. A tiszta Form I módosulat ssNMR spektrumát a rotortöltést követően  $135^\circ\text{C}$ -ra melegített, majd szobahőre hűtött mintán sikerült megmérni. Érdekes módon az anyag csak a mintaelőkészítés során kifejtett, jellemzően nyomó erőhatásra érzékeny, azonban for-

gatás során a fellépő jelentékeny centrifugális erők nem okoztak polimorf átalakulást, mivel a Form X módosulat jelei egy napon keresztül 15 kHz-es forgatás után sem voltak detektálhatóak.

#### 6.4.3. Polimorf forma és segédanyagok kvalitatív meghatározása zaleplon készítményben

A zaleplon formulált készítményben (Sonata®, 10 mg hatóanyagtartalom) jól mérhető  $^{13}\text{C}$  CP/MAS módszerrel (17. ábra). A hatóanyagoknak több módosulatát is leírták [148, 149], ezek közül a Form I, Form II, és Form III módosulatoknak van gyakorlati jelentősége. A  $^{13}\text{C}$  spektrum egyértelmű információval szolgál arról, hogy formuláció tisztán a legstabilabb Form I módosulatot tartalmazza. A Sonata® készítmény kapszulátletete esetében a segédanyagok jelei döntően a 60–110 ppm tarto-



mányban jelennek meg. A hatóanyagoknak csak egyetlen jele esik ebbe a spektrumtartományba, ami az ssNMR általánosan nagyon jó szelektivitását bizonyítja hatóanyagok kimutatására készítményből. A spektrumban a segédanyagok jelei spektrumkönyvtár [150] alapján azonosíthatóak, jelüket a 17. ábra megfelelő szimbólumai mutatják. A Sonata<sup>®</sup> legnagyobb mennyiségben jelenlevő (49 mg / kapszulátöltet) segédanyaga a laktózonohidráttal, melynek éles csúcsai egyértelműen azonosíthatóak a készítmény spektrumában. A szintén nagyobb mennyiségben jelenlevő töltőanyag, a mikrokristályos cellulóz kissé szélesebb jelei is jól felismerhetők. A kapszulátöltet kék színű színezőanyaga, az indigókármin (FD&C Blue #2) kisebb mennyiségben fordul elő, de ennek is azonosíthatóak a hatóanyag csúcaival át nem fedő jelei. A kapszulátöltet tartalmaz még lubrikáns Mg-sztearátot, és emulgens Na-lauril szulfátot. Ezen két zsírsavszármazék ssNMR spektruma igen hasonló, legintenzívebb jelük eltolódása között a spektrumkönyvtár szerint 0,1 ppm a különbség, ami ssNMR esetében a hibahatáron belül van (18. ábra).

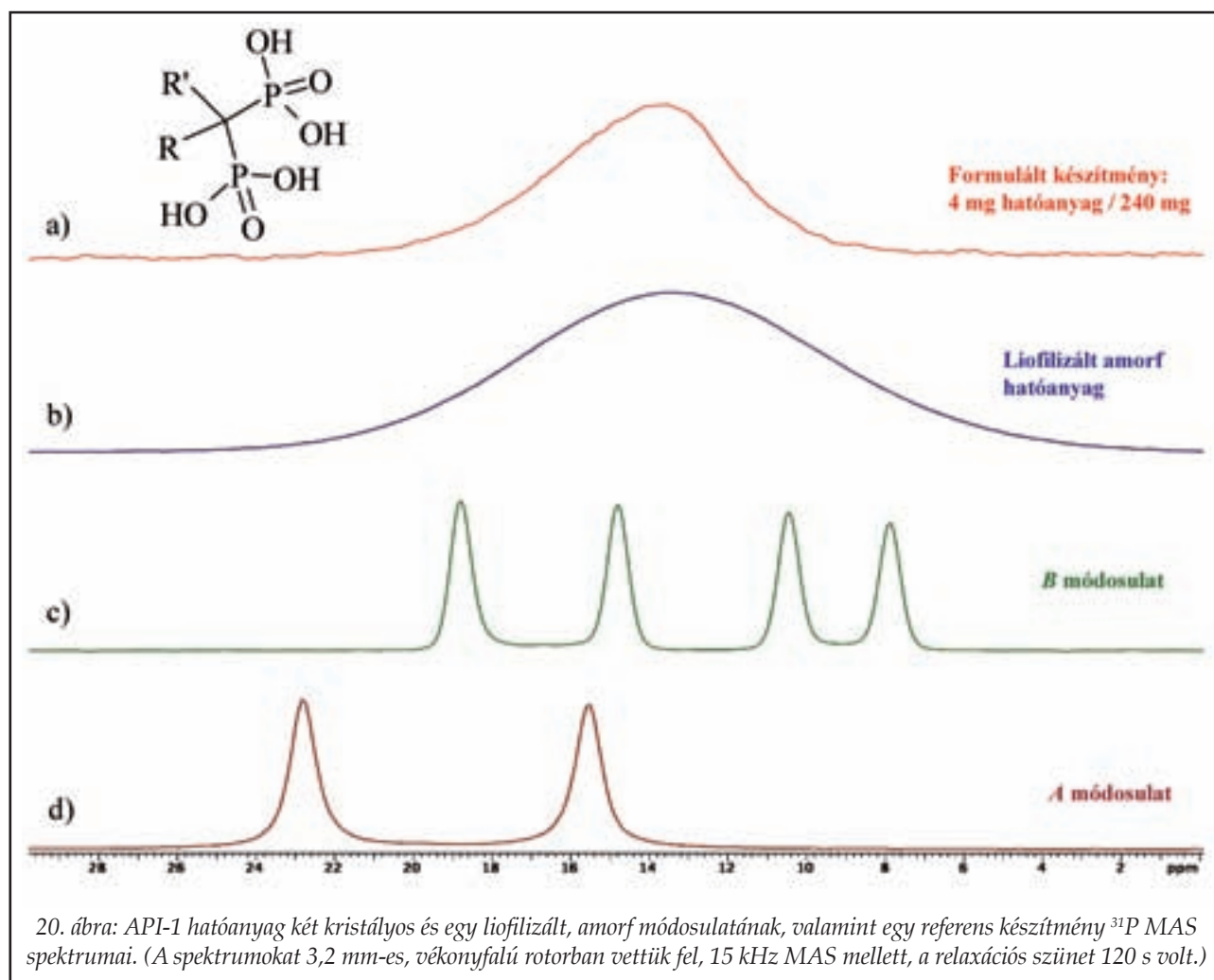
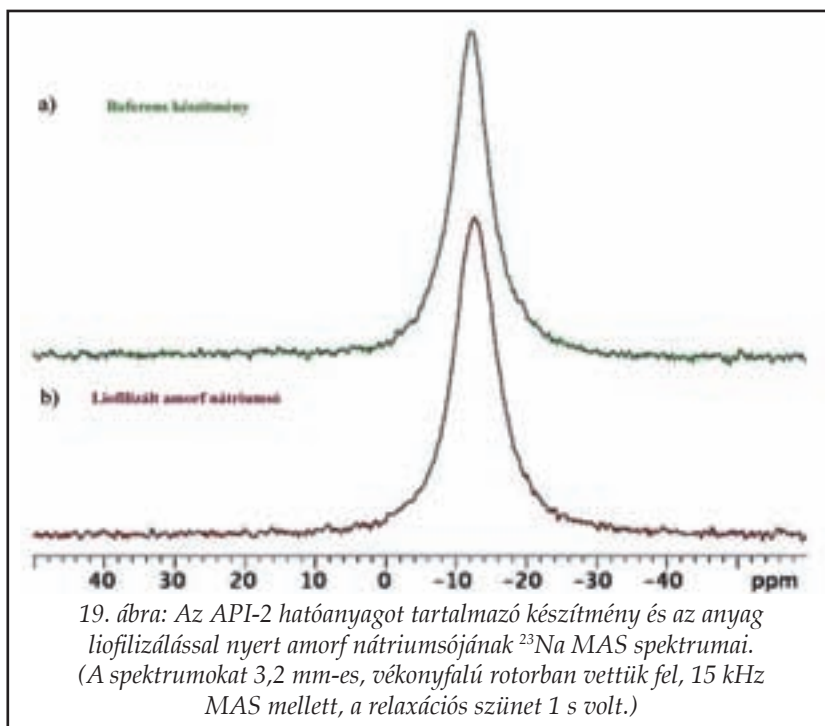
Egy további érdekességként megfigyelhető a 17. ábrán, hogy a bemutatott módosulatok spektrumai a kristályszerkezetről is értékes információt szolgáltatnak. A Form III spektrumában az NMR jelek megkettőződését tapasztaltuk, míg a Form I és Form II módosulatok csak egy jelsorozatot adnak. Mindez arra utal, hogy a Form III kristály elemi cellájában szimmetria szempontjából kétféle elhelyezkedésű molekula is van, míg a Form I és Form II módosulatok esetében csak egyféle.

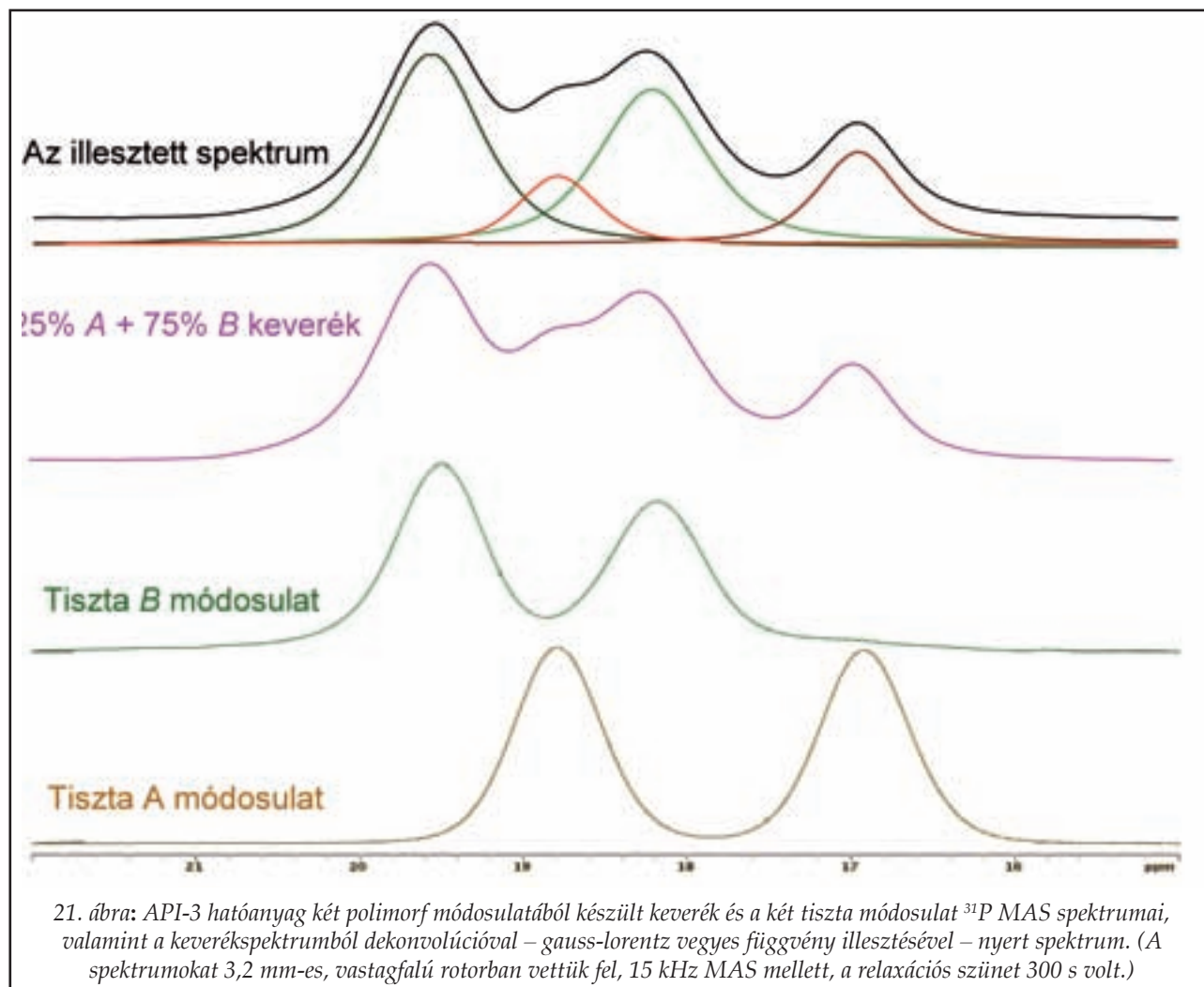
#### 6.4.4. Amorf hatóanyagok vizsgálata készítményben

Az API-2 gyenge sav típusú hatóanyag kristályos formája ismert. A referens készítmény előállításánál a kristályos hatóanyagot lúgos oldatból porlasztással viszik fel a tabletták segédanyagaira. A 18. ábra a) és c) része a referens készítmény és a kristályos hatóanyag  $^{13}\text{C}$  CP/MAS spektrumát mutatja. Utóbbiban a hatóanyag amorf formája jóval szélesebb jelei alapján egyértelműen megkülönböztethető a kristályos formától, azonban a szélesebb jelek következtében kisebb érzékenység-



gel detektálható. A spektrumok alapján tehát a készítmény a hatóanyag amorf formáját tartalmazza. Az amorf hatóanyag jelei nagyjából a kristályos forma egymáshoz közeli kémiai eltolódású jeleinek burkológörbéjeként jelentkeznek a spektrumban, azonban a karboxilátcsoport  $^{13}\text{C}$  jele a kristályos formához képest jelentős paramágneses eltolódást szenvedett. Ezek alapján gyanítható volt, hogy gyenge sav típusú vegyület esetleg nátriumsóvá alakult az eljárás során. A hatóanyagot NaOH-oldatban oldva és liofilizálással amorf Na-só formában kinyerve, a minta  $^{13}\text{C}$  spektrumában a karboxilát jel és a spektrum további jelei azonos kémiai eltolódásnál jelentkeztek, mint a tablettá esetében. A 19. ábrán a liofilizálással





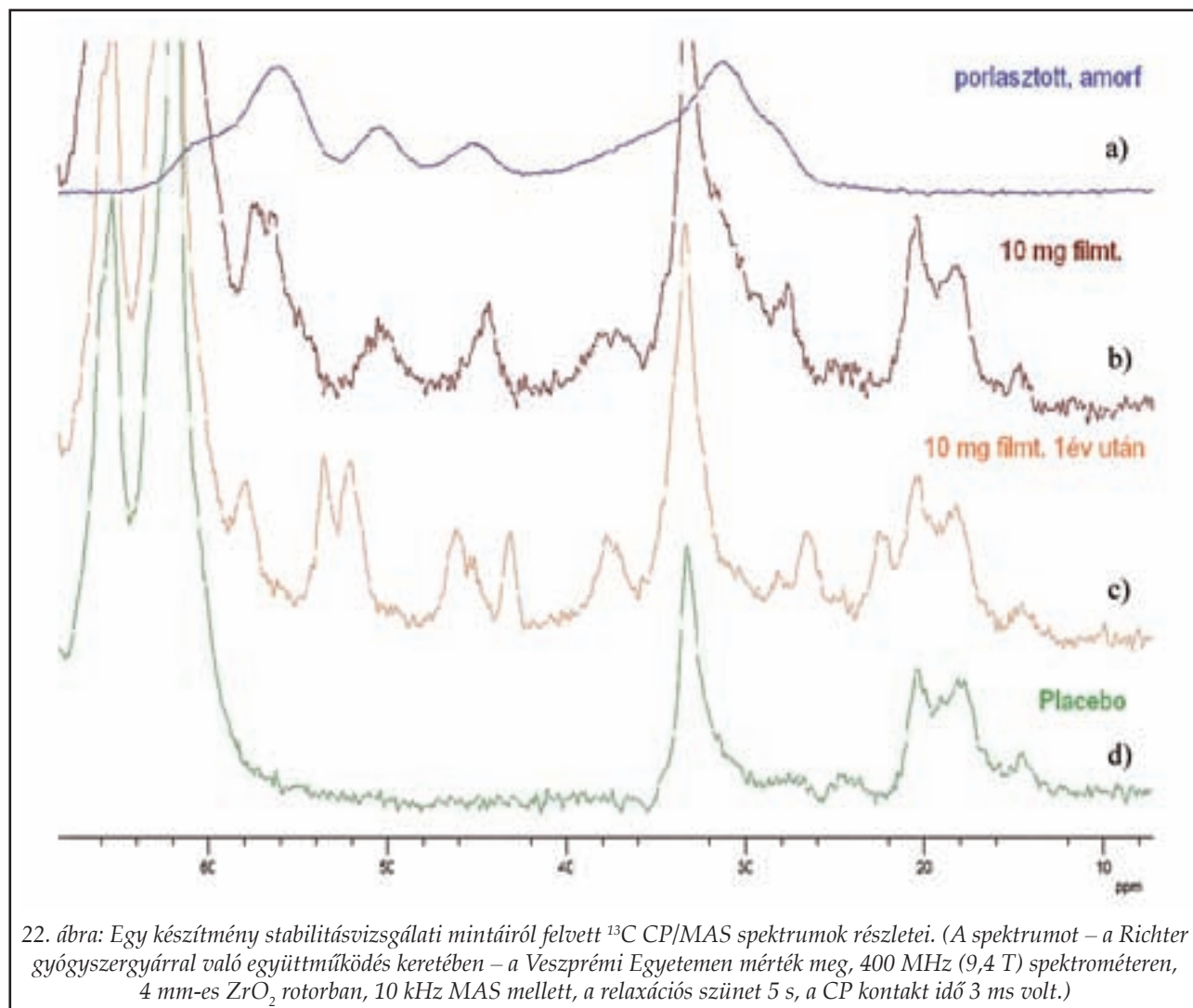
előállított amorf nátriumsó és a referens készítmény  $^{23}\text{Na}$  MAS spektruma látható, a  $-12$  ppm eltolódású nátrium jel szintén megegyezik a két vizsgált anyagban, amely igazolja, hogy a készítményben a hatóanyag amorf nátriumsó formában van jelen.

#### 6.4.5. Hatóanyag szelektív mérése $^{31}\text{P}$ ssNMR módszerrel

Foszfortartalmú hatóanyag esetében a  $^{31}\text{P}$  ssNMR vizsgálatok nagyon hasznosak, mivel a  $^{31}\text{P}$  magnak a  $^{13}\text{C}$ -hoz képest kb. 380-szor nagyobb az abszolút érzékenysége. Ezenkívül formulált készítmények vizsgálatában lehetőséget adnak a hatóanyag szelektív meghatározására, a segédanyagok esetlegesen zavaró jeleinek kiküszöbölésére. Például API-1 hatóanyag jeleit készítményben  $^{13}\text{C}$  CP/MAS módszerrel nem sikerült kimutatni, csak a segédanyagok jeleit detektáltuk. A hatóanyag detektálását meggátolta egyrészt a kis hatóanyagtartalom, másrészt annak

amorf jellege. A 20. ábra API-1 hatóanyag két kristályos és egy liofilizálással előállított amorf módosulatának, valamint egy kis hatóanyag tartalmú (4 mg hatóanyag / 240 mg készítmény) referens formulált készítménynek a  $^{31}\text{P}$  MAS spektrumait mutatja. A  $^{31}\text{P}$  spektrumok alapján a hatóanyag már jól mérhető és egyértelműen igazolható, hogy a készítményben amorf formában van jelen.

A zaleplon példájához hasonlóan a kristályos módosulatok spektrumai itt is értékes információt nyújtanak a kristályszerkezetről. A molekulában két, szilárd fázisban nem ekvivalens foszfátcsoport található. Az A módosulat esetében két foszforjel detektálható, melyek a molekulán belüli nem ekvivalens foszfor atomoktól származnak. Ehhez képest a B módosulat spektrumában a jelek megkettőződnek. Mint azt a zaleplonnál is láthattuk, ez kétféle elhelyezkedésű molekula jelenlétére utal a kristályban B forma esetében, míg a hatóanyag az A módosulat elemi cellájában csak egyféle elhelyezkedésben fordul elő.



#### 6.4.6. Polimorf keverék összetételének meghatározása

A  $^{31}\text{P}$  MAS ssNMR mérések további előnye, hogy a mérési paraméterek gondos megválasztása mellett kvantitatívak, így külön kalibráció nélkül lehetséges relatív mennyiségek meghatározása, ellentétben a  $^{13}\text{C}$  CP/MAS kísérlettel. A 21. ábra az API-3 hatóanyag A és B módosulatáról, valamint egy 25 % A módosulatot tartalmazó A/B keverékről felvett  $^{31}\text{P}$  MAS NMR spektrumot mutatja. Az átfedő csúcsokat dekonvolúcióval szétválasztva kapott jelintenzitásokból meghatározható a két polimorf módosulat aránya a keverékben. Jelen példában az A formának a spektrum alapján számított mennyisége 24 %, ami igen jól közelíti a keverési arányt.

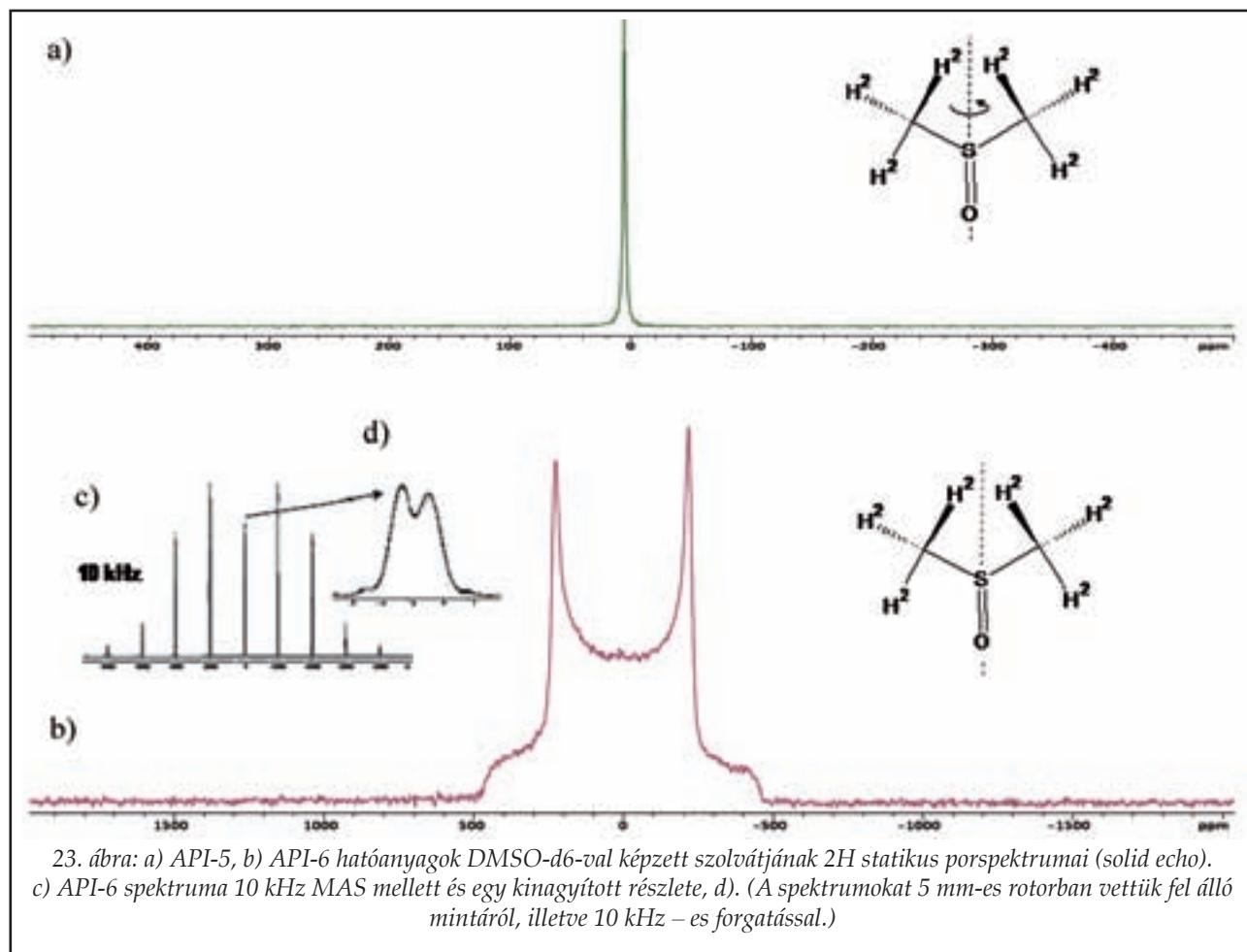
#### 6.4.7. Stabilitás vizsgálata készítményben ssNMR-rel, amorf $\rightarrow$ kristályos átalakulás

Az ssNMR alkalmas szilárd hatóanyagok és

gyógyszerformák fizikai stabilitásának vizsgálatára. A 22. ábra az API-4 hatóanyagot tartalmazó készítmény stabilitásvizsgálatának eredményeit mutatja be. A készítmény fejlesztési fázisában a hatóanyagot porlasztással vitték fel a segédanyagokra. A tiszta hatóanyag porlasztva szárítása amorf anyagot eredményez. Azonban a segédanyagokra porlasztott hatóanyag a tablettázás során és azt követően átalakulást szenved. A tisztán amorf formához képest a hatóanyag nagyobb lokális rendezettségű, élesebb jeleket adó formája detektálható a friss tablettában, míg az 1 évig tárolt filmtablettában az anyag már egyértelműen egyik kristályos módosulattá alakult.

#### 6.4.8. Szolvátok vizsgálata $^2\text{H}$ ssNMR alkalmazásával

Az ssNMR kiválóan alkalmas szolvátok vizsgálatára is. Deuterált oldószerekkel képzett szolvátok esetén a  $^2\text{H}$  spektrumok az oldószer-molekulák dina-



mikai tulajdonságaira, mozgékonyására jellemzőek. A 23. ábrán bemutatott példában az API-5 molekula DMSO-d<sub>6</sub> szolvátjának statikus <sup>2</sup>H NMR spektrumában egy éles jelet tapasztalunk, míg az API-6 esetében jellegzetes kvadrupol jelalakot detektálunk. Előbbi esetben a DMSO molekulák gyorsan, szabadon mozoghatnak, ami kiátlagolja a kvadrupól kölcsönhatást, míg az utóbbi esetben gátolt a molekulák mozgása, így a kvadrupól csatolás megfigyelhető. API-6 minta forgatásával kapott jel kétféle izotróp eltolódást mutat (ld. kinagyított rész), azaz a DMSO-d<sub>6</sub> metilcsoportjainak deutériumatomjai eltérő kémiai környezetet érznek, kémiaiailag nem ekvivalensek.

## 7. Összegzés

Összefoglalásul megállapítható, hogy a szilárdfázisú NMR spektrumok számos hasznos információt (szerkezeti, dinamikai, analitikai) nyújthatnak a vizsgált szilárd anyagokról (hatóanyag és segédanyag), azok kölcsönhatásairól. Azonban a szilárd fázisra jellemző fizikai effektus, vagyis a

kölcsönhatások irányfüggése (anizotrópia) ezek kinyerését megnehezíti. Mindazonáltal a hatalmas és egyre gyorsuló mérés technikai fejlődés eredményeként a módszer széleskörű felhasználását korlátozó különféle nehézségek leküzdhetővé váltak. A technika mára eljutott oda, hogy alkalmazása jelentősebb gyógyszergyárak és kutatóhelyek számára is elérhetővé vált, és az ssNMR egyre fontosabb helyet tölt be a szilárd anyagok analitikájában.

Az ssNMR hatékonyan alkalmazható a szilárdfázisú gyógyszeranalízisben, a polimorfia kutatásban. A hatóanyagok részletes szerkezeti és dinamikai vizsgálatán túl kiválóan alkalmas a hatóanyagok különböző szilárd formáinak meghatározására készítményben, amely bizonyos esetekben multinukleáris technikával szelektívvé is tehető. Az amorf anyagok vizsgálatában különösen hasznos, továbbá mennyiségi meghatározásra is alkalmassá tehető. Az ssNMR gyógyszeripari szerepe a jövőben várhatóan tovább fog növekedni, gyógyszerészeti alkalmazási lehetőségei a mérés technikai fejlődéssel tovább fognak bővülni.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondunk *dr. Havasi Balázsnak*, *dr. Körtvélyesi Zsoltnak* és *prof. dr. Szalontai Gábornak* a közreműködésükért, *Balogh Gábornak* folyamatos technikai támogatásáért, illetve *dr. Dave Rice-nak* és *dr. Vadim Zorin-nak* a mérés technikák implementálásában nyújtott segítségéért.

## IRODALOM

1. [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes](http://nobelprize.org/nobel_prizes) - hozzáférés: 2010-03-15.
2. Bloch, F., Hansen, W. W., Packard, M.: Phys Rev 69, 127. (1946).
3. Purcell, E. M., Torrey, H. C., Pound, R. V.: Phys Rev 69, 37-38. (1946).
4. Sohár, P.: Az NMR-sztori. Magyar Kémiai Folyóirat – Előadások 109-110, 120-126. (1989).
5. Pake, G. E.: J Chem Phys 16, 327-336. (1948).
6. Andrew, E. R., Bradbury, A., Eades, R. G.: Nature 182, 1659. (1958).
7. Bugay, D. E.: Pharmacol Res 10, 317-327 (1993).
8. Tishmack, P. A., Bugay, D. E., Byrn, S. R.: J Pharm Sci 92, 441-474. (2003).
9. Berendt, R. T., Sperger, D. M., Isbester, P. K., munson, E. J.: Trends Anal Chem 25, 977-984. (2006).
10. Harris, R. K.: Analyst 131, 351-373. (2006).
11. Harris, R. K.: J Pharm Pharmacol 59, 225-239. (2007).
12. Geppi, M., Mollica, G., Borsacchi, S., Veracini, C. A.: Appl Spectrosc Rev 43, 202-302. (2008).
13. Szalontay, G.: Szilárdfázisú NMR (ss-NMR) vizsgálata. In: Farkas, B., Révész, P. (Eds.): Kristályosítástól a tablettázásig – Anyagvizsgálati módszerek és technológiai eljárások kézikönyve. Universitas Szeged Kiadó, Szeged (2007)
14. Bak, M., Rasmussen, J.T., Nielsen, N.C.: J Magn Reson 147, 296-330. (2000).
15. Hayashi, Sh., Hayamizu, K.: Bulletin of the Chemical Society of Japan 64, 685-687. (1991).
16. Duer, M. J.: Introduction to Solid-State NMR Spectroscopy. Blackwell Publishing Ltd. UK (2004).
17. Lavois, D. D., Bitter, H-M. L., Jerschow, A.: Angew Chem Int Edit 41, 3096-3129. (2002).
18. <http://www.udel.edu/dybowski/research.htm> - hozzáférés: 2010. márc.15.
19. Brown, S. P., Emsley, L.: Solid-state NMR. In: Vo-Dinh, T., Gauglitz G. (Eds.): Handbook of Spectroscopy Vol. 2: NMR spectroscopy. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2003)
20. Harris, R. K., Becker, E. D., De Menezes, S. M. C., Granger, P., Hoffman, R. E., Zilm, K. W.: Pure Appl Chem 80, 59-84. (2008).
21. Emsley, L.; Lavois, D. D.; Pines, A.: Lectures on Pulsed NMR (3rd ed.) In: Maraviglia, B., (Ed.): The Proceedings of the International School of Physics "Enrico Fermi", Course CXXXIX. p.45-210. IOS Press, Amsterdam, (1999)
22. Schurko R.: Introduction to solid-state NMR. Notes. [http://mutuslab.cs.uwindsor.ca/schurko/ssnmr/ssnmr\\_schurko.pdf](http://mutuslab.cs.uwindsor.ca/schurko/ssnmr/ssnmr_schurko.pdf)- hozzáférés: 2010. márc. 15.
23. Samoson, A., Pines, A.: Rev Sci Instrum 60, 3239-3241. (1989).
24. Samoson, A., Lippmaa, E., Pines, A.: Mol Phys 65, 1013-1018. (1988).
25. Llor, A., Virlet, J.: Chem Phys Lett 152, 248-253. (1988).
26. Mueller, K. T., Sun, B. Q., Chingas, G. C., Zwanziger, J. W., Terao, T., Pines, A.: J Magn Reson 86, 470-487. (1990).
27. Bloch, F.: Phys Rev 111, 841-853. (1958).
28. Bennett, A. E., Rienstra, C. M., Auger, M., Lakshmi, K. V., Griffin, R. G.: J Chem Phys 103, 6951-6958. (1995).
29. Fung, B. M., Khitrin, A. K., Ermolaev, K.: J Magn Reson 142, 97-101. (2000).
30. Carravetta, M., Edén, M., Zhao, X., Brinkmann, A., Levitt, M. H.: Chem Phys Lett 321, 205. (2000)
31. Ernst, M., Zimmerman, H., Meier, B. H.: Chem Phys Lett 317, 581-588. (2000).
32. Hartmann, S. R., Hahn, E. L.: Phys Rev 128, 2042-2053. (1962).
33. Taylor, R. E.: Concept Magn Reson A 22A(1), 37-49. (2004).
34. Taylor, R. E.: Concept Magn Reson A 22A(2), 79-89. (2004)
35. Opella, S. J., Frey, M. H.: J Am Chem Soc 101, 5854-5856. (1979).
36. Saindon, P. J.: Solid pharmaceuticals: Analysis and identification by solid state carbon-13 NMR. Doktori értekezés, Purdue University, West Lafayette, Indiana, U.S. (1992)
37. Saindon, P. J., Cauchon, N. S., Sutton, P. A., Chang, C.-J., Peck, G. E., Byrn, S. R.: Pharmacol Res 10, 197-203. (1993).
38. Wu, X., Zilm, K. W.: J Magn Reson A 102, 205-213. (1993).
39. Wu, X.; Burns, S. T., Zilm, K. W.: J Magn Reson A 111, 29-36. (1994).
40. [http://nmr900.ca/testspectra\\_e.html](http://nmr900.ca/testspectra_e.html) hozzáférés: 2010. márc. 15.
41. Waugh, J. S., Huber, L. M., Haeberlen, U.: Phys Rev Lett 20, 180-182. (1968).
42. Mansfield, P.: J Phys C (Solid State Physics) 4, 1444-1452. (1971).
43. Rhim, W. K., Elleman, D. D., Vaughan, R. W.: J Chem Phys 58, 1772. (1973).
44. Burum, D. P., Rhim, W. K.: J Chem Phys 71, 944. (1979).
45. Cory, D. G.: Magn Reson 94, 526-534. (1991).
46. Lee, M. Goldberg, W.L.: Phys Rev 140, 1261-1271. (1965).
47. Bielecki, A., Kolbert, A. C., Levitt, M. H.: Chem Phys Lett 155, 341-346. (1989).
48. Bielecki, A., Kolbert, A. C., de Groot, H. J. M., Griffin, R. G., Levitt, M. H. In: Warren S. Warren (Ed.): Advances in Magnetic Resonance Vol. 14., p. 111. Academic Press (1990)
49. Vinogradov, E., Madhu, P. K., Vega, S.: Chem Phys Lett 314, 443-450. (1999).
50. Lesage, A., Duma, L., Sakellariou, D., Emsley, L.: J Am Chem Soc 123, 5747-5752. (2001).
51. Brown, S. P.: Prog Nucl Magn Res Sp 50, 199-251. (2007).
52. Griffin, J. M., Martin, D. R., Brown, S. P.: Angew Chem Int Edit 46, 8036-8038. (2007).
53. Morcombe, C. R., Zilm, K. W.: J Magn Res 162, 479-486. (2003).
54. Potrzebowski M. J., Tekely P., Dusausoy Y.: Solid State Nucl Magn Res 11, 253-257. (1998).
55. Dybowski, C., Neue, G.: Prog Nucl Magn Res Sp 41, 153-170. (2002).
56. Mildner, T., Ernst, H., Freude, D.: Solid State Nucl Magn Res 5, 269-271. (1995).
57. Ziarelli, F., Caldarelli, S.: Solid State Nucl Magn Res 29, 214-218. (2006).

58. Jelinek, R., Valente, A. P., Valentine, K. G., Opella, S. J.: *J Magn Res* 125, 185–187. (1997).
59. Svensson, A., Bergquista, K-E., Fex, T., Kihlberg, J.: *Tetrahedron Lett* 39, 7193-7196. (1998).
60. Elbayed, K., Bourdonneau, M., Furrer, J., Richert, Th., Raya, J., Hirschinger, J., Piotto, M.: *J Magn Res* 136, 127–129. (1999).
61. Silva, E. T., Câmara, C. A., San Gil, R. A. S., Fraga, C. A. M., Barreiro, E. J.: *Annu Magn Res* 5, 34-40. (2006).
62. Ramadhar, T. R., Amador, F., Ditty, M. J. T., Power, W. P.: *Magn Res Chem* 46, 30–35. (2008).
63. Lam, Y. H., Wassall, S. R., Morton, C. J., Smith, R., Separovic, F.: *Biophys J* 81, 2752-2761. (2001).
64. Ader, C., Schneider, R., Seidel, K., Etzkorn, M., Baldus, M.: *Biochem Soc T* 35, 991-995. (2007).
65. Kajiyu, K., Kumazawa, Sh., Naito, A., Nakayama, T.: *Magn Res Chem* 46, 174-177. (2008).
66. Changsan, N., Chan, H-K., Separovic, F., Srichana, T.: *J Pharm Sci* 98, 628-639. (2009).
67. Jensen, M., Bjerring, M., Nielsen, N. Ch., Nerdal, W.: *J Biol Inorg Chem* 15, 213-223. (2010).
68. Agrawal, P., Kihne, S., Hollander, J., Hofmann, M., Langosch, D., de Groot, H.: *Biochim Biophys Acta – Biomembranes* 1798, 202-209. (2010)
69. Watts, A., Straus, S. K., Grage, S. L., Kamihira, M., Lam, Y. H., Zhao, X.: *Methods Mol Biol* 278, 403-473. (2004).
70. Lorch, M., Fahem, S., Kaiser, C., Weber, I., Mason, A. J., Bowie, J. U., Glaubitz, C.: *Chem BioChem* 6, 1693-1700. (2005).
71. Kijac, A. Z., Li, Y., Sligar, S. G., Rienstra, C. M.: *Biochem* 46, 13696-13703. (2007).
72. Li, Y., Berthold, D. A., Frericks, H. L., Gennis, R. B., Rienstra, C. M.: *Chem BioChem* 8, 434-442. (2007).
73. Li, Y., Berthold, D. A., Gennis, R. B., Rienstra, C. M.: *Protein Sci* 17, 199-204. (2008).
74. Wickham, J. R., Rice, Ch. V.: *Solid State Nucl Magn Res* 34, 154-161. (2008).
75. Li, W.: *Analyst* 131, 777–781. (2006).
76. Bryant, P. L., Lukito, W. J., Gan, Zh., Hall, R. W., Butler, L. G.: *J Magn Res* 170, 257-262. (2004).
77. Zernia, G., Huster, D.: Investigation of collagen dynamics by solid-state NMR spectroscopy. In: Webb, G. A. (Ed.): *Modern Magnetic Resonance*, p. 87-92. Springer Netherlands (2006).
78. Wilson, E. E., Awonusi, A., Morris, M. D., Kohn, D. H., Tecklenburg, M. M. J., Beck, L. W.: *Biophys J* 90, 3722–3731. (2006).
79. Grant, D. J. W.: Theory and origin of polymorphism. In H. G. Brittain (ed.) *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-34. (1999)
80. Nic, M., Jirat, J., Kosata, B.: Online corrected version of: „McNaught, A. D., Wilkinson, A.: IUPAC. Compendium of chemical terminology, 2nd ed. (the „Gold Book”). Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997)”, <http://goldbook.iupac.org> – hozzáférés: 2009. nov. 20.; ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.A00243. (2006).
81. Jensen W.B.: *J Chem Educ* 83, 838-839. (2006).
82. Wada, Y., Matsubara, T.: *Powder Technol* 78, 109-114. (1994).
83. Kristl, A., Srcic, S., Vrečer, F., Sustar, B., Vojnovic, D.: *Int J Pharm* 139, 231-235. (1996).
84. Bettinetti, G., Sorrenti, M., Catenacci, L., Ferrari, F., Rossi, S.: *J Pharmaceut Biomed Anal* 41, 1205-1211. (2006).
85. Kukovec, B-M., Popovic, Z.: *J Mol Struct* 930, 121-125. (2009).
86. Brittain, H. G.: *J Pharm Sci* 96, 705-728. (2007).
87. Brittain, H. G.: *J Pharm Sci* 97, 3611-3636. (2008).
88. Brittain, H. G., *J Pharm Sci* 98, 1617–1642 (2009).
89. Nangia, A.: *Accounts Chem Res* 41, 595–604. (2008).
90. Smith, J. R., Xu, W., Raftery, D.: *J Phys Chem B* 110, 7766–7776. (2006).
91. Henck, J-O., Kuhnert-Brandstatter, M.: *J Pharm Sci* 88, 103-108. (1999).
92. Burger, A., Ramberger, R.: *Microchim Acta* 72, 259-271. (1979).
93. Burger, A., Ramberger, R.: *Microchim Acta* 72, 273-316. (1979).
94. Aguiar, A. J., Krc, J. Jr., Kinkel, A. W., Samyn, J. C.: *J Pharm Sci* 56, 847-853. (1967).
95. Miyazaki, S., Arita, T., Hori, R., Ito, K.: *Chem Pharm Bull* 22, 638-642. (1974).
96. Khalafallah, N., Khalil, S. A., Moustafa, M. A.: *J Pharm Sci* 63, 861-864. (1974).
97. Kobayashi, Y., Ito, S., Itai, S., Yamamoto, K.: *Int J Pharm* 193, 137-146. (2000).
98. Kato, Y., Kohketsu, M.: *Chem Pharm Bull* 29, 268-272. (1981).
99. Higuchi, W. I., Lau, P. K., Higuchi, T., Shell, J. W.: *J Pharm Sci* 52, 150-153. (1963).
100. Higuchi, W. I., Bernardo, P. D., Mehta, S. C.: *J Pharm Sci* 56, 200-207. (1967).
101. Bod, P., Harsanyi, K., Hegedus, B., Bogsch, E., Fekcs, É., Peter, I., Aracs, Zs., Miszori, S., Stiller, M.: Morphologically homogenous forms of famotidine and processes for their preparation. Richter Gedeon Vegyészeti - European Patent EP0256747 (1986).
102. Byrn, S., Pfeiffer, R., Ganey, M., Hoiberg, C., Poochikian, G.: *Pharmacol Res* 12, 945-954. (1995).
103. ICH Topic Q 6 A specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances. European Medicines Agency (2000).
104. Guidance for Industry ANDAs: Pharmaceutical solid polymorphism chemistry, Manufacturing, and controls Information. U.S. Department of Health and Human Services - Food and Drug Administration - Center for Drug Evaluation and Research (2007).
105. Soththivirat, S., Lubach, J. W., Haslam, J. L., Munson, E. J., Stella, V. J.: *J Pharm Sci* 96, 1008-1017. (2007).
106. Dukić, A., Mens, R., Adriaenssens, P., Foreman, P., Gelan, J., Remon, J. P., Vervaet, Ch.: *Eur J Pharm Biopharm* 66, 83-94. (2007).
107. Harris, R. K., Hodgkinson, P., Larsson, T., Muruganantham, A.: *J Pharmaceut Biomed Anal* 38, 858-864. (2005).
108. Kameda, T.: *J Phys D – Applied Physics* 38, 4313-4320. (2005).
109. Kameda, T., Tamada, Y.: *Int J Biol Macromol* 44, 64-69. (2009).
110. Campos, R., Ollivon, M., Marangoni, A. G.: *Crystal Growth Des* 10, 205–217. (2010).
111. Pouyani, T., Harbison, G. S., Prestwich, G. D.: *J Am Chem Soc* 116, 7515–7522. (1994).
112. Diez-Pena, E., Quijada-Garrido, I., Barrales-Rienda, J. M., Schnell, I., Spiess, H. W.: *Macromol Chem Phys* 205, 430–437. (2004).
113. Diez-Pena, E., Quijada-Garrido, I., Barrales-Rienda, J. M., Schnell, I., Spiess, H. W.: *Macromol Chem Phys* 205, 438-447. (2004).

114. Garcia, H., Barros, A. S., Gonçalves, C., Gama, F. M., Gil, A. M.: *Eur Polym J* 44, 2318-2329. (2008).
115. Capitani, D., De Angelis, A. A., Crescenzi, V., Masci, G., Segre, A. L.: *Carbohydr Polym* 45, 245-252. (2001).
116. Lumbach, J. W., Xu, D., Degmüller, B. E., Munson, E. J.: *J Pharm Sci* 96, 777-787. (2007).
117. Yoshinari, T., Forbes, R. T., York, P., Kawashima, Y.: *Int J Pharm* 247, 69-77. (2002).
118. Aldén, M., Lydén, M., Tegenfeldt, J.: *Int J Pharm* 110, 267-276. (1994).
119. Vachon, M. G., Nairn, J. G.: *Eur J Pharm Biopharm* 45, 9-21. (1998).
120. Kimura, K., Hirayama, F., Arima, H., Uekama, K.: *Pharmacol Res* 16, 1729-1734. (1999).
121. Pignatello, R., Ferro, M., de Guidi, G., Salemi, G., Vandelli, M. A., Guccione, S., Geppi, M., Forte, C., Puglisi, G.: *Int J Pharm* 218, 27-42. (2001).
122. Puttipatkhachorn, S., Nunthanid, J., Yamamoto, K., Peck, G. E.: *J Control Release* 75, 143-153. (2001).
123. Byrn, S. R., Xu, W., Newman, A. W.: *Adv Drug Deliver Rev* 48, 115-136. (2001).
124. Zhu, L., Kumar, V., Banker, G. S.: *Int J Pharm* 223, 35-47. (2001).
125. Wulff, M., Aldén, M., Tegenfeldt, J.: *Bioconjugate Chem* 13, 240-248. (2002).
126. Schachter D. M., Xiong, J., Tirol G. C.: *Int J Pharm* 281, 89-101. (2004).
127. Babonneau, F., Yeung, L., Steunou, N., Gervais, C., Ramila, A., Vallet-Regi, M.: *J Sol-Gel Sci Techn* 31, 219-223. (2004).
128. Wissing, S. A., Müller, R. H., Manthei, L., Mayer, C.: *Pharmacol Res* 21, 400-405. (2004).
129. Chen, J.-Z., Ranade, S. V., Xie, X.-Q.: *Int J Pharm* 305, 129-144. (2005).
130. Chen, X., Griesser, U. J., Te, R. L., Pfeiffer, R. R., Morris, K. R., Stowell, J. G., Byrn, S. R.: *J Pharm Biomed Anal* 38, 670-677. (2005).
131. Geppi, M., Guccione, S., Mollica, G., Pignatello, R., Veracini, C. A.: *Pharmacol Res* 22, 1544-1555. (2005).
132. Mollica, G., Geppi, M., Pignatello, R., Veracini, C. A.: *Pharmacol Res* 23, 2129-2140. (2006).
133. Pongpeerapat, A., Higashi, K., Tozuka, Y., Moribe, K., Yamamoto, K.: *Pharmacol Res* 23, 256-2574. (2006).
134. Aso, Y., Yoshioka, S.: *J Pharm Sci* 95, 318-325. (2006).
135. Bibby, D. C., Davies, N. M., Tucker, I. G.: *Int J Pharm* 180, 161-168. (1999).
136. Aso, Y., Yoshioka, S., Zhang, J., Zografi, G.: *Chem Pharm Bull* 50, 822-826. (2002).
137. Wang, L.-F., Chen, W. B., Chen, T.-Y., Lu, S. C.: *J Biomat Sci-Polym Ed* 14, 27-44. (2003).
138. Nakama, T., Ooya, T., Yui, N.: *Polym J* 36, 338-344. (2004).
139. Remenar, J. F., Wenslow, R., Ostovic, D., Peresypkin, A.: *Pharmacol Res* 21, 185-188. (2004).
140. Antal, L., Zelkó, R.: *Acta Pharm Hung* 78, 121-133. (2008).
141. Ziarelli, F., Viel, S., Sanchez, S., Cross, D., Caldarelli, S.: *J Magn Reson* 188, 260-266. (2007).
142. Sanchez, S., Ziarelli, F., Viel, S., Delaurent C., Caldarelli, S.: *J Pharm Biomed Anal* 47, 683-687. (2008).
143. Hegedűs, B., Bod, P., Harsányi, K., Péter, I., Kálmán, A., Parkányi, L.: *Pharm Biomed Anal* 7, 563-569. (1989).
144. Ferenczy, G., Párkányi, L., Ángyán J. G., Kálmán A., Hegedűs, B.: *J Mol Struct (Theochem.)* 503, 73-79. (2000).
145. Braun, D. E., Gelbrich, T., Kahlenberg, V., Tessadri, R., Wieser, J., Griesser, U. J.: *J Pharm Sci* 98, 2010-2026. (2009).
146. Némét, Z.: Gyógyszervegyületek szilárdfázisú analízise - A polimorfia kutatás korszerű módszerei a gyógyszeriparban. (3.1.2. fejezet) PhD értekezés Richter Gedeon NyRt., Budapesti Műszaki Egyetem VBK (2009)
147. Xu, M., Harris, K. D. M.: *J Am Chem Soc* 127, 10832-10833. (2005).
148. Aslam, F., Cowans, B., Byrn, S. R., Stahly, G. P.: Polymorphs of zaleplon and methods for the preparation thereof. American Home Products Corporation – World Patent WO 02/12244 (2001)
149. Fehér, E., Korödi, F., Singer, C., Magyar, E.: Process for the purifying of N-[3-(3-cyanopyrazolo[1,5-A]pyrimidin-7-yl)phenyl]-N-ethylacetamide (Zaleplon). Teva Pharmaceuticals – World Patent WO 03/011228 (2002)
150. Bugay, D. E., Findlay, W. P.: *Pharmaceutical Excipients*. Marcel Dekker Inc. New York (1999)

[Érkezett: 2010. március 17.]





## Orális nem-szteroid gyulladásgátló gyógyszerek felhasználásának vizsgálata a Budai Irgalmasrendi Kórház II. Reumatológia Osztályának rheumatoid arthritises betegei között

INOTAI ANDRÁS<sup>1</sup>, ROJKOVICH BERNADETTE<sup>2</sup> ÉS MÉSZÁROS ÁGNES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési Intézet, 1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.

<sup>2</sup>Budai Irgalmasrendi Kórház II. Reumatológia Osztály, 1023 Budapest, Árpád fejedelem útja 7.

Levelezési cím: inotai.andras@gytk.sote.hu

### Summary

Inotai, A., Rojkovich, B., Mészáros, Á.: *The assessment of oral NSAID use in patients with rheumatoid arthritis in Hungary – a cross sectional non interventional study*

Continuous NSAID (nonsteroidal anti-inflammatory drug) therapy is associated with gastrointestinal (GI) and cardiovascular (CV) side effects. In this paper, the oral NSAID use of 143 patients with rheumatoid arthritis was assessed focusing on safety and pharmacoeconomic aspects in a cross sectional non interventional study. The most widely used NSAIDs were meloxicam (n = 55, 38,5%) and diclofenac (n=30, 21%). We found that coxibs were overused (n = 13, 9,1%) compared with the average total coxib consumption in Hungary. According to our results, drugs associated with GI friend side effect profile (meloxicam, celecoxib, etoricoxib) were much preferred in patients with previous GI events, than in patients with low GI risk. The previous occurrence of GI events were significantly higher (p=0,019) in patients currently treated with safer NSAIDs, probably because of the so-called 'indication bias'. No statistically significant difference in patient's quality of life could be proved between NSAID drug groups. The uses of NSAIDs were considered to be rational concerning CV and GI risk as well as cost-effectiveness.

**Keywords:** NSAID, rheumatoid arthritis, COX2 inhibitor, coxib, drug utilization studies, cost-effectiveness

### Összefoglalás

A nemszteroid gyulladásgátlók (NSAID-ok) krónikus alkalmazása gastrointesztinális (GI) és kardiovaszkuláris (CV) mellékhatásokkal jár. Kérdőíves keresztmetszeti vizsgálatunkban 143 rheumatoid arthritises (RA-s) beteg orális NSAID terápiáját elemeztük biztonságossági és farmakoökonomiai szempontból. A leggyakrabban alkalmazott hatóanyag a meloxicam (n = 55, 38,5%) és a diklofenak (n = 30, 21%) volt. Koxibokat 13 fő (9,1%) alkalmazott, ami jelentős felülreprezentáltságot mutat az országos adatokhoz képest. A kórtörténetben GI eseménnyel rendelkező betegek között nagyobb arányban fordultak elő a GI szempontból biztonságosabb hatóanyagok (meloxicam, celecoxib, etoricoxib), mint azoknál a betegeknél, ahol nem fordult elő ilyen esemény. Feltehetően az indikáció okozta zavaró hatás miatt a jelenleg biztonságosabb hatóanyagokat szedő betegek kórtörténetében nagyobb a GI események előfordulásának aránya (p=0.019). A betegek életminősége szempontjából az egyes hatóanyagcsoportok között nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget. A gyógyszerelés GI, CV kockázat, valamint a költséghatékonyság szempontjából is racionálisnak tekinthető.

**Kulcsszavak:** NSAID, rheumatoid arthritis, COX2 inhibitor, coxib, gyógyszer-utilizáció, költség-hatékonyság

### Bevezetés

A rheumatoid arthritis (RA) krónikus, progrediáló, destruktív ízületi betegség [1]. Bár terápiájának alapjai mára a betegségmódosító gyógyszerek (DMARD, Disease Modifying Antirheumatic Drugs), és korszerű biológiai terápiák is hozzáférhetőek, továbbra is fontos szerep jut a NSAID (nem szteroid gyulladáscsökkentő) készítményeknek. A hagyományos, döntően COX1 izoenzim gátló NSAID-ok krónikus felhasználásának legnagyobb

kihívása a gastrointesztinális (GI) mellékhatások jelenléte volt. Az elmúlt évtizedben elterjedt szelektív COX2 gátló gyógyszerek (koxibok) releváns dózisban azonos terápiás hatás mellett kevesebb GI mellékhatást ígértek [2]. A rofekoxib, majd több más koxib közelmúltbeli, gyógyszerpiacról való visszavonása [3] azonban a hagyományos NSAID-okhoz képest meglévő kardiovaszkuláris (CV) többletkockázatra hívta fel a figyelmet. Az Egészségügyi Minisztérium „Gyógyszeres fájdalomcsillapítás és gyulladásgátlás a reumatológiai betegségekben”



## II. táblázat

Az orális NSAID-ok megoszlása esetszám szerint és százalékban a teljes betegpopulációban és a kórtörténetben előforduló GI események szerint csoportosítva

Hatóanyag	Teljes vizsgált betegpopuláció		Volt a kórtörténetben/jelenleg is van GI mellékhatás		Nem volt a kórtörténetben és jelenleg sincs GI mellékhatás	
	betegszám	%	betegszám	%	betegszám	%
Diklofenák	30	21,0	2	5,6	28	26,2
Indometacin	1	0,7	0	0,0	1	0,9
Aceklofenák	14	9,8	4	11,1	10	9,3
Piroxikám	1	0,7	0	0,0	1	0,9
Ibuprofen	2	1,4	1	2,8	1	0,9
Naproxen	7	4,9	1	2,8	6	5,6
Flurbiprofen	2	1,4	0	0,0	2	1,9
Meloxikám	55	38,5	19	52,8	36	33,6
Nimeszulid	14	9,8	2	5,6	12	11,2
Celecoxib	3	2,1	2	5,6	1	0,9
Etorikoxib	10	7,0	4	11,1	6	5,6
Tenoxicám	2	1,4	0	0,0	2	1,9
Metamizol	2	1,4	1	2,8	1	0,9
<b>Összesen</b>	<b>143</b>	<b>100,0</b>	<b>36</b>	<b>100,0</b>	<b>107</b>	<b>100,0</b>

## 3. Szelektív COX2 gátlók (koxibok).

A paracetamol tartalmú fájdalomcsillapítókat a minimális gyulladásgátló hatás miatt a vizsgálatból kizártuk.

Az adatok kiértékeléséhez SPSS 15.0 és STATA 10.1 szoftvereket alkalmaztunk. Kategorikus adatok statisztikai elemzésére Fisher-féle egzakt próbát, folytonos adatok elemzésére egyszeres osztályozású variancia-analízist (ANOVA) végeztünk. A csoportok közötti nyers életminőség- és fájdalomérték különbségek korrigálását az alapvető demográfiai (életkor, betegség fennállásának hossza)

és betegségaktivitási (DAS-28, disease activity score) paraméterekre regressziós modellel végeztük.

## Eredmények

A vizsgált betegek alapvető demográfiai mutatóit az I. táblázat tartalmazza. A vizsgált 253 beteg 56,5%-a (143 fő) volt a vizsgálat időpontjában krónikus orális NSAID terápiára állítva. Relatív többségük meloxikám (55 fő, 38,5%) illetve diklofenák (30 fő, 21%) tartalmú készítményeket szedett. Jelen-

## III. táblázat

## Adjuváns gastroprotektív terápiák megoszlása

Összesen	Vizsgált betegpopuláció		Jelenleg alkalmazott GI protektív terápia					
	betegek száma	gyakoriság %	ebből PPI		ebből H2 antagonistá		Összesen	
			betegek száma	gyakoriság %	betegek száma	gyakoriság %	betegek száma	gyakoriság %
Hagyományos NSAID-ok	61	42,7	7	11,5	10	16,4	17	27,9
Erősebb COX2 gátlók	69	48,3	5	7,2	14	20,3	19	27,5
Szelektív COX2 gátlók	13	9,1	4	30,8	0	0,0	4	30,8
<b>Összesen</b>	<b>143</b>	<b>100,0</b>	<b>16</b>	<b>11,2</b>	<b>24</b>	<b>16,8</b>	<b>40</b>	<b>28,0</b>

IV. táblázat

NSAID okozta gastrointesztinális események megoszlása a betegek kórtörténete alapján\*

Összesen	Vizsgált betegpopuláció		GI mellékhatás a kórtörténetben						Teljes magyar lakosság (2007)	
			Gyomorfekély vagy gyomorvérzés		NSAID gastropathia		Összesen			
	betegek száma	gyakoriság %	betegek száma	gyakoriság %	betegek száma	gyakoriság %	betegek száma	gyakoriság %	DDD/1000 lakos/nap	megoszlás %
Hagyományos NSAID-ok	61	42,7	7	11,5	2	3,3	9	14,8	38,32	83,3
Erősebb COX2 gátlók	69	48,3	15	21,7	9	13,0	21	30,4	7,52	16,4
Szelektív COX2 gátlók	13	9,1	3	23,1	4	30,8	6	46,2	0,14	0,3
<b>Összesen</b>	<b>143</b>	<b>100,0</b>	<b>25</b>	<b>17,5</b>	<b>15</b>	<b>10,5</b>	<b>36</b>	<b>25,2</b>	<b>45,99</b>	<b>100,0</b>

\*A „gyomorfekély/gyomorvérzés” és a „NSAID gastropathia” oszlopok összege nem szükségszerűen egyezik meg numerikusan az „összesen” oszloppal, mivel egy betegnek akár többféle GI eseménye is lehetett a kórtörténete során.

tősebb volt még a nimeszulid és az aceklofenak előfordulása (14 fő, 10% mindkét hatóanyag esetén). A szelektív COX2 gátlók etorikoxib és celekoxib 10, illetve 3 fős betegcsoporttal képviseltette magát (II. táblázat). A III. táblázat a NSAID-ok mellé szedett adjuváns terápiák megoszlását vizsgálja. Jól látható, hogy mindhárom vizsgált NSAID hatóanyagcsoport mellett a betegek 27,9-30,8%-a kapott adjuváns terápiaként PPI-t vagy H2 antagonistát, míg a teljes vizsgált betegpopulációban az adjuváns gastroprotektív terápia előfordulásának átlaga 28% volt. Azok közül a betegek közül, akik NSAID-ot szednek és akiknél a kórtörténetben előfordult, vagy jelenleg fennáll a vizsgált GI események valamelyike (36 fő), 10 beteg szed PPI-t (27,8%) és 5 H2 antagonistát (13,9%). Mivel a betegek a két GI protektív hatóanyag egyikét kapták csak egyszerre, összesen 41,7%-uk részesült ilyen kezelésben.

A IV. táblázatban megfigyelhető, hogy a GI mellékhatások a beteg kórtörténetében a COX1 gátlók esetén fordulnak elő a legkisebb, míg a szelektív COX2 gátlók esetén a legnagyobb százalékban. Bár a tendencia mindkét vizsgált esemény (gyomorfekély/gyomorvérzés ill. NSAID gastropathia) tekintetében megfigyelhető, a NSAID gastropathia esetén kifejezettebb volt. Összességében a GI mellékhatások statisztikailag szignifikánsan gyakrabban fordultak elő ( $p = 0,02$ ) a COX2 gátlókat használók körében.

Az V. táblázatban a három NSAID csoportban lévő betegek demográfiai paramétereinek és a PRO-k (patient reported outcomes) átlagainak (életminőség kérdőívek aggregált pontértéke és fájdalom VAS) egymástól való különbözőségét vizsgáltuk a NSAID hatóanyagcsoport, mint csoportváltozó alapján. A VI. táblázat a hagyományos NSAID-hoz, mint referenciacsoporthoz hasonlítja

V. táblázat

NSAID hatóanyagcsoportok és az életminőség I.

Mutató	Hagyományos NSAID-ok		Erősebb COX2 gátlók		Szelektív COX2 gátlók		ANOVA
	átlag	szórás	átlag	szórás	átlag	szórás	p értéke
DAS-28	4,57	1,42	4,42	1,62	3,85	1,46	0,3122
Életkor	57,03	12	55,75	12,98	55,85	9,77	0,8316
Betegségfennállás	13,67	10,05	11,25	7,33	13,67	14,51	0,3076
EQ5D index	0,464	0,35	0,526	0,31	0,568	0,2	0,4104
EQ5D VAS	53,75	21,23	59,99	19,04	58	17,54	0,2052
RAQoL	13,57	8,13	13,07	7,71	11,31	5,39	0,6298
Fájdalom VAS	53,05	24,49	46,91	23,18	36,62	19,6	0,0546

NSAID hatóanyagcsoportok és az életminőség II.

Mutató	Hagyományos NSAID-ok vs. Erősebb COX2 gátlók				Hagyományos NSAID-ok vs. Szelektív COX2 gátlók			
	nyers különbség (95%-os CI)	p értéke	korrigált különbség* (95%-os CI)	p értéke	nyers különbség (95%-os CI)	p értéke	korrigált különbség* (95%-os CI)	p értéke
DAS-28	-0,15 (-0,69; 0,38)	0,576			-0,71 (-1,64; 0,21)	0,128		
Életkor	-1,28 (-5,56; 3,00)	0,556			-1,19 (-8,63; 6,25)	0,753		
Betegség-fennállás	-2,42 (-5,67; 0,82)	0,143			-0,005 (-5,82; 5,81)	0,999		
EQ5D index	0,062 (-0,049; 0,173)	0,273	0,045 (-0,053; 0,143)	0,367	0,104 (-0,089; 0,297)	0,290	0,027 (-0,147; 0,200)	0,759
EQ5D VAS	6,23 (-0,68; 13,14)	0,077	5,83 (-0,89; 12,55)	0,088	4,25 (-7,77; 16,26)	0,486	0,46 (-11,42; 12,34)	0,939
RAQoL	-0,50 (-3,19; 2,18)	0,713	-0,34 (-2,77; 2,08)	0,778	-2,27 (-6,93; 2,40)	0,339	-0,44 (-4,73; 3,85)	0,839
Fájdalom VAS	-6,14 (-14,29; 2,019)	0,139	-4,53 (-11,28; 2,22)	0,186	-16,43 (-30,61; -2,26)	0,023	-9,72 (-21,65; 2,21)	0,109

\*Korrigálva korra, a betegség fennállásának időtartamára és a betegség aktivitására.

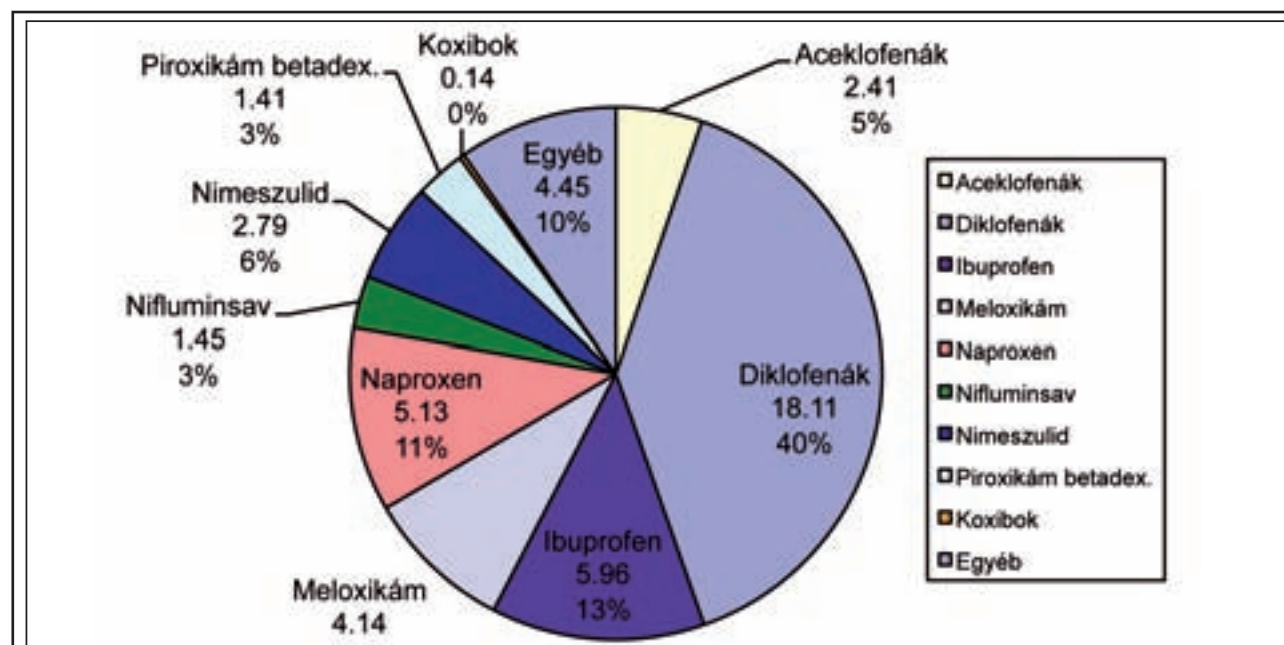
az erősebb COX2 gátló nimeszulid és meloxicam, valamint a koxibok (szelektív COX2 gátlók) csoportjában lévő betegek adatainak átlagát. A változók átlagának nyers különbsége, ezek konfidencia-intervallumai és a hozzá tartozó p értékek mellett feltüntettük a PRO-k korra, betegségaktivitására, valamint betegség fennállásának hosszára korrigált különbségeit, ezek konfidencia-intervallumait és a hozzá tartozó p-értékeket is.

### Megbeszélés

Az általunk vizsgált betegcsoport demográfiai mutatói összevethetőek Péntek és mtsai által 2004-ben végzett, hasonló létszámú (n = 255) multicent-

rikus vizsgálat [7, 8] adataival. Ez alapján a betegségaktivitás (DAS-28) tekintetében enyhébb súlyosságú betegcsoportról beszélhetünk, bár a betegpopuláció idősebb, a betegség fennállásának ideje pedig hosszabb jelen vizsgálat esetén. A fentiek miatt, továbbá annak következményeként, hogy jelen vizsgálat egy reumatológiai centrumban folyt, adataink általánosíthatósága a teljes hazai RA-s populációra nem teljes körű.

Az általunk alkalmazott NSAID okozta gastropathia definíciója valamivel szigorúbb, mint a szakmai protokollban ismertett [9], hiszen mi a tényleges fájdalommal járó eseteket rögzítettük, de nem számítottuk ide az alhasi diszkomfort enyhébb tünetcsoportjait.



1. ábra: Az orális NSAID-ok megoszlása százalékban és országos felhasználásuk szerint (Hatóanyag neve; DDD/1000 lakos/nap; %-os arány)

*Gyógyszerutilizációs szempontok**Biztonságosság*

A 143, krónikus NSAID terápián lévő beteg orális felhasználási adatait összevetettük egy közel-múltbeli, a teljes lakosság NSAID felhasználását (1. ábra) vizsgáló közleményünk [10] eredményeivel. Jól látható, hogy a teljes lakossági felhasználásból 18,11 DDD/1000 lakos/nap értéket kitevő diklofenak (hagyományos NSAID) felhasználása a vizsgált RA-s betegcsoportban háttérbe szorult. A COX2 izoenzimet erősebben gátló nimeszulid és meloxicam azonban az RA-s betegcsoportban összesen 49%-os részesedést képvisel, miközben a teljes lakosságban 2,79 ill. 4,14 DDD/1000 lakos/nap értékkel csupán 15%-os együttes arányt ért el. A koxibok 9%-os részesedése is komoly felülreprezentáltságot mutat az országos 0,141 DDD/1000 lakos/nap értékhez képest (kevesebb, mint 0,5%).

A szembetűnő különbségek mögött a felhasználói körben való eltérések és a különböző napi terápiás költségek állhatnak. Amint azt már korábban vizsgáltuk [11], a döntően COX1 gátló hagyományos NSAID-ok napi terápiás átlagköltségei (NTK) tekinthetők a legalacsonyabbnak, azonban ezek GI tolerálhatósága nem éri el a COX2-t erőteljesebben gátló nimeszulid és meloxicam [5, 12, 13] valamint a koxibok szintjét. Ez utóbbi hatóanyagcsoport mind a hagyományos NSAID-okhoz, mind a nimeszulidhoz és meloxicamhoz képest magasabb NTK mellett kevesebb GI mellékhatást ígér [14, 15]. Az országos fogyási adatok vélhetően mind krónikus, mind akut NSAID szedési eseteket reprezentálnak, míg a vizsgált RA-s betegpopuláció az interjúk alapján döntően krónikus felhasználója az orális NSAID terápiáknak. Ebből az következik, hogy mivel az NSAID-ok okozta GI mellékhatások dózis- és terápiás idő-függőek [5, 16], ezért rövid szedési időt és általános kockázati tényezőket feltételezve (teljes lakosság aggregált adatai) az alacsonyabb NTK-jú hagyományos NSAID-ok tűnnek racionális választásnak. A RA-s betegcsoportban azonban a krónikus felhasználás miatt komolyabb a GI mellékhatások előfordulásának valószínűsége, ami a betegek fokozottabb átállítását indokolja a hosszútávon jobb tolerálhatóságú, magasabb NTK-val rendelkező erősebb COX2 gátlóra, valamint a koxibokra. Utóbbiak mind GI tolerálhatóságban, mind NTK tekintetében meghaladják a nimeszulidot és a meloxicamot.

A II. táblázat azt mutatja, hogy a GI kockázat szempontjából kevésbé biztonságos diklofenakot a kórtörténetben GI eseménnyel rendelkező betegek kisebb százaléka szedi, mint ahol ilyen esemény még nem fordult elő (5,6% vs. 26,2%). Fordított a helyzet a biztonságosabbnak tartott meloxicam, celecoxib és etorikoxib esetén, ahol az adott hatóanyagra állított betegek százalékos aránya magasabb a kórtörténetben GI eseménnyel rendelkező betegek körében (arányok: meloxicam: 52,8% vs. 33,6%, celecoxib: 5,6% vs. 0,9%, etorikoxib: 11,1% vs. 5,6%). Ez a biztonságosabb, de magasabb napi terápiás költségű NSAID-ok racionális felhasználását mutatja.

A IV. táblázat adatai látszólag ellentétesek azzal a szakirodalmi megállapítással, amely szerint a COX1 gátlók körében fordult elő a legmagasabb arányban GI esemény és a szelektív COX2 gátló koxibok pedig a legbiztonságosabbnak tekinthetők GI mellékhatások szempontjából. Adataink példát mutatnak az indikáció okozta zavaró hatás [17] farmakoepidemiológiai jelenségére, amely szerint a legeredményesebbnek vélt gyógyszert a legsúlyosabb állapotú betegek kapják. (Ha mellékhatást vizsgálunk, amelynek elkerülése motiválja a döntést, mint jelen esetben is, a *kontraindikáció okozta zavaró hatás* jelenik meg.) Nem paralel elrendezésű, nem randomizált vizsgálat esetén az eleve fokozottabb kockázatú betegek miatt ezeknél a készítményeknél az eredményesség látszólag rosszabb lehet, mint a kevésbé biztonságosnak tekintett, ám enyhébb kockázatú betegcsoporton alkalmazott készítményé. Bár nem rendelkezünk pontos adatokkal a múltban szedett NSAID terápiákról, adataink azt a feltételezést látszanak igazolni, hogy a korábban hagyományos NSAID-on lévő betegeket GI mellékhatás jelentkezése után nimeszulid-ra és meloxicamra, illetve szelektív COX2 gátlóra állították át. Ennek a feltételezett terápiaváltásnak a pontos időpontjáról nincs információnk, mindazonáltal ez magyarázatul szolgálhat arra, hogy retrospektív elemzésünkben miért észleltünk a betegek kórtörténetében a koxiboknál lényegesen több GI mellékhatást, mint a kevésbé biztonságosnak tekintett szereknél. Az elvégzett Fisher-egzakt teszt statisztikailag szignifikáns különbséget igazol a hatóanyag-csoportok között a GI események gyakorisága tekintetében.

Nem megkerülhető emellett a koxibok emelkedett kardiovaszkuláris kockázata sem, a vizsgálat-

ban résztvevő 8, AMI-n átesett beteg egyike sem volt szelektív COX2 terápiára állítva. A tágabb értelemben vett CV kockázattal (pl. trombózis előfordulása a kórtörténetben) rendelkező 22 beteg közül 2 volt etorikoxib terápián. Az eredmények azt igazolják, hogy az anamnézisben előforduló CV eseményeket figyelembe veszik a krónikus NSAID terápia kiválasztásánál.

### *Költség-hatékonyság*

A celecoxib inkrementális költség-hatékonysági rátája (ICER) RA-ban a közelmúltban publikált méréseink szerint [18, 19] a hagyományos NSAID-okhoz képest magasabb (59 486 Euro/QALY, Quality adjusted life years), mint a hagyományos NSAID + PPI kombinációs terápia ICER értéke (14 287 Euro/QALY). Ez utóbbihoz képest többlet-egészségnyereséget tehát feltehetően a szelektív COX2 gátlók PPI-al való kombinációja eredményez [20]. Ezen kombináció magas NTK-ja és költségprémiuma viszont racionálisan csak kiemelten magas GI kockázatú betegek esetében alkalmazható célszerűen. Megerősíti a fenti hipotézist, hogy a három, krónikus celecoxib terápián lévő betegből kettő fájdalomcsillapítóját PPI-al való kombinációs terápiában szedi, a kórtörténetben előforduló GI események megnövekedett kockázata miatt. A magasabb ICER érték (gyengébb költség-hatékonysági mutató) visszaigazolja vizsgálatunkban a celecoxib kis volumenű, speciális rizikófaktorú betegcsoportban történő felhasználását.

### *Életminőség*

A V. táblázat alapján megállapítható, hogy a vizsgált PRO-k tekintetében csak a fájdalomskála esetén különböztek a vizsgált csoportok statisztikailag jelentős mértékben. ( $p = 0,055$ ). Mivel a vizsgált PRO-k átlagának eltérését számos tényező okozhatta a NSAID hatóanyagcsoportban lévő különbségen kívül, ezért az adatok betegségaktivitásra, korra, betegség fennállási időre való korrigálását is elvégeztük. A VI. táblázat adataiból megállapítható, hogy a hagyományos NSAID-okhoz, mint referenciacsoporthoz képest a szelektív COX2 gátló csoport által jelzett fájdalom VAS szint statisztikailag szignifikánsan eltér ( $p = 0,02$ ), a különbség pedig az adatok korrigálása után is megmarad, noha a bizonyíték statisztikai ereje ekkor már gyengébb ( $p = 0,1$ ). Az életminőség adatok tekintetében egyedül az EQ-5D VAS (hagyományos

NSAID vs. erősebb COX2 gátló) esetén találtunk gyenge bizonyítékot a két csoport különbségéről, azonban ez statisztikailag nem volt szignifikáns és klinikai relevanciája is kérdéses. Noha az NSAID-ok esetén a fájdalmat jelző VAS skála fontos kimenetnek tekinthető, a következtetések általánosíthatóságát korlátozza, hogy nem rendelkezünk betegsúlyú dózis adatokkal a vonatkozó készítményekre. Az alacsonyabb fájdalomszintet (jelen esetben magasabb eredményességet) a koxibok esetén az is okozhatta, hogy a komolyabb GI kockázat miatt a hagyományos NSAID-okat esetleg csak terápiásan szuboptimális dózisban tolerálják a betegek. Mindez – mivel az NSAID-ok hatása dóziszfüggő lehet – befolyásolhatta az eredményeket.

### *A vizsgálat korlátai*

Eredményeink interpretálhatóságát korlátozza, hogy az NSAID-ok dózisára vonatkozóan a betegtől nem lehetett megbízható információt nyerni. Hipotéziseink, megállapításaink bizonyos részének teljes körű igazolásához az elérhetőnél részletesebb kórtörténeti és terápiás adatokra, valamint magasabb betegszámra volna szükség. Az egycentrumú vizsgálati elrendezés az adatok általánosíthatóságát korlátozza.

### **Konklúzió**

Vizsgálatunk igazolja a hazai RA-s betegek NSAID terápiájának racionalitását mind biztonságossági, mind farmakoökonomiai szempontból. A GI szempontból biztonságosabbnak tekintett hatóanyagokra – nimeszulid, meloxicam – a NSAID-ot szedő betegek közel fele (48,3%) volt állítva. Az országos felhasználáshoz képest a szelektív COX2 gátlók (9,1%) is jelentős felülreprezentáltságot mutatnak. Feltehetően az indikáció okozta zavaró hatás miatt az említett hatóanyagokat szedő betegek kórtörténetében gyakoribbak voltak a GI mellékhatások ( $p = 0,02$ ), a kórtörténetben GI eseményekkel rendelkező betegeket ezekre a biztonságosabb szerekre állították át. Az NSAID-ot szedő betegeket vizsgálva, a kórtörténetben GI eseménnyel rendelkező betegek nagyobb százalékban alkalmaztak biztonságosabb NSAID-okat (meloxicam, celecoxib, etorikoxib), mint akiknél ilyen esemény még nem fordult elő. Nem találtunk erős bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy az egyes hatóanyagcsoportok betegeinek életminősége eltérne. A hagyományos NSAID-ot szedő betegek fájdalma

szignifikánsan magasabb volt a koxibok alkalmazásánál, amely bizonyíték jelentősen gyengült a demográfiai és betegségaktivitási adatokra való korrekciót követően. A racionális gyógyszeres terápia jelentősége kiemelkedő az erőforrások orvos-szakmai szempontokat figyelembe vevő, költség-hatékony, méltányos felhasználása érdekében.

#### IRODALOM

1. Péntek, M., Poór, Gy., Czirják, L., Rojkovich, B. et al.: *Magy. Reumatol.* 48, 42-51 (2007).
2. Bhatt, D. L., Scheiman, J., Abraham, N. S., Antman, E. M., et al.: *J Amer Coll Cardiol* 52, 1502-17 (2008)
3. Coruzzi, G., Venturi, N., Spaggiari, S.: *Acta Biomed.* 78(2), 96-110 (2007)
4. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja: Gyógyszeres fájdalomcsillapítás és gyulladásgátlás a reumatológiai betegségekben. <http://www.eum.hu/egeszsegpolitika/minosegfejlesztes/reumatologia>. [2010.01.24.]
5. *American College of Rheumatology ad hoc group on use of selective and nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* *Arthritis Care Res.* 59(8), 1058-1073 (2008)
6. Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A. et al.: *Arthritis Rheum.* 31, 315-24 (1988)
7. Péntek, M., Szekanecz, Z., Czirják, L., Poór, Gy. et al.: *Orv. Hetil.* 149, 733-741 (2008)
8. Brodszky, V., Bálint, P., Géher, P., Hodinka, L., Horváth, G., Koó, É., Péntek, M., Polgár, A., Seszták, M., Szántó, S., Ujfalussy, I., Gulácsi, L.: *Rheumatol. Int.* 30, 199-205 (2009)
9. <http://www.eum.hu/egeszsegpolitika/minosegfejlesztes/haziorvostan> [2010.01.04.]
10. Inotai, A., Hankó, B., Mészáros, Á.: *Pharmacoepidemiol. Drug. Saf.* 19, 183-190 (2010)
11. Inotai, A., Vincze, Z.: *Acta Pharm. Hung.* 78(2), 79-86 (2008)
12. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J.: *Rang—Dale's pharmacology, (6th ed).* Churchill Livingstone—Elsevier, London, 2007. 226-237. old.
13. Bjarnason, I., Thjodleifsson, B.: *Rheumatology.* 38(suppl.1), 24-32 (1999)
14. Silverstein, F.E., Faich, G., Goldstein, J.L., Simon, L.S., Pincus, T., Whelton, A., et al.: *JAMA.* 284, 1247-55 (2000)
15. Goldstein, J.L., Silverstein, F.E., Agrawal, N.M., et al.: *Am J Gastroenterol.* 95, 1681-1690 (2000)
16. Antman, E.M., Bennett, J.S., Daugherty, A., Furberg, C. et al.: *Circulation.* 115, 1634-42 (2007)
17. Lakner, G., Renczes, G., Antal, J.: *Klinikai vizsgálatok kézikönyve.* SpringMed, Budapest, 2009. 232.old.
18. Inotai, A., Mészáros, Á.: *Int. J. Technol. Assess. Health. Care.* 25(2), 190-195 (2009)
19. Inotai, A., Mészáros, Á.: *IME – Az egészségügyi vezetők lapja.* 7, 48-50 (2008)
20. Ray, W.A., Chung, C.P., Stein, C.M. et al.: *Gastroenterology.* 133, 790-8 (2007)

[Érkezett: 2010. február 23.]





## Szerzői útmutató

Az *Acta Pharmaceutica Hungarica* a gyógyszerészeti tudományok területéről közöl eredeti, kísérletes kutatómunka eredményeit bemutató közleményeket, de fórumot biztosít összefoglaló és nem kísérletes (történeti, szervezési) tanulmányok, valamint Ph.D. és D.Sc. értekezések téziseinek közlésére is.

Hazai kutatóhelyek vagy olyan szerzői kollektívák magyar nyelvű kéziratait közöljük, ahol az első szerző magyar. Lehetőség van külföldi folyóiratban már megjelent, kiemelkedő jelentőségű közlemények magyar nyelvű változatának közlésére is, az első megjelenés időpontjától számított egy éven belül, az első közlés bibliográfiai adatainak megjelölésével.

### Közlésre elfogadunk:

1. *Összegyűjtő közleményeket*, legfeljebb 25 gépelt oldal terjedelemben. Ezek megírására általában a szerkesztőbizottság felkérésére kerülhet sor, illetve az erre irányuló szándékot célszerű előzetesen egyeztetni a szerkesztőbizottsággal.

2. *Közleményeket*, legfeljebb 12 gépelt oldal terjedelemben. Az ábrák és táblázatok együttes száma maximálisan 10 lehet.

3. *Rövid közleményeket*, legfeljebb 4 gépelt oldal terjedelemben (összesen legfeljebb 4 ábra és táblázat). A közlemények megjelenési sorrendjében a rövid közlemények előnyt élveznek.

4. *Ph.D. értekezések összefoglaló közleményét*, legfeljebb 25 oldal terjedelemben.

Feleslegesen nagy terjedelmű dolgozatok esetében a szerkesztőbizottság fenntartja magának a jogot arra, hogy a lektori javaslatok alapján a szerzőt felkérje dolgozatának rövid közleménnyé való átdolgozására.

### A kézirat elkészítésének módja:

#### a) Általános szempontok

A kéziratot elektronikusan, csatolt file-ként kell a felelős szerkesztő e-mail címére elküldeni: zelrom@gytk.sote.hu

A táblázatokat külön file-ként, címmel és római sorszámmal ellátva készítsük.

Az ábrák és egyéb illusztrációk olyan színvonalon készüljenek, hogy azok nyomdai szerkesztésre alkalmasak legyenek. Az ábrákat külön file-ként kell csatolni, az elnevezésben az ábraszámokat fel kell tüntetni. Javasolt formátum: jpg, tiff.

Az *irodalmi hivatkozásokat* külön, a hivatkozások sorrendjében közöljük. A hivatkozási számot a szövegben tegyük szögletes zárójelbe.

A hivatkozások módja:

Folyóiratcikk:

1. Revell, L. K., Musser, S. M., Rowe, B. J., Feldmann, I. C.: *J. Pharm. Sci.* 86, 631-634 (1997)

Szakkönyv:

2. Gyarmati L., Rácz I., Plachy J., Csontos A.: *A gyógyszer-technológia és biofarmácia kémiai ellenőrző módszerei.* Medicina, Budapest, 1982. 147-152. old.

Könyvfejezet:

3. Ariens, E. J.: Racemates – an impediment in the use of drugs and agrochemicals. In: Krstulovic, A.M. (ed): *Chiral Separations by HPLC.* Ellis Horwood, Chichester, 1989. pp. 31-68.

Szabadalom:

4. *U.S. Pat.* 3 425 422 (1984)

Konferencia-előadás:

5. Duncan, R.: Polymer therapeutics: Targeting drugs and genes to tumours. 6<sup>th</sup> European Congress of Pharmaceutical Sciences. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11, (2000) S1-S2.

*Internetes hivatkozás:* teljes URL-cím a keresőablakból kimásolva és az elérés dátuma az alábbiak szerint:

6. <http://www.eum.hu/main.php?folderID=3746&objectID=6000268> [2008. 08. 05.] Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja - Gyógyszeres fájdalomcsillapítás és gyulladásátlás a reumatológiai betegségekben.

Az idegen orvosi kifejezések helyesírásában *Fábián P. és Magasi P.*: Orvosi helyesírási szótár. Akadémiai Kiadó, 1992. legyen az irányadó, a kémiai kifejezések nevezéktanára és helyesírására vonatkozóan pedig *Erdey-Grúz T. és Csányi P.*: A kémiai elnevezés és helyesírás szabályai. Akadémiai Kiadó, 1972.; *F. Csányi P., Fábián P. és Hőnyi E.*: Kémiai helyesírási szótár. Műszaki Kiadó, 1982.; valamint *F. Csányi P. és Simándi L.*: Szeretlen kémiai nevezéktan. Magyar Kémikusok Egyesülete, 1995.

A mértékegységek megjelölésében az SI-mértékrendszer szabályai az irányadók.

#### b) A kézirat felépítése

A kézirat szerkesztéséhez a következő beosztást kérjük:

A *dolgozat címe* (esetleg alcíme).

A *szerző(k) teljes neve* (tudományos fokozatok nélkül), a szerkesztőséggel kapcsolatot tartó szerző neve csillaggal megjelölve.

A szerző(k) *munkahelye* teljes postai címmel, valamint a *levelező szerző e-mail címe*.

A *dolgozat magyar nyelvű összefoglalása*.

A magyar nyelvű összefoglalás terjedelme a dolgozat hosszától függően 10-20 sor legyen és az általános megfogalmazások kerülésével tartalmazza a dolgozat legfontosabb, konkrét megállapításait.

**Kulcsszavak:** A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó megadása.

A dolgozat *címe angol nyelven*, a szerző(k) neve (keresztnevek rövidítve).

*Angol nyelvű összefoglalás.*

**Bevezetés**, amely tartalmazza a munka célkitűzéseit, valamint a vizsgálatok előzményeiből és irodalmi háttéréből annyit, amennyi a dolgozat megértéséhez és értékeléséhez szükséges.

**Key-words:** A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó angol nyelvű fordítása.

**Kísérleti rész**, amely tartalmazza a felhasznált eszközök és anyagok, valamint a kidolgozott módszerek pontos leírását.

**Eredmények.**

A dolgozatok csak a leírt módszerek teljesítőképességét megfelelően dokumentáló adatokkal fogadhatók el. Ezek megadásánál használjuk a matematikai statisztika korszerű módszereit.

**Az eredmények értékelése.**

**Ábracímek.**

**Következtetések.** Az utóbbi két fejezet összevonható az *Eredmények c.* fejezettel.

Az esetleges **köszönetnyilvánítások.**

**Irodalomjegyzék.**



