

Nagyműszeres szerkezetkutatás a Richter Gedeon Nyrt.-ben

Ifj. SZÁNTAY Csaba,* SÁNTA Zsuzsanna és HÁDA Viktor

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

1. Bevezetés

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2. Szerkezeti konfidencia

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

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

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

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

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

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

3. A Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutatási osztályának bemutatása

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

3.1. Centralizált szerkezetkutatási szolgáltatás

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

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

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

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

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

3.2. „Főállású” spektroszkópusok

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

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

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

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

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

3.3. Holisztikus munkafilozófia

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

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

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

3.4. Csúcsműszerezettség

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

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

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

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

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

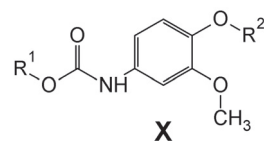
3.5. Tudományosság

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

4. Egy példa

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

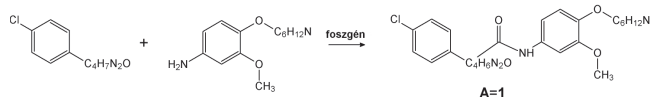
A példa kémiai kontextusát a korai fázisú felfedező kémiai programok egyike adja – ezekben az a cél, hogy egy adott molekulavázzal rendelkező vegyület funkciócsoportjainak szisztematikus módosításával nagyszámú hasonló vegyület kerüljön előállításra a hatás-szerkezet összefüggések feltérképezése érdekében.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



1. Ábra. Az **X** általános képletű molekulaváz.

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

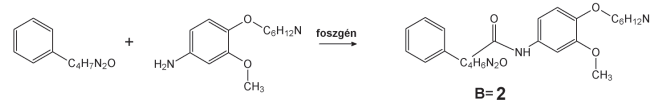
gátolt rotációja folytán a jelek egy része rendkívül széles volt az ^1H NMR spektrumokban - azaz egy NMR szempontból „barátságatlan” molekulacsaláddal volt dolgunk, ahol a teljes NMR asszignációhoz minden esetben hosszadalmas hőmérsékletfüggő méréseket kellett volna végezni. A 2.2 pontban kifejtett okokból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



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

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

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



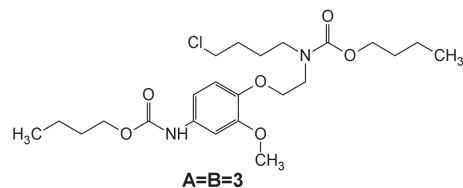
3. Ábra. A **2** szerkezet előállítását célzó reakció.

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

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

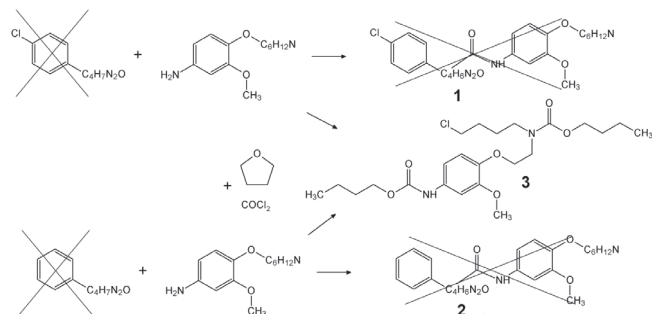
A nagyfelbontású MS mérések azt mutatták, hogy bár egy megdöbbentő coincidencia folytán **A** nominális molekulatömege megfelel **1**-nek, a mért pontostömegből számolt elemi összetétel $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{O}_6\text{N}_2\text{Cl}$ -nak adódik, ellentétben az **1** szerkezetnek megfelelő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

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



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

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



5. Ábra. A tényleges reakciók.

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

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

5. Összefoglalás

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

Köszönetnyilvánítás

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

Hivatkozások

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

Structure elucidation by NMR spectroscopy and mass spectrometry at Gedeon Richter

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

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