

Szokatlan bázicitású amfoter molekulák mikrospeciációja

Doktori értekezés

Kóczyán Kristóf

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Noszál Béla, egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Ungvárainé Dr. Nagy Zsuzsanna egyetemi docens, Ph.D.

Pápayné Dr. Sár Cecília egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vincze Zoltán egyetemi tanár, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Perjési Pál egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Idei Miklós, D.Sc.

Budapest
2007

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
1.1. A protonáltsági állapot jelentősége fiziológiai és gyógyszerterápiás rendszerekben	4
1.2. Protonálódási makroállandók és meghatározásuk	5
1.2.1. A protonálódási makroállandók definíciója és alkalmazhatósága	5
1.2.2. Protonálódási makroállandók meghatározási lehetőségei.....	6
1.2.2.1. Protonálódási állandó meghatározás potenciometriával	7
1.2.2.2. Protonálódási állandó meghatározás UV-pH titrálással	9
1.2.2.3. Protonálódási állandó meghatározás NMR-pH titrálással	11
1.3. Protonálódási mikroállandók és meghatározásuk.....	14
1.3.1. A protonálódási mikroállandók definíciója és alkalmazásai.....	14
1.3.2. Protonálódási mikroállandók meghatározási lehetőségei	17
1.3.2.1. Mikroállandó meghatározás UV-pH titrálással.....	18
1.3.2.2. Mikroállandó meghatározás NMR-pH titrálással	19
1.3.2.3. Mikroállandó meghatározás deduktív módszerekkel	21
1.4. A tenoxikám hatástani és kémiai tulajdonságainak áttekintése	22
1.4.1. Az oxikám család vegyületei	22
1.4.2. Az oxikámok hatásmechanizmusa	23
1.4.3. Az oxikámok gyógyászati felhasználása.....	25
1.4.4. A COX izoenzimek és szerepük	26
1.4.5. A tenoxikám szerkezete és protonálódási sajátságai.....	30
1.5. Béta-laktám antibiotikum alapvázak irodalmának áttekintése	32
1.5.1. Béta-laktám antibiotikumok hatásmechanizmusa.....	32
1.5.2. Béta-laktám antibiotikumok szerkezete és szintézise	33
1.5.3. Béta-laktám alapvázak labilitása.....	35
1.5.4. Béta-laktám alapvázak protonálódási sajátságai.....	35
2. Célkítűzések	37
3. Anyagok és módszerek.....	38
3.1. Vizsgált vegyületek, felhasznált reagensek	38
3.2. A szintetizált termékek szerkezetének bizonyítása.....	39

3.3. Az állandó ionerősség biztosítása a titrálások során.....	39
3.4. Potenciometriás és UV-pH titrálások	40
3.5. NMR-pH titrálások	42
4. Eredmények és megbeszélés	44
4.1. A tenoxicám mikrospeciációja	44
4.1.1. A tenoxicám k^N mikroállandójának meghatározása.....	44
4.1.2. A tenoxicám k^O mikroállandójának meghatározása.....	46
4.1.2.1. A tenoxicám k^O mikroállandóját modellező vegyületek szintézise.....	47
4.1.2.2. Az ideális modellvegyület definiálása	52
4.1.2.3. A piroxikám szubsztituált fenil-származékainak előállítása	53
4.1.2.4. A piroxikám és tenoxicám analóg szubsztituált fenil-származékainak titrálása	55
4.1.2.5. A piroxikám és tenoxicám analógok állandóinak értelmezése.....	58
4.1.2.6. A tenoxicám összes mikroállandójának kiszámítása.....	60
4.2. A tenoxicám szerkezetének újszerű módosításai	61
4.2.1. Tenoxicám prodrug szerkezetek előállítása.....	61
4.2.2. COX-2 szerkezetű tenoxicám-származékok szintézise	63
4.3. Béta-laktám alapvázak protonálódási sajátságainak vizsgálata.....	66
4.3.1. Béta-laktám alapvázak protonálódási makroállandói	66
4.3.2. A béta-laktám alapmolekulák mikroállandóinak meghatározása	69
4.3.2.1. A béta-laktám alapmolekulák észter-származékainak titrálása.....	70
4.3.2.2. A béta-laktám alapmolekulák protonálódási sajátságainak értelmezése	73
5. Következtetések	75
6. Összefoglalás	77
6.1 Summary.....	78
7. Irodalomjegyzék	79
8. Publikációs jegyzék	96
8.1. Az értekezéshez kapcsolódó publikációk	96
8.2. Az értekezéstől független közlemények	96
9. Köszönetnyilvánítás.....	98

1. Bevezetés

A gyógyszerészi kémia tudományág egyik alapvető feladata, hogy vizsgálja a hatóanyag molekuláris tulajdonságainak a terápiás aktivitásban betöltött szerepét. Ennek értelmében meg kell ismerni a kölcsönható bio- illetve gyógyszer-molekulák fizikai-kémiai sajátosságait, többek között sav-bázis tulajdonságait, vízdoldhatóságát, lipofilitását, kristályszerkezetét, sztereokémiáját. A gyógyszer-molekulák ezen tulajdonságainak összessége befolyásolja a hatóanyag szervezetbeli sorsát, az úgynevezett LADME rendszer egy vagy több elemét (L = Liberation (felszabadulás), A = Absorption (felszívódás), D = Distribution (megoszlás), M = Metabolism (metabolizmus), E = Elimination (kiválasztás)). A gyógyszerkutatás során fontos feladat, hogy megállapítsuk a molekula funkciós csoportjainak szerepét az egyes fizikai-kémiai tulajdonságok kialakításában. Ezek alapján pedig a szerkezet ésszerű változtatásával úgy módosíthatjuk a potenciális gyógyszer-vegyület fizikai-kémiai sajátosságait, hogy az előnyös változást jelentsen a molekula hatásában is (hatékonyság növekedés, mellékhatások gyakoriságának és erősségének csökkenése).

1.1. A protonáltsági állapot jelentősége fiziológiai és gyógyszerterápiás rendszerekben

A bio- és gyógyszer-molekulák protonakceptor és -donor képessége a biológiai rendszerek működésének és terápiás befolyásolásának igen fontos tényezője. A molekula protonáltsági állapota befolyásolja a szervezetbeli sorsának minden fázisát: a testnedvekben való oldódást, a membránokon keresztüli penetrációt, a plazmafehérjékhez való kötődést [1], az enzimátikus vagy anélküli átalakításokat, a receptorkötődést és a metabolizmust. A protonálódási állandók ismeretében kiszámítható, hogy a szervezet egy adott kompartmentjének kémhatásán milyen arányban találhatók meg a vegyület különböző mértékben protonált, így eltérő mértékben vagy módon töltött formái.

In vitro kémiai reakciók és analitikai eljárások tervezésekor is fontos, hogy ismerjük a molekula átlagos protonáltsági állapotát. Például, idő- és költségtakarékos megoldást nyújt az elválasztás-technika legnagyobb teljesítőképességű ágában, a

kapilláris elektroforézisben az elválasztás alapját képező mobilitás különbségek számítása, melyek pH-függése a protonálódási állandók ismeretében meghatározható [2]. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiában, a ma talán legelterjedtebben alkalmazott szeparációs technikában is számos esetben elengedhetetlen az elválasztandó vegyületek protonálódási sajátságainak előzetes ismerete. Egyes elméletek szerint ugyanis a mozgófázis pH-ját a minta komponenseinek függvényében úgy célszerű beállítani, hogy a vegyületek azonos protonáltsági állapotban legyenek, így a hasonló komponensek retenciójának különbségét ténylegesen az eltérő szerkezetükből adódó különböző mozgó/állófázis megoszlási hányados okozza [3].

1.2. Protonálódási makroállandók és meghatározásuk

Egy 78 kg-os átlagos felépítésű emberi szervezet mintegy 50 l vizet tartalmaz. 20 mg, 200 Dalton molekulatömegű gyógyszer bevétele esetén – egyenlő megoszlást feltételezve – 2×10^{-6} mól/dm³ híg oldat keletkezik a szervezetben a gyógyszerhatóanyagra nézve. Jogosan alkalmazhatjuk tehát ilyen rendszerekben is a híg oldatok törvényeit, így protonálódási egyensúlyok leírásakor a Brönsted-Lowry sav-bázis elméletet, mely savként definiálja a proton leadására képes vegyületet, míg bázisnak tekinti a proton felvételére alkalmasat. A sav protonvesztéssel az ő konjugált bázisává alakul át, míg egy bázis proton felvétellel a konjugált savvá.

1.2.1. A protonálódási makroállandók definíciója és alkalmazhatósága

Egyetlen protonálható csoporttal rendelkező molekula esetén a sav-bázis tulajdonságokat egyértelműen jellemzi a protonálódási makroállandó. Táblázatokban ennek tízes alapú logaritmusát, a $\log K$ értéket tüntetik fel, aminek számértéke ebben az esetben megegyezik a protonált forma savi disszociációs állandójának negatív tízes alapú logaritmusával (pK_a vagy pK_s).

Többcsoportos molekulák esetén a sav-bázis csoportok számával megegyező lépcsőzetes protonálódási makroállandó definiálható, valamint ilyen esetben a kumulatív protonálódási állandókat is célszerű megadni (β_i). Az előbbieket szemléltetéséhez vegyünk egy két proton felvételére képes, legbázikusabb formájában

egy negatív töltést tartalmazó molekulát (B^-), ahol lépésenként felírhatjuk a protonálódási egyensúlyokat az (1)-es és (2)-es egyenletek szerint, valamint a lépcsőzetes protonálódási makroállandók (K_i) és kumulatív protonálódási állandók (β_i) közti összefüggéseket ((3)-as és (4)-es egyenletek):



$$\beta_1 = K_1 \quad (3) \quad \beta_2 = K_1 \cdot K_2 = \frac{[H_2B^+]}{[B^-][H^+]^2} \quad (4)$$

Többcsoportos molekula esetén (n = csoportok száma) a protonálódási makroállandók logaritmusa ($\log K_i$), valamint a konjugált savak disszociációs állandójának negatív logaritmusa (pK_{aj}) számértékileg ugyan megegyezik, azonban az indexelés ellentétes sorrendben történik (pl.: $n = 2$ esetén $\log K_1 = pK_{a2}$, $\log K_2 = pK_{a1}$). Dolgozatom során a sav-bázis tulajdonságok leírásához konzekvensen a $\log K$ értéket használom, mivel egységesen az asszociáció irányából vizsgáljuk a sav-bázis egyensúlyokat. Nagy stabilitási-állandó gyűjteményekben szintén általános a $\log K$ kifejezés használata (pl.: [4]-[5]).

Egy vegyület makroszkopikus protonálódási állandóit ismerve kiszámíthatjuk, hogy egy adott pH értéknél a molekulán átlagosan hány proton tartózkodik, valamint a molekula izoelektromos pontját és a különböző mértékben protonált részecskék pH-függő koncentrációját is megadhatjuk.

1.2.2. Protonálódási makroállandók meghatározási lehetőségei

Protonálódási makroegyensúlyok óriási sokaságát (valószínűleg százazreit) jellemezték az elmúlt 60 évben, melyek táblázatos gyűjtemények köteteit töltik meg [4]-[7].

A protonálódási állandók meghatározási lehetőségeinek irodalma rendkívül kiterjedt [[8]-[13]], ezért dolgozatomban csak az alapelveket és azokat a módszereket mutatom be, melyeket vizsgálataink során használtunk.

Az előbbi kétszoportos bázis oldatára igaz:

$$C_B = [B^-] + [HB] + [H_2B^+] \quad (5)$$

$$C_H = [H^+] + [HB] + 2[H_2B^+] \quad (6)$$

ahol C_B és C_H a teljes bázis, illetve proton koncentráció. Az előbbi anyagmérleg-egyenletek jobb oldalai kifejezhetők kizárólag a $[H^+]$ és $[B^-]$ segítségével is:

$$C_B = [B^-](1 + \beta_1[H^+] + \beta_2[H^+]^2) \quad (7)$$

$$C_H = [H^+] + [B^-](\beta_1[H^+] + 2\beta_2[H^+]^2) \quad (8)$$

Mivel C_B és C_H ismert analitikai koncentrációk, a $[H^+]$ -t pedig pH méréssel meghatározhatjuk, megfelelő matematikai módszerrel a makroállandók meghatározhatók úgy, hogy minimum a csoportok számával megegyező különböző pH értéken kell vizsgáldnunk. A gyakorlatban számos, a csoportok számánál jóval több pH értéken mérünk annak érdekében, hogy a makroállandókra számított értékünk hibáját minimalizáljuk.

1.2.2.1. Protonálódási állandó meghatározás potenciometriával

A legszélesebb körben alkalmazott, viszonylag egyszerű módszer a protonálódási állandók meghatározására a potenciometriás titrálás, mely manapság a nagyfokú automatizálási lehetőségek miatt rendkívül időtakarékosnak tekinthető. Direkt titrálásnál a vizsgálandó vegyület vizes oldatát közvetlenül titráljuk a mérőoldattal, és a mérőoldat-fogyás függvényében vizsgáljuk a kombinált üvegelektrod elektromos jelét [14]. A 100 %-os titrálási értéket a görbe inflexiós pontjához, vagy annak első deriváltjának maximumához, vagy a második derivált előjelváltásához tartozó fogyás jelzi. Az elektródot előzetesen több pufferoldat segítségével kalibráljuk, így a cella leolvasott elektromotoros erejéhez tartozó feszültségekhez pH értékeket rendelhetünk. Az 50 %-os titráláshoz tartozó pH érték a Henderson-Hasselbach egyenlet (9) értelmében megadja a $\log K$ értékét, ugyanis ekkor a [savas forma] = [bázikus forma] egyenlőség fennáll.

$$\log K = \text{pH} + \log\left(\frac{[\text{savas forma}]}{[\text{bázikus forma}]}\right) \quad (9)$$

30 - 70 % közötti titrálási pontokból kapott $\log K$ értékek átlagát tekinthetjük a legpontosabb protonálódási állandónak. A módszer gyors, hiszen egyetlen titrálást igényel, viszont a szennyezések és az oldat CO_2 tartalma hibát okozhat. Az utóbbi

kiküszöbölésére megoldás a frissen kiforralt víz használata, valamint inert gáz (általában N₂) alkalmazása a mérőcella felett.

A direkt módszernél említett hibákat kiküszöbölhetjük az úgynevezett különbség-titrálásos eljárással. Ebben az esetben két titrálást végzünk: az elsőben adott mennyiségű erős savat titrálunk erős lúg mérőoldattal, majd a másodikban az első titrálással azonos mennyiségű savhoz hozzáadjuk a mérendő mintánkat, és ezt az oldatot titráljuk erős lúg mérőoldattal. A két titrálási görbe különbségéből számítjuk a protonálódási állandó értékét a \bar{H} átlag (\bar{H} , a molekuláról az adott pH-n átlagosan leadott protonok száma) meghatározásán keresztül. Bizonyos pH felett a két titrálási görbe lefutása párhuzamos, ott ugyanis a vizsgált molekula már az összes protonját leadta. Egyértékű savnál ekkor $\bar{H} = 1$, kétértékűnél $\bar{H} = 2$, stb. \bar{H} értékét felírhatjuk a protonálódási állandók segítségével is, egycsoportos molekula esetén:

$$\bar{H} = \frac{1}{1 + K[H^+]} \quad (10)$$

Kétcsoportos molekula esetén:

$$\bar{H} = \frac{2 + K_1[H^+]}{1 + K[H^+] + K_1K_2[H^+]^2} \quad (11)$$

Csoportonkénti 30 - 70 %-os titrálásnál ($\bar{H} = 0,3 - 0,7$, illetve $\bar{H} = 1,3 - 1,7$) a pH leolvasásával a protonálódási állandók számolhatók (pl.: $\bar{H} = 0,5$ -nél ott kell leolvasni a pH-t a titrálási görbéről, ahol a maximális távolság fele (egycsoportos molekulánál), negyede (kétcsoportos molekulánál) a két görbe közötti távolság).

Nagyfokú automatizálással az automata titrátorok egy része az előbbi számításokat a mérés során elvégzi.

A potenciometriás mérés hátránya, hogy az üvegelektrod pH = 2 - 12 mérési tartományban a legpontosabb, így az erősen savas ($\log K_i < 2$), illetve erősen bázikus funkciós csoportok ($\log K_i > 12$) meghatározása során a mérés pontatlansága növekszik az elektród nem-Nernsti viselkedésének következményeként és a titrálási görbepár közel vízszintes szakaszaiban történő kivonások elkerülhetetlenül nagy bizonytalanságának eredményeként. A gyakorlatban kívánatos, hogy a $\log K_i \pm 1$ pH tartomány proton koncentrációját mérni tudjuk, ami tovább csökkenti a meghatározható protonálódási állandók körét ($3 < \log K_i < 11$), különben az elektród által a pH mérésben

elkövetett viszonylag szerény hiba is jelentős hibát okoz a kapott protonálódási állandóban [15]. Emellett a mérendő vegyület oldhatósága is gátat szabhat a potenciometria alkalmazásának, ugyanis a titrálandó molekula koncentrációjának minden egyes nagyságrenddel való csökkenése egy nagyságrenddel csökkenti a potenciálugrást, ami a szórásban egy nagyságrendnyi növekedést okoz. Ezért kívánatos, hogy a mérendő anyag koncentrációja minimum 10^{-3} mol/dm³ legyen.

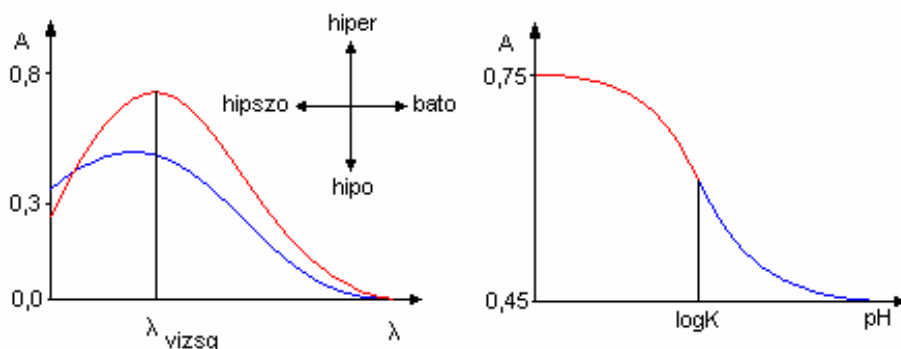
További problémát vet fel az oldatban esetleg jelenlévő, a sav-bázis egyensúlyokban részt vevő szennyezések, bomlástermékek hatása, melyek elvileg bizonyosan meghamisítják a fő komponensre számított eredményeket [16].

1.2.2.2. Protonálódási állandó meghatározás UV-pH titrálással

Az UV-pH titrálás a potenciometriánál érzékenyebb módszer a protonálódási állandók meghatározására [17]. Olyan vegyületeknél alkalmazható, melyek jelentős UV aktivitással bírnak, és a protonálható csoport része a kromofór csoportnak (pl.: fenolát, aromás gyűrű melletti karboxilát, heteroaromás gyűrű N-je, stb.). Az UV tartományban jól elnyelő csoportok általában többszörös kötéssel rendelkeznek (pl.: C=C, C≡C, C≡N, C=O, aromás gyűrű, stb.) és több ilyen csoport konjugációban van egymással. Minél kiterjedtebb a konjugáció, annál magasabb hullámhossznál van a molekula fényelnyelésének maximuma [18].

Az UV-pH titrálás során a mérendő vegyület oldatának fényelnyelését vizsgáljuk a pH függvényében adott hullámhossz(ak)on. A titrálandó anyag koncentrációját úgy kell megválasztanunk, hogy az oldat elnyelése a releváns hullámhossz tartományban 0,3 - 0,8 közé essen. Protonálódás hatására az UV spektrum hiper- vagy hipo-, bato- vagy hipszokróm eltolódást szenvedhet, többnyire a konjugáció változásának függvényében. A kiértékelés azon a hullámhosszon lesz legpontosabb, ahol legnagyobb az Y irányú (hiper-, illetve hipokróm) eltolódás a protonálódás hatására. Az előbbi szemléltetéséhez vegyünk egy egycsoportos molekulát, mely lúgos oldatának spektruma (1. ábra, kék görbe) savanyítás hatására (a molekula protonálódik) hiper- és batokróm eltolódást szenved (piros görbe). Továbbiakban annál a hullámhossznál vizsgálódunk, ahol a két görbe közti függőleges távolság a legnagyobb (λ_{vizsg}). Ezen a hullámhosszon a kb. 0,3 pH egységként felvett elnyelésértékeket a pH függvényében ábrázolva szigmoid

görbéhez jutunk, melynek inflexiós pontja jelöli ki a vizsgált molekula protonálódási makroállandójának logaritmusát.



1. ábra: Az UV-pH titrálás szemléltetése

Többs csoportos molekula esetén, ha mindegyik csoport protonálódása befolyásolja a vegyület fényelnyelését és a protonálódás nem átfedő, akkor a csoportok számával megegyező inflexiós pont jelentkezik a görbén, amelyek kijelölik a $\log K_i$ számértékeit.

Jelentős konjugációval rendelkező molekula esetén jellegzetesen 10^{-5} mól/dm³ töménységű oldat elégséges a méréshez, mely mintegy két nagyságrenddel kisebb, mint ami potenciometriához szükséges, ezért jóval kisebb oldhatóságú molekulák is vizsgálhatók. A pH mérés hasonlóképpen történik, mint a pH-potenciometria esetén, így a mérhető protonálódási állandóra vonatkozó, az üvegelektrod savi ill. bázikus hibájából adódó korlát megegyezik az előbbi fejezetben ismertetettel.

Gyakorlati szempontból nehézséget jelenthet a titrálás során az abszorbancia lineáris függése a koncentrációtól (Lambert-Beer-törvény), ugyanis a pH beállítás során az oldat koncentrációját konstans értéken kell tartani, vagy a hígulást figyelembe kell venni. Az előbbi eset megvalósítására alkalmas módszer, hogy készítünk azonos koncentrációjú savas és bázikus oldatot, és a kettő különböző mértékű elegyítésével állítunk elő eltérő pH-jú oldatokat. Nem pufferolt (pufferoldatokra érzékeny) oldatok esetén) további pontatlanságot eredményezhet a pH mérés és az abszorbancia felvétel közötti időkülönbség (pl.: a kvarcküvetében semleges pH környékén pontos pH-ra beállított oldatból kivesszük a mérőelektrodot, lefedjük a küvetát, behelyezzük egy nem-diódasoros UV spektrofotométerbe, ahol a megfelelő minőségű spektrum felvétele 200 - 440 nm között 60 nm / perc sebesség mellett 4 percig tart; ez idő alatt jó eséllyel

változik a pH érték akár néhány tizedet is). Elképzelhető olyan kivitelezés is, ahol pufferrendszerekkel állítjuk be azonos mintarészletek felett a pH-t, azonban ilyenkor pl. két csoport vizsgálata esetén szükséges minimum 15 eltérő pH-jú oldat elkészítése időigényes eljárás, bár kétségtelen előnye, hogy ebben az esetben a pH értéket stabilan tudjuk tartani a mérés során.

Leggyorsabban (és egyszerű esetekben megfelelő pontossággal) olyan automata titrátorok segítségével jutunk protonálódási állandókhoz, amelyek a titrátor cellában képesek a pH pontos beállítására és egyben a vizsgált vegyület teljes UV spektrumának pillanatszerű felvételére, majd a kiértékelés során számos hullámhosszon vizsgálják az elnyelés pH függését [19].

1.2.2.3. Protonálódási állandó meghatározás NMR-pH titrálással

NMR-pH titrálás segítségével is meghatározhatók protonálódási állandók. Ekkor a protonálódásban részt vevő csoport(ok) közelében lévő NMR magok kémiai eltolódását vizsgáljuk a pH függvényében. ^1H NMR esetén minél közelebb van a protonálódás helyéhez az adott szénkötésű proton, annál jobban változik kémiai környezete a protonfelvétel következtében, tehát annál jelentősebb a kémiai eltolódás változása. A nagyobb ugrás a titrálási görbén – az előzőekben bemutatott módszerekkel analóg módon – pontosabb eredményekhez vezet. Az eredmények szórása tovább csökkenthető, ha a lehető legtöbb mag kémiai eltolódásának pH függését együttesen vesszük számításba. Az utóbbi eset számítógépes kiértékeléséhez alkalmazható pl. az Opium szoftver [20]-[21], melyet tetszőleges számú mag véges nagy számú mérési pontjának együttes, nem-lineáris görbeillesztésére fejlesztettek ki.

A mágnesek térerejének növekedésével, a modern 1D/2D NMR technikák által a kémiai eltolódások precízen mérhető mennyiséggé váltak [22]-[23], így a számolt $\log K$ pontosságát egyre inkább a pH-mérés pontossága ($\pm 0,02$) szabja meg [24]. A pH mérés, mint limitáló tényező alapján a következő módszereket különböztethetjük meg:

- Hagyományos egyedi minták módszere: a minta törzsoldatából egyenlő részleteket kivéve kis ($2 < \text{ml}$) edényben keverés közben egyenként beállítjuk a pH-t üvegelektrod mellett, majd egyesével felvesszük az NMR spektrumokat. Így a potenciometriához hasonló pH mérés pontosságát kapunk. Mivel a mintákat egyesével

állítjuk elő, az ionerősséget pontosan szabályozni tudjuk, azonban a módszer nagy hátránya annak munka- és anyagigénye.

- On-line kapcsolt NMR-potenciometriás titrátor: hasonló jó precizitással mérhető a pH egy olyan kapcsolt technika segítségével, ahol egy automata potenciometriás titrátort tefloncső és perisztaltikus pumpa segítségével átfolyó cellás NMR próbafejjrel kötöttek össze, a titráló oldat adagolását és a spektrum(ok) felvételét is automatizálva. A módszer anyagigénye hasonló az előbbihez, azonban jóval gyorsabb titrálás valósítható meg [25].

- Egycsöves technika: a titráló oldatot egy Hamilton-fecskendő segítségével μ l-es részletekben adagoljuk a mintát tartalmazó, egyetlen NMR csőbe, ami rendkívül anyagtakarékos megoldást jelent, és a pH-t mikroelektróddal mérjük a csőben. Mivel adekvát kevertetést nem tudunk megvalósítani, a pH mérés meglehetősen pontatlan. A titráló oldat hozzáadása és a pH mérés a mágnesen kívül történik, bár a mágnesebe épített adagolóról és pH mérőről is beszámoltak már [26].

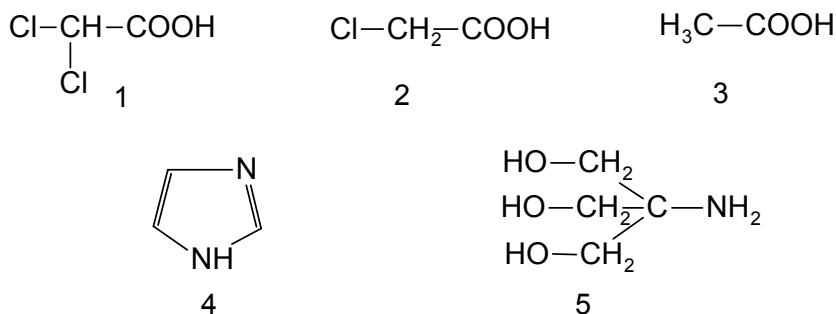
- *In-situ* pH-meghatározás indikátormolekulák segítségével: az előzőeknél pontosabb pH meghatározáshoz vezethet a megfelelő indikátormolekulák alkalmazása, mellyel teljesen kiküszöbölhető az üvegelektrod használata. Indikátormolekulákat pH meghatározáshoz először biológiai mintákban alkalmaztak (*in vivo* pH jelzés) [27]-[29]. Később számos közlemény jelent meg, melyekben ^1H [30]-[33], ^{19}F [34] és ^{13}C [35]-[36] indikátormolekulákról számoltak be. Szakács és mtsai indikátormolekulák egész sorát alkalmazták egy mintában, melyek segítségével szinte az egész pH tartomány ($0 < \text{pH} < 12$) lefedhető [37].

Az indikátor mért kémiai eltolódásából a pH a Henderson-Hasselbach típusú egyenlet (12) segítségével számítható ki:

$$\text{pH} = \log K_{\text{Ind}} + \log \frac{\delta_{\text{Ind}}^{\text{mért}} - \delta_{\text{HInd}}}{\delta_{\text{Ind}} - \delta_{\text{Ind}}^{\text{mért}}} \quad (12)$$

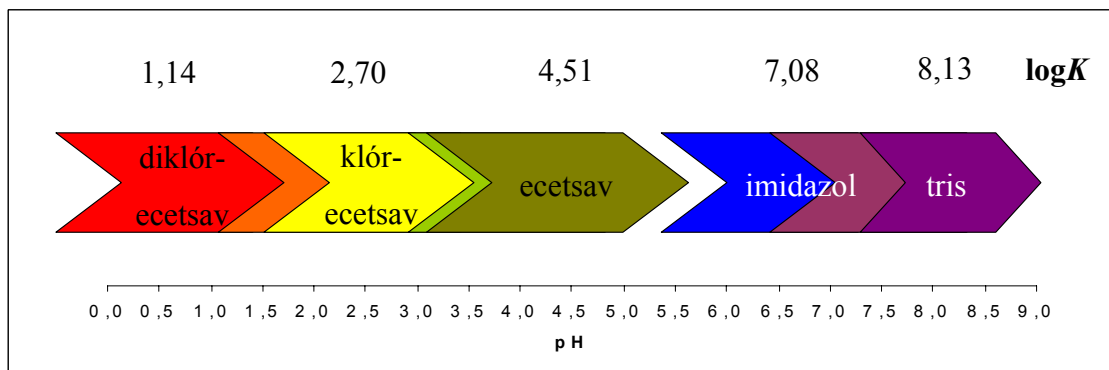
ahol δ_{Ind} és δ_{HInd} határeltolódások, valamint $\log K_{\text{Ind}}$ értékét külön kísérletből pontosan ismernünk kell. Az indikátormolekulákkal szemben támasztott további követelmények, hogy kevés, intenzív és a pH-tól jelentősen függő NMR jellel rendelkezzenek és hogy semmiféle asszociációs vagy egyéb reakcióba ne lépjenek a vizsgálandó vegyülettel. A 2. ábrán látható vegyületek hidrogénjeinek jelei kielégítik az

előbbi kritériumokat, így NMR méréseknél akár egymás jelenlétében is alkalmazhatók a pH jelzésére.



2. ábra: ^1H NMR indikátorok szerkezete: 1: diklórecetsav, 2: klórecetsav, 3: ecetsav, 4: imidazol, 5: TRIS (tris(hidroxiometil)aminometán)

A számított pH pontosságát (hibaterjedésen keresztül) a kémiai eltolódások standard deviációja határozza meg, tapasztalatok szerint a pH a $\log K_{\text{Ind}} \pm 1$ intervallumban számítható ki elfogadható pontossággal [37]. A 2. ábra molekulái segítségével a következőképpen fedhető le a pH tartomány:



3. ábra: Több indikátormolekula együttes alkalmazása a pH jelzésére

Lesznek olyan tartományok, ahol két molekula is pontosan jelzi a pH-t (átmeneti színek), itt a két számított pH átlagát szokás figyelembe venni. Amely pH-n egyetlen molekula $\log K$ értéke sem található 1 egységen belül, ott akkor követünk el kisebb hibát, ha a közelebbi $\log K$ értékű indikátormolekula által jelzett pH-t fogadjuk el helyesnek.

A diklórecetsav előzetes protonálódási állandó meghatározásához – a vegyület erősen savas jellegéből adódóan ($\log K = 1,14$) – egy speciális NMR módszert alkalmaztak [38]. Pontosán ismert HCl, KCl és diklórecetsav koncentrációjú minták pH-ját üvegelektóddal mérték. A $\text{pH} < 2$ értékek torzítatlanságát ($\Delta\text{pH} < 0,1$) számítással is ellenőrizték, a diklórecetsav ezen oldatokban mért ^1H kémiai eltolódásának, valamint a H^+ -ra vonatkozó anyagmérleg kombinálásával. Az anyagmérlegből számított pH segítségével kapták meg a diklóracetát indikátorparamétereit.

Fontos szempont, hogy NMR titrálás esetén a ppm skála kalibrálásához olyan referens anyagot használjunk, mely ionizációs állapotát a vizsgált pH-tartományban nem változtatja meg [39]. Erre alkalmas molekula a 2,2-dimetil-2-szilapentán-5-szulfonát Na^+ sója (DSS), amely csak - 6 alatti „pH-n” protonálódik [40].

Az NMR spektroszkópiás $\log K$ mérés előnyei a potenciometriás és UV-pH titrálásokkal szemben, hogy a vizsgálandó anyag pontos koncentrációját nem szükséges ismernünk, és szennyezők mindaddig nem zavarják, míg a rezonanciajelek hovatartozását (akár 2D technikákkal) egyértelműen el tudjuk dönteni és a szennyezők sem a vizsgált anyaggal sem az indikátormolekulával reakcióba nem lépnek [16]. Az NMR ismert, kisebb érzékenységet technikai újításokkal (növekvő térerő, hűtött mérőfejek) folyamatosan csökkentik a gyártók.

1.3. Protonálódási mikroállandók és meghatározásuk

A makroállandók igen fontos korlátja, hogy a molekula egészét jellemzik, az egyedi funkciós csoportok bázicitásáról azonban nem nyújtanak információt, ami azonban a szerkezetileg (is) kontrollált (patho)biokémiai reakciók megértéséhez elengedhetetlen.

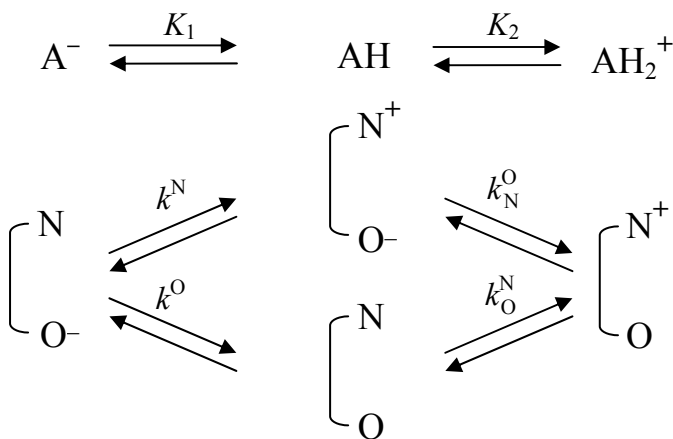
1.3.1. A protonálódási mikroállandók definíciója és alkalmazásai

Ha ismerni szeretnénk részletesen egy többszórtos molekula sav-bázis tulajdonságait, ahhoz a protonálódási makroállandókon kívül szükség van újabb állandók bevezetésére. A mikroállandók (mikroszkopikus protonálódási állandók)

alkalmasak arra, hogy jellemezzék az egyes funkciós csoportok bázicitását a molekula összes többi csoportjának bizonyos, meghatározott protonáltsági állapotában [41]. Más szavakkal a mikroszkopikus modell vizsgálja a felvett proton megoszlását a molekula sav-bázis funkciós csoportjain.

A mikrospeciáció mindazoknak a méréseknek és számolásoknak a folyamatát jelenti, amelyek a molekula összes lehetséges protonálódási mikroállandójának megismeréséhez vezet.

Mivel dolgozatomban biprotikus, (amfoter) molekulákkal foglalkozik, ezért a továbbiakban egy olyan kétcsoportos molekula általános mikrospeciációs sémáját mutatom be, mely legbázikusabb formájában egy negatív töltést tartalmaz:



4. ábra: Kétcsoportos molekula mikrospeciációja

Az anionos forma egy proton felvételével makroszkopikusan semleges részecskévé alakul, ami azonban kétféle protonáltsági izomer formájában valósulhat meg: egy ikerionos és egy töltésmentes mikrorészecskeként, melyek egy további proton felvételével egyaránt a kationos formává alakulnak. Két mikrorészecske közötti protonálódási egyensúlyi folyamatokat az alábbi mikroállandókkal jellemezhetjük:

$$k^N = \frac{[N^+][O^-]}{[N][O^-][H^+]} \quad (13)$$

$$k^O = \frac{[N][O]}{[N][O^-][H^+]} \quad (14)$$

$$k_N^N = \frac{[N^+][O]}{[N][O][H^+]} \quad (15)$$

$$k_N^O = \frac{[N^+][O]}{[N^+][O^-][H^+]} \quad (16)$$

A makro- és mikroállandók közötti összefüggések a két protonálható csoporttal rendelkező molekula esetében a következő egyenletekkel írhatók le:

$$\beta_1 = k^N + k^O \quad (17)$$

$$\beta_2 = k^N k_N^O + k^O k_O^N \quad (18)$$

$$K_2^{-1} = (k_O^N)^{-1} + (k_N^O)^{-1} \quad (19)$$

A (17) - (19)-es egyenletek közül azonban csak kettő független. k^N és k_O^N mikrokonstansok a bázikus karakterű csoport (például amino), míg k^O és k_N^O konstansok a savas jellegű csoport (például fenolos -OH, -COOH) konjugált bázis párjának bázicitására utalnak. A kölcsönhatási paraméter értéke a (20)-as egyenlet szerint az eltérő protonáltságú mikrorészecskék azonos funkciós csoportjának bázicitás különbségét adja meg, vagyis megmutatja, hogy egy másik csoport protonálódásának hatására mennyivel csökken az adott csoport bázicitása. Megjegyezzük, hogy kismolekuláknál szinte mindig bázicitáscsökkenést eredményez a molekula elektronsűrűségének csökkenése. Az igen ritka speciális esetek egyike a fumaráz-L tartarát protonjainak kooperatív kötődése [42].

$$\Delta \log k_{O-N} = \log k^O - \log k_N^O = \log k^N - \log k_O^N \quad (20)$$

Olyan molekulák esetén, ahol a protonálódási makroállandók kis átfedést mutatnak ($\Delta \log K_{1-2} > 3$) és a nagy $\Delta \log K$ nem a nagy kölcsönhatásnak, hanem a funkciós csoportok jelentősen eltérő bázicitásának a következménye, a major protonálódási útvonalhoz tartozó mikroállandók számértéke praktikusán megegyezik a makroállandókéval. Fontos azonban hangsúlyoznunk, hogy csak egyfogú ligandumok esetén létezik teljes egyezés, többcsoportos molekulánál a minor protonálódási út mikrorészecskéi mindig léteznek –legfeljebb kis koncentrációban –, és szerepelhetnek biokémiai és koordinatív folyamatokban [43].

Az azonos számú protont tartalmazó részecskéket protonáltsági izomereknek nevezzük, melyek koncentráció aránya a (13)-as és (14)-es egyenleteket felhasználva látható, hogy független a pH-tól:

$$k_Z = \frac{[O^N]}{[O^+]} = \frac{k^O [O^N] [H^+]}{k^N [O^+]} = \frac{k^O}{k^N} \quad (21)$$

A k_Z konstanst protonizomerizációs [44] vagy tautomerizációs állandónak nevezzük. Ezt a hányadost például a hőmérséklet vagy az oldószer változtatásával módosíthatjuk, pl.: a töltésmentes forma részaránya növekedni fog az ikerionos forma rovására, ha a közeg polaritását csökkentjük.

1.3.2. Protonálódási mikroállandók meghatározási lehetőségei

Ahhoz, hogy a kétcsoportos molekulára vonatkozó (17) - (19)-es összefüggésekben valamennyi paraméter értékét megadhassuk, három független információ ismerete szükséges, ami lehet K , k , β , $\Delta \log k_{O-N}$ vagy k_Z . Leggyakrabban kettő ezek közül az általában pH-potenciometriás technikával meghatározott makroállandó. A harmadik adat meghatározása általában ennél összetettebb feladatnak bizonyul. A meghatározást nehezíti, hogy a protonálódási folyamatok gyors kinetikával játszódnak le, ezáltal a protonáltsági izomerek mindig együtt fordulnak elő az oldatban. Ebből következik, hogy a mikrorészecskék az ismert elválasztástechnikai módszerekkel nem különíthetők el („koegzisztálnak”), összetett analitikai jelet szolgáltatnak, így a protonáltsági izomerek individuális spektroszkópiái és kinetikai jellemzői közvetlenül nem tanulmányozhatók [45]. Tovább nehezíti meghatározásukat, hogy koncentrációarányuk független a pH-tól ((21)-es egyenlet).

A mikroállandó méréséhez leggyakrabban spektroszkópiái titrálási technikák jönnek szóba, ám a megfelelő módszer kiválasztásában elsődleges szempont, hogy annak segítségével valamely csoport protonálódása a molekula egyéb funkciós csoportjaitól elkülönítve, szelektíven legyen mérhető. A molekula spektrális tulajdonságaitól függően UV-pH, NMR-pH és CD-pH titrálás egyaránt szóba jöhet, bár infravörös, Raman és fluoreszcens spektrometriát is találhatunk az irodalomban [46]-[48].

A spektroszkópiás módszerek széleskörű elterjedését megelőzően mikroállandó meghatározáshoz kizárólag a deduktív módszer állt rendelkezésre. Ez lényegében megfelelő modellvegyületek bázicitás adatainak átvitele a vizsgált vegyületre. Még ma is elkerülhetetlen a használata a következő 3 esetben:

A.) Ha a funkciós csoportok bázicitása nagyban eltér, így a minor protonáltsági izomer spektroszkópiás (vagy más analitikai jele) elhanyagolható.

B.) Ha egy proton felvételére alkalmas kötőhely bázicitását nem lehet szelektíven mérni spektroszkópiás módszerekkel, melynek oka a csoportok közelsége vagy jeleiknek átfedése.

C.) Ha a molekula spektruma kezelhetetlenül összetett.

1.3.2.1. Mikroállandó meghatározás UV-pH titrálással

Ha egy protonálható csoport egyben a molekula kromofór része is, a pH-függő UV-látható spektrumsorozatban gyakran találhatunk olyan k hullámhosszt, ahol a fényelnyelést a többi funkciós csoport H^+ felvétele nem befolyásolja. A kromofór csoport protonáltsági foka ekkor a spektrális adatokból a következő képlet szerint számítható ki:

$$\alpha_{(pH)} = \frac{A_{k, (pH)}^{mért} - A_{k,L}}{A_{k,H_nL} - A_{k,L}} \quad (22)$$

ahol $\alpha_{(pH)}$ az adott pH-án a kérdéses csoport protonáltsági móltörtje, $A_{k,L}$ és A_{k,H_nL} a csoport teljesen protonátlan, illetve protonált állapotának megfelelő pH-nál mért abszorbanciaértéke a szelektívnek feltételezett k hullámhosszon. További fontos feltétel a (22)-es egyenlet használhatóságához, hogy az össz ligandum koncentráció azonos legyen a vizsgált pH értékeken. Ezt a módszert elsősorban fenol-, tiol- és aromás aminocsoportok ionizációjának szelektív követésére használják [43],[49]-[50].

A protonáltsági móltört kifejezhető a mikrorészecskék segítségével is. Vegyük azt az esetet, ha a „O” csoport protonálódása eredményez csak spektrumváltozást, ezért erre a csoportra írjuk fel $\alpha_{(pH)}$ -t:

$$\alpha_{O(pH)} = \frac{[O^N] + [O^{N+}]}{[O^N] + [O^N] + [O^{N+}] + [O^{N+}]} \quad (23)$$

A mikrorészecske-koncentrációkat kifejezhetjük a megfelelő állandók segítségével, majd egyszerűsítés után a következő formulához jutunk:

$$\alpha_{O(pH)} = \frac{k^O [H^+] + \beta_2 [H^+]^2}{1 + \beta_1 [H^+] + \beta_2 [H^+]^2} \quad (24)$$

A (24)-es egyenletben csak k^O ismeretlen, hiszen a móltört és a hidrogénion koncentráció kísérleti adatok, míg a protonálódási makroállandók külön pH-

potenciometriás mérésből ismertek. Az ilyen módon meghatározott mikroállandó pontossága nagymértékben függ attól, hogy az a minor vagy a major protonálódási úthoz tartozik-e. Általános érvényű megállapítás, hogy a domináns út egyik állandójának meghatározása pontatlanabb értékhez vezet a minor út mikroállandóinak számításakor, mivel a „főútvonalon” a makro- és mikroállandók közti különbségek kicsik, különbségük kialakításában hibájuk nagy szerepet játszik, mikor az eredményeket a minor útra kiterjesztjük.

Ha a molekula egynél több csoportjának protonálódása is hozzájárul a mért spektrális változáshoz, a szelektív hullámhossz(ak) kiválasztása problematikusává válhat. A mikrorészecskék koncentrációarányának eltolására ekkor az UV-pH titrálást különböző hőmérsékleteken [51] vagy szerves oldószerkomponens jelenlétében [52] hajtják végre. Az így kapott spektrumsorozatból kedvező esetben rekonstruálni lehet az egyes mikrorészecskék egyedi spektrumát.

1.3.2.2. Mikroállandó meghatározás NMR-pH titrálással

Dolgozatomban csak ^1H NMR spektroszkópiás titrálások elvét mutatom be, bár az alapösszefüggések éppúgy igazak a többi NMR aktív mag esetére is. Mivel a hidrogének a molekula „külső peremén” helyezkednek el, a szolvatációs, konformációs vagy aggregációs változásokra is érzékenyebben reagálnak, mint a szénvázban található ^{13}C izotópok. Mindenfajta kémiai mag esetében a cél olyan szelektív mag keresése a molekulán, melynek kémiai eltolódását csak az egyik sav-bázis csoport protonálódása változtatja meg.

Egy spinaktív mag σ árnyékolási tényezőjének diamágneses komponense az elektronok árnyékolási hatását írja le, ezért arányos a mag helyén mérhető elektronsűrűséggel [53]. Az ^1H NMR spektroszkópiában a diamágneses árnyékolás dominál, ezért a szénhez kötött, nem cserélődő hidrogének kémiai eltolódása általában jó indikátora az ionizációval kapcsolatos elektronsűrűség-változásnak [54]. Egy csoport protonálódása alifás vegyületekben maximum négy kötésen keresztül okoz mérhető változást egy hidrogén NMR jelében [55]. Egy k jelű vicinális hidrogén tehát szelektíven jelezheti egy funkciós csoport α protonáltsági fokát, ha öt kötés távolságon

belül nincs további bázikus centrum és a kémiai eltolódást a vizsgált pH-tartományban a protonálódással nem összefüggő, más effektus nem befolyásolja [56]:

$$\alpha_{(\text{pH})} = \frac{\delta_k^{\text{mért}}(\text{pH}) - \delta_{k,L}}{\delta_{k,H_nL} - \delta_{k,L}} = \frac{\Delta\delta_k^{\text{mért}}}{\Delta\delta_k^{\text{max}}} \quad (25)$$

ahol az indexek jelölése a (22)-es egyenletével analóg.

Aromás, illetve kiterjedt konjugációt tartalmazó vegyületek π -elektronrendszere az ionizáció hatását négy kötésnél távolabbi protonokig is közvetítheti [57].

Kismolekulákban gyakori, hogy a funkciós csoportokat kevesebb, mint öt kovalens kötés választja el egymástól, ilyenkor nem lehetséges szelektív NMR magot találni. Jelentős konformációváltozás hiányában egy kétfogú ligandum O és N csoportjának hatása a k -edik spin kémiai eltolódására Sudmeier és Reilly szerint additív [58]:

$$\Delta\delta_k^{\text{mért}} = \delta_k^{\text{mért}} - \delta_{k,L} = C_{k,O}\alpha_O + C_{k,N}\alpha_N \quad (26)$$

ahol $C_{k,O}$ az O csoport teljes protonfelvételének ppm-ben mért hozzájárulása. Értéke egy adott magra – az előzőek alapján – a funkciós csoporttól távolodva általában csökken. Egy csoportszelektívnek tekintett NMR magra egy kivétellel az összes $C_{k,i}$ zérus és visszkapjuk a (25)-ös egyenletet.

A (26)-os egyenletben szereplő α protonáltsági móltörtet mikroállandókkal kifejtve:

$$\Delta\delta_k^{\text{mért}} = \frac{(C_{k,O}k^O + C_{k,N}k^N)[H^+] + (C_{k,O} + C_{k,N})k^Ok^N[H^+]^2}{1 + (k^O + k^N)[H^+] + k^Ok^N[H^+]^2} \quad (27)$$

ahol $C_{k,i}$ és α_i -t meghatározó mikroállandók korrelált paraméterek, ezért egyidejű számításuk a mért NMR-pH adatsor(ok)ból [59] kényszerfeltételek bevezetése nélkül nem megoldható [60]-[61].

Ha a csoportok pH-függő protonáltsági foka független kísérletből (például UV-pH titrálásból) ismert, a C együtthatók lineáris regresszióval kiszámíthatók az NMR titrálási görbékből [62]. Ez azonban a mikroállandók UV-pH meghatározását tenné lehetővé NMR-pH titrálás nélkül. Életszerűbb eset, hogy a C értékek meghatározásához szerkezetileg rokon, de kevesebb donortomot tartalmazó modellvegyületeket alkalmaznak [63]-[64], melyek segítségével egy nagyobb molekula analóg csoportjainak pH-függő protonáltsági fokát számítják ki a (26)-os egyenlettel.

A csoportjárulékok (26)-os egyenlet szerinti additivitása akkor áll fenn, valamint a C együtthatók átvihetősége modellvegyületből csak akkor lehetséges, ha a vizsgált mag kémiai eltolódásának pH-függése csak a protonálódás következménye. Például poliaza-cikloalkánok konformációja H^+ -felvételkor jelentősen megváltozik, ekkor a C együtthatók is pH-függővé válnak [57].

1.3.2.3. Mikroállandó meghatározás deduktív módszerekkel

Ha a korábbiakban részletezett feltételek miatt (lásd: 2.3.2. fejezet) közvetlen spektrális mérések nem szolgáltatnak elegendő információt a mikroállandók meghatározásához, akkor modellvegyületek bázicitásadatainak átvétele segítségével kaphatunk mikroszkopikus protonálódási állandókat. Modellvegyület szintézisekor pedig úgy kell eljárunk, hogy valamely csoport bázicitását úgy szüntessük meg, hogy közben a másik csoport bázicitása ne változzon meg. Kétcsoportos molekula esetén a modellvegyület megmaradt csoportjának makroállandója megegyezik a megfelelő csoport mikroállandójával.

Történetileg Wegscheidertől származik az az elgondolás, hogy a $-COOH$ és $-COOCH_3$ hatása a vegyület egy másik csoportjának bázicitására közel azonos, viszont jelentősen eltér a karboxilátétól, ezért egy dikarbonsav mikroállandói félésztereinak egyszerűbben mérhető makroállandóival közelíthetők [65]. Ebert ezen elv alapján azonosította a glicin minor H_2N-CH_2-COOH mikroformájának aminobázicitását a metilészter aminocsoportjára mért makroállandóval [66]. A karboxilcsoport „imitálására” a metilészteren [67]-[68] kívül használtak még etilésztert [69] és karboxamidot [70], a primer amin modellezésére pedig acetamidocsoportot [71] (további példák találhatóak a [43] könyvfejezetben).

A deduktív módszerek másik csoportja modellvegyületek kölcsönhatási paraméterek átvitelén alapul. Lehetséges olyan megvalósítási formája, amikor egy nagyobb molekula két csoportjának kölcsönhatási tényezőjét egy kisebb modellvegyületben mért értékkel azonosítjuk [72]-[73].

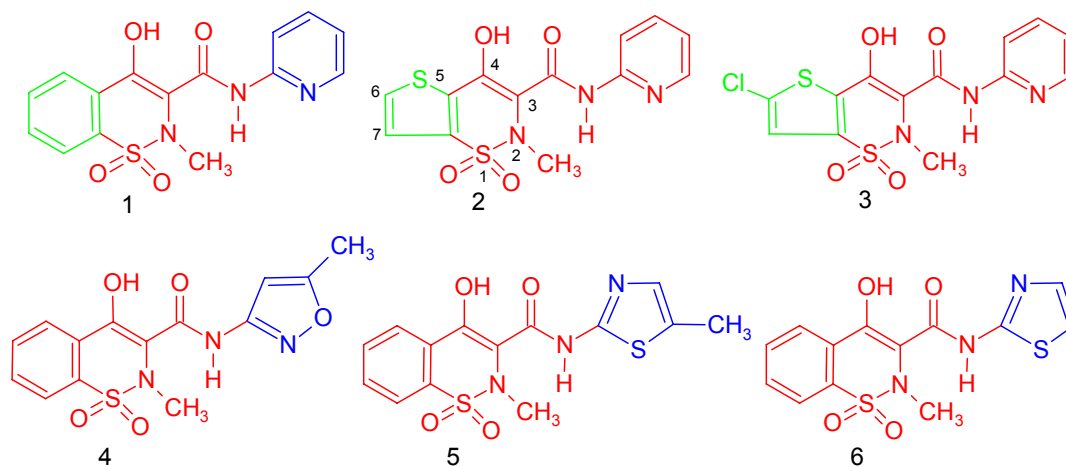
Másrészt olyan speciális esetekben, ha két molekula nagy szerkezeti hasonlóságot mutat, és az egyik molekulának ismertek a protonálódási mikroállandói, akkor a kölcsönhatási paraméter értéke ($\Delta \log k_{O-N}$) átvihető a hasonló molekulára. Így

rendkívül gyorsan, bár kísérletekkel nem alátámasztott módon juthatunk mikroállandókhoz [74]. A kölcsönhatási tényezők jobban átvihetők egy adott vegyületcsalád tagjai között, mint maguk a mikroállandók [75], [46].

1.4. A tenoxicám hatástani és kémiai tulajdonságainak áttekintése

1.4.1. Az oxikám család vegyületei

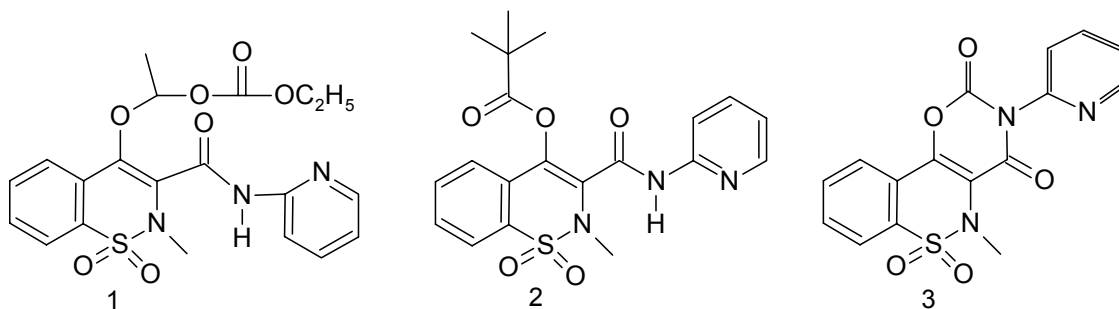
A nem szteroid gyulladásgátló szerek csoportjába tartozó oxikám szerkezetű molekulák első potens gyógyszer-molekulája, a piroxicám kezdeti sikerei után [76] intenzív kutatás indult meg egyéb oxikám-származékok szintézisére [77]-[78]. A „me too” gyógyszerkutatási koncepciót alkalmazva [79] bioizoszter helyettesítésekkel [80] a vegyületcsalád egyre újabb tagokkal bővült [81]. A 4. ábrán a fontosabb oxikám származékok szerkezete látható.



4. ábra: Oxikám szerkezetű molekulák: 1: piroxicám, 2: tenoxicám, 3: lornoxicám, 4: izoxicám, 5: meloxicám, 6: sudoxicám

A piroxicám szerkezetéből kiindulva, benzolcsoportjának tiofénre cserélésekor jutottak a tenoxicámhoz [82], illetve annak 6-klór-származékához, a lornoxicámhoz [83]. Hatásos vegyületekhez jutottak, ha a piroxicám oldalláncában lévő 2-piridil gyűrű helyett izoxazol gyűrű (izoxicám [84], vagy tioazol gyűrű (meloxicám [85] és sudoxicám [86]) szerepel.

A gyógyszerkutatás során megjelentek az oxikámok körében is prodrug szerkezetek, melyek valamilyen éter- (ampiroxikám [87]) vagy észter (pivoxikám [88], droxikám [89]) funkciós csoportot tartalmaznak, és a szervezetbe kerülve metabolikus átalakulások eredményeként szabadul fel belőlük az aktív hatóanyag (5. ábra).

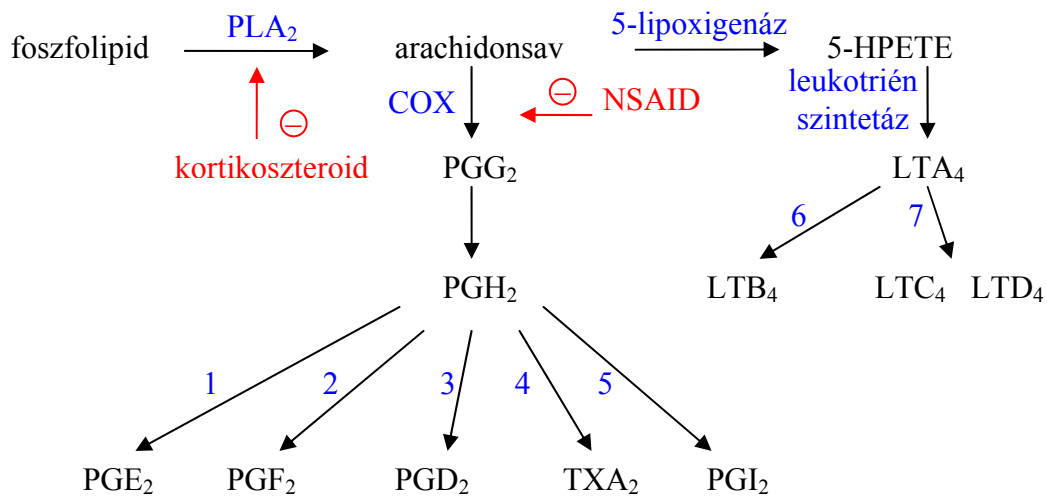


5. ábra: Prodrug szerkezetű oxikámok: 1: ampiroxikám, 2: pivoxikám, 3: droxikám

Az oxikámok körében végezhetünk olyan molekulákat, melyek metilezés hatására állandó kvaterner nitrogént, így + töltést tartalmaznak [90], így célzottabb terápiás lehetőséggel rendelkeznek.

1.4.2. Az oxikámok hatásmechanizmusa

A nem szteroid gyulladásgátlók hatásmechanizmusa viszonylag egységes, és ettől az oxikámok sem különböznek [91]. Láz-, fájdalomcsillapító és gyulladásgátló hármas hatással rendelkeznek, melyek közül az oxikámok esetén a gyulladásgátló hatás dominál. Hatásukat a prosztaglandinok bioszintéziséhez szükséges ciklooxygenáz enzimek gátlásán keresztül fejtik ki (6. ábra).



6. ábra: Gyulladásos mediátorok szintézise (az enzimeket késsel, a gátlószereket pirossal jelöltem). Rövidítések: PG: prosztaciklin; TXA₂: tromboxán; PGI₂: prosztaciklin; 5-HPETE: 5-hidroperoxi-eikozatetraenoiksav; LT: leukotrién; PLA₂: foszfolipáz A₂; COX: ciklooxygenáz; 1: PG endoperoxid E izomeráz; 2: PG endoperoxid reduktáz; 3: glutation-S-transzferáz; 4: TXA szintetáz; 5: prosztaciklin szintetáz; 6: LTA hidroláz; 7: glutation-S-transzferáz; NSAID: nem szteroid gyulladásgátló szerek

A gyulladás során felszabaduló mediátorok csak egy részét tüntettem fel az előbbi ábrán, ám ez elégséges ahhoz, hogy megértsük az oxikámok hatásmachizmusának és egyben fő mellékhatásainak molekuláris szintű eredetét. Ehhez célszerű végigvenni az ábrán szereplő mediátorok élettani hatását:

PGE₂: gyomorsav szekréció gátlás, értágulat, endometrium összehúzódás, bronchus tágulat

PGF₂: bronchus összehúzódás

PGD₂: bronchus összehúzódás

PGI₂: gyomorsav szekréció gátlás

TXA₂: vazokonstriktor, vérlemezke aggregációt kiváltó hatás

PGI₂: vérnyomáscsökkentő, vérlemezke aggregációt gátló hatás endotél sejtekben

LTB₄: kemotaktikus vegyület

LTC₄ + LTD₄ = SRS-A = slow reacting substance of anaphylaxis: vérnyomáscsökkentő, bronchokonstriktor hatás

Összességében az oxikámok a ciklooxygenáz enzim blokkolásával számos gyulladáshoz vezető anyag felszabadulását gátolva fejtik ki hatásukat, azonban olyan prosztaglandinok képződését is gátolják (PGE_2 , PGI_2), melyek fontos szerepet töltenek be a gyomor-bél rendszer ép mukóza rétegének védelmében. Az utóbbi folyamat eredménye a nem szteroid gyulladásgátló szerek fő mellékhatása: gastrointestinális rendszerre kifejtett ulcerogén és vesekárosító hatás, mely súlyosabb esetekben vérzéssel járó fekély kialakulásához vezet [92].

A 6. ábra egyúttal magyarázatot ad a szteroidok és a nem szteroid szerek gyulladásgátló hatásmechanizmusának különbségére. A kortikoszteroidok már az arachidonsav szintézisét is gátolják, így komplexebb módon, a ciklooxygenáz út prosztaglandinjai mellett a lipoxigenáz út leukotriénjeinek felszabadulását is megakadályozzák. Bár az utóbbira egyes újabb nem szteroid gyulladásgátló szerek is képesek [93], a szteroidok még számos egyéb módon fejtik ki gyulladásgátló hatásukat, mellyel egy időben egyéb speciális mellékhatások is megjelennek, mint pl. az immunszuppresszió vagy csonttömeg-vesztés, ami korlátozza tartós alkalmazhatóságukat [94].

1.4.3. Az oxikámok gyógyászati felhasználása

A Pharmindex online verziójának [95] alapján ma Magyarországon piroxikám hatóanyagot tartalmazó készítményből 19 (Feldene – Pfizer, Hotemin – Egis), meloxicámból 15 (Movalis – Boehringer Ingelheim), tenoxicámból 2 (Tilcotil –Teva), végül lornoxicámból 1 (Xefo – Nycomed) van forgalomban. Zárójelben az originalitást, vagy a legismertebb generikumot jelöltem meg a gyártó megjelölésével együtt. Gyógyszerforma tekintetében rendkívül változatos a kép: injekciót, tablettát, filmtablettát, kapszulát, szublingvális kapszulát, végbélkúpot és krémet is találhatunk közöttük.

Az oxikámokat elsődlegesen a mozgásszervek fájdalmas, gyulladáshoz vezető és degeneratív megbetegedéseiben használják. Tüneti kezelésként használatos krónikus poliarthritisben (rheumatoid arthritis), osteoarthritisben, spondylitis ankylopoetikában (morbus Bechterew), lágyrész-rendellenességekben (tendinitis, bursitis, a vállak vagy a csípők peri-arthritis, rándulások, ficamok), köszvényes roham esetén, primer

dismenorrhoeaban. Előfordulhat túlérzékenység a gyógyszerekkel szemben, továbbá azoknak sem adható, akiknél a szalicilátok vagy egyéb nem szteroid gyulladásgátlók asthmás, rhinitises vagy urticariás tüneteket okoznak. A gyomor-bélcsatorna felső szakaszának súlyos megbetegedéseiben (gastritis, gyomor- és nyombélfekély) alkalmazásuk szintén kontraindikált. Tilos továbbá használni olyan betegek altatással járó perioperatív medikációjában, akiknél veseelégtelenség vagy vérékenység áll fenn.

Tenoxicám esetében valamennyi indikációban, a köszvényes arthritis és primer dismenorrhoea kivételével, napi 20 mg (1 tabletta vagy 1 kúp, lehetőleg reggel) adása indokolt. Primer dismenorrhoea esetében a javasolt adag napi egyszeri 20-40 mg, míg köszvényes arthritises rohamokban a javallt adag naponta egyszer 40 mg 2 napig, ezután további 5 napig naponta egyszer 20 mg. A tablettát egy pohár vízzel, lehetőleg étkezés közben vagy közvetlenül étkezés után kell bevenni, ezáltal csökkenthetők a gyógyszer gyomor-bél rendszert irritáló (GIT) mellékhatásai. A terápiás hatás fokozatosan jelentkezik, és két hét után (amikor a plazmaszint eléri az egyensúlyi koncentrációt) a legkifejezettebb. Krónikus megbetegedések esetében a 20 mg-nál nagyobb napi adag kerülendő, mert az a mellékhatások gyakoriságát és erősségét fokozná a hatékonyság lényeges javulása nélkül. Fontos, hogy azoknál a betegeknél, akiknél hosszú távú kezelés szükséges, fenntartó adagként elegendő lehet napi 10 mg (1/2 tabletta) is.

1.4.4. A COX izoenzimek és szerepük

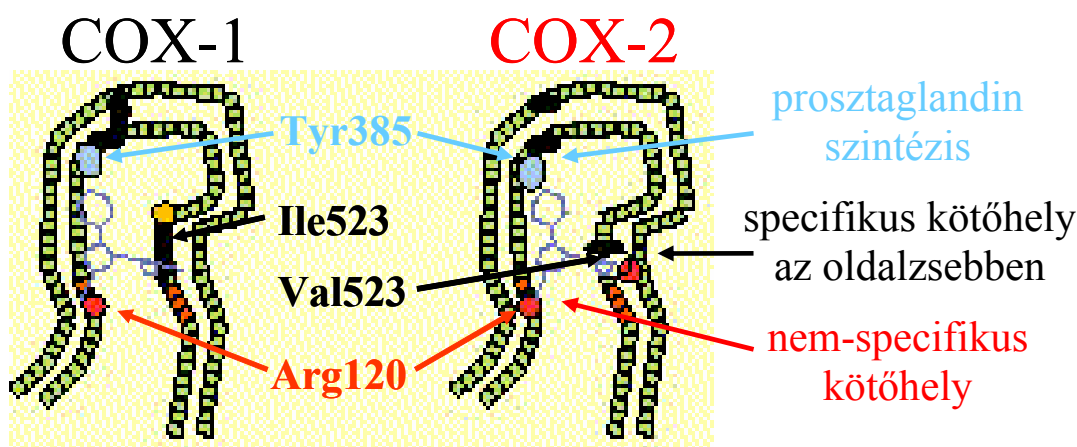
A nem szteroid gyulladásgátló szerek széles körben alkalmazott gyógyszerek. Csak az Egyesült Államokban évi 75 millió orvosi rendelvényt váltanak be valamilyen NSAID szerrel kapcsolatban, és emellett az OTC szerek (over the counter \approx vény nélkül kiadható gyógyszerek) egyik leggyakoribb csoportja [91]. Azonban a páciensek 30 - 40 %-ánál fellép valamilyen gyomor-bél rendszeri mellékhatás, ami végül nem kevesebb mint évi 20000 halálessel és 100000 kórházi kezeléssel hozható összefüggésbe. Az erős gyomorirritáló hatás összetett jelenség: a citoprotektív prosztaglandinok szintézisének gátlásán túl a nem szteroid gyulladásgátló szerek savas karakterének egyenes következménye a GIT irritáló hatásuk. Ez tovább potenciózódhat az úgynevezett ioncsapda jelenséggel, amelynek lényege, hogy a gyomor savas pH-ján

töltésmentes gyógyszermolekulák könnyen bekerülnek a mukóza sejtbe, ahol a jóval magasabb pH-jú intracelluláris folyadékban elvesztik savi hidrogénjüket, így ionizált formában a sejtől való kijutásuk erősen gátolt lesz.

A GIT mellékhatások elkerülése érdekében az egyik lehetséges megoldás a mizoprosztollal való együttlés, ami egy prosztoglandin prodrug vegyület, és a szervezetbe jutva a gyomor mukóza védelmét szolgáló PG-ok felszabadulását eredményezi [96]-[97].

A másik lehetséges megoldás az 1990-es évek egyik meghatározó felfedezésén alapult: a ciklooxygenáz enzim két izoformájának megkülönböztetésén [98]-[99]. A COX-1 izoforma konstitutív enzim, amely a szervezet normál működéséhez szükséges prosztoglandinok szintézisében vesz részt, melyek többek között biztosítják a gyomor-bél rendszer megfelelő védelmét a bázikus gyomor váladék termelésén és a mukóza sejtek véráramlásának növelésén keresztül. A COX-2 izoforma ezzel szemben főleg az erek simaizomsejtjeiben, fibroblasztokban és epiteliás sejtekben van jelen és a gyulladás hatására felszabaduló citokinekkal indukálható [100]-[101]. A COX-2 enzim szelektív gátlásával a gyomor-bél rendszerre kifejtett károsító hatás mérséklésével lehet gyulladásgátló hatást elérni [102].

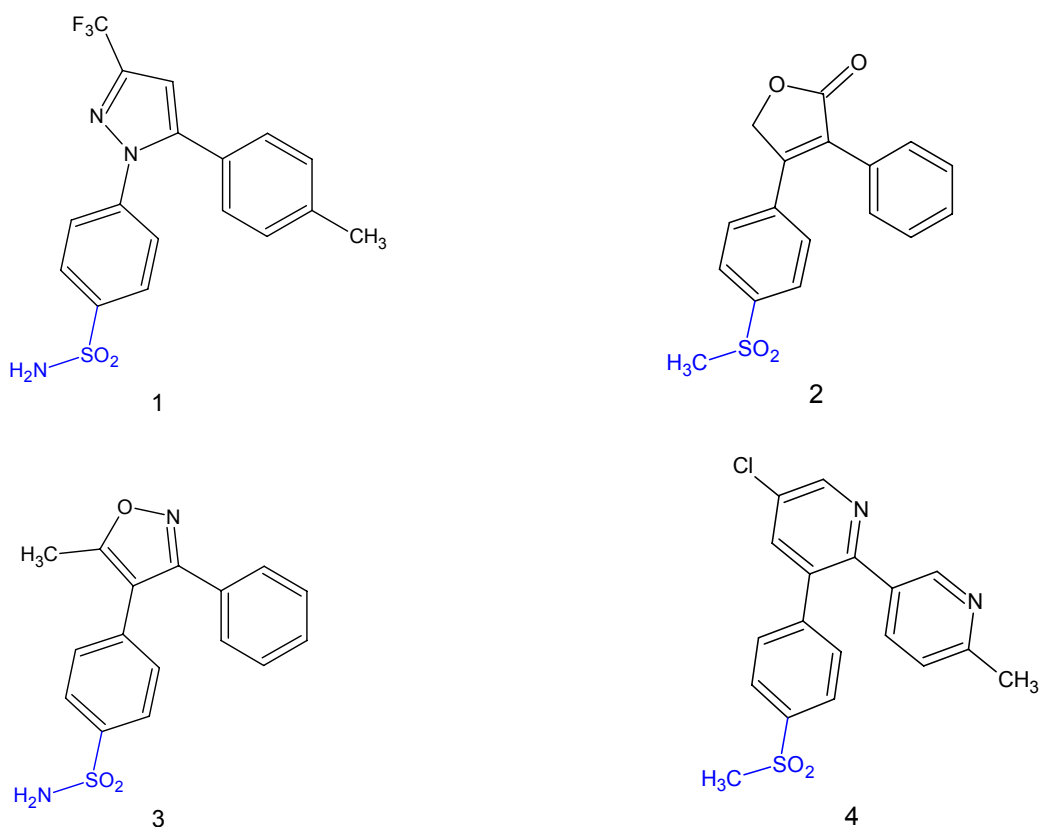
A két COX izoforma jelentősen eltérő fiziológiai funkciója ellenére rendkívül nagy szerkezeti hasonlóságot mutat [103]-[104]. Aktív kötőhelyekben az egy aminosav eltérés elégséges ahhoz, hogy a COX-2 esetében egy oldalszob is részese legyen a szubsztrátkötő centrumnak (7. ábra).



7. ábra: A COX izoenzimek szerkezete

A PG szintézis gátlásához mindkét izoenzim esetén a 385-ös helyzetű tirozinhoz kell az inhibitor molekulának közel kerülnie. Emellett a 120-as argininhez való kötődés is esszenciális a receptor-szubsztrát kötés kialakulásához. Az 523-as pozícióban lévő izoleucin hosszabb oldallánccal rendelkezik a COX-1 izoenzimben, mint a COX-2 523-as valinja, így elzárja a COX-2-ben jelen lévő specifikus oldalzsebet, mint harmadik kötődési pontot. Ennek következményeként léteznek olyan szerkezetű molekulák, melyek oldallánca befér a COX-2 hidrofíl oldalüregébe, ezáltal erősen kötődnek a COX-2 enzimhez, míg ugyanezen molekulák sztérikus okok miatt nem képesek kötődni a COX-1 izoformához.

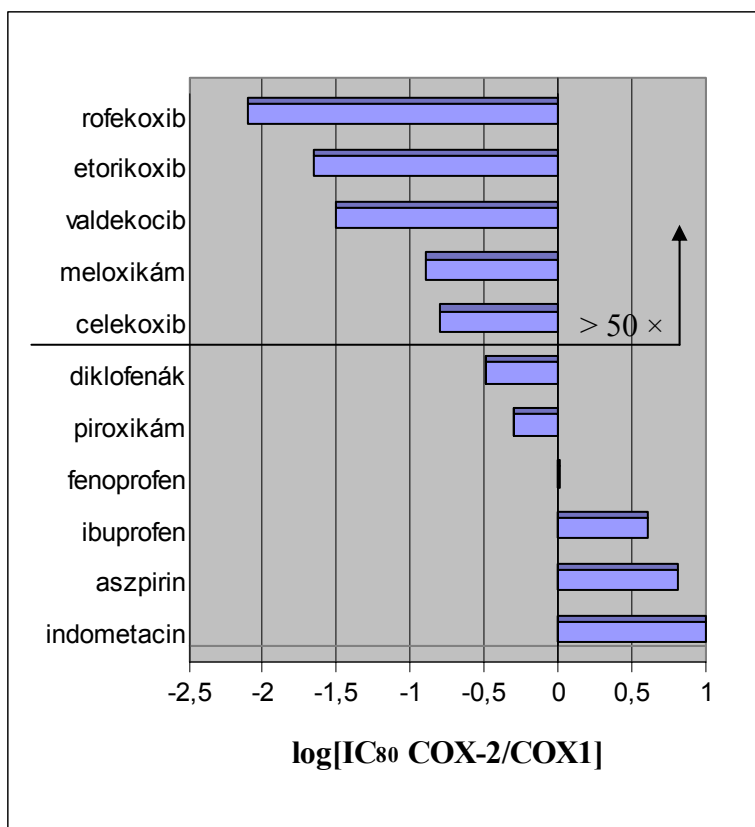
Az izoenzimek szerkezetének és fiziológiai szerepének tisztázása után rendkívül intenzív kutatás indult meg szelektív COX-2 szerek kifejlesztése érdekében, melyeknél a potens fájdalomcsillapító hatás mellett a gyomor-bél rendszeri mellékhatások csökkenését várták [105]-[107]. A szelektív COX-2 inhibitorok fogalma idővel összenőtt az ún. koxib vegyületcsaláddal [8. ábra].



8. ábra: A koxibok szerkezete: 1: celecoxib, 2: rofecoxib, 3: valdecoxib, 4: etoricoxib

Közös vonás az előbbi diaril származékoknál, hogy a hidrofílebb aromás gyűrű létesít specifikus kötést a COX-2 enzim oldalzsebével. A hidrofílszubsztituens a celekoxib [108] és a valdekoxib [109] esetén szulfonamid, míg a rofekoxibnál [110]-[111] és az etorikoxibnál [112] metilszulfonilcsoport.

A COX-2 szelektivitás egyik lehetséges mérőszáma egy vegyületnek a két izoenzimre kifejtett IC_{80} értékeinek hányadosa [113] (9. ábra).



9. ábra: COX-2 szelektivitás a nem szteroid gyulladásgátló szerek körében [113] (IC_{80} : az a farmakon koncentráció, mely az enzim molekulák 80 %-át gátolni képes)

COX-2 enzimre szelektívnek azokat a molekulákat tekinthetjük, melyek $50 \times$ kisebb koncentrációban is legalább annyira képesek gátolni a 2-es izoformát, mint az 1-eset ($\log IC_{80} \text{ COX-2/COX-1} < -0,7$). A 9. ábrán láthatjuk, hogy ebbe a tartományba esnek a koxib molekulacsalád tagjai, valamint az oxikámok közül a meloxicám.

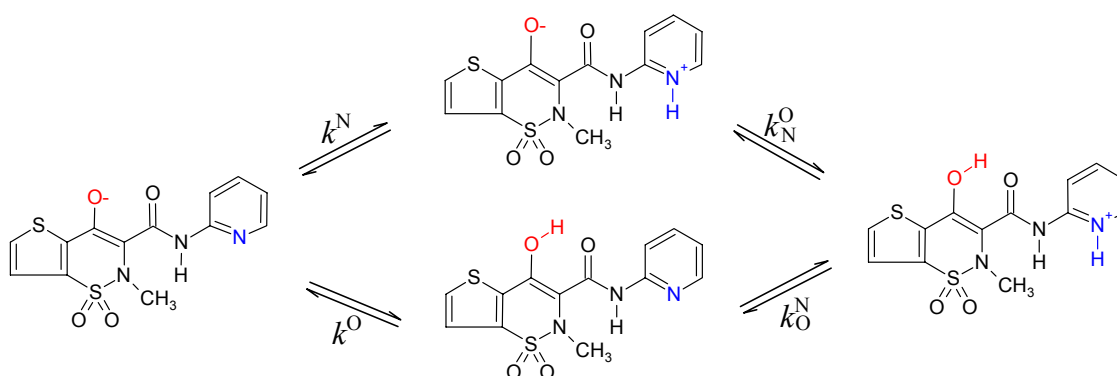
A koxib vegyületek kezdeti sikerei után kiderült, hogy a gyomor-bél rendszeri mellékhatások kisebb gyakorisága mellett egyes speciális körülmények között súlyos kardiovaszkuláris mellékhatásokkal rendelkeznek [114]-[115]. A jövőbeni perek elkerülése érdekében kivonták őket a piacról annak ellenére, hogy blockbuster [116]

státusszal rendelkeztek (piacra lépés után két évvel forgalmuk meghaladta az évi 1 milliárd dollárt) [117]-[118]. Azonban a meloxicám mind a mai napig forgalomban van, és a COX-1 szelektív szereknél kedvezőbb GIT mellékhatásprofil mellett mentes a koxibokra jellemző kedvezőtlen szív-ér rendszeri hatásoktól [119].

Végezetül fontos megemlítenünk, hogy a COX-2 szelektív szerek egyes rákos megbetegedések esetén sejtproliferizáció-gátló hatással rendelkeznek [120]-[121], így a kutatás fő irányvonala is erre terelődött. Bizonyos rosszindulatú daganatok esetén a kockázat-előny gondos orvosi mérlegelése után indokolt felhasználásuk [122].

1.4.5. A tenoxicám szerkezete és protonálódási sajátosságai

A tenoxicám, kémiai nevén 4-hidroxi-2-metil-*N*-(piridin-2-il)-2*H*-tieno[2,3-*e*]-1,2-tiazin-3-karboxamid-1,1-dioxid, fő építőelemei a tieno-tiazin biciklus, mely egyben egy gyűrűbe zárt szulfonamidcsoportot is jelent, valamint egy 2-piridil gyűrű. E két molekularészlet között egy savamid híd teremt meg az összeköttetést. Szerkezetéből eredően a vegyület rossz vízoldékonyságú [123]-[124], fényre érzékeny [125], és kiterjedt konjugációjának következményeként jelentős UV elnyeléssel rendelkezik. A molekula legbázikusabb formája két, proton felvételére képes csoportot tartalmaz: a tieno-tiazin biciklushoz közvetlenül kapcsolódó enolát oxigén és a piridil gyűrű nitrogén atomját. A két csoport négy eltérő protonáltságú részecskét eredményez: anionos, ikerionos, töltésmentes és kationos mikrorészecskét (10. ábra).



10. ábra: A tenoxicám mikrospeciációs sémája

A tenoxikám protonálódási sajátságait különböző kutatócsoportok tanulmányozták [126]-[127], [74]. Zimmermann és mtsai a következő makroállandóértékeket határozták meg (\pm standard deviáció): $\log K_1 = 5,34 \pm 0,06$, $\log K_2 = 1,07 \pm 0,11$. A mérés során UV-pH titrálást használtak, amit a $\text{pH} < 2$ tartományra vonatkozóan bemérésén alapuló pH számítással kombináltak. Mohames és mtsai potenciometriával csak az első protonálódási lépcső állandóját írták le ($\log K_1 = 5,29$). Tsai és mtsai a mikroállandókra is számoltak értékeket a következő megfontolások figyelembe vételével:

- a tenoxikám és a piroxikám, mint rokon molekulák, azonos kölcsönhatási paraméterrel rendelkeznek.

- a piroxikám kölcsönhatási paraméterét a piroxikám mikroállandóin keresztül számolták ki. Az izoxikám ($\log K = 3,93$) és meloxikám ($\log K = 4,08$) (3. ábra), mint egycsoportos molekulák, protonálódási makroállandóit úgy tekintették, mint lehetséges modelleket a piroxikám k^O mikroállandójának meghatározásához. Végül a két előbbi makroállandó logaritmusának átlagával számoltak.

A két közelítést felhasználva a tenoxikám mikroállandói a következőknek adódtak: $\log k^N = 5,34$, $\log k^O = 3,17$, $\log k_N^O = 1,88$, $\log k_O^N = 3,32$.

Néhány évvel később a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet munkatársai részvételével a piroxikám protonálódási sajátságait a klasszikusabb deduktív módszerrel újból megvizsgálták: *O*-metilpiroxikám modellvegyület segítségével határozták meg a $\log k_O^N$ állandót [68]. Az eredmények az 1. táblázatban találhatóak összehasonlítva Tsai és mtsainak piroxikámra vonatkozó eredményeivel.

Mikrokonstans	Tsai és mtsai. [74]	Takács-Novák és mtsai. [68]
$\log k^N$	5,44	5,40
$\log k^O$	ca. 4 ^a	4,60
$\log k_N^O$	1,88	1,92
$\log k_O^N$	3,32	2,72 ^b
^a Az izoxikám és meloxikám $\log K$ -jának átlaga		
^b <i>O</i> -metilpiroxikám modellvegyület segítségével kapott érték		

1. táblázat: A piroxikám mikrospeciációjának irodalmi összefoglalója

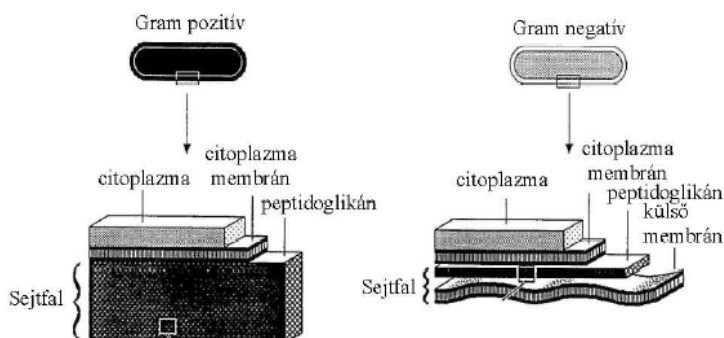
Az adatokat összevetve megállapíthatjuk, hogy a minor protonálódási útvonalhoz tartozó mikroállandók értékei között több mint fél nagyságrend különbség adódott a két megközelítés alapján. Mivel a tenoxikám irodalmi mikroállandóihoz a piroxikám régebbi protonálódási mikroállandóit használták fel, ezért a tenoxikám mikroállandóinak felülvizsgálata szükségessé vált.

1.5. Béta-laktám antibiotikum alapvázak irodalmának áttekintése

Definíció szerint az antibiotikumok kis koncentrációban szelektív toxicitással rendelkeznek a gazdasejtben jelenlévő mikroorganizmusokkal szemben, gátolva azok szaporodását vagy túlélését [128]. E gyógyszercsalád gyakran szükségtelen alkalmazása révén jelentősen növekedett a klasszikus antibiotikumokkal szembeni rezisztens törzsek száma [129]. Az ésszerű felhasználás serkentése mellett intenzív kutatás indult meg a minél szélesebb spektrumú és hatásosabb antibiotikumok szintézise céljából [130]. A béta-laktám antibiotikumok jelentősége többek között abban rejlik, hogy a világ antibiotikum fogyasztásán belül több mint 50 %-ot képviselnek.

1.5.1. Béta-laktám antibiotikumok hatásmechanizmusa

A béta-laktám antibiotikumok a bakteriális sejtfal szintézisének gátlásával fejtik ki hatásukat [131]. Bár a Gram (+) és Gram (-) baktériumok sejtfalszerkezete lényeges eltérést mutat (11. ábra), a béta-laktám molekulák támadáspontja, a peptidoglikán réteg, mindkét esetben megtalálható.



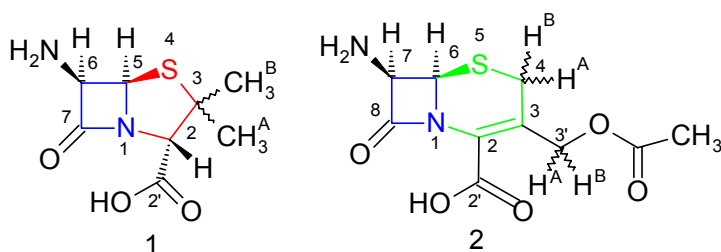
11. ábra: A bakteriális sejtfal felépítése (Forrás: Novák B: Mikrobiális fiziológia)

A peptidoglikán réteg felépítésére jellemző, hogy az *N*-acetilglukózaminból és az *N*-acetilmuraminsavból álló poliszacharid láncok között tetrapeptid hidak létesítenek kapcsolatot, majd egy transzpeptidáz enzim révén újabb peptid hidak segítségével stabil 3 dimenziós szerkezet alakul ki. A béta-laktámok hatásmechanizmusának lényege, hogy hamis szubsztrátként, nagy affinitással kötődnek az előbbi enzimhez, irreverzibilisen gátolva annak további működését. A sejtfal a keresztkötések hiányában meggyengül, képtelen lesz az ozmotikus nyomásnak ellenállni, ami végül a mikroorganizmus líziséhez vezet.

A béta-laktám rezisztenciáért sokszor a béta-laktamáz enzim a felelős [132], mely az antibiotikum hatásának kifejtése előtt képes a béta-laktám gyűrű felnyitásával a molekulát dezaktiválni [133]. Míg a Gram (+) baktériumnál a béta-laktamáz csak a vastag peptidoglikán rétegen kívülre szekretálódik, addig a Gram (-) baktériumok esetén a citoplazma membrán és a peptidoglikán réteg közötti térben felhalmozódhat. Az utóbbi eset sokkal erőteljesebb védekezési lehetőséget jelent a mikroba számára, hiszen a béta-laktamáz folyamatos pótlása nélkül is az enzim lényegesen magasabb koncentrációban jelenik meg az antibiotikum közelében [134].

1.5.2. Béta-laktám antibiotikumok szerkezete és szintézise

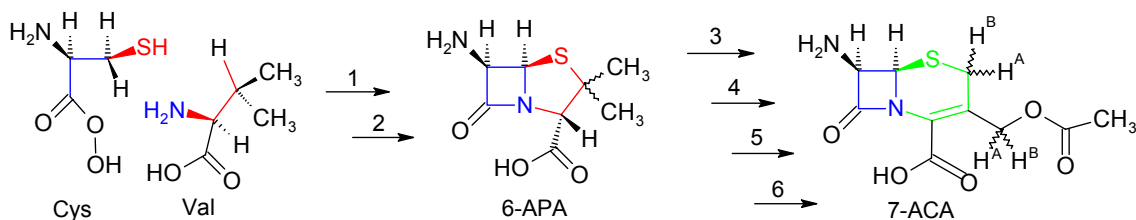
A béta-laktám antibiotikumok mikrobiális metabolitok, azok félszintetikus származékai és újabban totálszintézissel előállított termékek lehetnek [128]. Két legfontosabb csoportjuk a penicillin- és a kefalosporin-származékok, melyek alapvázainak központi eleme a béta-laktám gyűrű (12. ábra).



12. ábra: Béta-laktám antibiotikum alapvázak: 1: 6-aminopenicillánsav, 2: 7-aminokefalosporánsav (béta-laktám, tiazolidin, dihidrotiazin)

A 6-aminopenicillánsav (6-APA) a béta-laktám gyűrű mellett tiazolidin, míg a 7-aminokefalosporánsav dihidrotiazin gyűrűt tartalmaz. A 6-APA és 7-ACA a felszintetikus penicillinek, illetve kefalosporánsav származékok kulcsfontosságú kiindulási vegyületei [135]. Az Alexander Flemming által felfedezett penicillin [136] a *Penicillium chrysogenum* gomba fermentációs termék-keveréke, mely szerkezetiileg a 6-APA alapvegyület 6-aminocsoportjának különféleképpen szubsztituált vegyületeinek elegye [137]. Célzott fermentációval benzilpenicillin (Penicillin G) és fenoximetilpenicillin (Penicillin V) előállítása könnyen lehetséges, ekkor a táptalajhoz feleslegben fenilecetsavat, illetve fenoxiecetsavat adnak.

A béta-laktámok dipeptid származékok, mivel cisztein és valin aminosavak megfelelő összekapcsolásából jönnek létre a fermentáció során a penicillin-szintetáz enzim segítségével [138] (13. ábra).



13. ábra: 6-APA és 7-ACA szintézise aminosavakból (1: cisztein-valin-szintetáz, 2: penicillin-szintetáz, 3: expandáz, 4: dehidrogenáz, 5: hidroxiláz, 6: acil-transzferáz)

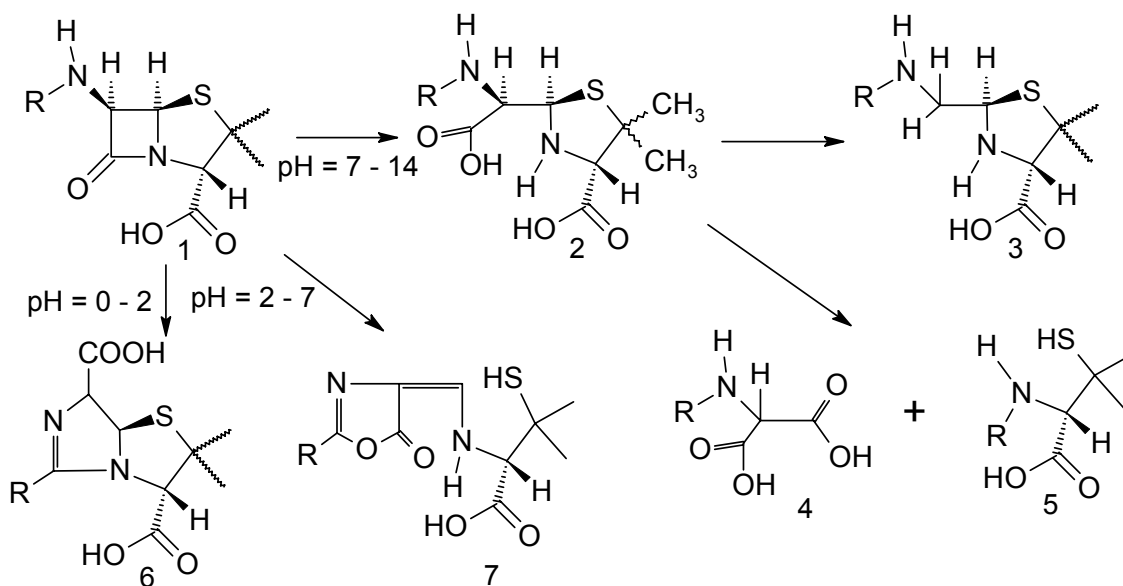
A hatáshoz elengedhetetlen a megfelelő kiralitás fennállása. Az első lépésben a cisztein-valin-szintetáz enzim végzi a valin aminosav konfigurációjának konverzióját.

A vázolt prekurzormentes fermentáció azonban alacsony hozammal eredményez 6-APA-t, ezért korábban kémiai reakciók segítségével hasították le a gomba fermentációs termékek oldalláncait [139]. Újabban megjelentek olyan 6-APA készítési technológiák is, ahol természetes gomba enzimekkel hasítják le a felesleges oldalláncaikat a béta-laktám gyűrű felnyílása nélkül [140]-[142]. 7-ACA-hoz a *Cephalosporium acremoium* által termelt kefalosporin C enzimátikus átalakításával is eljuthatunk [143].

A 6-APA és 7-ACA alapvegyületek biológiai hatása csekély, azonban szintetikus módosítások segítségével a legkülönbözőbb származékokat állították elő, mely során a sav- és béta-laktamáz-rezisztens vonások erősítésére törekedtek az antibiotikus hatás fenntartása mellett [144].

1.5.3. Béta-laktám alapvázak labilitása

A béta-laktám antibiotikumok a béta-laktám molekularészből eredően bomlékonyak. A közeg pH-jának függvényében eltérő mechanizmussal játszódik le a béta-laktám gyűrű felnyílása [145]. A 14. ábrán egy tetszőleges 6-APA származék látható, a fő bomlástermékek megjelölésével.



14. ábra: A béta-laktám váz felnyílásának lehetséges útjai a pH függvényében szubsztituált 6-APA származék esetén (1: 6-APA származék, 2: penicillosav, 3: penillosav, 4: penaldsav, 5: penicillamin, 6: penillsav, 7: penicillénsav)

A lúgos és savas hidrolízis között a fő különbség, hogy savas közegben a bomlási mechanizmusban részt vesz az amino oldallánc is, míg lúg esetén ezt nem figyelhetjük meg. A bomlás kinetikájának pH-függését részletesen tanulmányozták [146]-[150], és megállapították, hogy pH 6,0 - 6,8 között, hűtőben a leglassabb a gyűrű felnyílása. Emellett a fémmentes környezet biztosítása is elengedhetetlen, ugyanis a fémek katalizálják a gyűrűfelnyílást [151]-[152].

1.5.4. Béta-laktám alapvázak protonálódási sajátosságai

A 6-APA és a 7-ACA alapvázak legbázikusabb formája két protonálható csoporttal rendelkezik: a 2-es helyzetű karboxiláttal, és a 6-, illetve 7-es pozícióban lévő

primer aminocsoporttal (12. ábra). Az irodalomban található, a vizes közegben mért protonálódási makroállandókra vonatkozó adatokat a 2. táblázatban foglaltam össze.

Vegyület	$\log K_1$	$\log K_2$	Irodalom
6-APA	$5,30 \pm 0,40^a$	$2,42 \pm 0,50^a$	[153] ^b
6-APA	4,9	2,3	[154]
6-APA	4,60	2,60	[146]
6-APA	4,75	2,5	[155]
7-ACA	$4,90 \pm 0,40^a$	$2,42 \pm 0,50^a$	[153] ^b
7-ACA	–	1,75	[156]
^a Standard deviáció			
^b Kalkulált értékek az Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris (©1994-2007 ACD/Labs) felhasználásával.			

2. táblázat: A 6-APA és a 7-ACA irodalmi protonálódási állandóinak összefoglalása

Az irodalmi adatokat szórás nélkül vagy jelentős konfidencia intervallummal adták meg, emellett rossz egyezést mutatnak. A 7-ACA-ra vonatkozólag csak a második protonálódási lépcsőre találhatunk kísérleti adatokat, eltekintve a prediktált értékektől. Bár léteznek a 6-APA-ra vonatkozó, i-butanol / víz elegyben meghatározott pontos makroállandó értékek [157], a vizes adatokra vonatkozó makroállandó értékek pontosítása szükséges.

Mivel a két béta-laktám alapvegyület két sav-bázis csoporttal rendelkezik, ezért négy mikrorészecske formájában létezhet. E rendkívül nagy jelentőségű molekulák csoport-specifikus protonálódását, legjobb ismereteink szerint, eddig még nem tanulmányozták.

2. Célkitűzések

A doktori munkám keretében célul tűztük ki szokatlan bázicitású gyógyszer- és biomolekulák protonálódási sajátságainak vizsgálatát. Ennek tükrében vizsgálódásunk középpontjába a tenoxikám gyógyszermolekula és a béta-laktám antibiotikumok két fő alapmolekulája, a 6-aminopenicillánsav és a 7-aminokefalosporánsav került.

A rendkívül erősen savas enolos hidroxilcsoportot tartalmazó tenoxikám molekula esetében a protonálódási mikroállandók leírására új megközelítéseket terveztünk, mely során párhuzamokat kerestünk a rokon piroxikám molekula irodalomból részletesen ismert állandóival. A származékképzés módszerével előállítható protonálódási analógok vizsgálata, és az ideális analóg molekula biztonságos kiválasztása is céljaink között szerepelt.

Emellett vizsgálataink tárgyát képezte a tenoxikám-analógok szintézise közben felmerülő újszerű reakcióutak leírása és a keletkezett termékek szerkezetének bizonyítása is. A tenoxikám szerkezetének módosítása során vizsgálni kívántuk, hogy az oxikám molekulából eljuthatunk-e a COX-2 szelektív szerek farmakofór csoportját tartalmazó származékokhoz, illetve más oxikámoknál már leírt prodrug szerkezetekhez.

A kémiai labilis béta-laktám alapvázak esetén a protonálódási makroállandók pontosítását követően a mikroállandók meghatározását tűztük ki célul. Törekedtünk gyors, megbízható és a bomlástermékek zavaró hatását kiküszöbölő módszert találni a mérések kivitelezéséhez, mely során a degradációs termékek monitorozása is lehetséges.

3. Anyagok és módszerek

Ebben a fejezetben a kiindulási vegyületek, a szintézisek és a mérések során felhasznált reagensek és oldószeres eredetét mutatom be, míg a szerves szintézisek áttekintését egységesen az Eredmények és megbeszélés c. fejezetben taglalom, mivel a legtöbb irodalmi receptet kisebb-nagyobb módosítással optimalizáltunk céljaink eléréséhez.

3.1. Vizsgált vegyületek, felhasznált reagensek

A tenoxikám Dr. Kata Mihály (Szegei Tudományegyetem, Gyógyszer technológiai Intézet) nagylelkű ajándéka volt. A 6-APA-t az Aldrich-tól (Steinheim, Németo.) vettük, míg a 7-ACA gyári intermedier volt. A mérésekhez használt alapvegyszereket (NaOH, KOH, NaCl, KCl, cc. sósav), faktoralapanyagokat (KH-ftalát, KHCO₃), pufferkomponenseket (tetraoxalát, bórax, KH₂PO₄, Na₂HPO₄) és indikátormolekulákat (diklórecetsav, klórecetsav, ecetsav, imidazol, trisz(hidroximetil)aminometán (Tris)) analitikai tisztaságban a Reanal (Budapest), az Aldrich (Steinheim, Németo.) és a Merck (Whitehouse Station, NJ, USA) gyártóktól szereztük be. A tenoxikám és piroxikám-származékok szintéziséhez használt MeI, K₂CO₃, anilin, szubsztituált anilin származékok, Na₂SO₄, fenilhidrazin, Na₂CO₃, acetilklorid, benzoilklorid, furoilklorid, cinnamoilklorid, POCl₃, *N,N*-dimetil-anilin, etilklórecetsav, fém Na az előbbi gyártók termékei, csakúgy mint az acetone, etanol, dietiléter, dimetilformamid (DMF), kloroform, metanol, benzol, *i*-propanol, ammónia-oldat. A szacharin-Na sót a Hungaropharma Nagykereskedőtől (Budapest) rendeltük.

A béta-laktám származékok előállításához használt metilaminkloridot, karbamidot, NaNO₂-et, kénsavat, diklómetánt a Reanal (Budapest) és az Aldrich (Steinheim, Németo.) gyártóktól vettük.

Az NMR-spektroszkópiához referenciaanyagként a 3-trimethylsilyl-1-propánszulfonsav nátriumsóját (DSS, > 99 %, Fluka) használtuk, az egyes minták pedig > 99,8 atom% izotóptisztaságú D₂O, > 99,5 atom%-ban deuterált DMSO-*d*₆, > 99,5 % tisztaságú CDCl₃ oldószerrel készültek (Aldrich és Merck termékek).

Egyes titrálások oldószereként frissen desztillált vizet használtunk, a többi oldat Millipore vízzel készült. A metanol/víz oldószerkelegyek készítéséhez spektroszkópiai tisztaságú (> 99,8 %) metanolt (Aldrich) használtunk.

3.2. A szintetizált termékek szerkezetének bizonyítása

A szerves szintézisek során a reakciók előrehaladtát megfelelő időközönként, a reakcióelegyből közvetlenül vett minták vékonyréteg kromatográfiás (VRK) futtatásával követtük. Szilikagél lapokon (Merck) benzol : metanol 4 : 1 arányú elegyét használtuk futtatóreagensnek, míg kifejlesztőszernak tenoxikám- és piroxikám-származékok esetén Dragendorff-elegyet, béta-laktám-származékoknál ninhidrint alkalmaztunk. Az utóbbi kromatográfiás rendszert használtuk preparatív lemezen is (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, 0,2 mm, 20 × 20 cm) a 7-ACA-észter származék tisztításához.

Az intermedierek és a végtermékek olvadáspontját Stuart Scientific SMP készülékkel határoztuk meg; az UV-spektrumukat UNICAM SP-800 és Jasco V-550 spektrofotométerrel vettük fel. A vegyületek NMR-spektrumait Varian Unity Inova 500 és 600 MHz (Palo Alto, CA) készülékeken mértük meg DMSO-*d*₆-ban, egyes esetekben CDCl₃-ban. Ahol szükséges volt, ott ¹H spektrum mellett ¹³C spektrumot is detektáltunk, illetve egyes esetekben 1D NOESY és 2D technikákat is alkalmaztunk (2D COSY, HSQC és HMBC).

COX-2 szerkezetű tenoxikám származékoknál az IR spektrumokat PYE UNICAM SP-1100 IR-spektrofotométerrel vettük fel KBr kapszulából. A tömegspektrumukat MS-QP 1000EX (Shimadzu, Japán) készülékkel határoztuk meg. Elemanalízist (C, H, N) Perkin Elmer 2400 CHN analizátorral végeztünk; a számolt értékektől az eltérés a következő szórás értékeken belül esett: C: ± 0,30; H: ± 0,21; N: ± 0,16%.

3.3. Az állandó ionerősség biztosítása a titrálások során

A titrálások során törekedtünk az állandó ($c = 0,15$) ionerősség betartására, ezért a titrálásokat Szakács és mtsai által kifejlesztett PROTCSIM programmal előzetesen

megterveztük. A program figyelembe veszi a mérendő anyag, a pufferkomponensek, az NMR indikátorok titrátor (sav vagy bázis tartalmú oldat) hozzáadására bekövetkező asszociációs és disszociációs folyamatait, és jelzi a titrátor adagolás függvényében a várható oldat pH-t és az oldat ionkoncentrációját.

A tervezéshez szükséges az összes ligandum protonálódási makroállandójának ismerete, amelyet a mérendő anyag esetén a lehető legjobb közelítéssel pótolhatunk. A $\log K$ állandókat a IUPAC SC Database [158] és a Critical Stability Constants [4]-[5] adatbázisokból vettük.

Hasonló célú irodalmi programoknál [159] a PROTCSIM annyival kifinomultabb, hogy tetszőleges számú, értékűségű és protonáltsági fokú ligandumot tud kezelni mindkét elegyítendő oldatban, melyek ezen kívül erős savat/bázist, illetve 1 : 1 összetételű inert sókat is tartalmazhatnak.

3.4. Potenciometriás és UV-pH titrálások

A potenciometriás és UV-pH titrálásokat GLpK_aTM automata pK_a meghatározó (Sirius Analytical Instruments Ltd., Forest Row, Egyesült Királyság) készüléken végeztük. A beépített Ag / AgCl kombinált pH elektród kalibrálásához a négy-paraméteres módszert (Four PlusTM method) [160]-[161] használtuk. A készülék vezérlését és az eredmények kiértékelését a RefinementProTM szoftver (Sirius Analytical Instruments Ltd.) segítségével végeztük.

Üres titrálásokat minden mérési nap elején, illetve az adott közegű titrálásra való váltás után a következőképpen vettünk fel: ismert mennyiségű HCl-t tartalmazó, 0 - 44 tömeg% MeOH / víz oldatot faktorozott KOH oldattal titráltunk konstans ionerősség ($I = 0,15 \text{ M KCl}$) és hőmérséklet ($t = 25,0 \pm 0,5 \text{ °C}$) mellett, N₂ atmoszféra alatt 1,8 - 12,2 pH tartományban. A műszeres pH leolvasás a p_CH értéken keresztül, a következő többparaméteres összefüggés alapján történt:

$$\text{pH} = \alpha + S p_{\text{C}}\text{H} + j_{\text{H}}[\text{H}^+] + j_{\text{OH}}K_{\text{w}}/[\text{H}^+] \quad (28)$$

ahol α a $[\text{H}^+]$ aktivitás negatív logaritmus a megfelelő hőmérséklet és ionerősség mellett, S az elektródválasz meredeksége és a Nernsti meredekség közötti arányszám. j_{H} és j_{OH} korrekciós együtthatók a savas és a lúgos tartomány nem-ideális elektródválaszából adódó hiba mérséklésére, míg K_{w} a vízionkonstans.

Az UV-pH titrálásokhoz a GLpK_a készülékhez egy D-PAS™ UV spektrofotométer egységet csatlakoztattunk [19]. A minta elnyelését 200 - 700 nm tartományban *in situ* követtük egy száloptikai mérőfej segítségével. A módszer használatának eredményeként a logK meghatározáshoz szignifikánsan kisebb mintakonzentráció (10⁻⁵ M-nál kisebb) is elégséges a hagyományos módszerekhez képest. A logK számolásához a Target Factor Analysisnek (TFA) nevezett technikát alkalmazta a gép RefinementPro™ szoftver segítségével.

Az UV-pH titrálásokhoz kb. 1,0 mM koncentrációjú metanolos törzsoldatot készítettünk a mintákból. Ezekből 100-500 µl-nyi, egyenlő részleteket pipettáztunk a műszer mérőcellájába. 0,15 M-os KCl-oldattal 15 ml-re egészítettük ki a mintát a megfelelő koncentráció (5 - 30 µM) és ionerősség (I = 0,15 M KCl) biztosításához. A mérések során a mintaoldat kezdeti pH-ját 8-ra állítottuk be 0,5 M KOH segítségével, majd 0,5 M HCl-oldattal titráltunk kb. 2-es pH értékig, melyet a lineáris elektródválasz legsavasabb értékének tekintettünk. Titrálásonként mintegy 20 pH értéken vettük fel a vegyület UV spektrumát. A titrálás során állandó hőmérsékletet biztosítottunk (t = 25,0 ± 0,5 °C), és a mintát mindvégig N₂ atmoszférában tartottuk. Vegyületenként minimum 3 párhuzamos mérést végeztünk.

A vízdoldhatatlan vegyületek esetén (piroxikám *p*-Cl, *m*-CF₃ és *p*-CF₃ analógok) a metanol-víz elegyekben végzett UV-pH titrálásokkal meghatározott logK' értékből vizes közegre extrapoláltunk. A metanol-víz elegyek 16 - 44 tömeg% metanolt tartalmaztak. A titrálási protokoll megegyezett a vizes közegünél leírtakkal. Mindegyik vegyület esetén minimum 4 eltérő összetételű elegyben hajtottuk végre a meghatározást. A mért logK' értékeket a Yasuda-Shedlovsky módszerrel [162]-[163] extrapoláltuk vizes közegre a (29)-es egyenlet alapján:

$$\log K' + \log[\text{H}_2\text{O}] = a/\varepsilon + b \quad (29)$$

ahol ε a metanol-víz oldószer-elegy dielektromos állandója, míg $\log[\text{H}_2\text{O}]$ az adott elegy moláris vízkonzentrációja. Ez a módszer a leggyakrabban alkalmazott eljárás az oldószer-elegyes technikák körében [164]-[165].

3.5. NMR-pH titrálások

Az NMR titrálásokat Varian Unity Inova 500 és 600 MHz készülékeken végeztük egységesen 5 mm-es NMR csőben (Wilmad), és a kémiai eltolódásokat 0,5 mM koncentrációjú DSS referensre vonatkoztattuk. 10% D₂O tartalom mellett mértünk; az alacsony D₂O tartalom miatt az eredményeket nem korrigáltuk. A vízelnyomáshoz a presat programot használtuk (satpwr = 25, satdly = 2,5 s).

A béta-laktám alapmolekulák és származékaik meghatározásához az elektródnélküli NMR-pH titrálás módszerét alkalmaztuk, azaz az NMR csőben lévő mintaoldat pH-ját a minta mellett lévő indikátormolekulák aktuális kémiai eltolódásából számoltuk a (12)-es egyenlet segítségével (lásd: 2.2.2.2. fejezet). A mintaoldat és az indikátormolekulák (diklórecetsav, klórecetsav, ecetsav, imidazol, TRIS) koncentrációja 2 mM volt. Az indikátorok határeltolódásait az aktuális titrálás során olvastuk le, kivéve a rendkívül savas diklórecetsav esetén ($\log K = 1,14$), melynél a savasabb határeltolódását ($\delta = 6,345$) irodalomból vettük [38]. Az intézetünkben hasonló módszerrel végzett NMR titrálások azt bizonyították, hogy az indikátormolekulák határeltolódásai a legkülönbözőbb ligandumok jelenlétében sem változtak 5 ppb-nél nagyobb mértékben [166]-[167], ezzel is alátámaszthatjuk megbízható alkalmazhatóságukat. Segítségükkel számszerűsíthető a mért kémiai eltolódások reprodukálhatósága is, melyet 2 ppb-nek becsültünk összhangban más kutatók tapasztalataival [168]-[169]. A diklórecetsav, klórecetsav és ecetsav indikátormolekulák koncentrációjának pontos beméréséhez a molekulákból előzetesen törzsoldatokat készítettünk, amiket ismert koncentrációjú NaOH-oldattal faktoroztunk.

A mintát, az indikátormolekulákat, az NMR referencia anyagot, a faktorozott sósavat, a nagy tisztaságú NaCl-ot és a D₂O-t mérőlombikba mértük a PROTCSIM program által kiszámolt mennyiségben, és frissen kiforralt desztillált vízzel jelle töltöttük. Másik mérőlombikban elkészítettük a titráló oldatot, mely NaOH, NaCl és D₂O vizes oldatát tartalmazta. A mintaoldat 0,7 ml-ét NMR-csőbe mértük, és a titrátor megfelelő részleteit (2 - 50 μ l) Hamilton-pipettával adagoltuk hozzá úgy, hogy a pH kb. 0,3 egységekkel változzon. A spektrum felvételével egyidejűleg a megfelelő indikátormolekula eltolódásából rögtön megállapítottuk az oldatok pH-ját.

A mérési eredmények kiértékeléséhez Varian VnmrJ és Mestre-C 4.8.6.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanyolo.) szoftvereket használtunk. Az NMR magonkénti titrálási görbék egyedi kiértékeléséhez Origin 7SR2 (OriginLab, Northampton, USA) és Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, USA) szoftvereket alkalmaztunk. A protonálódási egyensúlyok kis szórású (0,002) kiértékelését az Opium programmal [21] hajtottuk végre, mely egyszerre illeszt függvényt a vizsgált vegyület összes szénkötésű hidrogén kémiai eltolódások pH függő adatsorára.

4. Eredmények és megbeszélés

4.1. A tenoxikám mikrospeciációja

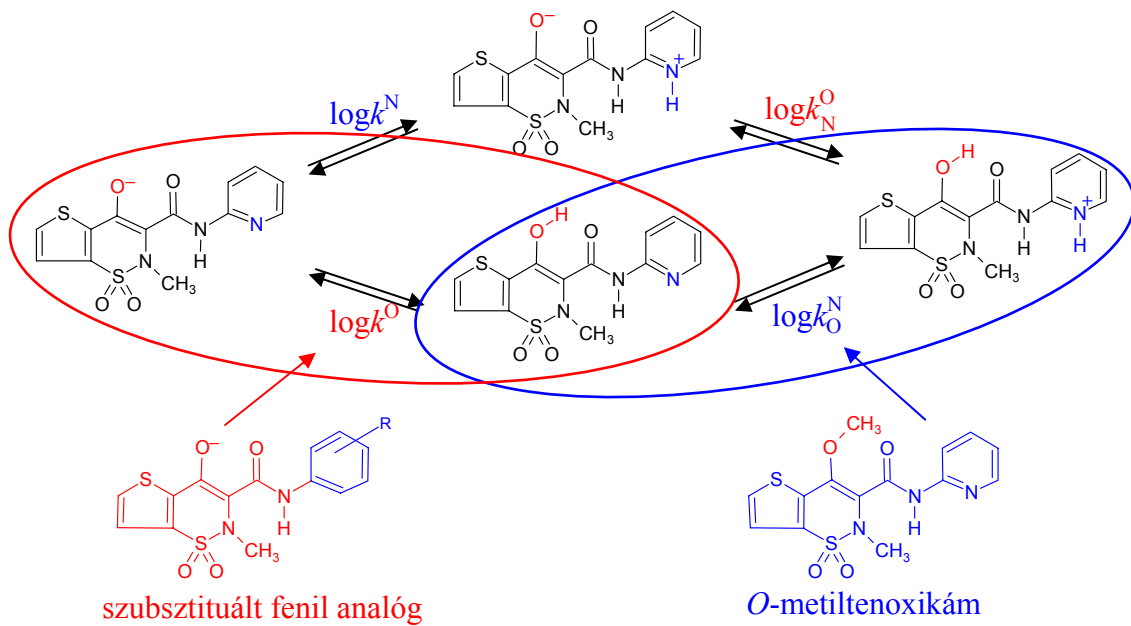
A tenoxikám 2.4.5. fejezetben összefoglalt irodalmi protonálódási állandóit alapul véve a protonálódási mikroállandók pontosítására törekedtünk. Direkt módszerrel a tenoxikám mikrospeciációját nem tudtuk elvégezni, ugyanis vizes oldatának ^1H NMR jelei a rossz vízoldhatóságából eredően még nagyszámú (128) pásztázás esetén is alig kivehetőek a zajhoz képest. A legnagyobb intenzitású N-CH₃ hidrogének szingulet jelét lehet jól asszignálni, mely pH függéséből csak az irodalmi makroállandó értékeket tudtuk reprodukálni.

Direkt UV-pH spektroszkópia sem vezetett célra, ugyanis a tenoxikám kiterjedt konjugációs rendszerének mindkét protonálható csoport részét képezi, ezért a mikroállandó meghatározásához szükséges egyik csoport szelektív UV elnyelése egyetlen hullámhosszon sem valósult meg. Az UV-pH titrálással is csak a makroállandó értékeket tudtuk megerősíteni. Ezek alapján a továbbiakban a makroállandókra vonatkozóan Zimmerman és mtsa eredményeit használtuk [126]: $\log K_1 = 5,34 \pm 0,06$, $\log K_2 = 1,07 \pm 0,11$ (\pm standard deviáció).

A mikroállandók meghatározásához alkalmas deduktív módszert kerestünk, ahol a származék-vegyületek a minor protonálódási, jelen esetben a töltésmentes formán keresztül vezető útvonal egyik protonálódási mikroállandóját (k_0^{N} vagy k^{O}) modellezték.

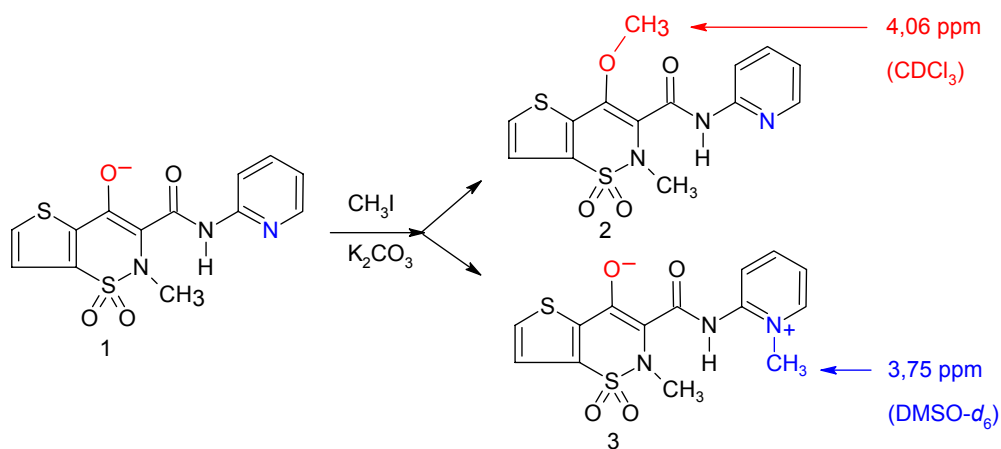
4.1.1. A tenoxikám k_0^{N} mikroállandójának meghatározása

A piroxikám, mint rokon molekula esetén alkalmazott módszert [170], [68] a tenoxikámra is kipróbáltuk. A deduktív módszer lényege ebben az esetben, hogy szelektív metilezéssel a molekula enolátcsoportját észterezzük, majd az *O*-metiltenoxikám, mint a k_0^{N} -mikrospeciációs modellvegyület (15. ábra) protonálódási állandóját meghatározzuk.



15. ábra: A tenoxikám mikrospeciációjához felhasználható modellvegyületek

A metilezés a 16. ábra szerint ment végbe.



16. ábra: A tenoxikám (1) metilezése (2: *O*-metiltenoxikám, 3: *N*-metiltenoxikám). A metilcsoportok mellett a ^1H NMR jelek kémiai eltolódása látszik az oldószer megjelölésével

A szintézis leírása: 3,47 g (10 mmól) tenoxikámot 50 ml acetóban szuszpendáltunk, majd 2,78 g (20 mmól) K_2CO_3 -ot és 3,74 ml (8,52 g, 60 mmól) metiljodidot adtunk hozzá, és 5 napig szobahőmérsékleten, fénytől védve kevertettük. A reakció két fő terméket eredményezett: *N*- és *O*-metiltenoxikámot.

N-metiltenoxikám (=2- $\{[(4\text{-Hidroxi-2-metil-1,1-dioxido-2H-tieno}[2,3\text{-}e][1,2]\text{tiazin-3-il)karbonil}]\text{amino}\}$ -1-methylpiridin): Az elegyből a kivált csapadékot szűrtük, 15 ml acetonnal mostuk. A szervesetlen szennyeződésektől 25 ml víz hozzáadásával és az elegy melegítésével szabadultunk meg. Hűtés után a csapadékot etanollal mostuk. Hozam: 2,6 g (72 %). Sárga kristályok. OP: 227 °C. UV (metanol): 384 nm ($\log \epsilon = 3,54$), 296 nm ($\log \epsilon = 3,40$). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,95 (s, 3H, NCH₃), 3,75 (s, 3H, N⁺CH₃), 7,28 (dd, J 7,2, 6,8 Hz, 1H, H-5'), 7,38 (d, J 5,0 Hz, 1H, H-7), 7,80 (d, J 5,0 Hz, 1H, H-6), 8,19 (dd, J 7,8, 7,2 Hz, H-4'), 8,52 (d, J 7,8 Hz, H-3'), 8,96 (d, J 6,8 Hz, H-6').

O-metiltenoxikám: (=4-Metoxi-2-metil-*N*-(piridin-2-il)-2H-tieno[2,3-*e*][1,2]tiazin-3-karboxamid 1,1-dioxid): Az előző leszűrt acetonos oldatot vákuum alatt bepároltuk, és a maradékot 20 ml száraz dietiléterben oldottuk. Az oldhatatlan szemcséket leszűrtük és 2 × 10 ml száraz éterrel mostuk. Az egyesített éteres oldatokat bepároltuk, majd a maradékot éter : hexán 1 : 1 elegyében szuszpendáltuk, végezetül a terméket szűrtük. Hozam: 0,4 g (12 %). Fehér kristályok. OP: 174 °C. UV (metanol): 332 nm ($\log \epsilon = 3,04$), 280 nm ($\log \epsilon = 2,82$). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl₃): δ 3,04 (s, 3H, NCH₃), 4,06 (s, 3H, OCH₃), 7,07 (dd, J 7,4, 6,5 Hz, 1H, H-5'), 7,35 (d, J 5,3 Hz, 1H, H-7), 7,72 (d, J 5,3 Hz, 1H, H-6), 7,76 (dd, J 8,1, 7,4 Hz, 1H, H-4'), 8,14 (d, J 8,1 Hz, 1H, H-3'), 8,30 (d, J 6,5 Hz, 1H, H-6').

Az *O*-metiltenoxikám észter kötése víz hozzáadására pillanatszerű hidrolízist szenvedett, ezért protonálódási állandó meghatározásra alkalmatlan. Az *O*-metilpiroxikámmal, mint stabil modellvegyülettel összevetve az eltérést arra vezettük vissza, hogy az *O*-metiltenoxikámban lévő tiofén gyűrű nagy térkitöltésű kén atomjának szomszédcsoport hatása elősegíti a térközeli észterkötés hidrolitikus bomlását.

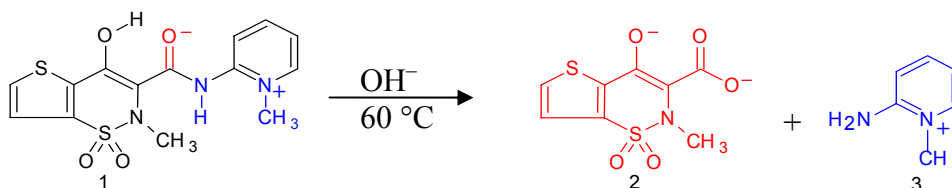
4.1.2. A tenoxikám k^0 mikroállandójának meghatározása

A minor protonálódási útvonal k^0 mikroállandójának meghatározásához olyan származékra van szükségünk, mely az enolátcsoport protonálódását modellezi, miközben a piridil gyűrű protonálatlan állapotban van. Ennek a feltételnek felelnek meg a tenoxikám fenil-származékai (15. ábra).

4.1.2.1. A tenoxikám k^0 mikroállandóját modellező vegyületek szintézise

A fenil-származékok előállításához a tenoxikám totálszintézisének [171] utolsó lépésében kell a 2-aminopiridint anilin-származékokra cserélni. Mivel a szükséges tenoxikám intermedier nem található meg kereskedelmi forgalomban, ezért azt a tenoxikám molekula kíméletes hidrolízisének keresztül állítottuk elő.

A tenoxikám hidrolízisének irodalma alapján [172] a molekula savamid kötése mind savas (pH = 1), mind lúgos (pH = 10) oldatban 2-aminopiridin leválása mellett hidrolizál a tieno-tiazin gyűrűrendszer felnyílása mellett. A módszer reprodukálása során azt tapasztaltuk, hogy a tenoxikám domináns mennyisége intakt maradt még 1 nap refluxáltatás után is a fenti közegekben. Ezért a metilezés során keletkezett, polarizáltabb savamidkötést tartalmazó *N*-metiltenoxikám hidrolízisének vizsgáltuk meg. 80 °C-on, 5 %-os NaOH-oldatban az *N*-metil-2-aminopiridin jó távozócsoportnak bizonyult, és a hidrolízis 3 óra alatt kvantitatíven lejátszódott a gyűrűrendszer felnyílása nélkül a következő ábra szerint:

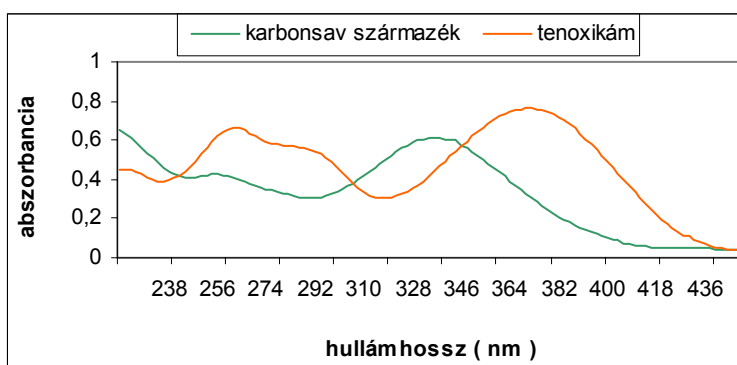


17. ábra: Az *N*-metiltenoxikám (1) kíméletes hidrolízise (2: karbonsav intermedier, 3: *N*-metil-2-aminopiridin)

A szintézis leírása: karbonsav-származék (=4-Hidroxi-2-metil-2*H*-tieno[2,3-*e*][1,2]tiazin-3-karbonsav 1,1-dioxid): 3,53 g (10 mmól) *N*-metiltenoxikámot 20 ml 5 %-os NaOH-oldatot és 10 ml etanolt tartalmazó elegyben szuszpendáltunk, és a reakcióelegyet 3 órán át 80 °C-os vízfürdön melegítettük. A metanolt vákummal elpárologtattuk, és a hátramaradt, lehűtött vizes oldatot 3-as pH-ra állítottuk cc. HCl segítségével, majd éjszakára hűtőbe helyeztük. A kivált fehér csapadékot szűrtük, etanol : víz 1 : 1 arányú hideg oldatának kis részleteivel mostuk, végül vákuum alatt szobahőmérsékleten megszáritottuk. Hozam: 1,52 g (57 %). Színtelen kristályok. OP: 242 °C. UV (metanol): 330 nm ($\log \epsilon = 3,02$), 256 nm ($\log \epsilon = 2,78$). ^1H NMR (500

MHz, DMSO- d_6): δ 2,95 (s, 3H, NCH₃), 7,38 (d, J 5,3 Hz, 1H, H-7), 7,79 (d, J 5,3 Hz, 1H, H-6). log K (UV-pH titr.): $4,27 \pm 0,04$.

A 18. ábrán feltüntettem a tenoxikám, illetve a képződött karbonsav származék UV spektrumait. A piridilcsoport leválása a konjugációs rendszer szignifikáns rövidülését okozza, így a spektrum jelentős hipszo- és hipokróm eltolódást mutat.



18. ábra: A tenoxikám és hidrolízis termékének UV spektruma metanolban

A karbonsav származék etilészterre alakításával (A módszer) vagy az *N*-metiltenoxikám alkoholízisével (B módszer) jutottunk el a totálszintézis utolsó intermediéréhez (19. ábra).

A szintézisek leírása: karbonsav-származék etilészter (=Etil-4-hidroxi-2-metil-2*H*-tieno[2,3-*e*] [1,2]tiazin-3-karboxilát 1,1-dioxid): A módszer (savkatalizált észterezés): 2,63 g (10 mmól) karbonsav-származékot 40 ml etanolban oldottunk, mely katalitikus mennyiségben kénsavat tartalmazott (0,4 g). Az oldatot 3 órán keresztül 80 °C-os vízfürdőben melegítettük, majd vákuum alatt bepároltuk. A maradékot 40 ml etanolban oldottuk, és az előbbieket kétszer megismételtük. Ezután a maradékot 30 ml kloroformban oldottuk, és 5 %-os nátriumkarbonát-oldattal (2×15 ml), majd vízzel (2×15 ml) mostuk. A vörösesbarna szerves fázist elválasztottuk, megszáritottuk (Na_2SO_4), szénen derítettük, és vákuum alatt bepároltuk. A nyers terméket etanolból átkristályosítottuk. Hozam: 1,32 g (45 %). Halványsárga kristályok. OP: 160 - 163 °C. UV (metanol): 310 nm ($\log \epsilon = 2,98$), 256 nm ($\log \epsilon = 2,85$). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1,19 (t, J 7,4 Hz, 3H, CH₃), 3,06 (s, 3H, NCH₃), 4,42 (q, J 7,4 Hz, 2H, CH₂), 7,39 (d, J 5,3 Hz, 1H, H-7), 7,85 (d, J 5,3 Hz, 1H, H-6). B módszer (alkoholízis): 3,53 g (10 mmól) *N*-metiltenoxikámot 40 ml etanolban oldottunk, mely 1,7 g (25 mmól) Na-etilátot tartalmazott. Az elegyet N₂ atmoszféra alatt 12 órán át 80 °C-os vízfürdőben

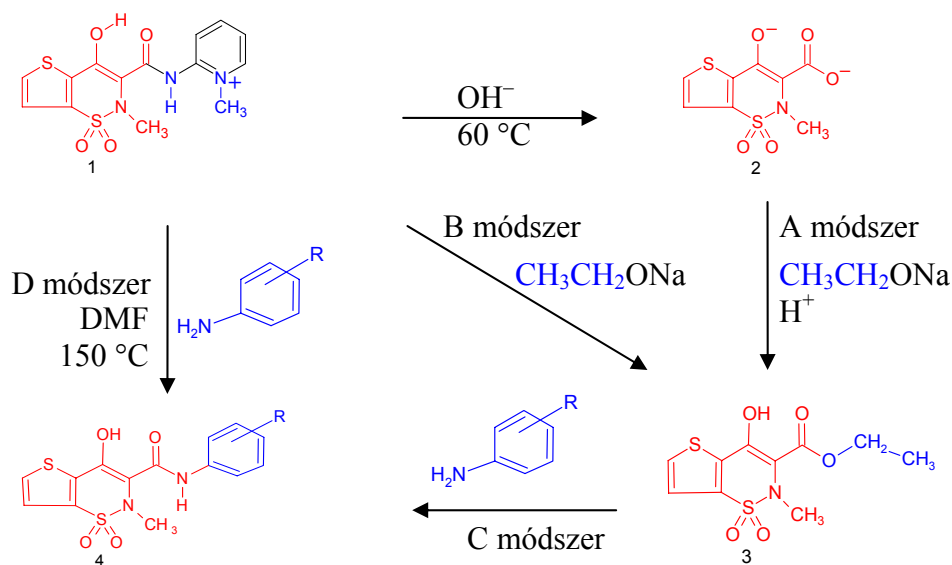
melegítettük. Az oldószert csökkentett nyomáson elpárologtattuk, majd a maradékot 10 %-os HCl-oldatban oldottuk, és kloroformmal kiráztuk (3 × 25 ml). A kombinált szerves fázist 5 %-os Na₂CO₃-oldattal (2 × 15 ml) és vízzel (2 × 15 ml) mostuk, majd megszárítottuk (Na₂SO₄), és bepárooltuk vákuum alatt. A maradékot oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (SiO₂, etilacetát oldószer), és etanolból átkristályosítottuk. Hozam: 1,71 g (58 %).

Az intermedierből kiindulva anilin felhasználásával a tenoxikám fenil származékához jutottunk (19. ábra).

A szintézis leírása: tenoxikám fenil-származék: C módszer: 0,97 g (3,4 mmól) karbonsav-származék etilésztert 10 ml dimetilformamidban oldottunk, majd 1,04 g (8,5 mmól, 2,5 × felesleg) anilint adtunk hozzá, és az elegyet 3 órán keresztül 130 °C-os olajfürdön melegítettük. A termék feldolgozását a D módszernél mutatom be. Hozam: 0,30 g (30 %).

N-Fenil-4-hidroxi-2-metil-2H-tieno[2,3-e] [1,2]tiazin-3-karboxamid 1,1-dioxid: Szintelen por. OP: 250 - 252 °C. UV (metanol): 376 nm (log ϵ = 3,32), 264 nm (log ϵ = 3,25). ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2,96 (s, 3H, NCH₃), 4,06 (s, 3H, OCH₃), 7,18 - 7,32 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7,39 (d, *J* 5,3 Hz, 1H, H-7), 7,85 (d, *J* 5,3 Hz, 1H, H-6).

Az előbbi három, viszonylag kis kitermelésű reakciólépés helyettesítésére kidolgoztunk egy egylépcsős módszert. Erélyes reakciókörülmények között *N*-metiltenoxikámból kiindulva közvetlenül a szubsztituált fenil-származékokhoz jutunk (19. ábra). A módszer segítségével előállítottunk fenil-, illetve *p*-(MeO), *m*-Me, *o*-Cl, *m*-Cl, *p*-Cl, *m*-CF₃ és *p*-CF₃ fenil-származékokat.



19. ábra: A tenoxicám szubsztituált fenil analógjaink (4) előállítási lehetőségei (1: *N*-metiltenoxicám, 2: karbonsav származék, 3: karbonsav származék etilészter)

A szintézis leírása: *tenoxicám szubsztituált fenil-származék:* D módszer (általános recept): 1,20 g (3,4 mmól) *N*-metiltenoxicámot 10 ml DMF-ben oldottunk, hozzáadtuk a szubsztituált anilin $2,5 \times$ feleslegét (8,5 mmól), majd az elegyet $130 - 150\text{ }^\circ\text{C}$ -os olajfürdőn melegítettük N_2 atmoszféra alatt 3-20 órán át. Egy óra melegítés elteltével az *N*-metiltenoxicám teljesen beoldódott az elegy folyamatos sötétedése mellett. A reakció végpontját VRK-val monitoroztuk. Végül az elegyet lehűtöttük, és 40 ml vízzel hígítottuk, melynek eredményeként barnássárga olajkiválást tapasztaltunk. Az oldat dekantálása után a maradékot 20 ml kloroformban feloldottuk, 10 %-os HCl-oldattal ($3 \times 10\text{ ml}$) és vízzel ($2 \times 10\text{ ml}$) mostuk, megszáritottuk (Na_2SO_4), szénen derítettük, és vákuum alatt bepároltuk. A maradékot megfelelő oldószerből átkristályosítottuk.

N-Fenil-4-hidroxi-2-metil-2*H*-tieno[2,3-*e*] [1,2]tiazin-3-karboxamid 1,1-dioxid: 3 óra reakcióidő, $130\text{ }^\circ\text{C}$, etilacetát: dietiléter 1 : 1 elegyből kristályosítottuk. Hozam: 74%. (A termék leírását lásd a C-módszernél).

4-Hidroxi-2-metil-N-(4'-metoxifenil)-2H-thieno [2,3-e][1,2]tiazin-3-karboxamid 1,1-dioxid: 3 óra reakcióidő, 130 °C, i-propanol : dietiléter 1 : 1 elegyből kristályosítottuk. Hozam: 82 %. Halványsárga kristályok. OP: 265 - 267 °C. UV (metanol): 366 nm (log ϵ = 3,55), 272 nm (log ϵ = 3,31). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2,98 (s, 3H, NCH₃), 3,76 (s, 3H, OCH₃), 7,41 (d, *J* 5,3 Hz, 1H, H-7), 7,47 (d, *J* 8,5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,61 (d, *J* 8,5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7,88 (d, *J* 5,3 Hz, 1H, H-6).

4-Hidroxi-2-metil-N-(3'-metilfenil)-2H-tieno [2,3-e][1,2]tiazin-3-karboxamid 1,1-dioxid: 6 óra reakcióidő, 130 °C, diizopropiléterből kristályosítottuk. Hozam: 65 %. Halványsárga kristályok. OP: 196 - 198 °C. UV (metanol): 374 nm (log ϵ = 3,58), 268 nm (log ϵ = 3,40). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2,36 (s, 3H, CH₃), 3,08 (s, 3H, NCH₃), 7,22 - 7,39 (m, 4H, H-2', H-4', H-5', H-6'), 7,37 (d, *J* 5,2 Hz, 1H, H-7), 7,86 (d, *J* 5,2 Hz, H-6).

4-Hidroxi-N-(2'-klórfenil)-2-metil-2H-tieno [2,3-e][1,2]tiazin-3-karboxamid 1,1-dioxid: 10 óra reakcióidő, 140 °C, benzolból kristályosítottuk. Hozam: 51 %. Halványsárga kristályok. OP: 181 - 182 °C. UV (metanol): 382 nm (log ϵ = 3,22), 268 nm (log ϵ = 3,10). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3,08 (s, 3H, NCH₃), 7,24 - 7,32 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6'), 7,39 (d, *J* 5,3 Hz, 1H, H-7), 7,85 (d, *J* 5,3 Hz, 1H, H-6).

4-Hidroxi-N-(3'-klórfenil)-2-metil-2H-tieno [2,3-e][1,2]tiazin-3-karboxamid 1,1-dioxid: 10 óra reakcióidő, 140 °C, a barnássárga nyers terméket oszlop-kromatográfiásan tisztítottuk (SiO₂, etilacetát oldószer), dietiléter : benzol 1 : 1 elegyből kristályosítottuk. Hozam: 78 %. Halványsárga kristályok. OP: 240 - 243°. UV (metanol): 354 nm (log ϵ = 3,58), 258 nm (log ϵ = 3,40). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2,97 (s, 3H, NCH₃), 7,21 - 7,42 (m, 4H, H-2', H-4', H-5', H-6'), 7,38 (d, *J* 5,1 Hz, 1H, H-7), 7,89 (d, *J* 5,1 Hz, 1H, H-6).

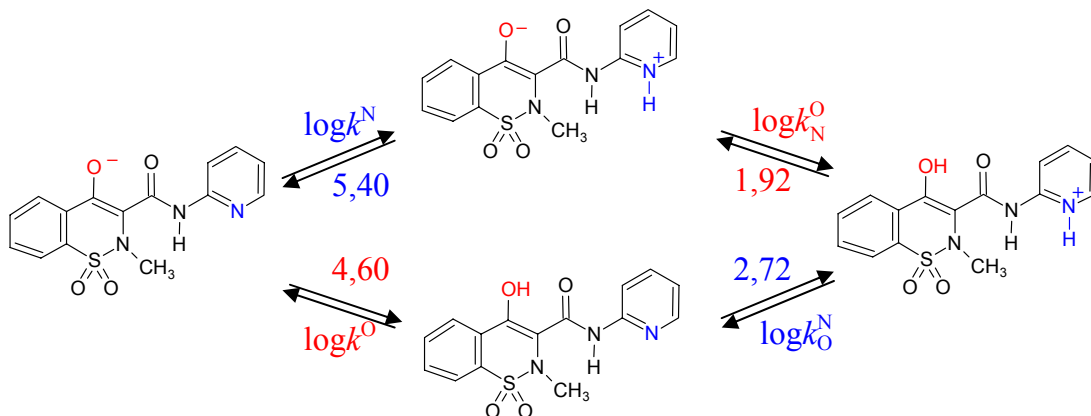
4-Hidroxi-N-(4'-klórfenil)-2-metil-2H-tieno [2,3-e][1,2]tiazin-3-karboxamid 1,1-dioxid: 10 óra reakcióidő, 140 °C, dietiléter : benzol 1 : 1 elegyből kristályosítottuk. Hozam: 78 %. Halványsárga kristályok. OP: 192 - 194 °C. UV (metanol): 386 nm (log ϵ = 3,78), 270 nm (log ϵ = 3,57). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,99 (s, 3H, NCH₃), 7,23 (d, *J* 7,8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7,41 (d, *J* 7,8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,39 (d, *J* 5,2 Hz, 1H, C-7); 7,86 (d, *J* 5,2 Hz, 1H, H-8), 10,55 (s, 1H, OH).

4-Hidroxi-2-metil-N-[3'-(trifluorometil)fenil]-2H-tieno [2,3-e][1,2]tiazin-3-karboxamid 1,1-dioxid: 20 óra reakcióidő, 150 °C, dietiléter : benzol 1 : 1 elegyből kristályosítottuk, majd i-propanolból átkristályosítottuk. Hozam: 37 %. Halványsárga kristályok. OP: 258 - 261 °C. UV (metanol): 404 nm ($\log \epsilon = 3,58$), 296 nm ($\log \epsilon = 3,34$). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 3,04 (s, 3H, NCH₃), 7,32 - 8,04 (m, 4H, H-2', H-4', H-5', H-6'), 7,37 (d, J 5,1 Hz, 1H, H-7), 7,78 (d, J 5,1 Hz, 1H, H-6).

4-Hidroxi-2-metil-N-[4'-(trifluorometil)fenil]-2H-tieno [2,3-e][1,2]tiazin-3-karboxamid 1,1-dioxid: 18 óra reakcióidő, 150 °C, izopropanol : dietiléter 1 : 1 elegyből kristályosítottuk, majd i-propanolból átkristályosítottuk. Hozam: 44 %. Halványsárga kristályok. OP: 272 - 275 °C. UV (metanol): 372 nm ($\log \epsilon = 3,68$), 258 nm ($\log \epsilon = 3,48$). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl₃): δ 2,95 (s, 3H, NCH₃), 7,38 (d, J 5,0 Hz, 1H, H-7), 7,67 (d, J 8,6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,89 (d, J 5,0 Hz, H-6), 7,91 (d, J 8,6 Hz, 2H, H-3', H-5').

4.1.2.2. Az ideális modellvegyület definiálása

Néhány kezdeti mérésünk azt bizonyította, hogy a tenoxikám szubsztituált fenil származékainak protonálódási makroállandói szignifikáns különbségeket mutatnak. Ebből eredően a mikrospeciációs számításokhoz a megfelelő modellvegyület kiválasztása nehézségekbe ütközik. Az ideális analóg definiálására a következő gondolatmenetet alkalmaztuk. Visszanyúltunk a rokon molekula, a piroxikám legmegbízhatóbb mikrospeciációs adataihoz [68] (20. ábra):

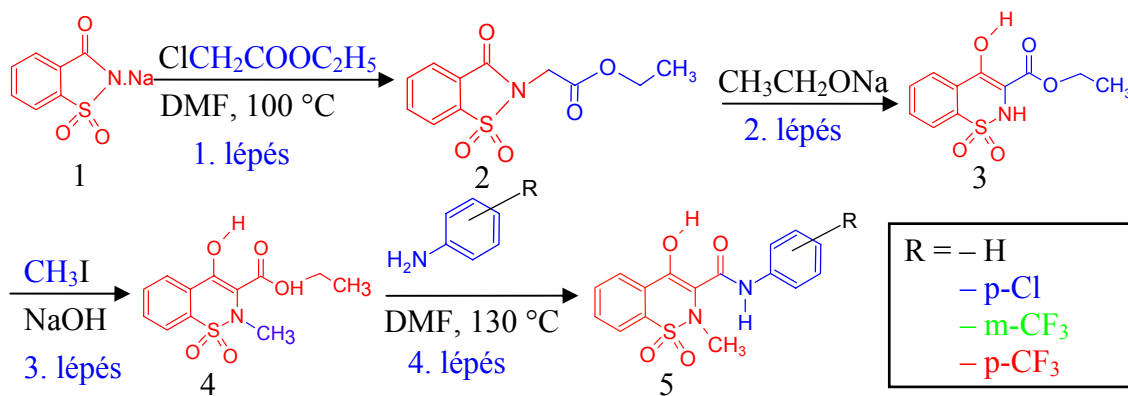


20. ábra: A piroxikám mikrospeciációs ábrája [68]

Az ábráról leolvashatjuk, hogy a k^0 , vagyis a minor útvonalhoz tartozó egyik mikroállandó logaritmikus értéke 4,60. Ez az adat enoléter képzéssel, vagyis adekvát módosítással született, amely azonban tenoxikám esetében nem járható út. De születethetett volna oly módon is, hogy enoléter képzés helyett a piridil-molekularész olyan ideális szubsztituenssel helyettesítjük, mely úgyszintén 4,60-as $\log k^0$ értéket ad. Ha sikerül ilyen ideális piroxikám származékot találnunk, akkor annak tenoxikám analógját fel tudjuk használni a tenoxikám k^0 mikroállandójának meghatározásához.

4.1.2.3. A piroxikám szubsztituált fenil-származékainak előállítása

A piroxikám szubsztituált fenil-származékainak szintéziséhez – csakúgy mint a tenoxikám esetében – a totálszintézisének [76] utolsó intermedierjére van szükség. Mivel ennek kereskedelmi ára igen magas, ezért a szacharin Na-sójából kiindulva a 21. ábra szerinti irodalmi módszereket alkalmazva állítottuk elő a kívánt modellvegyületeket (fenil, illetve *p*-Cl, *m*-CF₃ és *p*-CF₃ szubsztituált fenil-származékokat).



21. ábra: A piroxikám szubsztituált fenil-származékainak (5) előállítása (1: szacharin Na só, 2: *N*-aktivált oldalláncú szacharin, 3: piroxikám intermedier, 4: piroxikám végső intermedier)

A szintézis leírása: *N*-aktivált oldalláncú szacharin (Etil (3-oxo-1,2-benzoizotiazol-2(3*H*)-il)acetát 1,1-dioxid) (1. lépés): 61,5 g (0,30 mol) szacharin Na sót 240 ml DMF-ben oldottuk, és ekvivalens mennyiségű etilklóracetáttal reagáltattuk 100 °C-on 3 órán át [173] szerint. Az oldatot 4 × térfogatfeleslegű jeges vízre öntöttük. Hozam: 57,7 g (72 %). Fehér csapadék. OP: 104 - 105 °C. ¹H NMR (600 MHz,

DMSO- d_6): δ 1,18 (t, J 7,2 Hz, 3H, CH₃), 4,15 (q, J 7,2 Hz, 2H, CH₂), 4,60 (s, 2H, NCH₂), 8,00 (t, J 7,8 Hz, 1H, H-5), 8,07 (t, J 7,8 Hz, 1H, H-6), 8,12 (d, J 7,8 Hz, 1H, H-4), 8,33 (d, J 7,8 Hz, 1H, H-7).

Piroxikám intermedier (4-Hidroxi-1,1-dioxo-1,2-dihidro-benzo[e][1,2]tiazin-3-karbonsav etilészter) (2. lépés): 10 g (0,037 mól) *N*-aktivált szacharint 2 helyett [174] 3 \times feleslegű, frissen készített nátriumetilát-oldatban (2,56 g fém nátrium 40 ml vízmentes etanolban) oldottunk. Az elegyet 55 °C-on egy óráig melegítettük, hogy lejátszódhasson a Gabriel-Colman átrendeződés [175]. Állandó kevertetés mellett 4,5 ml 9 %-os HCl-oldatot csepegtettünk a rendszerhez, miközben az elegy hőmérsékletét mindvégig 5 °C alatt tartottuk. Szűrés előtt egy éjszakára a lombikot a hűtőszekrénybe helyeztük, hogy a kivált csapadék tömörödjön. Hozam: 68 %. Fehér csapadék. OP: 156 - 158 °C. UV (metanol): 320 nm ($\log \epsilon = 4,18$). ¹H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 1,33 (t, J 7,1 Hz, 3H, CH₃), 4,36 (q, J 7,1 Hz, 2H, CH₂), 7,84 (t, J 7,4 Hz, 1H, H-6), 7,86 (t, J 7,4 Hz, 1H, H-7), 7,89 (d, J 7,1 Hz, 1H, H-5), 8,04 (d, J 7,1 Hz, 1H, H-8), 11,54 (s, 1H, OH).

Piroxikám végső intermedier (4-Hidroxi-2-metil-1,1-dioxo-1,2-dihidro-benzo[e][1,2]tiazin-3-karbonsav etilészter) (3. lépés): Az előbbi intermedier 10 g-jához (0,037 mól) 8 ml metiljodidot, 40 ml vizet, 140 ml etanolt és 40 ml 1 M-os NaOH-oldatot adtunk [176] szerint. Az elegyet szobahőmérsékleten 18 órát állni hagytuk, majd a csapadékot szűrtük, vízzel mostuk és megszáritottuk. Hozam: 72 %. Sárga csapadék. OP: 161 - 163 °C. UV (metanol): 322 nm ($\log \epsilon = 4,15$). ¹H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 1,33 (t, J 7,1 Hz, 3H, CH₃), 2,82 (s, 3H, NCH₃), 4,36 (q, J 7,1 Hz, 2H, CH₂), 7,84 (t, J 7,4 Hz, 1H, H-6), 7,86 (t, J 7,4 Hz, 1H, H-7), 7,88 (d, J 7,1 Hz, 1H, H-5), 8,04 (d, J 7,1 Hz, 1H, H-8).

A piroxikám szubsztituált fenil-származékai (4. lépés): 0,28 g-ot (0,001 mól) az előbbi végső intermedierből 3 ml DMF-ban szuszpendáltunk, majd 3,5 \times feleslegben anilinszármazékokkal reagáltattuk 140 - 150 °C-os olajfürdőn 12 órán keresztül N₂ atmoszféra alatt. Az oldatokat lehűlés után 15 ml HCl-oldatra öntöttük, melyek ekvivalens mennyiségben tartalmaztak savat. A csapadékos oldatokat hűtőszekrénybe helyeztük 16 órára, majd szűrtük őket, végül lehűtött vízzel (3 \times 2 ml) és i-propanollal (3 \times 2 ml) mostuk.

N-Fenil-4-hidroxi-2-metil-1,2-dihidro-benzo [e][1,2]tiazin-3-karboxamid-1,1-dioxid: Hozam: 57 %. Fehér kristályok. OP: 216 - 217 °C. UV (metanol): 334 nm ($\log \varepsilon = 4,23$), 240 nm ($\log \varepsilon = 4,15$). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 2,87 (s, 3H, NCH₃), 7,19 (m, 1H, H-4'), 7,39 (t, J 7,1 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7,68 - 7,76 (m, 2H, H-6, H-7), 7,85 - 7,96 (m, 3H, H-5, H-2', H-6'), 8,04 (d, J 7,4 Hz, 1H, H-8), 10,30 (s, 1H, OH).

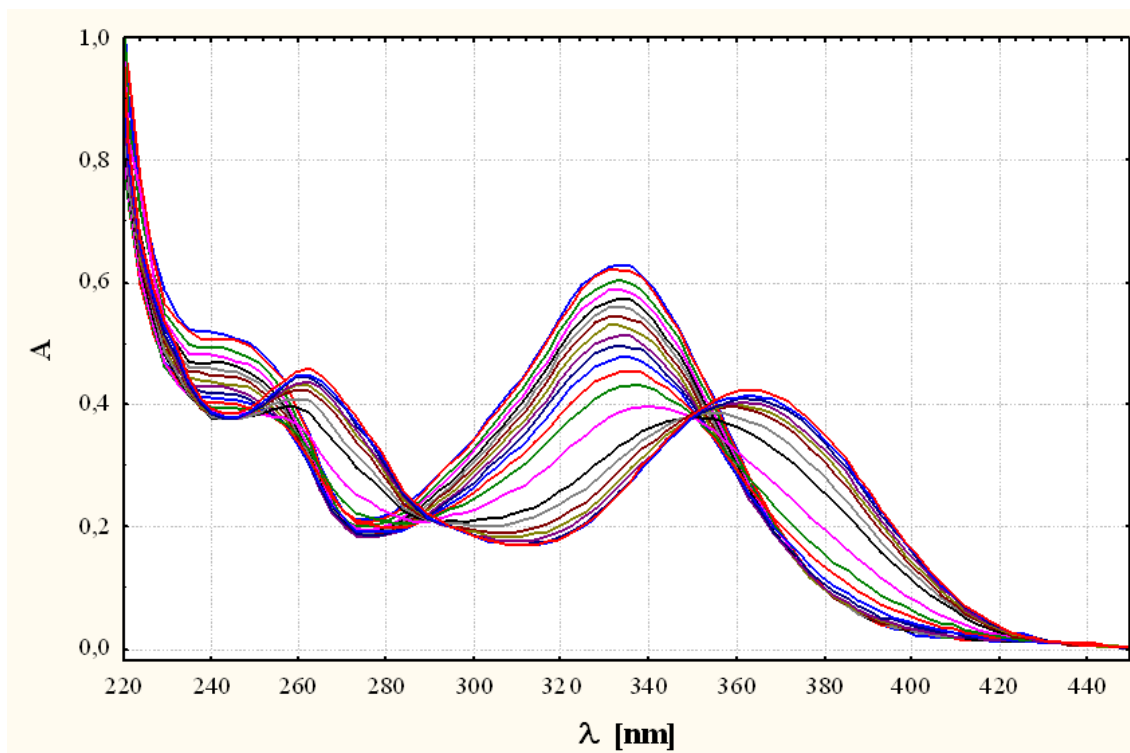
4-Hidroxi-N-(4-klórphenil)-2-metil-1,2-dihidro-benzo [e][1,2]tiazin-3-karboxamid-1,1-dioxid: Hozam: 64 %. Fehér kristályok. OP: 230 - 232 °C. UV (metanol): 334 nm ($\log \varepsilon = 4,36$), 249 nm ($\log \varepsilon = 4,28$). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 2,86 (s, 3H, NCH₃), 7,45 (d, J 7,8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7,79 (d, J 7,8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,86 - 7,95 (m, 3H, H-5, H-6, H-7), 8,04 (d, J 7,4 Hz, 1H, H-8), 10,42 (s, 1H, OH).

4-Hidroxi-2-metil-N-(3-trifluorometilfenil)-1,2-dihidro-benzo [e][1,2]tiazin-3-karboxamid-1,1-dioxid: Hozam: 60 %. Fehér kristályok. OP: 199 - 201 °C. UV (metanol): 334 nm ($\log \varepsilon = 4,38$), 249 nm ($\log \varepsilon = 4,25$). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 2,88 (s, 3H, NCH₃), 7,54 (d, J 8,0 Hz, 1H, H-4'), 7,64 (t, J 8,0 Hz, 1H, H-5'), 7,88 - 7,95 (m, 3H, H-5, H-6, H-7), 8,06 (d, J 7,6 Hz, 1H, H-8), 8,12 (d, J 8,0 Hz, H-6'), 8,19 (s, 1H, H-2'), 10,57 (s, 1H, OH).

4-Hidroxi-2-metil-N-(4-trifluorometilfenil)-1,2-dihidro-benzo[e][1,2]tiazin-3-karboxamid-1,1-dioxid: Hozam: 56 %. Fehér kristályok. OP: 237 - 239 °C. UV (metanol): 334 ($\log \varepsilon = 4,30$), 253 ($\log \varepsilon = 4,19$). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 2,88 (s, 3H, NCH₃), 7,77 (d, J 8,6 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7,88 - 7,95 (m, 3H, H-5, H-6, H-7), 8,02 (d, J 8,6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 10,60 (s, 1H, OH).

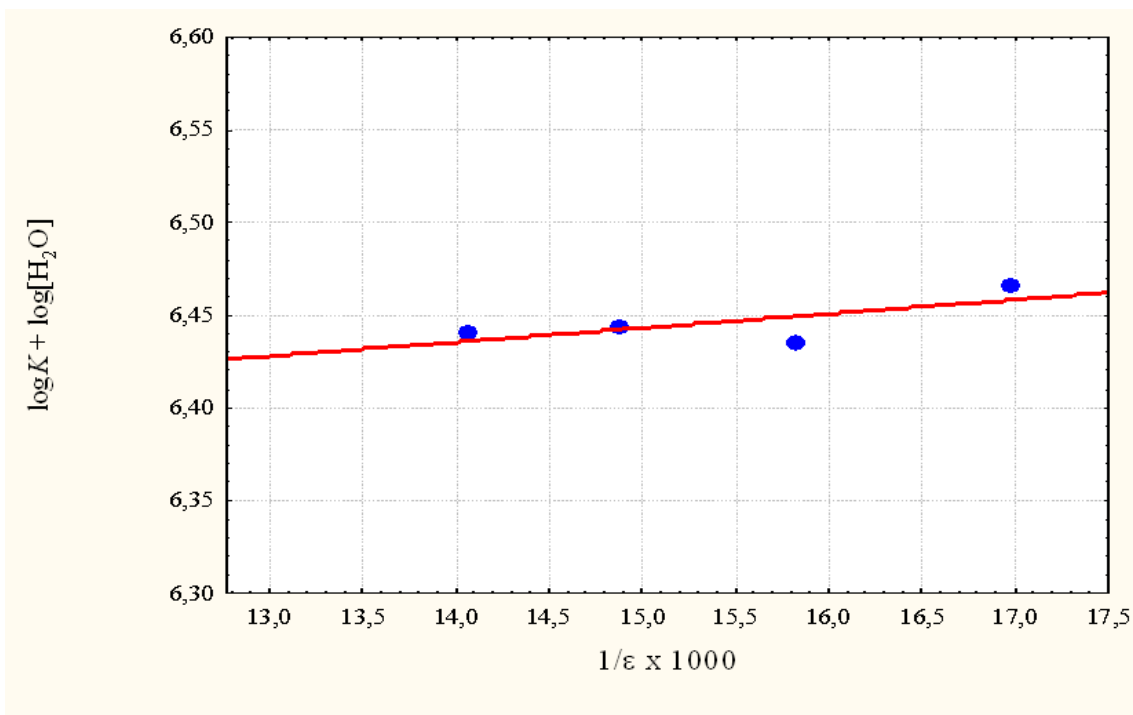
4.1.2.4. A piroxikám és tenoxikám analóg szubsztituált fenil-származékainak titrálása

Az előállított molekulák protonálódási állandóit gyenge oldékonyságuk, viszont jó UV elnyelésük és UV spektrumuk erős pH-függésének következtében UV-pH titrálásokkal határoztuk meg (22. ábra).



22. ábra: A piroxikám fenil-származék UV spektrumának pH függése (pH = 8 → 2 savanyítás hatására a spektrum maximuma hipszo- és batokrom eltolódást szenved)

A *p*-Cl, *m*-CF₃ és *p*-CF₃ szubsztituált piroxikám fenil-származékok leghígabb mérhető jellel rendelkező oldatában (5 μM) is a savas tartományban csapadékkiválást tapasztaltunk, ezért a vegyületek titrálását különböző metanol-víz elegyekben végeztük, majd a kapott eredményeket vizes közegre extrapoláltuk a Yasuda-Shedlowsky módszer segítségével (23. ábra).



23. ábra: A piroxikám *p*-Cl-fenil-származékának oldószerrelyes titrálási adatainak vizes közegre vetítése a Yasuda-Shedlowsky extrapolációval

Mivel előállított vegyületeink savas karakterűek, ezért az előbbi ábra görbéjének lefutása pozitív meredekségű. Ugyanis az oldószerrely metanoltartalmának növelésével a közeg dielektromos állandója csökken, tehát reciproka nő (X tengely), amiben a töltésmentes protonált forma egyre jobban szeret tartózkodni, így protonálódása már egyre kevésbé savas körülmények között lezajlik, tehát $\log K'$ értéke nő.

A modellvegyületek protonálódási állandóira vonatkozó eredményeinket a 3. táblázat foglalja össze.

Szubsztituens	$\log K$ piroxikám analógok ^a	$\log K$ tenoxikám analógok ^a
H	4,81	3,89
<i>p</i> -Cl	4,67 ^b	3,77
<i>m</i> -CF ₃	4,50 ^b	3,59
<i>p</i> -CF ₃	4,40 ^b	3,53
^a Standard deviáció = 0,01 - 0,03.		
^b Yasuda-Shedlowsky extrapolációval kapott értékek		

3. táblázat: A piroxikám és tenoxikám modellvegyületek protonálódási állandói

4.1.2.5. A piroxikám és tenoxikám analógok állandóinak értelmezése

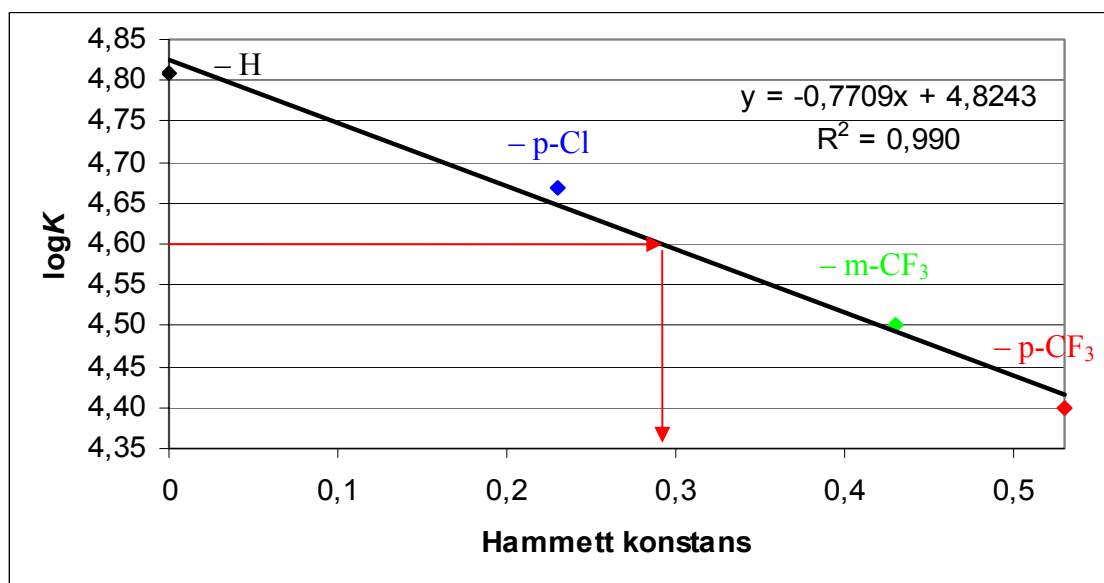
Az előállított piroxikám k^0 mikroállandóját modellező vegyületek $\log K$ értékei közül egyik sem egyezik meg a hibahatáron belül a kívánatos 4,60 értékkel, de valamennyien közel esnek hozzá (4,40-4,81), ezért a további pontosítás érdekében figyelembe vettük a Hammett közelítést.

Szubsztituált aromás vegyületek bázicitásadatainak értelmezésében segítséget nyújtanak a Hammett állandók. Egy szubsztituens Hammett konstans értékét (σ_s) definíciószerűen a következő egyenlet írja le:

$$\sigma_s = \log K_{ba} - \log K_{sba} \quad (30)$$

ahol K_{ba} a benzoésav protonálódási állandója, míg K_{sba} az adott szubsztituens tartalmazó benzoésav protonálódási állandója [177]-[179]. Ebből adódóan a benzoésav származékok és a hozzájuk tartozó Hammett konstansok közti lineáris összefüggés meredeksége + 1,00. Más molekulák esetében a meredekség ettől eltérő lehet, mely a protonálható csoport érzékenységének, és a molekulában lévő sztérikus és induktív hatások eredőjének függvénye.

Ha korreláltatjuk az előbbi molekulák fenil-szubsztituenseinek Hammett állandóit ($\sigma_H = 0,00$; $\sigma_{p-Cl} = 0,23$; $\sigma_{m-CF_3} = 0,43$; $\sigma_{p-CF_3} = 0,53$) és a megfelelő piroxikám modellvegyületek $\log K$ értékeit, akkor egy lineáris összefüggéshez jutunk (24. ábra).

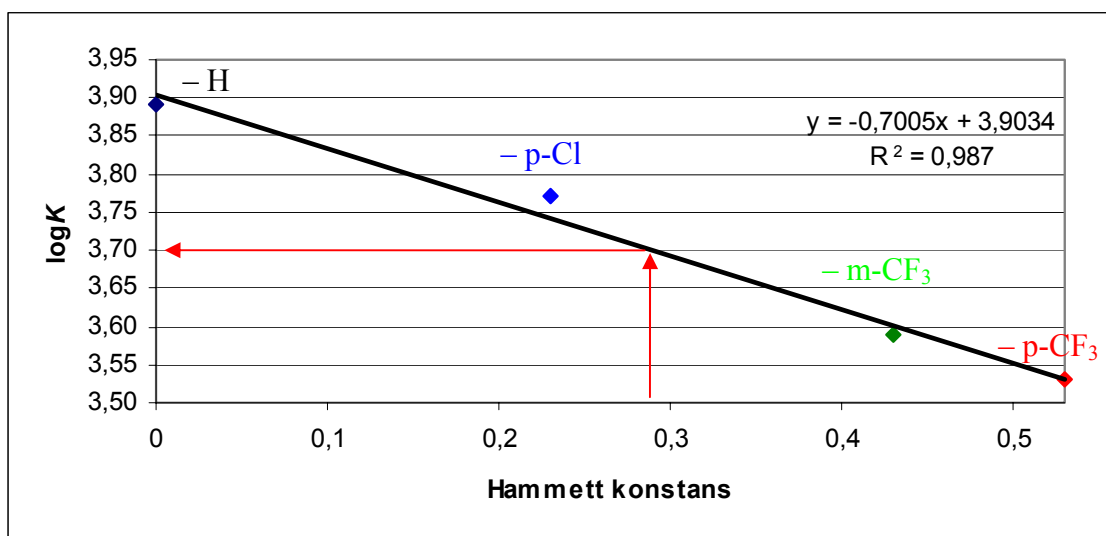


24. ábra: A piroxikám-származékok $\log K$ értékei az egyes fenil-szubsztituensek Hammett konstansai függvényében

Az R^2 determinációs koefficiens 1-hez közeli értéke (0,990) is alátámasztja a Hammett konstans protonálódási állandókból való származtatásának jogosságát.

A piroxikám-származékokra kapott összefüggés egyenletébe a 4,60-es értéket behelyettesítve ($\log k^0$) a Hammett konstansra 0,29-es értéket kapunk (24. ábrán piros nyíl mutatja a behelyettesítést). Ez az érték tehát egy olyan szubsztituens Hammett konstansa, mely szubsztituens tartalmazó piroxikám-származék a piroxikám 2-piridilcsoportjával megegyező elektronvonzó sajátást közvetít a molekula enolátcsoportjára nézve. Eredményeink jó egyezést mutatnak Katritzky és mtsai munkájával, akik a piridil gyűrű szigma értékére 0,268-at mértek infravörös intenzitási mérések alapján [180].

A piroxikám és a tenoxikám közti nagy szerkezeti analógia alapján egy 0,29-es Hammett szigmájú szubsztituens tartalmazó tenoxikám fenil-származék állandója a tenoxikám k^0 mikroállandójára jó közelítést ad. Tenoxikám-származékokat is szintetizáltunk, meghatároztuk protonálódási állandóikat, majd tenoxikám esetére is felrajzoltuk az előbbiekkal analóg ábrát:

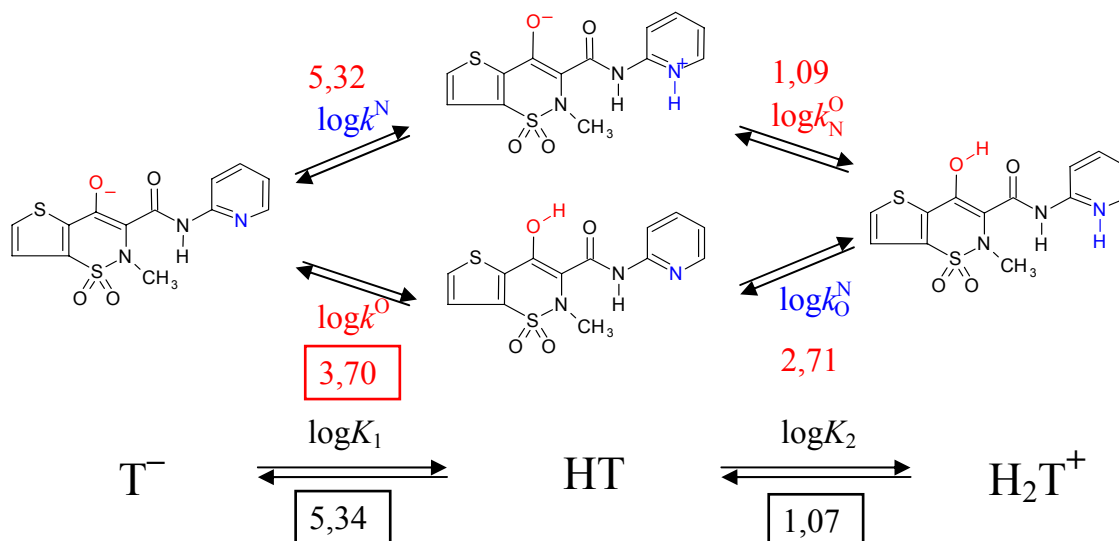


25. ábra: A tenoxikám-származékok $\log K$ értékei az egyes fenil-szubsztituensek Hammett konstansai függvényében

A tenoxikám fenil-származékok $\log K$ értékei és a fenil-szubsztituensek Hammett konstansai közti összefüggés is $R^2 > 0,98$ értékkel jellemezhető. A 0,29-es σ érték 3,70-es $\log K$ értéket jelölt ki (piros nyílak), mely $\pm 0,03$ bizonytalanságot hordoz magában (standard deviáció).

4.1.2.6. A tenoxikám összes mikroállandójának kiszámítása

A három független adat (2 makroállandó és egy mikroállandó), valamint a makro- és mikroállandók közötti összefüggések ((17) - (18)-as egyenletek) segítségével kiszámítottuk a tenoxikám összes mikroállandóját, melyet a 25. ábra szemléltet.



26. ábra: A tenoxikám makro- és mikroállandói a mikrospeciációs sémán feltüntetve. A három független adat: 2 makroállandó [126] és a $\log k^O$ mikroállandó (keretben)

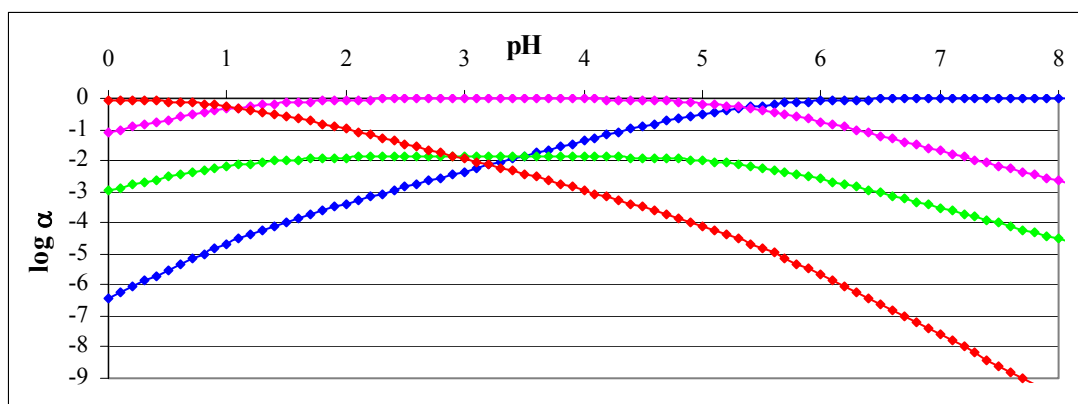
A piroxikám és a tenoxikám mikroállandóiból kiszámíthatjuk a két molekula kölcsönhatási paraméterét is. Ez a piroxikámnál 2,68-nak, míg a tenoxikámnál 2,61-nek adódott (4. táblázat), mely igazolja, hogy az itt bemutatott gondolatmenettel hasonló eredményeket kapunk homológ szerkezetű molekulákra, mint a klasszikus deduktív módszerrel.

Mikrokonstans	Piroxikám ^a	Tenoxikám
$\log k^N$	5,40	5,32
$\log k^O$	4,60	3,70
$\log k_N^O$	1,92	1,09
$\log k_O^N$	2,72	2,71 ^b

^a Takács-Novák és mtsai [68] eredménye *O*-metilpiroxikám modellvegyülettel

4. táblázat: A piroxikám és a tenoxikám mikroállandóinak összefoglalása. Pirossal a kölcsönhatási paraméter értékei láthatók

A mikroállandók lehetővé tették, hogy a pH függvényében bemutassuk a mikrorészecskék eloszlását:



27. ábra: A tenoxikám mikrorészecskéinek eloszlása a pH függvényében (kationos, ikerionos, töltésmentes, anionos mikrorészecske)

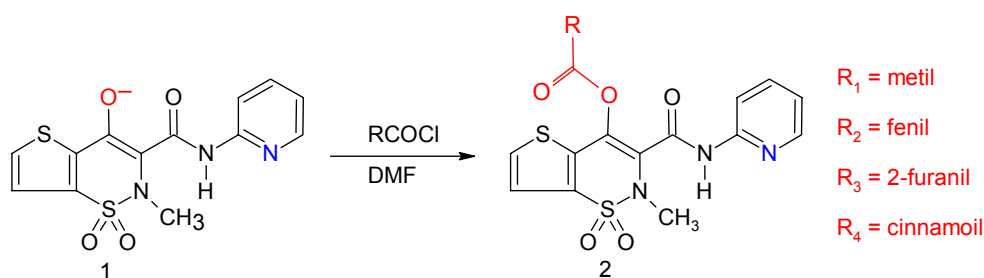
Jól látható az ikerionos forma dominanciája a töltésmentes felett, valamint a molekula enolcsoportjának erősen savas jellege, melynek eredményeként a kationos forma csak annyira savas közegben fordul elő dominánsan, mely az éhes gyomor pH egyes esetétől eltekintve ($\text{pH} \approx 1$) szervezetünk egyéb kompartmentjeire nem jellemző.

4.2. A tenoxikám szerkezetének újszerű módosításai

A tenoxikám mikrospeciációjához szükséges modellvegyületek szintéziséhez kidolgozott reakciók során többféle, az irodalomban még nem közölt szerkezet előállítását is megvalósítottuk. Ez a fejezet tömören összefoglalja a szintézisek eredményeit. A vegyületek elemösszetétel-analízisét a fejezet végén lévő táblázat mutatja be.

4.2.1. Tenoxikám prodrug szerkezetek előállítása

Az *O*-metiltenoxikám nagyfokú hidrolitikus instabilitása miatt *O*-acilezett származékokat is előállítottunk (28. ábra), ahol a karbonilcsoporttól stabilitásnövekedést vártunk. Az oldalláncokat egyben úgy választottuk meg, hogy azok az 5. ábrán bemutatott piroxikám prodrug szerkezetek oldalláncaihoz hasonlítsanak.



28. ábra: Tenoxicám prodrug szerkezetek (2) előállítása tenoxicámból (1)

A képződött vegyületeket izoláltuk, szerkezetüket leírtuk, azonban nagyfokú hidrolitikus hajlamuk megmaradt, így a prodrug vegyületekkel szemben támasztott követelményeket nem tudják kielégíteni.

A szintézis leírása: tenoxicám prodrug-származékok: 0,16 g (0,5 mmól) tenoxicámot 1 ml vízmentes dimetilformamidban szuszpendáltunk és savkloriddal reagáltattuk 10 % feleslegben (0,55 mmól). A savklorid hozzáadásakor a reakcióelegyet 0 °C-on tartottuk, majd szobahőmérsékleten 3 óráig. A keletkezett O-acil-származékok csapadék formájában kiváltak a reakcióelegyből, melyet leszűrtünk, etilacetáttal vagy éterrel mostunk, majd vákuum alatt megszáritottunk.

4-O-acetiltenoxicám ·HCl: Hozam: 39 %. Sárgásfehér kristályok. OP: 208 °C. UV (metanol): 354 nm ($\log \epsilon = 3,85$), 270 nm ($\log \epsilon = 2,82$). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 2,51 (s, 3H, COCH_3), 2,89 (s, 3H, NCH_3), 7,34 (dd, J 7,2, 5,8 Hz, 1H, H-5'), 7,45 (d, J 5,1 Hz, 1H, H-7), 7,74 (d, J 8,2 Hz, 1H, H-3'), 8,04 (d, J 5,1 Hz, 1H, H-6), 8,20 (dd, J 8,2, 7,2 Hz, 1H, H-4'), 8,34 (d, J 5,8 Hz, 1H, H-6'), 8,59 (s, 1H, H-NCO), 13,50 (s, 1H, H-N⁺).

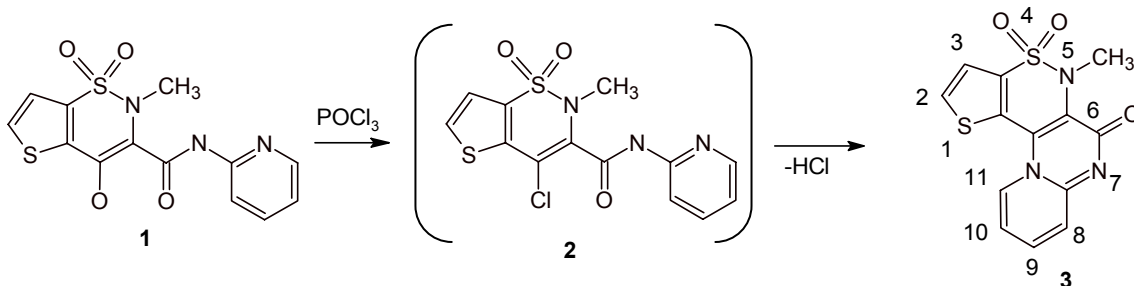
4-O-benzoiltenoxicám ·HCl: Hozam: 43 %. Sárgásfehér kristályok. OP: 199 °C. UV (metanol): 352 nm ($\log \epsilon = 3,20$), 272 nm ($\log \epsilon = 2,65$). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 2,92 (s, 3H, NCH_3), 7,41 (dd, J 7,1, 6,0 Hz, 1H, H-5'), 7,49 (d, J 5,1 Hz, 1H, H-7), 7,62 (t, J 5,2 Hz, 1H, H-4''), 7,67 (t, J 5,2 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7,83 (d, J 8,2 Hz, 1H, H-3'), 7,95 (d, J 5,2 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 8,08 (d, J 5,1 Hz, 1H, H-6), 8,25 (dd, J 8,2, 7,1 Hz, 1H, H-4'), 8,39 (d, J 6,0 Hz, 1H, H-6'), 8,51 (s, 1H, H-NCO), 13,47 (s, 1H, H-N⁺).

4-O-furoiltenoxikám ·HCl: Hozam: 24%. Sárgásfehér kristályok. OP: 184 °C. UV (metanol): 352 nm ($\log \epsilon = 3,08$), 248 nm ($\log \epsilon = 3,25$). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 2,90 (s, 3H, NCH_3), 6,66 (dd, J 3,4, 1,7 Hz, 1H, H-4''), 7,22 (dd, J 3,4, 0,9 Hz, 1H, H-3''), 7,36 (dd, J 7,2, 5,6 Hz, 1H, H-5''), 7,46 (d, J 5,2 Hz, 1H, H-7), 7,76 (d, J 8,4 Hz, 1H, H-3'), 7,92 (dd, J 1,7, 0,9 Hz, 1H, H-5''), 8,05 (d, J 5,2 Hz, 1H, H-6), 8,21 (dd, J 8,4, 7,2 Hz, 1H, H-4'), 8,36 (d, J 5,6 Hz, 1H, H-6'), 8,52 (s, 1H, H-NCO), 13,54 (s, 1H, H- N^+).

4-O-cinnamoiltenoxikám ·HCl: Hozam: 39 %. Sárgásfehér kristályok. OP: 206 °C. UV (metanol): 352 nm ($\log \epsilon = 3,28$), 272 nm ($\log \epsilon = 2,75$). ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 2,91 (s, 3H, NCH_3), 6,53 (s, 1H, H-1''), 7,18 - 7,27 (m, 5H, H-4'', H-5'', H-6'', H-7'', H-8''), 7,38 (dd, J 6,6, 6,2 Hz, 1H, H-5'), 7,47 (d, J 5,2 Hz, 1H, H-7), 7,79 (d, J 8,6 Hz, 1H, H-3'), 7,95 (s, 1H, H-2''), 8,08 (d, J 5,2 Hz, 1H, H-6), 8,23 (dd, J 8,6, 6,6 Hz, 1H, H-4'), 8,39 (d, J 6,2 Hz, 1H, H-6'), 8,54 (s, 1H, H-NCO), 13,50 (s, 1H, H- N^+).

4.2.2. COX-2 szerkezetű tenoxikám-származékok szintézise

Az enolos hidroxilcsoportot klórra cseréltük le, melynek eredményeként a reakció nem állt meg a klórszármazéknál, hanem a 29. ábra szerint sósav molekula kilépése közben egy új tetraciklusos származékhoz jutottunk.

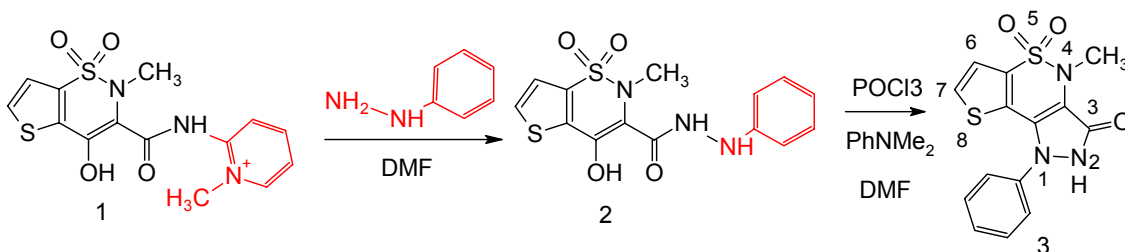


29. ábra: A tenoxikám (1) klórozása (2: klórt tartalmazó intermedier, 3: új tetraciklus)

A szintézis leírása: új tetraciklus: (5-Metil-5H,6H-pirido[2',1':2,3]pirimido[5,4-c]tieno[2,3-e] [1,2]tiazin-6-on 4,4-dioxid): 0,34 g (1 mmól) tenoxikámot 1 ml foszforilkloridban oldottunk és olajfürdőn 100 °C-on 3 órán át N_2 atmoszféra alatt melegítettük. Az elegyet lassan 15 ml vízre öntöttük, a csapadékos elegyet Na_2CO_3 -oldattal semlegesítettük, majd szűrtük vízlégszivattyú segítségével, és alaposan vízzel

mostuk. Szobahőmérsékleten történő szárítás után etanolból átkristályosítottuk a terméket. Hozam: 0,18 g (56 %). Sárgászöld csapadék. OP: 256 - 258 °C. UV (metanol): 352 nm ($\log \epsilon = 3,88$), 260 nm ($\log \epsilon = 3,52$). IR (KBr mátrix): 1638w, 1615w, 1333m, 1166m. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 3,05 (s, 3H, NCH_3), 7,20 (d, J 5,1 Hz, 1H, H-3), 7,35 (dd, J 8,6, 1,2 Hz, 1H, H-8), 7,69 (d, J 5,1 Hz, 1H, H-2), 7,88 (ddd, J 7,6, 6,7, 1,7 Hz, 1H, H-10), 8,37 (ddd, J 8,6, 6,7, 1,7 Hz, 1H, H-9), 9,07 (dd, J 7,6, 1,7 Hz, 1H, H-11). QP-MS: 319.

Az előző konstitutív gyűrűzáródási reakciót úgy módosítottuk, hogy kiindulási terméke a tenoxikám helyett annak fenilhidrazin-analógja legyen. Ez utóbbit a 5.1.2.1. fejezetben ismertetett D módszer segítségével állítottuk elő, anilin helyett fenilhidrazint használva. A reakció végterméke egy új triciklusos gyűrűrendszer lett:



30. ábra: Új, tenoxikám eredetű triciklus előállítás (3). (1: *N*-metilténnoxikám, 2: fenilhidrazin-analóg)

A szintézis leírása: *fenilhidrazin-analóg (4-Hidroxi-2-metil-2H-tieno[2,3-e][1,2]tiazin-3-karbonsav 2-fenilhidrazid 1,1-dioxid):* 1,20 g (3,4 mmól) *N*-metilténnoxikámot 10 ml DMF-ban szuszpendáltunk, 0,67 ml (6,8 mmól) fenilhidrazint adtunk az elegyhez, és 8 órán keresztül 100 °C-os olajfürdőben melegítettük N_2 atmoszféra alatt. Az elegyet hűtés után 40 ml vízzel hígítottuk, melynek hatására barnássárga olajos termék vált ki. Az oldószer dekantálása után a maradékot 20 ml kloroformban oldottuk és 5 %-os HCl-oldattal (3×10 ml) és vízzel mostuk (2×10 ml), Na_2SO_4 felett megszáritottuk, szénnel derítettük, és vákuum alatt bepárooltuk. A maradékot etanolból kristályosítottuk át. Hozam: 57 %. Fehér kristályok. OP: 248 - 249 °C. UV: (metanol): 420 nm ($\log \epsilon = 4,10$), 298 nm ($\log \epsilon = 3,78$). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 3,02 (s, 3H, NCH_3), 7,16 - 8,38 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7,41 (d, J 5,4 Hz, 1H, H-7), 7,88 (d, J 5,4 Hz, 1H, H-6), 8,83 (s, 1H, H-NCO), 13,86 (s, 1H, H-NPh).

Új triciklusos vegyület (1-Fenil-4-metil-1,4-dihidropirazolo[4,3-c]tieno[2,3-e][1,2]tiazin-3(2H)-on 5,5-dioxid): Az előbbi fenilhidrazin származék 0,7 g-ját (2 mmól) 8 ml toluolban oldottuk, majd 1 ml *N,N*-dimetilanilint és 2 ml foszforilkloridot adtunk hozzá. Az elegyet 7 órán keresztül 100 °C-os olajfürdőben melegítettük N₂ atmoszféra alatt. Hűtés után 25 ml jeges vizet adtunk a reakcióelegyhez, majd 22 ml toluollal hígítottuk. A fázisokat elválasztottuk. A vizes fázist pH = 3-ra állítottuk cc. NH₃-oldattal és 3 × 15 ml kloroformmal kiráztuk. A kombinált szerves fázisokat 10 % -os Na₂CO₃-oldattal (2 × 10 ml) és vízzel (2 × 10 ml) mostuk, Na₂SO₄ felett megszáritottuk, szénnel derítettük, és vákuum alatt bepároltuk. A maradékot szilikagél oszlopon tisztítottuk etilacetát : diklórmétán 1 : 1 elegyében. A nyers terméket *i*-propanolból átkristályosítottuk. Hozam: 0,31 g (47 %). Sárga csapadék. OP: 209 - 211 °C. UV (metanol): 362 nm (log ϵ = 4,22), 265 nm (log ϵ = 4,06). IR (KBr mátrix): 3253 w , 1648 w , 1623 m , 1336 m , 1157 m . ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3,17 (s, 3H, NCH₃), 6,66 - 7,10 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7,45 (d, *J* 5,1 Hz, 1H, H-6), 7,71 (d, *J* 5,1 Hz, 1H, H-7), 9,75 (s, 1H, H-N). QP-MS: 333.

Az új triciklus a szelektív COX-2 szerek (koxibok) szerkezetével mutat nagy hasonlóságot (8. ábra). Az alapmolekula *in vitro* sejtmigráció-gátló hatással rendelkezett, mely bizonyítja, hogy képes a COX-2 izoenzimhez kötődni. Mivel a tenoxikám – ellentétben a koxibokkal – nem rendelkezik kardiovaszkuláris mellékhatással, ezért érdemes a jövőben megvizsgálnunk, hogy a keletkezett termék egyesíti-e a termékbiztonságosságot a COX-2 szelektív szerek speciális alkalmazási lehetőségeivel.

A vegyületek kalkulált és mért elemösszetételét az 5. táblázat mutatja be.

Vegyület	C % _{szám}	H % _{szám}	N % _{szám}	C % _{mért}	H % _{mért}	N % _{mért}
4- <i>O</i> -acetilten.	47,48	3,45	11,08	47,19	3,35	11,17
4- <i>O</i> -benzoilten.	54,41	3,42	9,52	54,42	3,40	9,53
4- <i>O</i> -furoilten.	40,11	3,04	9,74	50,40	3,09	9,60
4- <i>O</i> -cinnamoilten.	56,52	3,67	8,99	56,32	3,59	8,78
tetraciklusos vegy.	48,89	2,84	13,16	48,81	2,72	13,20
fenilhydr.-analóg	47,85	3,73	11,96	48,12	3,52	11,99
triciklusos vegy.	50,44	3,33	12,60	50,28	3,20	12,66

5. táblázat: A tenoxikámból előállított új szerkezetek elemösszetétel adatai

4.3. Béta-laktám alapvázak protonálódási sajátságainak vizsgálata

A béta-laktám alapvázak sav-bázis tulajdonságainak vizsgálatát a protonálódási makroállandók meghatározásával kezdtük, majd deduktív módszerrel a csoportspecifikus állandókat határoztuk meg.

4.3.1. Béta-laktám alapvázak protonálódási makroállandói

Mivel a 6-aminopenicillinsav (6-APA) és a 7-aminokefalosporánsav (7-ACA) (12. ábra) bomlékony molekulák (14. ábra) és második protonálódási állandójuk logaritmusai az előzetes adatok alapján (2. táblázat) 2-es érték környékén várható, ezért potenciometrikus titrálások mellett NMR-pH titrálással is meghatároztuk protonálódási makroállandóikat. Eredményeinket a 6. táblázat tartalmazza.

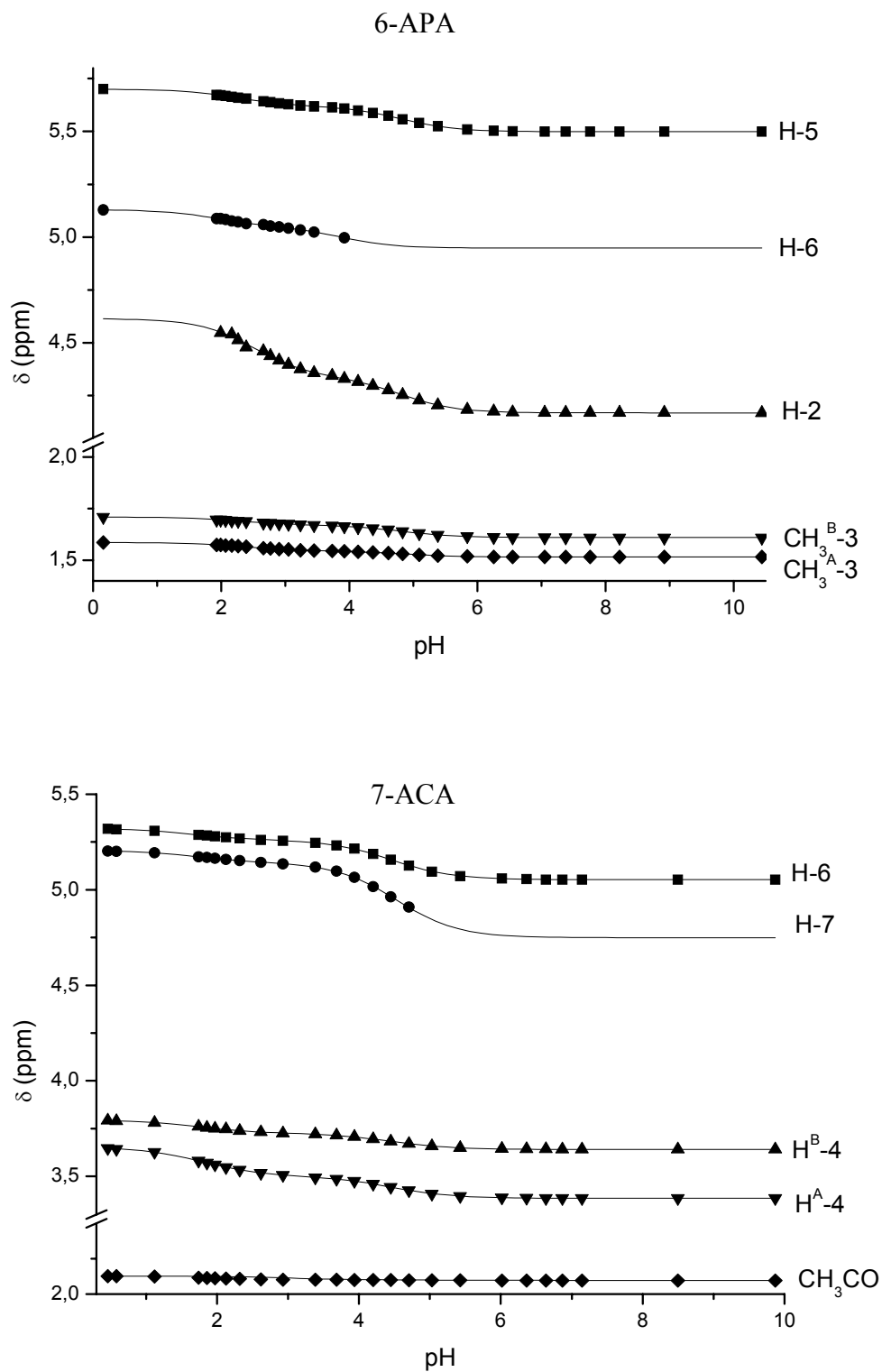
Konstans	6-APA		7-ACA	
	Potenciometria	NMR-pH	Potenciometria	NMR-pH
$\log K_1$	$4,69 \pm 0,01$	$4,80 \pm 0,02$	$4,47 \pm 0,01$	$4,47 \pm 0,01$
$\log K_2$	$2,29 \pm 0,01$	$2,37 \pm 0,03$	–	$1,78 \pm 0,01$

6. táblázat: A béta-laktám alapvázak potenciometriás és NMR-pH titrálás nyomán kapott makroállandói

Láthatjuk, hogy 6-APA esetén a két módszer eredményei között 0,1 egységnyi eltérés mutatkozik, ami még mindig sokkal kisebb érték, mint az irodalmi eredmények közti különbségek. A 6-APA esetén a potenciometriával kapott állandókat megbízhatóbbnak találtuk kisebb szórásuk miatt. A különbség onnan eredhet, hogy az NMR-pH titrálás egyik legfontosabb NMR aktív magja, a 6-os szénhez kapcsolódó H jelét jelentős pH tartományban nem tudtuk követni, mivel az a vízjel alá csúszott be (31. ábra). A hiba kiküszöbölésére a mikroállandók mérése során 2D NMR technikát vezettünk be.

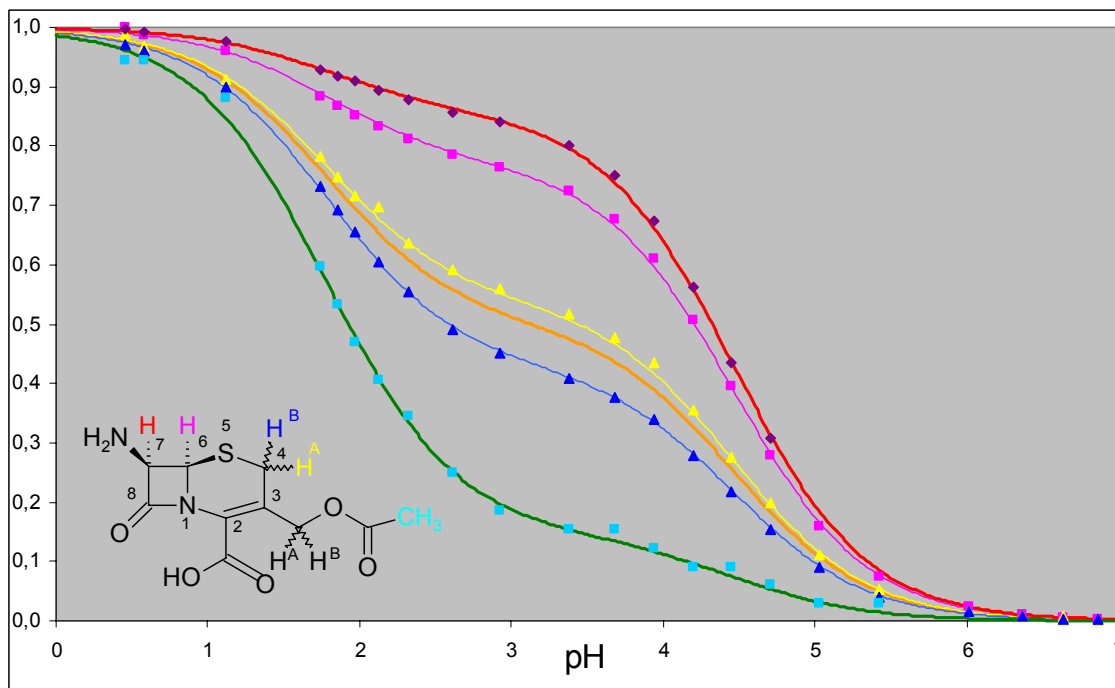
7-ACA esetén már egyértelműen látszik a potenciometriának az 1.2.2.1. fejezetben bemutatott korlátja: a 2-es alatti $\log K$ értékre még csak közelítő eredményeket sem tudunk mérni, míg az NMR-pH-val meghatározott érték szórása rendkívül jónak mondható. Az összes NMR titrálási pontra az Opium program

segítségével egyidejű illesztést végeztünk, mely tovább növelte az állandók megbízhatóságát.



31. ábra: A 6-APA és 7-ACA ¹H NMR-pH görbái számítógépes illesztéssel

Láthatjuk, hogy egyik molekula esetén sem találkozhatunk egylépcsős titrálási görbével, amit még szemléletesebben mutat a 32. ábra, ahol a 7-ACA titrálási görbéinek normált (Bjerrum-féle \bar{n} jellegű, 1-be torkolló) formája látható.



32. ábra: A 7-ACA ^1H NMR-pH titrálási görbéi normálás után

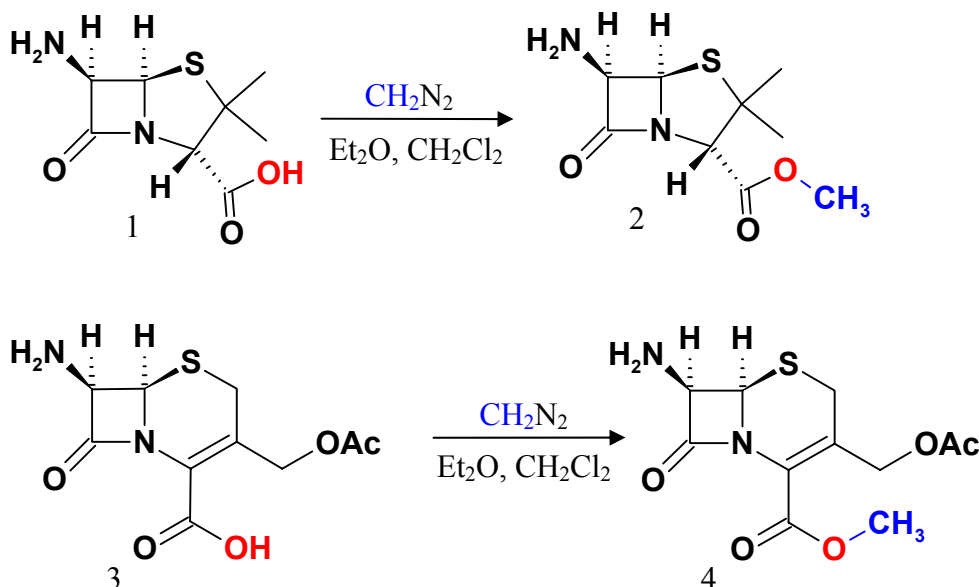
A narancssárga vonallal jelzett Bjerrum-görbe a molekula átlagos protonáltságát mutatja a pH függvényében. A Bjerrum-görbe feletti magok a bázikusabb csoport protonálódására érzékenyebbek, míg a görbe alatti magok a savasabbéra. Láthatjuk, hogy 7-ACA esetén a H-7 mag képes legszelektívebben jelezni az aminocsoport protonálódását, míg a karboxilát protonálódására a metilcsoport jeleinek követése a legalkalmasabb. Ha az előbbi két magot szelektívnek feltételezzük, akkor a Sudmeier és Reilly összefüggés ((26)-os egyenlet) $C_{k,0}$ értéke 0 vagy 1 lesz, így a protonáltsági móltörtből közvetlenül következtethetünk csoportspecifikus protonálódási arányokra. A piros és a zöld görbéket úgy rajzoltuk fel, hogy az előbbi két mag titrálási pontjaira illeszkedjenek. A görbe paramétereiből leolvashatjuk, hogy $\log k^N = 4,40$, illetve $\log k^O = 3,63$ lenne, azaz az első protonálódási lépcsőben 85,5 %-ban az aminocsoport, 14,5%-ban a karboxilát protonálódik, a második lépcsőben pedig fordítva. Természetesen a valóságban, mivel a görbék közül egyértelműen látszik, hogy nem szelektív magokat írunk le, az előbb leírt állandók és százalékok csak határértékek. A virtuális szelektív magok

görbái a piros felett, illetve a zöld görbe alatt futnának. Csak annyi bizonyos, hogy a $\log k^N$ értéke minimum 4,40 (maximum 4,47, ami a $\log K_1$ -gyel egyezik meg), a protonálódás első lépcsőben minimum 85,5 %-ban az aminosoporton játszódik le.

A kellőképpen szelektív magok hiánya, főként pedig a csoportok jelentősen eltérő (bár így is szokatlanul közel eső) bázicitása miatt tehát elkerülhetetlen volt, hogy a mikroállandók meghatározásához származékokat képezzünk.

4.3.2. A béta-laktám alapmolekulák mikroállandóinak meghatározása

A deduktív módszerrel történő mikroállandó meghatározáshoz a legkézenfekvőbb megoldást, a karboxilcsoport metilészterré történő átalakítását alkalmaztuk (33. ábra).



33. ábra: 6-APA (1) és 7-ACA (3) metilészterekké alakítása (2: 6-APA-metilészter, 4: 7-ACA-metilészter)

A szintézis leírása: *O-metil-6-aminopenicillánát:* 1,00 g (4,6 mmól) 6-APA-at 5 ml diklórmétánban szuszpendáltunk. Arndt előirata szerint [181]-[182] frissen elkészített diazometán 0,29 g-jának (7,0 mmól) 10 ml-nyi száraz éteres oldatát adagoltuk az elegyhez, majd 18 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük [183]. A reakciót VRK rétegen követtük (benzol : metanol 4 : 1 oldószer, ninhidrin előhívó reagens). A kivált csapadékot szűrtük, éterrel mostuk (3×10 ml), majd az egyesített

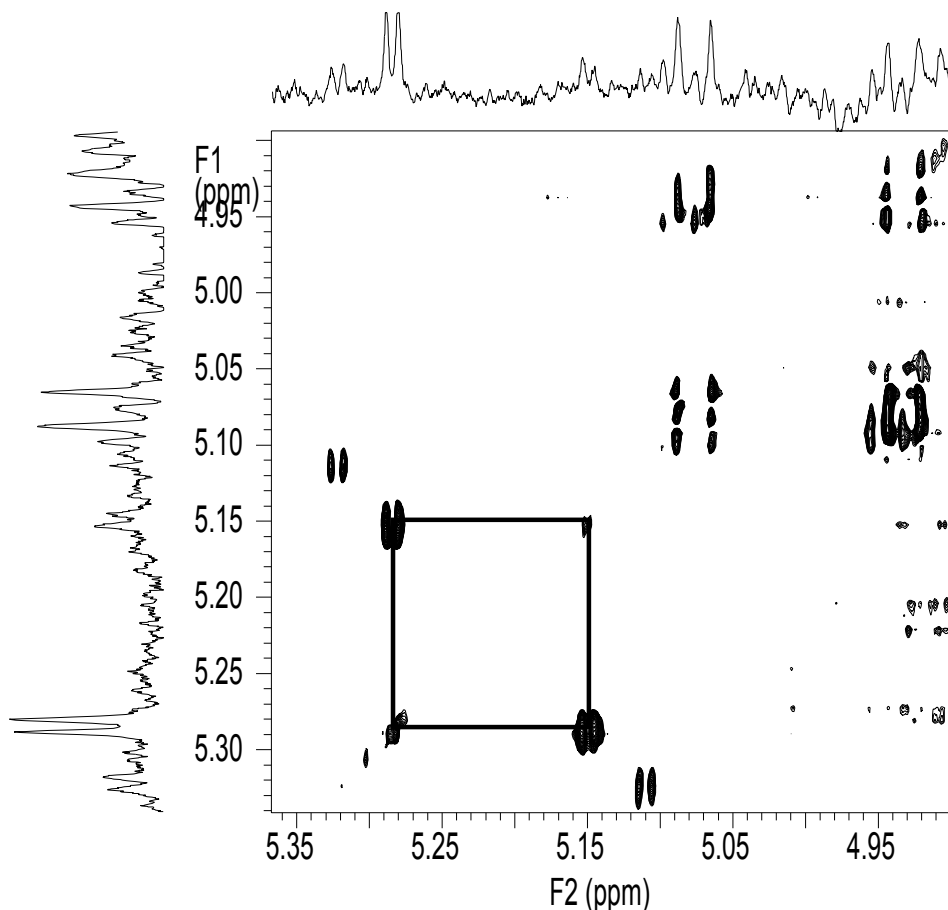
éteres részt vákuum alatt bepároltuk. A maradékot 15 ml diklórmetánban oldottuk, majd 2×5 ml vízzel kiráztuk a vízőldékony szennyezések eltávolítása céljából. A diklórmetános oldatot Na_2SO_4 felett megszáritottuk és vákuum alatt bepároltuk. Hozam: 0,38 g (36 %). Halványsárga csapadék. OP: 47 - 49 °C. ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1,41 (s, 3H, $\text{CH}_3^{\text{A}}-3$), 1,57 (s, 3H, $\text{CH}_3^{\text{B}}-3$), 2,17 (brs, 2H, NH_2), 3,70 (s, 3H, OCH_3), 4,28 (s, 1H, H-2), 4,59 (d, J 4,3 Hz, 1H, H-6), 5,43 (d, J 4,3 Hz, 1H, H-5); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 26,7 ($\text{CH}_3^{\text{A}}-3$), 30,5 ($\text{CH}_3^{\text{B}}-3$), 52,2 (OCH_3), 62,6 (C-6), 63,2 (C-3), 69,6 (C-2), 70,0 (C-5), 168,3 (CO-7), 178,8 (COOCH_3).

O-metil-7-aminokefalosporanát: 0,5 g (1,8 mmól) 7-ACA-at 10 ml diklórmetánban szuszpendáltunk és az éteres diazometán oldatot $1,5 \times$ feleslegben adtuk hozzá. A reakcióelegyet fénytől védve, szobahőmérsékleten 48 órán keresztül állni hagytuk állandó kevertetés mellett. A terméket a 6-APA-metilészterénél leírtak szerint tisztítottuk. 0,17 g (32 %) 7-ACA-metilészter keletkezett barnássárga, magas viszkozitású olaj formájában. Mivel a ^1H NMR spektrum mintegy 20 %-nyi szennyezést mutatott ki, ezért az olajat 1 ml diklórmetánban oldottuk és preparatív VRK oszlopon futattuk meg (Kieselgel 60 F_{254} , Merck, 0,2 mm, 20 x 20 cm) 50 ml benzol : metanol 4 : 1 futatóelegyben. A lemez egyik oldalát ninhidrinnel hívattuk elő, melynek segítségével 4 foltot tudtunk megkülönböztetni ($R_f = 0,42, 0,52, 0,57$ és $0,63$). Az elvált foltokat lekapartuk a lemezről, diklórmetánban oldottuk, és NMR-rel egymás után megvizsgáltuk. Az $R_f = 0,42$ -es folt gyakorlatilag tiszta 7-ACA metilészternek bizonyult, míg a többi számos bomlásterméket tartalmazott. A terméket fagyasztószekrényben egy hónapig tárolhattuk jelentős degradáció nélkül. Hozam: 0,13 g (23 %). Sárga olaj. ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2,03 (s, 3H, CH_3CO), 3,47 (d, J 18,2 Hz, 1H, $\text{H}^{\text{A}}-4$); 3,61 (d, J 18,2 Hz, 1H, $\text{H}^{\text{B}}-4$), 3,75 (s, 3H, OCH_3), 4,65 (d, J 13,0 Hz, 1H, $\text{H}^{\text{A}}-3'$), 4,82 (brm, 1H, H-7), 4,91 (d, J 13,0 Hz, 1H, $\text{H}^{\text{B}}-3'$), 5,00 (d, J 5,1 Hz, 1H, H-6).

4.3.2.1. A béta-laktám alapmolekulák észter-származékainak titrálása

A béta-laktám észterek titrálását kizárólag NMR-pH módszerrel vizsgáltuk, a vegyületek jelentős labilitása miatt. Az *in situ* pH jelzés segítségével a titrálás gyorsan (4 - 6 óra alatt) elvégezhető. Az alapvegyületek titrálásakor fellépett jelenség

kiküszöbölésére, miszerint bizonyos pH értékeknél az aminocsoport melletti H jel a vízjel alá csúszott 2 D TOCSY felvételeket is regisztráltunk (34. ábra). A módszert a 6-APA-metilészter esetén a H-6 mag lúgos határeltolódásának kimérésére, míg 7-ACA-metilészter esetén már az összes pH-értéken a H-7 mag kémiai eltolódásának mérésére használtuk.



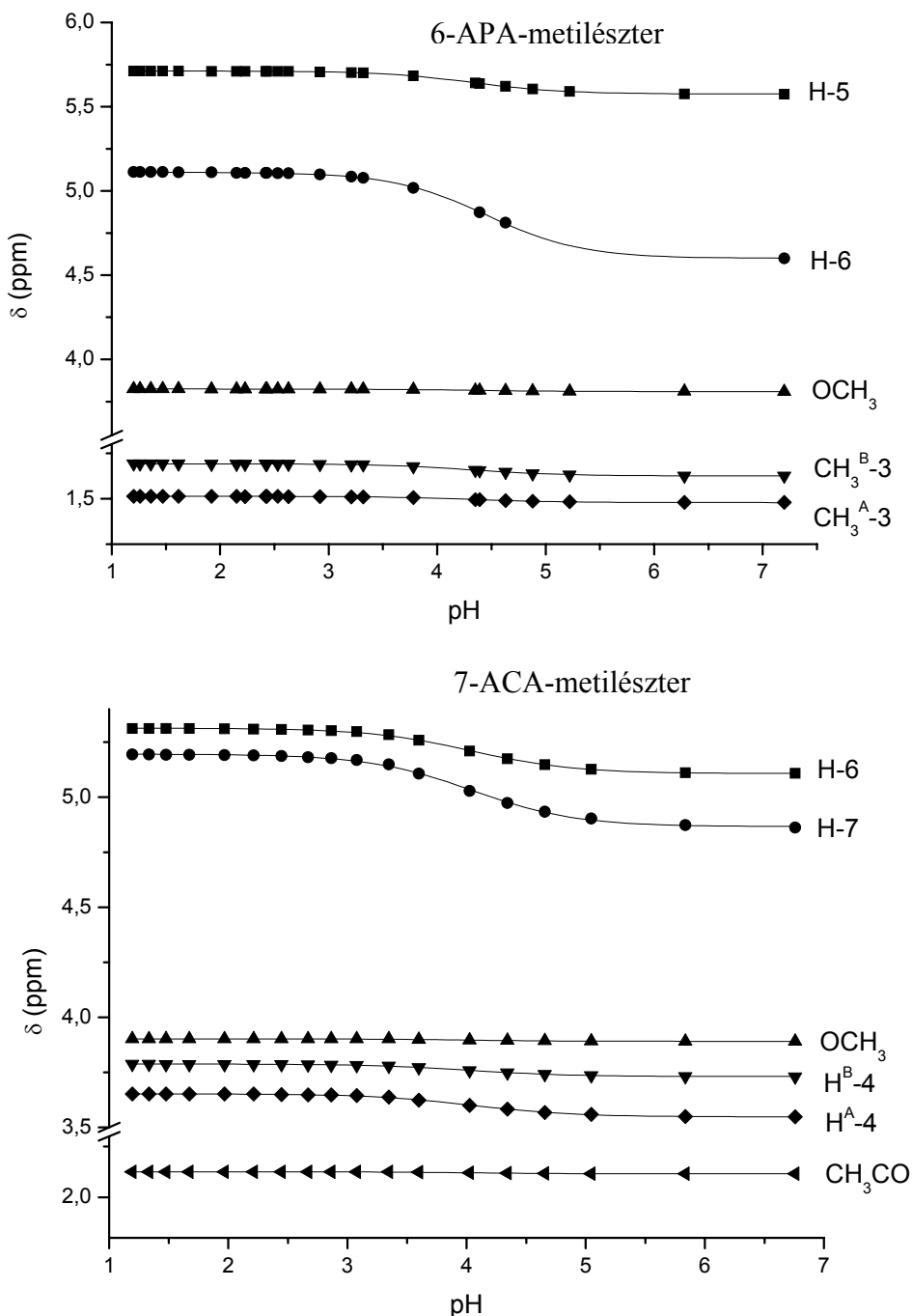
34. ábra: 7-ACA-metilészter 2D TOCSY spektruma pH = 3,35-nél

Jól láthatók, és könnyen asszignálhatók az egymással ${}^3J_{C-H}$ csatolásban lévő magok jelei, melyek a spektrumban keresztcsúcsot adnak. Máskülönben 1D spektrumból (felső vagy baloldali projekció) a vízelnyomás miatti csökkent jelintenzitások, a növekedett alapzaj, valamint a bomlástermékek jelenléte miatt a H-7 jele nehezen azonosítható.

Más módszerrel, így HSQC spektrumokkal is megoldható az előbbi probléma, bár a parciális degradációs termékek C-H jelei is keresztcsúcsokat adnának, és a skaláris csatolási állandó hiányában az azonos molekulához tartozó vicinális CH-CH

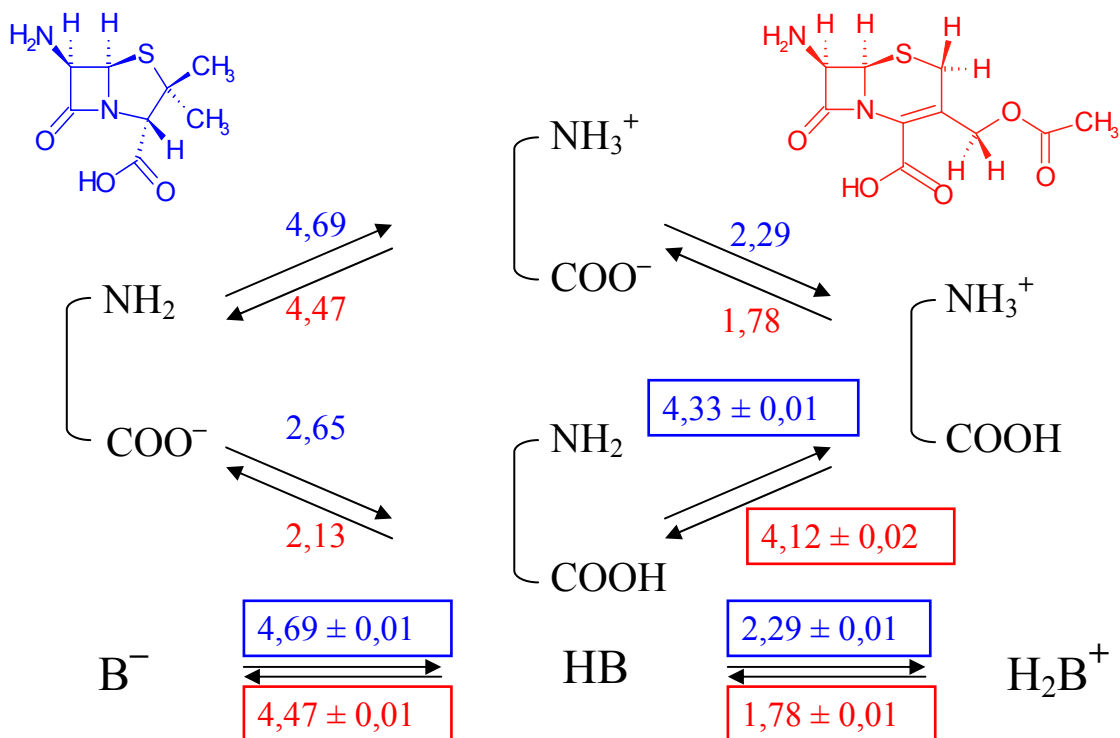
fragmensek (ép molekula, degradációs termék) azonosítása nem lehetséges. Ennek kiküszöbölésére további HMBC spektrumokra van szükség, majd a kétféle spektrumot korrelálni kell a $^3J_{C-H}$ heteronukleáris csatolás alapján. HSQC és HMBC spektrumok felvétele számos pH értéknél egy titrálás során azonban sokkal időigényesebb, mint a relatíve gyors TOCSY.

Az észterek titrálási görbéit a 35. ábra mutatja be.



35. ábra: 6-APA-metilészter és 7-ACA-metilészter 1H NMR-pH görbéi számítógépes illesztéssel

A görbék értelemszerűen egy lépcsőt tartalmaznak, melyekre az Opium program segítségével történő együttes illesztéssel a következő ábrán szemléltetett protonálódási állandó értékeket kaptuk, amik megegyeznek a megfelelő béta-laktám alapmolekula $\log k_0^N$ értékével.



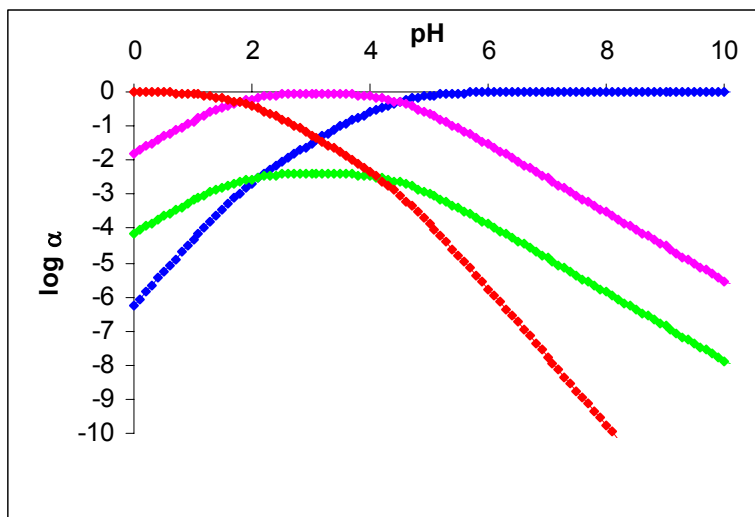
36. ábra: A béta-laktám alapvázak protonálódási sajátságainak összefoglalása (kékkel: 6-APA, pirossal: 7-ACA, bekeretezve: mért értékek)

4.3.2.2. A béta-laktám alapmolekulák protonálódási sajátságainak értelmezése

A protonálódási makroállandók is a béta-laktám molekulák szokatlan bázicitását mutatják. A molekulák legbázikusabb formái is csak $pH = 5$ alatt vesznek fel protont, ami felettből szokatlan nem-aromás primer aminocsoportot tartalmazó molekuláktól. A jelenség a béta-laktám gyűrűrendszer különleges tulajdonságainak következménye. Mikroállandók szintjén 7-ACA esetében az aminocsoporthoz $\log k_0^N = 4,12$ érték tartozik, ami tudomásunk szerint az összes ismert, természetes vegyületre vonatkozó irodalmi adat vonatkozásában is, a legkevésbé bázikus nem-aromás aminocsoportot jelenti.

Eredményeink alapján a penicillán és kefalosporán alapváz elektronvonzó sajátosságai igen nagy hasonlóságot mutatnak, ugyanis a két molekula kölcsönhatási paramétere lényegében megegyezik (6-APA: $4,69 - 4,33 = 2,65 - 2,29 = 0,36$, 7-ACA: $4,47 - 4,12 = 2,13 - 1,78 = 0,35$ logaritmusos egységekben).

A mikrorészecskék segítségével kiszámíthatjuk a mikrorészecskék pH-függő eloszlását, amit a 37. ábra mutat, a 7-ACA molekulára nézve logaritmusos formában.



37. ábra: A 7-ACA mikrorészecskéinek eloszlása a pH függvényében (kationos, ikerionos, töltésmentes, anionos mikrorészecske)

A domináns protonálódási útvonal az ikerionos formán keresztül vezet, a 6-APA esetében 99,1 %-ban, míg a 7-ACA esetén 99,5 %-ban. Láthatjuk, hogy a protonálódás gyakorlatilag teljes mértékben a savas tartományban zajlik le, és 7-es pH értéknél mindkét molekula több mint 99 %-a anionos formát ölt. Széles fiziológiai pH tartományban ($\approx 4,5 < \text{pH}$) a molekulák kétfogú proton akceptorként viselkednek.

5. Következtetések

Az értekezés célkitűzései között szerepelt:

1.) A tenoxikám, a 6-aminopenicillánsav (6-APA) és a 7-aminokefalosporánsav (7-ACA) sav-bázis tulajdonságainak vizsgálata makroszkopikus és mikroszkopikus szinteken. A gyógyászatban rendkívül fontos szerepet betöltő előbbi molekulák szokatlan bázicitású csoporttal rendelkeznek, és mikroszkopikus protonálódásukat még nem jellemezték megfelelő pontossággal.

2.) Új deduktív módszer kifejlesztése a tenoxikám mikroegyensúlyainak jellemzésére, mely más módszerekkel nem vizsgálható.

3.) A tenoxikám, a 6-APA és a 7-ACA megfelelő származékainak előállítása, melyek az eredeti molekulák megbízható mikrospeciációját teszik lehetővé.

4.) Tenoxikám származékok szintézise, melyek prodrug szerkezeti elemeket tartalmaznak, illetve olyan származékok előállítása, melyek a COX-2 izoenzimre szelektív szerek szerkezeti sajátosságait hordozzák magukon.

A kísérleti munkánk során a következő módszereket alkalmaztuk: pH-potenciometria, ^1H NMR és ^{13}C NMR spektroszkópia és ^1H NMR-pH titrálás, UV/VIS spektroszkópia és UV-pH titrálás, 2D NMR TOCSY és NOESY spektroszkópia, ^1H NMR vízelnyomásos technikák, *in situ* NMR pH meghatározás, vékonyréteg kromatográfia, elemanalízis, tömegspektrometria, IR spektroszkópia, Yasuda-Shedlovsky-féle oldószerkegyes pH-potenciometria. Az eredmények kiértékeléséhez Opium, Mestre-C, Origin, RefinementPro™ programokat használtunk, az állandó ionerősség és a megfelelő oldatösszetétel biztosításához szükséges beméréseket részben a PROTCSIM szoftver segítségével terveztük meg.

Az értekezés eredményei a következők:

Összesen 28 kémiai entitást állítottunk elő, azonosítottunk és jellemeztünk olvadáspont, UV- és NMR spektrumuk segítségével. 8 vegyület piroxikám- és tenoxikám-származék volt, 5 tenoxikám prodrug szerkezetű új kémiai entitás, 2 vegyület pedig új heterociklusos gyűrűrendszert tartalmazott, melyek COX-2 izoenzim kötő szerkezeti elemekkel rendelkeztek. 6-APA- és 7-ACA-metilészter származékokat is előállítottunk. A többi molekula az előbbi vegyületek intermedierje volt, többek

között a tenoxikám hidrolitikus terméke, mely ép tieno-tiazin biciklusos gyűrűrendszert tartalmazott.

A Hammett konstansokat, mint a mikrospeciáció módszertanában eddig még nem alkalmazott paramétereket, sikeresen alkalmaztuk a tenoxikám mikroegyensúlyainak meghatározása során. Az általunk meghatározott tenoxikám mikroállandók azt mutatták, hogy a korábbi megközelítésekkel kapott állandók mintegy fél nagyságrendnyi hibával terheltek. Az általunk meghatározott tenoxikám mikroállandó értékek ($k^N = 3,32$, $k^O = 3,70$, $k_O^N = 2,71$, $k_N^O = 1,09$ és a megfelelő kölcsönhatási paraméter = 2,61; minden adat logaritmikus egységben) azt jelzik, hogy az enolátsoport rendkívül gyenge bázicitással bír egy átlagos enoláthoz képest, amit a különös gyűrűrendszernek és heteroatomjainak erős elektronvonzó sajátosságainak tulajdoníthatunk.

A 6-APA és a 7-ACA mikrospeciációját is megvalósítottuk a metilészterek szintézisében, majd utóbbiak megfelelő módszerekkel történő mérésén és számolásokon keresztül. A 6-APA és 7-ACA molekulák mind a 4 aminocsoport-bázicitása szokatlanul alacsony. Legjobb tudomásunk szerint, a 7-ACA $\log k_O^N = 4,12$ értéke a legalacsonyabb irodalmi nem-aromás aminocsoport a természetes vegyületek körében. Ezek az értékek, mindazonáltal, érthetők, ha figyelembe vesszük a béta-laktám gyűrű sajátosságait, és a közeli elektronvonzó atomok hatásait.

Munkánk gyakorlati hasznosíthatóságai:

a.) A Hammett konstansokat a jövőben további vegyületcsoportok esetén is fel lehet használni mikroállandó meghatározáshoz.

b.) Tenoxikám-analógok további fejlesztésével elképzelhető, hogy olyan molekulákhoz jutunk, melyek egyesíthetik a COX-2 szelektív hatásokat.

c.) A tenoxikám, a 6-APA és a 7-ACA összes mikroállandójának ismerete nemcsak ezen molekulák részletesebb kémiai és (patho)biokémiai sajátosságainak molekuláris szintű megismeréséhez vezet, de segít abban, hogy terápiásan előnyösebb származékokat tervezhessünk.

6. Összefoglalás

A bio- és gyógyszermolekulák fizikai-kémiai tulajdonságainak ismerete nagyban hozzájárul ahhoz, hogy megértsük a hatóanyagok szerkezetbeli sorsát, a hatás molekuláris szintű mechanizmusát. Ezen belül a makroszkopikus és csoportspecifikus protonálódási állandók meghatározása rendkívül fontos terület. Segítségükkel kiszámíthatjuk a szerkezet különböző pH-jú kompartmentjeiben lévő eltérő protonáltságú, ezért eltérő farmakokinetikai és farmakodinámiás tulajdonságokkal rendelkező részecskék (mikrorészecskék) relatív koncentrációját és javíthatjuk egy-egy vegyületcsalád újabb tagjainak farmakokinetikai tulajdonságait.

Disszertációs munkám során három, szokatlan protonálódási sajátságokkal rendelkező molekula mikrospeciációját végeztük el. Megvalósítottuk a nem szteroid gyulladásgátló tenoxicám protonálódási mikroállandóinak leírását egy új, a Hammett konstansokat felhasználó deduktív módszer segítségével, melyhez a tenoxicám és piroxicám 4-4 származékát szintetizáltuk. A tenoxicám így meghatározott $\log k_{\text{N}}^{\text{O}}$ mikroállandója ismereteink szerint a legalacsonyabb enolát bázicitást mutató irodalmi paraméter, melynek értéke azonban az intramolekuláris környezet hatásaival jól értelmezhető. A kidolgozott kiértékelési eljárás alkalmas további vegyületcsoportok esetén is mikroállandó meghatározásra. Emellett a tenoxicám szerkezetének újszerű módosításával prodrug típusú vegyületeket, valamint a COX-2 izoenzim szelektív gátlására képes szerek szerkezetével rokon molekulákat állítottunk elő.

A másik két vizsgált molekula a két legfontosabb béta-laktám antibiotikum-típus alapvegyülete, a 6-aminopenicillánsav és a 7-aminokefalosporánsav volt. A bomlékony molekulák vizsgálatában 1D és 2D NMR technikákat kombináltunk *in situ* pH meghatározási módszerekkel. A 7-ACA aminocsoportjának egyik így feltárt protonálódási állandója ($\log k_{\text{O}}^{\text{N}} = 4,12$) ismereteink szerint a legkevésbé bázikus nem-aromás aminocsoport a természetes vegyületek körében.

6.1 Summary

The physico-chemical properties of bio- and drug molecules greatly influence their interactions in the body and strongly effect the mechanism of drug action. Among these properties, macroscopic and site-specific protonation constants are of crucial importance. Latter one is the tool to calculate the relative concentration of the various microspecies in the compartments of the body at different pH values, and also, it is the versatile parameter to improve the pharmacokinetic properties of a new molecule in a particular family of drugs.

In the present thesis work, the microspeciation of three molecules of great pharmaceutical importance and unusual acid-base properties, were carried out. The microconstants of tenoxicam, the non-steroidal anti-inflammatory drug, were described, introducing a novel deductive method using Hammett constants. For this purpose, a total of 8 tenoxicam and piroxicam derivatives were synthesised. To the best of our knowledge, the $\log k_{\text{N}}^{\text{O}}$ microconstant of tenoxicam obtained thus is the lowest enolate basicity value, which, however, can be well explained by the effects of the intramolecular environment. The developed evaluation procedure is suitable for microconstant determination of compounds in other molecule families. Besides, prodrug-type compounds and analogues similar to the structures of selective COX-2 isoenzyme inhibitors were synthesised.

The other two molecules studied, the 6-aminopenicillanic acid and 7-cephalosporanic acid, the core molecules of the two most important beta-lactam antibiotic-types were derivatised and investigated by 1D and 2D NMR techniques. The NMR-pH titration on the parent compounds and their ester derivatives, combined with *in situ* pH-measurements allowed the microspeciation of these easily decomposing molecules. One of the protonation constant of 7-ACA ($\log k_{\text{O}}^{\text{N}} = 4.12$), to the best of our knowledge, is the least non-aromatic basic amino-site among the natural compounds.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Hinderling PH, Hartmann D. (2005) The pH dependency of the binding of drugs to plasma proteins in man. *Ther Drug Monit*, 27 (1): 71-85.
- [2] Grossman PD, Wilson KJ, Petrie G, Lauer HH. (1988) Effect of buffer pH and peptide composition on the selectivity of peptide separations by capillary zone electrophoresis. *Anal Biochem*, 173 (2): 265-270.
- [3] Fekete J. Folyadék-kromatográfia elmélete és gyakorlata. Edison House, Budapest [Dabas], 2006.
- [4] Martell AE, Smith RS. Critical Stability Constants I., III., V. Plenum Press, New York, 1974, 1977, 1982.
- [5] Smith RS, Martell AE. Critical Stability Constants II., IV., VI. Plenum Press, New York, 1975, 1976, 1989.
- [6] Serjeant EP, Dempsey B. Ionisation constants of organic acids in aqueous solution. Pergamon, Oxford, 1979.
- [7] Sillén LG, Martell AE. Stability constants of metal-ion complexes I. II. Chemical Society, London, 1964, 1971.
- [8] Leggett DJ. Computational methods for the determination of formation constants. Plenum Press, New York, 1985.
- [9] Albert A, Serjeant EP. The determination of ionization constants, Chapman & Hall, New York, 1984.
- [10] Inczédy J. Analytical application of complex equilibria. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1977.
- [11] Beck MT. Chemistry of complex equilibria. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1970.
- [12] Butler JN. Ionic equilibrium: a mathematical approach. Addison-Wesley, Reading, MA, 1964.
- [13] Rossotti FJC, Rossotti HS. The determination of stability constants, McGraw-Hill, New York, 1961.
- [14] Józán M. Potenciometriás titrálás. In: Szász Gy, Takács M, Végh A (szerk.), *Gyógyszerészi Kémia. Medicina*, Budapest, 1990: 281-286.

- [15] Irving HM, Miles MG, Pettit LD. (1967) A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode. *Anal Chim Acta* 38: 475-488.
- [16] Bányai I, Blixt J, Glaser J, Tóth I. (1992) On the dissociation of hydrogen-cyanide in aqueous-solutions containing different ionic media - a combined potentiometric and C-13 NMR-study. *Acta Chim Scand*, 46 (2): 138-141.
- [17] Polster J, Lachmann H. *Spectrometric titrations*. VCH, Weinheim, 1989.
- [18] Görög S. Ultraibolya és látható spektroszkópia. In: Szász Gy, Takács M, Végh A (szerk.), *Gyógyszerészi Kémia. Medicina*, Budapest, 1990: 68-98.
- [19] Tam KY, Takács-Novák K. (2001) Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study. *Anal Chim Acta*, 434: 157-167.
- [20] Kyvala M, Lukes I. (1995) *Chemometrics '95, Pardubice, Book of Abstracts* 63.
- [21] <http://www.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html> (2006)
- [22] Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. (2000) Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed*, 13: 129-153.
- [23] Rabenstein DL, Hari SP, Kaerner A. (1997) Determination of acid dissociation constants of peptide side-chain functional groups by two-dimensional NMR. *Anal Chem*, 69: 4310-4316.
- [24] Naumann R, Alexander-Weber C, Eberhardt R, Giera J, Spitzer P. (2002) Traceability of pH measurements by glass electrode cells: performance characteristic of pH electrodes by multi-point calibration. *Anal Bioanal Chem*, 374: 778-786.
- [25] Hägele G. NMR controlled titrations of phosphorus-containing acids and bases in protolyses and complex formation. In: Quin LD, Verkade JG (szerk.), *Phosphorus-³¹P-NMR Spectral Properties in Compound Characterization and Structural Analysis*. VCH, New York, 1994: 395-409.
- [26] Yesinowski JP, Sunberg RJ, Benedict JJ. (1982) pH control and rapid mixing in spinning NMR samples. *J Magn Reson*, 47: 85-90.
- [27] Moon RB. (1974) C-13 magnetic-resonance studies of binding of carbon-monoxide to various hemoglobins. *Biochemistry-US*, 13: 3437.

- [28] Seo Y, Murakami M, Watari H, Imai Y, Yoshizaki K, Nishikawa H, Morimoto T. (1983) Intracellular pH determination by a P-31-NMR technique - the 2nd dissociation-constant of phosphoric-acid in a biological system. *J Biochem*, 94 (3): 729-734.
- [29] Blamire AM, Rajagopalan B, Radda GK. (1999) Measurement of myocardial pH by saturation transfer in man. *Magn Reson Med*, 41 (1): 198-203.
- [30] Rabenstein DL, Isab AA. (1982) Determination of the intracellular pH of intact erythrocytes by H-1-NMR spectroscopy. *Anal Biochem*, 121 (2): 423-432.
- [31] Yoon PS, Sharp RR. (1985) Ca-2+ and proton transport in chromaffin granule membranes - a proton NMR-study. *Biochemistry-US*, 24 (25): 7269-7273.
- [32] Gasparovic C, Barba I, Born J, Barton S, Arus C, Mann P. (1998) A study of imidazole-based nuclear magnetic resonance probes of cellular pH. *Anal Biochem*, 261 (1): 64-72.
- [33] Damon BM, Hsu AC, Stark HJ, Dawson MJ. (2003) The carnosine C-2 proton's chemical shift reports intracellular pH in oxidative and glycolytic muscle fibers. *Magn Reson Med*, 49 (2): 233-240.
- [34] Harper JL, Smith RAJ, Bedford JJ, Leader JP. (1997) Synthesis, acidity and F-19 NMR characteristics of imidazoles bearing 1-fluorinated substituents with potential application as probes for intracellular pH determination. *Tetrahedron*, 53 (24): 8211-8224.
- [35] Bodor A, Bányai I, Zékány L, Tóth I. (2002) Slow dynamics of aluminium-citrate complexes studied by H-1- and C-13-NMR spectroscopy. *Coordin Chem Rev*, 228 (2): 163-173.
- [36] Vistad OB, Akporiaye DE, Taulelle F, Lillerud KP. (2003) Morpholine, an in situ C-13 NMR pH meter for hydrothermal crystallogensis of SAPO-34. *Chem Mater*, 15 (8): 1650-1654.
- [37] Szakács Z, Hägele G, Tyka R. (2004) ¹H/³¹P NMR pH indicator series to eliminate the glass electrode in NMR spectroscopic pK_a determinations. *Anal Chim Acta*, 522: 247-258.
- [38] Szakács Z, Hägele G. (2004) Accurate determination of low pK values by ¹H NMR titration. *Talanta*, 62: 819-825.

- [39] Wishart DS, Sykes BD. (1994) Chemical shifts as a tool for structure determination. *Method Enzymol*, 239: 363-392.
- [40] Koeberg-Telder A, Cerfontain H. (1975) Solutes in sulphuric acid. Part VI. A nuclear magnetic resonance study of organic sulphonic acids and ^1H nuclear magnetic resonance standards; pK_{BH} determination of sulphonic acids. *J Chem Soc Perkin Trans 2*, 3: 226-229.
- [41] Bjerrum N. (1923) Dissoziationskonstanten von mehrbasischen Säuren und ihre Anwendung zur Berechnung molekularer Dimensionen. *Z Phys Chem*, 56: 219-242.
- [42] Alberty RA. (2000) Effect of pH on protein-ligand equilibria. *J Phys Chem B*, 104: 9929-9934.
- [43] Noszál B. Acid-base properties of bioligands. In: Burger K (szerk.), *Biocoordination Chemistry: Coordination Equilibria in Biologically Active Systems*. Ellis Horwood, Chichester, 1990: 18-55.
- [44] Ósz K, Lente G, Kállay Cs. (2005) New protonation microequilibrium treatment in the case of some amino acid and peptide derivatives containing a bis(imidazolyl)methyl group. *J Phys Chem B*, 109: 1039-1047.
- [45] Noszál B. (1986) Group constant: a measure of submolecular basicity. *J Phys Chem*, 90: 4104-4110.
- [46] Borkovec M, Jönsson B, Koper GJM. Ionization processes and proton binding in polyprotic systems: small molecules, proteins, interfaces and polyelectrolytes. In: Matijevic E (szerk.), *Surface and Colloid Science*. Vol. 16. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001: 246-275.
- [47] Sturgeon RJ, Schulman SG. (1977) Electronic absorption-spectra and protolytic equilibria of doxorubicin - direct spectrophotometric determination of microconstants. *J Pharm Sci*, 66 (7): 958-961.
- [48] Elson EL, Edsall JT. (1962) Raman spectra and sulfhydryl ionization constants of thioglycolic acid and cysteine. *Biochemistry-US*, 1: 1.
- [49] Arendt C, Hägele G. (1995) The PHOTO_T concept – hardware and software combination for the determination of macroscopic and microscopic dissociation constants. *Computer Chem Eng*, 19: 263-268.

- [50] Benesch RE, Benesch R. (1955) The acid strength of the –SH group in cysteine and related compounds. *J Am Chem Soc*, 77: 5877-5881.
- [51] D'Angelo JC, Collette T W. (1997) A method for the measurement of site-specific tautomeric and zwitterionic microspecies equilibrium constants. *Anal Chem*, 69: 1642-1650.
- [52] Takács-Novák K, Tam KY. (2000) Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants. V. Microconstants and tautomeric ratios of diprotic amphoteric drugs. *J Pharmaceut Biomed*, 21: 1171-1182.
- [53] Allred AL, Rochow EG. (1957) The nuclear magnetic resonance absorption of hydrogen in methyl groups. The electronegativity of substituents. *J Am Chem Soc*, 79: 5361-5365.
- [54] Sterk H, Holzer H. (1974) Relation between chemical shifts and charge densities. *Org Magn Reson*, 6: 133-143.
- [55] Hagen R, Roberts JD. (1969) Nuclear magnetic resonance spectroscopy. ¹³C spectra of aliphatic carboxylic acids and carboxylate anions. *J Am Chem Soc*, 91: 4504-4506.
- [56] Rabenstein DL, Sayer TL. (1976) Determination of microscopic acid dissociation constants by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal Chem*, 48: 1141-1145.
- [57] Szakács Z, Kraszni M, Noszál B. (2004) Determination of microscopic acid-base parameters from NMR-pH titrations. *Anal Bioanal Chem*, 378 (6): 1428-1448.
- [58] Sudmeier JL, Reilly CN. (1964) Nuclear magnetic resonance studies of protonation of polyamine and aminocarboxylate compounds in aqueous solution. *Anal Chem*, 36: 1698-1706.
- [59] Sayer TL, Rabenstein DL. (1976) Nuclear magnetic resonance studies of the acid-base chemistry of amino acids and peptides. III. Determination of the microscopic and macroscopic acid dissociation constants of α,ω -diaminocarboxylic acids. *Can J Chem*, 54: 3392-3403.
- [60] Kiss T, Tóth B. (1982) Microscopic dissociation processes of some tyrosine derivatives. *Talanta*, 29: 539-544.
- [61] Farkas E, Kiss T, Kurzak B. (1990) Microscopic dissociation processes of alaninehydroxamic acids. *J Chem Soc Perkin Trans 2*, 7: 1255-1257.

- [62] Noszál B, Guo W, Rabenstein DL. (1992) Characterization of the macroscopic and microscopic acidbase chemistry of the native disulfide and reduced dithiol forms of oxytocin, arginine-vasopressin, and related peptides. *J Org Chem*, 57: 2327-2334.
- [63] Imura H, Choppin GR, Cacheris WP, de Learie LA, Dunn TJ, White DH. (1997) Thermodynamics and NMR studies of DTPA-bis(methoxyethylamide) and its derivatives. Protonation and complexation with Ln(III). *Inorg Chim Acta*, 258: 227-236.
- [64] Letkeman P, Martell AE. (1979) Nuclear magnetic resonance and potentiometric protonation study of polyaminopolyacetic acids containing from two to six nitrogen atoms. *Inorg Chem*, 18: 1284-1289.
- [65] Wegscheider R. (1895) *Monatsh Chem*, 16: 153-158.
- [66] Ebert L. (1926) Determination of double ions in solutions of ampholytes. *Z Phys Chem*, 385-400.
- [67] Loewenstein A, Roberts JD. (1960) The ionization of citric acid studied by the nuclear magnetic resonance technique. *J Am Chem Soc*, 82: 2705-2710.
- [68] Takács-Novák K, Kökösi J, Podányi B, Noszál B, Tsai RS, Lisa G, Carrupt PA, Testa B. (1995) Microscopic protonation-deprotonation equilibria of the antiinflammatory agent piroxicam. *Helv Chim Acta*, 78 (3): 553-562.
- [69] Neuberger A. (1936) Dissociation constants and structures of glutamic acid and its esters. *Biochem J*, 30: 2085-2094.
- [70] Noszál B, Sándor P. (1989) Rota-microspeciation of aspartic acid and asparagine. *Anal Chem*, 61: 2631-6237.
- [71] Szilágyi L, Pusztahelyi SzZ, Jakab S, Kovács I. (1993) Microscopic protonation constants in tobramycin - an NMR and pH study with the aid of partially N-acetylated derivatives. *Carbohydr Res*, 247: 99-109.
- [72] Santos MA, Esteves MA, Vaz MC, Fraústo da Silva JJR, Noszál B, Farkas E. (1997) Microscopic acid-base equilibria of a synthetic hydroxamate siderophore analog, piperazine-1,4-bis(N-methylacetohydroxamic acid). *J Chem Soc Perkin Trans 2*, 10: 1977-1983.

- [73] Burger K, Sipos P, Véber M, Horváth I, Noszál B, Lów M. (1988) Formation microequilibria of proton, calcium and magnesium complexes of the gamma-carboxyglutamate ion and related compounds. *Inorg Chim Acta*, 152: 233-239.
- [74] Tsai RS, Carrupt PA, Eltayar N, Giroud Y, Andrade P, Testa B, Bree F, Tillement JP. (1993) Physicochemical and structural-properties of nonsteroidal antiinflammatory oxicams. *Helv Chim Acta*, 76 (2): 842-854.
- [75] Borkovec M, Brynda M, Koper GJM, Spiess B. (2002) Resolution of microscopic protonation mechanisms in polyprotic molecules. *Chimia*, 56: 695-701.
- [76] Wiseman EH, Chang YH, Lombardino JG. (1976) Piroxicam, a novel anti-inflammatory agent. *Arzneim-Forsch/Drug Res*, 26 (7): 1300-1303.
- [77] Lombardino JG, Wiseman EH. (1982) Piroxicam and other anti-inflammatory oxicams. *Med Res Rev*, 2 (2): 127-152.
- [78] Lombardino JG, Lowe JA. (2004) The role of the medicinal chemist in drug discovery -then and now. *Nature Rev Drug Disc*, 3 (10): 853-862.
- [79] Rogawski MA. (2006) Molecular targets versus models for new antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res*, 68 (1): 22-28.
- [80] Patani GA, LaVoie EJ. (1996) Bioisosterism: A rational approach in drug design. *Chem Rev*, 96 (8): 3147-3176.
- [81] Floersheim P, Pombovillar E, Shapiro G. (1992) Isosterism and bioisosterism case-studies with muscarinic agonists. *Chimia*, 46 (7-8): 323-334.
- [82] Kirchheiner B, Holm P, Jensen EM, Kryger J, Romberg O, Salveson A. (1982) A new long-acting anti-inflammatory agent, tenoxicam (Tilcotil) - in osteoarthritis of the knee and the hip - a randomized comparison with indomethacin. *Curr Therap Res Clin E*, 32 (5): 627-632.
- [83] Radhofer-Welte S, Rabasseda X. (2000) Lornoxicam, a new potent NSAID with an improved tolerability profile. *Drugs Today*, 36 (1): 55-76.
- [84] Dipasquale G, Rassaert C, Richter R, Welaj P, Gingold J, Singer R. (1975) Anti-inflammatory properties of isoxicam(4-hydroxy-2-methyl-n-[5-methyl-3-isoxoly]-2h-1,2-benzothiazine-3-carboxamide 1,1-dioxide)]. *Agents Act*, 5 (3): 256-263.
- [85] Engelhardt G (1996) Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of COX-2. *Brit J Rheum*, 35: 4-12.

- [86] Lombardino JG, Wiseman EH. (1972) Sudoxicam and related N-heterocyclic carboxamides of 4-hydroxy-2*h*-1,2-benzothiazine 1,1-dioxide - potent nonsteroidal antiinflammatory agents. *J Med Chem*, 15 (8): 848-849.
- [87] Carty TJ, Marfat A, Moore PF, Falkner FC, Twomey TM, Weissman A. (1993) Ampiroxicam, an antiinflammatory agent which is a prodrug of piroxicam. *Agents Act*, 39 (3-4): 157-165.
- [88] Olkkola KT, Brunetto AV, Mattila MJ. (1994) Pharmacokinetics of oxicam nonsteroidal antiinflammatory agents. *Clin Pharmacokin*, 26 (2): 107-120.
- [89] Esteve A, Martinez L, Roser R, Sagarra R. (1986) Pharmacokinetics of droxicam in rat and dog. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*, 8 (7): 423-429.
- [90] Piroxicam N⁺, Propoxicam N⁺ [Nicolas C, Verny M, Giraud I, Ollier M, Rapp M, Maurizis JC, Madelmont JC. (1999) New quaternary ammonium oxicam derivatives targeted toward cartilage: Synthesis, pharmacokinetic studies, and antiinflammatory potency. *J Med Chem*, 42 (25): 5235-5240.
- [91] Borne RF. Nonsteroidal anti-inflammatory agents. In: Williams DA, Lemke TM, (szerk.) *Foyes Principles Of Medicinal Chemistry* (Vth edition). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: 751-793.
- [92] Thillainayagam AV, Tabaqchali S, Warrington SJ, Farthing MJG. (1994) Interrelationships between helicobacter-pylori infection, nonsteroidal antiinflammatory drugs and gastroduodenal disease - a prospective-study in healthy-volunteers. *Digest Dis Sci*, 39 (5): 1085-1089.
- [93] Gaddi A, Cicero AFG, Pedro EJ. (2004) Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Arch Gerontol Geriat*, 38 (3): 201-212.
- [94] Lane NE, Lukert B. (1998) The science and therapy of glucocorticoid-induced bone loss. *Endocrin Metab Clin*, 27 (2): 465-483.
- [95] www.pharmindex.hu (2007)
- [96] Naesdall J, Brown K. (2006) NSAID-associated adverse effects and acid control aids to prevent them - A review of current treatment options. *Drug Safety*, 29 (2): 119-132.

- [97] Monk JP, Clissold SP. (1987) Misoprostol - a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the treatment of peptic-ulcer disease. *Drugs*, 33 (1): 1-30.
- [98] Hla T, Neilson K. (1992). Human Cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 (16): 7384-7388.
- [99] Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun WQ, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D. (1992) Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, 267 (36): 25934-25938.
- [100] Habib A, Creminon C, Frobert Y, Grassi J, Pradelles P, Maclouf J. (1993) Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial-cells using antibodies raised against the carboxyl-terminal region of the cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 268 (31): 23448-23454.
- [101] Botting JH. (1999) Nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Dugs Today*, 35: 225-235.
- [102] Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. (1993) Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 (24): 11693-11697.
- [103] Gierse JK, McDonald JJ, Hauser SD, Rangwala SH, Koboldt CM, Seibert K. (1996) A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J Biol Chem*, 271 (26): 15810-15814.
- [104] Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC. (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384 (6610): 644-648.
- [105] Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S. (1994) NS-398, a new antiinflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin-G/H synthase cyclooxygenase (COX-2) activity in-vitro. *Prostaglandins*, 47 (1): 55-59.
- [106] Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. (1994) Selective-inhibition of inducible cyclooxygenase-2

in-vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91 (8): 3228-3232.

- [107] Reitz DB, Li JJ, Norton MB, Reinhard EJ, Collins JT, Anderson GD, Gregory SA, Koboldt CM, Perkins WE, Seibert K, Isakson PC. (1994) Selective cyclooxygenase inhibitors - novel 1,2-diarylcyclopentenes are potent and orally-active COX-2 inhibitors. *J Med Chem*, 37 (23): 3878-3881.
- [108] Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, Carter JS, Collins PW, Docter S, Graneto MJ, Lee LF, Malecha JW, Miyashiro JM, Rogers RS, Rogier DJ, Yu SS, Anderson GD, Burton EG, Cogburn JN, Gregory SA, Koboldt CM, Perkins WE, Seibert K, Veenhuizen AW, Zhang YY, Isakson PC. (1997) Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: Identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib). *J Med Chem*, 40 (9): 1347-1365.
- [109] Talley JJ, Brown DL, Carter JS, Graneto MJ, Koboldt CM, Masferrer JL, Perkins WE, Rogers RS, Shaffer AF, Zhang YY, Zweifel BS, Seibert K. (2000) 4-[5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]-benzenesulfonamide, valdecoxib: A potent and selective inhibitor of COX-2. *J Med Chem*, 43 (5): 775-777.
- [110] Prasit P, Wang Z, Brideau C, Chan CC, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, Evans JF, Ford-Hutchinson AW, Gauthier JY, Gordon R, Guay J, Gresser M, Kargman S, Kennedy B, Leblanc Y, Leger S, Mancini J, O'Neill GP, Ouellet M, Percival MD, Perrier H, Riendeau D, Rodger I, Tagari P, Therien M, Vickers P, Wong E, Xu LJ, Young RN, Zamboni R, Boyce S, Rupniak N, Forrest N, Visco D, Patrick D. (1999) The discovery of rofecoxib, MK 966, Vioxx (R), 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone], an orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, 9 (13): 1773-1778.
- [111] Ehrich EW, Dallob A, De Lepeleire I, Van Hecken A, Riendeau D, Yuan WY, Porras A, Wittreich J, Seibold JR, De Schepper P, Mehlich DR, Gertz BJ. (1999) Characterization of rofecoxib as a cyclooxygenase-2 isoform inhibitor and demonstration of analgesia in the dental pain model. *Clin Pharmacol Ther*, 65 (3): 336-347.

- [112] Riendeau D, Percival MD, Brideau C, Charleson S, Dube D, Ethier D, Falgoutret JP, Friesen RW, Gordon R, Greig G, Guay J, Mancini J, Ouellet M, Wong E, Xu L, Boyce S, Visco D, Girard Y, Prasit P, Zamboni R, Rodger IW, Gresser M, Ford-Hutchinson AW, Young RN, Chan CC. (2001) Etoricoxib (MK-0663): Preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther*, 296 (2): 558-566.
- [113] Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. (1999) Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (13): 7563-7568.
- [114] Krotz F, Schiele TM, Klauss V, Sohn HY. Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. (2005) *J Vasc Res*, 42 (4): 312-324.
- [115] Johnsen SP, Larsson H, Tarone RE, McLaughlin JK, Norgard B, Friis S, Sorensen HT. (2005) Risk of hospitalization for myocardial infarction among users of rofecoxib, celecoxib, and other NSAIDs - A population-based case-control study. *Arch Intern Med*, 165 (9): 978-984.
- [116] Grabowski H, Vernon J. (1990) A New Look At The Returns And Risks To Pharmaceutical Research-And-Development. *Manage Sci*, 36 (7): 804-821.
- [117] Topol EJ, Falk GW. (2004) A coxib a day won't keep the doctor away. *Lancet*, 364 (9435): 639-640.
- [118] Topol EJ. (2004) Failing the public health - Rofecoxib, Merck, and the FDA. *New Engl J Med*, 351 (17): 1707-1709.
- [119] Gates BJ, Nguyen TT, Setter SM, Davies NM. (2005) Meloxicam: a reappraisal of pharmacokinetics, efficacy and safety. *Expert Opin Pharmacol*, 6 (12): 2117-2140.
- [120] Cha YI, DuBois RN. (2007) NSAIDs and cancer prevention: Targets downstream of COX-2. *Annu Rev Med*, 58: 239-252.
- [121] Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. (1998) Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res*, 58 (3): 409-412.

- [122] Hafner C, Reichle A, Vogt T. (2005) New indications for established drugs: Combined tumor-stroma-targeted cancer therapy with PPAR gamma agonists, COX-2 inhibitors, mTOR antagonists and metronomic chemotherapy. *Curr Canc Drug Targ*, 5 (6): 393-419.
- [123] European Pharmacopoeia, 5th edition. Council of Europe, Strasbourg, 2005: 2003-2004.
- [124] Gonzalez JP, Todd PA. (1987) Tenoxicam - a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*, 34 (3): 289-310.
- [125] Heizmann P, Korner J, Zinapold K. (1986) Determination of tenoxicam in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chrom*, 374: 95-102.
- [126] Bernhard E, Zimmermann F. (1984) Contribution to the understanding of oxamic acid ionization-constants, *Arzneim-Forsch/Drug Res*, 34 (6): 647-648.
- [127] Mohamed HA, Wadood HMA, Farghaly OA. (2002) Potentiometric and spectrofluorimetric studies on complexation of tenoxicam with some metal ions. *J Pharmaceut Biomed*, 28 (5): 819-826.
- [128] Mitscher LA. Antibiotics and antimicrobial agents. In: Williams DA, Lemke TM, (szerk.) *Foyes Principles Of Medicinal Chemistry* (Vth edition). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: 819-850.
- [129] Gold HS, Moellering RC. (1996) Drug therapy - Antimicrobial-drug resistance. *New Engl J Med*, 335 (19): 1445-1453.
- [130] Foucault C, Brouqui P. (2007) How to fight antimicrobial resistance. *Fems Immunol Med Mic*, 49 (2): 173-183.
- [131] Waxman DJ, Strominger JL. (1983) Penicillin-Binding Proteins And The Mechanism Of Action Of Beta-Lactam Antibiotics. *Annu Rev Biochem*, 52: 825-869.
- [132] Ambler RP. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philos T Roy Soc B*, 289 (1036): 321-331.
- [133] Livermore DM. (1995) Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, 8 (4): 557-584.

- [134] Iredell J, Thomas L, Espedido B. (2006) Beta-lactam resistance in the Gram negatives: increasing complexity of conditional, composite and multiply resistant phenotypes. *Pathology*, 38 (6): 498-506.
- [135] Rolinson GN, Geddes AM. (2007) The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Int J Antimicrob Ag*, 29 (1): 3-8.
- [136] Fleming A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with a special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit J Exp Path*, 10: 226-236.
- [137] Bennett JW, Chung KT. (2001) Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Adv Appl Microbiol*, 49: 163-184.
- [138] Kato T. (1953) Occurrence of penicillin-nucleus in culture broths, *J Antibiot*, 6: 130-136.
- [139] Verweij J, Devroom E. (1993) Industrial transformations of penicillins and cephalosporins. *Rec Trav Chim Roy Neth Chem Soc*, 112 (2): 66-81.
- [140] Parmar A, Kumar H, Marwaha S, Kennedy JF. (2000) Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Biotechnol Adv*, 18 (4): 289-301.
- [141] Wegman MA, Janssen MHA, van Rantwijk F, Sheldon RA. (2001) Towards biocatalytic synthesis of beta-lactam antibiotics. *Adv Synth Catal*, 343 (6-7): 559-576.
- [142] Sonawane VC. (2006) Enzymatic modifications of cephalosporins by cephalosporin acylase and other enzymes. *Crit Rev Biotechnol*, 26 (2): 95-120.
- [143] Barber MS, Giesecke U, Reichert A, Minas W. (2004) Industrial enzymatic production of cephalosporin-based beta-lactams. *Mol Biotechnol*, 88: 179-215.
- [144] Nathwani D, Wood MJ. (1993) Penicillins - a current review of their clinical-pharmacology and therapeutic use. *Drugs*, 45 (6): 866-894.
- [145] Takács M. Dipeptid Antibiotikumok, béta-laktám antibiotikumok. In: Szász Gy, Takács M, Végh A (szerk.), *Gyógyszerészi Kémia. Medicina*, Budapest, 1990: 1124-1137.

- [146] Berezin IV, Klyesov AA, Margolin AL, Nys PS, Savitskaya EM, Shvyadas VK. (1976) Study of penicillin amidase from *E. coli*. The pH-dependence of the equilibrium constant of the enzymic hydrolysis of benzylpenicillin. *Antibiotiki* 21: 519-523.
- [147] Bowden K, Bromley K. (1990) Reactions of carbonyl-compounds in basic solutions. 15. The alkaline-hydrolysis of *N*-methyl, *N*-phenyl and bicyclo lactams, penicillins and *N*-alkyl-*N*-methylacetamides. *J Chem Soc, Perkin Trans 2*, 12: 2111-2116.
- [148] Page MI. (1987) The mechanisms of reactions of beta-lactam antibiotics. *Adv Phys Org Chem*, 23: 165-270.
- [149] Schwarz MA, Wu GM. (1966) Kinetics and reactions involved in penicillin allergy I Mechanism of reaction of penicillins and 6-aminopenicillanic acid with glycine in alkaline solution. *J Pharm Sci*, 55: 550-555.
- [150] Tsuji A, Nakashima E, Deguchi Y, Nishide K, Shimizu T, Horiuchi S, Ishikawa S, Yamana T. (1981) Degradation kinetics and mechanism of aminocephalosporins in aqueous-solution – cefadroxil. *J Pharm Sci*, 70: 1120-1128.
- [151] Company M, Benitez MJ, Jimenez JS. (1991) Degradation of beta-lactam antibiotics in the presence of Zn-2+ and 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol (tris) - a hypothetical nonenzymatic model of beta-lactamases. *Int J Biol Macromol*, 13 (4): 225-230.
- [152] Beard SJ, Ciccognani DT, Hughes MN, Poole RK. (1992) Metal ion-catalyzed hydrolysis of ampicillin in microbiological-growth media. *Fems Microbiol Lett*, 96 (2-3): 207-212.
- [153] Scifinder adatok, melyeket az Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris (© 1994-2007 ACD/Labs) segítségével kalkuláltak.
- [154] Rapson HDC, Bird AE. (1963) Ionisation constants of some penicillins and of their alkaline and penicillinase hydrolysis products. *J Pharm Pharmacol*, 15: 222-231.
- [155] Richardson FS, Yeh CY, Troxell TC, Boyd DB. (1977). Electronic-structures of cephalosporins and penicillins. 6. Studies on circular-dichroism of penam and penam sulfoxides. *Tetrahedron*, 33: 711-721.

- [156] Demarco P, Nagarayan Y. Penicillins and Cefalosporins, Chemistry and Biology. Academic Press, New York, 1972: 312 (C. Oniscu táblázata)
- [157] Schaper KJ. (1979) Simultaneous determination of electronic and lipophilic properties [pK_a, P(ion), P(neutral)] of acids and bases by nonlinear regression analysis of pH-dependent partition measurements. J Chem Res-S, 11: 357., J Chem Res-M, 4480-4493.
- [158] Pettit LD, Powell K. The IUPAC Stability Constants Database. Academic Software.
- [159] Reijenga JC, Verheggen TPEM, Martens JHPA, Everaerts FM. (1996) Buffer capacity, ionic strength and heat dissipation in capillary electrophoresis. J Chromat A, 744: 147-153.
- [160] Avdeef A. (1993) pH-metric logP. II: refinement of partition coefficients and ionization constants of multiprotic substances. J Pharm Sci, 82: 183-190.
- [161] Avdeef A, Comer JEA, Thomson SJ. (1993) pH-metric logP. 3. Glass electrode calibration in methanol-water, applied to pK_a determination of water-insoluble substances. Anal Chem, 65: 42-49.
- [162] Yasuda M. (1959) Dissociation constants of some carboxylic acids in mixed aqueous solvents. Bull Chem Soc Jpn, 32: 429-432.
- [163] Shedlovsky T: Electrolytes. In: Pesce B (szerk.). Pergamon, New York, 1962: 146-151.
- [164] Takács-Novák K, Box KJ, Avdeef A. (1997) Potentiometric pK_a determination of water-insoluble compounds: validation study in methanol/water mixtures. Int J Pharm, 151: 235-248.
- [165] Avdeef A, Box KJ, Comer JEA, Gilges M, Hadley M, Hibbert C, Patterson W, Tam KY. (1999) pH-metric logP 11. pK_a determination of water-insoluble drugs in organic solvent-water mixtures. J Pharmaceut Biomed, 20: 631-641.
- [166] Szakács Z, Béni Sz, Varga Z, Órfi L, Kéri Gy, Noszál B. (2005) Acid-base profiling of imatinib (Gleevec) and its fragments. J Med Chem, 48: 249-255.
- [167] Boros M, Kőkösi J, Vámos J, Noszál B. (2007) Complete resolution of the microscopic protonation equilibria of N-methyl-(D)-aspartic acid and related compounds. J Pharmaceut Biomed, 43 (4): 1306-1314.

- [168] Frassinetti C, Ghelli S, Gans P, Sabatini A, Moruzzi MS, Vacca A. (1995) Nuclear magnetic resonance as a tool for determining protonation constants of natural polyprotic bases in solution. *Anal Biochem*, 231, 374-382.
- [169] Várnagy K, Sóvágó I, Kozłowski H. (1988) Transition-metal complexes of amino acids and derivatives containing disulfide bonds. *Inorg Chim Acta*, 151: 117-123.
- [170] Hammen PD, Berke H, Bordner J, Braisted AA, Lombardino JG, Whipple EB. (1989) Reactions of piroxicam with alkyl iodides. *J Heterocyclic Chem*, 26 (1): 11-16.
- [171] Binder D, Hromatka O, Geissler F, Schmied K, Noe CR, Burri K, Pfister R, Strub K, Zeller P. (1987) Analogs and derivatives of tenoxicam. 1. Synthesis and antiinflammatory activity of analogs with different residues on the ring nitrogen and the amide nitrogen. *J Med Chem*, 30 (4): 678-682.
- [172] Özer Ö, Asici S, Ertan G. (1996) The hydrolysis of tenoxicam in acidic and alkaline solutions and its stability in artificial gastric and intestinal media. *Sci Pharm*, 64: 71-82.
- [173] Park MS, Chang ES, Lee MS, Kwon SK. (2002) Synthesis of 3-aminohydantoinyl-1,2-benzothiazine derivatives, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 23 (12): 1836-1838.
- [174] Zinnes H, Comes RA, Zuleski FR, Caro AN, Shavel J. (1965) 1,2-benzothiazines 2. Preparation and sodium borohydride reduction of 3-acyl-2H-1,2-benzothiazin-4(3H)-one 1,1-dioxides. *J Org Chem*, 30: 2241-2246.
- [175] Gabriel S, Colman J. (1900) Chemical reaction of phthalimidoacetic esters with strong base to form substituted isoquinolines. *Ber Dtsch Chem Ges*, 33: 980.
- [176] Lombardino JG, Wiseman EH, McLamore WM. (1971) Synthesis and antiinflammatory activity of some 3-carboxamides of 2-alkyl-4-hydroxy-2H-1,2-benzothiazine 1,1-dioxide, *J Med Chem*, 14: 1171-1175.
- [177] Hammett LP. *Physical Organic Chemistry I. II.* McGraw Hill, New York, 1940: 121; 1972: 347-390.
- [178] Sekigawa K. (1972) A theoretical analysis of Hammett's σ : The correlations between substituent constants and various physical constants. *Tetrahedron*, 28 (3): 505-514.

- [179] Ruff F, Csizmadia GI. Szerves reakciómechanizmusok vizsgálata. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2000: 175-181.
- [180] Katritzky AR, Palmer CR, Swinbourne FJ, Tidwell TT, Topsom RD. (1969) Infrared intensities as a quantitative measure of intramolecular interactions. VI. Pyridine, pyridine 1-oxide, and monosubstituted derivatives. The ν_{16} band near 1600 cm^{-1} . J Am Chem Soc, 91 (3): 636-641.
- [181] Arndt F. (1943) Nitrosomethylurea, 1. From methylamine hydrochloride. Org Synth, 2: 461-462.
- [182] Arndt F. (1943) Preparation of diazomethane. Org Synth, 2: 165-167.
- [183] Schobert R, Stangl A. (2005) Domino functionalizations of the amino terminus of 6-aminopenicillanates with Ph_3PCCO . Tetrahedron Lett, 46: 1127-1130.

8. Publikációs jegyzék

8.1. Az értekezéshez kapcsolódó publikációk

1. Kóczyán K, Szakács Z, Kökösi J, Noszál B. (2007) Site-specific protonation microequilibria of penicillin and cephalosporin beta-lactam core molecules. *Eur J Pharm Sci*, közlésre elfogadva (megjelenés alatt), 10.1016/j.ejps.2007.05.001.
2. Kóczyán K, Kökösi J, Mazák K, Noszál B. (2005) Novel chemical transformations of tenoxicam. *Helv Chim Acta*, 88: 2355-2363.
3. Kóczyán K, Völgyi G, Kökösi J, Noszál B. (2007) Site-specific acid-base properties of tenoxicam. *Helv Chim Acta*, közlésre benyújtva.

8.2. Az értekezéstől független közlemények

1. Kóczyán K, Haghedooren E, Dragovic S, Noszál B, Hoogmartens J, Adams E. (2007) Column selection for pharmaceutical analyses based on a column classification using four test parameters. *J Pharmaceut Biomed*, közlésre elfogadva (megjelenés alatt), doi:10.1016/j.jpba.2007.04.015.
2. Haghedooren E, Visky D, Dehouck P, Kóczyán K, Diana J, Kovács Zs, Noszál B, Hoogmartens J, Adams E. (2007) Facilitated column selection in reversed-phase liquid chromatographic analysis: Applications on pharmaceutical separations. *LC-GC Europe*, 20: 82-96.
3. Visky D, Haghedooren E, Dehouck P, Kovács Zs, Kóczyán K, Noszál B, Hoogmartens J, Adams E. (2006) Facilitated column selection in pharmaceutical analyses using a simple column classification system. *J Chrom A*, 1101: 103-114.

4. Haghedooren E, Kóczyán K, Huang S, Dragovic S, Noszál B, Hoogmartens J, Adams E. (2007) Finding an alternative column for the separations of antibiotics on XTerra RP using a column classification system. *J Chrom B*, közlésre benyújtva.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Noszál Béla tanszékvezető egyetemi tanárnak, a Gyógyszerésztudományi Kar dékánjának, hogy még második egyetemi hallgatóként bevezetett a tudományos élet rejtelmeibe és a Gyógyszerészi Kémiai Intézet életébe. Munkámat értékes tanácsokkal segítette, és az elérhető legjobb műszerezettséget és feltételeket biztosította. Emellett lehetővé tette, hogy Ph.D. hallgatói éveimből 10 hónapot Belgiumban tölthessek el, ahol egy változatos és kihívásokkal teli kutatómunkába kapcsolódtam be.

Köszönöm Dr. Mazák Károlynak, hogy tudományos munkám elején évekig a segítségemre volt, és hasznos iránymutatást adott az analitikai mérésekkel kapcsolatban.

Külön köszönet illeti Dr. Kökösi József tudományos főmunkatársat, aki a szerves szintézisek útvesztőjében segítségemre volt, és váratlan ötleteivel mindig segített áthidalni a felmerülő akadályokat.

Köszönöm a rendkívüli gyorsaságot és precizitást Dr. Szakács Zoltánnak, akinek NMR és számítástechnika terén nem tudtam újat mutatni, ami viszont korántsem volt igaz fordítva.

Megköszönöm Dr. Takácsné-Novák Krisztinának, hogy gyakorlatvezetőmként a gyógyszerészi kémiai tárgyat kedvenceim közé emelte, és Ph.D. munkám során lehetővé tette a GLpK_aTM automata pK_a meghatározó készülék használatát.

Köszönöm Dr. Kövesdi Istvánnak, hogy az Egis Gyógyszergyárban, valamint Dr. Mátyus Péternek, hogy a Szerves Kémiai Intézetben engedélyezték az NMR készülékek használatát, amíg ilyen műszerrel a tanszékünk nem rendelkezett.

Köszönöm a Gyógyszerészi Kémiai Intézet minden munkatársának azt a sok erőfeszítést, mellyel munkám gördülékeny előrehaladását segítették. Kiemelném Völgyi Gergely, az UV-pH és potenciális titrálásokban, valamint Béni Szabolcs és Boros Miklós doktorandusz társaim nevét az NMR mérésekben nyújtott pótolhatatlan segítségükért.

Végezetül hálás köszönetem fejezem ki feleségemnek és szüleimnek, akik a nyugodt és gondtalan családi háttér biztosításával és nem kevés lemondással járultak hozzá jelen dolgozat megszületéséhez.