

# Szerkezet és mozgékonyág az ideák világában, avagy dinamikus fehérje térszerkezet-vizsgálat

PERCZEL András\*

Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium, valamint MTA Fehérje Modellező Kutatócsoport, ELTE Kémiai Intézet, Budapest 1117, Pázmány Péter sétány 1/a

„Non est volentis, neque currentis, sed miserentis Deus”  
(Nem azé, aki akarja, sem nem azé, aki fut, hanem a könyörülő Istené.)

## Prológus helyett

Ez az írás az MTA-n – 2010 októberében levelező taggá választásom kapcsán – tartott székfoglaló előadásom összefoglalója. A cikk a Magyar Kémiai Folyóirat főszerkesztője, dr. Sohár Pál akadémikus, évek óta tartó kedves unszolásának, atyai noszogatójának köszönhetően készült el. A dolgozat nem egy szokásos kutatási eredmény tudományos összefoglalója, nem az elért szakmai eredmények száraz bemutatása, inkább a szerző töprengéseinek és gondolatainak kelevéz gyűjteménye szerves molekulákról, azok térszerkezetéről és belső mozgásáról, valamint a molekulák megismerhetőségéről, megtapasztalásáról, láthatóságáról.

## Utazás a mélybe

A kíváncsi ember rendszerint szereti az egzotikus utazásokat. Sokak számára ez egy mesés távoli vidék bebarangolását, esetleg egy afrikai kirándulást jelentene. Felkerekedik és hajóra, repülőre száll, talán csak kerékpárra ül, vagy felölti túrabakancsát és nekivág az ismeretlennek, bejárja Ungot, s Baranyát. Vannak aztán olyan „utazók” is, akik egy tapodtat sem mozdulnak ki otthonukból, pedig bejárhatnák az elgondolt tájakat, megismerhetnék személyesen is az áhított helyet. Nem teszik, nem hajóznak új vizekre, nem kalandoznak új vidékekre, ám egy izgalmas könyv és a képzeletük segítségével járják az ismeretlent. Fantáziájuk és képzelőerejük segítségével utaznak a pampák végtelen síkságain, járják a hegyeket, eveznek ezüsttűkrű tavakon.

Olvasó vagy író, mindkettő lehet ilyen, mint például Karl May, aki világhírű „úti beszámolóit” úgy vetette papírra, hogy közben otthonából ki sem lépett. Vannak, akik megtehették volna, de nem utaztak, csak képzeletben. Megint mások viszont szükségszerűen lettek helyben maradásra kárhóztatva, mivel utazásuk célja elérhetetlen. Verne Gyula például a Föld közepe felé vette volna útját, ha tehette volna, de nem utazhatott, s álmai álmok maradnak talán örökre. A híres német és francia írók mellett, kiket létező tájak ihlettek meg, vannak olyanok, mint például Karinthy Frigyes, aki a koponyája körül utazott, s írta le kalandjait. Utazni tehát lehet a valóságban, vagy csak a képzelet szárnyán, a jelenben vagy akár más időben.

Ám az út, amire most Önt invitálok, kedves Olvasó, más természetű. Minden betűje a nagybetűs valóságról szól, mégis komoly szellemi erőfeszítést igényel a megértése. Nem kell fizikailag megmozdulnia, mégis ismeretlen világba vezetem

a gondolat szárnyán: tudásunk és ismereteink alapján a mikrokozmoszba utazunk. A spektroszkópiai mérések, adatok és tények, a ridegen fegyelmezett tudományos valóság talaján állva, ám az Ön olvasói fantáziára is alapozva, szeretnék betekintést nyújtani a mikrokozmoszt felépítő molekulák világába. A képzelőerőnek is teret hagyva, személyessé téve utazásunkat, kalandozunk el abba a valóvilágba, amit a molekulák uralnak, ahol ők töltik ki a teret. Utazunk hát ezúttal közösen, de ne a koponyánk körül, hanem a képzeletünk segítségével a mikrokozmosz felé.

## A szerkezetkutató világa: a mikrokozmosz kincsei

Életünk szokásos és kézenfekvő távolságegysége a méter. A legtöbb ember testmagassága 1,5 és 2 m lehet, lakásunk és munkahelyünk szobái is pár méter szélesek, hosszúak és magasak, s aligha futunk száz méternél többet esetenként a busz után. Talán tudjuk, hogy a csillagászatban használt távolságegység – az átlagos Nap-Föld távolság, – az 1 méteres referenciarendszernél 150 milliárdszor nagyobb. Persze erre legtöbbször aligha gondolunk. Egy nyári éjjelen ugyan elmerenghetünk a csillagok messzeségén, az ottani távolságok óriás mivoltán, ám inkább a csillagok rajzolatában szoktunk gyönyörködni, s a szinte felfoghatatlan távolságokkal nem sokat törődünk. Pedig döbbenetes, hogy az égen látott csillagok között lehet sok olyan, amely mára már kihunyott, ám régi „fénye” még bőszen vágat felénk.

A csillagászatban használt egységnyi távolság mintegy 11 nagyságrenddel tér el tehát hétköznapi egységünk hosszától, e nagyságrendi ugrást értjük ugyan, de csak nehezen érezzük. Ez a tizenegy nagyságrend felfelé csak alig több, mint az a 10 nagyságrend lefelé, amit meg kell tennünk ahhoz, hogy kézenfekvő világunkból – ezúttal lefelé – az atomok világába érkezzünk. Oda, ahol távolságegységként az Angströmöt érdemes használni, ami körülbelül egy NH kötés hossza. Míg a különböző távcsövekkel a távoli égitesteket, addig nagyítókkal és fénymikroszkópokkal a parányi tárgyakat, az egymástól is csak mikrométer távolságra lévő baktériumokat szoktuk vizsgálni. Ám a molekulák méretei a pici sejtek átlagos méreteinél is még több nagyságrenddel kisebbek! Ebben a tartományában a svéd fizikusról (Anders Jonas Ångström) elnevezett 1 Angström adódott jól használható távolságegységnek. Az atomok és molekulák világa tehát körülbelül 10 nagyságrenddel van, a szemünk számára szokványos hétköznapi világunkba „beágyazva”. Utazásunk

\* A dolgozat Perczel András az MTA levelező tagja 2010. november 16.-án tartott akadémiai székfoglaló előadásának szerkesztett változata.

első lépéseként fénymikroszkóp segítségével a 100 µm-es sejteket, vagy az 1 µm-es baktériumokat figyeljük meg. S csak mikor már megszoktuk ezt a dimenziót akkor haladunk tovább „lefelé”.

A látható fény 500 nm-es hullámhossza korlátként lép fel e mérettartománynál kisebb tárgyak megfigyelése során. A még kisebb, mindössze 100 nm-es influenzavírus, vagy az ennél is kisebb hepatitis vírus részleteit már csak elektronmikroszkóp segítségével tanulmányozhatjuk. A transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM), amely a tárgyakat elektronsugárral „világítja” át, vagy a pásztázó elektronmikroszkóp (SEM), amely a visszavert elektronok segítségével állít elő képet a tárgyak felületéről, segítik tájékozódásunkat. Hogy a molekulákról pontos és „éles” atomi felbontású képet alkothassunk még a krioelektronmikroszkóp sem igazán alkalmas eszköz, noha ezzel akár az 1-10 nm-es felbontás is elérhető esetenként. De akkor milyen eszközökkel ismerhetjük meg igazán a molekulákat s azok részleteit?

A molekulákat a természettudós sem „látja” úgy, mint ahogy a hétköznapi tárgyakat látjuk. A mért adatokat összegyűjtve, ezek alapján mégis el tudjuk azok térszerkezetét képzelni, le tudjuk írni úgy, mintha tényleg látnánk azokat. A képalakítás hiánya még nem jelenti az észlelés hiányát! Röntgen- és elektrondiffrakciós, valamint mágneses magrezonancia spektroszkópiái (NMR) mérési adatokra alapozott információk és logikus megfontolások alapján építünk „képet”, pótoljuk azok tényleges hiányát.

De milyen is a helyes kép egy molekuláról? Az atommagok és elektronok rendszerénél lejjebb a kémikus nem merészkedik; már ez a mélység is kellően komplex és szédítő számára. Bár a kvantummechanika nem értelmezi explicit módon a molekulaszervezet fogalmát, a kémikus mégis nagyon jelentőséget tulajdonít a molekulák reaktivitása és átalakíthatósága mellett, azok térszerkezete és belső mozgása iránt is. A szerkezetkutató ezeket az információkat gyűrja össze, s alkot segítségével „képet” a molekulákról. Sok szerves molekulához hasonlóan a fehérjéket felépítő aminosavak, bár kémiailag egységesek és jól definiáltak, térbeli megjelenésük – azaz térszerkezetük – többféle lehet. *Janus* a kétarcú római istenség csak két eltérő profillal rendelkezett, a molekulák legtöbbször ennél jóval többel bír.

Azokat a molekulákat, amelyek hol az egyik, hol a másik, hol a harmadik, stb. térszerkezetüket mutatják, ezen „arcok” súlyozott átlagaként célszerű bemutatni. A helyes ábrázolás esetén a molekuláról rajzolható „kép” tehát nem csak kicsi, de felettebb dinamikus is.<sup>1</sup> Ám e valóságú ábrázolás (dinamikus képhalmaz) sokszor túlságosan bonyolult, s az atomi részletek dinamikája gyakran csak kevéssé ismert, hajlamosak vagyunk hibásan, csak egy-egy jellegzetes „kimerevített” térszerkezet bemutatásával megelégedni. Így egy kicsit magunkat, s a világot is megtévesztjük egyszerűsítésünk által. A molekulák térszerkezetének sztochasztikus és determinisztikus leírásmódja éppen arra utal tehát, hogy a molekula térszerkezete – bármit is jelentsen az és bármennyi is legyen abból egy időben jelen – komplex módon összeköti a téralkatot (koordinátákat) és azok belső mozgását. Molekuláris téralkat és belsőmozgás: szét nem választható fogalom-pár! Ezt könnyen beláthatjuk, ha tudjuk,

hogy az atomok még zéró kelvinen is rezegnek egyensúlyi állapotaik körül. Érdemes tehát a molekula térszerkezet és a molekuláris belső mozgás összekapcsoltságából adódó tengernyi állapotra és megjelenési formára úgy tekintenünk, mint az adott molekula ideájának manifesztációira, a teljes valóságában meg nem ismerhető lényegére.

## Reflexiók az Ideá-ra

Bár a szerkezetkutató célkeresztjében lévő molekulák megismerhetőségéről töprengtem, eközben a filozófiai természetű „ideá” fogalma is felbukkant. Vajon mit is jelent pontosan az előbbi megfogalmazás, miszerint: a legtöbb molekula számos téralkat dinamikus egyensúlyaként írandó le, melyek a molekula ideájának manifesztációi? Mintha ugyanaz a dilemma jelenne meg a mikrokozmoszt benépesítő molekulák helyes leírása esetén, mint amit korábban Szókratész, a hétköznapi életünk tárgyai kapcsán fogalmazott meg. A görög „idein”, melynek jelentése „nézni”, valamely dolog látványára, annak jellegzetes vonásai szerinti besorolására utal. A karakterisztikus vonások alapján történő percepció, majd az ezt követő azonosítás tehát az észlelés kulcsmomentuma s arra utal, hogy egyes tárgyak és jelenségek változékonysága ellenére képesek vagyunk dolgokat felismerni, egyedi vonásaik mögött a tipikusat észrevenni.

Gyakran használt példa az, ahogy képesek vagyunk felismerni a közöset, s ezáltal meglátni a fát például a lehulló falevél, a zöldülő rügy, a hárs és fűz morfológiai eltérései ellenére is. A levél, a rügy s minden más is, mind a fára utal. A fa ideáját sejtjük meg a megfigyelt „tények” mögött. Láthatjuk tehát, hogy hétköznapi világunkban is meg kell birkóznunk a látottak feldolgozásával, az absztrakción keresztül az ideá, jelen esetben a fa ideájának megalkotásával. Sok egyedi vonásból vonjuk ki (extraháljuk) az ideát, s alkotjuk meg egy-egy tárgy vagy fogalom transzcendens képét. Furcsa módon már a hétköznapi világban megszerezhető élményeink és tapasztalataink sem magyaráznak meg bizonyos hétköznapi fogalmakat. Például a matematika tárgyai a számok, melyek azonban a maguk konkrétságában egyáltalán nem tapasztalhatók meg. Két almát és három körtét kezünkbe vehetünk ugyan, de sem a 2-es, sem a 3-as számmal közvetlenül nem találkozhatunk. Hasonlóan a geometria tárgyai sem tapasztalhatók meg, hiszen nem létezik a valóságban sem a pont, sem a kör, mégis elfogadjuk, hogy az érintő csupán egyetlen pontban érinti a kört. Nincs továbbá két egyforma alma vagy körte, mégis bátran használjuk az *egyforma*, az *egyenlő* kifejezést tárgyaink jellemzésére.

Mindezek fényében arra a következtetésre juthatunk, hogy a hétköznapi, „méteres” világunk számos fogalma sem a fizikai megtapasztaláson vagy a tényleges látáson alapul. Furcsa módon nem is az absztrakció az, ami fogalmaink megalkotásához vezet, hiszen ahhoz hogy absztrahálni tudjunk, ahhoz ismernünk kellene a tárgy *leglényegét*. Éppen annak a dolognak az ideáját – mondjuk a tökéletes almát vagy a tökéletes körtét, – tehát éppen azt, amit keresünk, *a priori* ismernünk kellene a fogalom megalkotásához. De ha mindez így van, akkor hogyan ismerjük fel és azonosítjuk a minket körülvevő tárgyakat? Gondolhatjuk azt, amint a görögök tették, hogy valamiképpen magunkkal hozzuk ezen

ismereteket. Pontosan nehéz lenne e képességünk eredetét megnevezni. Talán igazuk volt a görögöknek, miszerint földi életünk előtt istenekkel voltunk együtt és ott megszemléltük a valódi létezőket, ott megtapasztaltuk mindentől a valódit, megismertük az ideákat. Szerintük dolgunk ebben a világban nem több, de nem is kevesebb, mint mindarra visszaemlékezni (*anamnészisz*) amit „ott láttunk”. Ebben az értelemben egy-egy hétköznapi tárgy vagy fogalom létező *igazságát* ideájához való hasonlósága adja meg. Az igazi alma tehát pont olyan, mint amilyennek az almának lennie kell, de a létező (a létezés során megvalósuló) alma sohasem éri el önmaga eszményi állapotát, s ezért ideájára vonásai csak részben és töredékesen utalnak.

Igaz léte tehát csak az ideáknak van. Hétköznapi fogalmaink a szubjektív ideák világából valók, mert a valódi, az objektív ideák tőlük függetlenek. Azok örök és változatlan transzcendens valóságok, immanens világunkban nem megismerhetők. Fizikai tárgyaink vagy a megvalósuló események pusztá árnyékai csupán a saját ideáinknak, létezésük csupán utalás önmaguk tökéletes formájára. Mindez jól mutatja, hogy ha pusztán hétköznapi életünk tárgyait nézzük, ha valósnak vélt „méteres” világunkat szemléljük, már akkor is észre kell vennünk, hogy „az érzékelhető világ úgy viszonylik az ideákhoz, mint árnyék a testekhez.” Ha tehát ennek fényében „az ideák a valóság princípiumai”, akkor a lényeg meglátásában, sem a makro- sem a mikrokozmosz objektumainál, nincs könnyű dolgunk.

Ahogy tehát kellő megfigyelést követően egy hétköznapi fogalom, például a fa, ideájának megsejtésére képesek lehetünk, – bár az észlelés terén nehezebb helyzetbe kerülünk –, hasonló módon kereshetjük a mikrokozmosz tárgyainak ideáit is. Az idea keresésének stratégiája tehát nem méretfüggő! A kutatás tárgyát képező objektum méretétől függetlenül, azt megsejtethetjük. Kicsit másként megfogalmazva az „extrakciós” feladat – az idea megsejtésére – ugyanaz a mentális kihívás, noha az adatgyűjtés módja és eszközei merőben eltérnek, ha a fa vagy ha egy fehérje ideájának megfogalmazása a célunk. „Az anyag szerveződésének különböző szintjei vannak” ahogy ezt Kajtár Márton professzor oly szemléletesen fejti ki a „*Változatok négy elemre*” című könyvében: „Minden szinten mást tekintünk alkotórésznek, építőelemnek és mást szerkezetnek, struktúrának. Az élő szervezetek építőelemei a sejtek .... az anyag szerveződésének ezt a magasabb rendű szintjét vizsgálja a biológia. A sejt azonban maga is összetett: ezernél is többféle kicsi és nagy molekula bonyolultan szervezett rendszere, struktúrája .... ezt tanulmányozza a molekuláris biológia ... A molekulák atommagok és elektronok szervezett rendszerei. Ezek vizsgálatával foglalkozik a kémia.”

A szerkezetkutató kémikus feladata tehát többértű, mert egyrészt adatokat gyűjt eltérő spektroszkópiái és diffrakciós eljárások segítségével kis és nagymolekulák térszerkezetéről, belső mozgásáról, másrészt számításokat végez és molekulamodellez. Csak ezek segítségével tudja a „nyers” mérési adatokat értelmezni, s kísérheti meg a képalkotást. E háromdimenziós kirakós összerakása, hasonlóan a szokásos kirakósokéhoz annál bonyolultabb, minél több elemből (jelen esetben atomból vagy molekula fragmensből) épül

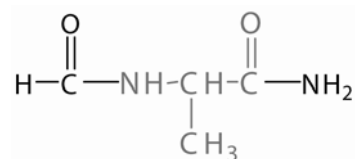
fel. Ugyanakkor a sokszor sziszifuszinak tűnő napi munka közben, a kémikus sem vesztheti szem elől, azt a pontosan soha meg nem oldható feladatot, amit az adatok kibontása, az egyes molekulák ideáinak meghatározása jelent. Ami adatot mérünk és ahogy jellemezzük az adott molekulát, azok mind a molekula ideájáról adnak számot, segítik elő a talán jobb felbontású „képalkotást”. Nagy kihívás, hogy fától lássuk az erdőt, hogy a tengernyi technikai részlet és partikuláris adat közepette ne veszítsük szem elől a lényegét. Célunk, hogy ki tudjuk válogatni a leglényegesebb vonásokat és emelni azokat, amelyek arra a molekulára nézve különösen fontosak és jellemzőek, s talán a „legtömörebb módon” reflektálnak az adott ideára. Cipész a kaptafánál, kémikus a molekuláknál maradjon. Lássunk inkább néhány példát arra, hogyan lehet a szerkezet-meghatározás kihívásai mellett az általánosra, az adott molekula ideájára következtetni.

### Fehérje-konformer prototípusok

A fehérjék bonyolult téralkatú, komplex poliamid rendszerek,<sup>2,3</sup> melyek a legváltozatosabb biológiai feladattal rendelkezhetnek. Ma fehérje adatbázisokból százezernél is több különböző fehérje 3D-térszerkezetét húzhatjuk elő, akár atomi felbontásban is tanulmányozhatjuk részleteiket.<sup>4</sup> Miközben e téralkatok száma igen nagy és sokszínűségük lenyűgöző, a fehérjéket felépítő aminosavak száma korlátos, mindössze 20. Elgondolkodtató tehát, hogy ez a véges számú fehérjeépítő, L-konfigurációjú,  $\alpha$ -aminosav milyen módon képes polimer láncra szerveződve ilyen nagyszámú, egymástól annyira különböző térszerkezetet létrehozni?

Alkalmazott kvantumkémiai módszerek segítségével arra a kérdésre kerestük a választ, hogy hány elkülöníthető téralkata lehet egy-egy ilyen fehérjeépítő aminosavnak? Mekkora az a konformációs „repertoár”, ami felhasználásra kerülhet aztán egy-egy fehérje bioaktív térszerkezetének kialakítása során?<sup>5</sup> Kezdetben – a nyolcvanas évek második felében, – csak alacsonyabb elméleti szinteken, s csak a legegyszerűbb királis aminosav, az alanin-diamidjának (1. ábra) konformációs feltérképezésére vállalkozhattunk.<sup>6</sup> Később, magasabb elméleti szinteken, hosszabb és bonyolultabb oldalláncú molekulák esetében is el tudtuk már végezni a téralkatok feltérképezését.<sup>7-12</sup>

Egyes molekulák esetében azóta e számolások helyességét kísérletes módszerek segítségével is igazolni tudtuk.<sup>13</sup> Megállapítottuk, hogy kilenc jól jellemezhető és elvben elkülöníthető molekula gerinc-konformer alkotja a fent említett repertoárt (2. ábra). Úgy tűnik, hogy ez a 9 téralkat prototípus a fehérjéket felépítő 20 természetes aminosav mindegyikére jellemző, s a fehérje téralkatok bármilyen sokszínűek és komplexek is lehetnek, ezek mindegyikben csak ez a 9 alapszerkezet variálódik.

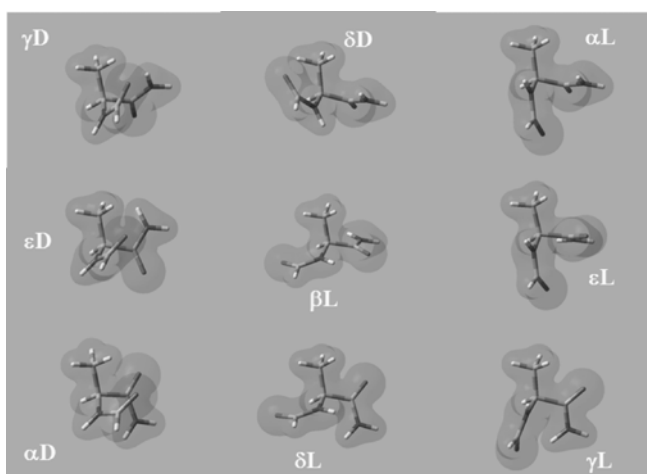


1. Ábra. A fehérjeépítő 20 természetes aminosav konformációs prototípusaként használt For-L-Ala-NH<sub>2</sub> kémiai szerkezete.

Egy  $n$  atomból felépülő molekula –  $n=16$  a For-L-Ala-NH<sub>2</sub>,

esetében (1. ábra) – nagyszámú ( $3n-6$ ) vibrációs és rotációs alapállapottal rendelkezik. Mint az embert az ujjlenyomata, ugyanolyan jól jellemzik a molekulák bármely térszerkezetét a vibrációs és rotációs energiaátmenetek. Tehát a fehérjeépítő-aminosavak bármely téralkata is jól jellemezhető ezen adatok segítségével. Ám az aminosavak és konformációs állapotaik egyedi jellemzése mellett, közös, erre a molekulacsaládra jellemző vonások is azonosíthatók voltak. S ahogy sok egyedi vonásból megalkotható a „fa” ideája, úgy a 20 különböző aminosav kémia és spektroszkópiai sokszínűségéből, konformációs tulajdonságaik együttes analiziséből meghatározhatóvá váltak közös vonások.<sup>14</sup> Ideájuk körvonalazódott.

Ahogy egy gyermek alapkaraktere is néhány ügyes fénykép segítségével behatárolható (3. ábra), úgy a 9 konformer prototípus beazonosítása hozzájárulhat a fehérjeépítő  $\alpha$ -L-aminosavak ideájának helyesebb meghatározásához.



2. Ábra. Bármilyen gazdag is a globuláris fehérjék térszerkezete, az azokat felépítő aminosavak úgynevezett gerinc-konformerei az ábrán látható kilenc prototípus ( $\gamma_D$ ,  $\delta_D$ ,  $\alpha_L$ , stb.) valamelyikével nagy szerkezeti hasonlóságot mutatnak.

### Tanulságok a legkisebb fehérje kapcsán

Máig nyitott kérdés a globuláris fehérje primer és terciér szerkezetének intim kapcsolata. Tudjuk, hogy az aminosav-sorrend, tehát az elsődleges vagy primer szerkezet nem csak a polipeptid-lánc kémiai összetételét, de a harmadlagos (tercier) szerkezetet is meghatározza. Tehát az aminosav összetétel és sorrend egyszerre határozza meg a globuláris fehérjék téralkatát és dinamikus jellemzőit. Ám homály fedi e globális összefüggés részleteit. Komoly szakmai érdeklődés övezi ezért az egyre rövidebb láncú, tehát egyre kisebb molekulatömegű olyan fehérjék vizsgálatát, amelyek vizes oldatban önállóan feltekerednek, azaz időátlagban egységes 3D-szerkezettel rendelkeznek. Ilyen minifehérjéket részben globuláris fehérjék lerövidítésével és átszabásával, részben *de novo* tervezéssel állíthatunk elő.<sup>15,16</sup> Az általunk előszeretettel vizsgált minifehérje e család legkisebb képviselője: mindössze 20 aminosavból épül fel, mégis rendelkezik az úgynevezett „Trp-kalitka” harmadlagos szerkezettel. Az  $\alpha$ - és  $3_{10}$ -hélix<sup>17</sup> mellett jelenlevő poliprolin típusú másodlagos szerkezeti elemek egymással



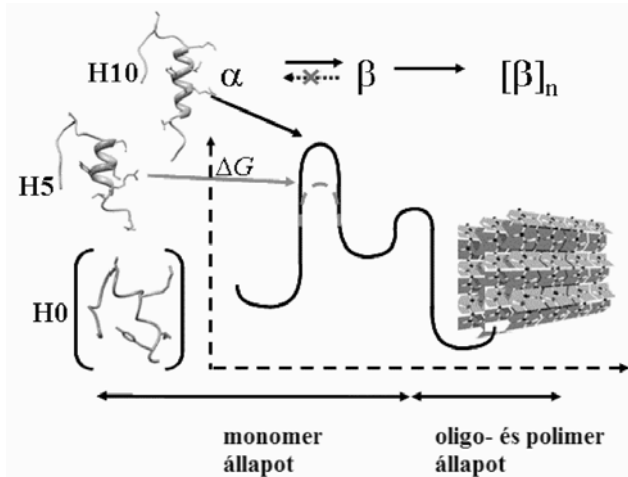
3. Ábra. Ahogy a kilenc különböző arckifejezésben felismerhetjük ugyanazt a személyt, megsejthetjük hangulatát, úgy a 9 konformer prototípus megismerése is elvezethet az aminosavak közös konformációs vonásának, ideájának megsejtéséhez.

kölcsönható, kompakt téralkatot hoznak létre vízben. Az *in vitro* és *in silico* feltekeredési vizsgálatok tanulságai szerint ez a térszerkezet stabil marad, a molekula akár 30-40 fokos melegítése ellenére is.<sup>15</sup> A globuláris fehérjék, s így a minifehérjék fel- és letekeredésének atomi részleteiről, a térszerkezet belső dinamikus viselkedéséről azért szeretnénk többet megtudni, hogy a fent említett ok-okozati összefüggést mélyebben és pontosabban megérthessük.<sup>18-20</sup>

A nagyobb, akár több száz aminosavból felépülő fehérjék esetében gyakran meg kell elégednünk az úgynevezett két-állapotú modell adta precizitással. Ennek alkalmazása során feltételezünk egy teljesen feltekeredett (F), valamint egy teljesen letekeredett (U) makromolekuláris állapotot, s csupán ezen két állapot segítségével jellemezzük a fehérje térszerkezetének hőmérséklet- (vagy nyomás-) függését. Mivel a mindössze 20 aminosavból álló minifehérje kellően kisméretű molekuláris rendszer, ezért itt eredményesen vizsgálhattuk a folyamat részleteit, a le- és fel-tekeredési út részállomásait is. A  $^{15}\text{N}$  és  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  jelölt fehérjék hőmérsékletfüggő NMR-mérései alapján különböző közti-állapotokat figyeltünk meg, és jellemeztük azokat mind semleges, mind savas pH-n.

Az NMR spektrumok elemzésére egy új dekonvolúciós eljárást dolgoztunk ki, mellyel jellemezni tudtuk az akár „láthatatlan” fel- és letekeredett, illetve a közbülső intermedier állapotokat is.<sup>21,22</sup> Újszerű elemző módszerünknek köszönhetően azokat a teljesen tiszta (pl. 100% F, 100% U 4. ábra) téralkatokat is jellemezni tudtuk, amelyek a gyakorlatban nem tudnak megvalósulni egyéb okok miatt. Például a 100%-ban feltekeredett állapot nem tud megvalósulni, mert olyan alacsony hőmérsékletre kellene lehűteni a molekulát, ahol a közeget jelentő víz már megfagy. Egy alkalmas, nem-lineáris illesztési módszert felhasználva megkaptuk mind a több-lépéses feltekeredési folyamat termodinamikai paramétereit ( $\Delta H^{F-1}$ ,  $T_m^{F-1}$ ,  $\Delta C_p^{F-1}$ )





**5. Ábra.** A Tc5b egy mutánsa a H0, és ennek 5 (H5) majd további 5 aminosavval meghosszabbított variánsa (H10), konformációs preferenciájuk jellemzése. A H0 nagyfokú rendezetlensége (U-állapot) stabilizálódik az első, majd a második 5 aminosav hozzáadásával, ám míg a H10 a Trp-kalitka téralkatát igen magas koncentrációban is megőrzi, addig a H5 már fiziológiásnak mondható körülmények között is könnyen aggregálódik.

Más betegségek során tapasztalt fehérjék hibás fel- és letekeredése mellett, ezen betegségek esetében egyes fehérjék (pl. Tau, APP-fragmensek) fokozott aggregációs képessége áll. A H0, H5 és H10 modellek összehasonlító szerkezetvizsgálata egy olyan aggregációs modell-rendszert eredményezett, amelyben a fehérjék 3 alapállapota elkülönülten, de egy rendszerben tanulmányozható. Nevezetesen a rendezetlen (H0), az aggregálódó (H5) és a globuláris jellegű megőrző (H10) modellek fehérje-állapotai lefedik a ma ismert „fehérje-konformációs teret”; a „fehérje univerzumot”. Eredményeink szerint a Trp-kalitka téralkat ígéretes modell nem csak a fehérjék le- és feltekeredésének, de a különböző aggregációs vizsgálatoknak is. (Ugyanez nagyobb globuláris fehérjék esetében atomi szinten csak nehezen vagy elnagyoltan tanulmányozható.)

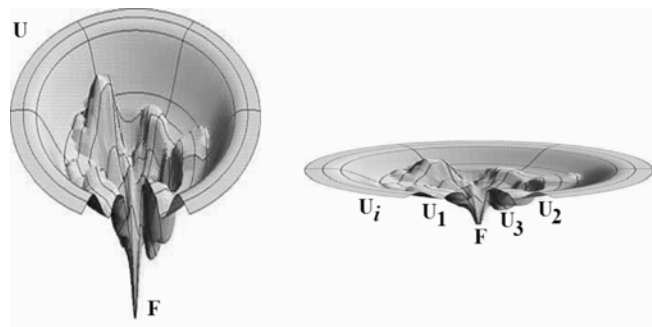
Talán ezek a modellrendszerek segíthetnek jobban megérteni a káros fehérje aggregáció és amiloid képződés molekuláris hátterét, a „fehérje-temető” mibenlétét. Most, a korábbi példaktól eltérően nem egy molekula, hanem egy fogalom, a fehérje aggregáció ideájának mélyebb megértése volt a cél. Megállapítottuk, hogy az aggregáció fogalma szorosan és szervesen összekapcsolódik a fehérjékkel, azok poliamid kémiai összetételéből következik. Leszögezhetjük, hogy akkor lesz ez a képesség felfokozott, ha az említett  $\alpha \rightarrow \beta$  irreverzibilis konformációs átmenetek aktiválási szabadentalpiája lecsökken. Történhet ez egy mutáció, egy átalakulás vagy környezeti változás megjelenésével. Tehát bármely változás a fehérje állapotában, amely ez irányba hat, a fehérjét sérülékenyebbé, sebezhetővé teszi, minek következtében a fehérje könnyebben jut termodinamikai mélypontjára, az úgynevezett „fehérje-temetőbe”. Az aggregáció mint esemény ideája összetett és bonyolult, de a folyamat mibenléte alkalmas modell rendszerek segítségével hatékonyan tanulmányozható, ahogy ezt néhány Trp-kalitka modell példája is jól szemlélteti.

## A rendezetlenség titkai

Korábban úgy tekintettünk az U-állapotra (4. ábra) - s talán ezen példák esteében is olyan színben tűnhettek fel, - mint valami rossz és elkerülendő helyzetre. Valóban az U-állapot jellemzése ( $U_1, U_2, U_3, U_4, \dots$  azonosítása) (6. ábra), különösen atomi szinten nehéz, gyakran megoldhatatlan kihívást jelent a szerkezetkutató számára. A sok ezer, talán milliárdnyi, netán milliárdnyi egymástól különböző téralkat szimultán jellemzése ma megoldhatatlan feladat. Mégis számos olyan fehérjét ismerünk, amely bár az úgynevezett rendezetlen rendezetlen fehérjék (angol rövidítésük nyomán: IDP-k) családjába tartozik, világos biológia feladatot hordoz.<sup>24,25</sup>

Néhány éve derült fény arra, hogy a hagyományos dajkafehérjékhez (chaperon-okhoz) hasonlóan az IDP-k is képesek számottevő bioaktivitásra. Ennek a jelenségnek a szerkezet-funkció vizsgálatára az *A. thaliana* (lúdfű) egy dehidrin nevű fehérjét az ERD14-t használtuk fel. A dehidrinek növényi stressz-fehérjék, amelyek leggyakrabban teljesen rendezetlen téralkatúak (U-állapot), s amelyek kifejeződése a sejtben és szövetekben jelentős mértékben megnő a kiszáradás, a fokozott só koncentráció, vagy fagyveszély esetén. Különböző enzimek jelenlétében (alkohol dehidrogenáz, luciferáz, citrát szintáz) végzett „chaperon” aktivitás vizsgálatok révén kimutattuk, hogy az ERD14 valóban, *in vitro* körülmények között is hatékony védelmet nyújt az említett stresszek esetén.

A jelenség szerkezeti hátterének vizsgálatához a 185 aminosavból felépülő ERD14 molekulát használtuk fel, jellemeztük modern és szofisztikált<sup>26</sup> 3D-, 5D-NMR mérések segítségével.<sup>27</sup> A másodlagos kémiai eltolódásértékek és relaxációs adatok megerősítették elképzelésünket, miszerint az ERD14 teljesen rendezetlen, ám ugyanakkor öt rövid régiója valamelyest korlátozott mozgékonyasága miatt, helyi „helicitási” hajlamot mutat. *E. coli* rendszerben túlermelt ERD14 *in-cell* NMR mérések segítségével kimutattuk, hogy ebből három régió (konzervált K-szegmensek) további rendeződésen megy keresztül. Ezekben a pontokban valószínűleg a fehérje megköti a sejtek egyes molekuláit.



**6. Ábra.** Mind a globuláris, mind a fibriláris fehérjék hipotetikus feltekeredési energiátölcseré (bal oldali tölcser) számottevően különbözik attól, ami egy belsőleg rendezetlen fehérje (IDP) esetében tapasztalható (jobb oldali tölcser). Míg az első esetben az F (feltekeredett) és U (rendezetlen) állapotokat nagyobb energia választja el egymástól, addig az IDP-k esetében ez az érték kicsi, továbbá az egyes állapotok (F,  $U_1, U_2, U_3, U_4, \dots$ ) közötti gátmagasság is igen alacsony. Ezért a második esetben az állapotok könnyen cserélődve, kiterjedt dinamikus rendszert alkothatnak, ahol i értéke csillagászati nagyságú is lehet.

Ezek a vizsgálatok a fehérje-rendezetlenség fogalmát, mint ideát járják körül és mutattak rá arra, hogyan is lehetséges az, hogy az IDP-k is hatékony bioaktív molekulák. A korábbi elképzelésekkel ellentétben tehát – Anfinsen Nobel-díjas kísérlete ellenére, – nem csak a rendezett téralkatú (F-állapotú), de a rendezetlen dinamikus sokaságot alkotó (U-állapot) fehérjék is hordozhatnak biológiai szerepet (6. ábra).

### Epilógus

Összefoglalóm szakmai része fő kutatási területemről, a fehérjék fel- és letekeredéséről, egyes polipeptidek és fehérjék önszerveződő<sup>28,29</sup> aggregációs képességéről számolt be.<sup>30</sup> A megvizsgált példákon keresztül az egyedi tulajdonságok, a technikai részletek megismertetése és bemutatása mellett céлом volt az „egészre” is fókuszálni. Mert szépek a fák, de még szebb, ha az egész erdőben gyönyörködhetünk. Próbáltam a klasszikus „idea-tan” jegyében egyes molekulák vagy állapotok ideáira utalva, azokról teljesebb képet alkotni. Kérdés persze, hogy mindez mennyire sikerült, egyáltalán mennyire sikerülhet ez a feladat? Vajon meg lehet-e valamely tárgy vagy fogalom ideáját igazán és objektíven ragadni, ha figyelembe vesszük a fenomenológia, mint filozófiai irányzat elgondolását?

Az idea-tanhoz hasonlóan – e szintén görög eredetű kifejezés – a *phainomenon* és a *logosz (tan)* szóösszetételből áll. Az első tag a *phainomenon*, a megjelenő, a megmutató jelenség vagy tárgy vizsgálatának mibenlétére utal. A fenomenológia mottója talán az a felszólítás is lehetne, miszerint vissza a jelenséghez, ahhoz, ami megfigyelhető. E filozófiai irányzat két kiemelkedő képviselője, Maurice Merleau-Ponty és Edmund Husserl, éppen a megfigyelés problémás voltára hívják fel a figyelmünket. Ha látok ugyanis egy tárgyat, akkor soha sem lehetek teljesen biztos abban, hogy e látvány híven tükrözi (reprezentálja) a megismeréstől független objektumot (ha akarom, a tárgy ideáját). Ám biztos lehetek abban, hogy van egy olyan személyes – megfigyelőről megfigyelőre változó élményem, miszerint látom azt az objektumot. Tehát amit megismerek ebben az élményben, az nem maga az objektum (idea), hanem a látvány élménye (fenomén).

Ennek fényében tehát bármilyen objektíven is akarok egy tárgyat leírni, például a fa ideáját meghatározni, egy molekula ideáját körvonalazni, az *ab ovo* lehetetlen feladat. Hiszen a megfigyelést éppen a megfigyelőtől, tehát önmagamtól nem tudom függetleníteni! Objektív lehet-e tehát a megismerés egyáltalán? Avagy beavatkozik-e szükségszerűen a megfigyelő (személyisége) magába a megfigyelés folyamatába és ezáltal befolyásolja, de legalább is szubjektív színezettel látja el a megfigyelés objektívnek vélt folyamatát? S ha szükségszerűen személyes a megfigyelés végeredménye, akkor talán ideák megfogalmazása helyett inkább fenomének megalkotására kellene törekednünk, ami a megismerő tudat számára a (jelen)valóság. Miben lehetek hát biztos, ha magában a megfigyelés objektívitasában sem bízhatok? Vajon célom lehet-e az objektív valóság megismerése, ha pontos leírása nem is? Tényleg csak tükör által homályosan láthatunk? Talán túl sok is a kérdés ezen a ponton, s ezért álljon itt inkább a Magyar Tudományos Akadémia korábbi főtítkára,

Arany János „A tudós macskája” című verséből egy rövid idézet.

„Nagy volt, mondok, a tudósnak  
Az ő tudománya,  
De mi haszna! Kevés hozzá  
A vágott dohánya.  
Könyvet irt a bölcseségről  
-- S hajna!  
Ilyen ápró dőreségek  
Gyakran estek rajta.”

### Köszönetnyilvánítás

A sort szüleimmel édesanyámmal és édesapámmal kezdem, hiszen nekik köszönhetem neveltetésem és világnézetem alapjait. Középiskolás tanáraimmal folytatom a sort, akik közül név szerint említem Fórián-Szabó Zoltán kémia és Pázmándi György biológia tanáraimat. Nekik köszönhetem, hogy 1977-ben megismerkedhettem Kajtár Márton és Hollósi Miklós professzorokkal az ELTE-n, akiknek köszönhetően döntöttem végleg a kémia tanulása és későbbi művelése mellett. Mellettük egyetemi tanulmányaim során Kucsman Árpád és Medzihradsky Kálmán professzorok hatása volt meghatározó.

Mint fiatal kutató korán megismerkedtem Gráf László biokémikus, Náray-Szabó Gábor elméleti kémikus és Tusnady Gábor matematikus professzorokkal; köszönet támogatásukért a közös munka kapcsán diszciplínáik megszerettedéséért. Később lehetőségem nyílt több ország különböző laboratóriumában dolgoznom, ezért itt a teljesség igénye nélkül nekik mondok köszönetet: Csizmadia G. Imre (Torontó), Gerard D. Fasman (Boston), Iain D. Campbell (Oxford), John Markley és William Milo Westler (Wisconsin), Tóth Gábor és Penke Botond (Szeged) professzoroknak.

Közvetlen munkatársaim, korábbi diákjaim és PhD hallgatóim mindegyikének köszönöm az izgalmas munkát a közös kutatást. Név szerint csak azokat szeretném abc sorrendben kiemelni, akikkel több közös meghatározó közleményt írtunk: dr. Beke Tamás, dr. Bodor Andrea, dr. Czajlik András, dr. Gáspári Zoltán, dr. Hudáky Péter, dr. Hudáky Ilona, dr. Harmath Veronika, dr. Jákló Imre, dr. Kiss Róbert, dr. Láng András, dr. Mucsi Zoltán, dr. Pálfi Villó Katalin, Rovó Petra, dr. Pohl Gábor, Stráner Pál és dr. Szalayné Ágoston Bianka. Végül de nem utolsó sorban szeretném megköszönni feleségemnek dr. Perczel Forintos Dórának, a jobbik énemnek (ahogy ezt az angolok mondják) több mint három évtizeden át kitartó szeretetét és támogatását, valamint közben felnőtt gyermekeink, Kristófnak, Júliának és Györgynek, hogy néha a játszótér helyett, bejöttek velem NMR-t mérni.

### Hivatkozások:

1. Gáspári, Z.; Perczel, A.; „Protein dynamics as reported by NMR” Annual reports in NMR spectroscopy, **2010**.
2. Perczel, A.; Hollósi, M.; Foxman, B. M.; Fasman, G. D. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *113*, 9772-9784.

3. Perczel, A.; Jáklí, I.; Foxman, B.M.; Fasman, G.D. *Biopolymers* **1996**, *38*, 723-732.
4. Hudáky, I.; Perczel, A. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2008**, *70*, 1389-1407.
5. Hódi, Zs.; Németh, A.L.; Radnai, L.; Hetényi, Cs.; Schlett, K.; Bodor, A.; Perczel, A.; Nyitray, L. *Biochemistry* **2006**, *45*: 12582-12595.
6. Perczel, A.; Ángyán, J.G.; Kajtár, M.; Viviani, W.; Rivail, J.L.; Marcoccia, J.F.; Csizmadia, I.G.; *Journal of the American Chemical Society*, **1991**, *113*, 6256-6265.
7. Perczel, A.; McAllister, M.A.; Császár, P.; Csizmadia, I.G. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 4849-4858.
8. Viviani, W.; Rivail, J.L.; Perczel, A.; Csizmadia, I.G. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 8321-8329.
9. Perczel, A.; Farkas, Ö.; Csizmadia, I.G. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 1653-1654.
10. Perczel, A.; Farkas, Ö.; Csizmadia, I.G. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 7809-7817.
11. Topol, I.A.; Burt, S.K.; Deretey, E.; Tang, T.H.; Perczel, A.; Rashin, A.; Csizmadia, I.G. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 6054-6060.
12. Láng, A.; Csizmadia, I.G.; Perczel, A. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2005**, *58*, 571-588.
13. Pohl, G.; Perczel, A.; Vass, E.; Magyarfalvi, G.; Tarczay, G. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, *9*, 4698-4708.
14. Beke, T.; Czajlik, A.; Csizmadia, I.G.; Perczel, A. *Physical Biology* **2006**, *3*, 26-39.
15. Neidigh, J.W.; Fesinmeyer, R.M.; Andersen, N.H. *Nature Structural Biology*, **2002**, *9*, 425-430.
16. Mucsi, Z.; Perczel, A.; Orosz, G. *Journal of Peptide Science* **2002**, *8*, 643-655.
17. Jáklí, I.; Fejér, Sz.N.; Farkas, Ö.; Viskolcz, B.; Jensen, S.K.J.; Csizmadia, I.G.; Perczel, A. *Chemical Physics Letters* **2013**, *563*, 80-87.
18. Szenthe, B.; Gáspári, Z.; Nagy, A.; Perczel, A.; Gráf, L. *Biochemistry* **2004**, *43*, 3376-3384.
19. Fodor, K.; Harmat, V.; Hetényi, C.; Kardos, J.; Antal, J.; Perczel, A.; Patthy, A.; Katona, G.; Gráf, L. *Journal of Molecular Biology* **2005**, *350*, 156-169.
20. Gáspári, Z.; Szenthe, B.; Patthy, A.; Westler, W.M.; Gráf, L.; Perczel, A.; *FEBS Journal* **2006**, *273*, 1831-1842.
21. Rovó, P.; Farkas, V.; Hegyi, O.; Szolomajer-Csikós, O.; Tóth, G.K.; Perczel, A. *Journal of Peptide Science* **2011**, *17*, 610-619.
22. Rovó, P.; Láng, A.; Stráner, P.; Nyitray, L.; Huszár, K.; Perczel, A. *Chem.Eur.J.* **2013**, *19*, 2628-2640.
23. Farkas, V.; Csordás, B.; Hegyi, O.; Tóth, G.K.; Perczel, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 3513-3522.
24. Tompa, P. „Structure and function of intrinsically disordered proteins” Taylor and Francis, **2009**.
25. Kiss, R.; Kovács, D.; Tompa, P.; Perczel, A. *Biochemistry* **2008**, *47*, 6936-6945.
26. Westler, W.M.; Lin, J.J.; Perczel, A.; Weinhold, F.; Markley, J.L. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 1310-1316.
27. Ágoston, B.S.; Kovács, D.; Tompa, P.; Perczel, A. *Biomolecular NMR Assignments* **2011**, *5*, 189-193.
28. Beke, T.; Csizmadia, I.G.; Perczel, A. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 5158-5167.
29. Pohl, G.; Beke, T.; Borbély, J.; Perczel, A. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 14548-14559.
30. Perczel, A.; Hudáky, P.; Pálfi, V.K. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 14959-14965.

### Retrieving the “idea” of structure any dynamics:dynamic structure analysis of polypeptides and proteins

The present paper is a conceptual summary on structure and dynamics of organic biomolecules, especially on peptides and proteins, rather than a research article focusing on technical details of the latter subject. The problem of properly presenting molecular structures, encoding not only spatial information (3D-coordinates) but also their internal dynamics has been around for chemists and biochemist. Ignoring the dynamical aspect of biopolymers (conformational ensemble properties, internal mobility, local unfolding, etc.), can conclude to misunderstandings on the true nature of biomolecules. Measuring and incorporating both type of information and thus, attempting to retrieving the true “platon-

idea” of a biomolecules could be lengthy, but rewarding. Such a complex “view” can provide a better description of what is observed indeed. Examples are presented here on how useful is to determine dynamical and conformational data on *i*) simple proteinogenic amino acid derivatives, *ii*) mini-proteins and *iii*) intrinsically disordered proteins. Although the proper graphical presentation of protein flexibility is yet a challenge, it has advantages when doing molecular docking, analyzing macromolecular interaction, etc.. For studies incorporating molecular flexibility to understand and predict biological processes, we have proposed the term **DSAR for Dynamic Structure-Activity Relationship** analysis.



# Izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok szintézise

NONN Melinda,<sup>a</sup> KISS Loránd,<sup>a</sup> FORRÓ Enikő,<sup>a</sup> SILANPÄÄ REIJO,<sup>b</sup> MUCSI Zoltán<sup>c</sup> és FÜLÖP Ferenc<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerkémiai Intézet, Eötvös u. 6, 6720, Szeged

<sup>b</sup>Jyväskylä Egyetem, Kémiai Intézet, FIN-40014, Finnország

<sup>c</sup>Szegedi Tudományegyetem, Kémiai Informatikai Intézet, 6725, Szeged

## 1. Bevezetés

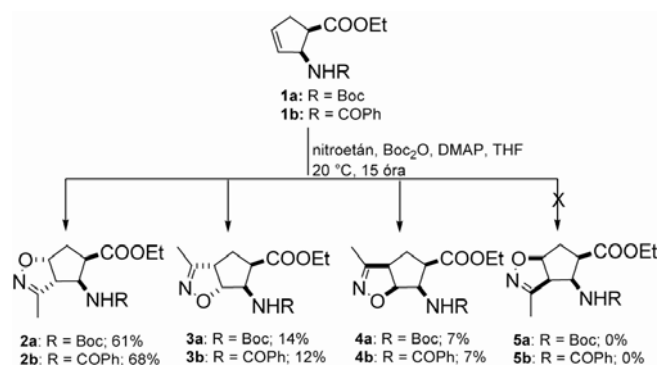
Az izoxazolin gyűrűt tartalmazó vegyületek számos képviselője különböző biológiai (influenzaellenes, antifungális) hatással rendelkezik.<sup>1</sup> Izoxazolinváz kiépítésére alkalmazható egyik módszer a nitril-oxidok alkénekre történő 1,3-dipoláros cikloaddíciója.<sup>2</sup> Nitril-oxidok *in situ* generálására legismertebb eljárások a Mukaiyama módszer, amely primer nitroalkánok dehidratációján alapszik,<sup>3</sup> illetve a Huisgen módszer, a hidroximoi-kloridok bázis indukált dehidrohalogénezése.<sup>4</sup> A ciklusos  $\alpha$ - vagy  $\gamma$ -aminosav származékokra nitril-oxidokkal végrehajtott cikloaddíciók biológiailag aktív vegyületek szintéziséhez vezetnek.<sup>5</sup> Ciklopenténváz  $\gamma$ -aminosavakra történő sztereoselektív cikloaddícióval különböző multisubsztituált antivirális hatású származékot állítottak elő.<sup>6</sup> Farmakológiai hatásuknak köszönhetően a ciklusos  $\beta$ -aminosavakra az elmúlt években egyre nagyobb figyelem irányult.<sup>7</sup> A természetben előforduló ciszpentacin [(1*R*,2*S*)-2-amino-1-ciklopentánkarbonsav], valamint az icofungipen [(1*R*,2*S*)-2-amino-4-metilciklopentánkarbonsav], baktériumellenes és antifungális hatású vegyületek.<sup>7b</sup> A ciklusos  $\beta$ -aminosavakat széles körben alkalmazzák új típusú peptidek szintézisére. Ezen kívül, a  $\beta$ -aminosavak különböző természetes vegyületek komponensei, valamint potenciális gyógyszervegyületek és heterociklusok építőelemeiként is szolgálnak.<sup>8</sup> Számos multifunkciós ciklusos aminosavszármazék (Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir) különböző biológiai hatással rendelkezik.<sup>7c</sup> A cikloalkénváz  $\beta$ -aminosavak kettős kötése lehetőséget nyújt újabb funkciós csoportok szelektív kialakítására. Kutatócsoportunkban különböző szelektív funkcionálizálási technikákat alkalmazva hidroxil, fluor, dihidroxil, amino vagy azid funkciókat alakítottak ki  $\beta$ -aminosav vázán. Kutatómunkánk célja a nitril-oxidok 1,3-dipoláros cikloaddíciójával izoxazolingyűrűvel kondenzált új típusú  $\beta$ -aminosav származékok regio- és sztereoselektív szintézise volt.

## 2. Eredmények

### 2.1. Izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok előállítása

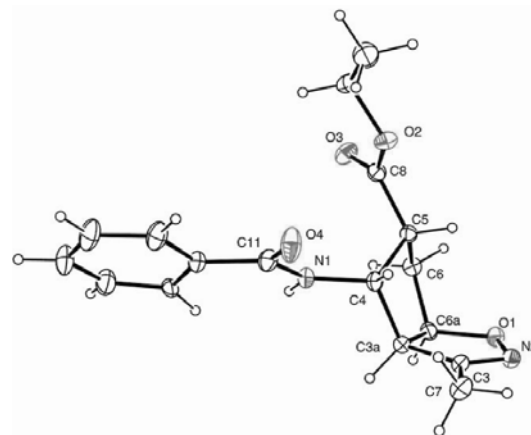
Munkánk első részében a *tert*-butoxikarbonil (Boc), illetve benzoil (COPh) csoporttal védett etil-(*cisz*-2-aminociklopent-3-én)-karboxilátra (**1a**, **1b**) terveztük végrehajtani a cikloaddíciót. Nitril-oxid generálására nitroetánt, vízelvonószerként *di-tert*-butildikarbonátot

(Boc<sub>2</sub>O), bázisként pedig 4-dimetilaminopiridint (DMAP), alkalmaztunk. E reakciókat szobahőmérsékleten végeztük, THF oldószerben (1. ábra).



1. Ábra. Nitroetánból generált nitril-oxid 1,3-dipoláros cikloaddíciója etil-(*cisz*-2-aminociklopent-3-én)-karboxilátra.

A reakciókban a lehetséges négy regio- és sztereoizomerből három izoxazolingyűrűvel kondenzált származék keletkezett (**2a**, **2b**; **3a**, **3b**; **4a**, **4b**). Az izomereket kromatográfiai módszerrel választottuk el. A vegyületek szerkezetét <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, COSY, NOESY, HSQC spektroszkópiai módszerekkel állapítottuk meg. A legnagyobb termeléssel képződő **2b** termék szerkezetét röntgendiffrakciós méréssel is igazoltuk (2. ábra).

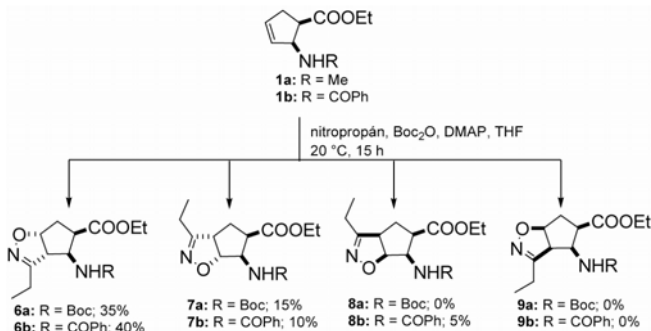


2. Ábra. A **2b** vegyület röntgendiffrakciós képe.

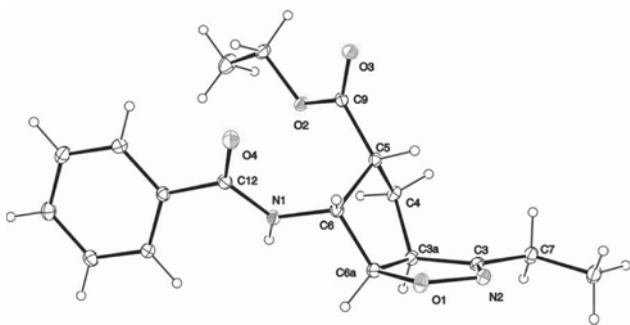
A **2a**, **2b** és **3a**, **3b** vegyületek esetében az izoxazolin gyűrű az észter, illetve amino funkciókhoz viszonyítva *transz*, míg a minor termékben (**4a**, **4b**) *cisz* térállású. A major termékben

\* Fülöp Ferenc. Tel.: (36)-62-545-462; fax: (36)-62-545-705; e-mail: fulop@pharm.u-szeged.hu

(**2a**, **2b**) az izoxazolingyűrűben lévő oxigénatom távolabb esik a karbamát, illetve amid funkciótól. Ez a szelektivitás a nitrogén elektronszívó hatásával magyarázható, mely szerint a 4-es szénatomon lecsökken az elektronsűrűség, és a dipol reagens oxigénje erre a szénatomra támad. A nitril-oxid képzését a homológ 1-nitropropánnal is elvégeztük, majd a korábbi reakciókörülményeket alkalmazva végrehajtottuk a cikloaddíciót miközben szintén három izoxazolinvázas izomer képződött (3. és 4. ábra). A termékek aránya megközelítőleg hasonló volt, mint a korábbi reakcióban.

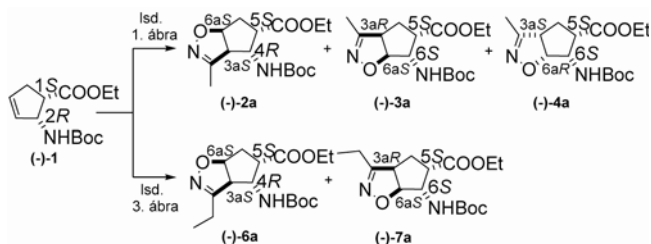


3. Ábra. Nitropropánból képzett nitril-oxid 1,3-dipoláros cikloaddíciója etil-*cis*-2-aminociklopent-3-énkarboxilátra.



4. Ábra. A **6b** vegyület röntgendiffrakciós képe.

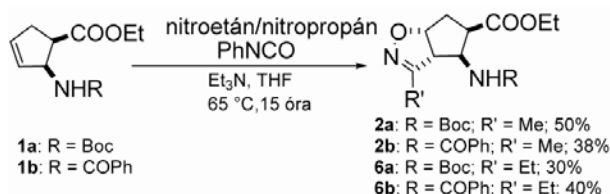
Ebben az esetben is a legjobb termeléssel képződő **6** termékben az izoxazolin gyűrű *transz* térállású az észter, illetve amino funkciókhoz viszonyítva, valamint az izoxazolin gyűrű oxigénatomja távolabb esik a karbamát, illetve amid funkciótól. E cikloaddíciós termékeket enantiomertiszta formában is előállítottuk az optikailag aktív etil-*(cis)*-2-aminociklopent-3-én)-karboxiláttól [(-)-**1**] kiindulva, amit a racém  $\beta$ -laktám *Candida antarctica* B-Lipáz által katalizált enantioszelektív gyűrűnyitásával állítottunk elő. Az 1. és 3. ábrán bemutatott reakciókörülményeket alkalmazva a (-)-**1** enantiomertiszta vegyületre megkaptuk az optikailag aktív izoxazolingyűrűvel kondenzált  $\beta$ -aminokarboxilátokat [(-)-**2a**, (-)-**3a**, (-)-**4a**, (-)-**6a**, (-)-**7a**] (5. ábra).<sup>9</sup>



5. Ábra. Enantiomertiszta izoxazolingyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok szintézise.

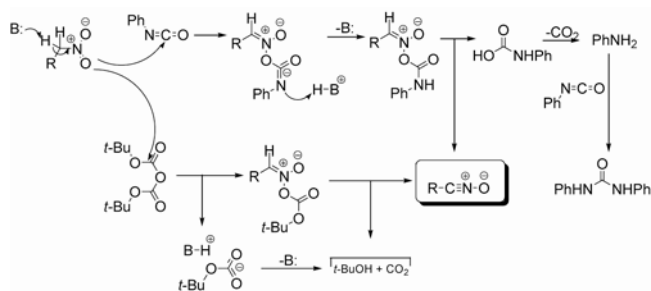
## 2.2 Izoxazolingyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok szelektív szintézise

Az előbbi reakciók során — annak ellenére, hogy különböző izoxazolingyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok regio- és sztereoiszomerjeit sikerült előállítanunk — nem értünk el 100%-os regio- és sztereoszelektivitást. Ezért a cikloaddíciós reakciókat elvégeztük fenilizocianát (PhNCO) vízelvonószert és trietilamin (TEA) bázis jelenlétében, THF oldószerben, 65 °C-on (6. ábra).



6. Ábra. Izoxazolingyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok regio- és sztereoszelektív szintézise.

Meglepő módon e körülmények között egyetlen termék (**2a**, **2b**, illetve **6a**, **6b**) képződött, jóllehet az irodalomban nem találtunk arra példát, hogy a két módszer közötti különbség befolyásolhatja a reakció szelektivitását. Mindkét eljárásban a nitril-oxid hasonló mechanizmus szerint képződik (7. ábra).



7. Ábra. Nitril-oxid generálása a Mukaiyama módszer alapján, primer nitroalkánból Boc<sub>2</sub>O vagy PhNCO vízelvonószert jelenlétében.

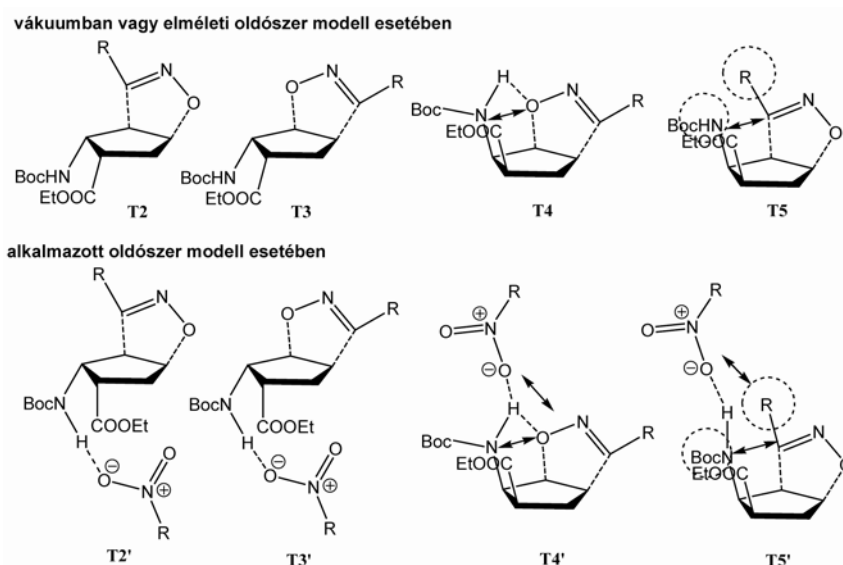
A reakció szelektivitásának alátámasztására DFT számításokat<sup>10</sup> végeztünk az **1a** vegyület és MeNCO reakciója között G03 program felhasználásával. Az átmeneti állapotok ( $\Delta H^\ddagger$ ;  $\Delta G^\ddagger$ ) és a termékek ( $\Delta H$ ;  $\Delta G$ ) reakció entalpia változásait valamint a Gibbs féle szabad energia változásait az 1. táblázat tartalmazza. Kinetikus szempontból a cikloaddíciós reakció főtermékének a **4a** vegyület javasolt, mivel ennek a legalacsonyabb a Gibbs féle szabad energiája ( $\Delta G^\ddagger$ ). Ezen szempont alapján a **3a** vegyület kialakulása a legkedvezőtlenebb. Ezen kívül azt is megállapítottuk, hogy a **2a** és **5a** vegyületek gyakorlatilag azonos  $\Delta G^\ddagger$  értékeket mutattak (1 Táblázat). A **4a** komponens legalacsonyabb  $\Delta G^\ddagger$  értékének magyarázatául szolgál az, hogy intermolekuláris H-kötés alakulhat ki a MeNCO és az etil-*(cis)*-2-aminociklopent-3-én)-karboxilát (**1a**) amid funkciója között (8. ábra). Hasonló eredményeket kaptunk HF/3-21G; B3LYP/6-31G(d,p) és B3LYP/6-311++G(2d,2p) számítások esetében is, függetlenül az alkalmazott oldószermodellről [IEFPCM(THF)] és az elméleti modelltől, ezért kiterjesztettük komplexebb leírásra. Az irodalomban ismert, hogy néhány kiválasztott oldószer molekula vagy más komponens az oldószerben több információt adhat a mechanizmusról, ezért az általunk kiválasztott oldószer

THF volt. Azonban a nitroalkán feleslege második oldószerként (koszolvens) szolgálhat, erős hidrogénkötést alakítva ki a kiindulási vegyület amid funkciójával. Ebben az esetben az eredmények megváltoztak. A legalacsonyabb  $\Delta G^\ddagger$  értéket a **2a** vegyület mutatta (8. ábra), valamint a **3a** termék  $\Delta G^\ddagger$  értéke nem sokban különbözött az előbbtől,

ami alátámasztja a kísérleti eredményeket. A **4a** és **5a** cikloaddíciós termékeknél  $\Delta G^\ddagger$  értékei minden esetben alacsonyabbak voltak, mint azok számított  $\Delta G^\ddagger$  értékei vákuumban, mivel a nitro vegyület bizonyos mértékben elfoglalja a reaktív területet és megakadályozva ezáltal a MeNCO támadását (8. ábra).

**1. Táblázat.** A **2b**, **3b**, **4b** és **5b** cikloaddíciós termékek entalpia változásai ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) és Gibbs féle szabad energia változásai ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) vákuumban, elméleti oldószer modell, illetve alkalmazott oldószermodell használatával.

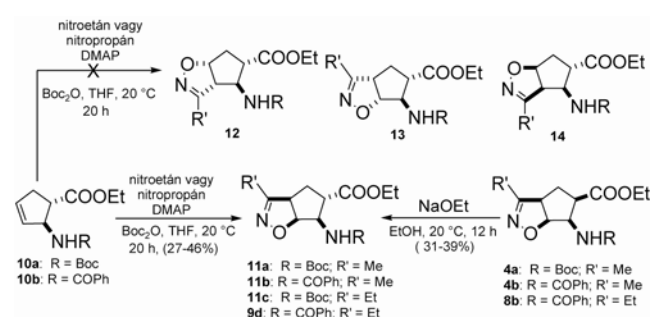
	vákuumban				oldószerben (THF)				koszolvenssel			
	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$	$\Delta H$	$\Delta G$	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$	$\Delta H$	$\Delta G$	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$	$\Delta H$	$\Delta G$
<b>2b</b>	55,8	<b>114,1</b>	-169,5	<b>-104,3</b>	59,1	<b>118,2</b>	-165,7	<b>-100,0</b>	67,3	<b>126,1</b>	-164,1	<b>-100,1</b>
<b>3b</b>	75,1	<b>128,3</b>	-159,1	<b>-97,2</b>	79,3	<b>132,5</b>	-154,1	<b>-92,0</b>	70,1	<b>129,3</b>	-153,4	<b>-92,0</b>
<b>4b</b>	49,8	<b>109,5</b>	-164,1	<b>-101,5</b>	54,2	<b>113,8</b>	-160,3	<b>-98,1</b>	75,8	<b>135,5</b>	-160,2	<b>-97,7</b>
<b>5b</b>	54,9	<b>113,7</b>	-166,7	<b>-100,9</b>	58,2	<b>117,9</b>	-161,9	<b>-96,3</b>	95,4	<b>153,9</b>	-161,3	<b>-96,5</b>



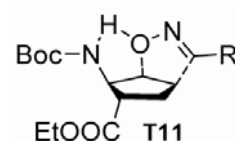
**8. Ábra.** A **2a**, **3a**, **4a** és **5a** cikloaddíciós termékek **T2**, **T3**, **T4** és **T5** átmeneti állapotai; sztérikus kölcsönhatások kialakulásai a  $-\text{COOEt}$  és a nitril-oxid között a **T2** és **T3** átmeneti állapotban, valamint  $-\text{NHBoc}$  és a nitril-oxid, valamint  $-\text{COOEt}$  és nitril-oxid közötti kölcsönhatás a **T5** átmeneti állapotban és a H-kötéses kölcsönhatás kialakulása az  $-\text{NHBoc}$  és a nitril-oxid között a **T4** átmeneti állapotban.

További kísérleteinkben az etil-(*transz*-2-aminociklopent-3-én)-karboxilátot használtuk dipolarofil-ként, melyet a megfelelő *cisz* aminoészter NaOEt-os epimerizációjával állítottunk elő. Nitril-oxid előállítására az 1. ábrán leírt módszert alkalmaztuk. Míg a *cisz* vegyület esetén a reakció nem volt teljesen szelektív, addig a *transz* származékkal végzett kísérlet során reakció teljes szelektivitással egy terméket (**11**) eredményezett, melyben az izoxazolin gyűrű *cisz* térállású a karbamát, illetve amid funkcióhoz képest, és *transz* térállású az észter csoporthoz viszonyítva. A heterociklusban lévő oxigénatom pedig közelebb esik az amino funkcióhoz (9. Ábra). Ezt az izomert korábban már sikerült előállítanunk, mégpedig a minor (**4**) termék NaOEt-tal történő izomerizációjával.

A reakciók szelektivitása feltehetően sztérikus és hidrogénkötéses kölcsönhatással magyarázható. Az átmeneti állapotban sztérikus taszító hatás alakul ki a nitril-oxid és az észter csoport között, valamint hidrogénkötéses kölcsönhatás jön létre a karbamát hidrogénje, illetve a nitril-oxid között<sup>5d</sup> (10. ábra).

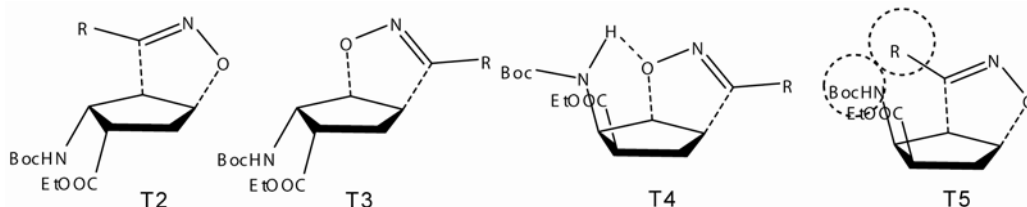


**9. Ábra.** Az etil-(*transz*-2-aminociklopent-3-én)-karboxilátra végrehajtott 1,3- dipoláros cikloaddíció.



**10. Ábra.** **T11** átmeneti állapot.

A 2. és 3. ábrán bemutatott cikloaddíciós reakciók szelektivitása hasonlóképpen magyarázható. A két főtermék sztereokémiáját az észter funkció és a nitril-oxid között kialakult sztérikus tasztítás határozza meg (10. ábra). A hidrogén-kötéses kölcsönhatás ez esetben elhanyagolható. A minor termékek esetében (**5a**, **5b** és **9b**) az átmeneti

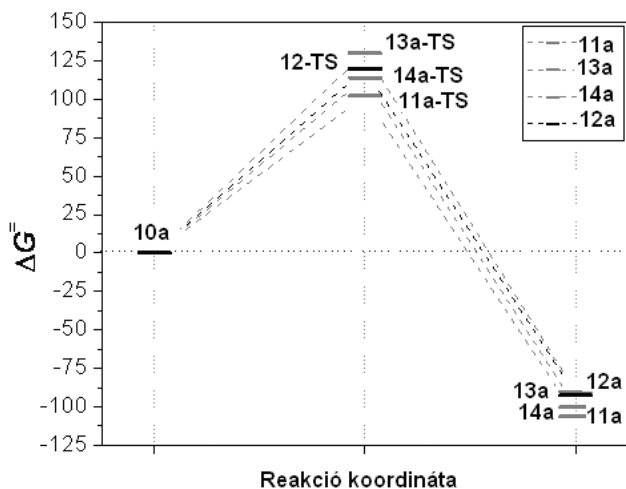


11. Ábra. A 2, 3, 4 és 5 cikloaddíciós termékekhez vezető reakciók átmeneti állapotai (**T2**, **T3**, **T4**, **T5**); sztérikus tasztító kölcsönhatás az észter és a nitril-oxid között a **T2** és **T3** állapotban, a karbamát és nitril-oxid között, valamint az észter és a nitril-oxid között a **T5** átmeneti állapotban; és H-kötéses kölcsönhatás a karbamát és nitril-oxid között a **T4** állapotban.

A különböző szinteken elvégzett számításaink [(B3LYP/6-31++G(d,p), B3LYP/6-311++G(d,p) és B3LYP/6-311++G(2d,2p)] az etil-(*transz*-2-aminociklo-pent-3-én)-karboxilát és a nitril-oxid között ugyanazon eredményeket mutatta, mint amiket a kísérletek során tapasztaltunk. A reakciók során a legkedvezőbb terméknek a **11a**, **11b**, **11c** és **11d** transzpentacin származék bizonyult (2. táblázat és 12. ábra).

2. Táblázat. A **10a** vegyületből keletkező transzpentacin származékok (**11a**, **12**, **13** és **14**) entalpia változásai ( $\Delta H^\ddagger$ ) (kJ mol<sup>-1</sup>), illetve Gibbs féle szabad energia változásai ( $\Delta G^\ddagger$ ) (kJ mol<sup>-1</sup>)

	10a → TS		10a → termékek	
	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$	$\Delta H$	$\Delta G$
<b>11a</b>	47,76	102,21	-170,02	-106,24
<b>12</b>	65,32	119,90	-154,35	-92,50
<b>13</b>	76,83	130,31	-152,22	-90,46
<b>14</b>	55,36	113,99	-163,44	-100,12

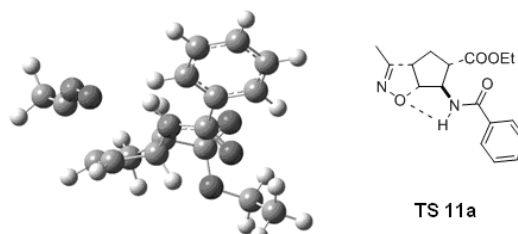


12. Ábra. A **10a** vegyület átalakulásának energiadiagramja.

Ezek alapján megállapítható, hogy nitril-oxid addíciójának szelektivitása az etil-(*transz*-2-aminociklo-pent-3-én)-

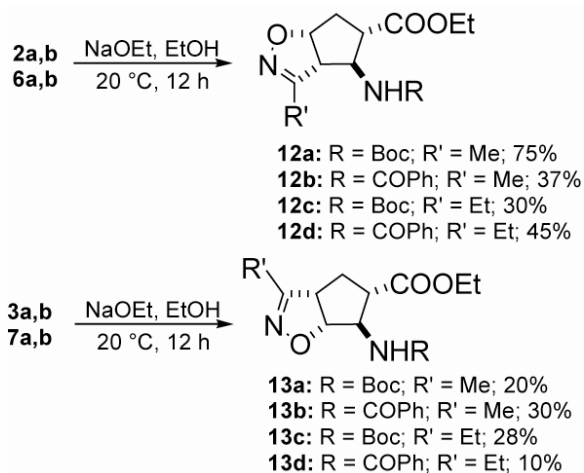
állapotban a H-kötéses kölcsönhatás a nitril-oxid és a karbamát funkció között erőteljesebb lehet, mint az észter és a nitril-oxid sztérikus tasztító hatása. A lehetséges negyedik izomer azért nem képződhetett, mivel nem csak az észter és a nitril-oxid között alakulhat ki sztérikus tasztítás, hanem a karbamát funkció és a nitril-oxid alkil funkciója között is (11. ábra).

karboxilátra nagymértékben hidrogén-kötéses kölcsönhatással magyarázható (13. ábra).



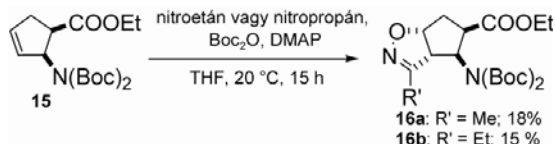
13. Ábra. A **11a** vegyülethez vezető reakció átmeneti állapotának H-kötéssel stabilizált szerkezete.

Az előállított izoxazolinvázas  $\beta$ -aminoésztereket (**2a**, **2b**; **3a**, **3b**; **6a**, **6b**; **7a**, **7b**) NaOEt-tal reagáltatva epimerizáció során a megfelelő transzpentacin származékokhoz jutottunk (**12a**, **12b**, **12c**, **12d**, **13a**, **13b**, **13c**, **13d**) (14. ábra).



14. Ábra. Izoxazolingyűrűvel kondenzált transzpentacin származékok szintézise a **2a**, **2b**; **6a**, **6b**; **3a**, **3b** és **7a**, **7b** vegyületek epimerizációjával.

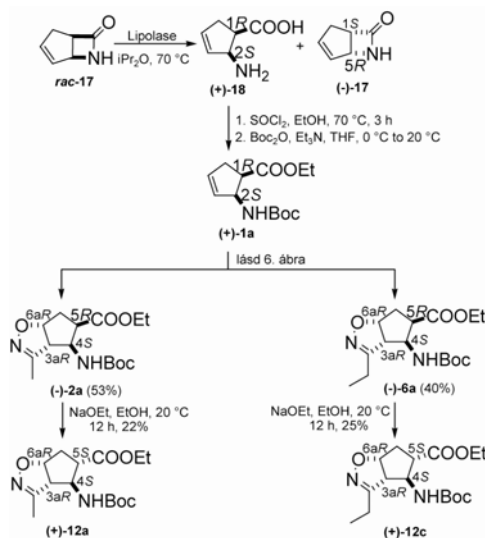
Érdeemesnek tartottuk megvizsgálni a cikloaddíciós reakciót a szubsztrát változtatásával. A Boc-csoporttal kétszeresen védett *cisz* aminoészterrel (**15**) — mely esetében nem alakulhat ki hidrogénkötéses kölcsönhatás — is elvégeztük a reakciót (15. ábra).



15. Ábra. Izoxazolin gyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékok szintézise kétszeresen Boc- védett cisz aminoszterből kiindulva.

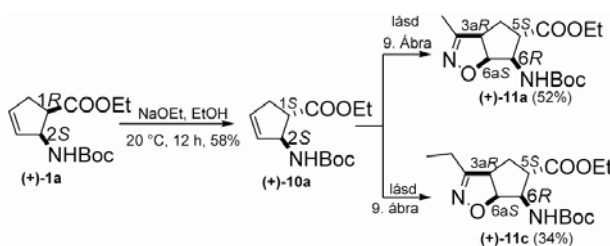
A reakcióban regio- és sztereoselektíven egy termék (**16a**, **16b**) képződött. A keletkezett termékben az izoxazolin gyűrű *transz* térállású a karbamát és az észter csoporthoz viszonyítva (taszító szterikus kölcsönhatás), valamint a gyűrűben levő oxigénatom távolabb esik a karbamát csoporttól.

Ezután az izoxazolin gyűrűvel kondenzált  $\beta$ -aminosavakat enantiomertiszta formában is előállítottuk. Az enantiomertiszta kiindulási anyagot a racém  $\beta$ -laktám (**17**) enzim rezolválásával állítottuk elő, az így keletkezett enantiomertiszta  $\beta$ -aminosavat [(+)-**18**] a (+)-**1** védett aminoszterre alakítottuk át. Nitril-oxid generálását nitroetánból, illetve 1-nitropropánból végeztük, PhNCO és DMAP jelenlétében (16. ábra). A keletkezett termékeket [(-)-**2a**, (-)-**6a**] NaOEt-tal izomerizáltuk, melynek során megkaptuk az enantiomertiszta transzpentacin származékokat [(+)-**12a**, (+)-**12c**] (16. ábra).



16. Ábra. Enantiomertiszta izoxazolingyűrűvel kondenzált transzpentacin származékok szintézise etil-(*cisz*-2-aminociklopent-3-én)-karboxiláttól.

A cikloaddíciós reakciókat az enantiomertiszta etil-(*transz*-2-aminociklopent-3-én)-karboxilátra [(+)-**10a**] is elvégeztük (17. ábra).<sup>10</sup>



17. Ábra. Enantiomertiszta izoxazolingyűrűvel kondenzált transzpentacin származékok szintézise etil-(*transz*-2-aminociklopent-3-én)-karboxiláttól.

### 3. Összefoglaló

Kísérleti munkánk során új, izoxazolingyűrűvel kondenzált ciszpentacin származékokat állítottunk elő. A nitril-oxid különbözőmódotörténő generálásával, valamint adipolarofil változtatásával teljes regio- és sztereoselektivitást értünk el. A szelektivitást kémiai számításokkal is alátámasztottuk. Enantiomertiszta  $\beta$ -laktámból kiindulva az izoxazolinvázas termékek enantiomerjeit is sikerült előállítanunk.

### Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak az OTKA (NK81371 K100530) támogatásáért.

### Hivatkozások

- (a) Kai, H.; Matsumoto, H.; Hattori, N.; Takase, A.; Fujiwara, T.; Sugimoto, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1997-2000. (b) Basappa, M.; Sadashiva, P.; Mantelingu, K.; Swamy, N. S.; Ranappa, K. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4539-4544.
- (a) Nair, V.; Suja, T. D. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 12247-12275. (b) Gothelf, K. V.; Jorgensen, K. A. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 863-910. (c) Gallos, J. K.; Koumbis, A. E. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 397-425. (d) Pellissier, H. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3235-3285. (e) Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis; Kobayashi, S., Jorgensen, K. A., Wiley-VCH: Weinheim **2002**. (f) Nitrile Oxides, Nitrones and Nitronates in Organic Synthesis; Torsell, K. B. G., New York, VCH, **1988**. (g) Namboothiri, I. N. N.; Rastogi, N.; Ganguly, B.; Mobin, S. M.; Cojocar, M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1453-1462.
- Mukaiyama, T.; Hoshino, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *62*, 5339-5342.
- Christl, M.; Huisgen, R. *Chem. Ber.* **1973**, *106*, 3345-3367.
- (a) Pinto, A.; Conti, P.; De Amici, M.; Tamborini, L.; Grazioso, G.; Colleoni, S.; Mennini, T.; Gobbi, M.; De Micheli, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 867-875. (b) Conti, P.; Caligiuri, A.; Pinto, A.; Roda, G.; Tamborini, L.; Nielsen, B.; Madsen, U.; Frydenvang, K.; Colombo, A.; De Micheli, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 1059-1068. (c) Roda, G.; Conti, P.; De Amici, M.; He, J.; Polavaropu, P. L.; De Micheli, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3079-3090. (d) Conti, P.; De Amici, M.; Di Ventimiglia, S. J.; Stensbol, T. B.; Madsen, U.; Osborne, H. B.; Russo, E.; De Sarro, G.; Bruno, G.; De Micheli, C. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3102-3108.
- (a) Chand, P.; Bantia, S.; Kotian, P. L.; El-Kattan, Y.; Lin, T-H.; Babu, Y. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4071-4077. (b) Chand, P.; Kotian, P. L.; Dehghani, A.; El-Kattan, Y.; Lin, T-H.; Hutchison, T. L.; Babu, Y. S.; Bantia, S.; Elliot, A. J.; Montgomery, J. A. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4379-4392. (c) Mineno, T.; Miller, M. J. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6591-6596.
- (a) Fülöp, F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2181-2204. (b) Park, K.H.; Kurth, M. J. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8629-8659. (c) Mittendorf, J.; Kunisch, F.; Matzke, M.; Militzer, H.-C.; Schmidt, A.; Schönfeld, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 433-436. (d) Hamersak, Z.; Roje, M.; Avdagic, A.; Sunjic, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 635-644. (e) Yang, D.; Zhang, D-W.; Hao, Y.; Wu, Y-D.; Luo, S-W.; Zhu, N-Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6719-6722. (f) Rathore, N.; Gellman, S. H.; Pablo, J. J. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3425-3435. (g) Kiss, L.; Fülöp, F. *Synlett* **2010**, 1302.
- (a) Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11516-11529. (b) Roy, O.; Faure, S.; Aitken, D. J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5981-5984. (c)

Chandrasekhar, S.; Sudhakar, A.; Kiran, M. U.; Babu, B. N.; Jagadeesh, B. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 7368-7371. (d) Rua, F.; Boussert, S.; Parella, T.; Diez-Perez, I.; Branchadell, V.; Giralt, E.; Ortuno, R. M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3643-3645. (e) D'Elia, V.; Zwicknagl, H.; Reiser, O. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3262-3265. (f) Hetényi, A.; Szakonyi, Zs.; Mándity, I. M.; Szolnoki, É.; Tóth, G. K.; Martinek, T. A.; Fülöp, F. *Chem. Commun.* **2009**, 177-179. (g) Fülöp, F.; Martinek, T. A.; Tóth, G. K. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 323-334. (h) Martinek, T. A.; Tóth, G. K.; Vass, E.; Hollósi, M.; Fülöp, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1718-1721. (i) Hetényi, A.; Mándity, I. M.; Martinek, T. A.; Tóth, G. K.; Fülöp, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 547-553. (j) Martinek, T. A.;

Fülöp, F. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 3657-3666. (k) Torres, E.; Acosta-Silva, C.; Rua, F.; Alvarez-Larena, A.; Parella, T.; Branchadell, V.; Ortuno, R. M. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5669-5675. (l) Fernandez, D.; Torres, E.; Aviles, F. X.; Ortuno, R. M.; Vendrell, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3824-3828. (m) Fernandes, C.; Pereira, E.; Faure, S.; Aitken, D. J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3217-3220. (n) Kiss, L.; Forró, E.; Fülöp, F. Synthesis of carbocyclic  $\beta$ -amino acids. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*. Vol. 1, Ed. A. B. Hughes, Wiley, Weinheim, **2009**, 367-409. 9. Kiss, L.; Nonn, M.; Forró, E.; Sillanpää, R.; Fülöp, F. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2605-2608. 10. Nonn, M.; Kiss, L.; Forró, E.; Mucsi, Z.; Fülöp, F.; *Tetrahedron* **2011**, *67*, 4079-4085.

### Synthesis of isoxazoline-fused cispentacin derivatives

The 1,3-dipolar cycloaddition of nitrile oxides to alkenes has become widely used as a highly efficient method for the synthesis of isoxazolines.<sup>2</sup> A number of nitrile oxide cycloadditions to cyclic  $\alpha$ - or  $\gamma$ -amino acid derivatives have been performed in recent years with the aim of the synthesis of different biologically active compounds. Alicyclic  $\beta$ -amino acids have acquired great interest in recent years because of their pharmacological potential.<sup>7</sup>

Our aim was to synthesize novel, isoxazoline-fused  $\beta$ -aminocyclopentanecarboxylates regio- and stereoisomers in racemic and enantiomerically pure form.

When amino ester **1a** (with Boc amino protecting group) was submitted to the cycloaddition reactions in THF at 20 °C for 15 h two regioisomers and a diastereomer **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a**, **4b** were detected and isolated in moderate yields (Scheme 1, Scheme 3). The regioselectivity can probably be explained in terms of electronic factors: because of the electron-withdrawing effect of the nitrogen atom of the carbamate, the negatively charged oxygen atom of the dipolar agent attacks at C-4 of amino ester **1a**, **1b**, farthest from the carbamate or amide group.

The synthetic routes have also been applied for the synthesis of enantiomerically pure isoxazoline-fused  $\beta$ -aminocyclopentane carboxylates (Scheme 5).

Since the above procedure was not selective, we continued our experiments to search for other synthetic routes for the preparation of isoxazoline-fused cispentacins with higher selectivity. **1a**, **1b** were subjected to 1,3-dipolar cycloaddition under the conditions, using  $\text{RNO}_2$ ,  $\text{PhNCO}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$  in THF at 65 °C (Scheme 6). The reactions resulted 100% selectively in **2a**, **2b**, **2c**, **2d**. The explanation of the unexpected selectivity under these reaction conditions is not yet clear. The mechanism of the generation of nitrile oxide with  $\text{PhNCO}$  and  $\text{Et}_3\text{N}$  is similar to that for  $\text{Boc}_2\text{O}$  and DMAP (see Scheme 7). We are not aware of any similar example in the literature.

Whereas the addition to the corresponding *cis* isomer (**1a**, **1b**) gave three isomers (Scheme 1 and 3), under the same experimental conditions ( $\text{RNO}_2$ ,  $\text{Boc}_2\text{O}$  and DMAP) the *trans* counterparts (**10a**, **10b**) furnished selectively only one cycloadduct isomer (**11a**, **11b**, **11c**, **11d**) (Scheme 9), which can be synthesized by epimerization of very minor product (**4a**, **4b**, **4c**, **4d**) in the presence of NaOEt in EtOH. The selectivity is probably explained by steric and H-bonding interactions (Scheme 10).

The synthesized isoxazoline-fused cispentacin derivatives (Scheme 1 and 3) offered an opportunity for the preparation of new isoxazoline-fused transpentacin derivatives. Accordingly, **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **6a**, **6b**, **7a**, **7b** were epimerized at C-5 with NaOEt in EtOH to give isoxazoline-fused amino esters (Scheme 14), in which the amino and carboxylate functions were *trans*.

Next, the diprotected *cis* amino ester **17** was reacted with nitrile oxides under the conditions given in Scheme 1 and 3 and the transformation led to only the *trans* isoxazoline-fused derivatives (**18a** and **18b**) (Scheme 15). This selectivity can be explained with electron-withdrawing effect of the nitrogen atom of the carbamate, H-bonding interactions were not possible between the diprotected amino function and the nitrile oxide.

The regio- and stereoselectivity of the nitrile oxide 1,3-dipolar cycloaddition were confirmed by theoretical calculations too (see Table 1, 2 and Scheme 12).

The 100% regio- and stereoselective synthesis of **2a** and **6a** (Scheme 6) and **11a** and **11c** (Scheme 9) was extended to their preparation in enantiomerically pure form starting from the racemic  $\beta$ -lactam (**rac-17**) (Scheme 16).

In conclusion, isoxazoline-fused cispentacin derivatives were synthesized regio- and stereoselectively via the 1,3-dipolar cycloaddition of nitrile oxides to ethyl *cis*- and *trans*-2-amino-3-cyclopentene carboxylates. The cycloadducts were also prepared in enantiomerically pure form.

# Polimer adszorpció és diszpergált részecskék elektrokinetikai potenciálja gyenge és erős elektromos terekben

BÁRÁNY Sándor<sup>1,\*</sup> és MALYSHEVA Mariya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Miskolci Egyetem Egészségügyi Kara, Nanobiotechnológiai és Reg. Med. Tanszék, 3515 Miskolc- Egyetemváros, Magyarország és II. Rákóczi Ferenc Magyar Főiskola, Beregszász, Kárpátalja, Ukrajna

<sup>2</sup>T. Sevcsenko Kijevi Tudományegyetem Kémiai Kara, Kijev, Vladimirskaia utca 64, Ukrajna

## 1. Bevezetés, rövid irodalmi áttekintés

Az adszorbeált polimerek – a szerkezetük, molekulatömegük, a hozzáadott mennyiség, valamint polielektrolitok esetében töltéselőjelük és töltéssűrűségük függvényében – nagymértékben és igen különbözőképpen változtatják meg a diszpergált részecskék elektrokinetikai potenciáljának értékét. A probléma szisztematikus és tudományos igényű vizsgálata a múlt század 70-es éveiben kezdődött elsősorban a híres holland kolloidkémia iskola képviselői,<sup>1-5</sup> egyes angol kutatók<sup>6,7</sup> és jómagam (B.S.) által még Kijevben végzett (Baran A. A. néven publikált), majd a Miskolci Egyetemen folytatott<sup>8-17</sup> párhuzamosan futó kutatásaiban. A probléma sokoldalúsága és nehézsége arra vezethető vissza, hogy az adszorbeált polimerek megváltoztatják a felületközeli folyadékréteg számos tulajdonságát és a részecskék elektromos kettősrétegének (EKR) minden paraméterét, ami számos módszerrel végzett komplex vizsgálatok szükségességét indokolják. Jómagam, többek között társszerzőmmel és más munkatársaim közreműködésével részletesen vizsgáltam az adszorbeált polimerek hatását a diszpergált mikrofázisok elektrokinetikai potenciáljára,<sup>8-13</sup> felületi töltéssűrűségére<sup>12-15</sup> és felületi vezetőképességére.<sup>12-17</sup> Aláhúzendő, hogy a polimeradszorpció hatását a diszpergált részecskék elektrokinetikai potenciáljára kutatásainkig kizárólag gyenge (néhány vagy néhány tíz V/cm) elektromos terekben vizsgálták.

Az irodalmi adatokból és saját eredményekből leszűrhető fő következtetések az alábbiakban összegezhetők (itt csak a problémát tárgyaló néhány fontosabb monográfia és összefoglaló említésére van lehetőség).<sup>4,5,9,12,13,15</sup>

1. A leggyakrabban megfigyelt jelenség az, hogy nemionos polimerek adszorpciója a felületen vastag, hidrodinamikailag nem permeábilis polimer-rétegek képződéséhez vezet, ami a hasadási sík oldat felé való eltolódásával, azaz az elektrokinetikai potenciál (és az elektromos taszítóerők részarányának) csökkenésével párosul. Meghatározott feltételek/feltevések mellett a polimer-nélküli és polimerrel borított részecskék elektrokinetikai potenciáljának értékeiből kiszámítható a polimer-réteg hidrodinamikai vagy pontosabban/más névvel „elektrokinetikai” vastagsága (lásd alább és <sup>1-5, 9, 12, 13, 15</sup>).

2. Ha a nemionos polimer sok kötésponttal kapcsolódik a felülethez, azon vékony tömör réteget képezve, a Stern rétegben felhalmozódó szegmensek/ismétlődő egységek megváltoztat(hat)ják a felület töltéssűrűségét mind a közeg permittivitása, és következésképpen az EKR kapacitásának

változása miatt, mind pedig a felület irányába orientált dipólus egységekben megjelenő „adszorpciós potenciálesés”  $\psi_a$  hatása következtében. Ez az elektrokinetikai potenciál változásához vezet. Az ún. „adszorpciós vagy dipólus potenciál” jelentőségét egy elegáns kísérlettel demonstráltuk, melyben kimutattuk, hogy a pozitív AgI szol töltésjele és  $\zeta$ -potenciálja *nemionos* polietilénoxid vagy polivinil-alkohol jelenlétében negatívvá változik. Ez azt jelenti, hogy az  $\psi_a$  értéke meghaladja/túlkompenzálja az EKR klasszikus  $\psi_i$  „ionos” potenciálesését; részletesebben lásd.<sup>12-15</sup>

3. Az adszorbeált ismétlődő egységek kiszoríthatják a Stern rétegből a specifikusan adszorbeált ellenionok egy részét, ami a  $\psi_\beta$  Stern- potenciál értékének növekedéséhez vezet. A jelenség realitását kísérletileg is bizonyítottuk, pl. a fenti effektus hatásával magyaráztuk negatív töltésű AgI részecskék  $\zeta$ - potenciájának növekedését kismennyiségű polietilénoxid jelenlétében.<sup>12,13,15</sup>

4. Vastag tömör polimer-rétegek képződése a részecskék felületén, melyekben az immobilizált vízmolekulák elvesztik oldóképességüket, a Stern réteg kitágulásához, az EKR fegyverzeteinek szétválásához, azaz a  $\psi_\beta$  Stern- és  $\zeta$ - potenciál növekedéséhez vezet. Ezeket az elképzeléseket sikeresen alkalmazták egyes hidrofób szolok stabilitása változásainak értelmezésére különböző szerves anyagok, illetve polimerek jelenlétében.<sup>5,11,12,15</sup>

5. Az adszorbeált polimerláncok felületen képződött hurkaiban és láncvégeiben lokalizált szegmensek megváltoztathatják a diffúz réteg ellenionjainak térbeli eloszlását. Bár sokan feltételezik, hogy a polimer-adszorpció nem változtatja meg az ellenionok eloszlását,<sup>1,8,12,13,15</sup> elképzelhető, hogy jelentős felületi borítottságonál ez nem helytálló.<sup>15</sup> Hajlékonyláncú makromolekulák állandó felületi töltéssel rendelkező felületen megvalósuló adszorpciója esetében Brooks<sup>18</sup> feltételezte, hogy a hidratált szegmensek által elfoglalt „kizárt térfogat” megváltoztatja az ellenionok térbeli eloszlását, ami konstans fázisok-közötti potenciálesés feltételnel a felületi töltéssűrűség (és zéta- potenciál) csökkenéséhez vezet.

6. A részecskékkel ellentétes töltéselőjelű polielektrolitok adszorpciója a  $\zeta$ - potenciál jelentős csökkenéséhez, illetve töltéselőjelének megváltozásához vezet, ami a kolloidoldat destabilizációjával (flokkulálásával) párosul. Gyakran a minimális stabilitás és a részecske izoelektromos pontja eltér egymástól. Az azonos töltéselőjelű polielektrolitok adszorpciója a legtöbb esetben az elektrokinetikai potenciál és az állandóság növekedéséhez vezet.<sup>12,13,19</sup>

\* Tel./Fax: 46-565110, E-mail: akmsb@gold.uni-miskolc.hu

Elméleti síkon a problémát Ohshima,<sup>20</sup> Dukhin, Zimmermann, Werner<sup>21-23</sup> és mások vizsgálták. Egy kemény kolloidrészecskéből (magból) és annak felületén adszorbeált polielektrolit rétegből (PER) képzett puha „felületből” álló „részecske” elektromos kettősrétegének leírása igen nehéz feladat mind elméleti, mind kísérleti szempontból. Itt csak egy néhány jellegzetes eredményt van módunkban ismertetni. Az utóbbi két évtizedben a Smoluchowski-féle elektrokinetika elméletét kiterjesztették a puha felületek esetére, melyekhez tartoznak, pl. a polielektrolit-rétegek, biológiai és mesterséges membránok. Ohshima<sup>20</sup> analitikailag megoldotta a nem-linearizált Poisson-Boltzmann egyenletet vastag és egyenletes szegmenseloszlással jellemezhető PER esetére, és integrális formában levezetett egy általános hidrodinamikai egyenletet.

A kifejlesztett elméletben az elektroforetikus/elektroosztatikus sebesség leírására szolgáló egyenletek feltételezik a PER makro-ionjainak teljes mértékű disszociációját. Dukhin, Zimmermann és Werner<sup>21</sup> levezették a Poisson-Boltzmann egyenlet analitikai megoldását a vastag polielektrolit rétegben lévő ionos csoportok bármilyen fokú disszociációja esetére, az ún. kizárt ko-ionok közelítést alkalmazva. Ezek a szerzők<sup>22</sup> kimutatták, hogy a puha felületek jellemzésében a további elrehaladás csak az elektrokinetika potenciál és felületi vezetőképesség együttes mérése révén érhető el. A széles pH és ionerősség intervallumban végzett említett komplex mérések információval szolgálnak mind a síkfelületen, mind a szférikus részecskék felületén adszorbeált PER Donnan potenciálját, felületi töltését és potenciálját illetően. Dukhin és társai<sup>23</sup> aláhúzták, hogy a szilárd/kemény felületek jellemzésére alkalmazott elektrokinetika ( $\zeta$ -potenciál) mérések nem használhatók a vastag polielektrolit - rétegek belső szerkezetének adekvát jellemzésére annak ellenére, hogy ezek a mérések továbbra is hasznos információval szolgálnak a PER/elektrolit határfelület szerkezetéről és elektromos tulajdonságairól. Az adszorbeált polielektrolit réteg-szerkezetek vizsgálatának egyik új és hatékony módszere a különböző méretű mikro-csatornában végzett elektrokinetika és felületi vezetőképesség mérések. Ez a módszer/megközelítés feltételezi a PER- ben lokalizált szegmensek egyenletes eloszlását.

A fenti rövid felsorolás is mutatja a probléma összetettségét. Az alábbiakban, az utóbbi években végzett kutatásainkból be szeretném mutatni a polimer-adszorpció hatását a részecskék erős elektromos terekben megvalósuló elektroforézisére, valamint ennek összehasonlítását a nemionos polimerrel borított részecskék viselkedésével gyenge külső terekben. Ilyen irányú kutatásokat, tudomásom szerint, eddig rajtam kívül (B.S.) nem folytattak.

## 2. Nemionos polimer adszorpció és elektroforézis gyenge elektromos terekben

Miben különbözik a polimerrel borított részecskék viselkedése gyenge és erős elektromos terekben?

Gyenge elektromos terekben az adszorbeált nemionos polimer nagymértékben csökkentik a részecskék elektroforetikus ( $ef$ ) sebességét és ennek megfelelő

$\zeta$ - potenciál értékét, ami a hasadási sík oldat felé való eltolódásával magyarázható, feltételezve, hogy: 1. a polimeradszorpció nem változtatja meg az ionok eloszlását a diffúz kettősrétegben és 2. a polimerrétegben lokalizált folyadék (víz) immobilizált, a viszkozitása jelentősen nagyobb, mint a tömbfázisban. Ennek következtében feltételezik, hogy a réteg „effektív” vagy hidrodinamikai vastagsága megfelel annak a felülettől számított távolságnak, melynél az oldószer viszkozitása ugrásszerűen megváltozik. Nagyszámú irodalmi adat áll rendelkezésünkre a hozzáadott polimer mennyisége és a részecskék elektrokinetika potenciálja közötti összefüggésekről (1. pl. <sup>1-7,12,13,15</sup>). Kevesebb adatunk van az egyidejűleg mért polimer-adszorpció értéke és  $\zeta$ - potenciál összefüggésekről<sup>6-10,12,13,15,24</sup>. Illusztrációként bemutatom az általunk mért polisztirol és grafit részecskék elektrokinetika potenciáljának változását az adszorbeált polietilén-oxid (PEO) adszorpciójának függvényében (1. és 2. ábra).

Az elektroforetikus méréseket gyenge elektromos térben, 6 V/cm potenciál gradiensnél mértük, állandó ionerősséget biztosító  $10^{-4}$  M KCl oldatban. A méréseket házi, kvarcból készített mikroelektroforetikus cellában végeztük, meghatározva egyedi részecskék elektroforetikus sebességét, a <sup>9-10</sup>cikkekben leírt módon. A feltüntetett értékek általában 3-5 mérés átlaga, a mérések hibahatára 5%-ra tehető. Kimutattuk, hogy a polimer adszorpciója a vizsgált részecskék felületén nagy affinitású izotermákkal jellemezhető, azaz a polimernek az oldatból való teljes elnyelődésével kis koncentrációknál és telítési szakasz gyors elérésével nagy koncentrációknál. A nagymolekula tömegű PEO minta ( $M=3 \times 10^6$ ) maximális adszorpciója a polisztirol és grafit részecskéken megfelelően  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  és  $0,8 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  értéket ért el. Az adszorbeált mennyiség ( $\Gamma$ ) a polimer molekulatömegével növekszik. A részecskék elektrokinetika potenciálját a klasszikus Smoluchowski egyenlet alapján, azaz az EKR polarizációjának elhanyagolása feltételnel számoltuk, mivel kísérleteinkben a  $Du \ll 1$  feltétel helytálló.<sup>5,9,15</sup>

Amint az 1. és 2. ábrából látható, a  $\zeta$ - potenciál legnagyobb esése kis polimer adszorpció értékeknél figyelhető meg ( $<0.1 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  adszorbeált PEO) és a  $\zeta(\Gamma)$  függvények telítési szakasz elérésével jellemezhetőek. Példaképpen megemlíthető, hogy polisztirol részecskék elektrokinetika potenciálja a PEO adszorpciójának  $0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ -tól  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ -ig való növekedésével  $110 \text{ mV}$ -tól kb.  $10 \text{ mV}$ -ig csökken le (1. ábra). Hasonlóképpen a PEO adszorpciója  $0,8 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ -ig a grafit részecskék  $\zeta$ - potenciáljának  $50 \text{ mV}$ -tól kb.  $5 \text{ mV}$ -ig való csökkenését vonja maga után (2. ábra). Polivinil-pirrolidon adszorpciója esetében is a vizsgált részecskék elektrokinetika potenciálja kb. a kiinduló érték egy-tizedére csökkent le. Jó összhangban az adszorpció eredményekkel, a minta molekulatömegének növelésével a  $\zeta$ - potenciál esésének mértéke növekszik, azaz korreláció figyelhető meg az adszorbeált mennyiség és a nemionos polimernek a zéta-potenciálra kifejtett hatása között.

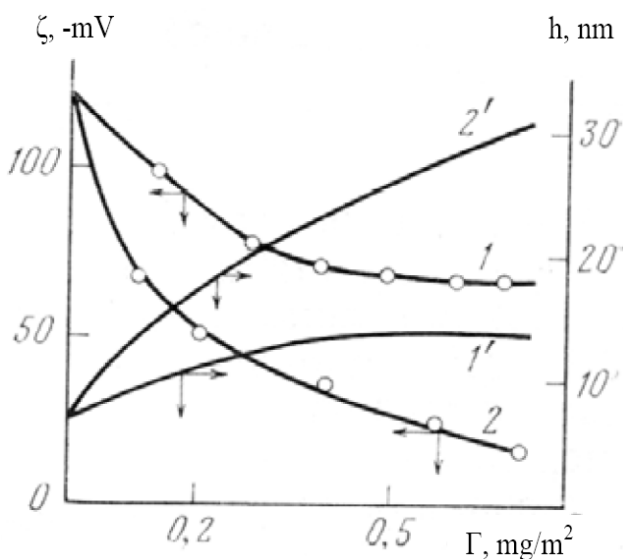
Abból a szokásos és elfogadott feltételezésből<sup>2-5, 8-15</sup> kiindulva, hogy a polimeradszorpció számottevően nem változtatja meg a részecskék felületi töltéssűrűségét és az ionok eloszlását a kettősrétegben (az utóbbit a részecskék körüli polimer-burok laza/szellős szerkezete is indokolja,



lásd alább) a diffúz EKR potenciáljai közötti összefüggést leíró egyenlet alapján kiszámoltam (B.S.) a polisztirol és grafit részecskék felületén képződött PEO és PVP rétegek  $h$  „elektroforetikus” vastagságát:

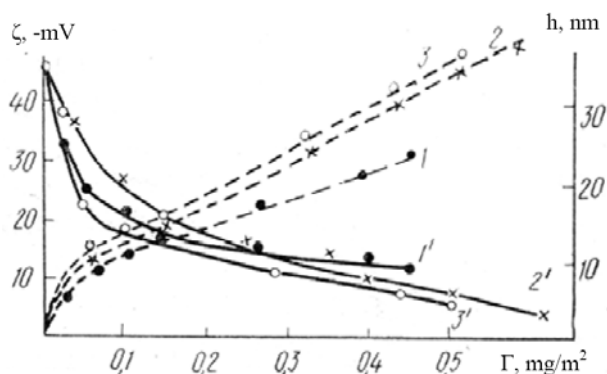
$$\exp(\kappa h) = \tanh(ze\zeta/4kT)/(ze\psi_0/4kT) \quad (1)$$

ahol:  $\kappa$  - a reciproka Debye sugár,  $h$  - a diffúz réteg vastagsága a Stern- réteg határa és a hasadási sík között,  $\zeta$  - a részecske elektrokinetikus potenciálja adott  $h$  értéknél,  $\psi_0$  - a Stern- potenciál, amelynek a polimer-nélküli részecskék kiinduló zéta- potenciálját ( $\zeta_0$ ) vettük.



1. Ábra. 30  $\mu\text{m}$  átmérőjű polisztirol részecskék elektrokinetikus potenciálja (1, 2) és az ebből számított polimerreteg vastagsága (1', 2') az adszorbeált polietilén-glikol,  $M=6 \cdot 10^3$  (1, 1') és polietilén-oxid,  $M=3 \cdot 10^6$  (2, 2') mennyiségének függvényében gyenge elektromos térben (6 V/cm),  $10^{-4}$  M KCl oldatban, a szuszpenzió koncentrációja 0,06%.

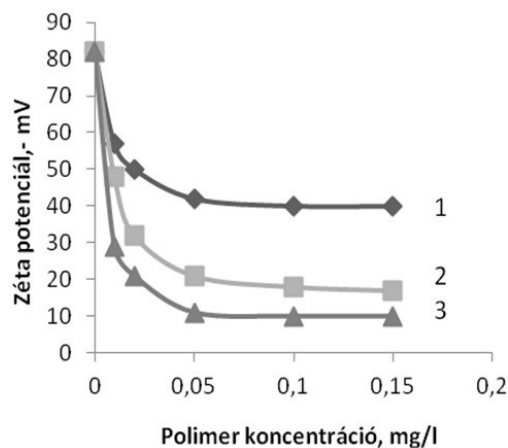
A fenti koncepció szerint a polimer-réteg vastagsága  $d=h+\delta$  (ahol  $\delta$  -a Stern réteg kiterjedése  $\approx 0,4$  nm), tehát az a felülettől számított távolság, ahol a folyadék viszkozitása drámaian megváltozik. Az (1) képlet alkalmazhatóságát, amely síkfelületre érvényes, az indokolja, hogy kutatásunkban vékony EKR-el ( $\kappa a \gg 1$ ) rendelkező részecskéket vizsgáltunk



2. Ábra. 30  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$  méretű grafitrészecskék elektrokinetikus potenciálja (1, 2', 3') és az ebből számított polimerreteg vastagsága (1, 2, 3) a polietilén-oxid,  $M=3 \cdot 5 \cdot 10^5$  (1, 1)  $M=10^6$  (2, 2') és  $M=3 \cdot 10^6$  (3, 3') adszorpciójának függvényében gyenge elektromos térben (6 V/cm),  $10^{-4}$  M KCl oldat, szuszpenzió koncentráció 0,1 %.

Az 1. és 2. ábrák a polimerretek vastagságának változását mutatják be az adszorbeált polimer-mennyiség függvényében. A görbéket a kísérletileg mért  $\Gamma$  ( $C_{\text{pol}}$ ) and  $\zeta$  ( $C_{\text{pol}}$ ) függvények alapján szerkesztettük meg. Látható, hogy a polimerreteg vastagsága az adszorpció mértékével növekszik és a nagy móltömegű PEO minta esetében a polisztirol felületén eléri a 30-35 nm-t, a grafit részecskék felületén pedig az 50-60 nm-t. Figyelembe véve a száraz PEO sűrűségét ( $1,24 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), a hidratált ismétlődő egység térfogatát ( $0,059 \text{ nm}^3$ ), az  $\Gamma=1 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ -nek megfelelő egységek számát egységnyi felületen  $M=3 \cdot 10^6$  móltömegű minta esetében ( $1,4 \cdot 10^{19}$ ), valamint azt a térfogatot, melyet ez a számú ismétlődő egység elfoglal a felület-közeli térben ( $1,4 \cdot 10^{19} \times 0,059 \text{ nm}^3 = 8,3 \cdot 10^{17} \text{ nm}^3$ ), könnyű kiszámolni, hogy 30 nm vastagságú adszorbeált rétegben a polimer egységek a részecskék-körül térfogatnak csak kb. 3%-át töltik ki. Ez az alacsony térfogati arány azt jelenti, hogy: 1. az adszorpció rétegen belül az elektroosztatikus csúszás elhanyagolható, és 2. az ionok mobilitása e rétegen belül számottevően nem csökken, azaz a polimerrel borított részecskék felületi vezetése jelentős marad. Ez biztosítja a megfelelő feltételeket a részecskék gyors elektroforetikus mozgásához erős elektromos terekben (lásd alább).

Külön megemlítjük polimeradszorpció hatásának általunk elvégzett vizsgálatát nem konvencionális rendszerekben, nevezetesen polivinil-alkohol (PVA) láncra felfűzött (grafted) poliakril-amid (PAA) kopolimerek hatását szilícium dioxid részecskék elektrokinetikus potenciáljára,<sup>25</sup> valamint polietilén-oxid adszorpciójának hatását szilícium és titán karbid,<sup>26</sup> illetve szilícium- nitrid részecskék<sup>27</sup> elektrokinetikus potenciáljára. Kimutattuk, hogy PVA/PAA kopolimer adszorpciója nem változtatja meg a szilícium dioxid felületének töltéssűrűségét, és drámaian csökkenti a részecskék (negatív)  $\zeta$ - potenciálját (3. ábra).



3. Ábra. Szilícium dioxid részecskék elektrokinetikus potenciáljának függése a hozzáadott PVA/PAA kopolimer mennyiségétől. 1-PVA homopolimer,  $M=8 \cdot 10^4$ , 2- a kopolimer  $M=2,2 \cdot 10^5$ , PAA lánc  $M=8 \cdot 10^4$ , egy PVA láncra felfűzött PAA száma 1,8. 3-a minta  $M=4,3 \cdot 10^5$ , a PAA lánc  $M=6 \cdot 10^4$ , egy PVA láncra felfűzött PAA száma 5,6. KCl koncentráció  $5 \cdot 10^{-5}$  M, pH 8,2.

A legnagyobb csökkenés kis polimer koncentrációknál figyelhető meg. A csökkenés mértéke a minta molekulatömegével és az oldalláncra felfűzött PAA mennyiségének növelésével lényegesen növekszik (3. ábra). A vizsgált kopolimerek  $\zeta$ - potenciálra kifejtett

hatásának mértéke sokszorosan meghaladja az alkotó komponensek hatását; egyértelmű korreláció figyelhető meg az adszorbeált mennyiség és a részecskék elektrokinetikai potenciálja között. A minták fent leírt módon számított „elektrokinetikai” polimerréteg vastagsága 80-160 nm között mozog, ami kb. kétszer kisebb, mint a polimergombolyag, tehetetlenségi sugárral jellemzett oldatban felvett mérete. Ez a makromolekuláknak a polimer-adszorpció során bekövetkezett jelentős deformációjára utal.

A SiC, TiC és Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> szuszpenziók polietilénoxid oldatokban megfigyelt viselkedése<sup>26,27</sup> hasonlít a sokoldalúan vizsgált polisztirol, ezüst jodid, fénoxid, fémszulfid, agyagásvány részecskék viselkedéséhez.<sup>1-15</sup> A PEO adszorpciója a részecskék felületén széles pH intervallumban (4,0-11,4) független a közeg pH értékétől, nem változtatja meg a részecskék felületi töltéssűrűségét, nagymértékben csökkenti ezek elektrokinetikai potenciálját, az utóbbi értéke arányos az adszorbeált polimer mennyiséggel. Elsőként tettünk kísérletet arra, hogy a fenti rendszerek példáján összehasonlítsuk a makromolekulák oldatban felvett méreteit, valamint az adszorbeált polimerréteg láncvégeinek hosszát és a réteg „elektrokinetikai” vastagságát. Ebből a célból sokoldalú méréseket végeztünk, amelyek magába foglalták a polimer-oldatok viszkozitásának, fényszórásának, a polimer-adszorpciónak és ennek a részecskék elektrokinetikai potenciáljára való hatásának meghatározását.

A jól ismert Flory, Mark-Kuen-Houwink összefüggések alapján<sup>28</sup> meghatároztuk a különböző móltömegű PEO molekulák  $\langle r^2 \rangle^{1/2}$  átlagos láncvég-hosszát,  $\langle s^2 \rangle^{1/2}$  tehetetlenségi sugarát és  $Rg$  effektív hidrodinamikai sugarát. Az utóbbi a  $Rg = 0,835 \langle s^2 \rangle^{1/2}$  összefüggésből számítható, ahol  $\langle s^2 \rangle^{1/2} = \langle r^2 \rangle^{1/2} / 6$  és  $[\eta] = \Phi \langle r^2 \rangle^{3/2} / M$ . Itt  $\Phi$  - a Flory állandó, ami PEO vizes oldatában  $= 2,2 \cdot 10^{21}$ ,  $[\eta]$  - a polimer-oldat határ-viszkozitása. A táblázatból látható, hogy a makromolekula oldatban felvett,  $2Rg$ -vel jellemzett átmérője kb. három-négyszerese a polimerréteg vastagságának. Ez azt jelenti, hogy a PEO adszorpciója a makromolekula jelentős deformációjával párosul. Hasonló összefüggéseket figyeltünk meg a többi vizsgált rendszerben is.

Az általánosan elfogadott elképzelések szerint az adszorbeált polimerréteg vastagságát tömény és mérsékelt tömény oldatokban a felülethez kapcsolódó makromolekulák láncvégeinek hossza határozza meg.<sup>5,29</sup> Nem léteznek direkt módszerek a láncvégek molekulatömegének ( $M_l$ ) meghatározására. Ugyanakkor ennek értéke megbecsülhető a Scheujtens-Fleer-féle polimeradszorpció elmélet alapján,<sup>29</sup> amely szerint 1000 szegmensnél hosszabb polimerláncot tartalmazó makromolekulák  $1 \cdot 10^{-4}$  vagy  $5 \cdot 10^{-4}$  térfogati törttel jellemezhető oldatából mérsékelt „jó” oldószerben a szilárd felületen adszorbeált láncok 7%, illetve 10% a láncvégekben halmozódik fel. A fenti térfogati tört 0, 1 g/l és 0, 5 g/l polimer-koncentrációnak felel meg. Ezen feltételek mellett minden adszorbeált makromolekula átlagosan 1,7 láncvéget tartalmaz. Figyelembe véve a láncvégekben halmozott polimer részarányát, a polimer átlagos móltömegét és az adszorbeált molekulára eső láncvégek számát, kimutatható, hogy 0,1 g/l és 0,5 g/l polimerkoncentrációnál az adszorbeált láncvégek móltömege megfelelően  $M_l = Mx0,07/1,7$  és  $M_l = Mx0,1/1,7$ .

A kapott értékekből a már ismertetett Flory-Huggins elmélet képletei segítségével meghatároztuk a láncvégek  $\langle r^2 \rangle^{1/2}$ ,  $\langle s^2 \rangle^{1/2}$  és  $Rg$  értékeit (Táblázat). Ezek alapján ki tudtuk számolni a SiC és TiC részecskék felületét borító polimerrétegek között ható tasztítóerők nagyságát.<sup>30</sup>

### 3. Elektroforézis erős elektromos terekben

Mielőtt áttérnénk dolgozatunk fő mondanivalójára, bevezetésképpen emlékeztetünk arra, mit jelent és milyen feltételek mellett jön létre az erős elektromos terekben megvalósuló nem-lineáris elektroforézis.

Mint már ismertettem,<sup>31</sup> mi (B.S. és társszerzői)<sup>31-37</sup> az erős (néhány száz V/cm) külső elektromos terekben megvalósuló nem-lineáris elektroforézis kétféle típusát különböztetjük meg. Az elsőt (az ún. „klasszikus nem-lineáris elektroforézist”) a külső elektromos tér és a tér által indukált ion-töltések kölcsönhatása hozza létre olyan feltételeknél, amikor az elektromos tér által indukált elektrofit-koncentrációváltozások elhanyagolhatók az egyensúlyi koncentráció nagyságához képest.<sup>35-37</sup> A második, az ún. „szupergyors elektroforézis” vagy „kettes típusú elektroforézis”, amit az erős elektromos tér és maga a tér által, az EKR tartományán kívül a koncentrációs polarizáció által indukált másodlagos ionréteg (ellenionokból képzett térfogati töltés) közötti kölcsönhatás eredményez.<sup>32-34, 37</sup> Az utóbbi jelenség csak unipoláris vezető részecskék (azaz olyan anyagokat tartalmazó részecskék, melyek csak egyfajta típusú ionokat, azaz kationokat vagy anionokat, illetve elektronokat vezetnek) esetében figyelhető meg, ha a részecskék vezetése meghaladja a közeg vezetését. A polimeradszorpció hatását a „klasszikus” nem-lineáris elektroforézisre vizsgáltuk.

Kimutattuk,<sup>35-37</sup> hogy a külső elektromos tér növekedésével az elektroforézis  $V_{ef}$  sebességnek az  $E$  térerősségtől való függése egyre erősebben eltér a lineáristól, és  $V_{ef}$  csak az  $E$  páratlan hatványainak függvénye, azaz:

$$V_{ef} = \mu(1) E + \mu(3) E^3 \quad (2),$$

ahol a  $\mu(1)$  és  $\mu(3)$  koefficiensek függetlenek a térerősségtől

A „köbös” elektroforézist jellemző  $\mu(3)$  számítására alkalmas összefüggést vezetünk le vékony EKR és szimmetrikus  $z^+ = z^- = 1$  elektrolit esetére:<sup>35</sup>

$$\mu_{eph}^3 = -a^2 z^+ z^- \frac{e}{3kT} \epsilon_m \frac{Du}{1 + 2Du} \quad (3)$$

ahol  $a$  - a részecske sugara,  $z^+$  és  $z^-$  - a kationok és anionok töltése,  $\epsilon_m$  - a közeg permittivitása,  $\mu$  - a részecskék elektroforetikus mozgékonyasága ( $= V_{ef}/E$ ),  $Du$  - az EKR polarizációját jellemző ún. Dukhin szám<sup>5, 35-38</sup>

$$Du = [\exp(\bar{\psi}_\delta / 2 - 1)] / \kappa a \quad (4)$$

Itt  $a$  - a gömb alakú részecske sugara vagy a pálcika alakú részecske rövid tengelye,  $\kappa$  - a reciproka Debye sugár és  $\bar{\psi}$  a dimenzió nélküli Stern-potenciál,  $\bar{\psi}_\delta = z e \bar{\psi} / kT$ , ezt a gyakorlatban megközelítésként a mért  $\zeta$ -potenciál értékével helyettesítjük.

Látható, hogy a "kőbős" nem-lineáris elektroforézis - ellentétben a klasszikus elektroforézissel - egyenesen arányos a részecskék sugarának négyzetével, az elektromos tér gradiensének köbével, de független a részecskék - potenciáljának értékétől. Kísérletileg kimutattuk, hogy néhány tíz  $\mu\text{m}$  átmérőjű homodiszperz polisztirol, alumínium-

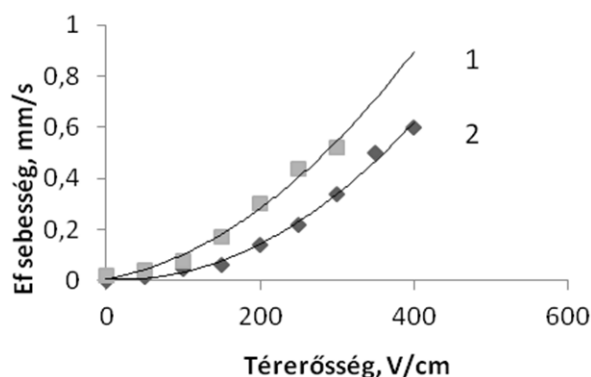
oxid és grafit részecskék, valamint *Saccharomyces Cerevisiae* élesztősejtek elektroforetikus sebessége - jó összhangban a fenti elmélettel - jelentősen növekszik a részecskemérettel, kb. 100-200 V/cm térerősséig lineárisan függ a külső elektromos tér gradiensétől, erősebb terekben pedig  $V_{ef} \sim E^3$ .<sup>35-37</sup>

**Táblázat.** PEO rétegek  $h$  "elektrokinetikai" vastagsága TiC részecskék felületén. A makromolekula méretei vizes oldatban, és az adszorbeált láncvégek méretei.

Cp, g.l <sup>-1</sup>	Makromolekula oldatban/adszorbeált					Adszorbeált makromolekula láncvége					
	h, nm	M	$\langle r^2 \rangle^{1/2}$ , nm	$\langle s^2 \rangle^{1/2}$ , nm	2 Rg, nm	h/2Rg	M	$\langle r^2 \rangle^{1/2}$ , nm	$\langle s^2 \rangle^{1/2}$ , nm	2 Rg, nm	h/2Rg
0,015	4	3,8 x 10 <sup>5</sup>	74	30	50	0,08	1,6x10 <sup>4</sup>	22	9	15	0,93
0,03	12					0,24					
0,1	14					0,28					
0,25	15					0,28					
0,5	15					0,28					
0,015	9	2,2 x 10 <sup>6</sup>	209	85	142	0,06	9 x 10 <sup>4</sup>	62	25	43	0,94
0,03	15					0,10					
0,1	40					0,28					
0,25	42					0,29					
0,5	42					0,29					

#### 4. Polimeradszorpció és elektroforézis erős elektromos terekben

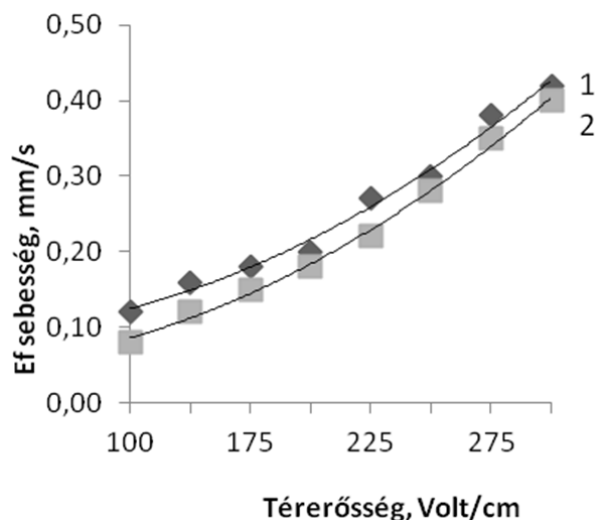
Az adszorbeált polietilén-oxid és polivinil-pirrolidon (PVP) hatását latex, grafit és alumínium-oxid részecskék „elektrokinetikai potenciál-elektromos térerősség” függvényekre a 4-6 ábrákkal illusztráljuk. Az erős elektromos terekben létrejövő nagy elektroforetikus sebességek mérésére egy speciális, képelemzésen és rövid elektromos impulzusok alkalmazásán alapuló új módszert dolgoztunk ki.<sup>34, 36</sup> Az ábrákon bemutatott sebességek 5 mérés átlagolt értéke, a mérések hibahatára 3-5%. A megfigyelt törvényszerűségek az alábbiakban összegezhetők:



**4. Ábra.** 50  $\mu\text{m}$  átlag-átmérőjű grafit részecskék elektroforetikus sebességének függése az elektromos tér erősségétől desztillált vízben (felső görbe) és 1  $\text{mg.m}^{-2}$  adszorbeált PEO jelenlétében (alsó görbe).

(1) A részecskék  $ef$  sebessége erős elektromos terekben polimerrel borított részecskék esetében – csakúgy, mint a borítatlan részecskékénél - egy-két nagyságrenddel nagyobb (néhány tized vagy néhány mm/sec), mint gyenge terekben (jellemzően néhány  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ).

(2) Az „elektroforetikus sebesség –térerősség” függvények lefutása mind a csupasz, mind a polimerrel borított részecskék esetében hasonló, azaz az elektromos gradiens növekedésével a részecskék sebessége kb. 100 V/cm feszültségig először egyenes arányosan növekszik, amit erősebb terekben egy sokkal meredekebb növekedési szakasz követ. Kb. 100-400 V/cm feszültség tartományban az elektroforetikus sebesség nagyjából az általunk megjósolt  $E^3$  törvény szerint emelkedik. Tehát az elképzelésünk, amely szerint az erős elektromos terekben a jelentős  $ef$  sebességet az EKR polarizációja következtében a részecskék felületén létrejött „nettó” töltés<sup>35</sup> hozza létre, érvényes nem csak a polimer-nélküli, de a polimerrel borított részecskék esetében is.

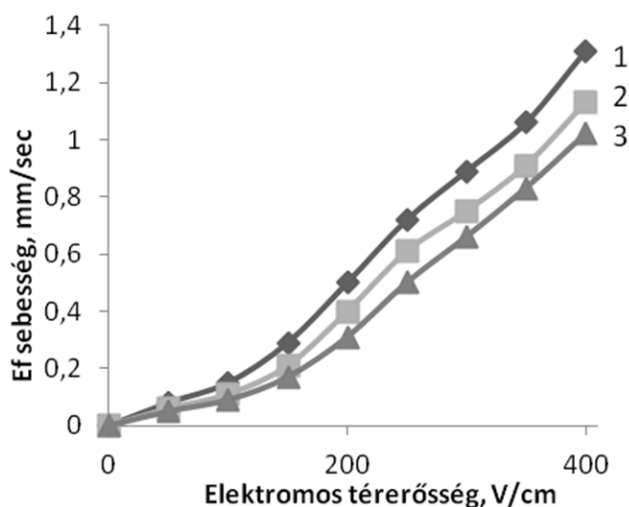


**5. Ábra.** 75  $\mu\text{m}$  átlag-átmérőjű alumínium-oxid részecskék elektroforetikus sebességének függése az elektromos tér erősségétől desztillált vízben (felső görbe) és 1  $\text{mg.m}^{-2}$  adszorbeált PVP jelenlétében (alsó görbe).

(3) Látható, hogy az 1 mg.m<sup>-2</sup> adszorbeált polimert tartalmazó részecskék *ef* sebessége kisebb, mint a csupasz részecskéké, mind gyenge (1- 3. ábra), mind erős elektromos terekben (4-6 ábra). Ugyanakkor a két sebesség-esésben igen nagy a különbség: gyenge terekben a  $\zeta$ - potenciál a polimeradszorpció következtében nagyságrenddel vagy még nagyobb mértékben csökken, míg erős terekben ez a csökkenés csak néhány tíz százalék, szélsőséges esetben is csak legfeljebb kétszeres. Pl. a PEO adszorpciójának növekedése grafit részecskék felületén 0,8 mg.m<sup>-2</sup>-ig gyenge elektromos térben az elektrokinetika potenciál kiinduló értékének egy tizedére való csökkenését eredményezi, erős térben (100 V/cm felett) ez az esés csak kb. 40-60 %-t tesz ki. (lásd a 2. és 4. ábrákat).

A polimerrel borított részecskénél a  $V_{ef}(E)$  függvényekben a vándorlási sebesség ugrásszerű növekedése nagyobb feszültségeknél következik be, mint a csupasz részecskék esetében. Ezek a megfigyelések alátámasztják a fent ismertetett következtetéseket, melyek szerint gyenge elektromos terekben az adszorbeált nem-ionos polimer elektroforézisre kifejtett hatása elsősorban a hasadási sík oldat felé való eltolódásának következménye, ami igen jelentős lehet. Ugyanakkor erős terekben a polimeradszorpciók a részecskék *ef* sebességére kifejtett hatása sokkal kisebb/gyengébb. Ez feltételezéseink szerint az adszorpció rétegben lokalizált ionok vezetésének kismértékű csökkenésével magyarázható, ami a polimer-szegmensek fékező hatásának következménye.

(4) A polisztirol részecskék erős terekben (100 V/cm felett) megfigyelt "kőbös" elektroforetikus sebessége a részecskeméret növelésével - mind a csupasz, mind a polimerrel borított részecskék esetében - növekszik (6. ábra), jó összhangban az elméleti előrejelzéssel. Ez is egy újabb bizonyítéka annak, hogy az általunk kidolgozott nem-lineáris elektroforézis elmélete helytálló nem csak nagyméretű diszpergált részecskék esetében, hanem adszorbeált polimert tartalmazó részecskéket tartalmazó rendszerekben is.



6. Ábra. 1 mg.m<sup>-2</sup> PEO-t ( $M=3 \cdot 10^6$ ) adszorbeált, különböző méretű polisztirol részecskék elektroforetikus sebességének függése a térerősségtől. A részecskék átmérője 50 μm (1), 30 μm (2) és 22 μm (3).

## Köszönetnyilvánítás

A tanulmány/kutató munka a TÁMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0001 jelű projekt részeként – az Új Magyarország Fejlesztési Terv keretében – az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

## Irodalom

1. Fleer, G.J.; Koopal, L.K.; Lyklema, J. *Kolloid ZZ. Polymere* **1972**, *250*, 689-698.
2. Koopal, L.K.; Lyklema, J. *Farad. Discuss. Chem. Soc.* **1975**, *59*, 230.
3. Lyklema, J. *Pure Appl. Chem.*, **1976**, *46*, 149.
4. Koopal, L.K.; Lyklema, J. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *100*, 895-905.
5. Lyklema, J. *Fundamentals of Interface and Colloid Science, vol. II*, Academic Press: London- San Diego- New York, etc. **1995**.
6. Vincent, B. *Adv. Colloid Interf. Sci.* **1974**, *4*, 1-196.
7. Garvey, M.J.; Tadros Th. F.; Vincent B. *J. Colloid Interf. Sci.* **1976**, *55*, 440-448.
8. Eremenko, B.V.; Platonov, B.E.; Baran, A.A.; Mamchenko, A.V. *Kolloidn. Zhurnal.* **1975**, *37*, 1083-1089.
9. Baran, A.A.; Kocherga, I.I. *Theoret. and Eksperim. Chem.* **1976**, *12*, 640-647.
10. Baran, A.A.; Kocherga, I.I.; Solomentseva, I.M. *Kolloidn. Zhurnal.* **1977**, *39*, 9-15.
11. Baran, A.A.; Solomentseva, I.M.; Semnikhin, N.M. *Kolloidn. Zhurnal*, **1979**, *41*, 835-841.
12. Baran, A.A. *Polymer-containing disperse systems*, Naukova Dumka: Kiev, **1986** (orosz nyelven).
13. Bárány, S. *Polimerek diszperz rendszerekben*. A Kémia újabb eredményei. Akadémiai Kiadó: Budapest, **2000**, *88*, 1-162.
14. Eremenko, B.V.; Baran, A.A.; Platonov, B.E. *Dokladi Akademii Nauk SSSR (Proc. USSR Acad. Sci.)* **1975**, *223*, 116-119.
15. Baran, A.A.; Platonov, B.E. *Russian Chemical Reviews.* **1981**, *50*, 161-191 (Russian version) 88-105 (English version).
16. Baran, A.A.; Dudkina, L.M. *Theoret. and Eksperim. Chem.* **1979**, *15*, 162-167.
17. Barany, S.; Dukhin, S. *Colloids Surf. A.*, **2001**, *192*, 307- 316.
18. Brooks, D.E. *J. Colloid Interf. Sci.* **1977**, *43*, 687-694.
19. Gregory, J.; Barany, S. *Adv. Colloid Interf. Sci.* **2011**, *169* (1), 1-12.
20. Ohshima, H. *Colloids Surf. A* **1995**, *103*, 249-255.
21. Dukhin, S.; Zimmermann, R.; Werner, C. *J. Colloid Interf. Sci.* **2005**, *286*, 761-766.
22. Dukhin, S.; Zimmermann, R.; Werner, C. *Adv. Colloid Interf. Sci.* **2006**, *122*, 93-98.
23. Dukhin, S.; Zimmermann, R.; Werner, C. *J. Colloid Interf. Sci.* **2008**, *328*, 217-224.
24. Csemesz, F.; Rohrsetzer, S.; Kovács, P. *Colloids a. Surfaces*, **1987**, *24*, 101-107.
25. Eremenko, B.V.; Malysheva, M.L.; Rusina, O.D. et al. *Colloids a. Surfaces A*, **1995**, *98*, 19-24.
26. Eremenko, B.V.; Malysheva, M.L.; Baran, A.A. *Colloids a. Surfaces* **1992**, *69*, 117-124.
27. Eremenko, B.V.; Malysheva, M.L.; Bezuglaya, T.N.; Savickaya, A.N. *Kolloidn Zhurnal* **1997**, *59*, 38-46.
28. Bodor Géza. *A polimerek szerkezete*. Budapest: Műszaki Könyvkiadó, **1982**.
29. Scheujtens, J.M.H.M.; Fleer, G.J. *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 178-189.

30. Barany, S.; Malysheva, M. L.; Eremenko B.V. *J. Colloid a. Interface Sci.* **2004**, *275*, 148-157.
31. Bárány, S. *Magyar Kém. Folyóirat*, **2010**, *116*, 166-173.
32. Baran, A. A.; Babich, Ya. A.; Tarovsky, A. A.; Mishchuk, N.A., *Colloids Surf. A*, **1992**, *68*, 141- 151.
33. Barany, S., *Advances in Colloid a. Interface Sci.* **1998**, *75*, 45-78.
34. Barany, S.; Mishchuk, N.; Prieve, D. *J. Colloid Interf. Sci.* **1998**, *207*, 240-250.
35. Shilov, V.N.; Barany, S.; Grosse, K. *Advances in Colloid a. Interface Sci.* **2003**, *104*, 159-173.
36. Barany, S., Madai, F., Shilov, V. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **2004**, *128*, 14-20.
37. Barany, S. *Adv. Colloid Interf. Sci.*, **2009**, *147-148*, 36-43.
38. Dukhin, S.S., Derjaguin, B.V. *Electrokinetic Phenomena*, in: *Surface and Colloid Science* (E. Matijevic, ed.), Vol. 7, Wiley: New York and Toronto, **1974**.

### Polymer adsorption and electrokinetic potential of dispersed particles in weak and strong electric fields

The effect of adsorbed non-ionic polymers on electrophoresis of dispersed particles in weak and strong electric field is compared. A short review on the changes in the electrical double layer (EDL) structure as a result of adsorption of polymers using literature data and own results is given. We have shown that adsorption of poly(ethylene oxide) and poly(vinyl pyrrolidone) as well as poly(vinyl alcohol)/ polyacrylamide grafted copolymers strongly, by an order of magnitude or more, decreases the electrophoretic velocity ( $V_{ef}$ ) of polystyrene, graphite and aluminium-oxide as well as correspondingly silica particles in weak electric fields (6 V/cm). This decrease is bigger the adsorbed amount or the molecular mass of the polymer is higher. This is explained by the shift of the shear plane toward solution due to polymer adsorption. It is shown also that the adsorption of poly(ethylene oxide) onto SiC, TiC and Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> surfaces has no effect on the surface charge density and causes a considerable decrease in the electrokinetic potential of

the particles owing to the shift of the shear plane towards solution. The calculated "electrophoretic" thickness of PEO adsorbed layers are in good agreement with the dimensions of the end of tails of adsorbed macromolecules estimated from the Scheutjens-Fleer theory of polymer adsorption.

At the same time the polymer adsorption only slightly decreases the  $V_{ef}$  of particles in strong (100-400 V/cm) fields. In line with our theoretical predictions, it means that the non-linear ("cubic") electrophoresis, that arises in strong electric fields, is independent of the position of the shear plane, i.e. the zeta-potential value. It proves our idea that the electrophoretic velocity in strong electric fields is determined mainly by the surface conductivity of particles, i.e. it is not a function of the electrokinetic potential but rather the Dukhin number that characterizes the polarization of the electric double layer.

# Fentiazin egységet tartalmazó szenzor- és szelektormolekulák szintézise és molekuláris felismerőképességük vizsgálata

KORMOS Attila és HUSZTHY Péter\*

Budapest Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Szent Gellért tér 4., 1111 Budapest, Magyarország

## 1. Bevezetés

Napjainkban az egyre szigorúbb követelmények egyre szelektívebb analitikai módszereket igényelnek, például a klinikai kémiában, az ipar számos területén, vagy a környezetvédelemben. Megoldást jelenthet erre a problémára a szelektív komplexképzési tulajdonságokkal rendelkező szenzor- és szelektormolekulák kifejlesztése. Utóbbiak működésének alapja a molekuláris felismerés jelensége, mely során egy gazdamolekula az öt körülvevő molekulahalmazból kiválaszt egy vendégmolekulát, és egy másodlagos kötőerőkkel összetartott komplexet alkot vele.

Az első szintetikus gazdamolekulákat, a koronaétereket Pedersen fedezte fel 1967-ben, amikor melléktermékként izolálta a dibenzo-18-korona-6-étert.<sup>1</sup> A koronaéterek szelektivitása növelhető a gyűrű merevségének növelésével, mivel ekkor a gazdamolekula bizonyos vendégmolekulákkal szemben előrendezetté válik, ami azt jelenti, hogy a komplex kialakításához kisebb konformációváltozásra van szükség. A makrociklus merevebbé tétele megvalósítható például triciklusos heterociklusos vegyületek beépítésével.<sup>2-12</sup> A kutatócsoportunkban folyó triciklusos heteroaromás egységet tartalmazó koronaéterek előállítását és vizsgálatát célzó kutatások<sup>8-12</sup> folytatásaként figyelmünk a fentiazin felé fordult. A fentiazin NH-csoportjának koordinációs tulajdonságait nemcsak az aromás gyűrűk szubsztitúciójával, hanem a kénatom oxidációs állapotának változtatásával is lehet módosítani. A szakirodalomban közölték néhány fentiazin egységet tartalmazó koronaéter előállítását,<sup>13-15</sup> azonban ezen származékok makrogyűrűjének koordinációs szférájában a fentiazin nitrogénatomja nem vesz részt.

Bár az anionok komplexálására alkalmas szintetikus receptormolekulák az első koronaéterekkel egyidőben már igen korán megjelentek,<sup>16,17</sup> az anionszenzorok fejlődése jóval lassabb volt a kationok, illetve semleges molekulák komplexálására alkalmas ligandumokéhoz képest. Az utóbbi évtizedben azonban ez a kutatási terület is gyors fejlődésnek indult. Az anionszenzorok egyik csoportját a viszonylag savanyú NH-csoportot tartalmazó semleges molekulák alkotják, melyek az anionokat hidrogénkötéssel komplexálják.<sup>18-24</sup> A megfelelő helyzetbe bevitt elektronszívó szubsztituensek segítségével a szenzormolekulákban lévő NH-csoportok polaritása tovább növelhető. A nagyfokú polarizáció nemcsak erősebb hidrogénkötéseket eredményezhet, hanem azt is, hogy egy-egy bázikus anion deprotonálhatja a savasabb származékot. Amennyiben egy anion deprotonálja az anionszenzort, akkor a ligandum egyszerű sav-bázis indikátorként viselkedik, és a szelektivitás főleg az anion bázicitásától függ, a

szelektivitás azonban növelhető a kötőhelyek számának és térbeli elhelyezkedésének változtatásával.<sup>25,26</sup>

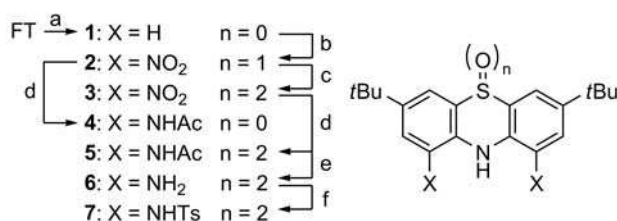
Az anionszenzorok között több enantioszelektív receptormolekulára is találhatunk példát. Az eddig közölt származékokban a kiralitást hordozó egységek a leggyakrabban aminosavak, BINOL-, illetve szteroid-származékok,<sup>27,28</sup> emellett néhány cukor egységet tartalmazó anionszenzor is ismert az irodalomban.<sup>29,30</sup>

Doktori munkám során célul tűztük ki fentiazin egységet tartalmazó koronaéterek előállítását. A szintézis során olyan származékokhoz jutottunk, mely alkalmas fentiazin egységet tartalmazó anionszenzorok előállítására. Az új potenciális szenzormolekulák szintézisében túl célul tűztük ki azok komplexképzési tulajdonságainak vizsgálatát UV-látható spektroszkópiával.

## 2. A fentiazin egységet tartalmazó koronaéterek és anionszenzorok előállítása

### 2.1. A koronaéterek előállításához szükséges prekurzorok szintézise

A makrociklizációhoz szükséges 1,9-diszubsztituált fentiazinok előállítása több úton lehetséges. Egyrészt a megfelelő funkciós csoportokat tartalmazó vegyületekből kiindulva a fentiazin egység utólagos kialakításával, másrészt fentiazinból kiindulva aromás elektrofil szubsztitúciós reakciók segítségével. Mivel a fentiazin aromás elektrofil szubsztitúciós reakcióiban először mindig 3,7-diszubsztituált származékok keletkeznek főtermékként, így 1,9-diszubsztituált származékok előállításához védőcsoportot kell alkalmazni 3-as és 7-es helyzetben. Védőcsoportként *tert*-butilcsoportokat alkalmaztunk. Irodalmi módszer<sup>31</sup> módosításával állítottuk elő fentiazinból kiindulva az **1** 3,7-di-*tert*-butilfentiazint,

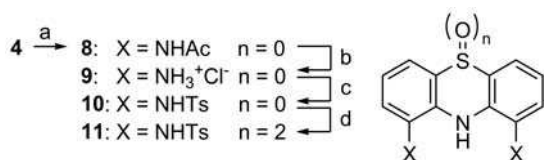


**1. Ábra.** A *tert*-butilcsoportot tartalmazó **7** tozilamid előállítása (FT: fentiazin; a: *t*BuCl, AlCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; b: AcONO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; c: 30%-os vizes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AcOH; d: H<sub>2</sub>, Pd/C, Ac<sub>2</sub>O, AcOH; e: H<sub>2</sub>, Pd/C, AcOH; f: TsCl, piridin).

\* Tel.: +36-1-4631071; fax: +36-1-4633297; e-mail: huszthy@mail.bme.hu

melyet acetyl-nitráttal nitráltunk. Az így nyert **2** dinitrofeniazin-5-oxidot hidrogén-peroxiddal oxidálva kaptuk a **3** dinitrofeniazin-5,5-dioxidot. A két nitrovegyületet katalitikus hidrogénezéssel redukáltuk. Amennyiben a **2** dinitrofeniazin-5-oxidból indulunk ki, a nitrocsoportok mellett a fentiazin szulfonilcsoportja is redukálódik. Ismert, hogy a kénatomon oxidálatlan aminofentiazin származékok levegőn könnyen fentiazínium vegyületé oxidálódnak (ld. metilénkék példája). Ennek elkerülésére a szulfoxidból kiinduló redukción ecetsavanhidrid jelenlétében végeztük, így jutottunk a kénatomján oxidálatlan **4** fentiazin-diacetamidhoz. Amennyiben a **3** dinitrofeniazin-5,5-dioxidot alakítjuk tovább, a fentiazin szulfonilcsoportja nem redukálódik, és ebben az esetben már a szabad amin is stabil levegőn. A redukción mind ecetsavanhidrid jelenlétében, mind ecetsavanhidrid távollétében elvégezve kaptuk az **5** 5,5-dioxidofentiazin-diacetamidot, illetve a **6** diamint tozilezve olyan származékot nyerhetünk, mely fentiazin egységet tartalmazó koronaéter közvetlen prekuzora lehet. A reakciót piridin oldószerben, két ekvivalens tozil-kloriddal végezve sikerült előállítanunk a kívánt **7** ditozilamidot (1. ábra).<sup>33</sup>

Ahhoz, hogy a későbbiekben a fentiazin aromás gyűrűre különböző szubsztituenseket tudjunk vinni, szükséges a *tert*-butilcsoportok eltávolítása. A *tert*-butilcsoportok eltávolítását Friedel–Crafts típusú átkilezéssel végeztük. A **4** diacetamidot alumínium-klorid és fenol jelenlétében forralva regáltattuk, majd az így nyert **8** *tert*-butilcsoportokat nem tartalmazó diacetamidot 20%-os vizes sósavban forralva jutottunk a **9** sósavas sóhoz. A fentebb említett oxidációra való érzékenysége miatt a szabad ament a további reakciók során csak a reakcióelegyben szabadítottuk fel. A **9** sósavas sót piridinben tozil-kloriddal reagáltattuk, majd a kapott **10** ditozilamidot *meta*-klórperbenzoesavval oxidálva jutottunk a **11** ditozilamidhoz (2. ábra).<sup>33</sup> A **7** és **11** tozilamidok fentiazin egységet tartalmazó koronaéterek lehetséges prekuzorai.



**2. Ábra.** A *tert*-butilcsoportot nem tartalmazó **11** ditozilamid szintézise (a:  $\text{AlCl}_3$ , fenol, toluol; b: 20%-os vizes sósav; c:  $\text{TsCl}$ , piridin; d:  $m\text{CPBA}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

## 2.2. Fentiazin egységet tartalmazó koronaéterek előállítása

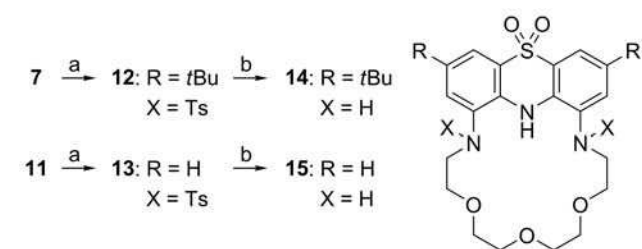
A **12** makrociklust koronaéterek előállítására bevált módszerrel állítottuk elő. A **7** ditozilamidot tetraetilglikolditozilát és kálium-karbonát jelenlétében acetonitrilben forralva jutottunk a kívánt termékhez. Azonos körülmények között a *tert*-butilcsoportokat nem tartalmazó **11** ditozilamid esetén azonban nem sikerült a várt koronaétert (**13**) kinyerni. A reakciót más alkálifémiont tartalmazó bázisok (cézium-karbonát, kálium-*tert*-butilát) jelenlétében különböző oldószerekben (acetonitril, DMF, DMSO) elvégezve sem sikerült a kívánt makrociklust előállítani. Amennyiben Hünig-bázist (*N,N*-diizopropil-etilamint) alkalmaztunk a reakcióban különböző oldószerekben (dimetoxietán, diglim, acetonitril), sikerült a kívánt koronaétert izolálni. Legjobb

eredményt acetonitril oldószer alkalmazása esetén értünk el (3. ábra, 1. táblázat).

**1. Táblázat.** A makrociklizációs reakciók körülményei.

Kiinduló	R	bázis	oldószer	termelés
<b>7</b>	<i>t</i> Bu	$\text{K}_2\text{CO}_3$	MeCN	15%
<b>11</b>	H	$\text{K}_2\text{CO}_3$	MeCN	–
<b>11</b>	H	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	MeCN	–
<b>11</b>	H	$\text{K}_2\text{CO}_3$	DMF	–
<b>11</b>	H	KOtBu	DMF	–
<b>11</b>	H	KOtBu	DMSO	–
<b>11</b>	H	Hünig-bázis	dimetoxietán	14%
<b>11</b>	H	Hünig-bázis	diglim	6%
<b>11</b>	H	Hünig-bázis	MeCN	45%
<b>7</b>	<i>t</i> Bu	Hünig-bázis	dimetoxietán	8%
<b>7</b>	<i>t</i> Bu	Hünig-bázis	MeCN	52%

Mivel Hünig-bázist alkalmazva sikerült a **13** koronaétert előállítani, megvizsgáltuk, hogy a *tert*-butilcsoportokat tartalmazó **12** makrociklus szintézisének is alkalmazható-e az utóbbi bázis. Hasonló eredményt tapasztaltunk, acetonitril alkalmazva jó termeléssel tudtuk a **12** koronaétert kinyerni (3. ábra, 1. táblázat).<sup>33</sup>

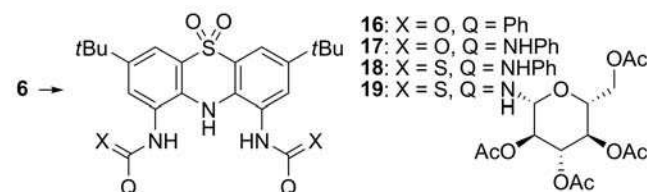


**3. Ábra.** A koronaéterek előállítása (a: a makrociklizációs reakciók körülményei az 1. táblázatban találhatóak; b:  $\text{Na}(\text{Hg})$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , MeOH).

A **12** és **13** koronaéterek tozilcsoportjait nátrium-amalgám segítségével távolítottuk el, így jutottunk a **14** és **15** szekunder aminocsoportokat tartalmazó makrociklusokhoz (3. ábra).<sup>33</sup>

## 2.3. Az anionszenzorok szintézise

A **6** diamint benzoil-kloriddal (BzCl-dal) piridinben acilezve állítottuk elő a **16** dibenzamidot.<sup>32</sup> Fenilizocianáttal és fenilzotiocianáttal reagáltatva a **6** diamint a **17** karbamidhoz és a **18** tiokarbamidhoz jutottunk, melyek több kötőhellyel rendelkeznek, és így várhatóan



**4. Ábra.** Az anionszenzorok szintézise (reagensek: BzCl, illetve a megfelelő izocianát vagy izotiocianát, piridin oldószerben).

stabilabb komplexet képeznek anionokkal.<sup>34</sup> A **6** diamint tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glükopiranozil-izotiocianáttal reagáltatva állítottuk elő a **19** tiokarbamidot, mely királis karboxilátok enantiomerjeinek megkülönböztetésére lehet alkalmas.<sup>35</sup>

### 3. Az anionszenzorok komplexképzési tulajdonságainak vizsgálata

A lehetséges szenzormolekulák (**5**, **16**–**19**) komplexképzési tulajdonságait UV-látható spektroszkópiával vizsgáltuk acetonitril oldószerben.

#### 3.1. A **5** acetamid és a **16** benzamid anionokkal szemben mutatott viselkedése

Az **5** acetamid és a **16** benzamid anionokkal szemben mutatott viselkedését fluorid, klorid, bromid, jodid, hidrogén-szulfát, dihidrogén-foszfát és acetát jelenlétében vizsgáltuk (5. ábra, 2. táblázat).<sup>32</sup> Míg az **5** acetamid hidrogénkötéses komplexet képzett kloriddal, addig fluorid, acetát és dihidrogén-foszfát jelenlétében mindkét szenzormolekula esetében deprotonálódást tapasztaltunk. Az **5** acetamid fluoriddal történő titrálása során a komplexképzésre jellemző sávot is megfigyeltük. Mindkét szenzormolekula esetén sikerült ecetsav jelenlétében visszaszorítani a deprotonálódást az acetáttal történő komplexképződés javára.

**2. Táblázat.** Az **5** és **16** szenzormolekulák komplexképződésének ( $K_1$ ) és a deprotonálódásának ( $K_2$ ) egyensúlyi állandói különböző anionok esetén.

	<b>5</b>		<b>16</b>	
	log $K_1$	log $K_2$	log $K_1$	log $K_2$
F <sup>-</sup>	5,13	5,28	–	6,05
Cl <sup>-</sup>	3,83	–	–	–
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	–	-1,05	–	-0,52
AcO <sup>-</sup>	3,52 <sup>a</sup>	0,67	<sup>b</sup>	0,94

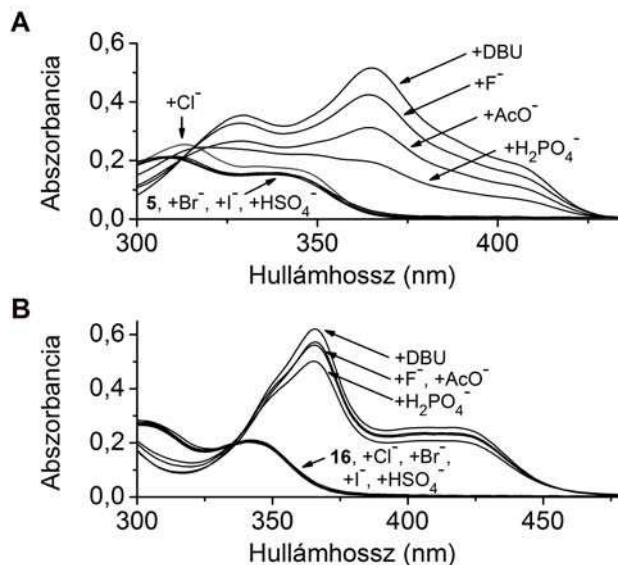
<sup>a</sup>Ecetsav jelenlétében acetáttal végzett titrálásból számított érték

<sup>b</sup>Az ecetsav jelenlétében acetáttal kapott titrálási spektrumsorozatot nem sikerült megfelelően illeszteni

#### 3.2. Karbamid és tiokarbamid egységet tartalmazó szenzormolekulák (**17** és **18**) komplexképzési tulajdonságainak vizsgálata

A **17** karbamid és a **18** tiokarbamid anionokkal szemben mutatott viselkedését fluorid, klorid, bromid, jodid, hidrogén-szulfát, szulfát, dihidrogén-foszfát, nitrát és acetát jelenlétében vizsgáltuk (3. táblázat).<sup>34</sup> Míg a legtöbb anion esetében egyszerű komplexképződést tapasztaltunk, addig fluorid és acetát hozzáadására deprotonálódásra jellemző spektrális változást figyeltünk meg. Az így kapott spektrumok azonban nem egyeztek meg a deprotonált szenzormolekulák spektrumával (6. ábra). Ez alapján arra következtettünk, hogy a deprotonált szenzormolekulák anionnal alkotott komplexei keletkeztek. Ezt a **17** karbamid esetén röntgendiffrakciós vizsgálattal is sikerült alátámasztani (6. ábra).<sup>34</sup>

Mivel a fenti eredmények azt mutatták, hogy fluorid és acetát esetén az anion feleslege deprotonálta a semleges receptor-anion komplexet, megvizsgáltuk, hogy a DBU-val vagy tetrabutillammónium-hidroxiddal deprotonált receptormolekulák képesek-e komplexet képezni anionokkal.



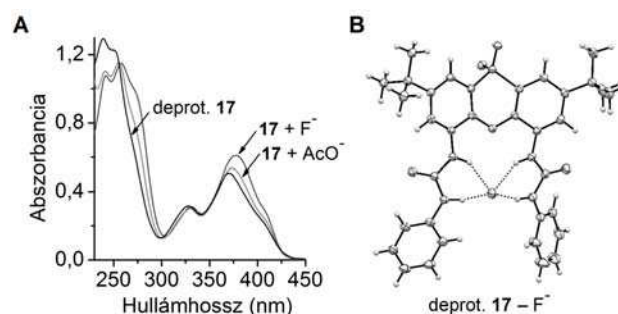
**5. Ábra.** Az **5** acetamid és a **16** benzamid (20  $\mu$ M, A: **5**, B: **16**) oldatának spektrális változásai különböző anionok (4 ekv. F<sup>-</sup>, AcO<sup>-</sup> és H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, valamint 100 ekv. Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> és HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>) hatására acetonitril oldószerben.

**3. Táblázat.** A **17**, **18**, deprotonált **17** és deprotonált **18** szenzormolekulák egyensúlyi állandói különböző anionok esetén<sup>a</sup>

	<b>17</b>		<b>18</b>	
	log $K_1$	log $K_2$	log $K_1$	log $K_2$
F <sup>-</sup>	>8	>8	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>
Cl <sup>-</sup>	5,99	–	4,45	–
Br <sup>-</sup>	4,60	–	3,28	–
I <sup>-</sup>	–	–	–	–
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3,23	–	–	–
HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	4,51	–	3,26	–
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	6,72	–	6,28	–
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	7,51	–	6,17	–
AcO <sup>-</sup>	7,57	5,61	6,44	3,87

<sup>a</sup>  $K_1 = [LHX^-] / ([LH][X^-])$ ,  $K_2 = [LX_2^-] / ([L^-][X^-])$

<sup>b</sup> a titrálási spektrumsorozatot nem lehetett megfelelően illeszteni



**6. Ábra.** A deprotonált **17** oldatának (20  $\mu$ M) spektruma és a fluorid- és acetáttal történő titrálások végpontját jelző spektrumok (A), a **17** karbamidból tetrabutillammónium-fluorid jelenlétében készült kristály aszimmetrikus egységének szerkezete (B, a tetrabutillammónium ellenionokat az áttekinthetőség érdekében nem tüntettük fel).

A deprotonált receptormolekulák oldatához tetrabutillammónium-fluoridot, illetve -acetátot adagolva a komplexképződésre jellemző spektrális változásokat tapasztaltunk. A fluorid erősen, az acetát valamivel gyengébben kötődött a deprotonált molekulákhoz (3. táblázat).



### 3.3. Glükóz egységet tartalmazó tiokarbamid (19) enantioszelektivitásának vizsgálata

A **19** acetilezett glükóz egységeket tartalmazó tiokarbamid enantioszelektivitását mandulasav ( $\Delta\log K=0,19$ ), *tert*-butoxikarbonil-védett fenilglicin ( $\Delta\log K=0,22$ ), *tert*-butoxikarbonil-védett fenilalanin ( $\Delta\log K=0,09$ ), valamint *tert*-butoxikarbonil-védett alanin ( $\Delta\log K=0,04$ ) tetrabutilammónium sóinak enantiomerjei között vizsgáltuk. A nitrogéneken lévő védőcsoportnak az enantioszelektivitásra gyakorolt hatását *N*-védett fenilglicin tetrabutilammónium-sók esetén tanulmányoztuk. A vizsgálatokat formil- ( $\Delta\log K=0,05$ ), acetyl- ( $\Delta\log K=0,18$ ), valamint pivaloilcsoportot ( $\Delta\log K=0,22$ ) tartalmazó fenilglicin-származékok tetrabutilammónium sóinak enantiomerjeivel végeztük el.<sup>35</sup> Megállapítható, hogy a védőcsoport térkitöltésének a növekedésével nőtt az enantioszelektivitás.

### 4. Összefoglalás

Sikeresen szintetizáltunk fentiazin egységet tartalmazó koronaétereket, anionszenzorokat, valamint ezek prekursorait. A **14** és **15** makrociklusok szekunder aminocsoportjai lehetőséget nyújtanak arra, hogy ezeket alkilezve, illetve acilezve különböző célokra alkalmas új szenzor- és szelektormolekulákat állíthassunk elő.

Az **5** és **16–18** szenzormolekulák anionokkal szemben mutatott viselkedését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a több kötőhellyel rendelkező **17** karbamid és **18** tiokarbamid kedvezőbb komplexképzési tulajdonságokkal rendelkezik, fluoriddal és acetáttal még a deprotonált formáik is képesek komplexet képezni.

A **19** glükóz egységeket tartalmazó tiokarbamid a vizsgált optikailag aktív karboxilátok enantiomerjeivel szemben közepes szelektivitást mutatott.

### Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönik az OTKA Irodának a kutatás pénzügyi támogatását (K 81127 és PD 104618).

### Hivatkozások

- Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2495–2496; 7017–7036.
- Cox, B. G.; Hurwood, T. V.; Prodi, L.; Montalti, M.; Bolletta, F.; Watt, C. I. F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 289–296.
- Li, F.; Delgado, R.; Coelho, A.; Drew, M. G. B.; Félix, V. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8550–8558.
- Mateus, P.; Li, F.; Esteves, C. V.; Delgado, R.; Brandão, P.; Félix, V. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, 4700–4708.
- Chandler, C. J.; Deady, L. W.; Reiss, J. A.; Tzimos, V. J. *Heterocycl. Chem.* **1982**, *19*, 1017–1019.
- Wang, T.; Bradshaw, J. S.; Huszthy, P.; Kou, X.; Dalley, K.; Izatt, R. M. *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, *31*, 1–10.
- Aragoni, M. C.; Arca, M.; Bencini, A.; Biagini, S.; Blake, A. J.; Caltagirone, C.; Demartin, F.; De Filippo, G.; Devillanova, F. A.; Garau, A.; Gloe, K.; Isaia, F.; Lippolis, V.; Valtancoli, B.; Wenzel, M. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 8391–8404.
- Huszthy, P.; Samu, E.; Vermes, B.; Mezey-Vándor, G.; Nőgrádi, M.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1491–1504.
- Samu, E.; Huszthy, P.; Somogyi, L.; Hollósi, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2775–2795.
- Huszthy, P.; Köntös, Z.; Vermes, B.; Pintér, Á. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4967–4975.
- Szalay, L.; Farkas, V.; Vass, E.; Hollósi, M.; Móczár, I.; Pintér, Á.; Huszthy, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1487–1493.
- Kertész, J.; Móczár, I.; Kormos, A.; Baranyai, P.; Kubinyi, M.; Tóth, K.; Huszthy, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 684–689.
- Iqbal, N.; Ueno, Y. *Monatsh. Chem.* **1992**, *123*, 199–201.
- Iqbal, N.; Kando, T.; Kato, T.; Ueno, Y. *Pharmazie* **1992**, *47*, 554–554.
- Radutiu, A. C.; Baciú, I.; Caproiu, M. T.; Draghici, C.; Beteringhe, A.; Ionita, G.; Ionita, P.; Spataru, T.; Spataru, N.; Baratoiu, R. D.; Contantinescu, T.; Balaband, A. T. *Arkivoc*, **2009**, (xiii), 342–362.
- Shriver, D. F.; Biallas, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 1078–1081.
- Park, C. H.; Simmons, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2431–2432.
- Gale, P. A. In *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*; Atwood, J. L.; Steed, J. W. Eds.; Marcel Dekker: New York, NY, 2004; Vol. 1.; pp 31–41.
- Li, A.-F.; Wang, J.-H.; Wang, F.; Jiang, Y.-B. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3729–3745.
- Amendola, V.; Fabbrizzi L.; Mosca, L. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3889–3915.
- Sessler, J. L.; Camiolo S.; Gale, P. A. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 17–55.
- Gale, P. A. *Chem. Commun.* **2008**, 4525–4540.
- García-Garrido, S. E.; Caltagirone, C.; Light, M. E.; Gale, P. A. *Chem. Commun.* **2007**, 1450–1452.
- Thangadurai, T. D.; Singh, N. J.; Hwang, I.-C.; Lee, J. W.; Chandran R. P.; Kim, K. S. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5461–5464.
- Amendola, V.; Esteban-Gómez, D.; Fabbrizzi L.; Licchelli, M. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 343–353.
- Amendola, V.; Bonizzoni, M.; Esteban-Gómez, D.; Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Sancenón F.; Taglietti, A. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 1451–1470.
- Stibor, I.; Zlatušková, P. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *255*, 31–63.
- Dieng, P. S.; Sirlin, C. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 3334–3348.
- Kim, Y. K.; Lee, H. N.; Singh, N. J.; Choi, H. J.; Xue, J. Y.; Kim, K. S.; Yoon, J.; Hyun, M. H. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 301–304.
- Choi, M. K.; Kim, H. N.; Choi, H. J.; Yoon, J.; Hyun, M. H. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4522–4525.
- Greci, L.; Mar'in, A.; Stipa, P.; Carloni, P. *Polym. Degrad. Stab.* **1995**, *50*, 305–312.
- Kormos, A.; Móczár, I.; Sveiczter, A.; Baranyai, P.; Párkányi, L.; Tóth, K.; Huszthy, P. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7063–7069.
- Kormos, A.; Sveiczter, A.; Földi, T.; Rohoncz, Á.; Huszthy, P. *Arkivoc* **2013**, közlésre elfogadva
- Kormos, A.; Móczár, I.; Pál, D.; Baranyai, P.; Holczbauer, T.; Palló, A.; Tóth, K.; Huszthy, P. közlésre beküldve
- Kormos, A.; Móczár, I.; Pál, D.; Baranyai, P.; Kupai, J.; Tóth, K.; Huszthy, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 62–65.

### Synthesis and molecular recognition studies of sensor and selector molecules containing a phenothiazine unit

Since Pedersen's first crown ethers,<sup>1</sup> many derivatives of those have been prepared with different applications. The selectivity of crown ethers can be enhanced by making the macrocycle more

rigid, which can be achieved for example by incorporating tricyclic heterocycles in the macroring.<sup>2-12</sup> In continuation of our research on crown ethers containing tricyclic ring systems,<sup>8-12</sup> our attention turned toward phenothiazine. The coordinative properties of the nitrogen of phenothiazine can not only be modified by substitution in the aromatic rings, but also by changing the oxidation state of the sulfur atom making it a promising building element of new macrocycles. There are some crown ethers containing phenothiazine units reported in the literature,<sup>13-15</sup> but there is no example in which the heteroatom (N or S atom) of the phenothiazine unit is part of the macroring.

Although the first synthetic anion receptors already appeared in the late '60s,<sup>16,17</sup> the development of host molecules for anion recognition was much slower than that for cations. However, the field of anion sensors has expanded notably in the past decade. One of the main groups of anion receptors consists of neutral molecules, which bind anions *via* hydrogen bond formation (often accompanied by deprotonation).<sup>18-26</sup> There are also many examples for enantioselective anion sensors,<sup>27-30</sup> among them some derivatives containing sugar units.<sup>29,30</sup>

The aim of my PhD work was the synthesis of crown ethers containing a phenothiazine unit in which the NH group of the phenothiazine is part of the macroring. Further goal of my work was the synthesis and molecular recognition studies of anion receptor molecules having a phenothiazine unit.

Electrophilic aromatic substitution reactions of phenothiazine take place first in positions 3 and 7, so these positions were protected by *tert*-butyl groups to make possible to synthesize 1,9-disubstituted derivatives needed for the preparation of the appropriate crown ethers. The reported<sup>31</sup> phenothiazine derivative **1** protected by *tert*-butyl groups in positions 3 and 7 was prepared by an improved procedure using *tert*-butyl chloride and aluminium chloride in dichloromethane. Di-*tert*-butylphenothiazine **1** was then nitrated using acetyl nitrate in dichloromethane to give dinitrophenothiazine 5-oxide **2**. The latter phenothiazine derivative was oxidized to dinitrophenothiazine 5,5-dioxide **3** with hydrogen peroxide. Dinitro derivatives **2** and **3** were then hydrogenated in acetic acid in the presence of acetic anhydride to give diacetamides **4** and **5**. Hydrogenation of dinitrophenothiazine 5,5-dioxide **3** in the absence of acetic anhydride gave diamine **6**. Ditosylamide **7** was then prepared from diamine **6** with tosyl chloride in pyridine (Fig. 1).<sup>32,33</sup> The *tert*-butyl protecting groups of diacetamide **4** were removed by aluminium chloride in the presence of phenol in toluene to give diacetamide **8**. The latter diamide was deacetylated using 20% hydrochloric acid, and the resulted hydrochloride salt **9** was reacted with tosyl chloride in pyridine to give ditosylamide **10**. Ditosylamide **10** was then oxidized using *meta*-chloroperbenzoic acid rendering ditosylamide **11** (Fig. 2).<sup>33</sup>

Ditosylamides **7** and **11** were reacted with tetraethyleneglycol ditosylate in the presence of bases [potassium carbonate, cesium carbonate, potassium *tert*-butoxide or Hünig's base (*N*-ethyl-*N,N*-diisopropylamine)] in different solvents (acetonitrile, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, dimethoxyethane or diglyme, see Table 1. for more details). *Tert*-butyl substituted crown ether **12** was first prepared by a usual method using potassium carbonate as a base and acetonitrile as a solvent. The same conditions were applied for the synthesis of crown ether **13**, but the desired product could not be isolated. The formation of crown ether **13** could not be observed in the presence of other bases

containing alkaline metal cations as templates (cesium carbonate or potassium *tert*-butoxide). Surprisingly when Hünig's base was used in different solvents, formation of crown ether **7** took place. Acetonitrile proved to be the best solvent for the reaction with reproducible yields even in larger scales. As crown ether **13** could be prepared in the presence of Hünig's base, we examined whether the latter base could also be useful in the synthesis of *tert*-butyl substituted crown ether **12**. Similar results were obtained as in the case of crown ether **13**, crown ether **12** could be isolated in a good yield using Hünig's base in acetonitrile. The tosyl protecting groups of crown ethers **12** and **13** were removed by amalgamated sodium in methanol to give crown ethers **14** and **15** (Fig. 3).<sup>33</sup> These new crown ethers are promising precursors of sensor and selector molecules with wide applications.

The anion sensors (**16-19**) were prepared starting from diamine **6** using benzoyl chloride or the appropriate isocyanate or isothiocyanate in pyridine (Fig. 4).<sup>32,34,35</sup> The anion recognition studies on sensor molecules **5**, **16-19** were performed in acetonitrile by UV-vis spectroscopy.

The anion recognition ability of receptors **5** and **16** was studied toward the tetrabutylammonium salts of fluoride, chloride, bromide, iodide, hydrogen sulfate, dihydrogen phosphate and acetate (Fig 5, Table 2).<sup>32</sup> Fluoride, acetate and dihydrogen phosphate caused the deprotonation of both receptor molecules. In the case of receptor **5** and fluoride, spectral shift characteristic for complexation, also appeared beside the spectrum of the deprotonated form. Chloride caused changes in the absorption spectrum of receptor **5** indicating a complexation process. In the case of acetate, we suppressed deprotonation by addition of acetic acid in order to promote the complex formation.

The anion recognition ability of receptors **17** and **18** was studied toward the tetrabutylammonium salts of fluoride, chloride, bromide, iodide, nitrate, hydrogen sulfate, sulfate, dihydrogen phosphate and acetate (Table 3).<sup>34</sup> While both receptor molecules formed complexes of 1:1 stoichiometry with most of the anions, fluoride and acetate caused spectral changes characteristic to deprotonation, however, these spectra were different from those of deprotonated receptors **17** and **18** (Fig. 6). These results suggested that deprotonated receptor-anion complexes had been formed. In the case of receptor **17**, this assumption was also confirmed by NMR titration and X-ray crystallography (Fig 6). Since our latter results showed that in the cases of fluoride and acetate, deprotonated receptor-anion complexes were formed *via* deprotonation of the neutral receptor-anion complexes by an excess of the anion, we also examined whether the receptors deprotonated by an excess of DBU or tetrabutylammonium hydroxide could form complexes with anions. As expected, fluoride was strongly complexed by the deprotonated receptors. The deprotonated receptors showed similar, but weaker complexing ability toward acetate than fluoride (Table 3).

The enantiomeric recognition ability of receptor **19** was studied toward the enantiomers of tetrabutylammonium salts of mandelic acid ( $\Delta\log K=0.19$ ), *tert*-butoxycarbonyl-protected phenylglycine ( $\Delta\log K=0.22$ ), *tert*-butoxycarbonyl-protected phenylalanine ( $\Delta\log K=0.09$ ) and *tert*-butoxycarbonyl-protected alanine ( $\Delta\log K=0.04$ ). The effect of size of the protecting group on enantioselectivity was also examined in the case of phenylglycine with the enantiomers of tetrabutylammonium salts of formyl- ( $\Delta\log K=0.05$ ), acetyl- ( $\Delta\log K=0.18$ ) and pivaloyl- ( $\Delta\log K=0.22$ ) protected phenylglycine.<sup>35</sup>

# Piridin egységet tartalmazó királis 18-korona-6-éterek szintézise és alkalmazásuk

KUPAI József<sup>a</sup> és HUSZTHY Péter<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Szent Gellért tér 4., 1111 Budapest, Magyarország

<sup>b</sup>MTA-BME Alkaloidkémiai Kutatócsoport, Szent Gellért tér 4., 1111 Budapest, Magyarország

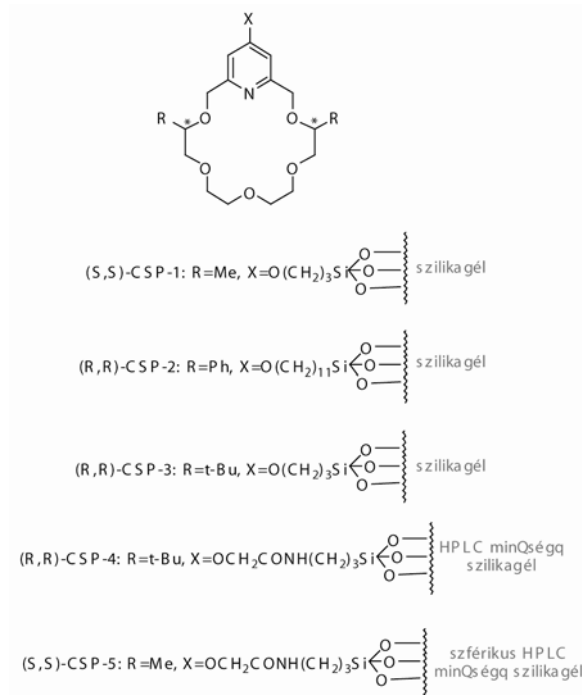
## 1. Bevezetés

Az enantiomer-felismerés egy gyakran előforduló jelenség a természetben amely egy vendégmolekulával történő megkülönböztetését jelenti, vagyis különböző stabilitású komplexek képződnek az enantiomerekkel (termodinamikus kontroll), illetve a komplexképzés vagy a komplexdisszociáció sebessége (kinetikus kontroll) különbözhet. Az enantiomer-felismerésnek az élő természetben történő működésére példaként említhetjük az egyféle konfigurációjú aminosavak és cukrok beépülését és lebomlását a metabolizmus során. A szintetikus receptorokkal kiváltható enantiomer-felismerő-képességet *Cram és munkatársai* mutatták ki először a bisz(binaftil)-22-korona-6-éter gazdamolekula és származékainak, valamint szerves ammóniumsók enantiomerjeinek a kölcsönhatását vizsgálva.<sup>1</sup>

A primer aminok, aminosavak és származékaik nagy biológiai jelentőséggel bírnak. Az aminosavak a fehérjék építőelemei, a primer aminok az aminosavak bomlástermékei vagy akár neurotranszmitterként funkcionálhatnak. Éppen ezért az enantioszelektív felismerésükre szolgáló szintetikus receptorok fejlesztése is nagy jelentőségű.<sup>2</sup>

A nagy enantioszelektivitással rendelkező makrociklusok szilárd hordozóhoz (például szilikagélhez vagy Merrifield-féle polimer gyantához) történő kötésével kapott királis állófázisokat különböző racém szerves protonált primer és szekunder aminok enantiomerjeinek elválasztására lehet használni.<sup>3,4</sup> Az első piridino-18-korona-6-éter alapú királis állófázist [(S,S)-CSP-1; ld. 1. Ábra] *Bradshaw és munkatársai* állították elő.<sup>5</sup> Azóta négy piridino-koronaéter alapú királis állófázist [(S,S)-CSP-2, (S,S)-CSP-5; ld. 1. Ábra] szintetizáltak, és sikeresen alkalmazták azokat protonált primer aminok, aminosavak és származékaik enantiomerjeinek elválasztására.<sup>6,10</sup>

Ez idáig csak a piridingyűrű négyes helyzetében oxigénatomon át kapcsolódó oldalkarral kötöttek piridino-koronaétert szilikagélhez, amint azt az 1. Ábrán is láthatjuk. Doktori munkám során célom volt olyan új királis állófázisok előállítása és vizsgálata, ahol az enantiomertiszta piridino-koronaéter szelektormolekulákat nem oxigénatomon, hanem nitrogén-, ill. szénatomon keresztül kapcsolódó karral kötjük szférikus HPLC minőségű szilikagélhez. Utóbbi módosítással nagyobb kémiai stabilitású, illetve a megváltozott elektronikus hatások miatt nagyobb enantioszelektivitást biztosító királis állófázisok szintézisét céloztuk meg.



1. Ábra. Piridino-koronaéter alapú királis állófázisok.

## 2. Eredmények

A továbbiakban az új királis állófázisok előállítását, majd azok enantiomerek elválasztására történő alkalmazását ismertetjük.

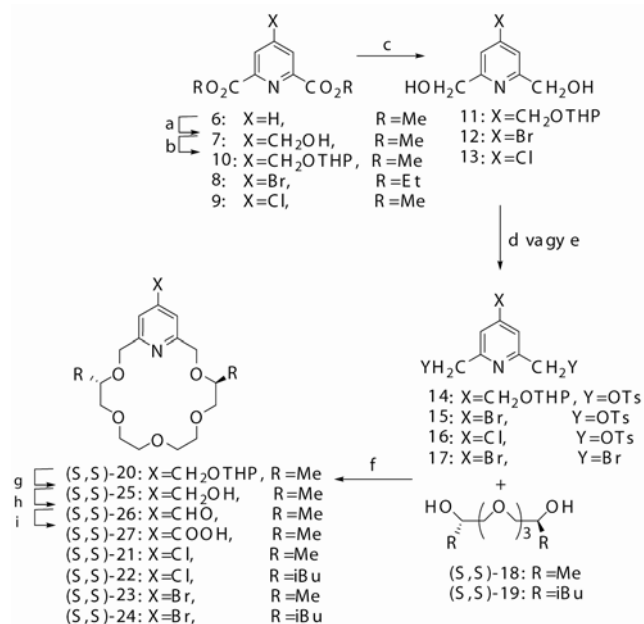
### 2.1. A piridingyűrű négyes helyzetében szubsztituált piridino-18-korona-6-éterek szintézise

A ligandumok szintézisének kétféle stratégiát követtünk:

1) A piridingyűrű négyes helyzetébe még a makrociklizációs lépés előtt beépítettük a megfelelő könnyen átalakítható szubsztituenst, és a kapott a piridingyűrű négyes helyzetében szubsztituált piridin-2,6-dimetanol-ditozilát, illetve a megfelelő dialkil-szubsztituált tetraetilénglikol makrociklizációs reakciójában nyertük a megfelelő piridino-koronaéter-származékokat. A kereskedelemről könnyen beszerezhető, viszonylag olcsó alapanyagokból (aceton, dietil-oxalát, fém nátrium, etanol) kiindulva az irodalminál egyszerűbb vagy környezetkímélőbb eljárásokat alkalmazva

\* Tel.: +36-1-4631071; fax: +36-1-4633297; e-mail: huszthy@mail.bme.hu

a **6** dimetil-kelidamátion keresztül jutottunk a piridingyűrű négyes helyzetében hidroximetil-csoporttal (**7**), illetve halogénatommal (**8**, **9**) szubsztituált dialkil-2,6-piridin-dikarboxilátokhoz.<sup>11,12</sup> A hidroximetil-csoportnak a **6** diészter négyes helyzetébe történő bevitelénél alkalmazott *Fenton* típusú reakciónál a 30%-os kénsavat 70%-os perklórsavra, illetve a vas-szulfátot vas-perklorátra cserélve az irodalmi módszerhez képest jelentős termelésjavulást értünk el. A hidroximetil-csoportot tetrahidropiranyl-csoporttal (THP) láttuk el (**10**), mert ez volt a legalkalmasabb védelem a további erős bázikus körülményeket igénylő lépéseknél (2. Ábra).<sup>11</sup>



**2. Ábra.** Az enantiomertiszta piridino-koronaéterek előállítására makrociklizációval (a:  $Fe(ClO_4)_2$ ,  $H_2O_2$ , MeOH,  $HClO_4$ ; b: 3,4-dihidro-2H-pirán, piridinium-*p*-toluolszulfonát,  $CH_2Cl_2$ ; c:  $NaBH_4$ , EtOH; d: TsCl, 40% aq. KOH/  $CH_2Cl_2$ ; e:  $PBr_3$ ,  $Et_2O$ ; f: NaH, THF; g: proton formában lévő kationcserélő gyanta, MeOH; h:  $(COCl)_2$ , DMSO, TEA,  $CH_2Cl_2$ ; i:  $HCOOH$ ,  $H_2O_2$ )

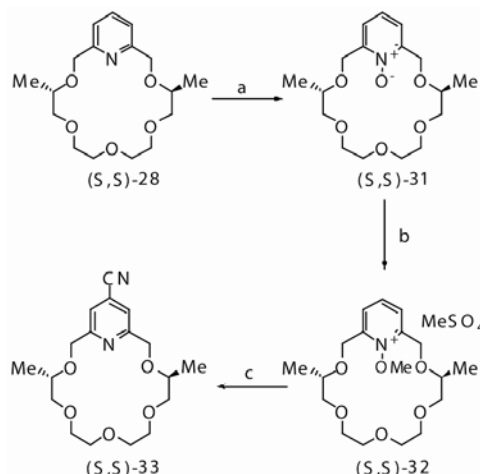
A piridingyűrű négyes helyzetében szubsztituált piridin-2,6-diésztereket nátrium-tetrahidrido-boráttal **11–13** diolokká redukáltuk, majd az irodalmi módszertől<sup>13</sup> eltérve izoláltuk. A **13** klór-diól tisztításánál az irodalomban<sup>14</sup> alkalmazott időigényes folyamatos extrakciót átkristályosítással váltottuk ki (2. Ábra).<sup>12</sup>

A **11–13** diolokat a piridingyűrű kettes és hatos helyzetében lévő metilencsoportokon jó kilépőcsoportokkal rendelkező származékokká alakítottuk. Így jutottunk a **14–16** dítózilátokhoz, illetve a **17** biszbrómmetil-származékhoz, melyeknek az (S,S)-**18**, illetve az (S,S)-**19** enantiomertiszta dialkil-szubsztituált tetraetilnglikolokból erős bázissal képzett biszalkoxidokkal történő gyűrűzárás reakciójából az (S,S)-**20** THP-védett hidroximetil-csoporttal, illetve az (S,S)-**21**–(S,S)-**24** halogénatommal szubsztituált piridino-koronaétereket nyertük. A piridingyűrű négyes helyzetében brómatomot, a kiralitáscentrumokon metilcsoportot tartalmazó (S,S)-**23** piridino-koronaétert egyrészt a **15** bróm-dítózilátból, másrészt a **17** tribrómszármazékból is előállítottuk. Mivel a tozilátból kiindulva jobb termelést

értünk el, mint a tribrómszármazék esetén, ezért érdemes a diolokat dítózilátokká alakítani (2. Ábra).<sup>11,12</sup>

Az (S,S)-**20** makrociklus tetrahidropiranyl-csoportjának eltávolításával az (S,S)-**25** hidroximetil-csoporttal szubsztituált származékhoz jutottunk. Utóbbi *Swern*-oxidációjával az (S,S)-**26** aldehidet, majd további oxidációval az (S,S)-**27** karbonsavat kaptuk. Az (S,S)-**27** karboxilcsoporttal szubsztituált piridino-koronaéter egy királis állófázis fontos prekuzora (2. Ábra).<sup>11</sup>

2) Másik szintézisstratégiánk szerint a korábban már közölt, a makrogyűrűben a kiralitáscentrumokon metilcsoportokkal szubsztituált (S,S)-**28** piridino-koronaétert,<sup>15</sup> illetve az (S,S)-**29** dimetil-szubsztituált,<sup>16</sup> és az (S,S)-**30** diizobutil-szubsztituált<sup>9</sup> piridino-koronaétereket szintetizáltuk, majd ezután ezekből állítottuk elő a piridingyűrű négyes helyzetében a könnyen átalakítható funkciós csoportokat hordozó makrociklusokat (3. és 4. Ábra). Ezzel a szintézisstratégiával a piridingyűrű négyes helyzetében halogénatommal szubsztituált piridino-koronaéterek szintézisét jobb össztermeléssel végeztük, mint amikor a halogénatomot a piridingyűrű négyes helyzetébe a gyűrűzárás előtt vittük be (ld. 2. Ábra).<sup>12,17</sup>



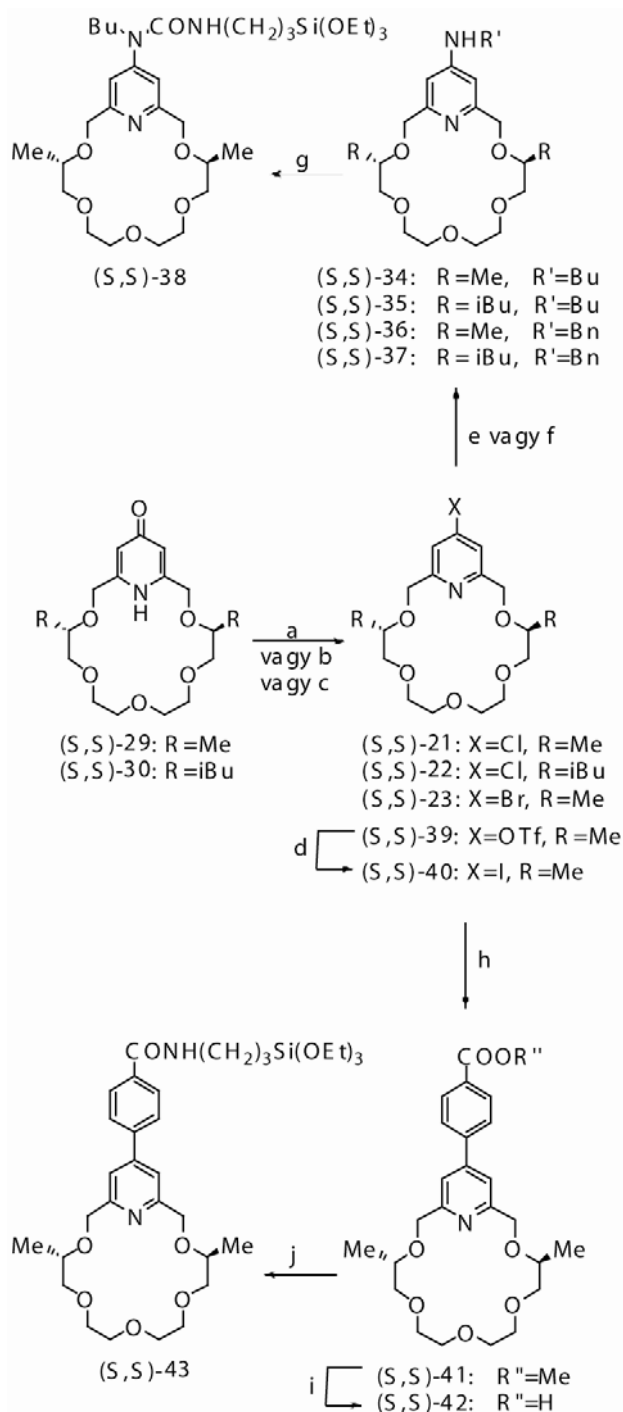
**3. Ábra.** A piridingyűrű négyes helyzetében cianocsoporttal szubsztituált piridino-koronaéter előállítására (a: MCPBA,  $CH_2Cl_2$ ; b:  $Me_2SO_3$ ; c: NaCN, MeOH/ $H_2O$ ).

Az (S,S)-**28** piridino-koronaétert az (S,S)-**31** N-oxidá oxidáltuk, majd az (S,S)-**32** N-metoxi-származékká alakítottuk, hogy a piridingyűrű négyes helyzetében nukleofil szubsztitúcióra képes piridino-koronaétert kapjunk. Utóbbi nátrium-cianidval reagáltatva (S,S)-**33** a négyes helyzetben cianocsoporttal szubsztituált koronaéterszármazékhoz jutottunk, amely új piridino-koronaéter alapú királis állófázis prekuzora lehet (3. Ábra).<sup>18</sup>

## 2.2. Az új piridino-koronaéter alapú királis állófázisok szintézise

Az (S,S)-**21**–(S,S)-**24** halogénatommal szubsztituált piridino-koronaétereket az (S,S)-**29** dimetil-szubsztituált, és az (S,S)-**30** diizobutil-szubsztituált piridino-koronaéterekből állítottuk elő. Az (S,S)-**21** és (S,S)-**22** klórszármazékokat butil-aminnal, illetve benzil-aminnal bombacsőben reagáltatva butilamino-csoporttal- [(S,S)-**34**,

(*S,S*)-**35**], illetve benzilamino-csoporttal [(*S,S*)-**36**, (*S,S*)-**37**] szubsztituált makrociklusokat szintetizáltunk. Az (*S,S*)-**34**–(*S,S*)-**37** szekunder aminok új piridino-koronaéter alapú királis állófázisok prekursorai (4. Ábra).<sup>17</sup>

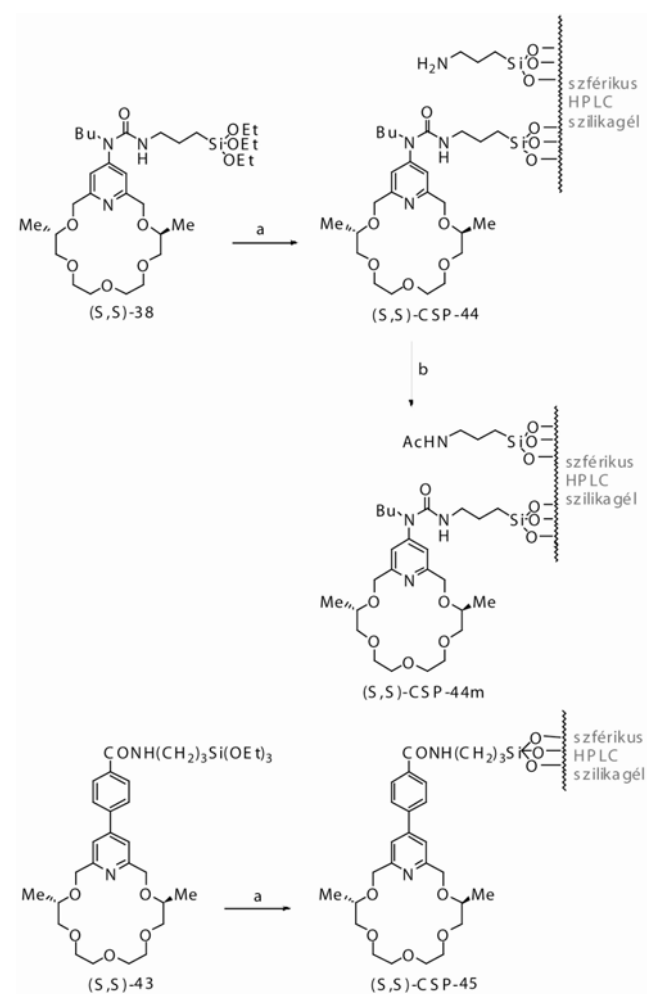


**4. Ábra.** A trietoxiszilil-végcsoporttal rendelkező makrociklusok szintézise (a:  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ , kat. DMF; b:  $\text{PBr}_5$ ,  $\text{CHCl}_3$ ; c:  $\text{Tf}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; d: NaI, 30% aq. HCl,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; e:  $\text{BuNH}_2$ ; f:  $\text{BnNH}_2$ ; g:  $(\text{EtO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NCO}$ ; h:  $\text{MeOOC}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{B}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , KBr, dioxán; i: 25% aq. tetrametilammónium-hidroxid, MeOH, majd AcOH; j:  $\text{SOCl}_2$ , majd  $(\text{EtO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ , TEA, THF).

A szekunder aminok közül a legjobb össztermeléssel előállítható (*S,S*)-**34** butilamino-származékot 3-

(trietoxiszilil)propil-izocianáttal reagáltatva a trietoxiszilil-végcsoportú (*S,S*)-**38** szelektormolekulához jutottunk (4.Ábra).<sup>17</sup>

A piridino-koronaéter piridingyűrűjének négyes helyzetében szénatomon keresztül kapcsolódó oldalkar kialakításához szén–szén kapcsolási reakciót kellett végeznünk. Ezért az (*S,S*)-**29** piridono-koronaétert az (*S,S*)-**39** triflátá alakítottuk. Utóbbi triflát és a belőle előállított (*S,S*)-**40** jodid egyaránt alkalmas elektrofilnek bizonyultak a megfelelő *Suzuki*-reakcióhoz. Az (*S,S*)-**41** észtert az (*S,S*)-**40** jodidból jobb eredménnyel lehet szintetizálni, mint az (*S,S*)-**39** triflátból kiindulva, de az össztermelés jobb volt az utóbbi esetben. Az (*S,S*)-**41** észter hidrolízisével kapott (*S,S*)-**42** karbonsav tionil-kloriddal történő savkloridá alakítása után utóbbit 3-(trietoxiszilil)propil-aminnal reagáltatva a trietoxiszilil-végcsoportot tartalmazó (*S,S*)-**43** amidot kaptuk (4. Ábra).<sup>17</sup>



**5. Ábra.** Az új piridino-koronaéter alapú királis állófázisok előállítása (a: szférikus HPLC szilikagél, toluol; b:  $\text{Ac}_2\text{O}$ , TEA, DMF).

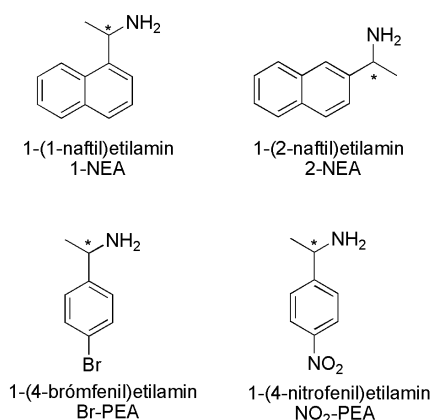
Az (*S,S*)-**38**, illetve az (*S,S*)-**43** trietoxiszilil-végcsoportú piridino-koronaétereket szférikus HPLC minőségű szilikagéllel toluolban forralva az (*S,S*)-CSP-44, illetve az (*S,S*)-CSP-45 piridino-koronaéter alapú királis állófázisokhoz jutottunk.

Az (*S,S*)-**38** szelektormolekula szilikagélhez történő rögzítésekor alkalmazott erélyes körülmények miatt a

karbamid egységek egy része elhidrolizált, így a szilikagél felületén szabad aminopropil-csoportokat is tartalmazó királis állófázist [(*S,S*)-CSP-44] kaptunk. Az aminopropil-csoportokat a HPLC oszlopon átengedett ecetsav-anhidriddel acetileztük, így (*S,S*)-CSP-44m módosított királis állófázisoz jutottunk (5. Ábra).<sup>17</sup>

### 2.3. Vendégmolekulák enantiomerjeinek elválasztása az új királis állófázisok segítségével

A doktori munkám során előállított királis állófázisokat [(*S,S*)-CSP-44, (*S,S*)-CSP-44m, (*S,S*)-CSP-45] négy különböző vendégmolekula [1-(1-naftil)etilamin (1-NEA), 1-(2-naftil)etilamin (2-NEA), 1-(4-brómfenil)etilamin (Br-PEA), 1-(4-nitrofenil)etilamin (NO<sub>2</sub>-PEA)] enantiomerjeinek elválasztására alkalmaztuk (6. Ábra).



6. Ábra. Az új piridino-koronaéter alapú királis állófázisokkal elválasztani kívánt vendégmolekulák.

Minden esetben az (*S*)-enantiomernek volt kisebb a retenció ideje, mint az antipódjának. Tehát mindhárom királis állófázis heterokirális preferenciát mutatott. Az enantiomer-elválasztás minden esetben az 1-NEA vendégmolekulára volt a legsikeresebb (1. Táblázat).<sup>17</sup>

Az (*S,S*)-CSP-44 királis állófázissal egyedül az 1-NEA enantiomerjeit tudtuk szétválasztani az elvárható ( $R_s > 1,5$ ) felbontással, a többi analit esetén a szilikagél felületén lévő szabad aminopropil-csoportok csúcshézesedést okoztak.

A vizsgált analitok esetében (1-NEA, a Br-PEA és a NO<sub>2</sub>-PEA) az (*S,S*)-CSP-44m módosított királis állófázissal sokkal hatékonyabb elválasztást értünk el, mint (*S,S*)-CSP-44 alkalmazásával. Az (*S,S*)-CSP-44m királis állófázissal az 1-NEA enantiomerjeinél jobb felbontást tudtuk elérni, mint az irodalomban eddig ismert piridino-koronaéter alapú királis HPLC állófázisok [(*R,R*)-CSP-4; (*S,S*)-CSP-5] esetén. A 2-NEA enantiomerjeinek elválasztásánál az (*S,S*)-CSP-44m királis állófázissal alapvonalválást sikerült elérnünk, de a között<sup>10</sup> [(*S,S*)-CSP-5] elválasztási hatékonyságot nem sikerült elérnünk.

Az (*S,S*)-CSP-45 királis állófázissal mind az eddig között piridino-koronaéter alapú királis állófázisokhoz, mind az (*S,S*)-CSP-45-höz, és az (*S,S*)-CSP-44m-hez viszonyítva hatékonyabb enantiomer-elválasztást értünk el. Ez valószínűleg a gazdamolekula aril-piridin egysége és a vendégmolekulák aromás gyűrűi között megnövekedett  $\pi$ - $\pi$  vonzó kölcsönhatásnak köszönhető.

A kromatográfias vizsgálatokat összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a három új királis állófázis [(*S,S*)-CSP-44, (*S,S*)-CSP-44m, (*S,S*)-CSP-45] alkalmas protonált primer aminok enantiomerjeinek elválasztására. Az (*S,S*)-

1. Táblázat. Az irodalmi (*R,R*)-CSP-4, (*S,S*)-CSP-5 és az új (*S,S*)-CSP-44, (*S,S*)-CSP-44m és (*S,S*)-CSP-45 királis állófázisok enantiomer-elválasztó-képességének összehasonlítása.

Királis állófázis	Analit	<i>t</i> ( <i>S</i> ) [perc]	<i>t</i> ( <i>R</i> ) [perc]	$\alpha$	$R_s$	eluens
( <i>R,R</i> )-CSP-4	1-NEA	4,48	6,02	1,52	1,54	A
( <i>S,S</i> )-CSP-5	1-NEA	4,77	8,65	2,12	2,73	B
( <i>S,S</i> )-CSP-44	1-NEA	4,61	6,22	1,67	1,67	C
( <i>S,S</i> )-CSP-44m	1-NEA	7,40	11,47	1,78	4,54	C
( <i>S,S</i> )-CSP-45	1-NEA	16,22	37,79	2,49	9,20	D
( <i>S,S</i> )-CSP-5	2-NEA	4,74	7,00	1,66	1,97	B
( <i>S,S</i> )-CSP-44m	2-NEA	8,35	10,92	1,42	1,60	C
( <i>S,S</i> )-CSP-45	2-NEA	15,79	25,07	1,66	4,53	D
( <i>S,S</i> )-CSP-44	Br-PEA	3,61	4,23	1,44	0,85	C
( <i>S,S</i> )-CSP-44m	Br-PEA	4,97	6,23	1,46	1,00	C
( <i>S,S</i> )-CSP-45	Br-PEA	15,91	23,09	1,51	3,58	D
( <i>S,S</i> )-CSP-44	NO <sub>2</sub> -PEA	2,70	2,91	1,40	0,61	C
( <i>S,S</i> )-CSP-44m	NO <sub>2</sub> -PEA	3,02	3,30	1,35	0,95	C
( <i>S,S</i> )-CSP-45	NO <sub>2</sub> -PEA	16,12	21,86	1,40	3,30	D

A: Izokratikus elúció: diklórmetán–metanol 9:1; B: Gradiens elúció: 5–0% metanol + 1% trietil-amin; C: Izokratikus elúció: acetonitril–metanol 7:3 + 0,05% hangyasav és 0,2% trietil-amin; D: Izokratikus elúció: acetonitril–metanol 1:4 + 0,2% hangyasav és 0,1% trietil-amin.

CSP-44m és az (S,S)-CSP-45 királis állófázisok az eddig közölt piridino-koronaéter alapú királis állófázisoknál nagyobb hatékonyságot mutattak.<sup>17</sup>

### 3. Összefoglalás

Sikeresen szintetizáltunk a piridingyűrű négyes helyzetében szubsztituált új, enantiomertiszta piridino-18-korona-6-étereket, illetve nitrogén-, illetve szénatomon keresztül kapcsolódó kart tartalmazó piridino-koronaéter alapú új királis állófázisokat. Utóbbi királis állófázisok az irodalomban ismert piridino-koronaéter alapú királis állófázisoknál sokkal hatékonyabbnak bizonyultak protonált primer aralkilaminok enantiomerjeinek elválasztására. Bebizonyítottuk, hogy a királis állófázisok heterokirális preferenciát mutatnak.

A piridingyűrű négyes helyzetében ciano- [(S,S)-33], karboxil- [(S,S)-27], butilamino- [(S,S)-35] és benzilaminocsoporttal [(S,S)-36, (S,S)-37] szubsztituált piridino-koronaéterek ígéretes prekursorai lehetnek további piridino-koronaéter alapú királis állófázisoknak.

A gyűrűzárási reakciók tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a piridingyűrű négyes helyzetében halogénatommal szubsztituált piridino-koronaéterek szintézisének jobb össztermelést érhetünk el, ha a makrociklizációs reakció után visszük be a piridingyűrű négyes helyzetébe a halogénatomot, mint ha előtte végeznénk azt.

Szintetikus jelentősége van, hogy kidolgoztunk egy közel kvantitatív termeléssel lejártszódó butilamino-, illetve benzilaminocsoport bevitelére alkalmas módszert a piridingyűrű négyes helyzetében klóratommal szubsztituált piridino-koronaéterek esetében.

Ugyancsak szintetikus jelentősége van, hogy bebizonyítottuk, hogy a piridingyűrű négyes helyzetébe hidroximetil-csoport bevitelére alkalmas Fenton típusú reakciónál a tömény perklorosavas–vas-perklorátos közegben sokkal jobb termelést lehet elérni, mint a szakirodalomban közölt 30%-os kénsavas–vas-szulfátos közegben.

### 3. Kísérleti rész

A szintetikus munka során preparatív szerves kémiai módszereket alkalmaztunk. A reakciók előrehaladását vékonyréteg-kromatográfiával követtük. Az anyagok tisztítására oszlopkromatográfiát, preparatív vékonyréteg-kromatográfiát, átkristályosítást, illetve vákuumdesztillációt alkalmaztunk. Az anyagok tisztaságának ellenőrzésére vékonyréteg-kromatográfiát, olvadáspontmérést, illetve optikai forgatóképesség-mérést használtunk. Az előállított vegyületek szerkezetét IR, <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR, tömegspektroszkópiái, valamint elemi analízis módszerekkel igazoltuk. A királis koronaéter szelektort tartalmazó HPLC oszlopokat egy Haskel típusú pumpával készítettük el. Az oszlopteszteléseket és vizsgálatokat Hitachi típusú HPLC rendszerben végeztük.

### Köszönetnyilvánítás

Köszönjük Szabó Zsuzsának és a Pro Progressio Alapítványnak az egyéves doktorjelölti ösztöndíjat. Köszönettel tartozunk az OTKA Irodának (K62654, K81127 és PD71910) és az Új Széchenyi Terv TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002 programnak a kutatáshoz szükséges anyagi háttér biztosításáért.

Köszönjük Lévai Sándornak és Dr. Balogh György Tibornak (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Nyrt.) a HPLC mérések elvégzésében és kiértékelésében nyújtott messzemenő segítségüket, illetve köszönjük Varga Gábornak (Chiroquest Kft.) a HPLC oszlopok töltését.

### Hivatkozások

1. Kyba, E. P.; Siegel, M. G.; Sousa, L. R.; Sogah, G. D. Y.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2691–2692.
2. Späth, A.; König, B. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 32.
3. Hyun, M. H. *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 242–250.
4. Huszthy, P.; Bakó, P.; Makó, A.; Töke, L. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2005**, *111*, 55–61.
5. Bradshaw, J. S.; Huszthy, P.; Wang, T. M.; Zhu, C. Y.; Nazarenko, A. Y.; Izatt, R. M. *Supramol. Chem.* **1993**, *1*, 267–275.
6. Huszthy, P.; Bradshaw, J. S.; Bodurov, A. V.; Izatt, R. M. *ACH-Models Chem.* **1994**, *131*, 445–454.
7. Köntös, Z.; Huszthy, P.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2087–2099.
8. Köntös, Z.; Huszthy, P.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M. *Enantiomer* **2000**, *5*, 561–566.
9. Horváth, G.; Huszthy, P.; Szarvas, S.; Szókán, G.; Redd, J. T.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, *39*, 3576–3581.
10. Farkas, V.; Tóth, T.; Orosz, G.; Huszthy, P.; Hollósi, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1883–1889.
11. Kupai, J.; Huszthy, P.; Katz, M.; Tóth, T. *Arkivoc* **2012**, *v*, 134–145.
12. Kupai, J.; Huszthy, P.; Székely, K.; Tóth, T.; Párkányi, L. *Arkivoc* **2011**, *ix*, 77–93.
13. Horváth, G.; Rusa, C.; Köntös, Z.; Gerencsér, J.; Huszthy, P. *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 3719–3731.
14. Lüning, U.; Baumstark, R.; Müller, M. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 987–998.
15. Izatt, R. M.; Wang, T. M.; Hathaway, J. K.; Zhang, X. X.; Curtis, J. C.; Bradshaw, J. S.; Zhu, C. Y.; Huszthy, P. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1994**, *17*, 157–175.
16. Horváth, G.; Huszthy, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 4573–4583.
17. Kupai, J.; Lévai, S.; Antal, K.; Balogh, G. T.; Tóth, T.; Huszthy, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 415–427.
18. Tóth, T.; Huszthy, P.; Kupai, J.; Nyitrai, J. *Arkivoc* **2008**, *iii*, 66–79.

### Synthesis and application of chiral 18-crown-6 ethers containing a pyridine subunit

The study of enantiomeric recognition of chiral amines and chiral protonated amines is of great significance because these compounds are basic building blocks of biological molecules and therefore often used as guests.

In the past three decades, optically active macrocycles containing pyridine subunit have become attractive hosts due to their ability

for chiral discrimination towards chiral organic ammonium salts, amino acids and their derivatives.

New enantiomerically pure pyridino-18-crown-6 ethers containing different substituents at position 4 of the pyridine ring were synthesized from commercially available and relatively cheap starting materials. Some pyridino-crown ether derivatives [(*S,S*)-**27**, (*S,S*)-**33**, (*S,S*)-**43**] were prepared, which served as precursors of new chiral stationary phases where the linking units at position 4 of the pyridine ring were attached through a nitrogen or a carbon atom. Two of them [(*S,S*)-**38**, (*S,S*)-**43**] were heated with spherical HPLC silica gel in toluene to give new pyridino-crown ether-based chiral stationary phases [(*S,S*)-CSP-**44**, (*S,S*)-CSP-**45**]. They were suitable for the enantioseparation of protonated primary aralkylamines [1-(1-naphthyl)ethylamine (1-NEA), 1-(2-naphthyl)ethylamine (2-NEA), 1-(4-bromophenyl)ethylamine and 1-(4-nitrophenyl)ethylamine]. Unfortunately during the immobilization of pyridino-crown ether derivative (*S,S*)-**38** to silica gel, as a result of the long and harsh conditions a part of the urea units of the attached pyridino-crown ether was hydrolyzed.

To avoid an interference of the 3-aminopropylsilyl groups immobilized to silica gel with the amino groups of the analytes, we acetylated the 3-aminopropylsilyl groups. We obtained a

modified chiral stationary phase [(*S,S*)-CSP-**44m**], which showed better enantioseparation factors for the separation of the mixture of 1-NEA enantiomers than (*S,S*)-CSP-**44** and the reported<sup>10</sup> pyridino-crown ether-based chiral stationary phase [(*S,S*)-CSP-**5**]. Chiral stationary phase (*S,S*)-CSP-**45** showed the best enantioseparation factors for the separation of the mixtures of enantiomers of 1-NEA and 2-NEA among all the pyridino-crown ether-based chiral stationary phases. This observation can be rationalized as follows: beside the tripod-like hydrogen bonding which always occurs in the case of analogous crown ethers the extended aromatic system of aryl-substituted pyridine unit, securing a strong  $\pi$ - $\pi$  interaction, also contributes to a great extent to the stability of their complexes with organic ammonium salts containing aromatic moieties resulting in high selectivity towards the enantiomers of the studied amine compounds.

It was found in all cases that the (*S*)-enantiomer eluted with a shorter retention time than that of its antipode. The observed elution order can be explained by the generally observed higher stability of the heterochiral complexes [i.e., (*R,R*)-crown ether-(*S*)-aralkylammonium salt or (*S,S*)-crown ether-(*R*)-aralkylammonium salt] compared to that of homochiral complexes [i.e., (*S,S*)-crown ether-(*S*)-aralkylammonium salt or (*R,R*)-crown ether-(*R*)-aralkylammonium salt].



# Gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztése folyamatos gyógyszer technológiai eljárásokkal

NAGY Zsombor Kristóf\*

*Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szerves Kémia és Technológia Tanszék, 1111. Budapest Budafoki út 8.*

## 1. Bevezetés

A gyógyszeripari innováción belül egyre növekszik a készítménytechnológiai fejlesztések jelentősége, ami részben gazdasági tényezőkre vezethető vissza, részben pedig a fejlesztett és piacra vitt hatóanyagok tulajdonságainak változásából adódik. A gazdasági tényezők között megemlítendő a nagy árbevételű generáló originális gyógyszerek csökkenő száma, a kutatás-fejlesztési költségek növekedése, a globalizálódott gyógyszerpiac, az erőteljes állami árkontroll, melyek mind a gyógyszeripari verseny kiéleződését eredményezik.<sup>1</sup> Az éleződő verseny következtében a fejlesztések sikeressége és költsége kiemelt jelentőségűvé válik.

Az originális kutatások növekvő költségeivel és csökkenő sikerességével párhuzamosan nő a kisebb kockázatú (alapvetően gyógyszer technológiai természetű) generikus fejlesztések, valamint a gyártástechnológiát optimalizáló fejlesztések jelentősége. A gyártástechnológiai fejlesztések területén kiemelt fontosságú a gyártás idő- és energiaigényének, valamint környezeti terhelésének csökkentése. Ezek a tendenciák, továbbá a hatósági szabályozás megváltozása, abba az irányba hatnak, hogy a gyógyszeripar területén minél több költség hatékony folyamatos technológia és folyamatos üzemű gyártósor kerüljön alkalmazásra, ami szükségessé teszi az ipari megvalósítást megalapozó kutatások végzését.

A gyógyszer technológiai fejlesztések jelentőségének növekedése abból is adódik, hogy a fejlesztett és piacra vitt hatóanyagok között nagymértékben megnövekedett a rossz vízoldhatóságú molekulák, valamint a biotechnológiai eredetű, érzékeny hatóanyagok aránya. Ezek újabb kihívások elé állítják a gyógyszer technológusokat. Vízben rosszul oldódó hatóanyagok esetén a kioldódást hatékonyan kell javítani, hogy a megfelelő biohasznosulás megvalósulhasson. Az egyre nagyobb jelentőségű – de érzékeny – biotechnológiai eredetű hatóanyagok esetében pedig kíméletes eljárások szükségesek a formulálás során, hogy azok biológiai aktivitása megmaradjon.

A kioldódás javítására alkalmazható folyamatos technológiák közül az olvadék extrúzió egyre nagyobb jelentőségűvé válik, ami a témával foglalkozó publikációk számának növekedésében is megmutatkozik.

Az olvadék extrúzió szuperkritikus CO<sub>2</sub> lágyító használatával a gyógyszer technológia egyik ígéretes új iránya, amiről csak

néhány publikáció született, és ezeken belül is csak egy foglalkozott a kioldódás gyorsításával.<sup>2</sup>

Hasonló a helyzet az elektrosztatikus szálképzés esetében, mely ugyancsak folyamatos technológia, és elméleti megfontolások alapján kiválóan alkalmas lehet hatóanyagok kioldódásának javítására, mégis a doktori munkát megelőzően megjelent egyetlen ilyen témájú cikkben az így előállított szálal mintával csak gyengébb kioldódás javítást tudtak elérni az azonos összetételű öntött filmhez képest.<sup>3</sup>

A biotechnológiai eredetű hatóanyagok számának növekedése a gyógyszer technológia területén is új kihívásokat hozott, melyek közül az egyik legjelentősebb a biohatóanyagok szilárd formába hozása. Ezt napjainkban elsősorban fagyasztva szárítással oldják meg, mely technológiának számos komoly hátránya van. Biohatóanyagok szilárd formulálása területén az elektrosztatikus szálképzés ígéretes technológia a pillanatszerűen, szobahőmérsékleten megvalósítható szárítási folyamatának köszönhetően, ezért gyógyszer technológiai alkalmazhatóságának vizsgálata rendkívül időszerű az idő és energiaigényes fagyasztva szárítás kiváltásának elősegítésére.

## Célkitűzés

A szakirodalom elemzése során azonosított gyógyszeripari trendeket és kihívásokat figyelembe véve a kísérleti munka fő célkitűzései a következők voltak:

- Szuperkritikus CO<sub>2</sub>-dal kombinált extrúzió gyógyszer technológiai alkalmazhatóságának vizsgálata vízben rosszul oldódó hatóanyagok kioldódásának javítására, valamint összehasonlítása az olvadék extrúzió technológiájával.
- Elektrosztatikus szálképzés technológiájának vizsgálata és alkalmazása vízben rosszul oldódó hatóanyagok kioldódásának javítására, szájon pillanatszerűen oldódó készítmények fejlesztésére, valamint összehasonlítása az olvadék extrúzió és filmöntés technológiájával
- Biohatóanyagok szárítására, szilárd formulálására és alkalmazására szolgáló új módszerek kifejlesztése.

Az új technológiák, gyógyszerformák, gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztésénél kiemelt cél volt az ipari igények és a megvalósíthatóság szem előtt tartása.

\* E-mail: zsknagy@oct.bme.hu, Tel.: +3614631424. Jelen közlemény Nagy Zsombor Kristóf PhD disszertációja és az ahhoz kapcsolódó közlemények alapján készült.

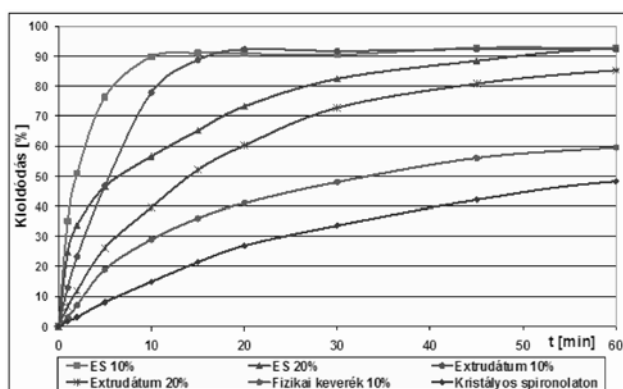
Egy vízben rosszul oldódó, de jól felszívódó hatóanyag – a spironolakton – kioldódásának javítása kapcsán hasonlítjuk össze az elektrosztatikus szálképzés és az olvadék extrúzió hatékonyságát egy új amfifil terpolimer (soluplus) alkalmazásával. Az összehasonlításához tartozik a kialakított szilárd mikrodiszperziók, ill. szilárd oldatok részletes vizsgálata, valamint az alkalmazott analitikai módszerek teljesítőképességének összevetése kristályos spironolakton-nyomok kimutatására.

A szuperkritikus extrúzió, az olvadék extrúzió és az elektrosztatikus szálképzés összehasonlítására egy másik vízben rosszul oldódó, de jól felszívódó hatóanyag – a carvedilol – kioldódásának javítása kapcsán kerül sor, egy páratartalomra nem érzékeny, vízben nem oldódó, viszont (ionizációja révén) savas közegben gyorsan oldódó polimer mátrix (Eudragit E) alkalmazásával.

Carvedilol kioldódásának semleges közegben történő javítása érdekében vízben jól oldódó, hidrophil polivinilpirrolidon alkalmazásával is megkíséreltük az elektrosztatikus szálképzést. Pillanatszerűen oldódó rendszer kialakítása és alkalmazása volt a cél egy új gyógyszerbejuttató rendszer kifejlesztése érdekében.

Új gyógyszerbejuttató rendszer kifejlesztésére volt szükség az – elsősorban idős betegek által szedett – Alzheimer kór elleni hatóanyag (donepezil HCl) esetében is. A tervezett szájjában oldódó rendszer kifejlesztése a hatóanyag amorf állapotának stabilizálását igényelte.

Biohatóanyagok kíméletes szárításának és szilárd formulálásának megvalósítására szintén célszerűnek látszott az elektrosztatikus szálképzés alkalmazhatóságának vizsgálata, amelyhez – a vaginitis kezelésére alkalmas – élő *Lactobacillus acidophilus* tartalmú nanoszálakat kívántunk előállítani és vizsgálni.



1. Ábra. Spironolakton tartalmú formulációk kioldódása (dózis: 25 mg).

Az ipari léptékű gyártás lehetőségeinek és korlátainak feltérképezése érdekében kísérleteket terveztünk porlasztólevegővel kombinált elektrosztatikus szálképzéssel, nanospider technológia alkalmazásával és olvadékból történő szájképzéssel.

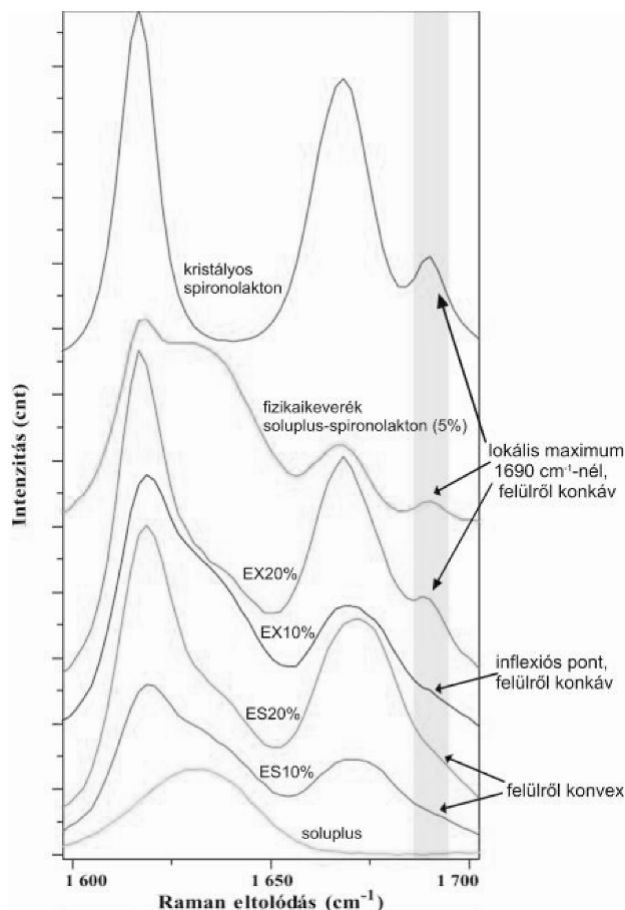
A következő részek e célkitűzések elérése során kapott néhány fontosabb eredményt ismertetik.

## 2. Spironolakton kioldódásának javítása<sup>4</sup>

Jelentősen sikerült javítani a BCS II. csoportba tartozó spironolakton kioldódását olvadék extrúzióval és elektrosztatikus szálképzéssel micellaképző polivinilkaprolaktám – polietilénglikol – polivinilacetát ojtott kopolimert használva mátrixként.

Elektrosztatikus szálképzés nagy amorfizációs hatékonyságának köszönhetően a hatóanyag és a polimer molekulárisan diszperz szilárd oldata képződött, míg az extrúziós módszer esetén a hatóanyag inhomogenitását és kristályos fázis jelenlétét tapasztaltuk. A szálak mintákban a maradék oldószer két nap után a HS-GC/MS módszer kimutatási határa alá csökkent (20 ppm), míg az etanol megengedett felső értéke 5000 ppm gyógyszerkészítményekben.

Az alkalmazott öt különböző analitikai módszer közül a Raman spektrometrián alapuló technikák tudták csak kimutatni a 10% spironolakton tartalmú extrudátumban a kristályos fázist.

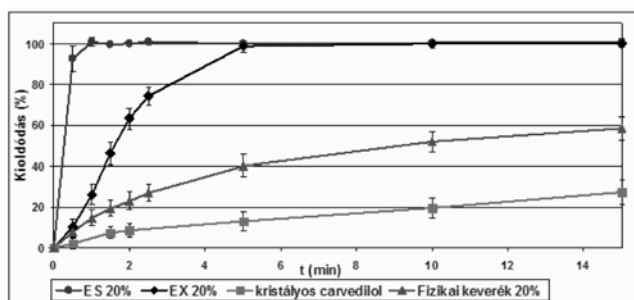


2. Ábra. Transzmissziós Raman spektrumok az 1690 cm<sup>-1</sup>-nél jelentkező kristályos spironolaktonra jellemző csúcs kiemelésével.

A legérzékenyebbnek a kristályos spironolakton nyomok kimutatására a Raman mikroszopiás módszer bizonyult. Megállapítottuk, hogy a Raman mikrospektrometria és a pásztázó elektronmikroszkópia Röntgen analízissel kombinálva kiválóan alkalmas spironolakton eloszlásának vizsgálatára soluplus mátrixban.

### 3. Carvedilol kioldódásának javítása savas közegben<sup>5,6</sup>

Szuperkritikus CO<sub>2</sub>-dal kombinált extrúzióval és Eudragit E kopolimer mátrixot alkalmazva sikerrel tudtunk előállítani olyan szilárd formulációt, melyből a BCS II. osztályába tartozó carvedilol teljes kioldódása 5 perc alatt végbement. Szuperkritikus CO<sub>2</sub> jelentős lágyító hatásának köszönhetően a termék fajlagos felülete növelhető, az extrúzió hőmérséklete csökkenthető, nagyobb termelékenység és kisebb tartózkodási idő érhető el, így az enyhébb körülményekkel a bomlás esélye csökkenthető. Az extrudátumok hatóanyag-leadását is jelentősen meghaladó sebességű, 1 perc alatti kioldódást tudunk elérni – azonos összetétel mellett – elektrosztatikus szálképzéssel előállított nanoszálás szövedékkel. A javulás a jelentősen megnövelt fajlagos felületnek köszönhető.

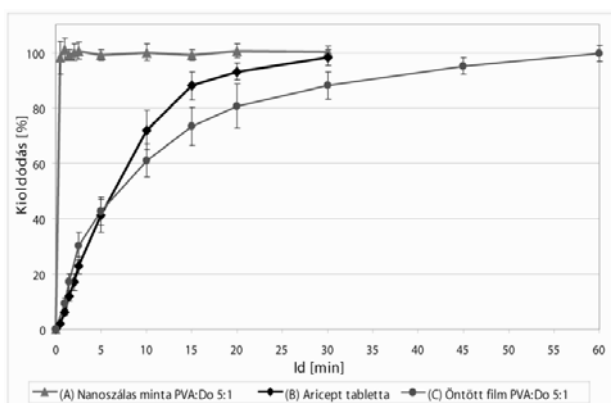


3. Ábra. Carvedilol tartalmú formulációk kioldódása (dózis 12,5mg).

A polimer mátrix a hatóanyagot minden esetben amorf formában tartalmazta, és a kioldódás során a carvedilol oldatba jutásának sebességét a polimer mátrix igen gyors oldódása határozta meg, amit segített az alkalmazott Eudragit E ionizációja (protonálódása) is.

### 4. Szájban azonnal oldódó donepezil HCl tartalmú gyógyszerhordozó fejlesztése<sup>7</sup>

Donepezil HCl diffúziója hatékonyan gátolható montmorillonit alkalmazásával, mely ionosan a felületéhez tudja kötni a hatóanyagot, valamint a diffúziót fizikailag



4. Ábra. Donepezil HCl tartalmú formulációk kioldódásának vizsgálata (dózis 10 mg).

is gátolja. Ezt kihasználva sikerült stabil amorf donepezilt tartalmazó szilárd rendszereket kialakítani. A montmorillonit

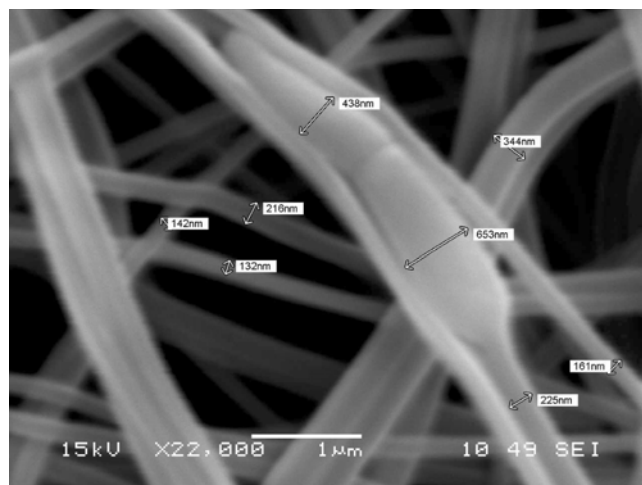
diffúzió gátló hatására alapozva gyors oldódású és jó párazáró hatású PVA-MMT alapú filmbevonó rendszereket is sikerrel állítottunk elő és alkalmaztunk.

Elektrosztatikus szálképzéssel előállított PVA alapú nanoszálás gyógyszerhordozó rendszerrel pillanatszerű kioldódást értünk el, köszönhetően a hatékony amorfizációnak, a nagymértékben megnövelt fajlagos felületnek, és a viszonylag kis molekulatömegű vízoldható polimer mátrixnak.

A hatóanyag kristályosodását a vizsgált 12 hónapos periódusban sikerült megátolni, ami szintén bizonyítja a nanoszálás hatékony diffúziógátlását. Ezzel a gyors oldódású nanohálával sikerült teljesíteni a célul kitűzött 30 s alatti oldódást, ami új lehetőségeket nyit szájban oldódó készítmények fejlesztésében, gyermekek és idősek kezelésében és az Alzheimer kór elleni küzdelemben egyaránt.

### 5. Élő Lactobacillus acidophilus tartalmú nanoszálak

Lactobacillus acidophilus biohatóanyagot tartalmazó polimer oldatokból elektrosztatikus szálképzés alkalmazásával sikeresen állítottunk elő nanoszálás szövedékeket. A nanoszálás termékek minden esetben nagy mennyiségben tartalmaztak szaporodásra képes Lactobacillus acidophilus



5. Ábra. PVA nanoszálakba ágyazott Lactobacillus acidophilus baktériumok pásztázó elektronmikroszkópos felvétele.

baktériumokat. PVP K30 és PVP K90 esetében 400 milliót és 600 milliót, PVA alkohol esetében pedig az 1 milliárdot is meghaladta az életképes baktériumok grammonkénti száma. A kiindulási csíraszámhoz képest a túlélés minden esetben meghaladta a 30%-ot, ami összevethető a fagyasztva szárításnál elért túlélési százalékokkal.

7°C-on tárolt nanoszálás termékek mindhárom alkalmazott szálképző polimer esetében még 90 nap után is, több mint 10 millió életképes Lactobacillus acidophilus csírát tartalmaztak grammonként, mely rendszer – kapszulába töltve, vagy direkt alkalmazva vagy akár öblítő folyadékban feloldva – hatékony lehet bacterialis vaginosis kezelésében.

## 6. Méretnövelés és ipari alkalmazhatóság vizsgálata

A korábbiakban bemutatott gyógyszerhordozó rendszerek előállításának méretnövelhetősége kulcsfontosságú a későbbi ipari alkalmazások megvalósításához. Az olvadék extrúzió és a szuperkritikus CO<sub>2</sub>-dal kombinált extrúzió esetében – ahogy azt már a szakirodalmi áttekintésben is bemutattuk – a méretnövelt, ipari gyártás már számos esetben megvalósult.

A fejlesztett mikro- és nanoszálak gyógyszerhordozó rendszerek méretnövelt előállítása nagyobb kihívásként jelentkezett, ezért megvalósítására különböző alternatív megoldásokat alkalmaztunk és hasonlítottunk össze.

Az elvégzett méretnövelési kísérleteink és a szakirodalom elemzése alapján nanoszálak gyártásánál a termelési kapacitás elegendően nagy lehet ahhoz, hogy kielégítse gyógyszeripar mennyiségi igényeit. A bemutatott potenciális gyógyszerformák gyártása várhatóan könnyen kivitelezhető, amennyiben a nanoszálképzést a már jelenleg is létező gyártási lépésekkel integráljuk (pl. szájban oldódó filmek gyártásának és csomagolásának filmképzést követő lépéseivel).

Ily módon nagy mennyiségben és standardizáltan gyártott, a betegeknek beadható/elfogadható gyógyszerforma a nanoszálak alkalmazásában valamint a gyógyszer-technológia területén is nagy áttörést hozhat, ami további új gyógyszerbejuttatási lehetőségek előtt nyitná meg a kaput kismolekulás és biohatóanyagok esetében egyaránt.

## Development of Innovative Drug Delivery Systems Using Continuous Pharmaceutical Technologies

Importance of the drug formulation developments in the pharmaceutical industry is rapidly increasing partly due to economic factors and partly to the changing tendencies of drug candidates and marketed drugs (namely most of them are poorly water soluble and the ratio of sensitive biodrugs is increasing). The need for reduction of production costs initiates new research activities to develop pharmaceutical manufacturing technologies with decreased time and energy consumption. Continuous pharmaceutical production is a promising way to achieve these aims.<sup>1</sup>

Thus, during the present research work continuous processes, technologies (melt extrusion, supercritical CO<sub>2</sub>-assisted melt extrusion, electrostatic spinning) were used and developed to tackle the formulation challenges of the poorly water soluble active pharmaceutical ingredients (APIs) and biotech drugs.

Micro- and nanofibres were prepared the first time by electrospinning of polyvinyl caprolactam/polyethylene glycol/polyvinyl acetate graft copolymer, which could be used as drug delivery system. This way the dissolution of poorly water-soluble spironolactone could be significantly improved (from >8 hours to 10 min), owing to the efficient amorphization and enhanced specific surface area.

## Köszönetnyilvánítás

A szerző köszönettel tartozik a következő személyeknek a segítségükért: Marosi György témavezető, Fekete Pál konzulens, Molnár Kolos, Kállai Nikolett, Marosfői Béla Botond, Kovács Klára, Nyúl Katalin, Balogh Attila, Horváth Tímea, Drávavölgyi Gábor, Baán Adrienn, Tobak Teodóra, Mayer Adrienn, Madarász János, Suhajda Ágnes, Molnár Viktor, Ott Péter, Varga Erzsébet, Kramarics Áron, Eva Kostakova, Martial Sauceau, Jacques Fages, Bozsik Erzsébet, Demeter Ádám és a kutatócsoport tagjai. Külön köszönet illeti Szabó Zsuzsát nagylelkű ösztöndíj támogatásáért. A munka kapcsolódik a „Minőség-orientált, összehangolt oktatási és K+F+I stratégia, valamint működési modell kidolgozása a Műegyetemen” c. projekt szakmai célkitűzéseinek megvalósításához (Új Széchenyi Terv TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002), valamint az OTKA K76346 és NN8246 projektjéhez.

## Hivatkozások

1. Nagy, Zs. K. MA thesis, University of West Hungary, 2011.
2. Verreck, G.; Decorte, A.; Heymans, K.; Adriaensen, J.; Cleeren, D.; Jacobs, A.; Liu, D.; Tomasko, D.; Arien, A.; Peeters, J. *Eur. J. of Pharm. Sci.* **2005**, *26*, 349-358
3. Verreck, G.; Chun, I.; Peeters, J.; Rosenblatt, J.; Brewster, M.E. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 810-817.
4. Nagy, Z.K.; Balogh, A.; Vajna, B.; Farkas, A.; Patyi, G.; Kramarics, A.; Marosi, G. *J. of Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 322-332.
5. Nagy, Z.K.; Sauceau, M.; Nyul, K.; Rodier, E.; Vajna, B.; Marosi, G.; Fages, J. *Polym. for Adv. Tech.* **2012**, *23*, 909-918.
6. Nagy, Z. K.; Balogh, A.; Drávavölgyi, G.; Ferguson, J.; Pataki, H.; Vajna, B.; Marosi, G. *J. of Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 508-517.
7. Nagy, Z.K.; Nyul, K.; Wagner, I.; Molnar, K.; Marosi, G. *Exp. Polym. Lett.* **2010**, *4*, 763-772.

The detection of crystalline drug traces nearby amorphous majority could be performed with higher sensitivity by transmission and micro-Raman spectrometry than by other methods (XRPD, DSC).<sup>4</sup>

Supercritical CO<sub>2</sub>-assisted extrusion and Eudragit E matrix was successfully applied for improving the dissolution of carvedilol of poor water solubility from several hours to 5 minutes. The polymer matrix, of good solubility below pH 5 in aqueous medium, promoted the amorphization and homogeneous distribution efficiently. The experiments lead to the conclusion that the temperature of the extrusion can be decreased, the productivity can be increased and residence time can be reduced this way owing to the detected significant plasticizing effect of supercritical CO<sub>2</sub>. Additionally the CO<sub>2</sub>, released from the product, contributes to the increase the surface area, which accelerates the dissolution.<sup>5</sup>

New fabric-type drug delivery system, consisting of submicron-size fibers, could be produced using Eudragit E matrix, which allowed the reduction of the dissolution time of antihypertensive carvedilol to 1 minute exceeding the performance of extrudates. The result was ascribed to the large surface area of the submicron-size fibres and the stable amorphous structure.<sup>6</sup>

Rapid dissolution of donepezil HCl, used against Alzheimer disease, could be ensured by PVA-based nanofibrous drug carrier system prepared by electrospinning method. The rapid dissolution is explained by the presence of water soluble polymer of relatively low molecular mass, the efficient amorphization and the high surface area, which was verified by several analytical methods (e.g. SEM, XRPD, Raman microspectrometry). The crystallization could be restricted up to min. 12 months, which shows the large diffusion-restricting capability of the nanofibres.<sup>7</sup>

Network of electrospun nanofibres containing *Lactobacillus acidophilus* probiotic bacteria could be prepared from polymer solutions. Large amount of *Lactobacillus acidophilus* bacteria of reproduction capability survived the process. In the cases of PVP K30 and PVP K90 the numbers of viable bacteria per gram are 400 and 600 million respectively, while with PVA this number achieved

1 billion. Each nanofibrous product, kept at 7°C, preserved 10 million viable *Lactobacillus acidophilus* per gram regardless of the type of the applied polymer. (It is comparable with the surviving ratio achievable using the costly freeze drying process.). The pharmaceuticals developed according to this process can be applied efficiently for the treatment of bacterial vaginosis.

Based on the investigation of scale-up possibilities the output of the developed technologies can be high enough to fulfil the quantity requirements of pharmaceutical industry.

Industrial scale production of patient-friendly fibrous dosage forms can result in significant break-through in the field of electrospinning and pharmaceutical technology, which could open up new drug delivery opportunities in case of small molecules and biopharmaceuticals as well.

# Élelmiszer-allergének mennyiségi meghatározására alkalmas analitikai módszerek alkalmazási környezetének fejlesztése

KORMOSNÉ BUGYI Zsuzsanna\* és TÖMÖSKÖZI Sándor

*Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,*

*Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék, Szent Gellért tér 4., 1111 Budapest, Magyarország*

## 1. Bevezetés

Az élelmiszerlánc biztonságának szavatolása során számos olyan tényező vizsgálata szükséges, melyek kockázatot jelentenek a fogyasztók számára. A „hagyományos”, főként külső forrásokból származó biológiai, kémiai és fizikai veszélyforrások mellett az utóbbi évtizedekben egyre növekvő egy olyan speciális élelmiszerbiztonsági terület jelentősége, melynél a veszély forrásai az élelmiszerek olyan természetes alkotói, elsősorban fehérjéi, melyek túlérzékenységi reakciókat (pl. allergia, intolerancia) válthatnak ki az emberi szervezetben. A különböző típusú rendellenességek eltérő mechanizmussal rendelkeznek, jelenleg egyetlen hatékony kezelési módjuk a kiváltó fehérjéket elhagyó diéta alkalmazása.<sup>1-2</sup>

Az érintett fogyasztók biztonságos élelmiszer-alapanyagokkal és -termékekkel történő ellátásában az érintett szektor minden szereplőjének (a fogyasztóknak, a klinikumnak, az élelmiszergyártóknak, az analitikai módszerfejlesztőknek, a vizsgáló laboratóriumoknak és a hatóságoknak) együtt kell működni. A jelentkező igen összetett problémák megoldása csak több tudományterület szoros együttműködésével lehetséges. A klinikai kutatásoknak minél pontosabban meg kell határozniuk a túlérzékenységi reakciók mechanizmusát, azonosítaniuk kell a kiváltó fehérjemolekulákat és -epitópokat, valamint a tüneteket kiváltó küszöbdózisokat.

Emellett szükség van a kiváltó molekulák és epitópok minél szélesebb körű fehérjekémiai vizsgálatára, valamint az élelmiszer-előállítás során alkalmazott fizikai-kémiai műveletek fehérjeszerkezetre, funkcionális tulajdonságokra (pl. oldhatóság) és biológiai aktivitásra (pl. immunaktivitás) gyakorolt hatásainak megértésére.

Ezek az információk elengedhetetlenek a területhez kapcsolódó szabályozási környezet kialakításához. Az élelmiszerek megfelelő ellenőrzéséhez olyan analitikai módszertan létrehozására van szükség, mely képes a tüneteket kiváltó komponensek megbízható meghatározására. A validált, megbízható analitikai módszertan mindenképpen szükséges a gyártásközi- és termékellenőrzéshez, az élelmiszerbiztonsági és allergénmenedzsment rendszerek működtetéséhez, a fogyasztók megbízható informálásához.<sup>3-4</sup>

Az allergének meghatározása többféle módszerrel lehetséges, jelenleg rutinszerűen a viszonylag egyszerűen kivitelezhető és specifikus immunanalitikai elven működő

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) módszerek terjedtek el. Az ELISA módszertan alkalmazhatósága azonban korlátozott, melynek egyik oka, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható kitek érvényesítése akadályokba ütközik. Ez részben a validálás alapját képező referencia anyagok és referencia módszerek hiányával, részben egyéb tényezőkkel magyarázható.

Utóbbiak közül érdemes kiemelni a tünetekért felelős fehérjék sokféleségét és genetikai-környezeti változékonyságát, a küszöbdózisokról és kiváltó élelmiszer-összetevők molekuláris jellemzőiről rendelkezésre álló ismeretek elégtelenségét, valamint az élelmiszerfeldolgozási folyamatok kiváltó molekulákra gyakorolt hatásait leíró adatok hiányosságait. Ezeket a tényezőket figyelembe kell venni az analitikai módszerfejlesztés, valamint a módszervalidáláshoz szükséges referencia anyagok fejlesztése során is.<sup>5-9</sup>

A probléma megoldásán számos nemzetközi kutatócsoport dolgozik. A munkában Tanszékünk is részt vesz az Európai Unió 6. Keretprogramja által támogatott MoniQA (Monitoring and Quality Assurance in the Food Supply Chain) Kiválóság-hálózat Allergén Munkacsoportjának tagjaként. A Munkacsoport tevékenységéhez is kapcsolódóan a jelen közleményben bemutatott doktori értekezés alapjául szolgáló kutatómunka fő célkitűzései a következők voltak:

- Olyan új referencia anyagok fejlesztése, melyek három gyakori allergén, a tej, tojás és glutén fehérjéit feldolgozott, reális élelmiszer-mátrixban tartalmazzák.
- A fejlesztett referencia anyagok segítségével a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA módszerek teljesítményjellemzőinek meghatározása, összehasonlító elemzése és az eredmények mögött álló jelenségek értelmezése. Ilyen irányú vizsgálataink újszerűsége, hogy az elsők között végeztük el azokat reális élelmiszer-mátrixot modellező referencia anyagok felhasználásával. Ezzel az eddigieknél jobban definiált körülmények között nyílt lehetőség a módszervalidálás kivitelezésére és az analitikai eredményeket befolyásoló jelenségek tanulmányozására.
- A feldolgozási folyamaton átesett fehérjék meghatározásakor kapott analitikai adatok összevetése a natív állapotban lévő fehérjék által szolgáltatott eredményekkel, így módon becsülve és értékelve a feldolgozási folyamatok által okozott analitikai bizonytalanság mértékét, valamint az ennek hátterében álló fehérjeszintű változásokat.

\* Tel.: +36-1/463-3865; fax: +36-1/463-3855; e-mail: bugyi@mail.bme.hu

## 2. Eredmények

### 2.1. A tej- és tojásfehérjét, valamint gliadint tartalmazó referencia anyagok fejlesztése

Mivel olyan mintamatrix létrehozását láttuk célszerűnek, mely bármely allergén komponens esetében univerzálisan alkalmazható a referencia anyag fejlesztés alapanyagaként, elsőként a 4. fejezetben bemutatott irodalmi recept (sütemény)<sup>10</sup> módosítására volt szükség allergénmentes modelltermék előállítása céljából. A módosítások elsősorban annak érdekében történtek, hogy az allergén szempontból zavaró összetevőket eltávolítsuk úgy, hogy az anyag konzisztenciája ne változzon negatív irányba, és az előállítási folyamat reprodukálhatóan megvalósítható legyen. Emellett szükséges volt olyan homogenizálási módszerek létrehozása, melyek a mintamatrixhoz kis mennyiségben adagolt tej-, tojás- és gliadin-fehérjék homogén eloszlását biztosítják. Ezt a tej- és tojásfehérjék esetében porkeveréssel, míg a gliadin esetében folyadék-homogenizálás és porkeverés kombinációjával oldottuk meg.<sup>11-13</sup>

Az alapanyag-fejlesztés és a homogenizálási kísérletek eredményeként sikerült előállítási protokollokat létrehozni a tej, a tojás a gliadin referencia anyagok előállításához.

### 2.2. A referencia anyagok és előállítási folyamatuk jellemzése

Az analitikai célra szánt referencia anyag előállításának megbízhatósága szempontjából döntő fontosságú a mintákban a mérendő fehérjék homogén eloszlásának biztosítása, valamint az egyes sarzsok közötti bizonytalanság, vagyis a független tételek előállításából eredő hiba mértékének megállapítása. E két tényezőtől becsülhető a mintamatrix alkalmazásából eredő véletlen hiba nagysága. Ennek becslése érdekében valamennyi modelltermékre kísérletet állítottunk össze, melyben 3-3 párhuzamos sarzsot készítettünk az előzőekben említett előállítási protokollok szerint. Az alkalmazott koncentráció-szintek a következők voltak:

- Tej: 0, 100 mg/kg tejpor
- Tojás: 0, 1000 mg/kg tojáspor
- Glutén: 0, 10, 50 mg/kg gliadin

A mintákat több alkalommal, 3-5 párhuzamos alkalmazásával ELISA módszerrel mértük. Az adatokat összefoglalva elmondható, hogy a fejlesztett referencia anyagokban a mérendő fehérjék eloszlása homogénnek tekinthető mind sarzsokon belül, mind sarzsok között, mely arra utal, hogy az előállítási folyamat standardizálása megvalósítható. Emellett a kapott adatok segítségével becsülhetővé válik a mérés során a modelltermék alkalmazásából eredő hiba mértéke adott ELISA kit esetében.

### 2.3. Az ELISA módszerek teljesítményjellemzőinek vizsgálata a referencia anyagok segítségével

Az előállított referencia anyagok lehetővé tették, hogy az eddigieknél részletesebben és megalapozottabban hasonlíthassuk össze a jelenleg hozzáférhető és rutinanalitikában használható kitek analitikai teljesítményét

és – közvetett módon – értelmezzük az eredmények mögött álló fizikai-kémiai jelenségeket. Lehetővé vált továbbá az egyes módszerek egyedi analitikai bizonytalanságainak, rendszeres és véletlenszerű hibáinak becslése, a hiba lehetséges forrásainak azonosítása is. Ehhez az analitikai teljesítményjellemzők közül a pontosságot, valamint a precizitást, utóbbin belül pedig az ismételhetőséget és a reprodukálhatóságot vizsgáltuk.

A módszerek **pontosságát** az adott analit visszanyerés értékei alapján becsültük, amely során azt tapasztaltuk, hogy a visszanyerések egyik kit esetében sem érték el a nominális értéket (feldolgozatlan minták esetében ELISA kittől függően 48-96%-os visszanyerési értékek adódtak). Emellett azt is megállapítottuk, hogy a visszanyerés értékek a sült termékek esetében jelentősen lecsökkentek a natív fehérjét tartalmazó, feldolgozatlan alapanyag-keverékhez képest (ELISA kittől függően 5-72%-os visszanyerési értékeket tapasztaltunk). A visszanyerési értékek alakulását nagymértékben befolyásolhatják a minták elméleti koncentrációjának számításnak alapjául szolgáló összefüggések, valamint a feldolgozási folyamat.

Az **ismételhetőség** meghatározására az ELISA kitek standard oldatsorainak egyes tagjait a referencia anyagokkal együtt mintaként vittük fel az ELISA lemezre és a kalibrációs görbe alapján meghatároztunk allergén fehérje-tartalmukat. A kapott szórásadatokat tanulmányozva az összes kit esetében megállapítható, hogy a referencia anyag előállításának bármely fázisából származó (porkeverék, nyers tézta és sült termék) mintával kapott szórásérték a módszerek kalibrációjához használt standard anyagok szórásaival összemérhető, sőt egyes esetekben annál kisebbnek adódott. Ez azt jelzi, hogy referencia anyagunk homogenitása megfelelő, másrészt, hogy az analitikai eredmények bizonytalansága nagyrészt a módszer saját bizonytalanságából ered. Vagyis a modelltermék-előállítás és a mérés kivitelezése során nem történt olyan véletlen hiba, mely a mérési adatok bizonytalanságát jelentősen megnövelné. Fontos megjegyezni azt is, hogy a standard oldatok szórásainak alakulása koncentrációfüggést mutat, növekvő koncentrációhoz növekvő bizonytalanság társul.

Az ismételhetőség és a **reprodukálhatóság** összehasonlítása során a tej ELISA és a gliadin ELISA esetében a várt eredmény adódott, vagyis a reprodukálhatósági szórások nagyobbak adódtak, a mérés bizonytalansága megnövekedett. A többi esetben azt tapasztaltuk, hogy vagy nincs szignifikáns különbség, vagy a reprodukálhatósági szórásérték kisebb, mint az ismételhetőség esetében. Ez részben a módszerek érdeme, részben a kifejlesztett anyagunk alkalmazhatóságának köszönhető.

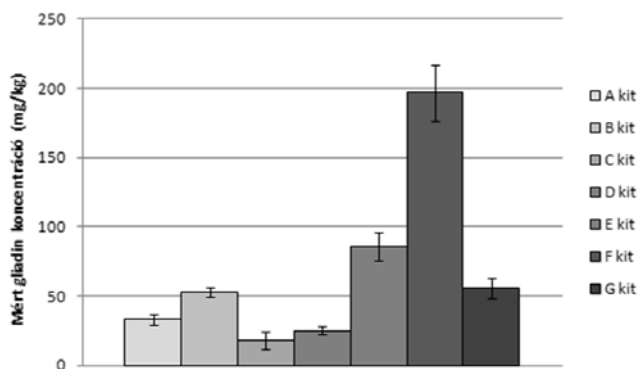
### 2.4. Kereskedelmi forgalomban kapható glutén ELISA kitek összehasonlító vizsgálata

A gliadin tartalmú referencia anyag esetében lehetőségünk volt arra, hogy elvégezzük hét, kereskedelmi forgalomban kapható, glutén meghatározására alkalmas ELISA kit összehasonlító vizsgálatát.<sup>14</sup> A kísérletsorozat újszerűsége, hogy az összehasonlító elemzést elsőként végeztük el feldolgozott mátrixból készült referencia anyaggal. Ennek előnye, hogy a referencia anyagok segítségével olyan kísérleteket tudunk megtervezni, melyek a reális mintamatrix

miatt a mindennapi gyakorlatot jobban megközelítő véletlen hibabeccslés meghatározásával jellemezni képesek az egyes módszereket és képesek összehasonlítani azok teljesítményjellemzőit. Az eredmények komplex értékelése pedig alkalmat adhat az immunanalitikai módszerek kritikus pontjainak azonosítására, az ezekből származó hibák nagyságrendjének meghatározására is.

A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a különböző módszerek egy adott minta esetében eltérő eredményeket szolgáltatnak (1. ábra), mely élelmiszer-biztonsági kockázatot hordoz. A mért gliadin-koncentrációk eltérése főként a különböző ellenanyagok és extrakciós módszerek alkalmazásából ered, valamint abból a tényből, hogy a referencia anyagban alkalmazott gliadin összetétele eltérhet a kitek kalibrációjához használt kalibráló anyagoktól. Utóbbi felhívja a figyelmet a standardizált kalibráló anyagok hiányára, valamint arra a kérdésre, hogy ezeket az anyagokat hogyan válasszák meg.

Az adatokat vizsgálva megfigyelhető továbbá, hogy a módszerek közötti véletlen hibák nagysága (az ismétlésből eredő szórások) jelentősen nem tér el egymástól. Tehát az alkalmazott antitestek és mintaelőkészítési eljárások különbözősége összességében nem a véletlen hibákra, hanem a visszanyerési értékre (vagyis a módszer pontosságára) vannak hatással. Ennek felderítésére referencia anyag nélkül nem lett volna lehetőség.



1. Ábra. 50 mg/kg gliadin tartalmú sütemény elemzése kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitekkel (kit kódok: A-G).

A képet még árnyaltabbá teszi, hogy az eddig tárgyalt tényezők mellett egy újabbat is figyelembe kell venni, vagyis a gliadin feldolgozott mátrixból történő meghatározását, a feldolgozás analitikai eredményekre gyakorolt hatását.

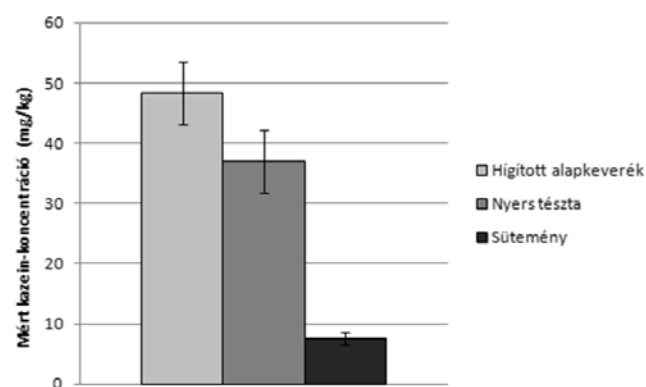
### 2.5. A feldolgozási folyamatok analitikai eredményekre gyakorolt hatásai

Az élelmiszerek legnagyobb részét feldolgozott formában fogyasztjuk, így fontos információt gyűjteni arról, hogyan hatnak a feldolgozási folyamatok a túlérzékenységi reakciókat kiváltó fehérjékre, és hogy ezek a molekuláris változások milyen mértékben befolyásolják az analitikai eredményeket. Az ilyen jellegű adatok a feldolgozott mátrixú referencia anyagok fejlesztése, és ezáltal a módszervalidálás szempontjából is fontosak.

Kísérleteink során a modelltermék-előállítási folyamat minden lépéséből (alapanyag-keverék, tészta, sütemény) mintát vettünk, így megteremtettük annak lehetőségét, hogy megvizsgáljuk, az egyes feldolgozási lépések miként hatottak az analitikai eredményekre.<sup>11-12, 14-15</sup> Megállapítottuk, hogy a tésztaképződés folyamata a mérhető allergén-tartalmat nem befolyásolja.

Ugyanakkor a sült modelltermékek mért allergén fehérjetartalma szignifikánsan alacsonyabbnak adódik. Ez a jelenség egyértelműen a hőkezelés hatásának tulajdonítható (2. ábra). Elmondható tehát, hogy a hőkezelésnek, az alkalmazott kitektől függő mértékben, jelentős hatása van az immunanalitikai módszerek által szolgáltatott eredményekre, amit a módszerek fejlesztésekor nagyon fontos figyelembe venni.

A feldolgozás hatása alapvetően két módon befolyásolhatja az analitikai eredményeket. Egyrészt a bekövetkező fehérjemódosulások megváltoztathatják a fehérjék oldhatóságát, mely az extrakció hatékonyságát ronthatja. Másrészt a megváltozott fehérjeszerkezet hatására csökkenhet a fehérje ellenanyaghoz való affinitása, mely az analitikai detektálhatóságot ronthatja.<sup>16-17</sup> A jelenség hátterében álló okok nincsenek pontosan felderítve, sok esetben csak feltételezések léteznek. A befolyásoló tényezők feltárásához molekuláris szintű vizsgálatokra is szükség lesz.



2. Ábra. A hőkezelés (180 °C) hatása tejpor tartalmú referencia anyag esetében (névleges koncentráció: 100 ppm tejpor).

### 3. Összefoglalás

Az új modelltermékek kidolgozásával és felhasználásukkal lehetőség nyílt arra, hogy az ELISA módszerek kivitelezése során jelentkező hibákat becsüljük úgy, hogy a mérési adatokat ismert névleges koncentrációhoz hasonlítjuk. Ezen hiba nagysága jellemzi az ELISA módszer alkalmazhatóságának lehetőségét és korlátait. A jelenlegi szabályozás ugyanis nem veszi figyelembe a fent leírt jelenségekből adódó mérési bizonytalanságot. Így az élelmiszer-gyártókkal szemben olyan követelményeket támaszt, melyek megbízható igazolására a jelenlegi módszertan nem alkalmas. Ez felhívja a figyelmet az analitikai módszertan továbbfejlesztésének és a területen folyó fejlesztő munka harmonizációjának szükségességére.



#### 4. Kísérleti rész

A referencia anyagok előállításának alapjául egy, Scaravelli és munkatársai<sup>10</sup> által létrehozott modelltermék (sütemény) receptje szolgált, melyet eredetileg mogoró meghatározására alkalmas PCR módszerek fejlesztéséhez alakítottak ki. Az anyagfejlesztés két fő lépése a recept módosítása, valamint a tej-, tojás- és gliadin fehérjék homogenizálási módszereinek kidolgozása volt. Ennek megfelelően a kísérletek során alkalmazott referencia anyagok kialakítása is a kutatómunka részét képezte.

A referencia anyagok analitikai vizsgálatához olyan kísérlettervet állítottunk össze, mely lehetővé tette azt is, hogy a feldolgozási folyamat analitikai eredményekre gyakorolt hatását jellemezhesük. Az elkészült sült modelltermékeket, valamint az előállítás korábbi lépéseiből származó alapanyag-keverékeket és nyers tésztákat ELISA módszerek felhasználásával elemeztük (Tepnel BIODIAG Casein Assay Kit, RIDASCREEN Fast Ei/Egg Protein, RIDASCREEN Gliadin).

A gliadin referencia anyag segítségével elvégeztük továbbá hét, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit összehasonlító vizsgálatát (AgraQuant Gluten Assay (Romer Labs), BIODIAG Gluten Assay Kit (Tepnel), Gliadin ELISA (ELISA Systems), HAVEN Gluten-Check ELISA kit (Diagnostic Innovations), RIDASCREEN Gliadin (R-Biopharm), Veratox Quantitative Gliadin Test (Neogen), Wheat protein ELISA kit (Gliadin) II (Morinaga)).

Az ELISA mérések kivitelezése és az adatok kiértékelése a gyártók által szolgáltatott használati útmutató szerint történt, emellett a kapott eredményeket az átlagok és szórások vizsgálatával, valamint t-próbákkal statisztikailag is elemeztük.

#### Köszönetnyilvánítás

A kutatómunkát az EU 6. Keretprogramja által támogatott MoniQA Kiválóságshálózat (FOOD-CT-2006-036337) és a „Minőségorientált, összehangolt oktatási és K+F+I stratégia, valamint működési modell kidolgozása a Műegyetemen” c. projekt (TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002), a Varga József Alapítvány, valamint az állami doktori ösztöndíj támogatta. Köszönet illeti a következő cégeket, akik a glutén ELISA összehasonlító vizsgálatához ingyen kitéket

#### Improving the conditions of the analytical methodology for the quantification of food allergens

Food-induced hypersensitivity reactions (e.g. allergies, intolerances) are representing a significant food safety issue. The only effective treatment of classic food allergies and other individual disorders (e.g. celiac disease) is a diet excluding the food components responsible for triggering the symptoms.

In order to ensure the safety of the affected population it is necessary to precisely and reliably quantify the allergenic components present in foodstuffs even in low concentration ranges. To reach this goal validated analytical methods are needed. In case of the most widely

used immunoanalytical-based ELISA methodology validation is limited by - together with other factors - the lack of reference materials and reference methods.

#### Hivatkozások

1. Taylor S. L.; Hefle S. L. *Food Technol.* **2001**, *55*, 68-83.
2. Sicherer S. H.; Sampson H. A. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S116-S125.
3. Gendel S.; Buchanan R.; Dennis S.; Acheson D.; Assimon S. A.; Beru N.; Bolger P.; Carlson D.; Carvajal R.; Copp C.; Falci K.; Garber E.; Harden E.; Kane R.; Kvenberg J.; Luccioli S.; Park D.; Raybourne R.; Troxell T.; Vierk K. *J. Food Prot.* **2008**, *71*, 1043-1088.
4. Hischenhuber C.; Crevel R.; Jarry B.; Mäki M.; Moneret-Vautrin D. A.; Romano A.; Troncone R.; Ward R. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2006**, *23*, 559-575.
5. Kerbach S.; Alldrick A. J.; Crevel R. W. R.; Dömötör L.; DunnGalvin A.; Mills E. N. C.; Pfaff S.; Poms R. E.; Popping B.; Tömösközi S. *Qual. Assur. Saf. Crop.* **2009**, *1*, 50-60.
6. Poms R.; Emons H.; Anklam E. *In Detecting Allergens in Food*; Koppelman S.J.; Hefle S.L. Ed.; Woodhead Publishing Ltd.: Cambridge, **2006**; pp. 348-356.
7. Abbott M.; Hayward S.; Ross W.; Godefroy S. B.; Ulberth F.; van Hengel A. J.; Roberts J.; Akiyama H.; Popping B.; Yeung J. M.; Wehling P.; Taylor S. L.; Poms R. E.; Delahaut P. *J. AOAC Int.* **2009**, *93*, 442-450.
8. Takács K.; Szamos J.; Janáky T.; Polgár M.; Gelencsér É. *Food Agr. Immunol.* **2010a**, *21*, 317-334.
9. Takács K.; Szamos J.; Kovács E.; Janáky T.; Polgár M.; Gelencsér É. *Sütőiparosok Pékek.* **2010b**, *57*, 27-32.
10. Scaravelli E.; Brohée M.; Marchelli R.; van Hengel A. *J. Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 857-869.
11. Bugyi Zs; Nagy J; Török K; Hajas L; Tömösközi S. *Anal. Chim. Acta.* **2010**, *672*, 25-29.
12. Bugyi Zs; Török K; Hajas L; Adonyi Zs; Diaz-Amigo C; Popping B; Poms R; Kerbach S; Tömösközi S. *J. AOAC Int.* **2012**, *95*, 382-387.
13. van Eckert R.; Berghofer E.; Ciclitira P. J.; Chirido F.; Denery-Papini S.; Ellis H. J.; Ferranti P.; Goodwin P.; Immer U.; Mamone G.; Méndez E.; Mothes T.; Novalín S.; Osman A.; Rumbo M.; Stern M.; Thorell L.; Whim A.; Wieser H. *J. Cereal Sci.* **2006**, *43*, 331-341.
14. Bugyi Zs; Török K; Hajas L; Adonyi Zs; Popping B; Tömösközi S. *Qual. Assur. Saf. Crop.* **2013**, *5*, 79-87.
15. Bugyi Zs; Kovács A; Óri Zs; Tömösközi S. *In Gluten Proteins 2009*, Gérard Branlard Ed., INRA. **2009**; pp. 320-322.
16. Thomas K.; Herouet-Guicheney C.; Ladics G.; Bannon G.; Cockburn A.; Crevel R.; Fitzpatrick J.; Mills C.; Privalle L.; Vieths S. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 1116-1122.
17. Monaci L.; Brohée M.; Tregoeat V.; van Hengel A. *Food Chem.* **2011**, *127*, 669-675.

used immunoanalytical-based ELISA methodology validation is limited by - together with other factors - the lack of reference materials and reference methods.

For supporting the validation of analytical methods for allergen quantification, the main objective of this work was the development of reference materials containing major allergenic proteins (milk, egg, and gliadin) in a processed food matrix. With the help of the developed reference materials we determined the analytical performance of the related ELISA methods, the uncertainty of the measurements and the effects of food processing on the measurable

protein content. We also attempted to identify the molecular, chemical and physical background of the experienced phenomena.

The major outcome of this work is that we developed three reference materials containing milk, egg and gliadin proteins in known amount in a processed food matrix. Besides, the production procedure of the reference materials was standardized and a production protocol was created for all of the produced reference materials. We also determined the analytical uncertainty originated from the production process.

With the application of the reference materials we studied certain performance characteristics of the applied ELISA methods. Applying realistic food matrices was a step forward compared to the previously applied unprocessed model matrices. With the help of the new materials, performance characteristics of the currently available ELISA methods can be determined more precisely, just like the analytical uncertainty of the methods and the phenomena occurring during the analysis of real food samples can be studied more effectively.

The reference materials also made it possible to carry out a comparative study of commercially available gluten ELISA kits that was implemented with a reference material in a realistic food matrix for the first time. We observed that the results of the analysis of a certain sample varied among the kits (Fig.1.). During this experiment we identified several factors that can affect the

analytical results (e.g. applied antibody, extraction method). We also found that these factors are mostly influencing the accuracy of the measurement and not its precision.

The effects of heat treatment on the analytical results were also investigated with the help of reference materials. We found that heat treatment reduces the measurable allergenic protein content (Fig.2.). Thus, heat treatment influences the solubility and immunoaffinity of the proteins (or both) through changing their structure.

The developed reference materials can be used as standard materials for method development and method validation. Besides, as the analyte went through all steps of food processing, errors of the ELISA methods can be modelled more reliably using these materials and the limitations of the methodology can be estimated more precisely. This information can be used for refining official thresholds and for determining the future trends of analytical method development. With the application of the reference materials, factors causing the variability of the analytical data can be identified better (e.g. target molecules, antibodies, calibrators, effects of processing) that could be useful for improving the methodology. Improving the analytical methods together with the improvement of the results of clinical research could result in a more precise allergen policy helping the work of food manufacturers, this way enhancing the safety of consumers and widening the range of the products available for them.

## Gegus Ernő (1921-2006)

BORSZÉKI János\*

*Pannon Egyetem, Mérnöki Kar*



**Gegus Ernő (1921-2006)**

Gegus Ernő 1921. december 24.-én született Budapesten. Vegyészmérnöki oklevelét a József Nádor Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetemen szerezte

1944-ben (okl. szám: 284), majd az Egyetem Elektrokémiai Tanszékén kezdte meg munkáját.

Hamarosan katonai szolgálatra kellett bevonulnia. Erről az időszakról 1996-ban írt és barátainak, közvetlen munkatársainak átadott megemlékezésében (Ige az igában) így ír:

„1944. október 15. a Szálasi-puccs után a halasztások, felmentések megszűntek, egy heti tanakodás után 23.-án bevonultunk az évfolyam zömével Piliscsabára az utász-vegyiharcos alakulathoz. Innen novemberben Dorogra vezényelnek iskolára, onnan december elején Csapakra megyünk, gyalogosan. Itt jön az 'aranyélet', az iskolában szalmán fekszünk, kiképzés békaügetésben dombnak fel; a vasas víz miatt a kulacsokban csak csopaki rizling lehetett”.

További nehézségek után 1945. februárjában Zsidára kerül, majd március 15.-én Szentgotthárdra vezénylik, ahol március 31.-én a szovjet csapatok elérik a magyar csapatokat és fogságba esik. Az útról, megemlékezésében ezt írja:

„Első 'külföldi' utam ez, 23 évesen a Körös völgyén a Küküllő mellett, majd Brassónál a Kárpátokon át a romániai átmenő lágerbe. Itt még nyolcan-kilencen együtt vagyunk vegyészmérnök hadifoglyok. Itt értesülünk május 9.-én a

béke kitöréséről. A láger hangulata azonban nem ezt tükrözte. ... Két hét után zakatolva robognak a marhavagonok lakóival éjjel-nappal valamerre észak felé.... Jó két heti utazás után Bakut és a tengeri olajkutakat elhagyva, elérkeztünk az itteni nagy elosztótáborba Rusztaviba.”

Gegus Ernő Grúziában, Bulacsari faluban töltötte a következő éveket, malária, egész napos kemény fizikai munka közben. Megtanult oroszul a lágerbe csempészett német-orosz szótár és nyelvkönyv segítségével. 1948 október végén 43 fogolytársával együtt elszállították vissza Rusztaviba, ahol felcsillant a remény, hogy hazajöhetnek.

Sajnos nem így történt, fél év sztálingrádi lágerélet után (-20 °C), 1949-ben Voronyezsbe vitték a foglyokat. Mozdonygyárban dolgozik, otthonról alig jönnek hírek, télen -43 fok. 1950 tavasza még mindig itt találja, míg novemberben megindultak a várva-várt előkészületek a hazatérésre.

Erről így ír: „Már nem a szokásos vakláрма, indul a bevagonírozás. Átesünk az ellenőrző motozáson, elveszik Bibliámat, majd a szokásos kétheti vonatkozás marhavagonokban, de nyitott ajtókkal, befutunk Máramarosszigetre. Azután Nyíregyháza–Sóstó dec. 1.-én. Vizsgálat tüdőszűrés, ujjlenyomat, szinte bűnözőként kezelnek.” Hazatérő bizonyítványt kapott, azonban rendőri felügyelet alá helyezték, mert ”szabadságkorlátozás nélkül ittléte a közrend és a biztonság szempontjából aggályos és káros”.

1950. dec. 3.-án így utazhatott Budapestre. A Műszaki Egyetem Elektrokémiai Tanszékén Lányi professzor sokáig fenntartotta státuszát, de ajánlatára az Erdey László vezette Általános Kémiai Tanszéken kapott 1951. januárjában önálló kutatói állást. Feladata a színképelemzői laboratórium elindítása, a kutatásokat a nemrégiben leszállított szovjet kvarc-spektrográf segítségével kezdhette meg.

Közben 1951. szeptemberében megszüntették rendőri felügyeletét.

1953. szeptember 4.-én megnősült, felesége Sára, gyermekei: Gábor (1954, villamosmérnök), Márta (1956, ELTE angol, történelem szak), Sára (1960, eü. középiskola)

A Műegyetemen érte 1956 őszének felforrósodott hangulata és a kirobbanó tüntetésen már együtt vonult a Bem térre az egyetemi polgárokkal. A további eseményeken nem vett részt, azonban a harcokban mentés közben meghalt három református teológus újratemetésén (1957. február 17.-én) viszont ott volt. Ennek folytatása lett letartóztatása, amiről így emlékezik (Ige az igában – folytatás):

\*Borszéki János CSc ny. egyetemi docens

„Fél tíz körül rendőr csöngetett be egy nyomozóval együtt és kint strázsált egy másik rendőr. Házkutatási parancssal jöttek, a szomszédból tanút is hívtak. A gyerekekkel tapintatosan bántak, Gábort hagyták aludni, Márti meg a babakocsiból pislogott rájuk. Végigbogarászták a szekrényeket, a kétezernyi könyvet (az egyikben ott lapult Illyés: 'Egy mondat a zsarnokságról' verse – megtalálták), egy halom forradalmi újságot, egy-két gyanús kéziratot elvittek velem együtt, úgy hajnali 2-3 óra tájban.”

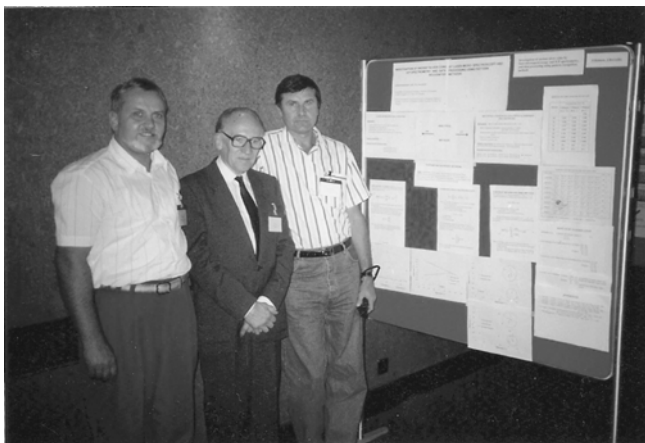
Előzetes a Gyűjtőfogházban, vallatás, majd 1957. június 5.-re tüzték ki a tárgyalást. Ítélet: 6 hónapi börtön, amelyet Állampusztán kellett letöltenie.

Szabadulása után (1957. november 13.) jelentkeznie kellett az Akadémián, ahol közölték, hogy nem maradhat állásában. Felajánlottak a Vasipari Kutató Intézetben a Vegyészeti Osztályon kutatói állást. 1959. jan. 1.-től itt dolgozott, ahol feladata magas fokon művelt szakmájához kapcsolódott: szinképelemző laboratórium megszervezése. Az itt eltöltött eredményes kutatóévek után 1970-től a Veszprémi Egyetem Analitikai Tanszékén működő MTA Kutatócsoport munkájában vett részt, mint tudományos főmunkatárs.

1986-ban ment nyugdíjba, de rendszeresen részt vett és tanácsaival segítette a tanszéken folyó spektrokémiai kutatásokat.

### Szakmai munkássága

A Műszaki Egyetemen folytatott spektrokémiai kutatásainak egyik fontos eredménye az Erdey-Gegus-Kocsis porlasztó kifejlesztése (1), amely lehetővé tette oldatok közvetlen beporlasztását fűrt elektródon keresztül a spektrokémiai sugárforrásba. A Vasipari Kutatóban töltött évek alatt kidolgozta a szilárd anyagok homogenitásának mennyiségi meghatározására alkalmas eljárást.



Gegus Ernő munkatársaival a British Museumban rendezett Archeometriai Konferencián.

Közben meghatározó szerepe volt a Török Tibor és Zimmer Károly vezetése alatt szerveződő Szinképelemző Szakbizottságnak, amely GTE, később a Magyar Kémikusok Egyesületével közösen évente rendezi a Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlést. Ekkor már engedélyt kapott külföldi konferenciákon való részvételre (Tátralomnic

'1959', Görlitz '1962', Gliwice, Belgrád, Zágráb '1963' Moszkva '1964', Kína '1965', Merseburg '1968').

Brüsszeli meghívásának elfogadását a VASKUT 1966-ban nem engedélyezte. Drezda, Linz '1970' voltak a következő szakmai fórumok, ahol fémipari kutatásairól beszámolhatott.

Kimagasló eredményeket ért el a lézer-mikroszinképelemzés területén, amely megalapozta későbbi archeometriai kutatásait is. Egyik legfontosabb munkája a társszerzőként írt Emissziós Szinképelemzés kétkötetes szakkönyv (2), amelynek elméleti kötete ma is alapvető jelentőségű. Oroszul és angolul is megjelent, az MTA nívódíjjal tüntette ki.

1970-től a Veszprémi Egyetem MTA Analitikai Kutatócsoportjának munkatársa, majd 1974-től főmunkatársa volt, nyugdíjazásáig, 1986-ig, majd nyugdíjasként tovább folytatta kutatómunkáját a Veszprémi Egyetemen.

A Veszprémi Egyetemen töltött évei alatt részt vesz az oktatói munkában, előadásokat tart, vezeti a Tanszéken folyó spektrokémiai kutatásokat. Az egyre jelentősebbé váló atomszorpciós spektrometria elméleti háttérének tisztázására módszert fejlesztett ki szilárd fémvegyületek párolgási folyamatainak vizsgálatára. Munkatársaival lézer-mikroszinképelemzés adatait alakfelismerő módszerekkel dolgozta fel, bevezette a roncsolás-mentes módszerrel végzett archeometriai kutatásokat. Mint a lézeres mikroszinképelemzés nemzetközileg elismert szakértője, az UNIDO megbízásából Argentínában részt vett egy új kutatólaboratórium indításában (1977).

Archeometriai kutatásairól Budapesten (Archeometriai Világkonferencia, 1998), Londonban és New Yorkban számolt be. Ezen eredményeit részben a British Museum: Metallurgy in Numismatics (1998) és Kaba Melinda: Aquincumi Orgona (3) publikálta.



Göncz Árpád Köztársasági Elnök látogatása a Veszprémi Egyetem Analitikai Kémia Tanszékén (Gegus Ernő meghívására) 1992.

Kiváló nyelv- és szaktudása révén (orosz, angol, német, francia) több, idegen nyelven megjelent, alapvető műszaki és kémiai szakkönyv magyar nyelvű fordításában, mint szerkesztő működött közre:

Perry: Vegyész mérnökök kézikönyve I-II. Műszaki Kiadó, 1964.

Römpp: Vegyészeti Lexikon, Műszaki Kiadó, 1985.

Különleges érdemei voltak a szinképelemzés hazai elterjesztésének és a hazai kutatások elősegítésében. A GTE és az MKE keretében végzett tudományszervezői munkássága mellett egyik főszervezője volt az évenként megrendezett Olasz-Magyar Spektroszkópiai Szimpóziumoknak, a CSI (Colloquium Spectroscopicum Internationale) és CANAS (Conference of Analytical Spectroscopy) rendezvényeknek.

Alapító tagja volt a GTE Szinképelemző Szakbizottságának, Elnökségi tagja a MKE Spektrokémiai Társaságának, tagja a MTA Analitikai Kémiai Szakbizottságának, a Nemzetközi Etalon Bizottságnak, a Canadian Journal of Spectroscopy és az ICP Newsletter szerkesztő bizottságának.



Veszprémi Egyetem, Analitikai Kémia Tanszék 1992.



Archeometriai Világkonferencia megnyitó fogadása a Nemzeti Múzeumban 1998.

Több mint 50 éven át volt a Pasaréti Református Egyház aktív presbitere.

A Veszprémi Egyetemen széleskörű, fáradhatatlan tudományos, oktatói, közéleti tevékenysége, a közösség iránti elkötelezettsége, mások szolgálata és segítése mellett több diplomadolgozat és doktori téma vezetője volt, kandidátusi disszertációk szakmai segítsége jellemezte emberségét. 80. születésnapjáról a Magyar Kémiai Folyóirat különszámában emlékezett meg. (Cikkgyűjtemény)

Kitüntetései: Kiváló feltaláló (1973), GTE Egyesületi Érem (1978), Munka Érdemrend ezüst fokozata (1981), Pattantyús Ábrahám-díj (1988), Török Tibor-emlékérem (2002), Náray Szabó István-díj (2004).

A hadifogság, munkatábor, börtön és pályájának törései után 1989-ben megszerezte az MTA kémiai tudomány doktori címet, 1998-ban a Veszprémi Egyetem címzetes egyetemi tanára lett, s megkapta a gyémántdiplomát is.

Életének, munkásságának, tevékenységének emlékeit őrzik írásai és alkotásai.