

Az NMR spektroszkópia szerepe és alkalmazási lehetőségei a modern gyógyszeriparban

Ifj. SZÁNTAY Csaba,* SZAKÁCS Zoltán, BÉNI Zoltán és DUBROVAY Zsófia

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

1. Bevezetés

Tapasztalatunk szerint a kémiai társadalom túlnyomó része az oldatfázisú NMR spektroszkópia gyógyszeripari szerepét ma is leginkább a kismolekulás szintézistámogató analitikával azonosítja. Kétségtelen tény, hogy az NMR spektroszkópia eme klasszikusnak mondható kémiai alkalmazása, azaz a szintetikus gyógyszerkémikusok által előállított intermedierek és végtermékek szerkezetvizsgálata jelenleg is a gyógyszeripari NMR spektroszkópiai szolgáltatás legjelentősebb részét képezi világszerte. Ugyanakkor az ilyen típusú szerkezetvizsgálatok módszertanában olyan új lehetőségek nyíltak meg az utóbbi időkben, amik általában kevésbé köztudottak. Ezen túlmenően pedig számos egyéb olyan, a gyógyszeripari kutatás-fejlesztést és minőségbiztosítást hatékonyan és innovatív módon támogató NMR alkalmazás is előtérbe került, amelynek gyakorlati jelentősége, felhasználhatóságának lehetőségei és korlátai szintén kevésbé ismertek, illetve sokszor téves, vagy túlzottan optimista elképzelések alakultak ki velük kapcsolatban. Valójában ez utóbbi alkalmazások köre, valamint a mögöttük rejlő módszertani arzenál annyira tág, hogy ezen rövid keretek között még felsorolásszerűen sincs mód teljességükben áttekinteni őket. A jelen dolgozatban ezért elsősorban arra vállalkozunk, hogy röviden vázoljuk, illetve néhány gyakorlati példa megemlékezésével illusztráljuk a kismolekulás NMR-es szerkezetvizsgálatok modern műszerezettség mellett megnyíló lehetőségeit azoknak a szervezési elveknek és tapasztalatoknak az alapján, amelyek a Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutatói osztályának munkájához köthetők. Másodsorban, az NMR innovatív gyógyszeripari alkalmazásai közül nagyon röviden kitérünk a ligandum-receptor kötődésvizsgálatok legújabb lehetőségeire és korlátaira, valamint a kapcsolt technikák (elsősorban LC-NMR) alkalmazhatóságának jelen helyzetére.

Tárgyalásunk a következő két vezérfonalra épül. 1) Abban a privilegizált, de egyúttal fokozott felelősséggel is járó helyzetben vagyunk, hogy a Richter Szerkezetkutatói osztálya a régió legmagasabb szintű kiépítettséggel rendelkező NMR műszerparkjával rendelkezik, továbbá az osztály munkája sajátos módon illeszkedik a vállalati szervezeti struktúrába, ami a tipikustól sokban eltérő jellegű szerkezetvizsgáló szolgáltatásban testesül meg. Úgy véljük, hogy mindez olyan tapasztalatokat nyújtott és olyan szemléletet érlelt ki, amit ha teljességében nem is, de néhány vonatkozásában érdemes közkinccsá tenni. 2) Általános tapasztalatunk, hogy miután a tudományos-műszaki irodalom elsődlegesen valamely NMR alkalmazási terület sikeres eseteit publikálja, ezzel akarva-akaratlanul pozitív módon szűri a „valóságot”. Ebből adódóan az a

kép, amit egy (főleg még kiforratlan) alkalmazási terület lehetőségeiről pusztán az irodalom olvasásával, vagy anekdotikus információra alapozva alkothatunk, gyakran nem megfelelően életszerű, ami irreális elvárásokat, sőt helytelen beruházási, illetve munkamódszertani döntéseket is eredményezhet.

A következőkben a fenti vezérlő gondolatok mentén, a gyakorlati életszerűség optikáján keresztül igyekszünk egy közel sem teljes képet nyújtani a modern NMR spektroszkópia gyógyszeripari alkalmazási lehetőségeiről a kismolekulás szerkezetvizsgálatok tekintetében. Ennek megfelelően tehát nem tárgyaljuk például a gyógyszeripari célú biomolekuláris alkalmazások (biomolekulák szimilitásának, kismolekulás szennyezéseinek, térszerkezetének vizsgálata, metabonomika, stb.) igen jelentős lehetőségeit, annak ellenére, hogy ezen vizsgálatok egy része az utóbbi néhány évben osztályunkon napi gyakorlattá váltak. Ez a terület önmagában is olyan tág és izgalmas, hogy egyrészt méltó tárgyalása a jelen dolgozat kereteibe nem férne bele, másrészt a mi gyógyszeripari környezetünkben a biomolekulák szerkezetvizsgálatának problémaköre legfőképpen az ún. bioszimilitások (azaz egy originátor által gyártott fehérjéhez minél hasonlóbb szerkezetű saját gyártású termék) szerkezet-analitikájának vonatkozásában merül fel, az ezzel kapcsolatos know-how elemek többsége pedig jelenleg vállalati titkot képez. Ugyanakkor a hazai biomolekulás NMR vizsgálatok művelésének néhány érdekes vonásába nyújt betekintést a Debreceni Egyetem^{1,2} és az ELTE kutatóinak³ a jelen folyóiratban nemrég megjelent közleményei.

2. A Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutatói osztályának bemutatása

A gyógyszeripari analitikára nehezedő kihívások (ebbe beleértve a szerkezetvizsgálatokat is) 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 egyre növekvő igényeket támaszt a probléma megoldásában érintett kutatók együttműködésének és személyes felelősségének tekintetében is. Különböző gyógyszeripari cégek különböző szintű tudatossággal, illetve más-más filozófiával, ebből adódóan pedig más-más technikai és szervezeti apparátus kiépítésével közelítik meg ezt a problémát.

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

A Szerkezetkutatói 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 osztály kis szerves molekulák, illetve biomolekulák szerkezetvizsgálatát célzó stratégiai nagyműszereket foglal egyetlen szakmai és szervezeti egységbe. Az a szerkezetkutatói 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) egyedülálló minőségű és hatékonyságú szerkezetanalitikai támogatást biztosítanak. Az alábbiakban ezeket a jellemzőket vesszük röviden sorra.

2.1. Centralizált szerkezetkutatói szolgáltatás

A Richter a kiemelt képességű NMR és MS spektrométereit a cég egészét kiszolgáló központosított formában üzemelteti, ily módon a cég egésze számára elérhető egy „state-of-the-art” spektrométerekre, ezek egymást komplementer módon kiegészíténi tudó jellegűre, valamint cég-specifikus humán know-how-ra épülő szerkezetfelderítési potenciál. Mint azt a bevezetőben említettük, a gyógyszeriparon kívül általában kevésbé ismert, hogy az oldatfázisú kismolekulás NMR szerkezetfelderítés valójában mennyi mindenre terjed ki a tradicionális szintézistámogató szerepén túl. Hogy a legfontosabb ilyen egyéb alkalmazásokat említsük: *a)* 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; *b)* a méretnövelések során előálló nyomszennyezők meghatározása azzal a céllal, hogy a technológiai körülményeket a lehető legnagyobb tisztaságú hatóanyag előállítása érdekében lehessen optimálni (quality by design); *c)* a hatóanyag stabilitási tesztek során keletkező bomlástermékek szerkezetének meghatározása részint hatásági elvárásként, részint pedig azért, hogy ezek ismeretében megfelelően hosszú lejáratú időt biztosító kiserelési formát lehessen fejleszteni; *d)* hatóanyag gyártási nyomszennyezők szerkezetmeghatározása szintén hatásági követelményként, valamint azért, mert a nyomszennyezői profil egy adott gyártási technológiát egyedi módon, jellemzően jellemzően jellemző, ezért ennek ismerete pl. a gyógyszeripari versenyhelyzetből adódó szabadalomtörési perekben kulcskérdés lehet; *e)* a nagyon szigorú analitikai ellenőrzések során a specifikációkon esetleg kívül eső gyártási hatóanyagszavakkal összefüggésben gyakran felmerül, hogy a probléma lehetséges okát szerkezetkutatói oldalról is vizsgálni kell, *f)* 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; *g)* minőségellenőrzési céllal a hatóságok vagy más üzleti partnerek felé dokumentált szerkezetvizsgálati eredmények, amelyeknek egyik legfőbb célja, hogy szakmai tartalmukban és megjelenítési formájukban is kétséget kizáró módon tükrözzék az adott termék minőségét; *h)* vásárolt hatóanyagok, intermedierek, segédanyagok

analitikája kapcsán felmerülő szerkezetvizsgálatok, amelyek célja, hogy ellenőrizzük a beszállítónak a szerkezetre vonatkozó analitikai állításait (nem ritka, hogy a miénknél 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); *i)* 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 veszteségként jelentkezhet, hanem miután a gyógyszerek bizalmi termékek, az ezzel járó erkölcsi veszteség is rendkívül káros lehet, nem is beszélve az érintett szakemberek felelősségéről); *j)* új, természetes eredetű vegyületek szerkezetének azonosítása, *k)* végül, de nem utolsósorban, meg kell említeni a bioanalitikai szerkezetvizsgálatokat (amelyekre a fentebb említett okokból itt bővebben nem térünk ki).

Annak, hogy a fentebb vázolt feladatokat egy centralizált nagyműszeres szolgáltatás formájában valósítsuk meg, számos előnye van. Egy molekula vagy molekulacsalád, annak teljes gyógyszergyártási életciklusa során számos szervezeti egységet „megjár” és – amint azt a fentiek is érzékeltették – eközben számos különböző típusú szerkezetvizsgálati problémát vethet fel. A központosított szerkezetkutatói biztosság, hogy ily módon egy helyen csapódik le és tárolódik mindaz az NMR spektroszkópiai ismeretanyag, ami az adott molekulacsaládhoz kapcsolódik. Ez lehetőséget ad például arra, hogy alapos ismereteket (célszerűen gyakran 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 az NMR 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 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 spektroszkópiai háttér adatok osztályunkon rendelkezésre álltak.

2.2. „Főállású” spektroszkópikusok

Érdekes dolog belegondolni az NMR (és a mellette komplementer információt nyújtó MS) spektroszkópia szerkezeti kémiai célú „művelésének” évtizedekre visszanyúló történetébe.⁴ Az oldatfázisú NMR spektroszkópia kismolekulás szerves kémiai alkalmazása

világszerte az 1970-es évektől kezdett robbanásszerűen terjedni. A „spektrumfejtés” tudománya ekkoriban még fejlődésének kezdeti stádiumában volt, tehát azok az ismeretek, szabályszerűségek, amik a szerkezetmeghatározás mesterségbeli know-how elemeit képezik, ekkortájt kerültek felfedezésre. Ezidőben többnyire a vállalkozó szellemű vegyészek még maguk próbálták megtanulni a spektruminterpretáció fogásait, hiszen ez eleinte nem tűnt nagyobb kihívásnak, mint pl. az ugyancsak általuk művelt és már megszokott IR spektrumértékelés. Az NMR spektroszkópia rohamos módszertani fejlődése, a spektrométerek komplexitásának növekedése és a mérés technikai know-how egyre sokrétűbbé válása azonban hamarosan „egész emberek” követelt meg erre a célra. Így léptek színre azok a vegyészeti munkát támogató kismolekulás szerkezetanalízisre szakosodott NMR spektroszkópikusok, akik hatalmas NMR spektroszkópiai ismeretanyag és tapasztalat hordozóivá váltak.

Körülbelül az 1990-es évektől jelent meg a spektrométerek felhasználóbarát üzemmódban való működtethetőségének tendenciája, azaz a készülékek (bizonyos alkalmazási korlátok között) nem NMR szakemberek által is könnyen használhatókká váltak. Emellett a legalapvetőbb két-dimenziós (2D) NMR módszerek is rutin jelleggel megvalósíthatóvá váltak a legtöbb spektrométeren.⁵ Ezek a tendenciák indították el az „önkiszolgáló” (open-access) NMR spektrométerek korszakát, abból a megfontolásból kiindulva, hogy a „fool-proof” mérési beállításokkal elkészíthető modern 2D technikák birtokában a vegyészek kevesebb „klasszikus” NMR ismeret birtokában is hatékonyan tudják monitorozni szintéziseiket. Ezzel párhuzamosan az NMR spektroszkópikusok egyre inkább a biomolekulás szerkezeti problémákra kezdtek koncentrálni, így a kismolekulás vizsgálatok sok intézményben számottevő mértékben visszakerültek a szintetikus vegyészek saját hatáskörébe. Bár ez a tendencia az egyik oldalon hasznosnak bizonyult, elsősorban bizonyos vegyületcsaládok rutin jellegű vizsgálatánál, a másik oldalon komoly veszélyei is vannak. Egyrészt számos esetben a „rutin” 2D spektrumok nem elégségesek a szerkezetek helyes megfejtéséhez, illetve az NMR spektroszkópiailag nem igazán „vájtszemű”, és a várt szerkezet iránt gyakran elfogult vegyész könnyen téves szerkezetre jut (amire sok példa található az irodalomban is). Másrészt félővé vált, hogy a kismolekulás NMR szakterület szűkülésével kikopnak a szakmából azok az élő szakismeretek, amelyek a 70-es 80-as években kiépültek, és amelyekre gyakran óriási szükség van (és mindig is lesz) az igazán megbízható és gyors szerkezetazonosításhoz. Felismervén ezt a problémát és ellensúlyozandó az előbb említett trendeket, a nemzetközi NMR szakma 1999-ben elindított egy a mai napig évente nagy sikerrel megrendezett konferencia sorozatot SMASH, azaz: „small molecules are still hot” néven, ami a kismolekulás NMR spektroszkópiai világ aktivitását és presztízsét hivatott fenntartani.

Mindezt azért volt fontos hangsúlyozni, hogy értsük, a fenti tendenciák fényében nem magától értetődő, hogy egy gyógyszeripari intézmény szervezeti, stratégiai, munkaköri, valamint funkcionális értelemben hogyan viszonyuljon a főállású kismolekulás NMR (vagy MS) spektroszkópiai szakma státuszához. Tapasztalataink alapján azonban teljes egyértelműséggel kijelenthetjük,

hogy egy 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, mérés-módszertani és spektruminterpretációs szaktudás mindenkor megfelelő erővel a rendelkezésére áll. Érdemes ennek okaira néhány olyan tényezőn 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 nagyon 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. Másrészt a gyógyszeriparban nem csak 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 közlését is. Ez pedig a szakterület csínjait-bínjait jól ismerő, azért felelősséget vállaló és abban felelősségre is vonható szakembereken keresztül biztosítható a leginkább. Harmadrészt a fentebb említett centralizáltság nyilvánvalóan csak egy „dedikált” spektroszkópiai csapattal valósítható meg ideális módon. Mint ahogy a 2.1. pontban már tárgyaltuk, ennek nagy előnye, hogy ugyanaz az NMR 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 iniciáljanak.

2.3. Holisztikus munkafilozófia

Osztályunk 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 banálisan magától értetődőnek tűnhet, gyakorlati megvalósítása számos nehézségbe ütközik, és számos döntési helyzetet vet fel. Osztályunkra évente átlagosan mintegy 3000 minta érkezik szerkezetvizsgálatra, ezeknek kb. 10%-a eltér a vegyész vagy a kémiai intuíció 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 ¹³C 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 mert 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 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.^{6,7,8,9} 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. Hangsúlyozzuk, hogy 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 születnek, igen ritka. Ugyanakkor ennek a munkastílusnak a haszna igen gyakran tetten érhető, legfőképpen amikor csak a két módszer együttműködése világít rá egy váratlan szerkezeti problémára.

2.4. Csúcsműszerezettség

Amint a fenti tárgyalásunk érzékeltette, a szerkezetkutatás átszövi egy gyógyszergyár tevékenységének szinte egész vertikumát. Az, hogy egy gyógyszer cég 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, 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 szinte exponenciálisan növekszik a megvásárolni kívánt készülékek teljesítőképességével. Erre a dilemmára való tekintettel egy gyógyszeripari cég számára a szerkezetkutatás szintjének és funkcionalitásának a meghatározása, valamint ennek a szolgáltatásnak a cégen belüli „pozicionálása” stratégiai kérdés kell (vagy kellene), hogy legyen. Véleményünk szerint egy cég stratégiai nagyműszereinek (NMR, MS) színvonala jól tükrözi a cég elkötelezettségét a kutatás és a termelés minősége, valamint az innováció iránt.

A Szerkezetkutatási osztály oldatfázisú NMR műszerparkja jelenleg egy 400 MHz-es, részben „open-access” céllal is használt „workhorse” készülékből, egy 500 MHz-es, hűtött mérőfejjel ellátott készülékből, és a régióban egyedülálló kiépítettségű, hűtött mérőfejjel, valamint LC és SPE kiegészítővel ellátott ultranagy érzékenységű 800 MHz-es spektrométerből áll (1. Ábra). Az alábbiakban ennek a készüléknek a gyógyszergyári funkciójáról és jelentőségéről szólunk néhány szót.

A Richterben üzemelő 800 MHz-es készülék különlegessége, hogy világviszonylatban is ritka módon, kettős felhasználási céllal került megvásárlásra. A jelenlegi általános gyakorlatban ugyanis a 300–600 MHz-es NMR készülékeket tekintik „kémiai frekvenciás”, azaz „kismolekulás”

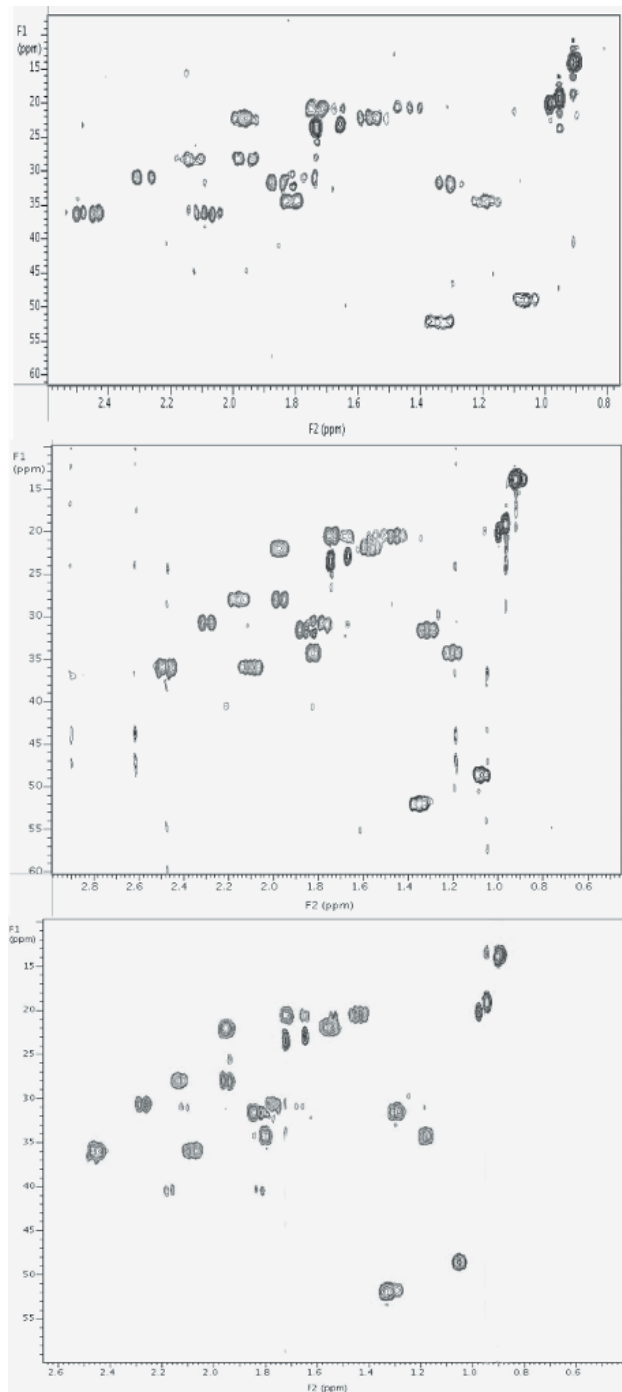
készülékeknek, a 700–950 MHz-es spektrométereket pedig „biológiai frekvenciás”, azaz elsősorban vagy kizárólagosan „nagy-molekulás” kutatási céllal használt készülékeknek. A Richter 800 MHz-es készülékét egyszerre használjuk kis- és nagymolekulás vizsgálatokra, ami főleg abban a tekintetben, hogy ilyen nagy térerőn rutinszerűen mérünk kismolekulákat, viszonylag szokatlan. Ugyanakkor ennek a megközelítésnek óriási gyakorlati előnyei vannak a gyógyszeriparban. Ennek okait érzékeltetendő, fontos rávilágítanunk az NMR mérési érzékenység kérdésének néhány elvi és gyakorlati vonatkozására.^{10,11}



1. Ábra. A Szerkezetkutatási osztályon üzemelő 800 MHz-es NMR spektrométer mágnes.

Amint az jól ismert, az NMR spektroszkópia páratlanul részletgazdag, atomi szintű információt tud nyújtani egy molekula szerkezetéről. Hasonló részletességű és egzaktágú strukturális adatokat csak az egykristály-röntgendiffrakció tud szolgáltatni, ami azonban nem ad molekuladinamikai információt és számos gyógyszergyári szempontból releváns probléma esetén – mint például a nyomszennyezők azonosításában – a felhasználhatósága rendkívül korlátozott. Ugyanakkor az NMR meglehetősen érzéketlen módszer, ezért az NMR mérési érzékenység javítására világszerte nagy erőfeszítések irányulnak. A számos lehetséges érzékenységnövelő technológia mellett kétségtelenül a leginkább robusztus (és így a különböző jellegű ipari K+F és minőségbiztosítási igényeket leginkább kielégítő) megoldást a különösen erős mágnesekkel (>700 MHz) kombinált hűtött mérőfej nyújtja. Amint az jól ismert, a térerő növelése növeli a minta makroszkópikus mágneszettségi vektorának abszolút értékét, ezáltal növeli a detektált jel nagyságát, tehát a mérési érzékenységet; ugyanakkor a rezonancia-frekvencia skálát is szélesíti, ezáltal növelve a spektrális diszperziót. A (meglehetősen drága) hűtött mérőfej esetében a tekercset, a hangolóköröket és az előerősítőt héliumgáz keringetésével 25 K-re hűtjük, ami az elektronikus zaj termikus részének (Johnson-zaj) csökkentésével redukálja a zajszintet, ezáltal 3–4-szeresére növelve a jel/zaj viszonyt és kb. tizedére csökkentve a mérési időt.¹² A Bruker-nél újabbán jóval olcsóbb beruházási és fenntartási költségű, nitrogénnel hűtött kriofej is elérhető (Prodigy®), ahol a jel/zaj arány növekedése kb. feleakkora.

A 800 MHz-es NMR spektrométer kiemelkedő érzékenységét és felbontását, összehasonlítva osztályunk másik két készülékével, a 2. Ábra illusztrálja.



2. Ábra. Ugyanabból a 3 mg-nyi szteroid mintából készített 2D ^1H - ^{13}C korrelációs spektrum (HSQC) részlete. A felső spektrum 400 MHz-en készült normál mérőfejjel 3 óra alatt, a középső spektrum 500 MHz-en hűtött mérőfejjel 22 perc alatt, az alsó spektrum 800 MHz-en hűtött mérőfejjel 5 perc alatt.

Mindennek a gyakorlati jelentősége a kismolekulás szerkezetvizsgálatokban óriási. Ezzel kapcsolatban érdemes az érzékenység jelentőségének két aspektusára felhívni a figyelmet, méghozzá a milligrammok és a mikrogrammok „világának” tekintetében.

A mikrogrammok világán belül, tehát az extrém kis mennyiségű minták vizsgálatánál könnyen érthetőnek tűnik, hogy miért lényeges a minél nagyobb NMR érzékenység, hiszen átlagos műszerezettség mellett az ismeretlen komponensek szerkezetét vagy csak alacsony biztonsági fokkal, vagy igen hosszú idő alatt, költséges és hosszadalmas mintagyűjtéssel, vagy egyáltalán nem lehet meghatározni. Ugyanakkor a nagy érzékenység és felbontás jelentőségének számos gyakorlati vonatkozását csak kevesen realizálják. Ezzel kapcsolatosan fontos hangsúlyozni, hogy az NMR spektroszkópia nagyságrendekkel érzéketlenebb, mint a tömegspektrometria, ami azt jelenti, hogy a gyógyszeripari szerkezetfelderítés egyik legfontosabb és leginkább problémás területén, azaz a mikroszennyezők és metabolitok világában nehéz az NMR-t és MS-t a holisztikus megközelítés jelentőségét szem előtt tartó módon “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 (ezt alább a 3.3. fejezet példáján keresztül illusztráljuk).

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 , ^{13}C és legalább négyféle további kétdimenziós NMR spektrum felvételét igényli (heterociklusok konstitúciójának igazolásához gyakran még többkötéses ^1H - ^{15}N 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 (pl. biszindolok - lásd alább) 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 ^{13}C asszignációhoz szükséges méréseket anélkül, hogy ez az átfutási időben veszteséget okozna. Ez nagyban növeli a szerkezetmeghatározás biztonságát, 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. Lehetőséget ad arra is, hogy a vegyészek a korábban megszokottnál jóval kisebb mintamennyiségeket adjanak le vizsgálatra, és biztonságot nyújt abból a szempontból, hogy a teljes asszignáció utólag bármikor elkészíthető egy molekuláról (pl. szabadalmi beadványoknál). Akár többkomponensű mintákban a minor komponensek szerkezetét is meghatározhatjuk (elválasztás nélkül), ami rendkívül nagy segítséget jelent a vegyésznek. Ezáltal a 800 MHz-es NMR készüléken a napi gyakorlatban számos olyan szerkezetkutatósi feladat válik gyorsan és egyértelműen megoldhatóvá, ami 500, illetve 400 MHz-en nem, vagy csak lényegesen lassabban, vagy csak jelentősen nagyobb anyagmennyiségekkel, vagy jóval tisztábban előállított mintákból lehetséges.

2.5. Tudományosság

Mivel a gyógyszeripari kutatások elsődlegesen üzleti érdekeltségűek 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”). Éppen ezért 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.

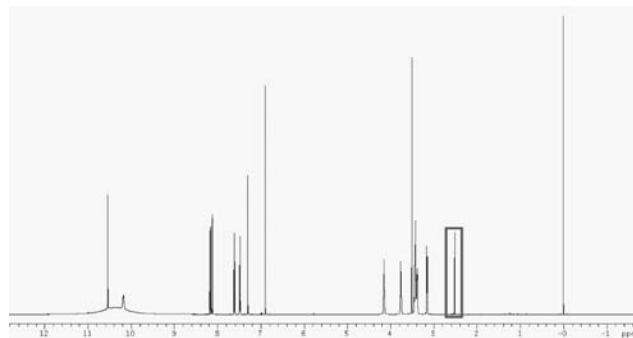
3. Példák

Az alábbiakban három közelmúltbeli és valós gyógyszeripari példával szeretnénk nagyon vázlatosan, inkább csak utalásszerűen, vagyis minden szakmai részletet mellőzve illusztrálni a fentieket.

3.1. Metánszulfonsav mennyiségi kimutatása

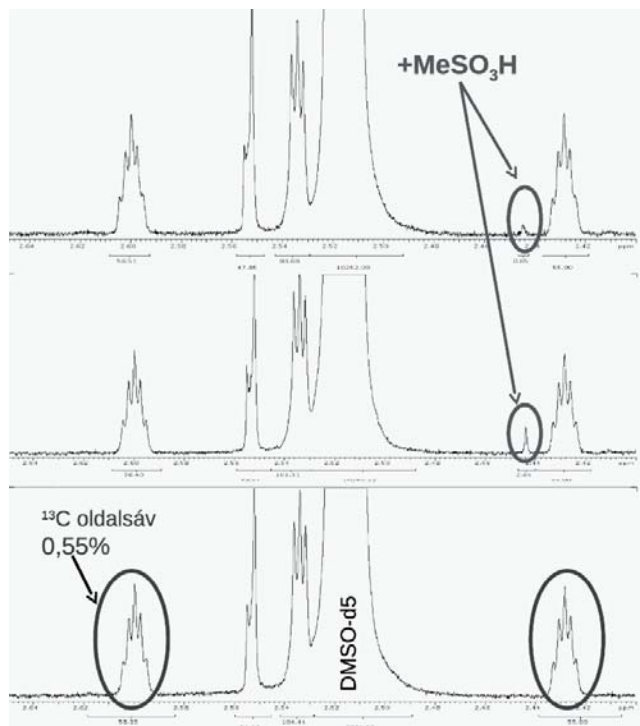
A közelmúltban egyik generikus hatóanyagunk esetében a gyártás kémiai hátterére hivatkozva a külföldi hatóság kérte annak bizonyítását, hogy a hatóanyagunk nem tartalmaz 20 ppm-nél nagyobb mennyiségben metánszulfonsavat, ami potenciálisan genotoxikus szennyezőnek tekinthető. Miután a hatósági kérésre a cégnek néhány napon belül reagálnia kellett, megfelelő GC-MS módszer kidolgozására nem volt idő, ezért a problémát nagyérzékenységű ^1H NMR mérésekkel kellett megoldanunk. A feladat teljesítése ^1H NMR-rel a MeSO_3H jelének megfelelően széles tartományú integrálhatóságát, azaz a hatóanyag közeli jeleitől való teljes elválását, valamint a hatóság által elvárt rendkívül kis kimutathatósági határ miatt ultra nagy mérési érzékenységet és felbontást követelt meg. Maga a hatóanyag csak $\text{DMSO}-d_6$ oldószerben volt megfelelően oldható, ezért további nehézségként merült fel, hogy a MeSO_3H metil jelének megfelelően el kellett válnia a $\text{DMSO}-d_5$ proton rezonancia jelétől, valamint annak ^{13}C szatellit jelétől is. Mindez csak 800 MHz-en volt megoldható. A vizsgált hatóanyag 800 MHz-es ^1H NMR spektrumát a 3. Ábra mutatja.

Ezt a spektrumot összehasonlítva ugyanezen minta 10 ppm (150 ng) metánszulfonsavval (4. Ábra, középen), valamint 2 ppm (30 ng) metánszulfonsavval addicionált spektrumával (4. Ábra, felül) megállapítható volt, hogy a hatóanyagban a metánszulfonsav NMR-rel kimutathatatlan (4. Ábra, alul) és biztosan nem haladta meg a 10 ppm, sőt még a 2 ppm-es mennyiséget sem. Főkomponens mellett ilyen kis mennyiségű potenciális szennyezés NMR spektroszkópiával történő kimutatására korábban sem mód, sem példa nem volt. A hatóság a bizonyítást elfogadta. Ez a példa nem szerkezetfejlesztési szempontból érdekes,



3. Ábra. A Richter által gyártott generikus hatóanyag 800 MHz-es ^1H NMR spektruma $\text{DMSO}-d_6$ oldószerben. A bekeretezett rész mutatja a $\text{DMSO}-d_5$ -től származó ^1H jelet, amelynek tövében kellett a MeSO_3H jelének hiányát bizonyítani.

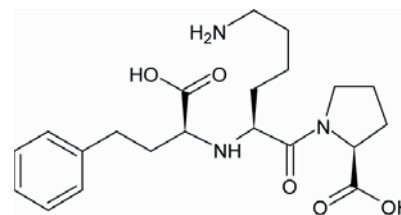
hanem azt demonstrálja, hogy bizonyos esetekben a csúcsműszerezettség házon belüli elérhetőségének milyen kritikus üzleti vonzata lehet.



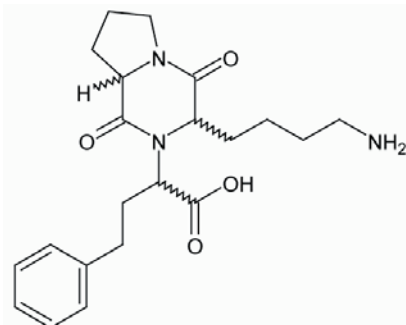
4. Ábra. A 3. Ábra hatóanyag spektrumának kinagyított részlete (alul), valamint a 10 ppm (középen), illetve 2 ppm (felül) metánszulfonsavval addicionált ugyanezen minta megfelelő spektrumrészletei.

3.1. Vásárolt diketopiperazin szerkezetének kritikája

Társaságunk régóta gyártja a lizinopril hatóanyagot (5. Ábra), aminek ismert potenciális szennyezői a diketopiperazinok (6. Ábra).



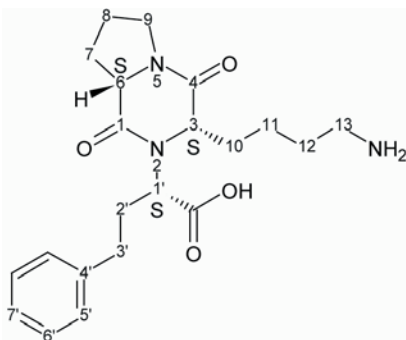
5. Ábra. A lizinopril hatóanyag képlete.



6. Ábra. Lizinopril-diketopiperazin szennyezők általános képlete.

A diketopiperazinok 3 sztereogén centrumot tartalmaznak, azaz 8 konfigurációs izomerként fordulhatnak elő (4 enantiomer pár), ráadásul bonyolult konformációs dinamikát mutatnak, ezért relatív konfigurációjuk azonosítása tipikus NMR feladat, de közel sem egyszerű. A téma tudományos igényességű („holisztikus”) vizsgálatának eredményeképpen egyik korábbi munkatársunk igen részletes tanulmányt publikált a vegyületcsalád NMR spektroszkópiai jellemzéséről.¹⁵

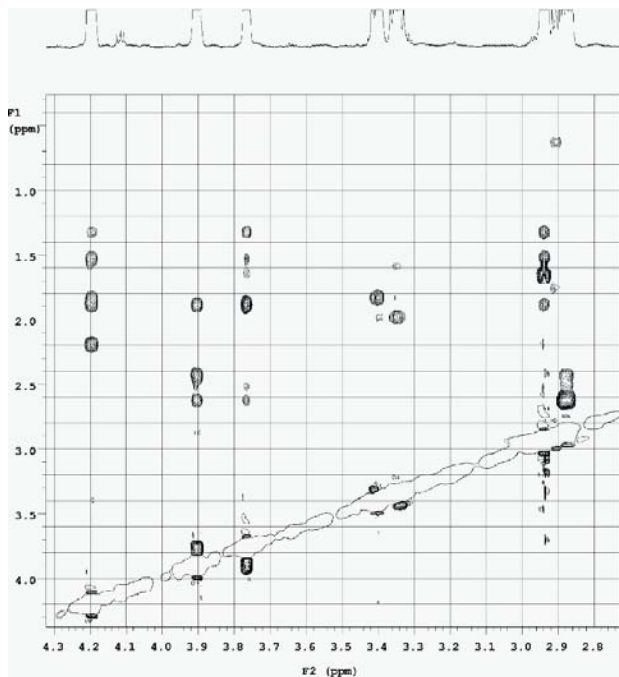
Nemrégiben a Richter szennyezési standardként egy neves külföldi cégtől 1'S3S6S konfigurációjú diketopiperazint vásárolt (7. Ábra).



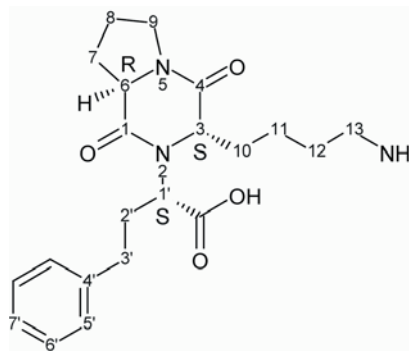
7. Ábra. Külföldi gyártótól vásárolt, névlegesen 1'S3S6S konfigurációjú lizinopril diketopiperazin standard képlete.

A mintához az elvárásoknak megfelelően analitikai bizonylat érkezett, többek között egy alacsony térerejű NMR karakterizálás. A beérkezett minta Richterben belüli HPLC analízise során azonban gyanús volt annak retenciós ideje, ezért a mintát szerkezetazonosítás céljából a kromatográfus kollégák NMR vizsgálatra küldték. A 800 MHz-en elkészített NOESY spektrum alapján (8. Ábra), valamint a molekulacsáladra vonatkozó korábbi igen részletes NMR háttérismereteink¹⁵ birtokában teljes egyértelműséggel bizonyítani tudtuk, hogy a vásárolt anyag valójában 1'S3S6R konfigurációjú (9. Ábra).

A példa azért érdekes, mert mutatja, hogy milyen fontos lehet a megfelelő tudományos háttér birtoklása egy üzleti probléma megoldásában. Ezekre az adatokra hivatkozva a Richter meggyőző, és minden vitát elkerülő módon tudta érvényesíteni reklamációját az ügyben. A példa azért is tanulságos, mert mutatja, hogy az igen magasintű analitikai apparátus meglétének milyen kulcsszerepe van minőségellenőrzési szempontból.



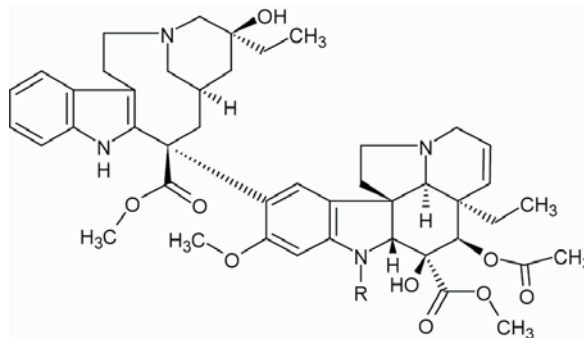
8. Ábra. Vásárolt diketopiperazin standard 800 MHz-es NOESY spektrumának részlete.



9. Ábra. A vásárolt diketopiperazin általunk megállapított helyes konfigurációja 1'S3S6R.

3.3. Vinblasztin és vinkrisztin szennyezők szerkezetmeghatározása

A vinblasztin (VLB) és vinkrisztin (VCR) a *Catharanthus roseus* nevű növény természetes, ún. „biszindol” alkaloidjai (10. Ábra), melyeket több mint 50 éve forgalmaznak rákellenes gyógyszerként.

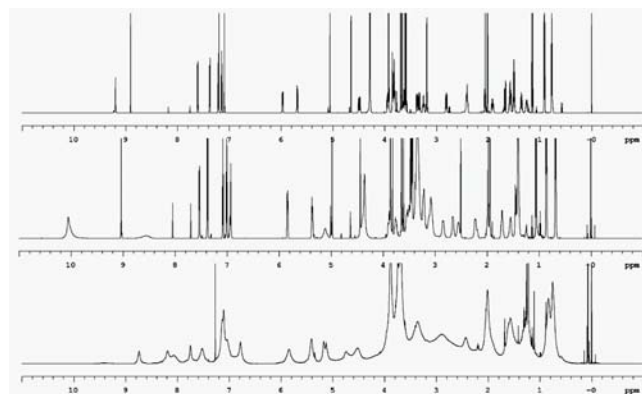


10. Ábra. A vinblasztin (R = CH₃) és a vinkrisztin (R = CHO) képlete.

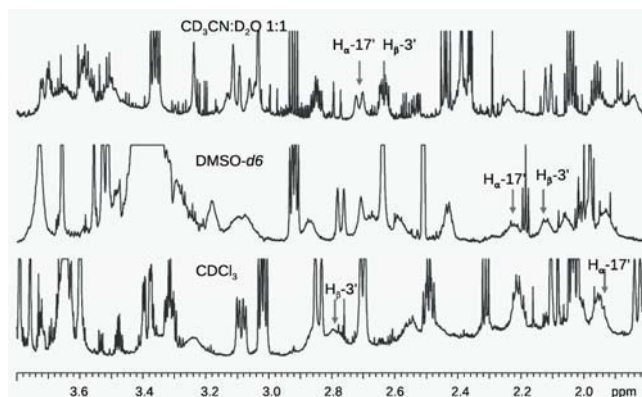
A Richter mindkét hatóanyagot nagy tisztaságban gyártja. A VLB extrakcióval és ezt követő kromatográfiás tisztítással, míg a VCR (miután a növényben jóval kisebb mennyiségben van jelen) a VLB-ból kémiai úton készül. A cég eljárásfejlesztést kezdeményezett a VLB kinyerés hatékonyságának fokozására. Az új eljárás üzemítése során a VLB frakciókban HPLC-UV alapján eddig ismeretlen rokon szerkezetű nyomszennyezések jelentek meg, így azonosításuk kritikusan fontos volt.

Az ilyen típusú biszindolok szerkezetének meghatározása elképzelhetetlen mélyreható NMR és MS vizsgálatok nélkül, ráadásul NMR szempontból is rendkívüli kihívásokat jelent a következő okokból.¹⁶ 1) Molekulaméreténél fogva igen zsúfolt spektrumokat ad, ami igényli a minél nagyobb téreőr (és felbontás) alkalmazását. 2) Ugyancsak méreténél fogva speciális relaxációs tulajdonságokkal rendelkezik, ezért a szerkezeti szempontból nagyon lényeges információt nyújtó nukleáris Overhauser effektusok csak nehezen mérhetők. 3) A szerkezet biztos feltérképezése szinte minden esetben megköveteli a teljes ¹H és ¹³C hozzárendelés elkészítését, ami hosszadalmas 2D méréseket és spektruminterpretációt igényel. 4) Az előbbi igény teljesítése a nyomszennyezők esetében LC-NMR-rel kivitelezhetetlen (lásd 5. fejezet), ami mindenképpen szükségessé teszi a preparatív HPLC-s legyűjtést. 5) Miután maguk a hatóanyagok igen drágák, és a kérdéses szennyezők mennyisége a hatóanyagra nézve a 0,1% környékén van, rendkívüli jelentősége van annak, hogy mennyi az NMR vizsgálatokra minimálisan legyűjtendő anyagmennyiség, mert ennek megfelelő mennyiségű időt és hatóanyagot kell „beáldozni” a probléma megoldására. Ezt a problémát jól érzékeltetik a következő adatok: az 1980-as években az akkor rendelkezésünkre álló 300 MHz-es készüléken 80 mg tiszta biszindol mintából 4-5 nap kellett a szükséges 1D és 2D mérések elkészítéséhez. Az ismeretlen szennyezők ilyen mennyiségű legyűjtése természetesen rendkívül idő- és költségigényes volt. Később, az 1990-es években a konvencionális mérőfejjel ellátott 500 MHz-es készüléken 2 teljes nap kellett a spektrumok elkészítéséhez 50 mg mintából. 2005 után, a hűtött mérőfejjel felszerelt 500 MHz-es spektrométeren már 20-30 mg mintából 1 éjszaka alatt elkészíthetők voltak a mérések. Jelenleg, a hűtött mérőfejes 800 MHz-es készüléken akár 10 mg alatti, szennyezésre nézve dúsított (nemcsak legyűjtött) mintából is 1 napon belül kivitelezhető az összes szükséges mérés, ami igen jelentős idő- és költségmegtakarítást jelent. Mindez ismételtelen mutatja a nagy mérési érzékenység gyakorlati jelentőségét. 6) A biszindolok konfigurációs szempontból bonyolult térszerkezettel rendelkeznek. 7) Az ismeretlen szennyezők szerkezetének meghatározása a gyakorlatban azt is igényli, hogy megfelelő NMR referenciaadatokkal rendelkezünk a hatóanyagokra nézve. A VLB és VCR hatóanyag szulfát só formájában kerülnek forgalomba. Bár a VLB bázis NMR irodalma jelentős, VCR bázisra, valamint VLB- és VCR-szulfátra nézve gyakorlatilag nincs érdemi NMR irodalom. 8) A biszindolok jellemző módon hajlamosak olyan konformációs dinamikát, illetve önasszociációs tulajdonságokat mutatni, amelyek rendkívüli módon szélesítik a rezonancia jeleket, ezzel nehezítve vagy megakadályozva a szükséges NMR jellemzők kimérését. A VCR esetében az *N*-formil csoport szobahőmérsékleten két, egymásba lassan átalakuló rotamerként van jelen, ami a jelek megkettőződését okozza, ezzel is növelve a mérések idejét,

és nehezítve az asszignációt. 9) A jelszélesedési problémák általában az oldószer megfelelő megválasztásával kezelhetők (11. Ábra), azonban a biszindolok ¹H kémiai eltolódásai is nagymértékű oldószer-érzékenységet mutatnak (12. Ábra).

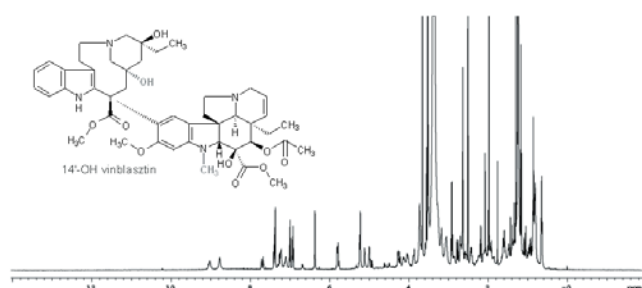


11. Ábra. A VCR szulfát ¹H NMR spektruma 800 MHz-en CD₃CN+D₂O 1:1 arányú elegyében (felül), DMSO-*d*₆-ban (középen) és CDCl₃-ban (alul).



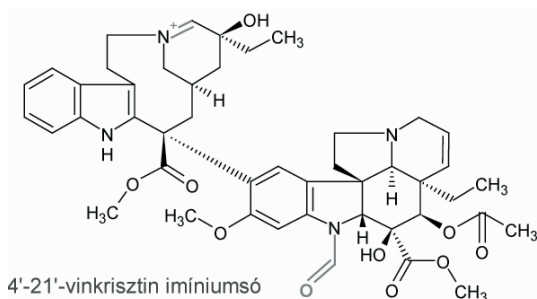
12. Ábra. Az egyik VLB szennyező (14'-OH VLB) ¹H NMR spektrumának részlete 800 MHz-en CDCl₃-ban (alul), DMSO-ban (középen) és CD₃CN+D₂O 1:1 keverékében (felül)

A fentiekre való tekintettel az ismeretlen biszindol szennyezők szerkezetének meghatározása először preparatív HPLC legyűjtést igényelt, amiből tipikusan 10 mg-nál kisebb tömegű, további szennyezőket is tartalmazó mintákat kaptunk szerkezetvizsgálatra. Illusztrációként az egyik ilyen szennyező (14'-OH VLB) különböző oldószerekben fölvetett NMR spektrumait mutatja a 12. és 13. Ábra. Ebben az esetben a szerkezet megfejtéséhez szükséges spektrumok mérési időigénye a következő volt: ROESY 2 óra, HMBC 5 óra, TOCSY 2 óra, HSQC 3 óra, ¹³C spektrum 10 óra.



13. Ábra. A 14'-OH VLB nyomszennyezőre nézve dúsított 5 mg mintából DMSO-*d*₆-ban készült 800 MHz-es NMR spektrum, valamint az általunk azonosított szerkezet.

Anyomszennyezők szerkezetének vizsgálatához szükség volt arra is, hogy referenciaadatként a VLB és VCR teljes NMR hozzárendelését elkészítsük különböző oldószerekben mind a bázis, mind a szulfát formákra, valamint hogy feltárjuk a kellemetlen jelszélesedések okait. Ezen vizsgálatok során tettük meg a felismerést, hogy a VLB/VCR sók a mono- és dikationos forma olyan egyensúlyaként vannak jelen, amely egyensúly helyzete érzékenyen változik az oldószer polaritásának és protikuságának függvényében. Nemrég publikált ezirányú eredményeink¹⁷ szilárd alapot nyújtottak ahhoz, hogy a kérdéses nyomszennyezők szerkezetét meghatározhassuk. Külön hangsúlyozandó, hogy az új vegyületek azonosítása szoros és kiegyensúlyozott együttműködést igényelt az NMR és nagyfelbontású MS-MS vizsgálatokat végző spektroszkópikusok között. Ennek jelentősége különösen a 4'-21'-VCR iminiumsó nyomszennyező (14. Ábra) azonosításának sok izgalmas fordulattal teli történetében jelentkezett, amelynek során az NMR és MS adatok közötti ellentmondások kísérletes iteratív jellegű feloldása vezetett a helyes szerkezethez.¹⁸



14. Ábra. A 4'-21'-vinkrisztin iminiumsó általunk meghatározott szerkezete.

Mindez jól illusztrálja, hogy egy-egy gyártási szennyező szerkezetének a meghatározása milyen sok gyakorlati nehézséget vet fel, és milyen kihívásokat jelenthet mind műszerezettségi, mind pedig intellektuális szempontból.

4. Ligandum-receptor kötődésvizsgálatok NMR spektroszkópiával

A kismolekulák fehérjekötődésének tanulmányozása biokémiai, racionális hatóanyagfelfedezési és fejlesztési, valamint farmakokinetikai szempontból egyaránt fontos feladat. Az interakciót mind a kismolekula, mind a makromolekula oldaláról vizsgálhatjuk NMR spektroszkópiával.¹⁹⁻²⁴

A fehérjén detektált módszerek közül a 2D ¹H-¹⁵N HSQC spektrum alkalmazása a leggyakoribb. Az amidprotonok korrelációs csúcsai a fehérje gerinc állapotát tükrözik és kismolekula hozzáadására történő változásaikból nemcsak a kölcsönhatás tényére, hanem annak erősségére és a fehérje kötőhelyére is következtethetünk.¹⁹⁻²⁴ Hátránya, hogy ¹⁵N izotópjelölt fehérje nagyobb mennyiségére (>100 μM) van szükség és kb. 30 kDa-nál nagyobb fehérjék esetén (jelszélesedés miatt) a ma elérhető legnagyobb téror esetén is csak a flexibilis doménekre korlátozva, speciális módszerekkel (pl. TROSY: transverse relaxation optimized spectroscopy, metil ¹³C-izotópjelölés²⁵) vagy egyáltalán nem alkalmazható.

A ligandum megfigyelésén alapuló módszerek fehérjeigénye 2-3 nagyságrenddel kisebb, és nincs szükség annak izotópjelzésére sem. Kötött állapotban a kismolekula a fehérjével alkotott komplexére jellemző relaxációs, diffúziós és NOE (nuclear Overhauser effect) tulajdonságokat vesz fel, jelei erősen kiszélesednek az oldatbeli szabad állapothoz képest. Ha két populáció között gyors a csere, kiátlagolt kémiai eltolódásokat, relaxáció-sebességeket (jelszélességeket) vagy diffúziós állandót mérhetünk.^{24,26} A gyors csere feltétele miatt a legtöbb ligandum alapú módszer csak a gyenge-közepes affinitású (K_d : 100 nM-10 mM) rendszerekre működik (kompetícióval erősebb kötődés is detektálható^{27,28}), ezeknek az ún. fragmens alapú gyógyszerfejlesztésben^{13,23,24} van jelentősége. Kötődő kismolekulák elegyekből történő azonosítására (szűrésére, NMR screening) érzékeny módszerek alapulnak ¹⁹F detektáláson,²⁹⁻³¹ közülük az ún. FAXS (fluorine chemical shift anisotropy and exchange for screening) kompetíciós kötődésvizsgálati módszer, amely fluorozott „kémligandumot” igényel, a nM-os enzimigényű 3-FABS (3 fluorine atoms for biochemical screening) funkcionális biokémiai esszé során pedig a fluorozott szubsztrát és a belőle adott idő alatt keletkezett termék molarányát mérjük NMR-el. A ligandum ¹H NMR jeleit detektáljuk a relaxációs ($T_{1\rho}$, T_2) módszerek^{24,31} vagy a telítésátvitel-differencia (saturation transfer difference, STD) esetén.^{32,33} Az STD során a fehérje egyes protonjait besugározva a telítési információ spindiffúzióval szétterjed a makromolekula egészére és a kötődő ligandum fehérjeközelbeni protonjaira is. Utóbbiak a kismolekula disszociációja után is megőrzik egy bizonyos ideig ezt a telítési információt, ami a kötődő molekulareszlet rezonanciajeleinek intenzitásváltozásában jelentkezik egy üres tartományon besugárzott kontrollspektrumhoz képest.³² Vegyülettárak NMR alapú szűrése oldható fehérjével ma már a gyógyszeriparban is egyre gyakrabban alkalmazott módszer (a Richter NMR laboratóriuma is rendelkezik validált módszerrel), bár áteresztőképessége az újabb fejlesztések (érzékenységnövelés hűtött mérőfejekkel, 10-20 vegyületet tartalmazó elegyek szűrése) ellenére sem közelíti meg a HTS (high throughput screening) esszéjét, kivéve a szilárd hordozóhoz immobilizált fehérjét, automata átfolyó rendszert, speciális mérőcellapárt és ezen térfogatszelektív NMR ¹H detektálást megvalósító, szabadalommal védett ún. TINS (target immobilized NMR screening) módszert.^{35,36} Az aspecifikus kötődés miatti fals pozitív találatok komoly gyakorlati problémát jelenthetnek a ligandum alapú módszereknél, eliminálásuk referencialigandum leszorításával (kompetíció)^{33,34} vagy inaktivált fehérjét alkalmazó kontroll³⁵ mérésével lehetséges.

Membránfehérjékhez történő kötődés vizsgálata lényegesen problematikusabb, és jelenleg is alaputatási szinten, elsősorban akadémiai kutatóhelyeken művelt terület.³⁷⁻⁴⁰ Anyagtakarékosságuk miatt elsősorban ligandum oldali (STD, relaxációs) módszerek jönnek szóba. Kulcskérdés a fehérje stabilitásának, funkcionális formájának megőrzése a szolubilizálás³⁸ vagy immobilizálás (TINS)³⁶ során, jelenleg ez csak empirikusan kísérletezhető ki. Célravezető lehet a túlexpresszált célfehérjét tartalmazó membránpreparátumok alkalmazása,⁴⁰ ilyen inhomogén membránszuspenziókkal mi is végeztünk exploratív STD méréseket a Richterben. Mivel a ligandum aspecifikus kötődése, kitapadása sokkal valószínűbb egy lipideket is tartalmazó rendszerben (ezért

is alkalmazták az STD továbbfejlesztett, kettős differencia változatát: STDD³⁸⁻⁴⁰), mint oldható fehérjék esetén, kontroll membránpreparátumok és speciálisan optimált kompetíciós titrálások nélkül könnyű túlinterepreálni egy esetleges pozitív kötődési eredményt.

Míg az NMR kötődésvizsgálatoknak nagyobb vegyülettárak szűrésében egyelőre alárendelt szerep jut, az NMR páratlanul értékes információt szolgáltathat egy-egy találat kötődési geometriájáról a racionális hatóanyagfejlesztés számára. A már említett STD,⁴¹ valamint az újabb AFP-NOESY (adiabatic fast passage nuclear Overhauser effect spectroscopy)⁴² és DIRECTION (difference of inversion recovery rate with and without target irradiation)⁴³ módszerekkel a ligandum fehérjéhez legközelebbi protonjai azonosíthatók (epitóp feltérképezés). Transzferált NOESY alapján a kötődő ligandum geometriáját,^{44,45} interligandum NOE-k (ILOE) alapján pedig egy fehérje szomszédos helyein kötődő vegyületeket azonosíthatunk,^{22,45} a dokkolással kombinált INPHARMA (interligand NOEs for pharmacophore mapping) módszer⁴⁶ pedig két, ugyanarra a helyre kompetitíven kötődő ligandum relatív (esetleg abszolút) orientációját képes meghatározni. Az NMR-rel kapható ligandumoldali szerkezeti információ különösen értékesnek bizonyulhat membránfehérjére történő hatóanyagfejlesztés során, ahol általában a röntgenszerkezet nem ismert.

5. Kromatográfiával kapcsolt NMR

Az LC-NMR gyógyszeripari felhasználhatóságának kérdése (elsősorban metabolitok és nyomszennyezők szerkezetvizsgálatában) folyamatos és élő probléma, hiszen gyakran olyan operatív dilemmát vet fel, mint hogy a kérdéses minor komponenst célszerű-e inkább preparatív HPLC-vel legyűjteni és ebben a formában küldeni szerkezetmeghatározásra, vagy ez a lépés kikerülhet a megfelelő LC-NMR vizsgálatokkal. Bár sokszor nem lehet pontosan előre tudni, hogy ilyen esetekben mi a legbölcsebb döntés, a helyzet elemzéséhez rendkívül fontos annak megértése, hogy mire képes (és mire nem) az LC-NMR, legfőképpen pedig igen fontos azt látni, hogy a közhiedelemmel szemben az LC-NMR nem „spórolja meg” ab ovo a preparatív legyűjtést.

Ugyan a folyadékkromatográf direkt kapcsolását az NMR spektrométerhez (online LC-NMR) már a hetvenes évek végén megvalósították,^{47,48} elsősorban az NMR mérőfejek érzékenysége, valamint a megvalósításhoz szükséges speciális hardver- és szoftverigény miatt a technika alkalmazhatósága a kilencvenes évek végéig csak nagyon szűk területekre korlátozódott. Az utóbbi két évtized technológiai fejlesztései, így a drasztikus NMR érzékenységnövekedés (hűtött mérőfejek, „micro-(cryo)-probe-ok” megjelenése), az átfolyó küvettek kifejlesztése, valamint a hatékony oldószerelnyomási szekvenciák kidolgozása után került az LC-NMR technika arra a szintre, hogy a készülékek kereskedelmi forgalomban elérhető eszközökké váltak. Ennek következményeként az utóbbi évtizedben ugrásszerűen megnőtt az LC-NMR technika különböző tudományterületeken való alkalmazási lehetőségeivel foglalkozó szakkikkek és összefoglalók száma.^{49,50} Ezen területek között a gyógyszeripar szempontjából elsősorban

az új természetes vegyületek növényi extraktumokból való azonosítása, adott gyógyszervegyületek/jelöltek metabolizmusának a kutatás egyre korábbi fázisaiban való feltérképezése, valamint a hatóanyagok, készítmények fejlesztése során felbukkanó szennyezések, bomlástermékek azonosítása bír kiemelt jelentőséggel. A kromatográfiával (és egyéb elválasztástechnikákkal) kapcsolt NMR spektroszkópiai vizsgálatok megjelenése előtt ilyen típusú problémákat a keresett komponens komplex mintából való dúsítását, illetve (preparatív kromatográfiás) izolálását az NMR spektroszkópia klasszikus „off-line” alkalmazásával valósították meg. Az LC-NMR megjelenésével lehetőség nyílt arra, hogy az ilyen problémák a sok esetben hosszadalmas és költségigényes dúsítási, izolálási lépés kihagyásával is megoldhatóak legyenek.

Mindamellet, hogy a közlemények (elsősorban akadémiai intézetekből) száma az elérhető műszerezettséggel párhuzamosan ezeken a területeken is folyamatosan növekedett és növekszik, az on-line LC-NMR várt, széles körű elterjedése mégsem következett be a gyógyszeripar területén. Ennek legfőbb szakmai oka az, hogy a gyakorlati megvalósítást tekintve az NMR spektroszkópia off-line használatával összehasonlítva korántsem egyértelműek az on-line LC-NMR nyújtotta előnyök. Az „on-line versus off-line NMR” kérdés problematikája szinte a kezdetektől jelen van az LC-NMR, illetve a fent felsorolt problémákat gyakorlati szempontból tárgyaló szakirodalomban.^{7,51,52,53} Ennek az összehasonlításnak sarkalatos kérdése továbbra is az NMR érzékenység, hiszen ez még a ma elérhető nagy érzékenységű spektrométerek esetében is limitáló tényező. Ha egy tipikus metabolitazonosítási feladatot tekintünk, ahol például egy 10–50 μM oldhatóságú, 400 körüli relatív molekulatömegű gyógyszerjelöltből mintegy 10–30%-ban képződik metabolit, utóbbi koncentrációja a rendelkezésre álló biológiai mintában kb. 400 ng – 6 $\mu\text{g/ml}$. Ez a koncentráció a biztos szerkezetazonosításhoz szükségesnek a legalsó határa, és még akkor is csak korlátozott információtartalmú spektrumokat (1D és homonukleáris 2D ^1H) remélhetünk reális időbefektetéssel, ha a metabolit tisztán izolálva, deuterált oldószerben lenne ilyen koncentrációban feloldva. Ezzel szemben a metabolitvizsgálatra kapott biológiai minta általában limitált térfogatú, H_2O alapú és nagy pufferkoncentrációjú (sótartalmú), és az utóbbi komponensek további zavaró protonjeleket hozhatnak a spektrumba. Az on-line LC-NMR alkalmazás ekkor azt a feladatot rója az analitikusra, hogy olyan kromatográfiás módszert dolgozzon ki, ahol a fenti biológiai minta nagy részének egyetlen injektálásával a keresett komponens minél nagyobb mennyiségét az átfolyó cellába tudja juttatni. Ezen túlmenően, költséghatékonysági szempontokat is tekintve, a kromatográfiás módszert úgy kell optimálnia (protonált eluensek deuterált oldószerekre való cseréje, tipikusan D_2O és CH_3CN eluensek használata, a termosztálás szűkebb tartománya), hogy a mért NMR spektrumokban a kérdéses komponens jeleiből minél kevesebb essen az oldószerelnyomás miatt használhatatlan tartományokba. Hasonló kihívásokkal kell szembesülnünk szennyezések szerkezetfelderítése, illetve természetes vegyületek extraktumokból történő azonosítása során, ahol az elérhető mintatérlet és összetétel ugyan általában eltér a fenti scenáriótól, ám az NMR szempontokat továbbra is szem előtt kell tartani a sikeres megoldás érdekében.

A gyakorlatunk azt mutatja, hogy problémás szerkezetű és igen kis anyagmennyiségben rendelkezésre álló minták esetében a legbiztosabb módon a multinukleáris NMR és MS vizsgálatok kombinációja vezet egyértelmű eredményre. A holisztikus megközelítés a gyakorlatban akkor kivitelezhető a legmegfelelőbb módon, ha módunk van off-line NMR vizsgálatokra, hiszen ekkor lehetőségünk van az összes szükséges időigényes speciális NMR felvétel elkészítésére anélkül, hogy a mintának az LC küvetében való diffúziója időbeli limitet szabna a méréseknek. Ezen túlmenően off-line üzemmódban lehetőségünk adódik arra is, hogy a mintát bármikor visszategyük a spektrométerbe, ha újabb NMR kísérletek válnak szükségessé a szerkezet megfejtéséhez (ez tipikusan az első méréseket követő spektruminterpretáció során szokott felmerülni). Mindezen túl az off-line üzemmód tudja a legbiztosabban garantálni, hogy a tömegspektrometriás kollégák ugyanarról a molekuláról készítették el a nagyfelbontású MS-MS spektrumokat.

Mindent egybevetve, olyan életszerű helyzetekben, amikor a lehető leggyorsabban kell pl. egy ismeretlen nyomszennyező szerkezetét meghatározni, közel sem egyértelműek az LC-NMR előnyei, és az ideális munkamenet kidolgozása a fenti kérdések gondos mérlegelését igényli.

Az LC-NMR hátrányait kiküszöbölendő, az utóbbi évtizedben az on-line LC-NMR alkalmazásokról a fókusz (a fenti területeket figyelembe véve) egyre inkább az „at-line” LC-SPE-NMR felhasználás felé látszik eltolódni. A két módszer között az alapvető különbség az, hogy az LC-SPE-NMR esetében a keresett komponens kromatográfiás elválasztását követően azt egy szilárd fázisú extrakciós tölteten dúsítjuk, majd a megfelelő deuterált (!) oldószerben oldva végezzük el a szükséges NMR spektroszkópiai méréseket. Ez az elrendezés sokkal közelebb áll a klasszikus off-line NMR alkalmazáshoz. Az on-line LC-NMR-rel összevetve előny, hogy a legtöbb esetben nincs szükség a kromatográfiás rendszer NMR szempontokat is figyelembe vevő optimalására, és a tisztaságvizsgálati vagy pedig a keresett metabolit detektálására és kvantifikálására a farmakológián egyébként használt használt LC(-MS) módszerek a legtöbb esetben módosítás nélkül használhatók. Ezen felül az SPE töltetről való leoldáshoz „NMR-barát” deuterált oldószereket használhatunk, így a spektrum jóval kisebb része esik ki az oldószerelnyomás miatt (bár a minta koncentrációjától függően itt is szükség lehet az oldószer maradék jelének elnyomására). Emellett az LC-SPE alkalmazás lehetőséget kínál az oldószer alkalmas megválasztására, ami az oldószerspecifikus referenciaadatokat figyelembe véve megkönnyítheti a szerkezetfelderítést. Ezen túlmenően az LC-SPE-NMR elrendezés alkalmazásakor nem feltétlenül van szükség átfolyó küvetta alkalmazására a mérőfejben, a hagyományos 3-5 mm átmérőjű NMR csövekben is dolgozhatunk.

Ugyanakkor az extrakciós lépés beépítésével (ismeretlen komponens esetén nincs lehetőség a mindenre kiterjedő optimalásra) a keresett komponensből értékes anyagmennyiséget veszíthetünk (különösen erősen poláris metabolitok esetében), ami megnehezítheti a szerkezet felderítését. Emellett, amíg az on-line LC-NMR egyetlen injektálása során a „kromatográfiás szennyezésektől” (oszloptöltetről, eluensből dúsuló komponensek) származó jelek nem zavarják a keresett komponens jeleinek

azonosítását, addig a többszöri injektálás és extrakció miatt az LC-SPE minatelőkészítés során ezek a komponensek akár a keresett ismeretlenek mennyiségével összevethető mértékben dúsulhatnak fel, megnehezítve az NMR spektrumok kiértékelését.

6. Összefoglalás

A fentiekben igyekeztünk vázlatos képet nyújtani arról, hogy milyen sokrétű és komoly kihívásokkal teli elvárást támaszt a modern gyógyszeripar a kismolekulás oldatfázisú NMR spektroszkópiával szemben. Bemutattuk, hogy a Richter Gedeon Nyrt-ben működő NMR laboratórium hogyan próbál ezeknek a kihívásoknak megfelelni mind műszerezettség, mind munkafilozófia tekintetében. Bár az akadémiai szférában az igen nagy térerejű NMR készülékeket leginkább biomolekulás kutatások céljára használják, igyekeztünk rámutatni arra, hogy gyógyszeripari környezetben az ilyen spektrométerek érzékenysége és felbontása egyrészt rendkívül hasznos a mindennapi rutin kismolekulás feladatok megoldásában, másrészt pedig gyakran elengedhetetlen ahhoz, hogy a cég a termékminőségre vonatkozó modern hatósági követelményeknek eleget tegyen, vagy hogy vitás szabadalmi kérdésekben piaci érdekeit érvényre tudja juttatni. Ezzel kapcsolatosan tárgyaltuk a „holisztikus” szerkezetkutatás, legfőképpen az NMR és a tömegspektrometria együttműködésének szükségességét is. Mindezt három valós példán keresztül illusztráltuk. Röviden tárgyaltuk továbbá az NMR alapú kötődésvizsgálatok jelenlegi lehetőségeit valamint az LC-NMR használatának előnyeit és korlátait valós gyógyszeripari körülmények között.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük a Szerkezetkutatási osztályon jelenleg dolgozó összes kollégánknak (Balogh Gábor, Dékány Miklós, Háda Viktor, Hevér Helga, Kóti János, Kiss Róbert, Kreutzné Kun Ibolya, Nagy Magdolna, Pallag Erika, Sánta Zsuzsanna, Sziki Erika), valamint minden korábbi munkatársunknak, hogy szorgos és lelkes munkájukkal hozzájárultak osztályunk valamint a Richter fejlődéséhez, továbbá köszönjük a Richter vezetőségének a támogatást.

Hivatkozások

1. Batta, Gy. *Magy. Kém. Foly.* **2004**, 109–110, 127–135.
2. Szilágyi, L.; Kövér, K.; Batta, Gy.; Bányai, I.; Tóth, I. *Magy. Kém. Foly.* **2011**, 117, 133–141.
3. Bodor, A.; Farkas, V.; Harmat, V.; Jákl, I.; Karancsiné Menyhárd, D.; Stráner, P.; Perczel A. *Magy. Kém. Foly.* **2012**, 118, 159.
4. Sohár, P. *Magy. Kém. Foly.* **2004**, 109–110, 120–126.
5. Berger, S.; Braun, S. *200 and more NMR experiments*. Wiley-VCH: Weinheim, **2004**.
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.; Szóke, 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. Kovacs, H.; Moskau, D.; Spraul, M. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectr.* **2005**, *46*, 131–155.
13. Hajduk, P. J.; Greer, J. *Nature Rev. Drug. Disc.* **2007**, *6*, 211–219.
14. Batta, Gy.; Kövér, K.; Szántay, Cs. Jr., Eds. *Methods for structure elucidation by high-resolution NMR: Applications to organic molecules of moderate molecular weight. In Analytical Spectroscopy Library*, Elsevier, **1997**; Vol. 8, pp 1–357.
15. Demeter, Á.; Fodor, T.; Fischer, J. *J. Mol. Struct.* **1998**, *471*, 161–174.
16. Béni, Z.; Háda, V.; Dubrovay, Zs.; Szántay, Cs. Jr. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *69*, 106–124.
17. Dubrovay, Zs.; Háda, V.; Béni, Z.; Szántay, Cs. Jr. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.019>
18. Háda, V.; Dubrovay, Zs.; Lakó-Futó, Á.; Galambos, J.; Gulyás, Z.; Aranyi A.; Szántay, Cs. Jr. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, közlésre elfogadva.
19. Hajduk, P. J.; Burns, D. J. *Comb. Chem. HTS* **2002**, *5*, 613–621.
20. Stockman, B. J.; Dalvit, C. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectr.* **2002**, *41*, 187–231.
21. Lepre, C. A.; Moore, J. M.; Peng, J. W. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3641–3675.
22. Pellecchia, M. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 961–971.
23. Klages, J.; Coles, M.; Kessler, H. *Analyst* **2007**, *132*, 692–705.
24. Dalvit, C. *Drug Disc. Today* **2009**, *14*, 1051–1057.
25. Guo, C.; Zhang, D.; Tugarinov, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10872–10873.
26. Hajduk, P. J.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12257–12261.
27. Dalvit, C.; Flocco, M.; Knapp, S.; Mostardini, M.; Perego, R.; Stockman, B. J.; Veronesi, M.; Varasi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7702–7709.
28. Wang, Y. S.; Liu, D.; Wyss, D. F. *Magn. Reson. Chem.* **2004**, *42*, 485–489.
29. Dalvit, C.; Fagerness, P. E.; Hadden, D. T. A.; Sarver, R. W.; Stockman, B. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7696–7703.
30. Dalvit, C.; Mongelli, N.; Papeo, G.; Giordano, P.; Veronesi, M.; Moskau, D.; Kümmerle, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13380–13385.
31. Dalvit, C.; Gossert, A. D.; Coutant, J.; Piotto, M. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 199–202.
32. Meyer, B.; Peters, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864–890.
33. McCoy, M. A.; Senior, M. M.; Wyss, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7978–7979.
34. Ji, Z.; Yao, Z.; Liu, M. *Anal. Biochem.* **2009**, *385*, 380–382.
35. Marquardsen, T.; Hofmann, M.; Hollander, J. G.; Loch, C. M. P.; Kühne, S. R.; Engelke, F.; Siegal, G. *J. Magn. Reson.* **2006**, *182*, 55–65.
36. Früh, V.; Zhou, Y.; Chen, D.; Loch, C.; Eiso, A. B.; Grinkova, Y. N.; Verheij, H.; Sligar, S. G.; Bushweller, J. H.; Siegal, G. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 881–891.
37. Yanamala N.; Dutta, A.; Beck, B.; van Flett, B.; Hay, K.; Yazbak, A.; Ishima, R.; Doemling, A.; Klein-Seetharaman, J. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2010**, *75*, 237–256.
38. Meinecke, R.; Meyer, B. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3059–3065.
39. Claasen, B.; Axmann, M.; Meinecke, R.; Meyer, B.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 916–919.
40. Assadi-Porter, F. M.; Tonelli, M.; Maillet, E.; Hallenga, K.; Benard, O.; Max, M.; Markley, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7212–7213.
41. Kemper, S.; Patel, M. K.; Errey, J. C.; Davis, B. G.; Jones, J. A.; Claridge, T. D. W. *J. Magn. Reson.* **2010**, *203*, 1–10.
42. Auer, R.; Kloiber, K.; Vavrinska, A.; Geist, L.; Coudevylle, N.; Konrat, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1480–1481.
43. Mizukoshi, Y.; Abe, A.; Takizawa, T.; Hanzawa, H.; Fukunishi, Y.; Shimada, I.; Takahashi, H. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1391–1394.
44. Post, C. B.; *Current Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 581–588.
45. Rademacher, C.; Guiard, J.; Kitov, P. I.; Fiege, B.; Dalton, K. P.; Parra, F.; Bundle, D. R.; Peters, T. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 7442–7453.
46. Sánchez-Pedregal, V. M.; Reese, M.; Meiler, J.; Blommers, M. J. J.; Griesinger, C.; Carlomagno, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4172–4175.
47. Watanabe, N.; Niki, E. *Proc. Jpn. Acad. Ser B* **1978**, *54*, 194–199.
48. Bayer, E.; Albert, K.; Nieder, M.; Grom, E.; Keller, T. *J. Chromatogr. A* **1979**, *186*, 497–507.
49. Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Wilson, I. D. *J. Chromatogr. B* **2000**, *748*, 233–258.
50. Albert, K., Ed. *On-line LC-NMR and related techniques*. Wiley, **2002**.
51. Singh, S.; Handa, T.; Narayanam, M.; Sahu, A.; Junwal, M.; Shah R. P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *69*, 148–173.
52. Griffiths, L. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4091–4095.
53. Elipe, M. V. S. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *497*, 1–25.

The role and applicability of NMR spectroscopy in the modern pharmaceutical industry

For most chemists NMR spectroscopy is traditionally associated with its classical role of supporting synthetic chemistry projects. Outside of the pharmaceutical industry it is rarely known or appreciated however, that even if we disregard the more recent pharmaceutical uses of NMR such as biomolecular investigations, fragment-based drug design or metabonomics, the role of NMR in small-molecule structure determination is vastly more complex and important than that. It is also little known that the fiercely competitive business environment of the pharmaceutical industry as well as the tough regulatory demands place increasing pressures on the performance of NMR. Given the hugely expensive nature of high-end NMR instruments, the extent to which any given pharma company should, or would, allocate NMR resources to its own R&D projects or to its quality-control system, is not at all inherently obvious.

As NMR spectroscopists of the Spectroscopic Research Department of Gedeon Richter Plc. we are privileged in that Richter owns the

most powerful NMR instrumentation in the region, and in that our department works within a unique organizational framework along the lines of a special working philosophy. Based on the experiences and conceptual insights that we have gained within this working environment over the years, in this article we discuss the manifold industrial uses of NMR in liquid-phase small-molecule structure elucidation, and we explain the reasons why, in that capacity, high-end NMR instruments are playing an increasingly important role in the industry, particularly with regard to medicinal chemistry and the impurity profiling of drug substances. We also give a brief outline of the reasons why we advocate a „holistic” approach to NMR and MS-based structure elucidation, meaning that acquiring all the necessary NMR data needed for a full ¹H and ¹³C (¹⁵N) assignment together with high-quality MS data for each investigated sample has both short- and long-term benefits in both a scientific and business context. We provide three real-life examples that illuminate the above concepts. Additionally, we briefly discuss the use of NMR in ligand-receptor investigations and the feasibility of using LC-NMR for the identification of drug impurities, degradants and metabolites.