

Magyar

Kémiai Folyóirat

Kémiai Közlemények

122. ÉVFOLYAM, 2016

2-4

A Magyar Kémikusok Egyesülete tudományos folyóirata
A Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Osztályának közleményei
Magyar Kémiai Folyóirat 122. évfolyam, 2-4. szám 53-212. oldal, 2016

Útmutatás szerzőknek

A Magyar Kémiai Folyóirat fő feladata egyrészt a magyar kémiai szaknyelv folyamatos ápolása, s a kémiai tudomány fejlődéséhez, az aktuális tudományos újdonságokhoz alkalmazása, egyidejűleg a minél teljesebb körű szakmai információ-csere késedelem nélkül biztosítása, s az, hogy magas szakmai színvonalon tegye hozzáférhetővé az érdeklődők számára a hazai és külföldön élő magyar kémikusok kiemelkedő tudományos kutatási eredményeit, sikereit és mutassa be a kémiai tudományok világszerte bekövetkező fejlődését, változását, a kémia legfrissebb vívmányait, alkalmazásait, az érdeklődés gyújtópontjába kerülő területeit, másrészt, hogy segítséget nyújtson következő kémikus nemzedékeknek a kémiai tudomány anyanyelven való megismeréséhez, a kémiai ismeretek, fogalmak szakmailag helyes és pontos magyar nyelvű kifejezéseinek megtanulásához.

A Magyar Kémiai Folyóirat negyedévenként jelenik meg. Eredeti magyarnyelvű közleményeket – az alább megadott, szigorúan korlátozott terjedelemben, a nemzetközi tudományos folyóiratok átlagos színvonalát elérő munkák esetén – jelentet meg, előnybe részesítve fiatal kutatók első önálló közleményeit. Összefoglaló cikkeket közöl (felkérés alapján) hazai kiemelkedő teljesítményű kutatóműhelyek hosszabb idő alatt elért eredményeiről, hazai nemzetközi konferenciákról, a nemzetközi érdeklődés gyújtópontjába került kutatási területekről, bemutatta a friss eredményeket, fejlődési irányokat, s ha van, a hazai hozzájárulást, külföldön élő, sikeres magyar származású vegyész-kutatók munkájáról, a szomszédos országokban, határainkon kívül működő magyar kémikusok közzétételre érdemes tudományos eredményeiről. Helyet kapnak a folyóiratban könyvismertetések, kémiai és rokontárgyú kiadványokról. Külön rovatként közli a korábban már a Magyar Kémiai Folyóirat-ba beolvasd Kémiai Közlemények profiljából átvéve akadémiai székfoglalók, MTA doktora címért megvédett értekezések és PhD-dolgozatok összefoglalóit és akadémiai fórumokon elhangzott egyes előadások rövidített változatát. Idegen nyelven már közzétett cikkek másod-közlését a folyóirat nem vállalja. Terjedelem túllépést csak a szerkesztőbizottság hozzájárulásával, a többlet terjedelemben megváltása ellenében fogad el.

Az egyes közlemény-fajták térítésmentesen, szerkesztőbizottsági hozzájárulás nélkül kitölthető terjedelme (nyomtatott oldalak):

1. Összefoglaló közlemények a) jelentős, aktuális kutatási terület legújabb nemzetközi eredményeiről: max. 8 + 1 oldal angol nyelvű kivonat, b) kiemelkedő hazai kutatóhelyek újabb eredményeiről, ill. c) külföldön alkotó magyar származású kiemelkedő elismertségű kutatók munkásságáról: max. 6 + 1 oldal angol nyelvű kivonat.
2. Eredeti közlemények: új tudományos eredményeket bemutató, lektorált magyar nyelvű közlemények: max. 4 + 1 oldal angol nyelvű kivonat. Előnyt élveznek fiatal kutatók (pl. kiemelkedő PhD értekezések összefoglalója) és határon túli magyar kutatók munkái.
3. A "Kémiai Közlemények" rovatban a) Akadémiai székfoglaló előadások rövidítve és b) MTA Doktora védések anyagának összefoglalói: max. 4-4, továbbá c) a Szerk. Bizottság, vagy az MTA Kémiai Tud. Osztálya által kiválasztott és az Osztály szervezésében elhangzott előadás összefoglalója: max. 2 oldal + féloldalas angol nyelvű kivonat.
4. Könyvismertetés: max. fél oldal.

A megadott maximális terjedelemben túllépéséhez esetenként a Szerkesztő Bizottság – a költség-többlet szerző általi megtérítése ellenében – hozzájárulhat.

A kézirat elkészítését segítő mintafajlt, valamint a részletes formai követelményeket a folyóirat honlapján találja meg:

Magyar Kémiai Folyóirat

HUNGARIAN JOURNAL OF CHEMISTRY

és

MTA Kémiai Közlemények

A Magyar Kémikusok Egyesületének lapja

Megindította Than Károly 1895-ben

Főszerkesztő: Sohár Pál**A szerkesztőbizottság tagjai:**Baranyai András, Felinger Attila, Gelencsér András,
Keglevich György, Szilágyi László, Wölfling János**Szerkesztő:** Huszthy Péter**Technikai szerkesztő:** Nagy Tibor Zsigmond**TARTALOMJEGYZÉK**

Főszerkesztői levél..... 55

Greiner István: Kémiai kutatás és fejlesztés a hazai
gyógyszeriparban 56**KÖZLEMÉNYEK***Szente Lajos, Szilágyi Erzsébet, Szejtli Gabriella:*
CycloLab Kft: A Chinoin Rt. Biokémiai Kutató
Laboratóriumától az Illatos úti gyárig..... 57*Szente Lajos, Fenyvesi Éva:* Szejtli József élete és
fontosabb felismerései a ciklodextrinek gyógyszeres
alkalmazása terén 60*Bálint Mihály, Fenyvesi Éva:* A ciklodextrinek
élelmiszeripari alkalmazásai napjainkban..... 65*Puskás István, Schrott Mária:* A ciklodextrinek
aggregációjának gyógyszerformulázási
következményei 71*Benkovics Gábor, Malanga Milo, Fenyvesi Éva:*
A „látható” ciklodextrinek: fluoreszcensen jelölt
ciklodextrinek szintézise és sejtbiológiai alkalmazása
..... 76*Fenyvesi Éva, Szente Lajos:* Ciklodextrinokkal
segített új szennyvíz-tisztítási eljárások: a kémcsőtől a
szennyvíztisztító telepig..... 83*Szemán Julianna, Csabai Katalin, Sohajda Tamás:*
Ciklodextrinek korszerű analitikája: ciklodextrinre
szabott kromatográfias állófázisok fejlesztése 90*Domány György, Galambos János, Gál Krisztina:*
A metabotrop glutaminsav receptor 5 negatív
allostérikus modulátorainak kutatása 95**CONTENTS**

Letter from the editor-in-chief..... 55

István Greiner: Chemical R&D in the Hungarian
Pharmaceutical Industry..... 56**PAPERS***Lajos Szente, Erzsébet Szilágyi, Gabriella Szejtli:*
CycloLab Ltd: From the Chinoin Biochemical Lab to
the Pharmaceutical Factory..... 57*Lajos Szente, Éva Fenyvesi:* József Szejtli and his
important findings in the pharmaceutical application
of cyclodextrins..... 60*Mihály Bálint, Éva Fenyvesi:* Application of
cyclodextrins in the food industry..... 65*István Puskás, Mária Schrott:* Pharmaceutical use of
cyclodextrins: advantages and disadvantages of self-
assembly..... 71*Gábor Benkovics, Milo Malanga, Éva Fenyvesi:* The
“visible” cyclodextrins: Synthesis and cell biological
application of fluorescent-tagged cyclodextrins 76*Éva Fenyvesi, Lajos Szente:* Cyclodextrin-enabled
novel waste water treatment technologies: from the
test tube to the waste water treatment plant 83*Julianna Szemán, Katalin Csabai, Tamás Sohajda:*
State of art analysis of cyclodextrins: development of
tailor-made stationary phases specifically designed for
cyclodextrin analysis..... 90*György Domány, János Galambos, Krisztina
Gál:* Search for negative allosteric modulators of
metabotropic glutamate receptor 5..... 95

<i>Mahó Sándor, Greiner István, Csörgei János, Sánta Csaba, Sörös Béla, Ledeczki István: Szteroidkémiai kutatás-fejlesztés a Richter Gedeon Nyrt.-ben.....</i>	104	<i>Sándor Mahó, István Greiner, János Csörgei, Csaba Sánta, Béla Sörös, István Ledeczki: Steroid Research and Development at Gedeon Richter Plc.</i>	104
<i>Domány György, Greiner István: A kémia, ami a cariprazine-hoz vezetett</i>	112	<i>György Domány, István Greiner: The chemistry that lead to cariprazine</i>	112
<i>Dargó Gergő, Balogh György Tibor: pH-metriás titrálás a fizikai-kémia alapú gyógyszerkémia szolgálatában: ciklodextrin-gyógyszermolekula komplexképzés vizsgálata (gyors) UV-pH titrálással</i>	117	<i>Gergő Dargó, György Tibor Balogh: pH-metric titration as a versatile tool for physico-chemical based medicinal chemistry: study on the cyclodextrin complexation of drugs using (fast) UV-pH titration</i>	117
<i>Iff. Szántay Csaba, Sánta Zsuzsanna, Háda Viktor: Nagyműszeres szerkezetkutatás a Richter Gedeon Nyrt.-ben</i>	124	<i>Csaba Szántay Jr., Zsuzsanna Sánta, Viktor Háda: Structure elucidation by NMR spectroscopy and mass spectrometry at Gedeon Richter.....</i>	124
<i>Babják Mónika, Czipóné Takács Tímea, Meszlényi Gábor: Gyógyszeranalitika a fejlesztő szemével ..</i>	134	<i>Mónika Babják, Tímea Czipóné Takács, Gábor Meszlényi: Drug analysis from a developer's point of view</i>	134
<i>Demeter Ádám, Szalay Zsófia, Janke Dénes, Marosi Attila: Gyógyszerhatóanyagok polimorfiaja komplex megközelítésben.....</i>	143	<i>Ádám Demeter, Zsófia Szalay, Dénes Janke, Attila Marosi: Pharmaceutical polymorphism research in complex treatment.....</i>	143
<i>Éles János, Bozó Éva, Hornok Katalin, Szentirmay Éva, Beke Gyula, Borza István, Vágó István, Huszár József, Bényei Gyula, Domány György, Keserű György Miklós, Greiner István: Bradykinin B1 receptor antagonist molekula kutatása fájdalom kezelésére.....</i>	154	<i>János Éles, Éva Bozó, Katalin Hornok, Éva Szentirmay, Gyula Beke, István Borza, István Vágó, József Huszár, Gyula Bényei, György Domány, György Miklós Keserű, István Greiner: Bradykinin B1 receptor antagonist research for the treatment of pain</i>	154
<i>Porcs-Makkay Márta, Pandur Angéla, Simig Gyula, Volk Balázs: 2H-1,2,3-Benzotiadiazin-1,1-dioxidok előállítása, redukciós és alkilezési reakcióik. Egy érdekes mezoionos vegyületsalád szintézise.....</i>	162	<i>Márta Porcs-Makkay, Angéla Pandur, Gyula Simig, Balázs Volk: Preparation of 2H-1,2,3-benzothiadiazine 1,1-dioxides and consecutive reduction-alkylation reactions thereof. Synthesis of a family of compounds with an interesting mesoionic structure</i>	162
<i>Milen Mátyás, Ábrányi-Balogh Péter, Volk Balázs: β-Karbolinvas vegyületek szintézise</i>	172	<i>Mátyás Milen, Péter Ábrányi-Balogh, Balázs Volk: Synthesis of β-carbolines</i>	172
<i>Kormány Róbert: A Quality by Design elv folyadékkromatográfiás alkalmazása</i>	179	<i>Róbert Kormány: Quality by Design principle in liquid chromatography</i>	179
<i>Földesi Tamás, Volk Balázs, Milen Mátyás: Pirrolotriazepin-származékok előállítása</i>	187	<i>Tamás Földesi, Balázs Volk, Mátyás Milen: Synthesis of pyrrolotriazepine derivatives</i>	187
<i>Farkas Ferenc, Dancsó András, Markovits Imre, Madarász János, Nyitrai Izabella: Biztonságtechnikai szempontok a gyógyszeriparban: Egy tofisopam intermedier esete</i>	195	<i>Ferenc Farkas, András Dancsó, Imre Markovits, János Madarász, Izabella Nyitrai: Safety investigations in pharmaceutical industry: case study of tofisopam intermediate</i>	195
<i>Markovits Imre, Farkas Ferenc, Csanaky Lilla, Pataki Hajnalka, Janiné Vakulya Gabriella, Farkas Béla: Gyógyszerhatóanyagok fizikai tulajdonságainak finomhangolása</i>	200	<i>Imre Markovits, Ferenc Farkas, Lilla Csanaky, Hajnalka Pataki, Gabriella Janiné Vakulya, Béla Farkas: Fine tuning of physical properties of active pharmaceutical ingredients</i>	200
<i>Gáti Tamás: Táncoló halogének: fluor atomot tartalmazó, négyszeresen szubsztituált tiofén származék szerkezetének meghatározása NMR-rel</i>	207	<i>Tamás Gáti: Halogen dancing: Structure determination of Fluorine Containing tetra substituted thiophene derivative.....</i>	207

Tisztelt Előfizetők és Olvasók!

A *Magyar Kémiai Folyóirat* új folyamának immár 13. évfolyama is utolsó számához érkezett. Büszkén jelenthetem, hogy minden ellenállás és több szempontból is megalapozott ellenérv dacára sikerült életben tartani a több, mint évszázados hagyományt képviselő, és a magyarországi kémiai kutatások magyarországi eredményeit bemutató egyetlen magyar nyelvű kiadványt.

A lap közreadásának legfontosabb célja továbbra is a szakmai színvonal megőrzése, illetve lehetőség szerinti növelése mellett, a magyar kémiai szaknyelv folyamatos frissítése, a korszerűség követelményeihez igazítása és hozzáférhetővé tétele a szakmai utánpótlás és a határainkon kívül tevékenykedő, magyar nyelven is publikáló és előadó magyar vegyész kollégáink számára, akik a környező országokban, s a világ más tájain más nyelven tanulják és oktatják a kémiát, más nyelvet használnak mindennapi szakmai munkájukhoz, illetve más nyelven olvassák a szakirodalmat.

A 122. évfolyam számaiban is folytattuk a megújult lapban elindított sorozatainkat, közöttük az akadémiai székfoglalók közlését. A 2016/1 lapszámban a hazai polimer-kémiai kutatások szaktekintélyének, Iván Béla levelező tag előadása alapján összeállított közlemény jelent meg. Az elhunyt kollégáinkról megemlékező írások sorában, Pallos László professzorról, a magyarországi gyógyszerkutatás egyik legkiválóbb személyiségéről jelent meg méltatás. A legsikeresebb, kiemelkedő hazai kutatóműhelyek eredményeit bemutató sorozatunkban, ebben az évben a gyógyszerkémia területén működő vállalatok és intézmények adtak áttekintést legfontosabb új eredményeikről a 2016/2-4 lapszámokban. Folytattuk a doktori (PhD) értekezések összefoglalóinak publikálását. Ezt a sorozatunkat különösen fontos feladatnak tartjuk, mivel lehetőséget nyújt fiatal kutatóknak, hogy a fokozatszerzéshez kötelezően előírt, több idegen nyelvű közleményük lényegét összefoglalják, s ezzel gyakorlatot szerezhessenek eredményeik tömör, ám mégis minden fontos momentumot áttekinthető formában tartalmazó írások elkészítésében és a korszerű, szabatos magyar szaknyelv használatában.

Mint minden évben eddig is, szeretnék köszönetet mondani a benyújtott kéziratokat lektoráló, s alább felsorolt kollégáinknak önzetlen és felelősségteljes munkájukért, amivel hozzájárultak a Magyar Kémiai Folyóirat szakmai színvonalának megőrzéséhez.

Aigner Zoltán, Ágai Béla, Bátori Sándor, Bényei Attila, Blazsó Marianna, Bódiss János, Bombicz Petra, Csámpai Antal, Császár Attila, Cserhalmi Zsuzsa, Csomós Péter, Csonka Gábor, Czugler Mátyás, Dávid Ádám Zoltán, Deák György, † Fekete Jenő, Felinger Attila, Forgó Péter, Fülöp Ferenc, Hernádi Klára, Hohmann Judit, Horvai György, Kállai Tamás, Keglevich György, Kiss Éva, Kristyán Sándor, Kurtán Tibor, Kuzmann János, Mazák Károly, Mészáros Róbert, Morvai Miklós, Novák Zoltán, Novák Tibor, Nyulászi László, Pajkossy Tamás, Pasinszki Tibor, Pintér István, Pongó László, Rábai József, Simonné Sarkadi Livia, Sípos Melinda, Skodáné Földes Rita, Soós Tibor, Szakonyi Zsolt, Szalay Roland, Sente Lajos, Szilágyi László, Timári Géza, Batta Gyula, Torkos Kornél, Tóth Gábor, Tóth Tünde, Veszprémi Tamás, Vidóczy Tamás, Wölfling János.

A lap szerkesztőségének nevében köszönetet mondok a Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Tudományok Osztálya anyagi támogatásáért, a közlemények szerzőinek és a lap előfizetőinek a *Magyar Kémiai Folyóirat* iránti bizalmukért és támogatásukért. Külön is köszönöm a külföldi magyar pályatársaink számára kettős előfizetést vállaló, sajnos alig néhány kollégáink áldozatkészségét. Kérem valamennyi magyar kémikus kollégámat, hogy vállaljanak kettős előfizetést, hogy minél több határainkon kívül a kémia területén működő magyar kutatóhoz, magyarul kémiát tanító és tanuló honfitársunkhoz eljuthassanak a lap számai.

Sohár Pál
főszerkesztő

Kémiai kutatás és fejlesztés a hazai gyógyszeriparban

GREINER István*

Richter Gedeon Nyrt., Gyömrői út 19-21., 1103 Budapest, Magyarország

A magyar gyógyszeripar több, mint 100 éves történelme során mindig nagy hangsúlyt fektetett arra, hogy innovatív termékekkel és megoldásokkal méltó versenytársa lehessen a világ vezető gyógyszeripari cégeinek. Ahhoz, hogy ezt a célt elérhesse az érintett tudományok számos területén a legújabb és leghatékonyabb megoldások alkalmazására törekedett, és talán nem is sikertelenül. A XX. század vérvivataros és diktatúrákkal tarkított évtizedeiben találékonysággal, elkötelezett tulajdonosokkal és vezetőkkel, azok remek politikai érzékével felvértezve mindvégig az ipar vezető ágazataként igyekezett szolgálni a mindenkori tulajdonosok érdekeit, valamint a magyar és a világ sok más országában élő emberek egészségét, utóbbit lehetőleg megfizethető áron. A célok megvalósításához a kémiai tudomány és tudás hazai létrehozói, ismerői és alkalmazói is jelentős mértékben hozzájárultak. Sajnos egyfelől a történelmi távolság homálya, másfelől a különszám terjedelme nem engedi meg, hogy minden fontos tudományos és/vagy gyakorlati eredmény megemlítésre kerülhessen, ez indokolja azt, hogy e számban csak a közelmúlt néhány szakmai sikeréről olvashatunk.

Az ezredfordulóra a hazai gyógyszerkutatással és kémiai fejlesztéssel foglalkozó cégek és kutatóhelyek állapota többé kevésbé stabilizálódott. Az összes gyógyszergyár tulajdonosi struktúrája egyértelművé vált, habár összességében nem a legszerencsésebb kimenettel. A Richter Gedeon Nyrt. kivételével mindegyik cég szakmai befektető birtokába került és ezzel az is együtt járt, hogy a magyarországi leányvállalatokkal kapcsolatos stratégiai döntések mind külföldön születtek és születnek meg. Ennek következtében a közelmúltban a hazai gyógyszeripari K+F befektetések jelentősen csökkentek, és ez sajnos negatívan hatott a kémiai kutatás-fejlesztési tevékenységekre is. Míg korábban az ipari K+F kiadások közel háromnegyede gyógyszeripari eredetű volt, addig mára, az elmúlt időszakban újonnan hazánkba telepített nem gyógyszeripari (Nokia, Bosch...) K+F egységek és a már fentebb említett gyógyszeripari K+F ráfordítások csökkenésének eredményeképpen, már csak 40% körüli értéken mozog. Az elmúlt öt évben két nagy gyógyszergyár is abbahagyta az originális kutatás preklinikai részét hazánkban. Sajnos a kicsit korábban Budapesten megnyílt új gyógyszerkutatási kémiai egység nem, vagy csak kis mértékben tudta ezt a veszteséget kompenzálni. Érdekes fordulatnak tűnik azonban, hogy épp az utóbbi időben váltak nyilvánossá olyan új hazai gyógyszeripari innovációs eredmények, melyek pont azt igazolják, hogy érdemes hazánk „szürkeállományát” az eddiginél jobban kihasználni, akár a multinacionális vállalatoknak is, a siker megalapozott reményével. Reméljük, hogy a külföldi irányítású vállalatok döntéshozói is mihamarabb erre a következtetésre fognak jutni és újra emelkedni fognak majd a hazai gyógyszeripari K+F ráfordítások.

Bízató momentumként tekinthetünk arra a tényre is, hogy pályázati pénzből már egyetemi-akadémiai műhelyek is gyógyszerjelöltjük preklinikai fejlesztési lehetőségéhez jutottak és ennek mintájára újabb távlatok nyílnak meg a hazai nem vállalati kutatóhelyek előtt is. Nagyon bízunk benne, hogy az ilyen K+F tevékenységek száma emelkedni fog a közeljövőben és új, jelentős eredményeket tud majd felmutatni a magyar gyógyszerkutatás.

Ebben a számban számos olyan új tudományos és szakmai eredmény kerül ismertetésre, melyekről az érdeklődő olvasó korábban nem, vagy alig hallhatott. Mindez tudatos választás eredményeképpen alakult így. Azok a nagyközönség által is jól érthető és szakmailag is jelentős sikerek, melyek korábban már jelentős nyilvánosságot kaptak, a tudományos élet szűkebb berkein belül többször is ismertetésre kerültek. Ugyanakkor a kémia korai kutatáshoz, vagy ipari méretnöveléshez kötött területein végzett belső tevékenységeknek sokkal kevesebb a megjelenési lehetősége, sőt, egyes esetekben a vállalatok ezek publikálását céges általános politikai gyakorlatra hivatkozva nem is engedélyezik. Most azonban mindezek mellett sikerült néhány szakmailag is elismerésre méltó eredményt megjelentetni mind a szintetikus kémia, mind az analitika területéről. Az egykori három nagy gyógyszergyár (Chinoin, Egis, Richter) közös történelmi gyökereire utal az is, hogy közvetve, vagy közvetlenül, de mindhárom múltbeli teljesítménye is említésre kerül a következő oldalakon, és ezekre az értékes hagyományokra mindegyik (utód)cégnél büszkék lehetünk.

Nagyon bízom abban, hogy a tisztelt Olvasó, mire a cikkek olvasásának végére ér, érteni és érezni fogja mi és hogyan zajlik ma a hazai műhelyekben a gyógyszerkutatás területén, hogyan gondolkoznak a kollégák, milyen célok mentén próbálnak az adott témákban nap, mint nap előrébb haladni és milyen módon igyekeznek összhangba hozni a kapott tudományos eredményeket az üzleti élet igényeivel. Meggyőződésem ugyanis, hogy a gyógyszeriparban jelentős, tartós és elismert üzleti sikert csak a tudományos ismeretek magas szintű felhasználásával lehet biztosítani, és vallom, hogy ezt a magyar ipari kutatóhelyek ma, csak úgy, mint régen, képesek is megvalósítani.

Chemical R&D in the Hungarian Pharmaceutical Industry

In this short prologue the transition of the Hungarian pharmaceutical industry is described during the past 3 decades in a very concise form. Past achievements, present activities and future possibilities were also mentioned using general terms helping the reader to be prepared for the content of articles in this issue.

* e-mail: i.greiner@richter.hu

CycloLab Kft: A Chinoin Rt. Biokémiai Kutató Laboratóriumától az Illatos úti gyárig

SZENTE Lajos,* SZILÁGYI Erzsébet és SZEJTLI Gabriella

CycloLab Ciklodextrin Kutató Fejlesztő Laboratórium Kft.

Illatos út 7. 1097 Budapest, Magyarország

1. A hazai ciklodextrin kutatás kezdete a Chinoin Rt. Biokémiai Laboratóriumában

Földi Zoltán, a Chinoin Rt. egykori vezérigazgatója rózsadombi magánlaboratóriumában, 1973-ban, Szejtli József alapította meg a Biokémiai Kutatólaboratóriumot. (1. ábra) A Chinoin Rt. "Földi paradicsoma" 16 éven át a hazai és nemzetközi ciklodextrin kutatás-fejlesztés központjaként működött.



1. Ábra. Minden itt kezdődött: a Földi Zoltán rózsadombi laboratóriumának HRSZ száma.

Kezdetben, az 1973-1976 közötti időszakban, a ciklodextrin téma mellett a laboratóriumban egyéb gyógyszeripari vonatkozású poliszacharid-kémiai kutatás (a kondroitin-szulfát és a kitozán alkalmazása) is folyt. Szejtli rövid idő alatt egy dinamikus, fiatal kutatócsoportot épített ki maga körül. Az akkoriban még világviszonylatban is kevés helyen tanulmányozott, de sok felhasználási lehetőséget ígérő téma, a vonzó rózsadombi munkakörnyezet, a stimuláló szakmai közeg és a legendás előd, Földi Zoltán személyes jelenléte a sors különös ajándéka volt a tanulni vágyó pályakezdő kutatók számára. A Chinoin Rt. nyújtotta kutatási és pénzügyi háttér és a lelkes, jól terhelhető kutatógárda tette lehetővé, hogy a ciklodextrin téma szisztematikus fejlesztési projektté váljon. A rózsadombi laboratóriumban intenzív kutatómunka indult a ciklodextrinek ipari gyárthatóságának és gyakorlati hasznosíthatóságának felderítésére. A ciklodextrinek értékesítésének elemi feltétele, hogy azok kellő mennyiségben és jó minőségben legyenek hozzáférhetők és ismertek legyenek felhasználási lehetőségeik, valamint azok korlátai. Ennek érdekében saját technológia kidolgozására, próbagyártásokra került sor.

Az 1975 és 1989 közötti időszakban Szejtli laborja szinte minden fontosabb alkalmazási lehetőséget felderített, a gyógyszer- és élelmiszeripartól kezdve, a kozmetikai és mezőgazdasági alkalmazásokon át a vegyipari felhasználásig. A Chinoin Rt. tucatszám jelentette be a vonatkozó találmányokat. Ez akkoriban, kb. 50 szabadalmat jelentett.



2. Ábra. Szejtli József (középen) a Chinoin Rt. Kutatási Igazgatójával, Mészáros Zoltánnal (jobbra) és Kovács Gáborral a prosztaglandin téma vezetőjével 1975 nyarán.

A ciklodextrin laboratórium az akkori idők lehetőségei mellett a lehető legszélesebb fórumokon publikálta új tudományos eredményeit. A hazai ciklodextrin kutatás kezdeti időszakában, a teljes magyar kutató vertikum csatornába állításával, a rózsadombi Laboratóriumból több, mint 130 tudományos közlemény jelent meg. Nem véletlen, hogy néhány év alatt a Szejtli vezette Chinoinos kutatócsoport a világ ciklodextrin-kutatásának ismert és elismert központja lett. A Biokémiai Kutatólaboratórium több, mint 25 nemzetközi kapcsolatot alakított ki. 1982-1985 között számos japán, nyugatnémet, francia és amerikai kutató látogatta meg a laboratóriumot. A nem kifejezetten akadémiai kutatóhelynek számító intézményben japán professzorok ösztöndíjasként hosszabb időt töltöttek a ciklodextrin komplexképződés tanulmányozásával.

2. A Chinoin Rt.-től a CycloLab Leányvállalat felé

Az 1980-as évek végére a Biokémiai Kutatólaboratórium már kizárólag ciklodextrin kutatással foglalkozott, a Chinoin

* Tel.: +36-1-347-6060; fax: +36-1-347-6068; e-mail: szente@cyclolab.hu

Rt.-ben a ciklodextrin téma önálló egységgé, első lépésben, önmagát finanszírozni képes leányvállalattá nőtte ki magát.

„A Chinoin Rt. Gyógyszer és Vegyészeti Termékek Gyára Vállalati Tanácsa az 1988. szeptember 26.-i döntésével a CYCLODEXTRIN-ek kutatása, alkalmazásának fejlesztése és a termékek piacának megteremtése érdekében határozta el a kutató-fejlesztő leányvállalat létrehozását.”- idézet a leányvállalat alapító okiratából.

Az újdonsült leány a CycloLab nevet kapta, amelyet később, kft-vé alakulása után is megtartott a mai napig. A névadó, a Chinoin Rt. akkori kutatási igazgatója, Kovács Ferenc volt.

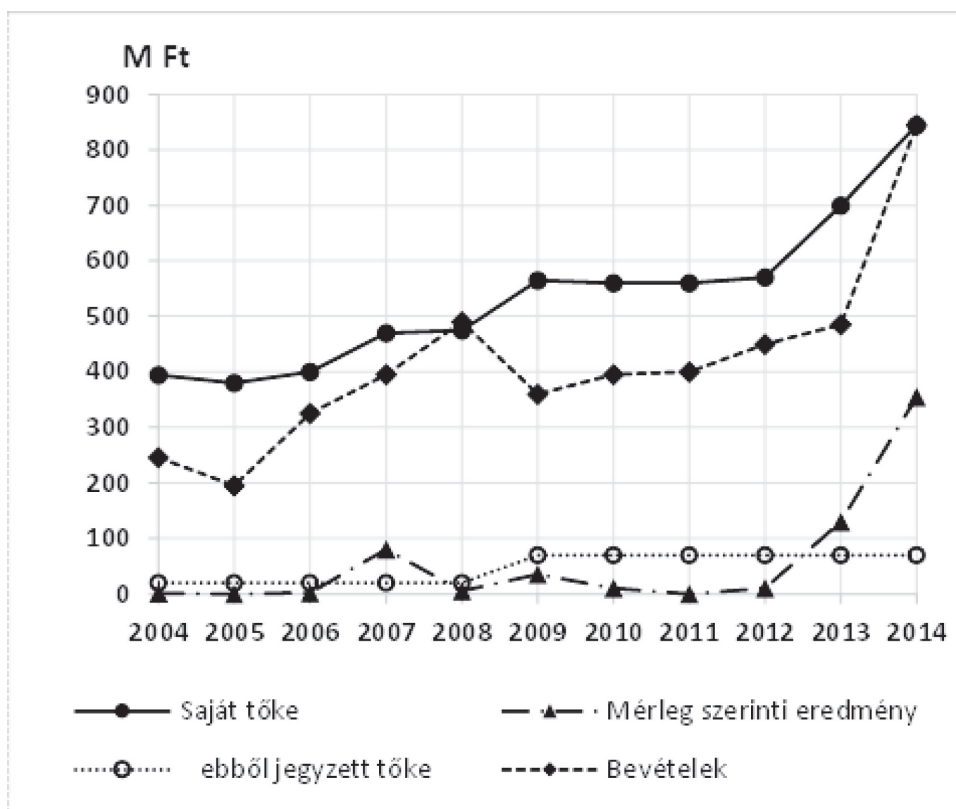
3. A Ciklodextrin Kutató-fejlesztő Leányvállalat Kft-vé alakul

A leányvállalat működése 1989.01.01-én indult és 1991.12.12.-én szűnt meg azért, hogy 1992.01.01-től korlátozott felelősségű társasági (kft) formában működjön tovább.

A CycloLab Kft. tulajdonosa a megalakulásakor 30%-ban az anyavállalat, a Chinoin Rt., míg 70%-ban a dolgozók egy csoportja volt. Ez akkor, megalakuláskor, 19 magánszemélyt jelentett. A kft. induló vagyona 10 580 000 Ft volt.

Az újonnan alakult vállalat 1992 és 1994 között, az MTA Központi Kémiai Kutatóintézetében bérelt laboratóriumokat és irodákat. Ezt követően a Rózsadombról a XI. kerületbe költözött. A Dombóvári úti Sütőipari Kutató Laboratóriumait és irodáit nyolc éven át bérelte. A vállalat tevékenységében egyre jelentősebb szerepet játszó szintetikus gyógyszergyártási tevékenység miatt szükség volt nagyobb területű laboratóriumokra és üzemsarnokokra. A megnövekedett területigény kielégítésére 2001-től a CycloLab Kft. az Illatos út 7 alatti ipari területen vásárolt ingatlanokat, építette fel korszerű laboratóriumait. Ez az Illatos úti ingatlan 15 éve a cég telephelye, 5 éve regisztrált gyógyszer gyártóhely is.

1996-ban a Chinoin Rt. 30 %-os részesedését a kft. tagok megvásárolták, így 1996.06.30.-tól a CycloLab Kft. független magánvállalként működött tovább ill., működik a mai napig. 2008-ban a tulajdoni viszonyok jelentősen egyszerűsödtek, így a Kft-nek ma négy magánszemély a tulajdonosa. A CycloLab Kft. jelen tevékenysége felöleli a ciklodextrin technológia teljes spektrumát: a különböző ciklodextrin származékok laboratóriumi szintű előállításától a kutatás-fejlesztésen át az ipari méretekben történő gyártásig. Ezek eredménye a több száz kutatási jelentésen kívül kb. 130 találmányi bejelentés és 400 feletti publikáció referált tudományos folyóiratokban. Vállalatunknál az



3. Ábra. A CycloLab Kft. bevételeinek, eredményeinek és vagyonának alakulása az elmúlt 10 évben.

utóbbi 10 évben 18 szakdolgozat (diplomamunka) készült és 4 munkatársunk szerezte meg a PhD fokozatot.

Az utóbbi 10 év eredményeit összefoglaló 3. ábrán látható, hogy a CycloLab Kft. lassú ütemben, de folyamatosan

gyarapodott, a 2004-2014 közötti időszakban bevételeink 246 M Ft-ról 844 M Ft-ra, az adózás előtti eredményünk 1,3 M Ft-ról 355 M Ft-ra, a saját tőkénk pedig 394M Ft-ról 844 M Ft-ra nőtt. A CycloLab Kft. 36 munkatársunknak nyújt biztos megélhetést és színvonalas, szakmai kihívásokban gazdag munkalehetőséget.

A Magyar Kémiai Folyóirat e számának további közleményeiben néhány fontosabb kutatási területen elért eredményeinkről adunk számot.

CycloLab Ltd: From the Chinoin Biochemical Lab to the Pharmaceutical Factory

This introductory article intends to give an overview on the history and significant milestones of CycloLab, Cyclodextrin Research and Development Laboratory. It covers nearly 25 years, from the beginning at Chinoin's Zoltán Földi Laboratory, until the establishment of Illatos út Headquarters and Pharmaceutical Factory. The research of cyclodextrins applications became the only topic of the laboratory at that time. In this period the most important applications have been explored and protected by approximately 50 patent applications. In collaboration with universities and research institutes about 130 scientific papers have been published bringing international recognition to the Hungarian cyclodextrin research. When CycloLab Ltd. was established by József Szejtli in 1992 as a spin-off of Sanofi-Aventis-Chinoin group, he was already an internationally recognized pioneer and leader of cyclodextrin science and technology and his laboratory became the center of cyclodextrin research and application. He had several international collaborations. In 1982-1985 numerous Japanese, German (west), French and American scientists visited the laboratory and Japanese professors spent a few months or few years here as research fellows.

After a few years of intermediary status as a subsidiary of Chinoin CycloLab started to work as a private research and development company, which was unique in Hungary at that time. Utilizing the internationally recognized goodwill, the costumers, mainly pharmaceutical companies, ordered cyclodextrin-related research

from us. The task was to solubilize insoluble drugs, improve the stability, dissolution, taste and odor, modify the pharmacokinetic profile, etc. These partners provided the income for survival of the company.

Moving from the laboratory of Zoltán Földi to the Hungarian Academy of Sciences Central Research Institute of Chemistry, then to the former Research Institute of Baking Industry we purchased a building in Illatos street (an industrial area in Budapest) where the modern laboratories and the manufacturing unit were constructed.

CycloLab is today the world's only all-round cyclodextrin research-development and GMP-manufacturing firm that provides services in any kinds of cyclodextrin applications. The privately-owned, financially independent SME organization has a core team of 36 employees, including some internationally acknowledged, highly published scientists/engineers in this field. CycloLab's team has played central role in the development of a number of already marketed pharmaceutical products, clinically used therapeutic methods, and over a hundred of different food, personal care products in Europe and USA. Some official, regulatory Pharmacopoeial analytical methods currently used for the characterization of pharmaceutical cyclodextrins were developed by CycloLab's analysts. Now the company has a manufacturing facility where a cyclodextrin derivative as pharmaceutical excipient is produced under GMP conditions with the approval of the US Food and Drug Administration. The company has been continuously growing in terms of its technical and manufacturing capabilities, as well as of the company's market value and owners' equity.

The following papers written by CycloLab's researchers give a more detailed view on the pharmaceutical, diagnostic, food, environmental and analytical applications of cyclodextrins developed in our laboratory.

Szejtli József élete és fontosabb felismerései a ciklodextrinek gyógyszeres alkalmazása terén

SZENTE Lajos* és FENYVESI Éva

CycloLab Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Laboratórium Kft, Illatos út 7, 1097 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Jelen sorok írásakor Szejtli József már tizenkét éve nincs közöttünk, de napi teendőink végzése során gyakran alkalmazzuk valamelyik eljárását, használjuk fel eredményeit, vagy kerül kézbe egy-egy közleménye. A kutató vegyészmérnök, a feltaláló, a vállalat- és folyóirat-alapító, a generációkat oktató tanár sokunk ismerőse. (1. ábra) Amit Szejtli 1970 és 2004 között a ciklodextrin kémia és technológia megalapozása, hazai és nemzetközi elterjesztése terén tett, elismerésre méltó teljesítmény. Neve ma már elválaszthatatlanul összeforrott az alkalmazott szénhidrát- és szupramolekuláris kémia, a ciklodextrin technológia és ipar eredményeivel.



1. Ábra. Szejtli József (1933-2004).

1.1. A korai iskolás évek

Nagykanizsán született, általános iskolai tanárai felfigyelnek az élénk, gyors észjárású, egyedi módon gondolkodó kisdíákra, aki, - amint tehette - elhagyta a szülői házat és nagy elszántsággal érkezett Budapestre, hogy tanulmányait a Petrik Lajos vegyipari technikumban elkezdje. 1952-ben itt szerzett vegyésztechnikusi oklevelet.

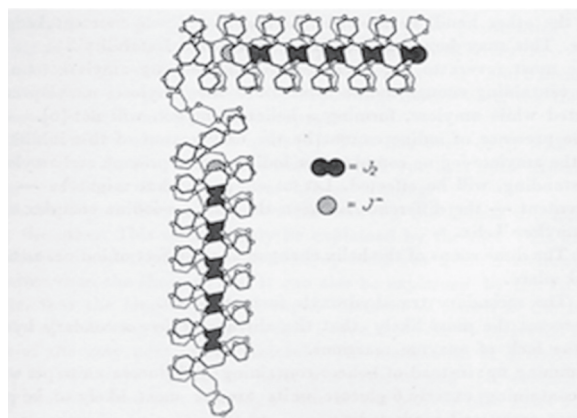
1.2. A Budapesti Műszaki Egyetem

Az egyetemi évek alatt példás előmenetelével kivívja évfolyamtársai és tanárai elismerését, 1957-ben diplomázik. A Mezőgazdasági Kémiai Technológiai tanszéken tanársegéd és nemzetközileg is figyelmet érdemlő eredményeket ér el. Több, mint 40 cikket publikál a keményítő, az amilóz és a jód közötti komplexképződés mechanizmusáról. Kiépíti poliszacharid-kémiai laborját és kijelöli főbb kutatási irányait. Érdeklődése fókuszában a keményítő és az amilóz vizes oldatbani szerkezete, valamint e poliszacharidok zárványkomplex-képző tulajdonságai állnak.

1.3. Külföldi tanulmányútjai

Sikerrel pályázott meg egy ösztöndíjat a trondheimi Norvég Királyi Algakutató Intézetbe, ahol 1963-64 között dolgozott. A tengeri algákban található alginátokat használta modellként a poliszacharidok hidrolitikus bomlásának vizsgálatához. A glikozidos kötés hidrolízis kinetikájával kapcsolatban tett alapvető megállapításai negyvenöt év után is hivatkozott eredmények.

1965-1966 között az akkori NDK Tudományos Akadémia Táplálkozástudományi Intézetében, Potsdamban volt ösztöndíjas. Az intézetben, abban az időben, számos neves, az egykori berlini Kaiser Institut-ból induló német kémikussal dolgozhatott együtt. Fő kutatási témája a keményítő retrogradációja és a folyamat befolyásolhatósága volt. A potsdami évek alatt Szejtli munkatársaival részletesen tanulmányozta és publikálta az amilóz-jód csatorna-komplexek szerkezetével kapcsolatos – máig helytálló – elképzelését (2. ábra).



2. Ábra. A Szejtli-féle amilóz-jód zárványkomplex 1967-ben közölt szerkezete.²

A potsdami tartózkodást követően egy UNESCO szakértői állásajánlat nyomán Szejtli Kubába került, ahol 1967-70 között dolgozott. A havannai egyetemen biokémiát és poliszacharid kémiát oktatott. Az UNESCO szakértői munka és az oktatás mellett állami kutatási feladatokat is végzett. Elmondása szerint ezekről az eredményekről magának a kubai vezetésnek kellett beszámolnia. Kuba első embere és szűkebb tanácsadói köre rendszeres szakmai konzultációkat tartott az UNESCO szakértők bevonásával.

A kubai tanácsadói és egyetemi oktatói tevékenysége mellett - mintegy kikapcsolódásként - írja meg Szejtli az első könyvét glikozid kötések hidrolízisének kinetikájáról, mely egyben akadémiai doktori értekezésének tárgya is lett.¹

* Tel.: +36-1-347-6060; fax: +36-1-347-6068; e-mail: szente@cyclolab.hu

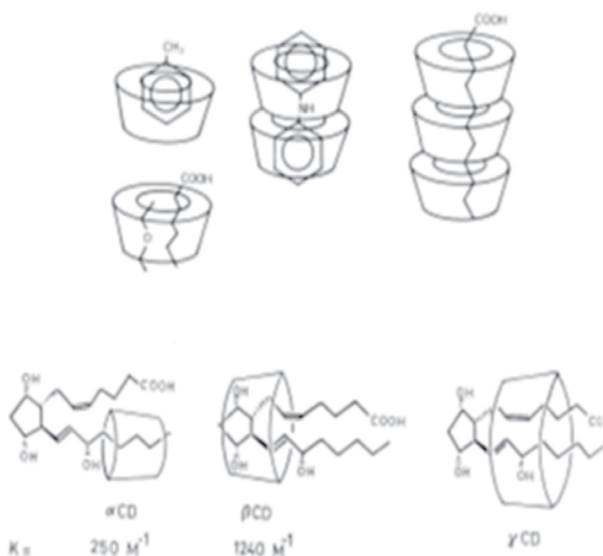
1.4. A hazatérés és a Chinoinban töltött évek

A hazatérés után nem sokkal egy szerencsés találkozáskövetően Mezey Barna, a Chinoin akkori vezérigazgatója, felkérte, hogy a rózsadombi Földi Zoltán-féle Chinoin kutatólaboratóriumot „ébressze fel álmából”, szakmai működését indítsa be. Szejtli az 1973-1976 közötti időszakban egy időben indította a ciklodextrin, a kondroitin-szulfát és a kitozán témákat. Ekkor már fiatal kutatói csapatot épített ki maga körül. Szejtli személyisége, sokoldalúsága, a legendás nagy előd, Földi Zoltán személyes jelenléte a laborban, a sors különös ajándéka volt minden tanulni vágyó kezdő kutató számára.

2. Ciklodextrin kutatás a Chinoinban

A már említett számos témából szinte magától választódott ki a ciklodextrin projekt. A hazai keményítőre alapuló, a petrokémiától független téma Szejtlit már korábban foglalkoztatta, és a Chinoinos évek alatt látta elérkezettnek az időt, hogy a témát ipari fejlesztési projektté tegye. Szerencsés körülmény, hogy a Chinoin kutatási igazgatója, Mészáros Zoltán, fantáziát látott az újszerű, alig ismert és emiatt kockázatos témában. Néhány év elteltével a Szejtli-vezette Chinoinos csapat a világ ciklodextrin kutatásának egyik ismert és elismert központja lett. A zárvány-komplexek gyakorlati alkalmazására kiterjedt vizsgálatokat indított és rövid idő alatt több mint ezer különféle szerkezetű gazdavendég típusú komplexet állított elő és vizsgált. Kimutatta, hogy az üregméret és az üregbejárat kémiai környezete alapvető hatással van a képződött komplexek stabilitására és sztöchiometriájára. Egy eredeti, kézzel rajzolt Szejtli illusztráció mutatja a lehetséges zárvány-komplex szerkezeteket, ahogy azt 1978-ban feltételeztük. (3. ábra)

A komplexek létezésének igazolására szilárd állapotban és vizes oldatban új módszereket javasolt és vezetett be. Ismert analitikai módszereket adaptált a zárvány-komplexek vizsgálatára, és a nehezen kimutatható nem-kovalens kölcsönhatások igazolására.^{4,6}



3. Ábra. A CD üregmérettől és a vendégmolekula szerkezetétől függően különféle zárvány-komplexek képződhetnek. (eredeti Szejtli rajz 1978-ból).³

A szakmai hitvallás: „Ha bármely területen kiemelkedőt szeretnél alkotni, írd róla egy könyvet” szokta mondani. A ciklodextrin témáról, e különleges makrociklusok szerkezetéről és gyakorlati hasznosíthatóságukról szóló első összefoglaló műve 1981-ben jelent meg az Akadémiai Kiadónál. Ezt az alapművet követte 1988-ban a ciklodextrin technológia egészét bemutató könyve, Hollandiában. A két alapműre napjainkig összesen kb. 5000 független hivatkozásról tudunk, és a kézikönyvek hosszú évekig szinte minden ciklodextrines kutatóműhelyben a polcon álltak. Ezekben a monográfiáiban Szejtli összefoglalta a ciklodextrinek gyártásáról, szerkezetéről és hasznosíthatóságukról szóló ismereteit és elképzeléseit.

Eszerint a ciklodextrinek:

- Ipari méretekben, kellő tisztaságban gazdaságosan előállíthatók;
- Nem toxikusak, biológiailag lebomló, nem környezetszennyező anyagok;
- Funkcionális segédanyagként használható, zárvány-komplex-képző, molekuláris kapszulázásra alkalmas makrociklusok;
- Segítségükkel kevésbé stabilis, lipofil hatóanyagok stabilitása és vízdékonysága javítható, miközben a ciklodextrinek és hatóanyagok között nem alakul ki kovalens kötés
- A gazda-vendég típusú komplexképződés; megfordítható, egyensúlyi folyamat, a bezárt hatóanyagok felszabadulása szabályozható módon valósítható meg.

A Ciklodextrines Folyóirat (Cyclodextrin News) megalapítása: A második nagy ciklodextrin technológiai monográfiájának megírásakor már elmélyült szakmai és emberi kapcsolatban állt egy angol kémikussal, James Pagingtonnal. Az akkor már 10 éve művelt munkák során Szejtli összegyűjtötte és osztályozta a ciklodextrin tárgyú összes fellelhető irodalmat. Elhatározta, hogy egy havi rendszerességgel megjelenő folyóiratban közléseket és kommentálja a ciklodextrin téma fontosabb eredményeit. A folyóirat alapítására hivatalosan ekkor még nem volt lehetőség, így a fent említett brit kolléga neve alatt, Angliában jelent meg a magyar „Cyclodextrin News” első száma Szejtli és Pagington kiadó-szerkesztők neve alatt, 1986-ban. A folyóirat, azóta havi rendszerességgel - immár 30 éve! - jelenik meg, számos nagy külföldi gyógyszergyár, akadémiai intézet, külföldi egyetem és neves könyvtárak járatják. Ma már elektronikus formában, ingyenesen hozzáférhető a CycloLab honlapján.⁷

A Nemzetközi Ciklodextrin Szimpóziumok kezdeményezője: Szejtli a ciklodextrin téma kérdéseivel kapcsolatos nemzetközi tudományos fórum megteremtésében is úttörő szerepet vállalt. Hosszú évekig évente egyszer rendezett hazai munkaértekezleteket. Ezen a fórumon mintegy 30-40 kiváló hazai kutató vett részt és számolt be a ciklodextrin kutatás során elért legújabb eredményeiről, azaz, már akkoriban létrejött és működött – nem deklaráltan – a Magyar Ciklodextrin Társaság. Ezekből az összejövetelekből nőtt ki aztán az első nemzetközi ciklodextrin konferencia 1981-ben, Budapesten. A világ akkor legnevesebb ciklodextrin kutatói

gyültek össze Japánból, USA-ból és Európából. Azóta 2 évente, a világ ciklodextrin kutatói és az ipar képviselői (kb. 150-200 fő) tanácskoznak és vitatkoznak a ciklodextrin téma elméleti és gyakorlati vonatkozásairól. Ebben az évben a 18. nemzetközi ciklodextrin konferenciát Gainesville-ben (USA) rendezik.

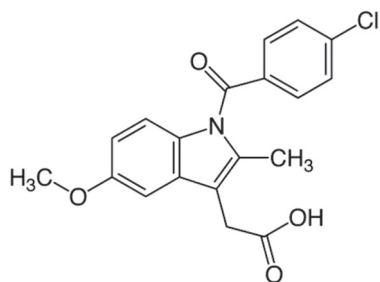
Elismerések: Szejtli számos magas tudományos elismerésben részesült: 1986-ban Akadémiai-díjat, 1991-ben Moet-Hennessy-díjat kapott. 1995-ben a Japán Kémiai Társaság tiszteleti tagja lett, végül, 2003-ban, Széchenyi-díjat kapott.

Legfontosabb eredményei:

- Megteremtődött a ciklodextrin ipar (míg 1975-ben globálisan évi 1-2 kg, addig 2015-ben már 14-15 ezer tonnányi mennyiségben gyártottak és használtak ciklodextrineket (USA, Japán, EU).
- Kutató-fejlesztő céget alapított: a CycloLab® ma világszerte elismert kutatóhely és iskola. Ez idáig három japán kolléga mellett amerikai, belga, francia, olasz kutatók is dolgoztak és töltötték ösztöndíjas idejüket a CycloLab-ban.
- Szejtli iskolateremtő volt, kinevelt egy új szakmai generációt, követőit, akik ma már a harmadik ciklodextrines generáció kinevelésén dolgoznak
- Írt kb. 500 cikket, 120 találmányt, négy könyvet és több könyvfejezetet
- Közvetlen szellemi atyja hat, több millió-dollár forgalmú sikeres terméknek

3. A ciklodextrines gyógyszerformulázás kifejlesztése

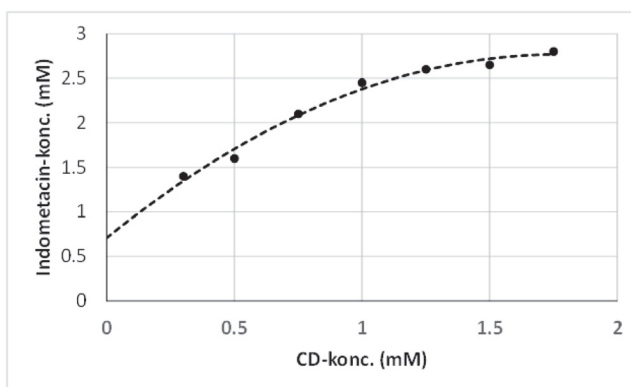
Szejtlinek köszönhetően kialakult egy protokoll, melyet követve a ciklodextrines gyógyszerformulázás kifejlesztése rutin feladattá vált. Az indometacin (4. ábra) példáján mutatjuk be a legfontosabb lépéseket.



4. Ábra. Az indometacin szerkezete.

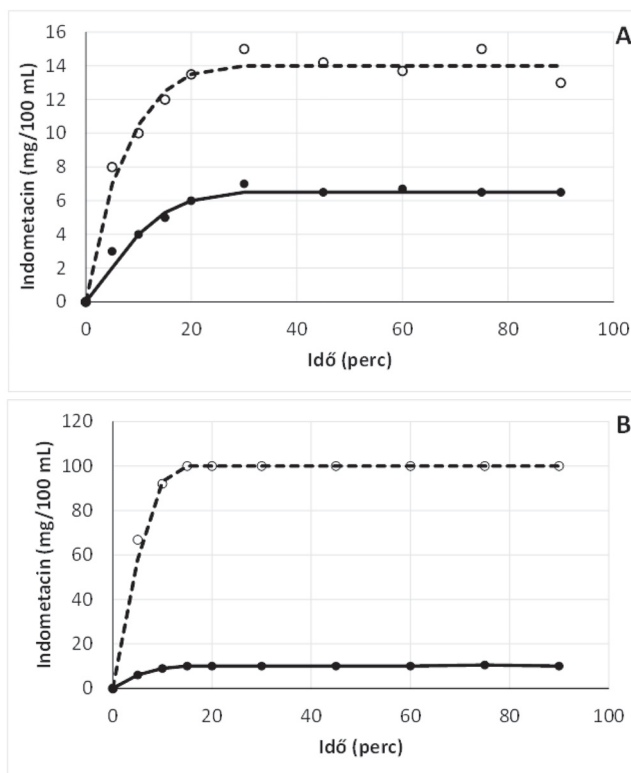
Az első lépés annak vizsgálata, hogy van-e kölcsönhatás a kiválasztott gyógyszer és ciklodextrin molekula között. Ennek legegyszerűbb módja a fázis-oldékonyság-vizsgálat. Ilyenkor azt mérjük, hogy az egyébként vízben rosszul oldódó hatóanyag oldékonysága növekszik-e a gazdamolekula jelenlétében. Indometacin esetében jelentős oldódás-emelkedést látunk, ami arra utal, hogy van kölcsönhatás, és ez feltehetően komplexképzés (5. ábra). A komplex képződését cirkuláris dikroizmus vizsgálattal is bizonyították.⁸ A fellépő Cotton-effektusok arra utalnak, hogy az indometacin molekula királis környezetbe került.

A komplexképződés igazolására sokszor megfelelő volt a pordiffrakciós vizsgálat is. A komplexnek a hatóanyagétól



5. Ábra. Az indometacin oldékonysága vizes oldatban a β -ciklodextrin koncentráció függvényében (37 °C-on pH 7.0 pufferben).⁸

és a ciklodextrinétől eltérő kristályossága szolgáltatott alapot ehhez. Később elterjedtek a termoanalitikai vizsgálatok. A differenciális pásztázó kalorimetria felvételen komplexképzés hatására eltűnt a hatóanyagot jellemző olvadáshő, párolgáshő jele. Manapság elsősorban NMR vizsgálatokkal igazoljuk a komplexképzést. A 2D módszerrel a komplex szerkezetére is következtethetünk. Választ kaphatunk arra a kérdésre, hogy a vendégmolekula mely része helyezkedik el a ciklodextrin gyűrű belsejében.



6. Ábra Indometacin oldódása önmagában (●) és β -ciklodextrin komplexből (○) pH 7 (A) és pH 8 (B) pufferben.⁸

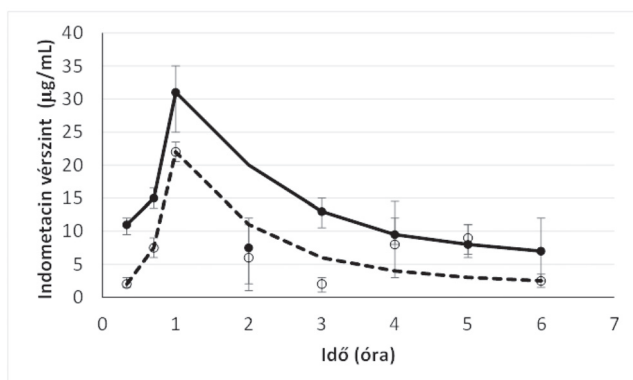
Az 5. ábrán látható oldékonysági izoterma a Higuchi-Connors-féle osztályozás szerint A_N típusú (a lineáristól negatív irányban eltér), ami jellemzően akkor áll elő, ha egy vendégmolekula feloldásához egynél több gazdamolekula szükséges. A görbe kezdeti lineáris szakaszából számítható komplex asszociációs állandó (142 M^{-1}) megmutatja, hogy mekkora affinitással lép kölcsönhatásba az első ciklodextrin molekula az indometacin molekulával. Ez a nagyságrendű

asszociációs állandó nem utal túl erős kölcsönhatásra, ami kedvező abból a szempontból, hogy vizes közegben könnyen fel is szabadul a komplexből a hatóanyag.

Ezután elkészíthetjük a komplexet. Erre többféle lehetőség van. A legegyszerűbb a közös oldatból kikristályosított komplex. Az indometacin komplexet is így állították elő: β CD 70 °C-os vizes oldatához adták az indometacin acetonos oldatát intenzív keverés közben, majd lassú lehűlés közben kivált a komplex, melynek hatóanyag-tartalma 12,5%. Ebből az összetételből számított indometacin: β - ciklodextrin molarány közel 1:2. Későbbi szerkezetvizsgálatok igazolták is, hogy mindkét aromás gyűrű kötőhelyként szolgál.

A 6. ábra kioldódási görbéi mutatják hogyan változott a kioldódás a komplexképzés következtében. Míg pH 7-es foszfát pufferben 2-szeres, pH 8-as pufferben 10-szeres a kioldódott hatóanyag koncentráció a nem komplexált hatóanyaghoz képest.

A fiziológiás pH-hoz közeli értékeken mért jelentős kioldódás-növekedés magyarázza az állatkísérletek eredményeit. 150-170 g-os CFY hím és nőstény-patkányoknak (1:1 arányban) 24 órás éheztesítés után gyomorszondán keresztül adtak 5 mg indometacin vagy 5 mg indometacinnak megfelelő 40 mg komplexet. A kísérleti állatok vérében levő indometacin-tartalmat megfelelő mintaelőkészítés után gázkromatográfiával határozták meg.



7. Ábra. A vérben gázkromatográfiával meghatározott indometacin szintek az orális beadás után eltelt idő függvényében.⁸

A 7. ábra jól szemlélteti, hogy azonos mennyiségű hatóanyagot komplex formájában beadva valamennyi vizsgált időpontban magasabb vérszintek érhetők el, mint a szabad hatóanyag beadása után. Gyorsabb és nagyobb mértékű a felszívódás. A magasabb vérszint érték tovább fennmarad.

4. Milyen nyomot hagyott Szejtli József maga után?

Neve és munkássága összeforrt a ciklodextrin kutatás-fejlesztéssel, az ebből származó, ma már piacon levő sikeres termékekkel, használatba vett eljárásokkal. Tudósként is alapvető felismeréseket tett a szupramolekuláris kémia terén, innovátorként pedig az általa alapított vállalat márkánév a nemzetközi piacon, elsősorban Nyugat-Európában, Japánban és USA-ban. A ciklodextrin technológiáját Szejtli József munkássága tette kémiai „hungarikummá”.

Szejtli József neve és tudományos öröksége megőrzése céljából 2013-ban, születése 80.-dik évfordulóján, a CycloLab vezetése, egykori tanítványai, megalapították a Szejtli József díjat. A díj bronz plakettből (8. ábra), jelentős euro pénzjutalomból és oklevélből áll. Átadására a nemzetközi ciklodextrin konferenciákon kerül sor. A díjazottak, zsűri által kiválasztott fiatal kutatók, akik nemzetközileg kiemelkedő tudományos eredményeikért részesülnek az elismerésben.



8. Ábra. A Szejtli-medál.

Hivatkozások

1. Szejtli, J. Säurehydrolyse glycosidischer Bindungen. Fachbuchverlag:Leipzig, 1976.
2. Szejtli, J.; Richter, M.; Augustat, S. Molecular configuration of amylose and its complexes in aqueous solutions. Part II. Relation between the DP of helical segments of the amylose-iodine complex and the equilibrium concentration of free iodine. *Biopolymers* 1967, Vol. 5. 1. pp 5–16.
3. Szejtli, J. *Med. Res. Rev.* 1994, 14, 353-386.
4. Szejtli, J. *Starch/Staerke*, 1978, 30, 427-431.
5. Szejtli, J. *Chem. Rev.* 1998, 98, 1743-1753.
6. Szejtli, J. Cyclodextrins and molecular encapsulation. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 2004, Vol. 2, pp. 283-304.
7. www.cyclolab.hu
8. Szejtli, J.; Gerlóczy, A.; Szente, L.; Bánky-Előd, E.; Sebestyén, Gy.; Fónagy, A.; Kurcz, M. *Acta Pharm. Hung.* 1979, 49, 207-221.

József Szejtli and his important findings in the pharmaceutical application of cyclodextrins

József Szejtli, pioneer of cyclodextrin science and technology, founder of CycloLab Cyclodextrin Research and Development Laboratory, Ltd. graduated from Technical University as chemical engineer, in 1957. He defended his PhD theses in 1961, subsequently he received an appointment as postdoctoral fellow in Norway in 1963 studying seaweed polysaccharides. Between 1965-66 he worked in Potsdam, at the Institute of Nutrition of German Academy of Science, where he studied structure of amylose and its inclusion complexes, moving him a step closer to cyclodextrins, an area that would forever be in debt to his scientific and industrial perseverance. He worked as UNESCO expert for 3 years in Cuba studying the polysaccharides available there (e.g. chondroitin sulfate extracted from sharks). Returning to Hungary, at Chinoi he began his life work crusade on cyclodextrin science and technology, in 1973.

He succeeded at the greatest challenge a scientist can accept: he created commercial products from his ideas. Through his perseverance, business acumen and tireless efforts, Dr. Szejtli has created a financially independent self-sustaining place of science and business, where his team can prosper and maintain a balance between academic research and industrial applications. So, Szejtli

has acted as an inventor and innovator at the same time. He has authored about 500 papers, 6 books over 80 patents. As research scientist, pioneer, motivator, entrepreneur and mentor, Szejtli has left behind significant footprints such as:

- he created cyclodextrin industry with 14-15 thousand tons of global CD uses (in 2014)
- founded CycloLab Ltd, a world-wide recognized leader of cyclodextrin technology
- created six marketed products each with multimillion USD annual sales value
- mentored new generation of cyclodextrin scientists, all world-wide acknowledged experts in the field of cyclodextrin-based supramolecular chemistry
- established the Cyclodextrin News, the monthly periodical on the cyclodextrin-related literature (Volume 30 was started in 2016)
- started the tradition of the International Cyclodextrin Symposia held biannually (18th meeting will be held in 2016)

He worked out a protocol for the development of drug formulations with cyclodextrins which became a routine. The first step is to prove if there is an interaction between the drug and the selected cyclodextrin. The phase-solubility studies (recording the drug concentration as the function of the cyclodextrin concentration) have the advantage of simplicity. The solubility enhancement is the proof of interaction. For proving the inclusion complex formation (that the drug molecule is located within the cavity) further studies are needed. Earlier X-ray diffraction and circular dichroism was used for this purpose. Later thermoanalytical methods (thermogravimetry and differential scanning calorimetry) gave the evidence. Nowadays NMR is used for this purpose.

The solubility isotherm of indomethacin in β CD solutions (Fig. 5) shows that the stoichiometry of the complex differs from 1:1. The complex association constant (142 M^{-1}) calculated from the initial linear part is large enough to change the properties (solubility) of the drug but small enough to allow its release into the aqueous environment.

The complex was prepared from a common solution obtained by mixing indomethacin dissolved in acetone and β -cyclodextrin dissolved in water at 70 °C. Upon cooling the crystalline complex was obtained. Its indomethacin content was 12.5% corresponding to 1:2 indomethacin:cyclodextrin molar ratio.

The release profile shown in Fig. 6 indicate the large enhancement of drug dissolution by complexation especially at pH 8. This result explains the enhanced absorption of indomethacin in rats after *per os* administration of 5 mg indomethacin or 40 mg β -cyclodextrin complex corresponding to 5 mg drug. The indomethacin level in the blood of the experimental animals measured by gas chromatography (Fig. 7) was enhanced at each time point. Higher and faster absorption occurred and the blood level was maintained for longer time when the complex was administered compared to the free drug. The improved pharmacokinetic parameters unambiguously show the advantages of the cyclodextrin formulations.

At the 80th anniversary of his birth the management of CycloLab established the Szejtli prize to be awarded biannually to a young cyclodextrin researcher who demonstrated outstanding achievement in the cyclodextrin chemistry. With the ceremony at the International Cyclodextrin Symposia we hope to keep him in memory for long.

A ciklodextrinek élelmiszeripari alkalmazásai napjainkban

BÁLINT Mihály* és FENYVESI Éva

CycloLab Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Laboratórium Kft, Illatos út 7, 1097 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A ciklodextrinek (CD-ek) élelmiszeripari alkalmazása már a ciklodextrin-kutatás hőskorában felvetődött.¹ Az illékony aromaanyagok komplexképzését könnyű volt igazolni, hiszen komplexbe zárva lényegesen lassúbbá vált a párolgás miatti anyagvesztés. Ezek az anyagok ráadásul általában érzékenyek fény- és hőhatásra, de a komplexképzés védelmet nyújt ezen káros hatásokkal szemben is. A ciklodextrines formulázás hatásai tehát hasonlóképpen érvényesülnek az élelmiszeriparban alkalmazott lipofil, illékony, bomlékony anyagokra (aromák, vitaminok, színezékek, zsírok, stb.), mint a gyógyszerek hatóanyagaina, ahogy ezeket Puskás István kollégánk e külön számban közölt cikkében bemutatja. További élelmiszer-specifikus előnyt jelent a kellemetlen ízek és szagok elfedése. A CD-komplexált aromák a szokásos fűszerekhez képest mentesek mikrobiológiai szennyezésektől, nem tartalmaznak esetleg irritáló hatású rostkomponenseket. Technológiai előnyt jelent, hogy a folyadékokból könnyebben kezelhető, szilárd porok keletkeznek komplexképzéssel, és hogy az aromatartalom pontosan adagolható (nem függ a fűszernövény fajtájától, termesztési helyétől, évjáratától). Emulziók stabilizálására, habzásátlásra is lehet használni a CD-eket, ezen kívül csökkentik az enzim oxidációs folyamatok következtében tapasztalt barnulást pl. gyümölcslevek esetében.

Ezeket az előnyöket Szejtli professzor, a ciklodextrin-kutatás hazai úttörője, már 1981-ben megjelent könyvében összefoglalta.²

A CD-ek számos előnyös tulajdonsága érvényesíthető akkor is, ha nem közvetlen az élelmiszerekben használjuk őket, hanem azok csomagolásában: tartósítószer/CD zárványkomplexszel impregnált fólia segítségével elkerülhetjük, hogy a tartósítószer az élelmiszerhez keverjék. CD-tartalmú aromatartó csomagolóanyagok pedig segítik megőrizni a becsomagolt élelmiszer íz- és illatanyagait.³

Az élelmiszeripari alkalmazás lehetőségeit számos kutatóhelyen részletesen vizsgálták. A CycloLab irodalmi adatbázisában⁴ kb. 1500 cikket és 800 szabadalmat találunk a „food” keresőszóra. A leggyakoribb az íz- és illatanyagok komplexálása (780) és a zsírsavak stabilizálása (650). Vitaminok komplexeire keresve 620, mellékíz csökkentésére 600, kellemetlen szag elfedésére kb. 100 találatot kapunk. Nagyszámú összefoglaló közlemény tekinti át az élelmiszeripari alkalmazások különféle vonatkozásait.^{5,6,7,8,9,10}

A három alap CD (α -, β - és γ CD) megtalálható a természetben. Egyes talajlakó baktériumok energiátárolásra állítják elő, ezért rendelkeznek a keményítőt bontó és a keletkező fragmentumokat ciklizáló enzimmal. Nemrégén kiderült, hogy egyes fermentált élelmiszerekben, pl. sörben,

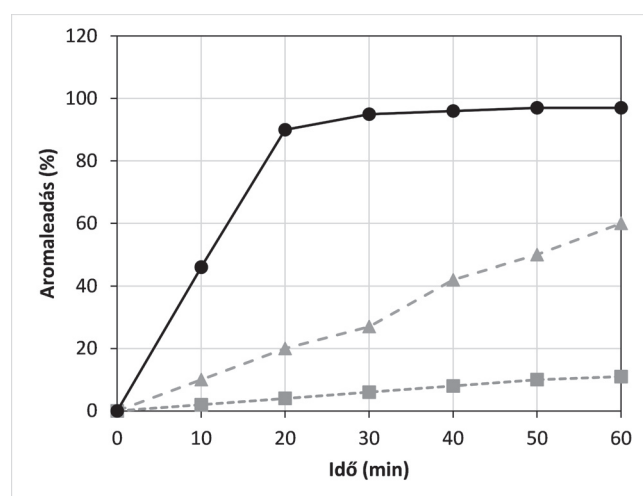
kukoricaszirupban és kenyérben, nyomnyi mennyiségben mindhárom természetes CD glükózil és maltozil származékai kimutathatók.¹¹ Ez tehát arra utal, hogy a CD-ek nem idegen anyagok az emberi emésztőrendszer számára, hiszen ezek az alap élelmiszerek régóta szerepelnek az emberiség étlapján.

A három alap CD sorsa az emberi emésztőrendszerben alapvetően különbözik. Az α CD és a β CD emberi emésztőenzimek által nem emészthető, csak a bélflóra mikroorganizmusai képesek lebontani.¹² A γ CD már az emberi nyál amiláz által emészthető, és a szájüregben nagyrészt a keményítő lebomlási termékeihez hasonló, nyílt láncú maltooligomerekké alakul.¹³

2. Történeti áttekintés

2.1. CD-tartalmú élelmiszerek

A CD-ek ipari méretű gyártása a hetvenes években kezdődött és a nyolcvanas években már megjelentek az első CD-tartalmú élelmiszerek Európában. Ezek CD-nel stabilizált aromákat tartalmazó pudingporok voltak (Manet cég termékei, Franciaország). Nagyjából ezekkel egy időben került forgalomba Magyarországon egy fűszer-só termékcsalád, melynek tagjait különböző, a laboratóriumunkban kifejlesztett aroma/CD komplexekkel készítették (Chrompack cég termékei). Később egyes áruházláncok árulták a CycloLab Kft. aromásított cukor termékeit, melyekben a CD-nel stabilizált aroma (citromháj-, rum- és vaníliaaroma) hosszú ideig eltartható, de sütés közben nedvesség és hő hatására felszabadul. Példaként a citrus aroma felszabadulását mutatja az 1. Ábra.



1. Ábra. Citrus aroma felszabadulása 50 °C-on β CD komplexből 25% (□) és 95% (Δ) RH mellett valamint laktózos keverékből (●) 25% RH mellett gőztérábrázálással mérve.¹⁰

* Tel.: +36-1-347-6060; fax: +36-1-347-6068; e-mail: balint@cyclolab.hu

A komplexet 50 °C-on 25% relatív páratartalom (RH) mellett tárolva 1 óra alatt mindössze kb. az aroma-tartalom 10%-a szabadul fel, míg ugyanilyen körülmények között egy laktózos keverékből közel 100% mindössze 30 perc alatt. A RH növelésével a komplex disszociál és több aroma válik szabadná.¹⁰

Hasonló elvet követve készültek aromásított teák: a szobahőmérsékletű tárolás során stabilizált aromák nem illannak el az aromásított teafüről, nem oxidálódnak, nem bomlanak, de a forró italban felszabadulnak a komplexből.¹⁰

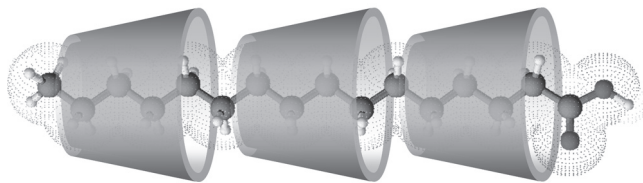
Az élelmiszeraromák eltarthatóságát szemléltetik az 1. Táblázat adatai. A komplexek többsége 10 év után is megőrizte aromatartalmának több mint 80%-át.¹⁴ Csak a citromolaj esetében mértünk ennél alacsonyabb olajtartalmat a tárolás után, mivel ennek fő komponense, a citrál kevésbé stabil komplexeket képez.¹⁵ Ugyanezek az illóolajok önmagukban többnyire pár napos tárolás után észrevehetően elillannak, oxidálódnak.

1. Táblázat. Illóolaj/ β CD komplexek maradék illóolajtartalma több éves tárolás után¹⁴

	Olajtartalom (%)		10 év után a kezdetihez képest (%)
	Kezdeti	10 év után	
Ánizsolaj/CD	9,9	8,0	81
Bergamott/CD	10,2	9,8	96
Citromolaj/CD	10,2	7,0	69
Majorannaolaj/CD	10,6	10,0	94
Fokhagymaolaj/CD	10,0	8,7	87

Az aromák CD-nel alkotott komplexei állandó minőséget biztosítanak, ami egy roppant érdekes alkalmazásra ad lehetőséget: hivatásos kóstolók ízérzékelésének kalibrációjára CD-nel stabilizált sör illetve víz aromaszterdeket használnak.¹⁶

A zsírsavak komplexeinek képződésekor több CD gyűrű is felűződik a hosszú zsírsavláncra polirotaxán-típusú szerkezetet eredményezve (2. Ábra). Míg a telített zsírsavakkal a kisebb üregméretű α CD, a telítetlen zsírsavakkal a szélesebb β CD képez nagyobb stabilitású komplexet. A γ CD ürege túl nagy átmérőjű ezekhez a hosszú zsírsavláncokhoz, ezért a komplexek asszociációs állandója kisebb. Esetenként 2 alkilánc is elfér egy ilyen nagy gyűrűben.¹⁷ A komplexek sztöchiometriáját a zsírsavlánc hossza határozza meg. Általában 6 CH₂ egységre jut egy CD.¹⁸



2. Ábra. Palmitinsav (C16:0) CD komplexének sematikus rajza.

A komplexálás nemcsak a vízdékonyságot fokozza, hanem meg is védi az oxidációtól a telítetlen zsírsav (PUFA)

komponenseket (2. Táblázat). Az oxidáció termékei részben mérgezőek (peroxi-vegyületek), részben kellemetlen avas ízt és szagot okoznak, de mindezek keletkezése elkerülhető CD-es komplexképzéssel. Például, a 18 C-atomos, 2 kettős kötést tartalmazó linolsav (C18:2) és a három kettős kötéssel bíró linolénsav (C18:3) vízben oldhatatlan komplexeket képeznek β CD-nel, melyekben a zsírsav komponensek hosszabb ideig tárolhatók.¹⁹ Laboratóriumunk korábbi eredményei a β CD metilezett származékával készült vízben oldódó komplexekre vonatkoznak, melyek zsírsav-tartalmát gázkromatográfiával határozták meg (2. Táblázat).

2. Táblázat. Telítetlen zsírsavak tárolási stabilitása metilezett β CD-nel stabilizálva 60 °C-on nyitott edényben normál páratartalom mellett³⁰

Zsírsav	Zsírsav-tartalom (%)		6 hónap után a kezdetihez képest (%)
	Kezdeti	6 hónap után	
Olajsav (C18:1)	4,0	3,7	92,5
Linolsav (C18:2)	3,6	3,4	94,4
Linolénsav (C18:3)	4,1	3,3	82,5

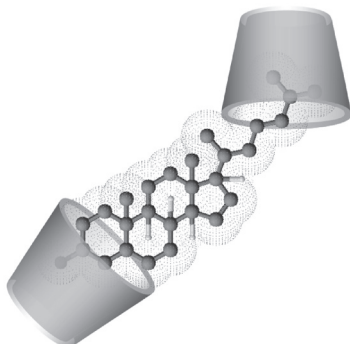
A halolajokban előforduló eikozapentaénsav (EPA, C20:5 w3) és dokozahexaénsav (DHA, C22:6 w3) w3 zsírsavak, melyekben a kettős kötések a zsírsavlánc ω végétől számított harmadik C atomnál kezdődnek, különösen érzékenyek az oxidatív változásokra. γ CD-nel formulázott, hosszú ideig tárolható halolaj-készítményt vásárolhatunk élelmiszer-kiegészítőként.²⁰

A CD termelés növekedésével az élelmiszeripari felhasználás is növekedett. 2008-ban a nyugati világban (Európa és Észak-Amerika) az évi 8600 tonna CD-ből 1200 tonnát (14%-ot) az élelmiszeripar használt fel. A távol-keleti gyártási és felhasználási adatok nem állnak rendelkezésre, de sejthető, hogy a nyugati világot meghaladó mértékű. Japánban különösen sok élelmiszer tartalmaz CD-t íz- és állományjavító adalékként továbbá a kellemetlen szagok elfedésére. Ebben az országban 1988-ban a CD felhasználás közel 80%-át az élelmiszerek tették ki.²¹

2.2. CD mint technológiai segédanyag alkalmazása az élelmiszerek előállításában

A három természetes CD féleség közül a β CD különösen nagy affinitással képez komplexet koleszterinnel. Ez a komplex, amely 1 molekula koleszterin és 2 molekula β CD nem kovalens kapcsolódásával jön létre (3. Ábra), vízben oldhatatlan. Ezt a jelenséget használják fel csökkentett koleszterin-tartalmú élelmiszerek előállítására.²² Például, a CD-nel kezelt tejből, koleszterin-szegény vaj és sajtok állíthatók elő. A legkülönbözőbb sajtokra (Cheddar, Mozzarella, camembert, feta, kéksajt, stb.) kipróbálták az eljárást és akár 90%-kal csökkent koleszterin-tartalmat értek el. Az így készült sajtok élvezeti értéke nem romlik, mivel a koleszterint jelentősen nagyobb affinitással köti a CD, mint az íz- és illatanyagokat, így megfelelően beállított technológia esetén az utóbbiakat nem vonja ki.²³ A tejből kiszűrt koleszterin-CD komplexből a koleszterin kinyerhető és pl. szteroid szintézis alapanyagaként hasznosítható, a „kiürült” CD pedig visszaforgatható.²⁴

Hasonló eljárást dolgoztak ki koleszterinmentes tojás előállítására. Ez esetben azonban nemcsak a koleszterint, hanem a karotinoid komponenseket is megköti a CD, ami a koleszterinmentes tojás kevésbé intenzív sárga színén szabad szemmel is érzékelhető.²⁵

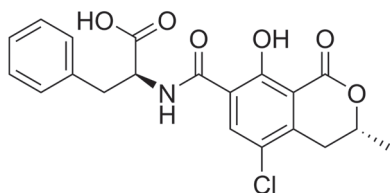


3. Ábra. A koleszterin/βCD 1:2 komplex szerkezeti modellje. A CD-t a molekula alakját utánzó dézsával jelenítjük meg.

CD-nel vonják ki a szabad zsírsavakat a sütőolajból²⁶, a jellegzetes „kecske”-ízt okozó zsírsavakat a kecsketejből²⁷, valamint a mellékízt okozó komponenseket a szójatejből.²⁸ Japán kutatók kimutatták, hogy szójatejet CD-nel kezelve az allergén komponensek (pl. a Gm30K fehérje) koncentrációja is csökken.²⁹

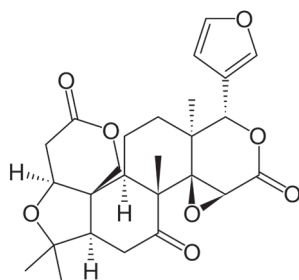
A telítetlen zsírsavak is kivonhatók olajokból vízben oldódó CD-származékok segítségével. A metilzett CD származékok vizes oldatai alkalmasak erre.³⁰

Almaléhez 1% βCD-t adva, nemcsak az enzimés barnulás mértéke csökken, hanem az aflatoxinok (pl. patulin) koncentrációja is.³¹ Kávéból, kakaóból, borból, sörből a gombatoxinok közül az ochratoxint sikerült kivonni CD-es komplexálással (4. Ábra).³²



4. Ábra. Egy tipikus gombatoxin, az Ochratoxin A képlete.

Citruslevek keserűségét okozó komponensek kivonására CD-polimert alkalmaznak. A polimerrel töltött oszlop szelektíven köti meg a naringint és limonint (5. Ábra).³³



5. Ábra. Limonin, a citruslevek keserűségét okozó egyik komponens.

Az oszlop híg vizes lúgos oldattal (2% NaOH vagy Na₂CO₃) regenerálható és legalább 20-szor újrahasználatos a megkötési kapacitás jelentősebb csökkenése nélkül.^{34,35}

Kitozánhoz kötött CD is alkalmas oszloptöltet többféle növényi kivonat (articsóka, aloé) ízének javítására.³⁶

3. Ciklodextrinek alkalmazhatósága élelmiszerekben a hatáság illetve a gyártó szemszögéből

3.1. Az Európai Unió területén érvényes szabályozás

Az első élelmiszerben történő felhasználásra engedélyezett ciklodextrin a βCD volt: a Közös FAO/WHO Élelmiszer-adalékanyag Szakértői Bizottság (JECFA) 1993-as³⁷ és 1995-ös³⁸ pozitív állásfoglalása után az EU Élelmiszer-tudományi Bizottsága 1996-ban³⁹ 0-5 milligramm/testsúlykilogramm elfogadható napi beviteli mennyiséget határozott meg. A βCD élelmiszeraromák, -színezékek és egyes vitaminok hordozójaként illetve stabilizálószerként E459 azonosítóval került be az engedélyezett élelmiszer adalékanyagok közé. Jelenleg az 1333/2008/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet az összes helyesbitéssel és módosítással⁴⁰ a βCD-t színezékektől és édesítőszerektől különböző más adalékanyagként engedélyezi felhasználásra az alábbiak szerint:

- *quantum satis* (amennyi elég) mennyiségben tabletta és bevonatos tabletta formájú élelmiszerek esetén, minden élelmiszerkategóriánál, kivéve az azonos rendeletben meghatározott élelmiszereket, amelyekben adalékanyag jelenléte nem engedhető meg,
- *quantum satis* mennyiségben egyéb édességek esetén, beleértve a leheletfrissítő cukorkákat is, kizárólag tabletta és bevonatos tabletta formában,
- *quantum satis* mennyiségben szilárd étrend-kiegészítők esetén, beleértve a kapszulákat, tablettákat és hasonlókat, kivéve a rágható formákat, kizárólag tabletta és bevonatos tabletta formában,
- 500 mg/l maximális mennyiségben a kész élelmiszerben ízesített instant italporok esetén,
- hordozóként élelmiszer-adalékokban, 1000 mg/kg maximális mennyiségben a kész élelmiszerben,
- élelmiszer-adalékként élelmiszer-aromákban, 500 mg/l maximális mennyiségben a kész élelmiszerben ízesített teák és ízesített instant italporoknál, 1000 mg/kg maximális mennyiségben a fogyasztásra kész élelmiszerben vagy a gyártó útmutatásai szerint elkészített élelmiszerben ízesített snackeknél,
- élelmiszer-adalékként tápanyagokban, kivéve az azonos rendeletben meghatározott csecsemőknek és kisgyerekeknek készült élelmiszerekben használt tápanyagokat, 100000 mg/kg mennyiségben a készítményben, 1000 mg/kg mennyiségben a kész élelmiszerben.

Az EU területén 1997-től hatályba lépett 258/97/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet⁴¹ alapján az az élelmiszer vagy élelmiszerben felhasználni kívánt anyag, amely bizonyítható módon 1997. májusa előtt nem volt jelentős

mennyiségben élelmiszerként fogyasztva egyik tagállamban sem, de biztonságos fogyasztására vonatkozóan adatok állnak rendelkezésre, új élelmiszerként illetve új élelmiszer-összetevőként engedélyezhető. Mivel α CD és γ CD esetén élelmiszerben történő felhasználásra az engedélyezési eljárás 1997 után kezdődött, így mindkettő új élelmiszer-összetevőként került elfogadásra.

Az α CD a 2008/413/EK bizottsági határozat alapján 2008 óta, a γ CD a 2012/288/EU bizottsági végrehajtási határozat alapján 2012 óta új élelmiszer-összetevőként forgalmazható az EU területén.

Így egy roppant érdekes helyzet áll fenn: míg kémiai szempontból és gyakorlati felhasználhatóságuk alapján nagyon hasonló molekulákról beszélhetünk, szabályozás szempontjából a β CD élelmiszerekhez szándékosan hozzáadott, kizárólag technológiai célokat szolgáló komponens, amely szigorúan szabályozott élelmiszerfajtákhoz korlátozott mennyiségben adható, addig az α CD és a γ CD jelenleg technológiai célokat nem tölthet be élelmiszerekben, továbbá mennyiségi korlátozás nem vonatkozik rájuk. Az α CD mennyiségi felhasználhatóságára mindössze ajánlás vonatkozik a „diétás termékekkel, táplálkozással és allergiákkal foglalkozó tudományos testületnek a Bizottság kérésére kiadott, az alfa-ciklodextrin biztonságosságáról szóló szakvéleményében”.⁴²

2007 óta az EU-ban forgalmazott élelmiszereken feltüntetett tápanyag-összetételre és egészségre vonatkozó állításokat a 1924/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet⁴³ szabályozza. Jelenleg az α CD-re jóváhagyott egészségre vonatkozó állítást találhatunk az EU adatbázisban⁴⁴: „Az alfa-ciklodextrin fogyasztása keményítő-tartalmú étel részeként hozzájárul az adott étkezés utáni vércukorszint-emelkedésének mérsékléséhez”. Az állítás felhasználhatóságának feltétele, hogy legalább 5 g α CD-t kell tartalmaznia a készítménynek minden 50 g keményítőt tartalmazó ételadaghoz, amely mellé fogyasztásra kerül.

3.2. Az Európai Unió kívüli szabályozás

Az α CD-t a JECFA 2002-ben⁴⁵ biztonságosnak ítélte technológiai funkciót betöltő élelmiszer komponensként, elfogadható napi beviteli mennyiség meghatározása nélkül, továbbá 2006-ban⁴⁶ élelmi rostként történő felhasználását is jóváhagyta. 2004-ben az USA-ban GRAS (Generally Recognized As Safe, azaz rendeltetésszerű használat mellett – beleértve a felhasználás módját és mennyiségét – szakértők által biztonságosnak tartott) besorolást nyert.¹³

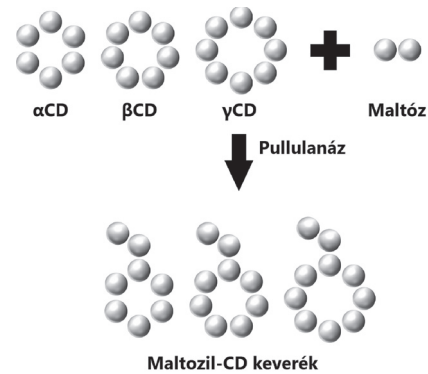
A β CD GRAS besorolást 2001-ben nyert az USA-ban,⁴⁷ azonban már 1996-tól évi 50 tonnás mennyiségben használták élelmiszerekben.

A γ CD volt a második CD, amelyet a JECFA biztonságosnak ítélt élelmiszer adalékként történő felhasználásra 1999-ben⁴⁸ (elfogadható napi beviteli mennyiség meghatározása nélkül), és az első, amely GRAS besorolást kapott az USA-ban 2000-ben.⁴⁹

A GRAS besorolás nem jelent szigorú szabályozást sem a felhasználás módjára sem a mennyiségre, csak az

engedélyezést kezdeményező személy által feltételezett élelmiszertípusokat és az azokban felhasznált mennyiségeket veszi alapul a besorolás megadásakor, ami leginkább ajánlásként értelmezhető.

Japánban a három alap CD-en kívül a maltozil-CD is engedélyezett élelmiszerben történő felhasználásra: ISOELEAT márkanév alatt maltozil- α CD, - β CD és - γ CD keverékként érhető el (6. Ábra).²¹

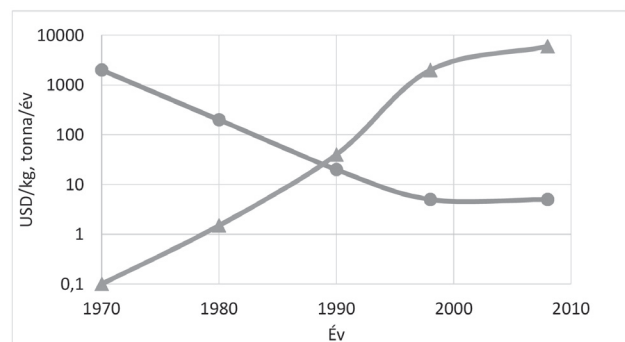


6. Ábra. Az ISOELEAT gyártási folyamata, a végtermék legalább 50% maltozil-származékot, 80% CD-t tartalmaz (α CD: β CD: γ CD arány 6:3:1).²¹

Japánban a CD-ek élelmiszeripari felhasználása már az 1980-as években 400 tonna/éves mennyiségben jellemző volt, amelynek alapja, hogy az oldószermentes technológiával előállított CD-eket természetes élelmiszer adaléknak tekinti a hatóság.²¹

3.3. Ciklodextrinek alkalmazhatósága a gyártó szemszögéből

Élelmiszer-előállítók részéről a CD-ek alkalmazásával kapcsolatban az egyik meghatározó tényező azok költsége: bár a CD-ek ára az évtizedek folyamán igen jelentős mértékben csökkent, és hozzáférhetőségük sokat javult, még mindig a magasabb árkategóriájú adalékanyagokhoz hasonló költséggel bírnak (7. Ábra).



7. Ábra. A β CD árának (●) és termelésének (▲) alakulása az évek során.⁵⁰

Így élelmiszerhez akkor használ CD-t az előállító, ha az kimagasló technológiai előnnyel jár, illetve valamilyen tulajdonságát (beleértve az egészségre vonatkozó előnyös tulajdonságokat is) hirdetheti akár a termék csomagolásán, akár kapcsolódó felületeken.

Mivel Japánban már a 80-as évek óta egy megengedő szabályozási környezetben jelen vannak CD-ek az élelmiszerekben íz- és állományjavító adalékként, mára a vásárlók körében is ismert anyagokról beszélhetünk, amelyek pusztán jelenléte a termékben pozitív vásárlói megítélést eredményez. Az EU területén a szigorúbb szabályozás akadályozhatja a piaci elterjedést.

Hivatkozások

- Crini, G. *Chem. Rev.* **2014**, *114*(21), 10940-10975.
- Szejtli, J. *Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1982**.
- Fenyvesi, É.; Balogh, K.; M. Sényi, J.; Siró, I.; Szente, L. *CDNews* **2007**, *21*(4).
- <http://www.cyclodextrin.net/>
- Szente, L.; Szejtli, J. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 137-142.
- Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J. C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gandara, J. *Food Hydrocol.* **2009**, *23*, 1631-1640.
- Cabral Marques, H. *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25*, 313-326.
- Cravotto, G.; Binello, A.; Baranelli, E.; Carraro, P.; Trotta, F. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2006**, *2*, 343-350.
- Martina, K.; Binello, A.; Lawson, D.; Jicsinszky, L.; Cravotto, G. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2013**, *9*(3), 167-179.
- Fenyvesi, É.; Vikmon, M. A.; Szente, L. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2013**, DOI:10.1080/10408398.2013.809513
- Szente, L.; Harangi, J.; Greiner, M.; Mandel, F. *Chemistry & Biodiversity* **2006**, *3*(9), 1004-1014.
- Antenucci, R. N.; Palmer, J. K. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*(6), 1316-1321.
- U.S. Food and Drug Administration GRAS Notice No. 155.
- Szente, L.; Gal-Fuzy, M.; Szejtli, J. *Acta Aliment.* **1988**, *17*, 93-199.
- Szente, L.; Szejtli, J. *ACS Symp. Ser.* **1988**, *370*, 148-157.
- <http://www.flavoractiv.com/>
- Yannakopoulou, K.; Mavridis, I. M. *Current Organic Chemistry* **2004**, *8*(1), 25-34.
- Schlenk, H.; Sand, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 2312-2320.
- Gorska, A.; Ostrowska-Ligeza, E.; Wirkowska, M.; Brys, J. *ZYWN.-Nauk Technol. Jakosc.* **2011**, *18*, 115-123.
- <http://www.wacker.com/cms/en/industries/lifescience/neutraceuticals/neutraceuticals-applications/neutra.jsp>
- Hashimoto, H. *Proceedings of 4th International Symposium on Cyclodextrins* **1988**, 533-43.
- Alonso, L.; Fontecha, J.; Cuesta, P.; Juarez, M.; Gilliland, S. E. *Milchwissenschaft* **2010**, *65*, 36-37.
- Kwak, H. S.; Jung, C. S.; Seok, J. S.; Ahn, J. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **2003**, *16*(3), 409-416.
- Roderbourg, H.; Dalemans, D.; Bouhon, R. European Patent 0387708, 1990.
- Awad, A. C.; Bennink, M. R.; Smith, D. M. *Poult. Sci.* **1997**, *76*, 649-653.
- Conte, J. A.; Stauffer, K. R. U.S. Patent 5 560 950, 1996.
- Luiz, M. T. B.; Fett, R. Brazilian Patent 9 802 169, 2000; *Chem. Abstr.* **2000**, *134*, 162218.
- Akshay, A.; Srinivasan, D. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1007-1013.
- Origasa, K.; Ogawa, T. Japanese Patent 2008 220 301, 2008; *Chem. Abstr.* **2008**, *149*, 377411.
- Szente, L.; Szejtli, J.; Szemán, J.; Kato, L. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1993**, *16*, 339-354.
- Essa, H. A.; Ayesh, A. M. *Egypt. J. Food Sci.* **2002**, *30*, 1-21.
- Verrone, R.; Catucci, L.; Cosma, P.; Fini, P.; Agostiano, A.; Lippolis, V.; Pascale, M. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57*, 475-479.
- Shaw, P. E.; Wilson, C. W. *J. Food Sci.* **1983**, *48*(2), 646-7.
- Shaw, P. E.; Wilson, C. W. *J. Food Sci.* **1983**, *50*(4), 1205-7.
- Újházy, A.; Szejtli, J. *Gordian* **1989**, *89*, 43-45.
- Binello, A.; Cravotto, G.; Nano, G. M.; Spagliardi P. *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*(5), 394-400.
- Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA) WHO FAS **1993**, *32*, 173-193.
- Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA) WHO FAS **1995**, *35*, 257-268.
- Scientific Committee for Food (SCF) (1996). Opinion on β -cyclodextrin manufactured by the action of the enzyme Cycloglycosyltransferase obtained from *Bacillus circulans* on partially hydrolysed starch. Expressed on 13.12.1996. Forty First series of reports of the Scientific Committee for Food (1997). European Commission, Luxembourg, Cat no. GT 07 97660-EN-DE-FR.
- Az Európai Parlament és a Tanács 1333/2008/EK Rendeletének az összes helyesbítéssel és módosítással egységes szerkezetbe foglalt 2015.09.01-i változata
- Az Európai Parlament és a Tanács 258/97/EK Rendeletének az összes helyesbítéssel és módosítással egységes szerkezetbe foglalt 2009.08.07-i változata
- Bresson, J.-L.; Flynn, A. *The EFSA Journal* **2007**, *537*, 1-21.
- Az Európai Parlament és a Tanács 1924/2006/EK Rendeletének az összes helyesbítéssel és módosítással egységes szerkezetbe foglalt 2012.11.09-i változata
- <http://ec.europa.eu/nuhclaims/>
- Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA) WHO FAS **2002**, *48*, 111-127.
- Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA) WHO FAS **2006**, *54*, 3-15.
- U.S. Food and Drug Administration GRAS Notice No. 74.
- Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA) WHO FAS **1999**, *42*, γ -cyclodextrin.
- U.S. Food and Drug Administration GRAS Notice No. 46.
- Szejtli, J. *Pure and Applied Chemistry* **2004**, *76*(10), 1825-1845.

Application of cyclodextrins in the food industry

The idea of applying cyclodextrins (CDs) in food dates back to the beginnings of cyclodextrin research.¹ The complex formation with volatile compounds was easily proven by the measurable decrease in the material loss. These compounds are usually prone to light- and heat-induced decomposition that are also prevented by CDs. The fact that the volatility of certain molecules are reduced upon complex formation can also be utilized in food for reducing undesirable odors. Covering the unpleasant taste is an additional benefit. Flavor ingredients complexed with CDs are free from microbiological contaminants, do not contain irritating fibrous

materials compared to the original flavors. Certain technological advantages might originate from formulating with CDs: by bringing liquids into solid form, handling can be improved through easier and more precise dosing. CDs can also be used for stabilizing emulsions, as defoamers and they also mitigate browning of fruit juices (due to enzymatic oxidation).²

The advantages of CD complex formation can be exploited in food packaging as well: the direct addition of the preservative to the foodstuff can be avoided by using foil impregnated with preservative/CD inclusion complex without losing microbiological safety. CD-containing packaging material can be employed also for preserving taste and flavor components.³

The fate of the three parent CDs (α -, β - and γ CD) in the human digestive tract is essentially different: while the α CD and the β CD are not degraded by human digestive enzymes (only fermented by certain members of the intestinal microflora),¹² the γ CD is readily metabolized by human salivary amylase.¹³

As the industrial production of CDs started in the 1970s, their application in marketed food products occurred as early as the 1980s. The amount of food products that contain CDs is remarkably higher in Japan compared to other parts of the world: this is probably due to the permissive regulatory environment with CDs since they are legally approved as natural food additives for more than 30 years.²¹ Public awareness of CDs in Japan is high and their simple presence in foodstuff contributes to a better image of the product.

In Hungary, a family of flavored salts were the first products marketed. Later on, a flavored sugar family useful for baking was introduced. The CD-stabilized flavors (lemon peel, rum and vanilla) can be stored for a long time but are released upon the effect of heat and moisture during baking. The release of citrus oil flavor is illustrated in Fig. 1. The essential oil/CD complexes showed extreme stability: over 80% of the flavor content was preserved after storing the complex for 10 years at ambient conditions (Table 1).¹⁴

Effective stabilization of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) can be achieved by complexation as well. Over 80% of the sensitive linolenic acid (C18:3), a PUFA with three double bonds was detected after 6-month storage at 60 °C (Table 2).³⁰ Fish oil containing PUFAs stabilized by γ CD can be purchased as nutritional supplement.²⁰

CDs can be applied in food processing. For instance, cholesterol can be removed from milk to produce butter and cheese with reduced cholesterol content.²² Fungal toxins, such as patulin and ochratoxin can be removed from beverages by CD complexation.^{31,32} CD

polymer is applied for reducing the limonin and naringin content in citrus juices, the two components responsible for the bitter taste.³³

The regulatory status of the parent CDs around the world shows certain variety. In the USA the three parent CDs have GRAS (Generally Recognized as Safe - the substance is generally recognized, among qualified experts, as having been adequately shown to be safe under the conditions of its intended use) approval.^{13,47,49} In the EU the α CD and the β CD are approved as novel food ingredients (2008/413/EC Commission Decision and 2012/288/EU Commission Implementing Decision, respectively) while the β CD is approved as a food additive with the code E459.⁴⁰

This situation creates a peculiar environment for CDs in foods in the EU: while the three CDs, chemically and concerning their practical utilization, are very similar, from the regulatory point of view β CD is a substance intentionally added to food for solely technological purposes (with strict limitations on food categories it can be added to and respective allowed amounts), the α CD and the γ CD cannot have technological purpose in food but no further restrictions apply to them.

In the EU Register of nutrition and health claims made on foods⁴⁴ one authorised claim can be found for α CD: "Consumption of alpha-cyclodextrin as part of a starch-containing meal contributes to the reduction of the blood glucose rise after that meal". The claim may be used for food which contains at least 5 g of α CD per 50 g of starch in a quantified portion as part of the meal. In order to bear the claim information shall be given to the consumer that the beneficial effect is obtained by consuming the α CD as part of the meal.

For the manufacturers of food products one of the main factor in deciding for the incorporation of an ingredient is its cost. Although the price of the CDs dramatically decreased since their initial production, they still belong to the group of the more expensive additives (Fig.7).

A ciklodextrinek aggregációjának gyógyszerformulázási következményei

PUSKÁS István* és SCHROTT Mária

CycloLab Ciklodextrin Kutató Fejlesztő Laboratórium Kft.

Illatos út 7. 1097 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A ciklodextrinek (CD) hat, hét vagy nyolc α -D-glükopiranoz-egységből álló ciklikus oligoszacharidok. A glükopiranoz egységek számától függően alfa-, béta-, illetve gamma-CD néven ismertek, ezek az ún. alap ciklodextrinek. A CD-k csonkakúp alakú, belső üreggel rendelkező nanoméretű molekulák. A szerkezeti elrendeződés következményeként ez az üreg apoláris; a molekula pereme és külső felülete poláris. A CD-k asszociációs típusú, ún. zárványkomplexeket képezhetnek különböző kémiai szerkezetű (elsősorban egy, vagy több apoláris csoportot tartalmazó) ionokkal, gyökökkel vagy molekulákkal, de klasszikus értelemben vett kémiai kötés közöttük általában nem jön létre. Megfelelő körülmények között a zárványkomplex könnyen disszociálhat, és ekkor a szabaddá vált vendégmolekula visszanyeri eredeti fizikai-kémiai sajátságait.^{1,2}

A Magyar Kémiai Folyóirat hasábjain első alkalommal 1978-ban jelent meg ciklodextrin témájú közlemény, melyben Szejtli József és munkatársai elemezték a CD-komplekképzés színezékek spektrális sajátságaira gyakorolt hatását, valamint javasolták e jelenség kihasználását CD-tartalmú oldatok analitikai vizsgálatára.³

A CD-k sajátságait tárgyaló tudományos közlemények (cikkek, monográfiák) számottevő hányada kapcsolódik gyógyszeripari alkalmazáshoz,⁴ mert számos gyógyszermolekula alkalmas komplexképző partner a CD-k számára. A ciklodextrinnek történő komplexképzés egyik leggyakoribb velejárója, hogy a bezárt vegyület oldékony-sága vizes fázisban (akár sokszorosan) felülmúlhatja a komplexálatlan vegyületét. Sok kevéssé oldható hatóanyagból nehéz előállítani vizes közegű injektálható készítményt. További probléma lehet, ha az alkalmazandó vegyületek illékonyak, hő hatására elbomlanak, érzékenyek az oxidációra, fényre, bizonyos ionokra, illetve összeférhetetlenek más összetevőkkel. Ezekben az esetekben sikerrel alkalmazták a CD-ket gyógyszerformulázási segédanyagként. A CD-k alkalmazásán alapuló technológiai jellemzők javulása a vendégmolekulák CD komplexen belüli molekuláris szintű diszperz állapotával indokolható. A kialakuló komplex egésze hidrophil kémiai karakterű lesz, és a hatóanyag védett mikrokörnyezetbe kerül.

Ciklodextrinnek célszerűen szabályozhatók egyes hatóanyagok farmakokinetikai jellemzői is.⁵ A forgalomba került ciklodextrin-farmakon komplexeket tartalmazó gyógyszerkészítmények jelentős része tablettá, kapszulá, illetve draszté formában kerül kiszerezésre.⁶ Ilyen készítmények kritikus jellemzője a hatóanyag(ok)

felszabadulási és oldódási sebessége, valamint a biológiai felszívódás mértéke.

A vízben rosszul oldódó farmakonok biológiai hasznosulása gyakran csekély mértékű. A hatóanyag azonban jól oldódó ciklodextrin zárványkomplexéből gyomornedvvel érintkezve percekben belül felszabadulhat, valamint a felszívódás szempontjából kedvező magas szabad farmakon-koncentráció hosszú ideig biztosítható. A hidrophil komplex asszociátum, valamint maga a CD gyakorlatilag nem szívódik fel a tápcsatornából.⁷

További előnyös sajátsága is lehet a CD-komplekxbe zárt farmakonoknak. A gyógyszerhatóanyagok jelentős része kellemetlen ízű vagy szagú, alkalmazásuk súlyos mellékhatással járhat, irritálhatják a gyomorfalat vagy a nyálkahártyát. A problémák részleges vagy teljes megoldását a hatóanyag CD-be történő bezárása kínálja.⁸

Kedvező komplexképző tulajdonságaik, jó vízdoldhatóságuk és csekély aggregációs hajlamuk miatt számos forgalomban lévő gyógyszerészeti készítményben alkalmaznak kémiai módosított ciklodextrin-származékokat is, például 2-hidroxi-propil- β -ciklodextrint (HPBCD), és szulfo-butil- β -ciklodextrint.⁹ E termékek túlnyomó többsége parenterális készítmény vagy szemcsepp, melyekkel szemben szigorú hatósági követelményeket támasztanak. Ezek közül kiemelendő, hogy szemmel detektálható részecskék nem lehetnek jelen a termékben. E formulációk fejlesztésekor az aggregációs sajátságok vizsgálatának kiemelt jelentősége van, mivel az aggregátumok a hatóanyag kikristályosodásának gócai lehetnek.

A ciklodextrinek komplexképző sajátsága kedvezően hasznosítható biológiai aktivitást mutató makromolekulák és peptidok stabil, injektálható vizes oldatainak előállítására.¹⁰ Kiemelkedő gyógyászati jelentőségű, de alacsony oldékony-ságú, idővel aggregálódó polipeptideket pl. interleukin-2-t (IL-2); tumor nekrozis faktort (TNF), makrofág kolónia stimuláló faktort (M-CSF), inzulint és eritropoietint (EPO) tartalmazó vizes oldatok hosszabb ideig tárolhatók, ha adalékanyagként HPBCD-t is tartalmaznak. A stabilitásnövekedés ugyanakkor nem csökkenti a polipeptid oldatok biológiai hasznosulási arányát.¹¹

ACD-k gyógyászati felhasználása jelentős paradigmaváltáson ment keresztül a 2000-es évek fordulóján, miután gyakorlati alkalmazást is nyert a felismerés, hogy bizonyos CD-származékok önmagukban is alkalmas vegyületek orvosi kezelés céljára. A CD-kutatás történetének ezen izgalmas

* Tel.:(1) 347 60 77; fax:(1) 347 60 68; e-mail: puskas@cyclolab.hu

fejezetét Sente Lajos foglalta össze e folyóirat egy évvel korábbi számában.¹²

2. A ciklodextrinek és komplexeik aggregációs viselkedése

A CD-kből készült vizes oldatok ideálistól eltérő ozmózisnyomás-adataiból számolt aktivitási együtthatók alapján japán kutatók már az 1980-as évek elején feltételezték, hogy ezen oligoszacharid molekulák önszerveződésre (legalábbis dimer képzésére) hajlamosak.¹³

A műszeres vizsgálati lehetőségek szélesedő tárházának (pl. az új fényszórásos technikák, atomerő mikroszkópia (AFM), elektron-mikroszkópia, elektron spin rezonancia (ESR) spektroszkópia, stb.) bővülésével, és az egyre érzékenyebb módszerek elérhetővé válásával az intermolekuláris kölcsönhatások részletesebb jellemzésére nyílt lehetőség.^{14,15} Az aggregátumok méreteloszlásának és stabilitásának vizsgálata gyakorlatban is kiaknázható eredményeket szolgáltatott a gyógyszerfejlesztő szakemberek számára.

Az 1990-es években több közlemény is foglalkozott azzal a felismeréssel, hogy számottevő különbség lehet az alap CD-k, illetve származékaik aggregációs hajlama között. Az alap CD-k vizes oldatban meglehetősen hajlamosak aggregációra, az aggregált részecskék átmérője akár a néhány mikrométert is elérheti.¹⁶ Különösen figyelemreméltó, hogy a gamma-ciklodextrin akár néhány százalékos vizes oldata napokon belül szabad szemmel is látható opaleszcenciát mutat és ülepedő diszperz rendszert képez.¹⁷

Hidrofil CD-származékok kevésbé aggregálnak, mint a megfelelő alapvegyület, mivel a CD-molekulák peremén található -OH csoportok teljes vagy részbeni szubsztitúciója miatt csökkenhet az intermolekuláris hidrogénhidak létrejöttének lehetősége.¹⁸ Amennyiben hidrofób oldalláncokat építünk a CD-molekulákra, a vízben való oldékonyság csökkenése mellett vizes oldatukban az aggregáció mértékének növekedésére számíthatunk.^{19,20}



1. Ábra. Polimerrel stabilizált ciklodextrin-hatóanyag komplex sematikus ábrázolása.

A ciklodextrinek aggregációra való hajlama (alkalmas körülmények között) gyógyszerformulálási szempontból akár előnyös is lehet. Nanoméretű CD- vagy CD-komplex aggregátumok vízoldható polimerekkel sztérikusan

stabilizálhatók. A polimer burokkal védett aggregátumok további összeépülésre már nem hajlamosak, a polimerekkel stabilizált aggregátumok inkább az asszociációs kolloid rendszerekkel mutatnak szerkezeti analógiát (ld. 1. ábra). Ilyen típusú formulációkat a gyakorlatban vizes közegben melegítéssel, majd visszahűtéssel állítanak elő. A gyógyszerészet mellett a kozmetikum-, illetve növényvédőszer-formulálás során is használható eljárás szabadalmi oltalomban is részesült.²¹

Jelen közleményben néhány saját (a Cyclolab Kft-nél elvégzett) ciklodextrin-aggregációs vizsgálatot mutatunk be.

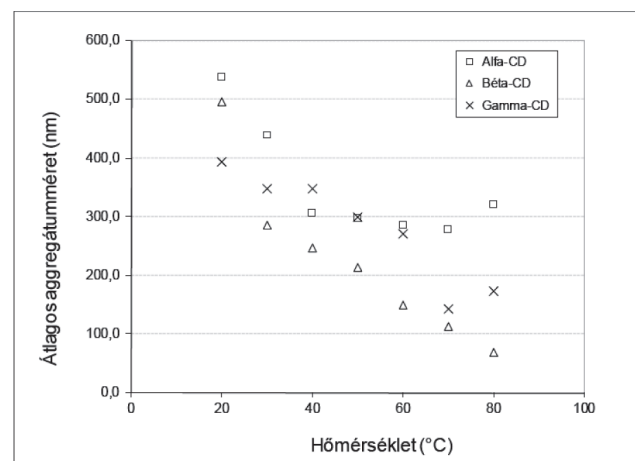
3. Vizsgálati módszer

Az aggregátumok méreteloszlását Malvern Zetasizer Nano ZS készülékkel (Malvern Instruments Ltd, Egyesült Királyság), dinamikus fényszórás mérés (fotonkorrelációs spektroszkópia) módszerrel vizsgáltuk. A készülék lézertáplálása 633 nm-es HeNe lézer, a folyadéktartó 1,00 × 1,00 cm méretű üvegküvetta volt. A részecskeméret-eloszlásokat közvetlenül a készülékből nyert autokorrelációs függvényekből Zetasizer Software 6.2 verziójú szoftverrel értékeltük.

A folyadék mintákat közvetlenül vizsgálat előtt precíziós, szőtt, egyszálú, 10 μm-es névleges résméretű szitaszöveten (Medifab, SEFAR AG, Svájc) szűrtük a szemmel érzékelhető lebegő szennyeződések eltávolítása végett.

4. Felhasznált anyagok

A kísérletek során használt ciklodextrinek a CycloLab Ciklodextrin Kutató Fejlesztő Laboratórium Kft. (Budapest, Magyarország) termékei. Adalékanyagokként a Molar Chemical (Budapest, Magyarország) p.a. minőségű finomvegyszereit használtuk fel.



2. Ábra. Az aggregátumméret változása a hőmérséklet függvényében az alap CD-k vizes oldataiban (a kísérleti adatok hibahátára: ± 20 nm).

5. Eredmények

Különböző CD molekulák aggregációját vizsgáltuk a hőmérséklet függvényében. A három, leggyakrabban

alkalmazott (ún. alap) CD vizes oldatában lévő aggregátumok fényszórással meghatározott méretét a 2. ábrán mutatjuk be. A CD-k koncentrációit úgy választottuk meg, hogy azok közel legyenek a telítési értékhez, mivel leggyakrabban ilyen oldatokat alkalmazunk preparatív célú komplexképzés során, amennyiben oldat fázisú technikát választunk. Mindhárom esetben azt tapasztaltuk, hogy az átlagos aggregátumméret – némileg elérő mértékben – csökken a hőmérséklet emelkedésével. A vizsgált hőmérséklet-tartományban egyik esetben sem értük el a teljes mértékű de-aggregációt, azaz a hőmozgás kinetikai energiája még 80 °C körül sem elegendő, hogy e CD-molekulák összekapcsolódását megakadályozza.

A CD-k aggregációs állapotának vizsgálatából nyert adatok nemcsak gyógyszer technológiai fejlesztések során hasznosíthatók. Az élettudományok és a biotechnológia jónéhány területén alkalmaznak CD-ket elsősorban szolubilizálószerként, illetve sejtmembrán-összetétel módosító ágensként. A szolubilizált gyógyszer molekulák

fizikai állapota jelentős hatással lehet e szállítást végző („carrier”) molekulák hatékonyságára, és a megcélzott terület elérhetőségére is az ún. „fokozott permeabilitás és visszatartás” hatás miatt.²² Nanoméretű részecskéket tartalmazó gyógyszerformulációk alkalmazásával a nehezen átjárható biológiai gátrendszeren keresztül is átjuttatható a kívánt hatóanyag.^{23,24} Az 1. táblázatban biológiai alkalmazásokban gyakran alkalmazott adalékanyagok (hidrogénhid kötést perturbáló karbamid, makromolekulák, savak) és koszolvens hatását vizsgáltuk alap β - és γ -CD-k, és egy kiválasztott szövetbarát, alacsony toxicitású CD-származék (HPBCD) aggregációjára. Annak felderítésére végeztük el a vizsgálatokat, hogy pusztán ezen adalékanyagok alkalmazásával célzottan módosíthatók-e a CD-k aggregációs sajátságai.

A vizsgált adalékanyagok és koszolvens de-aggregáló hatása kétféleképp nyilvánulhat meg. Egyfelől az aggregátumok mérete csökkenhet, vagy az aggregátumok mennyisége csökken változatlan átlagos átmérő mellett.

1. Táblázat Különböző sajátságú segédanyagok és koszolvens hatása a ciklodextrinek aggregációs sajátságaira (25 °C)

Ciklodextrin	Segédanyag / koszolvens (koncentráció)	Hatás
β -ciklodextrin	citromsav (0,1 – 1,0 %)	De-aggregáló hatás
	citromsav (0,1 – 1,0 %) 80 °C-ra melegítés, majd 25°C-ra visszahűtés után	Jelentős de-aggregáló hatás
	dimetil formamid (0,1 – 1,0 %)	De-aggregáló hatás
	karbamid (1,0 %)	Nincs hatással az aggregációra
	dimetil szulfoxid (1,0 %)	Nincs hatással az aggregációra
	polivinil pirrolidon K-30 (0,1 %)	De-aggregáló hatás
γ - ciklodextrin	citromsav (0,1-1,0 %)	Aggregáló hatás
	karbamid (1,0 %)	Nincs hatással az aggregációra
	dimetil formamid (1,0 %)	Nincs hatással az aggregációra
	polivinil pirrolidon K-30 (1,0 %)	De-aggregáló hatás
2-hidroxi-propil- β - ciklodextrin, átlagos szubsztitúciófok: ~ 4	1,0% citromsav / citrát puffer (pH=6)	
	NaCl (0,9 %)	
	KH ₂ PO ₄ (1,0 %)	
	EDTE (1,0 %)	
	Foszfát pufferelt sóoldat (PBS)	Nincs hatással az aggregációra
	bórsav (1,0 %)	
	arginin (1,0 %)	
	fruktóz (5,0 %)	
	glicerin (1,0 %)	
	etanol (1,0-15 V%)	
	nátrium tetraborát (1,0 %)	Aggregáló hatás
	polivinil pirrolidon K-17 (1,0 %)	De-aggregáló hatás
polivinil pirrolidon K-17 (1,0 %) + etanol (5,0-20 V%)	Jelentős de-aggregáló hatás	

Citromsav jelenlétében a β -CD aggregációra való hajlama csökken, különösen melegítés hatására. Azonban meglepő módon ellenkező hatást tapasztaltunk γ -CD esetben. Nagy töménységben alkalmazott karbamid hidrogénhid-kötésekre gyakorolt hatása közismert, az oldatbeli CD-k de-aggregációját is okozhatja.^{17,25,26} Az általunk alkalmazott alacsonyabb (1,0%) koncentrációban még az

érzékeny dinamikus fényszórásméréssel sem tapasztaltunk szignifikáns aggregációbeli változást.

Egy széles körben használt makromolekuláris adalékanyag – a polivinil-pirrolidon (PVP) – jelentékeny de-aggregáló hatását figyelhettük meg mindhárom vizsgált CD esetén. E makromolekulák gombolyagmérete fényszórásméréssel

10-20 nm-nek adódott, ami legalább egy nagyságrenddel kisebb, mint a CD-aggregátumok jellemző mérete. Emiatt a polimer molekulákról szóródó fény nem zavarta az aggregációs vizsgálatok értékelését. PVP jelenlétében azt tapasztaltuk, hogy az adalékanyagmentes CD-oldatokra jellemző mérettartományban nem, vagy alig észlelhetők aggregátumok. Pusztán a fényszórásos vizsgálatok alapján azonban nem adható válasz arra, hogy a polimer gombolyagok méretével összemérhető, vagy annál kisebb CD-aggregátumok (esetleg a polimer által stabilizált formában) továbbra is léteznek-e az oldatban. A vizsgálat során használt PVP-k molekulatömegét úgy választottuk meg, hogy engedélyezési szempontból igazodjon a CD-k felhasználási területéhez. A *per os* alkalmazásra javasolt magasabb molekulatömegű (K-30 jelű) mintát, míg az elsősorban parenterális célra használt HPBCD mellé injektábilis PVP K-17 jelű anyagot választottunk.

Mindkét PVP minta hatékony adalékanyagként bizonyult a CD-k önaggregációjának megakadályozására. PVP K-17 és HPBCD esetében vizsgáltuk etanol koszolvens hatását is. Az önmagában de-aggregációt nem okozó etanol PVP jelenlétében a polimer de-aggregáló hatását jelentősen fokozta.

A mérési eredményeinkből levonható tapasztalatok összhangban vannak Messner és munkatársainak membránpermeációs adatokból levont következtetéseivel, miszerint polimer adalékanyagokkal (karboximetilcellulóz, hidroxipropilmetilcellulóz), valamint etanollal lehetséges csökkenteni hatóanyag/ciklodextrin komplex aggregátumok méretét.²⁷

6. Összefoglalás

Fotonkorrelációs spektroszkópia alkalmazásával többféle ciklodextrin aggregációs sajátosságait vizsgáltuk vizes oldatban. Különböző közegekben összehasonlítottuk az alap ciklodextrinek és egy ciklodextrin származék (2-hidroxipropil-béta-ciklodextrin) önszerveződését. Részecskeméret elemzéseink alapján megállapítottuk, hogy szokásos adalékanyagok alkalmazásával (pl. citromsav, polivinil-pirrolidon), illetve a hőmérséklet változtatásával kontrollálható a ciklodextrin molekulák aggregációra való hajlama.

Pharmaceutical use of cyclodextrins: advantages and disadvantages of self-assembly

It has been known that cyclodextrin (CD) molecules are susceptible to self-association since the 1980's when Miyajima et al. reported their observations on the non-ideal osmotic behavior of CD-solutions.¹³ This phenomenon can cause problems in parenteral drug formulations.

As various modern, sensitive instrumental analysis techniques (laser light scattering, atomic-force microscopy, electron microscopy) were developed, in-detail data on the characterization

Hivatkozások

1. Szejtli, J. *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, **1988**.
2. Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1754.
3. Szejtli, J.; Budai, Zs.; Kajtár, M. *Magyar Kémiai Folyóirat* **1978**, *84(2)*, 68-78.
4. Fenyvesi, É.; Tuza, K., *Cyclodextrin News* **2016**, *30(1)*, 1-4.
5. Frömmling, K.-H.; Szejtli, J. *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, **1994**.
6. Fenyvesi, É. *Cyclodextrin News* **2013**, *27(2)*, 1-4.
7. Committee for Human Medicinal Products (CHMP)EMA/CHMP/333892/2013 **2014**, 1-17.
8. Szejtli, J.; Szente, L. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *61*, 115-125.
9. Szente, L.; Szejtli, J. *Adv. Drug Del. Rev.* **1999**, *36*, 17-28.
10. Brewster, M. E.; Simpkins, J. W.; Hora, M. S.; Stern, W. C. *J. Parenter. Sci. Technol.* **1989**, *43(5)*, 231-240.
11. Konings, F. J.; Noppe, M. J. M.; Mesens, J. L. Európai szabadalmi bejelentés EP513072, **1992**.
12. Szente, L. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2015** *121(1)*, 34-38.
13. Miyajima, K.; Sawada, M.; Nakagaki, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, *56*, 3556-3560.
14. Bonini, M.; Rossi, S.; Karlsson, G.; Almgren, M.; Lo Nostro, P.; Baglioni, P. *Langmuir*. **2006**, *22*, 1478-1484
15. Rossi, S.; Bonini, M.; Lo Nostro, P.; Baglioni, P. *Langmuir*. **2007**, *23*, 10959-10967.
16. Coleman, A. W.; Nicolis, I.; Keller, N.; Dalbiez, J. P. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1992**, *13*, 139-143.
17. Szente, L.; Szejtli, J.; Kis, G. L. *J. Pharm. Sci.*, **1998**, *87(6)*, 778-781.
18. González-Gaitano, G.; Rodríguez, P.; Isasi, J.R.; Fuentes, M.; Tardajos, G.; Sánchez, M. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *44*, 101-105.
19. Raffaini, G.; Mazzaglia, A.; Ganazzoli, F. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2015**, *11*, 2459-2473.
20. Lombardo, D.; Longo, A.; Darcy R.; Mazzaglia, A. *Langmuir*, **2004**, *20(4)*, 1057-1064.
21. Loftsson, T. egyesült államokbeli szabadalom, **1992**, US5472954.
22. Owen, S. C.; Doak, A. K.; Wassam, P.; Shoichet, M.S.; Shoichet, B.K. *ACS Chem Biol.* **2012**, *7(8)*, 1429-1435.
23. Kürti, L.; Gáspár, R.; Márki, Á.; Kápolna, E.; Bocsik, A.; Veszélka, S.; Bartos, C.; Ambrus, R.; Vastag, M.; Deli, M.A.; Szabó-Révész, P. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *50*, 86-92.
24. Singh, R.; Lillard, J. W. *Exp Mol Pathol.* **2009**, *86(3)* 215-223.
25. Hinze, W. L.; Pharr, D. Y.; Fu, Z. S.; Smith, T. K. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 275-277.
27. Coleman, A. W.; Munoz, M.; Chatjikagis, A. K.; Cardot, P. *J. Phys. Org. Chem.* **1993**, *6*, 651-659.
28. Messner, M.; Kurkov, S.V.; Maraver Palazón, M.; Álvarez Fernández, B.; Brewster, M. E.; Loftsson, T. *Int. J. Pharm.* **2011**, *419(1-2)*, 322-328.

of intermolecular interactions became available. In the 1990's several publications dealt with the peculiarity of hydrophilic CD-derivatives, that these compounds are less likely to form aggregates compared to the starting material parent CDs.¹⁴⁻¹⁶ Szente et al. conducted extensive investigations on the aggregation properties of gamma-CD which shows opalescence in aqueous solution even in few percentage concentration.¹⁵

Ability to control the aggregate state of CDs offers multiple benefit for the pharmaceutical technologists. On one hand aggregation phenomenon in injectable and ophthalmic preparations is often sought to be eliminated since such aggregates might be seeds

for the precipitation of the solubilized drug. However, if such nanosized associates are kinetically stabilized by water soluble polymer chains, then the apparent solubility of some drugs difficult to formulate might be increased manifold.¹⁹ Such systems are prepared by heating and cooling cycles and might be well utilized in pharmaceutical, cosmetic and agrochemical applications.

In present work photon correlation spectroscopy has been employed for the purpose of characterizing the aggregation behavior of CD molecules. Parent cyclodextrins and a cyclodextrin derivative, (2-hydroxy)propyl- β -cyclodextrin (HP β CD) were studied in different aqueous media. Based on particle size analysis data we have demonstrated that the tendency of cyclodextrin molecules to form aggregates may be controlled by both temperature and numerous additives. Cyclodextrins are used in various pharmaceutical and life science fields as solubilizers and membrane-composition modifiers. The aggregate state of these carrier molecules may affect or modify the performance of cyclodextrin-drug associates as well as the availability to the targeted tissues.

The changes of the mean aggregate sizes as functions of temperature (between 20 and 80 °C) were evaluated. Nearly saturated solutions prepared from the three parent CDs were evaluated, since we aimed modeling the circumstances applied upon liquid phase complex preparation. It was found that the aggregate sizes decrease by increasing the temperature in the studied range, but complete deaggregation could not be reached. The reduction of the mean sizes somewhat differed comparing the three parent CDs. It could be seen that increasing the kinetic energy of the individual cyclodextrin molecules may disrupt the aggregate architecture.

Eventual aggregative or anti-aggregative effect of representative compounds of distinct chemical properties (hydrogen bond breakers/modifiers, macromolecules, acids, cosolvents) present as additives was also studied. When anti-aggregative effect was

observed, usually also the intensity of the scattered light attributed to the aggregates was found to decrease besides the reduction of the mean size.

Some additives behaved differently if the preparation of the solution was followed by heat treatment: citric acid caused de-aggregation of β -CD especially when the solution was heated to elevated temperature. Surprisingly citric acid affected the aggregation behavior of γ -CD in a controversial way at room temperature. Urea has earlier been reported to deaggregate β -CD due to its ability to affect the intermolecular hydrogen-bond network of the CD, however, this effect was only significant in somewhat concentrated solutions (i.e. above 1 M). We have observed that urea applied in dilute solution (1.0 w%) is practically inefficient.

A polymeric additive – polyvinylpyrrolidone (PVP) – widely used in the pharmaceutical formulations showed anti-aggregation effect. Solvated PVP macromolecules being in a coiled up conformation scatter light themselves, but their size (10-20 nm) is smaller at least by one order of magnitude than that of the typical CD aggregates. The deaggregation of CD molecules was recorded as the particle population falling within the range characteristic to CD-associates was less or no longer detectable in the presence of PVP. Due to practical applicability purposes the effect of a higher molecular mass PVP suitable for *per os* use (K-30) was evaluated when anti-aggregation of β -CD or γ -CD was studied whereas HP β CD was investigated in the presence of PVP K-17 which represents the grade of highest molecular mass still allowed for parenteral administration. Both PVP samples proved to be an effective additive to prevent the self-aggregation of β -CD, γ -CD and HP β CD. The de-aggregative effect of lower molecular mass PVP could be enhanced by using ethanol as a cosolvent.

Based on the presented results it is anticipated that further exploration of the characteristic aggregation state of cyclodextrins may find its relevance in pharmaceutical and biological applications.

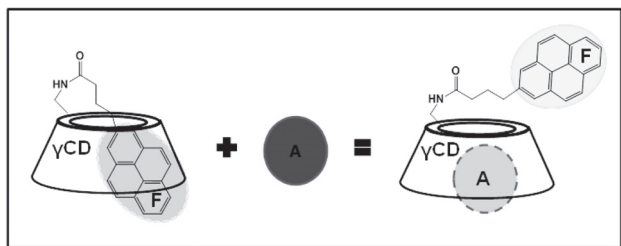
A „látható” ciklodextrinek: fluoreszcensen jelölt ciklodextrinek szintézise és sejtbiológiai alkalmazása

BENKOVICS Gábor,* MALANGA Milo és FENYVESI Éva

CycloLab Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Laboratórium Kft, Illatos út 7, 1097 Budapest, Magyarország

Bevezetés

A természetes ciklodextrinek (CDk) szénhidrát makrociklusok, fényelnyelésük maximuma 200 nm-nél kisebb hullámhosszon található, tehát az UV/Vis spektroszkópiában „láthatatlanok”. Zárványkomplexeiket emiatt leggyakrabban a vendégmolekula abszorpciós illetve emissziós spektrumának változásain keresztül lehet vizsgálni.^{1,2} Ismerünk azonban számos olyan felhasználási területet is (fluoreszcens nyomjelzés, szenzorok, fotodinámiai terápia), amelyek megkövetelik e makrociklusok „láthatóvá” tételét. Az ilyen célú alkalmazásokhoz a CD molekula kémiai módosítására van szükség, melynek során a fluorofórt – a fluoreszcens jelzőmolekulát – a megfelelő pozícióban a megfelelő kovalens kötéssel a gyűrűhöz kapcsolják. A legelső ilyen jellegű származékok poliaromás szénhidrogének (naftalin, antracén, pirén) CD-nel alkotott konjugátumai voltak, melyek lehetővé tették különböző spektroszkópiailag inaktív szerves vegyület (pl. szteroidok) fluoreszcens spektroszkópiai vizsgálatát.³ Bebizonyosodott, hogy a zárványkomplex-képződés hatással van a gyűrűhöz csatolt festékmolekula emissziós spektrumára és így az mintegy jelzőrendszerként szolgál a komplexképzés detektálásához. E szignalizációs lehetőséget ötvözve a CD-üreg molekulaméret- illetve sok esetben enantiomer-felismerő képességével, megszülettek az első CD-alapú fluoreszcens szenzorok (1. Ábra).



1. Ábra. Fluoreszcens jelzőmolekulához (F) csatolt γ -ciklodextrin mint kemioszenzor spektroszkópiailag inert szerves molekulák (A) detektálásához.³ A CD-alapú szenzorok alapja a komplexképződés által gerjesztett emissziós hullámhossz-eltolódás ($\lambda_{\max, \text{CD}} \neq \lambda_{\max, \text{CD-komplex}}$).

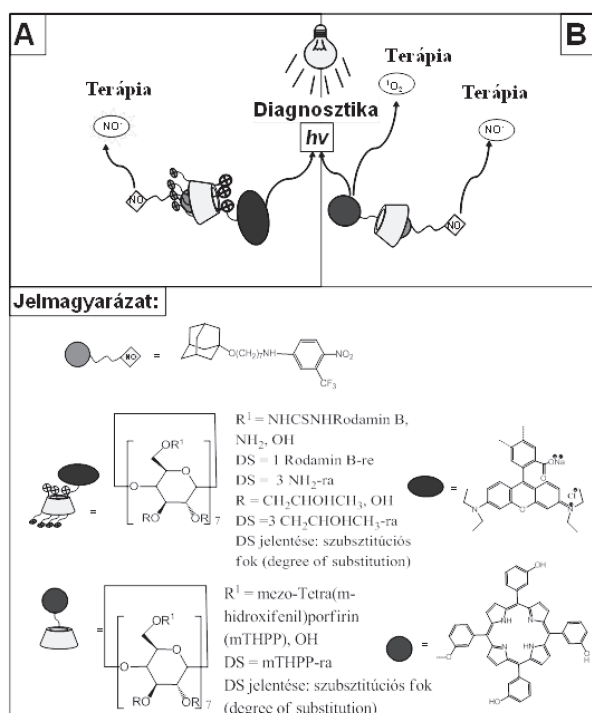
A későbbiek során, ahogy a CDk egyre nagyobb szerepet kaptak a gyógyszerek formulálásában és felmerült a CD-alapú, célzott gyógyszerbevitelre alkalmas hordozók előállításának lehetősége, szükségszerűvé vált a gyógyszer-technológiai szempontból jelentős CD-származékok (CD-polimerek, 2-hidroxipropil- β CD (HP β CD), metilezett- β CDk) fluoreszcens jelölése is. A CycloLab Kutató-fejlesztő Laboratóriumban 2009-től kezdve folytak ilyen irányú kísérletek. Laboratóriumunk ekkor vált tagjává egy több európai kutatóközpontot és egyetemet

magába foglaló konzorciumnak - az Európai Unió által támogatott CYCLON és CYCLON Hit nevű Marie Curie programoknak köszönhetően - melyek elsődleges célja CD-alapú gyógyszerhordozók előállítása, spektroszkópiai, mikroszkópiai és biológiai vizsgálata és lehetőséges alkalmazása a multidrog-rezisztens mechanizmusok leküzdésében. Ezekhez a kutatásokhoz is elengedhetetlen a CDk fluoreszcens jelölése, aminek következtében a konfokális mikroszkóp lencséjén keresztül láthatóvá válik a gyógyszerhordozó és esetenként vele együtt a szállított hatóanyag is.

Napjainkban a jelölt, azaz „látható” CDk esetében is megfigyelhető az a trend, ami a nem jelölt, azaz „láthatatlan” CDk esetében már évek óta jelen van: a fluoreszcens ciklodextrinek is elindultak a segédanyagból hatóanyaggá válás útján. Ahogy a HP β CD is egy kiváló szolubilizáló szerből, azaz gyógyszer-technológiai segédanyagból vált reményt keltő hatóanyaggá,⁴ úgy lépnek ki a fluoreszcens CDk is a vizualizálást támogató segédanyagok területéről a fotodinámiai terápia (PDT) világába, ahol már mint fő komponensek szerepelnek. Jó példa erre K. Yannakopoulou, illetve S. Sortino kutatócsoportjának tevékenysége ezen a területen. Mindkét csoport a CycloLab Kft.-vel szorosan együttműködve olyan CD-alapú gyógyszerhordozó-rendszerek kifejlesztésén dolgozik, amelyek mellett, hogy biztosítják a biológiai szövetekben történő fluoreszcens detektálást, megfelelő hullámhosszon történő megvilágítás hatására képesek nagy reaktivitású szingulett oxigén termelésére vagy nitrogén-monoxid (NO) felszabadítására, ami a környező sejtekben szöveti bomlást eredményez, így ún. fényérzékenyítő anyagokként (fotoszenzibilizátorokként) alkalmazhatóak a rákos és bakteriális megbetegedések fotodinámiai kezelésében. S. Sortino és kutatócsoportja, fluoreszcensen jelölt CD-monomereket⁵ és vízoldható CD-polimereket⁶ alkalmaz, melyek a fotoreaktív ágensekkel (NO-fotodonorok) nagy stabilitású zárványkomplext képeznek, így azok vízoldhatóságát, biohasznosulását, sejtmembránokon való átjutását nagymértékben növelik. Egy külön a CD-es alkalmazásokra kifejlesztett NO-fotodonor az adamantánhoz kapcsolt orto-trifluorometil-nitroanilin származék, melyben az adamantán-csoport β CD-gyűrűhöz való nagy affinitása biztosítja a stabil zárványkomplex képződését, így a fluoreszcensen jelölt CD és NO-fotodonor együttes jelenlétét is. A CD-üreghez kovalensen kapcsolt rodamin B jelzőcsoport pedig lehetővé teszi a zárványkomplex detektálását és így kijelöli a lézeres gerjesztés területét is. A lézerefény hatására ezután aktivizálódik a vendégmolekulaként hordozott NO-fotodonor és felszabadul a sejtromboló hatású NO (2A. Ábra).⁵

* Tel.: +36-1-347-6060 fax:+36-1-347-6068; e-mail: benkovics@cyclolab.hu

Yannakopoulou és kutatócsoportja egy másik megközelítést alkalmaz a CDk PDT-ban történő alkalmazásához: a fényérzékenyítő anyagot, esetükben különböző porfirin származékokat, közvetlenül a CD-gyűrűhöz kapcsolják. A porfirin vegyületek kedvelt fotoérzékenyítő anyagok, melyek a megfelelő hullámhosszú fényel történő besugárzás után képesek szingulett oxigén kibocsátásra. Terápiás alkalmazásukat viszont döntő mértékben befolyásolja rendkívül alacsony vízoldhatóságuk, illetve a vizes oldatokban fellépő aggregálódás, ami csökkenti a fluoreszcenciát és a szingulett oxigén termelést.⁷ Ezeket a negatív tulajdonságokat sikerült leküzdeni *mezo*-tetra(m-hidroxifenil)porfirin (mTHPP) esetében β CD-gyűrűhöz történő kovalens kapcsolással egy enzimátikus úton nem hasadó éterkötéssel keresztül.⁸ A kapott konjugátum vízoldhatósága nagymértékben növekedett a szabad porfirin származékéhoz képest, a fluoreszcens jel intenzitása is megnőtt, így a kutatóknak lehetőségük nyílt a konjugátum *in vitro* vizsgálatára fluoreszcens képalkotási módszerek (fluorescent life imaging) és konfokális mikroszkóp segítségével rákos laphámsejt kolóniákon. A mTHPP- β CD konjugátum a szabad CD-üregnek köszönhetően alkalmas további fotoaktív molekulák komplexálására. A már említett, Sortino és kutatócsoportja által alkalmazott, adamantán-módosított NO-fotodonor komplexálásával sikerült egy olyan bimodális szupramolekuláris rendszert létrehozni, ami egyidejűleg képes szingulett oxigén termelésére és NO felszabadítására, ráadásul a mTHPP fluoreszcenciájának köszönhetően e szupramolekuláris rendszer detektálása is biztosított⁹ (2B. Ábra).



2. Ábra. Fluoreszcensen jelölt ciklodextrinek fotodinámiai alkalmazásának sematikus ábrázolása.^{6,9}

E rövid áttekintés és az említett kutatócsoportok aktív munkája jól mutatja a „látható” CDk sokrétű alkalmazási lehetőségét, molekuláris kemoszenzoroktól kezdve a gyógyszerhordozó rendszereken keresztül az egyre elterjedtebb és a multidrog-rezisztens baktériumok illetve

különböző rákos megbetegedések kezelésében alternatív gyógymódot jelentő fotodinámiai terápiaikig.

1. Fluoreszcensen jelölt ciklodextrin származékok előállítása

1.1. Reaktív intermedierek szintézise fluoreszcensen jelölt ciklodextrinek előállításához

Ahhoz, hogy könnyen jellemezhető és alkalmazható fluoreszcens CD-hez jussunk, szükség van a CD-gyűrű célzott irányú, szelektív kémiai módosítására. Ennek legkézenfekvőbb módja a molekula peremén lévő és a hidrofil jelleget adó hidroxil (OH)-csoportok helyettesítése. A CD molekula szűkebb oldalán glükopiranoz egységeként egy primer OH-csoport, míg a szélesebb, szekunder oldalán glükopiranoz egységeként 2 szekunder OH-csoport található. A perem különböző tulajdonságú OH-csoportjai számos lehetőséget nyújtanak a CDk kémiai finomhangolására. A cél a legtöbb esetben a CD molekula oldhatóságának növelése, a komplexképzés befolyásolása, a CDk szilárd fázishoz való rögzítése illetve a fluoreszcens CDk esetében a kívánt festékanyag CD-hez kötése.

1.1.1. A C-6-os helyzet monoszubsztitúciója: 6-monoazido-6-monodezoxi-ciklodextrinek előállítása

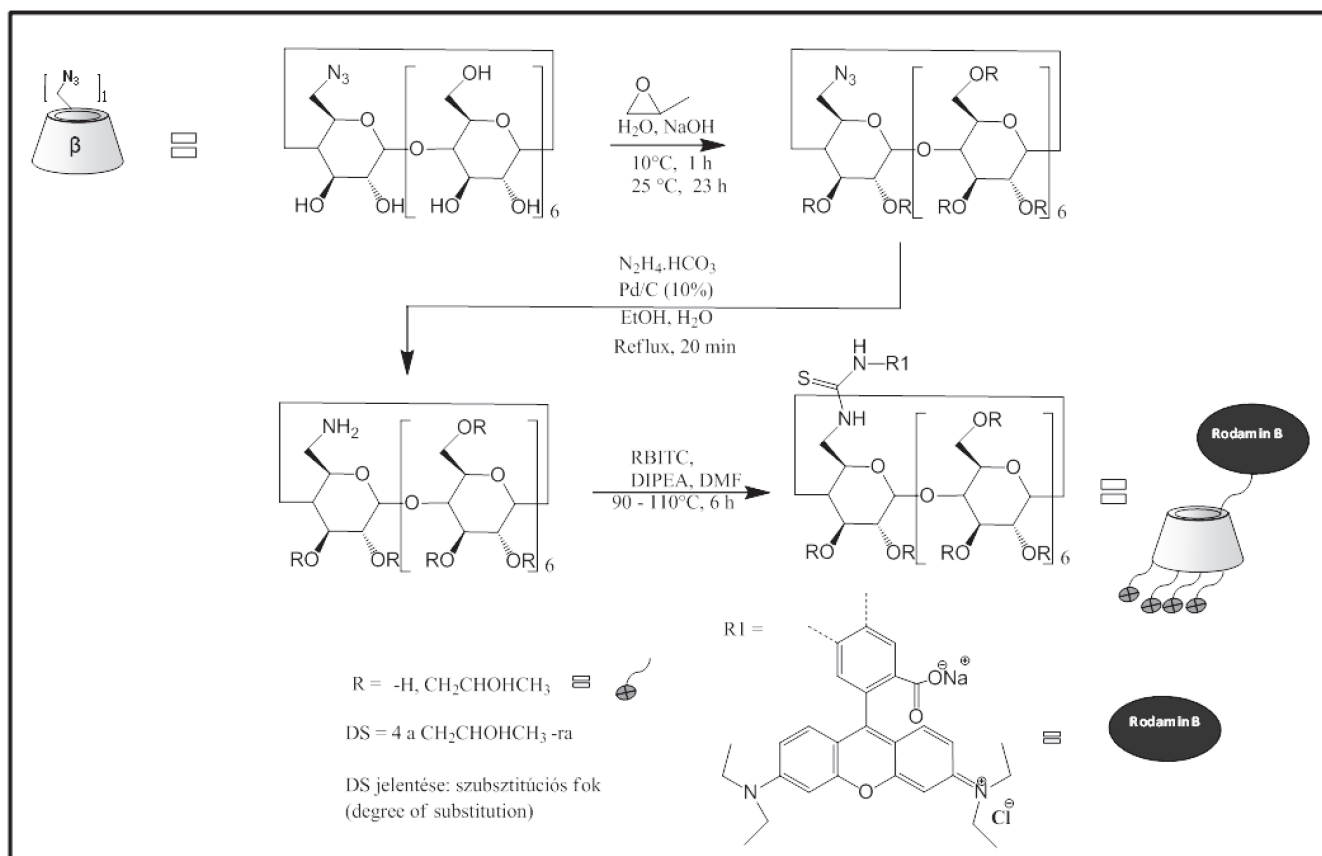
A nagyszámú OH-csoport együttes jelenléte a lehetőségek mellett a szelektív szubsztitúció nehézségeit is magában rejti. A CD-gyűrű OH-csoportjai közül a legerősebben nukleofilek a primer oldalon található C-6-os helyzetben lévő OH csoportok, a szekunder oldal C-2-es helyzetben lévő OH csoportjai a legkönnyebben deprotonálhatóak, míg a C-3-as helyzetű OH-csoportok sztérikusan a legjobban gátoltak. Ezeket a reaktivitásbeli különbségeket célszerű figyelembe venni a CD-gyűrű szelektív módosításánál ám sok esetben a reagens és a CD-üreg közti zárványkomplex-képződés is befolyásolhatja a reakció kimenetelét. A fluoreszcensen jelzett CDk szintézisekor a leggyakrabban alkalmazott stratégia a primer oldal szelektív monoszubsztitúciója paratoluolszulfonsav(tozil)-származékokkal. A reakciókörülmények függvényében (reagens, oldószer, szerves sók szerepe) a helyettesítés kizárólag a primer oldalon megy végbe, minek következtében főtermékként a 6-*O*-monotozil-CD képződik.^{10,11} A reakció melléktermékeiként a kristályosítással vagy az α - és γ CD esetében preparatív folyadékkromatográfiával eltávolítható kiindulási CD és a 6,6'-*O*-ditozil-CDk vannak jelen a nyers reakciótermékben. A szulfonát észterek jó távozó csoportok, így semleges pH mellett könnyen helyettesíthetőek különféle nukleofil csoportokkal (magas pH-n a mono-6-*O*-tozil-CD egy 3,6-anhidroglükopiranoz egységet tartalmazó CD-né bomlik, ezért a szubsztitúció nem megy végbe).¹² A helyettesítéshez leggyakrabban használt nukleofil-csoportot tartalmazó vegyület a nátrium- illetve lítium-azid,¹³ mivel a reakció termékei, a 6-monoazido-6-monodezoxi-CDk számos előnyös tulajdonságot mutatnak: 1.) könnyen tárolhatóak (szobahőmérsékleten nem bomlanak), 2.) meglehetősen ellenállóak a CD többi OH-csoportján végbemenő további reakciókkal szemben és 3.) az azido-csoport egyszerűen amino-csoporttá redukálható, ami újabb lehetőségeket nyit meg a monoszubsztituált CDk

előállításához. A 6-monoazido-6-monodezoxi-CDk tehát több szempontból is kulcsfontosságú intermedierek a fluoreszcensen jelölt CDk előállításánál.

1.1.2. Hidroxialkilezés az oldhatóság növelése érdekében: 6-monodezoxi-6-monoazido-Me β CD és 6-monodezoxi-6-monoazido-HP β CD előállítása

A gyógyszer technológiai szempontból legfontosabb CD-származékok a HP β CD és a részlegesen metilezett β CD (Me β CD). Oldhatóságuk többszöröse a természetes β CD-ének. A fluoreszcens festékmolekula gyűrűhöz való csatolása után is vízdékonyak maradnak a konjugátumok, ami a sejtbiológiai alkalmazás egyik alapkövetelménye. A Me β CD és a HP β CD szelektív fluoreszcens jelölésével és e fluoreszcens CD-származékok különböző sejtkolóniákon való mikroszkópiai vizsgálatával bővebb információt szerezhetünk a CDk szöveti eloszlásáról, sejtmembránokon való átjutásáról, valamint a CDk biológiailag fontos molekulákkal való interakciójáról (pl. koleszterin-

CD kölcsönhatások). A jelzett Me β CD illetve HP β CD szintézisének kiindulási anyaga is a 6-monoazido-6-monodezoxi- β CD. A jelzett HP β CD előállításánál a kiindulási 6-monoazido-6-monodezoxi- β CD alkalikus vizes közegben lép reakcióba az 1,2-propilénoxiddal (3. Ábra), míg a jelzett Me β CD esetében a 6-monoazido-6-monodezoxi- β CD metilezése ugyancsak alkalikus vizes oldatban, dimetilszulfáttal történik. Az így kapott részlegesen alkilezett azido-CD származékokban a következő lépésben az azido-csoport aminos-csoporttá történő redukciójára kerül sor. E reakció lépéshez többféle eljárást is kidolgoztak az évek során. Az egyik, a szénhidrátkémiában jól bevált módszer a katalitikus transzfer hidrogénezés hidrazin karbonáttal, palládium katalizátor jelenlétében.¹⁴ A reakció gyorsan végbemenő, kvantitatív, könnyen méretnövelhető és feldolgozható, a végtermékek a 6-monoamino-6-monodezoxi-HP β CD illetve a 6-monoamino-6-monodezoxi-Me β CD az aminos-csoportnak köszönhetően már alkalmasak a különféle, kereskedelemben is kapható jelzővegyületekkel (xantín-izotiocianátokkal, antracén-benzaldehiddel, stb.) való stabil kovalens kötés létrehozására.



3. Ábra. Rodamin B-vel jelölt 2-hidroxi-propil- β -ciklodextrin előállításának szintézisútja 6-monoazido-6-monodezoxi- β -ciklodextrinből.¹⁷

1.2. A fluoreszcens jelzővegyületek kapcsolása ciklodextrin-templáthoz: fluoreszcensen jelölt ciklodextrin monomerek előállítása

A sejtbiológiai felhasználás céljából előállított fluoreszcens CDk esetében kulcskérdés a fluorofór és a CD közötti kötés stabilitása. Amennyiben e kötés enzimatis úton könnyen hasítható (pl. észter kötés), úgy a fluoriméter küvettájában vagy a fluoreszcens (konfokális) mikroszkóp lencséje

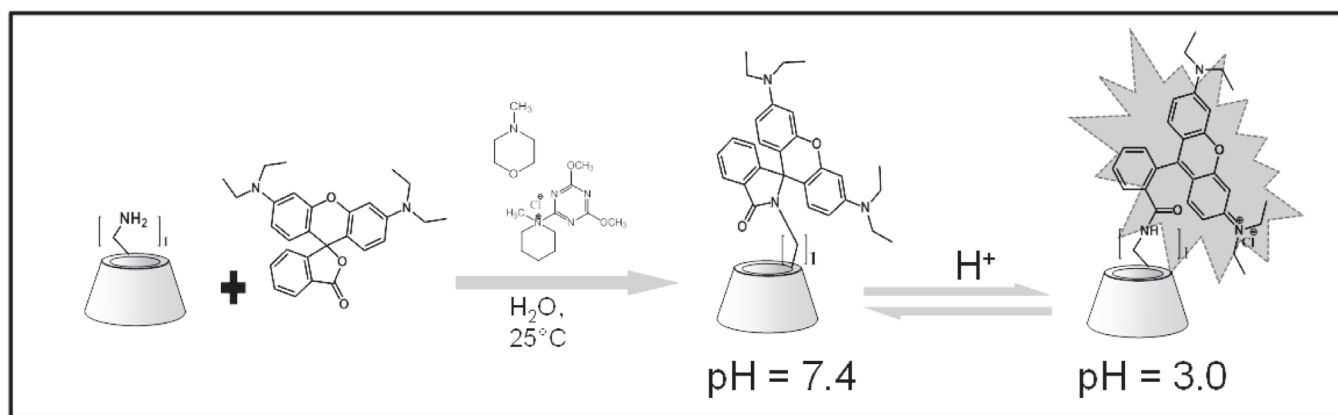
alatt már nem lehet különbséget tenni a bomlástermékként keletkező szabad jelzővegyület és a fluoreszcens CD között, ami álpozitív eredményekhez vezethet. Ezt a szempontot figyelembe véve a fluorofór CD-hez történő kapcsolásához a legmegfelelőbb stratégia az izotiocianát funkciós csoportot tartalmazó xantinszármazékok reakciója aminos-CD-nel. A CD-gyűrű és a jelzőmolekula közt létrejövő tiokarbamid kötés megfelelő stabilitást ad a konjugátumnak az enzimatis hidrolízissel szemben. Ezt az eljárást a CDk-en

elsőként Mourtzis és munkatársai alkalmazták, guanidino-alkilamino-CDk fluoreszcenil izotiocianáttal (FITC) történő jelöléséhez,¹⁵ majd a későbbiekben Fenyvesi és munkatársai is ezt a szintézisutat választották FITC-tal jelölt Me β CD előállításához.¹⁶

Malanga és munkatársai egy jól reprodukálható és többféle CD-származék, köztük a HP β CD,¹⁷ Me β CD¹⁷ és a tetraamino-HP β CD⁶ jelöléséhez is alkalmazható módszert (3.Ábra) dolgoztak ki a rodamin B izotiocianát (RBITC) CD-gyűrűhöz való kapcsolására.

Egy másik járható út stabil fluorofór-CD konjugátum létrehozásához az 1,3-dipoláris cikloaddíció, más néven klikk-reakció monoazido-CDk és terminális alkin-csoportot tartalmazó fluorofórok közt. Anand és munkatársai ily módon nitrobenzofurazán jelzőmolekulát rögzítettek karboximetil- β CD-hez, hogy a kapott anionos CD és kationos porfirinszármazékok asszociációját spektroszkópiai módszerekkel jellemzhessék.¹⁸ Ezt az eljárást használta Carmona és csoportja is cianin jelzőmolekulák β CD-hez kapcsolására. Az így előállított vegyületeken végzett mikroszkópiai és spektroszkópiai vizsgálatok bizonyították, hogy a cianin- β CD konjugátumok stabil zárványkomplexet alkotnak doxorubicinnal és e zárványkomplexek képesek keresztüljutni a HeLa sejtek membránjain.¹⁹ Szintén klikk-reakciót alkalmazott Mallard, antracén jelzőmolekula és azido- β CD kapcsolására, hogy ezzel illékony szerves vegyületek kimutatására használható kemoszenzort nyerjen.²⁰ Ez a megközelítés viszont nem járt sikerrel, mivel a klikk-reakció során keletkező triazol gyűrű nem nyújt elég flexibilitást a rendszernek, így a CD-üreggel intramolekuláris zárványkomplexet képező antracén nem

helyettesíthető a detektálni kívánt célvegyülettel, ezért nem következik be a fentiekben már említett, komplexképződés által gerjesztett emissziós hullámhossz-eltolódás (1. Ábra). A népszerű és gyakran alkalmazott klikk-reakció tehát az antracén és a β CD esetében nem alkalmas CD-alapú molekuláris szenzorok előállítására, csupán a CD fluoreszcens jelölésére. CD-alapú szenzorok előállításánál tehát nem a fluorofór-CD közti kötés hidrolízissel szembeni stabilitása, sokkal inkább a kötés flexibilitása a fő szempont. A xantin- β CD származékok esetében például, ha a merev tiokarbamát-kötés helyett amid- vagy észterkötésen keresztül kapcsoljuk a festékmolekulát a CD-gyűrűhöz, olyan szenzorokat kapunk, melyek a pH függvényében változtatják fluoreszcencia intenzitásukat.²¹ Ebben a spektrális változásban a legnagyobb szerepe a CD-hez csatolt xantin-származékok spirogyűrűvé záródásának, illetve újbóli kinyílásának van. Az amid kötésen keresztül kapcsolt rodamin B- β CD konjugátum esetében például semleges pH-nál a gyűrűzárt spiro-laktám forma van jelen, ami nem mutat fluoreszcencia intenzitást, míg alacsony pH mellett a nyitott amid forma jelenik meg, ami már erősen fluoreszkál (4. Ábra). Ennek a pH-érték változtatással ki-be kapcsolható fluoreszcenciának olyan rendszerekben lehet hasznát venni, ahol fontos a savas kémhatású közeg fluoreszcens kijelölése (pl. lizoszómákat célzó gyógyszerhordozók jelölése). Egy másik nagy előnye ennek az újonnan kidolgozott eljárásnak, hogy a kapcsolás meglehetősen enyhe körülmények közt vízben, szobahőmérsékleten is végbevihető, ráadásul az összes xantin-származékban jelen lévő karboxil-csoporton keresztül történik, így könnyen adaptálható a már említett rodamin B-n kívül egyéb xantinszármazékok vagy más típusú, karboxil-csoporttal rendelkező jelzőmolekulák CD-hez történő kapcsolására is.



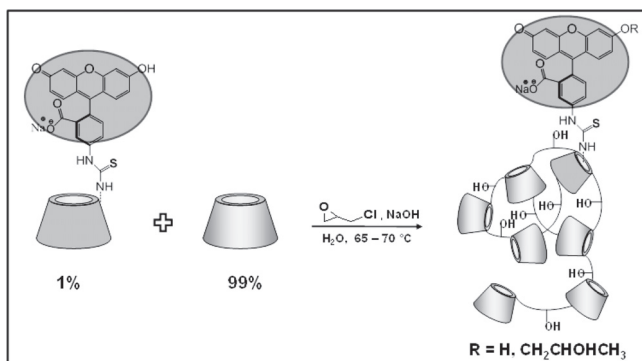
4. Ábra. Fluoreszcensen jelölt ciklodextrinek előállításának és pH-érzékeny szenzorokként történő alkalmazásának sematikus ábrázolása.²¹

1.3. Fluoreszcensen jelölt ciklodextrin-polimerek előállítása

A CD-polimerek olyan CD-származékok, melyek molekulánként több egymáshoz kapcsolt CD-gyűrűt tartalmaznak. A gyűrűk összekapcsolásának egyik gyakran alkalmazott módja a térhálósítás, melynek következtében ún. kereszt-kötött CD-polimerek keletkeznek. Térhálósítószerként többféle két- vagy többfunkciós reagens alkalmazható. Az epiklórhidrinnel kereszt-kötött CD-polimerek előállításánál a megfelelő reakcióparaméterek beállítása (reakcióidő, reakcióelegy töménysége, reagens arányok) vízben jól oldódó kereszt-kötött CD-polimert eredményez,

mely több szempontból is ígéretes gyógyszerhordozó rendszer. A CD-gyűrűk közelsége a polimer molekulán belül lehetőséget ad olyan vendégmolekulák hatékony komplexálására is, melyek struktúrájában egynél több kötőhely (komplexet képező egység) szerepel (pl. tolnaftát). Az ilyen vendégmolekulák esetében a polimerben egymás közelségében jelenlévő CDk kooperatív komplexképzése nagy oldékonyságnövelést és erős asszociációt biztosít. A komplexálás után a lassú disszociáció következtében a hatóanyagok lassabban szabadulnak fel a polimer mátrixból így elnyújtott, szabályozott hatóanyag leadás érhető el.²² Az epiklórhidrinnel kereszt-kötött CD-polimer a térhálósítás után tovább módosítható a CD szabad OH-csoportjainak

illetve a CD-gyűrűk közötti kötést biztosító glikoléterek OH-csoportjainak helyettesítésével. Pozitívan és negatívan töltött CD-polimerek is előállíthatók ezáltal, melyeknek olyan esetekben van jelentőségük, ahol az ionos kölcsönhatások segítik a zárványkomplex-képzést. Az epiklóridinnel keresztkötött CD-polimerek fluoreszcens jelölésére Malanga és munkatársai dolgoztak ki két különféle eljárást.²³ Az első az ún. térhálósítás előtti (pre-branching) fluoreszcens jelölés, melyben a jelöletlen CD és a jelöletlen CD-hez viszonyítva 1%-ban jelen lévő fluoreszcensen jelölt CD kopolimerizációs reakcióban adja a jelölt CD-polimert. (5. Ábra)



5. Ábra. Fluoreszcensen jelölt ciklodextrin-kopolimer előállításának egyik lehetséges szintézisútja (térhálósítás-előtti jelölés).²³

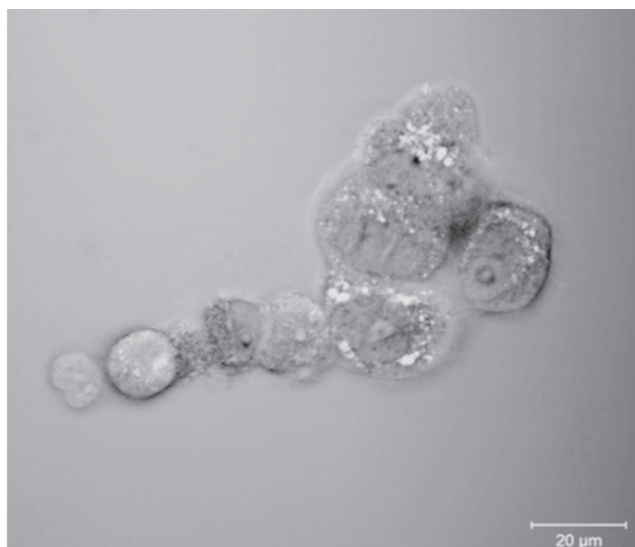
A második stratégia a térhálósítás utáni (post-branching) jelölés. Ennek a szintézisútnak az első lépése a már keresztkötött CDk primér oldalának jódozása. A cél a reakcióban részt vevő CD molekulák 1%-ában egy primer OH-csoport jódra cserélése. Második lépésben az 1%-ban jódozott polimer nátrium-aziddal reagál. Végeredményként azido-CD-polimer keletkezik, ami egy kulcsfontosságú közti termék, mivel a CD-polimerek módosításának többféle lehetőségét is magában hordozza (pozitívan töltött amino-CD-polimerek előállítása, további módosítás klikk-reakción keresztül, stb.). A xantin-származékokkal történő jelöléshez, az azido-CD-polimert a 3. lépésben amino-CD-polimerré redukálják a fluoreszcens monomerek előállításánál már ismert katalitikus transzfer hidrogénezéssel. A fluoreszcens jelzőmolekula (xantin-izotiocianátok) kapcsolása az utolsó reakciólépésben piridinben történik hozzáadott extra bázis (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undek-7-én (DBU)) jelenlétében. A fluoreszcensen jelölt, keresztkötött polimer és az azido-CD-polimer, mint közti termék is tovább módosítható különféle ionos csoportokkal, így mindkét szintézisúttal előállíthatók fluoreszcensen jelölt, töltést hordozó polimerek is, amik tovább bővítik a gyógyszerhordozó rendszerek felhasználási területét.

2. A fluoreszcensen jelölt ciklodextrinek sejtbiológiai alkalmazása

A természetes CDk kémiai szerkezetüknél, hidrofíll jellegüknél és nagy molekulatömegüknél fogva nem képesek keresztüljutni a biológiai membránokon és nem szívódnak fel a gyomor-bél traktuson keresztül. Emiatt a hatóanyag biohasznosulását fokozó hatásukat egy olyan mechanizmussal lehet jellemezni, melynek során a CD csupán a sejtmembrán felszínéig szállítja a hatóanyagot, ahol

ezután a CD-hatóanyag zárványkomplex disszociál és csak a hatóanyag szabad, nem komplexált formája jut keresztül a lipofil sejtmembránon, míg a CD az extracelluláris térben marad.²⁴ Ezzel, a természetes CDk-ról általánosan elfogadott vélekedéssel szemben, metilezett- és 2-hidroxi-propil-CD-származékok esetében patkányokon elvégzett kísérletek meglepő módon végbélben keresztüli felszívódást mutattak, ami arra enged következtetni, hogy ezek a CD-származékok kis mértékben képesek felszívódni a végbél nyálkahártyán keresztül, tehát átjuthatnak a bélhámsejtek membránjain.²⁵ Egy másik ok, amiért valószínűsíthető, hogy a CDk bejutnak a sejtekbe, a HP β CD Nieman-Pick C (NPC) kezelésében mutatkozó aktivitása. E betegek agysejtjeiben felgyülemlett koleszterin szolubilizációja és annak extrakciója kézenfekvő magyarázatnak tűnt a HP β CD hatására bekövetkező, kedvező idegrendszeri változások értelmezésére. Ez azonban feltételezi a HP β CD jelenlétét a sejtben belül, azaz a vér-agy gáton való átjutását.²⁶ A CDk fluoreszcens jelölésével közvetlen bizonyítékot kaphatunk ezekre a feltételezésekre, megválaszolhatóak azok a nagyon fontos kérdések, miszerint a CD-származékok mint gyógyszerhordozó rendszerek vagy mint terápiás ágensek képesek-e a sejtmembránokon való átjutásra. Felderíthetjük az átjutás transzportmechanizmusait, mértékét és a CD-származék sejtben belüli további sorsát. Nagy segítség ez az olyan gyógyszerhordozó-rendszerek megtervezésénél és előállításánál, melyeknél a hatóanyag intracelluláris célba juttatása a fő kitűzés (transzfelejtési ágensek, sejtben belüli élősködők célzott elérése), de segíthetnek az egyes CD-származékok terápiás vagy éppen toxikus hatásainak feltérképezésében is. A legelső ilyen jellegű kísérleteket polikationos CD-származékokon végezték, melyeknél a DNS-val való erős asszociáció miatt felmerült a CDk transzfelejtési ágensként való alkalmazásának lehetősége. Díaz-Moscónak és munkatársainak sikerült bizonyítani, hogy az általuk előállított amfifil jellegű lissamine rodamin B-vel jelölt polikationos CD-származékok, ún. CDplexek receptor-mediált endocitózissal jutnak át Vero-sejtek membránjain.²⁷ Pár évvel később ugyancsak a kationos CD-származékok, mint DNS-vektorok kapcsán Mourtzis és csoportja kimutatta, hogy míg a fiziológiás pH-n többszörösen pozitívan töltött FITC-guanidino-alkilamino- β CD keresztüljut a HeLa sejtek membránjain receptor-mediált endocitózissal, a pozitív töltést nem hordozó FITC-NH- β CD erre nem képes.¹⁵ Müllernek és munkatársainak sikerült kimutatnia FITC-NH-Me β CD receptor mediált endocitózist HeLa és BHK-21 sejtvonalakon,²⁸ majd Fenyvesinek és csoportjának szintén a FITC-NH-Me β CD internalizációját Caco-2 bélhámsejtben (1. Kép).²⁹ Az utóbbi kutatócsoport megfigyelései bizonyították a FITC-jelölt HP β CD-ről és a FITC-jelölt, keresztkötött β CD-polimerről is, hogy ezek a molekulák is endocitózissal jutnak át a Caco-2 sejtmembránokon. Fluoreszcens paclitaxel (Flutax-1) RBITC-NH-Me β CD-nel alkotott zárványkomplexén végzett kísérletekkel sikerült megfigyelni a jelölt CD és a paclitaxel származék sejtben belüli ko-lokalizációját, ami egyértelmű bizonyítéka annak, hogy nemcsak a CD-származékok, hanem az általuk zárványkomplexben hordozott vendégmolekula is bejut a sejtbe endocitotikus úton. Ez magyarázat lehet a CD-származékok biohasznosulását növelő hatására és jól szemlélteti, hogy a CD-alapú gyógyszerhordozó rendszerek alkalmasak lehetnek különböző hatóanyagok intracelluláris célba juttatására.³⁰

A fluoreszcens jelöléssel láthatóvá tett CDk tehát forradalmasíthatják az *in vitro* vizsgálatokat és új eszközök adnak az orvosok, biológusok kezébe. Ez esetben a hasonlóan érzékeny nyomjelzést biztosító radioaktív-jelzéssel szemben nincs szükség sugárvédelmi intézkedésekre. A kérdés, amire még a közeljövő kutatásainak válaszolnia kell, hogy mennyire módosítja a CDk eredeti tulajdonságait a nagyméretű, lipofil fluoreszcens jelzőcsoport, mennyiben segíti ennek a csoportnak a jelenléte esetleg akár a sejtmembránon való átjutást.



1. Kép. Transzmissziós elektron mikroszkóppal és konfokális mikroszkóppal készült felvételek átfedése FITC- β CD-polimerrel kezelt HeLa sejtekről. Jól látható a jelölt ciklodextrin internalizációja (élénk színű aggregátumok a sötét sejtmembránon belül).

Köszönetnyilvánítás

A témakörben végzett munkánkat a CyclonHit (FP7-PEOPLE-ITN-2013-608407) és a Cyclon (FP7-PEOPLE-ITN-2008-237962) Marie Curie projektek támogatták. A konfokális és transzmissziós elektron mikroszkópos vizsgálatokért köszönet Prof. Marica B. Ericson-nak és Vladimir Kirejev-nek, a University of Gotheborg munkatársainak.

Hivatkozások

- Szejtli, J.; *Cyclodextrins and their inclusion complexes*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1982**.
- Szejtli, J.; *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Pergamon: Oxford, **1996**; Vol. 3.
- Ueno, A.; Suzuki, I.; Osa, T. *Anal. Chem.* **1990**, *62* (22), 2461–2466.
- Yokoo, M.; Kubota, Y.; Motoyama, K.; Higashi, T.; Taniyoshi, M.; Tokommaru, H.; Nishiyama, R.; Tabe, Y.; Mochinaga, S.; Sato, A.; Sueoka-Aragane, N.; Sueoka, E.; Arima, H.; Irie, T.; Kimura, S. *PLoS One* **2015**, *10* (11), e0141946.
- Kandoth, N.; Mosinger, J.; Gref, R.; Sortino, S. *J. Mater. Chem. B.* **2013**, *1*, 3458–3463.
- Kandoth, N.; Malanga, M.; Fraix, A.; Jicsinszky, L.; Fenyvesi, E.; Parisi, T.; Colao, I.; Sciortino, M. T.; Sortino, S. *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 2888–2894.
- Cunderlikova, B.; Bjorklund, E. G.; Pettersen, E. O.; Moan, J. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 246–252.
- Kirejev, V.; Gonçalves, A. R.; Aggelidou, C.; Manet, I.; Mårtensson, J.; Yannakopoulou, K.; Ericson, M. B. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2014**, *13*, 1185–1191.
- Fraix, A.; Gonçalves, A. R.; Cardile, V.; Graziano, A. C. E.; Theodossiou, T. A.; Yannakopoulou, K.; Sortino, S. *Chem. Asian J.*, **2013**, *8*(11), 2634–2641.
- Petter, R. C.; Salek, J. S.; Sikorski, C. T.; Kumaravel, G.; Fu-Tyan, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3860–3868.
- Zhong, N.; Byun, H. S.; Bittman, R. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 2919–2920.
- Ashton, P. R.; Ellwood, P.; Staton, I.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **1991**, *30*, 80–81.
- Zhang, Z. B.; Zhang, W. G.; Luo, W. J.; Fan, J. *J. Chromatogr. A*, **2008**, *1213*, 162–168.
- Jicsinszky, L.; Ivanyi, R. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *45*, 139–145.
- Mourtzis, N.; Paravatou, M.; Mavridis, I. M.; Roberts, M. L.; Yannakopoulou, K. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4188–4200.
- Fenyvesi, E.; Jicsinszky, L. *Land Contam. Reclam.* **2009**, *17*, 405–412.
- Malanga, M.; Jicsinszky, L.; Fenyvesi, E. *J. Drug Del. Sci. Tech.* **2012**, *22*, (3), 260–265.
- Anand, R.; Manoli, F.; Manet, I.; Donzello, M. P.; Viola, E.; Malanga, M.; Fenyvesi, E.; Jicsinszky, L.; Monti, S. *RSC ADV.*, **2014**, *4*, 26359–26367.
- Carmona, T.; Marcelo, G.; Rinaldi, L.; Martina, K.; Cravotto, G.; Mendicuti, F. *Dyes Pigm.* **2015**, *114*, 204–214.
- Mallard, I.; Landy, D.; Bouchemal, N.; Fourmentin, S. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 35–42.
- Malanga, M.; Darcsi, A.; Balint, M.; Benkovics, G.; Beni, Sz.; Sohajda, T. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 537–548.
- Fenyvesi, E.; Szejtli, J.; Zsádon, B. *Magyar Kémikusok. Lapja* **1990**, *3-4*, 114–117.
- Malanga, M.; Balint, M.; Puskas, I.; Tuza, K.; Sohajda, T.; Jicsinszky, L.; Szente L.; Fenyvesi, E.; *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 3007–3018.
- Lofthsson, T.; Jarho, P.; Masson, M.; Jarvinen, T. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2005**, *2*, 335–351.
- Matsuda, H.; Arima, H. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 81–99.
- Rosenbaum, A. I.; Zhang, G.; Warren, D. J.; Maxfield, F. R. *PNAS* **2010**, *107*(12), 5477–5482.
- Diaz-Moscoco, A.; Vercauteren, D.; Rejman, J.; Benito, J. M.; Mellet C. O.; De Smedt, S. C.; Garcia Fernández, J. M. *J. Control. Release* **2010**, *146*, 318–325.
- Plazzo, A. P.; Höfera, C. T.; Jicsinszky, L.; Fenyvesi, E.; Szente, L.; Schiller, J.; Herrmann, A.; Müller, P. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165*, 505–511.
- Fenyvesi, F.; Reti-Nagy, K.; Bacso, Z.; Gutay-Toth, Z.; Malanga, M.; Fenyvesi, E.; Szente, L.; Varadi, J.; Bacskay, I.; Ujhelyi, Z.; Feher, P.; Szabo, G.; Vecsernyes, M. *PLoS ONE* **2014**, *9*(1), e84856.
- Réti-Nagy, K.; Malanga M.; Fenyvesi, E.; Szente, L.; Vamosi, Gy.; Varadi, J.; Bacskay, I.; Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Roka, E.; Vecsernyes, M.; Balogh, Gy.; Vasvari, G.; Fenyvesi, F. *Int. J. of Pharm.* **2015**, *496*, 509–517.

The “visible” cyclodextrins: Synthesis and cell biological application of fluorescent-tagged cyclodextrins.

Native cyclodextrins (CDs) don't adsorb light in the UV-Vis region (200–800 nm), but they can be converted into spectroscopically active compounds via modification with a chromophore unit. Among the chromophores, the group of fluorophores can provide high detection sensitivity in analytical applications. The low detection limit combined with the remarkable molecular recognition

abilities of the cyclodextrin cavity discriminating shape, bulkiness and polarity of the guest molecules, led to the development of cyclodextrin based chemosensors for the detection of spectroscopically inert biologically important molecules (steroids, alkaloids, etc.). The molecular mechanism behind the sensing ability of these systems is the change of fluorescence spectra in the presence of a competitive guest substance (i.e., target analyte). Besides the improved sensitivity the fluorescent substituent on CDs also ensures very high resolution in imaging processes, therefore makes possible the visualization of these molecules in biological pathways.

CDs can be directly modified with fluorophores in order to visualize if these versatile molecules may cross the biological barriers (cell membrane, blood-brain barrier, etc.) and can help to follow their distribution in living matter. The localization of cyclodextrins in living organisms using fluorescent probes has a great importance during the development of CD-containing drug formulations. In the recent years CycloLab Cyclodextrin R&D Ltd. has been involved in two international research projects aiming at the development, characterization and application of CD-based drug delivery systems to fight against multidrug resistance in cancer and in infectious diseases. The fluorescent visualization of CDs and CD-based nanoparticles using sophisticated optical techniques (fluorescent and confocal microscopy, life time imaging, etc.) is in the focus of these projects, since it helps to better understand the role of CDs in the delivery of active substances and their contribution against resistance mechanisms.

Nowadays CD derivatives are being rediscovered as active principles (FDA approved Bridion®, activity of 2-hydroxypropyl β -cyclodextrin in Niemann-Pick type C disease, etc.) and the same trend can be observed in the case of fluorophore-appended cyclodextrins, as they are entering the field of photodynamic therapy where they can be applied as active ingredients. Molecules with photosensitizing ability (porphyrin derivatives, photodonors of nitric-oxide free radical, etc.) have been appended covalently or in a supramolecular fashion to CD which resulted in improved solubility of the photoactive agent and enhanced singlet-oxygen or nitric-oxide free radical generation. Rhodamine B labeled cyclodextrins have been also successfully used in photodynamic therapy, in order to solubilize and visualize the photosensitizing agent.

All these above mentioned applications of fluorophore-appended cyclodextrins require specific, selective chemical modification of native CDs. In biological applications the most important requirement for the fluorescent conjugate formation is the stability

of the linkage between the CD and the fluorescent probe against enzymatic degradation. This stability can be ensured using click chemistry between azido-cyclodextrins and fluorophores bearing terminal alkyne functionalities. Another versatile and frequently used strategy for the fluorescent labeling is through thioureido bond formation between amino-cyclodextrins and fluorescent dyes bearing isothiocyanate functional group.

In the chemosensor development on the other hand the most important factor is the flexibility of the linkage, which allows changes in the structure of the conjugate. Xanthene dyes were appended to CDs *via* ester or amide bridge in order to make the fluorescence of the obtained molecules possible to be turned on or off. The switching of the fluorescence is possible through the formation of non-fluorescent lactones or lactams as the fluorophore can reversibly cyclize.

Water soluble CD polymers are promising candidates to be used as targeted drug delivery systems. The CDs fixed into polymeric structures behave differently from their monomeric counterparts. The close proximity of the adjacent cavities can enhance their complexation ability and ensures the strong association with larger molecules having more than one binding site. These polymers can also provide additional functionalities in that they can regulate the release of substances into water-based systems. Because of the possible biological application of these molecules, their fluorescent labeling is highly demanded. Encouraged by this fact two different strategies were recently developed in CycloLab Cyclodextrin R&D Ltd. for the introduction of fluorescent molecules into epichlorohydrin cross-linked CD polymer scaffold yielding in protocols with high reproducibility, versatility and applicability for various types of fluorescent probes. The main field of application of fluorescently labeled epichlorohydrin branched CD polymers are expected to be in cell biology where they can answer many important questions about the biodistribution of these molecules, but due to their interesting spectroscopic properties their application can span from material science to the pure physicochemical investigations.

Modification of parent CDs and CD polymers with fluorophores therefore offers a great opportunity to visualize these macrocycles in various biological processes, allows their application as chemosensors and also gives the possibility to develop sophisticated supramolecular nanostructures useful for innovative applications such as photodynamic therapy. All these possible utilizations of fluorescent-tagged CDs together with different synthetic strategies for their preparation are reviewed in this communication highlighting CycloLab Cyclodextrin R&D Ltd.'s and other research group's most recent achievements in this burgeoning field of applied supramolecular chemistry.

Ciklodextrinnek segített új szennyvíz-tisztítási eljárások: a kémcsőtől a szennyvíztisztító telepig

FENYVESI Éva* és SZENTE Lajos

CycloLab Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Laboratórium Kft, Illatos út 7, 1097 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A ciklodextrinek (CDk) környezetvédelmi alkalmazásainak kutatása kb. 40 éve kezdődött. Akkor merült fel először, hogy a tipikus talajszennyező anyagok, pl. szénhidrogének, policiklikus aromás szénhidrogének (PAH), poliklórozott bifenilek (PCB), stb. komplexet képeznek a ciklodextrinnekkel és ezt ki lehet használni a talajok tisztításában.¹ Kézenfekvőnek tűnt a talajmosási eljárások hatékonyságának növelése vizes ciklodextrin-oldatok alkalmazásával.² Később Gruiz Katalin csoportjával (Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem) együttműködve számos talajremediációs technológiában előnyösnek találtuk a ciklodextrinek alkalmazását, így pl. nőtt a bioremediációs³ és az *in situ* kémiai oxidációs technológiák⁴ hatékonysága. A ciklodextrinek alkalmazása a kockázatalapú környezetmenedzsmentben felöleli a talajtisztítási technológiákon kívül a talaj-, víz- és levegőszennyezettség felmérési módszereinek érzékenyebbé tételét, a levegő- és víztisztítási eljárások hatásfokának javítását is.⁵

Ma már tudjuk, hogy a tisztított szennyvíz sem egészen mentes káros anyagoktól, tartalmazhat biológiai úton nem lebomló vegyületeket, pl. gyógyszermaradványokat. A gyógyszermaradványok forrásai:

- a felhasznált gyógyszerek kiürülése az emberi, állati szervezetből (a fel nem szívódott hatóanyag és a felszívódott hatóanyagok metabolitjai);
- a fel nem használt gyógyszerek helytelen kezelése;
- gyógyszergyári szennyvizek.

További biológiailag nem lebomló szennyezőanyagok, ún. xenobiotikumok a növényvédőszeres, ipari segédanyagok, mosószerek, kozmetikumok és segédanyagaik, melyek a talajba és talajvízbe kerülve szennyezik a felszíni és felszín alatti vizeket és néha még az ivóvízben is kimutathatók. Köztük számos vegyület rákkeltő, a belső elválasztású (endokrin) hormonrendszert befolyásoló (hormonhatású), immunrendszer-károsító, reprotoxikus anyag, melyek hosszú távú hatásait ma még nem ismerjük.⁶⁻⁸

Ezeket az anyagokat, mivel rendkívül kis koncentrációban vannak jelen a vizekben, és csak a legújabb, nagyérzékenységű analitikai módszerekkel kimutathatóak, újonnan felmerült mikroszennyező anyagoknak nevezzük az angol emerging micropollutants fordításaként. Ezek koncentrációja folyamatosan növekszik az évek során részben a növekvő használat miatt, és mert a jelenlegi szennyvíztisztítási technológiák nem képesek eltávolításukra. Az eddig kipróbált utótisztítási eljárások: aktív szén megkötés, fordított ozmózis, esetleg a kettő kombinációja továbbá az ultraszűrés is csak részleges megoldást jelent.^{9,10}

* Tel.: +36-1-347-6075; fax: +36-1-347-6068; e-mail: fenyvesi.e@cyclolab.hu

A CDk komplexképző képessége régóta ismert. Ezek a 6, 7 vagy 8 glükóz egységekből álló gyűrűk (α -, β - vagy γ CD) képesek magukba zárni a szerves molekulákat vagy azok egyes csoportjait, és így jönnek létre a zárványkomplexek. A gyógyszerek közül különösen sok a zárványkomplexképzésre alkalmas vendégmolekula. Épp ez a széles körű gyógyszeripari alkalmazás alapja, hiszen a bezárt hatóanyagok sokszor jobban oldódnak, könnyebben felszívódnak, tovább stabilak maradnak, kevésbé keserű ízűek, stb., mint más eljárással formulázva¹¹ (lásd Puskás István cikkét ebben a kiadványban).¹² Hasonló előnyöket mutattak ki a növényvédőszer ciklodextrines komplexálásakor. A ciklodextrinbe zárt rovarirtó és gyomirtó szerek csak nedvesség hatására szabadulnak fel a komplexből, addig viszont stabilabbak, vízdékonyságuk jobb, mint ciklodextrines formulázás nélkül.¹³ A kozmetikai és háztartás-vegyipari alap- és segédanyagok közül is számos jó komplexképzőt találunk, melyek CD-be zárva kevésbé illékonyak és irritálóak, tovább eltarthatók.

A CDk alkalmazása a szennyvíztisztításban már a nyolcvanas években szóba került ipari szennyvizek nagy koncentrációjú szerves szennyezőanyagainak megkötésére. Már akkor világos volt, hogy a CD-t rögzíteni (immobilizálni) kell ehhez az alkalmazáshoz. Vízdékonyságának csökkentésére vagy cellulózsálak felületére kötötték vagy önmagában polimerizálták epoxivegyületeket (epiklóridint és diepoxi étereket) alkalmazva kapcsolószerként.^{14,15} Ezeket a fejlesztéseket az ELTE Kémiai Technológia Tanszékén Zsádon Béla kutatócsoportja végezte a Chinoi Biokémiai Laboratóriumával, a CycloLab elődjével együttműködve.

Később számos más immobilizálási eljárást is közöltek az irodalomban, pl. poliuretán-CD polimereket állítottak elő diizocianátokkal történő térhálósítással,¹⁶ CD-tartalmú polikarbonát nanoszivacsokat,¹⁷ akrilgyantákat¹⁸ irtak le. Polisztirol,¹⁹ polipropilén,²⁰ poliámin,²¹ poliészter²² és szilika²³ felületekhez kötötték CD-t különféle eljárásokkal. A téma fontosságát jelzi, hogy a *Nature* egyik legutóbbi számában címlapra került egy porózus CD polimer, melyet egy merev térhálósítószer, tetrafluorotereftálsav-dinitril alkalmazásával nyertek.²⁴

A CD-tartalmú szorbensek előállítását és szennyvíztisztítási alkalmazási lehetőségeit összefoglaló munkákból azonban világosan látszik, hogy a szorbensek legfeljebb néhány grammos tételben készültek és a technológiai modell-kísérletek is kis léptékűek voltak.^{25,26} Ezért határoztuk el, hogy a Nemzeti Technológiai Program támogatásával kidolgozzunk egy méretnövelt technológiát ezúttal a más módszerekkel nehezen eltávolítható újonnan felmerült mikroszennyező anyagokra koncentráva.²⁷

A CDFILTER konzorciumot a 2009-től 2012-ig tartó periódusban a CycloLab Kft vezette.²⁸ A konzorcium tagjai: Organica Technológiák Zrt., Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány Anyagtudományi és Technológiai Intézet, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék és az Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Környezettudományi Kooperációs Kutató Központ kutató-fejlesztő csoportjai. A CycloLab feladata volt a CD gyöngypolimerek előállítása és jellemzése, továbbá részvétel a gyöngypolimer és az ezeket tartalmazó szinterelt szűrőlapok tisztítási hatásfokának vizsgálatában laboratóriumi és félüzemi kísérletekben. Jelen közleményben ezen kísérletek eredményeit mutatjuk be.

A laboratóriumi modellkísérletekben ciklodextrinnel komplexet képező színezékeket (metilnarancs és fenolftalein) továbbá olyan gyógyszer-hatóanyagokat (karbamazepin és diklofenak) és nonilfenol-észtereket (a mosószeres alkotórésze) vizsgáltunk, melyek a hagyományos szennyvíztisztítási technológiával nem távolíthatók el. A 2007-ben végzett átfogó nemzetközi Duna-vizsgálatban (JDS2) átlagosan 37 ng/L (Budapestnél 50-60 ng/L) koncentrációban mutattak ki hangulatjavító hatású (antidepresszáns) karbamazepint, mint az egyik leginkább perzisztens gyógyszer-hatóanyagot.²⁹ A 2013-ban végzett hasonló nemzetközi vizsgálatban (JDS3) a karbamazepin átlagos koncentrációja 26 ng/L volt.³⁰ Ez utóbbi vizsgálatban metabolitját, a 10,11-dihidro-10,11-dihidroxi-karbamazepint is mérték átlag 53 ng/L-t detektálva. A nem-szteroid gyulladásgátló diklofenak koncentrációja 1-8 ng/L tartományban változott fokozatosan csökkenve a Duna haladási irányában 2007-ben, míg a 2013-as vizsgálatban 10 ng/L átlagos koncentrációt határoztak meg. A Duna-vizsgálat során 2007-ben néhány mintában 50 ng/L feletti koncentrációban mutattak ki nonilfenolt (a mosószeres alkotó felületaktív anyagok részleges lebomlási termékét), míg 9 ng/L volt a maximális koncentráció 2013-ban.

A félüzemi kísérletben 9 hatóanyag keverékét használtuk: négyféle nem-szteroid gyulladásgátlószert (ibuprofent, naproxent, ketoprofent és diklofenakot), 3 hormont (β -ösztradiolt, etinilösztadiolt és ösztriolt), egy ipari segédanyagot (biszfenol-A) és koleszterint. A lakosság körében legnagyobb aggodalmat kiváltó hormonok (ösztadiol és etinilösztadiol) szintje a detektálási határ (5 ng/L) alatt maradt a Duna mintákban a JDS3 vizsgálatban, csak öszttront mutattak ki pl. Budapestnél 1-2 ng/L koncentrációban.³⁰ Hormonhatású anyagok a nonilfenol és a biszfenol-A is. A JDS3 során maximum 1,9 mg/L biszfenol-A volt kimutatható néhány mintában.³⁰

Olyan modell szennyezőanyagokat választott tehát a konzorcium, melyek reális kockázatot jelentenek élő vizeinkben, pl. a Dunában. Kockázatuk felmérésekor nemcsak a mért koncentrációkat, hanem hatásukat és a felhasználás mértékét is figyelembe vettük.³¹

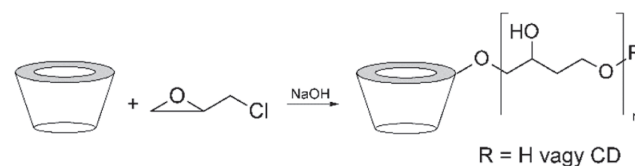
A laboratóriumi modellkísérletek során több kérdésre kerestünk a választ. Vizsgáltuk, hogy szükség van-e a CD gyűrűre, vagy elegendő egy hasonló szénhidrát-polimer. Tanulmányoztuk, hogy a három legismertebb CD féleség (α -, β - vagy γ CD) közül melyikből készült gyöngypolimer

a leghatékonyabb. Kísérleteket végeztünk arra vonatkozóan, hogy van-e szerepe a szemcseméretnek. A félüzemi kísérletek tervezésekor figyelembe vettük az azóta máshol már közölt laboratóriumi technológiai kísérletek eredményeit.³²

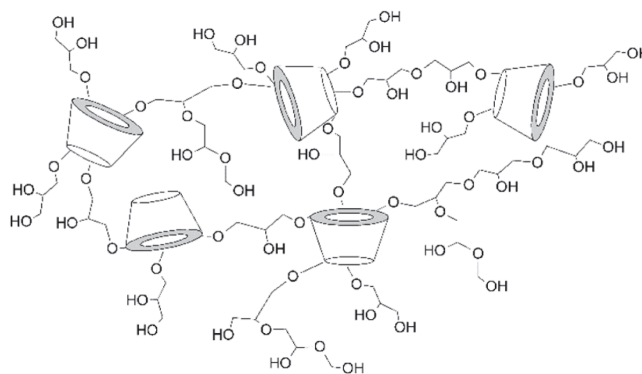
2. Ciklodextrin-alapú szorbensek

2.1. A szorbensek előállítása

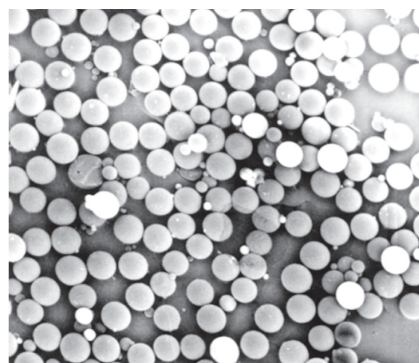
A CD polimereket a korábban leírt eljárással állítottuk elő emulziós polimerizációval lúgos közegben epiklorhidrint és etilén-glikol-bisz(epoxipropil)-étert alkalmazva térhálósító-szerként (1. ábra).³³ A gyöngypolimer szerkezeti vázlatát a 2. ábra mutatja, a 3. ábra pedig egy mikroszkópos kép a termékről.



1. Ábra A CD térhálósításának reakciósémája.



2. Ábra A CD gyöngypolimer szerkezeti vázlatja.

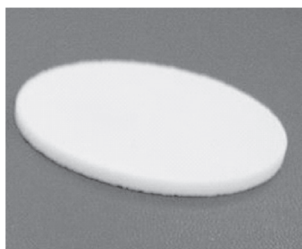


3. Ábra A BCD gyöngypolimererről készült mikroszkópos felvétel.

A gyöngypolimeret nagy sűrűségű polietilénbe ágyazva szinterelt szűrőlapok keletkeztek (4. Ábra).³⁴

3. Laboratóriumi modellkísérletek: a gyűrű, az üregméret és a szemcseméret szerepe

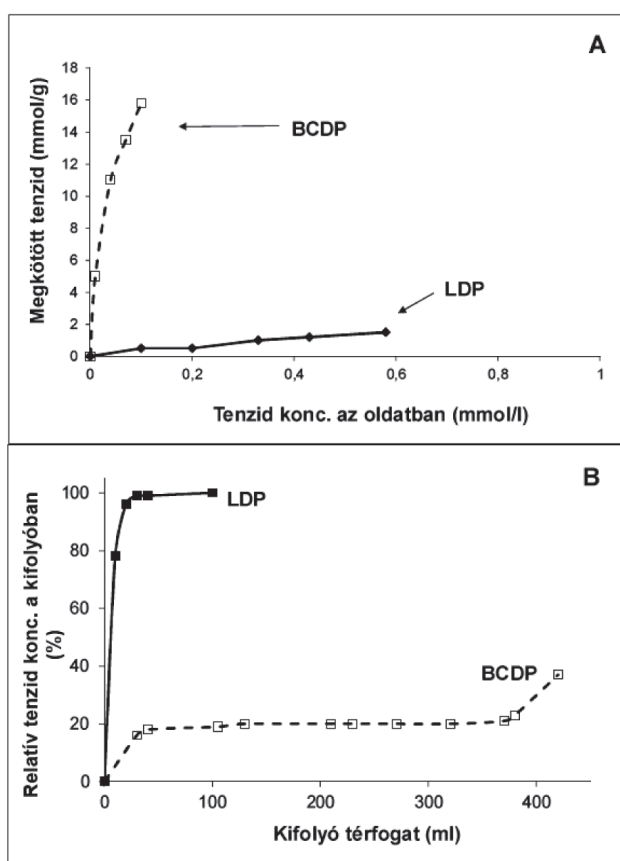
Laboratóriumi modellkísérleteket végeztünk, hogy megvizsgáljuk a CD-tartalmú szorbensek legfontosabb jellemzőinek hatását szorpciós kapacitásukra.



4. Ábra. 40% BCD gyöngypolimeret tartalmazó szinterelt szűrőlap.

3.1. Tenzid megkötése

Az első kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, van-e szerepe a ciklodextrin komplexképző képességének. Modell szennyezőanyagként egy nonilfenil-polietylénoxidot ($C_{20}H_{42}O_n$, $C_{15}H_{24}O$ ($n=9$)) választottunk, ami a mosószernek egyik komponense és jó komplexképző (5. Ábra).³⁵



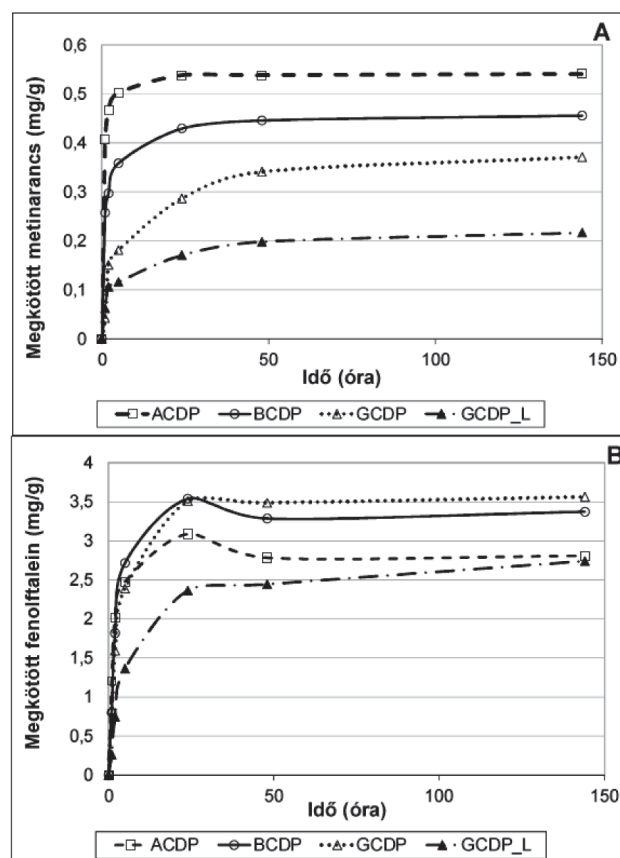
5. Ábra. Nonilfenol-etoxilát megkötése ciklodextrin polimeren (BCDP) és hasonló duzzadásfokú lineáris dextránból készült polimeren (LDP) egyensúlyi kísérletben (A) és oszlopos kísérletben (B).

A BCD térhálósításával nyert gyöngypolimer (BCDP) szorpciós képességét hasonlítottuk össze egy hasonló szemcseméretű, hasonló duzzadásfokú lineáris dextránból készült gyöngypolimerével (LDP). Az egyensúlyi izotermák alapján egyértelmű a BCDP nagyobb szorpciós kapacitása az LDP-hez képest. Az oszlopos kísérletben az LDP állófázison változatlan koncentrációban folyik át a tenzid oldat, míg azonos áramlási sebességet és tenzid koncentrációt alkalmazva a BCDP gyöngypolimer esetén az áttörési térfogat kb. 400 mL. Mindkét kísérlet azt mutatja, hogy a felületi adszorpción kívül a CD üreggel

való kölcsönhatásnak, a zárványkomplex-képzésnek is van szerepe a megkötésben.

3.2. Színezékek és gyógyszer-hatóanyagok megkötése

A színezék-megkötési kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a gyűrű méretétől hogyan függ a megkötő-képesség. α -, β - és γ CD térhálósításával előállított, hasonló fizikai sajátságú (szemcseméretű és duzzadásfokú) gyöngypolimeret (ACDP, BCDP és GCDP) hasonlítottunk össze (6. ábra).



6. Ábra. Metilnarancs (A) és fenolftalein (B) megkötése α -, β - és γ CD gyöngypolimerrel (ACDP, BCDP és GCDP, szemcseméret: 0,1-0,3 mm) (GCDP_L – nagy szemcseméretű (0,3-0,8 mm) γ CD gyöngypolimer).

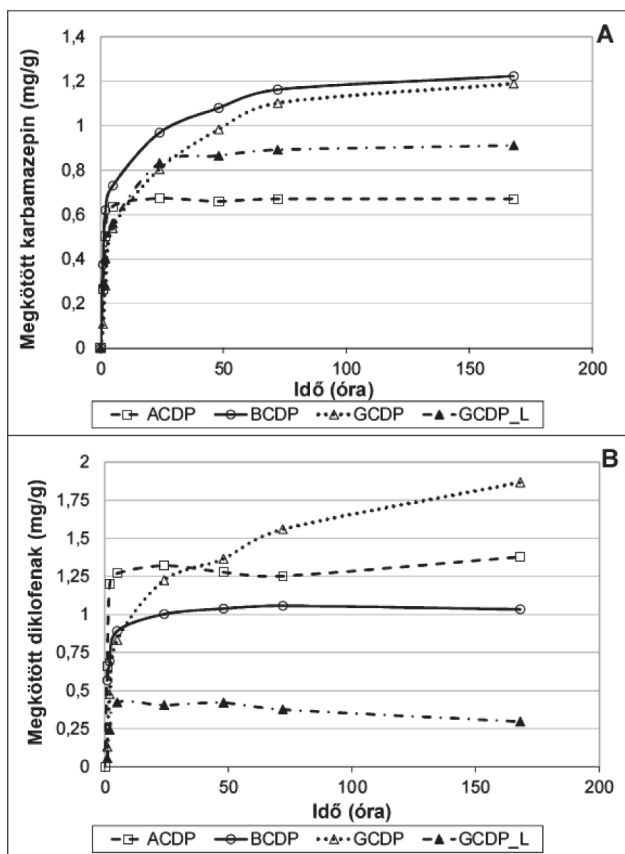
A két színezék közül a metilnarancs inkább az α CD-nel, míg a fenolftalein inkább a β - és γ CD-nel képez komplexet.^{36,37} Ezt tükrözik a megkötés kinetikai görbéi a 6. ábrán. A metilnarancs esetén a sorrend: ACDP > BCDP > GCDP, míg a fenolftalein esetén BCDP ~ GCDP > ACDP, követve a komplexek stabilitását jellemző asszociációs állandók sorrendjét. A nagyobb szemcseméretű GCDP-L jelű minta mindkét esetben kisebb megkötést mutat a kisebb szemcseméretű GCDP mintához képest.

Hasonló összefüggéseket kaptunk a két gyógyszer-hatóanyag esetén (7. Ábra). A karbamazepin a β - és γ CD-nel lép kölcsönhatásba, az α CD üregébe nem illeszkedik nagy mérete miatt. Ezzel összhangban a megkötés sorrendje BCDP ~ GCDP > ACDP.

A diklofenak komplexeket sokan vizsgálták, de alig található olyan irodalom, ahol a különböző üregméretű CDk affinitását hasonlították össze. Zughul és mtsai γ CD > β CD

> α CD sorrendet találtak.³⁸ Ez nem egyezik a polimerek megkötési sorrendjével: GCDP > ACDP > BCDP. Ez arra mutat, hogy az üregméreten kívül más paraméterek is szerepet játszhatnak.

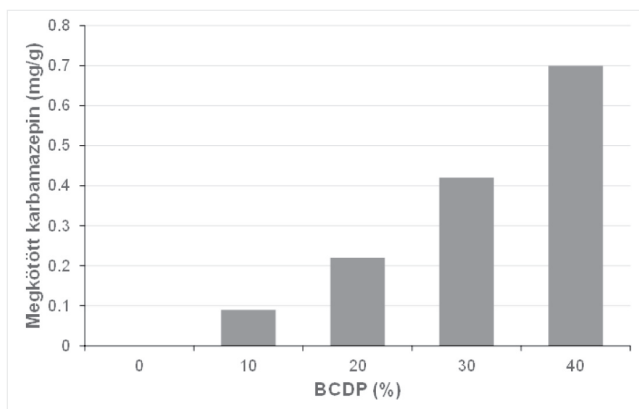
Mindkét hatóanyag megkötésekor kedvezőtlen volt a nagyobb szemcseméret.



7. Ábra. Karbamazepin (A) és diklofenak (B) megkötése α -, β - és γ CD gyöngypolimerekkel (ACDP, BCDP és GCDP) (GCDP_L – nagy szemcseméretű (0,3-0,8 mm) γ CD gyöngypolimer).

4. Megkötési kísérletek szinterelt szűrőkkel

A nagysűrűségű polietilénbe ágyazott gyöngypolimer is képes komplexképzésre. A szűrőlapok kapacitása arányos a beágyazott BCDP-tartalommal (8. Ábra).



8. Ábra. Szinterelt szűrőlapok karbamazepin-megkötése a beágyazott BCDP-tartalom függvényében.

Hasonló összefüggéseket tapasztaltak partnereink ibuprofen megkötésekor.³⁹ Kimutatták, hogy bár a gyöngypolimer megkötési kapacitása jelentősen csökken a szintereléssel, van mód ennek javítására. Például, kimosható szeretlen adalékok alkalmazásával porózus szerkezetű szűrőlapok jönnek létre, melyekben a CD gyűrűk jobban hozzáférhetők a megkötésre váró szerves mikroszennyező anyagok számára. A szennyezőanyaggal feltöltődött szűrőlapok etanollal regenerálhatók, és ezáltal nem csökken, hanem nő a megkötési kapacitás. Valószínűleg a gyártás folyamán belekerült szerves anyagokat mossuk ki etanollal, így aktiváljuk a szűrőlapokat.

5. Félüzemi kísérlet

A CycloLab Kft itt bemutatott laboratóriumi modellkísérleteinek, továbbá a konzorciumi partnerek máshol már közölt kisléptékű kísérleteinek^{32,34,39} eredményei alapján tervezte meg a konzorcium a félüzemi kísérletet, melyre az Organica Környezetvédelmi Technológiák Zrt. Telephelyén, Telkiben került sor. A kísérletet az Organica szakemberei végezték a CycloLabtól származó BCDP gyöngypolimerrel. A mintákat az ELTE kutatói elemezték gázkromatográfhoz kapcsolt tömegspektrometriával.⁴⁰

Mivel a telki tisztított szennyvíz a szerves mikroszennyező anyagok tekintetében időben igen változó összetételű, a félüzemi utótisztítást célzó kísérletekhez néhány kiválasztott vegyület törzsoldatának adagolásával biztosítottuk, hogy e vegyületek az átlagosan tapasztaltaknak megfelelő koncentrációban jelen legyenek a vízben a félüzemi kísérletek idején is. Ezért kilencféle szerves mikroszennyező anyaggal ~5 μ g/L koncentrációban szennyezett, előzetesen biológiailag tisztított kommunális szennyvízzel folytattak az utószűrő kísérletek. A 300 L tisztított, adalékolt szennyvízhez 1 kg BCDP gyöngypolimeret kevertünk, majd időnkénti mintavétellel ellenőriztük a víz összetételét.

1. Táblázat. Szerves mikroszennyező anyagok eltávolítása adalékolt, tisztított szennyvízből BCDP segítségével félüzemi méretben

Összetevő	Kiindulási konc. (μ g/L)	eltávolítás (%)	
		5 perc után	48 óra után
Ibuprofen	5,18	85,5	83,1
Naproxen	4,98	18,1	27,7
Ketoprofen	5,10	19,6	14,7
Biszfénol-A	5,38	95,7	99,4
Diklofenak	9,09	86,9	85,6
β -Ösztradiol	5,22	96,8	>99,9
Etinil-ösztadiol	5,15	>99,9	>99,9
Ösztrol	5,38	95,9	96,1
Koleszterin	6,09	86,1	91,4

A polimer nagyon hatékony szorbensnek bizonyult, már 5 perc kontaktidő alatt közel 90% ill. e feletti eltávolítást regisztráltunk a legtöbb adalékolt mikroszennyező anyag (ibuprofen, biszfénol-A, diklofenak, β -ösztadiol, etinil-ösztadiol, ösztrol, koleszterin) esetén (1. Táblázat). A magas eltávolítási hatásfok értékek alig változtak a megfigyelés további időtartamában egészen 48 óráig.

A Ketoprofén esetében tapasztalt az 5 perc után mérthez képest kisebb eltávolítási hatások 48 óra után részben a meghatározás pontatlanságával magyarázható ezen az alacsony koncentrációsinten, részben pedig azzal, hogy a különböző hatóanyagok versenyeznek a kötőhelyekért. Egyik leszoríthatja a másikat, amíg az egyensúly kialakul.

6. Összefoglalás

A több lépcsőben végrehajtott méretnövelés sikeresen bizonyította a CD-gyöngypolimer alkalmazhatóságát tisztított szennyvizekben maradó mikroszennyező anyagok eltávolítására. Biológiailag nem lebomló gyógyszer-hatóanyagok, hormonok, hormon-hatású ipari segédanyagok gyorsan és nagy kapacitással megköthetők a CD-alapú szorbensen. Ma még talán nem gazdaságos ilyen drága szorbensek alkalmazása, de a növekvő ivóvíz-hiány és a természetes vizek fokozódó elszennyeződése előbb-utóbb szükségessé teszi ilyen és ehhez hasonló megoldások kifejlesztését.

7. Kísérleti rész

7.1. Anyagok

A CD gyöngypolimer a CycloLab kísérleti termékei. Szemcseméretük 0,1-0,3 mm, kivéve a GCDP-L jelűt, melynek szemcsemérete 0,3-0,8 mm. Duzzadási térfogatuk: 4-5 ml/g. A szinterelt szűrőket a Bay Zoltán Közalapítvány kutatócsoportja állította elő nagysűrűségű polietilénbe ágyazva a CD gyöngypolimerrel.³⁴ A lineáris dextransból készült gyöngypolimer Sephadex G-25 a svéd Pharmacia cég terméke. Szemcsemérete 0,1-0,2 mm, duzzadási térfogata 5 ml/g. A megkötési kísérletekben használt modellanyagokat a Sigma-Aldrich-től szereztük be.

7.2. Módszerek

7.2.1. Tenzid megkötése egyensúlyi szorpciós kísérletben

Szorpciósizotermát vettünk fel úgy, hogy 0,4 g gyöngypolimer 4 mL 0,01-5% nonilfenil-polietilénoxidot (n=9) tartalmazó desztillált vizes oldatban duzzasztottunk kémcsövekben, majd rázattuk 5 órán keresztül. Előkísérleteink szerint ez az idő elegendő volt az egyensúly eléréséhez. Egy éjszakai állás után a felülúszót leöntöttük és UV spektrofotometriás méréssel meghatároztuk az oldott tenzid koncentrációját. A kezdeti és egyensúlyi koncentrációk különbségéből számítottuk a megkötött tenzid koncentrációját.

7.2.2. Tenzid megkötése átfolyós oszlopos kísérletben

A vízben duzzasztott gyöngypolimeret (száraz tömeg: 0,4 g) üvegoszlopba töltöttük (átmérő 0,4 cm, magasság 13-14 cm), majd a kapott gélágyon keresztül 15 mg/l koncentrációjú nonilfenil-polietilénoxid (n=9) oldatot folytattunk át és 5 mL-es frakciókban mértük a tenzid koncentrációt UV spektrofotométerrel.

7.2.3. Színezékek és gyógyszer-hatóanyagok megkötése

Kémcsövekbe mértünk 50 mg gyöngypolimer vagy ezt tartalmazó szinterelt szűrő darabkát és a modell vegyület vizes oldatát (5 mL), majd állni hagytuk és időközönként mintát vettünk, melynek koncentrációját UV-fotométerrel határoztuk meg. A megkötött mennyiséget a száraz polimer tömegére vonatkoztatva a kontroll oldat koncentrációjához viszonyított koncentráció-különbség alapján számítottuk.

7.2.4. Félüzemi kísérlet

A Telki szennyvíz-tisztító telep tisztított, szűrt szennyvizét használtuk a kísérlethez. 300 L ilyen vizet adalékoltunk a kiválasztott kilencféle szerves mikroszennyező anyaggal (ld. 1. Táblázat) úgy, hogy végső koncentrációjuk ~ 5 mg/L legyen. A 300 L vízhez 1 kg BCDP gyöngypolimer kevertünk. Az első mintavételre a bekeverés után 5 perccel került sor.

A mintákban maradt szerves mikroszennyező anyag koncentrációkat az ELTE gázkromatográfiás-tömegspektrometriás módszerével határozták meg.³⁹

Köszönetnyilvánítás

A munkát a CDFILTER (TECH_08-A4/2-2008-0161) projekt keretében végeztük a Nemzeti Technológiai Program támogatásával. Köszönetet mondunk név szerint a következő kutatóknak, fejlesztőknek: Tóth Imre, Kovács Róbert, Kenyeres István (ORGANICA Környezetvédelmi Technológiák Zrt.), Andersen Endre, Bánhegyi György, Rácz Ilona (Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány Anyagtudományi és Technológiai Intézet), Gruiz Katalin, Molnár Mónika (Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék), Záray Gyula, Barkács Katalin és Perlne Molnár Ibolya (Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Környezettudományi Kooperációs Kutató Központ kutató-fejlesztő csoportjai).

Hivatkozások

1. Szejtli, J. *In Minutes Int. Symp. Cyclodextrins*; 6th, Hedges, A. R., Ed.; Edition de Sante: Paris, 1992; pp. 380-389.
2. Fenyvesi, E.; Szeman, J.; Szejtli, J. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1996**, *25*(1-3), 229-232.
3. Gruiz, K.; Fenyvesi, E.; Kriston, E.; Molnar, M.; Horvath, B. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1996**, *25*(1-3), 233-236.
4. Fenyvesi, E.; Balogh, K.; Oláh, E.; Báta, B.; Varga, E.; Molnár, M.; Gruiz, K. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **2011**, *70*, 291-297.
5. Gruiz, K.; Molnar, M.; Fenyvesi, E.; Hajdu, Cs.; Atkari, A.; Barkacs, K. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **2011**, *70*(3-4), 299-306.
6. Kumar, A.; Xarorarak, I. *Sci. Total Environ.* **2010**, *508*, 5972-5989.
7. Boxall, A. B. A.; Rudd, M. A.; Brooks, B. W.; Caldwell, D. J.; Choi, K.; Hickman, S. és mtsai *Environ. Health Perspect.* **2012**, *120*, 1221-1229.

8. Schwarzenbach, R. P.; Escher, B. I.; Fenner, K.; Hofstetter, T. B.; Johnson, C. A.; von Gunten, U., és mtsai *Science* **2006**, *313*, 1072–1077.
9. Dlugolecka, M.; Dahlberg, A. G.; Plaza, E. *Vatten* **2006**, *62*, 139–148.
10. Xu, P.; Drewes, J. E.; Bellona, C.; Amy, G.; Kim, T. U.; Adam, M., és mtsai *Water Environ. Res.* **2005**, *77*, 40–48.
11. Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98(5)*, 1743–1753.
12. Puskás, I., Szente, L. *Magy. Kém. Foly.* **2016**.
13. Szente, L. *J. Therm. Anal.* **1998**, *51*, 957–963.
14. Otta, K.; Fenyvesi, É.; Zsardon, B.; Szejtli, J.; Tüdös, F. *In Proc. Int. Symp. Cyclodextrins, 1st*, Szejtli, J. Ed.; Reidel: Dordrecht, Neth. **1981**; pp. 357–362.
15. Szejtli, J.; Fenyvesi, E.; Zsardon, B. *Stärke* **1978**, *30(4)*, 127–131.
16. Ronio, A.; Penas, F. J.; Isasi, J. R.; Garcia-Zubiri, H. X.; Gonzalez-Gaitano, G. *React. Funct. Polym.* **2008**, *68(1)*, 406–413.
17. Trotta, F.; Ferrari, R. P.; Laurenti, E.; Moraglio, G.; Trossi, A. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1996**, *25(1-3)*, 225–228.
18. Janus, L.; Crini, G.; El-Rezzi, V.; Morcellet, M.; Cambiaghi, A.; Torri, G.; Naggi, A.; Vecchi, C. *React. Funct. Polym.* **1999**, *42(3)*, 173–180.
19. Tabuse, I.; Shimizu, N.; Yamamura, K. Japan Patent 54060761, **1979**; *Chem. Abstr.* **1979**, *91*, 162667.
20. Le Thuaut, P.; Morcellet, M.; Martel, B. *Info Chim. Mag.* **1999**, *411*, 122–123.
21. Crini, G.; Janus, L.; Morcellet, M.; Torri, G.; Morin, N. *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *73(14)*, 2903–2910.
22. Martel, B.; Morcellet, M.; Ruffin, D.; Ducoroy, L.; Weltrowski, M. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **2002**, *44(1-4)*, 443–446.
23. Sawicki, R.; Mercier, L. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40(6)*, 1978–1983.
24. Alsbaiee, A.; Smith, B. J.; Xiao, X.; Ling, Y.; Helbling, D. E.; Dichtel, W. R. *Nature* **2016**, *529*, 190–194.
25. Crini, G.; Morcellet, M. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25(13)*, 789–813.
26. Crini, G. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30(1)*, 38–70.
27. Nemzeti Technológia program 2008 Online elérhető: <http://nkfia.kormany.hu/nemzeti-technologia-program-2008-tech-08>
28. TECH_08-A4/2-2008-0161 Online elérhető: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/12041>
29. Joint Danube Survey 2. Final Scientific report. **2007**; https://www.icpdr.org/jds/files/ICPDR_Technical_Report_for_web_low_corrected.pdf
30. Joint Danube Survey 3. Final Scientific report. **2013**; https://www.icpdr.org/main/sites/.../jds3_final_scientific_report_2.pdf
31. Körinfo adatbázis. Újjonnan felismert veszélyes vegyi anyagok. <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/keftar/1640>
32. Nagy, Zs. M.; Molnár, M.; Fekete-Kertész, I.; Molnár-Perl, I.; Fenyvesi, É.; Gruiz, K. *Sci. Total Environ.* **2014**, *485–486*, 711–719.
33. Fenyvesi, É.; Zsardon, B.; Szejtli, J.; Tüdös, F. *Ann. Univ. Sci. Budap. Rolando Eotvos Nominatae, Sect. Chim.*, **1977**, *15*, 13–22.
34. Andersen, E.; Rác, I.; Erős, A.; Bánhegyi, Gy.; Fenyvesi, É.; Takács, E. *IOP Conf. Series: Mater. Sci. Eng.* **2013**, *47*, 012038.
35. Cserhati, T.; Szejtli, J. *Carbohydr. Res.*, **1992**, *224*, 165–173.
36. Buvári, A.; Barcza, L. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1989**, *7(3)*, 313–320.
37. Buvári-Barcza, A.; Kajtar, J.; Barcza, L. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1996**, *24(3)*, 211–217.
38. Abdoh, A. A.; Zughul, M. B.; Davies, J. E. D.; Badwan, A. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **2007**, *57(1-4)*, 503–510.
39. Jurecska, L.; Dobosy, P.; Barkács, K.; Fenyvesi, É.; Záray, Gy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *98*, 90–93.
40. Perlé Molnár, I.; Vasanits, Zs. A.; Sebők, Á.; Helenkár, A.; András, N.; Faludi, T.; Molnár, B.; Záray, Gy. *Magy. Kém. Foly. – Kém. Közl.* **2012**, *118(2-4)*, 55–64.

Cyclodextrin-enabled novel waste water treatment technologies: from the test tube to the waste water treatment plant

The environmental application of cyclodextrins (CDs) started about 40 years ago. At that time they were used in soil remediation technologies for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), etc.¹ As these contaminants form inclusion complexes with CDs using aqueous CD solutions enhanced the efficiency of the soil washing.² Later on further soil remediation technologies were developed in cooperation with the team of Prof. Katalin Gruiz at the Budapest University of Technology and Economics. The efficiency of bioremediation³, and in situ oxidation technologies⁴ was improved by CD application.

Recently, the inclusion complex forming ability of CDs has been utilized for the removal of residual pharmaceuticals and other micropollutants from purified waste water. Such persistent contaminants as the drug residues, cosmetic excipients, detergents and pesticides cannot be removed from the waste water by the traditional technologies. They get to the soil and groundwater polluting also the surface waters and sometimes they can be detected even in drinking water.⁶⁻⁸

As these xenobiotics (emerging micropollutants) are found in waters at extremely low concentration only the recently developed sophisticated analytical techniques can be used for their detection. Their concentration, however, is continuously increased and poses an increasing threat to the whole mankind and the environment.

CDs are cyclic oligosaccharides consisting of 6, 7 or 8 glucopyranose units. Their inclusion complex forming ability has been known for long. They are able to include a large variety of drugs and this is the reason of the wide applications in the pharmaceutical industry (see the details in the paper of Dr. István Puskás in this issue).¹² The inclusion complexes of pesticides ensure enhanced solubility, bioavailability, stability, wetting, etc. to the included pesticide molecule.¹³ Numerous excipients of the cosmetic and household formulations form also complexes with CDs resulting in reduced volatility, irritancy and longer durability.¹⁴ All these compounds are proper candidates for sorption on a CD-based filter as a tertiary treatment in the waste water treatment technology.

The experiments for application of CDs in the waste water treatment started in Hungary about 40 years ago by the team of Prof. Béla Zsardon at Eötvös University in collaboration with the Biochemistry group of Chinoin Pharm. Chem. Works, the predecessor of CycloLab Ltd. At that time CDs were immobilized on the surface of cellulose fibers using epoxy compounds such as epichlorohydrin and diepoxy ethers as coupling agents.¹⁵⁻¹⁶

Later on several sorbents were published obtained by immobilizing CDs on various macromolecular surfaces or by crosslinking various CD derivatives. Recently, the cover paper of *Nature* showed a novel porous CD polymer obtained by crosslinking with tetrafluoroterephthalic acid-dinitril showing the importance of this research field.²⁴

An overview of the literature shows clearly that the sorbents published so far were prepared in a few grams only and the

technological experiments remained at the lab scale. Therefore we decided to develop an up-scaled technology for the removal of the otherwise hardly removable emerging pollutants. We organized a consortium (CDFILTER)²⁸ headed by CycloLab with the participation of Organica Environmental Technologies Ltd (responsible for the pilot scale experiments), Bay Zoltan Applied Research Foundation, Institute of Material Science and Technology (responsible for the preparation of filter sheets), Budapest University of Technology and Economics (responsible for the lab scale technology experiments and ecotoxicological studies) and the Environmental Cooperation research Center of Eötvös University (responsible for the chemical analysis). In this work we used CD immobilized in the form of bead polymer for the sorption of non-biodegradable model compounds (dyes, drugs and surfactants both in laboratory and in pilot scale experiments).

CD polymer was compared with a carbohydrate polymer of similar properties (dextran crosslinked) to see the effect of inclusion complex formation in the mechanism of sorption. The superiority of the CD polymer proved the role of the cavities of definite size.

The sorption capacity of α -, β - and γ CD bead polymers (ACDP, BCDP and GCDP) of similar and different size was compared using dyes (methyl orange and phenolphthalein) and model drugs (carbamazepine and diclofenac). Both carbamazepine and diclofenac are typical contaminants in surface waters, also in Danube. As α CD forms complex of the highest stability with methyl orange the order of ACDP > BCDP > GCDP was found, while in the case of phenolphthalein BCDP ~ GCDP > ACDP

was obtained following the order of the association constants of inclusion complexes.

Similar relationships were obtained for the model drugs. Carbamazepine forms complexes with β - and γ CD, while it is too large to be included into the cavity of α CD. The order of the sorption capacity follows this trend: BCDP ~ GCDP > ACDP. The association constants of diclofenac CD complexes would predict the order of γ CD > β CD > α CD but we obtained the trend of GCDP > ACDP > BCDP suggesting that in the case of diclofenac some other parameters (different from those in connection with inclusion complexes) might play a role.

Our experiments unambiguously showed that the polymer beads of enhanced size are less effective sorbents showing the importance of the specific surface area.

Filter sheets made by sintering the CD polymer beads into ultrahigh density polyethylene were also effective sorbents. Their sorption capacity increased proportionally with the embedded CDP content.

In the pilot plant scale experiment 1 kg CD bead polymer was mixed to 300 L purified waste water spiked with 9 typical micropollutants (non-steroidal anti-inflammatory drugs, hormones and hormone-like chemicals) at ~5 ppb level (environmentally relevant concentration). The GC-MS analysis of the water samples showed that most of the pollutants were removed from the water in 5 min with >90% efficiency demonstrating the high potential of the CD-based sorbents in the tertiary waste water purifying step.

Ciklodextrinek korszerű analitikája: ciklodextrinre szabott kromatográfias állófázisok fejlesztése

SZEMÁN Julianna,* CSABAI Katalin és SOHAJDA Tamás

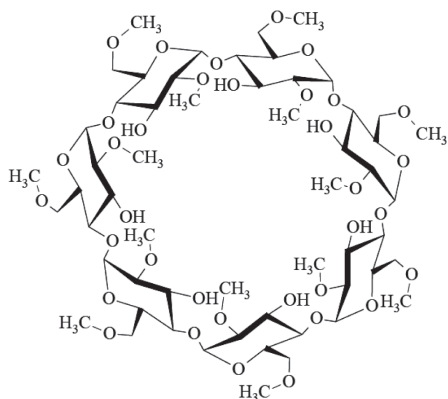
CycloLab Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Laboratórium Kft, Illatos út 7, 1097 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A ciklodextrinek (CD-k), főleg a ciklodextrin-származékok analitikája sok szempontból különbözik a gyógyszer-molekulák vagy az egyéb szénhidrátok vizsgálatától. Az alap ciklodextrinek (α -, β - és γ -CD) viszonylag egyszerűen vizsgálhatók folyadékkromatográfiával, de CD-származékok analízise már bonyolultabb feladat.

Az alap CD-k, főleg a β -CD vízoldhatósága alacsony, kémiai módosításával, pl. hidroxipropil-, szulfobutil- vagy metil-csoportok beépítésével viszont az oldhatóság jelentősen növelhető. A legelterjedtebb hidroxipropil- és szulfobutil-származékokat elsősorban gyógyszeripari formulázásra, a hatóanyag oldhatóságának és stabilitásának növelésére, biológiai hasznosulás javítására használják. A CD-származékok egyéb ipari és analitikai felhasználása is jelentős, például királis adalékként enantiomerek elválasztására is alkalmasak.

A CD-származékok a gyártási eljárástól függően igen különböző átlagos szubsztitúciós fokúak és komponens-eloszlásúak lehetnek, hiszen a β -ciklodextrin gyűrű 21 hidroxil-csoportja cserélhető ki a kívánt-oldallánra. Az 1. ábra egy egykomponensű, ún. "single isomer" CD-származék, a heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin (DIMEB) szerkezeti képletét mutatja, ahol minden egyes glükopiranoz egység a 2-es és 6-os helyzetben metilezett, míg a 3-as helyzetben érintetlen.



1. Ábra A DIMEB szerkezeti képlete.

A véletlenszerűen szubsztituált CD-származékok számos komponens-tartalmazznak, melyek a szubsztituensek számában és helyében különböznek. Az elméletileg lehetséges összetevők száma igen nagy (2^{21}), ezért valamennyi komponens elválasztása még a legkorszerűbb analitikai módszerekkel sem valósítható meg, és általában

nem is cél. Ennek ellenére elengedhetetlenül fontos a termékek komponens-eloszlásának jellemzése, a "batch to batch" reprodukálhatóság ellenőrzése. A véletlenszerűen szubsztituált CD-származékok széleskörűen használt, gyógyszerkönyvben is jegyzett képviselői a (2-hidroxipropil)- β -CD (HPBCD) és a szulfobutiléter- β -CD (SBECD).

A CD-származékok jellemzésére a szubsztitúciós fokot és egyes esetekben a szubsztitúciós mintázatokat szokás használni. A szubsztitúciós fok, (angol neve Average Degree of Substitution, DS), megadja a szubsztituensek átlagos számát egy ciklodextrin gyűrűn, melyet általában NMR-rel lehet meghatározni. Használják még pl. a gyógyszerkönyvben, a moláris szubsztitúciós fokot is (Molar Substitution, MS), amely a szubsztituensek átlagos száma a CD gyűrű egy glükóz egységén.

A szubsztitúciós mintázat a szubsztituensek elhelyezkedésére utal a CD gyűrűn, melyről elválasztástechnikai módszerekkel kaphatunk információt.

A ciklodextrinek és származékaik mennyiségi meghatározására eleinte nem elválasztástechnikai módszereket, hanem pl. spektrofotometriát, spektrofluorimetriát használtak. Ezek a módszerek a ciklodextrinek komplexképző képességén alapulnak. Ilyen pl. a fenolftalein vagy a metilnarancs színváltozásának követése,^{1,2} a naftol fluoreszcenciájának erősödése³ a ciklodextrin koncentráció függvényében. Ezekkel a módszerekkel nem kapunk elég ismeretet a véletlenszerűen helyettesített CD-származék komponens-összetételéről.

Az elválasztástechnikai módszerek (HPLC, CE, TLC, GC) viszont használhatók a minta komponens-eloszlásának jellemzésére, továbbá biológiai mintákban és készítményekben mennyiségi meghatározásra is. A vékonyréteg-kromatográfia (TLC) bevált azonosításra (gyors, olcsó egyszerű) és reakciók követésére. Az ionos származékok jellemzésére jól alkalmazható a kapilláris elektroforézis (CE), bár a CD-származékoknak általában nincs UV elnyelése, ezért megfelelő futtató pufferek használata szükséges, melyek segítségével a komplexképzés eredményeként létrejövő UV jel csökkenése mérhető (indirekt detektálás).

HPLC-vel mind az ionos és a nem ionos jellegű CD-származékok is jól vizsgálhatók. Az UV elnyelés hiánya miatt eleinte törésmutató (RI) detektort használtak, amely az alap CD-k esetében ma is megfelelő választás. A véletlenszerűen helyettesített CD-származékok esetében a komponensek tulajdonságai viszont jelentősen eltérnek,

* Tel.: +36-1-347-6074; fax: +36-1-347-6068; e-mail: szeman.j@cyclolab.hu.

a DS változhat, pl. 1–10 között. Könnyen belátható, hogy azonos oldószertartalommal – izokratikusan – ezen vegyületek többsége nem vizsgálható megfelelően, az RI detektor viszont nem használható gradiens elúcióval. A fényszóródásos detektor (Evaporative Light Scattering detector, ELSD) elterjedésével a CD-származékok vizsgálata jelentős fejlődésnek indult, mivel ez a detektor gradiens elúció esetén is alkalmazható. Hátránya, hogy a koncentráció – csúcsterület összefüggés nem lineáris, ezért a mennyiségi kiértékelés nem mindig egyszerű, mindenképpen mennyiségi referencia anyagot igényel. Használható még korona kisüléses (CAD), vezetőképességi, amperometriás és tömegspektrometriás detektor is, utóbbinak a komponensek azonosításánál van nagy jelentősége. Indirekt UV illetve fluorimetriás detektálás is alkalmazható a CE-hez hasonlóan megfelelő segédvegyületek alkalmazásával.^{4,5}

Az állófázis kiválasztásakor mérlegelni kell a vizsgálat célját, vagyis azt, hogy a komponenseloszlás jellemzésére vagy mennyiségi meghatározásra törekszünk-e. A CD-származékok vizsgálatára a szubsztituensek minőségétől és az analízis céljától függően főként fordított fázisú mérőmódszerek használatosak. A fordított fázisú módszerek esetében az apoláris kölcsönhatások mellett általában a zárványkomplex-képzés is jelentős szerepet játszik az elválasztásban.

Számos CD-származék vizsgálatára kielégítő elválasztást adnak a kereskedelmi forgalomban kapható C18, C8 és fenil-csoporttal származékolt oszlopok.^{6,7} A sokkomponensű, véletlenszerűen szubsztituált CD-származékok komponenseloszlását ujjlenyomat kromatogramokkal jellemezzük. Hasonló kromatográfiai módszerek használhatók az egykomponensű származékok esetén is a főkomponens melletti szennyező komponensek meghatározására.

Az alap szilikagélre amino-, diol- vagy más alkalmas csoportot kötve és nagy acetonitril-tartalmú mozgófázist alkalmazva, újabb, más szelektivitású elválasztási módszereket is lehet használni a CD-k kromatográfiai vizsgálatára (HILIC módszer).^{8,9,10}

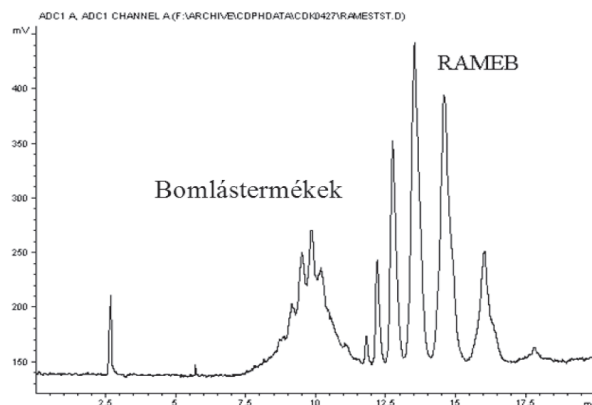
A vizsgálandó minták CD-származék-tartalmát méretkizárásos kromatográfiával határozzuk meg, mivel itt egy alkalmas oszlopon - a célnak megfelelően - a mérendő CD-származék komponensei egyetlen csúcsként jelennek meg, ami lehetővé teszi a mennyiségi értékelést.¹¹

Az ionos CD-származékok elválasztása egy újabb kihívást jelentett az analitikusok számára. A sokkomponensű SBECJ jellemzésére fordított fázisú ion-pár kromatográfiát illetve anioncserés kromatográfiát alkalmaztak sikeresen.^{12,13} A célnak megfelelő HPLC oszlop kiválasztása a kereskedelemben kapható oszlopok nagy választéka miatt azonban nem egyszerű, illetve bizonyos feladatokra nehéz a megfelelő állófázist megtalálni, ezért szükségessé vált különleges állófázisok fejlesztése a ciklodextrinek vizsgálatára. Ez a munka 2004-ben kezdődött meg a CycloLab és a BST/ChiroQuest Kft. szoros együttműködésével.

2. Ciklodextrinre szabott kromatográfiai állófázisok fejlesztése

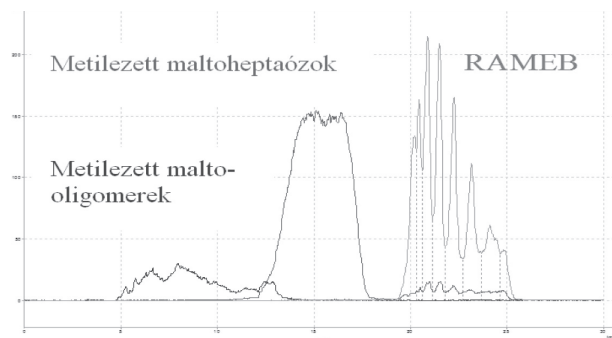
2.1. CD-Screen® kromatográfiai állófázis

Számítógépes modellezést is felhasználva olyan állófázisokat terveztünk, melyeknél a fő kölcsönhatás a szilikagélre felvitt funkció csoport és a CD közötti zárványkomplex-képzés volt. A szelektivitást növelő másodlagos kölcsönhatásokat a funkció csoport szilikagélhez való kötésére használt összekötő csoport biztosította. Számos potenciális jelölt közül a karbamid-csoporton keresztül kötött 4-nitrofenil-csoporttal készült állófázis adta a legjobb eredményeket. A nitro-csoport elektron-szívó hatása miatt erős komplexképzés jött létre, míg a karbamid-csoport hidrogén donor/akceptor funkciója a kapott állófázis szelektivitását növelte.¹⁴ Az így készült oszlopon nem csak a CD származékokról kaptunk jellemző kromatogramokat, hanem a bomlásukkor keletkezett lineáris maltooligomerek csoportja is jól elválasztható volt a főkomponensektől (2. ábra). Tömegspektrometriás detektálással a bomlástermékeket sikerült azonosítani (3. ábra).



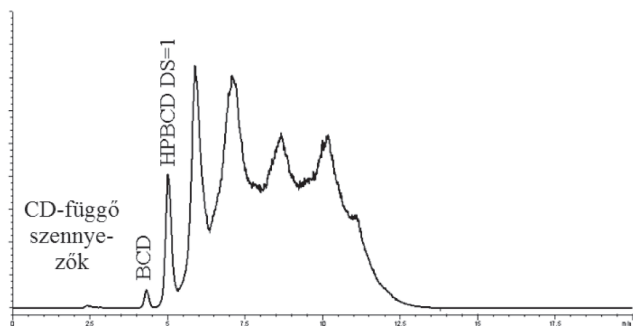
2. Ábra. Véletlenszerűen metilezett β -CD (RAMEB) jellemzése és bomlástermékeinek elválasztása CD-Screen oszlopon (Eluens: víz – acetonitril gradiens elúció, ELS detektálás).

A felhasznált alap szilikagél kiválasztása és az optimális borítottság vizsgálata után ez az állófázis került kereskedelmi forgalomba és kapta a CD-Screen® márkanevet. A CD-Screen® oszlop sikeres terméknek bizonyult, az európai gyógyszerkönyv Hydroxypropylbetadex (HPBCD) monográfiában (száma 1804) 2012-től a CD-Screen oszlop használatán alapuló,



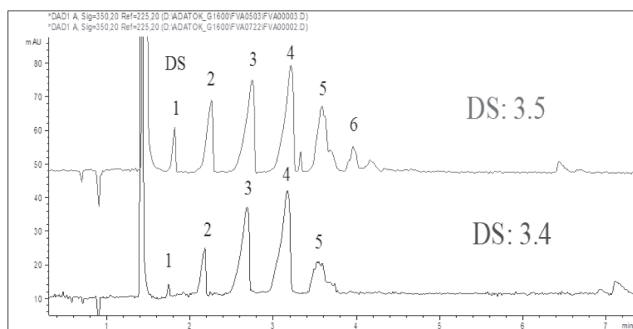
3. Ábra. A RAMEB és bomlástermékeinek azonosítása HPLC-MS mérésel.

a CycloLab-ban kidolgozott módszert írja elő a maradék β -CD és egyéb CD-től függő szennyezések vizsgálatára (4. ábra).¹⁵



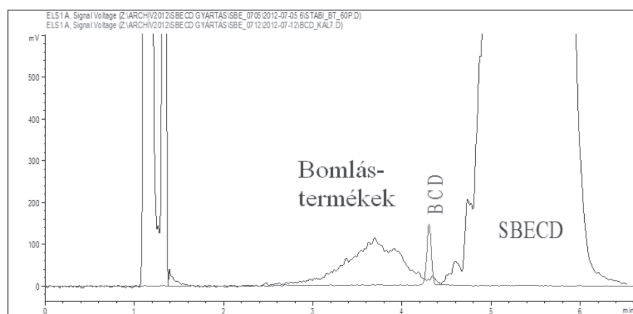
4. Ábra. HPBCD kromatogramja az európai gyógyszer-könyvben leírt módszerrel vizsgálva.

A CD-Screen® oszlopon ionos vegyületeket is sikerrel vizsgáltunk (5. és 6. ábra).

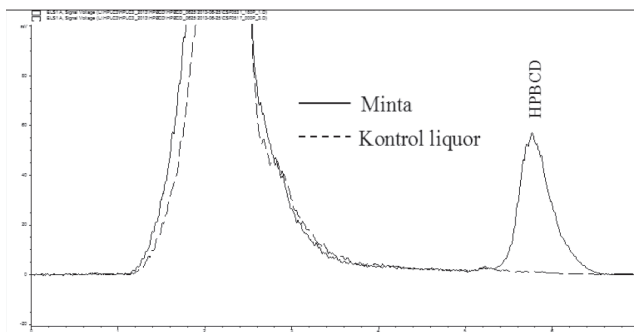


5. Ábra. Karboximetilezett 6-monodeoxi, 6-monoamino- β -CD szarcsok összehasonlító vizsgálata CD-Screen® oszlopon.

A CD-Screen® oszlopon megfelelő oldószer-gradiens programot használva a sokkomponensű CD-származékok mennyiségi meghatározása is megoldható ún. „one-peak” módszerrel. Klinikai vizsgálatok folytak a HPBCD hatásosságának bizonyítására Niemann-Pick betegségben szenvedő gyermekek kezelésében, melynek során szükségessé vált a HPBCD mérése a gerincvelői folyadékban (liquor). Kidolgoztunk egy olyan módszert, amellyel a HPBCD mennyiségét meg tudtuk határozni igen alacsony koncentráció-szinteken ezekben a biológiai mintákban¹⁶ (7. ábra). Az ELS detektor alkalmazása miatt azonban fontos megjegyezni, hogy csak abban az esetben kapunk pontos eredményt, ha a kalibrációhoz ugyanazt a HPBCD-t használjuk, amivel a kezelés történt.

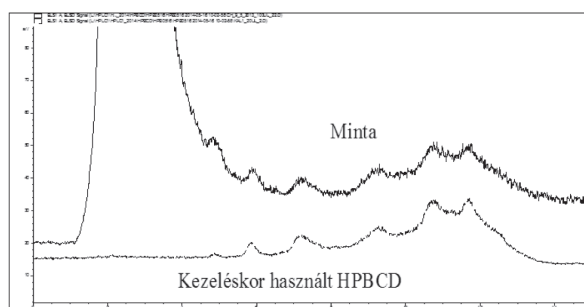


6. Ábra. SBECD lehetséges szennyező komponenseinek vizsgálata CD-Screen® oszlopon.



7. Ábra. HPBCD meghatározása gerincvelői folyadékban „one-peak” módszer használatával.

A gradiens változtatásával bizonyítottuk, hogy a detektált anyag ugyanolyan komponenseloszlású, mint amit a kezeléshez használtak (8. ábra).



8. Ábra. HPBCD komponenseloszlásának összehasonlítása a gerincvelői folyadékban mérve és a kezeléskor használt anyagban.

Az analitikai célra használható 3 és 5 μ m szemcseméretű kromatográfias állófázison kívül preparatív töltetet is előállítottunk, mely alkalmas különböző szubsztitúciós fokú frakciók elválasztására pl. HPBCD-ből vagy RAMEB-ből, illetve izomer/homológ szennyező komponensek elválasztására az egykomponensű CD-származékok esetében.

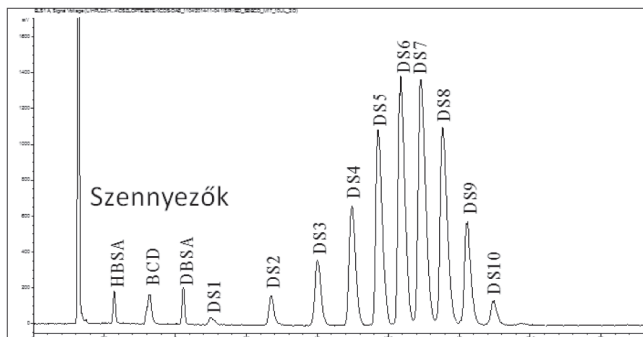
2.2. CD-Screen®-IEC kromatográfias állófázis

Bár a fenti példák mutatják, hogy a CD-Screen® oszloppal bizonyos feladatok megoldhatók, elkezdődött egy újabb állófázis fejlesztése, mely a komplexképző és az ioncserés kölcsönhatást használja az ionos CD-származékok vizsgálatára. Az első ilyen állófázist Varga Gábor† (ChiroQuest Kft) állította elő 2012-ben. A szilikagélre kötött dimetilamino-fenil-csoport (CD-Screen-DAP) lehetővé tette a szulfobutiléter- β -ciklodextrin (SBECD) komponenseinek szubsztitúciós fok szerinti elválasztását. Emellett a maradék β -CD, illetve a szintézis során keletkező szennyezések (hidroxibutánszulfonsav-HBSA és ennek dimerje - DBSA) mennyisége is meghatározható volt. (Az SBECD USP monográfia két különböző módszerrel vizsgálatja ezeket a jellemzőket.) Az állófázis előállításakor használt reagens azonban rendkívül mérgező, ezért kísérletek kezdődtek egyéb reagens alkalmazásával hasonló szelektivitású állófázisok készítésére. Az új funkciós csoportok kiválasztásának szempontjai a következők voltak:

- a funkciós csoport pK értéke;
- aromás gyűrűt tartalmazó funkciós csoport jelenléte a ciklodextrinnel való zárványkomplex-képzéshez;

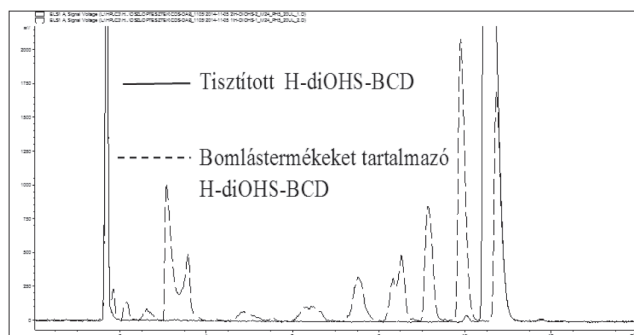
- kevéssé veszélyes, könnyen beszerezhető reagensek használata.

A megvizsgált funkciócsoportok közül a ((4-dimetilamino) aril)alkil-vegyülettel készült oszlopon kaptuk a legjobb elválasztást (CD-Screen®-IEC), sikerült az eredeti, CD-Screen-DAP oszlop szelektivitását elérni¹⁷ (9. ábra).



9. Ábra. SBECD komponenseinek elválasztása DS szerint és a szintézisből eredő szennyezők vizsgálata CD-Screen®-IEC oszlopon.

A kapilláris elektroforézisben királis elválasztásra az ionos - főleg az izomertizta (single isomer) - CD-származékok a leggyakrabban használt adalékanyagok. Ennek megfelelően rendkívül fontos ezek szintézisének követése, a végtérkép tisztaságának meghatározása és stabilitásuk vizsgálata. Vigh Gyula és munkatársai kifejlesztettek egy vegyületesaladot, melynek tagjai a CD gyűrű összes 6-os helyzetű OH-csoportja helyett szulfát-csoportot tartalmaznak.^{18,19,20} A CD-Screen®-IEC oszlop jól alkalmazható ezen vegyületek vizsgálatára is. A 10. ábrán látható, hogy a nem megfelelő körülmények között tárolt heptakis(2,3-dihidroxi-6-szulfát)- β -ciklodextrin (H-diOHS-BCD) bomlástermékei jól elválaszthatók a főkomponenstől.



10. Ábra. Tisztított és bomlástermékeket tartalmazó H-diOHS-BCD minták vizsgálata.

3. Összefoglalás

Nagyfokú változékonyságuknak és szerkezeti sajátágaiknak köszönhetően a ciklodextrinek helyes analitikája még napjainkban is kihívást jelent a szakemberek számára. Származéktól és céltól függően szinte bármely műszeres analitikai technika alkalmas lehet a ciklodextrinek vizsgálatára bizonyos nézőpontból, teljes jellemzésük azonban csak ezek kombinációjával érhető el. A CycloLab és a ChiroQuest Kft. kifejlesztett két folyadék-kromatográfias állófázist a ciklodextrinek elemzésére. A cikkben bemutatott példák bizonyítják a CD-Screen® márkanevű termékek

használhatóságát, amit az is alátámaszt, hogy az európai gyógyszerkönyv 1804-es számú monográfiája a CD-Screen® oszlopot adja meg a HPBCD szennyezőinek vizsgálatára. A CD-Screen® termékeket jelenleg (a feltaláló, Varga Gábor sajnálatosan korai halála miatt) a Bio-Sol-Dex Kft. állítja elő és forgalmazza (www.cd-screen.com).

Hivatkozások

1. Buvári, A.; Barcza L.; Kajtár, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1988**, *9*, 1687.
2. Mohamed, M. H.; Wilson, L. D.; Headley, J. V. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *80*, 186-196.
3. Gage, R.; Venn, R. F.; Bayliss, M. A. J.; Edgington, A. M.; Roffey, S. J.; Sorrell, B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 773-780.
4. Frijlink, H.W.; Visser, J.; Drenth, B.F.H. *J. Chromatogr.* **1987**, *415*, 325-333.
5. Szemán, J.; Gerlóczy, A.; Csabai, K.; Szejtli, J.; Kiss, G.L.; Su, P.; Chau, R.Y.; Jacober, A. *J. Chromatogr. B* **2002**, *774*, 157-164.
6. Caron, I.; Elfakir, C.; Dreux, M. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998**, *21*, 554-560.
7. Caron, I.; Elfakir, C.; Dreux, M. *Chromatographia* **1998**, *47*, 383-390.
8. Liu, G.; Goodall, D.M.; Loran, J.S. *Chirality* **1993**, *5*, 220-223.
9. Jaramillo, M.; Kirschner, D.L.; Dai, Z.; Green, T.K. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1316*, 92-96.
10. Estrada, R.; Vigh, G. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1226*, 24-30.
11. Szathmary, S. Cs. *J. Chromatogr.* **1989**, *487*, 99-105.
12. Grard, S.; Elfakir, C.; Dreux, M. *Chromatographia* **1999**, *50*, 695-700.
13. Grard, S.; Elfakir, C.; Dreux, M. *J. Chromatogr. A* **2000**, *897*, 185-193.
14. Szemán, J.; Csabai, K.; Kékesi, K.; Sente, L.; Varga, G. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1116*, 76-82.
15. PHARMEUROPA 23.4, October **2011**, 667.
16. Szemán, J.; Ludányi, K.; Dalmadi-Kiss, B.; Klebovich, I.; Sente, L. 17th International Cyclodextrin Symposium, Saarbrücken, **2014**, <https://www.researchgate.net/publication/295920205>
17. Szemán, J.; Iványi, R.; Ludányi, K.; Dalmadi-Kiss, B.; Sente, L.; Vigh, Gy.; Varga, G. 26th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Tbilisi, Georgia, **2015**, http://cd-screen.com/wp-content/uploads/2015/07/Szeman_poszter_PBA_A4.pdf
18. Vincent, J. B.; Sokolowski, A. D.; Nguyen, T. V.; Vigh, Gy. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4226.
19. Vincent, J. B.; Kirby, D. M.; Nguyen, T. V.; Vigh, Gy. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4419.
20. Cai, H.; Nguyen, T. V.; Vigh, Gy. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 580-589.

A cikkben szereplő anyagok rövidítései:

CD	Ciklodextrin
BCD	β -ciklodextrin
DIMEB	heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin
DBSA	hidroxibutánszulfonsav dimer
HBSA	hidroxibutánszulfonsav
H-diOHS-BCD	heptakis(2,3-dihidroxi-6-szulfát)- β -ciklodextrin
HPBCD	(2-hidroxiopropil)- β -ciklodextrin
RAMEB	Véletlenszerűen metilzett β -ciklodextrin
SBECD	szulfobutiléter- β -ciklodextrin

State of art analysis of cyclodextrins: development of tailor-made stationary phases specifically designed for cyclodextrin analysis

The analytical investigation of cyclodextrins (CDs) has a long and prosperous history. Several challenges arise during the investigation of this carbohydrate family including the lack of characteristic UV absorbance (in the majority of cases), potential interactions with matrix and background components (eluent, buffers), and interference with analytical reagents and interaction with column surface. Since most of the CD derivatives are not single isomers, but rather statistically substituted substances which consist of large number of isomers/homologues, sophisticated methods are necessary to be developed for the characterization of these multicomponent CD derivatives and for their quantitative determination in biological fluids.

Over the last 50 years, several analytical methods have been developed, each focusing on different aspects of the CD analysis. The traditional analysis of CDs was carried out by iodometry and TLC methods, supported by non-chromatographic methods using the specificity differences in color modification of certain dyes. TLC methods have been applied for identification and purity analysis for several years for both parent and derivatized CDs, and are still considered cost-effective tools to follow reactions. Average degree of substitution (DS) and identification is frequently studied by nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS). Capillary electrophoresis (CE) provides valuable information on the DS and peak distribution pattern of charged CD derivatives.

Considering all options, HPLC is still the most useful tool to characterize CDs. Of course, HPLC methods are evolving as well, and different approaches are suitable for different aspects of the analysis. Refractive index (RI) detectors and common columns (RP18 and RP8, HILIC and phenol and amino bonded phases) are well suited for investigating parent CDs and several other derivatives, while their use is discouraged for the analysis of multicomponent CD mixtures due to the limitation to use isocratic elution. The introduction of evaporative light scattering detector (ELSD), a universal detection system compatible with gradient elution, a new era in the analysis of CD derivatives, resulting in remarkable improvement in the HPLC analysis of CD derivatives. Since the use of gradient elution is necessary for good separation of the components (or component groups) in case of statistically substituted CD derivatives, the routine RI detection could be omitted making ELSD the dominating and highly recommended detection method of CD analysis ever since. The main drawback is that the detection has non-linear characteristics. Besides ELSD, Corona Charged Aerosol detector (CAD) as well as NQAD Aerosol detector (with Water-based Condensation Particle Counter technology) are well suited for HPLC analysis of CDs and CD derivatives.

When selecting the proper stationary phase, the aim of the analysis - characterization of component distribution, quantity of the CD or CD derivative, determination of the impurity profile - should be considered. Mainly reversed phase columns are used, such as C18, C8 or phenyl columns perform well because in addition to the apolar interactions also the inclusion complex formation plays a role in the mechanism of the separation. Further stationary phases obtained by bonding amino-, diol- or other suitable functional groups to the silica were also successfully applied in the chromatographic study of CDs (HILIC method).

The analysis of the ionic CD derivatives is challenging. For the characterization of the multicomponent SBECD reversed phase anion exchange chromatography was used.

The issues and uncertainties with the column selection for the analysis of CD derivatives drew the need for the development of tailor-made, novel stationary phases. Several aromatic groups as potential guests for CDs were covalently bonded on the silica gel matrix and the separation properties of the prepared columns were evaluated with various CDs. Inclusion complex formation between the selector groups of the stationary phase and CDs plays dominant role in the retention mechanism. The N-(4-nitrophenyl)-carbamide bonded silica gel stationary phase (CD-Screen®) was selected as the most effective column for the analysis of CD derivatives resulting in a special selectivity. The usefulness of the new stationary phase was demonstrated via the characterization of various statistically substituted CD derivatives and batch-to-batch analysis (Figures 4, 5, 8). This column is applied in the EP monograph for the analysis of related substances (practically the residual β -CD and any CD related impurity) in (2-hydroxypropyl)- β -CD (Figure 4). Besides enabling characterization of CD derivatives, the most remarkable property of CD-Screen® stationary phases is the suitability to follow the degradation of CDs (Figures 2, 6). The columns are also efficient to develop CD assay methods in biological samples (Figure 7).

Recently, a prototype of a novel CD-Screen® stationary phases, CD-Screen-DAP (dimethylamino phenyl bonded silica) was designed based on the combination of ion-exchange and inclusion phenomenon for the analysis of anionic CD derivatives enabling baseline separation of sulfobutyl ether- β -CD (SBECD) components. After optimizing the column chemistry, the CD-Screen®-IEC column with (4-dimethylamino)aryl)alkyl functions was commercialized. Besides SBECD fractions, the starting material BCD and several by-products of the synthesis (HBSA, DBSA) were separated as well in a single run (Figure 9). The column was also found suitable for the determination of impurity profile of single isomer CD derivatives (Figure 10).

A metabotróp glutaminsav receptor 5 negatív allosztérikus modulátorainak kutatása

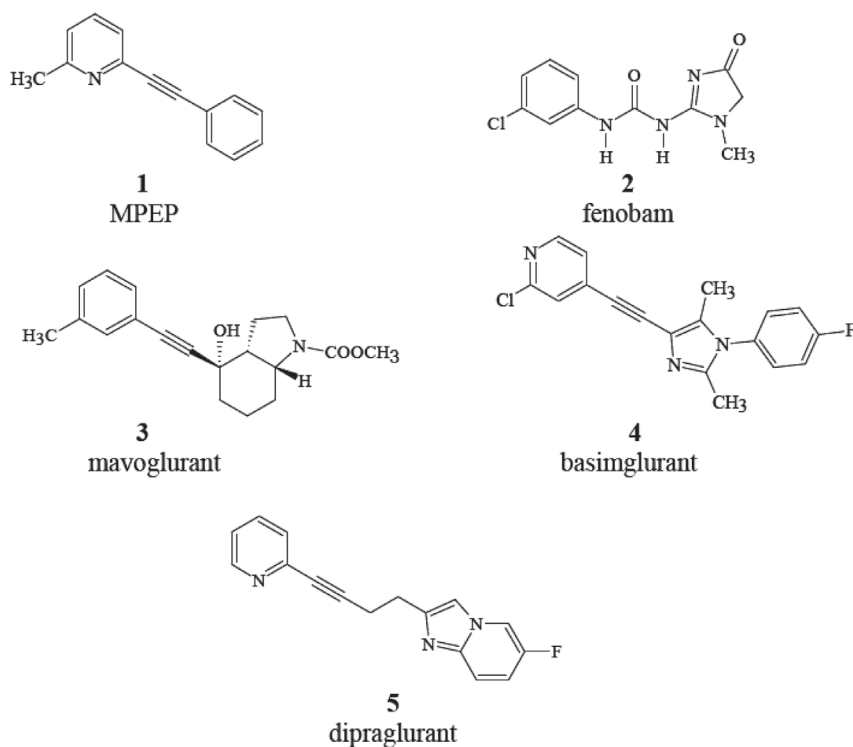
DOMÁNY György,* GALAMBOS János és GÁL Krisztina

Richter Gedeon Nyrt., Kutatási igazgatóság, Gyömrői út 19-21, 1103 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A glutaminsav az emlősök központi idegrendszerében izgató neurotranszmitterként játszik fontos szerepet. Kötődik a neuronokhoz, és bizonyos sejtfelszíni receptorokat aktivál. Ezek a receptorok a receptor-fehérjék szerkezeti jellemzői alapján két nagy csoportba sorolhatók, az ionotróp és a metabotróp glutaminsav receptorok közé. A metabotróp glutaminsav receptorok (mGluR) családja nyolc G-fehérjéhez kötött receptorból áll, amelyek három csoportba sorolhatók aminosav szekvencia homológiájuk, az effektorhoz való kapcsolódásuk és farmakológiájuk alapján. Az első csoportba tartozik a mGluR1 és az mGluR5 receptor, amelyek pozitívan kapcsolnak a foszfolipáz C-hez,

a második csoportot alkotó mGluR2 és mGluR3, illetve a harmadik csoportba sorolható mGluR4, mGluR6, mGluR7 és mGluR8 receptorok negatívan kapcsolnak az adenilát cikláshoz.¹ Nagy mennyiségű preklinikai adatot publikáltak mGluR5 „knock-out” egerekről és mGluR5 antagonisták hatásáról, amelyek arra utalnak, hogy az mGluR5 receptor fontos terápiás célpont lehet számos központi idegrendszeri betegség és tünet esetén, mint például a szorongás,² a fájdalom,³ a depresszió,⁴ az epilepszia,⁵ a neurodegeneráció,⁶ a Parkinson kór⁷ és a kokain függőség.⁸ Jelentős kielégítetlen orvosi igény van új szorongásgátlók iránt, amelyek gyorsan enyhítik a tüneteket, és nincsenek (benzodiazepin-szerű) mellékhatásaik.



1. Ábra. mGluR5 negatív allosztérikus modulátorok.

A közelmúlt felfedezései ugyancsak azt sugallják, hogy a mGluR5 receptorra ható anyagoknak fontos szerepük lehet a szorongás oldásában. Az irodalom szerint az mGluR5 receptor első szelektív negatív allosztérikus modulátorának (NAM), az MPEP jelű anyagnak (1), széles és potens anxiolitikum-szerű hatása van a szorongás rácsáló modelljeiben.⁹ A hatás kialakulása gyors, és szemben a benzodiazepinekkel, nem észlelhető szedáció vagy pszichotomimetikus hatás.¹⁰ Még a metabotróp glutaminsav receptor altípusok klónozására előtt kipróbálták a nem-

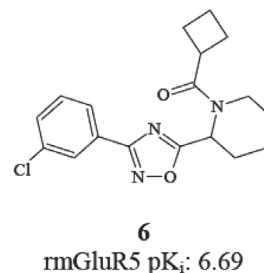
benzodiazepin szerkezetű, szorongásgátló hatású fenobamot (2) kettős vak, placebo kontrollált klinikai vizsgálatban, ahol is a benzodiazepinhez hasonló hatékonyságot mutatott.¹¹ A Roche kutatói pedig 2005-ben kimutatták, hogy a MPEP-hez hasonlóan a fenobam is negatív allosztérikus modulátora az mGluR5-nek,¹² és ezzel klinikai bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a mGluR5 működésének módosításával a szorongás kezelhető. Ezt követően számos gyógyszeripari indított el mGluR5 NAM kutatásokat.¹³ Többek között a mavoglurant (3), a basimglurant (4) és a dipraglurant (5) került kettes vagy hármas fázisú klinikai vizsgálatokra.¹⁴

* e-mail: gy.domany@richter.hu

Amikor elindítottuk saját mGluR5 negatív allosztérikus modulátor programunkat a vállalati molekulatár nagy áteresztőképességű szűrésével (HTS) kerestünk új kémiai kiindulási pontokat (hit). Több ígéretes szerkezet közül négy vegyületsalád – oxadiazolok/tetrazolok, karbamoil-oximok, tienopiridinek és 3-arilszulfonil-kinolinok – alaposabb vizsgálatát határoztuk el. A kémiai kiindulási pontokból vezérmolekulákat (lead) fejlesztettünk ki (hit-to-lead), majd ezeket optimalizáltuk. A 3-arilszulfonilkinolinok esetében a vezérmolekula optimalizálása klinikai kandidatest eredményezett.

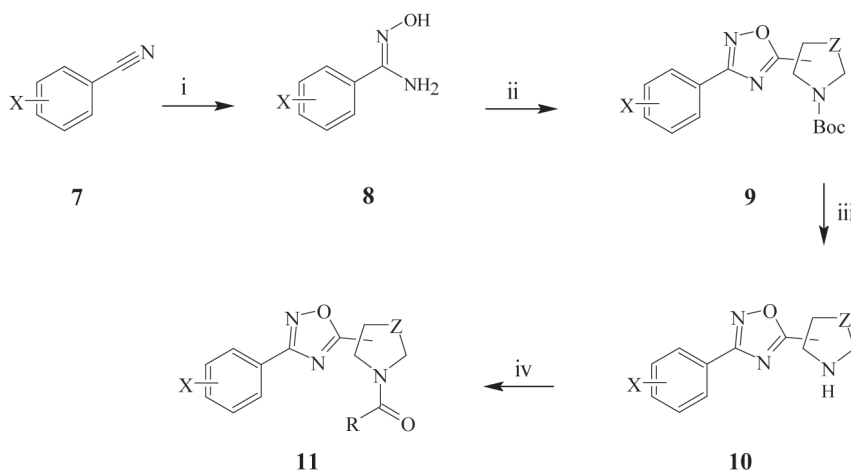
2. Oxadiazolok és tetrazolok¹⁵

A nagy áteresztőképességű szűrés során bukkantunk a **6** jelű vegyületre, melynek kötődése a patkány mGlu5 receptor allosztérikus (MPEP) kötőhelyéhez (K_i)¹⁶ ígéretes volt. Elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk az aromás gyűrű



2. Ábra. Az első HTS találat.

szubsztituens-mintázatának, a központi heterociklusnak, a telített heterociklusnak és a telített heterociklus nitrogénjén levő acil csoportnak a szerepét a hatékonyság változásában. Az 1. Reakciósémán látható módon előállítottunk 656 analógot majd megmértük affinitásukat a mGlu5 receptorhoz. A leghatékonyabb oxadiazolokat az 1. Táblázatban soroltuk fel.



ahol X = 3-Cl, 3-CH₃, 3-CN, 3-CH₃O, 3-CF₃, 3,4-di-CH₃, 3,4-di-CH₃O; Z = -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -S-.

Reagensek és reakciókörülmények: i: hidroxilamin hidroklorid, K₂CO₃, MeOH, szobahőmérséklet, 3 óra, 90%; ii: N-Boc-pipecolinsav, vagy N-Boc-nipecotinsav, vagy N-Boc-prolin, vagy N-Boc-tioprolin, klórhangyasav-izobutil-észter, N-metil-morfolin, DMF, 0 °C, 30 perc, majd tetrabutylammonium-fluorid, 0 °C, 3 óra, 60%; iii: HCl, EtOAc, szobahőfok, 3 óra, 50-70%; iv: RCOOH, EDC, TEA, CH₂Cl₂, szobahőfok, 20 óra, párhuzamos szintézis.

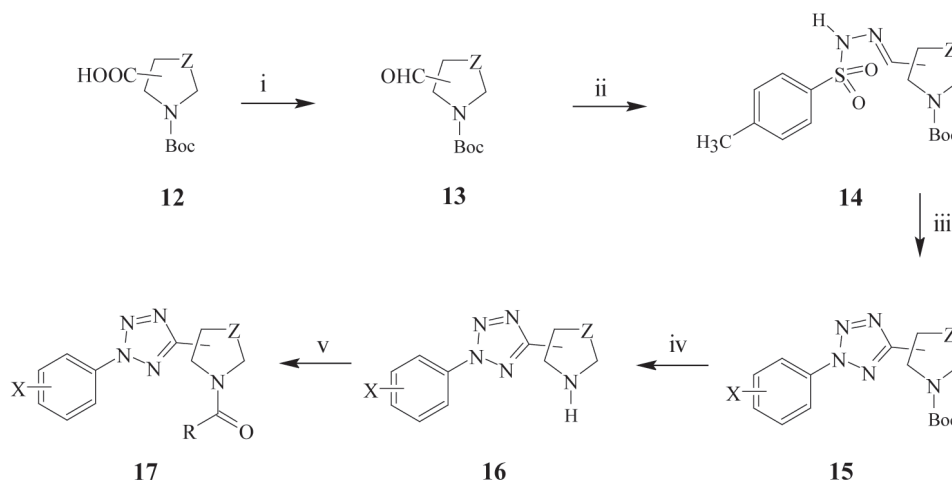
1. Reakcióséma. Az oxadiazol molekulatár előállítása.

1. Táblázat. A leghatékonyabb oxadiazolok

	X		R	pK_i
11a	3-Cl	4-tiazolidinil		7,08
11b	3-Cl	2-pirrolidinil		6,91
11c	3-Me	2-piperidinil		6,90
11d	3-Me	2-pirrolidinil		6,84
11e	3-MeO	2-piperidinil		6,74

Mivel az előzetes vizsgálatok arra utaltak, hogy központi heterociklusként a tetrazol hatékonyabb anyagokat szolgáltat, mint a fentebb tárgyalt oxadiazolok, egy 619 tagú,

központi tetrazolt tartalmazó és megfelelő tisztaságú (>85%) molekula-könyvtárat állítottunk elő a 2. Reakcióséma szerint.



ahol $X = 3\text{-Cl}, 3\text{-CH}_3, 3\text{-CN}, 3\text{-CH}_3\text{O}, 3\text{-CF}_3, 3,4\text{-di-CH}_3, 3,4\text{-di-CH}_3\text{O}$;

$Z = \text{-CH}_2\text{-}, \text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}, \text{-S-}$.

Reagensek és reakciókörülmények: i: a, N,O-dimetilhidroxilamin hidroklorid, DIPEA, DCC, DMAP, 0 °C, 30 perc, majd szobahőmérséklet, 3 óra, 85%; b, LAH, THF, 0 °C, 10 perc, 90%; ii: p-toluolszulfonsavhidrazid, etanol, 25 °C, 30 perc, 90%; iii: külön elkészített arildiazónium-klorid vizes oldata, NaOH, vizes etanol, 0 °C, 30 perc, majd 25 °C, 1 óra, 60%; iv: sósavas etilacetát, szobahőfok, 3 óra, 80-90%; RCOOH, EDC, TEA, CH₂Cl₂, szobahőfok, 20 óra, párhuzamos szintézis.

2. Reakcióséma. A tetrazol molekulatár előállítás.

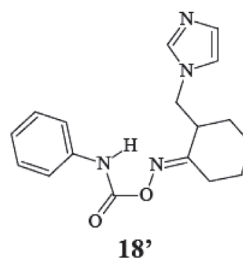
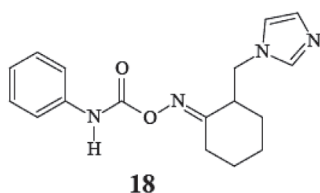
2. Táblázat. A leghatékonyabb tetrazolok

	X		R	pK _i
17a	3-Cl	2-piperidinil		7,31
17b	3-Me	2-piperidinil		7,14
17c	3-Cl	2-piperidinil		7,11
17d	3-Cl	2-piperidinil		7,06
17e	3-Cl	2-pirrolidinil		7,05

A nagyszámú analógot eredményező szintetikus kampány új ismereteket eredményezett a kémiai szerkezet és a biológiai hatás (SAR) összefüggésekről, de nem sikerült sem a vezérmolekulák hatását jelentősen meghaladni, sem az anyagok metabolikus stabilitását elfogadható szintre emelni. Ezért az ebben a körben végzett munkát lezártuk és figyelmünket a második HTS találat, a 18 jelű anyag felé fordítottuk.

3. Karbamoiloximok¹⁷

A HTS kampány során azonosított következő ígéretes anyag a 18 jelű E-karbamoiloxim volt. Egy másik ábrázolásmóddal (18'), melynek létjogosultságát a potenciálisan kialakuló hidrogén híd valószínűsíti, 18 meglepő hasonlóságot mutatott az előzőekben tárgyalt 6-tal, ezért a szerkezet/hatás összefüggések vizsgálata során előnyben részesítettük az oxadiazolok/tetrazolok optimalizálásakor hasznosnak talált helyettesítőket.

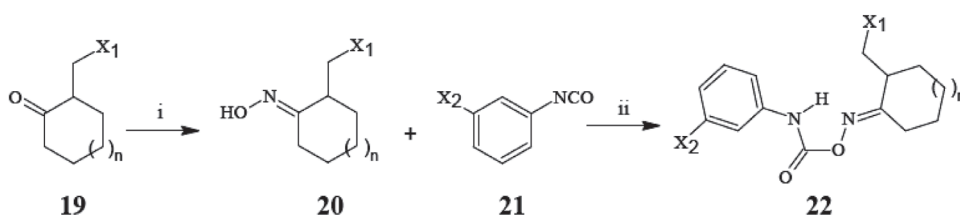


rmGluR5 pK_i: 6,98

3. Ábra. A második HTS találat.

Az új karbamoiloximokat a 3. Ábrán látható reakcióséma szerint szintetizáltuk. A kiindulási ketonokat (**19**) vagy egy aliciklusos keton és egy telített N-heterociklus Mannich

reakciójával, vagy egy aliciklusos keton és egy (hetero) aromás aldehid kondenzációjával, és az azt követő katalitikus redukcióval állítottuk elő.



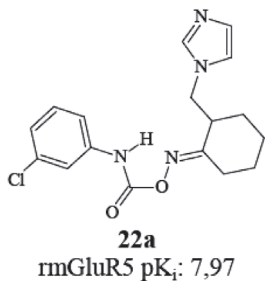
ahol X₁ = aromás karbo- vagy heterociklus;

X₂ = alkil, alkoxi, halogén stb.

n = 0 vagy 1

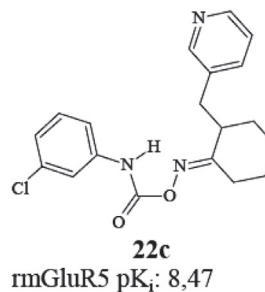
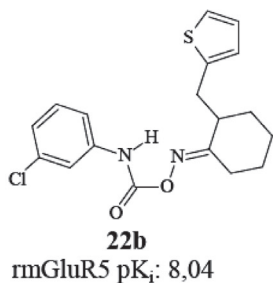
Reagensek és reakciókörülmények: i: hidroxilamin hidroklorid, NaOAc, MeOH, víz, 45 °C, 2-8 óra, majd a Z és E izomerek elválasztása, 50-80%; ii: CH₂Cl₂, szobahőmérséklet, 6-24 óra, 40-70 %.

3. Reakcióséma. Karbamoiloximok előállítása.



A karbamoiloxim rész és a ciklohexán gyűrű módosítása általában kevésbé hatékony anyagokhoz vezetett. Az aromás gyűrű helyettesítése a hármaskörű sorhoz hasonlóan – a oxadiazol/tetrazol sorhoz hasonlóan – javította az affinitást (**22a**). **22a** esetében megvizsgáltuk, hogy melyik enantiomer hordozza a hatást, és azt találtuk, hogy (+)-**22a** a hatás hordozója (rmGluR5 pK_i: 8,05), míg (-)-**22a** gyakorlatilag hatástalan. További hatásjavulást értünk el ha az imidazol gyűrűt más heterociklusokkal helyettesítettük (**22b**, **22c**).

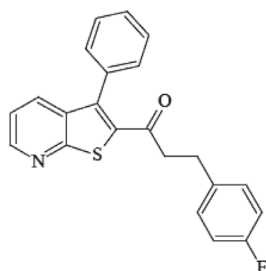
4. Ábra: A 22a képlete.



5. Ábra. A leghatékonyabb karbamoiloximok.

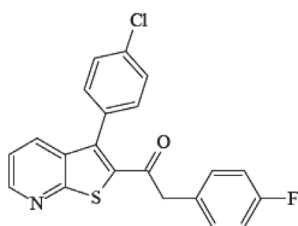
Míg **18** szerkezetének alkalmas változtatásával sikerült az anyagok hatékonyságát jelentősen növelni, metabolikus labilitásukon, és egyes esetekben CYP450 enzim gátló hatásukon nem tudtunk javítani. Így ezt a kemotípust is félretettük, és a következő HTS találat, a **23** jelű tienopiridin szerkezetének szisztematikus módosításába fogtunk.

4. Tieno[2,3-*b*]piridinek^{18,19}

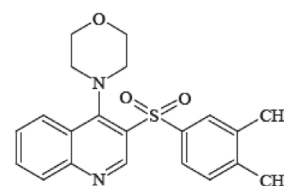


23
rmGluR5 pK_i: 6,46

6. **Ábra.** A harmadik HTS találat.

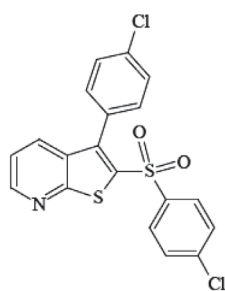


24
rmGluR5 pK_i: 7,08

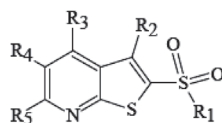


25
rmGluR5 pK_i: 7,17

7. **Ábra.** A -COCH₂- csoport és a -SO₂- csoport bioizosztériája.



26a
rmGluR5 pK_i: 7,91



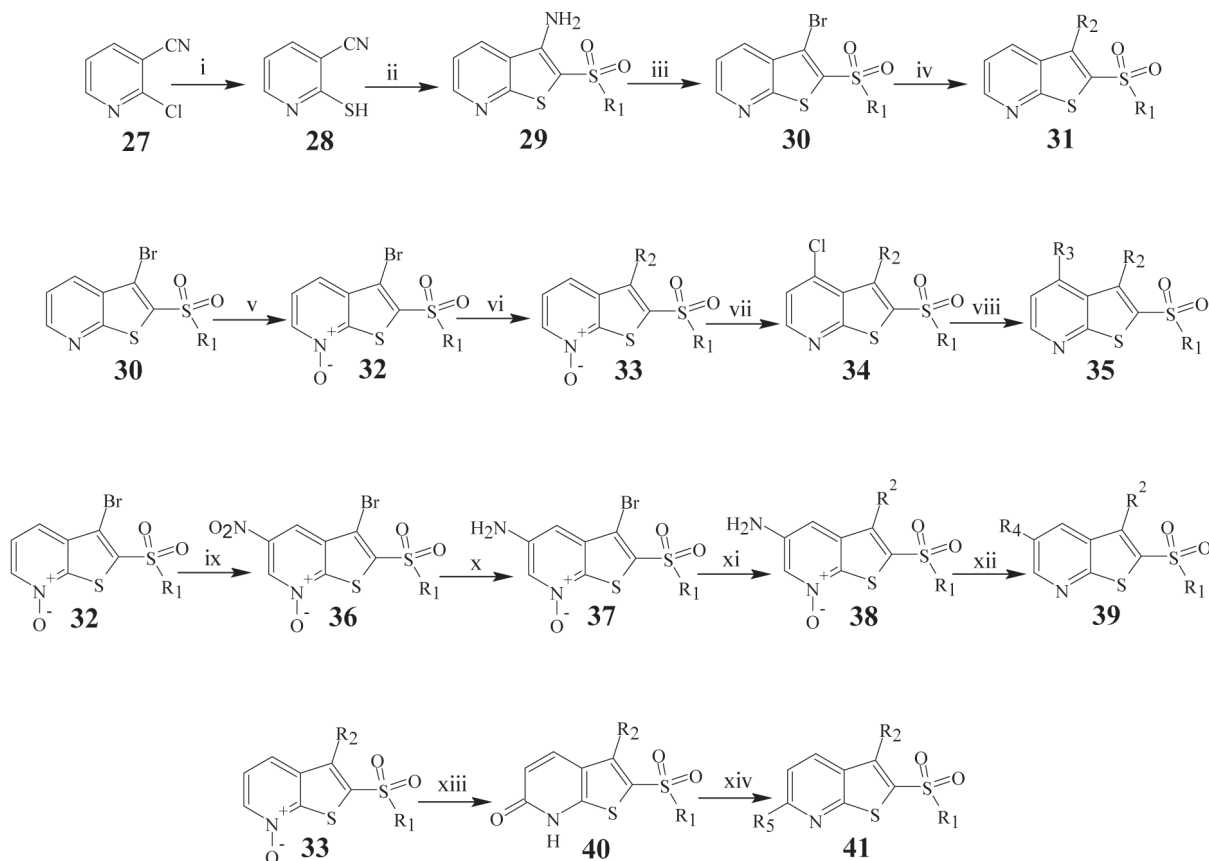
26

8. **Ábra.** Az új vezérmolekula.

A tienopiridinek reprezentatív képviselőjének, **23**-nak azonban a mérsékelt, de biztató hatásadatai mellett több előnytelen tulajdonsága is volt, mint például a magas lipofilitás, a gyenge oldhatóság és a rossz metabolikus stabilitás. Modellvegyületek előállításával és tulajdonságaik mérésével megállapítottuk, hogy a hatáshoz feltétlenül szükség van a tienopiridin piridin gyűrűjére, a tienopiridin 3-as fenil csoportjára, és 2-es szénatomhoz kapcsolódó keto csoportra. **23** alkalmas kémiai módosításai során a hatékonyságot sikerült javítanunk (például **24**), de a metabolikus stabilitás továbbra is elfogadhatatlanul alacsony maradt. A probléma megoldásához az ötletet egy következő HTS találat, a **25** jelű anyag adta.

Feltételeztük, hogy tienopiridin (**24**) és a kinolin (**25**) gyűrűrendszer egymás bioizosztérjei lehetnek, és a **24** jelű anyag kettes pozíciójában levő csoport helyettesíthető a **25** jelű anyag hármasszori pozíciójában levő csoporttal a hatás csökkenése nélkül. Az eredmény a **26a** jelű származék lett.

Ez az anyag volt az addig előállított leghatékonyabb tienopiridin származék, amelynek bár számos hátrányos fizikokémiai tulajdonsága volt, érdemesnek látszott a további optimalizálásra. Mivel a Vogel tesztben – a szorongás egy preklinikai in vivo modeljében²⁰ – 40 mg/kg dózisban szignifikáns hatást mutatott, a továbbiakban ezt tekintettük vezérmolekulánknak, és programot dolgoztunk ki az optimális R₁ – R₅ helyettesítő mintázat azonosítására a **26** általános képlettel jellemezhető vegyületek körében. A 4. Reakciósémán látható négy szintézisút vezetett a **26** általános képletű anyagok különböző képviselőinek megfelelő **31**, **35**, **39** és **41** általános képlettel jellemezhető új tieno[2,3-*b*]piridin származékokhoz.



ahol R₁: alkalmasan helyettesített aril, hetaril, alkil,

R₂: alkalmasan helyettesített aril, hetaril,

R₃: F, OH, OMe, NH₂, NMe₂

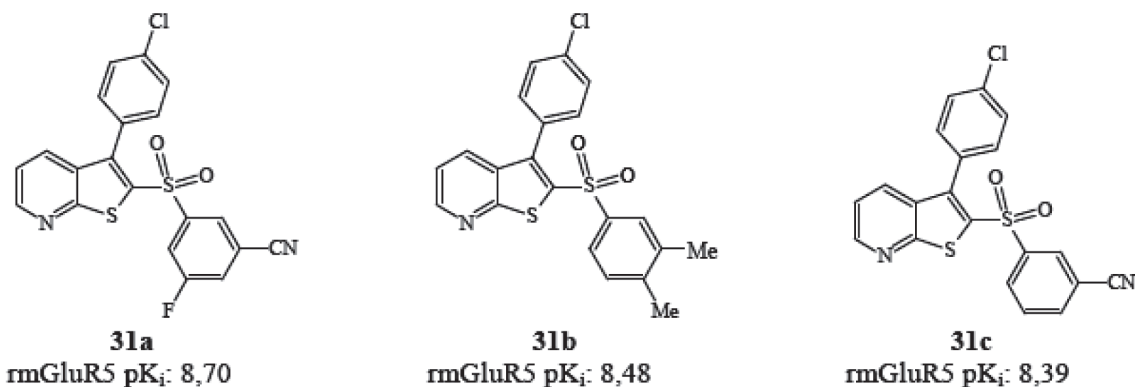
R₄: F, Cl, NH₂, NH-SO₂-Me

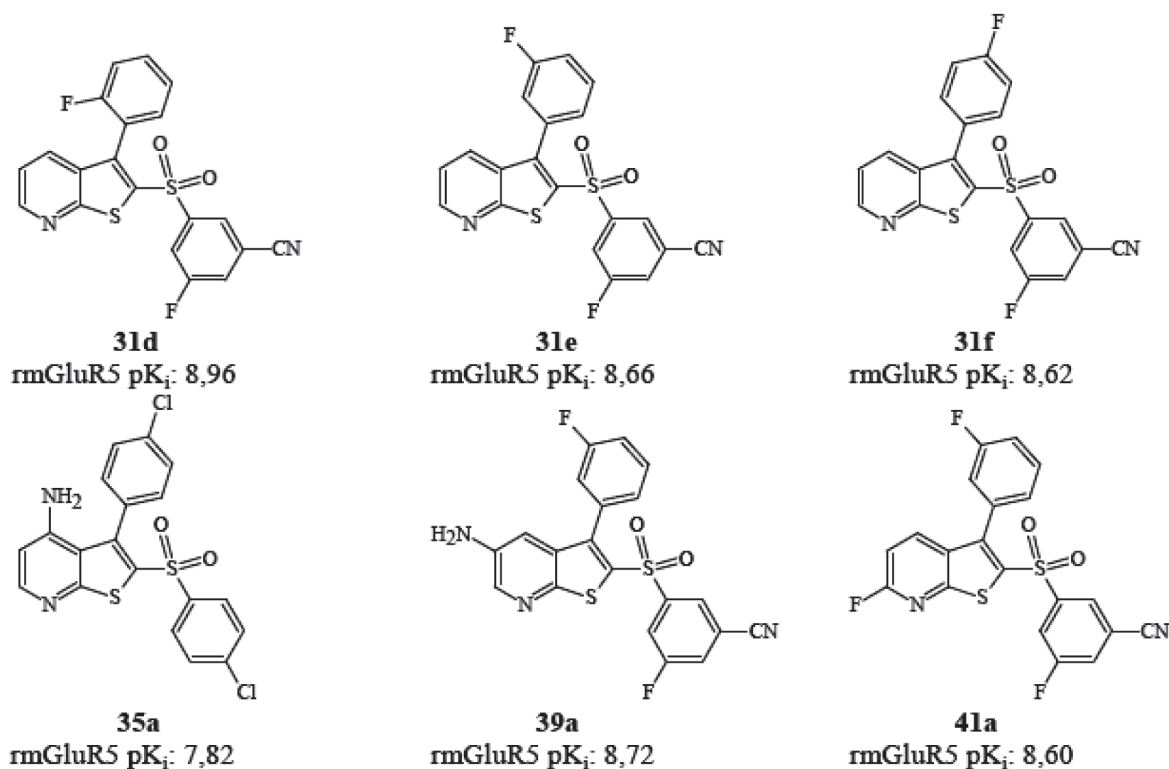
R₅: F, Cl, OH, OMe, NH₂, NMe₂

Reagensok és reakciókörülmények: i: tiokarbamid, 50% víz/50% EtOH, reflux, 4 óra, 90%; ii: Cl-CH₂-SO₂-R₁, NaOMe, DMF, 70-100 °C, 1-2 óra, 60-80%; iii: CuBr₂, t-Bu nitrit, MeCN, 60-80 °C, 1-2 óra, 50-70%; iv: R₂-B(OH)₂, Na₂CO₃, 40-50% toluol/50-60% EtOH, Pd(PPh₃)₄, 70-110 °C, 1-2 óra, 50-70%; v: 3-klór-perbenzoesav, CHCl₃, 0-25 °C, 1-3 nap, 80-90%; vi: POCl₃, DMF, 60 °C, 3 óra, 30-50%; vii: ha R₃ = F: KF, DMF, 140 °C, 2 nap, 20-30%; ha R₃ = OMe: NaOMe, MeOH, reflux, 4 óra, 50-70%; ha R₃ = OH: NaOAc, ecetsav, 100 °C, 2 nap, 30-40%; ha R₃ = NH₂: NaN₃, 105 °C, 5 óra, aztán NaBH₄, MeOH, szobahőfok, 1 nap, 50-60%; ha R₃ = NMe₂: HNMe₂, DMF, 250 °C, mikrohullámú reaktor, 10 perc, 20-30%; viii: vizes HNO₃, ecetsav, 100-130 °C, 2-6 óra, 10-30%; ix: SnCl₂, etilacetát, 70 °C, 2-4 óra, 70-80%; x: ha R₄ = F vagy Cl: NaNO₂, ccHCl, 0-5 °C, 1 óra, majd NaBF₄, 60 °C, 1 óra, vagy Cu(I)Cl, 60 °C, 1 óra, 20-40%; ha R₄ = NH-SO₂-Me: MeSO₂Cl, piridin, reflux, 3 óra, 60-70%; xi: (CF₃CO)₂O, DMF, szobahőmérséklet, 1-2 óra, 60-80%; xii: ha R₅ = Cl: POCl₃, DMF, 90-100 °C, 2-3 óra, 70-80%; ha R₅ = F: POCl₃, DMF, 90-100 °C, 2-3 óra, 70-80%; aztán KF, DMSO, 140 °C, 1-2 óra, 60-80%; ha R₅ = OMe: MeI, Ag₂CO₃, CH₂Cl₂, szobahőmérséklet, 1 nap, 40-60%; ha R₅ = NH₂ vagy NMe₂: (CF₃CO)₂O, piridin, CH₂Cl₂, 0-5 °C, 1 óra, aztán NH₃ vagy HNMe₂, metanol, 0-25 °C, 2 óra, 40-80%.

4. Reakcióséma. A **26** általános képlettel jellemezhető tienopiridinek előállítása.

A különféle helyettesítő mintázatú tienopiridinek közül a leghatékonyabbnak a következők bizonyultak:





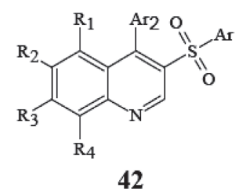
9. Ábra. A leghatékonyabb tienopiridinek.

A **26** általános képletű vegyületcsalád optimalizálásával számos in vitro igen hatékony és elfogadható metabolikus stabilitású anyagot állítottunk elő. Ezek közül például a **39a** már 3 mg/kg dózisban szignifikáns hatást mutatott a Vogel tesztben.

5. 3-Arilszulfonil-kinolinok²¹

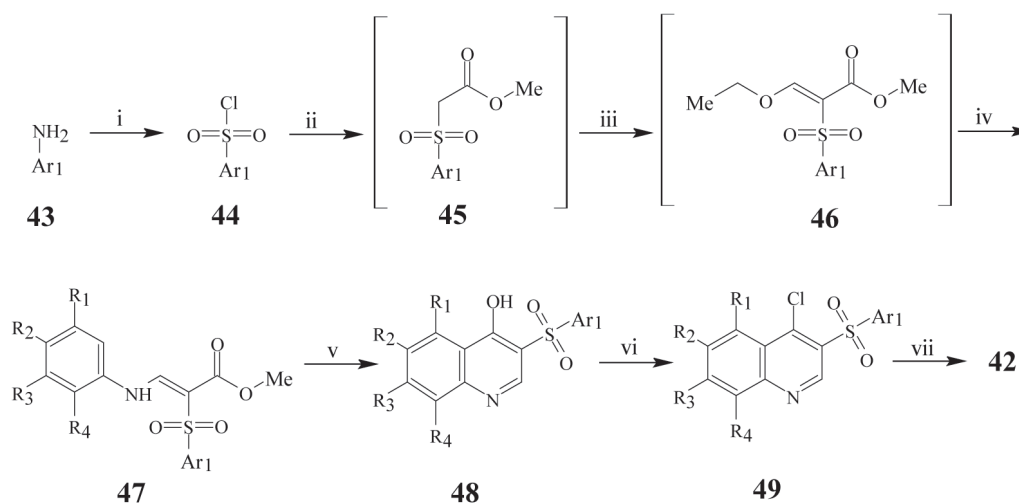
Az előző fejezetben bemutattuk, hogy a **25** jelű anyag arilszulfonil csoportjának beépítése a tienopiridin váz alkalmas szénatomjára egy in vitro és in vivo is hatékony vegyületcsaládhoz nyitotta meg az utat. Ebből a HTS találatból kiindulva azonban egy másik érdekes vegyületcsalád, a 3-arilszulfonil-kinolinok kifejlesztése is lehetővé vált. A tieno[2,3-*b*]piridinek mintájára a 4-es

pozícióban levő morfolint (szubsztituált) fenil csoporttal helyettesítve új, hatékony anyagokat nyertünk, amelyeknek a metabolikus stabilitása is megfelelőnek bizonyult az esetek nagy részében.



10. Ábra. A 3-arilszulfonil-4-aryl-kinolin molekula-könyvtár általános képlete.

Egy 164 tagú molekula-könyvtár készült a **42** általános képlettel jellemezhető 3-arilszulfonil-4-aryl-kinolinokból az 5. Reakcióséma szerint.

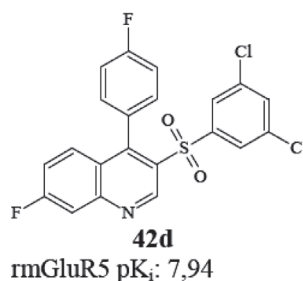
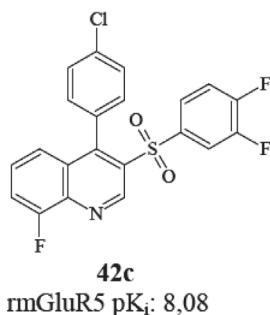
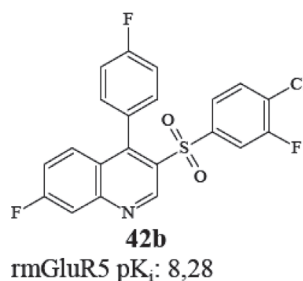
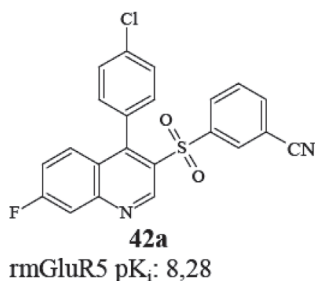


ahol Ar_1 és Ar_2 helyettesített fenil csoport,

R_1, R_2, R_3, R_4 = hidrogén, halogén, alkil, alkoxi, ciano stb.

Reagensok és reakciókörülmények: i: (a) $NaNO_2$, HCl , víz, 0-5 °C, 1 óra, (b) $SOCl_2$, $Cu(I)Cl$, HCl , víz, 0-5 °C, 2 óra, 80% (két lépés); ii: (a) Na_2SO_3 , $NaHCO_3$, víz, 70-72 °C, 1.5 óra, (b) $BrCH_2COOCH_3$, TBAB, víz, 70-72 °C, 1 óra; iii: $(CH_3CO)_2O$, $CH(OC_2H_5)_3$, 124-126 °C, 4.5 óra; iv: helyettesített anilin, TEA, 67-69 °C, 1.5 óra, 30% (négy lépés); v: $(C_6H_5)_2O$, reflux, 2.5 óra, 95%; vi: $POCl_3$, DIPEA, MeCN, 76-78 °C, 5 óra, 85%; $Ar_2B(OH)_2$, $Pd(PPh_3)_4$, Na_2CO_3 , 1,2-dimetoxietán, víz, 68-70, 2-4 óra, 65-90%.

5. Reakcióséma. A **42** általános képlettel jellemezhető 3-ariszulfonil-4-aryl-kinolinok előállítására.



11. Ábra. A leghatékonyabb 3-ariszulfonil-kinolinok.

A **42** általános képlettel jellemezhető vegyülettár négy legígéretesebb képviselője a **42a-42d** jelű származékok voltak. A fenti 3-ariszulfonil-4-aryl-kinolin származékok közül az in vivo leghatékonyabbnak **42a** bizonyult, mely már 1 mg/kg dózisban szignifikáns hatást mutatott a Vogel tesztben.

42a-t RGH-618 néven preklinikai fejlesztésre választottuk ki. Ez az anyag a sikeres preklinikai jellemzés után két fázis I-es dupla vak, randomizált, placebo kontrollált klinikai vizsgálatnak volt tárgya Európában és az Amerikai Egyesült Államokban. Ezek a vizsgálatok meghatározták a maximálisan tolerált dózist, és a farmakokinetikát emberben, valamint bizonyították a szer biztonságosságát, ezáltal megnyitva az utat a fázis kettes humán vizsgálatok felé.

5. Összefoglalás

A vállalati molekulatár nagy áteresztőképességű szűrésével négy anyagot találtunk, amelyek alkalmas kémiai kiindulási pontoknak tűntek új mGluR5 negatív allosztérikus modulátorok kutatásához. Ez a négy anyag szerkezete feltűnően különbözött a versenytársak jellemzően acetilén kötéstartalmazó molekuláitól. A vezérmolekula optimalizálás során az oxazolok/tetrazolok, a karbamoiloximok és a tienopyridinek esetén sikerült a hatékonyságot emelni, de a legjobb anyagok gyógyszeryszerűsége is sok kívánnivalót hagyott maga után. A 3-ariszulfonil-4-arylkinolinok között azonban találtunk hatékony, metabolikusan stabil és jól

felszívódó, in vivo is igen aktív anyagokat. Ezek közül a legalkalmasabbnak a **42a** jelű anyag bizonyult, amely RGH-618 számon preklinikai fejlesztésre került. Ezt követően két fázis I-es humán vizsgálatban sikerült igazolni, hogy az anyag további, immár beteg embereken végzendő fázis II-es vizsgálatokra alkalmas.

Ezt a közleményt a következő munkatársainkkal együtt írt öt idézett cikkünk anyagából állítottuk össze:

Béni Zoltán, Bielik Attila, Bobok Amrita Ágnes, Farkas Sándor, Fónagy Katalin, Greiner István, Gyertyán István, Háda Viktor, Horváth Attila, Keserű György Miklós, Kiss Béla, Kolok Sándor, Kóti János, Kurkó Dalma, Magdó Ildikó, Mikó-Bakk Mónika Laura, Molnár László, Nagy József, Nógrádi Katalin, Nyéki Olga, Sághy Katalin, Szakács Zoltán, Szombathelyi Zsolt, Vastag Mónika, Wágner Gábor, Wéber Csaba

Domány György, Galambos János és Gál Krisztina

Hivatkozások

- (a) Schoepp, D. D.; Conn, P. J. *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, *14*, 13; (b) Schoepp, D. D. *Neurochem. Int.* **1994**, *24*, 439; (c) Pin, J. P.; Duvoisin, R. *Neuropharmacology* **1995**, *34*, 1; (d) Bordi, F.; Ugolini, A. *Prog. Neurobiol.* **1999**, *59*, 55.
- Spooren, W. P.; Vassout, A.; Neijt, H. C.; Kuhn, R.; Gasparini, F.; Roux, S.; Porsolt, R. D.; Gentsch, C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *295*, 1267.

3. Walker, K.; Reeve, A.; Bowes, M.; Winter, J.; Wotherspoon, G.; Davis, A.; Schmid, P.; Gasparini, F.; Kuhn, R.; Urban, L. *Neuropharmacology* **2001**, *40*, 10.
4. Tatarczynska, E.; Klodzin'ska, A.; Chojnacka-Wójcik, E.; Palucha, A.; Gasparini, F.; Kuhn, R.; Pilc, A. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 1423.
5. Chapman, A. G.; Nanan, K.; Williams, M.; Meldrum, B. S. *Neuropharmacology* **2000**, *39*, 1567.
6. (a) Bruno, V.; Ksiazek, I.; Battaglia, G.; Lukic, S.; Leonhardt, T.; Sauer, D.; Gasparini, F.; Kuhn, R.; Nicoletti, F.; Flor, P. J. *Neuropharmacology* **2000**, *39*, 2223; (b) Movsesyan, V. A.; O'Leary, D. M.; Fan, L.; Bao, W.; Mullins, P. G.; Knobloch, S. M.; Faden, A. I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 41.
7. Ossowska, K.; Konieczny, J.; Wolfarth, S.; Wieron'ska, J.; Pilc, A. *Neuropharmacology* **2001**, *41*, 413.
8. Chiamulera, C.; Epping-Jordan, M. P.; Zocchi, A.; Marcon, C.; Cottiny, C.; Tacconi, S.; Corsi, M.; Orzi, F.; Conquet, F. *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 873.
9. Allgeier, H.; Auberson, Y.; Biollaz, M.; Cosford, N. D.; Gasparini, F.; Heckendorn, R.; Johnson, E. C.; Kuhn, R.; Varney, M. A.; Velicelebi, G. *WO 9902497*, **2007**.
10. O'Brien, J. A.; Lemaire, W.; Wittmann, M.; Jacobson, M. A.; Ha, S. N.; Wisnoski, D. D.; Lindsley, C. W.; Schaffhauser, H. J.; Rowe, B.; Sur, C.; Duggan, M. E.; Pettibone, D. J.; Conn, P. J.; Williams, D. L., Jr. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *309*, 568.
11. Pecknold, J. C.; McClure, D. J.; Appeltauer, L.; Wrzesinski, L.; Allan, T. J. *Clin. Psychopharmacol.* **1982**, *2*, 129.
12. Porter, R. H.; Jaeschke, G.; Sporen, W.; Ballard, T. M.; Büttelmann, B.; Kolczewski, S.; Peters, J. U.; Prinssen, E.; Wichmann, J.; Vieira, E.; Mühlemann, A.; Gatti, S.; Mutel, V.; Malherbe, P. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 711.
13. Jaeschke, G.; Wettstein, J. G.; Nordquist, R. E.; Sporen, W. *Expert Opin. Ther. Patents* **2008**, *18*, 123.
14. Thomson Reuters Cortellis™, www.cortellis.com.
15. Wágner, G.; Wéber, Cs.; Nyéki, O.; Nógrádi, K.; Bielik, A.; Molnár, L.; Bobok, A.; Horváth, A.; Kiss, B.; Kolok, S.; Nagy, J.; Kurkó, D.; Gál, K.; Greiner, I.; Szombathelyi, Zs.; Keserü, Gy. M.; Domány, Gy. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2010**, *20*, 3737.
16. Gasparini, F.; Andres, H.; Flor, P. J.; Heinrich, M.; Inderbitzin, W.; Lingenhöhl, K.; Müller, H.; Munk, V. C.; Omilusik, K.; Stierlin, C.; Stoehr, N.; Vranesic, I.; Kuhn, R. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2002**, *12*, 407.
17. Galambos, J.; Wágner, G.; Nógrádi, K.; Bielik, A.; Molnár, L.; Bobok, A.; Horváth, A.; Kiss, B.; Kolok, S.; Nagy, J.; Kurkó, D.; Bakk, M. L.; Vastag, M.; Sághy, K.; Gyertyán, I.; Gál, K.; Greiner, I.; Szombathelyi, Zs.; Keserü, Gy. M.; Domány, Gy. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2010**, *20*, 4371.
18. Nógrádi, K.; Wágner, G.; Domány, Gy.; Bobok, A.; Magdó, I.; Kiss, B.; Kolok, S.; Fónagy, K.; Gyertyán, I.; Háda, V.; Kóti, J.; Gál, K.; Farkas, S.; Keserü, Gy. M.; Greiner, I.; Szombathelyi, Zs. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2014**, *24*, 3845.
19. Nógrádi, K.; Wágner, G.; Domány, Gy.; Bobok, A.; Magdó, I.; Kolok, S.; Mikó-Bakk, M. L.; Vastag, M.; Sághy, K.; Gyertyán, I.; Kóti, J.; Gál, K.; Farkas, S.; Keserü, Gy. M.; Greiner, I.; Szombathelyi, Zs. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2015**, *25*, 1724.
20. Vogel, J. R.; Beer, B.; Clody, D. E. *Psychopharmacology* **1971**, *100*, 138.
21. Galambos, J.; Domány, Gy.; Nógrádi, K.; Wágner, G.; Keserü, Gy. M.; Bobok, A.; Kolok, S.; Mikó-Bakk, M. L.; Vastag, M.; Sághy, K.; Kóti, J.; Szakács, Z.; Béni, Z.; Gál, K.; Szombathelyi, Zs.; Greiner, I. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2016**, *26*, 1249.

Search for negative allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor 5

There is a growing body of evidence that negative allosteric modulators of mGluR5 may be important tools in the therapy of several disorders of the central nervous system, like anxiety, pain, depression, epilepsy, neurodegeneration, Parkinson's disease or cocaine abuse. In the past years several compounds (the „glurants”) discovered in different pharmaceutical research units reached high levels of the drug development.

The search for NAMs of mGluR5 in Richter started with a high throughput screening of the corporate compound library that resulted in promising hits in the oxadiazole/tetrazole, carbamoyloxime, thieno[2,3-b]pyridine, and 3-arylsulfonyl quinoline compound families.

After having identified compound **6**, an oxadiazole hit, a 656 membered oxadiazole compound library was designed, prepared and tested. The most potent representatives of this series showed moderate affinity (K_i about 100 nanomolar) towards allosteric binding site of the mGluR5 receptor. The replacement of the oxadiazole core by tetrazole resulted in more potent compounds, so another compound library with 619 tetrazole derivatives was prepared and tested. Several representatives of this series (e.g. **17a-17e**) had lower than 100 nanomolar K_i . Because of the suboptimal metabolic stability of the above compounds the further development have been terminated.

Then our attention turned to the next HTS hit, the carbamoyloxime **18**. Suitable substitution on the aromatic and the saturated carbocyclic rings lead to really potent compounds with nanomolar K_i , although the metabolic instability still remained a serious problem.

Continuing the exploration of the potential of the next HTS hit, compound **23** with thieno[2,3-b]pyridine ring system, we hoped, that the metabolic instability problem could be solved while retaining the activity of the compounds. The breakthrough happened when the side chain of **23** was substituted with an arylsulfonyl moiety. The resulting **26a** showed activity in a preclinical in vivo model of anxiety, in the Vogel test, at 40 mg/kg oral dose. Systematic optimisation of this structure resulted in several potent analogues (e.g. **31a-31f**, **35a**, **39a** and **41a**) with nanomolar affinity. Some of these thienopyridine derivatives showed significant activity in the Vogel test at 3 mg/kg oral dose. The most interesting compounds, however, were identified in the 3-arylsulfonyl compound family.

The substitution of the morpholine ring for substituted aryl groups in another HTS hit, compound **25**, resulted in a series of potent derivatives with acceptable metabolic stability like compound **42a-42d**, what is more, **42a** showed significant in vivo activity at already 1 mg/kg dose in the Vogel test. The results of a diverse set of pharmacological, pharmacokinetic and toxicological studies suggested that the best compound of this series (**42a**) has the potential to fulfil a therapeutic need in the treatment of anxiety and potentially other CNS disorders with a satisfactory safety profile. It was selected for preclinical and later clinical development with the name of RGH-618.

Safety, tolerability and pharmacokinetics of RGH-618 was investigated after single and multiple doses in healthy subjects in two double blind, randomized, placebo controlled Phase I trials in EU and US. These Phase I studies established the maximum tolerated dose and safety and pharmacokinetics of RGH-618 enabling continuation of the development into Phase II human proof-of-concept studies.

Szteroidkémiai kutatás-fejlesztés a Richter Gedeon Nyrt.-ben

MAHÓ Sándor,* GREINER István, CSÖRGEI János, SÁNTA Csaba, SÖRÖS Béla
és LEDNECZKI István

Richter Gedeon Nyrt., Gyömrői út 19-21., 1103 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A Richter Gedeon Nyrt. Magyarország egyetlen olyan gyógyszervállalata, ahol magas színvonalú K+F tevékenység zajlik a szteroidok területén. Társaságunk a megalapítása óta állít elő szteroid hatóanyag tartalmú termékeket, kezdetben organoterápiás készítményeket, melyek állati vagy növényi eredetű természetes szteroid hatóanyagokat tartalmaztak. Később természetes szteroid hatóanyagok félszintetikus gyártása is megindult, majd a II. világháború után, az 1950-es években indult el újra a szteroidok szintézise.¹ A Társaságnál kifejlesztett originális gyógyszerek hatóanyagainak (Depersolon® (hatóanyag: mazipredon-hidroklorid),^{2,3} Arduan® (USA: Arpilon®) (hatóanyag: pipekurónium-bromid)^{4,5}) szintézise mellett, a reprogenerikus időszakban több, már ismert hatóanyag szintézise is megvalósult. A 60-as években alapozódott meg a Társaság nőgyógyászati termékportfóliója, amelynek jelentős mérföldköve lett a Kelet-Európában elsőként törzskönyvezett fogamzásgátló készítmény, az Infecundin (1966, hatóanyagai: noretinodrel és mesztranol⁶). A készítmény neve utalt Ludwig Haberlandt harmincas években végzett antifertilitás kutatásaira, melynek során, az együttműködésük eredményeként Richter Gedeon innovatív gyártóként tervezett készítményt gyártani „Infecundin” néven.^{7,8} A nőgyógyászatban alkalmazott készítmények mellett, a Társaság stratégiájához illeszkedően, más terápiás területeken használt szteroid hatóanyagú termékek gyártása és kutatás-fejlesztése is folyik a Richter Gedeon Nyrt.-ben.

2. Szteroidkémiai kutatás-fejlesztési tevékenységek

A szteroid innováció egyik helyszíne a szteroidkémiai kutatásra dedikált Szteroid Szintetikus Laboratórium, melynek tevékenységét példákön keresztül mutatjuk be. Korábban, az 1990-es és a 2000-es évek elején is születtek hasonló témájú publikációk, melyekben bemutattuk fontosabb eredményeinket.⁹⁻¹¹ Az azóta eltelt egy-két évtized során született innovatív eredményeink szabadalmakon és publikációkon keresztül újfent gazdagították az alkalmazott szerves kémia tudományát. Az alábbiakban a teljesség igénye nélkül soroljuk fel laboratóriumunk főbb tevékenységi területeit.

2.1. Originális kutatás és ehhez kapcsolódó hatóanyag fejlesztés

Társaságunk több mint 110 éves története alatt mindig elkötelezett volt az innováció irányába. Ennek ma egyik stratégiai fontosságú eleme a központi idegrendszeri terápiás területre koncentráltó kismolekulás eredeti kutatás, amely az ötlettől a törzskönyvezésig tartó teljes folyamatot lefedi. Eredeti kutatásunk ugyanakkor egy másik stratégiai

területre, a nőgyógyászati kutatásokra is kiterjed, és a klinikai kutatások mellett a hatóanyag kémiai fejlesztését és a készítményfejlesztést fedi le.^{12,13}

2.2. Generikus hatóanyag fejlesztés

Társaságunk magas színvonalú szteroid hatóanyag és készítménygyártó üzemekkel rendelkezik, melyekben innovatív technológiákat is alkalmazunk, így azok lehetővé teszik bármilyen szteroid termék előállítását. A hagyományoknak és a stratégiánknak megfelelően generikus szteroid termékek fejlesztése is folyik Társaságunknál, melyeket természetesen saját hatóanyag forrásra alapozva végzünk.

2.3. Hatóanyag kémiai fejlesztés stratégiai együttműködésben, a partner cégek részére

Társaságunk világszerte ismert szteroid hatóanyag- és készítménygyártó-forgalmazó cég. Több gyógyszeripari vállalattal alakítottunk ki stratégiai partneri viszonyt, együttműködéseink döntő hányada innovatív termékek létrehozására irányul. Ennek egyik elemeként szteroid K+F és gyártói tudásunk és kapacitásunk felhasználásával a partner originális termékéhez hatóanyag kémiai fejlesztést és gyártást is végzünk.

2.4. Termékgondozás

A szteroid hatóanyagot tartalmazó gyógyszerekre jellemző a hosszú életgörbe. Társaságunknál például van olyan szteroid termék is, melyet már 45 éve folyamatosan gyártunk. A környezetvédelmi, biztonságtechnikai, gyógyszerbiztonsági, minőségi és gazdaságossági követelmények változása miatt azonban rendszeres időközönként szükséges a technológiai folyamat és az analitikai módszerek felülvizsgálata, változtatása.

2.5. Szennyezők és bomlástermékek szintézise

Mind a hatóanyagok, mind a készítmények esetén elengedhetetlenül szükséges és fontos, hogy a termékre jellemző szennyezőket és bomlástermékeket felderítsük, előállításukra módszert dolgozzunk ki és laboratóriumi méretben legyártssuk. Intermediereknél is fel kell deríteni a melléktermékeket és vizsgálni azok átalakulását és megjelenését a következő intermedier vagy hatóanyag szennyezőjeként. Sok szennyező és bomlástermék standardja a finomvegyeszer katalógusokból beszerezhető, de még több ilyen speciális vegyületet csak saját laboratóriumi előállításunkon keresztül tudunk biztosítani. Intermedier szennyezők esetén a beszerezhetőséget illetően még nehezebb a helyzet. Ezen vegyületek előállítása a legtöbb

* Tel.: 36-1-4315332; fax: 36-1-4315978; e-mail: s.maho@richter.hu

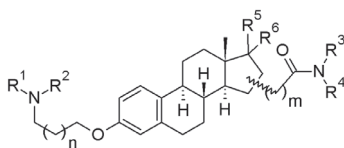
esetben bonyolultabb, mint a hatóanyag szintézise és igazi kémiai kihívás.

3. A szteroidkémiai kutatás-fejlesztési tevékenységek bemutatása sikeres K+F projekteken keresztül

A 2.1-2.5 pontokban felsorolt kutatás-fejlesztési tevékenységekre példákat hozunk néhány K+F projekt bemutatásával. A projektek többsége nem csak egy fentebb leírt tevékenységet ölel fel.

3.1. Hisztamin H₃ antagonisták kutatása

Az originális kutatás terén elért eredményeink egyik szép példája a Társaságunknál folyó központi idegrendszeri kutatáshoz kapcsolódik. Hisztamin H₃ receptor antagonisták/inverz agonisták kutatása során elvégeztük a Társaság vegyülettárának (amely számos diverz, szteroidvázás anyagot is tartalmaz) nagy áteresztőképességű tesztelését (HTS-t). Ennek eredményeként nitrogéntartalmú szteránvázás „hit” molekulákat azonosítottunk, melyek szerkezetéből és in vitro biológiai tulajdonságaiból kiindulva a modern, hatásmechanizmus alapú gyógyszerkémiai kutatás mentén sikerült olyan vegyületcsaládot (1. ábra) felfedeznünk, melynek egyik képviselőjét kiválasztottuk preklinikai fejlesztésre.¹⁴



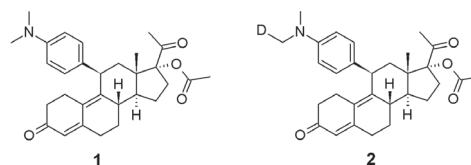
1. Ábra. Hisztamin H₃ receptor antagonistá ösztratrién-karboxamidok általános képlete.

R¹, R² és R³, R⁴ alkilsoportok
R⁵, R⁶=H, alkoxi, OH, oxocsoport
n=0-2, m=0-1

3.2. Uliprisztál-acetát

2012. február 27-én a Richter Gedeon Nyrt. bejelentette, hogy az Európai Gyógyszerügyi Hatóság megadta az 5 mg-os ESMYA® tabletta forgalomba hozatali engedélyét méhmióma enyhe és súlyos tüneteinek pre-operatív kezelésére.¹⁵ További sikeres klinikai vizsgálatok alapján az Európai Bizottság engedélyezte az 5 mg-os Esmya® tablettát méhmiómák szakaszos, hosszú távú kezelésére, melyet Társaságunk 2015. május 28-án jelentett be.¹⁶ Az ESMYA® (hatóanyaga: uliprisztál-acetát, **1**) first-in-class gyógyszer, orális aktív szelektív progeszteron receptor modulátor, amely reverzibilisen blokkolja a progeszteron receptorokat a célszövetben.¹⁷ Az uliprisztál-acetát hatóanyag szintézisére több szintézisutat dolgoztunk ki, melyek egyike egy másik progeszteron receptor modulátor, a telapriszton-acetát szintézisével részben közös volt¹⁹ (a szintézist ld. a **3.6.** pontnál.). A kémiai fejlesztés során mind a hatóanyag, mind az olyan intermedierek esetében, amelyek tartalmazták a 11-es helyzetben a 4-dimetilaminofenil csoportot, egy különös analitikai problémával szembesültünk: egy közel 0,1%-os „szennyezőt” detektáltunk a HPLC vizsgálatok során, amely a vizsgált molekula nitrogénhez kapcsolódó metilcsoportban

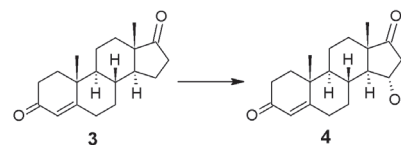
deutériumot tartalmazó izotopológjának (**2**) bizonyult.^{20,21} Ilyen nagy molekulák esetén korábban még nem figyeltek meg rutin HPLC vizsgálatok során ilyen jelenséget. A jelenség valószínű oka a pKa érték megváltozása az N-metil pozícióban történt hidrogén-deutérium csere következtében, ez már oly mértékű változás, amely a modern héjszerkezetű HPLC töltetek jobb felbontóképessége miatt elválasztást eredményez. A továbbiakban nem kell szennyezésként számolni a **2** elválasztott izotopológgal.



2. Ábra. Uliprisztál-acetát (**1**) és „szennyezésként” szeparált deutérium izotopológia (**2**).

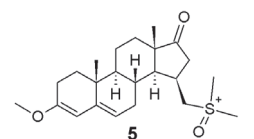
3.3. Drospirenon

Az egyik legsikeresebb generikus hatóanyag fejlesztésünk a drospirenon (**14**) progesztogén hatóanyag előállításához kapcsolódik. Míg az originátor dehidroepiandrosteronból kiindulva állítja elő a hatóanyagot, mi androsztendion (**3**) fermentációs hidroxilálásával jutunk egy olyan intermedierhez, a 15 α -hidroxi-androsztendionhoz (**4**), amely megfelelő kiindulási anyag a szintézishez²² (2. ábra).

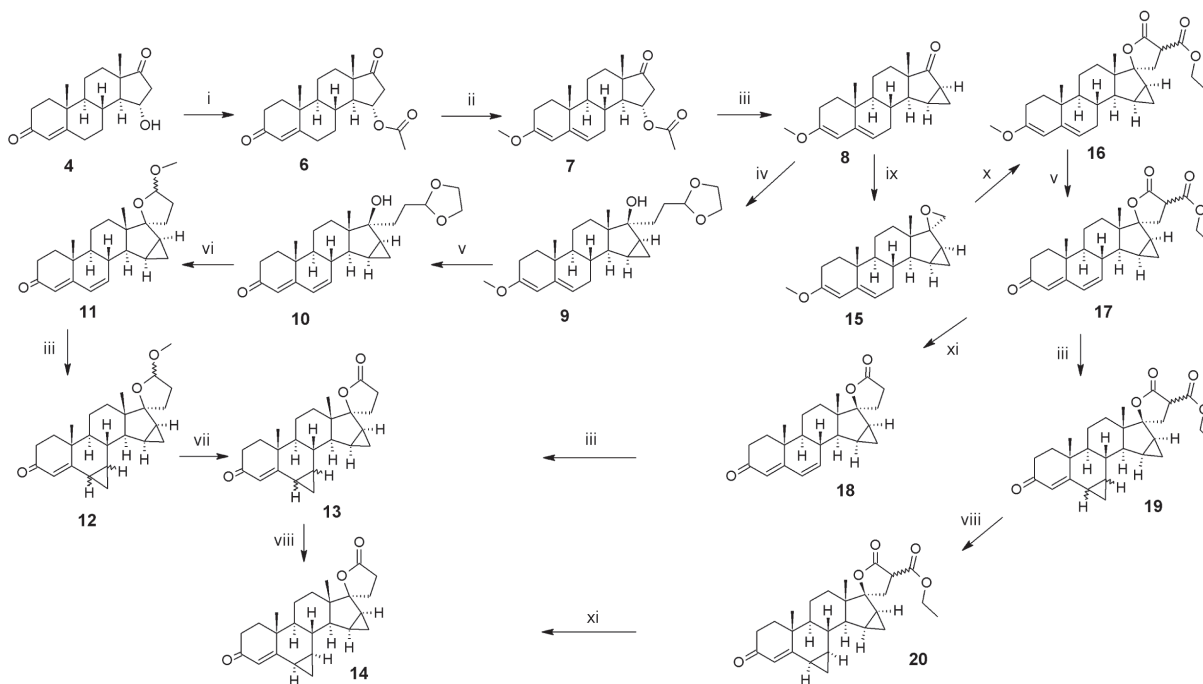


3. Ábra. 15 α -Hidroxi-androsztén-dion (**4**) előállítása fermentációval.

A hidroxilcsoport acetilezését követően a 3-oxo-4-en-6-one molekularészt enoléterként védjük, ez a védelem később alkalmas lesz a 6-os helyzetű kettőskötés kialakításához. A Corey-reakció kidolgozásánál izoláltunk egy, az irodalomban korábban le nem írt átmeneti terméket (**5**), melynek szerkezete alátámasztja a reakció mechanizmusát (4. ábra). A spirolakton gyűrű kialakítása alkil-lítiummal történő reakcióval, vagy spiroepoxid malonészterrel történő reakciójával történhet. A két megoldás hasonló intermedierjeinek (**9**, **16**) oxidációs reakciójával kapott 3-oxo-4,6-dién vegyületek (**11**, **17**, **19**) Corey-reakciójával egy izomer keverékhez jutunk, melynek preparatív HPLC módszerrel történő tisztításával jutunk a hatóanyaghoz (**14**) (5. ábra). Az itt vázolt szintézis az originátor eljárásait követően a drospirenon hatóanyag első független, szabadalmaztatott ipari szintézise.^{23,24} A hatóanyag sikeres szintéziséén túl a készítményfejlesztés is sikeres innováció volt.²⁵



4. Ábra. A Corey-reakció során izolált, reakció-mechanizmust bizonyító átmeneti termék.

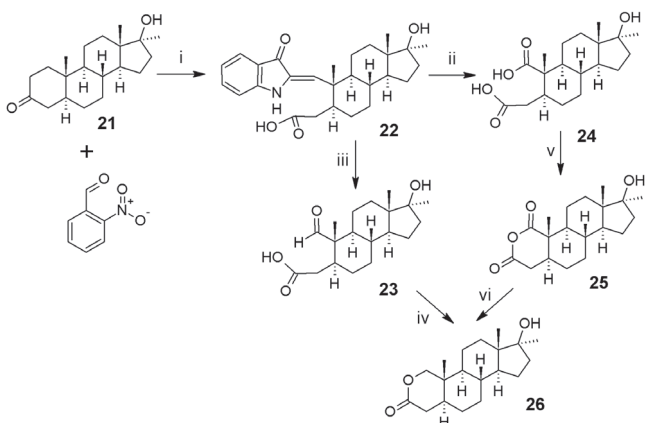


5. Ábra. A drospirenon (14) előállítása.

i: Ac_2O , ii: $\text{HC}(\text{OMe})_3$, H^+ , iii: $\text{Me}_3\text{OS}^+\text{T}^-$, KOH , iv: 2-(2-brómetil)-1,3-dioxolán, Li , v: 2,3,5,6-tetraklór-1,4-benzokinon, vi: MeOH , HCl , vii: Jones-oxidáció, viii: prep. HPLC, ix: $\text{Me}_3\text{S}^+\text{T}^-$, KOH , x: dietil-malonát, NaOMe , xi: NaCl , H_2O , DMF , 130°C .

3.4. Oxandrolon

Az oxandrolon egy anabolikus szteroid, amely a többi anabolikumtól eltérő módon metabolizálódik.²⁶ Az Oxandrin® (Savient Pharmaceuticals) hatóanyaga. Az oxandrolon hatóanyag molekulájában (26) az A-gyűrű 2-es pozíciójában egy oxigénatom van lakton szerkezet részeként. A szakirodalomból ismert eljárásokban mesztanolon (21) nevű szteroidvegyületből kiinduló szintézis során 1-es helyzetű kettőskötést építenek ki, majd ozmium-tetroxid és ólom-teraacetát alkalmazásával, vagy ozonolízissel egy aldehyd-karbonsav vegyületen keresztül állítják elő



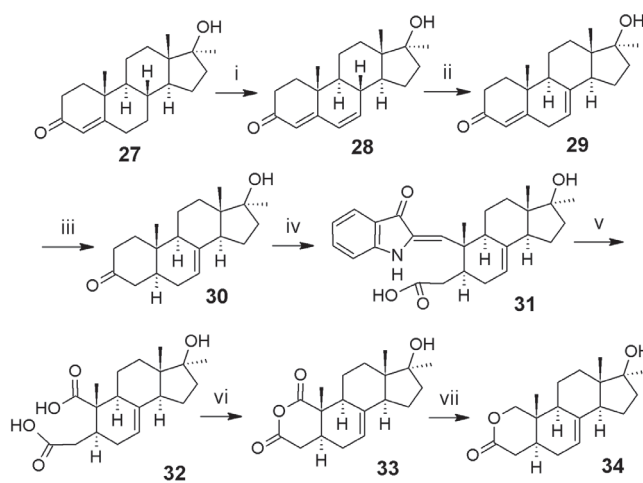
6. Ábra. Oxandrolon (26) előállítása.

i: KOH , ii: 1,5 mólekv. KMnO_4 , NaOH , iii: 3 mólekv. KMnO_4 , NaOH , iv: 1: NaBH_4 , 2: H_2SO_4 , v: Ac_2O , THF , iv: 1: NaBH_4 , DMF , 2: H_2SO_4

a hatóanyagot. Az ismert szintézisek reprodukcióját követően úgy döntöttünk, hogy alapvetően új szintézissel próbálkozunk. A kiindulási mesztanolont (21) alkálikus közegben 2-nitro-benzaldehiddel reagáltattuk, az aldol-kondenzációt követően többlépéses intramolekuláris redoxi

reakció eredményeként felhasadt a szteránváz 2,3 szén-szén kötése és egy olyan karbonsavhoz (22) jutottunk, amely egy hasítható kettőskötést tartalmazott. A kettőskötés hasítását kálium-permanganáttal különböző körülmények között végezve vagy az ismert aldehyd-karbonsavhoz (23), vagy egy új dikarbonsav származékhoz (24) jutottunk.²⁷ A dikarbonsav 22 anhidriddé alakítva, majd redukálva regiospecifikus reakcióban oxandrolonná (26) alakul.²⁸

A hatóanyagra vonatkozóan az amerikai gyógyszerkönyvi monográfiában lévő kevésbé pontos vékonyréteg-kromatográfiás tisztaság vizsgálati módszer²⁹ felváltására a Társaságunknál kifejlesztett HPLC módszert javasoltuk.³⁰



7. Ábra. Δ^7 -oxandrolon (34) előállítása.

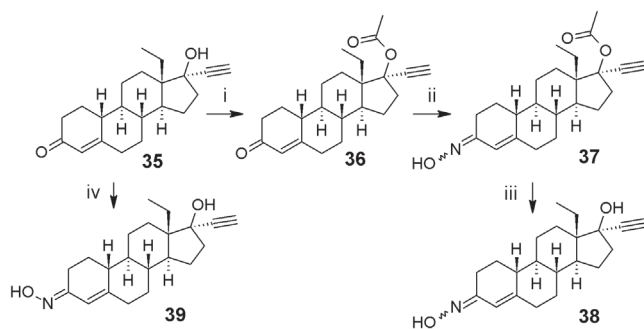
i: DDQ , ii: 1: KO^tBu , 2: H^+ , iii: Li , NH_3 , -33°C , iv: 2-nitro-benzaldehid, KOH , v: KMnO_4 , NaOH , vi: Ac_2O , THF , iv: 1: NaBH_4 , DMF , 2: H_2SO_4

A fejlesztés során komoly problémát okozott számunkra egy oxidációs melléreakció során képződő szennyező,

melyet izolálni nem sikerült, de kristályosítás dúsítással tömegarányát 0,4% mértékűre sikerült emelni (HPLC módszerrel történő mérés UV detektálást alkalmazva 210 nm hullámhosszon értékelve analitikai túlértékelttségét később hatvanszorosra mértük a hatóanyagra nézve), majd NMR módszerrel valószínűsítettük szerkezetét. A szennyezőt szintézise (7. ábra) után tudtuk egyértelműen beazonosítani.

3.5. Norgesztimét, Norelgesztromin

A norgesztimét (norgestimate, **37**) az Ortho-cyclen®, Ortho Tri-cyclen® (Ortho Pharmaceutical, Johnson and Johnson) tabletták hatóanyaga, a norelgesztromin (norelgestromin, **38**) pedig az Ortho Evra® (Ortho Pharmaceutical, Johnson and Johnson) nevű fogamzásgátló tapasz hatóanyaga. Mindkét vegyület "prodrug", oximizomerek amorf keveréke, a levonorgesztrel, mint aktív hatóanyag, metabolizmus útján szabadul fel. Mindkét hatóanyag esetében az originátorral egyeztetve végeztük a hatóanyagok kémiai fejlesztését, majd gyártását. A hatóanyagok kiindulási anyaga a Társaságunknál totálszintézissel gyártott levonorgesztrel (8. ábra). A hatóanyagokra és a norelgesztromin eltérő felszívódású oximizomerjeinek nagy tisztaságban történő előállítására innovatív eljárásokat dolgoztunk ki.^{31,32} A norelgesztromin E-izomerje (**39**) levonorgesztrelből direkt úton is előállítható nagy tisztaságban.

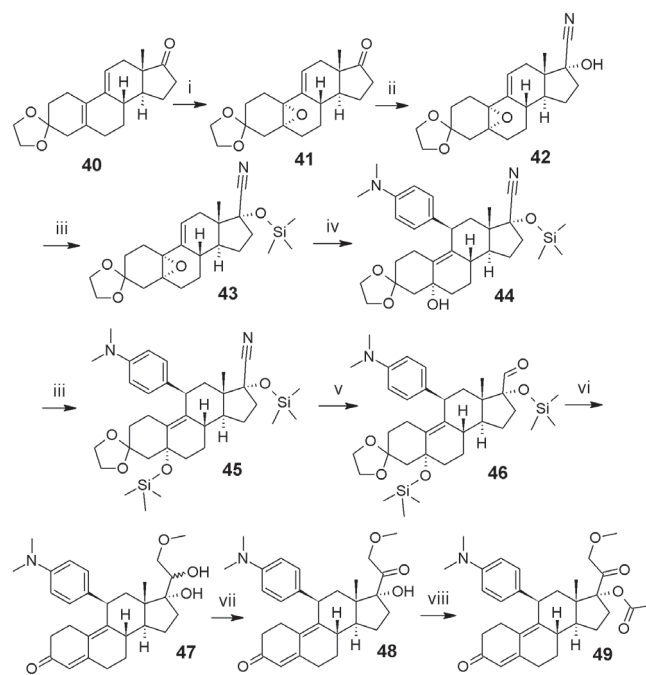


8. Ábra. Norgesztimét (**37**) és norelgesztromin (**38**) előállítása.
i: Ac_2O , HClO_4 ; ii: H_2NOH , iii: LiOH , iv: H_2NOH , HOAc

3.6. Telapriszton-acetát

A telapriszton-acetát (CDB-4124) egy új, fejlesztés alatt álló progeszteron receptor modulátor, melynek endometriózis és méhfibrózis indikációkban folynak klinikai vizsgálatai. A hatóanyag előállítására ipari eljárást (9. ábra) dolgoztunk ki a Repros Therapeutics-szal együttműködve.³³ A totálszintézissel előállított intermedierből (**40**) kiinduló eljárás kritikus lépése a metoximetil-csoport beépítése metoximetil-magnézium-kloriddal, amely nagyon hőérzékeny, ezért a klasszikus Grignard-reakcióval nem állítható elő. A sikeres kivitelezéshez katalitikus mennyiségű higanysóval kell a magnézium felületét amalgámolni és így sikerült a terméket alacsony hőmérsékleten előállítanunk.

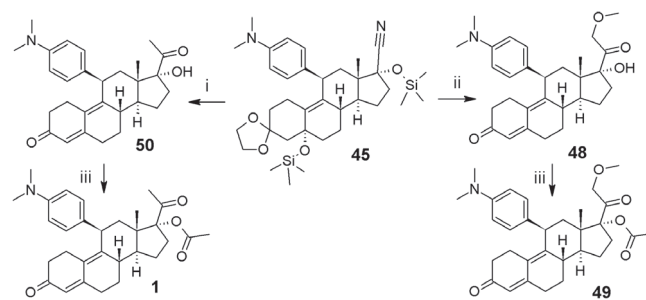
A fentebb ismertetett eljárás nagy hátránya a higanyó használata. Mivel a minőségügyi és környezetvédelmi elvárásokat csak rendkívüli nehézségekkel sikerült teljesíteni, az eljárás további fejlesztésre szorult. A megoldást a metoximetil-lítium reagens előállítása és alkalmazása jelentette. Ez a reagens olyan reakcióképes, hogy már a nitrilcsoporttal is reagál, így lényegesen lerövidült a szintézis.³⁴ A megváltozott szennyezésprofil és a tisztaság



9. Ábra. Telapriszton-acetát (**49**) előállítása.

i: H_2O_2 , $\text{Cl}_3\text{CCOCCl}_3$, ii: HCN , iii: TMSCl , imidazol, iv: 4-dimetilaminofenil-magnézium-bromid, CuCl , v: DIBAH , vi: 1: $\text{MeOCH}_2\text{MgCl}$, 2: KHSO_4 , vii: DMSO , DCC , TFA , Py , viii: Ac_2O , HClO_4

javulása morfológiai területen is hozott eredményeket, ugyanis két kristály-módosulatot is sikerült előállítanunk.^{35,36} A nitril-csoport metil-lítiummal is reagáltatható különleges körülmények között, így hatóanyag gyártástechnológiai okok nem akadályozzák az uliprisztál-acetát³⁷ és telapriszton-acetát³⁴ eljárás összevonását (10. ábra).



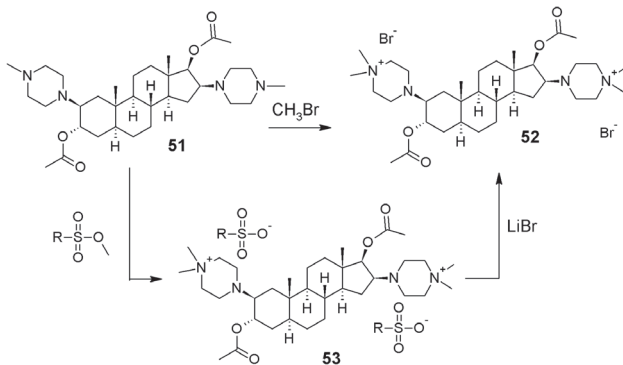
10. Ábra. Uliprisztál-acetát (**1**) és telapriszton-acetát (**49**) előállítása közös intermedierből.

i: MeLi , $\text{Me}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2$, ii: MeOCH_2Li , iii: Ac_2O , HClO_4

3.7. Pipekurónium-bromid

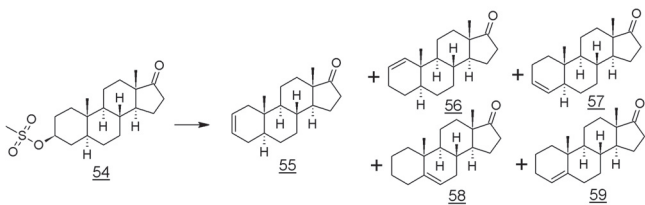
A pipekurónium-bromid hatóanyagot tartalmazó ARDUAN® Társaságunk eredeti terméke.^{4,5} A hatóanyag szintézis utolsó lépésében metil-bromidot alkalmazunk, amely teljesen beépül a molekulába. Azonban a 94/2003 (2003.07.02.) Kormányrendelet az ózonreagáló károsító gázok ipari felhasználásáról megnehezíti a pipekurónium-bromid hatóanyag gyártás során felhasznált metil-bromid beszerzését és felhasználását. Laboratóriumunk olyan megoldást talált, amely kiküszöböli a fenti reagenst. Az eljárás lényege az, hogy a kvaternizációs lépést alkil-, vagy arilszulfonsav-metilészterrel végezzük, majd lítium-bromiddal hajtjuk végre az anion cseréjét bromidionra.³⁸

Az eljárás a vekurónium-bromid hatóanyag előállítására is alkalmas. A két reakciót „egy edényben” is végre lehet hajtani (11. ábra).



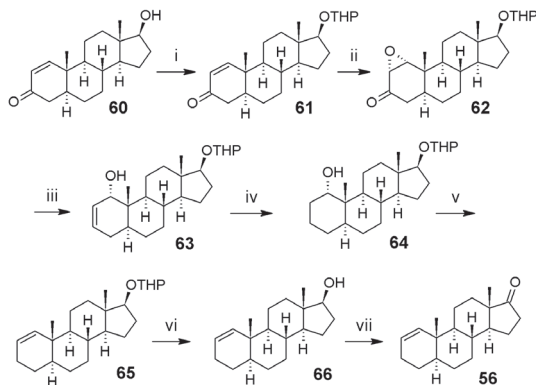
11. Ábra. A pipekurónium-bromid (52) szintézis zárólépése.

Környezetvédelmi és biztonságtechnikai szempontból a pipekurónium-bromid gyártás egyik intermedierjénél is szükség volt a technológia „gondozására”. Az eliminációs lépés ideális oldószere a benzol volt, melyet néhány apróbb változtatással toluolra cseréltünk. A megváltozott körülmények között nem csak a fő melléktermék (57), hanem az eliminációs melléktermékek aránya is megnövekedett³⁹ (12. ábra). A tisztítási lépés és a következő reakciólépéseknél alkalmazott tisztítási eljárások során tudtuk teljes mértékben ezeket a melléktermékeket és a belőlük keletkező szennyezőket („carry-over impurity”) az intermedierek mellől eltávolítani.



12. Ábra. A pipekurónium-bromid szintézis eliminációs lépésének főterméke (55) és melléktermékei.

A fenti melléktermékeket ugyan sikerült tisztán előállítanunk, de jelentős kihívást jelentett a Δ^1 -izomer (56) szintézise. A 60 vegyületből kiindulva nem a bizonytalan kimenetelű



13. Ábra. Az 56 eliminációs melléktermék szintézise.

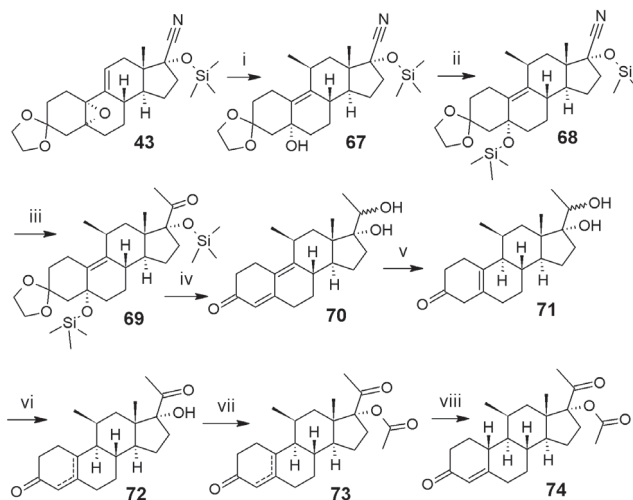
i: 3,4-dihidro-2H-pirán, H^+ ; ii: H_2O_2 , OH^- ; iii: H_2N_2 , Δ ; iv: $H_2/Pd-C$; v: $POCl_3$, Py ; vi: H^+ ; vii: Jones-ox.

deoxigénezési reakcióutakat^{40,41} követtük, hanem epoxidálással, majd a 62 vegyület Wharton-reakciójával egy olyan hidroxilcsoportot építettünk ki, amely szelektíven eliminálható volt (13. ábra).

3.8. Norgesztomet

A norgesztomet (74) ismert progesztin hatóanyag, melyet az állatgyógyászatban önmagában, vagy ösztradiol-monobenzoáttal kombinálva ciklusszabályozásra alkalmaznak. Az első, a szabadalomban leírt szintézis a szteroidkémia hőskorából származik, és a kapcsolódó szabadalmi eljárásokkal együtt a 11-keto-tigogenin-acetáttól indulva 26 lépést tartalmaz, mely teljesen alkalmatlan az ipari megvalósításra.⁴²⁻⁴⁵

Üzleti megfontolásoktól vezetve új, innovatív eljárást dolgoztunk ki ennek az viszonylag egyszerű vegyületnek a nagy kihívást jelentő szintézisére.⁴⁶ Kiindulási anyagként a progeszteron receptor modulátorok szintézisének is alkalmazott 43 epoxid-származékot választottuk. A 11 β helyzetű metilcsoport beépítését konjugált Grignard-reakcióval végeztük, majd a kialakuló hidroxilcsoport további védelmét követően metileztük a nitrilcsoportot és a 69 intermedierhez jutottunk. A 20-as oxocsoport redukciója, majd a védőcsoportok eltávolítása után a 9-es szénatom redukcióját fém lítiummal folyékony ammóniában hajtottuk végre. A 71 vegyület Swern-oxidációját és a 17-es hidroxilcsoport acetilézését követően sósavas kezeléssel tettük teljessé az 5(10) kettőskötés konjugációját (14. ábra).



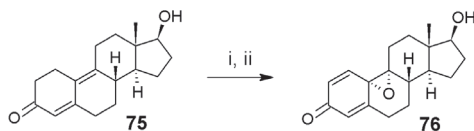
14. Ábra. A norgesztomet (74) szintézise.

i: $MeMgCl$, $CuCl$; ii: $TMSCl$, imidazol; iii: $MeLi$; iv: 1: $NaBH_4$, 2: $KHSO_4$; v: Li , NH_3 , $-40^\circ C$; vi: $DMSO$, $PySO_3$; vii: Ac_2O , $HClO_4$; viii: HCl

3.9. Ösztradiol

Mind a hatóanyagok, mind a készítmények esetében vizsgálni kell a bomlástermékek keletkezését, mennyiségüket. A kockázatkezelés és a pontos mennyiségi-minőségi meghatározás is igényli a bomlástermékek standardként történő előállítását. Az ösztradiol hatóanyagban és az ösztradiol tartalmú készítményekben oxidatív bomlások következnek be állás során. A vizsgálatok során egy az irodalomban eddig le nem írt bomlásterméket is azonosítottunk, majd előállításának (15. ábra) kidolgozása

során sikerült a bomlási folyamatot megértenünk, felderítenünk⁴⁷.



15. **Ábra.** Ösztadiol bomlástermék (76) előállítása.

i: metilénkék, tetrafenil-porfirin, hv, ii: prep. HPLC

Köszönetnyilvánítás

A hivatkozásokban felsorolt publikációk és szabadalmak Richterhez kötődő szerzői és feltalálói mellett az alábbi kollégáknak fejezzük ki köszönetünket: Dr. Gazdag Mária, Kováts Sándor†, Kovácsné Dr. Kozsda Éva, Mezei Istvánné, Costin Camarasu.

Hivatkozások

1. Dr. Csontos Jolán, Dr. Fekete György, Kováts Tibor, Dr. Lőw Miklós, Pillich Lajos, Dr. Takács István, *A Richter Gedeon Rt. 100 éves története*, Medicina Könyvkiadó: Budapest, **2001**.
2. Tuba Z., Szporny L., Tóth J. (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.), Eljárás 21-es szénatomon piperazin-származékokkal helyettesített kortikoszteroidok előállítására, HU150,350 sz. magyar szabadalom, 1961, Patent US 3,123,598; 1964; *Chem. Abstr.* **1964**,60, 17120.
3. Tóth, J., Tuba, Z., Szporny, L. *Nature*, **1961**, 191, 607.
4. Tuba Z., Bor D.-né Szabó M., Szeberényi Sz., Kárpáti E., Szporny L., Szepesi G. (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.), Eljárás új bisz-piperazino-androsztán származékok előállítására, HU165,600 sz. magyar szabadalom, 1972., Patent, GB1,398,050, 1973; *Chem. Abstr.* **1974**, 80, 121210.
5. Tuba, Z., Synthesis of 2b,16b-bis-(4'-dimethyl-1'-piperazino)-3a,17b-diacetoxy-5a-androstane dibromide and related compounds, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1980**, 30(2A), 342-346.
6. Tóth E., Kovatsits M., Görög S. (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.): Eljárás szteroidok etinil-származékainak előállítására, HU154,610 sz. magyar szabadalom, 1966, Patent DE1,668,615, 1967, *Chem. Abstr.* **1973**, 79, 79059.
7. Haberlandt, E.: Ludwig Haberlandt – A pioneer in hormonal contraception, *Wiener Klinische Wochenschrift*, **2009**, 121, 746-749.
8. Marks, L.V., *Sexual Chemistry*, Yale University Press, New Haven & London, **2001**.
9. Tuba Z., Mahó S., Horváth J., Gálik Gy., Széles J., Molnár Cs., Csörgői J., Tóth J., Szteránvázas vegyületek kutatása és fejlesztése a Richter Gedeon Rt.-ben, *Magy. Kem. Lapja.*, **1994**, 49(10-11), 418-436.
10. Tuba Z., Mahó S., Gálik Gy., Horváth J., Széles J., Tóth J., Szteránvázas vegyületek kutatása és fejlesztése a Richter Gedeon Rt.-ben I., *Magy. Kem. Lapja.*, **2001**, 56(12), 452-458.
11. Tuba Z., Mahó S., Gálik Gy., Horváth J., Széles J., Tóth J., Szteránvázas vegyületek kutatása és fejlesztése a Richter Gedeon Rt.-ben II., *Magy. Kem. Lapja.*, **2002**, 57(3), 82-85.
12. Éves jelentés / Richter Gedeon 2014
13. <http://www.richter.hu/hu-HU/rolunk/Pages/Stratégiánk.aspx>, 2016.08.22.
14. Mahó S.; Ledneczki I.; Gábor E.; Tapolcsányi P.; Kiss B.; Balázs O.; Schmidt É., (Richter Gedeon NyRt.) H3 antagonisták szteránvázas karboxamidok, P1100453 sz. magyar szabadalmi bejelentés, 2011.; PCT: WO2013027073, 2012, *Chem. Abstr.* **2013**, 159, 134053.
15. <http://www.richter.hu/hu-HU/Befektetok/kozlemenyek/Pages/kozlemenyek/rendkiv120227.aspx>, 2012.02.27.
16. <https://www.richter.hu/hu-HU/Befektetok/kozlemenyek/Pages/rendkiv150528.aspx>, 2015.05.28.
17. Donnez, J., Donnez, O., Matule, D., Ahrendt, H.-J., Hudecek, R., Zatik, J., Kasilovskiene, Z., Dumitrascu, M.C., Hervé Fernandez, Barlow, D.H., Bouchard, P., Fauser, B.C.J.M., Bestel, E., Loumaye, E., Long-term medical management of uterine fibroids with ulipristal acetate, *Fertility and Sterility*, **2016**, 105(1), 165-173e4.
18. Dancsi L.-né; Visky Gy.; Tuba Z.; Csörgői J.; Molnár Cs.; Magyar E.-né (Richter Gedeon Nyrt), Ipari eljárás 17a-acetoxi-11b-[4-(N,N-dimetil-amino)-fenil]-19-norpregna-4,9-dién-3,20-dion előállítására és új intermedierek az eljáráshoz, HU227,112 szabadalom, 2006, Patent EP2,027,140, 2007, Patent US8,110,691, 2008, *Chem. Abstr.*, **2007**, 148, 55255.
19. Mahó S., Sánta Cs.; Csörgői J.; Horváth J.; Aranyi A.; Béni Z. (Richter Gedeon NyRt.) Ipari eljárás szteroid hatóanyagok előállítására, HU230,319 sz. szabadalom, 2013, Industrial process for the synthesis of ulipristal acetate and its 4'-acetyl analogue, PCT: WO 2015049637, 2014, *Chem. Abstr.*, **2015**, 162, 514377.
20. Béni, Z., Orgoványi, J., Kóti, J., Sánta, Cs., Horváth, J., Mahó, S., Szántay, Cs. Jr., Detection by HPLC and Structural Characterization by NMR and MS of a Natural Deuterium Isotopologue of Ulipristal Acetate, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2014**, 98, 279-286.
21. Béni, Z., Structure Elucidation of a Mysterious Trace Component of Ulipristal Acetate, *In Anthropoc Awareness/ The Human Aspects of Scientific Thinking in NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry*, Szántay Cs. Jr. Ed.; Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, **2015**, pp355-365.
22. Jaksa I., Németh S., Könczöl K., Terdy L., Kozma I., Barta F. (Richter Gedeon Nyrt.), process for the selective isolation, purification and separation of monohydroxylated 3,17-diketosteroid compounds, HU227,238 sz. szabadalom, 2006, Patent EP2,069,382, 2007, *Chem. Abstr.* **2008**, 148, 353846.
23. Sörös B., Horváth J., Gálik Gy., Tuba Z., Mahó S., Balogh G., Bódi J., Aranyi A. (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.): Ipari eljárás 17-hidroxi-6b,7b;15b,16b-biszmetilén-3-oxo-17a-pregn-4-én-21-karbonsav-g-lakton előállítására és az eljárás kulcs-intermedierei; P0402465 számú magyar szabadalmi bejelentés, 2004, Patent EP1,817,326, 2005, Patent US8,309,712, 2007, *Chem. Abstr.* **2006**, 145, 28166.
24. Sörös B., Horváth J., Gálik Gy., Tuba Z., Mahó S., Balogh G. (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.): eljárás 17-hidroxi-6b,7b;15b,16b-biszmetilén-17a-pregn-4-én-3-on-21-karbonsav-g-lakton előállítására és az eljárás kulcs-intermedierei; P0402466 számú magyar szabadalmi bejelentés; 2004, Patent EP1,831,239, 2005, US8,450,476, 2007, *Chem. Abstr.*, **2006**, 145, 46211.
25. Bódis A., Greiner I., Nagy Kasza, J.M. (Richter Gedeon Nyrt.) Film-coated tablets containing drospirenone as active agent and method for the preparation thereof, HU0700826 sz. szabadalmi bejelentés, 2007, Patent EP2,072,041, 2008, *Chem. Abstr.*, **2009**, 151, 86680.
26. Schänzer, W., Metabolism of anabolic androgenic steroids, *Clinical Chemistry*, 1996, 42(7), 1001-1020.
27. Sánta, Cs.; Tuba, Z.; Mahó, S.; Széles, J.; Balogh, G.; Brlik, J., Trischler, F.; Szilágyi, G.; Bakcsi, E. (Richter Gedeon

- Vegyészeti Gyár Rt.): Eljárás szteránvázas A-nor-szeko vegyületek előállítására, valamint szekoinoxilidénkarbonsavszármazékok, mint intermedierek, HU224,816 sz. magyar szabadalom, 1999, Patent EP1,189,885, 2000, Patent US6,448,413, 2001, *Chem. Abstr.*, **2000**, 134, 42312.
28. Sánta, Cs.; Tuba, Z.; Mahó, S.; Széles, J.; Ferenczi, K.; Horváth, P.; Láncoz, K.; Mester, T.; Trompler, Á. (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.): Új eljárás 17b-hidroxi-17a-metil-2-oxa-5a-androsztán-3-on előállítására és intermediere, 224,817 sz. magyar szabadalom; 1999, Patent EP1,189,925, 2000; Patent US6,583,298, 2001, *Chem. Abstr.*, **2000**, 134, 42313.
 29. The United States Pharmacopeia/The National Formulary 23rd Edition, 1995, p1122
 30. Pharmacopeial Forum Vol. XX(1) [Jan.-Feb. 2006], p1-5.
 31. Tuba Z., Mahó S., Kiss J., Magyar E., Terdy L. (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.): Process for the synthesis of high purity d-(17a)-13-ethyl-17-hydroxy-18,19-dinorpregn-4-ene-20-yn-3-one-oxime; P03 01982 sz. magyar szabadalmi bejelentés, 2003; Patent EP1,638,988, 2004; *Chem. Abstr.*, **2005**, 142, 114326.
 32. Tuba Z., Mahó S., Keserő Gy., Kozma J., Horváth J., Balogh G. (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.): Pure d-(17a)-13-ethyl-17-hydroxy-18,19-dinorpregn-4-ene-20-yn-3-one-3E-and -3Z-oxime isomers and the pure isomers; P03 01981 sz. magyar szabadalmi bejelentés, 2003; Patent EP1,641,812, 2004, Patent US7,576,226, 2004, *Chem. Abstr.*, **2005**, 142, 114325.
 34. Sánta Cs., Széles J., Visky Gy., Csörgei J., Mahó S., Bódi J., Aranyi A., Molnár Cs., Terdy L., Tuba Z., Balogh G., Horváth Z. (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.): Industrial method for the synthesis of 17-acetoxy-11beta-[4-(dimethylamino)-phenyl]-21-methoxy-19-norpregna-4,9-dien-3,20-dione and the key intermediates of the process; HU228,636 sz. Magyar szabadalom, 2007; Patent EP2,160,398, 2008, US8,183,402, 2009, *Chem. Abstr.*, **2009**, 150, 98524.
 35. Sánta Cs., Demeter Á., Havasi B., Mahó S. (Richter Gedeon NyRt.): Egy szteroid vegyület új kristályos módosulata és eljárás annak előállítására, P09 00171 sz. Magyar szabadalmi bejelentés, 2009, Patent EP2,408,799, 2010, Patent US8,513,228, 2011, *Chem. Abstr.*, **2010**, 153, 440578.
 36. Balázs A., Csörgei J., Demeter Á., Sánta Cs. (Richter Gedeon NyRt.) Egy szerves vegyület új kristályos módosulata és eljárás annak előállítására, P09 00487 sz. Magyar szabadalmi bejelentés, 2009, Patent EP2,462,154, 2010, Patent US8,513,228, 2011, *Chem. Abstr.*, **2010**, 153, 440578.
 37. Sánta Cs., Csörgei J., Mahó S., Szabó G., Schäfer T., Béni Z. (Richter Gedeon NyRt.) Ipari eljárás szteroid intermedier előállítására, HU230,381 sz. magyar szabadalom, 2014, PCT: WO2015121840 (Process for the production of 21-methoxy-11-beta-phenyl-19-nor-pregna-4,9-diene-3,20-dione derivatives), *Chem. Abstr.*, **2015**, 163, 319908.
 38. Tuba Z., Mahó S., Szabó Gy., Gálík Gy., Balogh G. (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.): Environment-friendly process for the synthesis of quaternary ammonio-steroids; HU227,522 sz. magyar szabadalom, 2004; PCT: WO2006038047, *Chem. Abstr.*, **2006**, 144, 370304.
 39. S. Görög, A. Laukó, B. Herényi, A. Georgakis, É. Csizér, G. Balogh, Gy. Gálík, S. Mahó, Z. Tuba, Analysis of Steroids XXXIX. Estimation of the Impurity Profile of 5a-Androst-2-ene-17-one, *Chromatographia*, **1988**, 26, 316-320.
 40. Bowers, A., Cross, A.D., Edwards, J.A., Carpio, H., Calzada, M.C., Denot, E., Steroids. CCV. Ring A modified hormone analogs. Part I. Some ring A olefins, *J. Med. Chem.*, **1963**, 6, 156-161.
 41. Valera, C., Tavares da Silva, E., Amaral, C., Correia da Silva, G., Baptista, T., Alcaro, S., Costa, G., Carvalho, R.A., Teixeira, N.A.A., Roleira, F.M.F., *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 3992-4002.
 42. G.D. Searle & Co., Patent US3,527,778, 1969, *Chem. Abstr.*: nem referálta.
 43. British Drug Houses, Patent GB912,035, 1960, *Chem. Abstr.*, **1963**, 58, 59984
 44. British Drug Houses, Patent GB912,036, 1960, *Chem. Abstr.*, **1963**, 58, 59983
 45. British Drug Houses, Patent GB912,037, 1960, *Chem. Abstr.*, **1963**, 58, 59988
 46. Mahó S., Sörös B. (Richter Gedeon NyRt.) Eljárás (11b,17a)-17-acetoxi-11-metil-3-oxo-norpregn-4-én előállítására, HU230,397 sz. magyar szabadalom, 2013, PCT: WO2015075693, *Chem. Abstr.*, **2015**, 163, 21854.
 47. Zoltán B., Viktor H., E. Varga, S. Mahó, A. Aranyi, Cs. Szántay Jr., New oxidative decomposition mechanism of estradiol through the structural characterization of a minute impurity and its degradants, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2013**, 78-79, 183-189.

Steroid Research and Development at Gedeon Richter Plc.

Gedeon Richter Plc (GR) is the only pharmaceutical company in Hungary that has several decades of unparalleled experience in the R&D of steroid chemistry. Our company produces steroid drugs from the very beginnings. The first steroid experiments were conducted by the company's founder, Gedeon Richter himself and from that time many products with steroidal active pharmaceutical ingredients (APIs) have been produced. At the beginning organotherapy remedies containing steroids (animal or plant origin) were manufactured and later it was followed by the semisynthetic production of natural steroids. After WWII in the 1950s the synthetic steroid production had to be restarted again. Beside the invention of our original drugs (Depersolon® (API: mazipredone hydrochloride), Arduan® (USA: Arpilon®) (API: pipecuronium bromide)) many other so called reprogeneric drugs were synthesized at that time. In the 1960s the company's gynaecological portfolio was established and the first significant milestone was the Eastern-European registration of our contraceptive drug Infecundin in 1966

(API: norethynodrel and mestranol). The name „Infecundin” refers the contraceptive research work of Ludvig Haberlandt in the 1930s when an innovative cooperation started with him to produce the contraceptive drug composition Infecundin.

Beside gynaecology Gedeon Richter is involved in other therapeutic areas regarding both R&D activity and manufacturing of steroid API-s. Recently our original drug research is focused on the development of new central nervous system drugs and original gynaecologic research. The dedicated department for steroid innovation is the Steroid Synthetic Laboratory. The published articles and patents of this laboratory provided significant contributions to applied steroid organic chemistry during the past 50 years. In this present article the main achievements during the last one and the half decades are summarized.

Gedeon Richter has outstanding production plant facilities for steroidal APIs and for drug formulations using innovative technologies that enables us the preparation practically of any kind of steroid substance. Our company is world-wide known

producer of steroid APIs and drug formulations. Gedeon Richter plc. put an emphasis on strategic collaborations with other foreign companies aiming to produce innovative new drug products (e.g. norgestimate, norelgestromin, telapristone acetate). Since steroid products have long lifetime (we have an API in our pipeline, which has been produced for 45 years) the more stringent environmental, safety, quality and business needs require continuous revision and development of the applied technological and analytical processes. In case of APIs, intermediates and drug formulations it is essential and challenging task the identification and the synthesis of the typical (and critical) impurities and degradation products. Recently it has become strictly required to identify the carry over impurities as well. Surprisingly the synthesis of these chemical substances can be even more difficult than the original API's and can be a real challenge for us. As a demonstration of this activity a couple of representative examples from R&D projects are presented in the article.

One of our outstanding achievements in the field of original drug research was connected to the Company's CNS portfolio. During the HTS campaign of our compound collection several nitrogen containing steroid hits were identified with significant histamine H₃ receptor antagonist/inverse antagonist characteristics. On the basis of these molecules, as a result of a modern, Molecular Mechanism of Action (MMOA) based research a new steroid chemotype was discovered (scheme 1.) and the most promising derivative was selected as a preclinical candidate.

ESMYA® (API: ulipristal acetate, **1**), recently approved, original, first-in-class medicine is an orally active selective progesterone receptor modulator, which reversibly blocks progesterone receptors in the target tissues. For the synthesis of ulipristal acetate we developed several synthetic routes. The finally applied method was partly based on the synthesis of our another progesterone receptor modulator (telapristone acetate, scheme 9.). During the chemical development of the API and the intermediates we faced a strange analytical phenomenon. In case of those molecules which contain 4-dimethylaminophenyl group in position 11 an approximately 0.1% impurity was detected by HPLC method. It was proved to be an *N*-methyl deuterated isotopologue of the target molecule. This kind of phenomenon was never experienced among molecules with similar molecular weight.

Other successful generic API development was the synthesis of the progestin drospirenone (**14**, scheme 5.). In the synthesis, during the Corey-reaction step a previously unknown intermediate (**5**, scheme 4.) was identified, which helped us to understand the mechanism of the reaction. Our new synthesis became the first independent, patented industrial process of drospirenone following the originator.

For the synthesis of the anabolic steroid oxandrolone (**26**), a special process was elaborated, which enabled us to replace the dangerous and environmentally unfriendly oxidants like osmium tetroxide and ozone with the more favorable potassium permanganate (scheme 6.). As a further achievement our newly developed HPLC method was approved in the oxandrolone US Pharmacopoea instead of the outdated TLC purity test.

Norgestimate (**37**) is the active pharmaceutical ingredient of Ortho-cyclen®, Ortho Tri-cyclen® (Ortho Pharmaceutical, Johnson and Johnson) pills, and norelgestromin (**38**) is the API of Ortho Evra® (Ortho Pharmaceutical, Johnson and Johnson) contraceptive patch. Both compounds are prodrug and an amorphous mixture of two oxime isomers. The real active ingredient is levonorgestrel in both cases, which is liberated by metabolism. The development of the chemical syntheses and the scaled up plant productions was carried out in close cooperation with the originator. The starting material levonorgestrel was produced by GR with totalsynthetic method (scheme 8.). For the preparation of high purity active ingredients, and the norelgestromin oxime isomers (they have different absorption properties) innovative methods/processes were worked out. In addition we were able to synthesize the E-isomer of norelgestromin (**39**) in high purity directly from levonorgestrel.

In case of pipercuronium bromide, in the last reaction step the methylbromide (ozone layer depleting chemical) reagent was eliminated (scheme 11.) and for environmental reasons several other changes were applied. Due to these modifications the impurity profile of the API was changed and effective syntheses for the new carry over impurities had been worked out such as 5 α -androst-1-en-17-one (**56**, scheme 13.).

On the basis of commercial considerations a new, innovative process was elaborated for the progestin norgestomet (veterinary medicine). The synthesis of this relatively „simple” structure proved to be a real challenge for us. For starting material (**43**) epoxide derivative was chosen, which was formerly applied at the preparation of progesterone receptor modulators API-s (scheme 14.)

Both in case API-s and drug compositions it is required to explore the formation of the decomposition products and the evaluation of their quality and exact quantity. It makes necessary their preparation in standard quality. For example during storage oxidative reactions take place in case of estradiol and estradiol containing drug compositions. A new degradation product was identified and its synthetic preparation helped us to understand the whole decomposition process (scheme 15.).

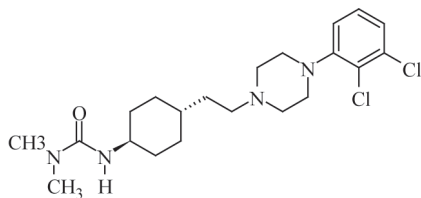
A kémia, ami a cariprazine-hoz vezetett

DOMÁNY György* és GREINER István

Richter Gedeon Nyrt., Kutatási igazgatóság, Gyömrői út 19-21, 1103 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

2015. szeptember 17-én a magyar gyógyszeripar történetében eddig példa nélküli eredményt tudott felmutatni a Richter Nyrt. Az FDA forgalombahozatali engedélyt adott a VRAYLAR márkanévű, cariprazine hatóanyagot tartalmazó készítményre az USA területére mind skizofrénia, mind bipoláris mánia indikációban. Ez az első olyan FDA által elfogadott készítmény Közép-Kelet-Európában, melyet itt, még pontosabban Magyarországon találtak fel, hazánkban végezték el, vagy innen irányították az összes szükséges preklinikai vizsgálatot, és a Richter Nyrt. önállóan végezte el az első fázis I. vizsgálatot is. Mindezeket túlmenően a további 46 klinikai vizsgálat megtervezésében, kivitelezésében és finanszírozásában is jelentős mértékben részt vett a hazai cég, sőt ezen túlmenően egy döntő jelentőségű fázis III hatékonysági vizsgálatot tervezett meg és végzett el teljesen egyedül a Richter Nyrt. Érdemes kiemelni, hogy a törzskönyvezési folyamat közel három évén át a már korábban is rendkívül jó együttműködési készséget mutató amerikai partner folyamatosan kikérte a Társaság véleményét, még a végső döntés előtt három órával is! Az alábbi fejezetek ennek az anyagnak a főbb kémiai kutatási eseményeit mutatják be.



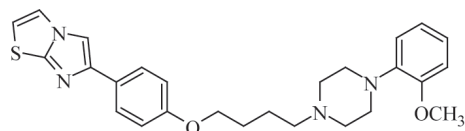
cariprazine

2. Előzmények

A cariprazine-hoz vezető kémiai úton több esetben kutatói intuíción túl a szerencsés véletlen is segítette munkánkat. Az első ezek közül a kémiai kiindulási pont azonosítása volt. A múlt század nyolcvanas-kilencvenes éveiben jelentős erővel kutattuk a vinpocetine-t (Cavinton) követő anyagokat. A biológiai vizsgálati rendszerben szerepelt egy teszt, amelyik az anyagok affinitását mérte a dopamin D_2 receptorhoz (megjegyzendő, hogy minden ismert antipszichotikum jelentős mértékben kötődik ehhez a fehérjéhez). Az előállított anyagok néhány ezreléke hatást mutatott ebben a vizsgálatban, majd részletes biológiai jellemzésük kiderült, hogy affinitásuk a dopamin D_3 receptorhoz még erősebb. Ezek szerkezetét célszerűen módosítva *in vivo* is aktív, potenciális antipszichotikumokat nyertünk, amelyek jellegzetes képviselője az RGH-1756 jelű anyag volt.¹

Humán receptorokon a dopamin D_3 szelektivitás még kifejezettebbnek mutatkozott. Az anyag elfogadható biológiai

hasznosulást mutatott patkányban, és aktív volt az apomorfin-indukálta mászásos viselkedés tesztben. Ez utóbbi eredmény ugyan nem közvetlen előrejelzője az antipszichotikus



RGH-1756

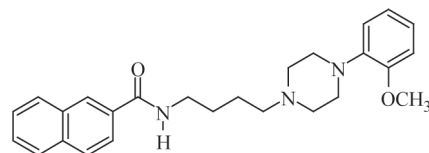
rD_3 - K_i : 2.4 nM; rD_2 - K_i : 15.8 nM

hatásnak emberben, de a részletes, célirányos vizsgálatok elvégzését mindenképpen indokolja. Mindazonáltal az RGH-1756 a patkány α -1 adrenoreceptorhoz mutatott jelentős affinitása, ami potenciális kardiovaszkuláris mellékhatásokra utal, valamint a később kiderülő, megengedettnél magasabb toxicitása miatt preklinikai fejlesztésre nem volt alkalmas.

Amikor azonban 1999 decemberében Társaságunknál egy új projekt indult szelektív dopamin D_3 receptor antagonisták kutatására, amelynek célja a kokain függőség kezelésére alkalmas szer kifejlesztése volt, az RGH-1756 kimagasló dopamin D_3 receptor affinitása és szelektivitása miatt igen alkalmas kémiai kiindulási pontként szolgált.

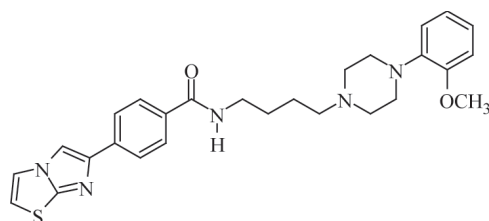
3. A projekt indulása

A vezérmolekula létrehozásához az RGH-1756 "spacer" részében levő éter oxigénjét az irodalomból ismert rokon szerkezetű szelektív dopamin D_3 ligandum BP-897-ben² fellelhető karboxamid csoportra cseréltük. Így jutottunk az 1 jelű anyaghoz, amelynek már több mint nyolcszázszoros volt a D_3 szelektivitása.



BP-897

rD_3 - IC_{50} : 0.6 nM; rD_2 - IC_{50} : 115 nM; α_1 - IC_{50} : 30 nM

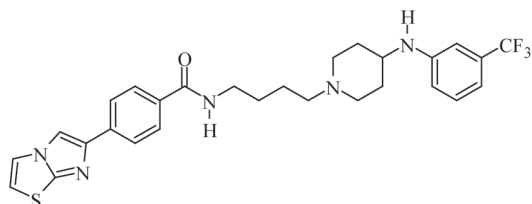


1

rD_3 - IC_{50} : 0.13 nM; rD_2 - IC_{50} : 108 nM; α_1 - IC_{50} : 4.3 nM

* e-mail: gy.domany@richter.hu

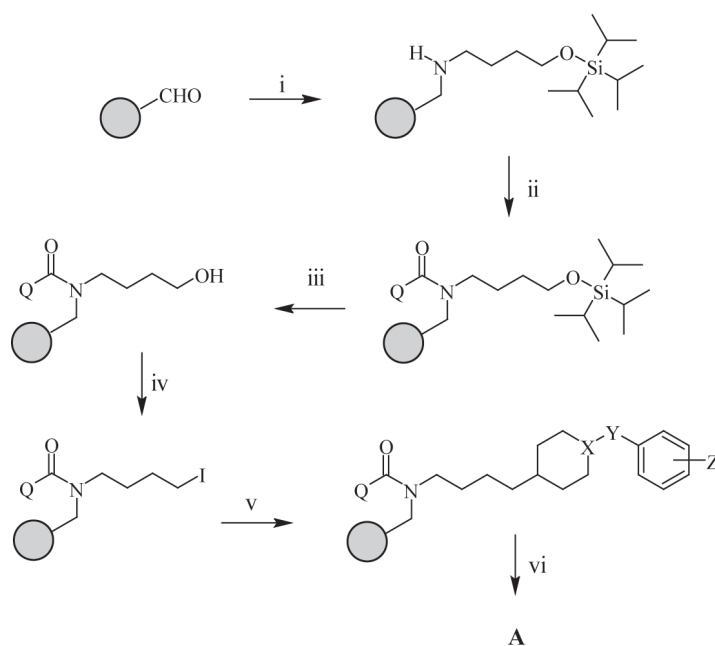
Következő lépésként a kardiovaszkuláris mellékhatásokért feltételezhetően felelős α_1 adrenoreceptor affinitást a 2-metoxifenil csoport alkalmas helyettesítésével terveztük kiküszöbölni. A 2-metoxifenil piperazint 3-trifluorometil-fenilamino-piperidinre cserélve jutottunk a **2** jelű anyaghoz, amely a részletesebb jellemzés végére alkalmas vezérmolekulának bizonyult.

**2**

rD_3 - IC_{50} : 1.0 nM; rD_2 - IC_{50} : 584 nM; $r\alpha_1$ - IC_{50} : 2829 nM

4. A vezérmolekulától a 4 jelű szulfonamidig

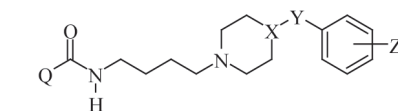
A vezérmolekula szerkezetéből kiindulva több száz **A** általános képlettel jellemezhető származékot állítottunk elő, és vizsgáltunk meg a releváns *in vitro* tesztekben.



i: "primer amin"/NaBH(OAc)₃/AcOH; ii: "sav"/HBTU/TEA; iii: Bu₄NF;
iv: I₂/Ph₃P/imidazol; v: "szekunder amin", DIPEA; vi: TFA/DCM.

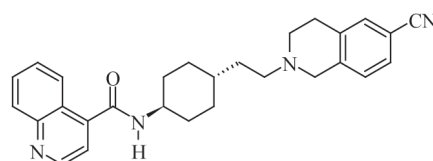
1. Ábra. Az **A** általános képletű molekulatár szilárdfázisú előállításának sémája.

Előállítottunk egy másik ismert dopamin D₃ receptor antagonistát (SB-277011)³ is, néhány általunk megtervezett származékával együtt, hogy további hatékony, szelektív és immár jól felszívódó vezérmolekulákat azonosíthassunk. Választásunk a patkányban igen jó biológiai hasznosulást mutató (rBA : 80.4%) **3** jelű anyagra esett.

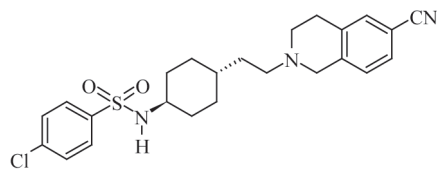
**A**

ahol Q aromás karbo- vagy heterociklus, X jelentése N vagy CH, Y jelentése egyes kötés, O, NH vagy CH₂ volt, míg Z egy vagy több alkil, alkoxi, nitril csoportot, halogén atomot, illetve egyéb helyettesítőt jelezhet a fenil gyűrű bármely szénatomján.

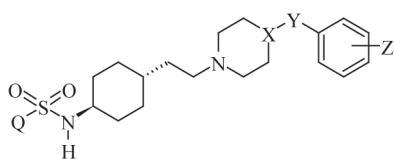
Ezek a származékok részben hagyományos folyadék fázisú szintézissel, részben automatizált szilárd fázisú párhuzamos szintézissel készültek a kombinatorikus kémia elvei szerint (a szilárdfázisú szintézis sémája az 1. ábrán látható). Közöttük több szelektív és nagy affinitású dopamin D₃ ligandumot találtunk, de a hatékony vegyületek nagy része elfogadhatatlanul alacsony biológiai hasznosulást mutatott patkányban (rBA < 20%).

A**SB-277011**

rD_3 - IC_{50} : 6.4 nM, rBA : 63%

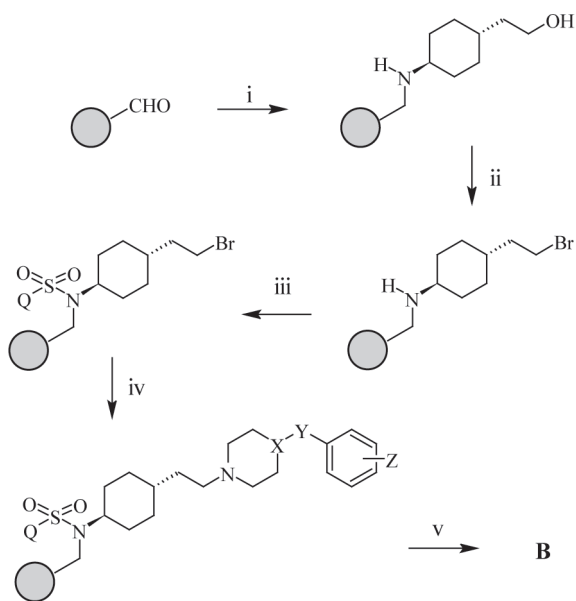
**3**rD₃-IC₅₀: 3.4 nM, rBA: 80.4%

Ebből a szerkezetből kiindulva egy következő (**B** általános képlettel jellemezhető) molekulatípust állítottunk elő, ismét részben oldatfázisú, részben automatizált szilárdfázisú párhuzamos szintézissel.

**B**

ahol Q, X, Y és Z ugyanazokat az atomokat illetve csoportokat jelentik, mint az **A** jelű molekulatárban.

Az automatizált szilárdfázisú szintézisre egy még rövidebb reakcióutat fejlesztetünk ki (2. ábra).

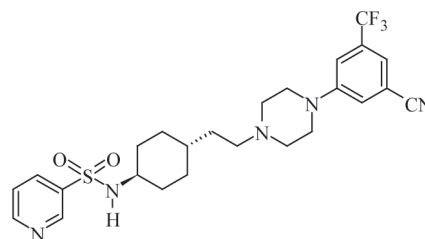


i: *transz*-4-aminociklohexilanol/NaBH(OAc)₃/CH₂Cl₂/AcOH;

ii: PPh₃, Br₂/imidazol/CH₂Cl₂; iii: QSO₂Cl/TEA/THF;
iv: "gyűrűs szekunder amin"/KI/DMF; v: TFA/CH₂Cl₂.

2. Ábra. A **B** általános képletű molekulatár szilárdfázisú előállításának sémája.

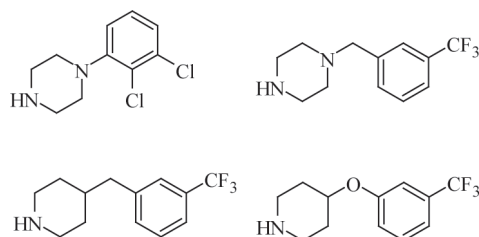
Az **A** és **B** molekulatárak több száz tagjából a **4** jelű, a dopamin D₃ receptorhoz nagy affinitást mutató, a D₂ és az α1 receptorok vonatkozásában egyaránt szelektív anyagot választottuk ki részletes farmakológiai vizsgálatokra.⁴

**4**rD₃-IC₅₀: 0.6 nM; rD₂-IC₅₀: 83 nM; rα₁-IC₅₀: 7804 nM;

5. A második projekt

Másfél évvel a projekt indulása után több szempont figyelembevételével az a döntés született, hogy a kutatást egy új antipszichotikum kifejlesztésének irányába folytassuk. Kémiai kiindulási pontként a **4** jelű anyag kiválóan megfelelt, mert jó biológiai hasznosulást mutatott és aktív volt az apomorfinnal indukált mászási viselkedés teszten (rBA: 54%; „apomorphine-climbing”- ED₅₀: 22 mg/kg). A részletes farmakológiai és biztonságossági vizsgálatok azonban kimutatták, hogy **4** patkányban indukálja a CYP1A enzimet, valamint QT intervallum nyújtó hatással bír, és így preklinikai fejlesztésre alkalmatlan.

Számos analóg vegyület vizsgálata után arra a következtetésre jutottunk, hogy a CYP1A enzim indukáló hatás kapcsolatban van a molekula fenilpiperazin részének helyettesítőivel, különösképpen a nitril csoporttal, és ennek eliminálásával megszabadulhatunk ettől a mellékhatástól. A kardiovaszkuláris mellékhatásokkal fenyegető QT intervallum nyújtást ellensúlyozandó pedig az antipszichotikus hatást kívántuk fokozni részben a dopamin D₂ affinitás fokozásával, részben az anyagok farmakokinetikai jellemzőinek megváltoztatásával, elsősorban az agy/plazma koncentráció arány növelésével. Az ekkor már jelentős mennyiségű szerkezeti és hatásadatot tartalmazó adatbázisunkat tanulmányozva négy olyan szerkezeti elemet (building block) azonosítottunk, amelyek alkalmasnak látszottak a kitűzött cél elérésére (3. ábra).

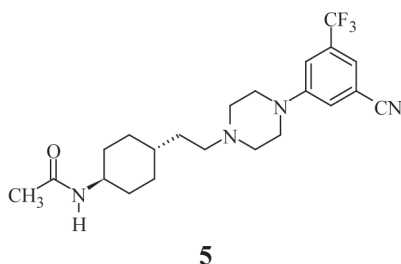


3. Ábra. Nagy D₃ és D₂ receptor affinitást várhatóan CYP indukció nélkül biztosító építőelemek.

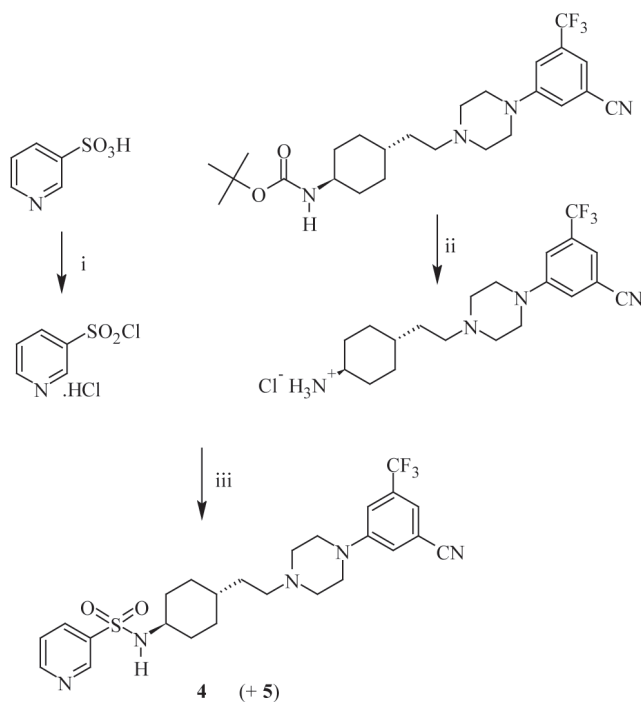
6. Az új vezérmolekula és optimalizása

Ekkor azonban történt valami, amely gyökeresen megváltoztatta vezérmolekula optimalizálásunk irányát. A **4** jelű anyag részletes farmakológiai vizsgálataihoz az anyagot több alkalommal és nagyobb mennyiségben

is elő kellett állítani. Ezen szintézisek során feltűnt egy makacs szennyeződés, amelynek kiküszöbölése céljából elkülönítettük azt, és ami az ezt követő szerkezet-meghatározás során az **5** jelű anyagnak bizonyult.



Az **5** jelű anyag keletkezése a **4** előállításánál során nem nyilvánvaló. Legvalószínűbbnek az tűnik, hogy a védőcsoport eltávolításhoz használt sósavas etil-acetátban jelenlévő ecetsav, amely a primer amin hidrokloridot szennyezi, vegyes anhidridet képez a reagensként használt piridin-3-szulfonsav kloriddal és verseng azzal a primer amin acilezésében (4. ábra).

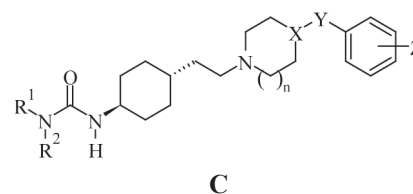


i: PCl_5 ; ii: HCl/EtOAc ; iii: $\text{TEA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$

4. Ábra. A **4** jelű anyag szintézise.

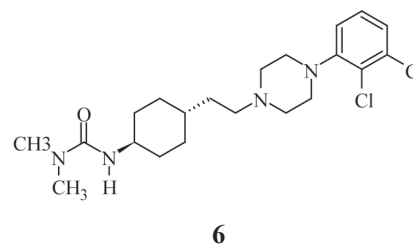
Az **5** jelű szennyeződés nagy affinitású, szelektív és *in vivo* kimagaslóan hatékony anyagnak bizonyult ($rD_3\text{-IC}_{50}$: 1.9 nM; $rD_2\text{-IC}_{50}$: 143 nM; $\alpha_1\text{-IC}_{50}$: >10,000 nM; "apomorphine-climbing"- ED_{50} : 1.54 mg/kg), bár **4**-hez hasonlóan jelentős mértékben indukálta CYP1A enzimet. Ez a szerencsés véletlen megfigyelés rávilágított arra, hogy ahhoz hogy hatékony és gyógyszereszerű anyagokat nyerjünk nem szükséges a molekulák bal felére nagy térkitöltésű, lipofil csoportokat tennünk, ahogy azt korábban az irodalom és saját korábbi tapasztalataink alapján gondoltuk, hanem éppen ellenkezőleg, a kis és kevésbé lipofil részek kifejezetten alkalmasabbak.

Az **5** jelű új vezérmolekula optimalizálásának legfőbb célja a CYP indukció és az esetleg felmerülő QT intervallum megnyúlás kiküszöbölése volt. Ezért a **C** általános képlettel jellemezhető vegyülettár előállítását tűztük ki célul.



ahol X, Y és Z ugyanazokat az atomokat illetve csoportokat jelentik, mint az **A** jelű molekulatárban (bár az anyagok zömmel a 3. ábrán látható gyűrűs szekunder aminok felhasználásával készültek), n lehet egy vagy kettő, R_1 és R_2 pedig H, alkilcsoport (esetleg együtt telített heterociklus)

Ez volt immár a harmadik előállított molekulatár a projektek során, és tagjai között több, minden korábban előállítottnál hatékonyabb és gyógyszerre fejlesztésre alkalmas anyagot azonosítottunk. A részletes farmakológiai jellemzés eredményeként a **6** jelű anyagot választottuk ki RGH-188 néven preklinikai, majd ezen vizsgálatok sikeres befejezése után klinikai vizsgálatokra.^{5,6}



(RGH-188, cariprazine)

$rD_3\text{-IC}_{50}$: 1.6 nM, $rD_2\text{-IC}_{50}$: 16 nM, $\alpha_1\text{-IC}_{50}$: 508 nM,
"apomorphine-climbing"- ED_{50} : 0.27 mg/kg, CYP1A
induction: 280%,
 rBA : 30%, $AUC_{\text{agy}}/AUC_{\text{plazma}}$: 7.6

7. Zárszó

Richter Nyrt. kutatás-fejlesztési tevékenységében mindig fontos szerepet játszottak azok a tapasztalatok, melyek a korábbi szakmai munka során keletkeztek. Ezekre építve sikerült több új hatóanyagot kifejleszteni, azonban egyik sem tudott a cariprazine-hoz hasonló sikert felmutatni, amihez annak idején jó intuíciókkal és némi szerencsével eljutottunk. Habár a vegyület már 2002-ben a kezünkben volt a kémiai kutatás igazi eredménye csak 2015-ben, 13 évvel később vált nyilvánvalóvá. Ez a tény mindennél jobban mutatja, hogy az új vegyületek kémiai kutatásával foglalkozó szakembereknek a kudarcűrő képesség, a nagy munkabírási és a szakmai kiválóság mellett rendkívüli türelemmel is kell rendelkezniük. Bizunk abban, hogy számosan közülük megélhetnek még hasonló sikereket, és átérezhetik azt az örömet, amit munkatársaink és mi, mert a gyógyszerkutatásban ez a legtöbb, amit el lehet érni.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők itt szeretnék kifejezni köszönetüket annak a több száz embernek, akik Richter Gedeon Nyrt. alkalmazottaiként a cariprazine sikeréért dolgoztak és dolgoznak, külön kiemelve a kémiáért felelős munkatársaikat.

Hivatkozások

1. Laszlovszky, I., Ács, T., Kiss, B., Domány, Gy. *Pharmazie*, **2001**, *56*, 287-289.
2. Pilla, M., Perachon, S., Sautel, F., Garrido, F., Mann, A., Wermuth, C.G., Schwartz, J.-C., Everitt, B.J., Sokoloff, P. *Nature*, **1999**, *400*, 371-375.

3. Stemp, G., Ashmeade, T., Branch, C. L., Hadley, M.S., Hunter, A.J., Johnson, C.N., Nash, D.J., Thewlis, K.M., Vong, A.K.K., Austin, N.E., Jeffrey, P., Avenell, K. Y., Boyfield, I., Hagan, J.J., Middlemiss, D.N., Reavill, C., Riley, G.R., Routledge, C. and Wood, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1878–1885.
4. Ágai-Csongor, É., Nógrádi, K., Galambos, J., Vágó, I., Bielik, A., Magdó, I., Ignác-Szendrei, Gy., Keserű, Gy. M., Greiner, I., Laszlovszky, I., Schmidt, É., Kiss, B., Sággy, K., Laszy, J., Gyertyán, I., Zájer-Balázs, M., Gémesi, L., Domány, Gy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5340-5344.
5. Ágai-Csongor, É., Galambos, J., Nógrádi, K., Vágó, I., Sággy, K., Kiss, B., Laszlovszky, I., Laszy, J., Gyertyán, I. *WO2005/012266 A1*. **2005**.
6. Ágai-Csongor, É., Domány, Gy., Nógrádi, K., Galambos, J., Vágó, I., Keserű, Gy.M., Greiner, I., Laszlovszky, I., Gere, A., Schmidt, É., Kiss, B., Vastag, M., Tihanyi, K., Sággy, K., Laszy, J., Gyertyán, I., Zájer-Balázs, M., Gémesi, L., Kapás, M., Szombathelyi, Zs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 3437-3440.

The chemistry that lead to cariprazine

On 17 September 2015 the U.S. Food and Drug Administration approved Vraylar (cariprazine) capsules to treat schizophrenia and bipolar disorder in adults. This novel atypical antipsychotic drug had been invented by the research division of Gedeon Richer Plc. and developed together with its american partner Forest Laboratories (at present Allergan Plc.).

This remarkable success story started in the nineties of the last century, when the search for new anti-dementia drugs unintentionally resulted in a few new 4-arylpiperazine derivatives that showed high affinity to the dopamine D₂ receptors. Since all the antipsychotics on the market at that time were functional antagonists of this receptor a new project was started to explore the potential of this compound family. After this lucky observation, a systematic modification of the structure of the best analogues lead to RGH-1756, a compound with acceptable affinity to the dopamine D₂ receptors and with especially high affinity to the dopamine D₃ receptors. However, because of cardiovascular side effects and low therapeutic index the preclinical development of this compound unfortunately could not be started. Nevertheless, when a new project aiming at the development of selective dopamine D₃ antagonists for the treatment of cocaine abuse was initiated in 1999, RGH-1756 was selected as a chemical starting point. After a few chemical modifications – partly influenced by the structure of **BP-897** – that improved the dopamine D₃ receptor selectivity versus dopamine D₂ and adrenaline α -1 receptors compound **2** was obtained and served as lead during the optimization procedure.

Hundreds of new compounds with the general formula **A** were prepared partly by traditional solution phase synthesis and partly by automated solid phase parallel synthesis utilizing the principles of combinatorial chemistry. Unfortunately, most of these compounds showed low bioavailability. Based on the structure of another selective dopamine D₃ ligand, **SB-277011**, several hundred new compounds with the general formula **B** was prepared and tested. Out of this series compound **4** was identified as a promising selective dopamine D₃ functional antagonist with good bioavailability.

By that time, however, the focus of the research of the company has been changed, and instead of drug abuse the possible symptomatic treatment of psychosis became our target. Since compound **4** showed good in vivo activity as a functional dopamine D₂ antagonist its preclinical development had been seriously considered. However, its CYP1A enzyme inducing and QT prolonging activity obstructed its preclinical development. By the time a medicinal chemical strategy were established for the elimination of these disadvantageous properties an unexpected observation occurred. A tenacious impurity of compound **4** (compound **5**) was isolated, synthesised and tested. It turned out that it has generally similar biological effects as its parent compound (**4**), but it was almost 10 times more active in vivo. This new compound became the new lead, the optimization of which resulted in a new series of urea derivatives with the general formula **C**. During this optimization we succeeded in the elimination of CYP enzyme induction and QT prolongation and identified compound **6** as the most promising derivative. It was selected for preclinical and later for clinical development as RGH-188.

pH-metriás titrálás a fizikai-kémia alapú gyógyszerkémia szolgálatában: ciklodextrin-gyógyszermolekula komplexképzés vizsgálata (gyors) UV-pH titrálással

DARGÓ Gergő^{a,b} és BALOGH György Tibor^{a,*}

^a Richter Gedeon Nyrt., Szintézistámogató laboratórium, Gyömrői út 19-21, 1103 Budapest

^b BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Budafoki út 8., 1111 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A Richter Gedeon Nyrt. kutatási menedzsmentje még a 2000-es évek közepén határozta el, hogy saját kutatási szervezetén belül kialakít egy olyan önálló csoportot, ahol az újonnan szintetizált vegyületek fizikai-kémiai jellemzése zajlik. A csoport megalakulásakor az elsődleges cél az alapvető, addig csak *in silico* becslések, illetve külső megbízások révén mért adatként előálló fizikai-kémiai paraméterek meghatározására alkalmas módszerek kialakítása, beállítása, „Richter-komforttá” tétele volt. Ennek megfelelően 1-2 év alatt beállításra kerültek a vegyületek proton-disszociációs állandójának (pK_a) és lipofilitásának ($\log P/D_{pH}$) meghatározására szolgáló potenciometrikus és UV-pH titrálási módszerek, a kinetikai és termodinamikai oldhatóság, továbbá a kémiai stabilitás (DMSO oldatban és fiziológiásan releváns vizes alapú pufferekben) meghatározására alkalmas, elsősorban 96-lyukú mérőtálcán/szűrőtálcán alapuló mérési módszerek, illetve a hatóanyagok permeabilitását jellemző két, vagy szendvics elrendezésű mérőtálcás *in vitro* nem-sejtes PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) módszer. Ezen vizsgálati módszerek közös vonásaként fontos kiemelni, hogy kiválasztásuknál, illetve kidolgozásuknál a legfontosabb szempontok a nagyon kis, jellemzően pár mg-ban rendelkezésre álló mintamennyiség, ami jellemzően diverz szerkezeti körből kerül ki, illetve további kihívás a minták nagy száma és a szűk időintervallumhoz kötött információigény voltak. Tekintettel a fentiekben említett széleskörű fizikai-kémiai vizsgálatokra, illetve a jelen írásos mű terjedelmi korlátjára a továbbiakban a leginkább a gyógyszerkémiai kutatások léptékéhez igazított, fokozottan annak igényét kielégítő, fizikai-kémiai paraméterek meghatározásban is általánosan használható módszerre a potenciometrikus, illetve különböző spektroszkópia, jellemzően spektrofotometrián alapuló UV-pH-metriás titrálási módszerre fókuszálunk. Hasonló módon az ezen a piacon egyeduralkodó néhány cég is a pH-metriás technikákon alapuló készülékeiken hajtott végre jelentősebb fejlesztéseket. A fejlesztés legfontosabb irányai (i) a pH-metriás titrálási technika alkalmazásának kiterjesztése a klasszikus pK_a és $\log P/D$ meghatározás mellett az oldhatóság vizsgálatra, (ii) a mérés anyagigényének gyakorlatilag egy nagyságrenddel történő csökkentése, (iii) a mérés ciklusidejének lerövidítése és így áteresztőképességének növelése (1. ábra).

A következőkben ez utóbbi két fejlesztési irány előnyeire, illetve az ezek által biztosított lehetőségekre térünk ki

részletesebben. A jellemző paraméterek változását a Sirius Analytical Inc. cég 2000-es években forgalmazott GlpKa, illetve a pár éve a piacon megjelent SiriusT3™ berendezésén mutatjuk be. Az 1. ábra alapján jól látható, hogy a mintaigény csökkenését a klasszikus pH-metriás (potenciometrikus), illetve csak a pK_a mérésnél alkalmazható UV-pH-metriás titrálásoknál is a titrálási térfogat egy nagyságrenddel történő csökkentésével (6-20 ml \rightarrow 0,8-3,5 ml) sikerült megoldani. A másik fejlesztési irány a mérés ciklusidejének csökkentése, amit a mintamozgatás robotizálásával, illetve a reagenseket adagoló automatikus buretták párhuzamos működésének biztosításával oldottak meg, mintánként 20-30 perces mérési időt eredményezve. Ezen felül a klasszikus egyensúlyi, illetve termodinamikai oldhatóság mérés 24-48 órás időigényéhez képest jelentős változást jelentett a kifejlesztett potenciometrikus oldhatóság-mérési módszer, melynek mérési ideje 60 perc/mérésre rövidült. A másik jelentősebb előrelépést a ciklusidő lerövidítésében egy új, ún. gyors UV-pH-metriás titrálási módszer bevezetésével sikerült a fejlesztőknek elérni (1. ábra). A számottevő ciklusidő rövidülést (20 perc/ 3 párhuzamos mérés) két, a vizsgálati módszert érintő változtatással sikerült elérni. A klasszikus két küvetta módszer helyett, az azonos oldószer háttérű (azonos koncentrációban adagolt, azonos koszolvenssel készített törzsoldatból kiinduló) minták esetében csak egy referencia küvetta alkalmaznak, ily módon a háttér UV-vis-pH spektrumok felvétele még nagyszámú minta esetében (akár 50 db minta) is csak egyszer szükséges. A másik ciklusidő rövidítését eredményező változtatás a gyors pH egyensúly beállítását, illetve a teljes titrálási pH-tartomány pufferálását biztosító puffer oldat kifejlesztése, ami együttesen biztosítja, hogy a teljes pH-tartományban a titrálási idő mintegy 6-7 percre rövidült.

Fentieknek megfelelően a következőkben ez utóbbi gyors UV-pH-metriás titrálással végzett kísérletes munkánkat szeretnénk bemutatni, amely során a gyógyszermolekulák és egyes ciklodextrinek között kialakuló kölcsönhatásokat vizsgáltuk a hatóanyagok proton-disszociációs képességének, ionizációs állandójának (pK_a), illetve multiprotikus vegyület esetében az adott szerkezeti egységre vonatkozóan szeparáltan az egyes pK_a értékeinek megváltozásán keresztül.

A szervezetbe kerülő, a gasztrointesztinális (GI)-rendszeren végighaladó, *per os* adagolású gyógyszerek biohasznosulását

* Tel.: +36-1-431-48-55; fax: +36-1-889-87-82; e-mail: gy.balogh@richter.hu



	GlpKa	Sirius T3™	Áteresztés
pK_a/p_sK_a (UV-pH)	6 – 10 mg	0,8 – 1,5 mg	20 - 25 perc/mérés
pK_a/p_sK_a (UV-pH)	50 µl 10 mM	50 µl 10 mM	20 - 25 perc/mérés
(gyors UV-pH)	DMSO-s oldat	DMSO-s oldat	20 perc/3 mérés
logP/D	8 – 12 mg	1 – 2 mg	30 - 35 perc/mérés
logS	-	2 – 6 mg	30 - 60 perc/mérés

A fent megjelölt mintaigények 3 párhuzamos mérés mellett értendők

1. Ábra. A pH-metriás titráló berendezés fejlesztése.

nagyban befolyásolja felszívódási hajlamuk, ami fizikai-kémiai értelemben elsősorban oldhatóságuktól és permeabilitásuktól függ. Ennek megfelelően már a gyógyszerkutatás korai fázisában fontos információt nyernünk a gyógyszer-jelölt molekulák ezen paramétereiről. A gyógyszermolekulákat az oldhatóságuk és permeabilitásuk alapján kialakított Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) négy osztályba sorolja.¹

Megfigyelhető, hogy az egyes osztályok esetén a felszívódási sebességet más-más paraméterek fogják limitálni (1. táblázat), úgy, mint a gyomor ürülése, az oldhatóság, a permeabilitás, vagy ezek kombinációja (BCS IV. osztály).² Ciklodextrinek (CD-ek) alkalmazása főként a gyógyszermolekulák oldhatóságának növelésére irányul, így első megközelítésben alkalmazásukkal a II., illetve a IV. BCS osztályokba sorolható anyagok biohasznosulásának növelésére láthatunk esélyt.

1. Táblázat. A Biofarmácia Osztályozási Rendszer (BCS) és a CD-ek hatása a biohasznosulásra²

Paraméterek	I. osztály	II. osztály	III. osztály	IV. osztály
Vizes oldhatóság	Fokozott	Rossz	Fokozott	Rossz
Permeabilitás	Magas	Magas	Alacsony	Alacsony
In vitro/ in vivo korreláció	Lehet jó	Jó	Rossz	Rossz
A felszívódási sebességet befolyásolja	Gyomor ürülése	Oldhatóság	Permeabilitás	Oldhatóság és permeabilitás
CD-ek alkalmazásának hatása a biohasznosulásra	Csökkentheti	Növelheti	Csökkentheti	Növelheti

Megfigyelhető, hogy az egyes osztályok esetén a felszívódási sebességet más-más paraméterek fogják limitálni (1. táblázat), úgy, mint a gyomor ürülése, az oldhatóság, a permeabilitás, vagy ezek kombinációja (BCS IV. osztály).² Ciklodextrinek (CD-ek) alkalmazása főként a gyógyszermolekulák oldhatóságának növelésére irányul, így első megközelítésben alkalmazásukkal a II., illetve a IV. BCS osztályokba sorolható anyagok biohasznosulásának növelésére láthatunk esélyt.

2. Ciklodextrinek

A CD-ek α -D-glükopiranoz egységek 1-4 kapcsolódásával kialakuló ciklikus oligoszacharidok, amelyeket keményítőből

enzimes átalakítással nyernek.³ A gyűrűk tagszáma 6, 7, 8, 9 lehet, a növekvő tagszám szerint elnevezésük α -, β -, γ -, illetve δ -CD-ek.

A csonkakúp alakú molekulákban a henger peremén találhatóak a glükóz egységek hidroxilcsoportjai, az üreg belsejében pedig a hidrogének, illetve a glikozil-kötésű oxigének.⁴ Ennek következtében a henger belseje apoláris, míg pereme és külseje poláris jellegű lesz, így vízben jól oldódnak, belső üregükben pedig különböző apoláris csoportot tartalmazó molekulákkal, mint vendégmolekulákkal képesek reverzibilis, nem kovalens zárvány-komplexek létrehozására.

Az üreg mérete a gyűrűtagszámmal változik, így eltérő méretű molekulákat, molekularészeket képesek az egyes CD-ek komplexálni. A hidroxilcsoportok különböző módosításával tovább növelhető a CD-ek vizes oldhatósága, így származékaikat is előszeretettel alkalmazzák a gyógyszeriparban.⁵

Az irodalomban számos példát találhatunk olyan gyógyszerekre, amelyek biohasznosulása növelhető CD-ek

alkalmazásával.^{6,7,8,9} A 2. táblázatban néhány olyan példa látható, ahol a CD-ek hatására bekövetkező biohasznosulás növekedést, a relatív biohasznosulást (F_{rel}) vizsgálták, melyeket a CD-t tartalmazó és a CD-t nem tartalmazó készítmények esetén mért plazma koncentráció időbeli függését leíró görbe alatti területek (AUC) hányadosából kapunk.² Látható, hogy ciklodextrinek alkalmazásával néhányszorostól akár több tizszeresre is sikerült növelni a hatóanyag biohasznosulását.

2. Táblázat Példák a biohasznosulás növelésére CD-ek alkalmazásával¹

Hatóanyag	CD ^a	Formulálás	Vizsgált faj	F_{rel}
Albendazol	HPBCD	Per os oldat	Bárány, egér	≤2,5
Karbamazepin	DIMEBCD	Per os por, oldat vagy tabletta	Nyúl, kutya, patkány	≤5,6
Cinnarizin	BCD, SBEBBCD, HPBCD	Per os oldat, tabletta, port tart. kapszula	Kutya	≤48
Digoxin	GCD	Tabletta	Kutya	5,4
17β-Ösztradiol	HPBCD	Szublingvális tabletta	Ember	5,8
Glibenklamid	BCD, SBEBBCD	port tart. kapszula	Kutya, patkány	≤6,2
Nifedipin	BCD, HPBCD	port tart. kapszula	Nyúl, kutya	≤2,9
Spirololakton	BCD, GCD, DIMEBCD, SBEBBCD, HPBCD	Per os por és oldat	Patkány, kutya	≤3,6

^a BCD: β-ciklodextrin, GCD: γ-ciklodextrin, HPBCD: 2-hidroxiopropil-β-ciklodextrin, DIMEBCD: dimetil-β-ciklodextrin, SBEBBCD: szulfobutil-éter-β-ciklodextrin

3. A komplexképzés vizsgálatának módszerei

A CD-ek gyógyszerek felszívódására, biohasznosulására gyakorolt hatásának azonosításához, a CD hatóanyaggal történő komplexképzésének vizsgálatára van szükség. A komplexképzés vizsgálatára alkalmas módszereket két fő csoportba sorolhatjuk. Az első a szabad és a komplexált hatóanyagforma elválasztásán alapuló technikák. Ide tartoznak a különböző kromatográfiák, az affinitás kapilláris elektroforézis, a dialízis, és tömegspektrometriás módszerek. A másik csoportba azok a vizsgálatok sorolhatók, melyek a gyógyszervegyület, vagy a CD valamilyen fizikai-kémiai sajátosságának megváltozásán alapulnak. Ilyen módszerek a fázis-oldhatóságon, UV-vis spektrofotometrián, potenciometrián, NMR-en, konduktometrián, valamint hidrolízis kinetikán alapuló módszerek.¹⁰ Az itt felsorolt technikák közül munkánk során az UV-vis spektroszkópia és potenciometria összekapcsolása révén előálló UV-pH titrálást alkalmaztuk (2. ábra). Célunk egy gyors, szűrés léptékű, a vizsgált hatóanyag proton-disszociációs sajátosságának, pK_a értékének megváltozásán alapuló mérési módszer kialakítása volt, mely segítségével könnyen előrejelezhető, hogy a gyógyszermolekula mely CD származékkal fog stabil/stabilabb komplexet képezni.

3.1. Komplexképzés vizsgálata UV-pH titrálással

Az UV-pH titrálással az olyan proton-disszociációra képes vegyületek esetében, melyek UV-vis spektruma pH-függést

mutat, a mért spektrumokból a két szélső (teljesen ionizált és teljesen neutrális forma) és egy átmeneti pH-n vett abszorbanciából a **Henderson-Hasselbalch egyenletet** felhasználva megadható(k) a vegyület pK_a értéke(i).¹¹

$$pK_a = pH + \log \left(\frac{[\text{proton donor}]}{[\text{proton akceptor}]} \right) \quad (1)$$

Az egyenlet UV-pH titrálás esetén átalakítható oly módon, hogy a koncentrációk hányadosának helyére a mért spektrofotometriás adatokból, az abszorbancia-változásokból származtatható mennyiségeket írunk, ily módon a **Henderson-Hasselbalch egyenlettel** analóg összefüggés írható fel, mely egy monoprotikus sav esetében a következő.¹³

$$pK_a = pH + \log \left(\frac{(A_A - A_{\text{átmeneti}})}{(A_{\text{átmeneti}} - A_{AH})} \right) \quad (2)$$

Az egyenlet bázisok és bizonyos megkötések mellett multiprotikus vegyületek esetében is analóg módon alkalmazható. Az egyenlet felhasználásával, több módszerrel is, már akár egy darab átmeneti pH értékből, és a három szükséges abszorbancia-értékből számolható a pK_a , de napjainkban a mérés automatizálása következtében, kifejezetten erre a célra írt programok is léteznek, melyek több átmeneti pH-hoz és választható hullámhossz intervallumhoz tartozó abszorbancia-értékek sokaságának mátrixából képesek meglehetősen nagy pontossággal megadni az adott vegyület pK_a értékét (pl.: RefinementPro, SiriusT3 Refine).

A módszerrel különböző CD-koncentrációk mellett mérve a proton-disszociációs állandót (pK_a -t), számolhatók a

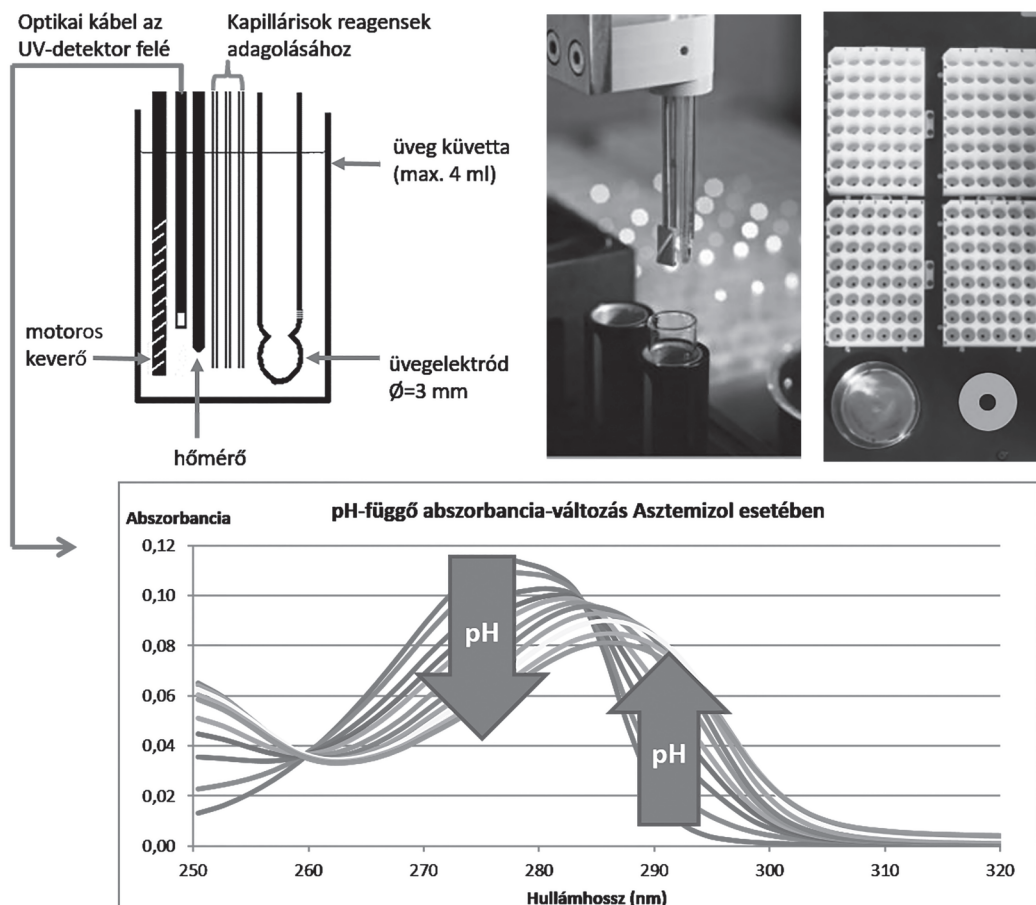
komplexálódás hatására megváltozó, látszólagos ionizációs állandók, $pK_{a,app}$ értékek is.

Azokban az esetekben, ahol CD hozzáadására azt tapasztaljuk, hogy a $pK_{a,app}$ érték szignifikánsan eltér a vegyület saját pK_a értékétől, stabil CD-gyógyszermolekula komplex kialakulása feltételezhető az oldatban. A két ionizációs állandó különbségének ($pK_a - pK_{a,app}$) nagysága a kialakuló komplex stabilitására utal, amit különböző CD-koncentráció mellett mérve, majd a kapott adatokat

a **Benesi-Hildebrand-egyenlet** szerint transzformálva a komplexstabilitási állandók nagysága megadható mind a proton-disszociált és a disszociálatlan molekulaformára (K_{11a} , K_{11b}):¹⁴

$$K_a / (K_{a,app} - K_a) = (1 / ((K_{11b} - K_{11a}) \cdot [CD]) + (K_{11a} / (K_{11b} - K_{11a})), \quad (3)$$

ahol az Asztemizol piperidin szerkezeti részének bázikus nitrogénjére vonatkozó proton-disszociációt figyelembe véve ($pK_{a,2}$), a neutrális molekulaformához tartozó stabilitási állandó (3. ábra):



2. Ábra. Az UV-pH titrálás vázlatja.

$$K_{11a} = y\text{-tengelymetszet} / \text{meredekség}, \quad (4)$$

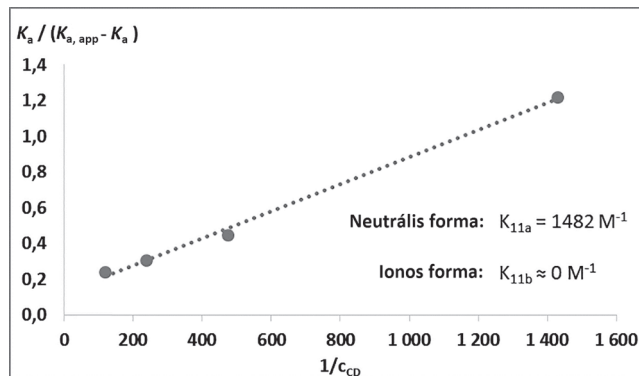
az egyszerűen protonált molekulaformához tartozó stabilitási állandó pedig:

$$K_{11b} = (1 + y\text{-tengelymetszet}) / \text{meredekség} \quad (5)$$

4. Használt módszerek, mintaelőkészítés

A méréseink során az UV-pH titrálásokhoz a Sirius Analytical cég SiriusT3™ készülékét használtuk. A készülék gyors mérési módjában (Fast UV-pH) a vizes közegben mérhető pK_a értékek meghatározására a vizsgált anyagok 5 μ l 10 mM-os koncentrációjú DMSO-törzsoldataiból konstans ionerősségű vízben titrálva (kezdeti térfogat: 1,2 ml, $I=0,15$ M KCl) anyagoként kb. 10-20 perc alatt végezhetünk 3 párhuzamos mérést, így a módszer gazdaságosan

alkalmazható nagyobb számú mérendő anyag esetében is (3. táblázat).



3. Ábra. Asztemizol-HPBCD komplex stabilitási együtthatóinak számítása a Benesi-Hildebrand egyenletből.

3. Táblázat. A pK_a változást vizsgáló mérési módszerek összehasonlítása

	potenciometrikus titrálás	(két küvettás) UV-pH titrálás	gyors (Fast) UV-pH titrálás
szükséges anyag mennyiség	0,8-1,5 mg szilárd minta 0,8-1,5 ml kezdeti titrálási térfogathoz	5 μ l 10 mM-os törzsoldat 0,8-1,5 ml kezdeti titrálási térfogathoz	5 μ l 10 mM-os törzsoldat 0,8-1,5 ml kezdeti titrálási térfogathoz
szükséges CD mennyiség	300 μ l 20 mg/ml koncentrációjú CD-oldat	300 μ l 20 mg/ml koncentrációjú CD-oldat	300 μ l 20 mg/ml koncentrációjú CD-oldat

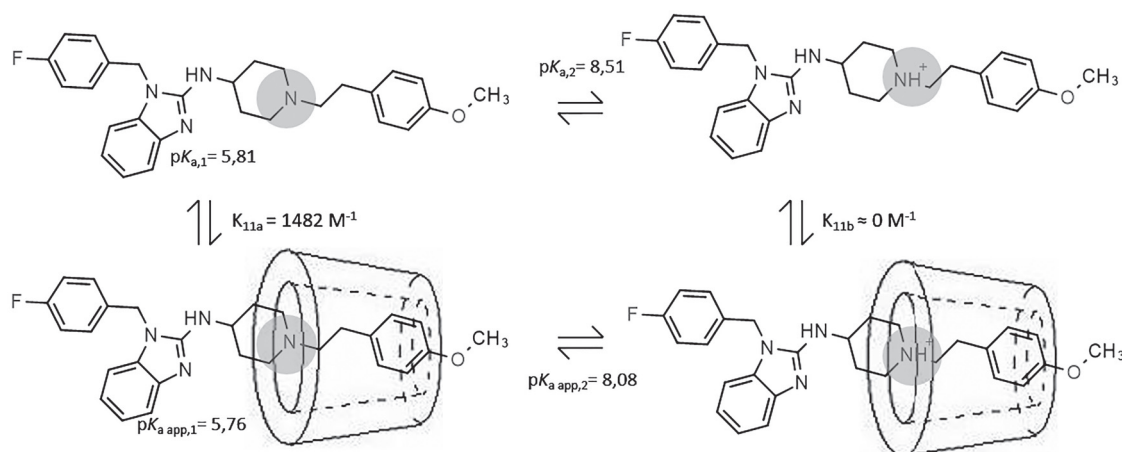
A CD-ek jelenlétében végzett méréseknél az 1,2 ml kezdeti titrálási térfogat 300 μ l-ét 20 mg/ml HPBCD-es oldattal helyettesítettük, mivel előzetes próbák alapján ekkora CD koncentráció mellett már szignifikáns pK_a változást tapasztaltunk, ha komplexálódás történt, így ezen beállítás mellett a módszerrel szűrés jelleggel azonosíthatók a vizsgált CD-el komplexálódásra hajlamos vegyületek.

5. Eredmények

Az eredmények alapján látható, hogy a vegyületek egy részénél jelentős pK_a változás tapasztalható, amit a HPBCD-el képzett komplex kialakulásával azonosítottunk, így elkülöníthetők azok a vegyületek, melyeknél esély van az oldhatóság növelésére az adott CD alkalmazásával (4. táblázat). A több pK_a értékkel rendelkező anyagok esetében az is megfigyelhető, hogy az egyes pK_a értékeket eltérő mértékben változtatta meg a CD jelenléte, ez alapján arra is lehet következtetni, hogy a CD-el kialakuló komplex a vendégmolekula mely szerkezeti részét érinti. Ez azt jelenti, hogy amelyik ionizálható molekularésznél nagyobb pK_a -változást tapasztalunk, ott valószínűsíthető, hogy az adott szerkezeti elem a CD belső üregébe, illetve annak közelébe

került, így a proton-disszociáció visszaszorulását, az egyensúlynak a neutrális forma irányába történő eltolódását okozza, a CD nélküli, szabad gyógyszer-molekula proton-disszociációs egyensúlyához képest. A kisebb méretű változás esetén pedig feltételezhetjük, hogy a molekula ionizálható szerkezeti eleme a CD gyűrűn kívül helyezkedik el, vagy a vegyület nem komplexálódott, így kevésbé van kitéve a komplexálódásból adódó, a proton-disszociációt befolyásoló hatásnak. Erre jó példa az Asztemizol-HPBCD komplexe is, melynek négy-egyensúlyát a 4. ábra mutatja, az ionos, illetve neutrális formákhoz tartozó proton-disszociációs állandók, valamint komplexstabilitási állandók feltüntetésével.

Tekintettel arra, hogy az alkalmazott UV-pH titrálás pK_a értékre vonatkoztatott átlagos hibája 0,01-0,02 nagyságú, az eredmények kiértékeléskor a 0,1-nél nagyobb pK_a változást mutató anyagokat ítéltük a HPBCD-el ténylegesen zárványkomplext képzőnek, hiszen így a titrator várható mérési hibájánál ez az eltérés már szignifikánsan, egy nagyságrenddel nagyobb. Néhány esetben oldhatósági problémák miatt (vizes közegben) csak a két küvettás méréssel volt meghatározható a valódi pK_a , így a kiértékelésnél az ezzel a módszerrel kapott értékeket használtuk (Asztemizol, Flufenaminsav, Glibenklamid).

4. Ábra. A pK_a értékek változása az Asztemizol-HPBCD komplexben.

A 4. táblázatban látható eredmények alapján az is megfigyelhető, hogy a vegyületek bázikus, illetve savas jellegének megfelelően néhány kivételtől eltekintve a HPBCD a $pK_{a,app}$ értéket a bázisok esetében csökkenti, míg savak esetében növeli. Ez megegyezik a várt hatással, hogy a komplexképződés a vegyület proton-disszociációját visszaszorítja, így annak savas/bázikus jellege is csökken. A trendtől eltérő esetekben feltételezhető, hogy a HPBCD komplexképző hatásán kívül más ok, pl. szterikus gátlás is fellép a disszociábilis protont tartalmazó csoporttal, így

ennek hatása jelenik meg az eredményben (pl. Nimeszulid). Az irodalom is megemlíti néhány hasonló esetet.¹⁵

6. Összefoglalás

Munkánk során egy UV-pH titráláson alapuló, a gyógyszer-molekulák és különböző CD származékok közötti komplexképzés vizsgálatára alkalmas szűrési módszert alakítottunk ki. A módszer gyógyszeripari relevanciája,

4. Táblázat. CD hatására bekövetkező pK_a változások

	vizes pK_a	SD	300 μ l HPBCD $pK_{a,app}$	SD	ΔpK_a
Savas karakterű hatóanyagok					
Glibenklamid	5,38	0,02	5,33	0,02	-0,05
Flufenaminsav	3,93	0,02	4,10	0,00	0,17
Dietilsztilbesztról $pK_{a,2}$	10,31	0,04	10,57	0,02	0,26
Dietilsztilbesztról $pK_{a,1}$	9,57	0,02	9,78	0,02	0,21
Diflunizál $pK_{a,1}$	2,58	0,01	3,17	0,01	0,59
Ösztradiol	10,33	0,02	10,32	0,02	-0,01
Ketoprofen	4,00	0,00	4,31	0,02	0,31
Fenilbutazon	4,33	0,00	4,48	0,01	0,15
Diklofenák Na	3,97	0,00	4,17	0,02	0,20
Nimeszulid	6,49	0,01	6,14	0,03	-0,35 (!)
Amfoter hatóanyagok					
Piroxikám $pK_{a,1}$	5,31	0,01	5,33	0,00	0,02
Diflunizál $pK_{a,2}$	12,85	0,14	12,96	0,03	0,11
Szalbutamol $pK_{a,1}$	10,15	0,02	10,24	0,06	0,09
Nitrazepám $pK_{a,1}$	10,51	0,01	10,43	0,02	-0,08
Szulfadimidin $pK_{a,1}$	7,51	0,01	7,58	0,00	0,07
Szulfadimidin $pK_{a,2}$	2,31	0,02	2,28	0,02	-0,03
Nitrazepám $pK_{a,2}$	2,94	0,02	2,83	0,03	-0,11
Szalbutamol $pK_{a,2}$	9,08	0,01	9,14	0,01	0,06
Piroxikám $pK_{a,2}$	1,88	0,02	1,93	0,04	0,05
Bázikus karakterű hatóanyagok					
Klozapin $pK_{a,2}$	7,66	0,02	7,68	0,02	0,02
Nifedipin	2,33	0,05	2,36	0,07	0,03
Asztemizol $pK_{a,1}$	5,81	0,01	5,76	0,04	-0,05
Papaverin	6,47	0,02	6,47	0,01	0,00
Ketokonazol $pK_{a,2}$	6,18	0,08	6,05	0,05	-0,13
Diazepám	3,41	0,02	3,26	0,03	-0,15
Ketokonazol $pK_{a,1}$	3,28	0,02	3,15	0,03	-0,13
Kodein	8,24	0,03	8,23	0,02	-0,01
Benzokain	2,54	0,02	2,13	0,05	-0,41
Asztemizol $pK_{a,2}$	8,53	0,06	8,08	0,08	-0,45
Klozapin $pK_{a,1}$	3,99	0,02	3,45	0,07	-0,54
Loratadin	5,26	0,02	4,14	0,02	-1,12
Dipiridamol	6,20	0,02	6,13	0,03	-0,07

hogy elősegítheti a megfelelő *per os* formulációk kiválasztását az in vivo állatkísérletekhez, oly módon, hogy segítséget nyújt a biohasznosulás javításához legalkalmasabb CD származék kiválasztásában, valamint a CD-gyógyszer arány beállításában.

A módszer előnyeként kiemeljük, hogy nagy érzékenységgel, minimális anyagmennyiségből, nagy áteresztőképességgel képes adatokat szolgáltatni, illetve multiprotikus vegyületek esetében arról is információt nyújthat, hogy a komplexképzés a molekula melyik szerkezeti részét érintette. Természetesen a kialakuló komplex egzakt szerkezetének megállapítására a szükséges a nagyműszeres technikák (pl. NMR) alkalmazása, és habár ezek a módszerek szolgáltatják a legpontosabb információt, számos hátránnyal rendelkeznek a szűrési módszerrel szemben (az NMR-pH-titrálás kivitelezése nehézkes, jelentősen nagyobb mintamennyiséget, és időt vesz igénybe, így áteresztőképessége kicsi).

Köszönetnyilvánítás

A levelező szerző köszönettel tartozik a Richter Gedeon Nyrt. Kutatási Igazgatóságának korábbi és jelenlegi menedzsmentjéből Dr. Greiner Istvánnak és Dr. Keserű György Miklósnak, akik rábízta és szakmai tanácsokkal segítette a fizikai-kémiai alapú gyógyszerkémiai támogató tevékenység kialakítását, illetve Dr. Takácsné Dr. Novák Krisztina professzorasszonynak, aki az első években segítette a gyógyszerek fizikai-kémiájának mélyebb megismerésében. A szerzők köszönettel tartoznak Dr. Sente Lajosnak és Dr. Sohajda Tamásnak, akik tanácsaikkal segítettek ciklodextrinokkal végzett vizsgálatokat, illetve a CycloLab Kft-nek az ciklodextrin származékok biztosításáért.

Hivatkozások

- Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P.; Crison, J.R.; *Pharm. Res.* **1995**, *12* (3), 413-420.
- Brewster, M. E.; Másson, M.; Loftsson, T. *Am. J. Drug Delivery.* **2004**, *2* (4), 1-15.
- Biwer, A.; Antranikian, G.; Heinzle, E. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2002**, *59*, 609-617.
- Sente, L.; Szemán, J. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8024-8030.
- Sente, L.; Szejtli, J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, *36*, 17-28.
- CycloLab, *CD News* **2013**, *27* (2), 1-16.
- Brewster, M. E.; Davis, M.E. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 1023-1035.
- Miller, L. A.; Ahmed, I.; Carrier, R. L. *J. Controlled Release.* **2007**, *123*, 78-99.
- Iglesias, E.; Brandariz, I. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 3050-3063.
- Chen, Z.; Lu, D.; Weber, S. G. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 229-238.
- Avdeef, A. *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State (2nd Edition)*, Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, **2012**
- Kép: <http://www.sirius-analytical.com/resource-library/literature/brochures>
- Vargas-Hernández, C.; Vidal Salgado, L. E. *Am. J. Anal. Chem.* **2014**, *5*, 1290-1301.
- Holzgabe, U.; Kahle, C. *Chirality.* **2004**, *16*, 509-515.
- Dahab, A. A. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 6624-6637.

pH-metric titration as a versatile tool for physico-chemical based medicinal chemistry: study on the cyclodextrin complexation of drugs using (fast) UV-pH titration

In the early 2000s the management of Gedeon Richter Plc. decided on establishing an independent research group for profiling the physicochemical properties of newly synthesized compounds. The main objective of this group was to create and fine-tune methods for measurement of physicochemical properties which prior to that originated from *in silico* estimations only. As a result, adequate techniques were designed in order to measure the proton dissociation constant (pK_a) and lipophilicity ($\log P/D_{pH}$) by potentiometric and UV-pH-metric titrations, kinetic and thermodynamic solubility and chemical stability using 96-well plate-based methods and permeability using the 96-well sandwich plate-based PAMPA™ technique. During the creation of these methods we had to take into consideration that only miniscule amounts of compounds are available from molecules with diverse chemical structure, moreover we had to be able to provide information about numerous compounds within narrow time intervals. This article focuses on development of potentiometric and UV-pH-metric titration techniques which are widely spread methods for measuring physicochemical properties in the pharmaceutical industry.

In recent years the few monopolistic suppliers of instruments for potentiometric and UV-pH-titrations made significant improvements on their techniques in order to improve the classical pK_a and $\log P/D$ measurements and expand the applicability of potentiometric titration for solubility measurements also. Sirius Analytical Inc. improved their former GpKa instrument creating Sirius T3™ by reducing the amount of required sample and the titration volume by an order of magnitude and by shortening the time of measurements using a fully automated sample handling and reagent dosing system (Figure 1.). In addition, a new, potentiometric-based method was developed for measuring solubility values thus significantly reducing the time of classical solubility measurements. As a result, SiriusT3™ became a convenient tool for physicochemical characterisation of drugs that can satisfy the need for high-throughput methods in pharmaceutical drug development.

Absorption of orally administered drugs mainly depends on their solubility and permeability. Based on these physicochemical parameters APIs can be categorized into the four classes of the Biopharmaceuticals Classification System (BCS). The absorption rate of the API is limited by different aspects in each class. (Table 1.) Bioavailability of APIs in BCS classes II and IV might be increased by improving their solubility through complexation with cyclodextrins (CDs).

CDs are cyclic oligosaccharides bonding into a toroid structure which is capable of forming inclusion complexes with hydrophobic moieties of drugs due to its apolar interior cavity. Besides, the hydrophilic external surface of the toroid ensures good aqueous solubility thus increasing the solubility of complexed APIs. Depending on the number of glucose units in the toroid CDs can form host-guest complexes with molecules of various sizes. Due to these prosperous properties CDs and their derivatives are widely used in pharmaceutical products. Several cases have been already reported where CDs were successfully used for improving bioavailability (Table 2.).

For studying complexation with CDs we used UV-pH-titration that combines UV-vis spectroscopy with potentiometric titration. Using UV-pH titration we can determine the pK_a values of the APIs from pH-dependent absorbance changes. Adding CDs to the medium and monitoring the changes in pK_a values due to complexation the determined apparent pK_a values ($pK_{a,app}$) can help us to identify the CD derivatives capable of complexation with the APIs. By applying different concentrations of CD the strength of the complex can be determined also. Our goal was to establish a fast and screening-like testing method that can be easily used for this purpose.

Using the built-in Fast UV-pH assay of SiriusT3™ instrument we were able to create a screening method where using 300 μ l of CD stock solution the presence or absence of complexation can be detected. Table 4. contains the results of our tests for complexation with HPBCD. In several cases significant changes could be detected in the pK_a values, suggesting the presence of CD-API complexes. In the case of APIs with more than one pK_a value the extent of the changes were different for each pK_a value. Based on this we can determine which part of the molecule entered the CD cavity and which part is located outside of the toroid. According to the data it can be concluded that pK_a values belonging to basic groups undergo a negative change in pK_a while those of acidic groups show a positive change in pK_a value. This is in agreement with the fact that complexation diminishes proton-dissociation, hence decreasing the acidic or alkaline character of the groups. In few cases the change was opposite to the expected which might be explained by steric inhibition of protonation of which there are already examples in the literature.¹⁵

The established testing method can be used in practice for determining the adequate CD derivate and CD-API ratio for the *per os* formulations for *in vivo* animal testing. We can highlight that the method can provide information with high sensitivity from numerous samples using only miniscule amounts of samples and might also provide structural information. However, it should be noted that for exact structural identification of the host-guest complexes using high resolution techniques (e.g. NMR) might be necessary, albeit they have several disadvantages compared to the screening method.

Nagyműszeres szerkezetkutatás a Richter Gedeon Nyrt.-ben

Ifj. SZÁNTAY Csaba,* SÁNTA Zsuzsanna és HÁDA Viktor

Richter Gedeon Nyrt, Szerkezetkutatási osztály, Gyömrői út 19-21, 1103 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Kérdezzük meg az „utca emberét” arról, hogy mi az innováció egy olyan tömegcikkben, mint pl. a mobiltelefon vagy a számítógép. Ha nem is fog tudni a kérdésre technikailag korrekt választ adni, mégis lesz rá egy „makroszkópikus”, vagyis az emberi érzékszervi tapasztalás világába eső elképzelése, hiszen nagy valószínűséggel látta már mindkét termékfajta belsejét: a chip-eket, a processzort, a tápegységet, a memóriát, stb. Ezzel szemben, ha azt a kérdést tesszük fel, hogy mi az innováció egy gyógyszerben, az emberek zöme zavarba jön. Itt ugyanis az innováció a hatóanyag molekulájának a szerkezetében, illetve abban a képességben rejlik, hogy a molekulák szerkezetét tudatosan manipulálni tudjuk - ehhez pedig az kell, hogy „lássuk” ezeket a szerkezeteket. Ennek a molekuláris szintű „látásnak” a koncepciója olyasmis, ami kívül esik az emberi érzékelési tartományon és így sokak számára felfoghatatlan. Az pedig, hogy ez a „molekula-látás” milyen (spektroszkópiái) eszközökkel és milyen módon valósítható meg, végképp rejtélyes a legtöbb ember számára.

Természetesen a jelen közlemény nem az „utca emberét” célozza meg. Ennek ellenére, tapasztalataink alapján az előző gondolatokat a tágabb értelemben vett szakmán belül is bizonyos fokig relevánsnak érezzük, hiszen sokan a szerkezetkutatást amolyan misztikus, fekete-doboz jellegű szolgáltatásnak tekintik. Ezen felfogás szerint a szerkezetkutatás szerepe egyszerűen az, hogy egy ismeretlen szerkezetéről megmondja, hogy az „micsoda”; hogy eközben mi történik a „fekete dobozban”, az általában keveseket érdekel.

A helyzet a valóságban ennél sokkal, sokkal bonyolultabb! Közleményünk egyik célja, hogy olyan üzeneteket küldjünk a „fekete dobozon” kívülre, amelyek megvilágítják a szerkezetkutatás néhány olyan árnyalatát, amelyek meggyőződésünk szerint mindenki számára, akik a szerkezetkutatási szolgáltatást aktívan használják vagy csak érdeklődnek a téma iránt, hasznosak. Ennek kapcsán igyekszünk azt is bemutatni, hogy a Richterben a szerkezetkutatás milyen filozófiára épül és miért.

Utalva közleményünk címére, nagyműszeres szerkezetvizsgálat alatt tipikusan a mágneses magrezonancia spektroszkópiát (NMR), a tömegspektrometriát (MS), és az egykristály röntgendiffrakciót (XRD) szokás érteni. Míután XRD vizsgálatokra a Richter gyakorlatában viszonylag ritkán van szükség, ezeket a cég eseti alapon, külső megbízás formájában végezteti el. A szerkezetvizsgálatokban más (általában nem „nagyműszeresnek” tekintett) módszerek is fontos szerepet játszanak, mint például az infravörös (IR), az ultraibolya (UV), vagy a cirkuláris dikroizmus (CD)

spektroszkópia. Tekintettel a cég napi szerkezetvizsgálati praxisában jelentkező domináns szerepükre, a jelen közleményben a Richter Szerkezetkutatási osztályán üzemelő NMR és MS alapú szerkezetvizsgálatokat mutatjuk be, ezeket tekintve „nagyműszeres” módszereknek. Bár az osztályon az IR spektroszkópia is hangsúlyos szerepet kap, részben a jelen közlemény céljait, részben pedig a kompaktságot szem előtt tartva ezt itt nem tárgyaljuk.

A Richter Szerkezetkutatási osztálya több, mint 25 éves múltra tekint vissza. Egészen az utóbbi évekig, a cég hagyományos kutatási és fejlesztési profiljának megfelelően az osztály döntően „kismolekulás” (ami alatt a kb. 1000 daltonnál kisebb molekulatömegű molekulák értendők) szerkezetkutatással foglalkozott. A vállalati portfólió mintegy 10 évvel ezelőtt történt biotechnológiai irányú kiterjesztése óta az osztály fokozatosan növekvő szerepet vállalt a biomolekulák szerkezetvizsgálatában is (jelenleg az NMR műszeres kapacitás közel harmadát, az MS kapacitásnak pedig nagyjából a felét biomolekulák vizsgálata köti le). Jelen közleményünket a kismolekulás szerkezetvizsgálatok bemutatására korlátozzuk, tárgyalásunkban több szempontból is építve e témában korábban megjelent főbb közleményeink gondolatíságára.^{1,2}

Talán nem túlzás azt állítani, hogy fennállása óta nemcsak rengeteg tapasztalat gyűlt össze az osztályon, de ezzel párhuzamosan kiérlelődött egy markáns elvekre épülő, ugyanakkor flexibilis működési modell és szemlélet, amely a Richterben zajló szerkezetkutatási „modus operandi”-t a cég egyik fontos know-how jellegű értékévé tette.

Ahhoz, hogy bemutassuk, hogyan is működik a Richter kismolekulás szerkezetvizsgálati szolgáltatása, először arról kell szólnunk, hogy mennyire nem magától értetődő az, hogy egy gyógyszergyár milyen műszeres és emberi erőforrások biztosításával, milyen szervezeti konstrukcióban, milyen tudatossággal, milyen minőségi és mennyiségi elvárások, és milyen egyéb működési elvek alapján építi fel a saját szerkezetkutatását. Ennek megértéséhez fontos röviden tárgyalni a modern NMR és MS alapú szerkezetvizsgálatok néhány kevésbé közismert, illetve gyakran félreértett vonatkozását, továbbá az ehhez fűződő (és az irodalomban ritkán említett, de a valóságban nagyon is lényeges) „emberi tényezőket”, amik a kísérlet-tervezéskor, az adatok interpretációjánál, és az eredmények tálalásakor jelentkezők, valamint azokat a dilemmákat, amik a működési modell kialakításakor mind analitikusi, mind pedig rendszer-szinten felmerülnek. Mindezt egy gyakorlati példán keresztül is szemléltetjük.

* Tel.: 4314952; fax: 4326003; e-mail: cs.szantay@richter.hu

2. A szerkezetéről és annak modern NMR és MS alapú vizsgálatáról - árnyaltan...

A gyógyszeripari szerkezetvizsgálatok iránti elvárások folyamatosan növekednek mind technikai, mind pedig adminisztratív értelemben. Ez többek között abban jelentkezik, hogy egyre rövidebb idő alatt egyre kisebb anyagmennyiségekből egyre biztosabban kell GLP (good laboratory practice) körülmények között szerkezeteket meghatározni és ezt magas szinten dokumentálni. Mindez növekvő igényeket támaszt nemcsak a műszeres képességek, de a probléma megoldásában érintett kutatók együttműködésének, személyes kompetenciájának és felelősségének tekintetében is. Ezen kihívások hatékony kezelése szempontjából hasznos, ha a szerkezetkutatói szolgáltatást igénylők árnyaltabb képpel rendelkeznek a szerkezetvizsgálatok mibenlétéről. Alább ezzel a céllal próbálunk meg néhány fontosabb és érdekesebb szempontot felvázolni közérthető formában.

2.1. Mit is értünk „szerkezet” és „meghatározás” alatt?

A valóságban a szerkezetmeghatározás sokszor sem folyamatában, sem mélységében, sem pedig végeredményében nem olyan „fekete-fehér” dolog, mint ahogyan azt sokan gondolják. Érdeemes először is azt látni, hogy a „szerkezet” fogalma alatt sokszor mást ért egy szintetikus vegyész, egy MS -, vagy egy NMR szakember. Egy szintetikus vegyész számára a szerkezet többnyire a molekulának azt a statikus, kétdimenziós grafikus reprezentációját jelenti, amely jelzi, hogy milyen atomok milyen számban vannak jelen a molekulában, milyen konstitúcióval kapcsolódnak egymáshoz, milyen az egyes kötések jellege, milyen a sztereogén centrumok relatív konfigurációja, esetleg hol és milyen töltés helyezkedik el a molekulában. Indokolt esetben ehhez járul még a molekula abszolút konfigurációjának ismerete. Miután a vegyész számára ez az az információ, ami szükséges ahhoz, szintetizálja a kérdéses molekulát, ő leginkább ezt érti molekulaszervezet alatt.

Szerkezetmeghatározási szempontból az MS és NMR egymást kiegészítő jellegének igen fontos szerepe van, különösen ismeretlen szerkezetek esetén. A modern MS egyik legfontosabb szerepe, hogy információt ad a pontos molekulatömegről, ami lehetővé teszi az elemi összetétel egzakt meghatározását. Továbbá az MS/MS fragmentáció hasznos lehet a konstitúció meghatározásában - ugyanakkor ennek lehetősége nagyban függ az adott problémától és nem ad annyira megbízható információt, mint az NMR. Amennyiben a minta megfelelő mennyiségben és tisztaságban áll rendelkezésre, az NMR lehetővé teszi olyan egydimenziós (1D) vagy kétdimenziós (2D) spektrumok sokaságának az elkészítését, amelyek segítségével feltérképezhető a molekula teljes spin-spin topológiája mind a kötésekén át, mind a téren ható atomi kölcsönhatások tekintetében. Mindez lehetővé teszi a konstitúció és a geometria nagy pontosságú meghatározását. A szintetikus vegyész számára fontos szerkezeti információ túl, sokszor érdekes a molekula konformációs tulajdonságainak a feltérképezése, hiszen a biológiai hatás megértése szempontjából ennek nagy jelentősége lehet. A biológiai hatás illetve a molekulaszervezet időbeli változása vagy bomlása szempontjából a molekula más dinamikai

tulajdonságainak (például izomerizációs folyamatok vagy intermolekuláris kölcsönhatások) meghatározása is rendkívül fontos lehet - ezek vizsgálata szintén tipikusan NMR feladat.

Habár az NMR finomabb szerkezeti információt szolgáltat, az MS jóval érzékenyebb. Ennek az érzékenységbeli különbségnek nincs nagy jelentősége akkor, amikor megfelelő mennyiségű minta áll rendelkezésre (a szintetikus minták tipikusan ebbe a kategóriába esnek); ilyenkor az NMR és MS kiváló együttműködésben járulnak hozzá a szerkezet meghatározásához. Azonban a gyógyszeriparban igen gyakori, hogy olyan, rendkívül kis mennyiségű izolált minták vagy egy hatóanyag mellett megjelenő nyomszennyezők, bomlástermékek, illetve metabolitok szerkezetét kell meghatározni, amely már az NMR mérhetőségi szint alatt van vagy annak határait súrolja, ezért nagyrészt az MS adatokra kell támaszkodnunk. Ilyen esetekben a tömegspektroszkópusok sokszor meglehetősen boldogok, ha a konstitúcióra nézve plauzibilis javaslatot tudnak tenni, a molekula konfigurációs és konformációs aspektusait (érthető módon) figyelmen kívül hagyva. Így a tömegspektroszkópusok hajlamosak inkább konstitúciócentrikusan gondolkodni egy molekuláról, míg az NMR spektroszkópusok számára a térszerkezet és a dinamika is a szerkezet része. Amennyiben nincs napi szintű szoros együttműködés az MS és NMR spektroszkópus között (aminek a jelentőségére később visszatérünk), ez a szemléletbeli különbség abban nyilvánulhat meg, hogy az MS szakemberben fel sem merül, hogy egy mintát tovább kellene vizsgálni NMR-rel a térszerkezetre nézve, míg az NMR spektroszkópusok sokszor hajlamosak annyira biztosak lenni a konstitúcióban, hogy nem jut eszükbe, hogy az elemi összetételt MS-el ellenőrizzék, ami komoly hibalehetőség lehet (lásd alább).

Ugyancsak fontos azt látni, hogy egy szerkezet meghatározása bizonyos NMR vagy MS adatok alapján nem ugyanaz, mint a szerkezet NMR, illetve MS alapú jellemzése. Jelenleg a tudományos irodalomban nincs univerzálisan elfogadott szabály arra nézve, hogy pontosan milyen részletességű és minőségű kísérleti, illetve adat-interpretációs elemekből álló NMR és MS jellemzést kell adni ahhoz, hogy egy szerkezet egyértelműen jellemzettnek legyen tekinthető. A gyakorlatban ennek a jellemzésnek a szintje több tényező függvénye lehet, úgymint a vizsgált molekula szerkezeti specifikumai, a spektroszkópus személyes szokásai, az adott laboratórium tradíciói és elvárásai, az adott szakfolyóirat előírásai, a rendelkezésre álló műszeres lehetőségek, a vizsgált minta mennyisége és tisztasága, stb. Az általunk alkalmazott, hatósági beadványokhoz készülő ún. dokumentatív szerkezetvizsgálatokban minden esetben a teljes NMR és MS jellemzés a cél (ez máshol nem feltétlenül van így). Hogy egészen pontosan mit értünk teljes NMR és MS jellemzés alatt, az szintén függhet eseti tényezőktől, de általános elvként a teljes NMR jellemzés a molekula összes ^1H and ^{13}C rezonanciajelének biztos, közvetlen kísérleti bizonyítékon nyugvó asszignációját jelenti, indokolt esetben kiegészítve bizonyos szerkezeti aspektusok bizonyítására szolgáló narratívával. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy a molekulában az összes szükséges egykötéses és távolható ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C skaláris és (amennyiben szerkezetileg szükséges) dipoláris kapcsolatot fel kell térképezni a megfelelő 1D és 2D mérésekkel. Ezt ki kell egészíteni a pontostömeg méréssel és a mért MS fragmentációk szerkezeti értelmezésével.

Ugyanakkor, ahogy fentebb is említettük, a szerkezet meghatározása önmagában nem feltétlenül igényli a teljes NMR és MS jellemzést. A kémiai kontextus és az adott molekulacsaládra vonatkozó spektroszkópiai ismeretek birtokában gyakran könnyen és (ténylegesen vagy látszólag) nagy megbízhatósággal lehet igazolni egy molekula szerkezetét akár egy egyszerű 1D ^1H NMR spektrum és/vagy egy kifelbontású MS spektrum alapján. Ilyen esetekben egyrészt feleslegesnek és öncélúnak tűnhet, másrészt óhatatlanul további értékes műszer- és humán időt emészt fel, ha további 2D NMR vagy nagyfelbontású MS illetve MS/MS mérésekbe és azok kiértékelésébe bonyolódunk. Az ilyen gyors, de „minimalista” megközelítésnek megvannak a hátrányai a jellemezhetőségre és nagyon is reális veszélyei a szerkezeti konfidenciára (lásd később) nézve.

A „fekete dobozon” kívül általában kevésbé ismert, hogy mind az NMR, mind az MS szempontjából léteznek „barátságos” és „barátságtalan” minták illetve molekulák. A „barátságosság” ebben az értelemben azt jelenti, hogy azok a szerkezeti információk, amiket az NMR és MS képes egy molekuláról nyújtani, és amik szükségesek a szerkezet bizonyításához, valóban meg is mérhető egyértelmű adatok formájában. Másrésztől a „barátságtalanság” úgy értendő, hogy nehézségekbe ütközik vagy éppenséggel lehetetlen ezeket az adatokat megmérni. Ennek több oka és formája is lehet. Például egy minta NMR szempontból lehet „barátságtalan” annak okán, hogy túlságosan kevés van belőle és/vagy nem elég tiszta, míg ezek a tulajdonságok nem feltétlenül jelentenek korlátot MS szempontból. NMR szempontból egy molekula lehet „barátságtalan” például amiatt, hogy különösen zsúfolt, nem elsődrendű spinrendszerrel rendelkező, vagy rendkívül szélesek a jelek valamilyen kémiai kicserélődési folyamat vagy más relaxációs jelenségek okán. Hasonlóan, ha egy molekula nem ionizálódik jól, akkor MS szempontból „barátságtalan”. Természetesen az ideális eset az, amikor a minta és a molekula is NMR és MS szempontból is „barátságos” – ez az a helyzet, ami leginkább a szintetikus mintákra jellemző. Ugyanakkor a gyógyszeripari szempontból legizgalmasabb és legnagyobb üzleti tétet is hordozó szerkezetvizsgáló problémák (mint például a hatóanyag metabolitjainak, bomlástermékeinek, vagy gyártási nyomszennyezőinek meghatározása) sokszor vagy az NMR, vagy az MS, vagy mindkét módszer tekintetében a „barátságtalan” kategóriába esik. Az NMR kisebb érzékenysége, ugyanakkor nagyobb szerkezeti információtartalma miatt a gyakorlatban az NMR „barátságtalansága” szokta a nagyobb problémát jelenteni.

A fenti megfontolások azt mutatják, hogy bár a „szerkezetmeghatározás” kifejezés egy egyértelmű analitikai feladatot sugall (látszólag hasonlóan ahhoz, mint pl. a pH vagy egy oldat koncentrációjának a meghatározása), a valóságban ez a feladat bizonyos fokú plaszticitást hordoz magában a szerkezeti részletek, a jellemezhetőség, és ahogy azonnal látni fogjuk, a szerkezeti konfidencia tekintetében is.

2.2. Szerkezeti konfidencia

A szakfolyóiratokban vagy akár a vállalati dokumentációkban leírt szerkezeteket a világ szereti „tudományosan bizonyított tényként” elkönyvelni. Ezt a (kényelmes) hozzáállást

nagyban táplálja az az általános felfogás, miszerint a modern, nagy tudású NMR és MS spektrométerekkel mérhető adatok minősége, a szofisztikált módszertani eszközök egész tárházának rendelkezésre állása,^{2c,2d} valamint a legújabb spektrum-értékelő szoftverek használata a szerkezet „összerakását” majdhogynem olyan mechanikus folyamattá teszik, amely egyértelmű módon vezet a biztos szerkezethez. Nem kétséges, hogy ebben sok igazság van, azonban ez leginkább az NMR és MS szempontból „barátságos” esetekre vonatkozik. A valóságban azonban még az ilyen „tisztá” helyzetekben is meglepően könnyű hibás szerkezeti konklúzióra jutni. Úgy tűnik, ez a probléma egyre nyíltabb, őszintébb és tudatosabb formában kerül tárgyalásra a modern kémiai irodalomban.²⁻⁵ Itt kiemelendő egy olyan közelmúltbeli, nagyműszeres szempontból „barátságos” és klinikai vizsgálatokra váró gyógyszerjelölt hatóanyagok az esete, ahol is ennek a hatóanyagok az NMR és MS alapon történt szerkezetmeghatározása hibás volt, komoly üzleti és erkölcsi károkat okozva egy gyógyszeripari cégnek.⁴ Az eset kapcsán az is előtérbe került, hogy a szerkezeti hibára a hatóanyag éveken át tartó és számos alapos analitikai vizsgálatot megért előélete ellenére csak jóval később, egy másik gyógyszerkutatói cég vizsgálatai során derült fény. Továbbá, ahogy arról fentebb már szó volt, a gyógyszeripari szempontból leginkább figyelemreméltó szerkezetkutatói problémák notóriusan „barátságtalanok” NMR, és gyakran MS szempontból is. Ilyen esetekben a mérési adatok és egyéb, a szerkezet szempontjából relevánsnak tűnő ismeretek értelmezésében sokkal inkább jelennek meg olyan szubjektív emberi tényezők, amik méginkább magukban rejtik a tévedés lehetőségét. Sokak szerint a kémiai irodalom meglehetősen nagy számban tartalmaz hibásan meghatározott szerkezeteket, amelyek észrevétlenek maradnak.⁵

A közelmúltban alaposan elemeztük az ilyen hibák okait, rámutatva arra, hogy ezek legfőképpen nem a spektroszkópiai szakértelem hiányából vagy figyelmetlenségéből adódnak, hanem a gondolkodásunkat átszövő, nem tudatos ún. „mentális csapdák” (ezek a „mentális csapdák” nemcsak a szerkezetkutatásban jelennek meg, hanem a tudományos gondolkodás más területeit is érintik).^{2a,2b} Részletesen tárgyaltuk azt a kérdést is, hogy milyen esetekben tudnak a szoftveres NMR spektrumértékelő programok segíteni ezeknek a hibáknak az elkerülésében, és milyen esetekben nem.^{2e}

A számos „mentális csapda” közül, ami a szerkezetkutatásban megjelenhet,^{2b} reprezentatív jelleggel itt most csak egyet említünk röviden, a „ne-keress-tovább” szindrómát. Ez a csapda igen gyakori, és annak megértéséhez kapcsolódik, hogy amikor egy szerkezetet „megfejtettünk”, akkor valójában az történt, hogy egy olyan szerkezetet találtunk, amiről a tudományosan egzakt kijelentés nem az, hogy megtaláltuk a helyes szerkezetet, hanem hogy találtunk egy *olyan* szerkezetet, ami bizonyos általánosan elfogadott illetve a fejünkben élő kritériumok alapján *konzisztens* a mért kísérleti adatokkal és esetleg más, a probléma kémiai kontextusára vonatkozó ismeretekkel (vagy vélelmekkel). Gyakran fordul elő, hogy egy nehéz, nagy kihívásokkal járó, esetleg komoly intézményi nyomás alatt vizsgált szerkezetmeghatározási probléma kapcsán a végre „megfejtett” szerkezet a spektroszkópusban olyan Heuréka!-érzést vált ki, aminek okán nem gondol bele

alaposabban abba, hogy esetleg más szerkezetek is lehetnek konzisztensek a kísérleti adataival, és így nem keres tovább. Természetesen, a konzisztencia megléte gyakran valóban a helyes szerkezetet takarja, de nem mindig. Minél több és jobb minőségű kísérleti adat van a kezünkben, annál inkább leszünk a lehetséges konzisztens szerkezetek száma, ezért is fontos, hogy a lehetőségekhez mérten törekedjünk az adatbőségre. Az irodalomban megjelent hibás szerkezetek jó része ebből a csapdából származik, és a saját praxisunkban is gyakran találkozunk vele.

Mint alább látni fogjuk, a korai felfedező kémiai kutatási szakaszban lehetséges olyan kutatási stratégiát alkotni, amelyben a szerkezeti konfidenciának a gyorsabb átfutás érdekében nem feltétlenül kell maximálisnak lennie. Ilyen megközelítés mellett azonban igen fontos, hogy az ezzel járó kockázatvállalás intézményi szinten tudatos legyen. Ettől eltekintve, általánosságban és alapelveként a szerkezetkutatásnak, mint tudományos tevékenységnek, a maximális szerkezeti konfidenciát kell megcéloznia. A hibázás lehetőségeinek megértése alapján^{2a} ehhez négy fő tényező kell: a) szaktudás; b) megfelelő minőségű nagyműszerek; c) komplex („holisztikus”) analitikai megközelítés (lásd alább); d) a „mentális csapdák” ismerete és tudatos elkerülése.

3. A Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutatási osztályának bemutatása

Különböző gyógyszeripari cégek különböző szintű tudatossággal és más-más filozófiával, ebből adódóan pedig más-más működési modelleket felállítva valósítják meg a szerkezetkutatást. A Szerkezetkutatási osztály tevékenysége hangsúlyosan a „high-end” tömeg- és NMR spektroszkópiára, kisebb részben az IR spektroszkópiára, valamint az ezeket funkcionálisan kiegészítő kapcsolt elválasztási technikákra és egyéb szoftveres és hardveres támogatásra épül. Az a szerkezetkutatási szolgáltatás, amit az osztály nyújt a Richter számára öt olyan, egymással szoros összefüggésben levő jellemzőre épül, amelyek egyikének sem magától értetődő a megléte, ugyanakkor egyedileg is, de legfőképpen összességükben, ezek a jellemzők (szerintünk) magas minőségű és hatékonyságú szerkezetanalitikai támogatást biztosítanak. Az alábbiakban ezeket a jellemzőket vesszük röviden sorra.

3.1. Centralizált szerkezetkutatási szolgáltatás

A cég alapvető filozófiája, hogy az NMR és MS alapú szerkezetvizsgálatokat maximális mértékben tartsa házon belül, vagyis az ezzel kapcsolatos műszeres kapacitás és emberi szaktudás cégen belül álljon rendelkezésre. (Tekintettel a nagyműszerek tetemes beruházási és fenntartási költségére, valamint az ezeket üzemeltető speciális képzettségű szakembergárda alkalmazásának problematikáira, vannak olyan gyógyszergyárak, ahol a nagyműszeres szerkezetkutatást külső cégekkel végeztetik el). A házon-belül tartás ugyan költséges, viszont nagy előnyei közé tartozik, hogy 1) egy gyógyszergyár tudáskincsének egyik legfőbb eleme, azaz a molekulaszervezetek ismerete cégen belül marad; 2) nagyfokú interaktivitást tesz lehetővé az analitikai szolgáltatásban a vegyészek és a szerkezetkutatók között (ennek óriási jelentősége lehet

a szolgáltatás minősége és sebessége tekintetében); 3) a hatósági céllal készülő szerkezetvizsgálati dokumentumok házon belül születnek meg; 4) összességében a szerkezetvizsgálati know-how házon belül termelődik és itt válik kamatoztathatóvá.

A Richter a kiemelt képességű NMR és MS spektrométereit a cég egészét kiszolgáló központosított formában üzemelteti, ilymódon a cég egésze számára elérhető egy „state-of-the-art” spektrométerekre, ezek egymást komplementer módon kiegészíteni tudó jellegére, valamint cég-specifikus humán know-how-ra épülő szerkezetfelderítési potenciál. A gyógyszeriparban a szerkezetfelderítés igénye rengeteg területre terjed ki. A legfontosabb ilyen alkalmazások a következők. a) Gyógyszerkémiai szintézistámogató szerkezeti analitika. b) Egy gyógyszerjelölt molekula főbb metabolitjainak szerkezetmeghatározása azzal a céllal, hogy ezek biológiai hatása tesztelhető legyen, és/vagy hogy ismeretükben a gyógyszerjelölt metabolikus stabilitása növelhető legyen. c) A méretnövelések során előálló nyomszennyezők meghatározása azzal a céllal, hogy a technológiai körülményeket a lehető legnagyobb tisztaságú hatóanyag előállítása érdekében lehessen optimálni (quality by design). d) Hatóanyag stabilitási tesztek során keletkező bomlástermékek szerkezetének meghatározása hatósági elvárásként illetve azért, hogy ezek ismeretében megfelelően hosszú lejárati időt biztosító kiserelési formát lehessen fejleszteni. e) Hatóanyag gyártási nyomszennyezők szerkezetmeghatározása szintén hatósági követelményként, valamint azért, mert a nyomszennyezői profil egy adott gyártási technológiát egyedi módon, ujjlenyomatszerűen jellemez, ezért ennek ismerete pl. a gyógyszeripari versenyhelyzetből adódó szabadalomtörési perekben kulcskérdés lehet. f) A szigorú analitikai ellenőrzések során a specifikációkon esetleg kívül eső gyártási hatóanyag sarzsokkal összefüggésben gyakran felmerül, hogy a probléma lehetséges okát szerkezetkutatási oldalról is vizsgálni kell. g) Hasonló szerkezetvizsgálati kérdések merülnek fel készítményanalitikai szinten, amikor is a gyógyszerformula fejlesztése során megjelenő új nyomszennyezőket és degradánsokat kell azonosítani, ami a hordozóanyagok jelenléte miatt különösen nagy kihívást jelenthet. h) Minőségellenőrzési céllal a hatóságok vagy más üzleti partnerek felé dokumentált szerkezetvizsgálatok, amelyeknek egyik legfőbb célja, hogy szakmai tartalmukban és megjelenítési formájukban is kétséget kizáró módon tükrözzék az adott termék minőségét. i) Vásárolt hatóanyagok, intermedierek, segédanyagok analitikája kapcsán felmerülő szerkezetvizsgálatok, amelyek célja, hogy ellenőrizzük a beszállítónak a szerkezetre vonatkozó analitikai állításait (nem ritka, hogy tekintélyes, de a Richterhez képest kevésbé fejlett NMR műszerezettség és tudást birtokló cégek helytelen szerkezettel, illetve szerkezeti interpretációval adnak el ilyen termékeket, amikor is a reklamációt csak egyértelműen meggyőző, saját szerkezeti analitikával tudjuk érvényre juttatni). j) Szabadalmi beadványok és iparjogvédelmi perek kapcsán felmerülő szerkezetvizsgálatok; utóbbi esetekben többnyire az eljárásra jellemző intermedierek és/vagy szennyezők szerkezetét kell igazolni olyan műszerezettség és szakmai érvek felvonultatásával, ami a bíróság számára nem hagy kétséget (egy ilyen per elvesztése a cég számára nemcsak közvetlen anyagi veszteséggént jelentkezhet, hanem, miután

a gyógyszerek bizalmi termékek, az ezzel járó erkölcsi veszteség is rendkívül káros lehet, nem is beszélve az érintett szakemberek felelőségéről). *k)* Új, természetes eredetű vegyületek szerkezetének azonosítása. *l)* A biotechnológiai programokban az oldatfázisú hatóanyagok és készítmények tárolására használt eszközök anyagából kioldódni képes ún. „extractable” és „leachable” kismolekulás nyomszennyezők azonosítása.

Annak, hogy a fentebb vázolt feladatokat egy centralizált nagyműszeres szolgáltatás formájában valósítjuk meg, számos előnye van. Egy molekula vagy molekulacsalád, annak teljes gyógyszergyári életciklusa során számos szervezeti egységet „megjár” és – amint azt a fentiek is érzékeltették – eközben számos különböző típusú szerkezetvizsgálati probléma vetődhet fel. A központosított szerkezetkutatás azt biztosítja, hogy ilymódon egy helyen csapódik le és tárolódik mindaz a nagyműszeres spektroszkópiai ismeretanyag, ami az adott molekulacsaládhoz kapcsolódik. Ez lehetőséget ad például arra, hogy alapos (célszerűen a szerkezet meghatározásához minimálisan szükségesnél mélyebb) ismereteket szerezzünk egy molekuláról még korai, szintetikus fázisában, amikor az viszonylag nagy mennyiségben és tisztán áll rendelkezésre. Később ugyanezen az osztályon és többnyire ugyanannál a spektroszkópus szakembernél jelennek meg az adott molekulával kapcsolatosan felmerülő metabolit vagy nyomszennyező azonosítási problémák. Ebben a fázisban, lévén hogy többnyire már jóval kisebb, sokszor az NMR vagy MS érzékenység határait súroló anyagmennyiségekkel kell elboldogulni és általában többkomponensű mintákkal kell dolgozni, lényegesen nehezebb, vagy éppenséggel lehetetlen azokat a spektrális információkat megmérni, amik a szerkezet egyértelmű megfejtéséhez ideális esetben szükségesek lennének. Ilyenkor a sikeres szerkezetmegfejtés érdekében gyakran kulcskérdés, hogy a korábban megszerzett ismeretek referenciaadatként rendelkezésre álljanak. A praxisunk során rengeteg olyan esettel találkozunk, ahol egy ismeretlen nyomszennyező sikeres szerkezetmeghatározása döntően azon múlt, hogy a szükséges NMR és MS háttér adatok osztályunkon rendelkezésre álltak.

3.2. „Főállású” spektroszkópusok

Amint azt korábban részletesebben is tárgyaltuk,¹ az NMR és MS kismolekulás szerkezetvizsgálati célú alkalmazása érdekes „evolúciót” mutat az ehhez kapcsolódó szaktudás tekintetében. Mindkét alkalmazás világszerte kb. az 1970-es évektől kezdett robbanásszerűen terjedni a kémikusok körében. A „spektrumfejtés” tudománya ekkoriban még fejlődésének kezdeti stádiumában volt, tehát azok az ismeretek, szabályszerűségek, amik a szerkezetmeghatározás mesterségbeli know-how elemeit képezik, ekkortájt kerültek felfedezésre. Ezidőben többnyire a vállalkozó szellemű vegyészek még maguk próbálták megtanulni a spektruminterpretáció fogásait. Az NMR és MS rohamos módszertani fejlődése, a spektrométerek komplexitásának növekedése és a mérés technikai know-how egyre sokrétűbbé válása azonban hamarosan „egész embereket” követelt meg erre a célra. Így léptek színre azok a vegyész munkát támogató kismolekulás szerkezetanalízisre szakosodott NMR és MS szakemberek, akik hatalmas spektroszkópiai ismeretanyag és tapasztalat hordozóivá váltak. Ez vezetett oda, hogy a legtöbb gyógyszeripari intézményben valamilyen

formában kialakult egy „professzionális” szerkezetkutatási szolgáltatás. Később, nagyjából az 1990-es évektől kezdődően, megindult a spektrométerek felhasználóbarát üzemmódban való működtetésének modern és erőteljes tendenciája, azaz a készülékek (bizonyos alkalmazási korlátok között) a szintetikus kémikusok által is könnyebben használhatókká váltak. Ezek a tendenciák indították el az „önkiszolgáló” (open-access) NMR és MS spektrométerek korszakát, ami hamar elvezetett oda, hogy a kismolekulás szerkezetvizsgálatok sok intézményben számottevő mértékben visszakerültek a szintetikus vegyészek saját hatáskörébe.

Ezen tendenciák fényében közel sem magától értetődő, hogy egy gyógyszeripari intézmény szervezeti, stratégiai, munkaköri értelemben hogyan viszonyuljon a főállású kismolekulás NMR és MS spektroszkópusi szakma státuszához. Tapasztalataink alapján azonban teljes egyértelműséggel kijelenthetjük, hogy egy olyan, a minőség, a hatékonyság és a versenyképesség növelése iránt elkötelezett cég, mint amilyen a Richter is, akkor jár el helyesen, ha ez a specializált műszeres, módszertani és spektruminterpretációs szaktudás mindenkor megfelelő erővel a rendelkezésére áll. Érdemes ennek okaira néhány olyan tényezőt keresztül felhívni a figyelmet, amelyek a gyógyszeriparon kívül nemigen ismertek, de jelentőségük még a gyógyszeriparon belül sem általánosan ismert vagy felismert. Egyrészt fontos hangsúlyozni, hogy egy olyan közegben, ahol minden tévesen megállapított molekulászerkezetnek komoly üzleti vonzata lehet, fokozottan indokolt lehet, hogy a szerkezetmeghatározás független analitikai szemmel történjen, hiszen a vegyészek óhatatlanul inkább hajlamosak a saját szintetikus munkájuk során várt szerkezetet „belelátni” a spektrumokba.^{2a,2b} Másrészt a gyógyszeriparban nemcsak az analitikai eredmény a fontos, hanem az adatok GLP szempontok szerinti mérése és dokumentálása, illetve az eredmények hatósági szempontból megfelelően meggyőző és szakmailag helytálló írásos közlése is. Ez pedig a szakterület csinijait-bínjait (beleértve a „mentális csapdákat”) jól ismerő, azért felelősséget vállaló és abban felelősségre is vonható szakembereken keresztül biztosítható a leginkább. Harmadrészt, a fentebb említett centralizáltság nyilvánvalóan csak egy „dedikált” spektroszkópusi csapattal valósítható meg ideális módon. Mint ahogy korábban már tárgyaltuk, ennek nagy előnye, hogy ugyanaz az spektroszkópus szakember végig követheti egy molekula vagy molekulacsalád gyógyszeripari életciklusát a kezdeti szintézistől a metabolitokon át a gyártási nyomszennyezőkig és bomlástermékekig, ezzel sokszor nagymértékben felgyorsítva és biztosabbá téve utóbbiak szerkezetmeghatározását. Negyedrészt az is nyilvánvaló, hogy csak professzionális spektroszkópusoktól várható el reálisan, hogy a versenyképesség fenntartásához szükséges új metodikák fejlődését nyomon kövessék és a szükséges módszereket adaptálják, illetve új műszeres beruházásokat kezdeményezzenek.

Egy, a fenti gondolatokkal szorosan összefüggő és a tényleges szerkezetvizsgálati működési protokoll kialakítását nagyban befolyásoló rendszerszintű dilemma például az, hogy a gyakorlatban milyen felelőségek, milyen kockázatvállalási elvek, és milyen döntési hatáskörök vezéreljék a választást, hogy egy szerkezetvizsgálat open-access vagy

„professzionális” alapon történjék-e meg. Az open-access alapú szerkezetvizsgálatok egyik nagy előnye, hogy adott vegyész adott molekulája nem kerül be a professzionális szerkezetvizsgálatok erősen terhelt gépezetébe (amit egy nehezebb probléma bármikor lelassíthat), és így a vegyész általában jóval gyorsabban juthat szerkezeti információhoz. A másik előny, hogy ily módon a professzionális szolgáltatást is kevesebb „rutin” jellegű terhelés éri, ezzel több teret adva a nehezebb problémákkal való foglalatosságnak. Ugyanakkor az open-access vizsgálatok veszélyeivel is tisztában kell lennünk. Az open-access alapú műszeres operátori ismeretek tipikusan csak olyan spektrális adatok megmérését teszik lehetővé, amik gyakran nem elégségesek a szerkezet helyes megfejtéséhez illetve a teljes spektrális jellemzéséhez, továbbá az adatinterpretáció tekintetében nem kellően képzett, a várt szerkezet iránt gyakran elfogult vegyész a fentebb tárgyalt okokból könnyen téves szerkezetre juthat. Ez a problémakör döntően a felfedező kémiai programokat érinti. Ezekben a programokban ugyanis nagy jelentősége van annak, hogy a vegyészek időegység alatt minél több különböző szerkezetű vegyületet szintetizáljanak és adjanak le a központi vegyülettárba (más néven molekulabankba), ezért itt merül fel leginkább a minél gyorsabb szerkezeti analízis igénye. A vállalati molekulabank képezi az alapját a különböző indikációs területeken elvégzett *in vivo* és *in vitro* biológiai teszteknek, valamint azoknak a számítós kémiai molekulatervezési projekteknek, amelyek alapján a gyógyszerjelölt molekulák kifejlesztését célzó további szintetikus lépések megtervezése történik. Ideális esetben a vegyülettárban regisztrált vegyületek kivétel nélkül biztosan ismert és jól karakterizált szerkezettel rendelkeznek, hiszen erre a biztos tudásra lehet jól építeni a gyógyszerkémiai megfontolásokat és molekulatervezési számításokat. Az open-access megközelítés ugyan gyorsabb átfutást biztosít és így gyorsabban növeli a molekulabankba bekerülő vegyületek számát, azonban ennek az ára, hogy ez alacsonyabb konfidencia- és jellemezhetőségi szinten történik, növelve a tévesen megadott szerkezetek valószínűségét. Ez később visszaüthet, mivel félreveheti a molekulatervezési számításokat és egyéb szerkezet alapú gyógyszerkémiai tervezéseket, továbbá kiderülhet, hogy például egy beadandó szabadalomhoz nem elég a vegyületek spektroszkópiailag jellemezhetőségi szintje, azaz újra kell mérni őket. Mindez tehát olyan kérdéseket vet fel, amire nincsenek könnyű válaszok. Mint alább látni fogjuk, a spektrométerek minősége perdöntő lehet abból a szempontból, hogy ezek a kockázatok minimalizálhatók legyenek.

3.3. Holisztikus munkafilozófia

Osztályunk a professzionális szerkezetvizsgálatokat tekintve alapvető céljának tekinti a lehető legkisebb átfutási idő mellett a lehető legtöbb esetben az egzakt szerkezeti megoldásra és ennek megfelelő részletességű spektrális karakterizálásra való törekvést. Bár ez a szándék magától értetődőnek tűnhet, gyakorlati megvalósítása számos nehézségbe ütközik. Osztályunkra évente több, mint 3000 minta érkezik szerkezetvizsgálatra, ezeknek kb. 10%-a eltér a vegyész vagy a kémiai intuición alapján várt szerkezettől, és kb. ugyanilyen mértékben fordulnak elő olyan esetek, amikor a „rutin” spektrumok felvételével csak NMR alapon, vagy csak MS alapon történő szerkezetmeghatározás helytelen eredményre vezetett volna. Ugyancsak gyakori

helyzet például az, hogy egy vegyület szerkezetében nagy valószínűséggel biztosak lehetünk pusztán az ^1H NMR spektrum egy részlete alapján – ez tehát önmagában még nem indokolná a lényegesen több műszer- és humán időt igénylő teljes ^1H és ^{13}C asszignáció elkészítését és MS spektrumok felvételét – de a téma egy későbbi fázisában, amikor ezeknek az adatoknak a megszerzésére nem vagy csak nehezen van lehetőség, kulcsfontosságúvá válhatnak. Ilyen eset állhat elő például egy rokon molekula vizsgálatánál, vagy olyankor, amikor hatósági/szabadalmi céllal utólag a molekula teljes spektrális jellemzésre van szükség. Munkafilozófiánk szerint ezért a lehető legnagyobb szerkezeti biztonság illetve a „proaktív” adatgyűjtés érdekében minden mintáról készítünk NMR és MS spektrumokat, és törekszünk arra, hogy az átfutási idő minimalizálásának kényszere által nyújtott lehetőségeken belül a lehető legtöbb mintáról készüljenek a teljes ^1H és ^{13}C asszignációt lehetővé tevő NMR spektrumok, továbbá törekszünk a kísérleti adatokkal konzisztens összes szerkezeti alternatíva tudatos keresésére és kizárására. Ennek megfelelően az osztály csakis az NMR, IR és MS spektroszkópus szakemberek konszenzusa alapján ad ki szerkezetet, tehát az egymásnak ellentmondó vagy ellentmondani látszó NMR, IR és MS kísérleti adatok és/vagy következtetések esetében az ellentmondás okait minden esetben fel kell tárni. A végső szerkezetről kiadott dokumentumban azt is jelezzük, hogy egy házon belül definiált és a vegyészek által is ismert skálán milyen szerkezeti konfidenciaszintet illetve jellemezhetőségi szintet tudunk a kiadott szerkezethez rendelni. A tapasztalat szerint a szerkezeti megfejtésnek az ilyen skála szerinti besorolása önmagában is nagyban segít, hogy a spektroszkópusok a „mentális csapdákat” tudatosabban kezeljék, és hogy a vegyész kollégák a szerkezetet ne feltétlenül vegyék „készpénznek”.

Az a munkamódszer, amely szerint a szerkezetvizsgálati eredmények főállású NMR és MS spektroszkópusok napi szintű szoros munkahelyi konzultációban történő egyeztetése és a fenti filozófiára alapozott felelősségvállalása alapján születik, tudomásunk szerint ritka. Ugyanakkor ennek a munkastílusnak a haszna gyakran tetten érhető, legfőképpen amikor csak a két módszer együttműködése világít rá egy váratlan szerkezeti problémára.

3.4. Csúcsműszerezettség

Amint arról már szó volt, a szerkezetkutatás átszövi egy gyógyszergyár tevékenységének szinte egész vertikumát. Az, hogy egy gyógyszergyár erre a célra mekkora és milyen színvonalú műszerparkot tartson fenn, illetve azt milyen szervezeti struktúrában üzemeltesse, korántsem egyszerű kérdés. Az egyik oldalon a gyógyszeripari versenyhelyzet és a folyamatosan szigorodó hatósági követelmények, valamint a néha már abszurd mértékű minőségi elvárások, a lehető legnagyobb tudású spektrométerek alkalmazását látszanak kikényszeríteni. A másik oldalon azonban számolni kell ezeknek a készülékeknek a megvásárlási, fenntartási, infrastrukturális és amortizációs költségeivel. Mindez óriási összeg, ami ráadásul rohamosan növekszik a megvásárolni kívánt készülékek teljesítőképességével. Erre a dilemmára való tekintettel egy gyógyszeripari cég számára a szerkezetkutatás műszerezettségének a meghatározása stratégiai kérdés kell, hogy legyen. Véleményünk szerint egy

cég stratégiai nagyműszereinek színvonala jól tükrözi a cég elkötelezettségét a kutatás és a termelés minősége, valamint az innováció iránt.

A Szerkezetkutatási osztály NMR műszerparkjának zászlóshajója jelenleg egy 800 MHz-es, hűtött mérőfejjel ellátott, igen nagy érzékenységgű készülék, míg az MS műszerpark csúcsműszere egy Fourier-transzformációs, lineáris ionsapdával ellátott, ultranagy felbontású spektrométer. Amint azt korábban részletesen tárgyaltuk,^{1,2} az ilyen csúcsműszerek használatának gyakorlati jelentősége a kismolekulás gyógyszeripari szerkezetvizsgálatokban óriási lehet. E tekintetben (és leginkább az NMR-t illetően, amelynek köztudottan az érzékenység a „gyenge pontja”) érdemes az érzékenység jelentőségének két aspektusára felhívni a figyelmet. A mikrogrammok világán belül, tehát az extrém kis mennyiségű minták vizsgálatánál könnyen érthetőnek tűnik, hogy miért lényeges a minél nagyobb NMR érzékenység. Itt ugyanis átlagos műszerezettség mellett az ismeretlen komponensek szerkezetét vagy csak alacsony konfidencia szinten, vagy igen hosszú idő alatt, vagy egyáltalán nem lehet meghatározni. Ugyanakkor a nagy érzékenység és felbontás jelentőségének számos gyakorlati vonatkozását csak kevesen realizálják. Ezzel kapcsolatosan fontos ismét hangsúlyozni, hogy az NMR spektroszkópia nagyságrendekkel érzékletlenebb, mint a tömegspektrometria, ami azt jelenti, hogy a gyógyszeripari szerkezetfelderítés egyik legfontosabb és leginkább problémás területén, azaz a mikroszennyezők és metabolitok világában nehéz az NMR-t és MS-t holisztikusan «összedolgoztatni». Az ultranagy NMR érzékenység éppen arra ad lehetőséget, hogy a lehető leggyorsabb és legbiztosabb szerkezetazonosítás érdekében a holisztikus megközelítést részben az NMR spektroszkópián belül, részben pedig a tömegspektrometriával karöltve jó minőségű és bőséges adatok gyors begyűjtésével valóban meg tudjuk valósítani.

A nagy érzékenység ugyanakkor a milligrammok világában, tehát elsősorban a szintetikus vegyészek által szolgáltatott minták vizsgálatánál is hallatlan előnyöket nyújt a gyakorlatban. Miután egyetlen minta teljes NMR asszignációja, azaz nagybiztonságú és a fentiekben említett «proaktív» NMR-es szerkezetmeghatározása tipikusan ¹H, ¹³C és legalább négyféle további kétdimenziós NMR spektrum felvételét igényli (heterociklusok konstitúciójának igazolásához gyakran még többkötéses ¹H-¹⁵N korrelációs spektrumra is szükség van), egy átlagos kismolekula 3 mg-nyi mennyiségének teljeskörű NMR vizsgálata a 400 MHz-es készüléken kb. 15 órát, az 500 MHz-es készüléken kb. 4 órát, a 800 MHz-es készüléken pedig kevesebb, mint 1 órát igényel. Nagyobb molekulatömegű vegyületek esetében ezek a különbségek még drámaibb módon növekednek tovább. Ezen adatokból láthatóan, a 800 MHz-es készülék érzékenysége és felbontása azt a lehetőséget adja, hogy rutinszerűen minden mintáról elkészítsük a teljes ¹H és ¹³C asszignációhoz szükséges méréseket anélkül, hogy ez az átfutási időben veszteséget okozna. Ez nagyban növeli a szerkezetmeghatározás biztonságát és nagy valószínűséggel szükségtelenné teszi, hogy ugyanarról a mintáról ismételt mérésekkel további adatokat kelljen begyűjteni, amennyiben a spektruminterpretáció során kiderül, hogy az addigi adatok nem elégségesek. Ez lehetőséget ad arra is, hogy a szintetikus kémia miniatürizálódási tendenciáinak megfelelően kisebb

mintamennyiségeket adjanak le vizsgálatra, és biztonságot nyújt abból a szempontból, hogy a teljes asszignáció utólag bármikor elkészíthető egy molekuláról. A nagy felbontás és érzékenység okán akár többkomponensű mintákban a minor komponensek szerkezetét is meghatározhatjuk (elválasztás nélkül), ami néha rendkívül nagy segítséget jelent a vegyésznek.

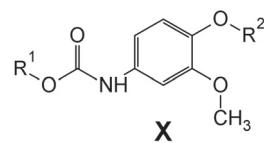
3.5. Tudományosság

Mivel a gyógyszeripari kutatások elsődlegesen üzleti érdekeltiségek és többnyire vállalati titkot képeznek, az ilyen kutatásokból származó eredmények tudományos folyóiratokban való publikálása általában komoly nehézségekbe ütközik. Ugyanakkor a minőségi kutatói létnek, a kutatói szakmaiság fejlesztésének elengedhetetlen része a publikálás. A gyógyszeriparból származó tudományos publikációk továbbá erősítik egy cég piaci megítélését is, hiszen tükrözik a cég kutatásának minőségét („quality of science”). Osztályunk is elkötelezett aziránt, hogy ne csak ipari kutatóhelyként, hanem a lehetőségekhez képest tudományos műhelyként is működjék. Nemcsak meggyőződésünk, de a napi tapasztalatunk is az, hogy ez az – iparban korántsem mindenhol felvállalt – attitűd a mindennapi munkában is olyan igényességet és innovatív hozzáállást teremt, amely nélkül nem lehet igazán versenyképes és minőségi szerkezetkutatási szolgáltatást nyújtani.

4. Egy példa

A fentebb leírtak relevanciáját számos olyan tudományos közlemény demonstrálja, ami az osztályon, illetve az osztály munkatársainak közreműködésével az elmúlt 25 év során született, és amelyekből itt most csak néhány reprezentatív cikkre hivatkozunk.^{1,2,6-15} Ebből kiemelendő a 2-es hivatkozásban megadott könyv, ami a jelen cikk szempontjából a leginkább aktuális, és amelyben több idevágó esettanulmányt is részletesen tárgyaltunk.^{2f-k} Ezek közül most az alábbi jellemző példát ragadjuk ki, erősen rövidített változatban.²ⁱ

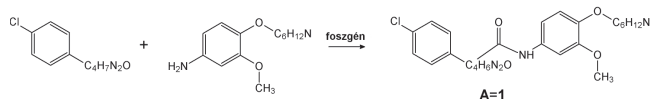
A példa kémiai kontextusát a korai fázisú felfedező kémiai programok egyike adja – ezekben az a cél, hogy egy adott molekulavázzal rendelkező vegyület funkciócsoportjainak szisztematikus módosításával nagyszámú hasonló vegyület kerüljön előállításra a hatás-szerkezet összefüggések feltérképezése érdekében. A jelen példában a molekulaváz egy 3,4-diszubsztituált anilidet tartalmaz középen, egy aromás vagy alifás gyűrűt az egyik oldalon, és egy alifás amint a másikon (1. Ábra). Az X általános képletű vázzal kapcsolatban a vegyészek egyik feladata az R¹ csoport módszeres változtatása volt.



1. Ábra. Az X általános képletű molekulaváz.

Az így előállított molekulacsalád NMR vizsgálata folyamatos nehézséget jelentett, mivel az amid csoport

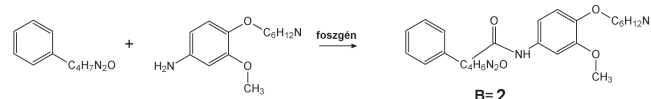
gátolt rotációja folytán a jelek egy része rendkívül széles volt az ^1H NMR spektrumokban - azaz egy NMR szempontból „barátságatlan” molekulacsaláddal volt dolgunk, ahol a teljes NMR asszignációhoz minden esetben hosszadalmas hőmérsékletfüggő méréseket kellett volna végezni. A 2.2 pontban kifejtett okokból kifolyólag, a szerkezeti konfidenciával kapcsolatos elvárásokat csökkentve a várt szerkezetek verifikálását leginkább a kifelbontású MS-sel meghatározott molekulatömeg alapján és a kémiai kontextusra támaszkodva végeztük el, az ^1H NMR spektrumnak mindössze annyi szerepet szánva, hogy az ne mondjon ellent a várt szerkezetnek. Ez a megközelítés nagyszámú megvizsgált **X** származék esetében kényelmesnek, gyorsnak és megbízhatónak bizonyult, annál is inkább, mert az R^1 csoport változtatását célzó kémiai reakciók is robotszuszak voltak, tehát senki nem várt semmilyen kémiai „meglepetést”. Ebben a helyzetben a molekulacsalád egyik „deviáns” tagja ébresztett rá minket ismét, hogy ez a rutin megközelítés milyen veszélyekkel járhat. A következő történet.



2. Ábra. Az **1** szerkezet előállítását célzó reakció.

A 2. ábrán bemutatott reakcióban (titkossági okokból a molekulaképleteknek csak a tárgyalás szempontjából releváns részeit mutatjuk) az **A**-val jelölt vegyület keletkezett, amelynek a kémiai megfontolások alapján várt szerkezete **1** volt. Ezt a vegyületet küldték el a Szerkezetkutatási osztályra gyors szerkezetverifikálás céljából. A kifelbontású MS-sel mért molekulatömeg teljes egyezésben volt **1** elméleti molekulatömegével, és a klóratom is egyértelműen detektálható volt az MS spektrumban. A molekulacsaládnál megszokott módon, a szobahőmérsékletű ^1H NMR spektrum meglehetősen „ronda” volt, nehezen értelmezhető széles jelekkel, de ugyanakkor jól látható módon mutatta az **1** szerkezet néhány jellegzetes elemét (pl. az OCH_3 csoportot és az aromás jeleket). Mindennek alapján úgy ítéltük meg, hogy **A** szerkezete megfelel a várt **1**-nek.

Ezt követően a vegyész a 3. ábrán bemutatott, tetrahydrofuran (THF) oldószerben végrehajtott reakcióban előállította a **2** szerkezetűnek várt **B** vegyületet, vagyis **1** klóratom nélküli analogját.



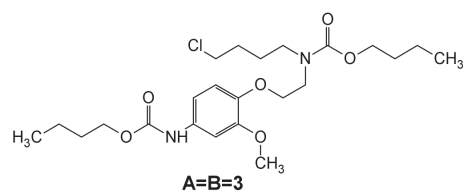
3. Ábra. A **2** szerkezet előállítását célzó reakció.

Meglepő módon, **B** MS spektruma ugyancsak arra utalt, hogy a molekula tartalmaz egy klóratomot, mi több, ugyanazt a molekulatömeget adta, mint **A**. Ráadásul **B** NMR spektruma is azonosnak bizonyult **A** spektrumával. A problémára első közelítésben az tűnt kézenfekvő megoldásnak, hogy a vegyész valójában vagy a 2 ábrán bemutatott reakciót ismételte meg azzal a céllal, hogy nagyobb mennyiségben állítsa elő **A**-t, azonban lefelejtette a klórt a rajzról a szerkezetvizsgálat-kérő lapon, vagy pedig tévedésből a 3. ábra szerinti reakcióban

is a para-klór szubsztituentet tartalmazó aromás reagenst használta. Amikor kiderült, hogy a vegyészek valóban a 3. ábrán bemutatott reakciót kívánták végrehajtani, részükről az volt a kézenfekvő feltételezés, hogy a Szerkezetkutatási osztályon történhetett akaratlan mintacsere. Ezeket a feltételezéseket követően egy ideig mindenki próbálta bizonyítani az igazát, és csak ezután (a lehetséges „mentális csapdákra” való tekintettel) jutottunk el oda, hogy saját kezdeti premisszáinkat megkérdőjelezzük, és egyenként felülbíraljuk. Így újraértékeljük azt a feltételezésünket, hogy „csak egy egyszerű” kapcsolási reakció játszódhat le, és bevetettük a nagyfelbontású MS és NMR technikák egész sorát a szerkezetek pontos meghatározásához.

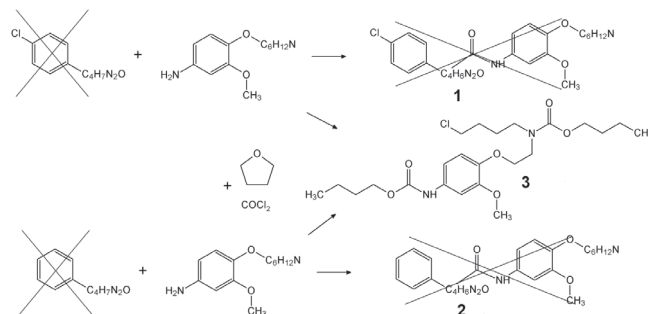
A nagyfelbontású MS mérések azt mutatták, hogy bár egy megdöbbentő coincidencia folytán **A** nominális molekulatömege megfelel **1**-nek, a mért pontostömegekből számolt elemi összetétel $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{O}_6\text{N}_2\text{Cl}$ -nak adódik, ellentétben az **1** szerkezetnek megfelelő $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{N}_4\text{Cl}$ elemi összetétellel. Ez azt jelentette, hogy **A** szerkezete merőben más kell, hogy legyen, mint **1**!

Az igen részletes és hosszadalmas, extrém nagy felbontású 2D méréseket is alkalmazó NMR analízis eredményeként egyértelműen igazolható volt, hogy az **A** és **B** vegyület is a 4. ábrán bemutatott (igencsak meglepő és váratlan) **3** szerkezettel jellemezhető.



4. Ábra. **A** és **B** tényleges szerkezete.

A **3** szerkezet azt bizonyítja, hogy a kiindulási vegyületek egyike nem vett részt a 2. és 3. ábrán bemutatott reakciókban. Ezzel szemben a butanol fragmens jelenléte **3**-ban arra utal, hogy az adott körülmények között az oldószerként használt THF felnyílhatott, és reaktívabbnak bizonyult a vártnál. Az **A** vegyületben mért klór pedig valójában a kapcsolószerként alkalmazott foszgenből származott (5. Ábra).



5. Ábra. A tényleges reakciók.

Könnyen lehet, hogy **A** vegyület esetében az **1** szerkezet helytelenségére nem derült volna fény, ha a vegyész nem próbálja meg a **B** vegyületet is előállítani. Ez például „mentális csapdák” egész tárházát vonultatja fel, és jól mutatja, hogy milyen könnyen lehet téves szerkezeti konklúziókra jutni,

illetve hogy ezek elkerülésében milyen nagy szerepe van a fentebb tárgyalt alapos nagyműszeres vizsgálatoknak (még akkor is, ha ez első látásra indokolatlannak tűnhet).

5. Összefoglalás

A fentiekben vázlatos képet nyújtottunk arról, hogy milyen sokrétű és komoly kihívásokkal teli elvárást támaszt a modern gyógyszeripar a kismolekulás NMR és MS szerkezetvizsgálatokkal szemben. Rávilágítottunk arra, hogy az a szó, hogy „szerkezetmeghatározás” valójában mennyi komplexitást takar, és mennyi dilemmát vethet fel mind a szerkezetvizsgáló analitikus részéről, mind pedig intézményi szinten. Tárgyaltuk a szerkezeti konfidencia és jellemezhetőség problematikáját, rámutatva arra, hogy még a legmodernebb szerkezetvizsgáló módszertani eszközök birtokában is milyen könnyű tévedni a szerkezetmeghatározásban. Ezt elkerülendő, általános elvként az fogalmazható meg, hogy a megfelelő spektroszkópiai szaktudást adottnak véve törekednünk arra, hogy minél bőségesebb és minél jobb minőségű kísérleti adatokat gyűjtsünk be (tapasztalataink alapján, megfelelően jó és nagyérzékenységű spektrométerek esetén az ezzel járó extra mérési idő nem annyira számottevő, mint amennyi nyereséget ez a megközelítés hoz a szerkezeti konfidencia és a jellemezhetőség tekintetében). Ugyancsak fontos, hogy elkerüljük az adat-értelmezéshez köthető „mentális csapdákat”. Bemutattuk, hogy mik azok a fontosabb működési elvek, amelyek mentén a Richter Szerkezetkutatói osztálya megpróbál ezeknek a kihívásoknak megfelelni munkafilozófia, műszerezettség, és emberierőforrás tekintetében. Ezzel kapcsolatosan tárgyaltuk a „holisztikus” szerkezetkutatás, legfőképpen az NMR és MS együttműködésének szükségességét is. Ezeket az elveket egy konkrét, tanulságos és izgalmas példán keresztül illusztráltuk.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük a Szerkezetkutatói osztályon jelenleg dolgozó összes kollégánknak (dr. Baginé dr. Timári Sarolta, Balogh Gábor, dr. Béni Zoltán, dr. Dékány Miklós, Gyulai Zsuzsanna, Hevér Helga, Hüse Dániel, Kóti János, dr. Kiss Róbert, dr. Krámos Balázs, Kreutzné Kun Ibolya, dr. Magdó Ildikó, Nagy Magdolna, Pallag Erika, dr. Pogány Péter, Szigetvári Aron, Sziki Erika, Szkiba-Kovács Ivett), valamint minden korábbi munkatársunknak, hogy szorgos és lelkes munkájukkal hozzájárultak osztályunk valamint a Richter fejlődéséhez, továbbá köszönjük a Richter vezetőségének a támogatást.

Hivatkozások

1. Szántay, Cs. ifj.; Szakács, Z.; Béni Z.; Dubrovay Zs. *Magy. Kém. Foly.* **2013**, *119*, 16-27.
2. Szántay, Cs. Jr., Ed. *Anthropic Awareness: the human aspects of scientific thinking in NMR spectroscopy and mass spectrometry*. Elsevier: New York, **2015**. a) Szántay, Cs. Jr. The Philosophy of “Anthropic Awareness” in Scientific Thinking pp. 5-93; b) Szántay, Cs. Jr. An „anthropic” modus operandi of structure elucidation by NMR and MS. pp 231-256.; c) Szakács, Z., Sánta Zs. NMR methodological overview. pp. 257-289. d) Háda V., Dékány M. MS methodological overview. pp. 291-315. e) Béni Z., Szakács, Z., Sánta Zs. Computer-assisted structure elucidation in NMR. pp. 318-354. f) Béni Z. Structure elucidation of a mysterious trace component of ulipristal acetate. pp. 355-365. g) Dubrovay Zs. Háda V. The adventurous discovery of the structure of a novel vincristine impurity. pp. 367-376. h) Szakács, Z. Kóti J. An elusive degradation product of ziprazidone. pp. 377-389. i) Sánta Zs., Háda V. The case of an emotion- and ‘emotycs’-laden structure determination of a small synthetic molecule with an unexpected structure. pp. 391-399. j) Szántay Cs. Jr., Demeter, Á. Self-induced recognition of enantiomers (SIRE) in NMR spectroscopy. pp. 401-415. k) Demeter, Á. Believe it or not: carbon protonation of the pyrimidine ring. pp. 417-431.
3. Elyashberg, E.M., Williams A.J., *Computer-based structure elucidation from spectral data: the art of solving problems*. (Lecture Notes in Chemistry 89). Springer: New York, **2015**.
4. Borman S. Tug Of War Over Promising Cancer Drug Candidate. *Chemical and Engineering News*, on-line kiadás, Web Dátum: május 21, 2014, elérhetőség: <http://cen.acs.org/articles/92/web/2014/05/Tug-War-Over-Promising-Cancer.html>
5. Carvalho EM, Periera FA, Junker J. How well does NMR behave in natural products structure determination? A survey of natural products published in 2007 and 2008. Poster presented at the 50th Experimental NMR Conference, 2009, March 29 – April 3, Asilomar, California.
6. Szántay, Cs. Jr.; Demeter, Á. NMR Spectroscopy. In: *Identification and Determination of Impurities in Drugs*; Görög, S., Ed.; Elsevier: New York, **2000**; pp 109-143.
7. Szántay, Cs. Jr.; Béni, Z.; Balogh, G.; Gáti, T. *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 806-820.
8. Görög, S.; Szántay, Cs. Jr. Spectroscopic methods in drug quality control and development. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; Elsevier: Oxford, **2010**; 2nd Ed., Vol. 3., pp 2640-2650.
9. Sánta, Zs.; Kóti, J.; Szöke, K.; Vukics, K.; Szántay, Cs. Jr. *J. Pharm Biomed Anal.* **2012**, *58*, 125-129.
10. Szántay, Cs. Jr. *Trends Anal. Chem.*, **1992**, *11*, 332-344.
11. Szántay, Cs. Jr.; Balogh, G. *Acta Pharm. Hung.* **2002**, *73*, 106-115.
12. Demeter, Á.; Fodor, T.; Fischer, J. *J. Mol. Struct.* **1998**, *471*, 161-174.
13. Béni, Z.; Háda, V.; Dubrovay, Zs.; Szántay, Cs. Jr. *J. Pharm Biomed. Anal.* **2012**, *69*, 106-124.
14. Dubrovay, Zs.; Háda, V.; Béni, Z.; Szántay, Cs. Jr. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *84*, 293-308.
15. Háda, V.; Dubrovay, Zs.; Lakó-Futó, Á.; Galambos, J.; Gulyás, Z.; Aranyi A.; Szántay, Cs. Jr. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *84*, 309-322.

Structure elucidation by NMR spectroscopy and mass spectrometry at Gedeon Richter

In this article we have outlined the manifold challenges and expectations that are present in today's NMR- and MS-based small-molecule structure elucidation in the pharmaceutical industry. As we have argued, in practice the seemingly simple phrase "structure elucidation" hides many complexities and can involve several difficulties in terms of the employed *modus operandi* of structural investigations within a pharmaceutical company. In particular, for any given structural problem the intended level of NMR and MS characterization (giving an NMR peak list or a full NMR assignment based on absolute methods such as two-dimensional experiments, providing low- or high-resolution MS, etc.), the intended depth of the investigation (stereochemistry, dynamical features, etc.), and the intended level of confidence in the correctness of a structural claim (quick but lower-confidence structure verification versus more time consuming in-depth structural proof), are serious dilemmas whose risks and benefits must be well understood and addressed by both the analyst and the institution. This understanding should be the basis of how structure elucidation is embedded into the research strategies of a company, and what instrumental and human resources are allocated to this task. The answers to these questions are far from self-evident, and herein we have highlighted the main concepts according to which small-molecule structural research is organized at Gedeon Richter. As a particularly interesting, important, but generally not properly appreciated issue, we have pointed out how easily even highly skilled experts may come to an erroneous structural conclusion, even when having the most modern NMR and MS instrumental capabilities at hand. The reasons behind being prone to making such errors are related to the so-called "mental traps", which are amply discussed in reference 2. In order to avoid such errors, as a general rule one should strive to acquire as much high-quality experimental data as possible (according to our experiences, with high-end, highly sensitive spectrometers the extra measurement time elicited by this approach is affordable, and it increases the level of confidence and characterizability significantly). We have discussed the five main principles according to which the Spectroscopic Research Department of Gedeon Richter tries to handle these challenges in terms of working philosophy, instrumentation, and

human resources. One key feature of that philosophy is centralized service: we provide structure-determination service for the whole company, from supporting medicinal chemistry projects through scale-up and metabolite identification as well as production related structural issues such as impurity profiling. This means that the same analyst can follow the lifecycle of a given molecule and its related derivatives, which greatly increases efficiency and confidence. In particular, one should note that while in their synthetic-chemistry stage, the submitted samples are usually pure and not significantly mass-limited, thus they are "NMR- and MS-friendly". However, structurally related metabolites and trace impurities can be "unfriendly" due to being seriously mass-limited and impure, providing only "fuzzy" experimental data that is more difficult to interpret. In such cases possessing a prior and secure spectral knowledge on the pertinent family of molecules can prove to be crucial. Secondly, Richter employs full-time NMR and MS spectroscopists, which has proven time and again to be a great asset in terms of avoiding error by the benefits of an independent and professional "analytical eye". Thirdly, we place great emphasis on using a "holistic" analytical approach to all small-molecule structural problems. This means, on the one hand, the recording of at least the most basic two-dimensional NMR experiments for each sample so as to secure the spectral assignments and to minimize the possibility of structural misassignment. On the other hand, it entails the concerted use of both NMR and MS for each problem. In our experience, the practice of cross-checking structural deductions as a default mode of action by these orthogonal methods, and resolving any conflicting inferences (which happens quite often) before finalizing the result, is absolutely essential for high-confidence structure determination. Fourthly, we stress the importance of using state-of-the-art NMR and MS spectrometers that provide high-quality and abundant experimental data in the shortest possible time. In certain cases, particularly when dealing with "unfriendly" samples, such data abundance can be essential in order to reduce the number of alternative structures that may be consistent (often in an unrecognized manner) with a more limited set of data. Fifthly, we pointed out the importance of being dedicated to science in terms of active publishing (as much as this is possible in the pharmaceutical industry) and following the literature in order to maintain the vigor for innovation and the dedication toward scientifically meticulous thought. All this was demonstrated through an intriguing real-life example.

Gyógyszeranalitika a fejlesztő szemével

BABJÁK Mónika,* CZIPÓNÉ TAKÁCS Tímea és MESZLÉNYI Gábor

Richter Gedeon Nyrt. Kutatási Analitikai Osztály

1103 Budapest, Gyömrői u. 19-21.

1. Bevezetés

Az analitika szerepe kiemelkedő jelentőségű a gyógyszeriparban a gyógyszerkutatástól kezdve a készítmények rutin vizsgálatáig. Feladata mindenütt ugyanaz: elősegíteni az anyagok megismerését, minőségi és mennyiségi jellemzését, továbbá a kapcsolódó folyamatok megértését abból a célból, hogy a gyógyszerek biztonságosságát biztosítsuk.

Természetesen más az analitika fókusza és mások az alkalmazott módszerek a kutatás/fejlesztési fázisban, más a klinikai vizsgálatokban és megint más a termék állandó minőségét igazoló rutin méréseknél. Az alábbiakban egy rövid áttekintést kívánunk adni és néhány példán keresztül bemutatni, hogy a Richter Gedeon Nyrt.-ben, a hatóanyagok fejlesztési fázisában melyek az analitika főbb feladatai, és milyen megoldásokat alkalmazunk a Kutatási Analitikai Osztályon.

2. A hatóanyagok fejlesztési fázisa

Akár originális, akár generikus fejlesztést végzünk a feladat azonos: a laboratóriumban néhány grammos mennyiségben előállított hatóanyagtól a végleges, akár 100 kg-os nagyságrendű üzemi gyártásig követni a folyamatot, analitikai támogatást adva a szintézist végző vegyésznek illetve a méretnövelő, ipari technológiát kialakító technológusnak. Mindeközben részletesen megismerni egyrészt a hatóanyagot, annak fizikai, fizikai-kémiai, kémiai tulajdonságait, feltárni azokat a körülményeket, amelyekre az anyag érzékeny, másrészt az előállítási folyamatot, és annak hatását a termék minőségére.

A fejlesztési fázisban folyó detektívmunkához igénybe vesszük a lehető legtöbb analitikai megközelítést, módszert. A módszerek kiválasztása három alapvető pilléren áll:

1. A gyógyszerkönyvek módszerei és általános előírásai a forgalomba hozott termékek esetén kötelezőek, ezért ezeket célszerű már a fejlesztési fázisban alkalmazni: az előírt módszerek megfelelőségét, alkalmazhatóságát tanulmányozni, illetve saját fejlesztésű módszerek esetén az általános előírásokat figyelembe venni.

2. A gyógyszerek minőségével, analitikájával több hatósági ajánlás, ún. guideline is foglalkozik. Az ICH (International Council for Harmonisation, korábban International Conference on Harmonisation) Q (quality, minőség) kategóriában több szempontból is iránymutatást ad a hatóanyagok vizsgálatára. Ezek az ajánlások részben metodikai megközelítéseket, részben követelményrendszert is tartalmaznak.

3. A termék jellemzését tudományos alapon megközelítve, a szakmai szabályoknak megfelelően, a legkorszerűbb eszközöket és metodikákat alkalmazzuk. A fejlesztőnek mindig szem előtt kell tartania, hogy az általa kidolgozott/kiválasztott módszert a jövőben fogják használni, ezért lehetőleg a legkorszerűbb, ma még talán csak ritkán használt, de a jövőben várhatóan széleskörűen elterjedő megoldásokat alkalmazzuk.

Mindezek alapján a fejlesztési fázisban folyamatosan változnak, fejlődnek mind számszerűsítésben, mind mélységben az analitikai módszerek. Célunk, hogy a fejlesztési folyamat végére, a végleges gyártástechnológia kidolgozása után meg tudjuk állapítani, hogy melyek a termék kritikus minőségi jellemzői, ezek milyen módszerrel mérhetők, milyen lesz a hatóanyag állandó minősége („a minőséget nem mérjük, hanem beépítjük a termékbe”), amit a rutin gyártáskor, minőségellenőrzéskor mindig igazolunk. Ezek a módszerek kerülnek a hatóanyag specifikációjába.

A fejlesztési folyamat során számos olyan mérést is végzünk, amelyet rutinban később nem kívánunk alkalmazni („un. kiegészítő mérések”), ezekhez akár a legkülönlegesebb, legdrágább metodikákat is alkalmazhatjuk. Ugyanakkor a rutin módszerek esetén a meglévő analitikai lehetőségeket illetve gazdaságossági szempontokat is célszerű figyelembe venni. Ezért a rutin módszerek esetén törekszünk a legegyszerűbb, leggazdaságosabb módszerek (pl. egyszerűen kivitelezhető, gyors, kis mintaigényű stb.) kidolgozására.

3. Az analitikai módszer megfelelőségének igazolása

A fejlesztési folyamatban nemcsak szakmai szempontok alapján, hanem minőségbiztosítási szempontból is fokozódó elvárás az analitikai módszerek megfelelőségének igazolása, a módszerek validálása. A holisztikus validálási szemlélet alapján a módszer megszületésétől, alkalmazásától kezdve folyamatosan, a felhasználásnak megfelelő mértékben kell igazolnunk a módszer megfelelőségét. A végleges módszereket a vonatkozó előírások és ajánlások figyelembevételével validálnunk kell, amely folyamatban előre eltervezett mérésorozattal, az eredmények statisztikai értékelésével igazoljuk, hogy a módszerünk alkalmas a felhasználási célra. Ezen cikk keretein belül nem foglalkozunk a validálás elméletével és gyakorlatával, csupán hangsúlyozni kívánjuk, hogy a validálási tevékenység mind időben, mind a mérések számában eléri, sőt gyakran meghaladja a módszerfejlesztésre fordított munka mennyiségét, és mint ilyen, a fejlesztő analitikusok egyik fő feladata.

* Tel.: +36-1431-4653 ; fax: +36-1431-6000 ; e-mail: m.babjak@richter.hu

4. A hatóanyagok vizsgálatának módszerei

A hatóanyag sohasem tiszta száz százalékban. Kismértékben mindig tartalmaz(hat) szennyezőket, amelyeket elsősorban mérés-technikai szempontból az alábbi csoportokba sorolhatjuk. (Vonatkozó guideline: Q3A: Impurities in new drug substances)

4.1. Víztartalom

A hatóanyagot legtöbbször szennyezi a gyártási folyamatban használt víz. Ez a víz nem jelent egészségügyi kockázatot, ugyanakkor pontos mennyiségének ismerete fontos. A víztartalom meghatározására elterjedten Karl Fischer (KF) titrálásos módszert alkalmazunk. Amennyiben a termék víz tartalma alacsony, a KF titrálásos módszer érzékenysége, illetve pontossága nem megfelelő, termogravimetriára visszavezethető összes nedvességtartalmat határozzunk meg (szárítási veszteség).

4.2. Szervetlen szennyezők

Ebbe a csoportba elsősorban a szervetlen sók tartoznak. A gyógyszerkönyvek előírása a mérés kivitelezés szempontjából megegyezik: $600 \pm 50^\circ\text{C}$ -on a mintát kénsavval roncsoljuk és a visszamaradó szulfáthamut visszamérjük.

4.3. Fémszennyezők

A fémszennyezők vizsgálatának új megközelítését a 2014-ben életbelépő új, ICH Q3D guideline foglalja össze. (Q3D: Guideline for elemental impurities) Az eddig az osztályunkon is sokszor alkalmazott módszert (a vizsgálandó mintából roncsolást követően tioacetamiddal szulfidot képzünk, aminek a színét vizuálisan értékeljük) felváltja a specifikus és érzékeny induktív csatolású plazma atomspektroszkópiás (ICP AS) mérés.

4.4. Illékony szennyezők

A hatóanyagot az előállításához használt oldószerek és a szintézis során keletkező általában kis molekulatömegű, illékony szerves komponensek szennyezhetik. A használt oldószerek listája ismert a gyártástechnológiából, a keletkező anyagok pedig a reakcióegyenletekből levezethetők (pl. észterek hidrolízisekor felszabaduló alkoholok, stb.). A vonatkozó ICH guideline (Q3C: Impurities for residual solvents) alapján azonban nemcsak ezeket a komponenseket kell vizsgálnunk, hanem a mérést ki kell terjesztenünk az alkalmazott oldószerek potenciális szennyezéseire is, különösen akkor, ha azok toxikológiai szempontból veszélyesek. A Q3C guideline az oldószereket 3 fő osztályba sorolja, és szabályozza az egyes osztályokba sorolt vegyületek megengedett mennyiségét.

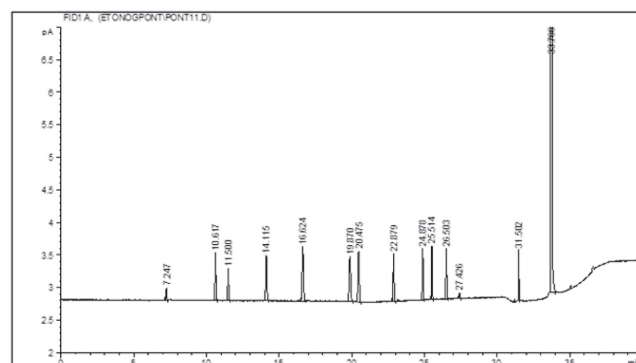
A 3. osztályban a nem veszélyes („solvents with low toxic potential”) komponensek találhatók. Ide tartozik többek között a gyógyszergyártásban oldószerként elterjedten használt etanol, aceton, etil-acetát, i-propanol. Megengedett mennyiségük a hatóanyagban 5000 ppm.

A 2. osztály („solvents to be limited”) oldószereinek megengedett mennyisége alacsonyabb. Pl. az acetonitril megengedett mennyisége 410 ppm, míg a metanolé 3000 ppm, vagy a diklórmétáné 600 ppm.

Az 1. osztály („solvents to be avoided”) oldószerei ma már előállításához nem használhatók, de mennyiségüket akkor is vizsgálni kell, ha valamelyik alkalmazott oldószert szennyezhetik. Leggyakrabban vizsgált komponens ebből az osztályból a benzol, amely az előállítás oldószereként használt toluol vagy a metanol potenciális szennyezője lehet. Megengedett mennyisége a hatóanyagban legfeljebb 2 ppm.

Ezen komponensek mennyiségét alapvetően gázkromatográfiai módszerrel (GC) határozzuk meg. A vizsgálandó vegyület illékonyága alapján alkalmazhatunk göztérinjektálást vagy folyadékinjektálást.

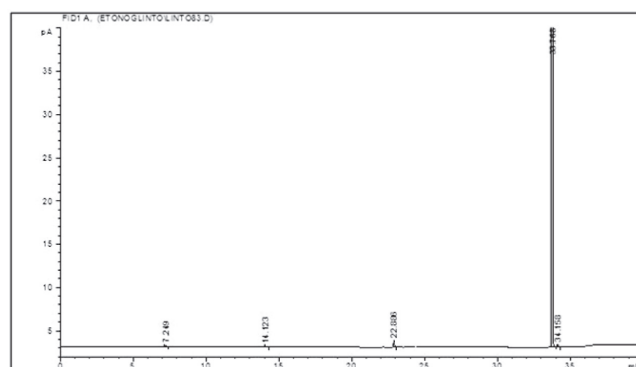
Gondolhatnánk, hogy kidolgozható egy teljesen általános módszer, amellyel hatóanyagtól függetlenül mérhetők ezek a komponensek. A gyakorlat azonban azt mutatja, hogy a hatóanyag fizikai-kémiai tulajdonsága, netán a gázkromatográf injektorában elszorított bomlása miatt mindenre jó módszer nem létezik, mindegyik módszert optimalálni kell.



1. Ábra. Referencia oldat gázkromatogramja.

Komponensek: 10,617 perc metanol, 11,500 perc metil-formiát;
14,115 perc etanol; 16,624 perc aceton;
19,870 perc diklórmétán, 20,475 perc terc-butanol;
22,879 perc diizopropiléter; 24,878 perc etilacetát;
25,514 perc tetrahidrofurán; 26,503 perc ciklohexán; 27,426 perc benzol;
31,502 perc toluol, 33,700 perc dimetil-szulfoxid (alap-oldószert).
A kromatogramon látható többi csúcs a dimetil-szulfoxidból származik.

Általában 30-60 m hosszú kvarc kapillárisokat alkalmazunk. A kapilláris bevonata/állófázisa többféle lehet attól függően, hogy egyszerűen forráspont alapján el tudjuk választani a mérendőket, vagy másodlagos kölcsönhatásokat is ki kell használnunk. A legelterjedtebb a lángionizációs detektor (FID) alkalmazása, de egyes esetekben szükség lehet a



2. Ábra. Hatóanyag minta oldat gázkromatogramja.

specifikus és még nagyobb érzékenységgű elektronbefogásos (ECD) vagy akár tömegspektrometriás (MS) detektálásra is.

Az előzőek értelmében az általunk kidolgozott GC módszer jóval többet tud, mint amennyi a hatóanyag minőségéből következne. Példaként bemutatunk két kromatogramot. Az első a referencia oldat kromatogramja, míg a második a hatóanyagé, ez utóbbiból látható, hogy magát a hatóanyagot csak nyomokban szennyezik illékony komponensek.

4.5. Rokon szerkezetű szerves szennyezők

A hatóanyagfejlesztés során az analitikus számára a legnagyobb kihívást a rokon szerkezetű szerves szennyezők mérésére alkalmas kromatográfias módszer kidolgozása jelenti. A gyógyszermolekulák fizikai-kémiai tulajdonsága valamint a módszertől megkívánt érzékenység miatt az esetek nagy részében ez folyadékromatográfias (HPLC) módszert jelent. Általánosságban feladatunk kimutatni minden olyan szennyezőt, ami a gyártási folyamat során (a gyártás köztes termékei, melléktermékek, a felhasznált kiindulási anyagok, ezek szennyezéseiből az előállítás során keletkező ún. „carry over” szennyezések stb.) illetve magából a hatóanyagból keletkezik (bomlástermékek). Az elv minden esetben ugyanaz, de a gyakorlati megvalósítás mindig egyedi. A vizsgálni kívánt vegyületek minden hatóagnál mások, ezért minden hatóanyagra, sőt azonos hatóanyag esetén akár az eltérő gyártási lépések miatt is egyedi, a feladatra optimált módszert/módszereket kell kidolgoznunk.

Egy tisztaságvizsgálati módszer kidolgozása előtt összegyűjtjük és vegyész illetve technológus kollégák bevonásával elemezzük az elérhető információkat a szintézis lépéseiről. A módszerfejlesztéshez gyakran nem végleges tisztaságú, hanem szennyezett vagy akár elrontott előállításból származó anyagokat is felhasználunk. A módszerfejlesztés kezdetén általában még nem ismertek a hatóanyag bomlástermékei, ezért az optimalás kezdetén ezeket in situ állítjuk elő a gyógyszerhatóanyag bomlasztásával (szilárdan hő, pára, fény terheléssel illetve oldatban savas/lúgos/peroxidos közegben).

Annak kiválasztására, hogy milyen elválasztási módot alkalmazzunk, segít az elválasztandó komponensek bizonyos fizikai-kémiai jellemzőinek ismerete, amelyekre mindenképp szükség van a hatékony és robusztus módszer fejlesztéséhez. Ilyen például az oldhatóság, a pK_a , azaz a sav-disszociációs állandó negatív logaritmus, a molekulák lipofilitását becsülő log P (semleges molekulákra) illetve a logD (ionos molekulákra).¹ Az adott molekula kromatográfias viselkedésének jellemzésére jól használható a logD-pH diagram, ami a molekula lipofilitásának változását jellemzi a pH függvényében.

A fizikai-kémiai adatokon kívül az elválasztandó vegyületek ismert szerkezetét is figyelembe kell venni, ha a szerkezeti izomerektől a nagyon eltérő polaritású vegyületekig minden szennyezőt egy kromatográfias rendszerben kívánunk elválasztani és detektálni.

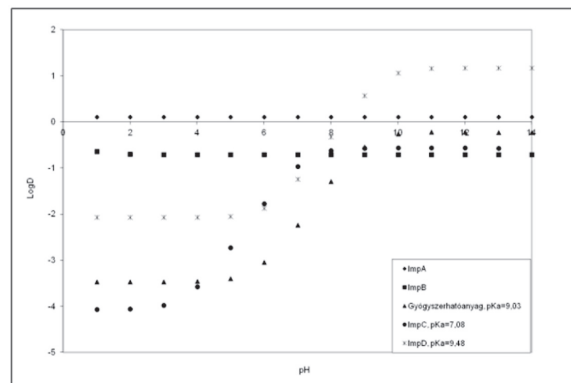
Az adatok birtokában tudjuk kiválasztani a folyadékromatográfias elválasztási módot (fordított fázis, normál fázis, HILIC stb.), illetve a szerencsére már nagyszámban rendelkezésre álló kromatográfias oszlopok

közül mindazokat, amelyek elméleti, irodalmi adatok illetve saját tapasztalataink alapján alkalmasak lehetnek a mérésre.

A fejlesztés és a végső módszer kidolgozása során esetenként számos kromatográfias oszlop kipróbálása és a paraméterek optimalása szükséges. Az egyfajta fordított fázisú oszlopon elvégzett módszerfejlesztés folyamatát az alábbi példán mutatjuk be.

A módszerfejlesztés kezdetén rendelkezésre állt a gyógyszerhatóanyag és a szintézisútra jellemző négy potenciális szennyezés, továbbiakban: ImpA, ImpB, ImpC, ImpD.

A 3. ábrán ábrázoltuk a gyógyszerhatóanyagnak és a négy ismert szennyezésének logD-pH görbét, a jelmagyarázatban feltüntetve a releváns pK_a értékeket is (ChemDesk szoftverrel meghatározva).



3. Ábra. A hatóanyag és négy potenciális szennyezésének LogD-pH összefüggése.

A módszerben mindenképp pH kontrollt kellett használnunk, hiszen a gyógyszerhatóanyag, az ImpC, az ImpD változtatják molekuláris formájukat a pH függvényében. A logD-pH görbék lefutásából az is látható, hogy a gyógyszerhatóanyag, az ImpC, és az ImpD bázikus funkciókat tartalmaznak. Ezek a vegyületek $pH \geq pK_a + 2$ (azaz esetünkben $pH \geq 11$) értékeknél lúgosabb tartományban vannak fordított fázis szempontjából kedvezőbb ion-visszaszorított, apolárisabb formában. Ez a pH tartomány számunkra mégsem volt kedvező, mert az előzetes stabilitási vizsgálatokból kiderült, hogy a gyógyszerhatóanyag lúgos közegben már szobahőmérsékleten is pillanatszerűen bomlik. Ha el akartuk kerülni a gyógyszerhatóanyag mérés közbeni degradációját mindenképp a $pH \leq 7$ tartományban kellett maradnunk.

A robusztusság szempontjából kedvezőnek tűnő $pH \leq pK_a - 2$ (estünkben $pH \leq 5$) tartományt is ki kellett zárnunk, mert itt a bázikus komponensek ionos formában vannak jelen, ezért visszatartásuk fordított fázison kicsi. A $pH \leq 5$ értéknél savasabb tartományban kérdéses, hogy a k (retenciós tényező) ≥ 1 kritérium teljesül-e, hiszen a főkomponens logD értéke még $pH=7$ -en sem éri el a (-2)-t. Hasonlóképpen gond lehet a savas/lúgos/oxidatív bomlástermékekkel, amelyek ugyan fejlesztés kezdetén nem voltak a kezünkben, de valószínűleg legalább olyan, vagy még polárisabbak, mint a vizsgálandó főkomponens. A fentieket figyelembe véve, mivel ragaszkodtunk a fordított fázis alkalmazásához

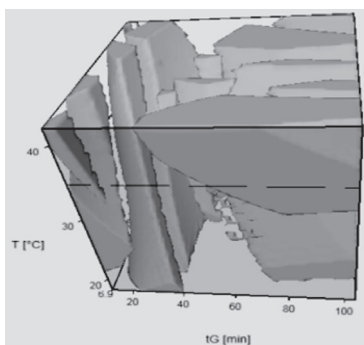
a mozgófázis pH-jának pH=7-hez minél közelebb eső értéket kellett választanunk, így az említett példában az optimáláshoz pH=6-7 tartomány tűnt megfelelőnek.

Ez az a tartomány, amint az a logD-pH függvények lefutásából is látható, ahol kis pH változásra nagy logD változás következik be, ezért a retenció állandóságához, azaz robusztus módszerhez kiemelten fontos volt a pontos, tömegmérésre visszavezetett pH beállítás.

A pH beállításhoz a foszfát puffer tűnt kedvezőnek, mert egyrészt a $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ rendszer puffer kapacitása a $\text{pK}_a \pm 1$, azaz 5,8-7,8 tartományban maximális. Másrészt alacsony UV cut off értéke miatt (195 nm) a foszfát az egyik legalkalmasabb, ha alacsony hullámhosszon kell detektálnunk (esetünkben sem a gyógyszerhatóanyag, sem az ismert szennyezések nem tartalmaznak $\lambda > 220$ nm magasabb hullámhosszon elnyelő kromofor csoportot).

Az oszlopválasztásnál figyelembe vettük az elválasztandó komponensek poláris jellegét és olyan oszlopokat választottunk a módszerfejlesztéshez, ahol a visszatartást és szelektivitást a poláris kölcsönhatások (hidrogénhid, dipól-dipól) is befolyásolják. A kezdeti kísérletek alapján hamar kiderült, hogy a pH 6-7 tartományban a foszfát ion nagyon lecsökkentette az oszlopok élettartamát. Így az oszlopválasztásnál az elsődleges szempont az állófázis pH térése lett. Ennek alapján a további fejlesztés Gemini C18 (150-4,6 mm, 3 μm , gyártó: Phenomenex (ajánlott pH: 1-12)) oszlopokon folyt.

Az állófázis, a puffer, a pH tartomány, detektálási hullámhossz megválasztása után a fejlesztést optimáló szoftverek, pl. DryLab[®] szoftver használatával tehetjük hatékonyabbá és gyorsabbá. A DryLab[®] (forgalmazó: Molnár-Institute) napjaink egyik intelligens optimáló szoftvere, amely segítségével a próbálkozásokon alapuló módszerfejlesztést felválthatjuk pontos, beállított kísérleti adatokon alapuló kísérlettervezésre.^{2,3} Nemcsak időt, vegyszert spórolhatunk, de segítségével a módszer robusztussága, illetve érzékenysége a változtatható paraméterekre is vizsgálható.

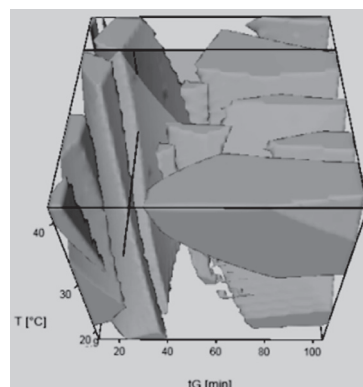


4. Ábra. DryLab[®] szoftverrel számolt háromdimenziós felbontás térkép

A 2009-ben megjelent DryLab[®] 3.9-es verzió már képes akár három faktor (gradiens idő, hőmérséklet, pH vagy terner eluens összetétele) egyidejű kezelésére és háromdimenziós felbontás térképek számolására. A szakirodalom az így létrejött három-dimenziós modellt „Cube”-nek vagyis kockának nevezi. A példánkban a DryLab[®] szoftver (verzió:4.2.0.7.) alkalmazásával 12 alapfutásból határoztuk

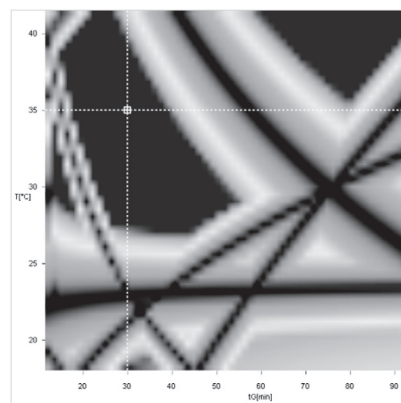
meg az optimális pH-t, a hőmérsékletet és gradienst. A DryLab[®] szoftver három dimenzióban, a pH, a hőmérséklet, és a gradiens idő (tG) függvényében ábrázolja, és jelöli a minimum $\text{Rs}=1,5$ elválasztást jelentő kísérleti pontokat. A térbeli ábrán az összefüggő területek jelentik a robusztus tartományokat. (4. Ábra)

A „DryLab[®] kockából” az optimum kiválasztása lényegében szubjektív szempontok alapján történik. Rendszerint arra törekszünk, hogy az elválasztás lehetőleg rövid legyen, az oszlop élettartamának növelése céljából a hőmérséklet minél alacsonyabb legyen és a választott optimum pedig egy robusztus tartomány belsejébe essen.



5. Ábra. Választott optimum 3D-ben szemléltetve.

Az 5. és 6. ábrákon a választott optimum látható 3D-ben illetve a szoftverrel számolt kétdimenziós felbontás térképen (pH=6,2) szemléltetve.

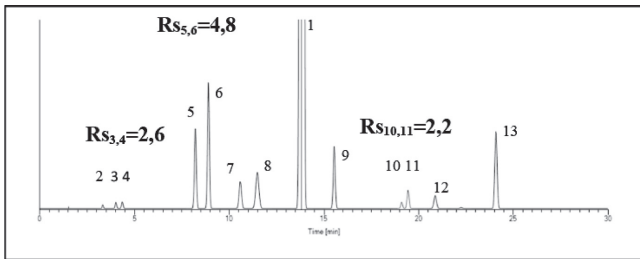


6. Ábra. DryLab[®] szoftverrel számolt kétdimenziós felbontás térkép. (pH=6,2).

Az optimált HPLC-s paraméterekkel a DryLab[®] szoftver által előre jelzett elválasztás a 7. ábrán, a megvalósult elválasztás jellemzésére pedig a modell oldat kromatogramja a 8. ábrán látható.

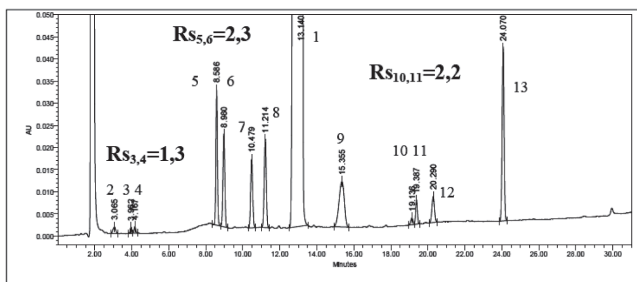
Tapasztalataink szerint a jósolt és a gyakorlatban kapott kromatogramok általában jó egyezést mutatnak, a retenciók eltérése < 5%.

A fejlesztés során több, a rokon szerkezetű szennyezések meghatározására alkalmas módszert is kidolgozunk abból a célból, hogy meggyőződjünk arról, hogy a későbbiekben rutin tisztaságvizsgálatra alkalmazandó módszerünk



7. Ábra. DryLab által jósolt kromatogram /modell oldat.

alkalmas-e minden szennyezés kimutatására. Ezek egy része eltérő elválasztási mechanizmuson alapul (elválasztás más típusú állófázison, eltérő pH-n, stb), más része alkalmas folyadékkromatográf-tömegspektrométer (LC-MS) kapcsolt



8. Ábra. Mért kromatogram / modell oldat.

technika megvalósítására. Az LC-MS módszerek alapvetően fontosak fejlesztési fázisban a hatóanyagok rokon szerkezetű szerves szennyezőinek és bomlástermékeinek azonosításához is.

4.6. Királis szennyezők

A forgalomba kerülő gyógyszer hatóanyagoknak több mint fele tartalmaz (legalább) egy királításcentrumot, azaz elvileg két optikai izomerjük létezik. Az optikai izomerek minden fizikai-kémiai tulajdonsága megegyezik (kivéve, hogy a polarizált fény síkját eltérő irányban forgatják el), így akirális közegben nem különböztethetők meg. Kromatográfias módszerekkel elválasztásuk királis környezetben valósítható meg (vagy a kromatográfias állófázis vagy a mozgófázis tartalmaz királis szelektort),⁴ vagy előzetes származékképzést követően az enantiomereket eltérő fizikai-kémiai tulajdonságú diasztereomer párokká alakítjuk,⁵ amelyek így elválaszthatók. A gyakorlatban mindig az egyszerűbben kivitelezhető megoldást választjuk.

Vannak olyan gyógyszerhatóanyagok, amelyek racém formában kerülnek forgalomba, ami azt jelenti, hogy a két optikai izomerjük közel egyforma mennyiségben van jelen. Ez esetben a fejlesztő analitikus feladata a megfelelő arány igazolása. Előfordulhat azonban, hogy az optikai izomereknek eltérő farmakológiai tulajdonságuk van, azaz csak az egyik enantiomerjük hatásos, míg a másik hatástalan, esetleg toxikus. Erre, és egyben a királis tisztaságvizsgálatok fontosságára az 50-es években kirobbant Contergan-botrány hívta fel a gyógyszerkutatók figyelmét. (A Contergan esetében a racém formában forgalomba hozott talidomid hatóanyag csak egyik enantiomerje volt nyugtató hatású, a másik enantiomerje súlyos magzatkárosodást

okozott). A hasonló balesetek elkerülése végett napjainkban világszerte előtérbe került a tiszta enantiomerek fejlesztése, és az enantiomer arány meghatározása helyett a királis tisztaságvizsgálat.

Az enantiomerarány meghatározásánál illetve a tisztaságvizsgálatnál más-más a feladat, így más az analitikai módszer, amivel célszerű a megoldást keresnünk.

Racém gyógyszerhatóanyag vizsgálatához a legideálisabb megoldást a nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis (HPCE) nyújtja. A háttér elektrolithoz adható királis szelektorok (ciklodextrinek (natív és származékolt) koronaéterek, epesavak, stb.) termékpalettája egyre bővülő, így jó eséllyel találunk köztük olyat, amellyel a két enantiomer elválasztható. A módszer általában gyors, mintáigénye és a méréshez felhasznált vegyszerigénye kicsi. Ugyanakkor napjainkban még problémás a módszer robusztussága valamint a detektálás érzékenysége, ezért ezt a korszerű metodikát elterjedten, rutinszerűen nem tudjuk alkalmazni királis tisztaságvizsgálatokban.

A gyógyszeriparban a királis oszlopokon végzett elválasztások terjedtek el annak ellenére, hogy ezek a speciális kromatográfias oszlopok igen drágák, és elméleti alapon a vizsgálandó vegyület szerkezetének ismeretében nem tudunk optimálni. Még mindig próbálkozásos alapon választjuk ki az ígéretesnek tűnő oszlopokat, amikhez a módszerfejlesztés nehézsége miatt az oszlopgyártók általában részletes módszerfejlesztési tematikát javasolnak, amelynek követésével jó esetben tudunk eredményt felmutatni. A feladat bonyolultságát jelzi, hogy az adott kromatográfias rendszerben nemcsak az enantiomereket kell elválasztani egymástól, hanem a módszernek specifikusnak kell lennie egyéb, nem királis izomerekre is.

4.7. Egyéb szennyezők

Az eddig tárgyalt szempontok szerinti mérések szinte rutinszerűen állnak össze a fejlesztés folyamán, de hatóanyagtól és eljárástól függően előfordulhat, hogy nem alkalmasak minden potenciális szennyező kimutatására. Az alábbiakban a teljesség igénye nélkül mutatunk be néhány példát ezekre:

A *kis molekulatömegű szerves savak* és bázisok általában nem gázkromatografálhatók származékképzés nélkül, illetve HPLC-vel sem detektálhatók kromofór csoportok hiányában. Ezen komponensek vizsgálatára célzottan külön módszereket dolgozunk ki (pl. gázkromatográfias mérés származékképzést követően, folyadékinjektálással, vagy HPLC ionpárokromatográfia indirekt UV detektálással, stb).

A hatóanyaghoz szerkezetileg nagyon hasonló szennyezések, az *izomerek* vizsgálata különös figyelmet igényel. Részben azért, mert hasonló fizikai-kémiai tulajdonságuk miatt kromatográfias elválasztásuk problémás lehet. Részben pedig azért, mert azonosításuk megegyező molekulatömegük és fragmentációjuk miatt MS detektálással is komoly feladatot jelent. Ezért (is) szükséges a tisztaságvizsgálatot nem egy, hanem legalább kettő, eltérő elválasztási mechanizmuson alapuló kromatográfias módszerrel végezni a fejlesztés során.

Napjaink egyik legnagyobb kihívása a *potenciálisan genotoxikus, nyomokban előforduló, rokon szerkezetű vegyületek* vizsgálata. Ezen komponensek mérése szinte kizárólag kapcsolt technikás kromatográfiás módszerrel történik, mivel megengedett mennyiségük általában legfeljebb 10-100 ppm között van. Ezt az érzékenységet a tömegspektrometriás MS/MS detektorok, rendkívül érzékeny és kiemelkedően specifikus módban (MRM) képesek biztosítani.

4.8. Hatóanyagtartalom meghatározása

Miközben egy kiszerelt gyógyszerkészítmény (tabletta, kapszula, stb.) hatóanyagtartalmának meghatározása teljesen evidens, a hatóanyagok rutin tartalmi mérése régóta vitatott koncepcionális kérdés.⁶ A legpontosabb tartalmi eredményt úgy tudnánk meghatározni, ha ismernénk a hatóanyag összes szennyezését, validált módszerekkel mennyiségüket a megfelelő pontossággal megmérnénk, és ezekből az adatokból ún. számított tartalmat határoznánk meg.

Ezzel szemben a hatósági elvárásoknak megfelelően minden hatóanyagból kell tartalmi meghatározást végeznünk. A hatóanyagtartalmi mérések két csoportba sorolhatók. A relatív mérések során valamely ismert tartalmú referencia anyagra vonatkoztatva mérjük és számítjuk, míg az ún. abszolút tartalmi mérések során a kapott jel nagyságból számítjuk ki a tartalmat. Leggyakrabban alkalmazott relatív mérések a kromatográfiás és az UV spektrofotometriás módszerek, abszolút módszerek a napjainkban egyre fontosabbá váló NMR illetve titrimetriás módszerek.

Gyakorlati példákat a titrimetriás tartalmi mérésekre mutatunk be, kiemelve, hogy ez a klasszikus módszer még mindig fontos szerepet tölt be a gyógyszeranalitikában.⁷

A gyógyszerhatóanyagok egy része valamilyen só formájában kerül előállításra. A szokásos (hidroklorid, hidrobromid, szulfát, acetát stb.) sók tartalmi mérése, vagy más oldalról megvilágítva, a sóképzés megfelelőségének, az elméleti sav:bázis arány igazolásának szinte kizárólagos módszere a sav/bázis titrálás.

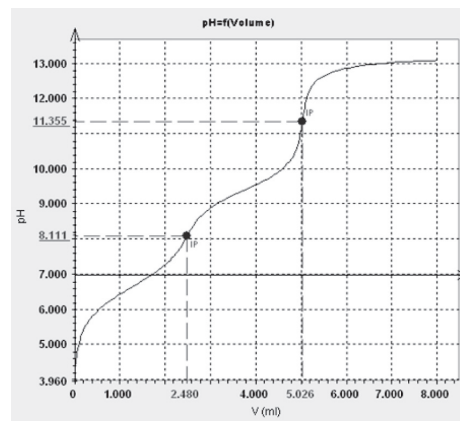
A mérés elve

A mérőoldat sav, illetve bázis, ami a megfelelő közegben pillanatszerűen reagál az adott hatóanyaggal. Az elektród a reakció végét potenciálugrás formájában érzékeli. A számítógéppel vezérelt automata titrátor a kért eredményt (pl. mérőoldat fogyás, hatóanyagkoncentráció) kiszámítja és tárolja. A sav-bázis titrálások kivitelezését tekintve kétfajta módszert használunk: vizes-félvizes közegű, és nemvizes közegű titrálások.

A félvizes közegű titrálások esetében vízzel korlátlanul elegyedő szerves oldószer (pl. metanol, etanol, acetone, acetonitril, 1,4-dioxán, tetrahydrofuran) és víz elegye a titráló közeg. A választást az oldhatóság és a titrálási görbe jellege határozza meg. Hasonló oldhatóság esetében azt az oldószert választjuk, ahol meredekebb a potenciálugrás, így jobban értékelhető az inflexiós pont.

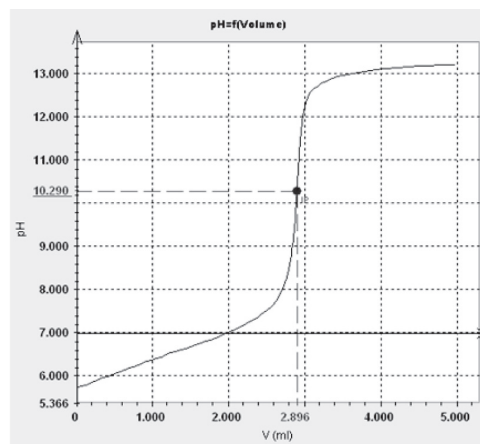
Érdekes példák félvizes közegű titrálásokra

Hatóanyag sók titrálásakor nem várt eredmények is tapasztalhatók. Példaként az egymással izomer maleát és fumarát sók titrálását mutatjuk be. Titráló közeg acetone és víz elegye, a mérőoldatunk 0,1 M-os, vizes nátrium-hidroxid volt. Nem várt módon a két anyag eltérő titrálási görbét eredményez.



9. Ábra. A maleát só titrálási görbéje.

A maleát szerkezetéből következően, ahogy várható volt, két lépcsőt kaptunk. Az első lépcső a szabad karboxilcsoporthoz rendelhető, a második a bázisról történő leszorításhoz.



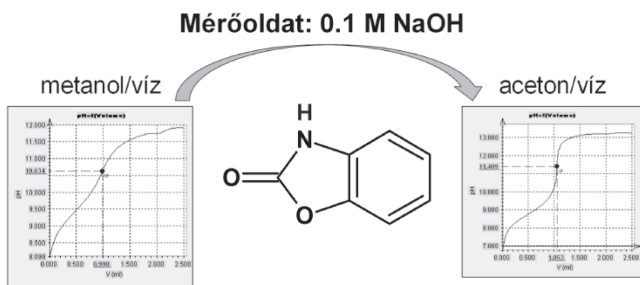
10. Ábra. A fumarát só titrálási görbéje.

A fumarát só és fumarát sav titrálási görbéje előre nem várt módon eltérő volt, egy lépcsőt kaptunk.

Az a feltételezésünk, hogy maleinsav esetében a közelség miatt az egyik karboxilcsoport karbonilja hídszerkezetet alkot a másik karboxilcsoport protonjával és ez okozza a két disszociációs állandó egymástól való eltávolodását, míg fumarát sav esetében a karboxilcsoportok olyan távol vannak, hogy „egyenértékűvé” válnak egymással.

Másik érdekes példánk a titráló közeg hatása. Ezt szemléletesen mutatja be a 2-benzoxazolinon molekularészletet tartalmazó hatóanyag példája. A vegyületsalád nem látszik savnak. A savasság oka a molekulán belüli elektronelokalizáció, konjugáció és a karbonil-és *o*-fenilénecsoporthoz negatív induktív effektusa.

Ha a metanol – víz rendszer helyett aceton – víz rendszert használunk a titráláskor, akkor a csekély meredekségű potenciálugrás (rossz értékelhetőség) már jól értékelhető titrálási görbévé válik és így az eredményünk is pontosabb, jobban reprodukálható.



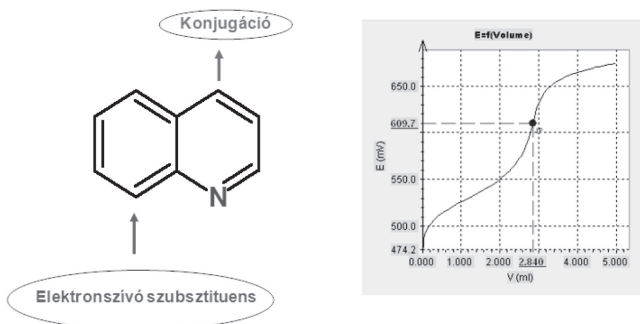
11. Ábra. A közeg hatása a titrálási görbére.

Az előző példából látjuk, hogy a titráló közeg nagymértékben befolyásolja a titrálhatóságot és a titrálási görbét. A gyógyszerhatóanyagok nagy része gyenge bázikusságú nitrogént tartalmaz. Ebben az esetben semmilyen féléves közegű titrálással nem tudjuk a problémát megoldani. A gyenge bázikusság oka, hogy bizonyos molekulán belüli hatások miatt a nitrogéneken nincs stabilan kötött elektronpár. Az ilyen típusú gyógyszermolekulákat csak *nemvizes közegű titrálással* lehet meghatározni. A tématerület elismert kutatója és továbbfejlesztője Társaságunk egyik szaktekintélye, a kutatási analitikai terület egyik vezetője volt. Dr. Gyenes István hosszú ideig vezette a Társaság Alkalmazott Fizikai-kémiai kutató laboratóriumát. A magyarul, angolul és németül megjelent „Titrálás nemvizes közegben” című műve Magyarországon és külföldön még ma is elismert szakkönyv.⁸

Nem vizes titrálás esetén a titráló közeg általában jégecet, de saját tapasztalatunk szerint a koncentrált ecetsav ugyanúgy megfelel közegeként. A mérőoldat jégecetes perklórsav. A perklórsav a legerősebb laboratóriumi szerves sav, de ebben a közegben egy, sokszorosan erősebb sav keletkezik, az acetacidium-perklorát.

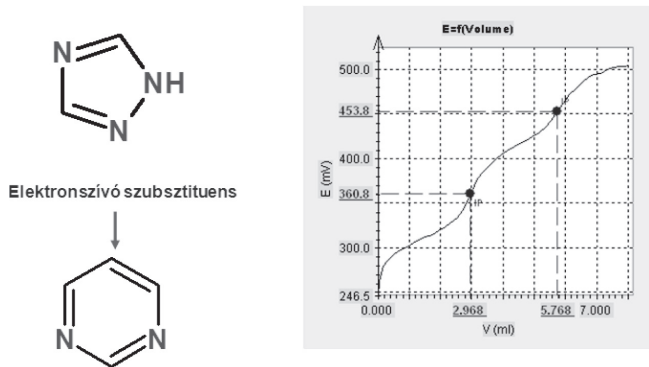
Néhány, a Richter jelenlegi portfóliójában szereplő hatóanyag vizsgálatának bemutatásával szeretnénk rámutatni a módszer jelentőségére.

Egy elektronszívó szubsztituenset tartalmazó, konjugatív hatásnak kitett kinolin-származékot ezzel a módszerrel sikerült pontosan, reprodukálhatóan megtitrálni (12. Ábra).



12. Ábra. Egy nagyon gyenge bázis perklórsavas titrálása.

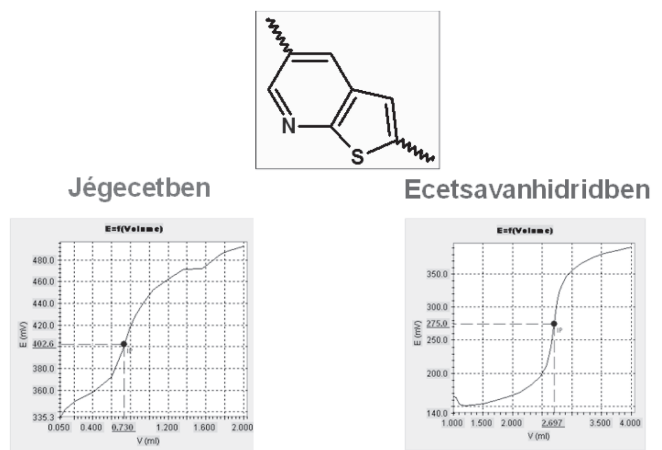
A módszer ún. „nivelláló” módszer (általában nem kapunk külön lépcsőket, a féléves közegű titrálásokkal szemben, melyek ún. differenciáló módszerek). Egyik gyógyszerhatóanyagunk (amely pirimidin illetve triazolcsoportot is tartalmaz) esetében viszont a perklórsavas titrálással két lépcsőt kaptunk (13. Ábra).



13. Ábra. Elkülönült lépcsők nemvizes közegben (differenciáló hatás).

A kísérleti tapasztalatok alapján az első lépcsőhöz a pirimidin-rész, a másodikhoz a triazolcsoport rendelhető.

A nemvizes közegű titrálásoknál a báziserősséget lehet még növelni. Ha közegeként jégecet vagy koncentrált ecetsav helyett ecetsavanhidridet alkalmazunk, akkor nő a báziserősség. A 14. ábrán egy olyan molekula bázisrészlete van, ami annyira gyenge, hogy jégecetben csak gyenge inflexiós pont látszik, de ecetsavanhidridben a titrálási görbe minden szempontból ideális.



14. Ábra. A báziserősség növelése.

Annak a magyarázata csak elméleti szintű, hogy az ecetsavanhidrid miért fokozza a báziserősséget. Feltételezhetően acetyl-perchlorate complex keletkezik, mely csak ecetsavanhidridben létezik, eddig még senkinek nem sikerült kinyerni.

Az irodalom szerint a „legradikálisabb” közeg” a koncentrált hangyasav és ecetsavanhidrid 1 – 1 térfogatarányú elegye. Ezt saját méréssel még nem sikerült igazolnunk. Ha egy bázis már olyan gyenge, hogy ecetsavanhidridben is megtitrálhatatlan volt, akkor a koncentrált hangyasav alkalmazása sem növelte meg a báziserősséget.

5. Összefoglalás

A hatóanyagok vizsgálati módszereinek fejlesztése a különböző technikákat művelő analitikusok speciális szakmai tudásán és a hatóanyag előállításához kapcsolódó egységek (szintetikus laborok, technológiai egységek, üzemek, minőségbiztosítás, stb.) szakembereinek együttes gondolkodásán alapul. A fejlesztés során célunk az anyagok és folyamatok minél részletesebb megismerése, és a hatóanyag vizsgálatára alkalmas korszerű, a gyógyszerhatóságok elvárásainak is megfelelő módszerek kidolgozása. Ebből a rövid összefoglalóból is reméljük kiderült, hogy bár az elvárások és az elvek minden hatóanyag esetén megegyeznek, de a megvalósítás módja mindig különböző és a fejlesztési folyamat számtalan izgalmas tudományos feladatot tartogat.

Köszönetnyilvánítás

A hatóanyagok analitikájának modern, tudományos és minőségbiztosítási alapokon álló megközelítése majdnem három évtizedre nyúlik vissza. Hálás köszönettel tartozunk elődeinknek, különösen Dr. Görög Sándornak és Dr. Gazdag Máriának, akiknek köszönhetően kialakult Társaságunknál a korszerű gyógyszeranalitikai kutatás. Az ő innovatív kezdeményezőképeségük és szakmai tudásuk vezetett a mai szilárd tudás alapon nyugvó rendszerhez, ami nélkül a Richter nem tartozna a világ élvonalába a gyártás, a fejlesztés és a kutatás területén.

Drug analysis from a developer's point of view

From original explorative research to the release qualification of drug products, the need for modern analytical support comes up in a large variety of activities in the pharmaceutical industry. The fundamental aim of the analytical work however is the same in the different fields: promoting a deeper knowledge and the qualitative and quantitative characterization of the materials, helping the understanding of the processes in order to guarantee the safety of the drugs.

The selection of the applied methods and techniques is based on three pillars:

1. Applying the methods and general chapters of pharmacopeias is essential in the case of drugs, therefore it is practical to use them during the development.
2. There are important ICH guidelines (International Council for Harmonisation, previously International Conference on Harmonisation) relating to the quality of the drugs. The objective of these guidances is to recommend both methodological approaches and acceptance criteria.
3. The characterization of the product should be based on scientific considerations. The analyst has to keep in view that the method developed today will be applied in the future, so state-of-the-art solutions are preferred.

Methods are in progress in the development phase, therefore the number and nature of the applied methods are continuously changing. Our aim is to find out what the critical quality attributes of the products are, and which methods are suitable for measuring them. Suitability of the method is very important from a quality assurance point of view. Validation of the methods is also the task of the method developer.

Köszönjük a fejlesztési folyamat számos területén dolgozó munkatársaink együttműködését.

Külön köszönet a Kutatási Analitikai Osztály jelenlegi munkatársainak munkájáért, amivel hozzájárulnak az osztály eredményeihez. (Dr. Varga Katalin, Dravecz Ferenc, Gáspár Bernadett, Dr. Kalmár Éva, Dr. Kovács Máté, Kövesné Dr. Fitz Mónika, Nagy Ádám, Dr. Osztheimer Éva, Dr. Szabovik Gabriella, Dr. Tarnai Máté illetve Asztalosné Haluszka Csilla, Bokor Irén, Cserhátiné Bódi Rózsa, Horváth Edit, Kériné Kisfaludy Katalin, Perutek Dorottya, Szentes Zsófia)

Hivatkozások

1. Kah, M.; Brown, CD. *Chemosphere* **2008**, *72*, 1401-1408.
2. DryLab® User Manual and Reference Guide, **2010**.
3. Molnár, I. J. *Chromatography A* **2002**, *125*, 129-156.
4. Szepesi, G.; Gazdag, M. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1988**, *6*, 623-639.
5. Görög, S.; Gazdag, M. *Journal of Chromatography B* **1994**, *659*, 51-84.
6. Görög, S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, *36*, 931-937.
7. Japanese Pharmacopoeia (JP), 16th Edition, **2016**.
8. Gyenes, I. *Titrálás nemvizes közegben*, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, **1960**.

The authors have surveyed in detail the different considerations of quality monitoring during the development process. The drug substance always contains impurities originating from the synthesis and/or the applied materials. According to the pertinent guideline (Q3A: Impurities in new drug substances) the impurities are classified as inorganic impurities, residual solvents, and organic impurities.

Inorganic impurities are normally known and include water, inorganic salts, and heavy metals. The methods to be applied are well known general methods such as "Karl Fisher titration" or "Loss on drying" or "Sulphated ash".

The control of residues of the solvents (and its potential impurities) is carried out according to the guideline (Q3C: Impurities for residual solvents). The used technique in most cases is gas chromatography (GC) with head space or liquid injection.

The most challenging work is to find out what the potential organic impurities of the drug substance are, which can arise during synthesis, purification and storage ("impurity profile"). According to the physical-chemical characteristics of the drug substances, the generally applied method is high performance liquid chromatography (HPLC). Collection of physical chemical attributes of the sample and known impurities (such as solubility, pK and logD-pH relation) is necessary for choosing the separation mode and its optimization. Separation of degradation products is also expected. The degradation products usually are not known and available at the beginning of the method development, therefore these components are "produced" by different stress tests (effect of temperature, humidity, light in solid form and/or effect of acidic, basic, and oxidative circumstances in solution). The detailed example shows how we select the pH of the mobile phase on the basis of the log D-pH relationship, and what are the other parameters which have to be taken into consideration to choose the right buffer. The polarity of the components determines the suitable column.

DryLab software is used for the optimization using the principle "Quality by Design". The robustness map, the "cube" predicted by DryLab represents a design space where robust separation can be achieved.

Among the related substances chiral impurities represent a very important problem. Racemic drug substances are usually characterized by capillary electrophoresis (HPCE). Enantiomeric purity can be measured with chiral HPLC, but the method development is a very challenging job even today.

The routinely applied method for the content determination of a drug substance is titrimetric assay. Examples and some interesting observations are shown to demonstrate that this classical method plays an important role in drug analysis.

The principle of the method is the instantaneous reaction of the volumetric solution with the active pharmaceutical substance in the proper medium. The end of the reaction is indicated by a potential jump when using electrodes. The computer of the automatic titrator calculates the results and stores them. With regard to the medium we use two main types of acid-base titration: aqueous-half aqueous and non-aqueous.

In the case of half-aqueous titration the organic solvent must mix with water unlimitedly. The solvents most frequently used are 1,4-dioxane, tetrahydrofuran, methanol, ethanol, acetone, acetonitrile. The choice of solvent determines the solubility of the substance to be measured and the character of the titration curve. The steeper the potential jump, the more accurately the inflection point can be evaluated.

We have highlighted some interesting examples in the field of half-aqueous titration. Interestingly, the titration curves of the isomeric maleate and fumarate salts differ in an acetone – water mixture when using a volumetric solution of 0.1 M sodium hydroxide. The titration curve of the maleate salt contains two inflection points, whereas that of the fumarate salt contains one inflection point. The article explains this phenomenon. The medium can also have some interesting effects. For example, the 2-benzoxazolinone moiety that is present in some drug substances does not seem to be acidic (the inflection point is barely visible) when using a mixture of methanol and water for the titration. However, in an acetone –water mixture we obtain an excellent titration curve.

We have also discussed some examples of non-aqueous titration. Many drug substances contain a weakly basic nitrogen atom due to electron delocalization, conjugation, and negative inductive effects within the molecule. In such cases only non-aqueous titrations can be used. The medium is glacial or concentrated acid, the volumetric solution is perchloric acid in glacial acetic acid. In this case a peculiar acid forms that is much stronger than aqueous perchloric acid. A renowned expert of this method was dr. István Gyenes who worked at Richter for many years and whose seminal book on the subject was published internationally. Quinolone derivatives (many drug substances contain this moiety) can only be titrated in this way, and an interesting example is given in our paper. If the organic base is so weak that the non-aqueous titration with perchloric acid does not give a proper titration curve, the glacial or concentrated acetic acid has to be changed to acetic anhydride. We give an example of this case.

Gyógyszerhatóanyagok polimorfája komplex megközelítésben

DEMETER Ádám,* SZALAY Zsófia, JANKE Dénes és MAROSI Attila

Richter Gedeon Nyrt., Hatóanyag morfológiai osztály, Gyömrői út 19-21, 1103 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A polimorfia egzakt tudományos definíciója korántsem egyértelmű,¹ a leginkább elterjedt definíció szerint a polimorf módosulatok egy- vagy többkomponensű rendszerek lehetnek, de csak az azonos kémiai tartalommal rendelkező, kristályszerkezetében eltérő formákat tekintjük egymás polimorfjainak. A gyógyszeripari gyakorlatban, és jelen közleményben, a jelentést gyakran kibővítve, mintegy gyűjtőfogalomként használjuk, egy adott gyógyszervegyület különböző szilárd formáira utalva,² beleértve a vegyület szabályos polimorf módosulatait, különböző szolvátjait és hidrátjait (szolvatomorf formák), továbbá a vegyület amorf formáját, illetve újabban a kokristályait is. Közleményünkben áttekintést kívánunk nyújtani a polimorfia gyógyszeripari fontosságáról, a szilárdfázisú analitika szerepéről, a tervezett és robusztus kristályosítás jelentőségéről. A hatóanyagra fókuszálva mutatjuk be a polimorfia kutatási-fejlesztési tevékenységet a Richterben, melyet szemléletes példákkal illusztrálunk.

1.1. A polimorfia gyógyszeripari jelentősége

A polimorfia gyógyszeripari jelentősége két szempontból is kiemelendő: egyrészt a hatóanyag polimorfája a termék hatékonyságához és biztonságosságához kapcsolódó minőségügyi kérdés. A polimorfia technológiai és analitikai kontrollja ma már a gyógyszergyártás és minőségellenőrzés megkerülhetetlen részévé vált hatóanyag és készítmény szinten egyaránt. Másrészt, a különböző szilárd formák eltérő fizikai-kémiai sajátosságai miatt különbözőképpen lehetnek előnyösek a hatóanyag és a készítmény előállítására szempontjából, ezért termékszabaddalmi oltalommal védhetők, ami iparjogvédelmi kérdés. A hatóanyag polimorf módosulatainak eltérő fizikai-kémiai sajátosságai (pl. olvadáspont, sűrűség, higroszkóposág, elektrosztatikus tulajdonságok, szemcseméret és habitus, folyási jellemző, tömörödési készség, tablettázhatóság, oldhatóság, oldódási sebesség, stb.) miatt a különböző szilárd formák fizikai és kémiai stabilitása, formulálási és egyéb technológiai viselkedése, továbbá kioldódása és biológiai hasznosíthatósága jelentősen különbözhet egymástól. A hatóanyagok polimorfája és az ahhoz kapcsolódó minőségügyi szempontok az 1960-as évektől kezdődően kerültek a kutatások fókuszába,³ azonban a kérdéskör gyógyszerhatósági kezelése és szabályozása csak a 2000-es évekre „kristályosodott ki”.^{2,4,5} Mindezt olyan esetek váltották ki, mint pl. az Abott cég Ritonavir⁶ és a UCB gyógyszergyár Rotigotine⁷ készítményeinek minőségi problémái, amely végső soron a termék piacról való átmeneti kivonását, újrafelkészítését vonta maga után, a komoly gazdasági hatásról nem is beszélve.

A polimorfia az originális és generikus termékek esetében is meghatározó jelentőséggel bír az innováció, a szellemi

tulajdonjogok tekintetében, továbbá hatással van a termék életciklus menedzsmentjére is.⁸ A polimorfia kutatás napjainkra a piaci verseny egyik offenzív/defenzív stratégiai eszközévé vált, amit egyértelműen jelez a polimorfiai és kapcsolódó morfológiai szabadalmak számának töretlen növekedése. Az originátor egy jól időzített polimorfiai szabadalma a generikus versenytársak piacra lépését gátolhatja az alapszabaddalom lejáratán és piaci exkluzivitási időn túl. A generikus gyártók ezért megpróbálnak saját innovatív só és/vagy polimorf formával szabadalmilag független úton előbb piacra kerülni. A gyártók közötti versenyben a polimorfia könnyen a szabadalmi jogviták színterévé válhat, amelyet a bitorlási perek egész sora kísérhet.⁹

1.2. Szilárdfázisú gyógyszeranalízis

A műszeres gyógyszeranalitikai vizsgálatok döntő többsége, a mérések számosságát tekintve, oldatfázisú mintából történik (HPLC, GC, CE, NMR, MS, titrimetria, ICP-OES, stb.). Talán kevésbé általánosan ismert, hogy a gyógyszeranalízisben számos olyan technikát alkalmazunk, amelyek a hatóanyag/segédanyag/készítmény szilárdfázisú jellemzőinek meghatározására irányulnak, ebből adódóan az analízis szilárdfázisú mintán történik. A hatóanyag szilárdfázisú jellemzőinek meghatározása, a polimorfia minőségi és mennyiségi analízise hatóanyagban és készítményben, a polimorf rendszerek stabilitási viszonyainak feltérképezése elképzelhetetlen korszerű szilárdfázisú analitikai háttér nélkül, amely számos analitikai technika és mérési módszer (1. táblázat) komplex alkalmazását követeli meg.^{10,11} A komplex szilárdfázisú analízis különösképpen hangsúlyossá válik összetett gyógyszerhordozó rendszerek, pl. nanokompozitok szerkezeti jellemzésében és viselkedésének megértésében, ami akár kisszögű röntgenszórás mérést is szükségessé tehet nemzetközi együttműködésben, szinkrotron állomáson. A bitorlás vagy függetlenség tényének bizonyítása szempontjából a szilárdfázisú analitikának szintén perdöntő szerepe van.

1.3. Sókiválasztás, polimorfiaszűrés, kokristályok

Az originális és generikus gyártók igyekeznek egy gyógyszervegyület minél több szilárd formáját felfedezni és jellemezni sókiválasztás, polimorfia- és kokristályosítás keretében, az előnyös módosulatokat pedig megpróbálják szabadalmaztatni így teremtve versenyelőnyt maguknak. Az originális gyártók fontos feladata, hogy a klinikai jelölt vegyületnek a fejlesztésre legalkalmasabb szilárd formáját válasszák ki. Ez lehet a vegyület neutrális vagy só formája, kristályos vagy amorf, anhidrát vagy hidrát, esetleg kokristály formája.^{12,13} A kiválasztás szempontjából meghatározó jellemzők: a tervezett gyógyszerforma, az

* Tel.: 431-5922 ; fax: 432-6006 ; e-mail: a.demeter@richter.hu

1. Táblázat. Leggyakoribb szilárdfázisú analitikai módszerek a gyógyszerhatóanyagok analizisében

Technika	Módszer
Mikroszkópia	polarizált fény mikroszkópia, pásztázó (SEM) ill. transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM), atomi erő mikroszkópia (AFM)
Termikus analízis	termogravimetria (TGA), differenciális pásztázó kalorimetria (DSC), modulált hőmérsékletű DSC, izotermális mikrokolorimetria, fejlődő gáz analízis (TGA-MS, TGA-IR)
Diffrakció	egykristály röntgendiffrakció (SCXRD), röntgen pordiffrakció (XRPD/PXRD), neutron pordiffrakció (NPD), kisszögű röntgen-szórás (SAXS)
Spektroszkópia	rezgési spektroszkópia (IR, RAMAN, NIR, terahertz), szilárdfázisú NMR spektroszkópia, termikusan stimulált áram spektroszkópia (TSC), dielektromos spektroszkópia
Szemcseméret analízis	mikroszkópos képanalízis, szitaanalízis, lézerdiffrakciós szemcseméret-meghatározás, fényszórásos szemcseméret-meghatározás
Kémiai térképezés	IR/ diszperzív Raman / NIR, mikro röntgenfluoreszcencia
Képkötés	NIR, terahertz pulsed imaging, röntgen mikrotomográfia
Egyéb technikák	dinamikus gőzszorpció, inverz gázkromatográfia, dinamikus mechanikus analízis, porozimetria, fajlagos felület gázadszorpció vizsgálat
Kapcsolt technikák	fűthető tárgyszal (HS-XRPD, HS-IR/Raman/NIR), változtatható páratér (VH-XRPD, VH-IR/RAMAN/NIR)

alkalmazás módja, a hatóanyag sav-bázis tulajdonságai, lipofilitása, oldhatósági profilja, farmakokinetikai viselkedése, a szilárd forma fizikai és kémiai stabilitása, termikus jellemzői, szorpció viselkedése, kompatibilitása segédanyagokkal, technológiai jellemzői (habitus, szemcseméret, szűrési, folyási tulajdonságok, apríthatóság) továbbá az előállítás technológiai reproduktibilitása és kontrollja. A screening fázisban a szilárd formák előállításának leghatékonyabb megoldása a nagy áteresztőképességű kristályosítás (High-Throughput Crystallization, HTC), amely a kristályosítás paraméterterében (oldószer, hőmérséklet, koncentráció, stb.) nagyszámú kísérletet végez el plate-en szubmikrogrammos anyagigénnyel.¹⁴ Hátránya viszont, hogy számos esetben produkál metastabil formákat, amelyek későbbi méretnövelés során nem reprodukálhatóak. Az adott közegben és hőmérsékleten termodinamikailag legstabilabb forma megtalálásának leghatékonyabb módja a szuszpenzióban végzett hosszú idejű (hetek, hónapok) kevertetés, amely végeredményben egy stabilabb polimorf, esetleg hidrát, vagy szolvát forma megjelenéséhez vezethet.

1.4. Kristályosítás

A hatóanyagokat szilárd formában leginkább kristályosítással állítjuk elő, mely az egyik leggyakrabban alkalmazott tisztítási művelet a gyógyszeriparban. A kristályosítás módja kritikus lehet az izolálhatóság, a kémiai tisztaság, a kihozatal és a gazdaságos gyártás szempontjából. Mindezen túl a kristályosításnak robusztus módon kell biztosítania a megfelelő kristályformát, a szemcsék kívánt habitusát és szemcseméreteloszlását, amelyek a szilárd gyógyszerformák előállítása szempontjából kritikus minőségi paraméterek (CQA, Critical Quality Attribute).

A kristályosítás egyszerre mérnöki tudomány¹⁵ és művészet. Mérnöki tudomány, aminek alapja az oldhatósági viszonyok, a fázisdiagramok, fázisegyensúlyok valamint, a kristályosodás metastabil zónájának, a göcképződésre (primer és szekunder, homogén és heterogén nukleáció) és növekedésre ható kritikus faktorok ismerete, a kristályosítási technikák (reaktív, hűtéses, kicsapásos, bepárlásos, olvadákból történő kristályosítás, stb.) és azokat megvalósító ipari készülékek megfelelő alkalmazása. Művészet abban a tekintetben, hogy egy új módosulat megtalálása, egy kevésbé

tiszta anyag kristályosodásra bírása, az olajosodás és amorf leválás elkerülése igényel egyfajta ráérzést, gyakorlatot, ami inkább művészet, mint tudomány. Továbbá művészet abban a tekintetben is, hogy a mikroszkóp tárgyszalán varázslatos formájú és színvilágú művészi hatást keltő kristályformák keletkezhetnek. A kristályosítás technológiájának kidolgozása és optimalizálása először laboratóriumban grammos méretben történik, de félüzemben kilogrammos, végül üzemi méretben (több száz kg) is megbízhatóan robusztusnak kell lennie. A kémiai tisztaság, kihozatal, kristályforma, habitus, és a szemcseméret minőségi követelményeknek (CQA) való megfeleléshez ismerni és optimalizálni kell a kristályosítási folyamat kritikus paramétereit (CPP, Critical Process Parameters), meg kell határozni a folyamat ún. tervezési terét (DS, Design Space) amelynek legbiztosabb és leghatékonyabb módja kísérlettervezés (DoE, Design of Experiments). A hatékony kísérlettervezést nagyban segíti az in-line mérőszondák alkalmazása, amelyekkel mintegy „belelátva” a reaktorba, a kristályosodási folyamat mélyebb megértéséhez jutunk. Mindez lehetővé teszi a kristályok és a kristályosítás minőségi tervezését (Crystallization by Design).

2. Polimorfia kutatás a Richterben

A morfológiai vizsgálatok kezdete a Richterben az 1970-es évekre nyúlik vissza. A tevékenység az 1980-as évektől kezdődően vált a K+F integráns részévé. Az időszak talán legfontosabb eredményét a famotidin tiszta A és B módosulatainak felfedezése és a vonatkozó szabadalom jelentik.¹⁶ 1981-ben alakult meg a Morfológiai és Biofarmáciai Csoport a készítményfejlesztési területen, ahol 1988-ban került beszerzésre az első Philips röntgen-pordiffrakciós készülék. A 90-es évektől a hatóanyagok polimorfiaja és kristályosítása egyre nagyobb hangsúlyt kapott, ezért megkezdődött a tevékenység műveléséhez szükséges eszközpark kialakítása a hatóanyagfejlesztési területen is. A kristályosítás kutatásában és technológiai fejlesztésében jelentős előrelépést jelentett az 1998-ban beszerzett Mettler-Toledo LabMax laboratóriumi reaktor. 2000-től önálló szervezeti keretek között a Hatóanyag morfológiai csoportban folytatódott a hatóanyagok polimorfia kutatási, kristályosítási és szilárdfázisú analitikai tevékenysége. 2002-

ben a készítményfejlesztésen megalakult a Gyógyszerfizikai osztály, ahol a preformulációs vizsgálatokhoz, a különböző gyógyszerformákkal kapcsolatos morfológiai kérdésekre fókuszálnak, valamint a készítményfejlesztéshez kapcsolódóan végeznek kioldódásvizsgálatokat. Az 1990-es évek végétől kezdődött az originális kutatási projektekből preklinikai fejlesztésre jelölt ún. RGH-számos vegyületek célzott polimorfiaszűrése és sókiválasztási folyamata. Az új originális kihívások és a generikus fejlesztésekben egyre nehezedő morfológiai szabadalmi helyzet, valamint a hatósági követelmények szigorodása miatt a terület műszeres és személyi megerősítése vált szükségessé. 2006-ban megalakult a Hatóanyag morfológiai osztály (HMO), amely komplex módon képes a hatóanyagok morfológiai és polimorfiai jellemzőivel kapcsolatos iparjogvédelmi, minőségügyi, kristályosítási és szilárdfázisú analitikai kérdések megoldására.

2.1. Hatóanyag morfológiai osztály feladatai

A HMO speciális műszerparkjával kiterjedt szilárdfázisú analitikai és kristályosítási tevékenységet végez, amely a kutatás, a fejlesztés, a gyártás és a minőségbiztosítás során felvetődő, a hatóanyagok és részben a készítmények morfológiai jellemzőihez köthető kérdések megválaszolását támogatja. Tevékenysége széles spektrumot fog át mind szakmai tekintetben (komplex szilárdfázisú analitika, só- és polimorfiaszűrés, kristályosítási eljárások fejlesztése), mind pedig a Richter tevékenységi köréhez kapcsolódóan. Egy K+F téma morfológiai vetülete az iparjogvédelmi helyzetértékelésétől kezdődően, a laboratóriumi, füzemi eljárásfejlesztésen keresztül az üzemi validációs fázisig, majd az azt követő törzskönyvi adatszolgáltatásig és hatósági válaszadásig tart. Az osztály termoanalitikai tevékenysége, pl. az illékony komponensek, az olvadáspont, bomlási hőmérséklet, a fázisátalakulások meghatározása a hatóanyag, üzemi intermedier, bomlástermék és egyéb standardok minősítésében, továbbá laboratóriumi K+F minták termikus jellemzésében elengedhetetlen. Üzemi technológia problémáknál, OOS (Out of Specification) kivizsgálásokban a gyökérokok azonosításában gyakran merül fel, hogy a probléma háttérben esetleg valamilyen morfológiai jellegű eltérés áll. Ilyen esetekben a kivizsgálási folyamatban veszünk részt különböző mérésekkel, vagy végzünk kristályosítási kísérleteket. Kiemelt jelentősége van a Richter originális kutatásából fejlesztésre jelölt klinikai kandidátus molekulák (RGH számos vegyületek) sókiválasztási és polimorfiaszűrésű folyamatának. Ebben a HMO intenzív preparatív tevékenységet végez, az előállt szilárd formák analitikai és fizikai-kémiai jellemzését, valamint a társosztályokkal közösen a fejlesztésre alkalmas szilárd forma kiválasztását, szabadalmi jellemzését végzi.¹⁷ Számos esetben van szükség polimorf keverékek mennyiségi analizisére alkalmas módszerek fejlesztésére, bizonyos minőségi vagy iparjogvédelmi szempontok szerint a módszer validálására és átadására a minőségellenőrző laboratóriumok felé.¹⁸⁻²⁰ A Készítményfejlesztési főosztály Gyógyszerfizikai osztályával együttműködésben végezzük a referens készítmények analizisét, ahol a hatóanyag polimorf módosulatának és szemcseméret eloszlásának meghatározása a kristályosítási eljárásfejlesztés kiindulópontjával szolgál. A kristályosítási eljárások kidolgozásában és optimalizálásában, üzemesítésében is aktívan részt vállal a HMO. Mindez

a centralizált tevékenység elképzelhetetlen lenne egy kiváló felkészültséggel rendelkező hatékony csapat nélkül. Hiszen egyszerre kell szilárdfázisú analitikai tudással és gondolkodással rendelkezni, a sokféle műszert mikroszkópi precizitással használni, az eredményeket komplex módon értékelni. Értetni kell az iparjogvédelmi és törzskönyvezési folyamatokat és elvárásokat, innovatívnak kell lenni a polimorfia kutatásban, és mérnöki gondolkodással kell megalkotni egy kristályosítási eljárást, ami üzemi körülmények között is az elvárt polimorfot adja a kívánt habitussal és szemcseméret eloszlásban. A HMO csapata mindezen feladatoknak egyszerre kell, hogy megfeleljen, ami komoly kihívást és leterheltséget jelent, de egyben biztosítja a munka változatosságát és sokszínűségét, az állandó szakmai fejlődés lehetőségét.

2.2. Hatóanyag morfológiai osztály eszközparkja

A HMO spektroszkópiai méréseire Nicolet 6700 FT-IR, Nicolet NXR-9650 FT-Raman és 1.6, 3.2 és 5.0MM MAS mérőfejekkel felszerelt Varian NMR 600 MHz szilárdfázisú NMR készülék áll rendelkezésre. A morfológiai vizsgálatokhoz nélkülözhetetlen röntgendiffrakciós felvételeket PANanalytical X'Pert PRO MPD diffraktométerrel, transzmissziós vagy reflexiós mintatartóban készítjük. A szemcseméret meghatározáshoz száraz (RODOS/M) vagy nedves (CUVETTE) diszpergálású módszereket fejlesztünk a Sympatec HELOS/BF lézerdiffrakciós készüléken. A mikroszkópos elemzésre Carl Zeiss Axio Imager M2 fénymikroszkóp ad lehetőséget. A termoanalitikai méréseket TA Instruments TGA Q5000 IR és Q50 termogravimetriás készüléken, valamint TA Instruments DSC Q1000 és Q10 differenciális pásztázó kaloriméterekkel végezzük. A hőmérsékletfüggő vizsgálatokra a Linkam fűthető tárgyasztallal végzett mikroszkópos vagy IR/Raman vizsgálat, illetve a fűthető tárgyasztalú XRPD használható. A kristályosítási technológiai fejlesztést Mettler-Toledo EasyMax 100 ml-es reaktorokban, valamint RC1e reakciókaloriméter 0,5 l és 2 l-es reaktorokban végezzük.

3. Esettanulmányok

Az alábbiakban szemléletes példákon keresztül adunk ízelítőt az előzőekben tárgyalt tevékenységekről.

3.1. Iparjogvédelmi tevékenység

A stroncium-ranelát (továbbiakban stroncium-ranelát) csontritkulás kezelésére használt hatóanyag.²¹ A hatóanyag 1989-es elsőbbségű kémiai alapszabadalma²² a sav kétértékű fémionokkal (stroncium, kalcium, magnézium) alkotott sóit és azok hidrátjait, ezen belül a stroncium-ranelát okta-, hepta- és tetrahidrát formáját védi. Az originátor 2004-es elsőbbséggel oltalom alá helyezte a stroncium-ranelát α kristályformáját, az igénypontban röntgen-pordiffrakciós (XRPD, *X-ray Powder Diffraction*) jellemzést és víztartalmat adott meg.²³ A szabadalom amerikai és eurázsiai ekvivalensének igénypontjában 22-24% víztartalom szerepel, mely 8,1-9 mol sztöchiometrikus víznek felel meg. Az európai szabadalom a víztartalmat 24%-ra korlátozta az igénypontban, ezáltal szigorúan véve nonahidrátot véd. Az originátor Protelos 2 g készítményéről az EMA (*European Medicinal Agency*) honlapján található ún. Scientific Discussion-ben is nonahidrát formát nevesítenek

aktív hatóanyagként. Egykristály röntgendiffrakciós vizsgálatok szerint a stroncium-ranelát elemi cellájában két ranelinsav distroncium sója található ($Z=2$) közel nonahidrát összetétellel: $[\text{Sr}_2(\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_8\text{S})(\text{H}_2\text{O})_5] \times 3,8 \text{ H}_2\text{O}$.²⁴

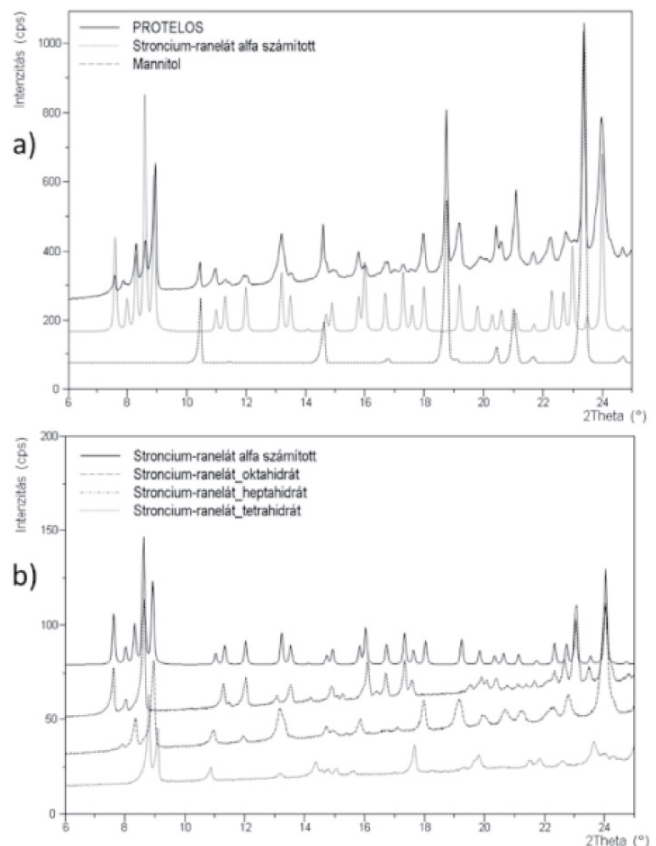
A fejlesztés kezdetén a referens készítményt (Protelos 2 g granulátum) vizsgáltuk. A szabadalom igénypontjában megadott XRPD csúcspozíció és relatív csúcsintenzitások alapján szimulált diffratogramot hasonlítottuk a készítmény mért diffraktogramjához (1.a ábra). Az α kristályforma egyértelműen azonosítható a készítményben. Mivel az α forma az alapszabadalom lejárata után is oltalom alatt állt, ezért kerülése tűnt indokoltnak. A fejlesztés során tiszta fázisként előállítottunk nona-, hepta- és tetrahidrát megfelelő víztartalmú kristályformákat. Az oktahidrát megfelelő víztartalmú anyag minden esetben a nona- és heptahidrát fázisok keverékének adódott XRPD alapján. A referencia módosulatok alapján egyértelművé vált, hogy az alfa kristályforma valójában szintén a nonahidrát/heptahidrát fázisok keveréke, tehát nem önállóan létező módosulat (1.b ábra). Továbbá dinamikus gözszorpciós vizsgálatokkal a vegyületről az is megállapítható volt, hogy a heptahidrát és nonahidrát állapotok a környezeti páratartalomtól függően könnyen egymásba alakulhatnak. A fenti információk alapvetően fontosak voltak a szabadalmilag független fejlesztési stratégia megalkotásában.

3.2. Sókiválasztás, polimorfiaszűrés

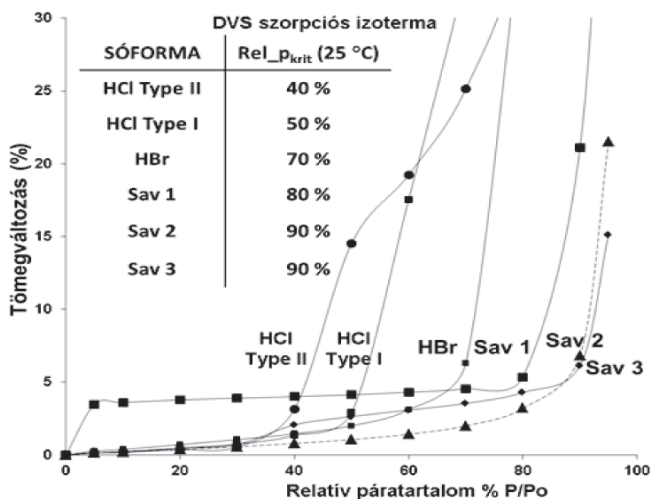
Egy fejlesztett hatóanyag esetében sókiválasztási tevékenységet indítottunk, mivel a HCl só (Type I) erősen higroszkóposnak bizonyult (2. ábra). Már a kristályosítási folyamatban is olajosodás volt jellemző, a szűrés során pedig elfolyósodott az anyag. Ezért elsődleges cél volt egy nem higroszkópos, előnyösen legalább 80-90 % relatív páratartalomig stabil sóforma előállítása, amiben a DVS szorpciós vizsgálatoknak kitüntetett szerepük volt. A sóképzési kísérletekben először a HCl sóból igyekeztünk eltérő polimorf módosulatot előállítani, abban a reményben, hogy másik HCl módosulat nem lesz higroszkópos. Sajnos azonban az előállított új Type II HCl még inkább higroszkópos volt. Ezért újabb sókat készítettünk, melyek közül sikerült megfelelő fizikai stabilitású sóformát ($p_{\text{krit}} > 90\% \text{ RH}$) találni (2. ábra), ami egyéb szempontok (megfelelő stabilitás, jól tisztul, jó termeléssel reprodukálhatóan előállítható) alapján is fejlesztésre alkalmasnak bizonyult.

3.3. Szilárdfázisú analízis: termoanalitikai vizsgálat

Ebben a példában egy szteroid vegyület intermedierjének, amely a 6-os pozícióban exociklusos kettőskötést tartalmaz, termikus analízis eredményeit mutatjuk be. A vegyület illékony komponens meghatározása céljából érkezett az osztályra, intermedier standard minősítéséhez. A 3. ábra felső részén láthatók a vegyület termogravimetriás (TG), derivált TG (DTG) és differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) görbéi. A TG görbén látható, hogy a vegyület 150 és 180 °C között 0,2%-os, jól elkülönülő, éles tömegvesztési lépcsőt mutat, amely során a tömegcsökkenés a maximális sebességét 167 °C körül éri el (ld. DTG görbe), majd kb. 227 °C felett újra felgyorsul a tömegvesztés, feltehetően az anyag párolgásához/bomlásához köthetően. A TG görbét vizsgálva felmerült a gyanú, hogy a 150-180 °C közötti tartományban tapasztalt tömegcsökkenés esetleg zárvány



1. Ábra. a) A Protelos készítmény röntgen-pordiffrakciós felvétele összehasonlítva a EP 1642897 B1 szabadalom alfa kristályformára megadott adatokból számított diffraktogrammal, valamint a mannit segédanyag felvételével (fentről lefelé). b) Az α forma számított diffraktogramja összehasonlítva a nonahidrát, heptahidrát és tetrahidrát referencia módosulatok felvételével (fentről lefelé).



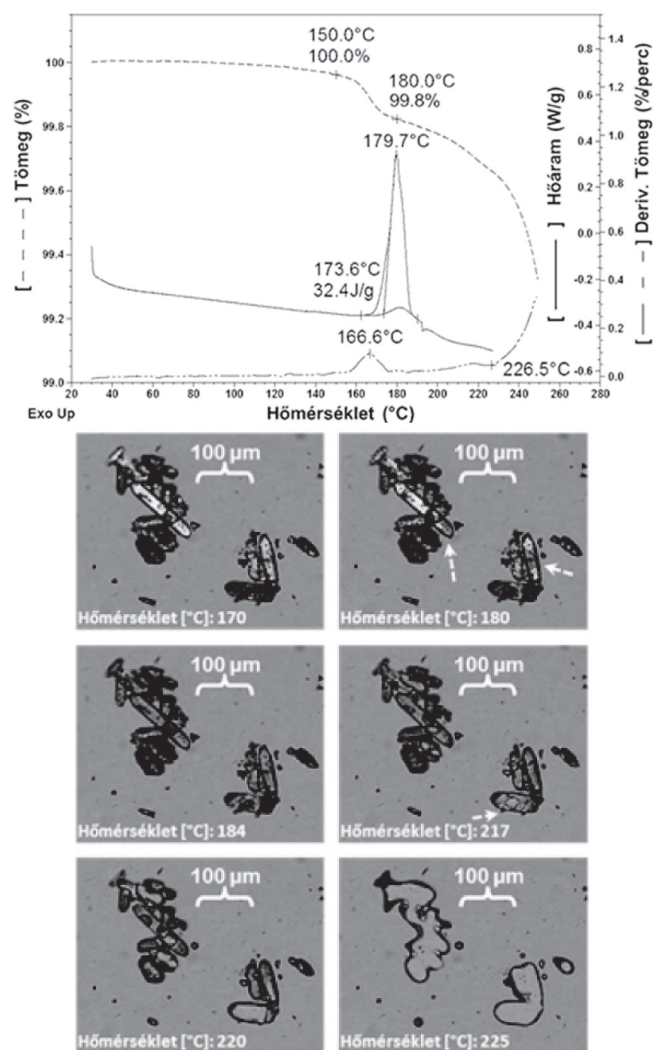
2. Ábra. A sókiválasztási folyamatban előállított különböző sóformák DVS szorpciós izotermái 25 °C-on. Az egyes sók kritikus relatív páratartalom ($\text{Rel}_p_{\text{krit}}$) értékeit, amely felett már higroszkópos a vegyület táblázatban tüntettük fel.

oldószer távozásához köthető, ezért DSC felvételt is készítettünk. A DSC görbén azt láthatjuk, hogy a tömegvesztési lépcsővel párhuzamosan, 170 °C felett egy éles exoterm csúcs jelenik meg. Ezt követően 230 °C-ig a DSC görbén más hőeffektus nem figyelhető meg;

az anyag termogramján olvadási endoterm nem látható. Ezek alapján az exoterm folyamat kétféle értelmezése kézenfekvő. Egyik lehetőség, hogy polimorf átalakulás történik (pl. kevésbé stabil polimorf átalakulása monotróp rendszer esetén a stabilabb formává), ez esetben még mindig számolhatunk zárványoldószer távozásával is. A másik lehetőség, hogy termokémiai reakció történik (pl. bomlás), mely esetben a tömegvesztés nem bizonylatolandó. A folyamat értelmezéséhez támogató termomikroszkópos vizsgálatot is végeztünk. A 3. ábra alsó részén látható polarizációs mikroszkópos képeket a mintáról fűthető tárgyasztal segítségével készült vizsgálat során nyertük. A mikroszkópi fotókon jól látható, hogy a vizsgált vegyület kristályai 170 °C-on egyértelműen egy kristályos anyag jelenlétét mutatják: kettőtörésük miatt a háttérnél sokkal fényesebbek és attól különböző színt is mutatnak polarizált fényben. A 180 °C-on készült fotón már látszik (ld. az ábrán fehér nyilakkal jelölve), hogy a kristályok szerkezetében valamilyen változás kezdődött meg, a szemcsék kezdik elveszíteni a kettőtörésüket, azonban az alakjuk változatlan. A 184 °C-os hőmérsékletet elérve a változás teljesen lezajlott, és a szemcsék – változatlan alak mellett – teljesen elvesztették a kettőtörésüket: a háttérrel megegyező (szürke) színt mutatnak. A jelenség azt jelzi, hogy a kristály átalakult, ez lehet makroszkopikus roncsolódás nélküli oldószeresztés/bomlás vagy fázisátalakulás is. A DSC exoterm csúcsa és a kettőtörés elvesztése inkább bomlási folyamatra utal. A szemcsék ezt követően 217 °C-ig nem mutatnak változást, amikor az ábra legalsó kristályában láthatóan elkezd kialakulni egy folyadéksepp (ld. fehér nyíl); megindul a minta átmenete folyékony (olvadék) állapotba. Ennek során 220 °C-nál a szemcsék lekerekedését tapasztaljuk, majd a 225 °C-os fotón már egyértelműen egy folyadék képe tárul a szemünk elé. A társosztálytól kapott reaktivitási információkat a fentiekkel összevetve a folyamat jól értelmezhetővé vált: a vegyület a 6-es pozícióban található exociklusos kettőtörés miatt dimerizációra hajlamos, amely reakcióhoz köztömben hidrogént veszít. A mért 0,2%-os tömegvesztés összhangban van a folyamathoz rendelhető kb. 0,3%-os elméleti tömegvesztéssel. Tehát a 150-185 °C körül lezajló termokémiai folyamatban az anyag kristályrácsa felbomlik, ezt mutatják a termomikroszkópos fotók, ahol az átalakulás során a kristályok anizotrópiája megszűnik. Ezt követően az anyag 217 és 225 °C között folyékony állapotba kerül, amihez nem tartozik olvadási endoterm, mivel a kémiai bomlás következtében a jól definiált kristályszerkezet már megbomlott. Végül az olvadék párolgása/bomlása okozza a TG/DTG görbén 227 °C felett elinduló gyorsuló ütemű tömegvesztést.

3.4. Szilárdfázisú analízis: kristályos fázisok mennyiségi meghatározása

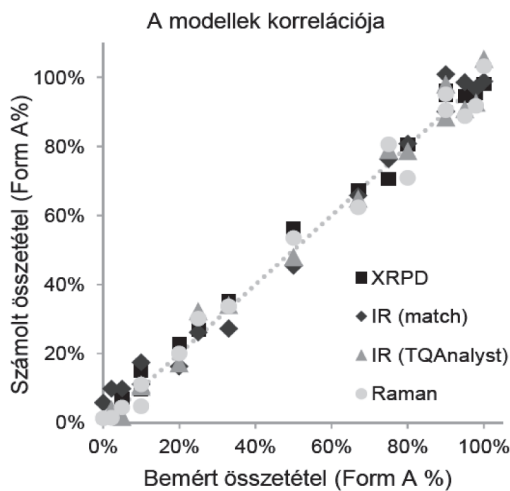
Egy generikus hatóanyagkristályosítási eljárásának vizsgálata azt mutatta, hogy a kristályforma keletkezése kinetikai hatások által kontrollált folyamat. A kristályosodás során, a gócképződés megindulásakor Form A (hidrát) vagy Form C (szolvát) módosulat keletkezik, ami a kristályosodás végére vagy az egyik tiszta módosulatot, vagy a két forma fizikai keverékét eredményezte. A kristályforma kialakulására ható kritikus folyamatparaméterek azonosításához kvantitatív módszert fejlesztettünk a keverékek összetételének meghatározására. Háromféle mérési módszer (IR, Raman és



3. Ábra. A dimerizációra hajlamos szteroid típusú vegyület TG, DTG, ill. DSC görbéi az ábra felső részén láthatók, rendre szaggatott, kettős szaggatott, ill. sima vonallal jelölve. Az ábra alsó része a minta termomikroszkópos vizsgálata során polarizált fényben készült fotókat mutatja be.

XRPD) eredményeit hasonlítottuk össze kvalitatív és kvantitatív szempontok alapján. Mindhárom módszert ismert összetételű porkeverékekkel kalibráltuk ($R^2 \sim 3-4\%$), és ezektől független, ismert összetételű mintákkal validáltuk (RMSEP $\sim 4\%$), valamint 90%-os keverékeken meghatároztuk a kimutatási határakat (DL $\sim 10\%$ a Form C módosulatra). A két módosulat legjobban röntgen-pordiffraktogramjuk alapján különböztethető meg. A diffraktogramokon jól elkülönülő csúcsokkal azonosítható a módosulatok jelenléte. Ugyanakkor, a Form C módosulat változó oldószer tartalma kismértékű eltérést okoz a csúcspozíciókban és relatív csúcsintenzitásokban, ami a kvantitatív meghatározás bizonytalanságát növeli. A mennyiségi meghatározáshoz a PANalytical HighScore Plus szoftver AutoScaler modulját használtuk megfelelő referencia diffraktogramokkal. A program által becsült fázisösszetételt kalibráltuk az ismert összetételű porkeverékeken (RMSEC – Root Mean Square Error of Calibration: a kalibráció négyzetes középérték hibája – 3,2%, RMSEP – Root Mean Square Error of Prediction: a predikció négyzetes középérték hibája – 3,5%). Az optikai spektroszkópiai módszereknél a Form C oldószer tartalom

változása nem okoz különbséget a spektrumban. Ugyanakkor a két módosulat felvétele nagyon hasonló, elsősorban intenzitásbeli különbségek alapján különböztethetők meg. Ennek ellenére a kvantitatív kemometriai módszerek mindkét mérési módszer esetében jól kalibrálhatóknak bizonyultak, a legjobb eredményeket PLS (Partial Least-Squares: részleges legkisebb négyzetek módszere) alapú modellekkel érték el (RMSEC 4,0% ill. 4,1%, RMSEP 3,7 ill. 4,0%). Így a kifejlesztett FT-IR módszer gyors rutinmódszer keverékek összetételének becslésére, míg az FT-Raman spektrumok értékelése készítmények esetében kerülhet előtérbe. A három módszer által adott eredmények hibahatáron belül egyeznek egymással a kalibráló sor elemeire és ismeretlen összetételű labormintákra egyaránt (4. ábra).

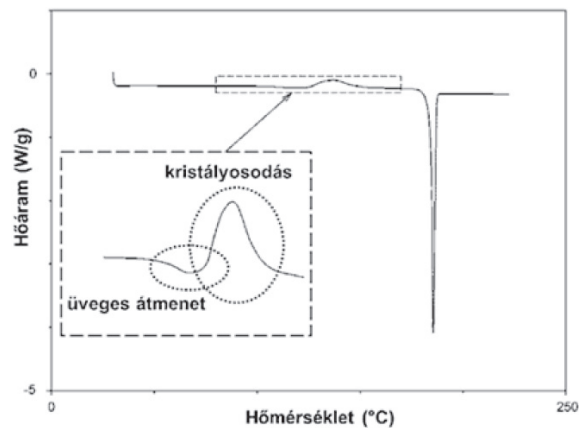


4. Ábra. A kvantitatív meghatározási módszerek korrelációja a kalibráló és validáló keverékekre.

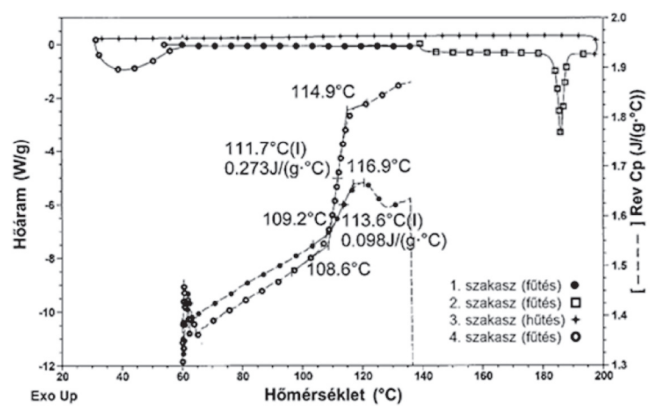
3.5. Szilárdfázisú analízis: amorf hányad mennyiségi meghatározása

A mennyiségi meghatározás lényegesen nehezebb kristályos és amorf fázisok keveréke esetén, mivel az amorf forma a spektrumokban jelentős csúcsszélesedést okoz, míg a diffraktogramban háttérként jelentkezik, ami specifikussági és érzékenységi korlátot is jelent. Azonban a hőmérséklet-modulált DSC (MDSC) technika, egy hőstabil hatóanyag kristályos-amorf hányadának meghatározására egyszerű rutin megoldást nyújthat, ami nem igényel nehezen előállítható kalibrációs keverékeket, ill. referencia fázisokat. A módszert egy amorf fázist is tartalmazó kristályos vegyület példáján mutatjuk be; ennek DSC görbéjét a 5. ábra mutatja, ahol kb. 110 °C-nál az amorf fázis üveges átmenete figyelhető meg (hőkapacitás-változás miatti alapvonal eltolódás), majd ez után a jelenlévő kristályos fázis göcképző hatására az olvadék kristályosodni kezd, melynek exoterm hőárama nem válik el teljesen az előtte bekövetkező folyamatól. Végül, kb. 190 °C körül a kristályos fázis megolvad.

A modulált DSC technika²⁵ lehetővé teszi az átlapoló termikus folyamatok, így pl. az üveges átmenet és kristályosodás szétválasztását,²⁶ amivel lehetőség nyílik az amorf hányad *in situ* meghatározására. A 6. ábrán látható MDSC termogramok közül a felső a mért teljes hőáramot mutatja, amelyen az alkalmazott mérési módszer látható ciklusokra bontva. A modulált DSC technika²⁵ lehetővé



5. Ábra. A részlegesen amorf vegyület DSC termogramja, melynél az amorf hányad üveges átmenete átlapol az olvadékból történő kristályosodással.



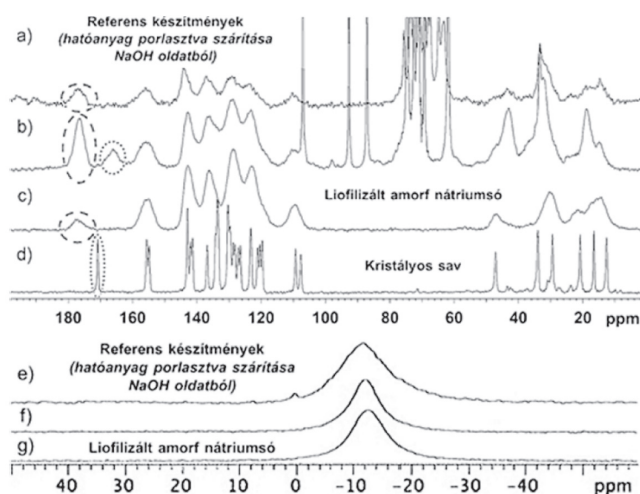
6. Ábra. A részlegesen amorf vegyület MDSC termogramja a mért teljes hőáram-jel (az ábra felső részén) és a mért reverzibilis hőkapacitás-jel (az ábra alsó részén) feltüntetésével. A görbéken látható szimbólumok a mérés különböző szakaszait jelölik: az első és a negyedik szakaszban hőmérséklet-moduláció mellett, lassú ütemű felfűtés történt; a második szakasz egy gyors ütemű normál felfűtést, a harmadik szakasz pedig egy még gyorsabb ütemű lehűtést (ún. „quench-cooling”) jelöl, amelynek során az anyag olvadékát túlhűtjük és az üveges állapotba kerül.

teszi az átlapoló termikus folyamatok, így pl. az üveges átmenet és kristályosodás szétválasztását,²⁶ amivel lehetőség nyílik az amorf hányad *in situ* meghatározására. A 6. ábrán látható MDSC termogramok közül a felső a mért teljes hőáramot mutatja, amelyen az alkalmazott mérési módszer látható ciklusokra bontva. Az ábra alsó részén látható két görberészlet a reverzibilis hőkapacitás jelet mutatja a fűtési program két szakaszában. A mért hőkapacitás-változás arányos az átmenet által érintett (amorf) anyag mennyiségével, így amorf-kristályos keverék esetén nagysága felhasználható az amorf hányad meghatározására. A bemutatott példában a kísérletet négy szakaszra osztottuk. Az első, az ábrán teli fekete karikákkal jelölt szakaszon a mintát kb. 60 °C-ról 135 °C-ig fűtöttük fel, hőmérséklet-moduláció mellett, amely során az amorf fázis ~109 és 117 °C között, üveges átmenetben megfolyt. Ezt követte a második (az ábrán üres négyzetekkel jelölt) szakasz, ahol a felfűtés – moduláció nélkül – tovább zajlott kb. 195 °C-ig, és ennek során a minta teljes tömege megolvadt. Ezt az olvadékot a harmadik (az ábrán csillagokkal jelölt) szakaszban nagy sebességgel lehűtöttük, így az anyag teljes tömege üveges

(amorf) állapotba került. A negyedik szakaszban – amelyet az ábrán üres körök jelölnek – ismételten modulálva felfűtöttük, kb. 135 °C-ig, ennek során ~109 és 115 °C között már a minta teljes mennyisége megfolyt. Az anyag amorf hányadát az első és a negyedik felfűtés során az üveges átmenet szakaszára kimért hőkapacitás-változás értékek aránya adja meg, amely a bemutatott példában 36% körüli.

3.6. Szilárdfázisú analízis: készítmény vizsgálata

Készítmények vizsgálata és az amorf állapotú hatóanyagok szilárdfázisú analitikája két olyan terület, ahol a szilárdfázisú mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia alkalmazása szelektivitása miatt előnyösebb lehet más technikákkal szemben.²⁷



7. Ábra. A vizsgált vegyület szilárdfázisú NMR spektrumai. Az ábra felső része a ¹³C CP/MAS spektrumokat mutatja, az anyag lúgos oldatából a segédanyagokra történő porlasztást követően formulált referens készítményekét (originátor tablettá a, licencadó tablettá b), a vegyület NaOH oldatból előállított lyofilizált amorf nátriumsóját (c) és a tiszta, kristályos savét (d). A hatóanyag karboxilcsoportjának jelét protonált, ill. deprotonált formájában pontozott, ill. szaggatott ellipszis jelöli. Az ábra alsó részén referens készítményeknek (e, f), ill. az anyag NaOH oldatból előállított lyofilizált amorf nátriumsójának (g) a ²³Na MAS szilárdfázisú NMR spektrumai láthatók.

Következő példánkban gyenge sav típusú hatóanyagot tartalmazó licenc készítményeket vizsgáltunk, ahol feladatunk a hatóanyag polimorf módosulatának azonosítása volt a tablettában. A vizsgálatokhoz a licencadó referens kristályos hatóanyagot (sav), valamint az originátor referens termékét is mellékelte. A referens termék segédanyagai povidone (K25), meglumine, nátrium-hidroxid, szorbitol (E420), magnézium-sztearát. A licencadó készítményében továbbá részben térhálósított PVP (crospovidon), valamint szorbitol helyett laktóz-monohidrát található. A referens készítmények alkalmazási előiratában a hatóanyag savként van feltüntetve. A 110 ppm feletti tartományban a tabletták segédanyagai közül csak a K-25 típusú polivinil-pirrolidont (PVP) és a magnézium-sztearát, illetve a 7. ábrán b)-vel jelölt licencadó tablettában lévő a crospovidon ad jelet. A sztearát karboxilát csúcsa 180 ppm felett várható (kis intenzitású, nem detektálható), míg a PVP-k jelének eltolódása 175 ppm. Az elporított készítményekről felvett ¹³C CP/MAS NMR spektrumokat összevetve a tiszta kristályos sav spektrumával (ld. 7. ábra a), b), ill. d) spektruma) megállapítható, hogy a

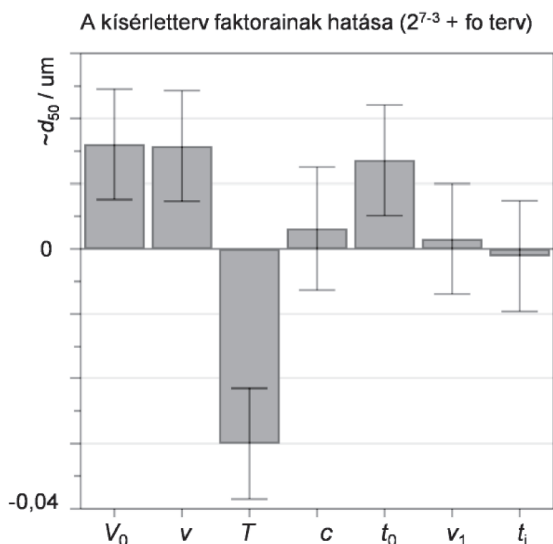
spektrum 110 és 170 ppm közötti tartománya a hatóanyag jeleire szelektív. Látható, hogy a hatóanyag jelei a kristályos sav referenciához képest jelentősen kiszélesedtek, azaz a vegyület a készítményben amorf formában van jelen. Ezen felül a hatóanyag karboxilcsoportja a készítményekben 6 ppm-mel nagyobb eltolódásnál van, mint a szabad savban (az ábrán b)-vel jelölt készítményben egy második, kisebb intenzitású jel is detektálható, ~166 ppm, eltolódásnál).

A továbbiakban informálódunk a készítmény gyártási technológiájáról, amely alapján a kristályos hatóanyagot NaOH-os oldatból juttatják a tablettá segédanyagaira. Összehasonlítás céljából NaOH oldatból lyofilizálással előállítottuk a vegyület amorf nátriumsóját is. A ¹³C CP/MAS NMR spektrumban az amorf nátriumsó jelei a készítményekben mért csúcsokkal megegyező pozíciókban voltak detektálhatók, azaz a 177 ppm körüli csúcs valóban az amorf nátriumsó karboxilátcsoportjának ¹³C jele (ami a PVP segédanyagok jelével együtt jelentkezik). A 166 ppm körüli csúcs a szabad amorf sav karboxilcsoportjának jele lehet, tehát az ábrán a)-val jelölt készítmény csak az amorf nátriumsót, míg a b) jelű készítmény a sót és vélhetően a savat egyaránt tartalmazza amorf formában. Mindezt megerősítették a 7. ábra alsó részén látható ²³Na MAS spektrumok is. Az ábrán látható, hogy az amorf nátriumsó és a referens készítmények spektrumában megfigyelhető a -12 ppm eltolódású nátrium jel, ami alátámasztja, hogy a készítményekben a hatóanyag (legalább részben) amorf nátriumsó formában van jelen.

3.7. Kristályosítás: kísérlettervezés és tervezési tér

3.7.1. Laborfejlesztés

Egy kristályosítási technológia ICH Q8 és Q11 irányelveinek megfelelő fejlesztési folyamatát a következő példán mutatjuk be. Egy generikus hatóanyag esetében a készítmény kioldódási vizsgálatok alapján a szemcseméret szigorú kontrolljára volt szükség. A meghatározott szemcseméret kritériumnak alapvetően csak monomodális, szűk eloszlású hatóanyag felelhetett meg. Az előzetesen felvázolt kristályosítási módszer paramétereinek hatását emiatt alaposan meg kellett vizsgálni. A kristályosítási módszer alapvetően egy kicsapós kristályosítás, amely két adagolási lépést tartalmaz: először a hatóanyag oldatát adagoljuk a kicsapószerhez, majd egy érlelési periódust követően további kicsapószerrel fejezzük be a kristályosítást. Az előkísérletek során kiválasztottuk az oldószert, a kicsapószer és a szárítási körülményeket, valamint megállapítottuk, hogy a második adagolási lépést követő utókevertetésnek nincs hatása a szemcseméretre. A faktorok számának csökkentése érdekében a keverési sebességet és a reaktor hőmérsékletét egy-egy kísérlet során állandó értéken tartottuk. Így végül hét paraméter hatását vizsgáltuk meg: a két adagolási idő (t_0 , t_1), az ezek közötti érlelési idő (t_i), a kicsapószer és az oldószert mennyisége (V_0 , V_1), a reaktorhőmérséklet (T) és a keverési sebesség (v). Ezekre a faktorokra hétfaktoros kísérlettervet írtunk fel ($2^{7-4} + \text{foldover}$, 19 kísérlet). A kísérleteket kitermelés és szemcseméret alapján értékeltük: száraz diszpergálásos lézerdiffrakciós szemcseméreteloszlás paraméterei (d_{10} , d_{50} , d_{90}) és alakja (monomodális vagy nem) valamint mikroszkópi felvételek (tús/lemezes szemcsealak elkerülése) alapján. A kísérletek statisztikai értékelése alapján a kristályosított

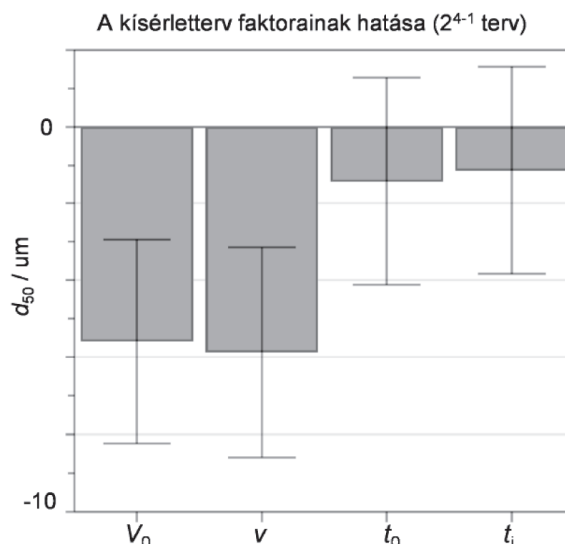


8. Ábra. A kristályosítási paraméterek hatásának vizsgálata $2^{7-3} +$ foldover tervvel: eredmények (d_{50}).

termék szemcseméretére a vizsgált tartományokon négy faktor van hatással: a kicsapószer mennyisége, a keverés, a hőmérséklet és az oldat adagolása (8. ábra). Az eloszlásgörbe alakja és a mikroszkópi felvételek alapján nem megfelelő terméket kaptunk esetenként a V_0 nagyobb és a t_0 kisebb értékénél, ezért itt a tartomány szűkítése mellett döntöttünk. Ugyanakkor a t_i hatását a vizsgált tartományon nem találtuk szignifikánsnak, ezért ott szélesebb tartományon folytattuk a kísérleteket. A következő kísérletsorozatban (2^{4-1} kísérletterv, 8 kísérlet) az új tartományok mellett a folyamat mélyebb megértésére koncentráltunk. Az első adagolás utáni mintavétellel, valamint turbiditásmérővel követtük a termék szemcseméretét illetve kristálykiválás folyamatát. Megállapítottuk, hogy az érlelési időnek a szélesebb tartományon sincs hatása a szemcseméretre, a t_0 adagolási idő hossza a leszűkített tartományon belül nem szignifikáns (9. ábra). A kicsapószer térfogatának és a keverési sebességnek a hatása nem változott. Az eloszlásgörbék alakja és a mikroszkópi felvételek alapján a keletkező kristályok habitusa megfelelő volt. A két kísérletsor eredményei alapján három olyan paraméter maradt, amellyel a kristályosított hatóanyag szemcseméretét érdemben befolyásolni lehetett: a keverés, a hőmérséklet és a kicsapószer mennyisége. Erre a három faktorra csillagpontos kísérlettervet írtunk fel, amely alkalmas volt a paraméterek optimalására és a szemcseméret kritériumnak megfelelő anyagot adó kristályosítási tervezési tér (DS) meghatározására. A végső módszernél a paraméterek értékét a robusztus pontnak megfelelően választottuk, mivel ilyen beállításokkal a legkisebb a valószínűsége a nem megfelelő termék keletkezésének (10. ábra).

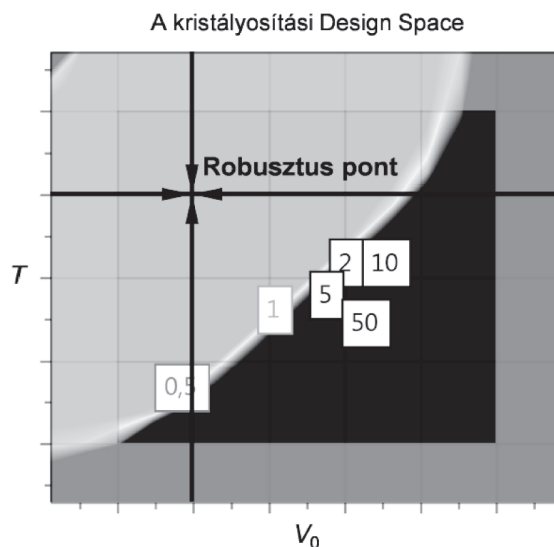
3.7.2. Üzemesítés

A hatóanyag kristályosításának üzemesítését a tervezési tér (Design Space, DS) és a kritikus paraméterek ismerete nagyban megkönnyítette. A termék szemcseméretét a nehezen átvihető paraméterek (idő/sebesség változók) közül csak a keverési sebesség befolyásolta. Ennek értékét modellezés segítségével állítottuk be. A másik két paraméter értéke jól szabályozható, így lehetőséget teremtettek a korrekcióra az első üzemesítés tapasztalatainak birtokában.



9. Ábra. A kristályosítási paraméterek hatásának pontosítása: eredmények (d_{50}).

Az első tétel szárítás előtt vett mintája a várakozásoknak megfelelő szemcseméretű lett, azonban a szárítás közben a szemcsék aprózódtak a szűrő-szárítóban. Ezen tapasztalatok fényében mindhárom paraméter értékén változtattunk azért, hogy a szűrő-szárító aprító hatását kompenzálva közelebb kerüljünk a szemcseméret-kritérium középehez: a reaktorhőmérsékletet a tervezési tér (DS) alapján számítottan kis mértékben megemeltük, a kicsapószer mennyiségét valamivel csökkentettük és a keverő fordulatszámát mérsékeljük. A három változtatás együttes hatása meghozta a kívánt eredményt, az üzemen szárított végtermék szemcsemérete a kritérium középeire esett. A kristályosítási eljárás fejlesztésének eredménye egy robusztus, reprodukálható és kontrollálható eljárás, amelyet az első próbálkozásuktól a tervezési tér (Design Space) megadásáig, a fejlesztés során végig a QbD elveihez igazodva dolgoztunk ki. A technológiát sikeresen méretnőveltük és validáltuk, az üzemi méretben gyártott hatóanyagból készült készítmény megfelelt a kioldódás vizsgálatokon.



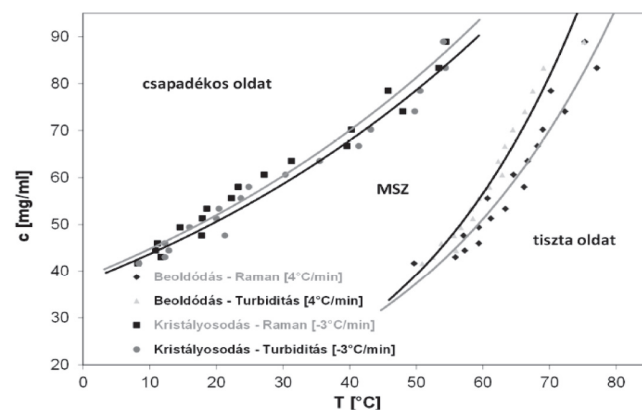
10. Ábra. A kristályosítási folyamat tervezési terének (DS) grafikus ábrázolása (hőmérséklet-kicsapószer felület). A robusztus pontban a keverési sebesség a vizsgált tartomány közepén helyezkedik el.

3.8. Kristályosítás: Metastabil zóna meghatározása

A kristályosodási folyamat megértéséhez és/vagy szabályozásához bizonyos esetekben elengedhetetlenek az in-line mérőszondák – turbiditás, FBRM (*Focused Beam Reflectance Measurement*), PVM (*Particle Vision Measurement*), Raman, ATR-FTIR, ATR-UV/VIS – alkalmazása, amelyekkel folyamatos adatrögzítésre nyílik lehetőség. Így nem maradunk le például egy göcképződésről, a szemcseméret változásáról, polimorf átalakulásról, vagy a kristályosítás érdemi végpontjáról. Alkalmazásukkal szükségtelemmé válnak az oly sokszor mind időzítésben, mind kivitelezésben komplikált mintázások és off-line mérések.

A kristályosítás technológiai optimalizálásához alapvetően fontos az ún. metastabil zóna (MSZ) ismerete, amely az oldhatósági görbe és spontán kiválás pontjait ábrázoló túltelítési görbe közötti tartomány (11. ábra). A megfelelő minőségű termék gyártásához a kristályosítást mindenképpen a metastabil zónán belül érdemes véghezvinni. Ezt elérhetjük a megfelelő ponton történő oltással, vagy a spontán göcképződést követően a metastabil zónába történő visszatéréssel (supersaturation control ill. direct nucleation control). A MSZ kiméréséhez különböző koncentrációk mellett meghatározzuk a teljes beoldódás hőmérsékletét, illetve a kristályosodás megindulását, rögzített fűtési, illetve hűtési sebesség és keverési fordulatszám mellett. A beoldódást és kiválást detektálhatjuk a szilárd fázist mérő szondákkal (turbiditásmérő, FBRM, Raman) vagy az oldatkonzentráción keresztül (ATR-FTIR, ATR-UV/VIS). A

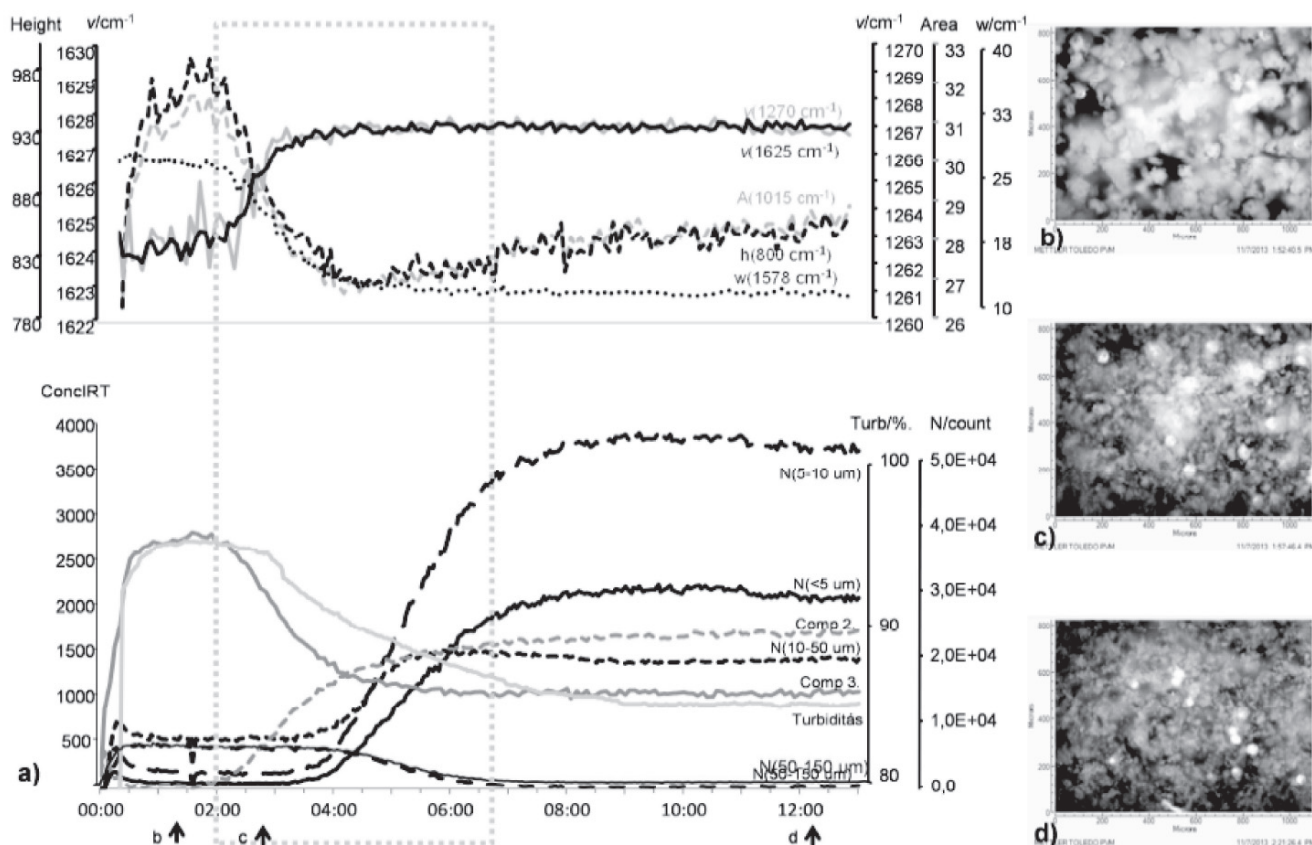
bemutatott példában (11. ábra) turbiditásmérővel és Raman szondával is kimértük a hatóanyag metastabil zónáját izopropanol:víz = 3:2 oldószerkeverékben.



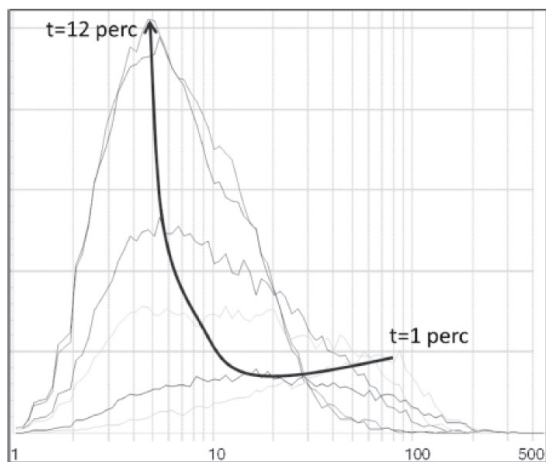
11. Ábra. Egy gyógyszerhatóanyag metastabil zónája (MSZ) izopropanol:víz = 3:2 oldószerkeverékben Raman és turbiditás szondákkal mérve (fűtési sebesség 4 °C/perc, hűtési sebesség 3 °C/min).

3.9. Kristályosítás: a folyamat megértése szondákkal támogatva

Az alábbi példában egy kicsapásos kristályosítás folyamatát vizsgáltuk PVM, FBRM és Raman szondák segítségével (12. ábra). Az in-line mérések alapján megállapítottuk, hogy a folyamat kétlépcsős. A PVM szonda által mutatott kép alapján (12. ábra b-d) a hatóanyag szerves oldatból vízbe történő kicsapásakor először nagyobb, pelyhes



12. Ábra. Az átkristályosodás detektálása turbiditásmérővel, FBRM, PVM és Raman-szondákkal. a) a szondák által rögzített jelek (fent Raman, lent: FBRM, Raman kemometria, turbiditás). b-d) az ábra a) részén nyílakkal jelölt időpontokban a PVM szondák által rögzített képek.



13. Ábra. Az FBRM szonda húr hossz eloszlásgörbe (szemcseméret eloszlással arányos) változása a kicsapásos kristályosítás folyamatában.

szemcsék keletkeznek, amelyek az utókevertetés során változó idő elteltével (1-10 perc) dezaggregálódnak. Eközben az FBRM szonda tanúsága szerint a kisebb méretű szemcsék száma megugrik (12.a ábra), a nagyobb szemcsék száma lecsökken, a szuszpenzió részecskeszáma is jelentősen megnő. A szemcseméret eloszlás változását kiválóan mutatja az FBRM szonda húr hossz eloszlásgörbéjének időfüggése (13. ábra) Ez a változás turbiditásmérővel is követhető: az

Hivatkozások

- Bernstein, J. *Polymorphism in Molecular Crystals*, Calendon Press: Oxford, Egyesült Királyság, **2002**.
- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *Guidance on Q6A specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances*, **1999**. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf Hozzáférés: 2016.04.29.
- Haleblian, J. K., McCrone, W. C. *J. Pharm. Sci.* **1969**, *58*, 911–929.
- Raw, A. S., Furness, M. S., Gill, D. S., Adams, R. C., Holcombe Jr., F. O., Yu, L. X. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 397–414.
- Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. *Guidance for industry: ANDAs: pharmaceutical solid polymorphism: chemistry, manufacturing, and controls information*, **2007**. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072866.pdf> Hozzáférés: 2016.04.29.
- Chemburkar, S. R., Bauer, J., Deming, K., Spiwek, H., Patel, K., Morris, J., Henry, R., Spanton, S., Dziki, W., Porter, W., Quick, J., Bauer, P., Donaubauber, J., Narayanan, B. A., Soldani, M., Riley, D., McFarland, K. *Org. Proc. Res. Dev.* **2000**, *4*, 413–417.
- Chaudhuri, K. R. *Exp. Opin. Drug. Deliv.* **2008**, *5*, 1169–1171.
- J. Lucas, P. Burgess, *PharmaVOICE* **2004** Február
- Mikó, K. *Iparjogvédelmi és szerzőijogi szemle*, **2008**, *3*, 63–83.
- Brittain, H. G. (Ed.) *Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*, Marcel Dekker: New York, NY, Egyesült Államok **1995**.
- Zakrzewski, A., Zakrzewski M. (Eds.) *Solid State Characterization of Pharmaceuticals*, Assa International Inc.: Danbury, CT, USA, **2006**.
- Stahl, P. H., Wermuth, C. G. (Eds.) *Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection and Use*, WILEY-VCH: Weinheim, Németország, **2002**.
- Wouters, J., Quéré L. (Eds.) *Pharmaceutical Salts and Co-crystals*, RCS Publishing: Cambridge, Egyesült Királyság, **2012**.
- Morissette, S. L., Almarsson, Ö., Peterson, M. L., Remenar, J. F., Read, M. J., Lemmo, A. V., Ellis, S., Cima, M. J., Gardner, C. R. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 275–300.
- Mullin, J. W. (Ed.) *Crystallization (4th Edition)*, Elsevier: Oxford, Egyesült Királyság, **2004**.
- Bod, P., Harsanyi, K., Hegedűs, B., Bogsch, E., Fekecs, E., Peter, I., Aracs, J., Miszori, S., Stiller, M. **EP 256747 B2** (priority: 1986.08.05 HU196775)
- Czibula, L., Demeter, Á., Nemes, A., Német, Z., Sebők, F., Bartáné Szalai, G. **WO 2010100512** (elsőbbség: 2009. 03. 03 HU 0900130).
- Német, Z., Demeter, Á., Pokol, G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 18–25.
- Német, Z., Csonka Kis, G., Pokol, G., Demeter, Á. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 338–346.
- Német, Z., Sajó, I., Demeter, Á. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*(3), 572–6.
- Blake, G. M., Fogelman, I. *Clin. Interv. Aging.* **2006**, *1*(4), 367–375.
- Wierzbicki, M., Bonnet, J., Brisset, M., Tsouderos, Y. **EP 0415850 B1** ≡ **US 5128367** (elsőbbség: 1989.09.01 FR 8911475).
- Horvath, S., Demuynck, I., Damien, G. **EP 1642897 B1** ≡ **US 7459568 B2** ≡ **WO 2006/035122** (elsőbbség: 2004.09.30 FR 10335).
- Stahl, K., Frankaer, C. G., Raffalt, A. C., Sørensen, S. R., Andersen, J. E. T. *Acta. Cryst. E* **2011** *67* 471–472.
- Seferis, J. C., Salin, I. M., Gill, P. S., Reading, M. *Proc. Acad. Greece* **1992** *67* 311.
- Thomas, L. C. *TA Instruments Technical Paper TP 012*, TA Instruments: New Castle, DE, Egyesült Államok, **2005**.
- Marosi, A., Szalay, Zs., Demeter, Á. *Acta Pharm. Hung.* **2010**, *80*, 18–45.

oldat zavarossága ugrásszerűen lecsökken a dezaggregáció következtében. Raman-szondával követett kísérletekben (12.a ábra felül) offline referenciák segítségével kimutattuk, hogy a primer csapadék amorf, míg a végtermék a kristályos hatóanyag, amit több jel kismértékű eltolódása illetve a spektrumsorozat kemometriai analízise is alátámaszt. Az amorf köztiterméket off-line technikával nem tudtuk kimutatni, valószínűleg már szűrés közben bekristályosodott a hatóanyag. Az alkalmazott szondák együttesével vált csak lehetővé a folyamat részletes vizsgálata, a kristályosodás mechanizmusának mélyebb megértése. Ezen információk birtokában a szemcseméret optimalizálására vonatkozó kísérlettervet már más szemmel írtuk fel, az FBRM szonda eredményei alapján egyértelmű, hogy bizonyos faktoroknak (pl. utókevertetés) nem lehet hatása a végtermék szemcseméretére.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak a Hatóanyag morfológiai osztály volt és jelenlegi munkatársainak, a társosztályokon dolgozó kollégáknak, a Richter Gedeon Nyrt vezetésének, az egyetemi és akadémiai partnereknek, hogy együttműködésükkel az elmúlt évtizedben jelentős mértékben segítettek a polimorfia kutatás, a szilárdfázisú analízis, a kristályosítás területén való eredményes működést, a szükséges műszeres háttér megteremtését, és a kapcsolódó tudásbázis kiépítését.

Pharmaceutical polymorphism research in complex treatment

Polymorphism of an active substance is important from quality and legal point of view. Different solid forms possess diverse physicochemical properties (e.g. melting point, density, hygroscopicity, electrostatic properties, particle size and habit, flow characteristics, compaction, compressibility, solubility, intrinsic dissolution rate, etc.) distinct physical and chemical stability. Such differences in solid state properties of the active substance may have profound effect on the technological processability and drug product performance. Solid-state analysis and control strategy of polymorphism now become an indispensable part of the pharmaceutical drug development and quality control of production.

Polymorphism has determining significance in innovation and intellectual property rights concerning both original and generic product development. Due to favorable solid-state properties, different solid forms (polymorphs, salts, amorphous, cocrystal) and processes to them can be protected by patent. Polymorphism became an offensive/defensive strategic tool in the market competition which also impacts product life cycle management. The polymorphism issues can easily become a forum for patent disputes, which may be accompanied by a series of patent infringement lawsuits where solid-state analysis provides per-final results.

In polymorphism research the complex use of solid state techniques is required. The most frequently used analytical methods include microscopy, thermal analysis, diffraction techniques (especially X-ray diffraction), spectroscopy (IR, NIR, solid-state NMR) and size and shape analysis. These methods are essential in a polymorph or salt screening as well as in the development of crystallization processes.

In Gedeon Richter Plc. morphological studies date back to the 1970s growing in importance since the 1980s. The most important result of that period is the discovery of the pure A and B forms of famotidine. After several preludes the Drug Polymorphism Research Division (HMO) was established in 2006 as the department responsible for polymorph and salt screening, solid state analytical characterization and crystallization of APIs as well as a scientific support in registration and patenting issues.

The present paper gives account of the polymorphism research activities in Gedeon Richter Plc. focusing on the development of the active substance illustrating them by examples from real life cases.

Clearing up the patent situation around polymorphic forms of an API, in some cases, requires more experimental and analytical work than expected. For example in case of strontium ranelate it was proven that the patented Form α does not exist as an independent stable solid form. It is actually a mixture of hepta- and nonahydrate phases described previously in the base patent. These two forms are dynamically interconverting into each other as a function of the relative humidity. Moreover, we have shown that the so-called octahydrate form is non-existent as a separate crystalline phase. The information obtained was crucial for the decision of the development strategy of this generic product.

Salt and polymorph screen is another issue in the early phase of pharmaceutical development. The Type I HCl salt of an API was found to be extremely hygroscopic. The aim of the polymorph screen of the HCl salt and the following salt screen was to find a non-hygroscopic (i.e. stable up to 90% RH according to DVS) form eligible for further development.

In some cases simple routine volatile impurities determination carried out by thermogravimetric analysis might open up questions that can have complicated answers. As it is shown in the TGA measurement case study, answering the question of volatile impurity content of the sample required to understand decomposition which was proven by combining TG, DSC, hot-stage microscope results with reactivity information.

The determination of the polymorph composition is a key step in process development as well as for quality control in systems with multiple polymorphic modifications. XRPD, IR and Raman based chemometric models were developed, calibrated and compared for the determination of the ratio of Form A and C of an API. The three independent methods correlated well with each other and they have different fields of applicability: XRPD and IR for drug substance while Raman might be advantageous in drug products as well.

The measurement of amorphous phase in a crystalline API is even more challenging. A modulated DSC technique was developed with two heating cycles, and the heat capacity change associated with the glass transition was measured on the reversing heat flow. In the first MDSC heating step the signal proportional to the amorphous content is measured, than the whole sample is 'amorphized' by melting and quench-cooling the sample. In the second MDSC heating step the heat capacity change signal is related to the whole sample. The amorphous content is determined by the ratio of the two signals.

Solid state NMR is a technique capable of detecting an amorphous API in a drug product. In the presented example not only the drug substance was detected but it was proven that the products contain an amorphous sodium salt of the API instead of the free acid.

The development of a crystallization procedure according to the guidelines (ICH Q8 and Q11) is shown in the example of a generic API where the accurate and tight control of particle size distribution was required. The critical process parameters of the developed crystallization procedure were screened with respect to particle size distribution as critical quality attributes in DoE (Design of Experiments) series. Three significant factors were found for which an optimization DoE was performed and the Design Space was determined. The knowledge obtained was used in the scale-up of the procedure to select and to refine the parameters for the optimal product.

Process development can be boosted by the use of in-line techniques (FBRM, PVM, Raman, ATR-FTIR, ATR-UV/VIS). The automated measurement of the metastable zone of an API is presented above by the use of turbidimeter and Raman probe.

In-line probes can really add to the understanding of crystallization processes. By the combined use of PVM, FBRM and Raman probes it was proven that during a (presumed) one step crystallization a recrystallization occurs. PVM probe showed changes of the suspension visually, a shift in the particle size was detected by FBRM and an amorphous to crystalline transformation was observed by Raman spectroscopy.

Bradykinin B1 receptor antagonisták kutatása fájdalom kezelésére

ÉLES János,* BOZÓ Éva, HORNOK Katalin, SZENTIRMAY Éva, BEKE Gyula, BORZA István,
VÁGÓ István, HUSZÁR József, BÉNYEI Gyula, DOMÁNY György,
KESERŰ György Miklós és GREINER István

Richter Gedeon Nyrt. Gyömrői út 19-21. 1103 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

2001. május 2-án a Richter Gedeon Nyrt. (RG) Gyógyszerkutatás és Fejlesztésének (K+F) házi Tudományos Bizottsága elfogadta explorációs kutatási témaként az orálisan hatékony nem-peptid bradykinin B1 receptor antagonisták (B1R) krónikus gyulladási fájdalom kezelésére benyújtott kutatási témajavaslatot. Továbbá a K+F perspektívát látott a megcélzott nem szteroid gyulladásgátlók (NSAIDok) és különösen a szelektív ciklooxygenáz-2 gátlók (COX-2) uralta terápiás terület meghódításában. Úgy ítélte meg, hogy a COX-2 gátlók hatékonyságával azonos, vagy annál hatékonyabb B1R antagonisták vegyületek kedvezőbb mellékhatás profillal, új hatásmechanizmussal, jó eséllyel indulhatnak és lehetnek sikeresek a COX-2 gátlókat követő új generációs fájdalom- és gyulladás csökkentő terapeutikumok versenyében.

2. Tudományos háttér

A szervezet kinin-kallikrein rendszere prekursor kininogének, proteolitikus kallikrein enzimek, kinin peptidek (kallikrein hatására kininogénekből képződnek) és receptorok összességéből áll. A múlt század 80-as éveiben a kininek, mint biológiailag aktív peptidek még elsősorban értágító és ödémaképző (a test szöveteiben a sejtek között kóros folyadékmennyiség felszaporodást és ezzel duzzanatot okozó) hatásuk révén voltak ismertek. A 1990-es évektől megszorodó kutatási eredmények azt sugallták, hogy a kininek fontos mediátorai mind a kardiovaszkuláris homeosztázis, mind a gyulladás és nocicepció (fájdalomérzés) folyamatának. A kininek, proinflammatorikus mediátorként részt vesznek a gyulladás akut fázisára jellemző lokális vazodilatáció és fokozódó kapilláris permeabilitás révén kialakuló ödéma képződésben. Számos mediátor, prosztanoid és citokin felszabadításával, elősegítik a gyulladás szubakut, celluláris fázisában, a fehérvérsejtek és a fagocitáló sejtek infiltrációját. Továbbá szerepet játszanak a véredények körül található idegvégződéseken lokalizálódva a gyulladás krónikus proliferatív fázisában jelentkező szöveti degeneráció és fibrózissal járó erős fájdalom érzet kialakulásában.¹

A kininek hatásukat két, farmakológiai profilban és expressziós mintázatban is eltérő, G-fehérjéhez kapcsolt hét transzmembrán doménből álló receptoron (B1R és B2R) keresztül fejtik ki. A bradykinin B1 és B2 receptorokat kódoló gének számos fajban azonosításra kerültek. A B2 receptorok számos fiziológiai folyamat részvevőjeként a szervezetben

konstitutívan expresszálódnak. Ezzel ellentétben a B1 receptorok általában nincsenek jelen az egészséges szövetekben, csak patológiás körülmények között (szöveti sérülés, gyulladási mediátorok, mint pl.: endotoxin, vagy citokinek mint pl.: IL1béta vagy TNF alpha hatására) jelennek meg.²

A szöveti sérülések alkalmával felszabaduló kininek fontos szignalizációs szerepet töltenek be a kötőszöveti sérüléssel járó fájdalmak és az azt követő gyulladási folyamatok kialakulásában. A kinin receptorok autoregulációja figyelhető meg az akut és krónikus folyamatokban, míg a B2R a gyulladás és fájdalom kiváltásában, addig a B1R ezeknek a fenntartásában működik közre.³ Gyulladás során elsőként a bradykinin és kallidin szabadulnak fel a szervezetben és B2 receptorhoz kötődve fejtik ki a hatásukat. Majd a BK és KD gyors metabolizálódása révén keletkező aktív metabolitok (desArg²BK, desArg¹⁰DK), a B2R gyors deszenzitizációjával egy időben, a gyulladási indukció hatására megjelenő Bradykinin B1 receptorokhoz kötődnek.^{4,5} Ilyen módon, míg a fájdalom akut fázisában a bradykinin B2 receptor kap szerepet, addig a krónikusban a B2R gyors deszenzitizációjával és endogén ligandjainak gyors eliminálódásával a B1 receptorok és azok agonistái jutnak szerephez. Mivel a B1 receptor deszenzitizációja a receptor internalizációja révén, épp úgy, mint a B1R ligandok disszociációja igen lassú, így biztosítják a krónikus gyulladás és hozzátársuló hiperlagézia fenntartását.^{6,7,8}

Összegezve, a B1R antagonisták szerepe a fájdalom közvetítésében lehet közvetlen perifériás hatás a B1R expresszáló nociceptorokon (konstitutív módon vagy indukció következtében), indirekt perifériás hatás más algogén mediátorok felszabadulásának gátlása révén, vagy centrális hatás a fájdalom gerincvelő hátsó szarvában történő transzmisszió blokkolása révén.⁹ Bízva a hatásmechanizmusban és a B1R antagonisták hatékonyságában, az esetleges mellékhatások csökkentése és elkerülése céljából kutatásunk a periférián hatékony B1R antagonisták kifejlesztésére irányult.

Úgy gondoltuk, hogy a B1R antagonisták megoldást jelenthetnek szöveti sérülés valamint krónikus gyulladási fájdalommal járó kórképek gyógyításában, mint rheumatoid arthritis,^{10,11} derékfájás, osteoarthritis illetve számos további betegség, pl.: diabetes szövödményeként fellépő hiperlagézia,¹² gyulladási bél betegség,¹³ posztoperatív fájdalom, légúti gyulladási megbetegedések,¹⁴ asthma, migrén, és daganatos fájdalom kezelésében.

* Tel.: 00 36 889 87 03; e-mail: j.eles@richter.hu

3. Explorációs kutatási feladatok

Az explorációs feladatok megoldása a gyógyszerfejlesztési követelmények megfogalmazása a primer teszt rendszer felállítását is eredményezte.

3.1. Elsődleges (primer) teszt rendszer

Elképzeléseink szerint a primer szűrési vizsgálatokban, amennyiben a vegyületek funkcionális teszten > 50% gátlást mutattak és $K_i < 200\text{nM}$ az értékük, úgy azonnal *in vitro* P450 screen vizsgálatra kerültek, párhuzamosan a funkcionális teszten történő IC_{50} meghatározással. Ezt követően Caco-2 permeabilitási teszten vizsgáltuk a vegyületek penetrációs készségét, majd funkcionális teszten B1/B2 szelektivitását illetve faj specifikusságát.

Idővel a primer teszt rendszer kibővült a B1R antagonistá vegyületek hERG csatorna gátlásának szűrésével is. A szív-kamrai és pitvari repolarizációt meghatározó legfontosabb ioncsatorna gátlását whole-cell patch clamp módszerrel teszteltük.

A projekt teszt-szűrőrendszerében a primer vizsgálatok sorrendiségét olyan formában alakítottuk ki, hogy a vegyületek minél gyorsabban kapjanak visszajelzést a vegyületek *in vitro* hatékonyságáról. Mivel a vegyületek *in vivo* hatékonyságának vizsgálata anyag- és időigényes folyamat, így a primer teszt rendszernek nagy áteresztőképességű tesztek sorozatából kellett állnia, hogy megszűrje a vegyületeket és leszűkítse a számukat.

3.2. Másodlagos (szekunder) teszt rendszer

Másodlagos teszt rendszer elemeként, a sejtes esszék beállításával párhuzamosan kezdődött el az *in vivo* tesztek beállítása.¹⁵ A tesztek beállítása során minden esetben tesztelésre kerültek a versenytársaik által publikált és a Richter által előállított „referencia” molekulák (Novartis, Sanofi, Bayer), ezen kívül a természetes peptid antagonisták (mint: pl.: DALBK, ([Leu⁸]des-Arg⁹-BK) és a megcélzott terápiás területen használt COX-2 gátló vegyületek. Mivel orálisan hatékony vegyület előállítás volt a cél, így a tesztekben a B1R antagonistákat minden esetben szájon át adagoltuk.

Patkányon a B1R agonistával (DABK) indukált talp ödéma,¹⁶ illetve komplett Freund adjuvánsal indukált (CFA)-indukált monoarthritis modell került beállításra, továbbá gyors szűrő vizsgálatként egér formalin tesztet használtunk.

Nyúl, hasonlóan a patkányhoz, B1R agonistával indukált „target specifikus” módszerben teszteltük a vegyületek funkcionális, gyulladáscsökkentő hatását (IL 1b -val előérzékenyített LysDABK-val kiváltott fül ödéma modell), krónikus fájdalom tesztként pedig az irodalomban eddig nem leírt CFA-indukált monoarthritis tesztet állítottuk be.

Mivel a cél humán gyógyszer kifejlesztés volt, úgy gondoltuk, hogy humán B1 receptort konstitutíven, egér B1R pedig csak patológiás körülmények között expresszáló humán B1R overexpresszáló transzgen egér hosszú távon megoldást jelenthet a fajspecifikus problémáinkra. A francia Nucleis cég által kifejlesztett, „speedy mouse” technológiával létrehozott egerek valóban megoldást jelentettek azoknak

a vegyületeknek az *in vivo* vizsgálatában, melyek se patkányban, se nyúlban nem szóltak meg (lásd lejjebb). Ezekben az egerekben beállításra kerültek a CFA-indukált mechanikus allodynia és hiperalgémia tesztek valamint a Sztreptozotocin indukált termális hiperalgémia modell.

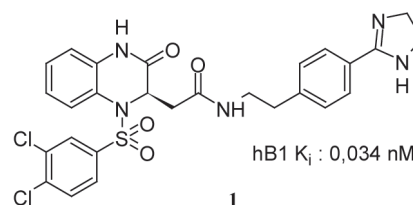
3.3. Harmadlagos (tercier) teszt rendszer

A harmadlagos tesztrendszerben kerültek meghatározásra a vegyület farmakokinetikai paraméterei, biológiai hatásosulása patkányon és kutyán, idegrendszeri mellékhatása (Irwin teszt, Rotarod, LMA) patkányon, kardiovaszkuláris mellékhatása (éber kutya, altatott nyúl, izolált Langendorff perfundált nyúl szív), ADME profilja (adszorpció (felszívódás), disztribúció (eloszlás), metabolizmus és elimináció (kiürülés)) és 4 napos patkány toxikológiai hatása.

4. Új gyógyszerjelölt molekula előállításának publikált molekulá továbbfejlesztésével

Azonos hatásterületen és molekuláris célponttal rendszerint párhuzamosan futnak kutatási programok különböző K+F tevékenységet folytató gyógyszeripari vállalatoknál. Ennek termékeként elsősorban szabadalmi bejelentések, majd ezek publikussá válását követően tudományos cikkek jelennek meg a szakfolyóiratokban. A szakirodalom folyamatos nyomon követésének segítségével és saját kutatásunk eredményeinek ötvözésével előnyösebb tulajdonságokkal bíró molekulákhoz juthatunk el.

Bradykinin B1 antagonistá kutatásunk a Merck cég által korábbiakban publikált szerkezetből és homológia modelltől indult el.¹⁷



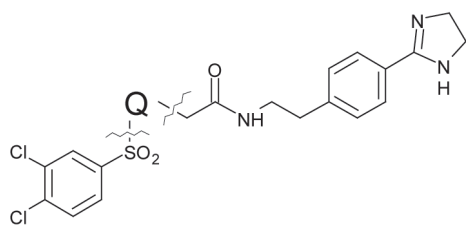
1. Ábra. Merck által publikált kinoxalinon¹⁷; hB1 K_i : humán Bradykinin B1 receptor kötődés.

Könnyen beazonosítható volt, hogy a publikált kinoxalinon (1. ábra) és versenytársaink hatékony molekulái egy arilszulfonamido acetamidból és egy ahhoz kapcsolódó bázikus oldalláncból épülnek fel. Előbbi a természetes peptid béta kanyar részét mímeli, míg utóbbi protonált formában egy aszparaginnal létesít kölcsönhatást a receptorba való bekötődése során.¹⁶

Kutatásunk során célul tűztük ki egy megfelelő hatékonyságot és gyógyszerzerűséget és nem utolsósorban szabadalmaztathatóságot biztosító arilszulfonamido-acetil amid azonosítását. Ehhez elsőként a Merck által alkalmazott oldalláncot választottuk megszintetizált molekuláink állandó építőköveként.

Nagyszámú molekula tesztelését követően a quinolinil acetamidokat találtuk a legígéretesebbnek, azonban a

megfelelő hatékonysággal bíró 1,2,3,4-tetrahidrokinolin-2-ilacetamid (**2**) és 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-1-ilacetamid (**4**) is gyenge *in vitro* metabolikus stabilitással rendelkezett, gyors ürülést feltételezve a szerkezetből (2. ábra).¹⁸



	Q	hKi (nM)	Patkány CL _{int} (ml/min x g)	Humán
2		6,3	2,6	7,1
3		481	nd	nd
4		2,2	1,9	4,2

2. Ábra. Kinolinszármazékok (CL_{int}: ürülés sebessége).

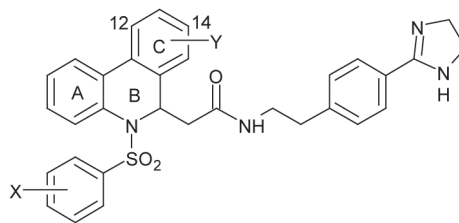
A továbbiakban a kiválasztott kinolinokhoz, mint állandó építőelemekhez kapcsolunk kevésbé flexibilis, kevesebb aromás gyűrűt tartalmazó nagyszámú bázikus oldalancot azzal a céllal, hogy a hatékonyságot optimalizáljuk illetve vizsgáljuk az oldalancok metabolikus stabilitásra kifejtett hatását. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a kinolinok hibridizálásával előállított **5** fenantridinszármazék milyen hatással van a hatékonyságra és a metabolikus stabilitásra. Az előállított fenantridinszármazékok nagy hatékonyságról tettek tanúbizonyságot, azonban a metabolikus stabilitás továbbra is alacsony maradt (3. ábra).

A metabolizmus részletes vizsgálata során kiderült, hogy a fenantridin C gyűrűje és a dihidroimidazolin rész felelős az alacsony metabolikus stabilitásért.

Szisztematikus helyettesítéssel sikerült beazonosítani a 12-metoxiszármazékot melynek humán metabolikus stabilitása elérte az elvárt szintet, illetve az oldallanc *transz*-ciklohexiletilpiperolidinre történő cseréje vezetett **12** fenantridinszármazékhoz, melyet alkalmasnak találtunk *in vivo* vizsgálatok elvégzésére (4. ábra).

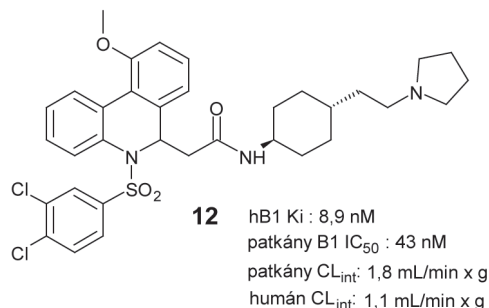
Továbbiakban CFA indukált patkány monoarthritis modellben vizsgáltuk legígéretesebb molekulánk fájdalomcsillapító hatását. Ebben a modellben **12** a Diclofenac-hoz és a Sanofi cég - klinikán is tesztelt - molekulájával hasonló mértékű hatékonyságot mutatott, azonban nagyságrendekkel

alacsonyabb dózisban sikerült ezt a farmkodinamiás hatást elérni (5. ábra). **12** végül preklinikai fejlesztésbe nem került, a továbbiakban ezt a molekulát a hatásmechanizmus további állatmodellekben történő alátámasztásához használtuk farmakológiai eszközként.



	X	Y	hB1Ki (nM)	patkány IC ₅₀ (nM)	patkány CL _{int} (ml/min x g)	humán
5	3,4-diCl	H	3,1	28	2,5	9,8
6	2,4,5-triMe	H	2,9	21	2,7	16,4
7	4-CH ₃	H	4,7	52	1,5	12,9
8	4-OCH ₃	H	15,5	81	4,8	14,5
9	3,4-diCl	14-F	1,2	45	1,6	5,5
10	3,4-diCl	12,14-diF	9,1	42	3,9	8,0
11	3,4-diCl	12-OMe	1,7	21	2,6	1,0

3. Ábra. Fenantridinszármazékok.



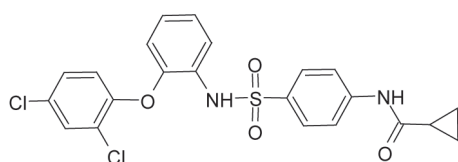
4. Ábra. Optimált molekula.

Vegyület	Dózis (mg/kg. p.o.)	Gátlás (%)
12	0,03	19
	0,1	27
	0,3	54
SSR240612	1	6
	3	16
	10	30
Diclofenac	0,3	23
	1	24
	3	35

5. Ábra. **12**-es vegyület és a referencia vegyületek analgetikus hatásának vizsgálata CFA-indukált monoarthritis modellben, patkányon. A tesztben három nappal a CFA injektálást követően egyszeri orális adagolás mellett vizsgáltuk a gyulladt fájó lábízület funkcionális kapacitására gyakorolt anyaghatást. Statisztika: páratlan t-teszt *p<0.005; **p<0.001

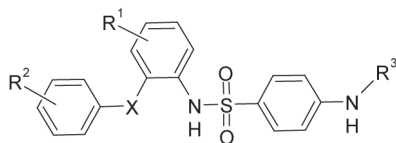
5. Új gyógyszerjelölt molekula előállításának szűréséből kiindulva

Előzőekben tárgyalt megközelítés mellett párhuzamosan kidolgoztunk egy robot technikára átültethető sejtes szűrésű rendszert (High Throughput Screening, HTS), melynek segítségével a Richter vegyülettár molekuláit szisztematikusan leteszteltük. Ennek eredményeképpen a kapott 102 validált találatot 8 csoportba lehetett sorolni. Ezek közül azokat, melyek a leghatékonyabbnak bizonyultak és megfelelő kémiai térrel (a módosításokkal kapott szerkezetek új, szabadalmaztatható vegyületeket eredményeznek) rendelkeztek, újra szintetizáltuk és részletes biológiai vizsgálatoknak vetettük alá. A találatok közül a **13** szulfanilamid származék mind kötődési, mind funkcionális teszten hatékony volt, megfelelő szabadalmaztatható kémiai térrel rendelkezett, így ezt a vegyületet választottuk vezérmolekulának (6. ábra).

**13**hB1 IC₅₀: 485 nMhB1 K_i: 187 nM

6. Ábra. A HTS alapján választott vezérmolekula.

A szerkezet-hatás összefüggések felderítése érdekében kémiai programot dolgoztunk ki a vegyület különböző régióinak módosítására (7. ábra).

R¹ és R² jelentése: halogén atom, alkilcsoport;

X jelentése: oxigén vagy kén atom, karbonilcsoport;

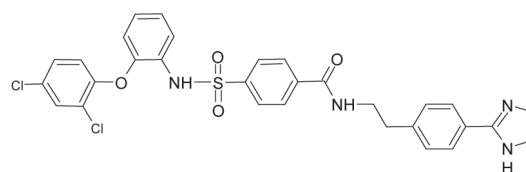
R³ jelentése: acil- vagy szulfonilcsoport.

7. Ábra. A HTS alapján választott vezérmolekula tervezett kémiai módosításai.

A vezérmolekula módosításával kapott 74 vegyület zöme hatástalannak bizonyult, egy vegyület kivételével, mely csak abban különbözött a HTS találatától, hogy ciklopropil-karbonilcsoport helyett acetilcsoportot tartalmazott (B1 func. IC₅₀ 82 nM; B1 binding K_i 47.4 nM). Két kritikus tényezővel kellett azonban számolnunk: az egyik a vegyület metabolikus stabilitása, a másik pedig, hogy a humán receptoron hatékony anyag patkány receptoron gyenge hatást mutatott, így a beállított rágsáló teszteken nem tudtunk *in vivo* vizsgálatokat végezni. Nyúl receptoron viszont a humánnál ugyan gyengébb, de a patkányhoz viszonyítva aktívabb volt a vegyület, ezért úgy döntöttünk, hogy nyúl *in vivo* modelleket állítunk be a további szintetizálendő vegyületek vizsgálatához (a későbbiekben is ezeket az *in vivo* tesztek alkalmaztuk). Ugyanebben az időben jelent meg a Merck-nek egy szabadalmi bejelentése, mely az

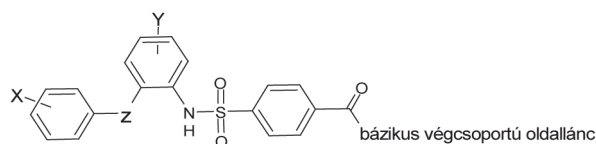
általunk előállított és tervezett molekulák teljes körét lefedte, így további származékokat ebben a vegyületszaládban nem állítottunk elő.

Szerencsésnek volt mondható az a változtatás, amikor az acetamido csoportot megfordítottuk és az így kapott benzoosav származékokra a korábbiakban már használt bázikus oldalláncot kapcsolunk. Az így kapott vegyület (**14**) mutatta az eddigi legjobb hatékonyságot (8. ábra). Ugyan ennek a molekulának nagy volt a molekulatömege, rossz az oldhatósága, gyenge a metabolikus stabilitása és meglehetősen lipofil volt, de ennek a környezete ismét a szabadalmaztatható térbe esett, így ez a molekula lett a következő vezérmolekulánk.

**14**hB1 IC₅₀: 9,5 nMhB1 K_i: 0,9 nM

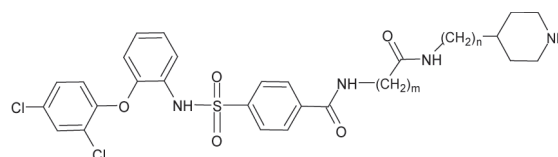
8. Ábra. A második vezérmolekula.

Célunk az volt, hogy a nanomoláris hatékonyság megőrzése mellett javítsunk a kedvezőtlen tulajdonságokon, mindezt elsősorban a bázikus oldalláncok változtatásával próbáltuk elérni (9. ábra).



9. Ábra. A második vezérmolekula optimalizálása.

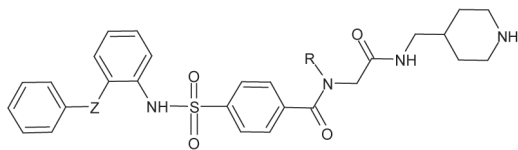
Vizsgáltuk a terminális fenoxycsoport helyettesíthetőségét, az oldallánc hosszának szerepét, különböző aminosavakat és bázikus aminokat építettünk be a molekulába (10. ábra).



	m	n	hB1 K _i (nM)
15	1	0	1.4
16	1	1	2.0
17	1	2	0.8
18	1	3	0.6
19	1	4	1.6
20	2	0	49.7
21	2	1	34.0
22	2	2	13.4

10. Ábra. A bázikus oldallánc hosszának szerepe a hatékonyságra.

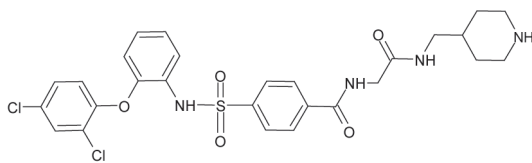
Azt találtuk, hogy azok a molekulák mutatják a legkedvezőbb hatékonyságot, melyek glicin linkert tartalmaznak (11. ábra).



	R	Z	hB1 K_i (nM)
23	Me	O	220
24	H	O	24.4
25	H	C=O	2.53
26	H	S	15.7
27	H	NH	19.2

11. Ábra. A terminális fenoxisoprot helyett alkalmazható csoportok vizsgálata.

28 már azokat a szerkezeti elemeket tartalmazta, melyek elengedhetetlenül szükségesek a hatékonysághoz, ugyanakkor metabolikusan stabil és szelektív volt. További kihívást jelentett azonban 28 alacsony biohasznosulása (12. ábra).



28

B1 funkcionális teszt

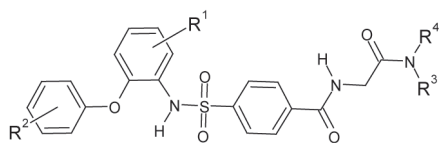
IC_{50} 3.3 nM (humán)
 IC_{50} 6.5 μ M (patkány)
 IC_{50} 28 nM (nyúl)

B1 receptor kötődés
 Metabolikus stabilitás
 Biohasznosulás

K_i 2.0 nM
 93/75/79% (hum/patkány/nyúl)
 0.38% (patkány)

12. Ábra. Optimált molekula a kulcs motívumokkal.

Ennek érdekében olyan kémiai programot dolgoztunk ki, melynek célja a vegyületek lipofilitásának növelése volt (13. ábra).



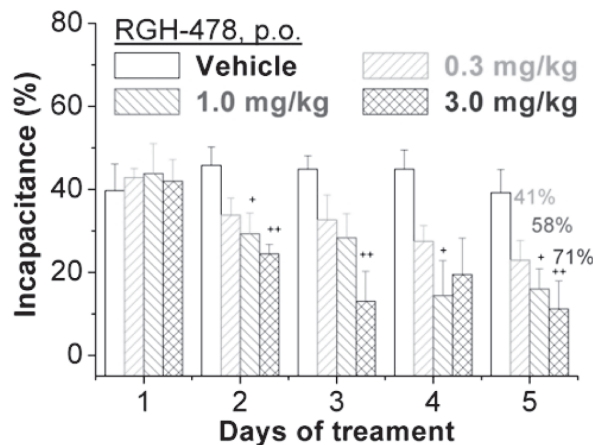
13. Ábra. A lipofilítás finomhangolására összeállított kémiai program.

A következőkben egy kis vegyület könyvtárat állítottunk elő az általunk kidolgozott párhuzamos szintézis módszerrel, és így jutottunk el a program első fejlesztési jelöltjéhez.

Az fejlesztési jelölt összefoglaló jellemzése:

- Hatékony B1 antagonist (human B1 IC_{50} : 0.21 nM; patkány IC_{50} B1: 42 nM; nyúl IC_{50} B1: 0.34 nM).
- Szelektív (>3000-szeres B2-vel és 151 egyéb receptorral szemben).
- Metabolikusan stabil (human Fm 88 %, patkány Fm 99 %).

- Biohasznosulása: 31 % (patkány), 100 % (kutya); $t_{1/2}$: 1.5 óra patkány és 1.8 óra kutya.
- Nagyon hatékony szubakut- és krónikus FCA indukálta monoarthritis tesztben nyúl (14. ábra); a krónikus tesztben hatékonyabb, mint egy nem-steroid gyulladáscsökkentő (diclofenac) és egy COX-2 gátló (valdecoxib) és ugyanolyan hatékony, mint a Sanofi SSR-240612 jelű B1 antagonistája.
- Nincs kardiovaszkuláris mellékhatása kutyákban.
- Nincs központi idegrendszeri mellékhatása.
- Nem mutagén.



14. Ábra. A fejlesztési jelölt analgetikus hatásának vizsgálata CFA-indukált monoarthritis tesztben, nyúl. A tesztben tizenegy nappal a CFA injektálást követően öt napon keresztül (Days of treatment) napi kétszeri adagolás mellett vizsgáltuk a fejlesztési jelölt gyulladt lábízület funkcionális kapacitására gyakorolt hatását (Incapacitance). Az ábrán a pre-dose értékek kerültek bemutatásra. Míg első napi adagolást követően még nem, a második naptól kezdődően már fenntartott analgetikus hatás volt megfigyelhető. Statisztika: páratlan t-teszt + $p < 0.005$; ++ $p < 0.001$

A kiválasztott vegyület félüzemi szintézisével (kg-os mennyiségek) párhuzamosan zajlottak a megfelelő formuláció kiválasztására irányuló kísérletek, a kioldódási és stabilitási valamint további biztonságossági és toxikológiai vizsgálatok. Csak alapos előkészítés után indulhatott a vegyület klinikai kipróbálása embereken, először egészséges önkénteseken (Fázis I vizsgálat), majd speciálisan kiválasztott betegpopuláción (Fázis II vizsgálat).

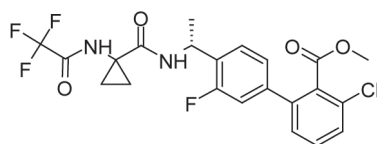
6. Követő molekula felfedezése

Figyelembe véve a preklinikai fejlesztésre kiválasztott molekulák magas kiesési rátáját, valamint a kérdéses kutatási téma művelése során összegyűjtött óriási mennyiségű belső tudást és tapasztalatot, a versenyképesség fenntartása érdekében nélkülözhetetlen egy vagy több azonos hatásmechanizmussal rendelkező követő molekula kidolgozása. A szerkezeti különbségekből fakadó eltérő farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságok növelik annak valószínűségét, hogy végül sikerül egy klinikailag biztonságos és hatékony molekulát kifejleszteni.

A preklinikai fejlesztési jelölt kiválasztását követően a követő molekulával szemben többek között követelményként támasztottuk, hogy az fejleszthetőség tekintetében

előnyösebb, analgetikus profil szempontjából pedig szélesebb spektrummal rendelkező vegyület kell, hogy legyen. A követő projekt tevékenységének gyújtópontjában a korábbi fejlesztésre kiválasztott molekulától szabadalmilag független, új kémiai szerkezet tervezése és szintézise állt. A kémiai kiindulópont megtalálása érdekében többféle stratégiát alkalmaztunk:

- a Richter vegyülettár újonnan előállított illetve vásárolt vegyületeit vizsgáltuk B1 hatásra nagy áteresztőképességű (HTS) *in vitro* tesztben,
- kereskedelmi forgalomban kapható vegyületekből célzott adatbázist építettünk és humán B1 receptor homológiamodellen virtuális szűrésnek vetettük alá, valamint
- a Merck gyógyszergyár MK-0686 számú B1 antagonistá gyógyszerjelölt molekuláján (29, 15. ábra) alapváz-módosítást (scaffold-hopping) hajtottunk végre, hogy így a szabadalmazhatóság feltételeinek megfelelő és remélhetőleg hatékony saját vezérmolekulához jussunk. A következőkben ezen utóbbi megközelítést mutatjuk be részletesebben.

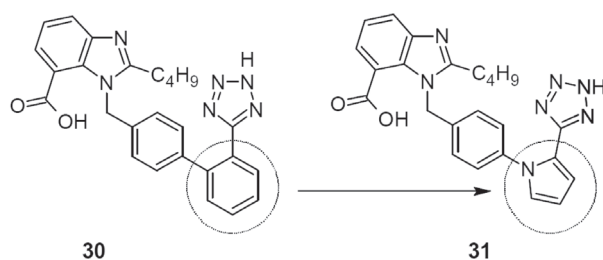


29
MK-0686

15. Ábra. MK-0686 a Merck cég B1 antagonistá klinikai jelöltje.

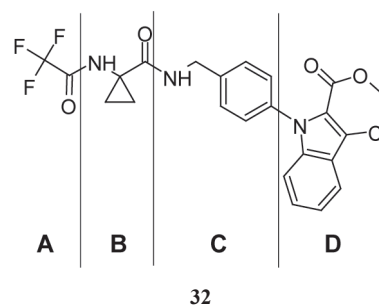
A jelentős számú versenytárs molekula közül az MK-0686 viszonylag alacsony molekulatömegével, a bázikus oldallánc és a szulfonamid molekularész hiányával, valamint deklaráltan agyi penetrációs tulajdonságával emelkedett ki. Utóbbi tulajdonság eredményeképp a centrális B1 receptorok modulációja feltehetően szélesebb fájdalomcsillapító profillal rendelkező vegyületeket eredményez. Ugyanakkor az MK-0686 hátrányos tulajdonságai között ismert volt, hogy szubsztrátuma és indukálója egyes CYP izoenzimeknek.

Bifenil-származékok gyógyszerkémiai irodalmának áttekintésekor találkoztunk Xu és munkatársai¹⁹ tevékenységével, akik angiotenzin receptor (AT₁) blokkoló vegyületek esetében sikerrel helyettesítették bifenil-metilamin-származékok tetrazolt hordozó fenil gyűrűjét (30, kötődési IC₅₀ 550nM) pirrol gyűrűvel (31, IC₅₀ 6,9nM; 16. ábra).



16. Ábra. Irodalmi példa sikeres fenil-pirrol bioizoszter cseréjére angiotenzin receptor (AT₁) blokkoló.

A fenti analógiából kiindulva és figyelembe véve a pirrol gyűrűt tartalmazó vegyületek CYP izoenzimekkel szemben gyakran megmutatózó gátló hatását, valamint a monohalogénezett pirrolszármazékok szintetikus hozzáférhetőségével kapcsolatos nehézségeket, az MK-0686 klór-benzoészav részletét 2-metoxikarbonil-3-klór-indol-1-il szerkezeti elemre cseréltük. Nagy örömmre az így kapott, egyszerűsített benzilamin linkert tartalmazó vegyület (32, 17. ábra.) magas humán B1 receptor affinitást mutatott (humán B1 receptor affinitás K_i = 10.1 nM; MK-0686 K_i = 2,4 nM), így megfelelő kiindulópontot jelentett az optimalizációhoz.

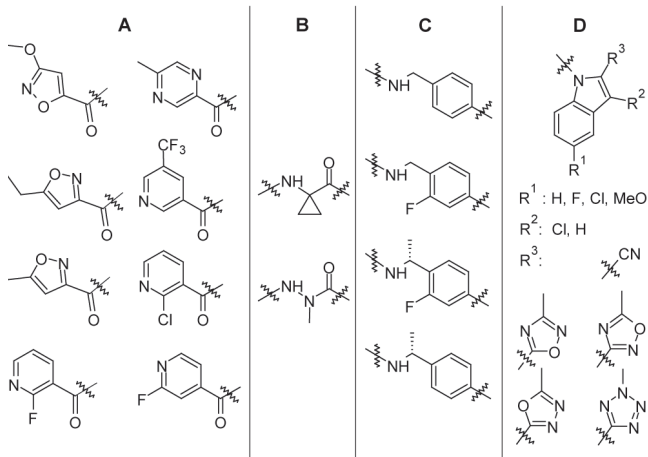


17. Ábra. A követő program vezérmolekulája.

A molekula elsőként kezelendő problémája a megkívántnál alacsonyabb metabolikus stabilitása volt (humán/patkány 48%/23% maradék vizsgált vegyület; kritérium: 70%/60%), melyet feltételezésünk szerint elsősorban az észtercsoport jelenléte okozott. Ezért különböző észter-bioizosztereket építettünk be a molekulába a metoxikarbonilcsoport helyére. Az így kapott vegyületcsalád egyes tagjai már metabolikusan stabilak voltak és *in vitro* penetrációs tesztekben a követelményeknek megfelelő eredményt adtak, így lehetővé vált egy vezérmolekula kiválasztása (szerkezeti képlet nélkül). A vezérmolekulát körülvevő kémiai tér benépesítéséhez a leghatékonyabb eszköznek a párhuzamos szintézis ígérkezett. Ennek előkészítéseként a molekulacsalád előállítására alkalmazott konvergens szintézisút négy kiinduló szintetikus elemének (17. ábra. A, B, C, D) megfelelő szintetikus ekvivalensek készletét hagyományos szintézissel és kereskedelmi forgalomban kapható vegyületek beszerzésével feltöltöttük. A szerkezeti változtatásokra a receptor affinitás szempontjából leginkább érzékeny középső régiót (B, C) érintő módosítások esetén egy-egy példát előállítottunk és a mért humán B1 receptor affinitási értékek alapján döntöttünk az adott építőelem felhasználásáról. Ezt követően az összegyűjtött A, B, C, és D elemekből egy 2800 molekulát tartalmazó virtuális könyvtárat építettünk, melyet *in silico* módszerrel (számolt fiziko-kémiai paraméterek, oldhatóság és penetráció predikció) és szintetikus hozzáférhetőség (idő- és költségkorlátok alkalmazása) szempontjából előszűrtünk. Az ezt követő szintetikus kampányban végül 234 vegyület készült el, melyeket egy célszerűen megválasztott *in vitro* teszt sorozaton megvizsgáltunk. Az egyes tesztek és kritériumok, valamint az azokat teljesítő molekulák száma a következő volt:

- humán B1 funkcionális gátlás > 50% (tesztvegyület koncentráció: 30nM): 121 vegyület
- humán B1 receptor kötődés K_i < 10 nM: 90 vegyület

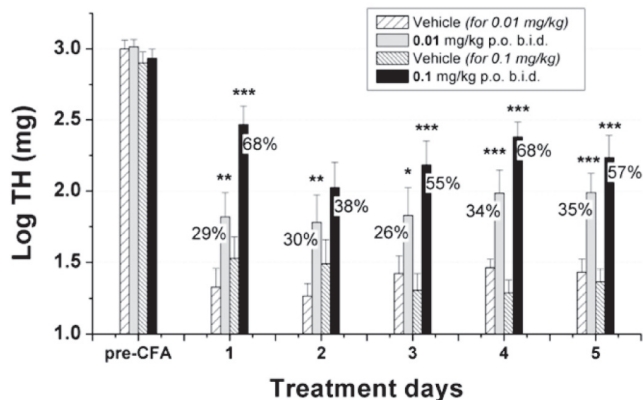
- humán B1 funkcionális gátlás IC₅₀ < 10 nM: 83 vegyület
- metabolikus stabilitás, maradék vizsgált vegyület > 70/60 % (humán/patkány): 51 vegyület
- penetráció Caco-2 sejteken, P_{app} > 10x10⁻⁶ 1/cm², PDR < 4: 29 vegyület.



18. Ábra. A vezérmolekula optimalizálása során az elsődleges *in vitro* tesztekben sikeresen szereplő 29 molekula építőelemei.

A 29 vegyület a 18. ábrán látható szerkezeti elemekből épült fel.

A további vizsgálatokat (többek között CYP enzim gátlás és indukción, hERG gátlás vizsgálata, patkány farmakokinetika, fájdalomcsillapító hatás humán B1 receptort overexpresszáló transzgen egéren, valamint kardiovaszkuláris biztonsági vizsgálat) két vegyület élte túl és került további vizsgálatokra. Az összesített vizsgálati eredmények elemzését követően további preklinikai vizsgálatokat már az újabb fejlesztésre kijelölt molekulával végeztük. (szerkezeti képlet nélkül, M_r 565, hB1 receptor kötődési K_i 2,4 nM, funkcionális IC₅₀ 0,5 nM, biohasznosíthatóság patkányban 47%). A 19. ábrán látható, hogy az újabb jelölt tolerancia fellépése nélkül, eredményesen csökkentette a fájdalmat hB1 receptort overexpresszáló transzgen egéren CFA által kiváltott gyulladási fájdalom teszt mellett.



19. Ábra. A követő fejlesztési jelölt analgetikus hatása CFA-indukált mechanikus allodynia tesztben B1R-t overexpresszáló transzgen egéren ismételt adagolás mellett. Maximum fájdalomküszöb változása (Log TH; Átlag± szórás) a kezelési napok függvényében (Treatment days). Statisztika: 2-utas ANOVA/Tukey teszt *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki a Richter Gedeon Nyrt. Bradykinin B1 programjában dolgozó alább felsorolt minden kutatójának és közreműködőjének: Balogh György Tibornak, Balázs Ottiliának, Boros Andrásnak, Buckle Dereck-nek, Bugovics Gyulának, Dallosné Szvetlanának, Dezső Péternek, Farkas Sándornak, Fodor Lászlónak, Galgóczy Kornélnak, Gullerné Ladó Zsuzsannának, Halász Attilának, Háda Viktornak, Heilinger Évának, Héjjas Krisztinának, Horváth Csillának, Horváth Irénnek, Hodocsek Barbarának, Karsai Editnek, Kiss Róbertnek, Könczöl Árpádnak, Kis-Varga Ágnesnek, Kolok Sándornak, Komlódi Zsoltnak, Kósa Jánosnak, Krajcovicz Zoltánnak, Likó Istvánnak, Linke Nikolettnek, Makó Évának, Magdó Ildikónak, Molnár Lászlónak, Nagy Józsefnek, Orosz Szabolcsnak, Papp Andrea Mártának, Perényi Zsoltnak, Polgár Timeának, Rónai Andrásnak, Selényi Györgynek, Schmidt Évának, Stark Holger-nek, Szalai K. Katalinnak, Szántay Csabának, Szondiné Kordás Krisztinának, Tar Miklósnak, Tarsay Ákosnak, Tarnawa Istvánnak, Tóth Szilviának, Trafikánt Gábornak, Vastag Mónikának, Visegrády Andrásnak és Tony Ainsworth-nek.

Hivatkozások

- Ahluwalia, A. and Perreti, M. *TIPS*, **1999**, *20*, 100-104.
- Marceau, F. and Regoli, D. *Nature Reviews*, **2004**, *3*, 845-852.
- Phagoo, S.B.; Poole, S. and Leeb-Lundberg, L.M. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 325-333.
- Marceau F.; Hess, J.F. and Bachvarov, D.R. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 357-386.
- Calixto, J.B.; Cabrini, D.A.; Ferreira, J. and Campos, M.M. *Pain*, **2000**, *87*, 1-5
- Dray, A.J. and Perkins, M.N. *TiNS* **1993**, *16*, 99-104.
- Dray, A.J. *Can J. Physiol. Pharmacol.* **1997**, *75*, 704-712.
- Couture, R.; Harrison, M.; Vianna, R.M. and Cloutier, F. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *429*, 161-176.
- Mason, G.S.; Cumberbatch, M.J.; Hill, R.G. and Rupniak, N.M. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2002**, *80*, 264-268.
- Bhoola, K.D.; Figueroa, C.D. and Worthy, K. *Pharmacol. Rev.* **1992**, *44*, 1-80.
- Cassim, B.; Shaw, O.M.; Mazur, M.; Misso, N.L.; Naran, A.; Langlands, D.R.; Thompson, P.J. and Bhoola, K.D. *Rheumatology*, **2009**, *48*, 490-495.
- Gabra, H.B. and Sirois, P. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *457*, 115-124.
- Marceau, F. and Regoli, D. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *154*, 1163-1165.
- Phagoo, S.B.; Reddi, K.; Anderson, K.D.; Leeb-Lundberg, L.M. and Warburton, D. *JPET* **2001**, *298*, 77-85.
- A projekt *in vivo* vizsgálataira a munkahelyi állatjóléti bizottság engedélyével a hatályos állatvédelmi törvények és rendeletek betartásával került sor. Feljebb, a kutatás szempontjából döntőfontosságú *in vivo* tesztek kerültek felsorolásra.
- Campos, M.M. and Calixto, J.B., *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *114*, 1005-1013.
- (a) Su, D. S.; Markowitz, M. K.; DiPardo, R. M.; Murphy, K. L.; Harrell C. M.; O'Malley S. S.; Ransom, R. W.; Chang, R. S. L.; Ha, S.; Hess F. J.; Pettibone, D. J.; Mason, G. S.; Boyce, S.; Freidinger R. M.; Bock, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7516. (b) Ha, S. N.; Hey, P. J.; Ransom, R. W.; Harrell, C. M. Jr.; Murphy, K. L.; Chang, R.; Chen, T. B.; Su, D. S.; Markowitz, M. K.; Bock, M. G.; Freidinger, R.M.; Hess, F. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 159.

18. Éles, J., Beke, Gy., Vágó, I., Bozó, É., Huszár, J., Tarcsay, Á., Kolok, S., Schmidt, É., Vastag, M., Hornok, K., Farkas, S., Domány, GY., Keserű, Gy.M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3095-3099.
19. Xu, J. Y., Zeng, Y., Ran, Q., Wei, Z., Bi, Y., He, Q.H., Wang, Q. J., Hu, S., Zhang, J., Tang, M. Y., Hua, W. Y., Wu, M. X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2921-2926.

Bradykinin B1 receptor antagonist research for the treatment of pain

Bradykinin B1 receptors, expressed in peripheral tissues following injury, mediate the effects of kinins provoking a number of acute and chronic inflammatory pathways resulting in pain, edema and vasodilatation. Studies support the hypothesis that the antagonists of these receptors will be effective anti-inflammatory drugs treating rheumatoid arthritis, osteoarthritis, inflammatory bowel disease and other inflammation related diseases.

In this article medicinal chemistry strategies providing a pharmacological tool and a preclinical development candidate with excellent *in vivo* activity, as well as a drug candidate under phase II clinical trials are presented, starting from competitors' bradykinin B1R antagonists and a high throughput screening hit.

At the beginning of the project a screening cascade was implemented to facilitate the identification of functionally active antagonists selectively binding to the B1 receptor with good ADME properties, suitable for *in vivo* animal studies. The latter consisted of mouse formalin test, complete Freund's Adjuvant (CFA) induced monoarthritis pain test in rats, lysDABK induced ear edema test and CFA-induced chronic monoarthritis test in rabbits, in accordance with the species specificity of the individual compounds.

The first approach started from a B1 receptor antagonist structure, with quinoxalinone central core and subnanomolar affinity, published by Merck and was supported by an in-house built homology model. The essential structural features assuring the peptidomimetic spatial arrangement of pharmacophores were retained but the central core and the basic side chain was modified to obtain patentable compounds with improved drug-like properties. The main issue to be faced during optimization was

the high human metabolic clearance which could be overcome by applying appropriate substitution on ring C of the phenanthridine scaffold in the best compound containing a unique saturated basic amine side chain. Compound **12** dose dependently alleviated the CFA-induced joint pain in rats with effectiveness in a lower dose range than the reference compounds and henceforth was used as a pharmacological tool in animal models.

Subsequently a HTS campaign was carried out which resulted in the identification of an acylamino sulfonamide derivative hit with sub-micromolar B1 receptor antagonist activity. In the extensive optimization program a major breakthrough came when the carboxamide bond was reversed and different basic amine side chains were attached to the benzoic acid derivative so obtained, to enable the selection of a lead compound. Further optimization comprised the incorporation of amino-acid and saturated ring building blocks into the side chain and the change in aromatic ring substitution pattern to improve physicochemical properties and metabolic stability as well as maintain nanomolar efficacy. The application of parallel synthesis resulted in the identification of the first preclinical candidate, a selective, metabolically stable and safe B1 receptor antagonist molecule (no structure given) which is highly effective in animal models of inflammatory pain.

At this point of the project a follow up program was launched based on scaffold hopping of MK-0686, a non-basic, brain-penetrant B1 receptor antagonist, developed by Merck. The novel hit structure obtained by the replacement of the terminal phenyl group of the competitor compound with an indole ring had high B1 receptor affinity but low metabolic stability, which was attributed to the vulnerability of the ester group attached to the indole moiety. The introduction of a number of ester bioisosteres improved ADME properties and permitted the selection of a lead compound (no structure given). In order to populate the chemical space around the lead a virtual library, consisting of 2800 structures, was generated and 234 molecules were synthesized following prioritization. Funneling of the compounds through the complete *in vitro* and *in vivo* screening cascade led to the nomination of the back-up preclinical development candidate (no structure given) which had an analgesic effect in a repeat-dose study in the CFA induced plantar allodynia pain model in B1R overexpressing transgenic mice with no development of tolerance.

2*H*-1,2,3-Benzotiadiazin-1,1-dioxidok előállítása, redukciós és alkilezési reakcióik. Egy érdekes mezoionos vegyületcsalád szintézise

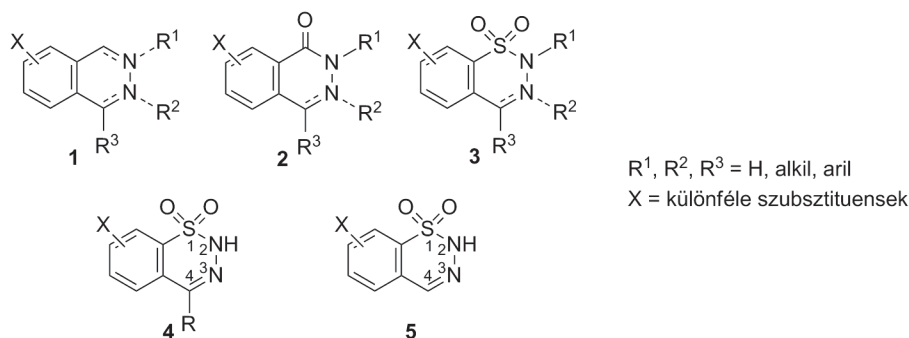
PORCS-MAKKAY Márta,* PANDUR Angéla, SIMIG Gyula és VOLK Balázs

Egis Gyógyszergyár Zrt., Keresztúri út 30–38, 1106 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Számos publikáció és szabadalmi bejelentés foglalkozik a ftalazin (1), valamint a ftalazinon (2) alapvázat tartalmazó vegyületek biológiai hatásaival (1. ábra). Az 1 általános képletű vegyületek ismert parazita ellenes szerek,¹ az AMPA/kainát receptor allosztérikus modulátorai² és foszfodieszteráz-4 (DPE-4) inhibitorok.³ Alkalmazhatóak továbbá a protein-kináz által közvetített betegségek⁴ és a depresszió kezelésében.⁵ A 2 általános képletű

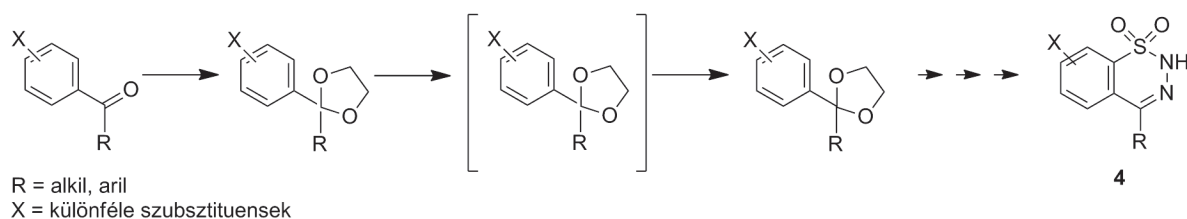
analogonjaik esetében is nagyszámú farmakológiai és terápiás hatást említenek meg az irodalomban, a poli(ADP-ribóz) polimeráz (RARP) gátlástól^{6,7} a gyulladásgátló hatásig.⁸ A vegyületcsalád más képviselői pedig sejtvédő tulajdonságokról,⁹ illetve antiallergiás hatásokról¹⁰ ismertek. Az említett vegyületekhez hasonló szerkezetű 1,2,3-benzotiadiazin-1,1-dioxid család (3) néhány ismert tagja CRTH-2 antagonistá,⁷ illetve baktérium- és gombaölő hatású szer.¹¹



1. Ábra. Az irodalomból ismert ftalazin (1), ftalazinon (2) és 1,2,3-benzotiadiazin-1,1-dioxid (3–5) vegyületcsaládok.

Az 1 és 2 vegyületcsaládok képviselőinek a szintézise jól dokumentált,¹² ezzel szemben a 3–5 (1. ábra) vegyületek előállítására és kémiájára vonatkozó irodalom meglehetősen szegényes. Az 5 (X=H)¹³ vegyületen kívül, az irodalomban csak néhány olyan 4 képletű vegyületet említenek, amelyek a 4 helyzetben amino,¹⁴ hidrazino¹⁵ vagy fenil¹⁶ szubsztituenst hordoznak. Ugyanakkor az 5 (X=H) vegyületen kívül, a 4-es helyzetben szubsztituálatlan, az aromás gyűrűn viszont különféleképpen funkcionálizált származékok (5, X≠H) ismeretlenek az irodalomban.

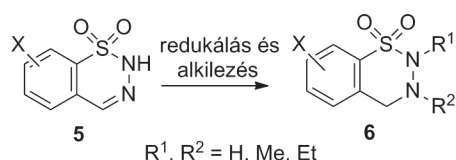
Kutatásaink során korábban már foglalkoztunk olyan, potenciálisan anxiolitikus hatású 2*H*-1,2,3-benzotiadiazin-1,1-dioxid származékokkal, amelyekben a 4 helyzetben alkil (4, R=alkil),¹⁷ illetve aril (4, R=Ph vagy szubsztituált Ph) csoport van. Egy széles körben általánosítható eljárást dolgoztunk ki a 4 (R=alkil, aril) célvegyületek előállítására. Aceto- és benzofenonokból nyert 1,3-dioxolánok *orto*-litiált származékainak klórszulfonálásával kaptuk azokat az *orto*-klórszulfonil ketálokat, amelyekből a ketál hidrolízisének követő hidrazinos gyűrűzárással jutottunk 4 (R=alkil, aril) vegyületekhez (2. ábra).^{18,19}



2. Ábra. 4-Alkil és 4-aril-2*H*-1,2,3-benzotiadiazin-1,1-dioxidok előállítása.

* Tel: +36204433740; e-mail: porcs-makkay.marta@egis.hu

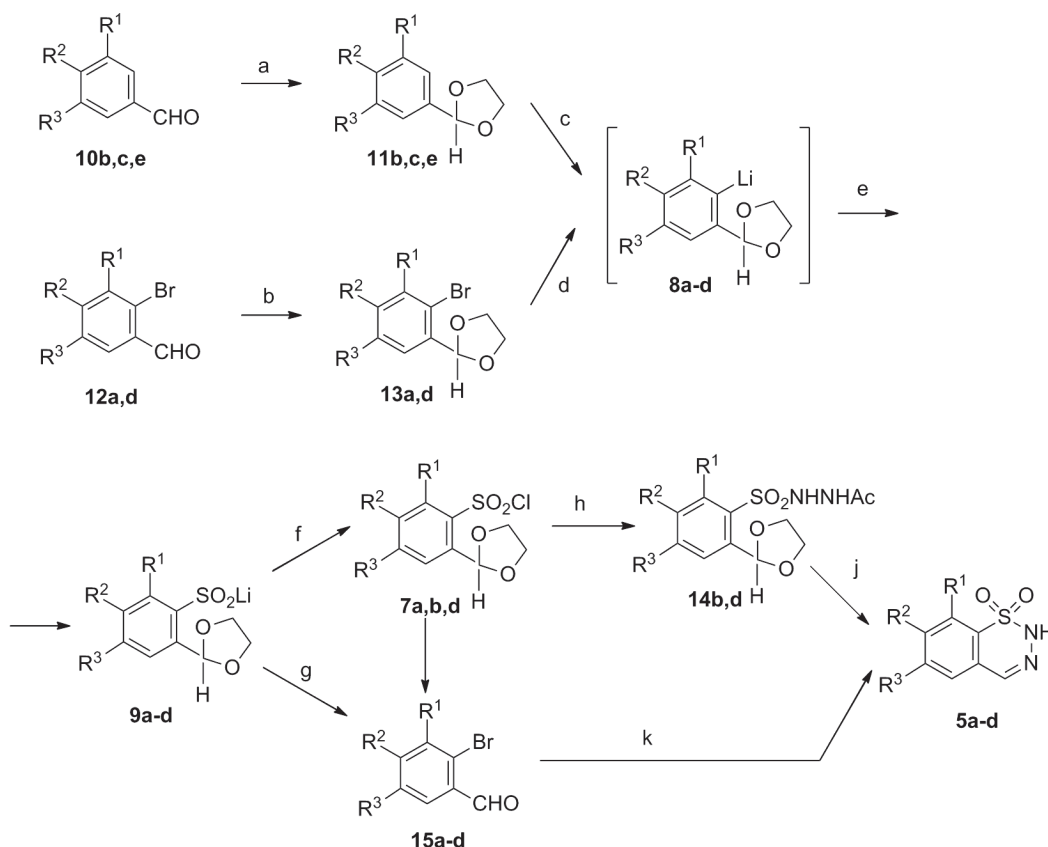
Az Egis Gyógyszergyárban a központi idegrendszerre ható (CNS) anyagok kutatása során célul tűztük ki **5** képletű vegyületek és ezekből a megfelelő telítetlen és telített származékok, valamint ezen vegyületek nitrogénen szubsztituált származékainak előállítását.²⁰ A 2 és 3 helyzetű nitrogének metil-, illetve etil-jodiddal történő alkilezésével (3. ábra, **6**) annak a lehetőségét vizsgáltuk, hogyan lehet ezekbe a helyzetekbe sokkal bonyolultabb szerkezetű, potenciálisan CNS hatást hordozó funkció csoportokat [pl. (ω -dialkilamino)alkil] beépíteni.^{21,22} Jelen közleményünkben ezen kutatási eredményeinkről számolunk be.



3. Ábra. A 2H-1,2,3-benzotriazin-1,1-dioxidok redukciójával, alkilezésével előállított 3,4-telített 2,3-dialkil származékok.

2. Eredmények

Elsődleges célunk tehát a 4 helyzetben szubsztituátlan 2H-1,2,3-benzotriazin-1,1-dioxidok (**5**) szintézisének kidolgozása volt. Az **5** vegyületek egyetlen ismert képviselőjének (**5**, X=H)^{13b} kulcsintermediere a nátrium 2-formil-benzolszulfonát, amely a 2-metil-benzolszulfonsav oxidációjával²³ vagy a 2-klór-benzaldehid nátrium-szulfittal történő nukleofil szubsztitúciójával²⁴ állítható elő. Mivel egyik módszer sem általánosítható más aromás szubsztitúciós mintázatok esetén, alternatív utat kellett keresnünk. A legígéretesebbnek az az eljárás tűnt, amely során különféle szubsztituenseket hordozó benzaldehidekből kiindulva, a formil funkciót egy utólag könnyen eltávolítható védőcsoporttal olyan szubsztituenssé alakítjuk, amely lítálási reakcióban *ortho* irányító csoportként működik, és így az *ortho*-lítált származék klórszulfonálásával juthatunk a kulcsintermedierekhez. Amennyiben a kiindulási benzaldehid szubsztituensei nem tették lehetővé hatékony irányított *ortho*-lítálást, megfelelően védett *ortho*-bróm-benzaldehidben bróm-lítium cserét végeztünk.



4. Ábra. Reagensek és reakciókörülmények: (a) HO-(CH₂)₂-OH, toluol, forralás, 6–12 óra, 84–100%; (b) HO-(CH₂)₂-OH, toluol, forralás, 5 óra, 90%; vagy MW, 2 óra, 77%; (c,d) BuLi, THF, –78 °C; (e) SO₂, THF, –78 °C-ról szobahőmérsékletre, 69–100% **11** vagy **13** vegyületekre számolva; (f) SO₂Cl₂, hexán, –5 és 0 °C között, 1 óra, 74–98%; (g) 1. lépés: SO₂Cl₂, hexán, –5 és 0 °C között, 1,5 óra; 2. lépés: H₂SO₄, CHCl₃, szilikagél, szobahőmérséklet, 3 h, 32–78% **11c** vegyületre számolva; (h) H₂N-NHAc, IPA, 0 °C-ról szobahőmérsékletre, 2–12 óra, 76–96%; (i) H₂SO₄, CHCl₃, szobahőmérséklet, 20–30 óra, 54–88%; (j) 10%-os vizes HCl, forralás, 2,5–3 óra, 56–87%; (k) N₂H₄·H₂O, THF, szobahőmérséklet vagy forralás, 1–2 óra, 20–89%.

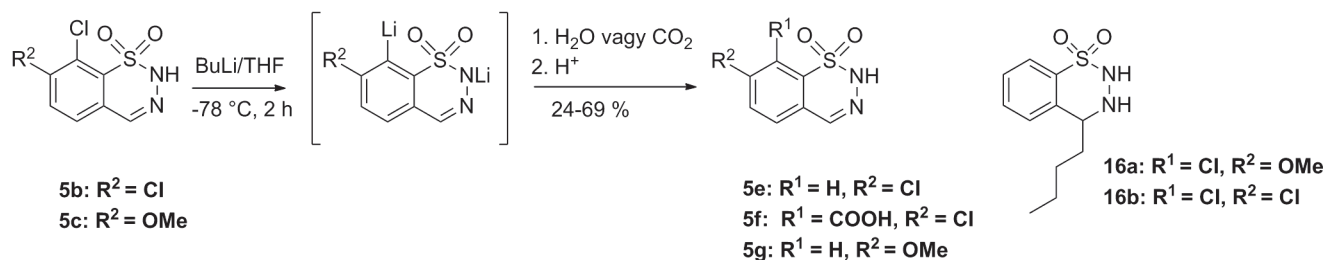
Az egyes vegyületek szintézisének meghatározó lépéseit az 1. Táblázatban foglaltuk össze.

1. Táblázat. A vegyületek szintézisének meghatározó lépései:

5, 6, 8-15	R ¹	R ²	R ³	A szintézis meghatározó lépései
a	H	H	H	b, f, i
b	Cl	Cl	H	a, f, h vagy a, f, i
c	Cl	OMe	H	a, g
d	H	H	OMe	b, f, h vagy b, f, i
e	H	Cl	H	Alternatív eljárás (lásd 5. ábra)

Eszerint a **10** benzaldehydeket etilenglikollal forralva toluolban *p*-toluolszulfonsav jelenlétében a megfelelő **11** jelű 1,3-dioxolánokká alakítottuk át (4. ábra). Hasonlóan jártunk el, amikor **12** *orto*-brómbenzaldehydekből indultunk ki, adott esetben mikrohullámú reaktorban dolgozva,²⁹ **13** acetálokat állítottuk elő. A **12a** brómszármazék alkalmazását az indokolta, hogy irodalmi példák a 2-fenil-1,3-dioxolán³⁰ (**11a**) sikertelen lítiálásáról számoltak be,³¹ amit saját kísérleteink is igazoltak. A **12d** brómvegyületre azért volt szükségünk, mert csak bróm-lítium cserével juthattunk a kívánt **5d** termékhez. A 2-(3-metoxi-fenil)-1,3-dioxolán lítiálása várhatóan a két szubsztituens között, a kétszeresen aktivált pozícióban játszódik le.³¹

A **11** és **13** acetálok tetrahydrofuranban (THF) butil-lítiummal (BuLi) végrehajtott lítiálása, majd az aril-lítium kéndioxidtal történő reakciója a **9** lítium-szulfínát sókat eredményezte, amelyeket szulfuril-kloriddal reagáltatva a megfelelő benzolszulfonil-klorid származékká alakítottunk. Ezt az oxidatív klórozást és azt követően a reakcióelegy feldolgozását az esetek egy részében a védőcsoport megtartásával tudtuk végrehajtani, így **7a,b,d** vegyületeket nyertünk ki. A 2,3-diklór (**7b**) és 4-metoxi (**7d**) köztitermékeket acetyl-hidrazinnal reagáltattuk 2-propanolban (IPA), így a **14b** és **14d** szulfonil-acetohidrazonokat kaptuk. Savas forralással egy-lombikos reakcióban játszódott le az acetál védőcsoport eltávolítása, a dezacetilezés, valamint a gyűrűzárás, **5b** és **5d** célvegyületeket eredményezve.

5. Ábra. Alternatív eljárás a 2*H*-1,2,3-benzotriazin-1,1-dioxidok előállítására.

Hasonlóképpen, ha a 8-klór-7-metoxi-2*H*-1,2,3-benzotriazin-1,1-dioxidot (**5c**) lítiáltuk, majd vízzel reagáltattuk, a 7-metoxi származékhoz (**5g**) jutottunk, amely a 4-metoxi-benzaldehyd acetál közvetlen lítiálásával nem állítható elő. Megjegyzendő, hogy ezek a lítiálások csak alacsony konverzióval játszódtak le. Ha alacsony hőmérsékleten, -78 °C-on dolgoztunk, a kiindulási anyag jelentős hányadát visszanyertük, míg 0 °C-on, a BuLi C=N kettős kötésre történő addíciója következtében a **16a** képletű

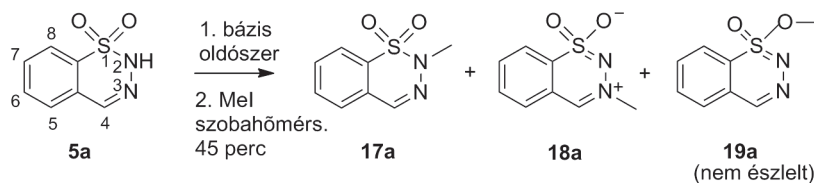
Alternatív eljárást alkalmaztunk **7a** esetében: a dioxolán védőcsoport lehasítása tömény kénsav hatására, kloroformban szilikagél jelenlétében kevertetve, a 2-formil-benzolszulfonil-kloridot (**15a**) eredményezte. **7b**-ből és **7d**-ből hasonlóan előállítottuk **15b**-t és **15d**-t. A **9c** 2-klór-3-metoxi lítium-szulfínát esetében az előzőektől eltérő viselkedést tapasztaltunk, ugyanis szulfuril-kloriddal reagáltatva, a reakcióelegy feldolgozása után **7c** és a megfelelő hidrolizált származék, **15c** keverékét nyertük ki. A hidrolízis teljessé vált, amikor az elegyet kénsav jelenlétében kevertettük. A **15a-d** vegyületeket hidrazin-monohidráttal reagáltatva **5a-d** célvegyületeket állítottuk elő.

A 2-(4-klór-fenil)-2-metil-¹⁸ és 2-(4-klór-fenil)-2-fenil-1,3-dioxolán¹⁹ lítiálása során szerzett tapasztalatok alapján megfogalmazott várakozásainkkal ellentétben, a 2-(4-klór-fenil)-1,3-dioxolán (**11e**) lítiálása butil-lítiummal sikertelennek bizonyult, még akkor is, amikor erélyesebb reakciókörülményeket alkalmaztunk (THF-ban -78 °C-ról rendre +50 °C-ra emelve a lítiálás hőmérsékletét). Következésképpen **5e** vegyület szintézisére egy alternatív utat kellett keresnünk. Arra alapozva, hogy a szulfonamid csoport erős *orto* irányító hatással rendelkezik,^{33,34} megkíséreltük a klór-lítium cserét kiváltani a 7,8-diklór-2*H*-1,2,3-benzotriazin-1,1-dioxid (**5b**) molekulában. Valóban, **5b** vegyület butil-lítiummal reagáltatva, majd az aril-lítium sót vízzel bontva 69%-os termeléssel eredményezte a várt **5e** vegyületet (5. ábra). A lítium sót szárazjéggel reagáltatva a 8-karboxi-7-klór származékhoz jutottunk (**5f**), amely alkalmas lehet további funkcionálisra.

4-butyl származék lett a főtermék. Hasonló addíciós terméket (**16b**) **5e** vegyület mellett is azonosítottunk ¹H NMR alapján, de **5b**-ből kiindulva csak nyomokban képződött.

Az így előállított 2*H*-1,2,3-benzotriazin-1,1-dioxidok alkilezését először a szubsztituálatlan alapvegyület (**5a**) metilezésével kíséreltük meg, metil-joddal, *N,N*-dimetil-formamidban (DMF), kálium-*tert*-butoxid (KOBU) jelenlétében. A várt, a 2 helyzetben szelektíven lejátszó

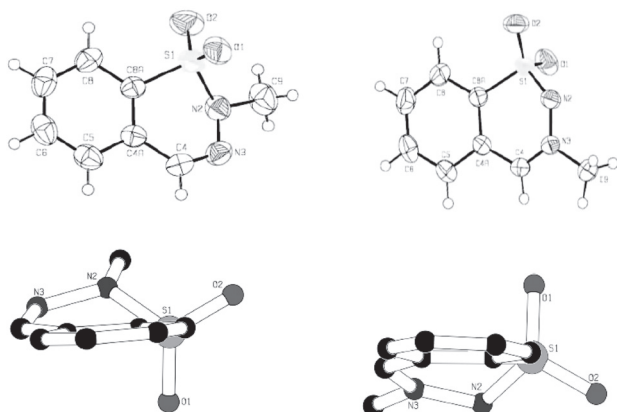
metilezés helyett kétkomponensű keveréket kaptunk, amelyben az összetevők 1,7:1 mólarányban voltak jelen, összehasonlítva az ^1H NMR spektrum $\delta=3,61$ és $4,08$ ppm-nél jelentkező metil jeleinek az intenzitását. Ugyanakkor, ha a metilezést THF-ban hajtottuk végre nátrium-hidridet (NaH) használva bázisként, a nyers reakcióelegy ugyanezt a két komponenst tartalmazta, de az előzőtől eltérően, 1:1,5 mólarányban.



bázis	oldószer	mólarány a nyers reakcióelegyben (17a : 18a : 19a)	izolált termelés (%)	
			17a	18a
KOBu ^t	DMF	1,7 : 1 : 0	39	29
NaH	THF	1 : 1,5 : 0	22	34

6. Ábra. A szubsztituátlan 2H-1,2,3-benzotriazin-1,1-dioxid alkilezése.

Ezzel szemben a másik termék metil jele szignifikánsan eltolódott ($\delta=4,08$ és $52,5$ ppm ^1H NMR, illetve ^{13}C NMR spektrumokban), ami arra utalt, hogy egy erősebb elektronvonzó atomhoz, feltehetőleg egy pozitív töltésű nitrogénhez (**18a**) vagy oxigénhez (**19a**) kapcsolódik. A pontos szerkezet igazolásához további NMR vizsgálatokra volt szükség. A metil csoport és a 4 helyzetű C atom között mért long-range korreláció ^1H - ^{13}C HMBC NMR-ben, valamint a metil csoport és a 4 helyzetű H atom közötti NOE hatás a mezoionos **18a** szerkezetet valószínűsítették. A vegyületek egykristály röntgen felvételei egyértelműen igazolták a **17a** és **18a** szerkezetet (7. ábra)³⁵.



7. Ábra. 17a (balra) és 18a (jobbra) vegyületek molekuláris diagramja.

A 2H-1,2,3-benzotriazin-1,1-dioxidok körében mezoionos szerkezetről nem tesz említést az irodalom. A legközelebbi analógiát a 2-alkilftalazin-2-ium-4-olat (**20**, 8. ábra) vegyületcsalád mutatja, amelynek egyes képviselőit egykristály röntgen mérési eredményekkel is jellemezték.³⁶

A 2H-1,2,3-benzotriazin-1,1-dioxid (**5a**) alkilezésekor megfigyelt reakciót sikeresen kiterjesztettük az aromás gyűrűn különféleképpen szubsztituált **5b-e** származékokra.

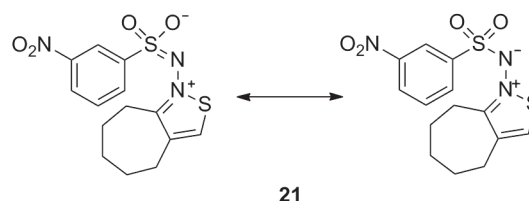
A reakcióelegy feldolgozása során világossá vált, hogy a két komponens egymástól könnyen elválasztható anélkül, hogy kromatográfias módszert kellene alkalmaznunk, ugyanis jelentősen eltér az oldékonyságuk vízben, valamint szerves oldószerekben. A két kristályos vegyületnek azonos a móltömege. Az egyik termék metil csoportja $3,61$ ppm-nél (^1H NMR) és $35,5$ ppm-nél (^{13}C NMR) adott jelet, ami megfelelt a várt 2-metil szerkezetnek (**17a**, 6. ábra).

Ezekben az esetekben is, a KOBu^t alkalmazása DMF-ban a 2-alkil-, míg a NaH THF-ban a 3-alkil származékok (**17**, ill. **18**) képződését segítette elő. A két alkil származékot minden esetben egyszerű módszerekkel szét tudtuk választani anélkül, hogy kromatográfias elválasztást alkalmaztunk volna (10. ábra).



8. Ábra. Ftalazonok mezoionos szerkezetei.

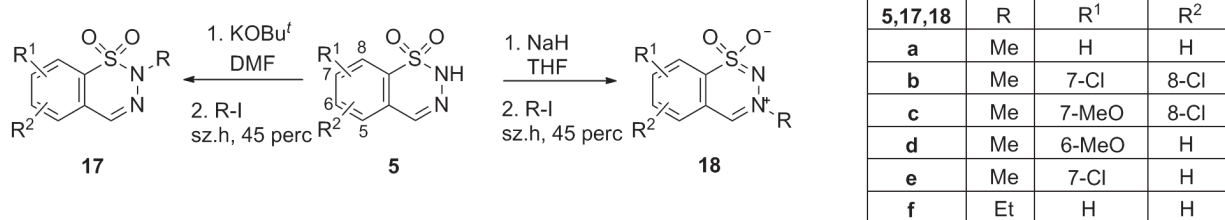
Az általunk említett vegyületeknek egy másik figyelemre-méltó analogonjáról (**21**, 9. ábra) szintén beszámoltak³⁷. **21** vegyületben a kötéshosszak és kötésszögek megközelítik a **18a** esetén mért értékeket.



9. Ábra. Mezoionos szerkezetű szulfonil-hidrazid analogon.

Az aromás gyűrűn szubsztituátlan **5a** 2H-1,2,3-benzotriazin-1,1-dioxid alkilezése etil-jodiddal a várt **17f** és **18f** vegyületeket eredményezte.

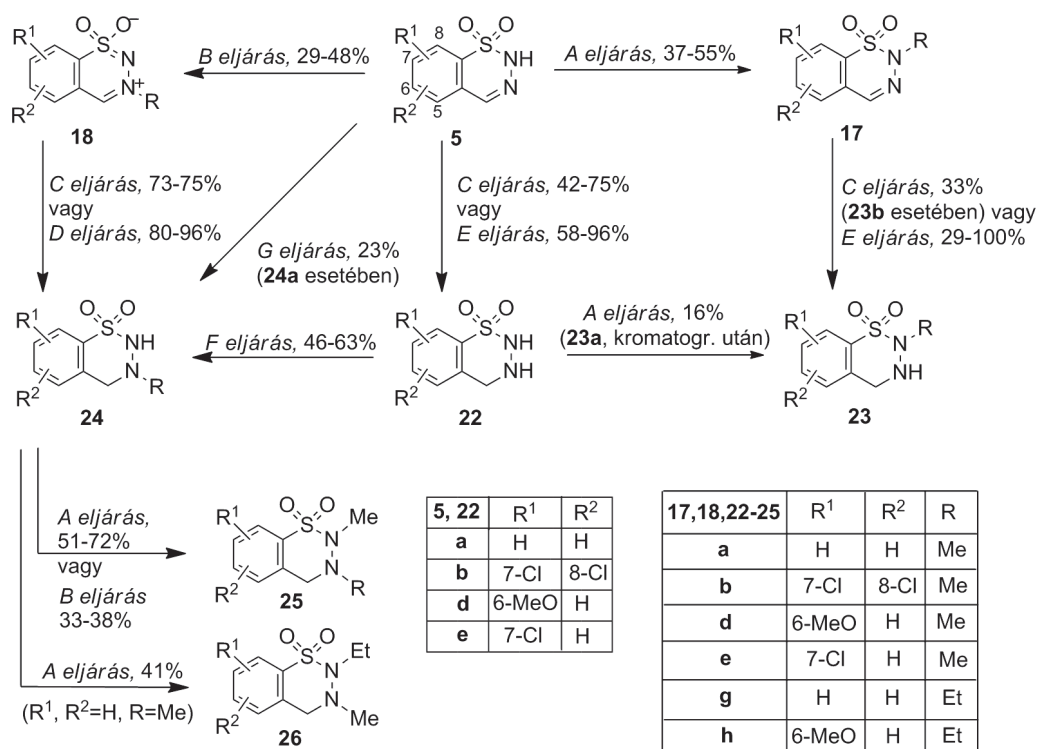
A továbbiakban a **17** és **18** képletű vegyületek telítésével és a 2, illetve 3 helyzetben vagy mindkettőben alkilezett telített vegyületek előállításával foglalkoztunk. Célunk annak megállapítása volt, milyen sorrendben és módszerrel érdemes a telítést és alkilezést elvégeznünk (11. ábra).



10. Ábra. 2H-1,2,3-Benzotiazin-1,1-dioxidok alkilezési reakciói.

Az **5a** vegyületet sikertelenül próbáltuk 10 bar nyomáson Pd/C katalizátor jelenlétében katalitikusan hidrogéneezni **22a** vegyületté. Ugyanakkor **5a** és az *N*(3)-alkil **18** vegyületek PtO₂ katalizátorral (*C eljárás*) a legtöbb esetben elfogadható termeléssel eredményezték a megfelelő telített

származékokat. Meglepő módon, a **17a** 2-metil származékot egyáltalán nem, a **17b-t** pedig csak nagyon alacsony termeléssel sikerült redukálni hasonló körülmények között. A katalizátor mennyiségének növelése sem módosította a termeléseket.



11. Ábra. *A eljárás*: KOBu^t, MeI vagy EtI, DMF, szobahőmérséklet, 0,5–9 óra. *B eljárás*: NaH, MeI vagy EtI, THF, szobahőmérséklet, 0,5–5 óra. *C eljárás*: H₂/PtO₂, AcOH (**23b** esetében) vagy THF+AcOH, 10 bar, szobahőmérséklet. *D eljárás*: NaBH₄, MeOH, szobahőmérséklet, 1–5 óra. *E eljárás*: NaBH₄/TFA, CH₂Cl₂, 0–5 °C, 1 óra. *F eljárás*: CH₂O, H₂/Pd/C, AcOH, 10 bar, szobahőmérséklet. *G eljárás*: CH₂O, H₂/PtO₂, AcOH, 10 bar, szobahőmérséklet.

Tapasztalataink alapján a hidrides redukció általánosan alkalmazható és hatékony eljárásnak bizonyult a C=N kötés telítésére az **5**, a **17** és a **18** vegyületcsaládoknál, **22**, **23** és **24** 3,4-dihidro származékokat eredményezve. Ha a mezoionos szerkezetű **18** vegyületeket nátrium-tetrahidroboráttal (NaBH₄) redukáltuk metanolban (*D eljárás*), magas termeléssel nyertük ki a várt **24** telített termékeket. Ezzel szemben **5** és **17** vegyületek átalakítása a megfelelő **22** és **23** vegyületekké sokkal erélyesebb reakciókörülményeket igényelt. A nátrium-borohidriddel trifluorecetsav (TFA) és CH₂Cl₂ elegyében végzett redukció (*E eljárás*) a 2 helyzetben szubsztituálatlan (**22a–e**) és a 2-alkil (**23a–e**) származékok teljes sorozatát szolgáltatva, közepestől kiválóig terjedő termeléssel. A 2. táblázatban foglaltuk össze valamennyi redukciós lépés termelését.

A továbbiakban a **22** vegyületek alkilezési reakcióit vizsgáltuk. Célunk 2-alkil (**23**), 3-alkil (**24**) és 2,3-dialkil (**25**, **26**) származékok szintézise volt. Valamennyi próbálkozásunk, hogy **22a** vegyületet szelektíven monoalkilezzük a 2 helyzetben, DMF-ban MeI-dal KOBu^t jelenlétében különféle reakciókörülmények között, sikertelennek bizonyult. Végül is a **22a,d,e** vegyületeket a 3 helyzetben redukatív alkilezéssel sikerült szubsztituálnunk. Amikor az említett vegyületeket hidrogén atmoszférában Pd/C katalizátor jelenlétében paraformaldehiddel reagáltattuk (11. ábra, *F eljárás*), közepes termeléssel ugyan (46–63%), de a várt **24a,d,e** 3-metil származékokat kaptuk. **24a-t** redukatív alkilezéssel közvetlenül **5a**-ból is sikerült egy-edényes reakcióban (*G eljárás*) előállítanunk. Ez utóbbi esetben viszont PtO₂ katalizátort kellett alkalmaznunk,

2. Táblázat. A különböző eljárásokkal végrehajtott redukálások termelése

Eljárás ^a	5 → 22				17 → 23						18 → 24					
	a	b	d	e	a	b	d	e	g	h	a	b	d	e	g	h
C	42	75	0	60	0	33	- ^b	-	-	-	75	73	-	-	-	-
D	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	92	91	96	80	80	95
E	58	96	65	85	91	99.6	29	48	84	76	-	-	-	-	-	-

^a C eljárás: H₂/PtO₂, AcOH (**5b** esetében) vagy THF+AcOH, 10 bar, szobahőmérséklet. D eljárás: NaBH₄, MeOH, szobahőmérséklet, 1–5 óra. E eljárás: NaBH₄/TFA, CH₂Cl₂, 0–5 °C, 1 óra.

^b A reakciót nem végeztük el, egy lényegesen hatékonyabb utat választottunk.

és csak alacsony termelést értünk el (23%), összehasonlítva **24a** két lépésben történt előállításával **5a**-ból kiindulva.

A 2,3-dialkil származékok közül először a **25a** vegyületet **23a** 3 helyzetben való metilezésével akartuk előállítani. A **22a** vegyület **24a**-vá történő átalakításánál sikeresen alkalmazott redukzív alkilezési módszerrel (*F eljárás*) azonban nem jártunk sikerrel. Ugyanakkor **24a,b,e,g** vegyületeket elfogadható termeléssel tudtuk **25a,b,e,g** dialkil származékokká alakítani, MeI-dal DMF-ban KOBu^t jelenlétében. Következésképpen a **25** és **26** dialkil

származékok előállításánál az alkil csoportot először a **22** kiindulási anyag 3 helyzetébe kell beépíteni. A második alkilcsoport bevitele **24a,d** vegyületek 2 helyzetébe lényegesen kedvezőbb az *A*, mint a *B* eljárással.

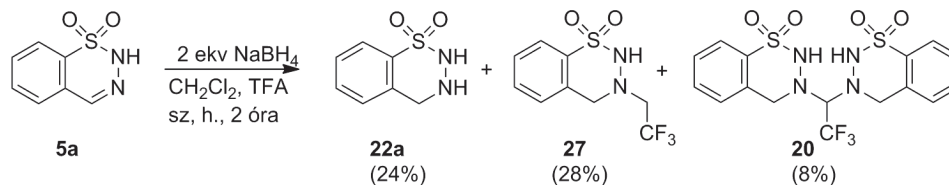
Az elmondottak alapján **22–25** vegyületek előállítása különféle utakon lehetséges. Az aromás gyűrűn szubsztituátlan modellt választva példaként, a 3. táblázatban összefoglaltuk a **23a–25a** vegyületek előállítására kipróbált változatokat, feltüntetve a különböző reakciósorozatokkal elért össztermeléseket, kiemelve közülük a legjobbakat.

3. Táblázat. **23a–25a** vegyületek előállításának lehetséges változatai

Cél-vegyület	Reakció sorozat	Alkalmazott eljárás	Össztermelés (%)
23a	5a → 22a → 23a	C eljárás + A eljárás	7
	5a → 22a → 23a	E eljárás + A eljárás	9
	5a → 17a → 23a	A eljárás + E eljárás	36
	5a → 17a → 23a	B eljárás + E eljárás	20
24a	5a → 18a → 24a	B eljárás + C eljárás	26
	5a → 18a → 24a	B eljárás + D eljárás	31
	5a → 18a → 24a	A eljárás + C eljárás	22
	5a → 18a → 24a	A eljárás + D eljárás	26
	5a → 24a	G eljárás	23
	5a → 22a → 24a	C eljárás + F eljárás	19
	5a → 22a → 24a	E eljárás + F eljárás	27
25a	5a → 18a → 24a → 25a	B eljárás + C eljárás + A eljárás	16
	5a → 18a → 24a → 25a	B eljárás + D eljárás + A eljárás	19
	5a → 18a → 24a → 25a	B eljárás + D eljárás + B eljárás	10
	5a → 18a → 24a → 25a	A eljárás + D eljárás + A eljárás	16
	5a → 17a → 23a → 25a	A eljárás + E eljárás + F eljárás	0
	5a → 24a → 25a	G eljárás + A eljárás	14

Végül néhány érdekes megfigyelés **5a** vegyület nátrium-tetrahidroboráttal trifluoecetsav és CH₂Cl₂ elegyében végzett redukciójával kapcsolatban (*E eljárás*). Ha **5a**-t 2 ekvivalens (ekv) NaBH₄-tal nagy feleslegben (13 ekv) használt TFA jelenlétében szobahőmérsékleten reagáltattuk,

többkomponensű termékegy képződött, amely a várt **22a** mellett, a **27** *N*(3)-(2,2,2-trifluoretill) származékot és a **28** aminált is tartalmazta (12. ábra), 1,9:2,4:1 molarányban (¹H NMR alapján). A három komponenst tisztán 24, 28, illetve 8%-os termeléssel, kromatográfiás módszer alkalmazásával sikerült kinyerni.



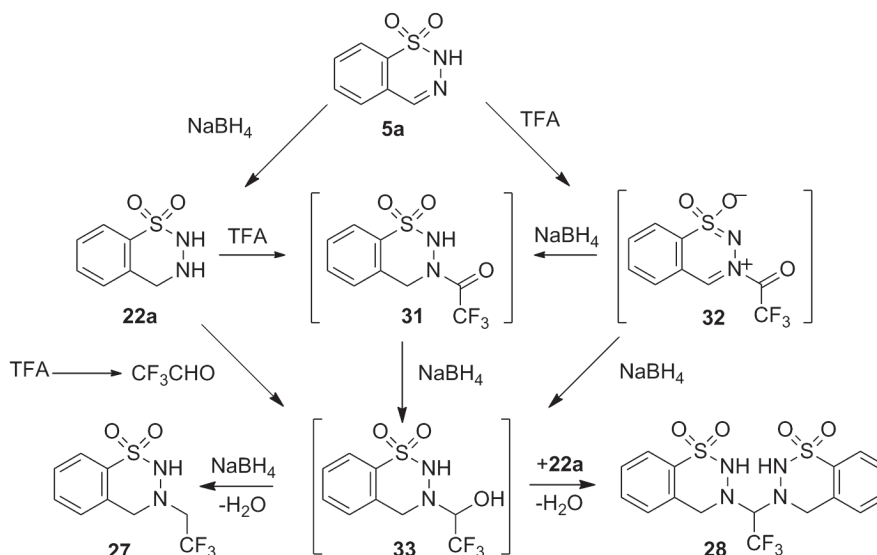
12. Ábra. A NaBH_4/TFA redukálás termékei és lehetséges melléktermékei.

A reakciót 0–5 °C-on megismételve, a fenti molarány 5,25:1,45:1-re módosult. A legjobb eredményt akkor sikerült elérnünk, amikor csak 1 ekv redukálószerrel használtunk és a redukciónál 0–5 °C-on végeztük. Ilyen körülmények között a reakcióelegyben a **28** melléktermék nem volt kimutatható, és **22a** telített származékot 58%-os termeléssel nyertük ki a nyers termék átkristályosításával.

27 trifluoretil származék a trifluoecetsavból redukív aminálási reakcióban keletkezik. Karbonsavak redukív aminálását, azaz tercier aminok előállítását karbonsavakból szekunder aminokkal (NaBH_4 -tal kvaterner ammónium sók jelenlétében) Perrio-Huard és mtsai ismertették az irodalomban³⁸. Hasonló, az aromás^{39,40}, benzil-⁴⁰ és cikloalkilaminok^{40,41} nitrogén atomján történő 2,2,2-trifluoretilézést írtak le, TFA jelenlétében NaBH_4 -tal vagy LiAlH_4 -del

végre hajtott redukálás során. Ismereteink szerint azonban **28** vegyülethez hasonló aminál képződését redukív körülmények között TFA és amin reakciójában nem írták még le.

A 13. ábrán vázoltuk **27** és **28** vegyületek képződésére feltételezett reakció-mechanizmust. A **33** kulcsintermediert három lehetséges úton képződhet. A **22a** vegyület és trifluoacetaldehid (amely a reakcióelegyben a TFA-ból képződik NaBH_4 -tal történő redukció során) reakciója a **33** intermediert eredményezi, amely két lépésben **31** trifluoacetyl származékon keresztül is képződhet. **5a** trifluoacetylézése **32** mezoionos szerkezetű benzotiadiazónium származékhoz vezet, amely redukcióval szintén **33** köztiterméké alakul. Ennek az intermediert a redukciója a **27**, míg **22a**-val történő reakciója a **28** vegyülethez vezet.



13. Ábra. A **27** és **28** melléktermékek képződésének feltételezett reakció mechanizmusa.

A **22a** 3,4-dihidro vegyületet TFA-ban (13 ekv) reagáltatva NaBH_4 -tal (2 ekv), a reakcióelegyben ^1H NMR spektrum alapján **27** és **28** termékeket 2,5:1 molarányban azonosítottuk. Ez az arány megközelíti az **5a** hasonló reakciója során mért arányt, arra utalva, hogy **5a**-ból kiindulva a **27** és **28** vegyületek képződése **22a**-n keresztül játszódik le.

3. Összefoglalás

Az **5** általános képletű, a 4 helyzetben szubsztituátlan, az aromás gyűrűn különféleképpen szubsztituált, új 2*H*-1,2,3-benzotiadiazin-1,1-dioxidok előállítására kidolgoztunk egy eljárást, amelynek kulcslépése a **11** dioxolán formájában védett **10** benzaldehidek *orto* helyzetbe irányított, illetve a **13** bróm származékok bróm-lítium cserén alapuló litiálása. Az így képződött **8** aril-lítium intermediert kéndioxiddal

reagáltatva a **9** szulfinsav sókat eredményezi, amelyek az aromás gyűrű szubsztituenseitől függően többféleképpen alakíthatók tovább az **5** célvegyületekké. Az egyik eljárás szerint a **9** szulfínátot **14** szulfonil-acetohidraziddá alakítjuk át a **7** klórszulfonil köztiterméken keresztül, miközben a védőcsoport változatlan marad, és csak az utolsó lépésben, a gyűrűzárás körülményei között hasad le. A másik eljárás során a védőcsoport eltávolítása után kapott **15** *orto*-formilbenzolszulfonil-klorid hidrazin-monohidráttal történő gyűrűzárása vezet az **5** célvegyülethez. Az itt bemutatott eljárásokkal, a jelen példákon túlmenően, lehetségessé vált a vizsgált vegyületcsalád számos más képviselőjének szintézise is.

A fenti eljárásokkal előállított új vegyületcsalád (**5**) metil-, illetve etil-jodiddal végrehajtott reakciói alapján

megállapítottuk, hogy az alkilezés nem szelektív, a 2 és a 3 helyzetben szubsztituált származékok elegye képződik (**17**, ill. **18**). A reakciókörülményektől függően az egyik vagy a másik alkil származék válik a reakció főtermékévé és a két vegyület könnyen – kromatográfia nélkül – elválasztható egymástól. Bebizonyítottuk, hogy a **18** monoalkil származék mezoionos szerkezetű, ezáltal új, a 2*H*-1,2,3-benzotiadiazin-1,1-dioxidok családjában eddig ismeretlen struktúrát képvisel.

A célvegyületeknek tekintett **25** telített 2,3-dialkil származék előállítására céljából vizsgáltuk a telítetlen **5** 2*H*-1,2,3-benzotiadiazin-1,1-dioxidok és megfelelő **17** *N*(2)- és **18** *N*(3)-alkil származékaiknak a redukcióját és alkilezését különböző reakciókörülményeket alkalmazva és különböző sorrendben végrehajtva az elemi reakciólépéseket. A C=N kettős kötés telítése során szerzett tapasztalatok alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a borohidrides redukció alkalmasabb a katalitikus hidrogénezésnél. Számos szintézisutat vizsgálva megállapítottuk, hogy a **25** 2,3-diszubsztituált 3,4-dihidro-2*H*-1,2,3-benzotiadiazin-1,1-dioxidok előállítása a megfelelő **24** telített 3-alkil származékokon keresztül valósítható meg. Az általunk kidolgozott új eljárás lehetőséget ad 2, illetve 3 helyzetben farmakofór csoportokat tartalmazó új 2*H*-1,2,3-benzotiadiazin-1,1-dioxidok szintézisére.

Hivatkozások

1. Fred, M. BE 646344 Belg. Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1968**, *68*, 39638.
2. Lukács, Gy.; Szabó, G.; Simig, Gy.; Flórián, E.; Gigler, G.; Lévay, Gy.; Mezei, T.; Porcs-Makkay, M.; Tihanyi, K.; Végh, M.; Egyed, A. WO 0039100 PCT Intern. Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 89535.
3. (a) Napoletano, M.; Norcini, G.; Grancini, G.; Pellacini, F.; Morazzoni, G. WO 0005219 PCT Intern. Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 122627. (b) Napoletano, M.; Norcini, G.; Botta, D.; Grancini, G.; Morazzoni, G.; Santangelo, F.; Siro, H.; Jorge, G.; Garcia Navio, J. L.; Alvarez-Builla, J. G. WO 9932456 PCT Intern. Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1999**, *131*, 73662.
4. Tasker, A.; Falsey, J. R.; Rzasza, R. M.; Herberich, B. J.; Zhang, D. WO 2010042649 PCT Intern. Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **2010**, *152*, 454124.
5. Sigal, M. V., Jr.; Marchini, P.; Poet, B. L. US 3274185 US Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1966**, *65*, 99390.
6. **2** vegyületek: Li, J.-H.; Tays, K. L.; Zhang, J. WO 9911624 PCT Intern. Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1999**, *130*, 218328.
7. **2** és **3** vegyületek: Bennani, Y.; Tumey, L. N.; Gleason, E. A.; Robarge, M. J. WO 2006034419 PCT Intern. Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **2006**, *144*, 350540.
8. Thomas, T. L.; Radov, L. A. EP 0164593 PCT Intern. Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1986**, *104*, 207293.
9. Radov, L. A.; Thomas, T. L. EP 0309765 *Eur. Pat. Appl.*; *Chem. Abstr.* **1989**, *111*, 153822.
10. Vogelsang, D.; Scheffer, G.; Brock, N.; Lenke, D. US 3813384 US Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1974**, *81*, 63654.
11. (a) Aoki, K.; Sasatake, K.; Kimura, T.; Hatakeyama, N. JP 49094832 Japanese Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1975**, *82*, 165882. (b) Aoki, K.; Sasatake, K.; Kimura, T.; Hatakeyama, N. JP 49094833 Japanese Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1975**, *82*, 120070. (c) Aoki, K.; Sasatake, K.; Kimura, T.; Yamazaki, Sh. JP 49094838 Japanese Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1975**, *82*, 150500. (d) Aoki, K.; Sasatake, K.; Kimura, T.; Yamazaki, Sh. JP 49094839 Japanese Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1975**, *82*, 150499.
12. Brown, D. J. *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Vol. 64, Cinnolines and Phthalazines: Supplement II. pp 109–171. (Eds: Taylor, E. C.; Wipf, P.; Weissberger, A.; John Wiley & Sons, 2005).
13. (a) King, J. F.; Hawson, A.; Deaken, D. M.; Komery, J. *Chem. Commun.* **1969**, *1*, 33–34. (b) A 2*H*-1,2,3-benzotiadiazin-1,1-dioxid (**5a**) előállítását alacsony termeléssel írták le: King, J. F.; Huston, B. L.; Hawson, A.; Komery, J.; Deaken, D. M.; Harding, D. R. K. *Can. J. Chem.* **1971**, *49*, 936–942. (c) King, J. F.; Hawson, A.; Huston, B. L.; Danks, L. J.; Komery, J. *Can. J. Chem.* **1971**, *49*, 943–955.
14. Nabar, U. V.; Mayadeo, M. S.; Deodhar, K. D. *Indian J. Chem. Sect. B* **1988**, *27B(2)*, 109–111.
15. Robertson, J. E.; Biel, J. H. US 3153614 US Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1965**, *62*, 9171.
16. (a) Wright, J. B. US 3407197 US Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1969**, *70*, 57914. (b) Wright, J. B. *J. Het. Chem.* **1968**, *5*, 453–459.
17. Porcs-Makkay, M.; Lukács, Gy.; Kapus, G.; Gacsályi, I.; Simig, Gy.; Lévay, Gy.; Mezei, T.; Végh, M.; Kertész, Sz.; Barkóczy, J.; Leveleki, Cs.; Hársing, L. WO 2008020255; *Chem. Abstr.* **2008**, *148*, 262627.
18. Lukács, Gy.; Porcs-Makkay, M.; Simig, Gy. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3211–3214.
19. Lukács, Gy.; Porcs-Makkay, M.; Simig, Gy. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *20*, 4130–4140.
20. Porcs-Makkay, M.; Lukács, Gy.; Pandur, A.; Simig, Gy.; Volk, B. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 286–293.
21. Porcs-Makkay, M.; Pandur, A.; Simig, Gy.; Volk, B. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 2169–2174.
22. Porcs-Makkay, M.; Pandur, A.; Simig, Gy.; Volk, B. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 44–50.
23. Imamura, H.; Nagao, S.; Hasegawa, R. JP 54100343 Japanese Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1980**, *92*, 41574.
24. Hichri, H.; Lesins, V.; Sommer, Ch. C. US 6040477 US Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 207658.
25. A piperonál ciklohexilaminnal képzett Schiff bázisának a litiálása (BuLi, –78 °C) az imin melletti pozícióban deuterált vagy jódozott terméket eredményezett: Ziegler, F. E.; Fowler, K. W. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 1564–1566.
26. Benzaldehidek ciklohexil iminjeinek 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-id litiáló ágenssel végzett reakcióit igen jó termeléssel írták le: Flippin, L. A.; Muchowski, J. M.; Carter, D. S. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2463–2467.
27. Harris, T. D.; Roth, G. P. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2004–2007.
28. (a) Comins, D. L.; Roth, G. P.; Mantlo, N. B. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3979–3982. (b) Comins, D. L.; Brown, J. D. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1078–1083. (c) Comins, D. L. *Synlett* **1992**, 615–625.
29. Általános eljárást dolgoztunk ki acetofenonok és benzofenonok dioxolánjának mikrohullámú reaktorban történő előállítására: Lukács, Gy.; Porcs-Makkay, M.; Komáromi, A.; Simig, Gy. *ARKIVOC* **2008** (iii), 17–24.
30. A 2-fenil-1,3-dioxolánt (**11a**) az alábbi cikkben írták le: Soderquist, J. A.; Kock, I.; Estrella, M. E. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10*, 1076–1079, ugyanakkor a közvetlen litiálására vonatkozó adat nincs az irodalomban.
31. Egyetlen irodalmi hivatkozás ismert, amelyben a szubsztituálatlan benzaldehid (**10a**) acetállá (dimetil acetál) történő átalakítását leírták, amelyet a továbbiakban litiálási reakciókban felhasználtak (*n*-BuLi-mal nem jászódott le a reakció, *t*-BuLi-mal 34%-os termelést értek el): Plaumann, H. B.; Keay, B. A.; Rodrigo, R. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *51*, 4921–4924. Metoxi-, illetve más alkoxi-benzaldehidek esetén az alkoxi csoportok száma és acetáltként védett formil csoportokhoz viszonyított helyzetük határozza meg, milyen pozícióban jászódik le a litiálás.
32. A szubsztituálatlan benzaldehid (**10a**) bróm-lítium cserével történő orto-litiálását ismertetik: (a) Robinson, R. P. EP 400916 Eur. Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **1991**, *114*, 228883. (b) Mughesh, G.; Panda, A.; Singh, H. B.; Narayan, S.; Puneekar,

- N. S.; Butcher, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 839–850. (c) Pöllnitz, A.; Silvestru, C.; Carpentier, J.-F.; Silvestru, A. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 5060–5070. (d) Dumoulin, D.; Lebrun, S.; Deniau, E.; Couture, A.; Grandclaudeon, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *22*, 3741–3752. (e) Anson, Ch. E.; Creaser, C. S.; Malkov, A. V.; Mojovic, L.; Stephenson, G. R. *J. Organomet. Chem.* **2003**, 101–122.
33. Meyers, I. A.; Lutomski, K. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4464–4466.
34. Blanchet, J.; Macklin, T.; Ang, P.; Metallinos, C.; Snieckus, V. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3199–3206.
35. (a) Beddoes, R. L.; Dalton, L.; Joule, J. A.; Mills, O. S.; Street, J. D.; Watt, C. I. F. *Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1986**, 787–797. (b) Helliwell, M.; Zhao, Y.; Joule, J. A. *Acta Crystallogr., Sect. C* **1997**, *53*, 884–886. (c) Zhao, Y.; Beddoes, R. L.; Joule, J. A. *J. Chem. Res., Miniprint* **1997**, 401–409. (d) Zhao, Y.; Helliwell, M.; Joule, J. A. *J. Chem. Res., Miniprint* **1999**, 1373–1381.
36. (a) Dennis, N.; Katritzky, A. R.; Lunt, E.; Ramaiah, M.; Harlow, R. L.; Simonsen, S. H. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *19*, 1569–1572. (b) Szabó, A.; Csámpai, A.; Körmendy, K.; Böcskei, Z. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 7021–7034. (c) Fuxreiter, M.; Csámpai, A.; Császár, J. *Heterocycles* **1994**, *38*, 1453–1457. (d) Körmendy, K.; Kálmán, A.; Koritsánszky, T.; Kövesdi, I.; Sohár, P.; Ruff, F. *Acta Chim. Hung.* **1986**, *123*, 15–29. (e) Liu, L.-P.; Lu, J.-M.; Shi, M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1303–1306.
37. Kolberg, A.; Sieler, J.; Schulze, B. *Sulfur Lett.* **2000**, *24*, 109–122.
38. Perrio-Huard, C.; Aubert, C.; Lasne, M.-C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I.* **2000**, 311–316.
39. (a) van Oeveren, A.; Pio, B. A.; Tegley, Ch. M.; Higuchi, R. I.; Wu, M.; Jones, T. K.; Marschke, K. B.; Negro-Vilar, A.; Zhi, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1523–1526. (b) Long, Y. O.; Higuchi, R. I.; Caferro, Th. R.; Lau, Th. L. S.; Wu, M.; Cummings, M. L.; Martinborough, E. A.; Marschke, K. B.; Chang, W. Y.; Lopez, F. J.; Karanewsky, D. S.; Zhi, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2967–2971. (c) Harada, K.; Motonaga, K.; Saito, K.; Tanaka, A. US 2012065231 US Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **2010**, *153*, 618712.
40. (a) Kikugawa, Y. JP 2009057359 Jap. Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **2009**, *150*, 329401. (b) Gribble, G. W.; Nutaltis, Ch. F.; Leese, R. M. *Heterocycles* **1984**, *22*, 379–386.
41. Huel, N.; Ceci, A.; Doods, H.; Kauffmann-Hefner, I.; Konezki, I.; Schuler-Metz, A.; Walter, R. WO 2009021944 PCT Intern. Pat. Appl.; *Chem. Abstr.* **2009**, *150*, 259765.

Preparation of 2*H*-1,2,3-benzothiadiazine 1,1-dioxides and consecutive reduction–alkylation reactions thereof. Synthesis of a family of compounds with an interesting mesoionic structure

In the course of our study aiming at the synthesis of new agents suitable for the prevention and treatment of anxiolytic disorders, we investigated the synthesis and the alkylation–reduction reactions of 2*H*-1,2,3-benzothiadiazine 1,1-dioxide derivatives.

A new, versatile synthetic route is disclosed here for the synthesis of 4-unsubstituted 2*H*-1,2,3-benzothiadiazine 1,1-dioxides (**5**). The key step of the synthetic route is a directed *ortho* lithiation of benzaldehyde derivatives protected as dioxolanes (**11**) or bromine–lithium exchange of their *ortho*-bromo congeners (**13**), followed by introduction of the sulfinate group by using sulfur dioxide as the electrophile for quenching the aromatic lithium salt. Thereafter, the slightly different behaviour of the analogues variously substituted on the aromatic ring necessitated the development of alternative methods for the further conversion of the lithium sulfinate salts (**9**) to the target compounds. According to one procedure, the sulfinate group was transformed to sulfonyl-acetohydrazide (**14**) via the corresponding sulfonyl chloride (**7**), while the dioxolane protecting group was kept intact until the final cyclisation reaction leading to the target compounds by the simultaneous removal of the dioxolane function and ring-closure. In the course of the other variant, the *ortho*-formylbenzenesulfonyl chloride (**15**), primarily prepared by the acidic cleavage of the protecting group, was cyclised to the corresponding 2*H*-1,2,3-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**5**). Thanks to the novel, versatile intermediates, i.e. the *ortho*-chlorosulfonylated benzaldehydes and their dioxolane counterparts, the significance of the synthetic route described above goes beyond the preparation of these particular compounds, by rendering possible the synthesis of various new compound families. It is worth mentioning that in each case the synthetic version applicable or more advantageous, should be selected taking into consideration the substituents and their position in the aromatic ring of the starting aldehyde.

In our further research aiming at the preparation of central nervous system (CNS) agents, possibilities were investigated for the derivatization of **5** and related compounds. Thus, saturation of the C=N double bond and alkylation of the unsubstituted nitrogen atoms in position 2 or 3 (in this order or vice versa) were envisaged in order to extend the scope of synthetic variations.

While the introduction of more complex R groups with potential CNS effects [e.g. (*o*-dialkylamino)alkyl, etc.] into positions 2 and 3 was also among our further plans, we decided to study the reduction and selective alkylation issues of this compound family first with simple alkylating agents such as methyl and ethyl iodide. Alkylation of 2*H*-1,2,3-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**5a**) was not selective and led to the formation of both *N*(2)- and *N*(3)-alkylated products. When KOBu^t was used as the base in DMF, the *N*(2)-alkyl derivative was the major product, while use of NaH in THF favored the formation of the *N*(3)-alkylated mesoionic product. Formation of a similar two-component mixture could be detected starting from variously substituted 2*H*-1,2,3-benzothiadiazine 1,1-dioxides (**5b–e**) on the aromatic ring, however the ratio of the two products in the crude reaction mixture depended on the character of the substituents. A selective work-up procedure was elaborated, thereby, despite the non-selective character of the alkylation reaction, based on the significant difference between the solubilities of the 2-alkyl (**17**) and 3-alkyl derivatives (**18**) in organic solvents, the desired compound could easily be prepared in each case. Nevertheless the minor compound could be isolated in crystalline form from each reaction mixture as well. The mesoionic structure of 3-alkyl derivatives (**18**) in the family of 2*H*-1,2,3-benzothiadiazine 1,1-dioxides is unprecedented in the literature, therefore it was studied in detail and beside the characterization by elemental analysis and spectra, its structure was also defined by single crystal X-ray measurements as well.

Henceforth aiming at the elaboration of synthetic routes to *N*(2)- and *N*(3)-alkylated or *N*(2),*N*(3)-dialkylated 3,4-dihydro-2*H*-1,2,3-benzothiadiazine 1,1-dioxides, reduction and *N*-alkylation reactions of the 3,4-unsaturated 2*H*-1,2,3-benzothiadiazine 1,1-dioxides were studied. Hydride reduction proved to be a general and efficient method for the saturation of the C=N double bond of compounds **5**, **17** and **18**. The reduction of mesoionic compounds **18** to saturated derivatives **24** with sodium borohydride in methanol gave high yields. However, transformation of compounds **5** and **17** to 3,4-dihydro derivatives **22** and **23**, respectively, required harsher reaction conditions. The reduction with sodium borohydride in the mixture of trifluoroacetic acid (TFA) and CH₂Cl₂ furnished the 2-unsubstituted (**22**) and 2-alkylated (**23**) 3,4-dihydro derivatives successfully. Reduction of the C=N double bond with sodium borohydride was unequivocally superior to catalytic hydrogenation. During our first experiments performed with NaBH₄/TFA, two trifluoroethylated by-products were detected in the reaction

mixture, which were isolated and identified by IR, NMR spectra and elemental analysis. By optimization of the reaction conditions (especially temperature and molar ratio of the substrate and reagents, respectively), formation of these impurities could be avoided and a mechanism for their formation was proposed as well.

As the next step, alkylation reactions of 3,4-saturated compounds **22** to 2-alkyl- (**23**) and 3-alkyl- (**24**) derivatives, and the synthesis of dialkylated title products (**25** and **26**) were investigated. Reductive *N*(3)-alkylation of compounds **22a,d,e** with paraformaldehyde in hydrogen atmosphere in the presence of Pd/C catalyst gave *N*(3)-methyl congeners **24a,d,e** in medium yields. A noteworthy difference was observed between the reactivities of *N*(2)-unsubstituted (**22a**) and *N*(2)-methyl derivative (**23a**) in the reductive *N*(3)-methylation reaction. Our attempts to synthesize dialkylated derivative **25a** by methylation of compound **23a** at the *N*(3) position under the

reductive methylation conditions applied for the transformation of **22a** into **24a**, failed. Similarly, methylation of **23a** with methyl iodide was unsuccessful. Furthermore, *N*(2)-alkylation of compound **22a** with MeI in the presence of KOBu' afforded the corresponding *N*(2)-methyl derivative **23a** only as a minor product. The preparation of compounds **23** was more efficient *via* the NaBH₄/TFA reduction of intermediates **17**. *N*(2)-Methylation of compounds **24** with MeI in the presence of KOBu' in DMF gave reasonable yields of the corresponding *N*(2),*N*(3)-dialkylated products **25a,b,d,e**. Thus, our results suggest that the synthesis of the new *N*(2),*N*(3)-dialkylated 3,4-dihydro-2*H*-1,2,3-benzothiadiazine 1,1-dioxides (**25**, **26**) should pass through intermediates of type **24**.

In conclusion, the variety of the synthetic routes specified above offers a tool to prepare several new 2*H*-1,2,3-benzothiadiazine 1,1-dioxide derivatives by choosing the appropriate method.

β-Karbolinvázás vegyületek szintézise

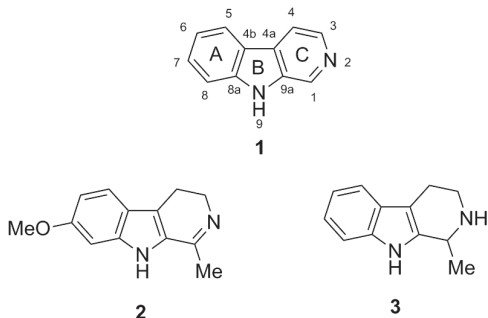
MILEN Mátyás,^{a,*} ÁBRÁNYI-BALOGH Péter^b és VOLK Balázs^a

^aEgis Gyógyszergyár Zrt., Hatóanyagfejlesztési igazgatóság, Keresztúri út 30–38., 1106 Budapest, Magyarország

^bMTA Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet, Gyógyszerkémiai Kutatócsoport, Magyar tudósok körútja 2., 1117 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

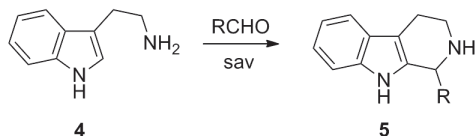
A β-karbolinok a biológiailag aktív természetes és mesterséges vegyületek nagy családját alkotják.¹ Legegyszerűbb képviselőjük a β-karbolin, más néven norharmán (1, 1. ábra), amely főleg növényekben² fordul elő, de kimutatták baktériumok,³ zsákállatok,⁴ tengeri szivacsok⁵ és természetes szervezetében is.⁶ Az alkaloidok között a C-gyűrűben különböző telítettséget mutató β-karbolinok szintén jelentősek. Az egyszerűen telített 1-metil-7-metoxi-3,4-dihidro-β-karbolin (harmalin, 2) a vegyületsalád legrégebben ismert képviselője. 1841-ben izolálta Goebel a gyógynövényként használt szíriai rutafüvből (*Peganum harmala*).⁷ A kétszeresen telített származékokra egyszerű példaként említhető a racém 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro-β-karbolin [(±)-calligonin, 3], amely megtalálható többek között az ezüsthűzben (*Elaeagnus angustifolia*),⁸ illetve kimutatták az évszázadok óta ételízesítőként használt szójaszószban is.⁹



1. Ábra. Egyszerű β-karbolin alkaloidok.

2. β-Karbolinok előállítása

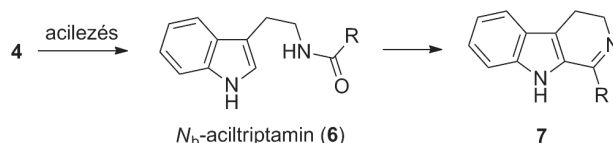
A β-karbolingyűrű kialakítására főleg két régen ismert módszert használnak, melyeknek számos változatát dolgozták ki. Ezek közül az egyik triptamin (4) és aldehidek savkatalizált Pictet-Spengler-reakciója, így 1,2,3,4-tetrahidro-β-karbolinokhoz (5) jutunk (2. ábra).¹⁰



2. Ábra. β-Karbolinok előállítása Pictet-Spengler-reakcióval.

A másik út 3,4-dihidro-β-karbolinok (7) előállítására használható. Ebben az esetben a triptamint (4) először acilezik, majd a gyűrűzárást általában magas hőmérsékleten, toluolban, xilolban, tetralinban forralva végzik foszforoxi-

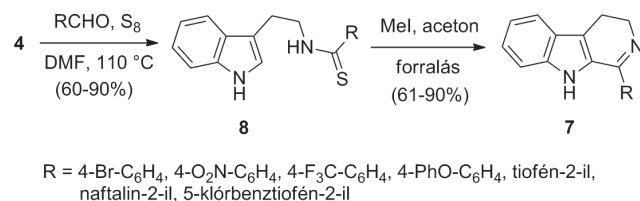
kloriddal (POCl₃), foszfor(V)-oxiddal (P₂O₅) vagy polifoszforsavval (3. ábra).¹¹



3. Ábra. β-Karbolinok előállítása Bischler-Napieralski-reakcióval.

Újabbán más reagensekkel, enyhébb kísérleti körülmények között is sikeresen megvalósították a Bischler-Napieralski-reakciót.¹² Ilyen például az általunk használt propilfoszfonsav-anhidrid (T3P[®]), melynek segítségével jó termeléssel állítottunk elő C-1 szubsztituált 3,4-dihidro-β-karbolinokat (7). A reakciót etil-acetátban triptaminból (4) és a megfelelő karbonsavakból kiindulva mikrohullámú reaktorban együst reakcióban végeztük.¹³

A 3,4-dihidro-β-karbolinok (7) egyszerűen előállíthatóak N_b-tioaciltryptaminokból (8) alkilezőszerek segítségével,¹⁴ így elkerülve a Bischler-Napieralski-reakció sokszor érelyes körülményeit. Kutatócsoportunkban az N_b-tioaciltryptaminok (8) szintézisére a háromkomponensű Willgerodt-Kindler-reakciót alkalmaztuk. Így olcsó alapanyagokból: triptaminból (4), a megfelelő aldehidből és elemi kénből kiindulva állítottuk elő a 8 tioamidokat. Ezt követően a gyűrűzárást acetonban, metil-jodid jelenlétében végeztük el (4. ábra).¹⁵



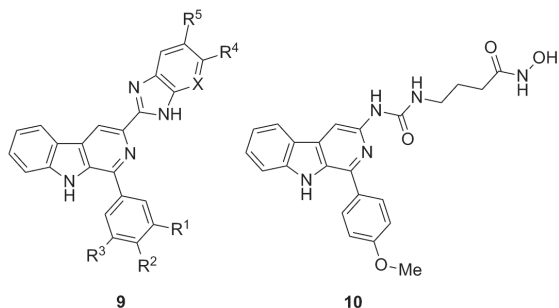
4. Ábra. 3,4-Dihidro-β-karbolinok (7) előállítása N_b-tioaciltryptaminokon (8) keresztül.

3. 1,3-Diszubsztituált egyszerű β-karbolinok

Újabbán jelentős figyelmet kapott az 1,3-diszubsztituált egyszerű β-karbolinok előállítása és biológiai vizsgálata. A 9 és 10 vegyületek rákellenes hatását az elmúlt években fedezték fel (5. ábra).^{16,17}

Az említett vegyületek jelentősége miatt célul tűztük ki olyan β-karbolinok előállítását, amelyek könnyen és változatosan tovább alakíthatóak a hármasképző pozícióban. Az 1-aril-9H-β-karbolin-3-karbaldehidek (11) előállítására egyszerű

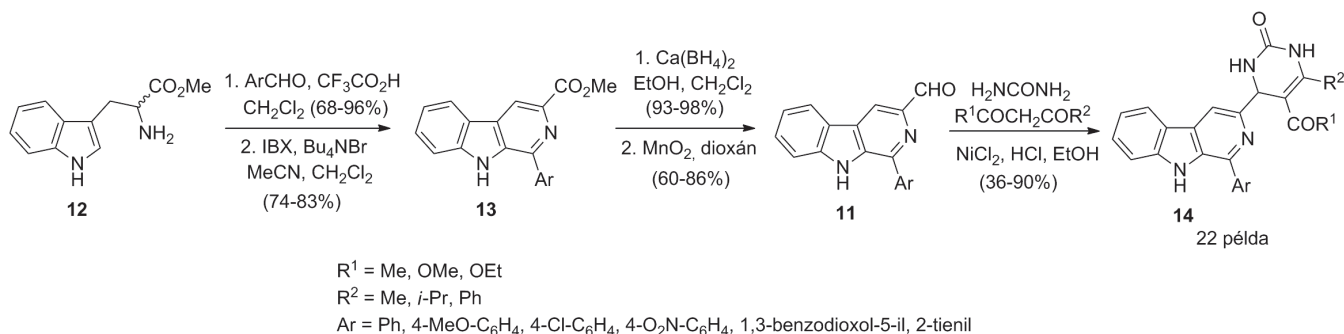
* e-mail: milen.matyas@egis.hu



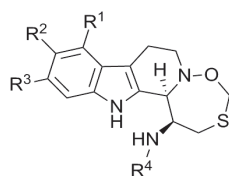
X = C, N
 R¹ = H, F, OMe
 R² = F, OMe, CF₃
 R³ = H, F, OMe
 R⁴ = H, Me, Cl
 R⁵ = H, Me, F, Cl, Br, OMe, CF₃

5. **Ábra.** Rákellenes hatású 1,3-diszubsztituált-β-karbolinok.

szintézist dolgoztunk ki racém triptofán metilészterből (12) kiindulva.¹⁸ Ezt az észtert különböző aromás



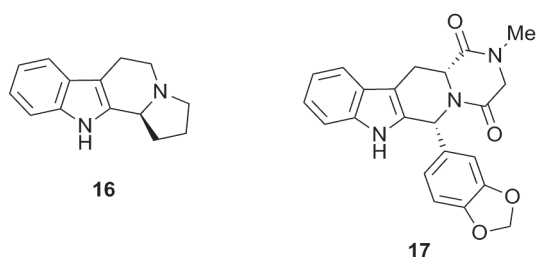
6. **Ábra.** 1-Aril-9*H*-β-karbolin-3-karbaldehidek (11) előállításuk és átalakításuk Biginelli-reakcióval.



15a R¹ = H, R² = OH, R³ = Br, R⁴ = H
 15b R¹ = Br, R² = OH, R³ = H, R⁴ = H
 15c R¹ = H, R² = OH, R³ = Br, R⁴ = Ac
 15d R¹ = H, R² = H, R³ = Br, R⁴ = H
 15e R¹ = H, R² = Br, R³ = H, R⁴ = H

7. **Ábra.** Az érdekes 1,3,7-oxatiazepingyűrűt tartalmazó eudisztomin alkaloidok képlete.

A harmicin (16) optikailag aktív izomerjét a malajziai *Kopsia griffithii* leveléből vonták ki, amely különböző



8. **Ábra.** A természetes harmicin (16) és a gyógyszerként használt tadalafil (17) szerkezete.

aldehidekkel reagáltattuk trifluoecetsavval katalizált Pictet-Spengler-reakcióban. Az így kapott 1,2,3,4-tetrahidro-β-karbolinszármazékok C-gyűrűjét 2-jódoxibenzooesavval (IBX) aromatizáltuk. A következő lépésben a 13 molekula észter csoportját először redukáltuk, majd a képződött alkoholt mangán-dioxiddal aldehiddé (11) oxidáltuk. Az aldehid azért értékes funkciós csoport, mert számos módon tovább alakítható. Példánkban Biginelli-reakcióval a farmakológiai szempontból jelentős dihidropirimidinon gyűrűt kapcsoltuk a β-karbolin vázhoz (6. ábra).

4. Kondenzált tetracyklosus β-karbolinok

Érdekes kiemelni a számos β-karbolinszármazék közül a kondenzált négy gyűrűt tartalmazó karbolinvázis vegyületeket. Ezek közé tartozik az eudisztomin alkaloidok családját képviselő eudisztomin C (15a), E (15b), F (15c), K (15d) és L (15e) (7. ábra). Ezeket a vegyületeket egy tengeri szivacsból (*Eudistoma olivaceum*) nyerték,¹⁹ és igazolták antibakteriális, antivirális és rákellenes hatásukat.²⁰

származékaival együtt szintén többféle biológiai hatást mutat.²¹ Egy másik jelentős kondenzált tetracyklosus β-karbolinszármazékokat, a mesterségesen előállított foszfodiészteráz-5 (PDE5) inhibitor tadalafil (Cialis®, 17) potenciazavarok elleni gyógyszerként alkalmazzák (8. ábra).²²

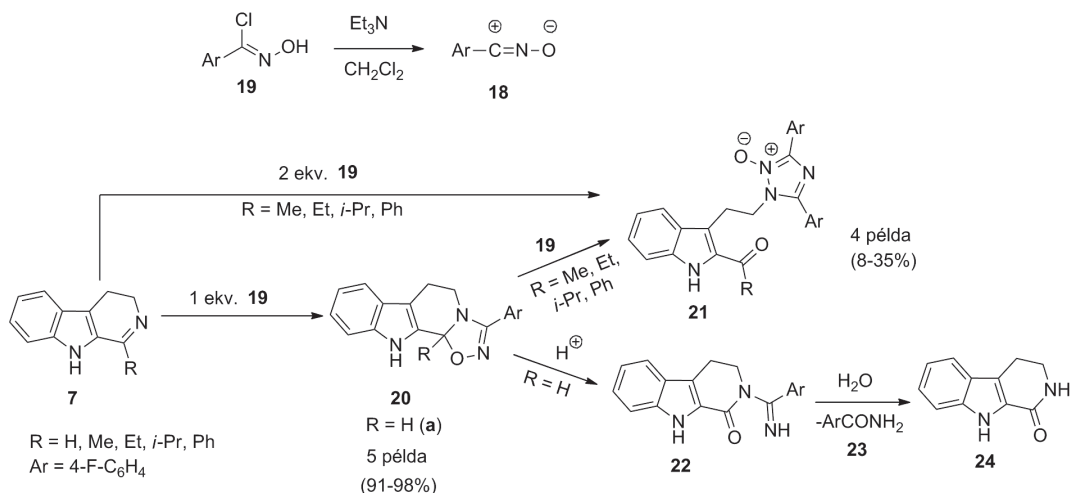
Tovább bővítendő a tetracyklosus β-karbolinszármazékok családját, célul tűztük ki 1,3-dipoláris cikloaddíció, valamint Staudinger-reakció segítségével oxadiazolino-piridoindol és β-laktámmal kondenzált β-karbolinok előállítását.

4.1. Kondenzált tetracyklosus β-karbolinok előállítása 1,3-dipoláris cikloaddícióval és a reakció mechanizmusának vizsgálata

Az oxadiazolin-gyűrűvel kondenzált β-karbolinokat (20) a 7 vegyületekből 4-fluorfenil-nitril oxid (18) alkalmazásával (1,3-dipoláris cikloaddícióval) állítottuk elő (9. ábra).²³ A 18 nitril oxid a reakcióelegyben *in situ* keletkezik 4-fluor-*N*-hidroxi-benzol-karboximidoil-kloridból (19). Egy ekvivalens dipóllal kiváló termeléssel kaptuk a célvegyületeket (20). Azonban két ekvivalens nitril oxid alkalmazásakor az 1-es szénatomon helyettesített 3,4-dihidro-β-karbolinokból (7) melléktermékként triazol-*N*-oxid-származékokat (21) izoláltunk 8–35% mennyiségben. Kísérletileg is igazoltuk, hogy a 21 melléktermék a 20 főtermékből keletkezik egy második reagens molekula addíciójával. Megfigyeltük

továbbá, hogy a helyettesítetlen oxadiazolino-piridindol (**20a**, R = H) DMSO- d_6 , illetve $CDCl_3$ oldatban különböző mértékben ugyan, de izomerizálódik. Igazoltuk, hogy ez az átalakulás savkatalizált gyűrűfelyülés, amelyet vizes közegű feldolgozás vagy tisztítás során az instabil amid-amidin (**22**) hidrolízise követ 4-fluorbenzamiddá (**23**) és 2,3,4,9-tetrahidro-1*H*- β -karbolin-1-onná (**24**).

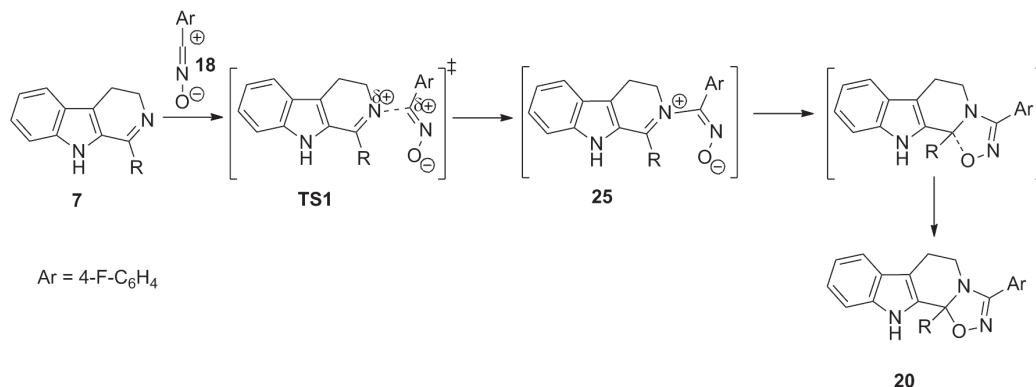
Kvantumkémiai számításokkal feltérképeztük a cikloaddíció és a mellékreakciók, így a kétszeres addíció és a gyűrűfelyülés mechanizmusát.²⁴ A cikloaddíciók esetén a



9. Ábra. 3,4-Dihidro- β -karbolinok (**7**) reakciói 4-fluor-*N*-hidroxi-benzol-karboximidoil-kloriddal (**19**).

A szubsztituálatlan oxadiazolino-piridindol (**20a**) izomerizációs és bomlási reakciója számításaink szerint az oxigén melletti nitrogén atomon történő protonálódással kezdődik (**20a+H⁺**), és az ezt követő proton leadás a C, D gyűrűk anellációs szénatomjáról vezet **26** intermedierhez. Ezután egy intramolekuláris gyűrűfelyülési reakció játszódik le a nitrogén és az oxigén atom között **TS2** átmeneti állapoton keresztül, ami **22** amid-amidinszármazékot eredményez (11. ábra). A **26** köztitermék szokatlanul magas energiátartalmának okát vizsgálva arra a következtetésre

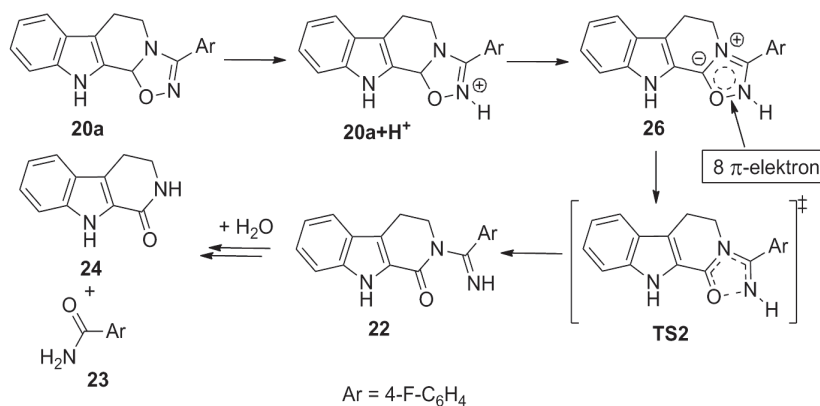
jutottunk, hogy az összefüggésben lehet az oxadiazolgyűrűben létrejövő antiaromás nyolc p-elektron tartalmozó rendszerrel. A $CDCl_3$ -ban nyomokban jelen levő sav valószínűleg a proton transzfer reakció (**20a** \rightarrow **22**) katalizátoraként szolgál, ezért az izomerizáció gyorsabb $CDCl_3$ -ban, mint savmentes oldószerekben. Valószínűnek tartjuk, hogy a savas iniciálás után **20a+H⁺** deprotonálódását egy másik **20a** molekula bázikus nitrogénatomja segíti elő. A savkatalízis igazolására sósavas etil-acetátban oldottuk **20a** vegyületet, amivel jelentősen gyorsítottuk az átalakulást. Savmentes etil-acetátban az izomerizáció nem játszódott le.



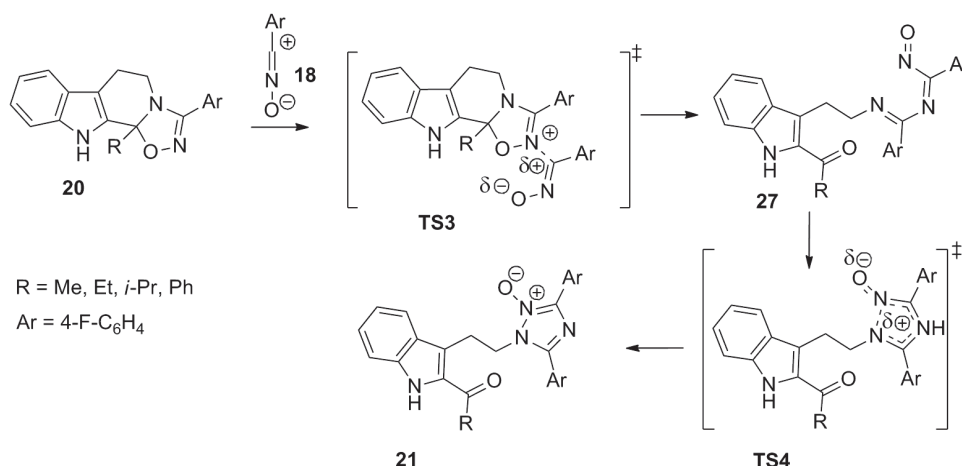
10. Ábra. Az oxazaharmicin-származék kialakulásának javasolt mechanizmusa.

Vizsgáltuk továbbá a kétszeres addukt keletkezésének mechanizmusát, és arra az eredményre jutottunk, hogy a reagens molekula megfelelő orientációja esetén a kiindulási vegyület (**20**) a C-N és N-O kötés egyidejű felhasadásával **TS3** átmeneti állapoton keresztül **27** alacsonyabb

energiatartalmú intermedierre alakul. A következő lépésben a kétszeres addukt (**21**) egy igen alacsony energiájú átmeneti állapotban (**TS4**) keresztül képződik, oly módon, hogy **27** intermedierben az *N*-oxid nitrogén atomja hajt végre támadást a triptamin *N_b*-nitrogénjére (12. ábra).



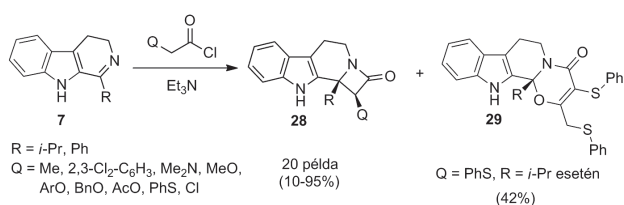
11. Ábra. A 20a vegyület izomerizációjának és bomlásának javasolt mechanizmusa.



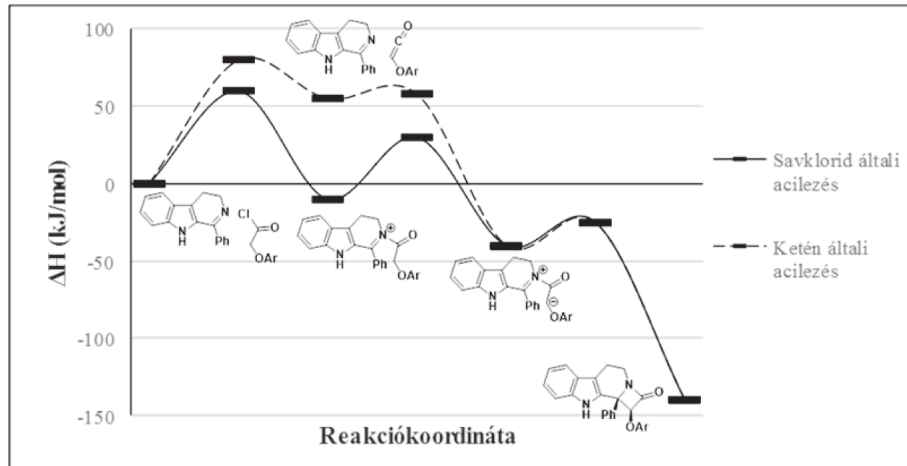
12. Ábra. A kétszeres addukt (21) kialakulásának javasolt mechanizmusa.

4.2. Kondenzált tetraciklusos β -karbolinok előállítása Staudinger-reakcióval és a reakció mechanizmusának vizsgálata

Új, β -laktám szerkezeti részletet tartalmazó kondenzált tetraciklusos β -karbolinok előállítását Staudinger-reakcióval valósítottuk meg (13. ábra).²⁵ Ennek a reakciónak az érdekessége, hogy minden esetben *cis*-szerkezetű laktámokat (28) izoláltunk. *Transz* izomer képződését nem tapasztaltuk, azonban néhány mellékreakciót megfigyeltünk. Ez utóbbiak a β -karbolin C-gyűrűjének felnyílásával, vagy többszörös acilezéssel jártak. Említésre méltó a feniltioacetil-klorid (Q = PhS) reakciója 7 vegyülettel, melynek során két acilcsoport beépülésével járó, Staudinger-reakcióban eddig még nem megfigyelt oxazingyűrűt tartalmazó termék (29) keletkezett.

13. Ábra. 3,4-Dihidro- β -karboliok (7) Staudinger-reakciója.

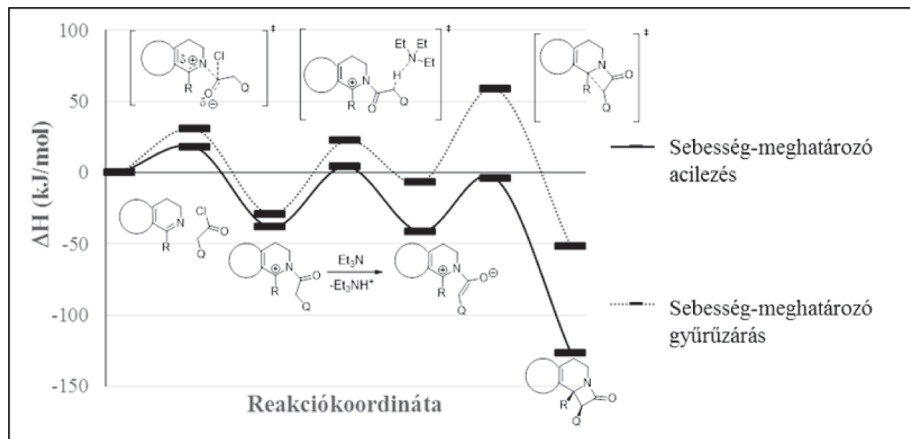
Az általunk végrehajtott Staudinger-reakció mechanizmusát több szempontból vizsgáltuk. Ismert, hogy a reakció első lépése az imin nitrogén atomjának acilezése, amit a gyűrű zárása követ. Az irodalomban általánosan elfogadott, hogy savkloridból kialakuló ketén végzi az acilezést.²⁶ Ezzel ellentétben számításaink azt mutatták, hogy az acilezési lépés energetikailag mintegy 25%-kal (~20 kJ/mol-lal) kedvezőbb, amennyiben azt a savklorid hajtja végre, és ezt nem előzi meg ketén kialakulása (14. ábra). Megfigyeltük továbbá, hogy a savklorid β -helyzetében levő atomok befolyással bírnak mind a reakció termelésére, mind sztereospecifitására. Számításokkal alátámasztottuk és értelmeztük kísérleti eredményeinket (15. ábra). A jobb termeléssel lejáró reakciók minden lépése exoterm, és inkább az elektronszívó szubsztituensekre (így a legtöbb heteroatomra) jellemzők. Ezzel ellentétben az inkább elektronszívó helyettesítők esetén a sebesség-meghatározó lépés legtöbbször a gyűrűzárás, a deprotonálódási lépés endoterm és a hozamok is alacsonyabbak. Sikeresült magyarázatot találnunk a reakció *cis*-szelektivitására, miután az irodalomban korábban leírt sztereoszelektivitást befolyásoló tényezők közül nem tudtuk egyértelműen eldönteni, melyik a meghatározó a mi reakciónkat tekintve. A számítások azt mutatták, hogy egy korábban még nem vizsgált szomszédcsoport közreműködés akadályozza a *transz* termék létrejöttét.



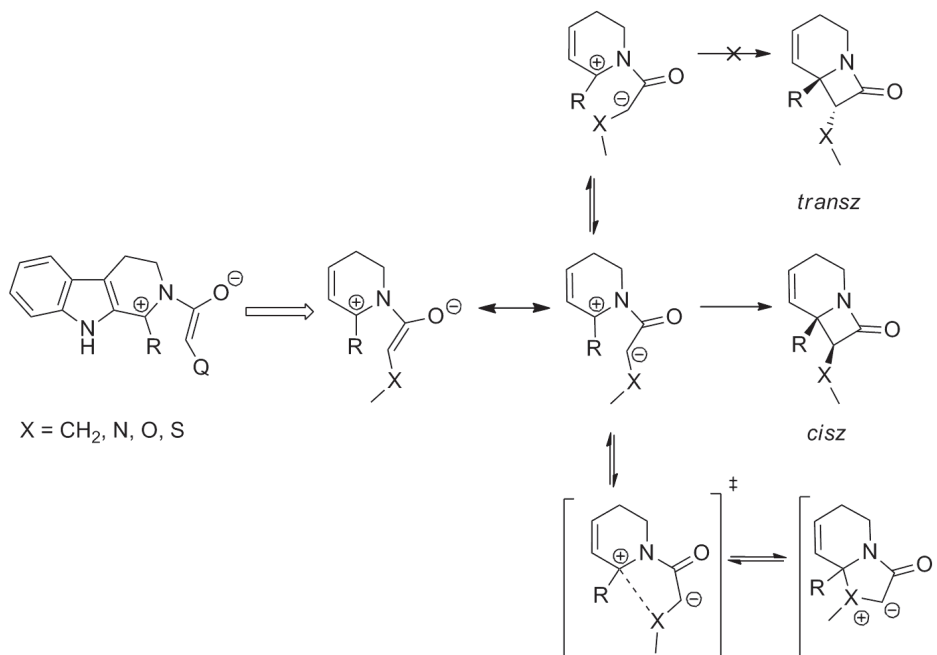
14. Ábra. A savklorid és a ketén acilezése közti energetikai különbség.

Az új hatás alapja, hogy amennyiben a gyűrűzárás előtti intermedier *transz* térállású, az acilcsoport β -helyzetű atomja vagy atomcsoportja koordinálódik a pozitív imin-

szénatomhoz, és így egy ötös gyűrűs szerkezet jön létre. Ez a lépés gátolja a *transz* gyűrűzárást, ám ez egy „zsákutca”, mivel a szerkezet nem stabil és kedvezőtlenebb, mint a *cisz* izomer keletkezése (16. ábra).



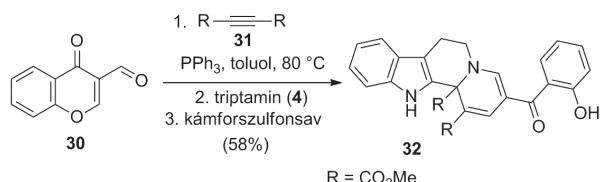
15. Ábra. Az acilcsoport β -helyzetében levő atom/atomcsoport hatása a reakció energetikájára.



16. Ábra. Szomszédcsoporthatása a reakció sztereoselektivitására.

4.3. Kondenzált tetraciklusos β -karbolinok előállítása kaszkád reakcióval

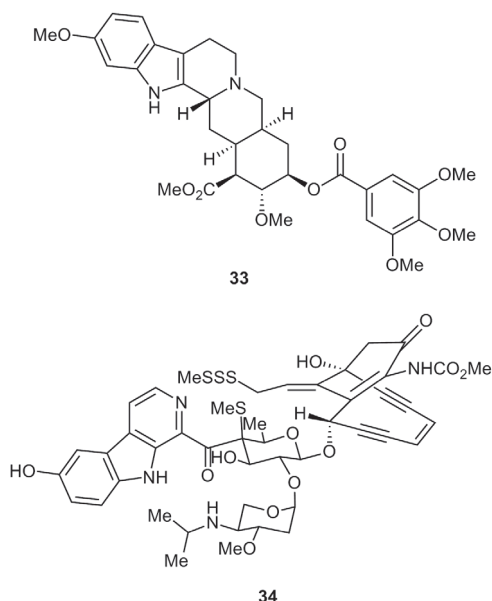
Német kutatók tizenkét egymást követő lépésből álló *one-pot* reakciót fedeztek fel 3-formilkromon (**30**), dimetil-acetiléndikarboxilát (**31**) és triptamin (**4**) között (17. ábra).²⁷ A folyamatban a trifenilfoszfán és a Brønsted-sav katalizátorként vesz részt. Ebben az érdekes, páratlanul hosszú kaszkád reakcióban a **32** β -karbolinvázis vegyülethez jutottak. A reakció kiterjesztésével huszonhat származékot állítottak elő és vizsgálták biológiai hatásukat.



17. Ábra. 1,2,3,4-Tetrahidro- β -karbolinok keletkezése kaszkád reakcióban.

5. Bonyolult szerkezetű, β -karbolingyűrűt tartalmazó vegyületek

A bonyolult összetételű β -karbolinok között találunk jelentős biológiai aktivitást mutató vegyületeket. Ezek közül két érdekes származékot mutatunk be.



18. Ábra. A (-)-reszerpin (**33**) és a shishijimicin A (**34**) szerkezeti képlete.

A (-)-reszerpint (**33**) (18. ábra) Schlitter és munkatársai izolálták az indiai kígyógyökérből (*Rauwolfia serpentina*) 1952-ben.²⁸ Az említett növény kivonatát már régen használták nyugtató és vérnyomáscsökkentő hatása miatt. A (-)-reszerpin (**33**) izolálása után három évvel felderítették a szerkezetét, abszolút konfigurációját.²⁹ 1958-ban pedig Woodward és csoportja beszámolt az első totálszintéziséről,³⁰ amelyet jelenleg is a szintetikus szerves kémia jelentős eredményeként tartanak számon.³¹

A rendkívül erős rákellenes hatást mutató shishijimicin A (**34**, 18. ábra) nevű, β -karbolingyűrűt tartalmazó alkaloidot

2003-ban izoláltak a *Didemnum proliferum* nevű tengeri élőlényből.³² Az első és eddig egyetlen totálszintézisét Nicolaou és munkatársai publikálták 2015-ben.³³

6. Összefoglalás

A β -karbolinok kémiája 1841-ben kezdődött a harmalin (**2**) izolálásával. Azóta a vegyületsalád több egyszerű és bonyolult képviselőjét sikerült megtalálni a természetben. A β -karbolin alkaloidok általában rendelkeznek biológiai hatással, ezért fontos az új származékok előállítása és farmakológiai vizsgálata. Egy ilyen mesterséges vegyület a potenciazavar kezelésére kifejlesztett és gyógyszerként használt tadalafil (Cialis®, **17**). A természetes β -karbolinokat biológiai hatásukon kívül sokszor szerkezetük azonosítása és szintézisük megvalósítása teszi érdekessé. Kutatócsoportunkban új megoldásokat dolgoztunk ki 3,4-dihidro- β -karbolinok szintézisére, továbbá új 1,3-diszubsztituált β -karbolinokat és tetraciklusos származékokat, így oxadiazolin- és β -laktám gyűrűvel kondenzált β -karbolinvázis vegyületeket állítottunk elő.

Hivatkozások

1. a) Love, B. E. *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 1–64. b) Rosillo, M.; González-Gómez, A.; Dominguez, G.; Pérez-Castells, J. *Targets Heterocycl. Syst.* **2008**, *12*, 212–257. c) Ashok, P.; Ganguly, S.; Murugesan, S. *Mini Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1778–1791. d) Laine, A. E.; Lood, C. L.; Koskinen, A. M. P. *Molecules* **2014**, *19*, 1544–1567.
2. a) Poindexter, E. H.; Carpenter, R. D. *Phytochemistry* **1962**, *1*, 215–221. b) Massiot, G.; Therpenier, P.; Jacquier, M.-J.; Men-Oliver, L. L.; Delaude, C. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2873–2876.
3. Zheng, L.; Yan, X.; Han, X.; Chen, H.; Lin, W.; Lee, F. S. C.; Wang, X. *Biotechnol. App. Biochem.* **2006**, *44*, 135–142.
4. Schumacher, R. W.; Davidson, B. S. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 10125–10130.
5. Rao, K. V.; Santarsiero, B. D.; Mesecar, A. D.; Schinazi, R. F.; Tekwani, B. L.; Hamann, M. T. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 823–828.
6. Siderhurst, M. S.; James, D. M.; Rithner, C. D.; Dick, D. L.; Bjostad, L. B. *J. Econ. Entomol.* **2005**, *98*, 1669–1678.
7. Goebel, F. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1841**, *38*, 363–366.
8. Nikolaeva, A. G.; Terent'eva, I. V.; Krivunchuk, P. E.; Prokopenko, A. P. *Chem. Nat. Compd.* **1970**, *6*, 517.
9. Tsuchiya, H.; Sato, M.; Watanabe, I. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4167–4174.
10. a) Cox, E. D.; Cook, J. M. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1797–1842. b) Stöckigt, J.; Antonchick, A. P.; Wu, F.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8538–856.
11. Whaley, W. M.; Govindachari, T. R. *Organic Reactions*, Roger Adams, John Wiley & Sons, INC: New York, 1951; Vol. VI. pp. 74–150.
12. Vaccari, D.; Davoli, P.; Ori, C.; Spaggiari, A.; Prati, F. *Synlett*, **2008**, 2807–2810.
13. Ábrányi-Balogh, P.; Földesi, T.; Grün, A.; Volk, B.; Keglevich, G.; Milen, M. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 1953–1957.
14. Ishida, A.; Nakamura, T.; Irie, K.; Oh-ishi, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 3237–3249.
15. Milen, M.; Slégel, P.; Keglevich, P.; Keglevich, G.; Simig, G.; Volk, B. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 5697–5700.
16. Kamal, A.; Rao, M. P. N.; Swapna, P.; Srinivasulu, V.; Bagul, C.; Shaik, A. B.; Mullagiri, K.; Kovvuri, J.; Reddy, V. S.; Vidyasagar, K.; Nagesh, N. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2370–2387.

17. Ling, Y.; Xu, C.; Luo, L.; Cao, J.; Feng, J.; Xue, Y.; Zhu, Q.; Ju, C.; Li, F.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Ling, X. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9214–9227.
18. Ábrányi-Balogh, P.; Dancsó, A.; Frigyes, D.; Volk, B.; Keglevich, G.; Milen, M. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5711–5719.
19. a) Kobayashi, J.; Harbour, G. C.; Gilmore, J.; Reinhart, K. L. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1526–1528. b) Kinzer, K. F.; Cardellina, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 925–926. c) Reinhart, K. L. Jr.; Kobayashi, J.; Harbour, G. C.; Gilmore, J.; Mascial, M.; Holt, T. G.; Shield, L. S.; Lafargue, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3378–3387.
20. a) Reinhart, K. L.; Kobayashi, J.; Harbour, G. C.; Hughes, R. G.; Mizsak, S. A.; Scahill, T. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1524–1526. b) Lake, R. J.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G. *Austr. J. Chem.* **1989**, *42*, 1201–1206. c) Adesanya, S. A.; Chbani, M.; Païs, M.; Debitus, C. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 525–527. d) McNulty, J.; Still, I. W. J. *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 121–138.
21. a) Kam, T.-S.; Sim, K.-M. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 145–147. b) Chakraborty, I.; Jana, S. *Synthesis* **2013**, *45*, 3325–3331.
22. a) Daugan, A.; Grondin, P.; Ruault, C.; de Gouville, A. C. M.; Coste, H.; Kirilovsky, J.; Hyafil, F.; Labaudiniere, R. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4525–4532. b) Daugan, A.; Grondin, P.; Ruault, C.; de Gouville, A. C. M.; Coste, H.; Linget, J. M.; Kirilovsky, J.; Hyafil, F.; Labaudiniere, R. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4533–4542. c) Zhang, Y.; He, Q.; Ding, H.; Wu, X.; Xie, Y. *Org. Prep. Proc. Int. Ed.* **2005**, *37*, 99–102.
23. a) Milen, M.; Ábrányi-Balogh, P.; Dancsó, A.; Simig, G.; Keglevich, G. *Lett. Org. Chem.* **2010**, *7*, 377–382. b) Ábrányi-Balogh, P. *Periodica Polytech., Chem. Eng.* **2010**, *54*, 47–48.
24. Milen, M.; Ábrányi-Balogh, P.; Mucsi, Z.; Dancsó, A.; Körtvélyesi, T.; Keglevich, G. *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 1811–1825.
25. a) Milen, M.; Ábrányi-Balogh, P.; Mucsi, Z.; Dancsó, A.; Frigyes, D.; Pongó, L.; Keglevich, G. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 1894–1902. b) Ábrányi-Balogh, P.; Mucsi, Z.; Csizmadia, I. G.; Dancsó, A.; Keglevich, G.; Milen, M. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 9682–9694.
26. Fu, N.; Tidwell, T. T. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10465–10496.
27. Dücker, H.; Pries, V.; Khedkar, V.; Menninger, S.; Bruss, H.; Bird, A. W.; Maliga, Z.; Brockmeyer, A.; Janning, P.; Hyman, A.; Grimme, S.; Schürmann, M.; Preut, H.; Hübel, K.; Ziegler, S.; Kumar, K.; Waldmann, H. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 179–184.
28. Müller, J. M.; Schlitter, E.; Bein, H. J. *Experientia* **1952**, *8*, 338.
29. a) Wenkert, E.; Liu, L. H. *Experientia* **1955**, *11*, 302–303. b) Diassi, P. A.; Weisenborn, F. L.; Dylion, C. M.; Winterseiner, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4687–4689. c) van Tاملen, E. E.; Hance, P. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4692–4693.
30. Woodward, R. B.; Bader, F. E.; Bickel, H.; Frey, A. J.; Kierstead, R. W. *Tetrahedron* **1958**, *2*, 1–57.
31. Nicolaou, K. C.; Vourloumis, D.; Winssinger, N.; Baran, P. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 44–122.
32. Oku, N.; Matsunage, S.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2044–2045.
33. Nicolaou, K. C.; Lu, Z.; Li, R.; Woods, J. R.; Sohn, T.-i. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8716–8719.

Synthesis of β -carbolines

The β -carbolines constitute an important class of natural and synthetic compounds displaying interesting biological activities. Among these the vinpocetine, the tadalafil and the abecarnil are current medicines against cerebrovascular disorder, erectile dysfunction and anxiety, respectively. Tetracycles containing a fourth ring condensed to the β -carboline skeleton are also remarkable. The harmicine, the akagerine, the arborescidine-type alkaloids, the canthin derivatives and part of the eudistomins show *inter alia* antibacterial, antiviral or anti-cancer effect.

In this short review we described the best known classical and recently discovered synthetic approaches for the preparation of compounds containing a β -carboline skeleton. In our research group two new methods have been developed and presented. One is a T3P[®]-promoted acylation and subsequent Bischler-Napieralski ring closure as a one-pot synthesis of 3,4-dihydro- β -carbolines from tryptamine and various carboxylic acids. Besides this method, a novel MeI-induced ring closure of thioamides formed from the Willgerodt-Kindler reaction of tryptamine, an aldehyde and elemental sulfur was worked out.

In addition, some examples of 1,3-disubstituted and fused tetracyclic β -carboline derivatives were demonstrated.

The carbaldehyde function has been inserted to the C-3 position of the β -carboline skeleton by a four-step synthesis starting from tryptophan methyl ester. The novel β -carboline-3-carbaldehydes have been used in Biginelli-reaction, attaching the dihydropyrimidinone ring to the carboline ring system.

The formation of oxadiazolino-pyridoindoles and azetopyridoindoles was developed in the [3+2] and [2+2] dipolar cycloaddition of 3,4-dihydro- β -carbolines with a nitrile-oxide or acetyl chloride derivatives.

In the case of the [3+2]-cycloaddition besides the formation of oxadiazolino-pyridoindoles, a novel isomerization and a further

degradation of the isomer so formed was also observed. Using two equivalents of the nitrile oxide in the reaction of 1-substituted- β -carbolines, a triazole-*N*-oxide side product was obtained. We have computed the mechanism of all the reaction steps. From the modelling we found, that the reaction mechanism was not a concerted 1,3-dipolar cycloaddition that is usual for the 1,3-dipoles, but a stepwise or quasi-stepwise ionic addition reaction. Up to the modelling, this theory is supported by the computed inflection points on the energy diagram or the local minima found on the potential energy surfaces. Based on the computations and further experiments the isomerization and degradation was proved to be acid-catalyzed and it was also proved, that the triazole-*N*-oxide derivative was formed in a second addition reaction from the primarily formed oxadiazolino-pyridoindole.

Applying the Staudinger-reaction novel β -lactam-fused carboline derivatives were synthesized. In all cases the products formed showed exclusively *cis* configuration. We managed to identify side reactions responsible for the isolated side products. According to quantum chemical calculations, in the case of these compounds the acylation by the acyl chlorides was more favourable energetically than the *in situ* generation of a ketene. We observed and also confirmed by computations that in the reactions with better yields and in the case of rather electron withdrawing groups the rate-limiting step was the acylation and all the three steps of the reaction proved to be exothermic. On the contrary by the electron donating substituents the rate-limitation appeared in the cyclization and the deprotonating step was endothermic. Up to our computations a novel heteroatom effect was found in the cyclization step, which explains the *cis*-selectivity. This new mechanistic pathway is based on the coordination of the non-bonding lone electron pair of the heteroatom in the β -position of the acyl chloride with the positively charged carbon atom of the imine. This coordination hinders the forming of the *trans* lactam through an unfavourable “dead-end” structure.

Finally, two biologically active representatives of β -carboline, (–)-reserpine and shishijimicin A were mentioned.

A Quality by Design elv folyadékkromatográfiás alkalmazása

KORMÁNY Róbert*

Egis Gyógyszergyár Zrt., Keresztúri út 30-38., 1106 Budapest, Magyarország

Bevezetés

Napjainkra a folyadékkromatográfia számos területen nélkülözhetetlen analitikai módszerré vált. Ez különösen igaz a gyógyszeripar minden ágára, ezen belül az új gyógyszermolekulák kutatására, fejlesztésére, a belőlük nyert termékek előállítására és a minőségbiztosításra is.

Folyadékkromatográfiás vizsgálati módszerek fejlesztése a gyógyszermolekulák (Active Pharmaceutical Ingredient, API) és szennyezőik elválasztására meglehetősen összetett feladat. A feladat bonyolultságát jelzi, hogy egyszerre lehet jelen az API-hoz hasonló és eltérő szerkezetű szennyező és bomlástermék egyaránt. Az egyes komponensek elválasztását biztosító kromatográfiás körülmények meghatározása, amelyet módszerfejlesztésnek nevezünk, sokparaméteres. Ennek az a következménye, hogy nagy idő- és költségráfordítást igényel. A folyadékkromatográfiás töltetek eltérő szelektivitásából következően így is sokszor előfordul, hogy a módszert nem lehet egyik laborból a másikba változtatlan paraméterek mellett átvinni. Külön kiemelő, hogy az eltérő gyártási helyről származó, de a hivatalos besorolás alapján azonos kategóriába tartozó állófázisoknál is problémát jelent a kolonnáról-kolonnára történő adaptálás. Ennek oka, hogy a folyadékkromatográfiában az elválasztás sok paramétertől függ. A szelektivitást, amely döntően befolyásolja az elválasztást, megszabják az állófázis fizikai-kémiai tulajdonságai.

A gyógyszeripari hatóságok elvárásaiban előírás, hogy a gyártásnál és a folyamatok ellenőrzésénél minden olyan paramétert, amely az eredményeket befolyásolja, a tudományos ismeretek alapján előre kell jelezni. Ezt a megközelítést nevezik Quality by Design (QbD) elvnek.^{1,2} Ez vonatkozik a gyártást ellenőrző analitikai eljárásokra is, így a legtöbbet alkalmazott hagyományos nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) és a modernebb ultranagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) módszerekre is.

A QbD alkalmazására a folyadékkromatográfiában az intelligens előrejelző és módszerfejlesztést segítő számítógépes programok alkalmazása szükségszerű. Ezek közül a DryLab egy széleskörűen használható kísérlettervező és módszeroptimalizáló program, melyben háromdimenziós modell segítségével egyszerre tudjuk előrejelezni a legfontosabb kromatográfiás paraméterek hatását a felbontásra.³

Természetesen a DryLab-on kívül rendelkezésre állnak más kísérlettervező és módszeroptimalizáló szoftverek is. Valós méréseken alapuló modellezést tesz még lehetővé a Fusion és az Osiris szoftver vagy az ACD Lab LC szimulátora. A

szoftverek másik nagy csoportja pedig a molekulaszervezet alapján végez előrejelzéseket, pl. ChromSword vagy ACD. Érdekes megközelítés a szelektivitás és felbontás optimalizálása az állófázis oldaláról, erre ad lehetőséget a POPLC szoftvercsomag.

1. QbD alapelvek a folyadékkromatográfiában

A QbD elvű folyadékkromatográfiás módszerfejlesztés alaplépései a következők:⁴

- Pontosan definiálni kell a vizsgálati módszer célját. A folyadékkromatográfiás módszerfejlesztésben a legfontosabb cél a kritikus csúcspár alapvonalas elválasztása. A kritikus csúcspárra leggyakrabban az $R_{S,krit.} > 1,5$ feltételt szabjuk meg, ezt tekintjük alapvonalas elválasztásnak.
- Kockázatelemzés alkalmazása, amely során meghatározzuk, melyik változónak van negatív hatása a módszer alkalmazhatóságára, vagyis melyik mérési paraméter rontja a felbontás értéket a kritikus csúcspárra nézve.
- Annak kísérleti értékelése, hogyan befolyásolják a kritikus változók a módszer alkalmazhatóságát. Ez szisztematikus multifaktoriális módon elvégezhető a kísérletek tervezésével (Design of Experiments, DoE). A kísérletek eredményeként tervezési tér (Design Space, DS) készíthető, amely leírja a paraméterek azon tartományát, melyen belül a módszer kezdetben megszabott céljai teljesülnek.
- Amikor a végső módszer elkészült a fent leírt lépések alapján, egy robusztussági vizsgálatot is el lehet végezni annak becslésére, hogy a módszer céljait (kritikus felbontás) mennyire befolyásolják a megállapított módszer paraméterek beállított eltérései.
- A robusztusság vizsgálat eredményei segítenek, hogy a módszerhez vagy a kritikus elválasztáshoz szabályozó stratégiát alakítsunk ki, ez a QbD elvű módszerfejlesztés következő fontos lépése.
- Mivel az alapkísérletek meg lettek határozva, a beállítások könnyen elvégezhetőek, ha megismételjük a kísérleteket és megkeressük az aktuális DS-t. Normál esetben csak kis eltérések lesznek. A DS-en belül a változók módosítása a szabályozó hatóságok szerint nem minősül „változtatásnak”, ezért a módszert nem kell újrapvalidálni.

2. A DryLab szoftver

30 évvel ezelőtt, 1986-ban DryLab név alatt elindult egy számítógépes folyadékkromatográfiás módszermodellezés⁵, amely kezdetben a retenciók időit (t_R), a retenciók tényező (k) és a kritikus felbontás ($R_{S,krit.}$) egydimenziós számításából

* e-mail: kormany.robort@egis.hu

indult, közben kromatogramokat vizualizálva, negyed századdal később a modell eljutott a három mért és nyolc számított dimenzióig.⁶ A számított dimenziók magukban foglalják az állófázis, a mozgófázis és a készülék legfontosabb paramétereit, úgy mint kolonnahossz és -átmérő, töltet szemcseméret, eluens kiindulási- és végső összetétel, térfogatáramlási sebesség, késleltetési- és kolonnán kívüli térfogat. A szakirodalom ezt a háromdimenziós modellt „cube”-nak, vagyis kockának nevezi. A szoftver a Horváth Csaba és munkatársai által kidolgozott szolvofób elméleten alapszik, mely a víz fontos, retenciót szabályozó szerepét magyarázza fordított fázisú körülmények között.⁷

$$\ln k = A + B\varepsilon + C\gamma + D(\kappa^e - 1)V^{2/3}\gamma + E + \ln(RT/P_0V)$$

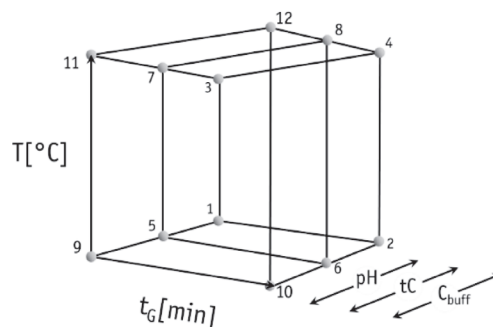
Az egyenletben az A, B, C, D és E kísérletileg meghatározható konstansok, ε az oldószer statikus dielektromos állandója, γ a felületi feszültség, κ^e az energia, amely ahhoz szükséges, hogy a megfelelő üreg kialakuljon a kötőhely felületén, V az oldószer molekulák térfogata, P_0 az atmoszférikus nyomás. Az elmélet szerint, a víz a nagy lipofóbicitású (dibenzantracénnel igazolva C8 tölteten $k_{\text{vizben}} \sim 4000$, $k_{\text{acetonitrilben}} \sim 1$), felületi tenzióját szerves oldószerekkel, pl. metanollal (MeOH) és acetonitrillel (AcN) lehet csökkenteni. Az elmélet szerint nagy energia szükséges ahhoz, hogy az apoláris molekulák oldódjanak a sokkal polárosabb vízben, ezért a visszatartás nagymértékben a víznek köszönhető. Gradiens módszerek esetén csökkentve a felületi tenziót, egyre kisebb energia szükséges a molekulák oldódásához, aminek eredményeként csökken a visszatartás.

2.1. A DryLab kocka

A DryLab kocka felépítése (1. Ábra) a modell alapú kísérlettervezés első szakasza (DoE). A faktorok a gradiens idő (t_G), a hőmérséklet (T), a pH vagy terner mozgófázis összetétel (t_C). Két típusú kocka elkészítésére van lehetőség. A t_G -T-pH kocka protonfunkciós csoportot tartalmazó (savas vagy bázikus karakterű) komponensek elválasztásánál ad fontos információt a komponensek retenciójának t_G , T és pH függésére, míg a t_G -T- t_C kockával a terner elegy szelektivitást befolyásoló hatását vizsgálhatjuk a t_G és T mellett.

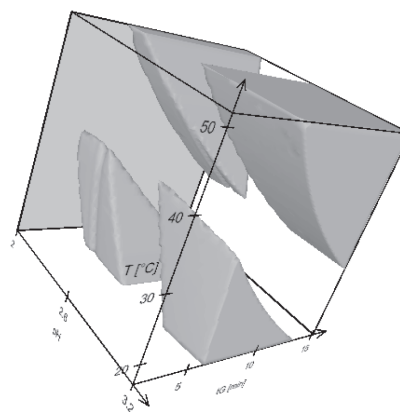
A t_G -t és T-t elegendő két szinten vizsgálni, mert feltételezzük a lineáris kapcsolatot, a pH és t_C esetében három szint kijelölése szükséges. Így alakul ki a kockánkenti 12 kísérlet. A kísérletek kiértékelt kromatogramjait átvisszük egy elektronikus exportáló file típusba, amelyet a DryLab program be tud olvasni. Ezt követi a megfelelő kromatográfiás csúcsok egymáshoz való illesztése, amelyet legkönnyebben a csúcsterületek alapján tudunk megtenni.⁸

Az 1. Ábrán lévő körök a kocka sarkain, illetve élein jelzik a mérési pontokat. Az 1, 5, 9, 3, 7 és 11 pontok tartoznak a rövid, míg a 2, 6, 10, 4, 8 és 12 pontok a hosszú gradiens időhöz (t_G -hez). A három különböző pH-jú vagy terner összetételű (t_C) mozgófázishoz három különböző, ún. t_G -T-sík tartozik. Az azonos pH-hoz/ t_C -hez tartozó t_G -T-síkok a következők: 1-2-3-4, 5-6-7-8 és 9-10-11-12. A szoftver a három mért t_G -T-sík mellé kiszámít további 97-et, ami által a kocka teljessé válik és megkapjuk a 2. ábrán látható felbontási térképet (Resolution Map).



1. Ábra. A kocka modelljének felépítése, ahol az egyes pontok az alakromatogramokat szimbolizálják.

A kockában minden pont reprezentál egy kromatogramot (kockánként nagyságrendileg 10^6 pont képzelhető el). Miután minden egyes kromatogram különböző komponens retenció mutat, így a kockával a szelektivitás változásokat kitűnően lehet tanulmányozni.



2. Ábra. DryLab kocka az $R_{S,krit.} > 1,5$ tartományokkal.

A QbD nevezéktanának megfelelően az egész kocka a tudástér (Knowledge Space, KS), ahol információink van a különböző faktorok hatásairól. A kockában lévő szabálytalan alakzatok jelölik azokat a paraméter tartományokat (Design Space, DS), ahol a kiindulási feltételeknek megfelelő értéket kapunk a kritikus csúcspár felbontására. Az alakzatok szélei a módszer alkalmazhatóságának alsó határai (Method Operable Design Region, MODR), ahol ugyan még teljesülnek a megfelelőségi kritériumok, de már nagy valószínűséggel nem lesz robusztus a rendszer.

A gyakorlatban úgy határozzuk meg a mérési paramétereket, hogy a legkevésbé visszatartott komponensnek is legyen megfelelő retenciója, illetve a leginkább visszatartott komponens is eluálódjon mind a 12 kísérletben. Ezeket a feltételeket úgy tudjuk meghatározni, hogy kiválasztjuk az alacsonyabb hőmérsékletet és itt végzünk néhány kísérletet.

Amennyiben harmadik dimenzióként a pH-t választottuk, célszerű az alacsonyabb és magasabb pH-n is elvégezni ugyanazokat a kísérleteket, mert a komponensek protonáltsági/deprotonáltsági viszonyai nagymértékben befolyásolják a retenciót. Előfordulhat, hogy egy bázikus csoportot tartalmazó molekulának magasabb pH-n még megvan a megfelelő visszatartása, de a pH csökkentésével

megnövekszik az ionizáltsági foka és csökken a retenciója, vagyis már nem teljesíti azt. Fordított értelemben ugyanez mondható el savas csoportot tartalmazó molekuláról, vagyis a pH növelésével növekszik az ionizáltsági fok és csökken a retenció. A fenti szabályokat alkalmazhatjuk az utolsóként eluálódó komponensre is, vagyis úgy válasszuk meg a pH-t és a gradiens összetételét, hogy az összes komponens eluálódjon. Amennyiben kiválasztottuk a kiindulási pontot (1. Ábra, 1-es pont), akkor néhány egyszerű szabály betartásával könnyen meghatározhatjuk a többi kísérleti pontot is.

Első szabály: a hosszabb t_G maximum háromszorosa legyen a rövidebb t_G -nek és ugyanazzal a mozgófázis összetétellel kezdődjön és érjen véget.

Második szabály: A két hőmérséklet között ne legyen 30°C -nál nagyobb különbség.

Harmadik szabály: a $\Delta\text{pH} \leq 0,6$ legyen.

Hasonlóan kell eljárni, ha harmadik dimenziókat a terner összetételt (t_G) választjuk. Itt az előkísérletek során a pH helyett a szerves módosítóra kell helyezni a hangsúlyt. A megfelelő visszatartás teljesülését az AcN-t tartalmazó rendszerben kell biztosítani, mivel az AcN erősebb eluens, mint a MeOH, vagyis a komponensek korábban eluálódnak. Ugyanezen okok miatt a gradiens idejét és meredekségét a MeOH-t tartalmazó rendszerben kell meghatározni.

2.2. t_G -T- t_G modell

Sok esetben a terner mozgófázis összetétel eltérő szelektivitást eredményez a folyadékkromatográfiában, mintha külön-külön alkalmaznánk a módosítókat. Tipikus terner mozgófázis a víz/puffer-AcN-MeOH különböző arányú elegye, de sok esetben segíthet kis mennyiségű tetrahydrofurán vagy izopropil-alkohol hozzáadása is a víz/puffer-AcN vagy víz/puffer-MeOH tartalmú elegyekhez, hogy megváltoztassuk a szelektivitást.

Az első DryLab kocka is terner mozgófázis összetétel optimalizálására született meg, ahol a t_G és T tengelyek mellett egy harmadik, ún. terner koncentrációs tengelyt (t_G) vezettek be, amely a szerves eluent variálta, amennyiben AcN és MeOH között keverékeket mért, illetve ábrázolt. Ez azt jelenti, hogy a puffer pH-ja („A” eluens) állandó marad, ugyanakkor a szerves rész („B” eluens) összetételét változtatjuk.⁹

Az alaptervek kivitelezésénél célszerű úgy eljárni, hogy az első t_G -T síkhoz (1. Ábra 1, 2, 3 és 4 pontok) tartozó méréseknél AcN-t, a második t_G -T síkhoz (1. Ábra 5, 6, 7, és 8 pontok) tartozó méréseknél AcN/MeOH=50/50(v/v) arányú elegyét, a harmadik t_G -T síkhoz (1. Ábra 9, 10, 11 és 12 pontok) tartozó méréseknél pedig MeOH-t választunk szerves módosító oldószernek.

2.3. t_G -T-pH modell

A t_G -T-pH elnevezés egy másik fajta kockára utal, amikor a gradiens idő (t_G) és a hőmérséklet (T) mellett a pH értékek (mint alternatívák a t_G -hez) optimalizálása történik.¹⁰ A t_G , illetve a szerves módosító (%B) hatása a

fordított fázisú folyadékkromatográfiában hatalmas. A víz eluensben lévő mennyiségének van a legnagyobb befolyása a szelektivitásra, illetve az egyes anyagok retenciójára. Amennyiben a vizsgálandó anyagok valamelyike rendelkezik protonfunkciós csoporttal (savas vagy bázikus karakterrel), akkor a mozgófázis pH-ját állandó értéken kell tartani, hogy a molekuláris formák egyensúlya és ezáltal a retenció idő ne változzon. Ezt a pH állandóságot tudjuk biztosítani megfelelő puffer oldatok alkalmazásával. A szelektivitás változtatása szempontjából viszont jól tudjuk használni ezt a paramétert, hiszen ha a protonfunkciós csoporttal rendelkező anyag $\text{pK}_a \pm 2$ értéke körül állítjuk be a pH-t, akkor a retenció pH-függő lesz. Ezáltal a szelektivitás és a felbontás szabályozható, a pH által pontosan beállítható lesz. Fontos megemlíteni, hogy minél nagyobb arányban van jelen az ionvisszaszorított molekuláris forma, annál nagyobb retenciót várhatunk.

2.4. Robusztusság vizsgálat

A robusztusság vizsgálat a módszervalidálás része, amely arra ad választ, hogy a módszer paramétereinek kismértékű, tudatos megváltoztatása mennyiben befolyásolja a mérési eredményeket, hogyan változik a szelektivitás és a felbontás. Ha az eredményekre a változtatás nincs vagy csak alig van hatással, azt mondjuk, hogy a módszer robusztus.

Az alkalmazott módszertől függ, hogy melyik kromatográfiás paramétert változtassuk. Változtatható kromatográfiás paraméterek lehetnek például: pH, puffer koncentráció, oszlop hőmérséklet, eluens összetétel, áramlási sebesség, illetve gradiens módszer esetén a gradiens ideje és meredeksége. Ennek a módszernek nagy hátránya, hogy időigényes és a különböző faktorok egymásra gyakorolt hatását nem tudjuk vizsgálni.

A DryLab szoftver legújabb verziója (DryLab4) lehetővé teszi a tervezett módszer szimulált robusztusság vizsgálatát, ahol a gradiens elúcióban leggyakrabban alkalmazott körülmények hatásait lehet modellezni. Ezek lehetnek a t_G , T, pH vagy t_G , térfogat-áramlási sebesség, induló és végső mozgófázis összetétel. A szoftver robusztusság vizsgáló modulja a hat mérési paramétert három szinten (-1, 0, +1) vizsgálja és kombinálja azokat, vagyis 3^6 teljes faktoros terv szimulációját végzi el, ez 729 szimulált kromatogramot eredményez.¹¹

A szimulált robusztusság vizsgálat megbízható, emellett gyorsabb és sokkal több információval szolgál, mint a hagyományosan alkalmazott, egyszerre egy faktor változtatásával mért módszer. A gyorsaság mellett előnye, hogy igyelembe veszi a kromatográfiás paraméterek egymásra gyakorolt hatását.

3. Esettanulmány

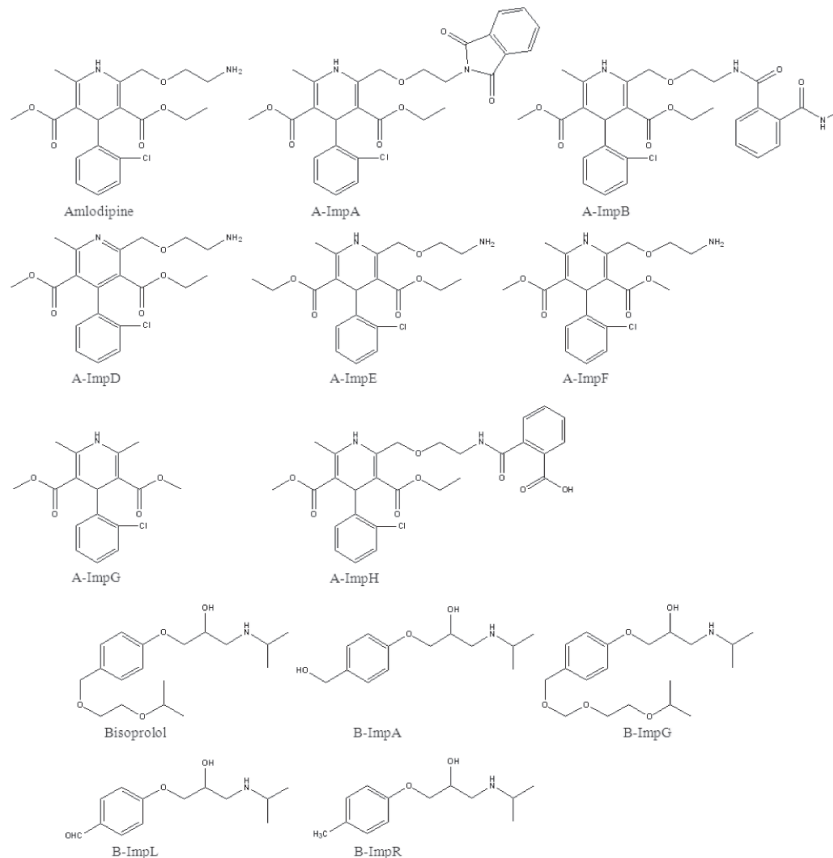
3.1. Modellvegyületek

Ebben az esettanulmányban konkrét mérésekkel bizonyítjuk a DryLab kísérlettervező és módszeroptimalizáló szoftver gyakorlati alkalmazhatóságát, illetve, hogy mennyire megbízhatóak az általa számított és modellezett eredmények.¹²

A kísérletekhez az amlodipin-bisoprolol hatóanyag kombináció és azok Európai Gyógyszerkönyvi (Ph.Eur.) szennyezői (3. Ábra) lettek kiválasztva.

Az amlodipin ún. lassú kalcium-csatorna blokkoló, míg a bisoprolol a béta-blokkolók csoportjába tartozik. Az amlodipin-bisoprolol kombináció napi alkalmazását II-es stádiumú esszenciális hipertóniában hatásosnak,

biztonságosnak és jól tolerálhatónak tekintik. A kombinációban szereplő mindkét gyógyszert egyébként önmagában is használják. A kombinációban vérnyomás csökkentő hatásaik összeadódnak. A fix dózisos kombinációs tabletták adását az indokolja, hogy így el lehet kerülni azokat a bonyolult gyógyszeradagolási sémákat, melyeket a betegek nem képesek követni. Az amlodipin-bezilát és a bisoprolol-fumarát fix kombinációját Concor AMLO néven hozzák forgalomba.¹³



3. Ábra. Az esettanulmányban szereplő molekulák szerkezeti képletei.

Kromatográfias szempontból persze sokkal inkább fontos a molekulák szerkezete, mint az élettani funkciója. A vizsgált molekulák között található szerkezetileg nagyon hasonló (pl. amlodipin és A-ImpE) és nagyon eltérő (pl. A-ImpA és B-ImpA). A modellvegyületek mindegyike tartalmaz protonfunkciós csoportot. Ez azt jelenti, hogy a molekuláris formák arányát állandó értéken kell tartani, hogy a retenciójuk ne változzon, vagyis pH kontroll alkalmazása szükséges.

A bisoprolol¹⁴ és szennyezői poláris molekulák, folyadékkromatográfias vizsgálatuknál magas víztartalmú induló mozgófázis összetétel szükséges ahhoz, hogy meglegyen a megfelelő retenció a legkevésbé visszatartott komponensre (B-ImpA) nézve is. A molekulák szekunder amino csoportot tartalmaznak ($pK_a > 10$), vagyis fordított fázisú körülmények között ionizált formában vizsgálhatóak. A bisoprolol-fumarátban jelenlévő fumársav a karboxil csoportban jelenlévő kettős kötések miatt szintén jelet ad a kromatográfias rendszerben, illetve van megfelelő visszatartása is, ezért ezt is szelektíven el kell választani

a többi szennyezőtől. A molekula két karboxil csoportot tartalmaz, ami miatt savas karakterű ($pK_{a1} = 3,03$, $pK_{a2} = 4,44$), így fordított fázisú körülmények között a teljesen ionvisszaszorított formától a teljesen ionizált formáig vizsgálható.

Az amlodipin¹⁵ és szennyezői kevésbé polárisak, az A-ImpA szennyező pedig kifejezetten apoláris jellegű, ezért folyadékkromatográfias vizsgálatuknál magas szerves oldószer tartalmú végső mozgófázis összetétel szükséges ahhoz, hogy a legjobban visszatartott komponens is eluálódjon az elemzés során. Az amlodipin, az A-ImpD, az A-ImpE és az A-ImpF szerkezetileg nagyon hasonlítanak egymásra, további közös tulajdonságuk, hogy primer amino csoportot tartalmaznak ($pK_a > 10$), vagyis fordított fázisú körülmények között ionizált formában vizsgálhatóak. Az A-ImpH komponens az aromás rendszerhez kapcsolódó szabad karboxil csoport miatt savas karakterű ($pK_a \sim 4$), ezáltal fordított fázisú körülmények között a teljesen ionvisszaszorított formától a teljesen ionizált formáig vizsgálható.

3.2. A kromatográfiai rendszer

A minta 10 µg/mL koncentrációban tartalmazta az elválasztani kívánt komponenseket.

A mérések kivitelezéséhez bináris pumparendszerrel rendelkező ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfot (Acquity UPLC) és 50×2,1 mm Acquity CSH C18, 1,7 µm állófázist használtunk. A teljesen porózus szemcsés állófázis hibrid szilikából épül fel és pozitív felületi töltéssel rendelkezik. A felület C18-as alkil láncsal és utószilanizálással módosított. A gyártó elsősorban bázikus vegyületek elválasztásához ajánlja ezt a típusú töltetet.

A mozgófázis „A” komponense 30 mM-os Na-foszfát puffert tartalmazott, melynek pH-ját 2,0 és 3,2 közé állítottuk be. Alacsony pH-n az állófázis szabad szilanol csoportjai ionvisszaszorított állapotban vannak, így nem alakul ki erős kölcsönhatás a bázikus csoportot tartalmazó molekulák és az állófázis felülete között, ami szimmetrikus csúcsokat eredményez.

A mozgófázis „B” komponense acetonitril volt, mely a vízzel dipól-dipól kölcsönhatásra képes, így a biner elegy viszkozitása az összetétel függvényében lapos görbe mentén alakul, vagyis nyomásesés szempontjából kedvezőbb, mint a víz-alkohol elegyek.

A módszerfejlesztés során sokkal egyszerűbben lehet dolgozni, ha a mozgófázis „B” komponense nem tartalmaz semmilyen adalékanyagot. Igaz, ilyenkor az oldószer gradiens mellett kialakul egy koncentráció gradiens is, de mérési tapasztalatok szerint ennek nincs befolyása az elválasztás minőségére.¹⁶ A fejlesztett módszerek nagyon jól reprodukálhatók. Előnye, hogy az eluens gyorsan elkészíthető, az „A” önmagában nem minősül veszélyes hulladéknak, a „B” más mérésekhez is felhasználható.

A mozgófázis térfogat-áramlási sebessége 0,5 mL/perc, az injektálási térfogat 1 µL, a detektálás hullámhossza 230 nm volt.

3.3. Kísérlet tervezése és kivitelezése

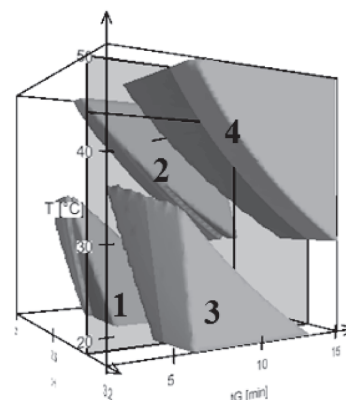
Az összes komponenst tartalmazó mintaoldatot injektálva, a 3.1. pontban leírtak alapján lett felépítve a kocka, amihez az egyes mérési pontokhoz tartozó paramétereket az 1. Táblázat tartalmazza.

A 4. Ábrán látható a kész kocka. Mivel nem teljes a kocka, nem felel meg minden körülmény az elválasztásnak, vagyis vannak olyan paraméter (t_G -T-pH) kombinációk, ahol nem teljesül a korábban megfogalmazott $R_{S,krit.} > 1,5$ feltétel a kritikus csúcsparra. A 4. Ábrán négy olyan tartományt találunk, ahol kijelölhetjük a mérés paramétereit, vagyis meghatározhatjuk a munkapontot. Az 1-es és 2-es tartományok alkalmasak lehetnek a mérés kivitelezésére, de pH~2 körül az állófázis élettartama rövidebb az alkil láncok hidrolízise miatt. A 3-as tartomány szintén megfelelő lenne a munkapont kijelöléséhez, viszont a kritikus csúcsparhoz tartozó felbontás nagyobb a 4-es tartományban, így a munkapont kijelölésére a 4-es tartományban került sor. A munkapont kijelölésének szempontja volt, hogy az elemzési idő rövid legyen, és az távol legyen az MODR-től.

1. Táblázat. DryLab mérési paraméterek

Mérési pont	t_G (perc) 10%B→90%B	T (°C)	pH
1	3,0	20	2,0
2	9,0	20	2,0
3	3,0	50	2,0
4	9,0	50	2,0
5	3,0	20	2,6
6	9,0	20	2,6
7	3,0	50	2,6
8	9,0	50	2,6
9	3,0	20	3,2
10	9,0	20	3,2
11	3,0	50	3,2
12	9,0	50	3,2

A 4. Ábrán látható a kész kocka. Mivel nem teljes a kocka, nem felel meg minden körülmény az elválasztásnak, vagyis vannak olyan paraméter (t_G -T-pH) kombinációk, ahol nem teljesül a korábban megfogalmazott $R_{S,krit.} > 1,5$ feltétel a kritikus csúcsparra. A 4. Ábrán négy olyan tartományt találunk, ahol kijelölhetjük a mérés paramétereit, vagyis meghatározhatjuk a munkapontot. Az 1-es és 2-es tartományok alkalmasak lehetnek a mérés kivitelezésére, de pH~2 körül az állófázis élettartama rövidebb az alkil láncok hidrolízise miatt. A 3-as tartomány szintén megfelelő lenne a munkapont kijelöléséhez, viszont a kritikus csúcsparhoz tartozó felbontás nagyobb a 4-es tartományban, így a munkapont kijelölésére a 4-es tartományban került sor. A munkapont kijelölésének szempontja volt, hogy az elemzési idő rövid legyen, és az távol legyen az MODR-től.



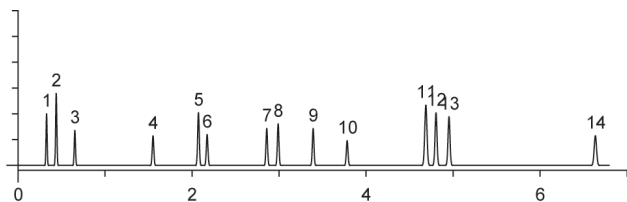
4. Ábra. DryLab kocka a munkaponttal.

A munkapont koordinátái a következők: $t_G=10$ perc (10%B→90%B), T=45 °C, pH=3,0.

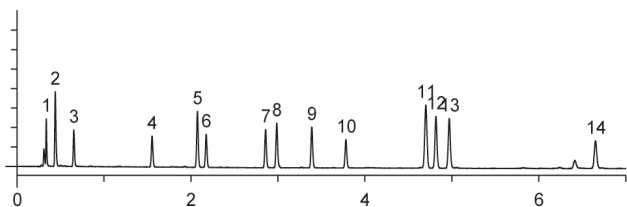
A kiindulási kísérleteknél 3 és 9 perces alapkísérletek szerepeltek, de a szoftver megbízható extrapolációja miatt a 10 perces t_G -nél is tudunk dolgozni. Az így kapott gradiens meredekség értéke 8 %B/perc. A munkaponthoz tartozó szimulált kromatogramból (5. Ábra) megállapítható, hogy

az elemzéshez szükséges idő 7 perc. Ez azt jelenti, hogy nem kell megvárni a 10 perces elemzési időt 90 %B-ig, elég, ha 10 %B-ról indulunk és hozzáadjuk a 7 perc*8 %B/perc=56 %B eluens összetételt.

Az ilyen körülmények között elvégzett szimuláció és a mért kromatogram jó egyezést mutatnak egymással (5. és 6. Ábra). A szimulált és mért felbontás értékek is nagyon hasonlóak. A számszerű értékeket a 2. Táblázat tartalmazza.



5. Ábra. Szimulált kromatogram. Retenciós sorrend: fumársav, B-ImpA, B-ImpL, B-ImpR, bisoprolol, B-ImpG, A-ImpD, A-ImpF, amlodipin, A-ImpE, A-ImpG, A-ImpB, A-ImpH, A-ImpH



6. Ábra. Mért kromatogram. Retenciós sorrend: fumársav, B-ImpA, B-ImpL, B-ImpR, bisoprolol, B-ImpG, A-ImpD, A-ImpF, amlodipin, A-ImpE, A-ImpG, A-ImpB, A-ImpH, A-ImpH

2. Táblázat. A munkapont szimulált és mért t_R és R_S értékei

	Szimulált t_R (perc)	Mért t_R (perc)	t_R különbség (perc) ($t_{R, \text{mért}} - t_{R, \text{szimulált}}$)	Szimulált R_S	Mért R_S
Fumársav	0,33	0,34	0,01		
B-ImpA	0,44	0,44	0,00	4,45	4,91
B-ImpL	0,65	0,65	0,00	8,06	8,34
B-ImpR	1,55	1,55	0,00	29,63	30,53
Bisoprolol	2,07	2,07	0,00	15,31	15,75
B-ImpG	2,17	2,18	0,01	2,96	3,01
A-ImpD	2,86	2,86	0,00	20,30	20,13
A-ImpF	2,99	2,99	0,00	3,86	3,70
Amlodipin	3,39	3,39	0,00	11,90	11,35
A-ImpE	3,78	3,78	0,00	11,24	10,73
A-ImpG	4,69	4,70	0,01	21,72	21,49
A-ImpB	4,80	4,82	0,02	2,55	2,52
A-ImpH	4,95	4,97	0,02	3,48	3,47
A-ImpA	6,63	6,65	0,02	36,09	34,54

3.4. Szimulált robusztusság vizsgálat

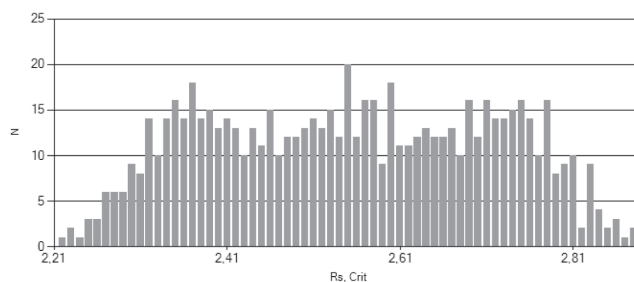
A fejlesztett módszer szimulált robusztusság vizsgálatának elvégzéséhez be kell állítani az elválasztást befolyásoló paraméterek tolerancia szintjét, vagyis hogy mennyi eltérést engedünk meg az eredeti módszerhez képest. Egyszerre hat változó hatását tudjuk vizsgálni (3. Táblázat), vagyis a szoftver 3^6 teljes faktoros terv szimulációját végzi el. A gyakorlatban a megengedett eltéréseket az elemzés megbízhatóságához érdemes igazítani.

3. Táblázat. Kromatográfias paraméterek és megengedett eltéréseik

Paraméterek	Értékek	\pm Eltérés
t_G (perc)	10,0	$\pm 0,1$
T (°C)	45	± 1
pH	3,0	$\pm 0,1$
Áramlási sebesség (mL/perc)	0,500	$\pm 0,005$
Induló %B	10,0	$\pm 0,5$
Végző %B	90,0	$\pm 0,5$

A 7. Ábrán látható az összes, $3^6=729$ db szimuláció $R_{S, \text{krit}}$ értékeinek eloszlása a felbontás függvényében. Az ábráról leolvasható, hogy minden kísérlet teljesíti a korábban megfogalmazott $R_{S, \text{krit}} > 1,5$ feltételt ($R_{S, \text{krit, min}} = 2,21$, $R_{S, \text{krit, max}} = 2,88$).

A szimulált robusztusság vizsgálat előnye a gyorsaság mellett, hogy figyelembe veszi a paraméterek egymásra gyakorolt hatását. A modell pontosságának igazolásához lehetetlen mind a 729 kísérletet elvégezni, ezért négy jellegzetes pont lett kiválasztva a szimulált eredmények pontosságának ellenőrzéséhez.



7. Ábra. A 729 mérés $R_{S, \text{krit}}$ eloszlása, egy ■ jelképez egy mérési paraméterhez tartozó $R_{S, \text{krit}}$ értéket.

Első mérési pont: az eredeti mérési paraméterek, ami a munkapontnak felel meg (Eredeti módszer). Ezek az eredmények a 2. Táblázatban is szerepelnek.

Második mérési pont: a legkisebb $R_{S, \text{krit}}$ értékhez tartozó paraméterek (Minimum $R_{S, \text{krit}}$.)

Harmadik mérési pont: a -1 -hez tartozó paraméterek (Alacsony paraméterek), a paraméterek csak negatív irányba térnek el.

Negyedik mérési pont: a $+1$ -hez tartozó paraméterek (Magas paraméterek), a paraméterek csak pozitív irányba térnek el.

Mind a négy pont mérési paramétereit tartalmazza az 5. Táblázat.

4. Táblázat. Mérési pontok a szimuláció jóságának megítéléséhez

Paraméterek	Eredeti módszer	Minimum $R_{S,krit}$	Alacsony paraméterek	Magas paraméterek
t_G (perc)	10,0	9,9	9,9	10,1
T (°C)	45	44	44	46
pH	3,0	3,1	2,9	3,1
Áramlási sebesség (mL/perc)	0,500	0,495	0,495	0,505
Induló %B	10,0	9,5	9,5	10,5
Végső %B	90,0	90,5	89,5	90,5

Az 5. Táblázat tartalmazza a robusztusság vizsgálat során kapott szimulált és mért t_R és $R_{S,krit}$ értékeket. A retenciók közötti különbség gyakorlatilag elhanyagolható, a legnagyobb eltérés 0,03 perc. A kritikus felbontás értéke

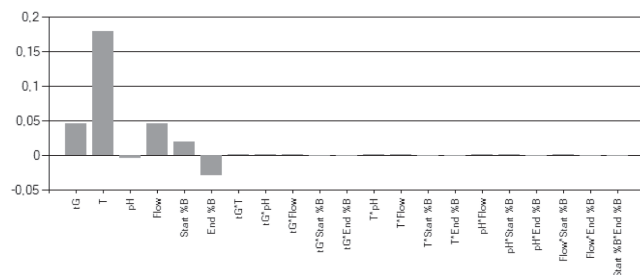
5. Táblázat. Az eredeti és robusztus paramétereken végzett kísérletek t_R és $R_{S,krit}$ szimulált és mért értékei

	Eredeti módszer		Minimum $R_{S,krit}$		Alacsony paraméterek		Magas paraméterek	
	Szimulált t_R (perc)	Mért t_R (perc)	Szimulált t_R (perc)	Mért t_R (perc)	Szimulált t_R (perc)	Mért t_R (perc)	Szimulált t_R (perc)	Mért t_R (perc)
F.sav	0,33	0,34	0,33	0,34	0,36	0,35	0,30	0,30
B-ImpA	0,44	0,44	0,48	0,48	0,47	0,46	0,41	0,43
B-ImpL	0,65	0,65	0,72	0,71	0,70	0,68	0,60	0,63
B-ImpR	1,55	1,55	1,63	1,63	1,59	1,60	1,51	1,52
Bisop.	2,07	2,07	2,15	2,14	2,11	2,11	2,02	2,04
B-ImpG	2,17	2,18	2,25	2,24	2,21	2,21	2,12	2,14
A-ImpD	2,86	2,86	2,93	2,92	2,89	2,89	2,81	2,82
A-ImpF	2,99	2,99	3,05	3,04	3,03	3,02	2,93	2,94
Amlo.	3,39	3,39	3,45	3,44	3,42	3,42	3,33	3,35
A-ImpE	3,78	3,78	3,84	3,82	3,81	3,81	3,72	3,75
A-ImpG	4,69	4,70	4,72	4,72	4,74	4,76	4,61	4,64
A-ImpB	4,80	4,82	4,83	4,82	4,85	4,89	4,73	4,77
A-ImpH	4,95	4,97	4,97	4,96	5,01	5,03	4,86	4,91
A-ImpA	6,63	6,65	6,65	6,63	6,67	6,69	6,56	6,61
$R_{S,krit}$	2,55	2,52	2,22	2,19	2,29	2,29	2,81	2,84

közötti különbségeknél is 0,03 vagy kisebb eltérések tapasztalhatók. A kritikus csúcspár mind a négy esetben az A-ImpG–A-ImpB.

A kapott eredményekből megállapítható, hogy a szimulált robusztusság vizsgálat megbízható, gyorsabb és sokkal több információval szolgál, mint a hagyományosan alkalmazott, egyszerre egy faktor változtatásával mért módszer. Így a robusztusság vizsgálat ideje lecsökkenthető több napról néhány percre.

A 8. Ábra ad felvilágosítást arról, melyik paraméter vagy paraméter kombináció van legnagyobb hatással a kritikus csúcspár felbontására. Ebben az esetben a hőmérséklet a legfőbb befolyásoló tényező. Hőmérséklet változtatás hatására az A-ImpB és A-ImpG komponensek sorrendje megváltozik. Alacsonyabb hőmérsékleten az A-ImpB, míg magasabb hőmérsékleten az A-ImpG eluálódik korábban. A gradiens ideje (t_G), az áramlási sebesség, az induló és végső eluens összetétel kis mértékben befolyásolják az elválasztást, ezen a paraméterek változtatása nincs hatással a szelektivitásra. Szintén nincs hatással a szelektivitásra a pH a munkapontnál, viszont a pH csökkentésével, pH~2,5 körül a fumsav és a B-ImpA retenciója felcserélődik. A mérési paraméterek kombinációja fontos információval szolgálhat az elválasztás minőségére. Itt a kombinált hatásoknak elenyésző szerepük van az elválasztásra.



8. Ábra. A kromatográfiai paraméterek hatása a felbontásra.

Összefoglalás

A közleményben ismertetett eredmények igazolják, hogy a rendelkezésre álló számítógépes szimulációs szoftver nagymértékben hozzájárul a hatékony, gyors és költségkímélő folyadékkromatográfiai módszerfejlesztéshez. A szimuláció megbízható eredményeket szolgáltat a vizsgálati módszerről. Természetesen ezt a szoftvert csak akkor lehet hatékonyan alkalmazni, ha mögötte ott van az analitikus tudása és tapasztalata. Az UHPLC technológia előretörésével a módszerfejlesztés még gyorsabbá válhat. A gyors és robusztus folyadékkromatográfiai módszerekkel mára elérteztünk ahhoz a határhoz, amikor nem a mérés időtartama, hanem a mintaelőkészítés gyorsasága szabja meg az elemzés idejét.

Hivatkozások

1. ICH Guidance for industry Q8(R2), **2009**.
2. ICH Guidance for industry Q11, **2012**.
3. Kormány, R.; Molnár, I.; Fekete J. *LCGC Europe* **2014**, 27/5, 240-248.
4. Molnár, I.; Rieger, H.-J.; Schmidt, A.; Fekete, J.; Kormány, R. *The Column* **2014**, 10/6, 16-21.

5. Snyder, L. R.; Dolan, J. W.; Lommen, D. C. *J. Chromatogr.* **1989**, *485*, 65-89.
6. Molnár, I.; Monks, K. E. *Chromatographia* **2011**, *73*, 5-14.
7. Horváth, Cs.; Melander, W.; Molnár, I. *J. Chromatogr.* **1976**, *125*, 129-156.
8. Molnár I.; Rieger, H.-J.; Monks, K. E. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3193-3200.
9. Eurby, M. R.; Schad, G.; Rieger, H.-J.; Molnár I. *Chromatography Today* **2010**, *December*, 13-20.
10. Monks, K. E.; Rieger, H.-J.; Molnár I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *56*, 874-879.
11. Monks, K. E.; Molnár I.; Rieger, H.-J.; Bogáti, B.; Szabó, E. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1232*, 218-230.
12. Kormány, R.; Molnár, I.; Fekete, J.; Guillaume, D.; Fekete, Sz. *Chromatographia* **2014**, *77*, 1119-1127.
13. Public Assessment Report of Concor AMLO Amlodipine/ Bisoprolol, HU/H/0237/001-004/DC **2012**.
14. European Pharmacopoeia 8.0 *Bisoprolol* **2014**, *01/2012:1710*, 1678.
15. European Pharmacopoeia 8.0 *Amlodipine* **2014**, *04/2012:1491*, 1547.
16. Kormány, R.; Molnár, I.; Rieger, H.-J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *80*, 79-88.

Quality by Design principle in liquid chromatography

In the last decade, an important technical evolution has occurred in pharmaceutical analysis with numerous innovative supports and advanced instruments that have been proposed to achieve fast or ultra-fast separations in liquid chromatography (LC) with an excellent sensitivity and ease of operation. Among the proposed strategies to increase the throughput, the use of short narrow-bore columns packed with sub-3 μm core-shell and porous sub-2 μm particles have emerged as the gold standards. Moreover method development is also of great importance, since in many cases it is the most time consuming step of drug development. The profiling of impurities and degradation products of active pharmaceutical ingredients (API) is one of the most challenging tasks in high performance liquid chromatography (HPLC), because of the requirements for both high-resolution and trace analysis, in addition to stringent regulatory and reporting guidelines. Finding the appropriate chromatographic conditions and then transferring the method is often challenging since it is influenced by many experimental parameters. As a consequence, the time and cost needs are high. It may happen that the method can not be transferred directly from one laboratory to another or using an alternative column is often problematic. The reasons are that selectivity and separation in LC depend on various parameters. Furthermore interactions can occur among these parameters. One of the most important requirements of modern liquid chromatography in the pharmaceutical development is that analysis time has to be as short as possible in order to improve analytical throughput. In the present paper, I focused on the application of experimental design and modeling software (DryLab) for method development. Computer modelling softwares can be applied to improve the throughput as well as to maximize information about method selectivity during the method development process. HPLC method development, robustness and Quality by Design (QbD) play an important role in the global economy, where pharmaceutical and chemical products are distributed worldwide and the method transfer process has been running for the same product in different countries and in different laboratories. Regulatory authorities (FDA, ICH, EMA, etc.) nowadays are promoting and requesting the application of QbD principles to ease the exchange of complex information about chromatographic selectivity and resolution to support method control, including method development, transfer and robustness testing. By applying QbD approaches, a better understanding and tuning of the method can be performed to ensure a requested separation in a Design Space (DS). This QbD concept has to be applied for in-process control including old conventional HPLC and as well as state-of-the-art ultra-high performance liquid chromatographic (UHPLC) separations.

The Q8(R2) and Q11 guideline of International Conference on Harmonization (ICH) clearly define the directions for API and finished product development. This means that during production and process controlling each parameter that can affect the results must be predicted.

Modeling in liquid chromatography began in 1986 when DryLab appeared, which calculated retention times (t_R), retention factors (k) and critical resolution ($R_{S,crit}$) in one dimensional computing. After twenty-five years, it is now possible to predict the effect of three measured and eight calculated variables on the separation. This three dimensional model is often called as the „cube”. The retention modeling of DryLab is mostly based on the solvophobic theory developed by Csaba Horváth and the linear solvent strength model. These theories explain the importance and role of water in reversed phase conditions.

The setup of the DryLab cube is the first step of model based experimental design. The independent variables - in most cases - are the temperature (T), the gradient time (t_G), and the mobile phase pH or the composition of the ternary mixture (t_C). Two types of cube can be prepared. The t_G - T -pH cube gives information about the pH dependence of the components' retention, while the influence of the ternary mixture on the selectivity and the achievable resolution can be examined with the t_G - T - t_C cube.

The main part of our research focused on the use of DryLab modeling and optimizing software. Its gain and possibilities in method development and reliability of predicted resolution were studied. Efforts were made on its implementation to every-day practice in order to increase analytical throughput and to apply QbD strategy in the field of pharmaceutical development. AS representative model compounds amlodipine and bisoprolol active pharmaceutical ingredients were selected, and their impurities from the European Pharmacopoeia (Ph.Eur.), so that the advantages of computer assisted method development can be demonstrated. Besides method development a so called "simulated robustness testing" approach was also applied. The analysis time of conventional pharmacopoeial methods were drastically shortened (down to the analysis time range of 5-7 minutes). The verification of prediction accuracy showed excellent agreement between calculated and measured retention times and resolutions.

The development strategy finding in the paper is applied successfully in the analytical R&D laboratories of Egis Pharmaceuticals Plc.

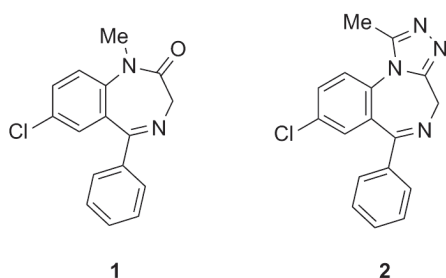
Pirrolotriazepin-származékok előállítása

FÖLDESI Tamás,^a VOLK Balázs^a és MILEN Mátyás^{a,*}

^aEgis Gyógyszergyár Zrt., Hatóanyagfejlesztési igazgatóság, 1106 Budapest, Keresztúri út 30–38.

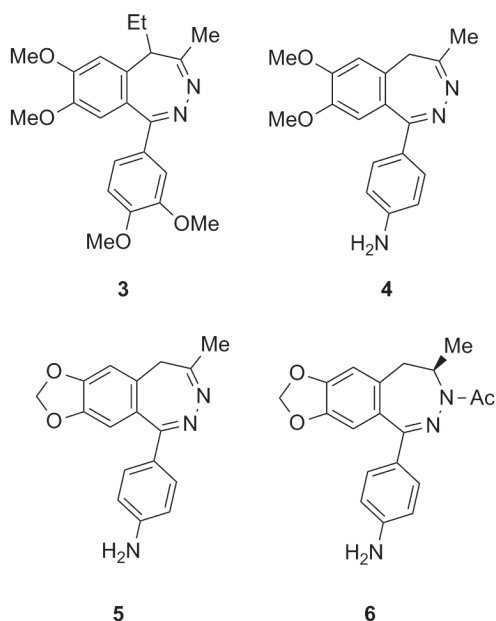
1. Bevezetés

A héttagú nitrogén heterociklusok kutatása és gyógyításban történő alkalmazása hosszú múltra tekint vissza. Az első ilyen jelentős vegyületcsalád az 1,4-benzodiazepinek közé tartozik. A diazepam (1), az alprazolam (2) és több más hasonló szerkezetű vegyület a múlt század második felében gyógyszerként került forgalomba (1. ábra).¹



1. Ábra. A diazepam (1) és az alprazolam (2) szerkezete.

Az 1,4-benzodiazepinek a gamma-amino-vajsav (GABA) neurotranszmitter hatását fokozzák, ennek eredményeképpen számos módon hatnak az idegrendszerre. Ezek közül a legismertebbek az izomrelaxáns, nyugtató, görcsoldó, szorongásoldó és altató hatások, valamint nem kívánt mellékhatásaik is vannak, például függőséget okoznak.¹ Ez utóbbi tulajdonság kiküszöbölése érdekében intenzív kutatás folyt hasonló szerkezetű molekulák előállítására és vizsgálatára.

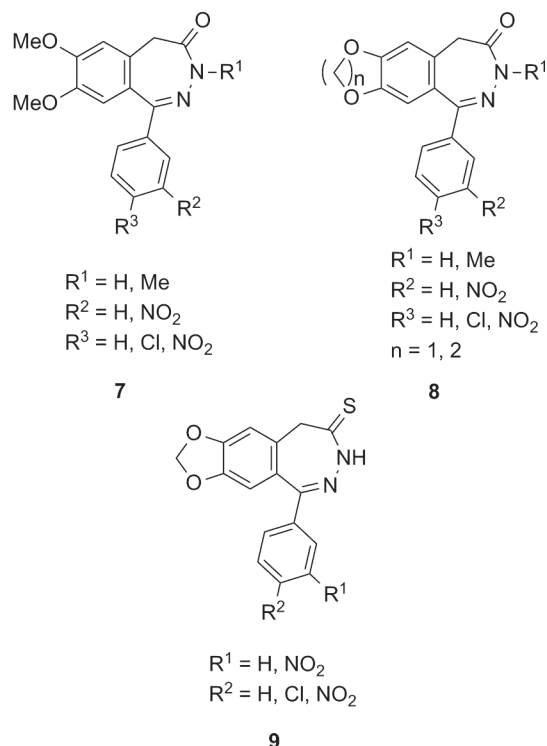


2. Ábra. Gyógyszerkémiai szempontból jelentős 2,3-benzodiazepin-származékok.

A következő nagy vegyületcsalád a 2,3-benzodiazepinek csoportja, melyek kutatásában az Egyesült Gyógyszer- és Tápszergyár (EGYT, ma Egis Gyógyszergyár Zrt.) és a néhai Gyógyszerkutató Intézet (GYKI) jártak az élen. Az intenzív munka eredményeképpen került piacra 1974-ben a tofisopam (Grandaxin, 3, 2. ábra), amely – különösen a vegetatív tünetekkel járó szorongásos betegségek esetében – jó szorongásoldó gyógyszernek bizonyult. Hatalmas előnye, hogy nincs altató és nyugtató hatása, az idegrendszert nem tompítja, emellett tartós alkalmazása esetén sem alakul ki függőség. Sajnos a tofisopam pontos hatásmechanizmusa máig sem ismert.² A 2,3-benzodiazepinek kutatása tovább folytatódott. A nerisopam (4) klinikai vizsgálatokig jutott, azonban gyógyszerként nem került forgalomba.³

Közben a GYKI-52466 vegyületről (5) kiderült, hogy 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav (AMPA) antagonistá hatású.

Ezért az 5 benzodiazepin-származéknak ezt a tulajdonságát az agyi érelzáródás következményeként kialakuló elégtelen vérrellátás által okozott agyi károsodás megakadályozására lehetne felhasználni.⁴ Ezen a területen a talampanel (6) jutott el a klinikai kipróbálásig (2. ábra).⁵

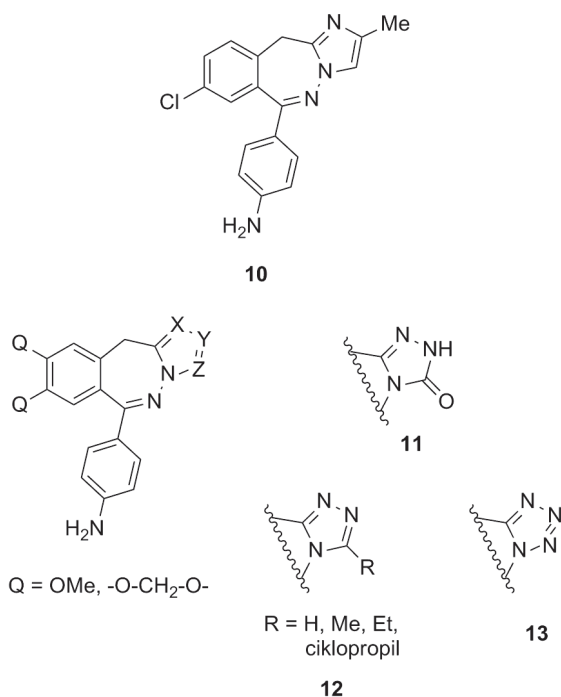


3. Ábra. 2,3-Benzodiazepin-4-on és tioanalóg vegyületek.

* Tel: +36 1 8035874; fax: +36 1 8035613; e-mail: milen.matyas@egis.hu

A 90-es évek második felében a 2,3-benzodiazepin-4-on vegyületek (**7**, **8**) és tio-analógjaik (**9**) keltették fel a kutatók érdeklődését. Az előállított vegyületek között többet találunk, amelyek nagyobb AMPA antagonistá hatást mutatnak, mint a GYKI-52466 (**5**, 3. ábra).⁶

Később részletesen vizsgálták, hogy a benzodiazepin alapvázra kondenzált C-gyűrű hogyan befolyásolja a biológiai aktivitást. A GYKI-47261 imidazolszármazék (**10**) az AMPA antagonistá hatás mellett Parkinson-kór elleni hatást is mutat.⁷ A vizsgált triciklusok közül a **11** triazolonszármazékoknak megnövekedett, míg a triazol- (**12**) és a tetrazolgyűrűvel (**13**) kondenzált származékoknak csökkent az antikonvulzív hatása a GYKI-52466 referencia anyaghoz (**5**) képest (4. ábra).⁸



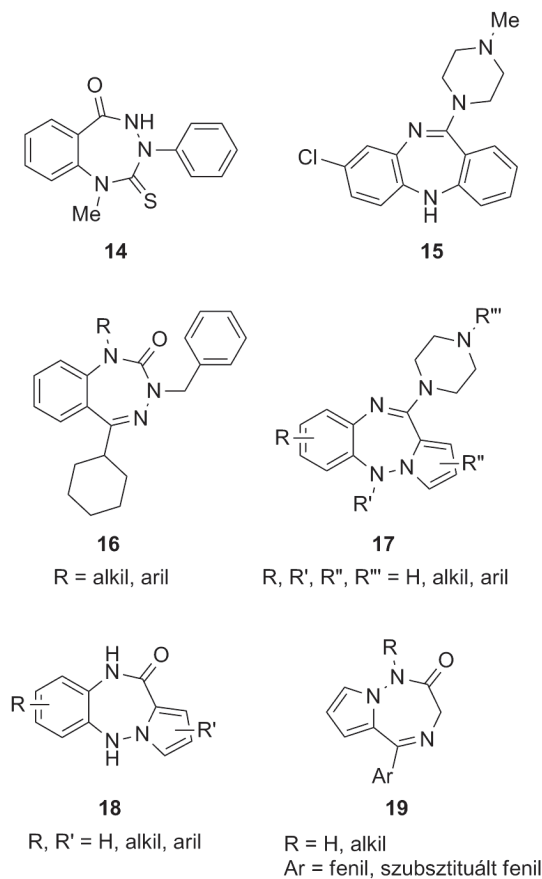
4. Ábra. Kondenzált triciklusos 2,3-benzodiazepinek.

2. Pirrolotriazepin-származékok és előállításuk

A benzolgyűrű és az öttagú, egy heteroatomot tartalmazó heterociklusok, úgymint a tiofén, a furán vagy a pirrol egymás bioizoszterei.⁹ Ebből kifolyólag a benzol heterociklusokkal történő helyettesítése és így új származékok előállítása érdekes területe a gyógyszerkémianak.

A benzotriazepin- és benzotriazepinon-származékok változatos biológiai aktivitást mutatnak. Az elmúlt néhány évben számos, gyógyszerkémiailag is jelentős vegyületcsaládot írtak le. Például, a **14** vegyület ugyanolyan mértékű antipszichotikus hatást mutat, mint a gyógyszerként forgalomban lévő klopazepin (**15**), azonban előzetes kísérletek alapján kevesebb mellékhatással rendelkezik (5. ábra).¹⁰ A benzotriazepin-származékok között találunk nempeptid paratiroid hormon receptor antagonistákat is (**16**, 5. ábra), amelyeket bizonyos rákos sejtburjánzások által előidézett kórosan magas kalcium-vér-szint csökkentésére lehetne

alkalmazni.¹¹ Ezzel szemben, az irodalomból csupán néhány pirrolotriazepin kondenzált triazepinszármazékot ismerünk. Ezek közül a **17** és **18** vegyületek különféle pszichotikus zavarok kezelésében lehetnek hasznosak (5. ábra).¹² A pirrolotriazepinek közül nagyon sokáig csak egyetlen egy vegyületcsalád (**19**, 5. ábra) volt ismert, amelynek néhány tagja anxiolitikus és antikonvulzív aktivitást mutat.¹³

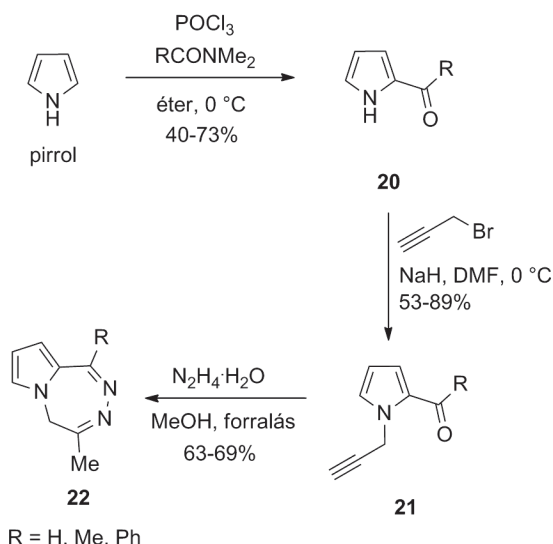


5. Ábra. Néhány jelentős triazepinszármazék.

2.1. 5H-pirrolo[2,1-d][1,2,5]triazepinek (**22**) és a 4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrolo[2,1-d][1,2,5]triazepin-1-on (**26**) előállítása

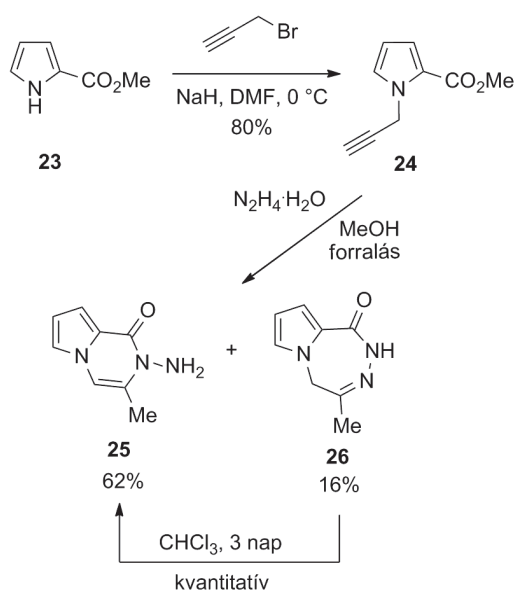
Az alábbi pirrolotriazepinokat (**22**) Balci és munkatársai állították elő¹⁴ a következő úton: a pirrol 2-es szénatomját Vilsmeier körülmények között acilezték, majd nitrogénatomját propargil-bromiddal alkilezték. Az oxo- és acetilén funkciós csoportot egyaránt tartalmazó intermediereket (**21**) hidrazin-hidráttal reagáltatva kapták a megfelelő triazepinszármazékokat (**22**, 6. ábra).

Ugyanezen szerzők a **26** pirrolotriazepinont is előállították az előzőekkel analóg módon metil 1H-pirrol-2-karboxiláttól (**23**) kiindulva (7. ábra). Azonban a várt termék (**26**) csak gyenge hozammal keletkezett a **25** pirrolopirazinon-származék mellett. Ennek okát részletesen vizsgálták és megállapították, hogy a két izomer termék közül a hattagú gyűrűs forma a stabilabb. Ezt kvantumkémiai számításokkal alátámasztották, illetve megfigyelték a **26** vegyület kloroformban végbemenő teljes izomerizációját.¹⁴



6. Ábra. A 22 pirrolotriazepinek szintézise.

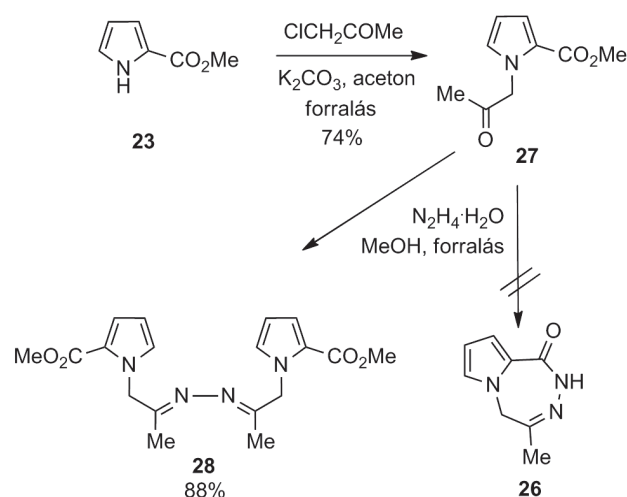
A 26 pirrolotriazepinont megpróbálták előállítani hidrazin-hidrát és metil 1-(2-oxopropil)-1*H*-pirrol-2-karboxilát (27) reakciójával is.¹⁴ Azonban a várt terméket (26) még nyomokban sem sikerült kimutatni, helyette a 28 diazinszármazék keletkezett (8. ábra).



7. Ábra. A 25 pirrolpirazinon és a 26 pirrolotriazepinon előállítása.

2.2. Az 1-aryl-3*H*-pirrolo[2,1-*d*][1,2,5]triazepin-4(5*H*)-on vegyületsalád szintézise

Kutatócsoportunkban az előzőekben bemutatott 26 pirrolotriazepinhez némileg hasonló vegyületeket szintetizáltunk a következő módon.¹⁵ Elsőként 2-acilpirrolokat (29) állítottunk elő a pirrol etil-magnézium-bromiddal, majd a megfelelő savkloriddal történő kezelésével (9. ábra, A módszer), vagy a megfelelő acilmorfolinnal Vilsmeier körülmények között (9. ábra, B módszer). A következő lépésben a 29 intermedierek nitrogénatomját

8. Ábra. Metil 1-(2-oxopropil)-1*H*-pirrol-2-karboxilát (27) reakciója hidrazin-hidrátal

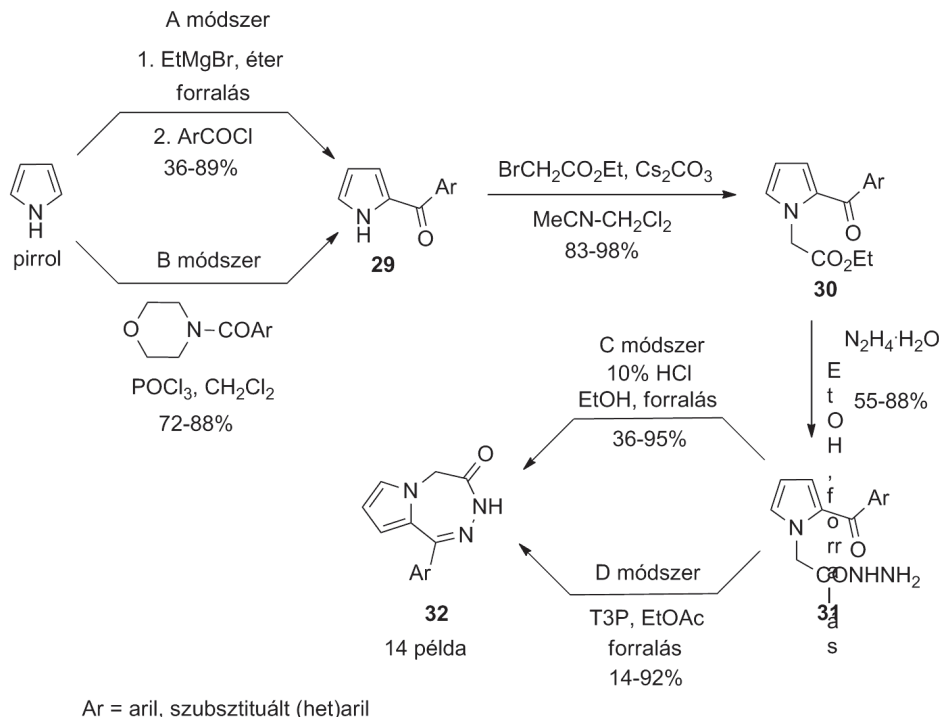
etil-bromacetáttal alkileztük cézium-karbonát jelenlétében, majd az így előállított vegyületeket (30) hidrazin-hidrátal reagáltattuk forró etanolban. Ilyen körülmények között a 31 savhidrazidokat izoláltuk, melyek gyűrűzárásával jutottunk el a kívánt pirrolotriazepinekhez (32). A szintézis utolsó lépése, a gyűrűzárás katalitikus mennyiségű sósav jelenlétében (9. ábra, C módszer), vagy propánfoszfonsav anhidrid (T3P®) reagens segítségével (9. ábra, D módszer) játszódott le.

2.3. 2-Aril-6-arylimidazo[1,2-*b*]pirrolo[1,2-*e*][1,2,5]triazepinek szintézise

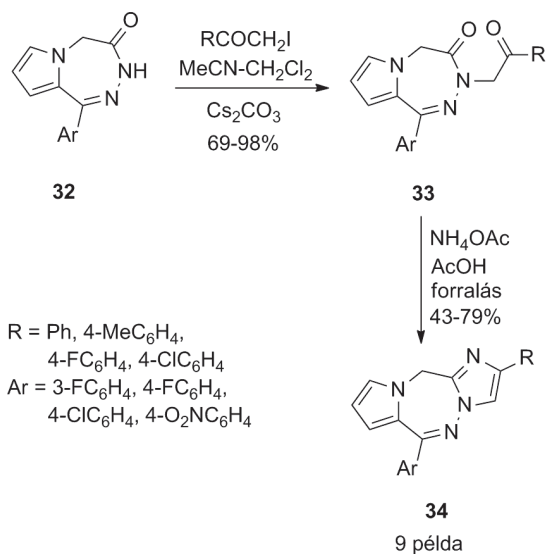
A 2,3-benzodiazepin-4-on származékok (7, 8) analógiájára a 32 pirrolotriazepinon típusú vegyületek jól használhatóak várhatóan biológiailag hatékony, bonyolultabb kondenzált triciklusok előállítására. Az imidazollal kondenzált pirrolotriazepinekhez (34) két lépésben jutottunk el a már rendelkezésre álló 32 vegyületekből (10. ábra).¹⁶ Először a triazepinyűrű karbonil csoport melletti nitrogénatomját alkileztük különféle 2-jódacetofenon-származékokkal, majd az így kapott 33 intermediereket forró ecetsavban ammónium-acetáttal reagáltatva jutottunk el a kívánt kondenzált triciklusokhoz (10. ábra).

2.4. 6-Aril-pirrolo[1,2-*e*][1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,5]triazepinek szintézise

A triazollal kondenzált pirrolotriazepinek (37) kiindulási anyagai szintén a már korábban előállított 32 vegyületek voltak.¹⁶ A kívánt termékekhez oly módon jutottunk el, hogy a pirrolotriazepinon-származékokban (32) lévő karbonil oxigénatomot Lawesson-reagenssel kénatomra cseréltük, ezt követően a tiovegyületeket (35) különböző savhidrazidokkal reagáltattuk (11. ábra, A módszer). Néhány esetben azonban csak gyenge termeléssel, vagy egyáltalán nem keletkezett a várt termék. Ekkor egy kerülő úton állítottuk elő a 37 pirrolotriazolotriazepiniket. A tiovegyület (35) kénatomját metil-jodiddal alkileztük, majd az *S*-metilszármazékot (36) katalitikus mennyiségű tömény sósav jelenlétében butanolban forraltuk a megfelelő savhidraziddal (11. ábra, B módszer).



9. Ábra. 1-Aril-pirrolotriazepinon-származékok (32) előállítás.



10. Ábra. Imidazolopirrolotriazepinek (34) előállítás.

2.5. 6-Aril-11H-pirrolo[1,2-e]tetrazolo[1,5-b][1,2,5]triazepinek szintézise

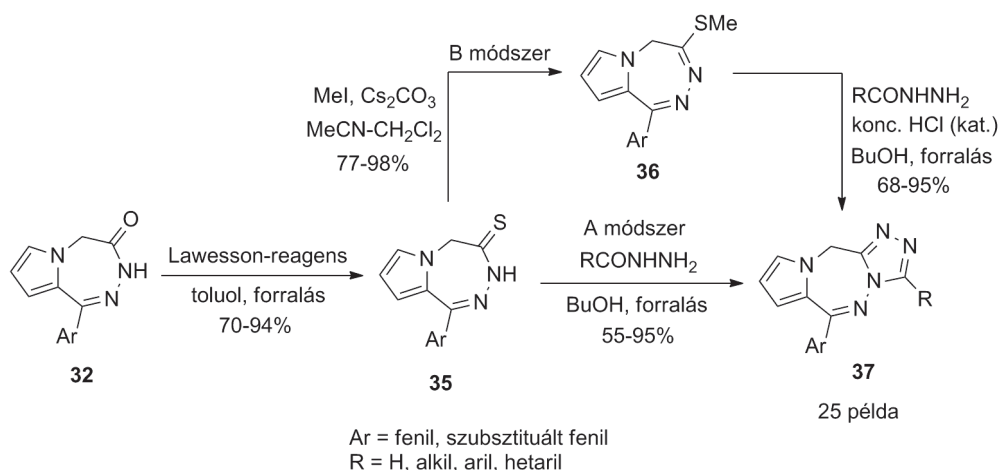
A tetrazolgyűrűt tartalmazó 39 triciklusokat már az előzőleg bemutatott 35 tiovegyületekből állítottuk elő két lépésben

(12. ábra).¹⁶ A tiovegyületeket (35) először hidrazin-hidráttal szobahőmérsékleten, tetrahydrofuranban reagáltattuk, majd a képződött hidrazonok (38) diazotálásával kaptuk a kívánt termékeket (39).

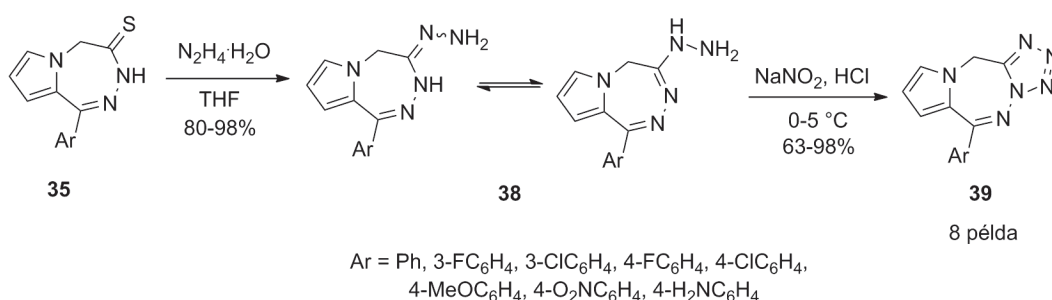
2.6. 6-Aril-pirrolo[1,2-e][1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,5]triazepin-3-onok szintézise

Az irodalmi bevezetőben már említést tettünk arra, hogy Chimirri és munkatársai által leírt triciklusos benzodiazepin-származékok közül a 11 triazolonyűrűt tartalmazó vegyületek voltak a legjobb AMPA antagonisták. Így fontosnak tartottuk a 13. ábrán látható 40 pirrolanalógok előállítását.

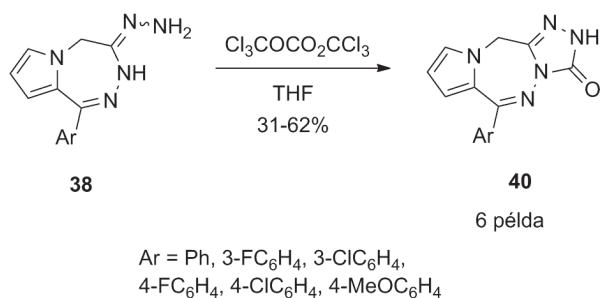
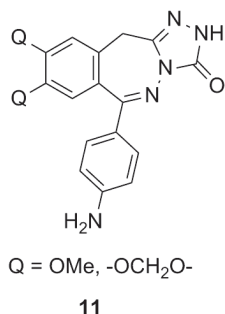
Irodalmi analógiák alapján először a 35 és 36 tiovegyületek és etil-karbazát (H₂NNHCO₂Et) reakciójával próbáltunk eljutni a 40 vegyületekhez,^{8a} azonban ezek a kísérletek nem vezettek eredményre. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az általunk már korábban előállított 38 hidrazonokba hogyan lehet C=O egységet beépíteni és így kialakítani a triazolonyűrűt. Többféle reagenst kipróbáltunk (karbonil-diimidazol, dietil-karbonát, trifoszfén), amelyek közül – ugyan közepes termeléssel – de egyedül trifoszfénnel (Cl₃COCO₂CCl₃) sikerült előállítani a kívánt vegyületeket (40, 13. ábra).¹⁷



11. Ábra. Triazolopyrrolo-triazepinek (37) előállítás.



12. Ábra. Tetrazolopyrrolo-triazepinek (39) előállítás.

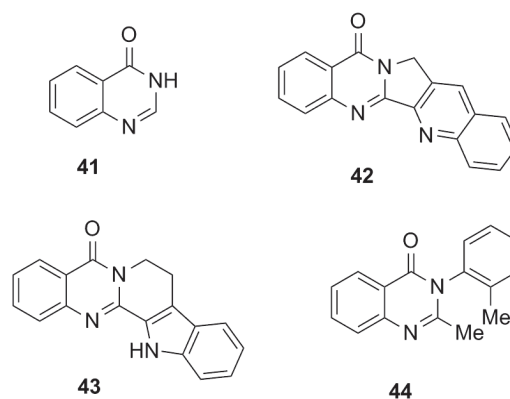


13. Ábra. Pirrolo-triazolopyrrolo-triazepin-származékok (40) előállítás.

3. 14-Arilpirrolo[20,10:4,5][1,2,5]triazepino[7,1-b] kinazolin-11(5H)-onok szintézise

A kinazolinon-származékok (kinazolin-4(3H)-on, 41, 14. ábra) jelentős része a biológiailag hatékony molekulák közé tartozik.¹⁸ A vegyületsoprot számos egyszerűbb

és bonyolultabb szerkezetű tagja izolálható különféle növényekből és állatokból.¹⁹ Például a loutonin A (42) a Kínában honos *Peganum nigellastrum* gyógynövényben található alkaloid, amely rákellenes hatást mutat.²⁰ A kinazolinon-alkaloidok egy másik fontos képviselője a pentaciklikus rutekarpin (43), amelyet az *Evodia rutaecarpa* szárított terméséből izoláltak.²¹ Magát a növényt a kínai orvoslás régóta alkalmazza kolera és emésztőrendszeri fertőzések ellen.²²

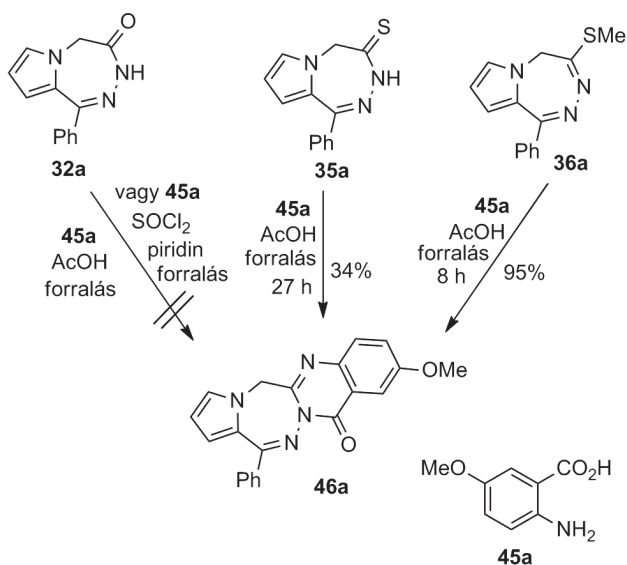


14. Ábra. Biológiailag hatékony kinazolinonszármazékok.

Az előzőleg bemutatott természetes anyagokon kívül számos mesterségesen előállított származék ismert, melyek között találunk antibakteriális,²³ rákellenes,²⁴ magasvérnyomás ellenes,²⁵ gyulladásgátló,²⁶ diabétesz ellenes²⁷ és antikonvulzáns²⁸ hatású vegyületeket. Ez utóbbira példa a metakvalon (44, 14. ábra), amely széles körben alkalmazott

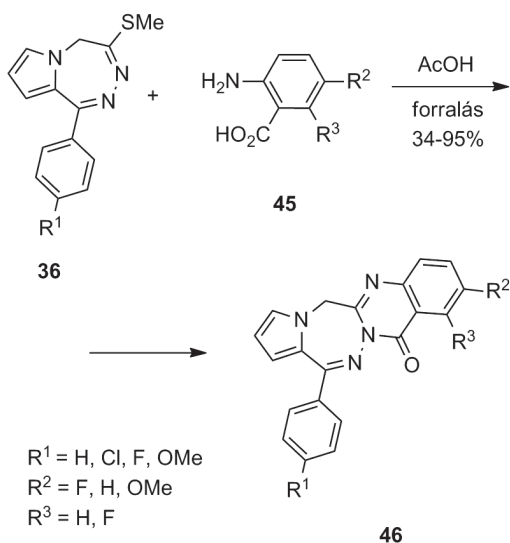
anxiolitikus és szedatív-hipnotikus gyógyszer.²⁹ A kinazolinon-származékok széleskörű biológiai aktivitása a struktúrákór kiterjedt kutatásához vezetett.³⁰

Az előzőek alapján látható, hogy a kinazolinon-származékok igen jelentős vegyületek. Ezért munkánk további céljaul azt tűztük ki, hogy az általunk már korábban előállított pirrolotriazepin szerkezeti elemre kinazolinongyűrűt felépítve – biológiailag várhatóan hatékony – új tetraciklusos vegyületcsaládot hozunk létre.³¹



15. Ábra. Kísérletek a 46a vegyület előállítására.

Kinazolinongyűrű kiépítésére leggyakrabban a Niementowski-reakciót alkalmazzák, amely antranilsavak és különféle karbonsavszármazékok (savamidok, tioamidok, amidinek, iminoészterek) kondenzációja.³² Munkánk során először a 32a pirrolotriazepinon vegyületet reagáltattuk 5-metoxi-antranilsavval (45a) forró ecetsavban, azonban ez a reakció sikertelennek bizonyult (15. ábra). Irodalmi analógia alapján³³ megkíséreltük előállítani a 46a vegyületet tionil-kloriddal piridinben, azonban így sem jártunk sikerrel. A 35a tioamid és az 5-metoxi-antranilsav (45a) forró

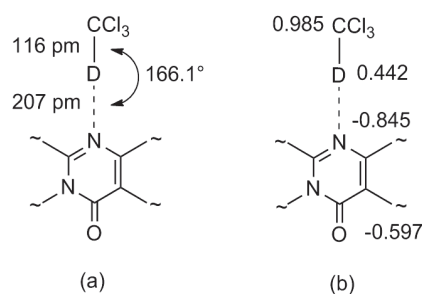
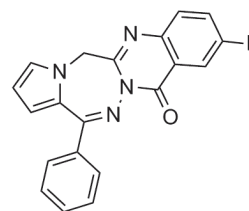
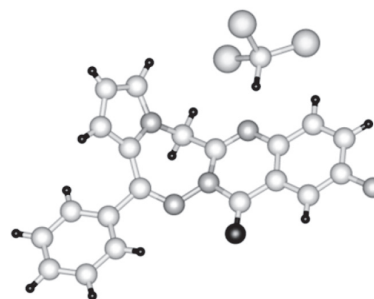


16. Ábra. Az előállított 46 kondenzált tetraciklusok.

ecetsavban történő reakciója már eredményes, de rendkívül lassú volt. 27 óra reakcióidő után a várt 46a vegyületet 34% termeléssel kaptuk, valamint a kiindulási tioamidot (35a) 62%-ban visszanyertük. A megoldást a 36a S-metil származék adta. Ebből kiindulva 95% termeléssel sikerült a kívánt 46a tetraciklust előállítanunk.

Az optimális körülmények megkeresése után a reakciót kiterjesztettük, és összesen hét új kinazolinon-származékot (46) szintetizáltunk (16. ábra).

A 46b ($R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{F}$, $R^3 = \text{H}$) vegyület CDCl_3 -ból növesztett egykristályáról röntgendiffrakciós felvételt készítettünk. A szerkezet érdekessége az a hidrogénkötés, amely a kinazolinongyűrű $\text{C}=\text{O}$ csoportjával szemben lévő nitrogénatom és a CDCl_3 deutériumatomja között alakult ki (17. ábra). Az irodalomban csak néhány példa ismert ilyen típusú hidrogénkötésre.³⁴



17. Ábra. A 46b vegyület szerkezete, (a) mért geometriai adatok, (b) számított töltéseloszlás.

4. Összefoglalás

A 2,3-benzodiazepinek a központi idegrendszerre ható vegyületek jelentős képviselői. A tofisopam (3, Grandaxin®) hatékony anxiolitikus gyógyszer, amely alacsony toxicitása mellett számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik. A 2,3-benzodiazepinek új származékainak előállítása fontos területe a gyógyszerkémianak. Az alapváz benzolgyűrűjének különféle heterociklusokkal történő cseréje új gyűrűrendszerek előállítását és így a meglévő biológiai hatásprofil módosítását teszi lehetővé. Munkánk során a

benzodiazepinekkel analóg pirrolotriazepin-származékokat állítottunk elő.

Hivatkozások

1. a) Calcaterra, N. E.; Barrow, J. C. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 253–260. b) Verster, J. C.; Volkerts, E. R.; *CNS Drug Rev.* **2004**, *10*, 45–76.
2. a) Horváth, E. J.; Horváth, K.; Hámori, T.; Fekete, M. I. K.; Sólyom, S.; Palkovits, M. *Prog. Neurobiology* **2000**, *60*, 309–342. b) Pellow, S.; File, S. E. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1986**, *10*, 221–227. c) Goldberg, H. L.; Finnerty, R. J. *Am. J. Psychiatry* **1979**, *136*, 196–199.
3. Palkovits, M.; Baffi, J. S.; Berzsényi, P.; Horváth, E. J. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *331*, 53–63.
4. Sólyom, S.; Tarnawa, I. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 913–939.
5. Tarnawa, I.; Berzsényi, P.; András, F.; Botka, P.; Hámori, T.; Ling, I.; Körösi, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 99–104.
6. a) Chimirri, A.; De Sarro, G.; De Sarro, A.; Gitto, R.; Grasso, S.; Quartarone, S.; Zappala, M.; Giusti, P.; Libri, V.; Constanti, A.; Chapman, A. G. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1258–1269. b) Wang, Y.; Konkoy, C. S.; Ilyin, V. I.; Vanover, K. E.; Carter, R. B.; Weber, E.; Keana, J. F. W.; Woodward, R. M.; Cai, S. X. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2621–2625. c) Grasso, S.; De Sarro, G.; De Sarro, A.; Micale, N.; Zappala, M.; Puia, G.; Baraldi, M.; De Micheli, C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4414–4421. d) Micale, N.; Colleon, S.; Postorino, G.; Pellicano, A.; Zappala, M.; Lazzaro, J.; Diana, V.; Cagnotto, A.; Menninic, T.; Grasso, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2200–2211.
7. Ábrahám, G.; Sólyom, S.; Csuzdi, E.; Berzsényi, P.; Ling, I.; Tarnawa, I.; Hámori, T.; Pallagi, I.; Horváth, K.; András, F.; Kapus, G.; Hársing Jr., L. G.; Király, I.; Patthy, M.; Horváth, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2127–2143.
8. a) Zappala, M.; Gitto, R.; Bevacqua, F.; Quartarone, S.; Chimirri, A.; Rizzo, M.; De Sarro, G.; De Sarro, A. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4834–4839. b) Gitto, R.; Zappala, M.; De Sarro, G.; Chimirri, A. *Il Farmaco* **2002**, *57*, 129–134. c) Csuzdi, E.; Hámori, T.; Ábrahám, G.; Sólyom, S.; Tarnawa, I.; Berzsényi, P.; András, F.; Ling, I.; Simay, A.; Gál, M.; Horváth, K.; Szentkúti, E.; Szöllősy, M.; Pallagi, I. PCT Intern. Patent WO 9728163, 1997; *Chem. Abstr.* **1997**, *127*, 205597.
9. a) Russell, R. K.; Press, J. B. In *Progress in Heterocyclic Chemistry*; Suschitzky, H., Schriener, E. F. V., Eds.; Pergamon: **1995**, Vol. 7, p 82. b) Hernandez, M. A.; Rathinavelu, A. In *Basic Pharmacology*; Taylor & Francis: **2006**, p 69–70.
10. Ibrahim, S. M.; Baraka, M. M.; El-Sabbagh, O. I.; Kothayer, H. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 1488–1496.
11. McDonald, I. M.; Austin, C.; Buck, I. M.; Dunstone, D. J.; Gaffen, J.; Griffin, E.; Harper, E. A.; Hull, R. A. D.; Kalindjian, S. B.; Linney, I. D.; Low, C. M. R.; Patel, D.; Pether, M. J.; Raynor, M.; Roberts, S. P.; Shaxted, M. E.; Spencer, J.; Steel, K. I. M.; Sykes, D. A.; Wright, P. T.; Xun, W. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4789–4792.
12. a) Fischer, R.; Künzle, F. M.; Schmuz, J. U.S. Patent 4,450,108, **1984**. b) Effland, R. C.; Davis, L.; Kapples, K. J.; Olsen, G. E. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 1015–1019.
13. Effland, R. C.; Klein, J. T.; Hamer, R. R. L.; Lake, B. U.S. Patent 4 517 195, 1985; *Chem. Abstr.* **1985**, *103*, 37509.
14. Menges, N.; Ozlem Sari, O.; Abdullayev, Y.; Erdem, S. S.; Balci, M. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5184–5195.
15. Milen, M.; Ábrányi-Balogh, P.; Dancsó, A.; Simig, G.; Volk, B. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 465–476.
16. Milen, M.; Földesi, T.; Dancsó, A.; Simig, G.; Balázs Volk, B. *Synlett* **2015**, *26*, 2418–2424.
17. Földesi, T.; Dancsó, A.; Volk, B.; Milen, M. *Lett. Org. Chem. megjelenés alatt*.
18. a) Connolly, D. J.; Cusack, D.; O’Sullivan, T. P.; Guiry, P. J. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10153–10202. b) Sharma, P. C.; Kaor, G.; Pahwa, R.; Sharma, A. Rajak, H. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4786–4812. c) He, L.; Li, H.; Chen, J.; Wu, X.-F. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 12065–12077.
19. a) Michael, J. P. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 650–668. b) Argade, N. P.; Mhaske, S. B. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9787–9826. c) Eguchi, S. *Top. Heterocycl. Chem.* **2006**, *6*, 113–156. d) Demeunynck, M.; Baussanne, I. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 794–814.
20. a) Ma, Z.-Z.; Hano, Y.; Nomura, T.; Chen, Y.-S. *Heterocycles* **1997**, *46*, 541–546. b) Cagir, A.; Jones, S. H.; Gao, R.; Eisenhauer, B. M.; Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13628–13629.
21. Asahina, Y.; Kashiwaki, K. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1915**, 1293.
22. Lee, S.H.; Son, J.-K.; Jeong, B. S.; Jeong, T.-C.; Chang, H. W.; Lee, E.-S.; Jahng, Y. *Molecules* **2008**, *13*, 272–300.
23. Pendergast, W.; Johnson, J. V.; Dickerson, S. H.; Dev, I. K.; Duch, D. S.; Ferone, R.; Hall, W. R.; Humphreys, J.; Kelly, J. M.; Wilson, D. C. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2279–2291.
24. a) Xia, Y.; Yang, Z.-Y.; Hour, M.-J.; Kuo, S.-C.; Xia, P.; Bastow, K. F.; Nakanishi, Y.; Nampoothiri, P.; Hackl, T.; Hamel, E.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1193–1196. b) Jiang, J. B.; Hesson, D. P.; Dusak, B. A.; Dexter, D. L.; Kang, G. J.; Hamel, E. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1721–1728. c) Cao, S.-L.; Feng, Y.-P.; Jiang, Y.-Y.; Liu, S.-Y.; Ding, G.-Y.; Li, R.-T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1915–1917.
25. a) Alagarsamy, V.; Pathak, U. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3457–3462. b) Chern, J.-W.; Tao, P.-L.; Wang, K.-C.; Gutcait, A.; Liu, S.-W.; Yen, M.-H.; Chien, S.-L.; Rong, J.-K. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3128–3141.
26. Alagarsamy, V.; Solomon, V. R.; Dhanabal, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 235–241.
27. Malamas, M. S.; Millen, J. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1492–1503.
28. Wolfe, J. F.; Rathman, T. L.; Sleevi, M. C.; Campbell, J. A.; Greenwood, T. D. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 161–166.
29. van Zyl, E. F. *Forensic Sci. Int.* **2001**, *122*, 142–149.
30. a) Xu, L.; Jiang, Y.; Ma, D. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1150–1153. b) Adib, M.; Sheikhi, E.; Bijanzadeh, H. R. *Synlett* **2012**, 85–88. c) Romero, A. H.; Salazar, J.; López, S. E. *Synthesis* **2013**, 2043–2050. d) Cheng, R.; Guo, T.; Zhang-Negrerie, D.; Du, Y.; Zhao, K. *Synthesis* **2013**, 2998–3006. e) Wei, H.; Li, T.; Zhou, Y.; Zhou, L.; Zeng, Q. *Synthesis* **2013**, 3349–3354.
31. Földesi, T.; Dancsó, A.; Simig, G.; Volk, B.; Milen, M. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 6759–6763.
32. Hisano, T. *Org. Prep. Proced. Int.* **1973**, *5*, 145–193.
33. Jahng, K. C.; Kim, S. I.; Kim, D. H.; Seo, C. S.; Son, J.-K.; Lee, S. H.; Lee, E. S.; Jahng, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 607–609.
34. Khare, B. N.; Mitra, S. S.; Lengyel, G. *J. Chem. Phys.* **1967**, *47*, 5173–5179.

Synthesis of pyrrolotriazepine derivatives

The 2,3-benzodiazepine ring can be found in pharmacologically active compounds. The most important 2,3-benzodiazepine derivative, tofisopam (**3**, Grandaxin®) is a commercially available non-sedative anxiolytic drug. Numerous 2,3-benzodiazepine derivatives were synthesized, but only nerisopam (**4**) became a

former drug candidate among them. Discovery of GYKI-52466 (**5**) opened a new therapeutic field, because of its AMPA antagonist effect. The AMPA antagonist drugs could be used to prevent brain damage caused by insufficient blood supply. In this field, talampanel (**6**) reached the clinical phase. The 2,3-benzodiazepin-4-ones (**7**, **8**), and its thio analogues (**9**) were also found to be AMPA receptor antagonists with marked anticonvulsant activity. Later, the effect of

introducing a further ring into the 2,3-benzodiazepine skeleton was examined exhaustively. The imidazole-condensed benzodiazepine derivative GYKI-47261 (**10**) showed antiparkinson effect beside the expected AMPA antagonist behaviour. Other derivatives containing an additional triazolone, triazole or tetrazole ring were also found to be potent anticonvulsant agents.

The benzene ring and the five-membered heterocycles having one heteroatom, such as thiophene, furan and pyrrole are bioisosteres to each other. Therefore, replacing the benzene ring to heterocycles, and synthesizing new ring systems are a very interesting and important field in pharmaceutical chemistry.

Benzotriazepines and benzotriazepinone derivatives show various biological activities, for example antipsychotic (**14**), and non-peptide parathyroid hormone receptor antagonists (**16**). In contrast, only a few pyrrole-condensed triazepine derivatives are known in the literature. Compounds **17** and **18** among them could be used in treating of psychotic disorders. For a very long time, only one pyrrolotriazepine compound family (**19**) was generally known, and these derivatives show anxiolytic and anticonvulsant activities. The next group of pyrrolotriazepines (**22**) was synthesized by Balci and co-workers. Beside the synthesis, interesting side-reactions and isomerisations were observed.

In a recent publication, we have described an efficient synthetic route for the preparation of 1-aryl-3*H*-pyrrolo[2,1-*d*][1,2,5] triazepin-4(5*H*)-ones (**32**), a compound family structurally related to 1-aryl-2,3-benzodiazepin-4-ones (**7**, **8**). At the first step in the four-step synthetic route, 2-arylpyrroles **29** were prepared from pyrrole either using ethyl magnesium bromide and appropriate acyl halides (Method A), or treating with Vilsmeier reagent (Method B). *N*-Alkylation of 2-arylpyrroles **29** with ethyl 2-bromoacetate led to compounds **30**. Subsequent reaction of esters **30** with hydrazine hydrate gave acyl hydrazides **31**. Ring closure of these latter either under acidic conditions in refluxing ethanol (Method C) or by a propanephosphonic acid anhydride (T3P®) promoted cyclisation (Method D) resulted in pyrrolotriazepinones **32**. Similarly to the 1-aryl-2,3-benzodiazepin-4-ones (**7**, **8**), compounds **32** could also be used to prepare various tricyclic systems.

Compounds **34** exhibiting the new imidazopyrrolotriazepine ring system were prepared from pyrrolotriazepinones **32** in two steps. The nitrogen atom adjacent to the carbonyl group was alkylated with various 2-iodoacetophenones to give the new ketones **33**, in an acetonitrile–dichloromethane mixture using cesium carbonate as the base. Then ring closure of compounds **33** was performed with ammonium acetate in refluxing acetic acid to afford tricyclic compounds **34**.

Compounds **37** containing the new pyrrolotriazolotriazepine ring system were also prepared from pyrrolotriazepinones **32**. The carbonyl group of derivatives **32** was converted into a thiocarbonyl moiety by using Lawesson's reagent in toluene leading to

pyrrolotriazepinethiones **35**. Compounds **37** containing the new pyrrolotriazolotriazepine ring system were then prepared from thiones **35** by treatment with various acyl hydrazides in refluxing butanol (Method A) in medium to excellent yields. In certain cases, an alternate approach proved to be more efficient: formation of the *S*-methyl derivative **36** and subsequent treatment with acyl hydrazides (Method B) afforded target compounds **37**.

Tetrazole derivatives **39** were synthesized from thiones **35** in two steps. At first, compounds **35** were treated with hydrazine hydrate at room temperature in THF, after that, the hydrazones **38** given from this step, were reacted with sodium nitrite in aqueous hydrochloric acid.

Among the tricyclic derivatives prepared by Chimirri and co-workers, triazolone derivatives **11** were the strongest AMPA antagonist compounds. Thus, we considered important to synthesize the pyrrole analogues **40**. According to literature procedures, we tried to prepare target compounds by several methods, but only the use of triphosgene led to the desired products.

Quinazolinone (quinazolin-4(3*H*)-one, **41**) derivatives constitute an important class of natural and synthetic compounds. A number of simple or more complex quinazolinones have been isolated and characterized from various plants, animals and microorganisms. For instance, loutonin A (**42**) extracted from the Chinese medicinal plant *Peganum nigellastrum* showed potent anti-tumor activity. Another important representative of the quinazolinone-type alkaloids is the pentacyclic rutaecarpine (**43**), which was isolated from the dried fruit of *Evodia rutaecarpa*, and used as a remedy for cholera, dysentery and worm infestations. Methaqualone (**44**), a synthetic quinazolinone derivative, is a widely used anxiolytic and sedative-hypnotic drug. The immense biological significance of quinazolinones has led to extensive studies towards various possible constructions of this core and the synthesis of new derivatives.

Seeing the importance of this compound family, we aimed to fuse the biologically active quinazolinone moiety with the pyrrolotriazepine skeleton synthesized by us, in order to prepare a new tetracyclic ring system with expected biological activity. To reach our target compounds, we tried out a few modifications of the classic Niementowski reaction, which is known to be an efficient tool to prepare quinazolinone derivatives. Among the starting materials derived from pyrrolotriazepinones **32**, the *S*-methyl derivatives **36** proved to be the suitable compound for our purpose: refluxing with anthralinic acids **45** in acetic acid for 4–8 h resulted in tetracyclic **46** in good yields. On the perspective view of compound **46b** co-crystallized with the NMR solvent CDCl₃ in a 1:1 molar ratio, an interesting phenomenon could be seen. The deuterium atom of the chloroform occupies a typical H-bond position. The H-donor properties of chloroform were already studied, however, there are only a few examples described in the literature. Here, the shape and the electron distribution of the molecule make the N(6) atom a good hydrogen acceptor, while the strong electron-withdrawing effect of the three chlorine atoms cause chloroform to be a hydrogen donor.

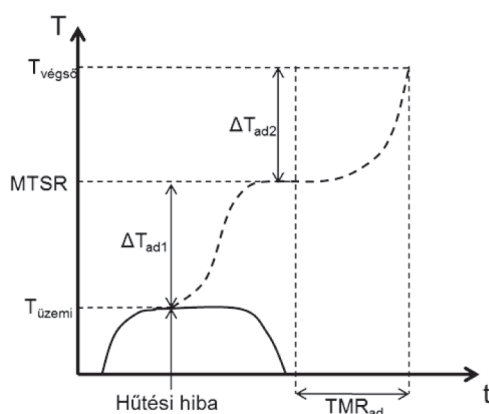
Biztonságtechnikai szempontok a gyógyszeriparban: Egy tofiosopam intermedier esete

FARKAS Ferenc,^{a,*} DANCSÓ András,^a MARKOVITS Imre,^a MADARÁSZ János^b és NYITRAI Izabella^c

^aEGIS Gyógyszergyár Zrt., Keresztúri út 30-38, 1106 Budapest, Magyarország ^bBudapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, Szent Gellér tér 4, 1111 Budapest, Magyarország ^cPannon Egyetem, Mérnöki Kar, Vegyészmérnöki és Folyamatmérnöki Intézet, Vegyipari Műveleti Intézeti Tanszék, Egyetem utca 10, 8200, Veszprém, Magyarország

1. Bevezetés

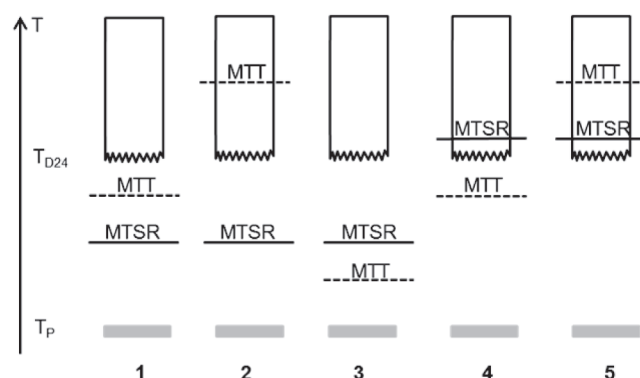
A szerves kémiai reakciók jelentős része exoterm, nagy energiaszabadulás esetén biztonságtechnikai kockázattal járnak. Egy Nagy-Britanniában elvégzett vizsgálat szerint minden hatodik robbanással járó vegyipari baleset valamilyen exoterm reakció biztonságtechnikai kockázatértékelésének elmulasztása miatt következik be.¹ Az utóbbi évtizedekben a modern termoanalitikai módszereknek köszönhetően lehetőségünk nyílt a vegyipari folyamatok során felszabaduló hő meghatározására, így a pontos kockázatbecslésre is. Az EGIS-ben a svájci SWISSI biztonságtechnikai intézet által kidolgozott módszert alkalmazzuk a reakciók veszélyességének meghatározására.² A kockázatértékelés során feltételezzük, hogy az exoterm reakció kivitelezésekor hűtési vagy keverési hiba lép fel (1. ábra).



1. Ábra. Egy reakció hőmérsékletének alakulása hűtési hiba bekövetkezése után.

Ekkor a reaktor, elég nagy méret esetén, kvázi adiabatikus módon viselkedik, így a reaktor hőmérséklete a reakcióhőből számítható adiabatikus hőmérsékletemelkedés mértékével (ΔT_{ad}) nő. Ilyenkor a reakcióelegy hőmérséklete eléri a kívánt reakció által elérhető maximális hőmérsékletet (MTSR, maximum temperature of the synthesis reaction). Magasabb hőmérsékleten nagyobb eséllyel valósulhatnak meg bomlási reakciók, melyek jellemzően nagy energiával járhatnak, ezáltal robbanást okozhatnak. Azt az időt, mely alatt adott hőmérsékleten, a bomlási reakció eléri a maximális sebességét, TMR_{ad} -al [time to maximum rate under adiabatic conditions] jelölik. A ΔT_{ad} a baleset súlyosságát, a TMR_{ad} a baleset bekövetkezésének valószínűségét jellemzi kvantitatív módon. A kívánt kémiai reakció vizsgálatára reakció kalorimétert, a bomlási reakció vizsgálatára

adiabatikus kalorimétert vagy DSC-t [differential scanning calorimeter] alkalmazhatunk. A reakciók SWISSI által javasolt veszélyességi osztályba sorolásához (2. ábra)³ be kell vezetnünk a T_{D24} fogalmát: ez az a hőmérséklet, melyen a reakcióelegyben a bomlási reakció 24 óra után éri el a maximális sebességét. Ismernünk kell a maximálisan elérhető technológiai hőmérsékletet [MTT, maximum temperature for technical reasons], ilyen pl. az oldószer forráspontja, ugyanis a reflux gátja lesz a hőmérséklet emelésének. A T_p pedig azt a hőmérsékletet jelenti, melyen végre akarják hajtani a reakciót, ezen a hőmérsékleten következik be a hűtési hiba is.



2. Ábra. Veszélyességi osztályok.

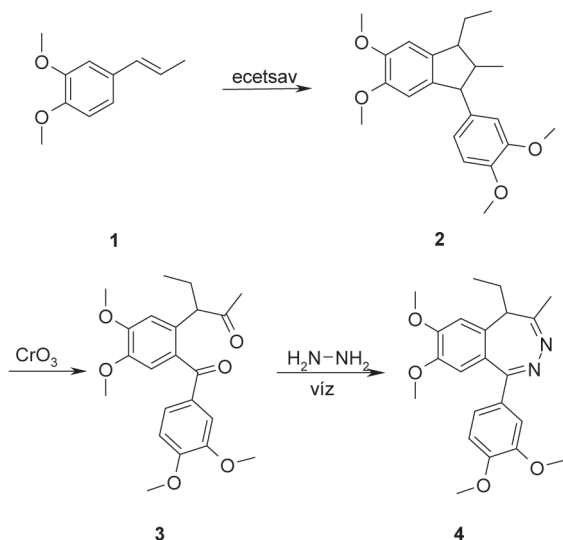
Az 1.-2. osztályba sorolt reakciók csak különleges körülmények között, pl. nagymennyiségű gázfelszabadulás esetén lehetnek veszélyesek. A 3.-4. osztályba tartozó reakcióknál van egy technikai gát, pl. reflux, amely megakadályozza, hogy elérjük azt a hőmérsékletet, ahol bekövetkezik a bomlás. Ebben az esetben igazolni kell, hogy a technikai gát méretezése, pl. reflux rendszer, megfelelő-e. Az 5. osztályba sorolt reakcióknál a nagyenergiájú bomlási folyamat túl nagy eséllyel valósul meg, ezért a technológia biztonságosabbá alakítása szükséges.

E munkában egy energia felszabadulásával járó reakció példáján mutatjuk be, milyen méréseket és számításokat végzünk el az EGIS-ben a biztonságtechnikai kockázatértékelés céljából. Kiemelt figyelmet szentelünk a kívánt reakció során bekövetkező termikus akkumuláció pontos meghatározásának. Egy autokatalitikus mechanizmusú bomlási reakció bekövetkezésének valószínűségét is vizsgáljuk.

* e-mail: Ferenc.Farkas@egis.hu

2. Tofisopam intermedier előállításának vizsgálata

A tofisopam (**4**), a Grandaxin® hatóanyaga, egy anxiolitikus hatású, Magyarországon fejlesztett originális EGIS gyógyszer. A **3** tofisopam intermediert metil-izoeugenolból (**1**) állítjuk elő. A reakció első részében ecetsavas közegben a **2** dimer képződése zajlik le. A nem izolált intermedierből feleslegben adagolt krómsav anhidrid oldattal végzett oxidáció segítségével alakítjuk ki a **3** diketon származékot.



2.1. Reakcióhő meghatározása

A diketon metil-izoeugenolból történő előállítása során felszabaduló hőmennyiséget viszonylag gyorsan és olcsón meghatározhatjuk számítási módszerrel a képződéshők felhasználásával (ΔH_f^0). A képződéshők egy része megtalálható kézikönyvekben,⁴ a többi kvantumkémiai úton számolhatjuk, mi ez utóbbi célra a HyperChem⁵ programot használtuk, az összehasonlítás kedvéért három különböző módszerrel: AM1, RM1 és PM3 (szemiempirikus NDDO, vagyis *neglect of diatomic differential overlap* módszerek STO, vagyis *Slater type orbital* bázissal). Először MM+ molekulamechanikával optimalizáltuk a szerkezeteket, majd az adott módszerrel kiszámítottuk a képződéshőt. Az adatokat az 1. táblázatban foglaltuk össze, a számított és mért reakcióhőket pedig a 2. táblázatban hasonlítottuk össze.

A 2. táblázatban a kísérleti és számított értékek közti nagy eltérés (2x) oka, hogy a számítással meghatározott érték elsősorban tájékozódásra és nagyságrendi becslésre szolgál, mivel sok tényezőt elhanyagolunk: vákuumban izolált molekulákra számolunk képződéshőket, pedig a reakciók kevés kivétellel kondenzált fázisban zajlanak, továbbá nem vesszük figyelembe az oldáshőket és a mellékreakciókat. Az EGIS-ben alkalmazott reakció kaloriméter nem alkalmas extrém magas vagy alacsony hőmérsékleten és nyomás alatt végrehajtott reakciók vizsgálatára. Ilyen esetekben a számított reakcióhő az egyetlen támpont a kockázatbecsléshez. A konkrét esetben a számított érték a mért eredménynek 51–63 %-a, számítási módszertől függően (pl. 2. táblázat).

1. Táblázat. Képződéshők (ΔH_f^0) kJ/mol-ban

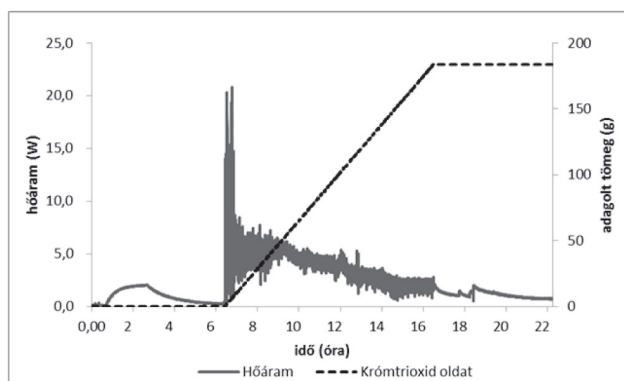
Vegyület	Irodalmi ³	Számított		
		AM1	RM1	PM3
CrO ₃	-589,9			
Cr ²⁺ aq	-143,6			
H ⁺ aq	0			
H ₂ O	-286,0			
CO ₂	-393,4			
1	NA ^a	-137,6	-136,7	-133,5
2	NA	-563,9	-640,3	-583,0

^a Nincs adat.

2. Táblázat. Számított és mért reakcióhők (ΔH) kJ/mol-ban

AM1	RM1	PM3	Kísérleti
-334,3	-412,5	-361,6	-651

A reakcióhő kísérleti úton való meghatározásának számos előnye van a számítási módszerekhez képest: ugyanazt a folyamatot mérhetjük, amely az üzemi reaktorban lezajlik, mérjük a fázisátalakulásból származó energiaváltozást is, valamint a reakció kinetikájáról is információt kapunk. Ilyen célra a Mettler Toledo RC-1 típusú kaloriméterét használjuk az EGIS-ben. A készülék érdekessége a reaktor hőátadó közeg felé eső falán elhelyezett, termoelemekből álló RT-Cal szenzor, mely a reaktor falán áthaladó hőáramot méri bizonyos időközönként. A reakció hőáram görbéjéről (3. ábra) leolvasható, hogy a dimer képződés és az oxidáció két külön folyamat, valamint hogy nagyobb hőfejlődéssel az oxidáció jár. A hőáramgörbe integrálja a reakcióhő. Fontos adat a maximális hőáram is, hiszen ennek ismeretében kiszámíthatjuk a biztonságos adagolási időt és, hogy a reakció szabályozásához mekkora üzemi hűtőteljesítményre van szükség.



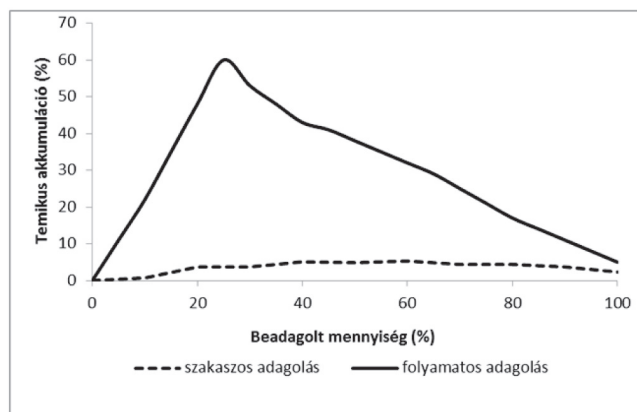
3. Ábra. A **2** vegyület előállításának hőáram görbéje.

A hőáram görbe azt is megmutatja, hogy a dimer képződése az összes hőfelszabadulás kisebb részét, mindössze 13 %-át teszi ki. A króm-trioxid oldat adagolás és hőáram viszonyának vizsgálatával pedig az akkumulációról kapunk információt. Az akkumuláció alatt azt értjük, amikor a reagens nem reagál el azonnal az adagolást követően, hanem a koncentrációja folyamatosan növekszik és csak

bizonyos idő elteltével lép reakcióba. Az akkumuláció reakció kaloriméterrel vizsgálható, ugyanis a konverzió jól helyettesíthető a termikus konverzióval. Ennek az a jelentősége, hogy az (1) képlet alapján az MTSR a termikus akkumuláció mértékével változik.

$$MTSR = T_r + X_{T,max} \Delta T_{ad} m_{rf} / m_{r,Tmax} \quad (1)$$

ahol: T_r a reakció hőmérséklete, $X_{T,max}$ a maximális termikus akkumuláció, m_{rf} a reakcióelegy tömege az adagolás végén, $m_{r,Tmax}$ a reakcióelegy tömege a maximális termikus akkumuláció időpontjában. Az adiabatikus hőmérsékletemelkedés a reakcióhő és a fajlagos hőkapacitás hányadosa. A fajlagos hőkapacitást a reakcióhő mérés során határozzuk meg a készülék kalibrálásakor. Egyszerű másodrendű reakciók esetén a termikus akkumuláció a sztöchiometrikus mennyiség beadolásakor éri el maximumát, a reakció kaloriméter iSafety (Mettler Toledo iControl RC1e 5.0 része) szoftvere is így módon számítja az MTSR-t. Ez alapján a maximális termikus akkumuláció jelen esetben 60 %, az MTSR 177 °C. Bonyolultabb mechanizmusú reakcióra, mint a krómsavas oxidáció, valójában ez nem érvényes, a termikus akkumulációt ilyenkor, folyamatos adagolás helyett (3. ábra), szakaszos adagolással határozzuk meg. A króm-trioxid oldatot 10 részletben adtuk a reakcióelegyhez, az adagolások közt várakoztunk és mértük a felszabaduló hő nagyságát. Ekkor a termikus akkumuláció az adagolás végétől a következő adagolás kezdetéig keletkező hő és a reakcióhő hányadosa. A 10 mérési pontból szerkesztett termikus akkumuláció görbét a 4. ábrán hasonlítottuk össze az iSafety szoftver segítségével folyamatos adagolás során meghatározottal.



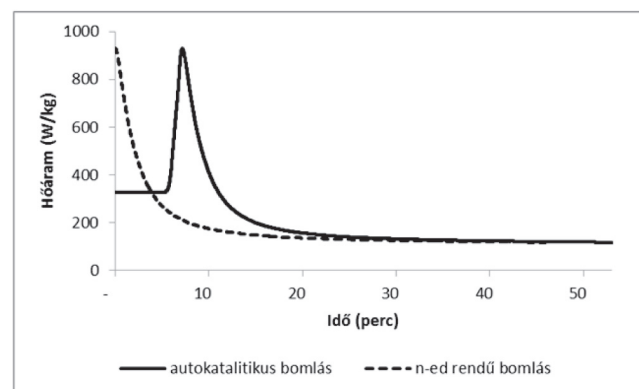
4. Ábra. Akkumuláció alakulása folyamatos és szakaszos adagolás esetén.

Szakaszos adagolás segítségével sikerült pontosabban meghatározni a termikus akkumulációt, mely jelentősen kisebb az iSafety szoftverrel számítottnál. A maximális termikus akkumuláció 5,1 %-ra, az MTSR pedig 35 °C-ra csökkent. Ennek a veszélyességi osztályba soroláshoz van jelentősége, hiszen minél kisebb az MTSR, a reakció annál biztonságosabb.

2.2. Bomlási reakció vizsgálata

A magasabb hőmérsékleten lejátszódó bomlási reakciók jellemzően nagy energiaszabadulással járnak. Ezeket a reakciókat DSC-vel vizsgáljuk, a méréseket a BMGE Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékén végezték. A

használt differenciális pásztázó kaloriméter Modulated DSC 2920 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) típusú hőáram (heat flux) mérőcellával rendelkező készülék volt. A mérések során nyomásálló tégléket alkalmaztunk állandó nitrogénöblítéssel, hogy a tégléből esetlegesen kiszabaduló gázok a szenzort ne károsítsák. Általában először egy dinamikus DSC mérést végzünk, a mintát szobahőmérsékletéről 5 °C/min fűtési sebességgel melegítjük 300 °C-ig. Amennyiben exoterm folyamatra utaló csúcsot kapunk, az onset hőmérsékletének környékén néhány 10 °C különbséggel izoterm mérést végzünk. Izoterm DSC-mérés során szobahőmérsékletéről a kívánt hőmérsékletre 50 °C/min sebességgel fűtjük fel a mintát általában 4-5 perc alatt, amely a kívánt hőmérsékletet elérve izoterm hőmérsékleti körülmények közé kerül. Ebben az állapotban legalább 60 percig nyomon követjük a termikus viselkedését. A dinamikus mérés során kapott hőfelszabadulásból a bomlási reakció hevességét tudjuk megbecsülni, az izoterm méréssel meghatározott maximális hőáramból a T_{D24} -et. A DSC görbe alakjából a bomlás kinetikájára is következtethetünk⁶ (5. ábra). Ha a reakció n-ed rendű, az izoterm mérés során a hőáram az idő előrehaladtával monoton csökken. Autokatalitikus mechanizmus esetén a reakció az idő előrehaladtával gyorsul, majd a maximális sebesség elérése után csökkenni kezd. Másfépp fogalmazva, a maximális hőáramot indukciós idő után éri el. Az autokatalitikus és n-ed rendű bomlási reakciók esetében a T_{D24} meghatározása eltérő módon történik.



5. Ábra. Autokatalitikus (oxidációs reakcióelegy, 216 °C) és n-ed rendű bomlás izoterm DSC felvételei.

A reakcióelegyet az oxidáció lezajlása után DSC-vel vizsgáltuk, és a dinamikus DSC mérés során 220 °C-on jelentős hőfelszabadulást tapasztaltunk ($\Delta T_{ad}=100$ °C). Ezután izoterm méréseket végeztünk 216, 246 és 261 °C-on. A görbék alakjából (5. ábra) megállapítottuk, hogy a bomlás autokatalitikus módon megy végbe.

Az autokatalitikus reakciók nagy részét jól jellemzi a Benito-Perez modell.⁷ A modell során külön figyelembe vesszük az iniciáló reakciót, mikor A kiindulási anyag B bomlási terméké alakul autokatalízis nélkül, valamint azt a folyamatot is, mikor B már katalizálja az A→B átalakulást. Tömegtartás-kinetikát feltételezve az egyszerűsített Benito-Perez modellt a következőképp írhatjuk fel:



$$-r_A = k_1 C_A + k_2 C_A C_B \quad (4)$$

ahol r_A a reakciósebesség, k a sebességi állandó és C a koncentráció. Ez alapján az autokatalitikus reakció hő- (5) és tömegmérlegét (6) a következő egyenletekkel határozhatjuk meg:

$$q' = \frac{dx}{dt} Q \quad (5)$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{Q}{c} k_{10} e^{-\frac{E_1}{RT}} (1-x) + \frac{Q}{c} C_{A0} k_{20} e^{-\frac{E_2}{RT} x} (1-x) \quad (6)$$

Az egyenletrendszer független változója a t idő, két függő változóval (x : konverzió, T : hőmérséklet) és hét paraméterrel rendelkezik, ez utóbbiak jelölését és az oxidáció utáni bomlásra meghatározott értékeit a 3. táblázatban összegeztük.

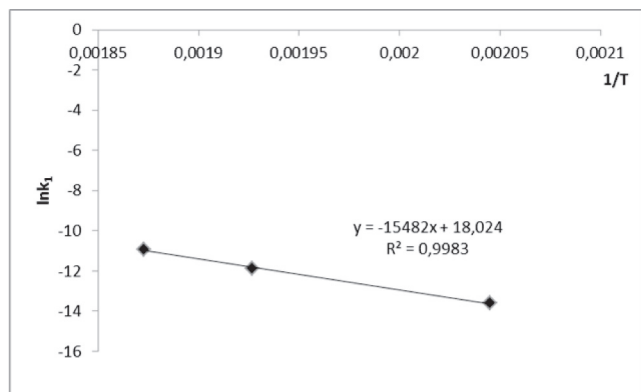
3. Táblázat. Az (5) és (6) egyenlet paraméterei a vizsgált reakció esetén

Jelölés	Jelentés	Érték
Q	bomlás során felszabadult hő	$2 \cdot 10^5$ kJ/kg
c	fajlagos hőkapacitás	2,05 kJ/kgK
k_{10}	iniciáló reakció preexponenciális tényezője	$6,64 \cdot 10^7$ 1/s
E_1	iniciáló reakció aktiválási energiája	128 kJ
$k_{20} C_{A0}$	az autokatalitikus reakció preexponenciális tényezőjének és az A komponens kezdeti koncentrációjának szorzata	1791 1/s
E_2	autokatalitikus reakció aktiválási energiája	47 kJ

A bomlás során felszabaduló hőmennyiséget mind a dinamikus, mind az izoterm DSC görbéből megkapjuk. A reakcióelegy fajlagos hőkapacitását a reakcióhő mérés során meghatároztuk reakció kaloriméterrel. Az iniciáló reakció preexponenciális tényezőjét megkapjuk, ha a sebességi állandót különböző hőmérsékleteken meghatározzuk (216, 246 és 261 °C) a (7) egyenlet alapján, majd a kapott eredményeket $1/T$ -lnK diagramon ábrázoljuk.

$$k_1 = \frac{q'_0}{Q} \quad (7)$$

ahol q'_0 az izoterm DSC mérés során az exoterm csúcs kezdetén jelentkező hőáram. Az iniciáló reakcióra kapott Arrhenius diagramot a 6. ábrán mutatjuk be. A preexponenciális tényezőt az egyenes tengelymetszete adja, az egyenes meredeksége pedig az aktiválási energia és az egyetemes gázállandó hányadosa.

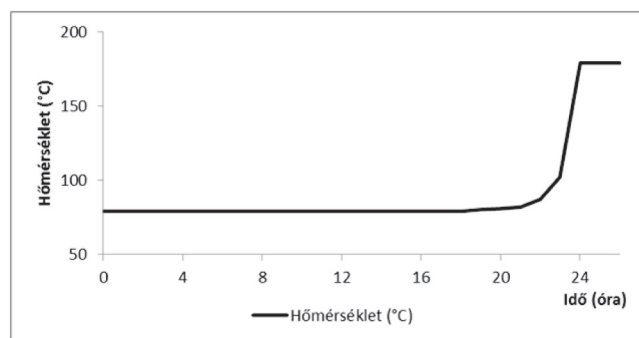


6. Ábra. Az iniciáló reakció Arrhenius diagramja.

Az autokatalitikus reakciónál is hasonlóképp határozzuk meg a preexponenciális tényezőt, csak a sebességi állandó számításánál az izoterm mérés során fellépő maximális hőáramot (q'_{max}) vesszük figyelembe a következő egyenlet szerint:

$$k_2 C_{A0} = \frac{4q'_{max}}{Q} \quad (8)$$

A paraméterek ismeretében az (5)-(6) differenciálegyenletrendszer numerikusan oldottuk meg a saját fejlesztésű Kinetika szabadszoftver⁸ segítségével. A kezdeti hőmérséklet változtatásával, iterálással kaptuk meg a T_{D24} értéket (79 °C). Az egyenlet megoldását grafikusán is ábrázoljuk (7. ábra), így a bomlási reakció által, adiabatikus körülmények között létrehozott hőmérsékletváltozáshoz jutottunk.



7. Ábra. A bomlási reakció hőmérséklet lefutása 79°C kezdeti hőmérséklet esetén.

3. Értékelés

Munkánk során a tofispam egyik intermedierének előállítását vizsgáltuk biztonságtechnikai szempontból, A szintézis során felszabaduló hőt meghatároztuk kétféle módon: reakció kaloriméter, valamint HyperChem program segítségével. A reakcióhő szoftveres úton történő becslése, pontatlansága miatt, csak akkor ajánlott, ha a kaloriméteres vizsgálat valamilyen ok miatt nem kivitelezhető. Megállapítottuk, hogy a termikus akkumulációt, a reagens nagy feleslegben történő adagolása esetén, több részletben történő szakaszos adagolással pontosabban mérhetjük. Ennek az MTSR számítása, ezáltal a veszélyességi osztályba sorolás során van jelentősége. A bomlási reakcióról a DSC mérések alapján feltételeztük, hogy autokatalitikus mechanizmusú. A reakció hő- és anyagmérlegét a Benito-Perez modell segítségével írtuk fel. Az egyenletrendszer megoldásával, melyet egy saját fejlesztésű szoftverrel végeztünk, határoztuk meg reakció veszélyességi osztályba sorolásához szükséges T_{D24} értéket.

A reakció kaloriméterrel és DSC-vel meghatározott adatok ($T_p=20$ °C, $MTSR=35$ °C, $T_{D24}=79$ °C, $MTT=100$ °C) ismeretében megállapíthatjuk, hogy a tofispam szintézisében alkalmazott reakció a második veszélyességi osztályba tartozik (2. ábra), megfelelő adagolási sebesség mellett. Ez azt jelenti, hogy üzemi méretben bekövetkező hűtési hiba esetén, ha leállítjuk az adagolást, a reakcióelegy csak 15 °C-al melegszik. Ezen a hőmérsékleten csekély esélye van a nagy energiájú bomlási folyamatok bekövetkezésének, így a reakció termikus szempontból biztonságosan megvalósítható. Vegyük észre, hogy ha a szoftver által meghatározott MTSR értéket vettük volna figyelembe, az

oxidáció az 5. veszélyességi osztályba tartozna, mivel az MTSR meghaladná a T_{D24} értéket. Ez akkora biztonsági kockázatot jelentene, hogy a technológiát mindenképpen át kellene dolgozni.

A bemutatott reakció jó példa annak demonstrálására, hogy a pontos kockázatbecsléshez milyen sokrétű és körültekintő vizsgálatokra van szükség.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk Lukács Gyulának és Százdí Lászlónak, hogy támogatásukkal segítették a biztonságtechnikai labor létrejöttét.

Hivatkozások

1. Madison, N.; Rogers, R. L. *Chem. Technol. Eur.* **1994**, 28-31.
2. Gyax, R. *Chem. Eng. Sci.* **1988**, *43*, 1759-1771.
3. Nanchen A.; Steinkrauss M.; Stoessel F. *Forsch. Ingenieurwes.* **2009**, *73*, 3-10.
4. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 67th ed., CRC Press, Boca Raton, **1986-87**.
5. *HyperChem* 8.0.9, HyperCube Inc.
6. Stoessel, F. *Thermal Safety of Chemical Processes*, Wiley-VCH: Weinheim, **2011**; pp 281-334.
7. Dien, J.M.; Fierz, H.; Stoessel, F.; Killé, G. *Chimia* **1994**, *48*, 542-550.
8. Kinetika szabadszoftver, http://dancso_andras.nanoweb.hu

Safety investigations in pharmaceutical industry: case study of tofisopam intermediate

The manufacturing of chemical products using exothermic reactions may represent various hazards^{1,2} (Fig. 1., Fig. 2.). The thermal behaviour of the exothermic reactions can be predicted based on the method of SWISSI³. During risk assessment cooling or mixing failure is assumed while performing the reaction. In this case the reactor behaves adiabatically, the temperature rises with adiabatic temperature increase (ΔT_{ad}). Temperature of reaction mixture might reach the maximum temperature of the synthesis reaction (MTSR). At higher temperatures the decomposition reactions are more probable, which cause high energy evolution, thus explosion may happen. T_{D24} is the temperature at which time to maximum decomposition rate under adiabatic conditions (TMR_{ad}) is 24 hours. ΔT_{ad} refers to how serious the accident is, TMR_{ad} describes the probability of the accident. MTT is the maximum temperature for technical reasons (for example the boiling point of solvent). T_p is the initial temperature of cooling failure scenario. These four temperature levels (T_p , MTSR, MTT, T_{D24}) classify the reactions into five different classes, ranging from the least critical to the most critical. The reactions in 1.-2. classes are dangerous only in particular conditions (for example huge amount of gas release). Reactions in 3.-4. criticality classes have a technical limit, for example the reflux, which prevents reaching the MTSR. The decomposition reaction in 5. criticality class reactions has too high probability, so the technology needs safety development. In the present paper we investigate a reaction with high energy release, demonstrate measurements and calculations required for risk assessment.

Tofisopam is the drug substance of Grandaxin®, which is an anxiolytic original EGIS drug. The investigated tofisopam intermediate is produced from methyl isoeugenol. The first part of the reaction is the formation of dimer in acetic acid. The diketone derivative is formed with oxidation by chromic acid anhydride solution excess.

The reaction enthalpy can be calculated from heats of formation (ΔH_f°). Heat of formation data was collected from handbooks⁴ and calculated by quantum-chemical methods (AM1, RM1 and PM3)⁵. The reaction enthalpy was also measured by a reaction calorimeter (Table 1., Table 2.). The experimental determination of reaction enthalpy has a lot of advantages compared to calculation methods. The energy of phase transition is measured and information about the kinetics of reaction can be collected. The measurement was carried out on a Mettler Toledo RC-1 instrument with iC Safety software (Fig. 3.). The equipment has a RT-Cal sensor in the wall of the reactor, which measures the heat flow through the reactor wall at stated intervals. It could be deduced from the reaction heat flow curve that the reaction consists of two parts, at first the dimer formation takes place then the oxidation follows. The dimer formation represents only 13 % of the total reaction enthalpy. The required dosing time and cooling power in plant can be calculated from the maximal heat flow. The relation between chromium (VI) oxide addition rate and heat flow was examined, thus information about thermal accumulation was collected. During accumulation the reagent does not react immediately after addition, but its concentration increases and reacts after a certain time. Thermal accumulation can be examined with reaction calorimeter (Eq. 1). Value of 60 % thermal accumulation (MTSR = 177 °C) was calculated in case of continuous addition by iC Safety software. The thermal accumulation estimation by the iC Safety software based on the reaction follows an irreversible second-order kinetics. If the reaction is complex, as in this case, an indirect method has to be used to determine thermal accumulation. Another method is to stop the feed during an experimental run in a reaction calorimeter and to measure the heat evolved after the interruption: it is proportional to the accumulation. In the experiment chromium (VI) oxide solution was added in 10 portions. Value of 5.1 % thermal accumulation (MTSR = 35 °C) was calculated using this method (Fig. 4.). The measured MTSR value is important to classify the reaction by criticality.

Decomposition reactions at elevated temperatures have typically high reaction enthalpies. These were investigated with a TA Instruments Modulated DSC 2920 device (Fig. 5.). At first a dynamic DSC measurement is performed: the sample is heated to 300 °C with 5 °C/min heating rate. If peaks referring to exothermic processes appear, isothermal measurements are performed around the onset temperature: the sample is heated to the required temperature with 50 °C/min heating rate in 4-5 minutes, and the thermal behaviour is examined for at least 60 minutes. Severity of the reaction can be estimated from the heat evolution during dynamic measurement, T_{D24} can be calculated from the maximal heat flow during isothermal measurement. The kinetics of the decomposition can be concluded from the form of the DSC curve (Fig. 5.). In case of n-th order reaction the heat flow during isothermal measurement decreases in time. In case of autocatalytic reaction the heat flow increases, and after reaching the maximum rate it decreases. The tested reaction proved to be rather autocatalytic than n-th order. At first a dynamic DSC was recorded where at 220 °C a remarkable heat release was observed, $DT_{ad} = 100$ °C. In the second step, three isothermal measurements were carried out at 216, 246, and 261 °C, respectively, and the Arrhenius parameters were determined (Fig. 6.). The autocatalytic reactions can be described by Benito-Perez model⁷ (Eqs. 2-6, Table 3.), which takes into consideration the initiation reaction (without autocatalysis) and the reaction where the product catalyses the transformation. Using the Benito-Perez model, the decomposition reaction was numerically simulated⁸ (Fig. 7.) and the value $T_{D24} = 79$ °C was obtained.

Taking the four temperature levels into account ($T_p = 20$ °C, MTSR = 35 °C, $T_{D24} = 79$ °C, MTT = 100 °C) measured by reaction calorimeter and DSC, the reaction is in 2. criticality class (Fig. 2.) if the addition rate is appropriate. In case of cooling failure in plant, if addition is stopped, the temperature of reaction mixture increases with 15 °C. The risk of this oxidation reaction is acceptable.

Gyógyszerhatóanyagok fizikai tulajdonságainak finomhangolása

MARKOVITS Imre,^{a,*} FARKAS Ferenc,^a CSANAKY Lilla,^b PATAKI Hajnalka,^b

JANINÉ VAKULYA Gabriella^a és FARKAS Béla^a

^aEgis Gyógyszergyár Zrt., Keresztúri út 30-38., 1106 Budapest, Magyarország

^bBudapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Műegyetem rakpart 3., 1111 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Az Egis Gyógyszergyár Zrt.-ben hosszú idő óta célzott erőfeszítéseket teszünk annak érdekében, hogy a gyógyszerhatóanyag fizikai tulajdonságai (szemcseméret-eloszlás, folyási tulajdonság, halmazsűrűség, maradékoldószer tartalom) mellett, hogy a hatósági előírásoknak megfeleljenek, a készítménygyártók vagy külső vásárlók igényeit is kielégítsék. Ebben a közleményben ebből a munkából emelünk ki néhány, az irodalomban kevésbé tárgyalt részt.

2. Gyógyszerhatóanyagok fizikai és szemcseszerkezettel összefüggő tulajdonságai

Hatóanyagok fizikai tulajdonságai alatt azokat a jellemzőket értjük, amelyek csak a szilárd fázisú hatóanyag sajátjai: kristályszerkezet, a szemcsék mérete, alakja, a szemcsehalmaz tulajdonságai (halmazsűrűség és folyási tulajdonságok). A hatóanyag kristályosítási lépésében alakul ki a hatóanyag szennyezésprofilja és a kristályrácsba, kristály felületén lévő pórusokba bezárt maradékoldószer mennyisége is, így ezeket a szemcsék alakjától, méretétől, azaz a szemcseszerkezettől függő tulajdonságokat is érdemes ebben a körben tárgyalni. A fizikai jellemzők jelentősége a szemcsés halmaz feldolgozhatóságában rejlik.

Az elérhető szakirodalomban számos példa van a kristályosítási vagy örlési paraméterek hatására a termék szemcseméret-eloszlására¹. A továbbiakban a saját példákban nem a teljes szemcseméret-eloszlást, hanem néhány jellemző paraméterét fogjuk használni, mint $d_{4,3}$, d_{10} , d_{50} és d_{90} értékek. Az első a térfogat szerinti átlagmérték. A többi jellemző mikrométerben kifejezve az az érték, amelynél a szemcsehalmaz szemcséinek 10, 50 és 90%-a kisebb szemcsemérettel rendelkezik.

A további szemcsés tulajdonságok függésére a folyamatparaméterektől kevesebb példát találunk, ezek beépülnek a gyógyszergyárak belső tudástárába. A halmazsűrűség alatt adott szemcsés halmaz látszólagos sűrűségét értjük, amely tartalmazza az anyag és a szemcsék közti levegő térfogatát és tömegét is. Ez lehet tömörítetlen (más néven laza), valamint tömörített is. A kifolyást jellemzően egy szabványos tölcserből történő kifolyással mérjük.

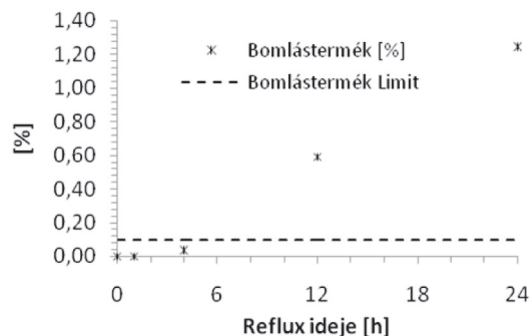
2.1. Kémiai tisztaság

A kristályosítás gyógyszerhatóanyagok esetében is alkalmazott tisztítási lépés. A terméknek igen szigorú követelményeknek kell megfelelnie. Jellemzően az

átkristályosítás, sóképzés során a szennyezők jelentősen csökkennek és – a kristályosítást hasonlóan vezetve – gyártási tételről gyártási tételre hasonló tisztulást lehet megfigyelni.

Carvedilol hatóanyag intermedierének laboratóriumi kristályosításainál azt figyeltük meg, hogy a jellemző szennyező mennyisége nagyon ingadozik a termékben. A kristályosítandó anyagban jelentős mennyiségben volt jelen a szennyező, szokásos kristályosításoknál ez kb. tizedére csökkent, viszont néhány esetben csupán ötödére. Ez utóbbi anyagból már nem lehetett megfelelő minőségű hatóanyagot gyártani. A hűtéses kristályosítást vizsgálva megállapítottuk, hogy különböző kísérletekben azonos hűtési profilt alkalmazva nagyon ingadozott a kristálykiválás hőmérséklete. A rendszer hajlamos volt az erős túlhűtésre, ez pedig azt jelentette, hogy a kristályosodás nagy hajtóerőnél, azaz nagy túltelítési értéknél indult meg. A nagy túltelítés a göcképződésnek kedvez, így apró kristályok keletkeznek, amelyek sok anyalúgot tudnak magukban tartani. A sok anyalúg nehezen vagy csak jelentős veszteséggel mosható ki, így oka volt a megnövekedett szennyező tartalomnak. Ezt megakadályozandó bevezettük a kristályosodás kontrollját, azaz a megfelelő hőmérsékleten oltva szabályoztuk a túltelítést, a termék szemcseméretét. Ezen apró módosítással sikerült a termék szennyező tartalmát állandósítani.

Általában a kristályosítás tisztítja a terméket, de előfordulhat az a kedvezőtlen eset is, ahol a kristályosítás oldószerében a termék bomlik és szennyező keletkezik. Ezt az esetet legegyszerűbben más oldószer választásával lehet elkerülni. De előfordulhat, hogy erre nincs lehetőség, mert például a bomlástermék oldószertől függetlenül, az oldás során alkalmazott magas hőmérséklet hatására keletkezik. Ekkor nagy hangsúlyt kap a szennyező keletkezésének idő- és hőmérséklet-függése. API-01 esetében megfigyeltük, hogy a bomlástermék az alkalmazott oldószerrel reflux hőmérsékletén keletkezik.



1. Ábra. API-01 bomlása kristályosítást megelőző beoldás során.

* Tel.: 0618031729; e-mail: markovits.imre@egis.hu

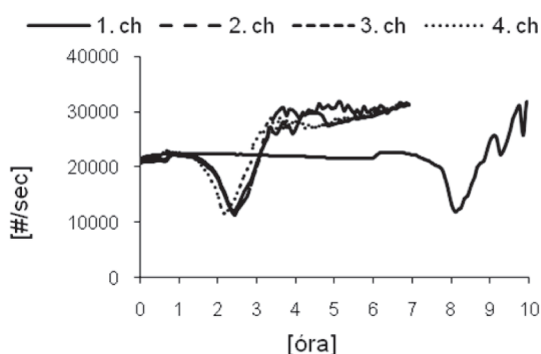
A mért eredményekből (1. ábra) jól látható, hogy kb. 4 óra alatt a szennyező elenyésző mértékben keletkezik, tehát az üzemi megvalósítás során legfeljebb 4 óráig szabad reflux vagy ahhoz közeli hőmérsékleteken tartani a reakcióelegyet.

2.2. Polimorfia

A kristályos hatóanyagok azon képessége, hogy különböző kristályszerkezetben képesek létezni (a hatóanyagok polimorfija), számos érdekes példában jelentkezik a gyógyszerhatóanyagok eljárásfejlesztése, gyártása során. Most csupán egy jelenséget emelek ki: a szilárd formák átalakulását oldószeres szuszpenzióban, ekkor az átalakulás kezdetét vagy végét kell jelezni. Az első esetben az átalakulást szeretnénk elkerülni, a második esetben pedig biztosak akarunk lenni, hogy lejátszódott. Az átalakulás mintavétele, off-line követése mellett egyre nagyobb teret kapnak az in-line technikák, a process analytical technology (PAT) eszköztárába tartozó mérések.

Ilyen mérőtechnika lehet az in-line Raman-szonda, hiszen az képes a szuszpenzióban lévő szilárd fázis monitorozására.² Másrészt a folyamat során általában jelentősen változik a szemcsék mérete, alakja is, azaz a szemcseméret mérésére alkalmas valamely módszer, mint a fókuszált lézerek visszaverődésén alapuló (Focused Beam Reflectance Measurement, FBRM) mérőmódszer³ vagy a zavarosság mérés is jelezheti az átalakulást.⁴

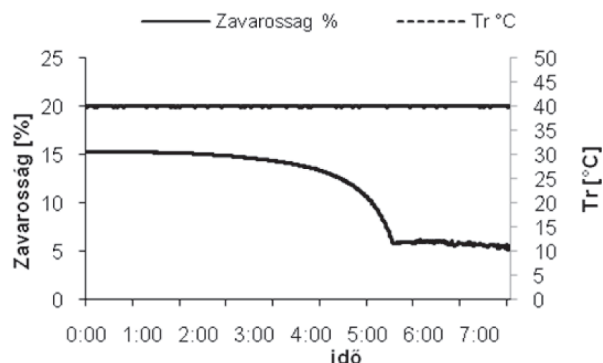
Az amorf-kristályos átmenet akkor lehet szükséges, ha a hatóanyag amorf formában keletkezik és idő kell a nagy energiatartalmú, amorf forma átalakulásához a stabilabb kristályos alakká. API-02 esetében FBRM berendezéssel követtük üzemi készülékben az átalakulást (2. ábra). Az ábrán az idő függvényében a másodpercenként mért szemcseszámot ábrázoltuk.



2. Ábra. Amorf-kristályos átmenet vizsgálata FBRM berendezéssel.

Az ábráról kitérünk a négy gyártási tétel esetében, hogy az átalakuláshoz egy jellegzetes változás tartozik a görbén: 2-4. gyártási tétel esetében 1,5 és 3,5 óra közötti szakasz. Ekkor az amorf szemcsék átalakulnak a kristályos formává, amit laboratóriumi kísérletekben előzőleg igazoltuk menet közben vett minták röntgen-pordiffrakciós vizsgálatával. Az első gyártási tétel esetében később történt meg az átalakulás,

a többinél szinte egy időben, hiszen az első gyártási tételt még nem oltották be az előző gyártási tételből visszamaradt kristályok.



3. Ábra. Kristályos formák közötti átalakulás követése zavarosságmérővel.

API-03 esetében két kristályos forma közötti átalakulást vizsgáltunk zavarosság mérővel (3. ábra).

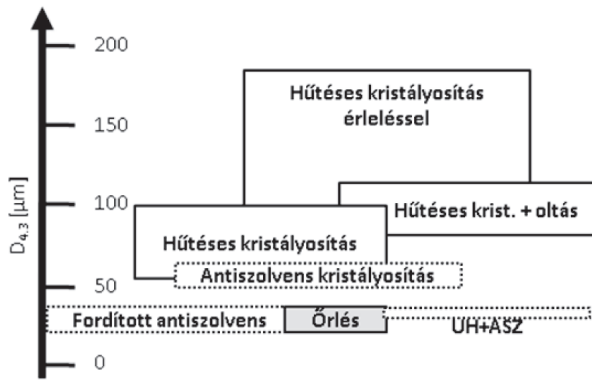
A hatóanyag esetében folyamat közbeni minták röntgen-pordiffraktogramjainak elemzésével igazoltuk, hogy az átalakulás befejeződése valóban a zavarosság jel állandósulásához köthető.

2.3. A hatóanyag szemcseméret-eloszlás változtatásának lehetőségei

A hatóanyag kívánt szemcseméret-eloszlásának kialakítására alkalmas módszer az elérendő szemcseméret tartománytól függ. Más eljárás szükséges a nano, mikro vagy ennél nagyobb méretű hatóanyagok előállítására. Általában igaz, hogy célzott szemcseméret-eloszlású kristályos hatóanyagok leginkább egy kristályosítási és egy őrlési eljárás kombinációjával állnak elő. Felmerül a kérdés, mire alkalmas a kristályosítás és mire alkalmas az őrlés. Az őrlés felesleges, mert minden megoldható kristályosítással? Fordítva is feltehető a kérdés: teljesen mindegy, milyen a kristályosítás terméke, őrléssel úgyis minden helyrehozható? Természetesen minden esetben a megfelelő szemcseméret elérése mellett a hatóanyaggal kapcsolatos összes gyógyszeripari követelménynek meg kell felelni.

2.3.1. A kristályosítás teljesítőképessége

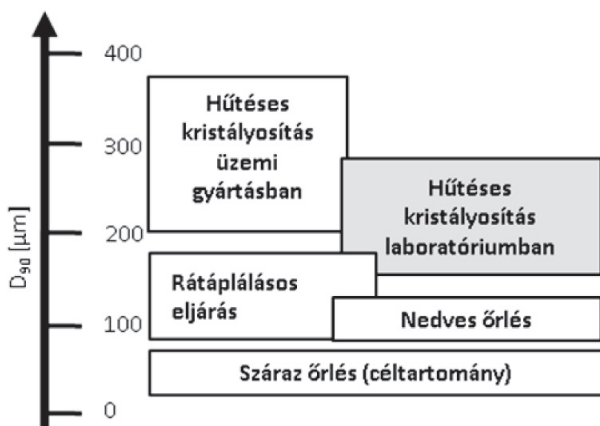
A nano méretű hatóanyagok előállításával nem foglalkozunk ebben a közleményben, csupán a $2 \mu\text{m} \leq d_{4,3} \leq 200 \mu\text{m}$ tartományba esőkkel. API-04 (4. ábra) esetében számos kristályosítási módszert kipróbáltunk,⁵ az egyes kristályosítási eljárások esetében szisztematikusan változtattuk az eljárás paramétereit, persze nem tévesztve szem elől az üzemi megvalósíthatóságot sem. A hűtéses kristályosítás mellett alkalmaztunk antiszolvens kristályosítást, ahol a hatóanyag oldatából egy azt rosszul oldó oldószerrel idéztük elő a kristályosodást. Fordított antiszolvens eljárásnál az antiszolvensbe adagoljuk a hatóanyag oldatát.



4. Ábra. API-04 kristályosításával elérhető átlagméretek.

Azt találtuk, hogy $d_{4,3}$ átlagérték esetében a $15 \mu\text{m} \leq d_{4,3} \leq 200 \mu\text{m}$ nagyságú tartomány elérhető. Látható, hogy a hűtési kristályosítás és variánsai lefedik az $50 \mu\text{m} \leq d_{4,3} \leq 200 \mu\text{m}$ tartományt. Antizolvens kristályosítással vagy fordított antizolvens kristályosítással, pedig már az $50 \mu\text{m}$ alatti tartomány is elérhető.

API-05 (5. ábra) esetében szintén több módszerrel kristályosítottunk, a szokásos eljárások mellett alkalmaztuk a jellemzően kis szemcséket eredményező speciális hűtési kristályosítást, a rátáplálásos eljárást. Ennek során a hatóanyag telített, forró oldatát a hatóanyag hideg szuszpenziójába adagoljuk, így biztosítva a gyors hűtést és kristályosodást.⁶



5. Ábra. API-05 kristályosításával elérhető szemcseméret tartományok.

A fenti példákban látható, hogy az alkalmazható módszerek minden egyes hatóanyagánál kijelölnek egy elérhető szemcseméret tartományt, amely magába foglalhatja akár a mikronizálással elérhető tartományt is, azaz a mikronizált termék kristályosítással vagy kristályosítás és őrlés kombinációjával is előállítható.

Vannak azonban olyan esetek is, amikor az eredmények mechanikus értelmezése tévútra viheti a fejlesztést. Cetirizine*2HCl hatóanyag esetében a kristályosító eljárást kellett felülvizsgáljunk, mert túl nagy szemcsék keletkeztek⁷, mégis kis intenzitású aprítást alkalmazva könnyen ki lehetett csúszni az alulról korlátos szemcseméret tartományból, amelyet az átlagos szemcseméret paraméterre állítottak fel. A szemcséket mikroszkóppal megvizsgálva kis szemcsék agglomerátumait figyeltük meg. Így érthetővé

vált, miért viselkedett a várttól eltérően az aprítás során az anyag. Nem azt az utat választottuk, hogy az agglomerált szemcsék méretét csökkentjük, hanem az agglomerátumokat felépítő egyedi szemcsék méretét terveztük növelni. Ennek megfelelően az eljárás kifejlesztése során ebbe az irányba tettünk lépéseket, azaz az antizolvens kristályosítás során többek között az antizolvens adagolásának lassításával és a kristályosítás megindulásának irányításával (oltás) valóban nagyobb egyedi szemcséket kaptunk, minimális agglomerációval, amelyek megfeleltek a követelményeknek.

2.3.2. Mire képes az őrlés?

A gyógyszeriparban alkalmazott számos malomtípus közül jelentős hányadot képviselnek a kalapácsos és verőcsapos malmok, valamint a mikronizálásra alkalmas légsugármalmok is. Az alábbiakban egy gyógyszeriparban használatos anyag példáján mutatjuk be, mit várhatunk el egy légsugármalmtól.

A légsugármalom olyan malom, amelyben az őrlőgázba adagolt aprítandó anyag injektoron keresztül jut be az őrlőtérbe, majd az őrlőgáz hatására a nagy energiájú szemcse-szemcse ütközések következtében a termék szemcsemérete jellemzően a mikronizált tartományba esik.

NaHCO₃ őrlését vizsgáltuk laboratóriumi őrlő berendezésen. Korábbi kísérleteink bizonyították, hogy ez a választott modell anyag keményebb, mint a mikronizálási kísérleteinkben felhasznált többi hatóanyag. A mikronizálási kísérletekben a két legjellemzőbb faktor hatását vizsgáltuk: őrlőnyomás ($p_{\text{örlo}}$), és az adagolási sebesség (v_{adagolas}) hatását a termék szemcseméret-eloszlásának d_{90} paraméterére.

Háromszintes két faktoros tervben, adott kiindulási szemcseméret-eloszlású termékből kiindulva elvégeztük a kísérleteket és statisztikai értékelő módszerekkel sikerült egy olyan, $d_{90} = f(p_{\text{örlo}}, v_{\text{adagolas}})$ összefüggést meghatározni, amely meglehetősen jó predikciós képességgel rendelkezik.

A kétdimenziós felületet (6. ábra) leginkább „az egyik sarkán megemelt asztalterítőhöz” lehet hasonlítani, hiszen alacsony őrlőnyomáson és nagy adagolási sebességnél az elégtelen számú és energiájú szemcse-szemcse ütközések miatt a mikronizálandó anyag részben mikronizálódik (bypass jelensége), így a termék bimodális eloszlást mutat. Az eloszlás kétcsúcú sűrűség-görbéje a mikronizált termék és a részben mikronizált kiindulási anyag keveréke, így akár a mikronizált tartománynál nagyobb tartomány is elérhető ($d_{90} > 20 \mu\text{m}$). A légsugármalmot a mikronizált terméket eredményező tartományban üzemeltetve lényegesen kisebb lesz az őrlési paraméterek ingadozása miatt bekövetkező ingadozás a termék szemcseméret-eloszlásában. Természetesen a malmot a „bypass tartományban” is lehet üzemeltetni, amennyiben a bimodális eloszlás nem hat kedvezőtlenül a hatóanyag feldolgozhatóságára vagy gyógyszer-készítmény tulajdonságaira. Ám arra figyelemmel kell lenni, hogy ebben a tartományban mind a malomparaméterek ingadozására, mind a kiindulási anyag szemcseméretének változására jelentősen megváltozhat a termék szemcseméret eloszlása. Robosztus mikronizálási eljárás kidolgozásakor a bypass tartomány kerülendő, így azonban egy malom konfigurációval csak egy meglehetősen szűk szemcseméret tartomány lesz elérhető.

2.4. Halmazsűrűség értékek

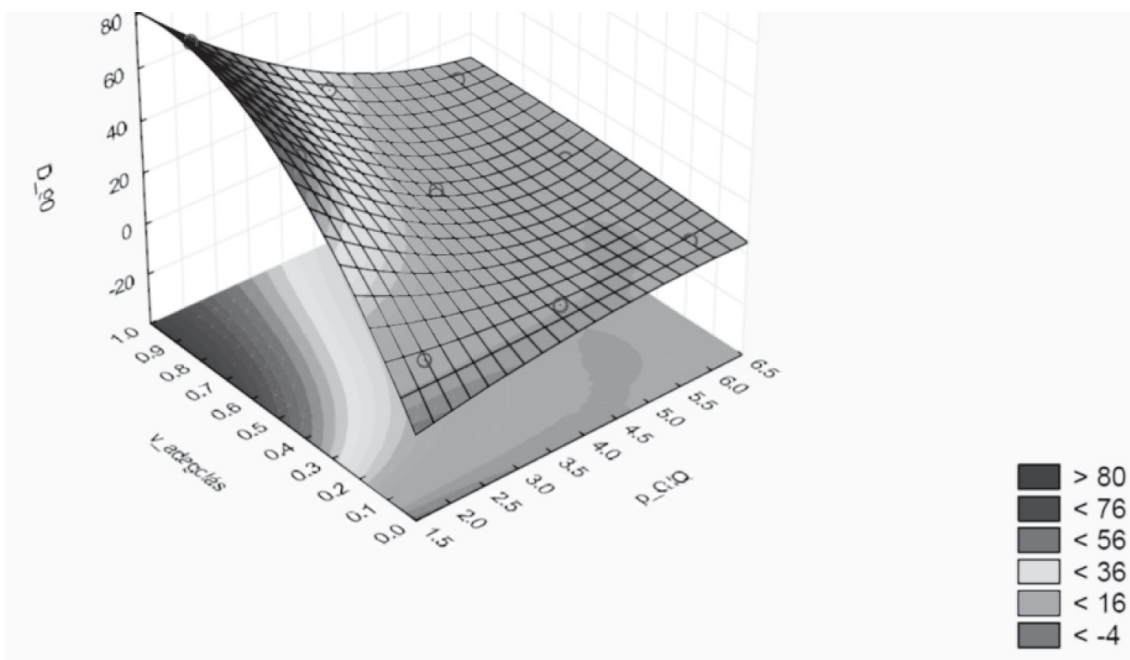
A halmaz sűrűsége alatt adott térfogathoz tartozó tömeget értjük, amely lehet mechanikai behatás nélküli (laza térfogattömeg: LTT) és mechanikai tömörítési eljárással elért (tömörített térfogattömeg: TTT).

A halmazsűrűség értékek nagyon egyszerűen meghatározhatók, de aktuális értéküket számos paraméter befolyásolja a halmaz egyéb mérhető tulajdonságai közül. Tapasztalataink szerint a leginkább meghatározó a por

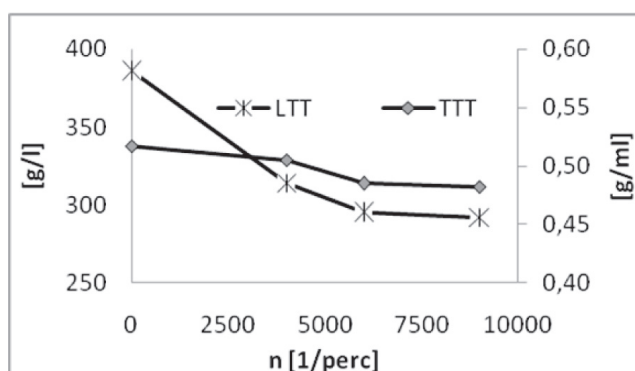
szemcseméret-eloszlása, a szemcsék alakja, de ezen kívül számos nehezen mérhető tulajdonság is hatással van rá: például elektrosztatikus feltöltöttség és előtömörítettség.

Az elektrosztatikus feltöltöttség a szemcsék közötti taszítás miatt a halmaz sűrűségét csökkenti, míg a tömörítettség növeli. Ezért nagyon fontos a körültekintő mérés, ellenkező esetben torzított eredményeket kapunk.

Az alábbi (API-06) hatóanyagnál vizsgáltuk az őrlés hatását a hatóanyag halmazsűrűségére (7. ábra).



6. Ábra. NaHCO₃ mikronizálása: d_{90} értékének függése az adagolás sebességétől ($v_{\text{adagolás}}$) és őrlőnyomástól ($p_{\text{örlo}}$).



7. Ábra. Halmazsűrűség értékek változása API-06 őrlése során.

Azt tapasztaltuk, hogy az aprítás intenzitását növelve a kalapácsos malom fordulatszámának növelésével csökkent a szemcseméret és a csökkenő szemcsemérettel az LTT és TTT értékei is csökkennek.

Persze nem mindegy, milyen hatóanyagból indultunk ki az aprítás során (1. táblázat). Látható, hogy ugyanúgy őrlve a különféle módon kristályosított hatóanyagokat, nem minden esetben csökken a halmazsűrűség.

Az aprított termékek esetében mind az eloszlás jellemzők, mind a halmazsűrűség értékek hasonlóak, azaz hasonló

szemcseméret-eloszlású anyagnál hasonló halmazsűrűség értékekre lehet számítani. Természetesen mindkét mérőmódszer szórását figyelembe véve lehet a hasonlóságot kijelenteni.

API-04 esetében előállítottunk az aprításhoz hasonló szemcseméretű termékeket direkt kristályosítással (2. táblázat).

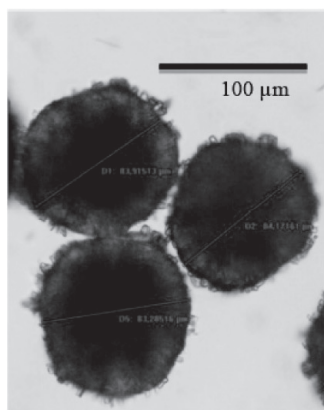
1. Táblázat. Különböző szemcseméretű API-06 minták őrlése azonos szemcseméretre

Ssz.	Őrlés előtt				Őrlés után			
	d_{10}	d_{50}	d_{90}	TTT	d_{10}	d_{50}	d_{90}	TTT
[-]	[μm]	[μm]	[μm]	[g/ml]	[μm]	[μm]	[μm]	[g/ml]
1	15	35	64	0,30	4	20	43	0,44
2	4	21	59	0,40	2	13	36	0,40
3	8	35	72	0,50	3	16	39	0,41

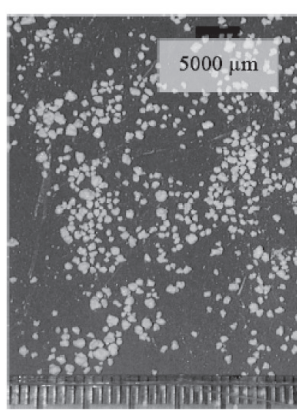
Két, direkt kristályosítási módszert találtunk alkalmasnak: A fordított antiszolvens kristályosítás mellett az ultrahanggal segített antiszolvens kristályosítás is hasonló terméket adott. Az adatokból látható, hogy nagy az eltérés a direkt kristályosítással előállított termék és a kristályosítást követő

apritással előállított termékek halmazsűrűségei között. Előzőé lényegesen alacsonyabb, bizonyítva azt is, hogy ennél a hatóanyagnál az előállítás útja jelentős hatással volt a termék halmazsűrűségére.

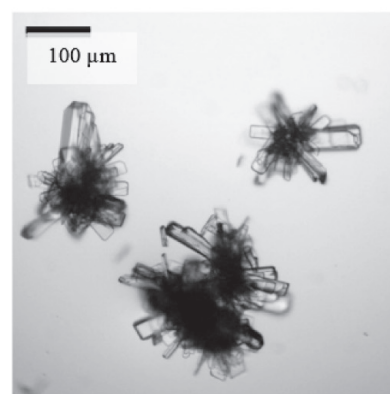
Következésképpen a laza térfogattömeg értékre a teljes szemcseméret-eloszlásnak van hatása. Amennyiben egy szűk halmazsűrűségű anyagot szeretnénk előállítani kristályosítás és őrlés kombinációjával, akkor mindkét eljárási lépés paramétereinek lehet hatása a termék halmazsűrűségére. Az őrléssel és kristályosítással előállított hatóanyag és a direkt kristályosítással előállított hatóanyag halmazsűrűsége között jelentős különbség lehet.



Szférikus polikristály (Clopidogrel-biszulfát)



Szférikus agglomerátum (API-07)



Szférikus kristálynövekedés (Metildopa)

8.Ábra. Szférikus termékek.

2.5. Folyási tulajdonságok

A hatóanyagok folyási tulajdonságai általában nem jók. Erre a mi gyakorlatunkban is számos példát találtunk. API-04 esetében vizsgáltuk, hogyan lehetne javítani a folyási tulajdonságokat a kristályosítási paraméterek változtatásával. Számos módszert kipróbálva a szemcseméret tartomány széles tartományban változott, de ezek közül csupán a legnagyobb szemcséket tartalmazó halmaz, az Ostwald-féle érleléssel kombinált hűtési kristályosítás terméke (4. ábra) mutatott értékelhető kifolyási sebességet.

A hatóanyag folyási tulajdonságait tudjuk javítani a szférikus szemcsék előállításával. Egyes esetekben a kristályosodás során eleve gömbszférikus polikristályos szemcsék keletkeznek (8. ábra). Más esetben a kristályosítási eljárás módosítható úgy, hogy az egyedi kristályokból a hatóanyaggal összeceментált szférikus agglomerátumok keletkezzenek.¹⁰ Megfigyeltük azt is, hogy némely hatóanyag a kristályosodás növekedési fázisában képes – azt segítő körülmények között – szférikus szemcsét képezni.

2.6. Maradékoldószer-tartalom

Hatósági irányelvek⁹- rögzítik a hatóanyagokban maradó szerves oldószerek maximális megengedett mennyiségét. Jellemzően a maradékoldószer-tartalom biztosítása nem ütközik nehézségekbe, de a gyakorlatunkban voltak olyan hatóanyagok is, amelyek esetében ez problémát jelentett. Két példát mutatunk be.

2. Táblázat. Különböző utakon előállított, hasonló átlagos szemcseméretű API-04 hatóanyagminták halmazsűrűségei

Sz.	Leírás	$d_{4,3}$	LTT	TTT
[-]	[-]	[μm]	[g/l]	[g/ml]
1	Direkt kristályosítás	32	0,14	0,27
2	Direkt szonokristályosítás	28	0,29	0,59
3	Kristályosítás+apritás	31	0,38	0,64
4	Kristályosítás+apritás	32	0,41	0,68
5	Kristályosítás+apritás	30	0,4	0,65

API-08 gyártása hűtési kristályosítással történt etanolból. A hűtési kristályosítási eljárás kidolgozása során három hűtési sebességet alkalmaztunk: $\Delta T/\Delta t=4,1$; 0,4 és 0,3 °C/perc sebességet. A termékek tulajdonságai közül vizsgáltuk az etanol-tartalmat, az átlagos szemcseméretet ($d_{4,3}$), a pórustérfogatot és a fajlagos felületet, a hűtési sebesség függvényében.⁸

3. Táblázat. API-08 kristályosításai vs. maradékoldószer-tartalom

$\Delta T/\Delta t$	$d_{(4,3)}$	F_{BET}	$V_{\text{PÓRUS}}$	Etanol
[°C/min]	[mm]	[m ² /g]	[cm ³ /g]	[ppm]
4,1	43,9	0,905	0,0028	4964
0,37	57,2	0,480	0,0011	2232
0,30	79,9	0,288	0,00095	525

Az eredményekből látható (3. táblázat), hogy a hűtési sebességet csökkentve megnőtt az átlagos szemcseméret és lecsökkent a termékből szárítással nem eltávolítható oldószer mennyisége. Ennek okát kutatva a termékek pórusszerkezetét hasonlítottuk össze. Látható, hogy a szemcsék felülete jelentősen csökken, másrészt a kristályok felületén a kristályosodási hibák miatt kialakuló pórusok mennyisége is harmadára csökkent. Ebből következik, hogy a leglassabb hűtési sebességet alkalmazva a kristályosodás kevesebb pórust termel, így kisebb esély van arra, hogy bezárult pórusok, zárványok legyenek a kristályokban.

API-01 esetében szintén egy hűtéses kristályosítással állítottuk elő a terméket, acetonitrilből kristályosítva. A szabályozás szerinti limit alacsony, mindössze 410 ppm. Változtattuk a hűtéses kristályosítás paramétereit, de pusztán kristályosítással nem sikerült biztonsággal a limit alá kerülni. Nagyon lassú hűtési ütemet és oltást alkalmazva 413 ppm maradék oldószert sikerült elérnünk. A hatóanyaggyártás következő lépése egy légsugármalommal történő őrlés volt, amely az oldószert nézve teljesen száraz nitrogénben történt. Így várható volt, hogy a szemcseméret csökkenés és a relatív nagy mennyiségű száraz gáz hatására csökken a maradékoldószer-tartalom.

4. Táblázat. Az acetonitril tartalom változása API-01 mikronizálása során

Minta neve	D ₅₀	D ₉₀	Acetonitril*
[-]	[µm]	[µm]	[ppm]
Kiindulás	91	238	1011*
1. minta	22	72	620
2. minta	11	27	392
3. minta	10	24	319

*normál szárítás 50°C, vákuum, tovább szárítva 100°C-on 24 órán át 896 ppm-re csökkent

A 4. táblázat adatai mutatják, hogy mikronizálással csökkenthető volt a termék acetonitril tartalma. Összességében megállapítható, hogy API-01 hatóanyag esetében a kristályosítási és őrlési paraméterek célszerű megválasztásával elérhető a kívánt maradékoldószer-tartalom követelmény. Ellenkező esetben, ha emelt hőmérsékletű, hosszú ideig tartó vákuumszárítást alkalmazva sem csökken jelentősen a maradékoldószer mennyisége, akkor csupán egy lehetőség marad, a terméket a megfelelő módszerrel át kellett kristályosítani.

3. Összefoglalás

Összefoglalva elmondható, hogy a gyógyszeripari gyakorlatban nagyszámú kristályosító módszer, valamint a többféle őrlőberendezés nyújtotta őrlési, aprítási lehetőségek kombinálásával számos út áll rendelkezésre a megfelelő fizikai tulajdonságokkal rendelkező por alakú gyógyszer hatóanyag előállítására.

Példákat mutattunk be arra, hogy a sokféle lehetséges utat számos tényező csökkentheti. Például a kémiai tisztaság kedvezőtlen alakulását is okozhatja a kristályosítási vagy őrlési eljárás. Például a nem megfelelően szabályozott kristályosítási eljárás miatt vagy a hatóanyag kémiai bomlása a kristályosító közegben növelheti egyes szennyezők mennyiségét. Arra ugyan nem mutattunk példákat, de akár az őrlés során is változhat a szennyezés profil, kristályszerkezet, maradékoldószer-tartalom például az őrlés okozta mechanikai behatás vagy keletkező hő hatása miatt. Behatárolja a lehetőségeket a kristály módosulatok átalakulása, például egy metastabil forma előállítása során az oldószertben eltöltött idő és a hőmérséklet fontos paraméterei az eljárásnak, hiszen a legtöbb esetben csak ezekkel a paraméterekkel akadályozhatjuk meg vagy tehetjük teljessé a szilárd fázis átalakulását egy stabilabb formává. A termék halmazsűrűségét meghatározhatja, milyen úton készült a

termék: direkt kristályosítással vagy őrlés és kristályosítás kombinációjával. Azt is bemutattunk néhány példán keresztül, hogy hogyan változik a halmazsűrűség adott hatóanyag őrlése során. Szűk halmazsűrűségű termék előállításánál mind a kristályosítási, mind az őrlési paramétereket szabályozni kell. Hatóanyagok folyási tulajdonságai javíthatók speciális eljárásokkal, néhány példát mutattunk különböző típusú szférikus szemcsékre. A maradékoldószer-tartalom is erősen behatárolhatja a lehetséges oldószereket vagy a kristályosítási és őrlési eljárás paramétereit. Példán keresztül mutattuk be, hogy mind a kristályosítási, mind az őrlési paraméterek változtatásával csökkenthető a termék maradékoldószer tartalma. Megállapítottuk azt is, hogy vannak olyan esetek, amikor csak átdolgozással javítható adott tétel maradékoldószer-tartalma, így a nagyon alacsony megengedett határértékkel rendelkező oldószerek, oldószer keverékek kerülendők.

Következésképpen egy kívánt fizikai tulajdonságokkal rendelkező hatóanyag előállításának utolsó lépéseinél, amely a kristályosítástól kezdődően a pormegmunkálásig tart, az eljárás megfelelő folyamat paramétereinek kiválasztása komplex megközelítést igényel.

Hivatkozások

- Mulin, J. W. Crystallization, Elsevier Butterworth-Heinemann, Oxford, **2001**; pp. 368-403.; Farkas, B., Révész, P. Kristályosítástól a tablettázásig, Universitas Szeged Kiadó, Szeged, **2007**, pp. 167-225 (kristályosítás) pp. 362-372 (mikronizálás); Mersmann, A. Crystallization Technology Handbook, Marcel Dekker Inc., **2001**, pp. 285-322. Tung H. H., Paul, E. L., Midler M., McCauley J. A. Crystallization of Organic Compounds, An Industrial Perspective, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, **2009**, pp. 137-278; Myerson A. S. Handbook of Industrial Crystallization, Butterworth Heinemann, Boston, **2002**, pp. 101-114.
- Pataki, H. Diplomadolgozat, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi egyetem, **2009**; Pataki, H.; Markovits, I.; Vajna, B.; Nagy, K Zs.; Marosi, Gy. J. *Crystal Growth & Design*, **2012**, *11*, pp. 5621-5628.
- Zhao, Y., Bao, Y., Wang, J., Rohani, S. *Pharmaceutics*, **2012**, *4* (1) pp 164-178.; Barthe, S. C., Grover, M. A., Rousseau, R. W. J. *Cryst. Growth & Des.*, **2008**, *8* (9), pp 3316-3322.
- Simon, L. L., Reinlein, S., Hungerbuehler, K. *Proceeding of 18th International Symposium on Industrial Crystallization*, **2011**, Zürich, pp 48-49.
- Csanaky, L. Diplomadolgozat, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, **2013**; Csanaky L., Markovits I., Farkas F.: Hatóanyag tulajdonságainak vizsgálata a kristályosítástól az aprításig. *Kristályosítási és Gyógyszerformuláló Szakosztály Kerekasztal Konferencia*, 2013, Balatonalmádi.
- Markovits, I.; Farkas, J.; Róna, P.; Rausz, V.; Janiné Vakulya, G.; Nagy, K.; Farkas, B. In: *Proceeding of the International workshop on Industrial Crystallization*, Louhi-Kultanen, M.; Hatakka, H. Ed.; Lappenranta, Digipaino, **2009**. pp. 23-30.
- Markovits, I.; Bartha, F.; Katona, Z.; Nagy, K.; Janiné-Vakulya, G.; Farkas, B. *Műszaki Kémiai Napok*, **07**, **2007**, Pannon Egyetem, pp. 76-78.
- Farkas, F.; Markovits, I.; Farkas, B. *Kristályosítási és Gyógyszerformuláló Szakosztály Kerekasztal Konferencia*, **2012**, Balatonszemes.
- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ICH Harmonized Tripartite Guideline Impurities: Guideline for Residual Q3C.

10. Krasznai, Gy.; Kovács, J.; Markovits, I.; Janiné-Vakulya G.; Nagy, K.; Farkas, B. *Műszaki Kémiai Napok*, 06, 2006, Pannon Egyetem, pp. 5-8.

Fine tuning of physical properties of active pharmaceutical ingredients

Physical properties, like particle size distribution (PSD), polymorphism, bulk density (tapped or not), and flowability are very important characteristics of active pharmaceutical ingredients from the point of view of processability. Physical properties, like chemical purity, crystal structure, particle size distribution, bulk density, flowability, residual solvent content are generated during a process that starts from crystallization and ends with milling. In the article case studies are shown how to modify physicochemical properties by process parameters.

Chemical purity. Crystallization has a cleaning effect so usually the crystallized product contains chemical impurities at lower levels. Crystallizing an intermediate of carvedilol the product mostly contained one of the impurities less than tenth compared to the original amount. But in some cases this purification effect was lower, only fifth of the original amount and in this case the quality of API was not sufficient. The fluctuation of the impurity level could be eliminated modifying the crystallization process. Introduction of seeding protocol stabilized the PSD of the product and chemical purity of API was secured. The reason for this is that the problem was basically an issue of removing and washing out the mother liquor from the wet, solid product. In some cases the crystallization can modify unfavorably the product's chemical purity, if side product is formed during the process. API-01 was crystallized from a solvent mixture, and at reflux temperature the decomposition reaction was considerable fast (Fig. 1), so a special temperature profile had to be introduced to ensure the pure product.

Polymorphism. Polymorphism has many aspects it can occur in the API development and production. Only one aspect is discussed in details, it is the transformation of solid forms. Two examples are presented in which this transformation was tracked with process analytical tools like focused beam reflectance measurement (FBRM) or turbidity probe. Fig. 2 shows measured particle numbers of API-02 vs. time curves collected by FBRM probe. It was justified by off-line X-ray powder diffraction measurements (XRPD), that characteristic change of the curve between 1.5-3.0 hours (batch No 2-4) and 7-9 hours (batch No. 1) indicates the transformation. In the case of API-03 a polymorph transformation was followed by turbidity measurement (Fig 3).

PSD: The suitable method to adjust the PSD of an API depends on the PSD range to reach. To manufacture a product in the micronized or higher PSD range can be accomplished by a combination of crystallization and milling method. The question arose what is the performance of crystallization and that of milling.

Performance of crystallization. In the case of API-04 several crystallization methods were systematically tested, and the average particle sizes ($d_{4,3}$ values) have been compared (Fig. 4). The experiments revealed that the range $50 \mu\text{m} \leq d_{4,3} \leq 200 \mu\text{m}$ can be reached using cooling crystallization. The antisolvent crystallization technique was able to produce a material having $d_{4,3} \leq 50 \mu\text{m}$. The whole PSD range that crystallization can cover is $15 \mu\text{m} \leq d_{4,3} \leq 200 \mu\text{m}$. API-05 was crystallized using cooling crystallization and filling-up crystallization (special crystallization method where the hot solution of an API is added into a cold suspension of API), and

the range $90 \mu\text{m} \leq d_{90} \leq 400 \mu\text{m}$ was achieved. Cetirizine*2HCl was crystallized by an antisolvent crystallization and in some cases it produced a material that was above the upper limit of specification. It seemed as if the material contained too big particles, but light microscopy examination revealed the particles were agglomerates of fine crystals. So a process development strategy was chosen, where the main aim was to increase the individual particle size and avoid agglomeration. Changing the crystallization parameters bigger individual crystals were produced containing fewer agglomerates, and the product robustly complied with the specifications.

Performance of milling. Among the several types of mills applied in the pharmaceutical industry some type like, the spiral or opposed jet mill, pin mill and the hammer mills are used most frequently. In the presented example a spiral jet mill was used to micronize sodium bicarbonate. Preliminary experiment showed that this material bears slightly harder characteristics than the average API's. During the experiment two factors at three levels were examined. The two factors were the grinding pressure (p_{grit}) and feeding rate ($v_{\text{adagolás}}$), which are usually the most influential factors of micronizing procedure by spiral jet mill. The two dimensional surface (Fig 6) is like a "table-cover that one corner is lifted". This surface shows that there is an operational region where the milling process is very sensitive to the milling parameters and the product is coarser. In this case where the feeding rate is high and the grinding pressure low, the phenomenon of bypass (some portion of feeded material goes through the mill without or with ineffective milling) can happen resulting in coarse product having bimodal PSD.

Bulk density. Bulk density values are relatively easy to measure, but its actual value is influenced by many factors. The most influential is the PSD and the shape of the crystals, but some other, difficult to measure characteristics like electrostatic charge and pretreatment of the sample can be also influential. In the case of API-06 the effect of milling and the starting material to the bulk density was investigated (Fig. 7 and Table 1). In the case of API-04 the bulk densities of similar materials produced by different routes are compared: by either direct crystallization or combination of crystallization and milling process (Table 2).

Flowability. The flowability of API is usually not sufficient. To improve it spherical particle formation can be a solution (Fig 8.)

Residual solvent content. Rigorous guidelines regulate the residual solvent content of API's. API-08 was crystallized from ethanol by a cooling crystallization. Changing the cooling profile (Table 3) the residual ethanol content decreased under the specified limit. API-01 was crystallized by a cooling crystallization from acetonitrile. The allowed residual acetonitrile content is maximum 410 ppm, what is a very low value. We showed that changing the cooling profile the residual acetonitrile could be decreased. As the crystallized material is micronized afterwards the effect of milling parameters were investigated on acetonitrile content (Table 4.). The experiments showed that as the PSD decreasing the residual acetonitrile content is also lower.

It is concluded that a complex approach is needed to achieve a certain powder characteristics. The desired crystal form has a certain parameter window that can limit the possible crystallization routes. Bulk density, residual solvent content, and flowability can be an issue, but despite all limiting circumstances there are some ways to design a combined method of crystallization and milling to achieve the active pharmaceutical components bearing the desired powder characteristics.

Táncoló halogének: fluor atomot tartalmazó, négyszeresen szubsztituált tiofén származék szerkezetének meghatározása NMR-rel

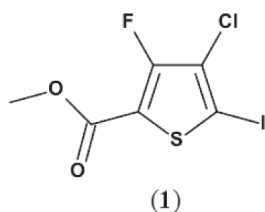
GÁTI Tamás^{a*}^aServier Kutatóintézet, Záhony utca 7., 1031 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Az NMR spektroszkópus számára gyakran különleges kihívást jelentenek a kevés (vagy nem karakterisztikus) hidrogénatomot, de sok heteroatomot és/vagy kvaterner szénatomot tartalmazó molekulák szerkezetének a meghatározása. Ilyenkor a leggyakrabban alkalmazott kétdimenziós homo és heteronukleáris NMR mérésekből (COSY, NOESY, TOCSY, HSQC, HMBC, ¹⁵N-HMBC) kapott korrelációk sokszor nem nyújtanak elegendő információt a molekulaszervezet egyértelmű meghatározásához. Ilyen esetekben gyakran származékot képeztünk feltételezve, hogy a kapott reakciótermékben a hidrogénatom hetero/kvaterner szén kedvezőbb aránya lehetővé teszi a molekulaszervezet visszafejtését. Ha azonban a szerkezetmeghatározás mindenképpen szükséges, akkor a gyakran nehézkes és drága röntgen vizsgálathoz kell folyamodni. Az NMR mérés technika dinamikus fejlődése eredményeként ma már elérhetők a hűtött NMR mérőfejjel (CryoProbeTM és ProdigyTM) felszerelt NMR spektrométerek ahol a szobahőmérsékletű mérőfejhez képest 4-5-szörös érzékenységnövekedést lehet elérni. Ennek eredményeként az NMR spektroszkópus számára kifinomult, nagyon érzékeny NMR módszerek válnak elérhetővé melyek alkalmazása és értelmezése révén a legtöbb molekulaszervezet már megfejthető és ezáltal az egykristály röntgen szerkezetmeghatározás megkerülhető.

2. A feladat

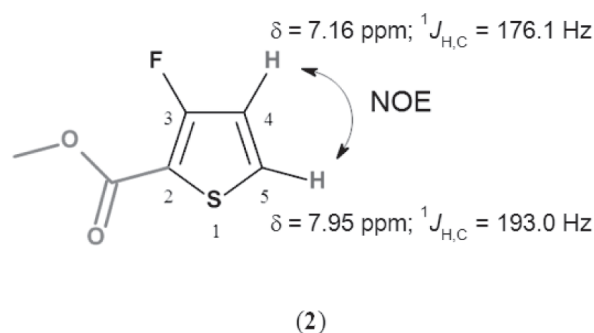
Az analitikai osztályra az alábbi négyszeresen szubsztituált tiofén származék (1) került szerkezetigazolásra.



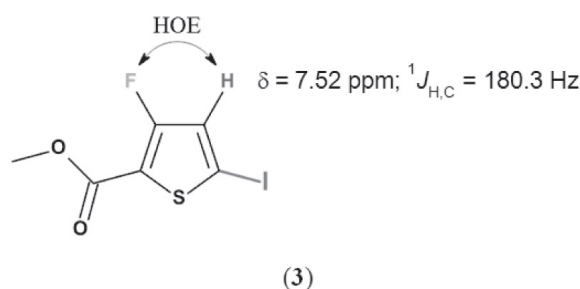
Az elméletileg lehetséges 12 szerkezeti izomer megkülönböztetése hagyományos NMR módszerekkel gyakorlatilag nem lehetséges, mivel az ¹H NMR spektrumban csupán egyetlen metoxi jel van, amely legfeljebb egy korrelációt mutat a HMBC spektrumban a karbonil szénatommal.

A feladat azonban a molekula felépítésének nyomon követése volt, ami első megközelítésre nem tűnt különösen

nehéz problémának. Az első reakciólépés a vásárolt 3-fluor-tiofén molekulán a 2-es helyzetű karboximetil csoport kiépítése volt (2). A három várható lehetséges szerkezeti izomer közül a proton-proton csatolási állandó és az NOE kölcsönhatás alapján egyértelműen igazolni lehetett a 2-es helyzetű kapcsolódást.



A második reakciólépésben a jód atom bevitele történt az 5-ös pozícióba (3). Az ¹H NMR spektrumban eltűnik az egyik sp²-es hidrogén jele. A szerkezetigazolás lehetséges pl. F-H HOE (Heteronuclear Overhauser Effect) kísérlettel.



Az utolsó reakciólépés a Cl atom bevitele volt. Itt csak az sp² hidrogén jelének eltűnését kellett nyugtáznia az ¹H NMR spektrumban, a móltömeget MS spektroszkópia igazolta.

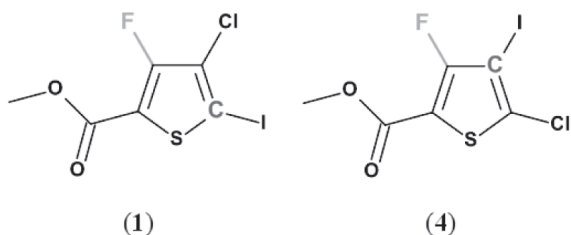
A molekulaszervezet helyessége azonban később megkérdőjeleződött, ugyanis a reakciókörülmények között (tetrametil-pirimidin, MgCl, LiCl, hexaklór-etán abszolút THF-ben, -48 °C fokon argon atmoszféra alatt) előfordulhat, hogy a halogén atomok helyet cserélnek a molekulában, amit az irodalom „táncoló halogének” jelenségként ír le.¹

3. A probléma

Egy egyszerű protonspektrum felvételével megoldható kérdés helyett így egy komoly szerkezetvizsgálati kihívással

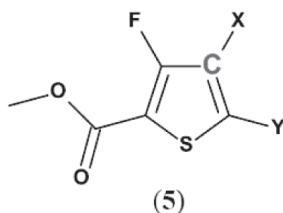
* Tel.: +36 1 8812050 ; e-mail: tamas.gati@servier.com

találtuk szemben magunkat, ahol az alábbi két szerkezeti izomert kellett egyértelműen megkülönböztetni egymástól.

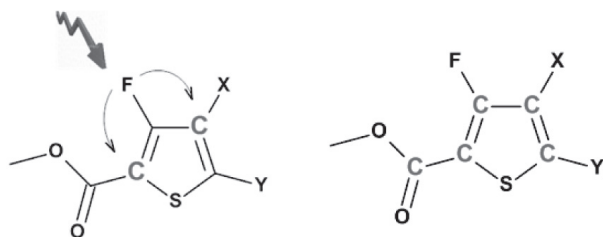


A két illetve három kötésen keresztüli C-F csatolási állandók, és a szénatomok kémiai eltolódásai a két izomerben nem különböznek szignifikánsan egymástól, így csupán az NMR paraméterek predikciójára nem hagyatkozhatunk, mindenképpen szükséges a spektrális bizonyíték. Kiindulásként megállapíthatjuk, hogy az $^1J_{F,C}$ csatolás (nagyobb, mint 200 Hz) szignifikánsan különbözik a többi C-F csatolástól, valamint azt, hogy a jód atom diamágneses hatásának (nehézatomból) köszönhetően a jód atomhoz kapcsolódó szénatom kémiai eltolódása lényegesen kisebb lesz mint a tiofén többi szénatomjéé (kiseb mint 100 ppm).

Így ha pl. a négyes szénatom kémiai eltolódását meg tudnánk határozni (5) biztosan meg lehetne határozni a molekulászerkezetet.



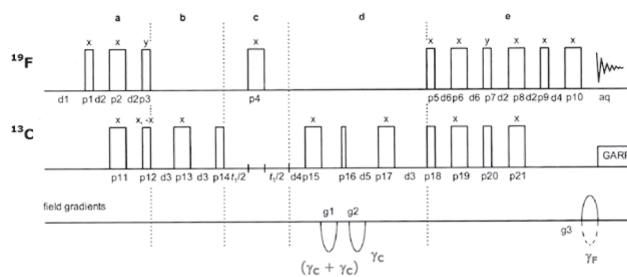
Elméletileg lehetséges NMR módszerek pl. a F-C HOE kísérlet, ahol a F atomot besugározva egy differencia spektrumban intenzitás növekedést észlelünk a hozzá térközelségben lévő 2-es és 4-es szénatomokon, vagy alkalmazhatjuk a klasszikus 2D INADEQUATE mérés technikát (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment), ahol az összes szén-szén korreláció megjelenik az NMR spektrumban (1. Ábra). Meg kell jegyezni azonban, hogy mindkét módszer rendkívül érzéketlen. Figyelembe véve a molekula rossz oldhatóságát, a kvaterner szénatomok hosszú relaxációs idejét, valamint azt a tényt, hogy a szénatomok jelei dublettéként jelentkeznek még a hűtött mérőfej technológiával is reménytelen, hogy belátható időn belül értékelhető spektrumot kapjunk.



1. Ábra. F-C HOE és 2D INADEQUATE NMR kísérletekből kapható információk.

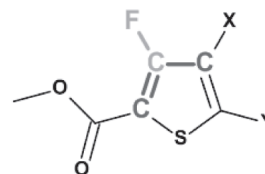
4. A megoldás

Az érzékeny fluor atommag jelenléte és az inverz detektálás eredményeként elérhető érzékenység növekedés indokolja a ^{19}F detektált 2D-(F-C)-HSQC- $^1J(\text{C-C})$ -ADEQUATE NMR pulzusszekvencia alkalmazását (Adequate sensitivity Double Quantum Spectroscopy), amely az NMR laborokban már régóta használt és a Bruker standard pulzusszekvencia könyvtárában is megtalálható ^1H , ^{13}C (1,1)-ADEQUATE ^{19}F , ^{13}C megfelelője (2. Ábra).



2. Ábra. ^{19}F detektált 2D-(F-C)-HSQC- $^1J(\text{C-C})$ -ADEQUATE NMR pulzusszekvencia.

A mérés során a mágnesezettség egy kötésen keresztül a fluor atomhoz kapcsolódó szénatomra tevődik, majd erről a szénatomról ugyancsak egy kötésen keresztül ^{13}C - ^{13}C korreláció létesül (kettős kvantum átmenet) majd, a detektálás több lépést követően az érzékenyebb fluor atomon történik. Ennek a módszernek az alkalmazásával tehát meg lehet határozni C-2 és C-4 kémiai eltolódását és így a molekula szerkezete is egyértelműen eldönthető (3. Ábra). A mérés eredményessége ugyancsak függ az $^1J_{C,C}$ csatolási állandó aktuális értékének helyes becslésétől.



3. Ábra. ^{19}F detektált 2D-(F-C)-HSQC- $^1J(\text{C-C})$ -ADEQUATE NMR kísérletből kapható információ.

Ahhoz, hogy a pulzusszekvencia ^{19}F atommagra alkalmazható legyen, ki kell számolni a dekódoló gradiens nagyságát a $^{19}\text{F}/^{13}\text{C}$ magpárra. Figyelembe véve a mágnesezettséget kódoló és dekódoló gradiens helyét a pulzusszekvenciában az alábbi egyenletet kell megoldani:

$$G_1 \cdot (\gamma_C + \gamma_F) + G_2 \cdot (\gamma_C) + G_3 \cdot (\gamma_F) = 0$$

ahol G_1 és G_2 mágnesezettséget kódoló gradiens; G_3 : dekódoló gradiens [%]; γ_C : ^{13}C rezonancia frekvenciája [Hz]; γ_F : ^{19}F rezonancia frekvenciája [Hz].

$$\gamma_F / \gamma_C = 3,7398$$

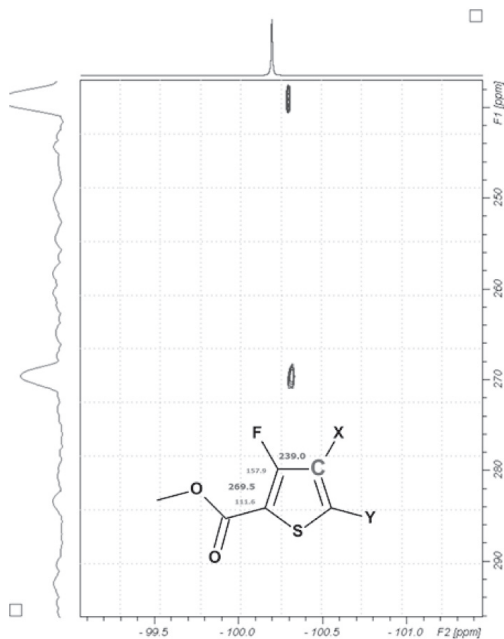
A kódoló G_1 és G_2 gradienseket az ^1H detektált pulzusszekvenciában alkalmazott értéken hagyva G_3 gradiens 62,62%-nak adódik.

$$78,4 \cdot (\gamma_C + \gamma_F) + 77,4 \cdot (\gamma_C) + G_3 \cdot (3,7398 \cdot \gamma_C) = 0$$

Mivel a ^{19}F atommag kémiai eltolódása viszonylag nagy tartományban változhat (C-F kötés esetén kb. 400 ppm), a G_3 dekódoló gradiens értékét érdemes mindig a mérendő ^{19}F atommag frekvenciájának figyelembevételével meghatározni, azaz a $\gamma_{\text{F}}/\gamma_{\text{C}}$ arányt ne a táblázatokban megtalálható giromágneses állandókból számoljuk! Szükséges esetben a G_3 dekódoló gradiens értéke, az első tizedesében több értékkel is eltérhet, ami ^{13}C - ^{13}C korreláción alapuló extrém érzékeny mérés esetében kritikus lehet a sikeres mérés szempontjából.

5. A mérési eredmények interpretálása

A 4. Ábrán a kb. 10 mg / 0,6 ml DMSO- d_6 koncentrációjú minta CryoProdigyTM mérőfejen mért ^{19}F detektált 2D-(F-C)-HSQC- ^1J (C-C)-ADEQUATE spektruma látható. A mérési idő kb. 1 órát (48 sor, 32 felvétel/inkrementum, 2 mp relaxációs várakozási idő) vett igénybe. Az F2 tengelyen a ^{19}F kémiai eltolódás skála [ppm] (a detektált atommag) található. Figyeljük meg, hogy a kalibráció után a korrelációk nem közvetlenül a ^{19}F jellel egy oszlopban vannak, hanem attól kisebb kémiai eltolódásnál, ami a ^{13}C atommag izotóp effektusával magyarázható. Az F2 tengely projekcióján az 1D ^{19}F NMR spektrum van feltüntetve, ahol 99%-ban a ^{12}C izotóp melletti fluor atom szingulett jele látható, azonban esetünkben a kb. 1%-ban jelen lévő ^{13}C izotóp melletti fluor atomról indul a kísérlet, ami a szatellit jelek átlagánál, a diamágneses eltolódás miatt a szingulett jeltől kisebb kémiai eltolódásnál jelentkezik (izotóp effektus).



4. Ábra. ^{19}F detektált 2D-(F-C)-HSQC- ^1J (C-C)-ADEQUATE NMR spektrum.

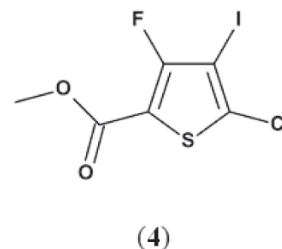
Az F1 tengely ún. kettős kvantum skála, a két ^{13}C atommag kémiai eltolódásának összege található [ppm]. A spektrumban megjelenő korrelációkat a fluor atomhoz közvetlenül kapcsolódó szénatom (C-3) kémiai eltolódásának valamint a mellette lévő szénatomok kémiai eltolódásának összegeként kell értelmezni. A két korreláció a spektrumban tehát $\delta_{\text{C}_3} + \delta_{\text{C}_2}$ illetve $\delta_{\text{C}_3} + \delta_{\text{C}_4}$ (4. Ábra). C-2 ill. C-3 kémiai eltolódásai az előzmények alapján ismertek és a kettő összegét felhasználhatjuk a spektrum kalibrálásához is.

A másik korreláció egy egyszerű kivonás eredményeként adja a

$$\delta_{\text{C}_4} = \delta_{\text{X}} - \delta_{\text{C}_3}$$

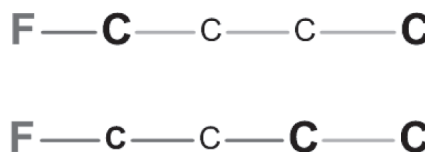
$$\delta_{\text{C}_4} = 239,0 - 157,9 = 81,1 \text{ ppm}$$

C-4 kémiai eltolódását. A 100 ppm alatt érték egyértelmű spektrális bizonyítéka, hogy a reakcióban a két halogén atom megcserélődött és így a helyes molekulaszervezet:



6. További lehetőségek

Az (1,1) ADEQUATE² pulzusszekvenciával a fluor atomhoz képest két kötés távolságra lehet ^{13}C - ^{13}C korrelációkat meghatározni. Ennek a módszernek léteznek távolható korreláción alapuló módosításai is: az (1,n) ill. (n,1) ADEQUATE² NMR kísérletek (az 1 egy kötésen keresztüli, az n távolható csatolást jelez), ahol 4 kötésen keresztüli információ nyerhető ki a molekulából (5. Ábra).

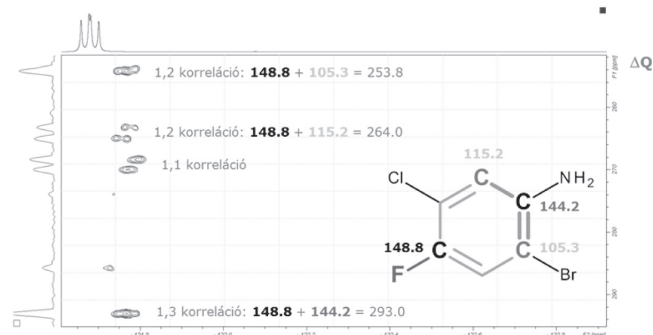


5. Ábra. (1,n) ill. (n,1) ADEQUATE NMR kísérletből nyerhető információ.

Elméletileg lehetséges még az (n,n) ADEQUATE pulzusszekvencia is ahol akár 6! kötésen keresztüli korrelációk segíthetnek a molekulaszervezet felderítésében.



6. Ábra. (n,n) ADEQUATE NMR kísérletből nyerhető információ.



7. Ábra. ^{19}F detektált 2D-(F-C)-HSQC- ^0J (C-C)-ADEQUATE NMR spektrum.

A fenti NMR kísérleteket ismert szerkezetű molekulán optimaltam. A 7. Ábrán az 1-amino-2-bróm-4-fluór-5-klórbenzol (1,n)-ADEQUATE spektrumban egyértelműen azonosíthatók a két (1,2) illetve az (1,3) korrelációk.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Tatai Jánosnak és Vasas Attilának a pulzusszekvencia optimalálásához szükséges vegyületeket.

Hivatkozások

1. Schnürch, M.; Spina, M.; Khan, A. F.; Mihovilovic, M. D.; Stanetty, P. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1046-1057.
2. Berger, S.; Braun, S. *200 and More NMR Experiments*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2004**, 593-600.

Halogen dancing: Structure determination of Fluorine Containing tetra substituted tiophene derivative

Structure determination of small molecules can be very challenging, especially in those molecules where the ratio of hydrogen and hetero/quaternary carbon atoms is low. In these cases the most commonly utilized 2D NMR experiments (COSY, HSQC, HMBC, NOESY, TOCSY) do not provide sufficient information to determine the unambiguous molecular structure. In many cases the chemist are asked to form derivatives, where the hydrogen hetero/quaternary ratio is better, thus the structure can be solved, but mostly the complicated and expensive X-ray experiment has to be carried out. However, the introduction of very sensitive cooled NMR probeheads (CryoProbe™ and Prodigy™) allows the NMR spectroscopist to apply sophisticated, extreme sensitive NMR experiments and hence to determine the structure of molecules possessing few informative hydrogen atoms.

In this work the structure determination of a tetra substituted tiophene derivative is reported (**1**), which had one fluorine atom. The differentiation of the twelve possible structural isomers by traditional one- and two-dimensional NMR methods is impossible since there is only one methoxy group in the molecule, resulting one signal in the ¹H NMR spectrum, which gives one correlation with the carbonyl carbon atom in the HMBC spectrum. Fortunately not this was the task, but to track the formation of the desired tetra substituted structure from the bought starting material: 3-fluoro-tiophene. In the first reaction step the introduction of the carboxymethyl group was carried out (**2**) where three possible structural isomers can be formed. Based on the vicinal proton-proton coupling constant, and the NOE interaction between the sp² hydrogens the expected connection in position C-2 was proved. In the second reaction step the iodine derivative was formed (**3**). In the ¹H NMR spectrum one of the two sp² hydrogens disappears. The structure identification can be based on F-H heteronuclear Overhauser experiment, or on the value of the direct proton-carbon coupling constant which is characteristically high in case of SCH groups (ca. 190 Hz). The last reaction step was the connection of the chlorine atom. The remaining sp² proton signal disappeared from the ¹H NMR spectrum; furthermore the molecular weight was also confirmed by MS spectroscopy, so the analytical department approved the correct substitution order of the molecule. Later however, the structure of the desired compound was questioned, because under certain reaction conditions (tetramethyl-pyrimidine, MgCl, LiCl, hexachloro-ethane in abs. THF at -48 °C under argon atmosphere) the swap of halogen atoms can happen. This phenomenon is described as "halogen dancing" in the literature. What seemed to be an easy structure identification problem turned to be a very challenging structure determination task where (**1**) and (**4**) had to be unequivocally differentiated. In the two compounds, the two and three bond C-F coupling constants and the chemical shifts of the carbon atoms are not differing characteristically, hence the prediction of the NMR parameters is not sufficient, spectral evidence is necessary in order to differentiate the two compounds. Certainties what can be used during the structure determinations are: the one bond C-F coupling constant is larger than 200 Hz,

and the chemical shift of the carbon atom which is connected to the iodine atom has the lowest value due to the shielding effect of the bulky iodine atom. Thus, if somehow the chemical shift of C-4 can be determined in compound (**5**) the molecular structure could be given. Possible NMR methods are for e.g. the F-C HOE experiment where by irradiating the F atom one can record signal intensity enhancement in the difference spectrum on the carbon atoms which are in the vicinity of the fluorine atom. The ultimate 2D INADEQUATE experiment could be also applied, where all carbon-carbon connections can be obtained (Fig.1.), however both methods are extremely insensitive. Taking into consideration the bad solubility of the molecule, the long relaxation time of the quaternary carbon atoms, and the fact that the signals appear as doublet in the carbon spectrum due to the coupling with the fluorine atom, it was not possible to record the aforementioned experiments in reasonable time, not even with the cryoprobe technologies. The presence of the sensitive ¹⁹F atom in the molecule, and the possibility of the application of the more sensitive inverse detection method suggested the utilization of ¹⁹F detected 2D-(F-C)-HSQC-¹J(C-C)-ADEQUATE pulse sequence (Fig.2.). In this experiment the magnetization is transferred by one-bond from ¹⁹F to ¹³C, and then from ¹³C to the neighbouring ¹³C (double quantum coherence), the detection is on the more sensitive nucleus after many back magnetization transfer steps. By utilizing this experiment C-2 and C-4 can be determined, thus the molecular structure can be given (Fig.3.). In order to be able to apply the pulse sequence on ¹⁹F nucleus, the decoding gradient has to be calculated on ¹⁹F/¹³C nuclei pair. Taking into consideration the positions of the coding and decoding gradients in the pulse sequence this equation has to be solved: $G_1 \cdot (\gamma_C + \gamma_F) + G_2 \cdot (\gamma_C) + G_3 \cdot (\gamma_F) = 0$; where G_1 and G_2 are the coding gradients, G_3 is the decoding gradient in [%] respectively; γ_C and γ_F are the resonance frequencies of ¹³C and ¹⁹F respectively. γ_F / γ_C is 3,7398. If we keep the values of G_1 and G_2 from the ¹H version G_3 results 62.62%. $78,4 \cdot (\gamma_C + \gamma_F) + 77,4 \cdot (\gamma_C) + G_3 \cdot (3,7398 \cdot \gamma_C) = 0$. Since the chemical shift range of ¹⁹F is large (in case of C-F ca. 400 ppm, in case of heteroatom connection ca. 900 ppm), the value of the G_3 decoding gradient should be always calculated by applying the actual γ_F / γ_C ratio, and should not be calculated from the gyromagnetic ratio given in the literature. In extreme cases G_3 can differ in the first decimal value which can be crucial in such an insensitive ¹³C-¹³C correlation experiment. On Fig. 4. the ¹⁹F detected 2D-(F-C)-HSQC-¹J(C-C)-ADEQUATE spectrum of a ca. 10 mg / 0.6 ml DMSO-*d*₆ sample can be seen. It was recorded on a CryoProdigy probehead, the experiment time was ca. one hour (48 rows, 32 scans/increment, 2 sec. relaxation delay). Note, that after the calibration of the spectrum the correlations are not aligned with the ¹⁹F signal, but they can be observed slightly upfield, which is due to isotope shift of ¹³C! The F1 axis is a so called double quantum scale, i.e. the sum of two carbon atoms can be read. The correlations appear in the spectrum should be interpreted as the sum of the carbon atom connected to fluorine atom (C-3) and the neighbouring carbon atom, i.e. the two correlations are $\delta_{C_3} + \delta_{C_2}$ and $\delta_{C_3} + \delta_{C_4}$. C-2 and C-3 have been determined before, thus the sum can be used for the calibration of the double quantum axis. The other correlation gives the chemical shift of C-4: $\delta_{C_4} = 239,0 - 157,9 = 81,1$ ppm. The low chemical shift unequivocal spectral proof that the two halogen atoms have swapped in the reaction, thus the correct molecular formula is (**4**).

Further applications of the ¹⁹F detected ADEQUATE NMR experiment should be considered. It is possible to get information through four bond connection in the molecules by applying (1,n)-ADEQUATE and (n,1)-ADEQUATE pulse sequences, where n corresponds to long-range 1 to one-bond correlation. It is even possible to establish 6-bond-correlation in a molecule by the utilization of (n,n)-ADEQUATE experiment. On Fig. 7. the ¹⁹F detected 2D-(F-C)-HSQC-ⁿJ(C-C)-ADEQUATE can be seen of 1-amino-2-bromo-4-fluoro-5-chlorobenzene. The two (1,2) correlations and the (1,3) correlation are highlighted on the spectrum.

A 122. évfolyam szerzői:

Ábrányi-Balogh Péter	172	Janke Dénes	143
Babják Mónika	134	Kelemen Zsolt	31
Bálint Mihály	65	Keserű György Miklós	154
Balogh György Tibor	117	Kormány Róbert	179
Bárány Sándor	13	Ledeczki István	104
Beke Gyula	154	Madarász János	195
Benkovics Gábor	76	Mahó Sándor	104
Bényei Gyula	154	Malanga Milo	76
Bordácsné Bocz Katalin	25	Manilo Maryna	13
Borza István	154	Markovits Imre	195, 200
Bozó Éva	154	Marosi Attila	143
Czipóné Takács Tímea	134	Meszlényi Gábor	134
Csabai Katalin	90	Milen Mátyás	172, 187
Csanaky Lilla	200	Nyitrai Izabella	195
Csörgei János	104	Nyulászi László	31
Dancsó András	195	Pandur Angéla	162
Dargó Gergő	117	Pataki Hajnalka	200
Demeter Ádám	143	Porcs-Makkay Márta	162
Domány György	95, 112, 154	Puskás István	71
Éles János	154	Sánta Csaba	104
Farkas Béla	200	Sánta Zsuzsanna	124
Farkas Ferenc	195, 200	Schrott Mária	71
Fenyvesi Éva	60, 65, 76, 83	Simig Gyula	162
Földesi Tamás	187	Sohajda Tamás	90
Gál Krisztina	95	Sörös Béla	104
Galambos János	95	Szabó Tamás	36
Gáti Tamás	207	Szalai Adrienn	13
Greiner István	104, 112, 154	Szalay Zsófia	143
Gyevi-Nagy László	19	Szejtli Gabriella	57
Háda Viktor	124	Szemán Julianna	90
Hornok Katalin	154	Szente Lajos	57, 60, 83
Huszár József	154	Szentirmay Éva	154
Huszthy Péter	36	Szilágyi Erzsébet	57
Ifj. Szántay Csaba	124	Tasi Gyula	19
Iván Béla	5	Vágó István	154
Janiné Vakulya Gabriella	200	Volk Balázs	162, 172, 187

A kiadvány a Magyar Tudományos Akadémia támogatásával készült

Főszerkesztő: Sohár Pál

Szerkesztő: Huszthy Péter

Technikai szerkesztő: Nagy Tibor Zsigmond

A szerkesztőség címe:

ELTE Általános és Szervetlen Kémiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A

telefon: 372-2910; fax: 372-2909; e-mail: mkf@para.chem.elte.hu

URL: <http://www.mkf.mke.org.hu>

Kiadó:

Magyar Kémikusok Egyesülete, 1015 Budapest, Hattyú u. 16. II/8.; Felelős kiadó: Androsits Beáta

telefon: 201-6883; e-mail: androsits@mke.org.hu

URL: <http://www.mke.org.hu>

Internetes változat: <http://www.mkf.mke.org.hu>

Nyomda:

Europrinting Kft., 1201 Budapest, Vágóhíd u. 55.; telefon: 287-8495, 96; fax: 287-8497

Felelős vezető: Endzsel Ernő

Terjeszti a Magyar Kémikusok Egyesülete

Előfizetési díj egy évre MKE tagoknak 1400,- forint, közületeknek 5000,- forint.

Közleményeink kivonatosan is csak a lapunkra való hivatkozással vehetők át.

Egyes cikkek teljes egészben való átvételéhez a szerkesztőség külön engedélye szükséges.

A folyóiratot az MTMT indexeli, és a REAL archiválja.

Index: 25.540

HU ISSN 1418-9933

