

Erősen bázikus molekulák protonálódásának jellemzése részecskespecifikus paraméterekkel

Doktori tézisek

Orgován Gábor



Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

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

Hivatalos bírálók: Dr. Demeter Ádám osztályvezető, Ph.D.
Dr. Tábi Tamás egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bagdy György egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Perjési Pál egyetemi tanár, C.Sc.
Dr. Kalász Huba c. egyetemi tanár, D.Sc.

Semmelweis Egyetem
Gyógyszerészi Kémiai Intézet

Budapest
2011

1. Bevezetés

A legtöbb bio- és gyógyszermolekula két vagy több protonálható csoportot tartalmaz. Az ionizálható molekulák szerkezetbeni sorsát (farmakokinetikai paramétereit) külső körülmények (a közeg pH-ja, hőmérséklete, relatív permittivitása) és belső paraméterek (a molekulaszervezet, lipofilitás, töltés és töltéseloszlás) határozzák meg. Az utóbbiakat különböző sav-bázis paraméterekkel, azaz a protonálódási állandókkal ($\log K$) jellemezhetjük.

Ezen értékek ismerete nélkülözhetetlen a gyógyszerfejlesztés minden fázisában, a törzskönyvezéshez nagy precizitással meghatározott protonálódási állandók szükségesei.

A gyógyszerek célmolekulához való kötődése már nemcsak a bruttó ionizációs állapottól függ, az egyes csoportok protonáltsági állapota is nagymértékben befolyásolja azt. Ezeket a folyamatokat a mikroszkopikus protonálódási állandókkal jellemezzük.

Ezeket a mikroállandókat pH-függő, csoportspecifikus spektroszkópiai módszerrel vagy rokon szerkezetű vegyületek bázicitásadatainak átvitelével lehet meghatározni.

Számos biológiai és gyógyszerészeti szempontból fontos vegyület tartalmaz igen erősen bázikus funkciós csoportokat (guanidino, amidin stb.), amelyek protonálódási folyamatai igen erősen lúgos közegben játszódnak le, ahol a pH pontos meghatározása rendkívül munka- és időigényes módszer alkalmazásával lehetséges.

Az irodalomban közölt protonálódási állandó értékek nagy része jelentős hibával terhelt, a magas pH-értékek meghatározásainak torzítottsága miatt.

Kidolgoztunk tehát egy ^1H NMR alapú pH-meghatározási módszert, amellyel erősen lúgos oldatok savasságát pontosan mérhetjük. A módszer alkalmazásával lehetőségünk nyílt olyan molekulák $\log K$ értékeinek meghatározására, melyeket eddig nem jellemeztek kellő pontossággal.

2. Célkitűzések

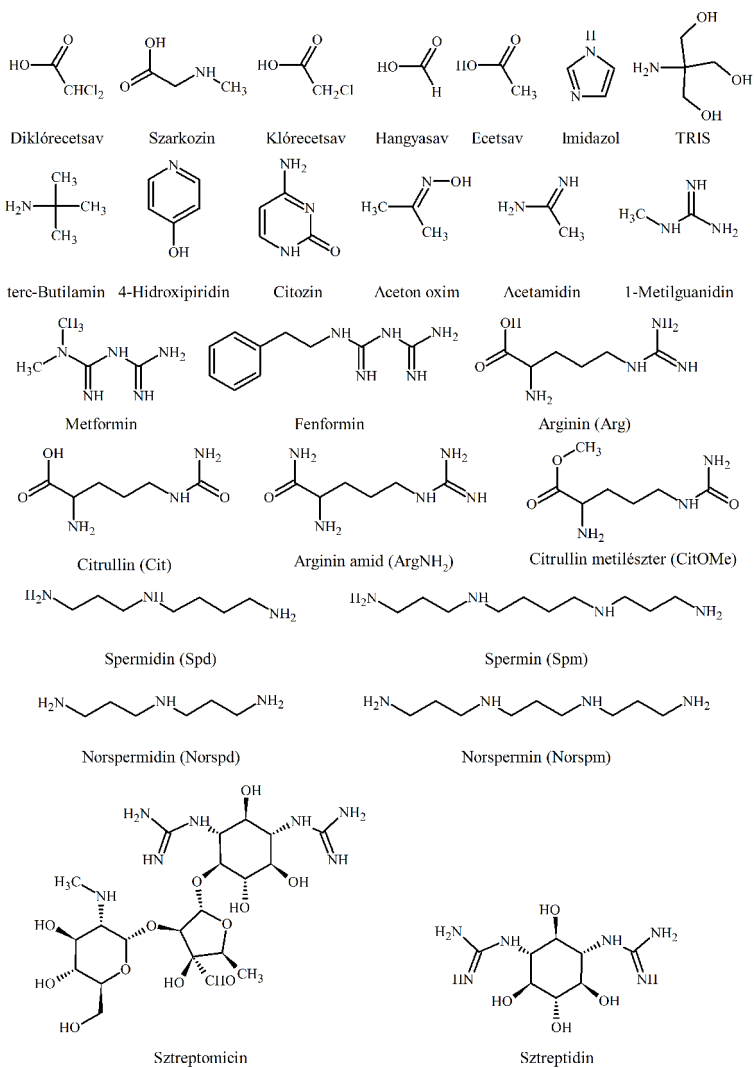
Munkánk során célul tűztük ki több, biológiai és gyógyszerészeti szempontból jelentős, igen erősen bázikus vegyület protonálódási makro- és mikroegyensúlyainak vizsgálatát. Eredményeink szerint az irodalomban közölt $\log K$ értékek nagy része jelentős hibával terhelt, főként a megfelelő pH-mérési módszer hiánya miatt.

A folyamatok jellemzéséhez szükséges egy olyan módszer kidolgozása, amellyel pontosan és torzításmentesen lehet mérni akár szélsőségesen magas pH-értékeket. Célunk tehát egy olyan ^1H NMR módszer kifejlesztése, ahol indikátormolekulák kémiai eltolódásából számíthatjuk ki az oldat pH-ját a teljes, 0-14 közötti pH-tartományban.

Célul tűzzük ki a legbázikusabb fehérjealkotó aminosav, az arginin mikroállandóinak pontos meghatározását ^1H NMR-pH módszerrel. A mikroállandók meghatározása csak modellvegyületek bázicitásadatinak átvitelével, deduktív módszerrel lehetséges. A vegyületek szerkezete az 1. ábrán látható.

További célunk az elsőként felfedezett aminoglikozid-típusú antibiotikum, a sztreptomycin (1. ábra) protonálódási folyamatainak részletes vizsgálata, a két guanidincsoport csoportspecifikus bázicitásainak meghatározása. A sztreptidin (1. ábra), az egyetlen rendelkezésre álló modellvegyület segítségével a sztreptomycin major mikrorészecskéinek protonálódási állandóit határozzuk meg.

Végül olyan ^{15}N NMR módszert fejlesztünk ki, amellyel az egyes aminosocportok bázicitása csoportspecifikus módszerekkel határozható meg. A módszer segítségével a sejtciklus szabályozásában igen jelentős szerepet betöltő lineáris poliaminok és nor-származékaik (1. ábra) mikroállandóit számítjuk ki.



1. ábra: A vizsgált molekulák szerkezete

3. Módszerek

Minden mérést 25 °C-on végeztünk, az oldatok ionerősségét KCl hozzáadásával állítottuk konstans értékre (1,00 M vagy 0,15 M). A vizsgált molekulák koncentrációja: indikátormolekulák (diklórecetsav, aceton oxim, szarkozin, klórecetsav, hangyasav, ecetsav, imidazol, TRIS, *terc*-butilamin, citozin, metilguanidin) 0,5 – 2 mM; biguanidinek (metformin, fenformin) 2 mM; arginin és modellvegyületei (arginin, citrullin, argininamid, citrullin metilészter): 5 mM; sztreptidin: 5 mM; sztreptomycin 20 mM; poliaminok (spermidin, spermin, norspermidin, norspermin) 50 mM voltak. A vegyületek képletei az 1. ábrán láthatóak.

NMR-pH titrálások. Minden NMR mérést 600 MHz-es Varian Unity spektrométeren végeztünk. Az oldatok 5% D₂O-t tartalmaztak. A vízjelet kettős spin echo vagy előtelítő pulzussal nyomtuk el. Az oldatok pH-ját Metrohm 6.0234.110 kombinált üvegelektóddal mértük és/vagy a megfelelő indikátormolekulák kémiai eltolódásából számítottuk.

Az indikátormolekulák, az arginin és modellvegyületei, valamint a biguanidinek esetén ¹H NMR spektrumokat regisztráltunk. A sztreptomycin és a sztreptidin átfedő hidrogénjeleinek kémiai eltolódását ¹³C HSQC mérésekkel határoztuk meg. A poliaminok hidrogénjeinek kémiai eltolódását ¹H és szükség szerint ¹³C HSQC mérésekkel, míg a nitrogénmagok kémiai eltolódását ¹⁵N HMBC spektrumok alapján határoztuk meg. A titrálási görbéket az OriginPro 8.0 szoftverrel értékeltük ki.

pH-potenciometriás titrálások. A pH-metriás méréseket Metrohm 716 DMS Titrino autobürettával csatlakoztatott Metrohm 6.0234.110 kombinált üvegelektóddal, állandó 1,00 M ionerősség mellett végeztük. A makroállandók meghatározásához a poliaminok 50 mM-os sósavval savanyított oldatát titráltuk KOH oldattal. Az NMR-pH és a potenciometriás titrálási görbék szimultán kiértékelése az OriginPro programmal történt.

4. Következtetések, új tudományos eredmények

1. Kidolgoztunk egy ^1H NMR alapú pH-meghatározási módszert, melynek segítségével a teljes (0 – 14) pH-tartományban pontosan és torzításmentesen határozható meg az oldat pH-ja. Az indikátormolekulák indikátorparamétereit a két leggyakrabban alkalmazott ionerősség mellett (0,15 M és 1,00 M) határoztuk meg. Eredményeink alapján 1,00 M-os ionerősségen a teljes pH-tartomány lefedhető öt indikátormolekulával (diklórecetsav, aceton oxim, szarkozin, ecetsav, imidazol). A pH-tartományt úgy határoztuk meg, hogy a pH-számítás maximális hibája 0,03 egység legyen (1. táblázat).

1. táblázat: Az indikátorparaméterek és a pH-meghatározására alkalmas tartomány 1 M ionerősségű oldatban

	logK	δ_{Ind}	δ_{HInd}	pH-tartomány
Diklórecetsav	1,04 (2)	6,072 (1)	6,346 (2)	< 2,0
Aceton oxim	1,73 (1)	1,896 (1)	2,338 (1)	0,5 – 3,1
Szarkozin (CH_2)	2,24 (1)	3,614 (1)	3,983 (1)	1,0 – 3,6
Szarkozin (CH_3)		2,737 (1)	2,804 (1)	1,8 – 2,6
Ecetsav	4,57 (1)	1,907 (1)	2,093 (1)	3,5 – 5,6
Imidazol (H2)	7,26 (1)	7,781 (1)	8,696 (1)	5,5 – 8,9
Imidazol (H4)		7,139 (1)	7,487 (1)	5,9 – 8,6
Szarkozin (CH_2)	10,24 (1)	3,107 (1)	3,613 (1)	8,7 – 11,8
Szarkozin (CH_3)		2,283 (1)	2,737 (1)	8,8 – 11,7
Aceton oxim	12,22 (1)	1,828 (1)	1,895 (1)	11,8 – 12,7
Aceton oxim		1,770 (1)	1,897 (1)	11,4 – 13,1
Imidazol (H2)	13,89 (2)	7,620 (3)	7,781 (1)	> 13

Az általunk kidolgozott indikátormolekula-sorozat segítségével lehetővé válik az igen magas pH-értékek és ebből következően az igen erősen bázikus molekulák protonálódási állandóinak pontos és torzítatlan meghatározása.

2. Meghatároztuk két erősen bázikus, orális antidiabetikumként használt biguanidin-származék, a metformin és a fenformin, protonálódási állandóit. Megmutattuk, hogy az irodalomban található $\log K_1$ értékek jelentősen eltérnek az általunk meghatározott torzításmentes értékektől.

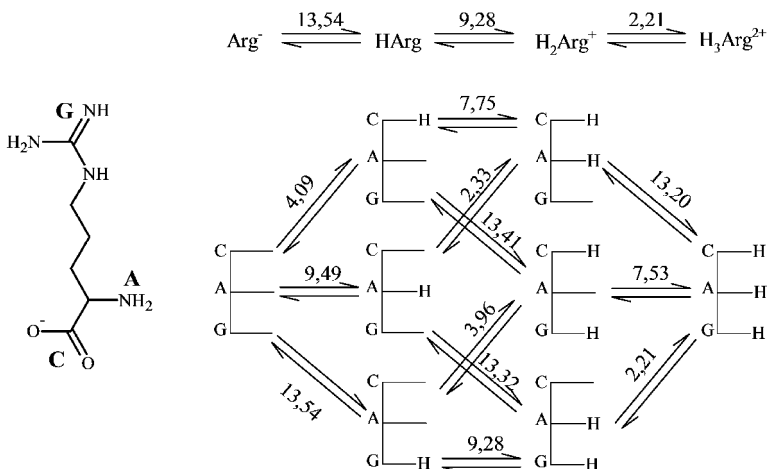
2. táblázat: A biguanidinek protonálódási állandói

	$\log K_1$	$\log K_2$
Metformin	$13,85 \pm 0,03$	$3,14 \pm 0,02$
Fenformin	$13,27 \pm 0,03$	$3,26 \pm 0,02$

3. Deduktív módszerrel és ^1H NMR-pH titrálásokkal meghatároztuk a legbázikusabb fehérjealkotó aminosav, az arginin összes mikroállandóját (2. ábra). A molekula három báziscentrumot tartalmaz: egy guanidino- (G), egy amino- (A) és egy karboxilátesoportot (C). A csoportok bázicitása, mint ismert, jelentősen eltér egymástól, így a mikroállandók kiszámítása csak deduktív módszerrel lehetséges, hiszen a minor mikrorészecskék több nagyságrenddel kisebb koncentrációban fordulnak elő. Modellvegyületként két, az argininnel izoelektronos vegyületet választottunk, melyek csak két-két protonálható csoportot tartalmaznak: citrullint és argininamidot. A számításokat egy független kísérleti adattal validáltuk: a citrullin metilészterének, az arginin rokon származékának makroállandója jó egyezést mutatott az arginin megfelelő mikroállandójával.

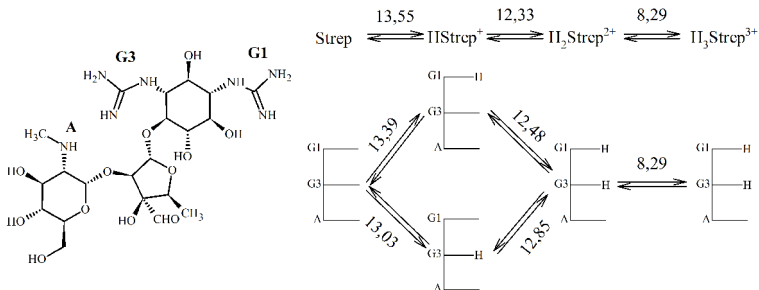
Az első protonálódási állandó irodalmi értéke egy logaritmus egységgel alacsonyabb, mint az általunk mért érték, így ennek megfelelően az izoelektronos pont is magasabb (11,41). Ezzel szemben az izoelektronos citrullin izoelektronos pontja 5,5 egységgel alacsonyabb (6,91). Ez az irodalomban közölt legnagyobb eltérés két izoelektronos molekula között.

Eredményeink szerint a minor mikrorészecskék koncentrációja 5, illetve 10 nagyságrenddel kisebb, mint a major részecskéké.



2. ábra: Az arginin protonálódási sémája, makro- és mikroállandói

4. Megmértük az elsőként felfedezett aminoglikozid típusú antibiotikum, a sztreptomycin és aglikonja, a sztreptidin protonálódási állandóit. A molekulák három, illetve két protonálható csoportot tartalmaznak (két guanidino és egy szekunder amino illetve két guanidino). Elsőként sikerült meghatároznunk két guanidino csoport párkölcsönhatási tényezőjét, amelynek értéke lényegesen alacsonyabbnak bizonyult, mint az 1,3-diaminopropán két nitrogénje közötti kölcsönhatási tényező. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy a protonált guanidinocsoportokon a töltések valószínűleg nagyobb mértékben találhatóak a „távolabbi” nitrogénatomokon. A kiterjedt delokalizáció miatt azonban a töltést nem lehet egyik nitrogénhez sem egyértelműen hozzárendelni. A sztreptidinből számított kölcsönhatási tényező átvitelével meghatároztuk a sztreptomycin egyes guanidinocsoportjaik bázicitását. Eredményeink szerint az 1-es helyzetű, sztérikusan kevésbé árnyékolt csoport bázicitása kétszer nagyobb, mint a 3-as helyzetűé (3. ábra). A molekula olyan erős bázis, hogy a molekulák 25 %-a még 1 M NaOH oldatban is protonált állapotban található.

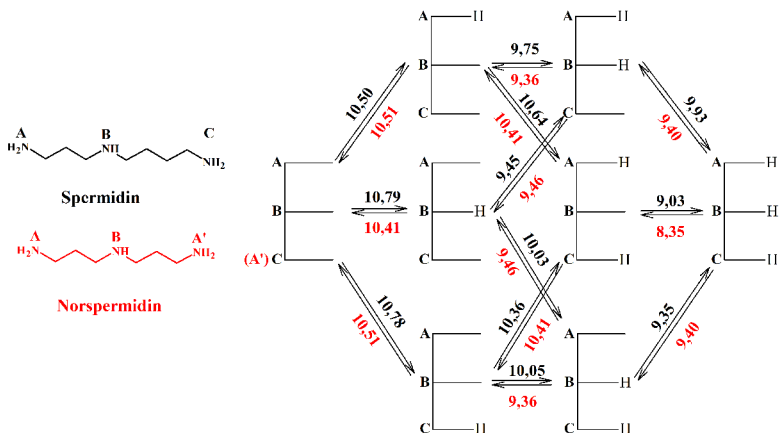


3. ábra: A sztreptomycin major protonálódási útvonala és mikroállandói

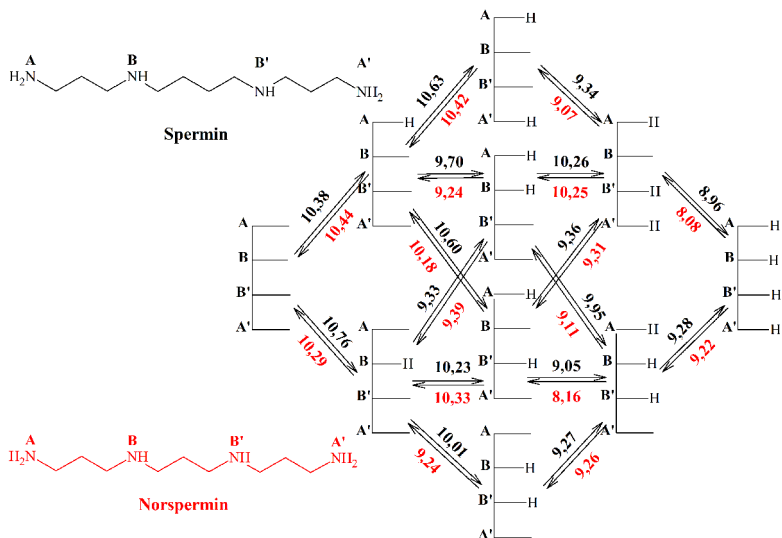
5. Meghatároztuk két lineáris triamin (spermidin és norspermidin, 4. ábra) és két tetraamin (spermin és norspermin, 5. ábra) összes makro- és mikroállandóját. A makroállandókat pH-potenciometriás és ¹H NMR-pH titrálási görbék szimultán kiértékelésével számítottuk ki. A mikroállandókat az egyes csoportok protonáltságának szelektív nyomon követésével, ¹⁵N NMR-pH titrálásokkal határoztuk meg. Az irodalomban a csoportspecifikus protonálódási állandókat csak ¹³C NMR-pH titrálási adatokból határoztak meg, azonban az eredmények megbízhatósága kérdéses, hiszen a báziscentrumok igen közel helyezkednek el egymáshoz, így a szénatomok kémiai eltolódása nem tekinthető a mellettük lévő aminocsoport protonálódására szelektívnek.

A minor protonálódási útvonalhoz tartozó mikroállandókat azonban a ¹⁵N NMR-pH titrálási görbék alapján nem lehet pontosan meghatározni, hiszen hozzájárulásuk az analitikai jelhez elhanyagolható. Ezért deduktív módszerrel határoztuk meg ezeket a mikroállandókat, egy kevesebb protonálható csoportot tartalmazó modellvegyület párkölcsönhatási tényezőjének átvitelével.

A négycsoportos vegyületek mikroállandóit azonban elvileg sem lehet meghatározni a kísérleti adatokból, az összes állandó kiszámításához további adatokra is szükség van. Ezek a spermidin és norspermidin megfelelő párkölcsönhatási tényezői voltak, így már az összes mikroállandó kiszámíthatóvá vált.



4. ábra: A spermidin és a norspermidin protonálódási sémája és mikroállandói



5. ábra: A spermin és a norspermin protonálódási sémája és mikroállandói

Eredményeink szerint a többszörösen protonált részecskék között minden esetben azok a fordulnak elő nagyobb arányban, ahol a töltések

egymástól minél távolabb helyezkednek el. A kétszeresen protonáltak esetén ezek az AB' és az AA' részecskék, a háromszor protonáltak közül pedig az ABA' species.

6. A Gauss-féle négyzetes hibaterjedési törvény alkalmazásával elsőként számítottuk ki a mikroállandók hibáját. Megmutattuk, hogy deduktív módszer esetén csak akkor számíthatjuk ki reális hibával a mikroállandókat, ha a modellvegyületek a valóban minor részecskéknek feleltethetők meg. Az egyes báziscentrumok protonálódásának szelektív nyomon követésével viszont csak összemérhető bázicitások esetén kaphatjuk meg a mikroállandókat reális hibával.

5. Összefoglalás

Doktori munkám során ^1H NMR alapú eljárást dolgoztam ki erősen lúgos oldatok pH-jának pontos és torzítatlan meghatározására. Ezen indikátormolekulák segítségével meghatároztam több biológiai és gyógyszerészeti szempontból jelentős, igen erősen bázikus molekula protonálódási makro- és mikroállandóit.

Meghatároztam két orális antidiabetikumként használt biguanidin-származék, a metformin és a fenformin protonálódási állandóit.

^1H NMR-pH titrálások és deduktív módszerek segítségével kiszámítottam a legbázikusabb fehérjealkotó aminosav, az arginin összes mikroállandóját.

Meghatároztam a két guanidinocsoportot tartalmazó aminoglikozid típusú antibiotikum, a sztreptomycin és aglikonja, a sztreptidin makroállandóit. Elsőként számítottam ki a két guanidinocsoport kölcsönhatási tényezőjét.

^{15}N NMR-pH titrálással meghatároztam két triamin (spermidin és norspermidin) és két tetraamin (spermin és norspermin) összes mikroállandóját, a lehető legkevesebb deduktív elem felhasználásával.

A Gauss-féle négyzetes hibaterjedési törvény alkalmazásával elsőként számítottam ki a mikroállandók standard hibáját.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapját képező közlemények

1. **Orgován G.**, Noszál B. (2011) Electrodeless, accurate pH determination in highly basic media using a new set of ^1H NMR pH indicators. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (5):958-964.
2. **Orgován G.**, Noszál B. (2011) The complete microspeciation of arginine and citrulline. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (5):965-971.

Egyéb publikációk

1. **Orgován G.**, Tihanyi K., Noszál B. (2009) NMR analysis, protonation equilibria and decomposition kinetics of tolperisone. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (5):718-723.
2. **Orgován G.**, Noszál B. (2011) Transporterization: a tool for drug delivery. In: Tihanyi K., Vastag M. (eds) *Solubility, Delivery and ADME problems of drugs and drug-candidates*. Bentham Science Publishers, *közlésre elfogadva*.

Előadások

1. *Tolperizon protonálódásának és bomlásának vizsgálata mágneses magrezonancia spektroszkópiával*, XXX. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2007. október 29.
2. *Tolperizon bomlásának analitikai és kinetikai jellemzése*, MTA Szerves és Gyógyszeranalitikai Munkabizottság ülése, Budapest, 2008. október 14.
3. *Egy klasszikus izomrelaxáns bomlásának analitikája és kinetikája*, MTA Gyógyszerésztudományi Komplex Bizottság ülése, Budapest, 2009. december 1.

4. *Erősen bázikus molekulák protonálódásának jellemzése részecskespecifikus paraméterekkel*, MTA Szerves és Gyógyszeranalitikai Munkabizottság ülése, 2011. május 16.

Poszterek

1. **Orgován G.**, Noszál B.: *Pontos és torzítatlan pH-meghatározás erősen lúgos oldatokban NMR-pH módszerrel*, Universitates Nostrae – Scientia Nostra, Budapest, 2010. november 18.