

Biológiailag aktív, többcsoportos molekulák észterhidrolízis sebességének jellemzése részecske- specifikus paraméterekkel

Doktori értekezés

dr. Szöcs Levente Szilárd

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Gáspár Vilmos, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Hegedűs Tamás, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Török Tamás, Ds.C., professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Perjési Pál, Ds.C., egyetemi tanár

Dr. Krajsovszky Gábor, Ph.D., egyetemi
docens

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítésjegyzék	4
1. Bevezetés (irodalmi áttekintés)	6
1.1 Észterek.....	8
1.1 Észter formában ható vegyületek.....	8
1.2 Prodrugok.....	9
1.2.1 A biohasznosíthatóság növelése	11
1.2.2 Gastrointesztinális tolerancia növelése.....	11
1.2.3 Íz javítása.....	11
1.2.4 Szag javítása	11
1.2.5 Vízoldékonyság növelése	12
1.2.6 Nyújtott hatástartamú készítmények előállítása	12
1.3 Észter típusú kábítószer molekulák	12
1.3.1 Heroin	12
1.3.2 Kokain	13
1.3.3 Metilfenidát	14
1.4 Észterhidrolízis	16
1.4.1 A nem-enzimatis ésterhidrolízis	16
1.4.2 Az enzimatis ésterhidrolízis.....	23
1.5 Az ésterhidrolízis kinetikája.....	28
1.6 Az ésterhidrolízist befolyásoló tényezők	30
1.6.1 Intramolekuláris tényezők	30
1.6.2 Intermolekuláris tényezők	32
1.7 Az ésterhidrolízis követésére alkalmas módszerek.....	33
1.7.1 Mágneses magrezonancia spektroszkópia.....	34
1.8 Protonálódási állandók áttekintése.....	35
1.8.1 Makroszkopikus protonálódási állandók	35
1.8.2 Makroállandók meghatározására alkalmas módszerek áttekintése	36
1.8.3 Mikroszkopikus protonálódási állandók.....	39

1.8.4 Mikroállandók meghatározásának lehetőségei	41
2. Célkitűzések.....	43
3. Anyagok és módszerek.....	44
3.1 Alkalmazott jelölések.....	44
3.2 A kísérletes munka során felhasznált vegyületek	44
3.2.1 A heroin és az előállított morfinszármazékok	44
3.2.2 A kokain és az előállított ekgonin származékok	46
3.2.3 A metilfenidát és a ritalinsav	49
3.3 NMR mérések	49
3.4 Egyensúlyi állandók meghatározása	50
3.5 Kinetikai vizsgálatok	50
4. Eredmények.....	52
4.1 A kísérletes munka során alkalmazott összefüggések és egyenletek áttekintése .	53
4.1.1 Egy protonálható és egy észtercsoportot csoportot tartalmazó vegyületek hidrolízise	53
4.1.2 Két protonálható és egy észtercsoportot tartalmazó vegyületek hidrolízise..	56
4.1.3 Két észter- és egy protonálható csoportot tartalmazó vegyületek hidrolízise	61
4.2. Morfinán vázas vegyületek	66
4.2.1 Protonálódási állandók	66
4.2.1 Hidrolízis sebességi állandók	67
4.3 Ekgonin vázas vegyületek.....	73
4.3.1 Protonálódási állandók	73
4.3.2 Hidrolízis sebességi állandók	74
4.4 Metilfenidát.....	79
4.4.1 Protonálódási állandók	79
4.4.2 Hidrolízis sebességi állandók	79
5. Megbeszélés.....	81
5.1 Morfinán vázas észterek	81
5.1.1 Protonálódási állandók	81
5.1.2 Hidrolízis sebességi állandók	81
5.2 Ekgonin vázas észterek	84
5.2.1 Protonálódási állandók	84
5.2.2 Hidrolízis sebességi állandók	84
5.3 Metilfenidát.....	86

5.3.1 Protonálódási állandók	86
5.3.2 Hidrolízis sebességi állandók	86
6. Következtetések.....	88
7. Összefoglalás	90
8. Summary.....	91
9. Irodalomjegyzék	92
10. Saját publikációk jegyzéke	106
10.1 A disszertáció alapját képező publikációk.....	106
10.2 A disszertáció alapját nem képező közlemények.....	106
11. Köszönetnyilvánítás.....	108

Rövidítésjegyzék

3AM - 3-acetilmorfin

6AK - 6-acetilkodein

6AM - 6-acetilmorfin

6ANMM - 6-acetil-*N*-metilmorfin

Ac - acil-hasadás

AchE - acetilkolin-észteráz

Al - alkil-hasadás

ADEPT - Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy (antitest irányított enzim prodrug terápia)

ADHD - Attention Deficit Hyperactivity Disorder (figyelemhiányos hiperaktivitászavar)

Asp - aszpartát

BE - benzoilekgonin

BEM – benzoilekgonin-metilamid

BuChE - butirilkolin-észteráz

CNS - central nervous system

dpgse - double pulsed field gradient spin-echo

DSS - dimetil-szilapentán-szulfonát

EC - extracelluláris

EC - Enzyme Commission (pl. EC 3.1.1.)

EME - ekgonin-metilészter

ER - endoplazmás retikulum

GDEPT - Gene-directed Enzyme Prodrug Therapy (gén irányított enzim prodrug terápia)

GIT - gasztrointesztinális traktus

Glu - glutamát

hCE - humán karboxil-észteráz

HDL - high-density lipoprotein

His - hisztidin

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A

IDPFG - inverse-detection gradient probehead

iso-OMPA - tetraizopropil-pirofoszforamid

KOD - kodein

KOK - kokain

K_w - vízionszorozat

LDL - low-density lipoprotein

LSD - lizergsav-dietilamid

L-DOPA - L-3,4-dihidroxifenilalanin

LSD - lizergsav-dietilamid

MEF - metilfenidát

NBS - National Bureau of Standards

NP-HPLC - normál fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

NMM - *N*-metilmorfin

PON - paraoxonáz

RP-HPLC - fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

RS - ritalinsav

Ser - szerin

S_N - nukleofil szubsztitúció

TMA - tetrametil-ammónium-klorid

1. Bevezetés (irodalmi áttekintés)

Észtercsoportot tartalmazó vegyületek nagy számban találhatóak a gyógyszerkincsben, de számos kábítószer is észter típusú molekula, mint például a kokain és a heroin.

Az észtercsoportot tartalmazó vegyületek legfontosabb biotranszformációs útvonala a hidrolízis, ami következtében történhet hatáscsökkenés, esetleg hatásvesztés, profarmakonok esetében viszont a hidrolízis eredményez biológiailag aktív molekulát.

Éppen ezért a hidrolízis kinetikájának egzakt mennyiségi jellemzése nagyon fontos a vegyületek metabolizmusának vizsgálata szempontjából illetve az új prodrugok tervezésénél is.

A heroin és a kokain (1. táblázat), a két legismertebb kemény drog, egyaránt két észter- és egy aminocsoportot tartalmaz. Részleges hidrolízisük során a keletkező termékeken egy észtercsoport mellett megjelenik egy újabb protonálható csoport is, mely nagyban befolyásolja a metabolizmus további lépéseit.

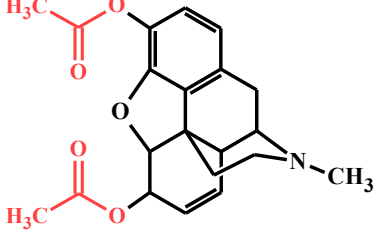
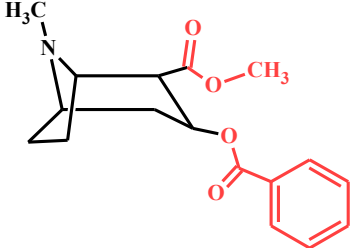
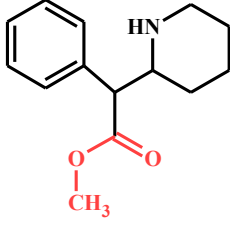
A heroin (3,6-diacetilmorfin) a morfin funkcionális prodrug-ja, így híres-hírhedt hatásainak farmakokinetikai fázisában heroinként, farmakodinámiás fázisában pedig – hidrolízis után – morfinként funkcionál, és utóbbi formában kötődik a receptorhoz. A heroin molekula két észter- és egy aminocsoportot tartalmaz. Hidrolízisében az észtercsoportok száma csökken, a bázikus csoportok száma azonban nőhet is, amennyiben a hármask helyzetű észtercsoport hidrolizál elsőként. Bomlásának sebességét elektronküldő és –szívó tényezők egyaránt befolyásolják, ezért ideális modellvegyület a hidrolízis sebességét befolyásoló intramolekuláris tényezők általános megismeréséhez, így prodrugok tervezéséhez.

A kokain központi idegrendszeri hatásainak kiváltásához mind a 2-es pozícióban lévő karboxilcsoportnak, mind a 3-as helyzetben lévő szekunder alkoholos hidroxilcsoportnak észteresítve kell lenniük. A molekula részleges hidrolízise hatásvesztéshez vezet, ezért a hidrolízis egzakt kinetikai és termodinamikai ismerete elengedhetetlen a vegyület farmakokinetikájának és farmakodinámiájának megértéséhez.

Közös pontok a heroin és a kokain estében, hogy a hidrolízis kaszkád 4 kovalens rendszert, 10 protonálódási állandót, 10 hidrolízis mikroállandót, benne konszekutív és szimultán kinetikai elemeket is tartalmaz, ezért – bár a molekulák és hatásaik mintegy 120 éve ismertek – részletes bomláskinetikájukat még nem tárták fel. A teljes részecske-specifikus hidrolízis feltérképezéséhez szükség volt a közti és a végtermékek protonálódási mikro- és makroállandóinak meghatározására illetve a közti termékek részecske-specifikus sebességi állandóinak meghatározására is.

A metilfenidát (1. táblázat) egy pszichotróp vegyület, amit főleg figyelemhiányos hiperaktivitás-zavarban (ADHD) illetve narkolepsziában szenvedő betegek kezelésére használnak. Magyarországon fokozottan ellenőrzött szerként van nyilvántartva. Szerkezetét tekintve egy észter- és egy szekunder amin tartalmaz. Hidrolízis után a keletkező vegyület már nem rendelkezik biológiai hatásokkal. A metilfenidát esetében is feltérképeztük a vegyület részecske-specifikus hidrolízis sebességi illetve protonálódási makro- és mikroállandóit.

1. táblázat: A heroin, a kokain és a metilfenidát szerkezeti képlete, pirossal az észtercsoportok vannak jelölve.

		
3,6-diacetilmorfin	kokain	metilfenidát

1.1 Észterek

Az észterek egy sav és egy alkohol (vagy fenol) kondenzációs reakciójában keletkeznek. A savkomponens lehet szerves sav (pl. karbonsav), de lehet szervetlen is (pl. salétromossav, salétromsav, foszforsav). A szervezetben számos észter típusú vegyület található, például a sejtmembrán alkotórészét képező foszfolipidek vagy a neurotranszmitter acetilkolin.

A gyógyszerkincsben is számos észter funkciós csoportot tartalmazó farmakon található. Ilyenek például az acetilszalicilsav, az enalapril, a petidin, a metilfenidát és a prokain. Számos kábítószer is az észterek kategóriájába sorolható, legfontosabbak közülük a kokain és a heroin.

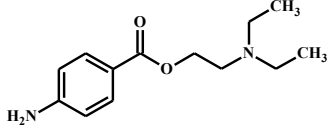
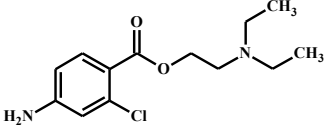
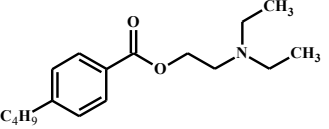
Az észter típusú gyógyszermolekulák két csoportba sorolhatók: az észter formában ható vegyületek és a prodrugok.

1.1 Észter formában ható vegyületek

Az észter formában ható vegyületek szervezetbe jutása után a hidrolízis miatt hatáscsökkenés vagy hatásvesztés következik be.

A helyi érzéstelenítők között számos észter típusú vegyülete található, ilyenek például a prokain vagy a tetrakain. A prokain hidrolízisének sebessége igen nagy, ezért hatása nagyon rövid. A klórprokain a C2-es helyzetben nagy elektronegativitású klór szubsztituenst tartalmaz, ezért a bomlás sebessége négyszerese a prokainénak. Négy szénatomból álló, elektronküldő tulajdonságú alkil-lánc bevitele a *p*-amino csoportra (tetrakain) a metabolizmus sebességét harmadára csökkenti, a toxicitást viszont megnöveli [1] (2. táblázat).

2. táblázat: Három észter típusú helyi érzéstelenítő szerkezete és hidrolízisük relatív sebessége a prokainhoz viszonyítva.

		
prokain	klórprokain	tetrakain
Hidrolízis relatív sebessége		
1	4	0,33

Az acetilkolin az egyik legfontosabb neurotranszmitter mind a perifériás, mind a központi idegrendszerben. Az acetilkolin-észterázok (AChE) hatására nagyon gyorsan elbomlik, ezért a terápiában paraszimpatomimetikumként nem használható. Származékai között szerepel a karbaminsavas észter a karbakol, illetve a metakolin is, ami az acetilkolintól annyiban különbözik, hogy az oxigén atom mellett (i szénatom) egy metilcsoportot tartalmaz. A szerkezeti módosításoknak köszönhetően az acetilkolin-észterázok nehezebben bontják le az említett vegyületeket, így hatástartamuk megnő. Elsősorban glaukóma kezelésére használják őket, azonban a metakolint légúti hiperreaktivitás megállapítására is lehet használni [2, 3].

A fenti példák demonstrálják, hogy számos vegyület esetén az észtercsoport esszenciális a hatás létrejöttéhez, a hatás időtartama pedig szerkezeti tényezőkkel befolyásolható illetve a különböző szerkezeti módosítások hatással vannak az észterhidrolízis kinetikájára is.

1.2 Prodrugok

Prodrugnak nevezünk minden olyan vegyületet, ami biotranszformációs lépés(ek)ben vesz részt, mielőtt farmakológiai aktivitást fejt ki (tehát a szervezetbe bejutva hatástalan vagy nagyon csekély hatású). A szervezetbe jutó prodrugokat két típusba sorolhatjuk [4]:

- 1.) Az első csoportba azok a vegyületek tartoznak, amelyek intracellulárisan aktiválódnak. Ezen a csoporton belül IA és IB alcsoportokat lehet megkülönböztetni.

IA: Az IA-ba azok a molekulák tartoznak, amelyek aktív formája a hatás helyén alakul ki. Ide tartoznak többek között az aciklovir, az 5-fluorouracil vagy az L-DOPA.

IB: Az IB alcsoportba azok a vegyületek tartoznak, amelyek átalakulása nem a hatás helyén történik, hanem azoknak a szerveknek a sejtjeiben, amelyek az elsődleges biotranszformációs útvonalat képviselik (máj, tüdő vagy gasztrointesztinális traktus). A sulindac, fenacetin vagy például a karbamazepin tartoznak ide.

- 2.) A második csoportba azok a molekulák tartoznak, amelyekből extracellulárisan (emésztőnedvek hatására vagy a szisztémás keringésben) alakul ki az aktív metabolit. Ez a csoport három további alcsoportra osztható (IIA, IIB, IIC)

IIA: A IIA alcsoportba azok a vegyületek tartoznak, amelyek a GIT miliójében alakulnak át aktív származékaikká. Ilyen például a Chronbetegségben alkalmazott szulfaszalazin.

IIB: A IIB-be azok tartoznak, amelyek a szisztémás keringésben vagy az extracelluláris folyadék kompartmentekben alakulnak át. Például a foszfénitoin tartozik ide, ami a fenitoin vízóldékony prodrugja vagy a lisdexamfetamin. A lisdexamfetamin az amfetamin jobbra forgató enantiomere és a lizin összekapcsolásával létrehozott prodrug. A molekula egy savamid kötést tartalmaz, így lassú hidrolízise miatt az abúzus kialakulásának veszélye is kisebb illetve a terápiás koncentráció is hosszú távra biztosított.

IIC: Ide azok a vegyületek tartoznak, amelyek a célsejtek közelében lévő extracelluláris térben alakulnak át. Például az antitest- vagy gén-irányított prodrugok a daganatterápiában (ADEPT [5], GDEPT [6])

Az I-es és II-es csoportokat nem lehet élesen elkülöníteni, mert léteznek olyan prodrugok amelyek ún. kevert típusba tartoznak (például a HMG-CoA-reduktáz gátló sztatationok).

A prodrug képzés célja nagyon sokrétű, az alábbiakban csak az észter funkciós csoportot tartalmazó vegyületekről lesz szó.

1.2.1 A biohasznosíthatóság növelése

Az észterképzés növeli a molekula lipofilitását, aminek többek között a felszívódásban van nagy jelentősége, így a biohasznosíthatóság nő. Erre példa az enalapril, aminek aktív formája az enalaprilát. Az antivirális oseltamivir esetében, az aktív forma az oseltamivir karboxilát biohasznosíthatósága mindössze 5%, az oseltamiviré pedig 80% [7]. De a valaciklovirt is ide sorolhatjuk, ami az aciklovir valin aminosavval képzett észtere. Sajnálatos példa a heroin (3,6-diacetilmorfin), ugyanis a morfin rossz biohasznosíthatóságának növelésére a molekulát 3-as és 6-os helyzetben acetilezték, így a lipofilitás nagymértékben megnövekedett, aminek következménye, hogy a heroin már átjut a vér-agy gáton.

1.2.2 Gastrointesztinális tolerancia növelése

A nem-szteroid gyulladáscsökkentők egyik legjellemzőbb mellékhatása a gyomorfal károsítása. A szalicilsavat erős gyomorirritáló hatása miatt csak külsőlegesen alkalmazzák. Az acetilszalicilsavat, amit Hoffmann 1897-ben állított elő először a szalicilsav acetilezésével [8], már lehet belsőlegesen is alkalmazni.

1.2.3 Íz javítása

Erre példa a klindamicin palmitát észtere, amit főleg szirupokban alkalmaznak [9].

1.2.4 Szag javítása

Illékony és erős szaggal rendelkező vegyületek esetén jöhet szóba ez a módosítás. Az 50-es évek végén a 2-merkaptotanol ftalát észterét állították elő (dietilditiol izoftalát) [10] amit lepra kezelésére használtak, ugyanis a 2-merkaptotanol nagyon illékony, jellegzetes erős szaga van és tűzveszélyes.

1.2.5 Vízoldékonyság növelése

Számos gyógyszervegyület vízoldékonysága csekély, ami parenterális adagolás esetén problémát okozhat. Ilyenek például a glükokortikoidok, amelyek vízoldékonysága észterképzéssel növelhető (pl. hidrokortizon-hemiszukcinát). Az E-vitaminnak is van forgalomban szukcinát észtere: a *D*- α -tokoferol-szukcinát.

1.2.6 Nyújtott hatástartamú készítmények előállítása

Hosszabb szénatomszámú telített karbonsavakat használnak például számos neuroleptikum észteresítésére. Egy nagyobb $\log P$ értékkel rendelkező vegyület keletkezik, ami a szervezet zsírraktáraiba diffundál, ahonnan a hatóanyag folyamatosan szabadul fel. Ilyen vegyület például a haloperidol, amit dekánsavval észteresíthetnek és az így keletkező haloperidol-dekanoátot intramuszkuláris injekcióban alkalmazzák.

1.3 Észter típusú kábítószer molekulák

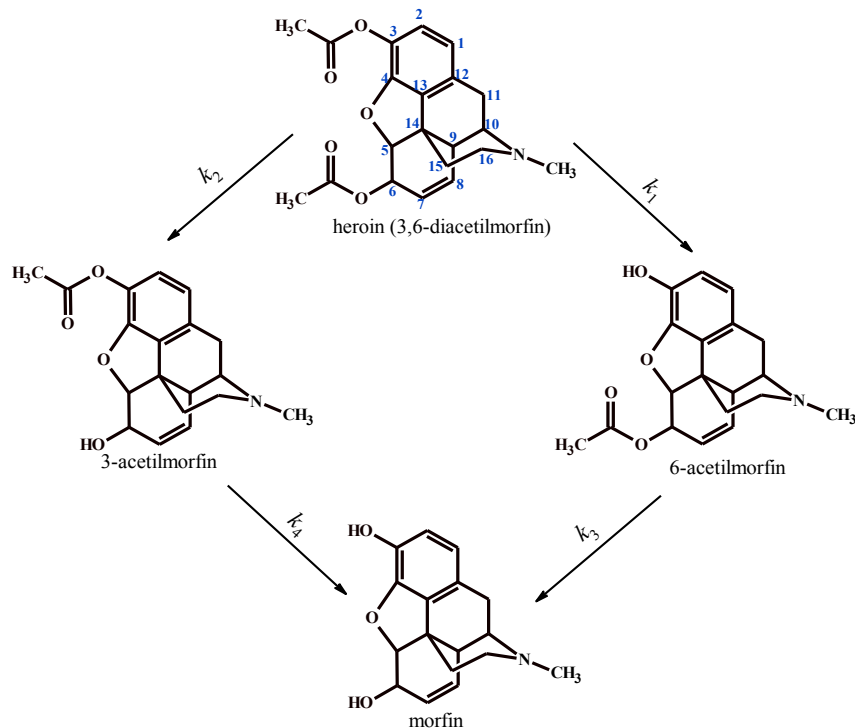
A kábítószereket két csoportba szokás osztani: lágy- és kemény drogokra. Lágy drognak tekintik például a marihuánát. A kemény drogok közé tartoznak az ópiátok (pl. heroin), stimulánsok (pl. kokain) vagy az LSD. A kokain és a heroin két észtercsoportot tartalmaznak és metabolizmusukban nagy szerepet játszik az észterhidrolízis.

1.3.1 Heroin

A heroin (3,6-diacetilmorfin) egy félszintetikus morfin származék erőteljes analgetikus és narkotikus hatással [11]. A vegyület az 1900-as évek elején terjedt el, mint kábítószer. Az 1920-as években hoztak korlátozásokat, törvényeket használatának visszaszorítására. Kábítószerként inhalálva illetve intravénásan alkalmazzák. Nagy lipofilitása miatt hamar átjut a vér-agy gáton, inhalálva 1-2 perc után, intravénásan adagolva azonnal hat. Napjainkban főleg olyan heroinfüggő betegeknél használják, aki nem tolerálja a metadont vagy a buprenorfint [12-14]. A terápiából való kivonásának két fő oka van: az egyik a nagy abúzuspotenciál, a másik pedig jobb és korszerűbb szintetikus morfinszármazékok felfedezése, mint például a fentanil, a sufentanil vagy a karfentanil. (A karfentanil a legerősebb opioid agonista, a morfinnál tízezerszer erősebb, de csak állatgyógyászatban használják [15])

A molekula hatása elsősorban a morfinnak köszönhető, ami hidrolízis után alakul ki a vegyületből és az opioid receptorokon (μ, κ, δ) fejt ki hatását. A hidrolízist a szervezetben karboxil-észterázok [16], acetilkolin-észterázok [17] illetve eritrocita butirilkolin-észterázok [18] katalizálják. A heroin hidrolízise történhet hármás és hatos helyzetben (1. ábra). A 3-as helyzetben történő hidrolízis 6-acetilmorfinhoz vezet. Ez tekinthető a major útvonalnak. A 6-os helyzetű hidrolízis 3-acetilmorfint eredményez, ez a vegyület kisebb, de nem elhanyagolható mennyiségben keletkezik. Az irodalomban eddig csak a major útvonal vizsgálatával foglalkoztak.

A 3AM-nak nincs, viszont a 6AM-nak (illetve a morfinnak) van analgetikus hatása, [19, 20], sőt az irodalomban leírtak egy speciális diacetilmorfin receptort is arra utalva, hogy a heroin önmagában is képes biológiai hatás kiváltására [21, 22].



1. ábra: A heroin hidrolízise

1.3.2 Kokain

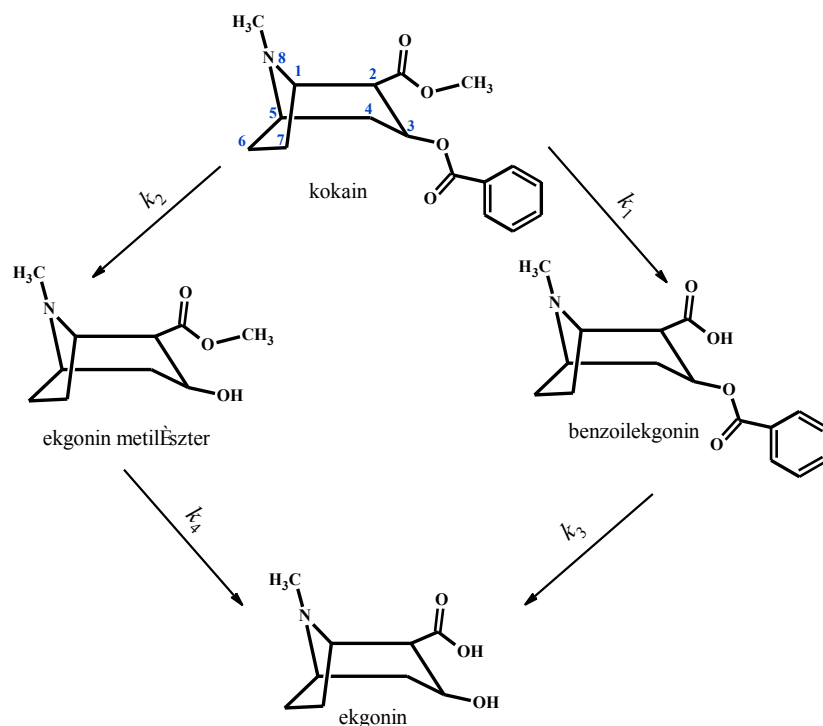
A kokain a dél-amerikai kokacserje (*Erythroxylum coca*) leveleiből kivont alkaloid. Erős helyi érzéstelenítő és pszichostimuláns szer. Nagy lipofilitása miatt gyorsan bejut a központi idegrendszerbe, ahol a dopamin, a szerotonin és a noradrenalin neurotranszmitterek visszavételét gátolja [23].

A heroin mellett a kemény drogok közé tartozik és csak az Amerikai Egyesült Államokban 2013-ban több mint 5000 ember halálát okozta [24].

Terápiásan már csak a fül-orr-gégészetben használják, mint helyi érzéstelenítő.

A kokain a szervezetben gyorsan hidrolizál benzoilekgoninná (BE) és ekgonin metilészterre (EME) (2. ábra). Mind a két folyamatot karboxil-észterázok és butirilkolin-észterázok katalizálják [25-27]. Ezek a major metabolitok, azonban számos minor metabolitot is kimutattak a vérből, kokain használat után (pl. norkokain, *m*-hidroxibenzoilekgonin) [28]. Kokain és alkohol egyidejű fogyasztása során átésztereződési reakció játszódhat le a 2-es helyzetben lévő metilészter és az etanol között. Ilyenkor kokaetilén nevű vegyület keletkezik, ami a kokainéval megegyező hatású [29] de potenciálisan kardiotoxikusabb [30].

A hatás kifejtéséhez mind a 2-es és 3-as helyzetben lévő észtercsoportra szükség van, tehát a hidrolízissel hatásvesztés következik be [31-35].

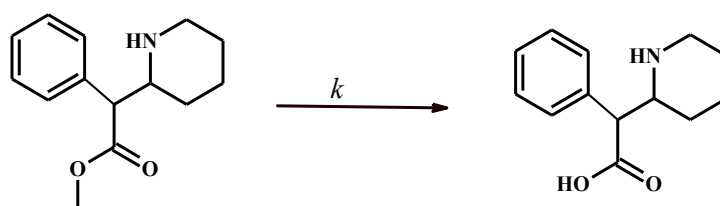


2. ábra: A kokain hidrolízise

1.3.3 Metilfenidát

A Ritalin hatóanyaga, a metilfenidát is egy észter típusú vegyület. Magyarországon fokozottan ellenőrzött szerként van forgalomban (P4 besorolású).

Terápiás indikációja a figyelemhiányos hiperaktivitás-zavar (Attention Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD) és a narkolepszia. Újabb vizsgálatok tárgya a vegyület indikációjának kiterjesztése idős betegekre, mert egy randomizált kettős vak vizsgálat szerint a vegyület egyetlen dózisa csökkenti az időskori elesések kockázatát [36]. A figyelemhiányos hiperaktivitás-zavar kialakulásában az agyi dopamin és noradrenalin neurotranszmitter rendszereket érintő funkcionális károsodások játszanak központi szerepet, azonban az ADHD patofiziológiai háttere nem teljesen tisztázott. A metilfenidát hatásmechanizmusa sem teljesen ismert, valószínűleg a dopamin visszavétel gátlásában van jelentős szerepe (hasonlóan az amfetaminhoz illetve a metamfetaminhoz). A metilfenidát fő metabolikus útja sztereoszelektív észterhidrolízis [37] (3. ábra) és a keletkező ritalinsav (α -fenil-2-piperidin-ecetsav) már inaktív vegyület [38]. Orális adagolás esetén a vegyület 70-75%-ban hidrolizál ritalinsavvá, <2%-ban pedig minor metabolitok keletkeznek, mint a *p*-hidroxi-metilfenidát, a 6-oxo-metilfenidát és az 5-hidroxi-6-oxo-metilfenidát. De a végső metabolikus lépés mindegyik molekula esetben az észterhidrolízis.



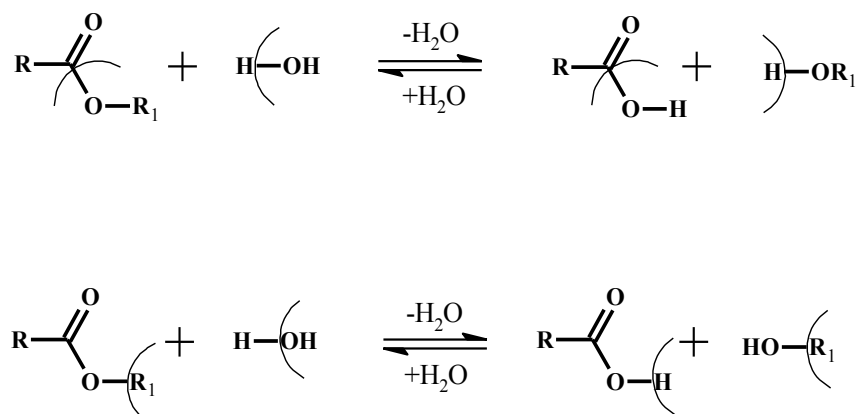
3. ábra: A metilfenidát hidrolízise

1.4 Észterhidrolízis

Az észterek hidrolízise történhet enzimátikus és nem-enzimátikus úton.

1.4.1 A nem-enzimátikus észterhidrolízis

Az észterképződés és hidrolízis egyensúlyra vezethető vissza, ahol az egyensúly helyzetét a koncentráció, a sebességét pedig a körülmények szabják meg és lényegesen gyorsítható például katalizátorokkal. Azonos körülmények között azonos mechanizmussal játszódnak le. Az észterhidrolízis esetén a hasadás történhet az acilcsoport és az oxigén atom között (acil-hasadás, jele: Ac) vagy az alkilcsoport és az oxigén atom között (alkil-hasadás, jele: Al) (4. ábra).



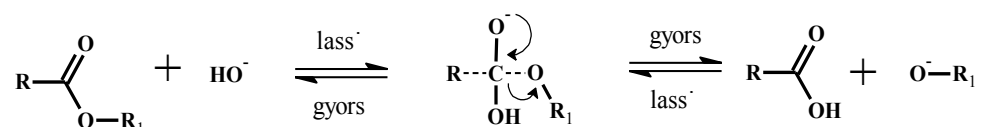
4.ábra: Acil-hasadás fent, alkil-hasadás lent

Az észterhidrolízis történhet sav- vagy báziskatalízissel, molekularitás szempontjából pedig lehet mono- vagy bimolekuláris. Így az észterhidrolízisnek illetve képződésnek elviekben nyolc típusa lehetséges, amit először Ingold vezetett be [39].

A báziskatalizált észterhidrolízis

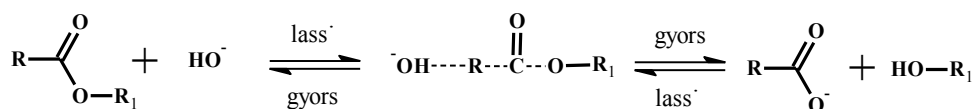
A báziskatalizált hidrolízis legismertebb példája a bimolekuláris báziskatalizált reakció ($B_{Ac}2$), amit elszappanosításnak is nevezünk. A reakció kezdeti lépése a hidroxidion nukleofil támadása a részlegesen pozitívan polározott karbonil szénatomra, ami a sebességmeghatározó lépés. Ezután kialakul egy tetraédes intermedier, amiről a hidroxidion „leszorítja” az alkohol komponenst, alkoxid formájában (5. ábra). Mivel a

keletkező alkoxid egy erős bázis, ezért proton vesz fel a karbonsavtól. Lúgos közegben ez a reakció irreverzibilis és mindig a karbonsav sója keletkezik. Ezért preparatív célokra is általában lúgos hidrolízist alkalmazunk kivéve, ha a vegyületünk lúgra érzékeny. Bimolekuláris reakció révén a lúg koncentrációjának növelése növeli a reakciósebességet is. Bár a hidroxidionok elhasználódnak a reakció folyamán, mégis sok esetben katalitikus mennyiségű lúg is biztosíthatja a hidrolízis folyamatos menetét, ugyanis a karbonsavak alkáli sói erősen hidrolizálnak, így vizes közegben újratermelődnek a hidroxidionok. A reakció típusa nukleofil acil szubsztitúció (S_NAc).



5. ábra: Észterek $B_{Ac}2$ típusú hidrolízise

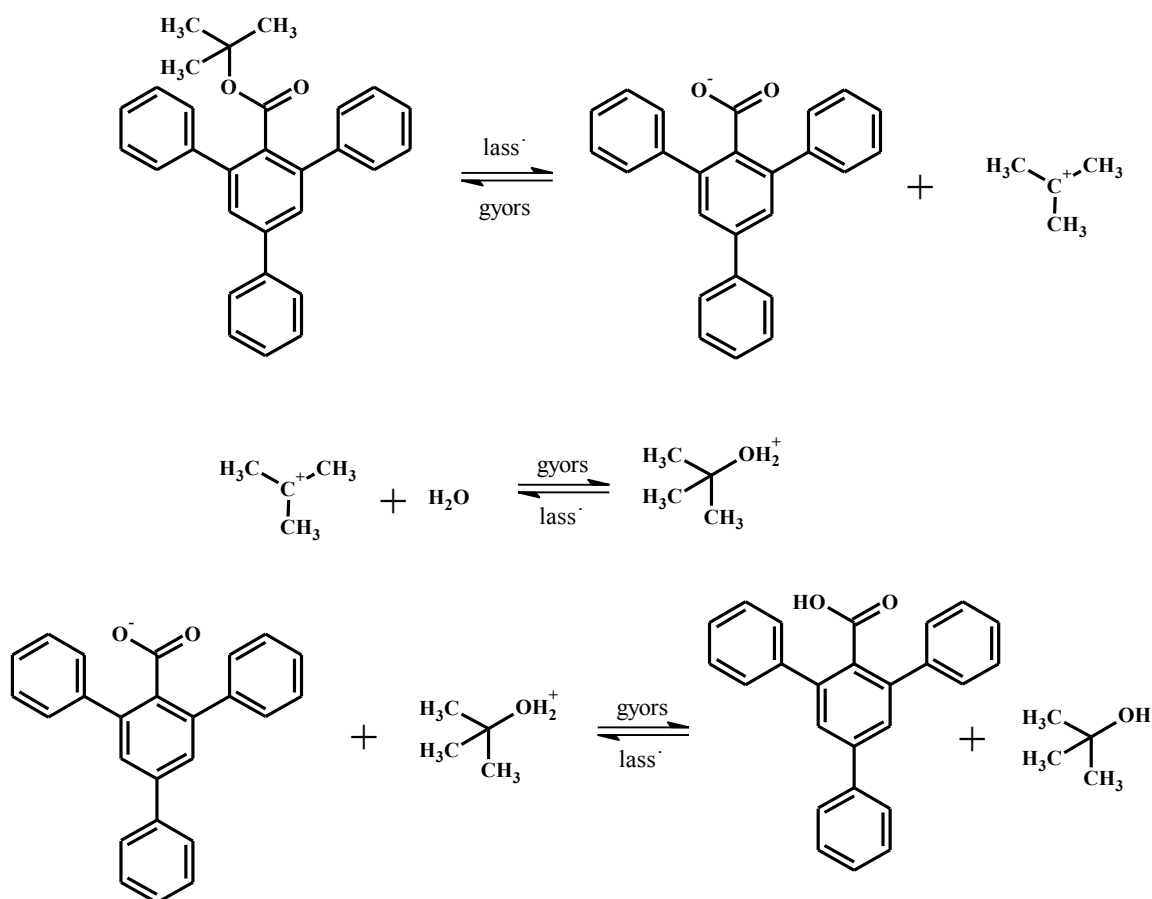
A bimolekuláris alkil-hasadást ($B_{Al}2$) a $B_{Ac}2$ teljesen háttérbe szorítja, mert a karbonil szénatom alapállapotban is jobban polározott, illetve reakció közben is jobban polározódik az alkoxicsoport oxigénhez kapcsolt szénatomjánál. (6. ábra). Ennek ellenére az irodalomban találunk néhány példát a $B_{Al}2$ típusú hidrolízisre. Az egyik a β -propiolakton semleges közegben történő hidrolízise [40], a másik a 2-benzilciklopentanon-2-karbonsav etilészterének hidrolízise, a metilésztere mellett [41], a harmadik pedig a metil-2,4,6-*tert*-butil benzoát lúgos közegű hidrolízise [42]. A reakció bimolekuláris nukleofil szubsztitúció mechanizmusa szerint megy végbe (S_N2).



6. ábra: Észterek $B_{Al}2$ típusú hidrolízise

Sokkal több példája ismeretes a monomolekuláris alkilhasadásnak ($B_{Al}1$) mint a bimolekuláris alkil-hasadásnak. Jellemzője, hogy csak különleges szerkezeti adottságok mellett tud érvényesülni és a sebessége független a lúg koncentrációjától. Főleg semleges közegben lép előtérbe. Szerkezeti feltételei, hogy az alkohol komponens elektronküldő csoportokat tartalmazzon, amelyek elősegítik a karboxilát képződését és a karbokation lehasadását. Ezen kívül fontos a képződött karbokation megfelelő stabilitása illetve az acil komponens nagy térigénye, ugyanis a sztérikus gátlás

következtében a hidroxidionok nukleofil támadása nehezített. Így a B_{Ac2} folyamat háttérbe szorul. A B_{Al1} típusú hidrolízisre példa a 2,4,6-trifenil-benzoészter-*tert*-butilészter, aminek a hidrolízise vizes-metanolos közegben is ugyanolyan gyorsan játszódik le, mint lúgos közegben. Ebben az esetben a három metilcsoport elektronküldő hatása elősegíti a karbokation leválását, ami ugyanolyan készségesen reagál a gyengébb nukleofil sajátosságú vízzel, mint az erősebb nukleofil hidroxidionnal (7. ábra). A reakciómechanizmus igazolása ^{18}O -izotópos vizet tartalmazó közegben történt meg, ugyanis a jelzett oxigén a képződött *tert*-butilalkoholban található meg [43]. A reakció típusa monomolekuláris nukleofil szubsztitúció (S_N1).



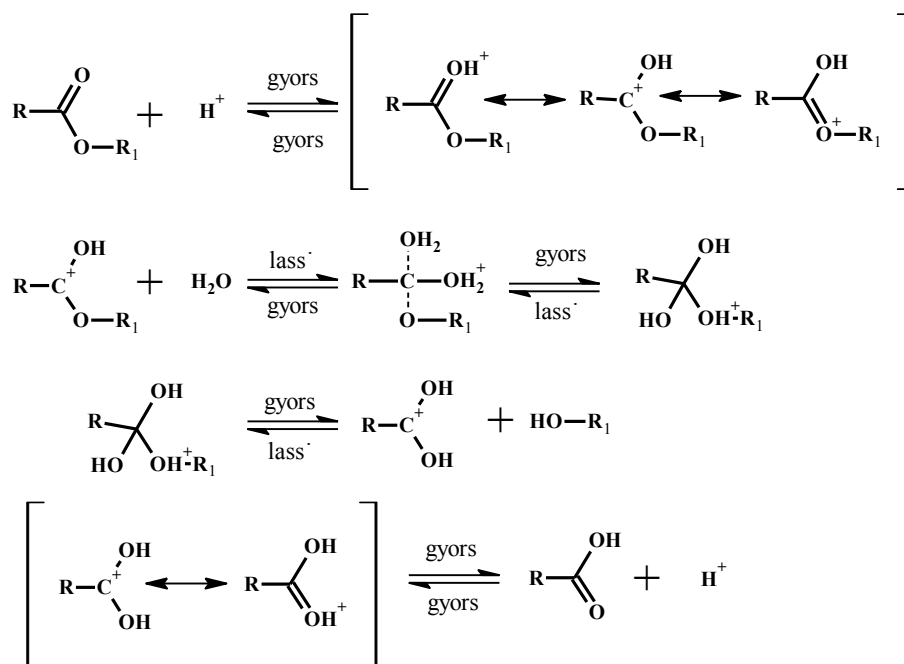
7. ábra: A B_{Al1} mechanizmus szerint lejátszódó 2,4,6-trifenil-benzoészter-*tert*-butilészter hidrolízise.

Monomolekuláris báziskatalizált acilhasadást (B_{Ac1}) eddig még nem írtak le az irodalomban. Ebben a nukleofil szubsztitúciós reakcióban (S_N1) -OR lenne a távozó csoport, ami nagyon valószínűtlen.

A savkatalizált észterhidrolízis

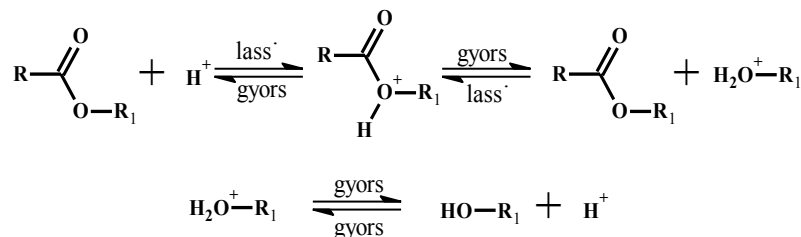
A savkatalizált észterhidrolízis legjelentősebb típusa a bimolekuláris savkatalizált ($A_{Ac}2$) észterhidrolízis, amelynek első lépése a karbonil szénatom protonálódása. Ezt követi a vízmolekula nukleofil addíciója a karbonil szénatomra, kialakítva a tetraédes intermediert. Ez a sebességhatározó lépés. Ezután egy intramolekuláris protonvándorlás következik, majd az alkohol eliminációja zajlik le. Végül a karbonsav deprotonálódásával képződik a termék (8. ábra).

A hidrolízis sebessége az észter koncentrációján kívül, a víz és a hidrogénion koncentrációjának is a függvénye. (A víz mennyisége abban az esetben jelentős, ha nem vízben, hanem például víz-aceton elegyben végezzük a reakciót.) A savamidok savval katalizált hidrolízise is $A_{Ac}2$ mechanizmus szerint megy végbe. A reakció típusa nukleofil acilszubsztitúció (S_NAc).

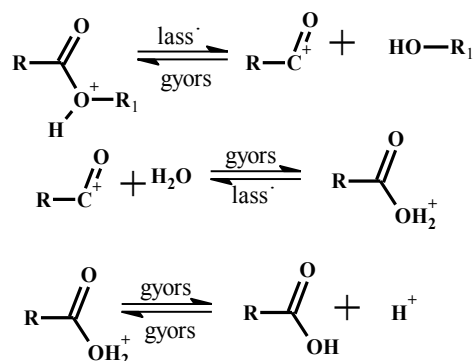


8. ábra: A bimolekuláris savkatalizált ($A_{Ac}2$) észterhidrolízis

A bimolekuláris savkatalizált alkilhasadás ($A_{Al}2$) (9. ábra) hasonlóan a $B_{Al}2$ -höz nagyon ritka esetekben fordul elő, az irodalomban a γ -laktonok hasításánál [44], illetve a 2,6-dimetil-benzimidát kénsavas hidrolízise során írtak le ilyen jellegű hidrolízist [45]. A reakció típusa bimolekuláris nukleofil szubsztitúció (S_N2).

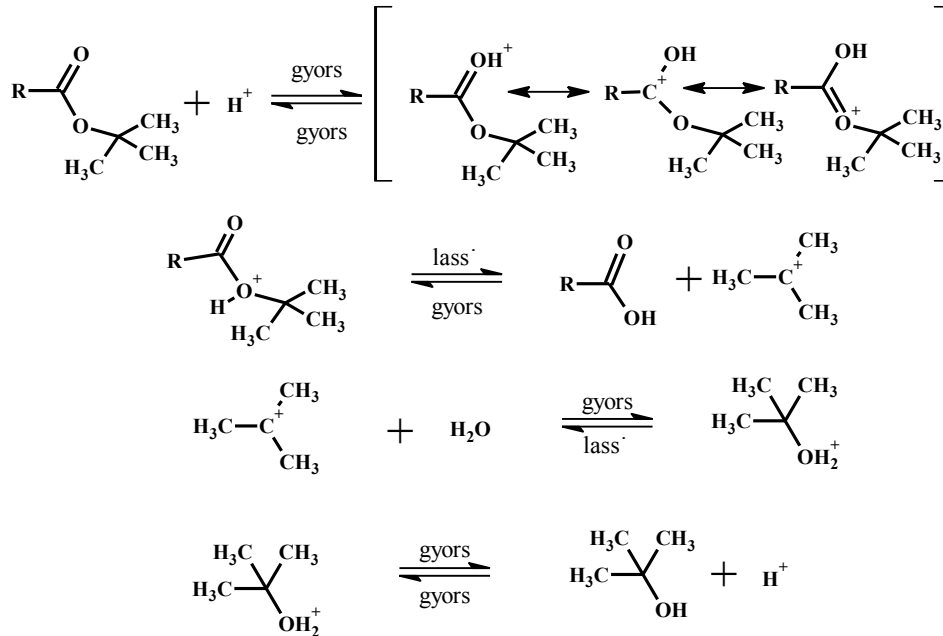
9. ábra: Az A_{Al}2 típusú észterhidrolízis

Amennyiben a karbonsav α -helyzetű szénatomján elektronküldő csoportok (pl. alkil) helyezkednek el, akkor a hidrolízis monomolekulárisan is lejátszódhat. Ha ezek a csoportok nagy térkitöltésűek, akkor megnehezítik a vízmolekula nukleofil támadását a karbonilcsoportra. E két hatás eredőjeként a bimolekuláris reakció sebessége lecsökkenhet. A monomolekuláris acil-O-hasadás (A_{Ac}1) disszociációval kezdődik, ahol egy acílium ion és egy alkohol keletkezik (10. ábra). Elektronküldő csoportok a disszociációt kedvezően befolyásolják. Ezt követi az acílium ion vízmolekulával való egyesülése, amely reakcióban a karbonsav protonált alakja keletkezik. Ez egyensúlyban van a szabad karbonsavval [46]. A hidrolízis független a víz koncentrációjától. Az A_{Ac}1 mechanizmussal végbemenő reakciókra példa a 2,4,6-trimetilbenzoesav észtereinek a hidrolízise [47]. A reakció típusa monomolekuláris nukleofil szubsztitúció (S_N1).

10. ábra: A monomolekuláris savkatalizált (A_{Ac}1) észterhidrolízis

A savas hidrolízis abban az esetben is monomolekuláris mechanizmus szerint játszódik le (A_{Al}1), ha az alkohol komponens tartalmaz elektronküldő csoportokat. Ebben az esetben a reakció első lépése az alkil-oxigén kötés lassú heterolitikus disszociációja. Ez a sebességmeghatározó lépés. Erre a reakciótípusra példa a *terc*-butilalkohol észtereinek ásványi savval történő hidrolízise (11. ábra) illetve a benzil-

acetát hidrolízise tömény kénsavas közegben [48]. A reakció típusa ebben az esetben is monomolekuláris nukleofil szubsztitúció (S_N1).



11. ábra: Az $A_{A1}1$ mechanizmus szerint végbemenő észterhidrolízis a *terc*-butanol észterek példáján szemléltetve

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy:

- 1.) az acilhasadás preferált az alkil-hasadással szemben
- 2.) térbelileg zsúfolt észtereket nehezebb hidrolizálni
- 3.) az észtercsoportban található két oxigénatom közül a protonálódás általában az acil csoport oxigénjén történik

A 3. táblázat az észterhidrolízis nyolc típusát foglalja össze.

3. táblázat: Az észter hidrolízis/képződés nyolc lehetséges típusa

Osztályozás	Mech.	Típus	A reakció lépései
Báziskatalizált	Acil-hasadás	B _{Ac} 1	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}^{\ominus} + \text{O}^{\ominus}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'} + \text{HO}^{\ominus}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH} + \text{O}^{\ominus}-\text{R}_1 \rightarrow \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^{\ominus} + \text{HO}-\text{R}_1$
		B _{Ac} 2	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_1 + \text{HO}^{\ominus} \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'}} \text{R}-\overset{\text{O}^{\ominus}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{lass'}]{\text{gyors}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH} + \text{O}^{\ominus}-\text{R}_1 \rightarrow \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^{\ominus} + \text{HO}-\text{R}_1$
	Alkil-hasadás	B _{Al} 1	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^{\ominus} + \text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{lass'}]{\text{gyors} + \text{H}_2\text{O}} \text{H}_2\text{O}^{\oplus}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{lass'}]{\text{gyors}} \text{HO}-\text{R}_1 + \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^{\ominus}$
		B _{Al} 2	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'} + \text{HO}^{\ominus}} \text{HO}^{\ominus} \cdots \text{R}_1 \cdots \text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R} \xrightleftharpoons[\text{lass'}]{\text{gyors}} \text{HO}-\text{R}_1 + \text{O}^{\ominus}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$
Savkatalizált	Acil-hasadás	A _{Ac} 1	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}^{\oplus} + \text{HO}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{lass'}]{\text{gyors}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}_2^{\oplus} \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'} + \text{H}^{\oplus}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$
		A _{Ac} 2	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'} + \text{H}^{\oplus}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'} + \text{H}_2\text{O}} \text{R}-\overset{\text{OH}_2^{\oplus}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{lass'}]{\text{gyors}} \text{R}-\overset{\text{OH}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{lass'}]{\text{gyors}} \text{R}-\overset{\text{OH}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH} \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'} + \text{H}^{\oplus}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$
	Alkil-hasadás	A _{Al} 1	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'} + \text{H}^{\oplus}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^{\oplus}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH} + \text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{lass'}]{\text{gyors} + \text{H}_2\text{O}} \text{H}_2\text{O}^{\oplus}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'} + \text{H}^{\oplus}} \text{HO}-\text{R}_1$
		A _{Al} 2	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'} + \text{H}^{\oplus}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^{\oplus}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{lass'}]{\text{gyors}} \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_1 + \text{H}_2\text{O}^{\oplus}-\text{R}_1 \xrightleftharpoons[\text{gyors}]{\text{lass'} + \text{H}^{\oplus}} \text{HO}-\text{R}_1$

A nem-enzimatis ésterhidrolízist számos egyéb vegyület is katalizálhatja, mint például a ciklodextrinek [49, 50], triklorometilszilan [51, 52], Dowex-50 [53] illetve indium-triklorid [54] is. Enantioszelektív ésterhidrolízis is megvalósítható polimerek segítségével [55, 56].

A fenol észterek hidrolízise általában gyorsabb, mint az alifás származékoké. Reagensként szóba jöhetnek például vizes-metanolos ammónium acetát [57] vagy az

Amberlyst-15 [58]. A fenol észterek szelektív hidrolízise is megvalósítható, mikrohullámú reaktorban alumíniummal [59].

Gyakorlati szempontból a sav- és báziskatalizált bimolekuláris illetve a savkatalizált monomolekuláris reakcióknak van jelentőségük.

1.4.2 Az enzimatis ésterhidrolízis

A gyógyszerek a szervezetbe kerülve különböző biotranszformációs folyamatokban vehetnek részt. Az éster típusú vegyületek leggyakoribb biotranszformációs lépése a hidrolízis, amit észterázok végeznek. Az enzimek osztályozására szolgáló rendszer az EC-szám (Enzyme Commission), ami 4 számjegyből áll pontokkal elválasztva (pl. EC 3.1.1.1 – a karboxil-észteráz enzimet jelöli). Az EC 3-ba a hidrolázok tartoznak, a 3.1 csoportba tartozók pedig olyan hidrolázok, amelyek észterkötést bontanak fel. Az észterázok tehát az EC 3.1-be tartoznak [60].

Az észterázoknak másik csoportosítási lehetősége az inhibitorok alapján történő osztályozás. Az irodalomban három inhibitor csoportot használnak az észterázok megkülönböztetésére. Ezek: a szulfhidril reagensek (főleg *p*-klór-higany(II)-benzoát), az organofoszfátok (pl. paraoxon, diizopropilfluorfoszfát) és a karbamát típusú ezerinek (pl. fizosztigmin) [61].

Inhibitorok alapján az észterázokat négy csoportba lehet sorolni:

- 1.) Kolinészterázok. Mind szerves foszfátészterekkel, mind fizosztigminnel gátolhatók és főleg töltéssel rendelkező észtereket hidrolizálnak
- 2.) Karboxil-észterázok. Organofoszfátokkal gátolhatók és főleg az alifás észtereket hidrolizálják (ezen belül is az ecetsavnál hosszabb szénláncúakat)
- 3.) Arilészterázok. Ezeket az enzimeket a szulfhidril reagensek gátolják és főleg aromás észtereket hidrolizálnak
- 4.) Acetil-észterázok. Ezeket az enzimeket a fenti három vegyületcsaládból egyik sem gátolja és főleg alifás észtereket hidrolizálnak.

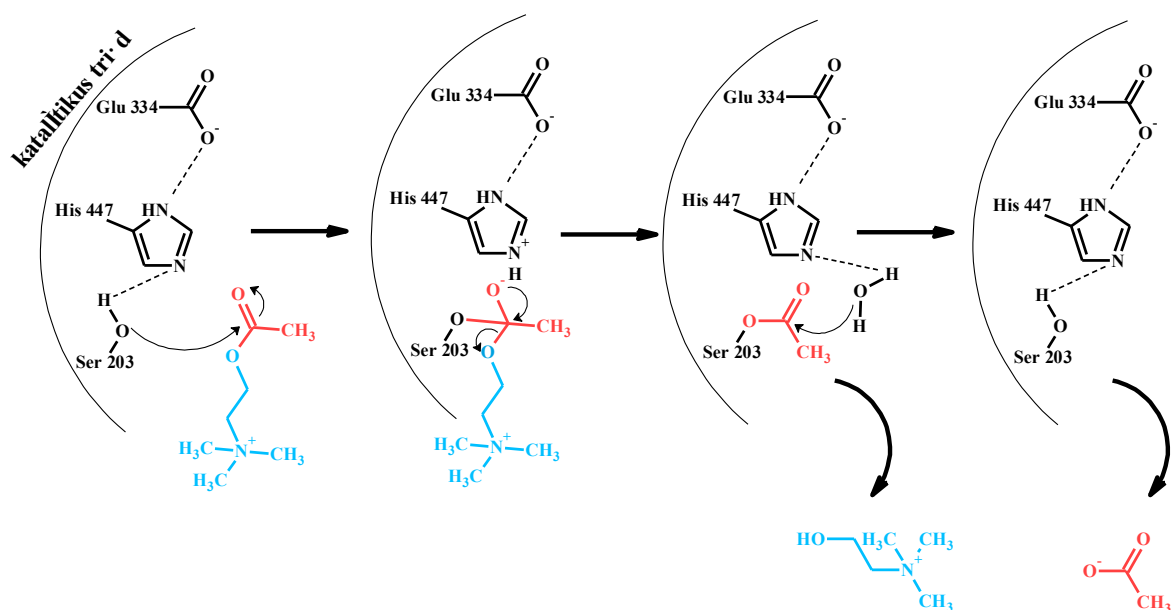
Kolinészterázok

A kolinészterázoknak két fő típusuk van az acetilkolin-észteráz (AChE, EC 3.1.1.7) és a pszeudoklinészteráz, más néven butirilkolin-észteráz (BuChE, EC 3.1.1.8). Szerkezetük kb. 50%-ban átfedést mutat egymással [62].

Az AChE a központi idegrendszerben és a vörösvértestek külső membránjában található meg, a BuChE pedig a plazmában. Az utóbbi felelős - a karboxil-észterázok mellett - többek között a kokain és a heroin hidrolitikus bomlásáért is. Mind a két enzim a szerin-hidrolázok csoportjába tartozik. A kolinészterázok szerkezete evolúciósan konzervatív és sok átfedés van más típusú szerin-hidrolázokéval. Az aktív centrumot 8 béta-redő és 6 alfa-hélix alakítja ki (α/β -fold [63]). A centrumot két alegységre lehet bontani: az egyik egy Ser-His-Glu aminosavakból álló katalitikus domén („katalitikus triád”). A karboxil-észterázok esetén Glu helyett Asp van [64]. Ez az észter kötőhely, ahol a tényleges hidrolízis történik. A másik alegység az ún. anionos kötőhely, ami egy triptofánból és két fenilalaninból áll. Feladata a szubsztrát megfelelő helyzetbe történő beállítása, hogy a katalitikus domén hozzáférhessen az észtercsoportoz [65].

Az acetilkolin esetében az anionos kötőhely kölcsönhatásba lép a kolin kvaterner nitrogénatomjával, majd az észter kötőhelyen lévő szerin hidroxilcsoportja nukleofil támadást indít az észtercsoport karbonil szénatomjára, kialakítva egy tetraédes intermediert. A szerin hidroxilcsoportjának megnövekedett nukleofilitása a His és a Glu aminosavaknak köszönhető, ugyanis ezek az aminosavak egy ún. „töltés-relé” rendszert (charge-relay system) alakítanak ki [66], aminek a következménye, hogy a szerin hidroxilcsoportja részben deprotonálódik. A reakció (báziskatalizált) bimolekuláris acilhasadás szerint megy végbe. Az acetát kovalensen kötve marad az enzimhez, amit egy vízmolekula spontán hidrolizál, így az enzim regenerálódik (12. ábra) [67].

Az összes észteráz a fent említett mechanizmus szerint működik.



12. ábra: Az AChE mechanizmusa

A szubsztrát bejutása a katalitikus centrumhoz egy aromás hasadékon (aromatic gorge) keresztül történik [68]. Ez eltérő méretű az AChE és a BuChE esetében, ami miatt a két enzim szubsztrátspecifitása eltérő. Az AChE főleg a kisebb molekulatömegű (pl. acetilkolin), a BuChE pedig a nagyobb molekulatömegű (pl. butirilkolin) észtereket képes nagyobb affinitással hidrolizálni. Az aromás régió közelében található a perifériás anionos hely, ami számos AChE inhibitor támadáspontja lehet [62].

Az AChE gátló vegyületeket három csoportba oszthatjuk [69]:

- 1.) Az aktív centrumhoz kötődő molekulák (pl. fizosztigmin, szerves foszfátészterek)
- 2.) Az aromás hasadékhoz kötődő vegyületek (pl. dekametónium)
- 3.) A perifériás anionos helyhez kötődő molekulák (pl. huperzin [70])

Az irodalomban leírtak egy szelektív butirilkolin-észteráz gátló molekulát [71] is, a tetraizopropil-pirofoszforamidot (iso-OMPA) illetve számos kutatás folyik a szelektív BuChE gátló molekulák Alzheimer kórban történő alkalmazását illetően is [72-74].

Karboxil-észterázok

A karboxil-észterázok (hCE, EC 3.1.1.1) az endoplazmás retikulumban (ER) ill. a citoszolban találhatóak meg. Észtereken kívül amidokat és karbamátokat is képesek hidrolizálni. A legtöbb xenobiotikum hidrolízisében ez az enzimtípus vesz részt. Ilyenek

például a metilfenidát [37], a kokain és a heroin is [16]. De számos prodrug aktiválásában is nagy szerepe van. Az irinotekán, amit főleg vastagbél-daganat terápiában használnak, hidrolízis után alakul át az aktív formává, ami gátolja a topoizomeráz 1-et. Hidrolízisét szintén a karboxil-észterázok végzik [75, 76].

A karboxil-észterázoknak öt izoenzime van [77], amiből kettő kiemelt jelentőségű: a hCE-1 és a hCE-2 [78].

Arilészterázok

Az arilészteráz (paraoxonáz, A-észteráz, EC 3.1.1.2) jelentősége abban rejlik, hogy ez az enzimtípus nem gátolható szerves foszfát észterekkel, hanem ezeket hidrolizálni képes. Nevét a paraoxonról kapta, ami a paration nevű vegyület aktív metabolitja - egy inszekticid - és erősen gátolja az AChE-t. A 7-es kromoszómán lévő paraoxonáz géncsalád kódolja, a *PON1*, a *PON2* és a *PON3* géneket. Ezeknek a géneknek a termékei a paraoxonáz 1 (PON1), a paraoxonáz 2 (PON2) és a paraoxonáz 3 (PON3) [79].

A PON1 a legjobban tanulmányozott enzim a háromból. Alifás és aromás laktonokat is hidrolizál (pl. mevasztatin) és a másik két enzimhez képest nagyobb affinitással hidrolizálja a szerves foszfát észter jellegű harci gázokat is, mint például a szarint és a szománt. A PON1 a májban szintetizálódik és HDL-hez kapcsolódva szállítódik a plazmában. Fontos szerepe van az oxidatív stressz kivédésében illetve antiatherogén hatású is, ugyanis az LDL-partikulákban hidrolizálja a lipidperoxidokat [80].

A paraoxonáz 2 nincs HDL-hez kötve, számos szövettípusban megtalálható és potenciális neuroprotektív szerepet tulajdonítanak neki [81, 82].

A PON3 szintén a májban szintetizálódik és HDL-hez kapcsolódik, de az affinitása a paraoxonhoz kb. százszor kisebb, mint a PON1-nek illetve nincs antiatherogén hatása [83].

Acetil-észterázok

Az acetil-észterázok (EC 3.1.1.6) emberben nem fordulnak elő. Főleg alifás acetát észtereket hidrolizálnak. Ez az enzimtípus számos gombában is megtalálható,

például az *Aspergillus niger*-ben és képes elbontani a glükóz-pentaacetát ill. az acetil-xilán mellett a cellulóz acetátot is [84].

1.5 Az észterhidrolízis kinetikája

Az észterhidrolízist a következő sebességi egyenlettel lehet leírni [85]:

$$\frac{d[\text{É}]}{dt} = k_{\text{hidrl}} [\text{É}] = k_0 [\text{É}] + k_{\text{H}^+} [\text{H}^+] [\text{É}] + k_{\text{OH}^-} [\text{OH}^-] [\text{É}] \quad (1)$$

Ahol,

$[\text{É}]$ az észter koncentrációja,

k_{hidrl} a látszólagos (mért) sebességi állandó

k_0 a nem katalizált (spontán) hidrolízis sebességi állandója

k_{H^+} a savkatalizált hidrolízis sebességi állandója

k_{OH^-} a báziskatalizált hidrolízis sebességi állandója

Híg vizes oldatokban állandó pH-t biztosítva a nem katalizált, a sav- és báziskatalizált folyamatok elsőrendű kinetika szerint játszódnak le:

$$k_{\text{hidrl}} = k_0 + k_{\text{H}^+} [\text{H}^+] + k_{\text{OH}^-} [\text{OH}^-] \quad (2)$$

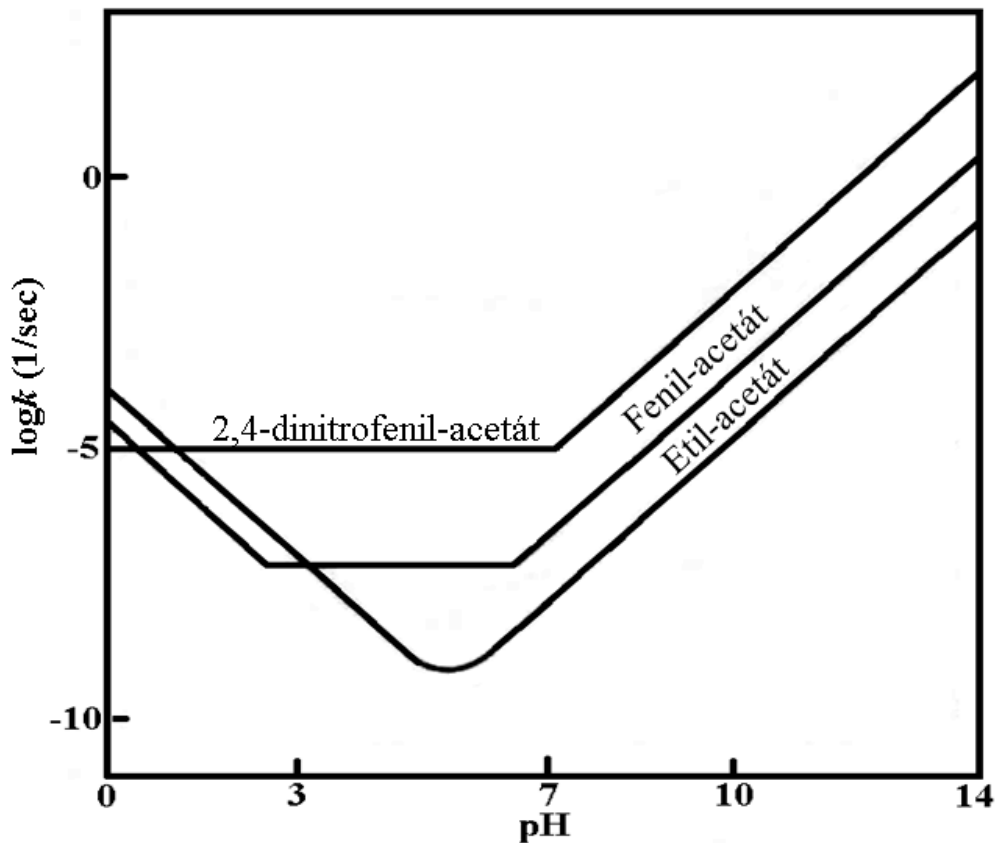
Bevezetve a vízionszorzatot:

$$K_w = [\text{OH}^-] [\text{H}^+] \quad (3)$$

A (2) egyenletet fel lehet írni a következőképpen:

$$k_{\text{hidrl}} = k_0 + k_{\text{H}^+} [\text{H}^+] + k_{\text{OH}^-} \left(\frac{K_w}{[\text{H}^+]} \right) \quad (4)$$

A 2. egyenletből látszik, hogy a hidrolízis sebessége függ a pH-tól és a sebességi állandók nagyságától. A k_{hidrl} -t a pH függvényében ábrázolva az észterek három különböző pH-hidrolízis profilt mutatnak (13. ábra) [85, 86].



13. ábra: Különböző anyagok hidrolízisének pH függése

Nem reaktív észterek hidrolízis sebessége az etil-acetát példáján tanulmányozható. A pH-sebesség profil két egyenesből áll, amelyek meredeksége a savas tartományban -1 , ill. lúgos közegben $+1$. A két egyenes metszéspontja között található minimum a nemkatalizált (spontán) folyamat sebessége, itt a k_0 értéke elhanyagolhatóan kicsi.

Reaktív észterek esetén, mint például a fenil-acetát esetében pH 3-7 között a spontán hidrolízis dominál.

A nagy reaktivitású észterek látszólagos hidrolízis sebességének változását a pH függvényében a 2,4-dinitrofenil-acetát példáján keresztül tanulmányozhatjuk.

1.6 Az észterhidrolízist befolyásoló tényezők

Az észterhidrolízist számos intra- és intermolekuláris tényező befolyásolja.

1.6.1 Intramolekuláris tényezők

A karbonsav aciditása és az aciditást befolyásoló tényezők

A Mensutkin-szabály értelmében egy karbonsav annál könnyebben észteresíthető illetve egy észter annál gyorsabban hidrolizál minél erősebb a karbonsav aciditása. A karbonsav aciditását *elektronos* és *sztérikus* effektusok jelentősen befolyásolják. Elektronos effektusok közül az induktív és a konjugációs hatások a legfontosabbak. $-I$ hatással rendelkező szubsztituensek (pl. $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-NO_2$, $-CN$) jelentősen növelik a karbonsav komponens aciditását, ugyanis a keletkező karboxilát anion stabilitása nő, illetve elősegítik a proton leválását. A hatás távolságfüggő. Legjobban akkor érvényesül, ha a $-I$ hatással rendelkező szubsztituens(ek) közvetlenül kapcsolódnak az α -szénatomhoz. Összehasonlítva a 3-klórpropionsav ($pK_s=4,52$) és a klórecetsav ($pK_s=1,86$) pK_s értékeit láthatjuk, hogy a klóratom $-I$ hatása a karboxilcsoport aciditására már egy metilencsoport közbeiktatásával is jelentősen csökkent.

A $+I$ hatással rendelkező szubsztituensek (pl. alkilcsoportok) a keletkező aniont destabilizálják, a proton leválását hátráltatják, ezért a savi erősséget csökkentik. Az elektronos effektusok kvantitatív mérését először Hammett írta le 1937-ben, *orto* és *para* helyzetben szubsztituált benzoésav származékok vizsgálata során [87]. A róla elnevezett Hammett-konstansok jelölése: σ , σ^+ , σ^- ill. ρ , ρ^+ , ρ^- . Hammett munkásságát Taft követte, aki alifás észterekre „terjesztette ki” a konstansokat (ρ és σ) [88]. Ezek a vizsgálatok lehetővé tették, hogy a szubsztituenseket elektronvonzó vagy elektronküldő erősségük alapján sorba állítsák, és hogy megkülönböztessék az induktív és mezomer effektust. Az eredeti Hammett-egyenletnek azóta számos kiegészítése illetve finomítása történt [89-91].

A konjugáció a keletkező negatív töltés diszpergálása révén növeli az anion stabilitását, így az aciditást is. Összehasonlítva a propánsav ($pK_s=4,87$) és a propinsav

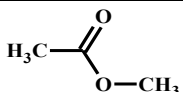
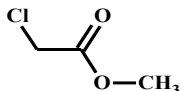
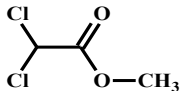
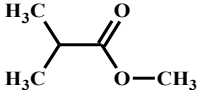
($pK_s=2,85$) pK_s értékeit láthatjuk, hogy az előbbi estében ahol nincs lehetőség konjugációra, a savi disszociációs állandó magasabb, tehát a propánsav gyengébb sav.

A sztérikus hatások közül a sztérikus gátlásnak a disszociálódó csoporton illetve a konjugálódó szubsztituensen van jelentősége. Az előbbire példa az *orto* és *para* helyzetben szubsztituált benzoészav származékok. Az induktív effektusok mind a két helyzetben érvényesülni tudnak, azonban az *orto* szubsztituált származékok esetében a karboxilcsoport kifordul a gyűrű síkjából, így a konjugációs hatások nem tudnak érvényesülni (sem a gyűrű $+K$ effektusa, sem a karboxil $-K$ effektusa). Így az *orto* szubsztituált benzoészav származékok mindig savasabbak, mint a *para* szubsztituáltak.

A *para*-nitrofenol ($pK_s=7,16$) és a 3,5-dimetil-4-nitrofenol ($pK_s=8,25$) pK_s értékeinek az összehasonlítása [92] A nitrocsoport $-I$ elektronszívó tulajdonsága folytán, mindkét esetben egyformán növeli a vegyület aciditását. A metilcsoportok hatására azonban kifordul a gyűrű síkjából, így a $-K$ effektusa nem tud érvényesülni, így ebben az esetben nem növeli a vegyület aciditását (A metilcsoportok gyenge $+I$ effektusa tovább csökkenti a vegyület savasságát). Tehát a *para*-nitrofenol $-K$, $-I$ effektusok révén savasabb.

A 4. táblázat néhány példát tartalmaz a savi erősség és a hidrolízis sebesség kapcsolatára.

4. táblázat: Néhány példa a hidrolízis sebesség és a savi erősség összefüggésére [46]

Vegyület	A hidrolízis relatív sebessége	A savi komponens erőssége (pK_s)
	1	4,76
	761	2,85
	16000	1,35
	0,01	4,86

A metil-izobutirát esetében a növekvő szterikus gátlás is csökkenti a hidrolízis sebességét, ugyanis minél zsúfoltabb a karbonil környezete, a hidroxidionok annál nehezebben tudnak nukleofil támadást indítani ellene.

A protonálódás hatása

Először Bell és mtsai. [93] figyelték meg, hogy ha az etil-acetát C₁ szénatomján az egyik hidrogént trietil-ammónium-csoportra cserélik és így az észter-csoport környezetében permanens pozitív töltés keletkezik, a lúgos hidrolízis 200-szor gyorsabb lesz, a savas hidrolízis sebessége 2000-d részére csökken.

1.6.2 Intermolekuláris tényezők

Hőmérséklet

Az Arrhenius-egyenlet a sebességi állandó hőmérsékletfüggését írja le. Az egyenlet van't Hoff holland kémikus javasolta először 1884-ben, majd később Arrhenius igazolta.

$$k = A e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (5)$$

Ahol E_a az aktiválási energia,

R az egyetemes gázállandó,

T a hőmérséklet,

A a pre-exponenciális faktor

Az (5) egyenletet logaritmizálva, az alábbi összefüggést kapjuk:

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (6)$$

A (6) egyenlet értelmében a sebességi állandó logaritmus és a hőmérséklet reciproka között lineáris összefüggés áll fenn, az $\ln(k) \cdot 1/T$ függvény meredekségéből kiszámítható az aktiválási energia, míg az ordináta metszéspontja az $\ln(A)$ -t adja meg.

Oldószer

Az oldószer jelentősen befolyásolhatja a hidrolízis sebességét, ami a solvatáció mértékével van összefüggésben. Báziskatalizált észterhidrolízis esetén a metanol illetve

a glikol a hidroxidionok solvatációját növelik, a reakciósebességet pedig csökkentik. Az aceton azonban az aktivált állapotot solvatálva növeli a hidrolízis sebességét [94].

pH

A (2) egyenletből látszik, miként függ a hidrolízis a pH-tól: magas, ill. alacsony pH-n a sav-, ill. a báziskatalizált hidrolízis dominál, közel semleges pH-n pedig a spontán hidrolízis. Pufferelt közegben a hidrolízis pszeudo-elsőrendű kinetikát követ, így a felezési idő független a koncentrációtól (7. egyenlet).

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{\text{hidrl}}} \quad (7)$$

Ionerősség

Az ionerősség gyorsíthatja vagy lassíthatja a hidrolízist attól függően, hogy milyen sót és milyen koncentrációban használunk az ionerősség beállítására. Nukleofil anionok, mint például a foszfát és acetát használata nagyobb koncentrációkban nem mindig célravezető, mert a spontán hidrolízist megnövelhetik [95].

1.7 Az észterhidrolízis követésére alkalmas módszerek

A látszólagos észterhidrolízis sebességi állandó meghatározásához bármilyen olyan módszer alkalmas, ami koncentrációt ill. koncentrációváltozást tud mérni és amelynek analízisideje elhanyagolható a reakció időskáláján. Klasszikus módszerek között szerepelnek a vezetőképességen alapuló eljárások [96] és a potenciometriás titrálások [97].

Az elválasztástechnikai módszerek nagy előnye, hogy elválasztás után direkt mérhető a komponensek koncentrációja. A legelterjedtebb kromatográfias módszer a hidrolízis nyomon követésére a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia, amit tömegspektrometriával is kapcsolhatnak [98]. Visky Dóra és munkatársai kapilláris elektroforézissel vizsgáltak különböző aminosav észtereket [99].

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával, mind normál (NP-HPLC), mind fordított fázisú változatával (RP-HPLC) a különböző észterek illetve bomlástermékeinek az elválasztása és meghatározása jól megvalósítható, de ha az

analízisidő túl hosszúra nyúlik, akkor a gyorsan hidrolizáló észterek mérése nem lesz megfelelő. A butil-acetát hidrolízisének vizsgálatára a gázkromatográfia kézen fekvő megoldásnak tűnik, azonban itt is a hosszú analízisidő miatt értékes információvesztés történhet a mérés során [100].

Munkám során az észterhidrolízist mágneses magrezonancia spektroszkópiával (NMR) követtem, ezért a továbbiakban erről a módszerről fogok részletesebben beszámolni.

1.7.1 Mágneses magrezonancia spektroszkópia

A mágneses magrezonancia alapjait először Isidor Rabi [101] írta le 1938-ban, amiért 1944-ben fizikai Nobel-díjjal jutalmazták. Azóta az NMR széleskörűen elterjedt az élelmiszeripartól az orvostudományokig, illetve a szerkezet-felderítés egyik legfontosabb eszköze lett.

Az észterhidrolízis nyomon követése mágneses magrezonancia spektroszkópiával számos előnnyel jár, mint például gyors mérési idő, illetve az *in situ* vizsgálat, ezért az irodalomban számos észter hidrolízisét vizsgálták NMR spektroszkópiával (5. táblázat).

5. táblázat: Gyógyszermolekulák és észter származékaik hidrolízisének vizsgálata NMR spektroszkópiával

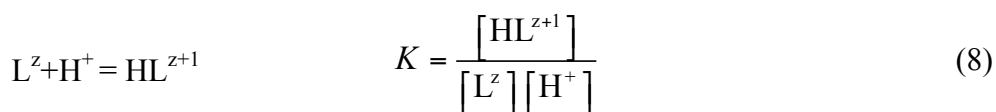
Vegyület	Év	Hivatkozás
acetilkolin	1991	[102]
karbakol	1991	[102]
atropin	1991	[102]
prokain	1991	[102]
neosztigmin	1993	[103]
betain észterek	2004	[104]
kamptotecin észterek	2010	[105]
ibuprofén észterek	2011	[106]

A módszer hátrányai: Minimum 3 mM-s oldatot kell készíteni, illetve megnehezíti az integrálást, ha a jelek átfednek egymással. A gyorsaság főleg az ^1H NMR mérésekre igaz.

1.8 Protonálódási állandók áttekintése

1.8.1 Makroszkopikus protonálódási állandók

A sav-bázis egyensúlyokat tekinthetjük a proton felvétel vagy a proton disszociáció oldaláról. Az előbbi esetben protonálódási állandóról (K), az utóbbiban pedig disszociációs (ionizációs) állandóról (K_s vagy K_a) beszélünk. A továbbiakban a konjugált bázis protonfelvételével, tehát a protonálódási állandóval jellemezzük a folyamatokat. A protonálódási állandó értékeit tízes alapú logaritmusként szokták megadni ($\log K$), aminek az értéke megegyezik a savi disszociációs állandó negatív tízes alapú logaritmusának az értékével ($\text{p}K_s$ vagy $\text{p}K_a$). Egy protonálható csoportot tartalmazó molekula esetén a proton felvétele a makroállandóval jellemezhető, amit az alábbi egyenlet ír le:



Ahol, L^z a z töltéssel rendelkező L ligand, ami egy proton felvételére képes.

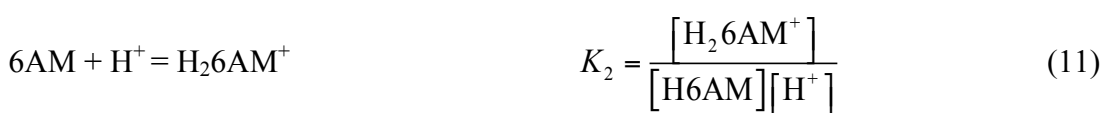
A makroszkopikus állandók jellemzésében a reagáló és keletkező részecskéket sztöchiometriai összetételük szintjén definiáljuk.

A protonálódási állandó értéke függ a mérési módszertől. Amennyiben az elektród $\text{p}[\text{H}]$ -skálára lett kalibrálva, látszólagos sebességi állandókat kapunk [107]. Ha hidrogénion-aktivitásra lett kalibrálva, akkor vegyes (Brønsted) állandókat kapunk:

$$K = \frac{[\text{HL}^{z+1}]}{[\text{L}^z] \alpha_{\text{H}^+}} \quad (9)$$

Amennyiben a molekula több protonálható csoportot is tartalmaz, a makroállandók lépcsőzetes protonálódási állandókkal jellemezhetők, amelyeket összevonva kapjuk a kumulatív állandókat (β).

Vegyük például a 6-acetilmorfint, ami legbázikusabb (6AM⁻) formában egy negatív töltéssel rendelkezik – a fenolos hidroxilcsoport ionizált formában van, a tercier aminocsoport pedig nincs protonálva. A molekula lépcsőzetes protonálódása során eljutunk a 6-acetilmorfin kétszeresen protonált állapotához:



A lépcsőzetes és a kumulatív állandók közötti összefüggések az alábbi egyenletek írják el:

$$\beta_1 = K_1 \quad (12)$$

$$\beta_2 = K_1 K_2 = \frac{[\text{H}_2\text{6AM}^+]}{[\text{6AM}^-][\text{H}^+]^2} \quad (13)$$

Ismerve egy vegyület makroszkopikus protonálódási állandóit, kiszámítható a molekula izoelektromos pontja, az adott pH-n átlagosan kötött protonok száma (Bjerrum-féle \bar{n} függvény [108]) és a különböző mértékben protonált részecskék eloszlása is.

1.8.2 Makroállandók meghatározására alkalmas módszerek áttekintése

Makroállandók meghatározására minden olyan módszer alkalmas, ahol a meghatározott mennyiség összefüggésbe hozható a protonálódási állandóval [109]. Leggyakrabban alkalmazott módszerek a pH-potenciometriás, az UV-pH és az NMR-pH titrálás. A továbbiakban az NMR-pH titrálásról lesz szó, ugyanis munkám során az egyensúlyi állandókat főleg ezzel a módszerrel határoztam meg.

NMR-pH titrálás

Egy NMR aktív mag kémiai eltolódása (δ) a következő egyenlettel írható le [110]:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_0} 10^6 \text{ ppm} = \frac{\sigma_{\text{ref}} - \sigma}{1 - \sigma_{\text{ref}}} \cong \sigma_{\text{ref}} - \sigma \quad (14)$$

Ahol,

V a vizsgált mag,

ν_{ref} a referenciaanyag magjának rezonanciafrekvenciája, Hz-ben,

σ és σ_{ref} ugyanezeknek a magoknak az árnyékolási tényezője,

ν_0 pedig a spektrométer MHz-ben kifejezett alapfrekvenciája.

A protonálódás vizes oldatban általában pillanatszerűen gyors folyamat az NMR „időskáláján”, ezért a protonált és a deprotonált forma egy közös rezonanciajelet ad a részecskék egyedi δ_L és δ_{HL} kémiai eltolódásainak móltörttekkel súlyozott átlagánál [111-113].

$$\delta^{\text{mért}} = \delta_L X_L + \delta_{HL} X_{HL} = \frac{\delta_L + \delta_{HL} K_L [H^+]}{1 + K_L [H^+]} \quad (15)$$

Ahol,

$\delta^{\text{mért}}$ a közös rezonanciajel kémiai eltolódása,

δ_L és δ_{HL} a deprotonált és a protonált forma kémiai eltolódásai (határeltolódások),

X_L és X_{HL} a móltörtjeik, K_L pedig a protonálódási állandó.

A szupravezető mágnesek térerejének növekedésével, illetve a különböző 2D technikák elterjedésével a kémiai eltolódások egyre pontosabban mérhető mennyiséggé váltak [114, 115], így a számított $\log K$ pontosságát egyre inkább a pH-mérés precizitása ($\pm 0,02$) szabja meg. Az NMR-pH titrálásoknak több formája ismert:

Egyedi minták módszere: a minta törzsoldatából egyenlő részleteket kivéve kis (6-700 μl) edényben keverés közben egyenként beállítjuk a pH-t üvegelektrod mellett, majd egyesével felvesszük az NMR spektrumokat. A munka meglehetősen anyag- és időigényes.

Egycsöves titrálás: A mérendő anyagot egyetlen NMR csőbe töltjük, ehhez μl -es mennyiségben adagoljuk a titráló oldatot, a pH-t mikroelektroddal mérjük. A módszer anyagtakarékos, azonban pontatlan, hiszen megfelelő kevertetés nélkül mérjük a pH-t. Ez és a mikroelektrod használata az egyedi minták módszerénél nagyobb pontatlanságot okoz.

In situ pH-meghatározás indikátormolekulákkal: A titrálást végezhetjük az egyedi minták módszere szerint vagy az egycsöves technikával. A legfőbb különbség, hogy a pH-t a megfelelő indikátormolekulák kémiai eltolódásaiból számítjuk. Pontossága megegyezik az egyedi minták módszerének precizitásával, sőt, megfelelő indikátormolekulák használatával erősen savas vagy lúgos oldatban meg is haladja azt. Szakács és mtsai. indikátormolekulák egész sorát alkalmazták egy mintában, melyek segítségével az majdnem az egész pH tartomány ($0 < \text{pH} < 12$) lefedhető [116, 117]. Ezt egészítették ki Orgován és Noszál, akik a lúgos tartomány meghatározására új indikátormolekulákat vezettek be [118]. Az indikátor mért kémiai eltolódásából a pH a Henderson-Hasselbach típusú egyenlet segítségével számítható ki:

$$\text{pH} = \log K_{\text{Ind}} + \log \frac{\delta_{\text{Ind}}^{\text{mért}} - \delta_{\text{HInd}}}{\delta_{\text{Ind}} - \delta_{\text{Ind}}^{\text{mért}}} \quad (16)$$

Ahol,

δ_{Ind} és δ_{HInd} határeltolódások

$\log K_{\text{Ind}}$ az indikátor protonálódási állandója, ami külön kísérletben lett meghatározva.

A (16) egyenletből látszik, hogy amennyiben egy NMR-pH indikátormolekula indikátorparaméterei (határeltolódásai és protonálódási állandója) ismertek, akkor a kémiai eltolódásból számítható a pH (kellő pontossággal általában $\log K - 1 < \text{pH} < \log K + 1$ intervallumban).

Relatív bázicitások meghatározása: Két egyértékű, összemérhető erősségű bázis protonálódási állandóinak különbségét ($\Delta \log K$) szimultán titrálásukkor sokkal pontosabban kaphatjuk meg, mint a saját protonálódási állandóikat az egyedi $\delta^{\text{mért}}$ -pH adatsorok kiértékelésével.

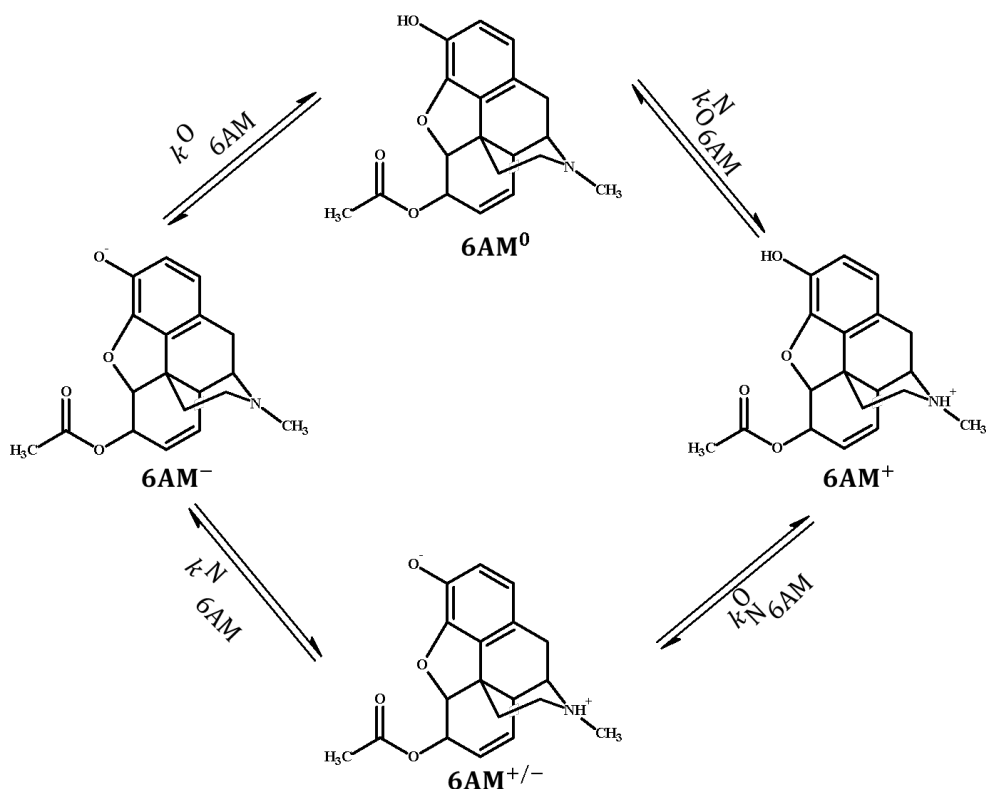
Az NMR spektroszkópiás $\log K$ mérés előnyei közé tartozik, hogy a mérendő anyag pontos koncentrációját nem szükséges ismerni és esetleges szennyezők sem zavarnak, ha a rezonanciajelek hovatartozása egyértelműen eldönthető, és a vizsgálandó anyag a szennyezővel nem lép asszociációs vagy egyéb reakcióba.

A ^1H -en kívül más NMR aktív magok protonálódását is követhetjük (^{13}C , ^{19}F , ^{15}N , ^{31}P), amelyek közül kiemelném a ^{15}N -t, mivel ^{15}N NMR-pH titrálás során közvetlenül a nitrogénatomok protonálódását követhetjük, így nitrogén tartalmú bázisok

protonálódásának vizsgálatára alkalmazható. A legfőbb probléma ezzel a technikával, hogy a ^{15}N nagyon alacsony természetes előfordulása miatt (0,37%) érzékenysége kicsi, pusztán 0,1% a protonhoz viszonyítva. A módszer alacsony érzékenysége szükségessé teszi rendkívül hosszú mérési idők, vagy tömény oldatok (természetes izotóparány mellett), vagy pedig ^{15}N dúsított minták használatát. A mérési idő csökkenthető hidrogénen detektált többdimenziós módszerek (^1H - ^{15}N HMBC) alkalmazásával.

1.8.3 Mikroszkopikus protonálódási állandók

A mikroszkopikus protonálódási állandók a sztöchiometrikus összetételen kívül azt is meghatározzák, hogy melyik funkciós csoporthoz kötődik a proton, illetve ennek a protonnak a kötődésekor a molekula egyéb funkciós csoportja(i) protonált(ak)-e. Rudolf Wegscheider már 1895-ben egyes többértékű savak és azok félésztereinek makroállandói vizsgálata során bevezette a csoportspecifikus állandók fogalmát [119]. A 6-acetilmorfin példájánál maradva tekintjük át a mikro- és makroállandók közötti alapvető összefüggéseket (14. ábra). A mikroállandókat „ k ”-val jelöltük, felső indexben a protonálódó csoportot, alsó indexben pedig a már protonált csoportot [120] (például a 6-acetilmorfin esetén $k_{\text{O}_{6\text{AM}}}^{\text{N}}$ és $k_{\text{6AM}}^{\text{N}}$ a terciér aminocsoport protonálódását jelenti, az előbbi jelölés esetén a fenolát már protonálva van, az utóbbi esetben pedig anionos formában).



14. ábra: A 6AM protonálódási sémája a mikroállandók feltüntetésével

A 14. ábrán láthatók a 6AM különböző protonáltsági állapotban lévő formái képletekkel, alatta pedig rövidítéssel ábrázolva. A mikrospeciáció az egyes mikrorészecskék pH-függő eloszlásának meghatározását jelenti. A 6-acetilmorfint 4 mikroszkopikus protonálódási állandóval jellemezhetünk: kettő vonatkozik a fenolátcsoporthoz bázicitására (k_{6AM}^O és $k_{N_{6AM}}^O$), kettő pedig a terciér aminocsoportra (k_{6AM}^N és $k_{O_{6AM}}^N$)

A következő összefüggések érvényesek a mikro-és makroállandók között:

$$\beta_1 = K_1 = k_{6AM}^O + k_{6AM}^N$$

(17)

$$\beta_2 = K_1 K_2 = k_{6AM}^O k_{O_{6AM}}^N = k_{6AM}^N k_{N_{6AM}}^O \quad (18)$$

A kölcsönhatási tényező megmutatja, hogy az egyik csoport protonálódása milyen hatással van a másik csoport bázicitására.

$$E = \frac{k_{6AM}^O}{k_{N_{6AM}}^O} = \frac{k_{6AM}^N}{k_{O_{6AM}}^N} \quad (19)$$

$$\log E = \log k_{6AM}^O - \log k_{N_{6AM}}^O = \log k_{6AM}^N - \log k_{O_{6AM}}^N \quad (20)$$

Kismolekulák protonálódásánál csökken az elektronsűrűség, hiszen az elektronok száma változatlan, az atommagok száma pedig egy hidrogénionnal több, ezért az egyik csoport protonálódása csökkenti a másik bázicitását.

1.8.4 Mikroállandók meghatározásának lehetőségei

Makroállandók meghatározása során kapott titrálási görbe nem alkalmazható mikroállandók meghatározására, kivéve totálszimmetrikus molekulák esetén. Minden egyéb esetben szükség van valamilyen többletinformációra, ami lehet rokon szerkezetű vegyület bázicitásadata (deduktív módszer) vagy valamilyen spektroszkópai méréssel nyert információ, amelyből számítható az egyes csoportok protonáltsági fokát jellemző f függvény. A spektroszkópai módszerek közül a megfelelő módszer kiválasztásában elsődleges szempont, hogy annak segítségével valamely csoport protonálódása a molekula egyéb funkciós csoportjaitól elkülönítve, szelektíven legyen mérhető. A molekula spektrális tulajdonságaitól függően UV-pH, NMR-pH és CD-pH titrálás egyaránt szóba jöhet, habár az irodalomban leírtak Raman- IR- ill. fluoreszcens spektroszkópiát is [121-123].

Munkám során a deduktív módszert alkalmaztam a mikroállandók meghatározására, ezért a továbbiakban a modellvegyületek bázicitásadatainak átviteléről lesz szó.

Modellvegyületek bázicitásadatainak átvitele

Deduktív módszer alkalmazására három esetben kerülhet sor:

- a.) Ha egy proton felvételére alkalmas kötőhely bázicitását nem lehet szelektíven mérni spektroszkópiás módszerekkel, melynek oka a csoportok közelsége vagy jeleiknek átfedése.
- b.) Ha valamelyik mikrorészecske koncentrációja nagyon alacsony [124]
- c.) A vegyület spektruma túlságosan összetett

A –COOH csoport modellezése metilészterként [125], etilészterként [126] vagy savamidként [127] történhet. Az alifás primer aminokat acetamidként modellezték [128], a protonált aminocsoportot pedig kvaterner származékként [129].

2. Célkitűzések

Céljaim közt szerepelt a két legismertebb kemény drog, a kokain és a heroin, illetve egy pszichotróp szer, a metilfenidát hidrolízisének feltérképezése, különös tekintettel a különböző protonáltsági állapotok hatásainak vizsgálatára a hidrolízis sebességére. A heroin és a kokain két-két észtercsoportot tartalmaznak, hidrolízisük első lépésében is észterek keletkeznek, ezért a teljes hidrolízis leírásához szükségünk van a köztitermékek hidrolízis kinetikáinak meghatározására is.

Ezen kívül a vegyületek és származékaik protonálódási makro- és mikroállandóinak meghatározása 37 °C-n is a céljaim között szerepelt, figyelembe véve, hogy az egyik vegyület - a benzoilekgonin - egyensúlyi állandó értékeire az irodalomban nincs egységes állásfoglalás.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Alkalmazott jelölések

A sebességi állandók jelölése „ k ”-val történik, felső index nélkül (például a k_{EME^+} az ekgonin metilészter protonált formájának a sebességi állandója, a $k_{\text{BE}^{\pm}}$ pedig a benzoilekgonin ikerionos formájának a sebességi állandója). A vegyületek rövidítése a Rövidítésjegyzék c. fejezetben található meg. Több észtercsoportot tartalmazó vegyületek esetén a sebességi állandó alsó indexében lévő szám jelzi, hogy a molekula melyik részéről történt a hidrolízis. A szám előtt lévő jelölés pedig a molekula protonáltsági állapotára utal (pl. a $k_{\text{KOK}_0(2)}$ a kokain semleges formájának a hidrolízise a 2-es pozícióban). A jelölésekről a későbbiekben még lesz szó.

3.2 A kísérletes munka során felhasznált vegyületek

A mérésekhez használt alapvegyszereket (NaOH, KOH, NaCl, KCl, tömény sósav), az elektródkalibrációhoz alkalmazott puffer komponenseket (nátrium-tetraoxalát, kálium-hidrogénftalát, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , bórax) analitikai tisztaságban a Reanal, a Merck és a Sigma-Aldrich gyártóktól szereztük be. Az NMR–spektroszkópiához referenciaként 3-trimetilszilil-1-propánszulfonsav nátriumsót (DSS, $\geq 99\%$, Fluka), tetrametil-ammónium-kloridot (TMA, Sigma) és pirazint (Sigma) használtam. A titrálások oldószereként kétszer desztillált vizet alkalmaztam.

3.2.1 A heroin és az előállított morfinszármazékok

A heroin hidrolízis kinetikájának meghatározása során a 3,6-diacetilmorfin (DAM) mellett felhasználtam a 3-acetilmorfin (3AM), a 6-acetilmorfin (6AM), a 6-acetilkodein (6AK) és a 6-acetil-*N*-metilmorfin (6ANMM) hidrolízise során kapott sebességi állandó értékeket. A protonálódási mikro- és makroállandók meghatározásához a fenti vegyületek egyensúlyi állandóin kívül a kodein és a morfin protonálódási állandóit is meghatároztam. A morfin-hidrokloridot, a kodein-hidrokloridot és a 3,6-diacetilmorfint a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be, a többi származékot pedig előállítottam. A morfin-hidrokloridból pH=9-10-n leválasztottam a bázist és a további szintézisekhez ezt használtam fel.

A 3-acetilmorfin előállítása

A 3-acetilmorfin előállítása irodalmi adatok alapján történt [130]. A morfint (1 mM) feloldottam 10 ml 10%-os NaHCO₃ oldatban, majd 1 mM (0,094 ml) ecetsavanhidridet adtam hozzá. Egy óra kevertetés után extraháltam 3x10 ml CHCl₃-al, majd a szerves fázist bepároltam. Áttetsző sűrű olaj keletkezett. Kitermelés: 98%. A vegyület szerkezetét ¹H NMR spektruma alapján igazoltam (600 MHz, D₂O): δ=6,84 (d, *J*=8,4 Hz, 1H), 6,72 (d, *J*=8,1 Hz, 1H), 5,63 (d, *J*=11,4 Hz, 1H), 5,39 (d, *J*=10,6 Hz, 1H), 4,99 (d, *J*=5,2 Hz, 1H), 4,33 (m, 1H), 3,66 (m, 1H), 3,15 (d, *J*=4,5 Hz, 1H), 2,74 (m, 1H), 2,62-2,49 (m, 2H), 2,47 (s, 3H), 2,29 (s, 3H), 2,11 (m, 1H), 1,96-1,82 (m, 2H)

A 6-acetilmorfin előállítása

A 6AM előállítása irodalmi adatok alapján történt [131]. A heroint (1mM) feloldottam 5 ml alkoholban, majd 2 mM hidroxilamin-hidroklorid oldatot adtam hozzá. Kis idő múlva a 6AM-hidroklorid kivált az oldatból. Kétszeri átkristályosítás után megkaptam a terméket. Halványsárga kristályok keletkeztek. Kitermelés: 98%. A vegyület szerkezetét ¹H NMR spektruma alapján igazoltam (600 MHz, D₂O): (600 MHz, D₂O): δ=6,79 (d, *J*=8,1 Hz, 1H), 6,72 (d, *J*=8,2 Hz, 1H), 5,76 (d, *J*=10,1 Hz, 1H), 5,59 (d, *J*=10,3 Hz, 1H), 5,29 (m, 1H), 5,24 (d, *J*=7,0 Hz, 1H), 4,25-4,16 (m, 1H), 3,44-3,06 (m, 3H), 3,01 (s, 3H), 2,40-2,24 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,15-2,06 (m, 2H).

A 6-acetilkodein előállítása

A kodeint (1 mM) feloldottam 10 ml 10%-os NaHCO₃ oldatban, majd 0,14 ml (1,5 mM) ecetsavanhidridet adtam hozzá. 2 óráig kevertettem, ezután extraháltam 3x10 ml CHCl₃-al, majd a szerves fázist bepároltam. Halványsárga kristályok keletkeztek. Kitermelés: 99%. A vegyület szerkezetét ¹H NMR spektruma alapján igazoltam (600 MHz, D₂O): 6,85 (d, *J*=8,4 Hz, 1H), 6,72 (d, *J*=8,5 Hz, 1H), 5,62 (d, *J*=10,2 Hz, 1H), 5,56 (d, *J*=10,3 Hz, 1H), 5,25-5,20 (m, 1H), 5,15 (d, *J*=7,0 Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,58 (m, 1H), 3,16-3,05 (m, 1H), 2,84 (m, 1H), 2,74 (m, 1H), 2,49 (s, 3H), 2,42 (m, 1H), 2,13 (s, 3H), 2,09-2,07 (m, 2H), 1,85 (m, 1H).

A 6-acetil-*N*-metilmorfin előállítása

A 6-acetil-*N*-metilmorfin előállítása irodalmi adatok alapján történt [132]. A 6-acetilmorfint (1 mM) feloldottam 5 ml metanolban és 2 ml metil-jodidot adtam hozzá. 40 °C-on kevertetem 3 óráig. Fehér csapadék vált ki, amit a reakcióidő letelte után szűrtem és metanollal mostam. Halványsárga kristályok keletkeztek. Kitermelés: 99%. A vegyület szerkezetét ¹H NMR spektruma alapján igazoltam (600 MHz, D₂O): δ=6,78 (d, *J*=8,4 Hz, 1H), 6,70 (d, *J*=7,9 Hz, 1H), 5,75 (d, *J*=9,7 Hz, 1H), 5,59 (d, *J*=10,0 Hz, 1H), 5,32 (m, 1H), 5,25 (d, *J*=6,7 Hz, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,61-3,48 (m, 1H), 3,47-3,35 (m, 2H), 3,40 (s, 3H), 3,30 (s, 3H), 2,64-2,39 (m, 2H), 2,16 (s, 3H), 2,06 (m, 2H)

A vizsgált vegyületek képleteit a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: A kinetikai vizsgálatokhoz és a protonálódási állandók meghatározásához felhasznált morfin származékok.

Morfin	Kodein	3-acetilmorfin	6-acetilmorfin
6-acetilkodein	6-acetil- <i>N</i> -metilmorfin	3,6-diacetilmorfin	

3.2.2 A kokain és az előállított ekgonin származékok

A kokain hidrolízis kinetikájának meghatározása során a kokain (KOK) mellett felhasználtam az ekgonin-metilészter (EME), a benzoilekgonin (BE) és a benzoilekgonin-metilamid (BEM) hidrolízise során kapott sebességi állandó értékeket. A protonálódási mikro- és makroállandók meghatározásához a fenti vegyületek

egyensúlyi állandóin kívül az ekgonin protonálódási állandóit is meghatároztam. A kokain-hidrokloridot a Sigma-Aldrich-től szereztük be, az összes többi származékát szintetizáltam.

Az ekgonin előállítása

Az ekgonin szintézise Bell és Archer irodalomban leírt módszere alapján történt [133]. Az előzetesen ammóniával leválasztott kokain bázist (8,4 mM) feloldottam 50 ml 1 M-os sósavban, majd 16 órán keresztül refluxáltattam. Ezután az oldatot extraháltam 3x50 ml éterrel, majd a vizes fázist bepároltam. Fehér kristályok keletkeztek. Kitermelés: 99%. A vegyület szerkezetét ¹H NMR spektruma alapján igazoltam (600 MHz, D₂O): δ=4.39 (dd, *J*=7,5;8,4 Hz, 1H), 4,08 (d, *J*=7,1 Hz, 1H), 3,93 (m, 1H), 3,12 (m, 1H), 2,80 (s, 3H), 2,42-2,28 (m, 2H), 2,20-2,12 (m, 2H), 2,10-1,96 (m, 2H).

Az ekgonin-metilészter előállítása

Az irodalomban leírt kokain szelektív hidrolízise [134-136] ekgonin-metilészterre nem hozott megfelelő eredményt, ezért az ekgonint diazometánnal reagáltattam, hogy a várt terméket megkapjam. Az ekgonin-hidrokloridot (4,5 mM) feloldottam 30 ml metanolban, majd részletekben, óvatosan hozzácsepegtettem a frissen előállított diazometán éteres oldatát (50 ml). Egy éjszakán át kevertetem, majd másnap a reagens feleslegét 15 ml ecetsavval elbontottam. Az oldat bepárlása után háromszor extraháltam NH₃-val és CHCl₃-al. Végül a kloroformos fázist bepároltam. Halványsárga, áttetsző kristályok keletkeztek. Kitermelés: 99%. A kapott termék szerkezetét ¹H NMR spektruma alapján igazoltam (600 MHz, CDCl₃): δ= 3,82 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,59 (m, 1H), 3,17 (m, 1H), 2,76 (m, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,13-1,97 (m, 2H), 1,93 (td, *J*=3;1,9,0;11,8 Hz, 1H), 1,84 (m, 1H), 1,59-1,50 (m, 2H).

A benzoilekgonin előállítása

A vegyület előállítása szabadalomi adatok alapján történt [137]. 8,8 mM kokain bázist 50 ml desztillált vízben refluxáltattam 5 órán keresztül. Ezután extraháltam 3x20 ml etil-acetáttal, majd a vizes fázist bepároltam. Fehér kristályos anyag keletkezett. Kitermelés: 98%. A vegyület szerkezetét ¹H NMR spektruma alapján igazoltam (600 MHz, CDCl₃): δ=8,01 (d, *J*=7,1 Hz, 2H), 7,52 (t, *J*=7,4 Hz, 1H), 7,40 (t, *J*=7,6 Hz, 2H),

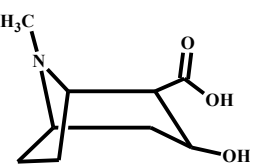
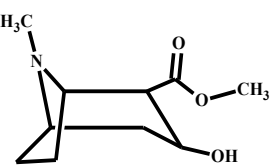
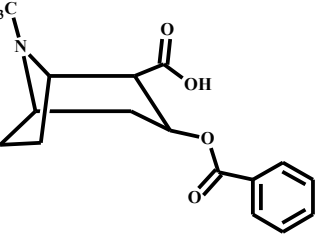
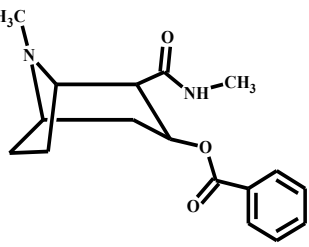
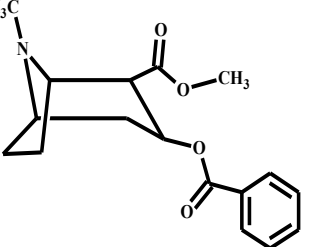
5,37 (m, 1H), 3,58 (m, 1H), 3,49 (m, 1H), 3,04 (dd, $J=6,7$; 2,9 Hz, 1H), 2,48 (s, 3H), 2,33-2,20 (m, 3H), 2,17 (m, 1H), 2,02-1,87 (m, 3H).

A benzoilekgonin-metilamid előállítása

1 mM benzoilekgonint elszuszpendáltattam 3 ml benzolban, majd óvatosan hozzácsepegtettem 0,4 ml (2 mM) tionil-kloridot. 2 óra után bepároltam az elegyet. Ezután hozzáadtam 1 ml benzolt és metil-amin gázt vezettem az oldatba. 30 perc után extraháltam nátrium-karbonát oldattal, majd bepároltam. Halványsárga kristályok keletkeztek. Kitermelés: 85%. A vegyület szerkezetét ^1H NMR spektroszkópiával igazoltam (600 MHz, CDCl_3): $\delta=9,34$ (s, 1H), 7,97 (d, $J=7,6$ Hz, 2H), 7,49 (t, $J=7,5$ Hz, 1H), 7,39 (t, $J=7,7$ Hz, 2H), 5,30 (m, 1H), 3,46 (m, 1H), 3,27 (m, 1H), 2,90 (dd, $J=6,6$; 3,1 Hz, 1H), 2,49 (s, 3H), 2,26 (s, 3H), 2,23-1,88 (m, 6H).

A vizsgált vegyületek képleteit a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat: A kinetikai vizsgálatokhoz és a protonálódási állandók meghatározásához felhasznált ekgonin származékok

		
Ekgonin	Ekgonin-metilészter	Benzoilekgonin
		
Benzoilekgonin-metilamid	Kokain	

3.2.3 A metilfenidát és a ritalinsav

Metilfenidát

Dörzsmozsárban elporítottam 30 db Ritalin tablettát. 20 ml metanollal 30 percig ultrahangos fürdőn kevertetem. Szűrés után bepároltam. Fehér kristályok keletkeztek. Ezután háromszor extraháltam 1 M NaOH-al és kloroformmal. A kloroformos fázis bepárlása után áttetsző kristályos anyag keletkezett, amit hűtőben tároltam. Kitermelés: 210 mg.

A ritalinsav előállítása

1 mM metilfenidátot feloldottam 2 ml 2M sósavban és 6 órán keresztül refluxáltattam. Bepárlás után fehér kristályos anyag keletkezett. A vegyület szerkezetét ^1H NMR spektroszkópiával igazoltam (600 MHz, D_2O): $\delta=7,34-7,26$ (m, 3H), 7,19 (d, $J=7,0$ Hz, 2H), 3,69 (d, $J=9,2$ Hz, 1H), 3,57 (t, $J=10,1$ Hz, 1H), 3,32 (d, $J=12,1$ Hz, 1H), 2,93 (td, $J=12,5$; 3,1 Hz, 1H), 1,74 (d, $J=14,6$ Hz 1H), 1,66 (d, $J=12,9$ Hz 1H), 1,53-1,43 (m, 2H), 1,35-1,22 (m, 2H).

3.3 NMR mérések

Az oldatfázisú NMR spektrumok felvétele Varian VNMRS 14.1 T (protonokra 600 MHz-es rezonanciafrekvenciájú) NMR-spektrométerével történt. Mérőfejnek kétcsatornás, inverz detektálásos gradiens (IDPFG) mérőfejet alkalmaztam, a mintatérben a hőmérséklet $37 \pm 0,1$ °C volt. Oldószerként 95% H_2O és 5% D_2O elegyét használtuk. Az ionerősséget minden esetben 0,15 M-ra állítottam be NaCl segítségével. Az oldószer jelének elnyomására dpfgse (double pulse field gradient spin echo) technikát alkalmaztam. Belső standardként pirazint használtam. A pirazin kémiai eltolódása a DSS-hez volt viszonyítva (8,619 ppm). d1 relaxációs időnek 5 s-t mértem és a további kísérletekben is ezt használtam. A kinetikai vizsgálatok során az integrálok szintén a pirazin jeléhez voltak viszonyítva. A spektrumok kiértékelésére a VNMRJ 3.2 és a MestReNova 6.02 programokat alkalmaztam.

3.4 Egyensúlyi állandók meghatározása

Az egyensúlyi állandókat NMR-pH titrálással határoztam meg és a (15) egyenlet szerint számoltam ki. A pH-t egy Metrohm 6.0234.110 pH kombinált üvegelektóddal felszerelt Metrohm 780-as pH mérővel határoztam meg. A mért pH-k az NBS által előírt 4 puffer kalibrációiból lettek számolva, amelyek a következők: 0,05 M kálium-tetraoxalát (pH=1,690), 0,05 M kálium-hidrogén-ftalát (pH=4,022), 0,025 M kálium-dihidrogén-foszfát+0,025 M dinátrium-hidrogén-foszfát (pH=6,841) és 0,01 M bórox puffer (pH=9,088). A vizsgált vegyületek 5% (v/v) nehézvizet tartalmazó 0,01 M HCl-ban illetve NaOH-ban lettek feloldva. Az oldatok elegyítése és pH mérés után vettem fel az ^1H NMR spektrumokat. Az ionerősséget minden esetben 0,15 M-ra állítottam be NaCl segítségével. Az adatok kiértékelése Origin 8 programmal történt.

Az ekgonin vázas észterek esetében a protonálódási állandókat GLpKa készülékkel (Sirius, Forest Row, UK) potenciometriás módszerrel is meghatároztuk. A titrálásokat kombinált üvegelektóddal végeztük, melynek kalibrálására az ún. négy-paraméteres technikát alkalmaztuk (Four PlusTM method). A titrálásokat konstans ionerősség mellett ($I=0,15$ M KCl) és 37 °C-on végeztük nitrogén atmoszféra alatt. Az EME, kokain és BEM esetében a minták ≈ 1 mM koncentrációjú vizes oldatainak 10 ml-ét 0,5 M sósav mérőoldattal pH 4-re állítottuk, majd 0,5 M KOH mérőoldattal titráltuk pH 12-ig. A BE és az ekgonin esetében a titrálásokat pH 2-12 tartományban végeztük. A protonálódási állandók értékeit RefinementProTM szoftver (Sirius, Forest Row, UK) segítségével három párhuzamos titrálásból számítottuk [138].

3.5 Kinetikai vizsgálatok

A hidrolízis nyomon követése *in situ* történt NMR spektroszkópiával. A bomlások vizsgálata pufferelt közegben történt, melyet 0,05 M nátrium-dihidrogén-foszfát és 0,025 M bórox különböző arányával állítottam be. Az észterekből 2-5 mg-ot mértem be, majd 2 ml puffert adtam hozzá, ami 5% nehézvizet tartalmazott. A hidrolízist legalább az anyavegyület 75%-os bomlásáig követtem. 8,5-ös pH alatt 20-30 percenként vettem fel egy spektrumot, 8,5 fölött pedig 5-7 percenként. Morfín észterek esetében a hidrolízis nyomon követésére az aromás, a 7-es, a 8-as, az 5-ös, a 6-os, az N-metil illetve a metoxi-csoportok protonjait használtam fel. Az ekgonin észtereknél a 2-es, a 3-as az N-metil, illetve ahol lehetett az O-metil és az aromás protonok jeleit

használtam a hidrolízis nyomon követésére. A metilfenidát bomlása során az *O*-metil, a fenil gyűrű orto helyzetű protonjait illetve a két kiralitáscentrum protonjait (az α helyzetű szénatom és a mellette lévő kiralitáscentrum) követtem nyomon. A vízelnyomás miatt az oldószer közelében lévő jeleket nem használtam a kinetikai számításokban. Az összes lehetséges protonra szimultán illesztés történt a (31) egyenlet alapján. Az adatok kiértékelése és az állandók kiszámítása nemlineáris paraméterillesztéssel az Origin 8 programmal történt.

4. Eredmények

Meghatároztam hét morfinán vázas vegyület – a heroin, a kodein, a 6-acetilkodein, a 6-acetil-*N*-metilmorfin, a 3-acetilmorfin, a 6-acetilmorfin és a morfin – makroszkopikus protonálódási állandó értékeit NMR-pH titrálást követő nemlineáris paraméterillesztéssel. A morfin és a 6AM esetében a mikroállandók is meghatározásra kerültek.

Meghatároztam továbbá a kokain, az ekgonin-metilészter, a benzoilekgonin-metilamid és a benzoilekgonin makroszkopikus protonálódási állandó értékeit. A BE és az ekgonin esetén a mikroállandókat is meghatároztuk. Az ekgonin észterek protonálódási állandó értékeit potenciometriás titrálással is meghatároztuk.

Megmértem a metilfenidát és a ritalinsav makroállandóit is NMR-pH titrálással, az utóbbi esetében kiszámoltam a mikroállandókat is.

A vegyületek protonálódási állandó értékeit táblázatban foglaltam össze.

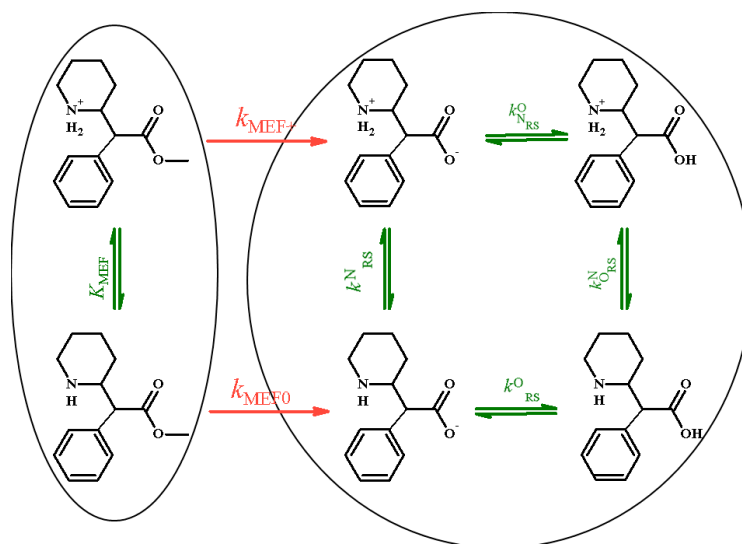
Meghatároztam a metilfenidát, a heroin illetve a kokain részecske- (és oldallánc-) specifikus hidrolízis sebességi állandóit. Ezen kívül meghatároztam a heroin és a kokain köztes hidrolízis termékeinek is a részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandóit is. Új módszert dolgoztam ki a két észter- és egy protonálható csoportot tartalmazó vegyületek konszekutív és szimultán hidrolízisének a leírására.

Minden vegyület esetén táblázatban tüntettem fel a különböző hidrogén-ion koncentráció mellett meghatározott látszólagos észterhidrolízis sebességi állandókat, mely értékek felhasználásával számítottam az észterek egyes mikrorészecskéihez tartozó pH-független, részecske- és (oldallánc-)specifikus észterhidrolízis sebességi állandókat, amelyeket külön táblázatokban tüntettem fel. Alacsonyabb pH-n a hidrolízis lassabb folyamat, akár több hétig is eltarthat, ezért az alacsonyabb pH-n mért részecske-specifikus sebességi állandók értékeinek nagyobb a hibája, mint a magasabb pH-n mért állandók értékeinek.

4.1 A kísérletes munka során alkalmazott összefüggések és egyenletek áttekintése

4.1.1 Egy protonálható és egy észtercsoportot csoportot tartalmazó vegyületek hidrolízise

A metilfenidát (MEF), a 3-acetilmorfin (3AM) és az ekgonin-metilészter (EME) is egy protonálható- illetve egy észtercsoportot tartalmaznak. A 15. ábra a metilfenidát példáján keresztül mutatja be a hidrolízis folyamatát, ami teljesen analóg a 3-acetilmorfin és az ekgonin-metilészter esetében is. A bomlás során keletkező vegyületek két protonálható csoporttal rendelkeznek, protonálódásukat két makroszkopikus és négy mikroszkopikus protonálódási állandóval lehet leírni.



15. ábra: A metilfenidát részecske-specifikus észterhidrolízise (zölddel az egyensúlyi állandók, pirossal a sebességi állandók jelölve)

A 3AM hidrolízise semleges és protonált formában történhet. A hidrolízis két másodrendű folyamatból tevődik össze, ami az alábbi egyenlettel írható le:

$$-\frac{d[\text{MEF}]_{\text{T}}}{dt} = k_{\text{MEF}^0} [\text{MEF}^0] [\text{OH}^-] + k_{\text{MEF}^+} [\text{MEF}^+] [\text{OH}^-] \quad (21)$$

Ahol,

k_{MEF^0} a semleges forma részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandója,

k_{MEF^+} a protonált forma részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandója,

$[\text{MEF}^0]$ a metilfenidát semleges formájának a koncentrációja,

$[\text{MEF}^+]$ a metilfenidát protonált formájának a koncentrációja

$[\text{MEF}]_{\text{T}}$ pedig a teljes észterkoncentráció:

$$[\text{MEF}]_{\text{T}} = [\text{MEF}^0] + [\text{MEF}^+] \quad (22)$$

A móltörtök bevezetésével a semleges és a protonált forma koncentrációi kifejezhetők az egyensúlyi állandók segítségével:

$$\alpha_{\text{MEF}^0} = \frac{[\text{MEF}^0]}{[\text{MEF}^0] + [\text{MEF}^+]} = \frac{1}{1 + K_{\text{MEF}} [\text{H}^+]} \quad (23)$$

$$\alpha_{\text{MEF}^+} = \frac{[\text{MEF}^+]}{[\text{MEF}^0] + [\text{MEF}^+]} = \frac{K_{\text{MEF}} [\text{H}^+]}{1 + K_{\text{MEF}} [\text{H}^+]} \quad (24)$$

A móltörtök és az összkoncentráció kapcsolata az alábbiak szerint írható fel:

$$[\text{MEF}^0] = \alpha_{\text{MEF}^0} [\text{MEF}]_{\text{T}} \quad (25)$$

$$[\text{MEF}^+] = \alpha_{\text{MEF}^+} [\text{MEF}]_{\text{T}} \quad (26)$$

A móltörtöket beillesztve a (26) egyenletbe,

$$-\frac{d[\text{MEF}]_{\text{T}}}{dt} = k_{\text{MEF}^0} \alpha_{\text{MEF}^0} [\text{MEF}]_{\text{T}} [\text{OH}^-] + k_{\text{MEF}^+} \alpha_{\text{MEF}^+} [\text{MEF}]_{\text{T}} [\text{OH}^-] \quad (27)$$

Majd kifejezve őket az egyensúlyi állandókkal az alábbi differenciálegyenletet kapjuk:

$$-\frac{d[\text{MEF}]_{\text{T}}}{[\text{MEF}]_{\text{T}}} = \frac{k_{\text{MEF}^0} [\text{OH}^-] + k_{\text{MEF}^+} K_{\text{MEF}} [\text{H}^+] [\text{OH}^-]}{1 + K_{\text{MEF}} [\text{H}^+]} dt \quad (28)$$

Integrálás után,

$$-\ln[\text{MEF}]_{\text{T}} = \frac{k_{\text{MEF}^0} [\text{OH}^-] + k_{\text{MEF}^+} K_{\text{MEF}} K_w}{1 + K_{\text{MEF}} [\text{H}^+]} t + C \quad (29)$$

Ahol,

C az integrációs konstans

Amennyiben a kezdeti feltétel teljesül $t=0$, $[\text{MEF}]_T = [\text{MEF}]_{T_0}$:

$$\frac{\ln \frac{[\text{MEF}]_{T_0}}{[\text{MEF}]_{T_t}}}{t} = \frac{k_{\text{MEF}0} [\text{OH}^-]}{1 + K_{\text{MEF}} [\text{H}^+]} + \frac{k_{\text{MEF}+} K_{\text{MEF}} K_w}{1 + K_{\text{MEF}} [\text{H}^+]} = k'_{\text{MEF}} \quad (30)$$

Ahol,

$[\text{MEF}]_{T_0}$ a MEF kezdeti koncentrációja,

$[\text{MEF}]_{T_t}$ az észter összkoncentrációja t időpontban,

$\frac{\ln \frac{[\text{MEF}]_{T_0}}{[\text{MEF}]_{T_t}}}{t}$ a MEF hidrolízisének látszólagos sebességi állandója (k'_{MEF})

Ha a látszólagos észterhidrolízis sebességi állandót legalább 6-8, állandó, ismert pH-n meghatározzuk, a protonálódási egyensúlyi állandó ismeretében a (30) egyenlet szerint nemlineáris paraméterillesztéssel $k_{\text{MEF}0}$ és $k_{\text{MEF}+}$ protonáltsági állapot specifikus észterhidrolízis sebességi állandók meghatározhatók.

A látszólagos sebességi állandókat az alábbi egyenletekből lehet kiszámolni:

$$[\dot{\text{E}}]_t = [\dot{\text{E}}]_0 e^{-k't} \quad (31)$$

$$[\dot{\text{E}}]_t = [\dot{\text{E}}]_0 (1 - e^{-k't}) \quad (32)$$

Ahol,

$[\dot{\text{E}}]_t$ az észter koncentráció t időpontban,

$[\dot{\text{E}}]_0$ a kezdeti észter koncentráció,

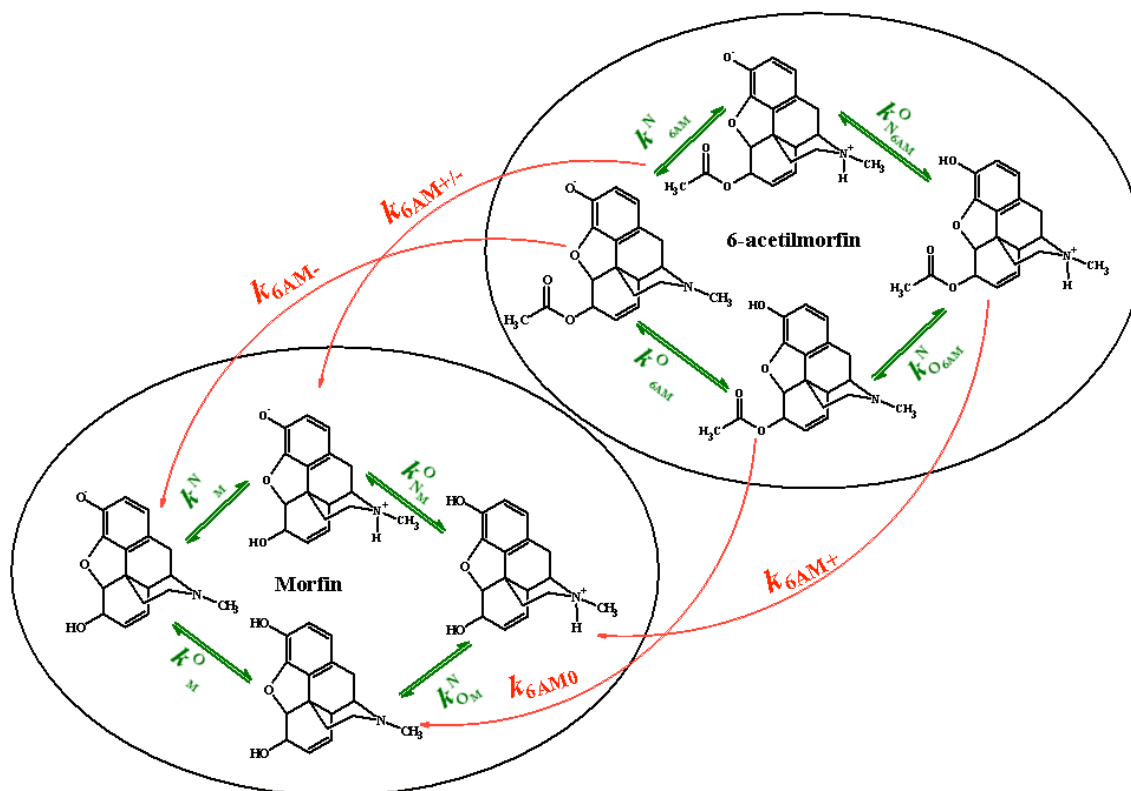
k' a látszólagos sebességi állandó

t a hőmérséklet

A (31) egyenlet az észter koncentrációjának csökkenését, a (32) pedig a hidrolízis termék megjelenését írja le, pufferelt közegben. [139]

4.1.2 Két protonálható és egy észtercsoportot tartalmazó vegyületek hidrolízise

A 6-acetilmorfin és a benzoilekgonin is két-két protonálható- és egy észtercsoportot tartalmaznak. A 16. ábra a 6-acetilmorfin példáján keresztül mutatja be a folyamatot. A benzoilekgonin hidrolízisének sémája analóg a 6AM-val.



16. ábra: A 6AM részecske-specifikus észterhidrolízise (zölddel az egyensúlyi állandók, pirossal a sebességi állandók jelölve)

A 6AM négy protonáltsági állapotban fordulhat elő, ezért bomlása négy mikrorészecske hidrolízisének az összege:

$$-\frac{d[6AM]_{\text{r}}}{dt} = k_{6AM^-} [6AM^-] [OH^-] + k_{6AM^0} [6AM^0] [OH^-] + k_{6AM^{+/-}} [6AM^{+/-}] [OH^-] + k_{6AM^+} [6AM^+] [OH^-] \quad (33)$$

Ahol,

k_{6AM^-} az anionos forma részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandója

k_{6AM^0} a töltésmentes forma részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandója

$k_{6AM^{+/-}}$ az ikerionos forma részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandója

k_{6AM^+} a kationos forma részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandója

$[6AM^-]$, $[6AM^0]$, $[6AM^{+/-}]$, $[6AM^+]$ a különböző protonáltsági állapotban lévő molekulák koncentrációja (anionos, töltésmentes, ikerionos és kationos)

$[6AM]_T$ a kezdeti észter koncentráció:

$$[6AM]_T = [6AM^-] + [6AM^0] + [6AM^{+/-}] + [6AM^+] \quad (34)$$

Az egyes mikrorészecskék koncentrációja kifejezhető móltörttekkel:

$$\alpha_{6AM^-} = \frac{[6AM^-]}{[6AM^-] + [6AM^0] + [6AM^{+/-}] + [6AM^+]} = \frac{1}{1 + K_{1,6AM} [H^+] + K_{1,6AM} K_{2,6AM} [H^+]^2} = \frac{[6AM^-]}{[6AM]_T} \quad (35)$$

$$\alpha_{6AM^0} = \frac{[6AM^0]}{[6AM^-] + [6AM^0] + [6AM^{+/-}] + [6AM^+]} = \frac{k_{6AM^0}^O [H^+]}{1 + K_{1,6AM} [H^+] + K_{1,6AM} K_{2,6AM} [H^+]^2} = \frac{[6AM^0]}{[6AM]_T} \quad (36)$$

$$\alpha_{6AM^{+/-}} = \frac{[6AM^{+/-}]}{[6AM^-] + [6AM^0] + [6AM^{+/-}] + [6AM^+]} = \frac{k_{6AM}^N [H^+]}{1 + K_{1,6AM} [H^+] + K_{1,6AM} K_{2,6AM} [H^+]^2} = \frac{[6AM^{+/-}]}{[6AM]_T} \quad (37)$$

$$\alpha_{6AM^+} = \frac{[6AM^+]}{[6AM^-] + [6AM^0] + [6AM^{+/-}] + [6AM^+]} = \frac{K_{1,6AM} K_{2,6AM} [H^+]^2}{1 + K_{1,6AM} [H^+] + K_{1,6AM} K_{2,6AM} [H^+]^2} = \frac{[6AM^+]}{[6AM]_T} \quad (38)$$

Az összkoncentráció és a móltörttek kapcsolata, pedig:

$$[6AM^-] = \alpha_{6AM^-} [6AM]_T \quad (39)$$

$$[6AM^0] = \alpha_{6AM^0} [6AM]_T \quad (40)$$

$$[6AM^{+/-}] = \alpha_{6AM^{+/-}} [6AM]_T \quad (41)$$

$$[6AM^+] = \alpha_{6AM^+} [6AM]_T \quad (42)$$

Amennyiben a móltörttekkel kifejezett részecske koncentrációkat beillesztjük a (31) egyenletbe:

$$-\frac{d[6AM]_T}{dt} = k_{6AM^-} \alpha_{6AM^-} [6AM]_T [OH^-] + k_{6AM^0} \alpha_{6AM^0} [6AM]_T [OH^-] + k_{6AM^{+/-}} \alpha_{6AM^{+/-}} [6AM]_T [OH^-] + k_{6AM^+} \alpha_{6AM^+} [6AM]_T [OH^-] \quad (43)$$

Ha a (35)-(38) egyenletek szerint a móltörteket kifejezzük a megfelelő egyensúlyi állandókkal, a következő összefüggéshez jutunk:

$$\frac{d[6AM]_T}{[6AM]_T} = \frac{(k_{6AM-} + (k_{6AM0} k_{6AM}^O + k_{6AM+/-} k_{6AM}^N) [H^+] + k_{6AM+} K_{1_{6AM}} K_{2_{6AM}} [H^+]^2) [OH^-]}{1 + K_{1_{6AM}} [H^+] + K_{1_{6AM}} K_{2_{6AM}} [H^+]^2} dt \quad (44)$$

Integrálás után:

$$-\ln[6AM]_T = \frac{k_{6AM-} [OH^-] + (k_{6AM0} k_{6AM}^O + k_{6AM+/-} k_{6AM}^N) K_w + k_{6AM+} K_{1_{6AM}} K_{2_{6AM}} K_w [H^+]}{1 + K_{1_{6AM}} [H^+] + K_{1_{6AM}} K_{2_{6AM}} [H^+]^2} t + C \quad (45)$$

Amennyiben a kezdeti feltétel teljesül: $t=0$, $[6AM]_T = [6AM]_{T_0}$ az egyenletet

átrendezve:

$$\frac{-\ln \frac{[6AM]_{T_0}}{[6AM]_{T_t}}}{t} = \frac{k_{6AM-} [OH^-] + (k_{6AM0} k_{6AM}^O + k_{6AM+/-} k_{6AM}^N) K_w + k_{6AM+} K_{1_{6AM}} K_{2_{6AM}} K_w [H^+]}{1 + K_{1_{6AM}} [H^+] + K_{1_{6AM}} K_{2_{6AM}} [H^+]^2} = k'_{6AM} \quad (46)$$

Ahol,

$[6AM]_{T_0}$ a 6AM kezdeti koncentrációja

$[6AM]_{T_t}$ a 6AM koncentrációja t időpontban

$\frac{-\ln \frac{[6AM]_{T_0}}{[6AM]_{T_t}}}{t}$ a látszólagos hidrolízis sebességi állandó (k'_{6AM})

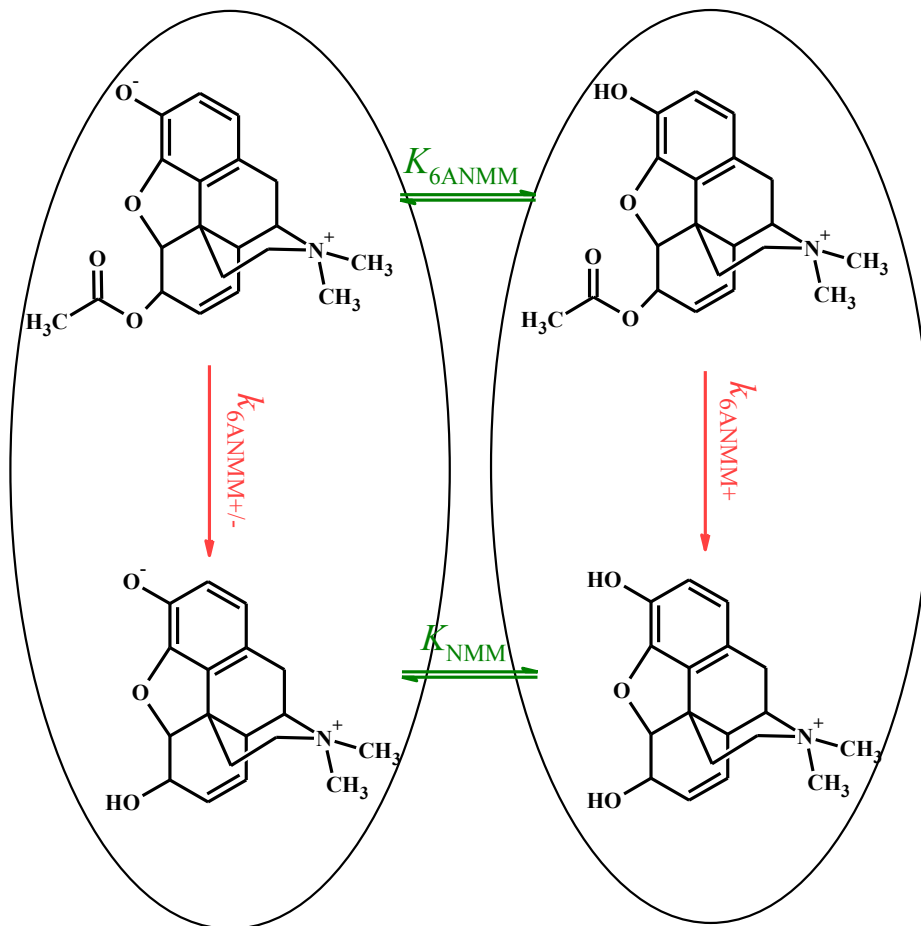
k_{6AM}^O , k_{6AM}^N , $K_{1_{6AM}}$, $K_{2_{6AM}}$ a megfelelő mikro- és makroállandók

A látszólagos sebességi állandók az előző fejezetben leírt (31) illetve (32) egyenletekből számolhatók.

A (46) egyenletből közvetlenül az anionos (k_{6AM-}) illetve a kationos (k_{6AM+}) forma pH független részecske-specifikus hidrolízis állandója számítható ki. A töltésmentes és ikerionos részecske állandóinak csak az összegeit kapjuk meg a fenti egyenletből.

Ahhoz, hogy a hiányzó két állandót meghatározzuk, többletinformációra van szükségünk, amit hasonló szerkezetű, de egyszerűbb vegyületek hidrolízis kinetikájának

vizsgálatakor kaphatunk meg [140]. A 6AM esetében ez a vegyület a 6-acetil-*N*-metilmorfin (6ANMM) volt. A 6ANMM egy konstans pozitív töltéssel, egy protonálható- és egy észtercsoporttal rendelkezik. Ez a vegyület jól modellezi az ikerionos formát, hiszen a kötéstávolságok illetve az elektronsűrűség is nagyban egyezik a 6AM-al. Részecske-specifikus hidrolízisét a 17. ábra szemlélteti.



17. ábra: A 6ANMM részecske-specifikus hidrolízise (zölddel az egyensúlyi állandók, pirossal a sebességi állandók jelölve)

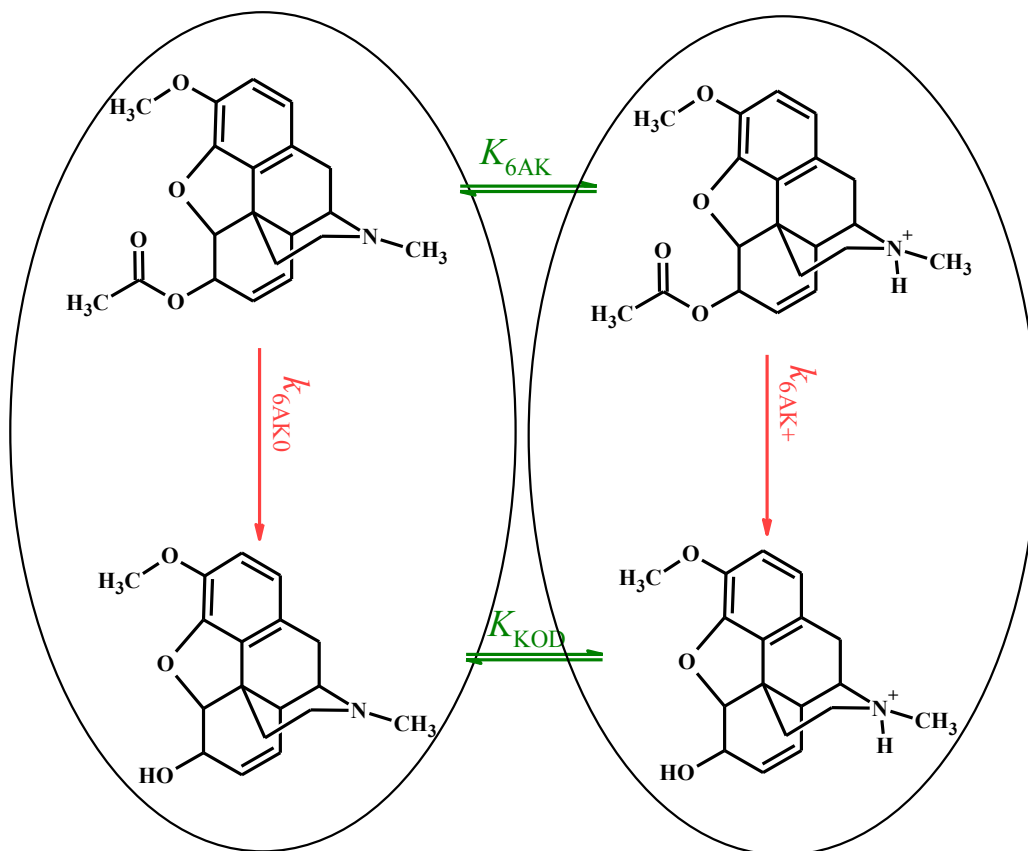
A 6ANMM hidrolízisének leírása teljesen analóg a MEF (ill. a 3AM és EME) hidrolízisét leíró (21) egyenlettel. A (47) egyenlet feltételezi, hogy a fenolát protonálódása ugyanakkora változást okoz a hidrolízis sebességében a 6ANMM-ban, mint a 6AM esetében.

$$\frac{k_{6ANMM+}}{k_{6ANMM+/-}} = \frac{k_{6AM+}}{k_{6AM+/-}} \quad (47)$$

Ennek értelmében, amennyiben meghatározzuk a 6ANMM részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandóit, a 6AM ikerionos formájának a sebességi állandója kiszámítható.

Így tehát megkapjuk a 6AM anionos, ikerionos és kationos formáinak a sebességi állandóit. Ezek ismeretében pedig a töltésmentes részecske hidrolízis sebességi állandója a (46) egyenletből már kiszámítható.

A feltételezésünk ellenőrzése a 6-acetilkodein (6AK) hidrolízisének a vizsgálata során történhet meg, ami jól modellezi a 6AM töltésmentes formáját (18. ábra).



18. ábra: A 6AK részecske-specifikus hidrolízise (zölddel az egyensúlyi állandók, pirossal a sebességi állandók jelölve)

A 6AK hidrolízisének leírására is a (21) egyenletet használjuk, amiből kiszámítható a töltésmentes (k_{6AK0}) és a kationos (k_{6AK+}) forma részecske-specifikus sebességi állandója.

A 6AM mikrorészecskék hidrolízishez való hozzájárulását hidrolízis frakciókkal jellemezhetjük, egy új fizikai-kémiai paraméterrel, ami egy-egy mikrorészecske hidrolízisben betöltött relatív szerepet jellemzi. Értéke kiszámítható, ha az adott mikrorészecske által az adott pH-n képviselt sebességet elosztjuk a hidrolízis ugyanazon pH-hoz tartozó bruttó sebességével. Ebben a paraméterben tehát mikroszkopikus koncentráció és sebességi adatok egyaránt szerepelnek. A (48) egyenlet a 6AM ikerionos formájának a hidrolízis frakcióját írja le.

$$\alpha_{\text{hydr}_{6\text{AM}^{+/-}}} = \frac{k_{6\text{AM}^{+/-}} [6\text{AM}^{+/-}] [\text{OH}^-]}{k_{6\text{AM}^-} [6\text{AM}^-] [\text{OH}^-] + k_{6\text{AM}^0} [6\text{AM}^0] [\text{OH}^-] + k_{6\text{AM}^{+/-}} [6\text{AM}^{+/-}] [\text{OH}^-] + k_{6\text{AM}^+} [6\text{AM}^+] [\text{OH}^-]} \quad (48)$$

A móltörteket bevezetve a (33)-(36) egyenletek alapján:

$$\alpha_{\text{hydr}_{6\text{AM}^{+/-}}} = \frac{\alpha_{6\text{AM}^{+/-}} k_{6\text{AM}^{+/-}}}{\alpha_{6\text{AM}^-} k_{6\text{AM}^-} + \alpha_{6\text{AM}^{+/-}} k_{6\text{AM}^{+/-}} + \alpha_{6\text{AM}^0} k_{6\text{AM}^0} + \alpha_{6\text{AM}^+} k_{6\text{AM}^+}} \quad (49)$$

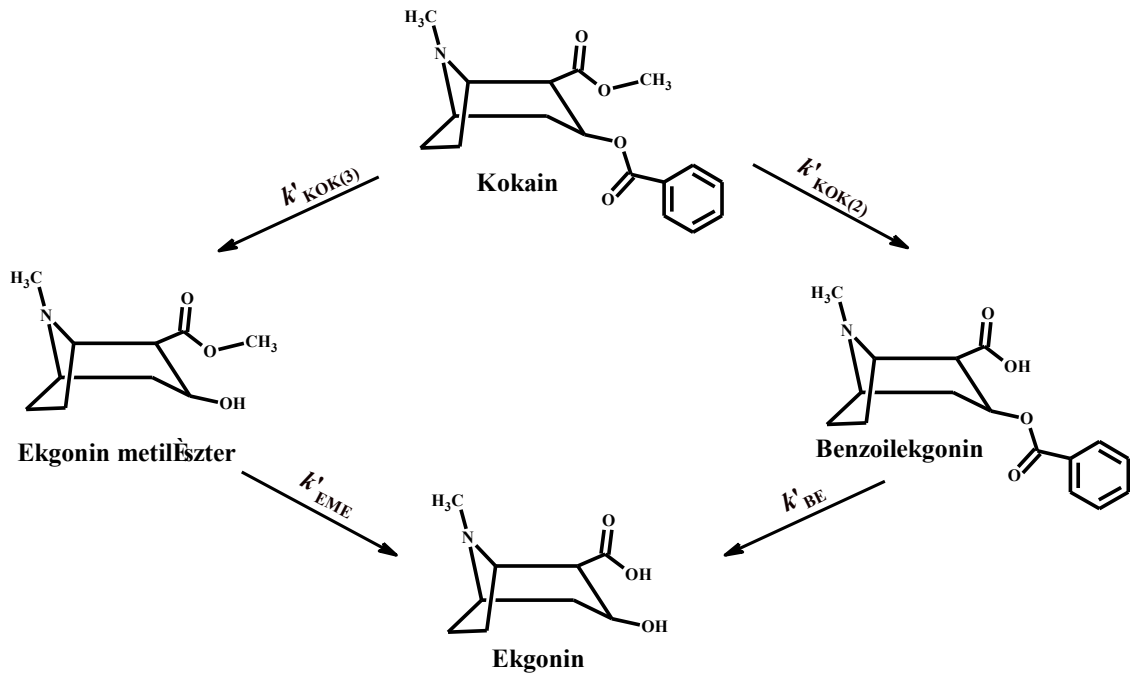
Majd a móltörteket kifejezve a protonálódási állandókkal és a $[\text{H}^+]$ megkapjuk az egyenlet végső formáját:

$$\alpha_{\text{hydr}_{6\text{AM}^{+/-}}} = \frac{k_{6\text{AM}^{+/-}} k_{6\text{AM}}^{\text{N}} [\text{H}^+]}{k_{6\text{AM}^-} + (k_{6\text{AM}^{+/-}} k_{6\text{AM}}^{\text{N}} + k_{6\text{AM}^0} k_{6\text{AM}}^{\text{O}}) [\text{H}^+] + k_{6\text{AM}^+} K_{1,6\text{AM}} K_{2,6\text{AM}} [\text{H}^+]^2} \quad (50)$$

4.1.3 Két észter- és egy protonálható csoportot tartalmazó vegyületek hidrolízise

A heroin (3,6-diacetilmorfin, DAM) és a kokain (benzoilekgonin-metil-észter, KOK) is egy protonálható- és két észtercsoportot tartalmaznak. A hidrolízis mind szimultán, mind konszekutív folyamatokat magában foglal. Szimultán, mert egyszerre két helyen is hidrolizálhat, konszekutív, mert a keletkezett egy észtercsoportot tartalmazó vegyület is tovább hidrolizál. Ahhoz, hogy a folyamatokat jellemezni tudjuk, monitoroznunk kell a közti termékek koncentrációit is.

A 19. ábra a kokain hidrolízisét mutatja be pufferezt közegben, ahol a folyamat elsőrendű kinetika szerint játszódik le.



19. ábra: A kokain hidrolízise pufferelt közegben

A hidrolízist az alábbi egyenletek írják le:

$$\frac{d[\text{KOK}]}{dt} = -k'_{\text{KOK}(2)}[\text{KOK}] - k'_{\text{KOK}(3)}[\text{KOK}] \quad (51)$$

$$\frac{d[\text{BE}]}{dt} = k'_{\text{KOK}(2)}[\text{KOK}] - k'_{\text{BE}}[\text{BE}] \quad (52)$$

$$\frac{d[\text{EME}]}{dt} = k'_{\text{KOK}(3)}[\text{KOK}] - k'_{\text{EME}}[\text{EME}] \quad (53)$$

Ahol,

$k'_{\text{KOK}(2)}$ a kokain 2-es helyzetben történő hidrolízisét jelző látszólagos sebességi állandó

$k'_{\text{KOK}(3)}$ a kokain 3-as helyzetben történő hidrolízisét jelző látszólagos sebességi állandó

k'_{BE} a benzoilekgonin látszólagos sebességi állandója

k'_{EME} az ekgonin-metilészter látszólagos sebességi állandója

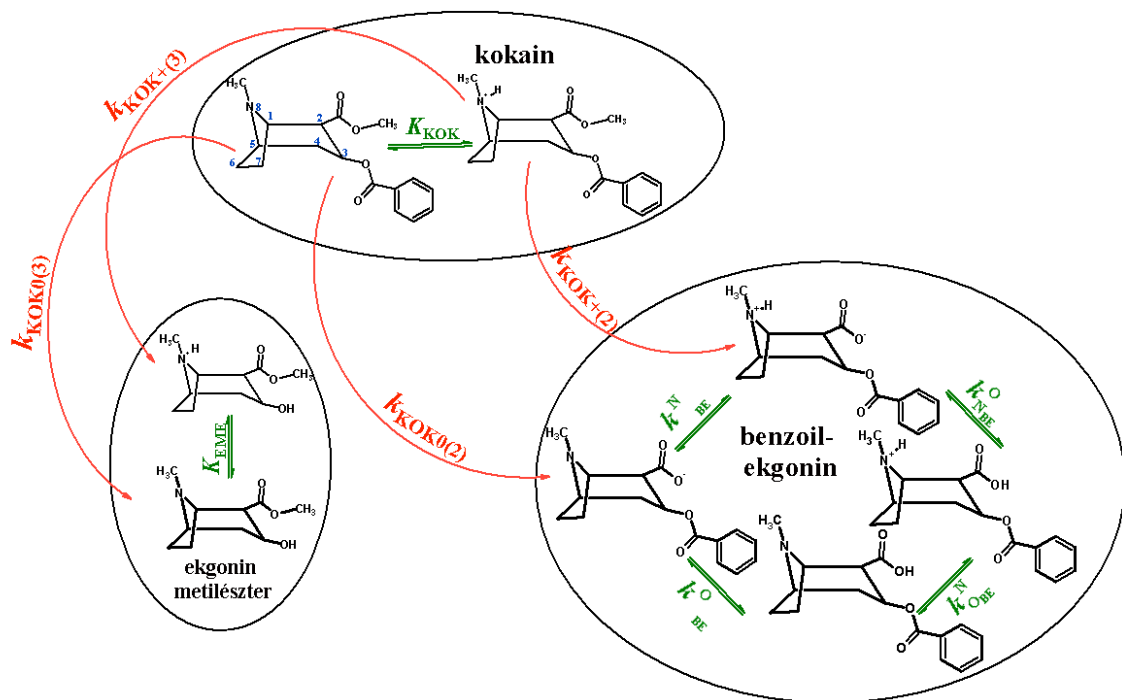
A (51) egyenlet a szimultán, a (52) és a (53) egyenletek pedig a konszekutív folyamatokat írják le. Az egyenletek átrendezése, majd integrálása után az alábbi összefüggéseket kapjuk:

$$[\text{KOK}] = [\text{KOK}]_0 e^{-(k'_{\text{KOK}(2)} + k'_{\text{KOK}(3)})t} \quad (54)$$

$$[\text{BE}] = \frac{k'_{\text{KOK}(2)} [\text{KOK}]_0}{k'_{\text{BE}} - (k'_{\text{KOK}(2)} + k'_{\text{KOK}(3)})} (e^{-(k'_{\text{KOK}(2)} + k'_{\text{KOK}(3)})t} - e^{-k'_{\text{BE}}t}) \quad (55)$$

$$[\text{EME}] = \frac{k'_{\text{KOK}(3)} [\text{KOK}]_0}{k'_{\text{EME}} - (k'_{\text{KOK}(2)} + k'_{\text{KOK}(3)})} (e^{-(k'_{\text{KOK}(2)} + k'_{\text{KOK}(3)})t} - e^{-k'_{\text{EME}}t}) \quad (56)$$

A hidrolízis sebessége nagyban függ a protonáltsági állapottól. A különböző protonáltsági állapotban lévő molekulák hidrolízisét a 20. ábra mutatja be.



20. ábra: A kokain részecske-specifikus hidrolízise (zölddel az egyensúlyi állandók, pirossal a sebességi állandók jelölve)

A különböző pH-kon meghatározott látszólagos sebességi állandókból a pH-független részecske- és oldallánc-specifikus hidrolízis sebességi állandók kiszámíthatók (hasonlóan, mint a 3AM ill. EME esetében):

$$k'_{\text{KOK}(2)} = k_{\text{KOK}(2)} \frac{1}{1 + K_{\text{KOK}} [\text{H}^+]} [\text{OH}^-] + k_{\text{KOK}(2)} \frac{K_{\text{KOK}} [\text{H}^+]}{1 + K_{\text{KOK}} [\text{H}^+]} [\text{OH}^-] \quad (57)$$

$$k'_{\text{KOK}(3)} = k_{\text{KOK}(3)} \frac{1}{1 + K_{\text{KOK}} [\text{H}^+]} [\text{OH}^-] + k_{\text{KOK}(3)} \frac{K_{\text{KOK}} [\text{H}^+]}{1 + K_{\text{KOK}} [\text{H}^+]} [\text{OH}^-] \quad (58)$$

Ahol,

$k_{\text{KOK}(2)+}$ a kokain protonált formájának, a 2-es helyzetben történő hidrolízis részecske-specifikus sebességi állandója

$k_{\text{KOK}(2)0}$ a kokain semleges formájának, a 2-es helyzetben történő hidrolízis részecske-specifikus sebességi állandója

$k_{\text{KOK}(3)+}$ a kokain protonált formájának, a 3-as helyzetben történő hidrolízis részecske-specifikus sebességi állandója

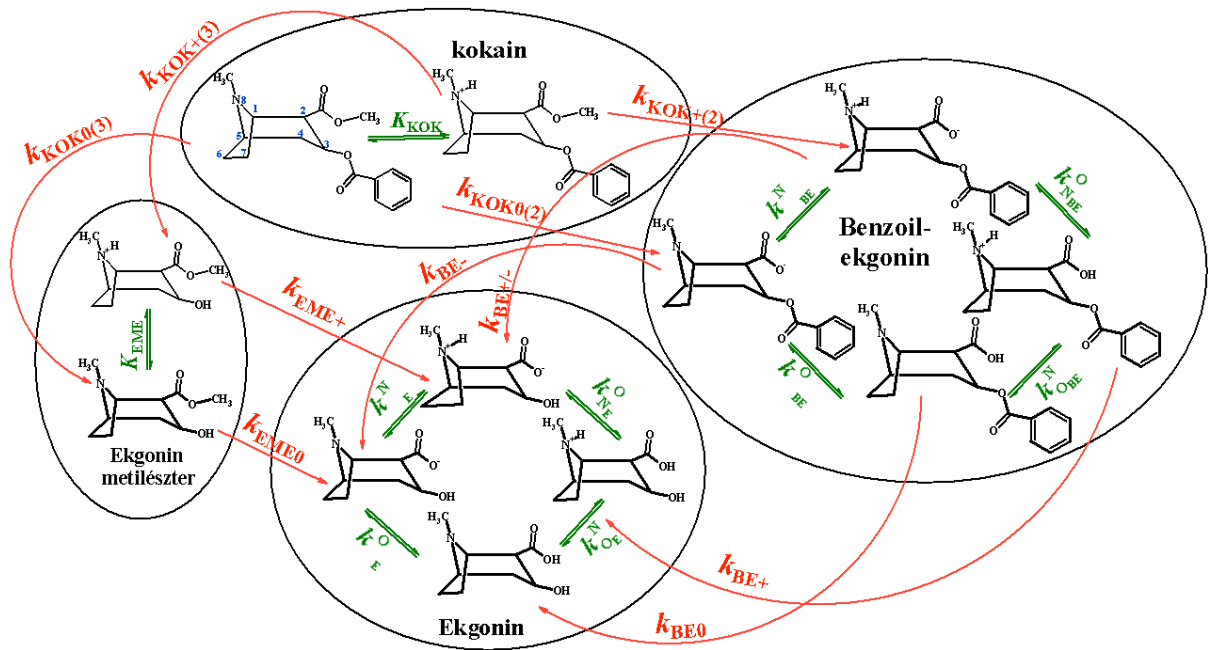
$k_{\text{KOK}(3)0}$ a kokain semleges formájának, a 3-as helyzetben történő hidrolízis részecske-specifikus sebességi állandója

K_{KOK} a kokain protonálódási állandója

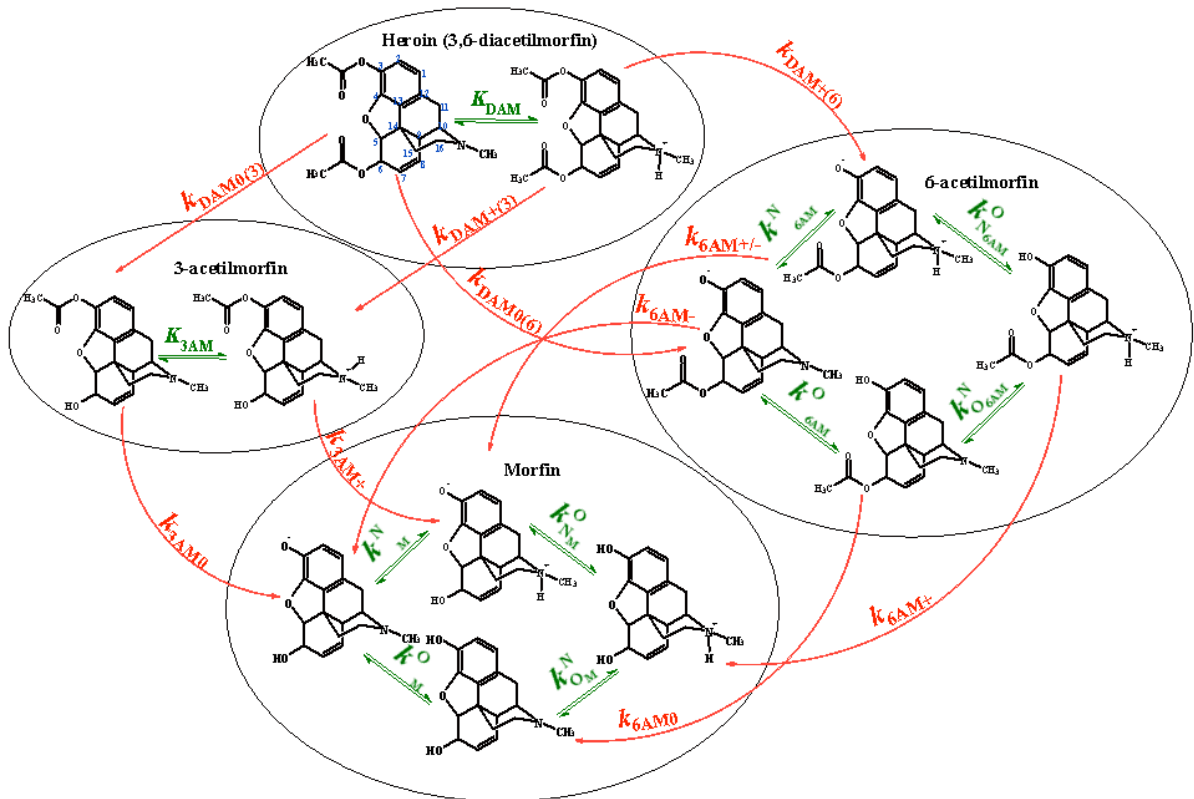
Az irodalomban csak a protonált kokainra vonatkozóan található meg adatok a hidrolízist illetően és ezek is kvantumkémiai számításokat takarnak [141].

A kokain első lépésében is észterek keletkeznek, az ekgonin metilészter és a benzoilekgonin. Ezek hidrolízis sebességi állandóit rendre az 5.1.1 és az 5.1.2 fejezet szerint határoztuk meg.

A kokain és a heroin teljes részecske- és oldallánc-specifikus hidrolízisét a 22. és a 23. ábrák mutatják.



22. ábra: A kokain teljes részecske-specifikus hidrolízise (zölddel az egyensúlyi állandók, pirossal a sebességi állandók jelölve)



23. ábra: A heroin teljes részecske-specifikus hidrolízise (zölddel az egyensúlyi állandók, pirossal a sebességi állandók jelölve)

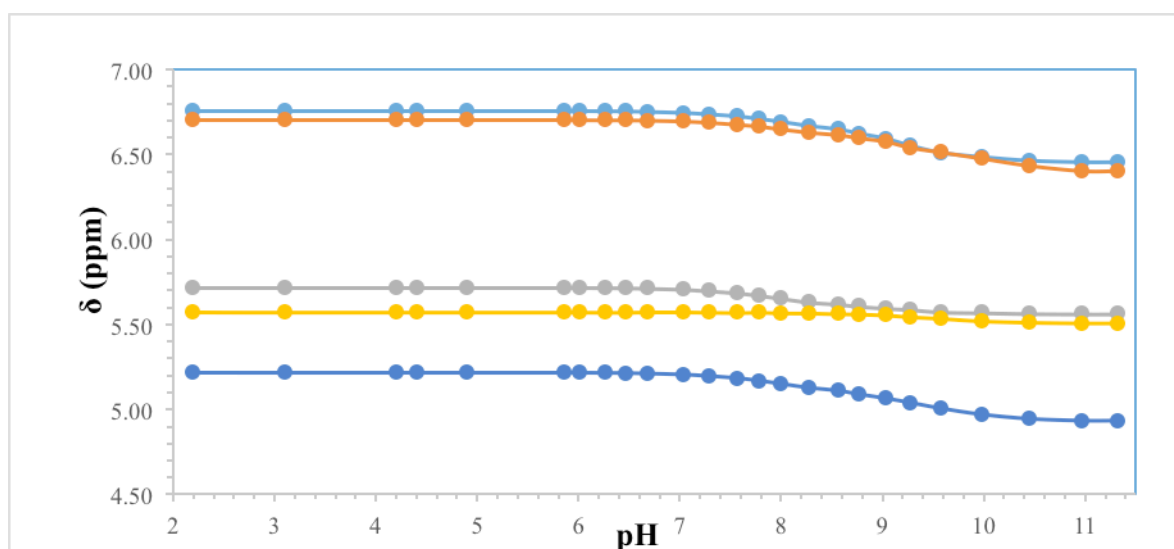
4.2. Morfinán vázas vegyületek

4.2.1 Protonálódási állandók

A vizsgált morfinán vázas vegyületek protonálódási állandóit a 8. táblázat tartalmazza. A méréseket 37 °C-n végeztük (az irodalomban főleg 25 °C-s adatok találhatóak). A 6AM mikroállandóinak meghatározásához felhasználtam a 6ANMM makroállandóját, a morfin mikroállandóinak kiszámításához pedig a kodein makroállandóját. A 24. ábra a 6AM NMR-pH titrálási görbáját ábrázolja.

8. táblázat: A morfin észtereinek illetve a kodeinnek a protonálódási állandói

Protonálódási állandók 37 °C-on (310 K)							
	3-acetil morfin	6-acetil morfin	3,6-diacetil morfin	Morfin	6-acetil-N-metilmorfin	6-acetil-kodein	Kodein
$\log K_1$	7,90±0,03	9,46±0,02	7,83±0,01	9,37±0,02	8,79±0,03	7,86±0,02	8,11±0,01
$\log K_2$	-	7,95±0,02	-	7,84±0,02	-	-	-
$\log k^N$	-	8,61±0,03	-	9,03±0,01	-	-	-
$\log k^O$	-	9,38±0,04	-	9,10±0,03	-	-	-
$\log k^N_O$	-	8,02±0,03	-	8,11±0,01	-	-	-
$\log k^O_N$	-	8,79±0,03	-	8,18±0,02	-	-	-



24. ábra: A 6AM NMR-pH titrálási görbéje (világos késsel a H1, bordóval a H2, szürkével a H6, sárgával a H8 és sötét késsel a H5-ös protonok kémiai eltolódásai, a váz számozását lásd az 1. ábrán)

4.2.1 Hidrolízis sebességi állandók

Egy észtercsoportot tartalmazó morfinán vázas vegyületek látszólagos hidrolízis sebességi állandóit (k') a 9. táblázat tartalmazza, amiket a (31) egyenlet alapján számoltunk ki.

9. táblázat: A vizsgált morfin észterek látszólagos hidrolízis sebességi állandói (k')

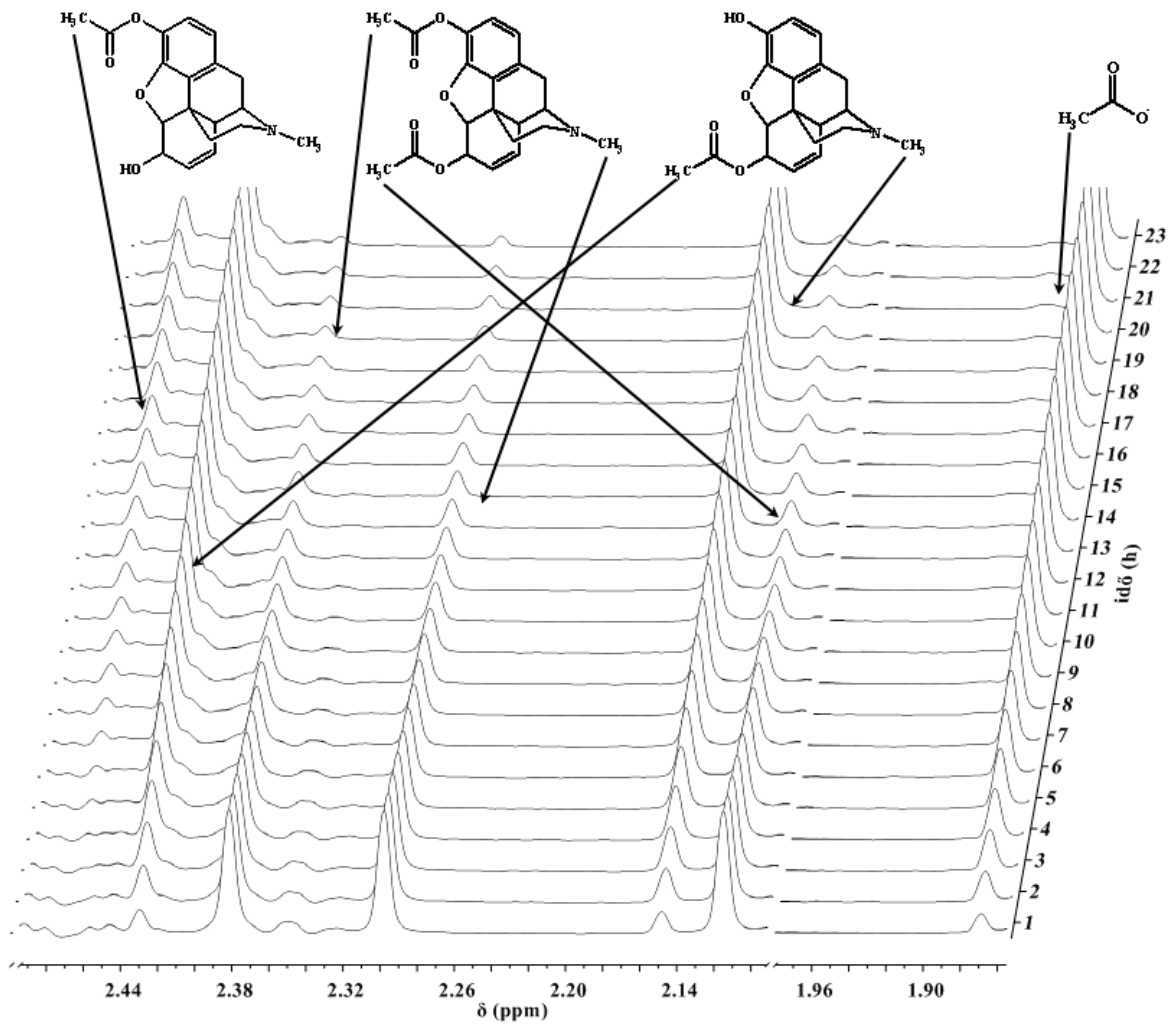
3-acetil morfin		6-acetil morfin		6-acetil kodein		6-acetil-N-metil morfin	
pH	k' (10^{-6} sec^{-1})	pH	k' (10^{-6} sec^{-1})	pH	k' (10^{-6} sec^{-1})	pH	k' (10^{-6} sec^{-1})
6,84	2,46±0,03	7,88	0,71±0,02	8,09	1,60±0,04	8,38	4,46±0,04
7,05	4,68±0,03	8,25	1,54±0,06	8,29	2,50±0,05	8,54	7,48±0,02
8,20	22,0±0,3	8,50	2,50±0,05	8,50	3,55±0,03	9,10	21,0±0,1
8,41	40,0±0,7	8,85	6,23±0,05	9,11	9,87±0,07	9,39	50,3±0,2
8,68	70,1±0,3	9,14	8,98±0,02	9,63	29,1±0,4	9,69	77,5±0,2
9,09	152±2	9,33	11,3±0,1	9,89	51,0±0,5	10,28	201±1
9,48	262±5	9,65	21,7±0,2			11,09	1240±15
9,70	428±15	10,15	79,7±0,1				
10,18	1200±35	10,49	183±2				
		11,30	1230±16				

A 3,6-diacetilmorfin két helyen hidrolizálhat: a 3-as illetve a 6-os helyzetben is. A 6-os helyzetben történő hidrolízis 3-acetilmorfinhoz, a 3-as helyzetben történő hidrolízis pedig 6-acetilmorfinhoz vezet. A heroin látszólagos sebességi állandó értékeit a 10. táblázat tartalmazza (Az alsó indexben, zárójelben lévő 3-as szám a 6-os helyzetben lévő acetyl csoport hidrolízisére, tehát a 3-acetilmorfin keletkezésére utal; a 6-os szám, pedig a 3-as pozícióban lévő észtercsoport hidrolízisét jelöli, tehát a 6-acetilmorfin keletkezését).

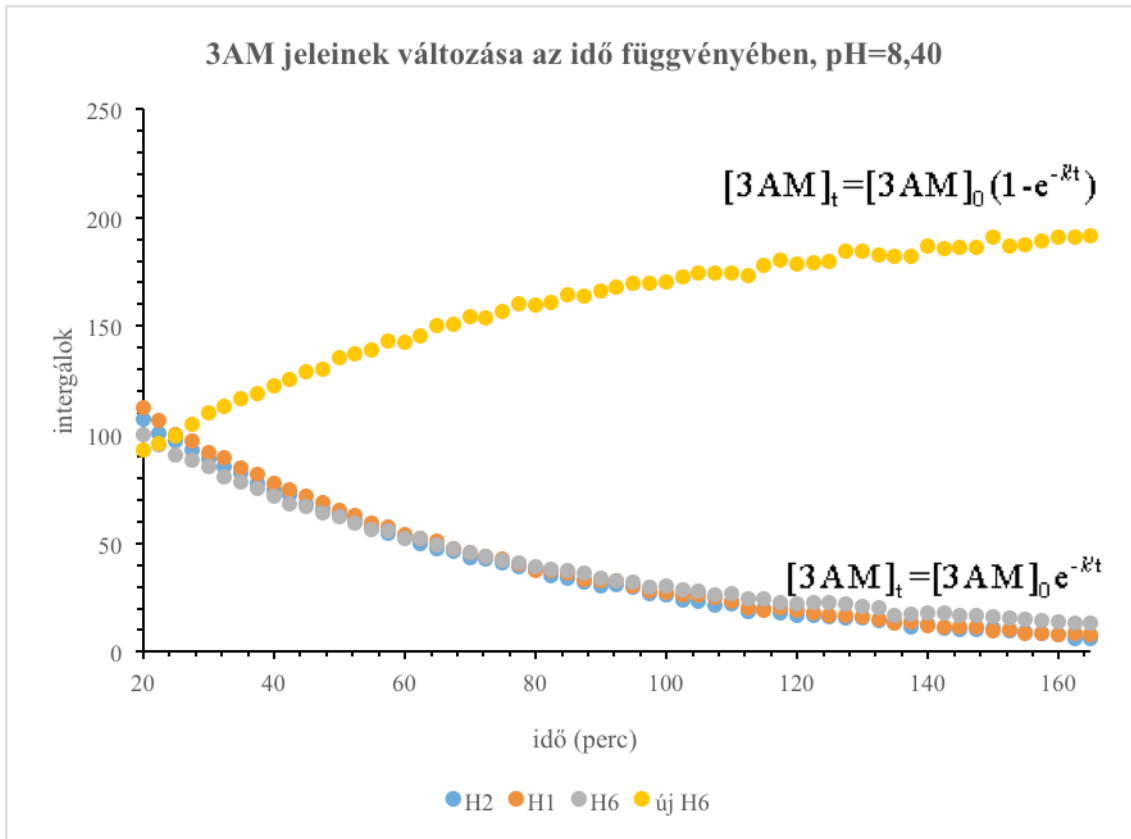
10. táblázat: A heroin látszólagos sebességi állandói

pH	$k'_{\text{DAM}(6)}$ (10^{-6} sec^{-1})	$k'_{\text{DAM}(3)}$ (10^{-6} sec^{-1})
7,22	9,30±0,04	0,81±0,09
8,40	32,1±0,7	2,43±0,89
8,60	61,5±0,5	4,52±0,1
8,75	65,0±0,6	5,2±0,7
9,21	181±1	12,5±0,1
9,44	240±8	18,5±0,1
9,74	469±13	35±2
10,19	1118±32	86±4

A 25. ábra a heroin ^1H NMR spektrumának egy részletét mutatja az idő függvényében, pufferelt közegben (pH=8,40). A spektrumon látszik, hogy a 3-as, a 6-os illetve az N-metil csoportok protonjainak jelei csökkennek (nemlineárisan), miközben a 3-acetilmorfin, a 6-acetilmorfin illetve az acetát jelei növekednek (nemlineárisan). A 26. ábrán a 3AM 1-es, 2-es és 6-os helyzetű protonjainak az integráljai vannak feltüntetve az idő függvényében. Látható, hogy az integrálok exponenciálisan csökkennek, míg a keletkező morfin 6-os helyzetű protonjának az integráljai exponenciálisan növekednek.

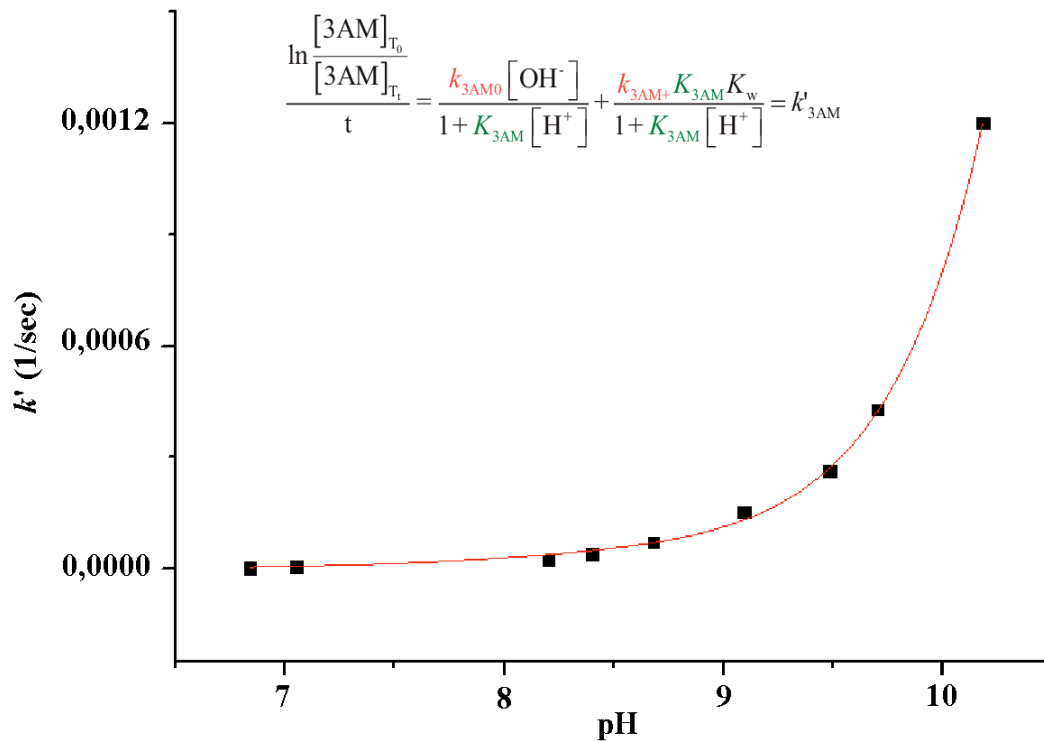


25. ábra: A heroin ^1H NMR spektrumának egy részlete pufferelt közegben (pH=8,40). A heroin metoxi ill. *N*-metil protonjainak jelei csökkennek, a 6AM, a 3AM illetve az acetát jelei pedig növekednek



26. ábra: A 3AM jeleinek csökkenése az idő függvényében a H1, H2 és H6 protonok integráljait ábrázolva és a görbékre illeszthető függvények egyenletei

A kapott látszólagos sebességi állandó értékekből nemlineáris paraméterillesztéssel számítottuk ki a részecske- és oldallánc-specifikus hidrolízis sebességi állandó értékeket az 5.1 fejezetben leírt egyenletek alapján. A 27. ábra a 3AM k' értékeinek az ábrázolása a pH függvényében. A többi észter esetén is hasonló a görbe lefutása.



27. ábra: A 3AM látszólagos sebességi állandóinak ábrázolása a pH függvényében (az értékeket a 11. táblázat tartalmazza)

A kiszámolt pH független részecske- és oldallánc-specifikus hidrolízis sebességi állandó értékeit a 11. táblázat tartalmazza. Alsó indexben a vegyület nevének rövidítése után a protonáltsági állapota következik, végül pedig - ha a vegyület több észtercsoportot tartalmaz -, hogy a molekula melyik észtercsoportja hasadt le; például $k_{DAM0(6)}$ a heroin semleges formájának a sebességi állandója, a 3-as helyzetben történő hidrolízis esetén, tehát a 6-acetilmorfin keletkezésére utal.

11. táblázat: A vizsgált morfinán vázas észterek pH független részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandói

A vegyület neve	pH független részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandó ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$)			
	Jelölése	Értéke	Jelölése	Értéke
3,6-diacetilmorfin	$k_{\text{DAM}0(6)}$	$2,30 \pm 0,08$	$k_{\text{DAM}0(3)}$	$0,13 \pm 0,002$
	$k_{\text{DAM}+(6)}$	$12,81 \pm 0,84$	$k_{\text{DAM}+(3)}$	$1,17 \pm 0,16$
3-acetilmorfin	$k_{3\text{AM}0}$	$1,89 \pm 0,03$	$k_{3\text{AM}+}$	$15,4 \pm 2,6$
6-acetilmorfin	$k_{6\text{AM}-}$	$0,13 \pm 0,002$	$k_{6\text{AM}+/-}$	$0,22 \pm 0,06$
	$k_{6\text{AM}0}$	$0,14 \pm 0,05$	$k_{6\text{AM}+}$	$1,04 \pm 0,21$
6-acetilkodein	$k_{6\text{AK}0}$	$0,14 \pm 0,002$	$k_{6\text{AK}+}$	$0,89 \pm 0,16$
6-acetil- <i>N</i> -metilmorfin	$k_{6\text{ANMM}+/-}$	$0,24 \pm 0,002$	$k_{6\text{ANMM}+}$	$1,14 \pm 0,15$

4.3 Ekgonin vázas vegyületek

4.3.1 Protonálódási állandók

A vizsgált vegyületek protonálódási állandó értékeit a 13. táblázat tartalmazza. A benzoilekgonin mikroállandóinak kiszámításához felhasználtuk a benzoilekgonin-metilamid (BEM) makroállandóját, az ekgonin mikroállandóihoz pedig az ekgonin-metilészter (EME) makroállandóját. Az irodalomban a benzoilekgonin protonálódási állandóira ellentmondásos értékeket kaptunk (12. táblázat), ezért az ekgonin észterek egyensúlyi állandó értékeit potenciometriás titrálásokkal is meghatároztuk.

12. táblázat: A benzoilekgonin irodalomban fellelhető $\log K$ értékei

Benzoilekgonin $\log K$ értékei		
$\log K_1$	$\log K_2$	hivatkozás
8,50	nincs adat	[142]
11,20	2,20	[143]
8,88	2,58	[144] ¹
11,80	nincs adat	[145]
8,6	4	[146]

¹ számított érték

13. táblázat: A különböző ekgonin származékok protonálódási állandó értékei

Protonálódási állandók 37 °C-on (310 K)										
	Ekgonin metilészter		Benzoilekgonin		Kokain		Ekgonin		Benzoilekgonin metilamid	
	Titrálás típusa									
	NMR-pH	Pot. metr.	NMR-pH	Pot. metr.	NMR-pH	Pot. metr.	NMR-pH	Pot. metr.	NMR-pH	Pot. metr.
$\log K_1$	9,04±0,05	8,95±0,01	10,80±0,01	10,69±0,02	8,56±0,01	8,56±0,01	10,72±0,02	10,68±0,01	8,60±0,03	8,61±0,04
$\log K_2$	-	-	2,21±0,01	2,30±0,02	-	-	2,67±0,04	2,68±0,05	-	-
$\log k^N$	-	-	10,80±0,02	10,69±0,03	-	-	10,72±0,03	10,68±0,02	-	-
$\log k^O$	-	-	4,41±0,03	4,38±0,04	-	-	4,83±0,02	4,80±0,02	-	-
$\log k^N_O$	-	-	8,60±0,02	8,61±0,03	-	-	8,56±0,01	8,56±0,01	-	-
$\log k^O_N$	-	-	2,21±0,04	2,30±0,02	-	-	2,67±0,02	2,68±0,04	-	-

4.3.2 Hidrolízis sebességi állandók

Egy észtercsoportot tartalmazó ekgonin vázas észterek látszólagos hidrolízis sebességi állandóit a 14. táblázat tartalmazza, amiket a (31) egyenlet alapján számoltunk ki.

14. táblázat: Az ekgonin észterek látszólagos sebességi állandó értékei

Ekgonin-metilészter		Benzoilekgonin		Benzoilekgonin-metilamid	
pH	k' (10^{-6} sec^{-1})	pH	k' (10^{-6} sec^{-1})	pH	k' (10^{-6} sec^{-1})
7,05	5,39±0,07	5,25	8,5E-4±2E-5	7,35	5,37E-4±0,03
8,33	75,7±0,35	8,58	1,18±0,01	8,25	5,07±0,02
8,67	129±1	9,25	5,58±0,02	8,39	5,22±0,4
8,82	140±1	9,46	5,61±0,05	9,26	16,5±0,4
9,06	186±	9,92	16,4±0,5	9,75	28±0,1
9,50	314±2	10,2	22,9±0,1	10,29	77±0,2
9,70	366±1	10,7	109±1		
		11,16	359±4		
		11,55	654±7		
		11,76	1100±10		

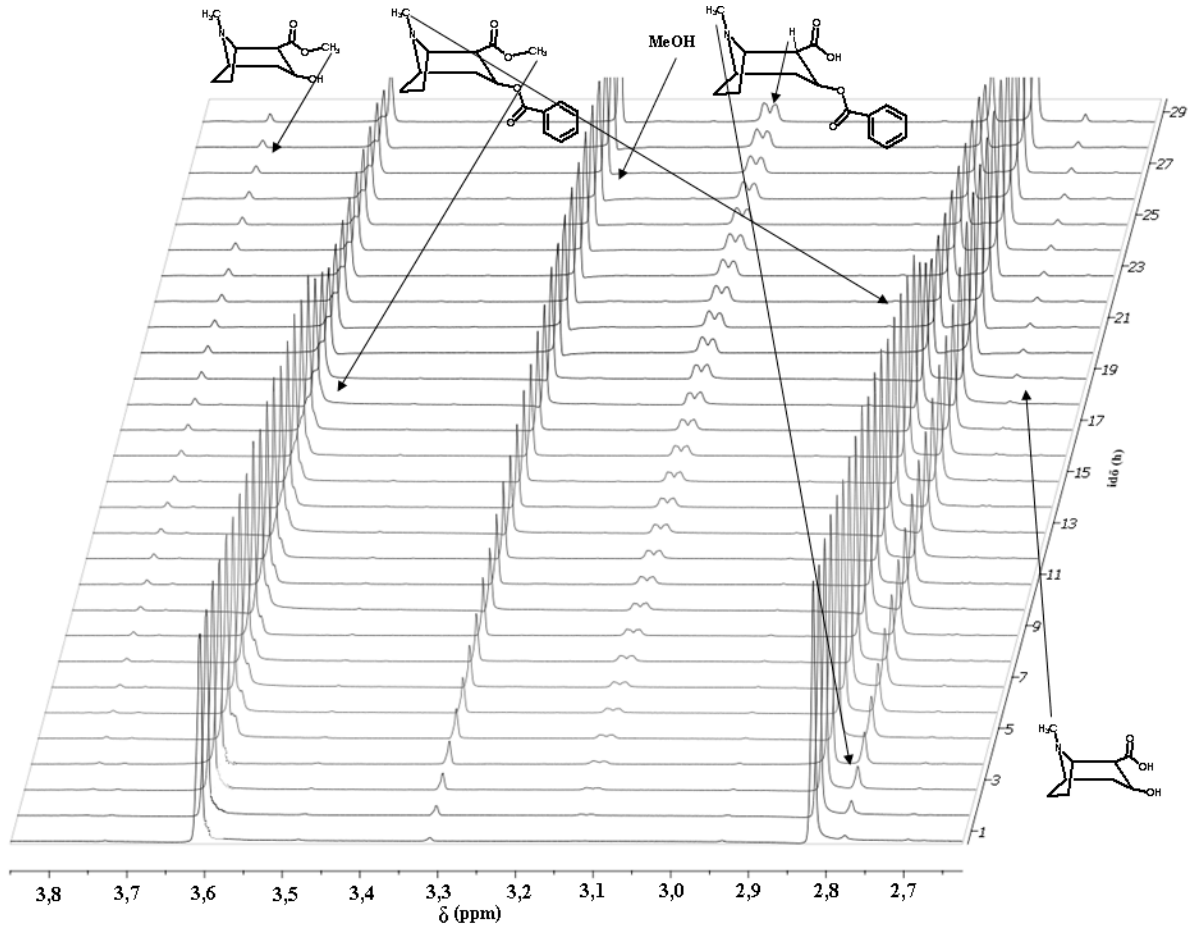
A kokain két helyen hidrolizálhat: a 2-es illetve a 3-as helyzetben. A 2-es helyzetben történő hidrolízis benzoilekgoninhoz, a 3-as helyzetben történő hidrolízis pedig ekgonin metilészterhez vezet.

A kokain látszólagos sebességi állandó értékeit a 15. táblázat tartalmazza. A jelölések: alsó indexben a vegyület nevének rövidítése után zárójelben az a molekularész található, ahol a hidrolízis végbement; $k'_{\text{KOK}(2)}$ tehát a kokain 2-es helyzetben történő hidrolízisére, azaz a benzoilekgonin keletkezésére utal.

15. táblázat: A kokain látszólagos sebességi állandói

pH	$k'_{\text{KOK}(2)}$ (10^{-6} sec^{-1})	$k'_{\text{KOK}(3)}$ (10^{-6} sec^{-1})
6,31	1,03±0,01	0,089±0,005
7,30	10,8±0,27	0,87±0,09
8,32	46,5±1,49	4,3±0,08
8,62	75,5±0,81	6,7±0,07
9,22	164±2,02	14,3±1,01
9,62	248±1,68	25±3,02

A látszólagos sebességi állandók ismeretében a pH-független részecske- és oldallánc-specifikus hidrolízis sebességi állandók az 5.1 fejezetben leírt egyenletek alapján kiszámíthatóak. Értékeiket a 16. táblázat tartalmazza. Alsó indexben a vegyület nevének rövidítése után a protonáltsági állapota következik, végül pedig - ha a vegyület több észtercsoportot tartalmaz-, hogy a molekula melyik észtercsoportja hasadt le; például $k_{\text{KOK}+(3)}$ a kokain protonált formájának a sebességi állandója, a 3-as helyzetben történő hidrolízis esetén, tehát az ekgonin-metilészter keletkezésére utal). A 28. ábra a kokain hidrolízisét mutatja pufferelt közegben, pH=7,30-nál. Az ábrán látható, hogy a kokain protonjainak jelei csökkennek, a benzoilekgonin és az ekgonin-metilészter protonjainak jelei pedig növekednek.



28. ábra: A kokain hidrolízise pufferelt közegben (pH=7,30). A kokain metilészter, N-metil és C2-es szenén lévő protonok jelei csökkennek; a benzoilekgonin és ekgonin-metilészter protonjainak jelei pedig növekednek.

16. táblázat: Az ekgonin észterek pH-független részecske-specifikus sebességi állandó értékei

A vegyület neve	pH független részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandó ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$)			
	Jelölése	Értéke	Jelölése	Értéke
KOK	$k_{\text{KOK0}(2)}$	0,81±0,06	$k_{\text{KOK0}(3)}$	0,077±0,008
	$k_{\text{KOK}+(2)}$	9,25±0,08	$k_{\text{KOK}+(3)}$	0,77±0,03
EME	k_{EME0}	0,30±0,09	$k_{\text{EME}+}$	8,57±0,38
BE	$k_{\text{BE-}}$	0,028 ± 0,01	$k_{\text{BE+/-}}$	0,083 ± 0,06
	k_{BE0}	0,057 ± 0,01	$k_{\text{BE+}}$	0,54 ± 0,11
BEM	k_{BEM0}	0,075±0,004	$k_{\text{BEM}+}$	0,71±0,05

4.4 Metilfenidát

4.4.1 Protonálódási állandók

A metilfenidát protonálódási állandó értékeit a 17. táblázat tartalmazza.

17. táblázat: A metilfenidát és a ritalinsav protonálódási mikro- és makroállandói

Protonálódási állandók 37 °C-on (310 K)		
	Metilfenidát	Ritalinsav
$\log K_1$	8,70±0,01	9,38±0,07
$\log K_2$	-	2,75±0,08
$\log k^N$	-	9,37±0,05
$\log k^O$	-	3,43±0,06
$\log k_O^N$	-	8,70±0,01
$\log k_N^O$	-	7,90±0,04

4.4.2 Hidrolízis sebességi állandók

A metilfenidát látszólagos hidrolízis sebességi állandóit a 18. táblázat tartalmazza.

18. táblázat: A metilfenidát k' értékei

pH	k'_{MEF0} (10^{-6} sec^{-1})
7,79	22,6±0,1
8,38	108±0,27
8,58	145±1,49
8,68	154±0,81
9,10	224±2,02
9,63	310±1,68

A látszólagos sebességi állandókból a pH-független részecske-specifikus sebességi állandók kiszámíthatóak az 5.1.3 fejezetben leírt egyenletek segítségével. A kapott értékeket a 19. táblázat tartalmazza, ahol k'_{MEF0} a metilfenidát semleges

formájának a részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandója, a k_{MEF^+} pedig a protonált forma sebességi állandója.

19. táblázat: A metilfenidát pH-független részecske-specifikus sebességi állandó értékei

A vegyület neve	pH független részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandó ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$)	
	Jelölése	Értéke
Metilfenidát	k_{MEF^0}	0,19±0,09
	k_{MEF^+}	15,54±0,52

5. Megbeszélés

5.1 Morfinán vázas észterek

5.1.1 Protonálódási állandók

A protonálódási makro- és mikroállandók meghatározása nem csak nélkülözhetetlen feltétele a pontos hidrolízis sebességi állandók meghatározásának, azok a protonálható csoport(ok) elektronsűrűségéről is felvilágosítást adnak.

A 8. táblázat a morfinán vázas észterek protonálódási makro- és mikroállandóit tartalmazza. Látható, hogy a tercier aminocsoport pH 8 körül protonálódik. A fenolát bázicitása 0,77 illetve 0,07 logK egységgel nagyobb a tercier aminocsoport bázicitásánál a 6AM és a morfin esetében. Mind a 3-as, mind pedig a 6-os helyzetben történő acetilálódás csökkenti a tercier aminocsoport bázicitását. Amennyiben a mikroállandókat hasonlítjuk össze (például a k^N és k_0^N ugyanazon a molekulán) láthatjuk, hogy az egyik csoport protonálódása 0,59 log egységgel csökkenti le a másik csoport bázicitását a 6AM, 0,92 log egységgel pedig a morfin esetében.

5.1.2 Hidrolízis sebességi állandók

A 6AM fenolát formái ($[6AM^-]$ és $[6AM^{+/-}]$) a heroin 3-as helyzetben történő hidrolízisének bomlástermékei, a morfin anionos és ikerionos formái pedig a 3AM hidrolízis termékei. Minél kisebb az elektronsűrűség a fenoláton, annál gyorsabb a hidrolízis sebessége.

A 11. táblázat a vizsgált vegyületek részecske- és oldallánc- specifikus hidrolízis sebességi állandóit tartalmazza, amiből számos következtetést lehet levonni. A molekula szerkezetétől és protonáltsági állapotától függően a hidrolízis 11-18-szor gyorsabb a 3-as helyzetben, mint a 6-os helyzetben, ha az alábbi sebességi állandókat hasonlítjuk össze: $k_{DAM0(6)}$ és $k_{DAM0(3)}$ (18-szoros sebesség növekedés), $k_{DAM+(6)}$ és $k_{DAM+(3)}$ (11-szeres sebesség növekedés), k_{3AM0} és k_{6AM0} (14-szeres sebesség növekedés), és k_{6AM+} (15-szörös sebesség növekedés). Ez a jelenség az aromás gyűrű elektronvonzó

tulajdonságának köszönhető, ami miatt a 3-as helyzetben lévő észtercsoport érzékenyebbé válik nukleofil támadásokra.

A nitrogén protonálódása az elektronsűrűséget csökkenti a molekula egészén, így a hidrolízis sebességét növeli. Összehasonlítva a $k_{\text{DAM}+(6)}$ és a $k_{\text{DAM}0(6)}$ illetve a $k_{\text{3AM}+}$ és a $k_{\text{3AM}0}$ sebességi állandókat, az előbbiek esetén 6-szoros sebesség növekedés figyelhető meg, míg a 3AM esetében 8-szoros sebesség növekedés mérhető. Kötések számát tekintve a 6-os helyzetű észtercsoport közelebb van a protonálható nitrogén atomhoz, azonban az aromás gyűrű negatív induktív effektusa az elektroneloszlást sokkal jobban befolyásolja, mint az alkil lánc, ezért a 3-as helyzetben lévő észtercsoport hidrolízise gyorsabban megy végbe.

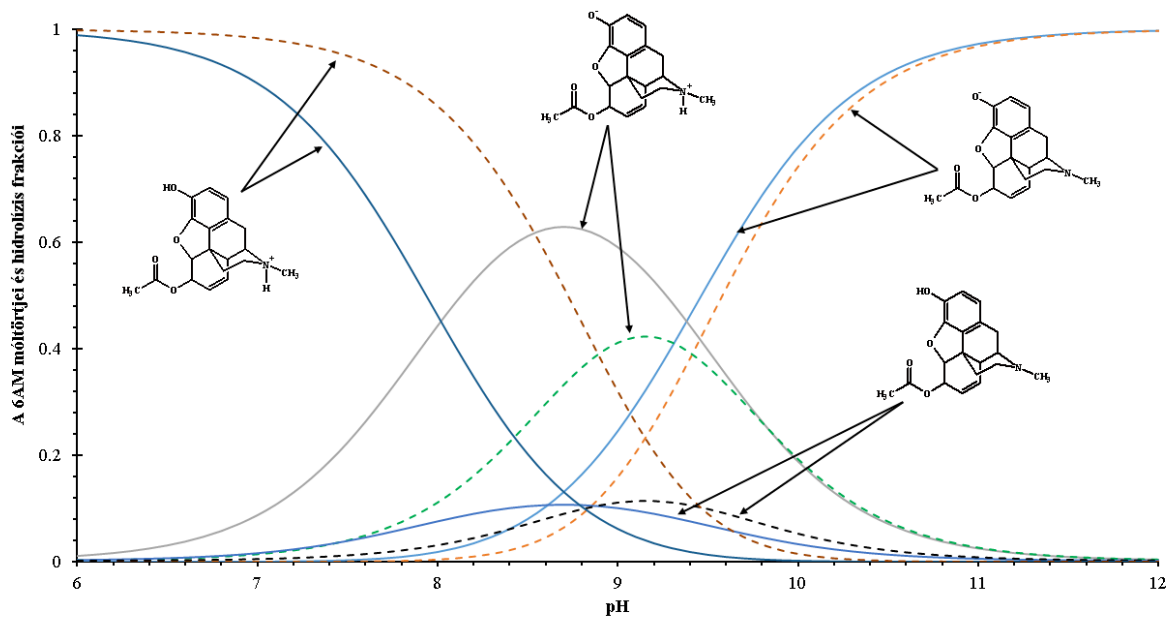
A fenolát protonálódásának hatása a 6-os helyzetű észtercsoport hidrolízisére megfigyelhető, ha összehasonlítjuk a 6AM anionos (k_{6AM^-}) és töltésmentes ($k_{\text{6AM}0}$) formáinak, illetve a kationos (k_{6AM^+}) és ikerionos ($k_{\text{6AM}+/-}$) formáinak hidrolízis sebességi állandóit. Előbbi esetben - ha csak a fenolát protonálódik - a hidrolízis sebessége mindössze egy századdal nagyobb a töltésmentes formánál, mint az anionos formánál. Ha a fenolát és a nitrogén is protonálva van, akkor nyolcszoros sebességnövekedés figyelhető meg az anionos formához képest, az ikerionos részecskéhez viszonyítva azonban, mindössze nyolc tizeddel nő a sebesség. Amennyiben a hidroxilcsoportot acetoxi csoportra cseréljük ki, a hidrolízis sebessége valamelyest lecsökken. Ezt tapasztalható, ha a heroin protonált formájának a részecske-specifikus sebességi állandóját, a 3-as helyzetben történő hidrolízis esetén ($k_{\text{DAM}+(6)} = 13 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) hasonlítjuk össze a 3AM protonált formájának a részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandójával ($k_{\text{3AM}+} = 15 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$).

A legnagyobb különbség a 3AM protonált formájának ($k_{\text{3AM}+}$) és a 6AM anionos formájának (k_{6AM^-}) részecske-specifikus sebességi állandói között van. A 3AM protonált formája 120-szor gyorsabban hidrolizál, mint a 6AM anionos formája.

A 6-acetilmorfin hidrolízis frakcióinak meghatározása

A 6-acetilmorfin oldatban négy mikrorészecske formájában fordul elő és mind a négy részecske hidrolizál. A különböző protonáltsági állapotú részecskék különböző

mértékben járulnak hozzá az észterhidrolízis sebességéhez, ezt egyrészt adott körülmények között a koncentrációjuk, másrészt egyedi sebességi mikroállandójuk befolyásolja. Ennek a jelenségnek a leírására egy új fizikai-kémiai paramétert vezettem be: a hidrolízis frakciókat, amik az adott protonáltsági állapotban lévő molekulák móltörtjeiből és a részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandókból állnak. A 28. ábra a 6AM négy mikrorészecskéjének móltörtjét, és a különböző protonáltsági állapotú részecskék mikroszkopikus észterhidrolízis hányadát mutatja a pH függvényében. Az ábrázolás alapjául a (48) - (50) egyenletek szolgálnak. Továbbá a 28. ábrán látszik az is, hogy a négy mikrorészecske hozzájárulása a hidrolízishez $\text{pH}=9,2\pm 0,1$ -nél a leginkább összemérhető. A mindkét csoportján protonált 6-acetilmorfin részecske hidrolízisben betöltött relatív szerepe bármely pH-n nagyobb, mint a móltörtje, a dupla elektronvonzó hatások miatt (a protonált fenolát- és aminocsoport), míg az anionos forma esetén ellentétes folyamat figyelhető meg.



28. ábra: A 6AM móltörtjei (folytonos vonal) és hidrolízis frakciói (szaggatott vonal)

5.2 Ekgonin vázas észterek

5.2.1 Protonálódási állandók

A 13. táblázat az ekgonin vázas vegyületek protonálódási állandó értékeit tartalmazza.

A benzoilekgonin (illetve az ekgonin) esetében látható, hogy a $\log K_1$ jóval magasabb, mint például a kokain $\log K$ értéke, a $\log K_2$ pedig alacsony összehasonlítva más karbonsavak $\log K$ értékeivel (pl. diklofenák: 3,99, ibuprofén: 3,98) [147]. Ennek oka abban keresendő, hogy a tercier amino- és a karboxilcsoport térben nagyon közel helyezkednek el egymáshoz és egy intramolekuláris hidrogén-híd jön létre a két funkciós csoport között. Ezt támasztja alá, hogy amennyiben a karboxilcsoport észteresítve van (pl. a kokain vagy ekgonin metilészter esetében) a $\log K$ minimum 1,5 egységgel csökken. A kettes és hármas helyzetben lévő dupla elektronvonzó hatások kumulatív eredményeként 0,48 $\log K$ egység csökkenés figyelhető meg összehasonlítva az ekgonin-metil-észter és a kokain protonálódási állandóit, illetve 0,44 $\log K$ egység csökkenés az ekgonin-metil-észter és a benzoilekgonin-metilamid esetében. A mikroállandókat összehasonlítva (például a k^N és k_0^N ugyanazon a molekulán) láthatjuk, hogy az egyik csoport protonálódása 2,20 log egységgel csökkenti le a másik csoport bázicitását a benzoilekgonin, 2,16 log egységgel pedig az ekgonin esetében.

5.2.2 Hidrolízis sebességi állandók

A BE karboxilát formái ($[BE^-]$ és $[BE^{+/-}]$ mikrorészecskék) a kokain 2-es helyzetben történő hidrolízisének termékei, míg az ekgonin anionos és ikerionos formái az ekgonin-metilészter hidrolízisének bomlástermékei. Minél kisebb az elektronsűrűség a karboxiláton, annál kisebb a bázicitása, a hidrolízis sebessége pedig gyorsabb.

A vizsgált ekgonin észterek részecske- és oldallánc-specifikus hidrolízis sebességi állandóit a 16. táblázat foglalja össze. A 2-es helyzetben történő hidrolízis sebessége 10-14-szer gyorsabb, mint a 3-as helyzetben, amit az alábbi részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandók összehasonlításával kapunk meg: $k_{KOK0(2)}$ és $k_{KOK0(3)}$, 10-szeres sebesség növekedés; $k_{KOK+(2)}$ és $k_{KOK+(3)}$ 11-szeres sebesség

növekedés; k_{EME0} és k_{BE0} 5-szörös sebesség növekedés; $k_{\text{EME+}}$ és $k_{\text{BE+}}$ 14-szeres sebesség növekedés. Ez a jelenség a hármas helyzetben lévő benzoilcsoport elektronvonzó tulajdonságainak köszönhető, így a kettes helyzetben lévő metilészter nukleofil támadásokkal szemben érzékenyebbé válik. A metilészter hidrolízisre való „érzékenysége” tovább növelhető amennyiben a nitrogén protonálva van, mert így tovább csökken az elektronsűrűség illetve a kötése erősség is. A tercier nitrogén mind sztérikusan, mind kötéstávolság szempontjából is közelebb van a metilészterhez, mint a 3-as helyzetben lévő benzoilcsoport. Ennek következményeként a protonált forma 11-szer illetve 28-szor gyorsabban hidrolizál, mint a semleges részecske összehasonlítva az alábbi sebességi állandókat: $k_{\text{KOK+(2)}}$ és $k_{\text{KOK0(2)}}$ ill. $k_{\text{EME+}}$ és k_{EME0} .

A karboxilát protonálódása a hidrolízis sebességére akkor állapítható meg, ha az alábbi részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandókat hasonlítjuk össze: $k_{\text{BE-}}$ és k_{BE0} illetve $k_{\text{BE+}}$ és $k_{\text{BE+/-}}$. Amennyiben csak a karboxilát protonálódik a hidrolízis sebessége kétszeresére nő ($k_{\text{BE-}}$ és k_{BE0}), azonban ha mind a karboxilát, mind pedig a tercier aminocsoport protonálva van hétszeres sebességnövekedés következik be ($k_{\text{BE+}}$ és $k_{\text{BE+/-}}$).

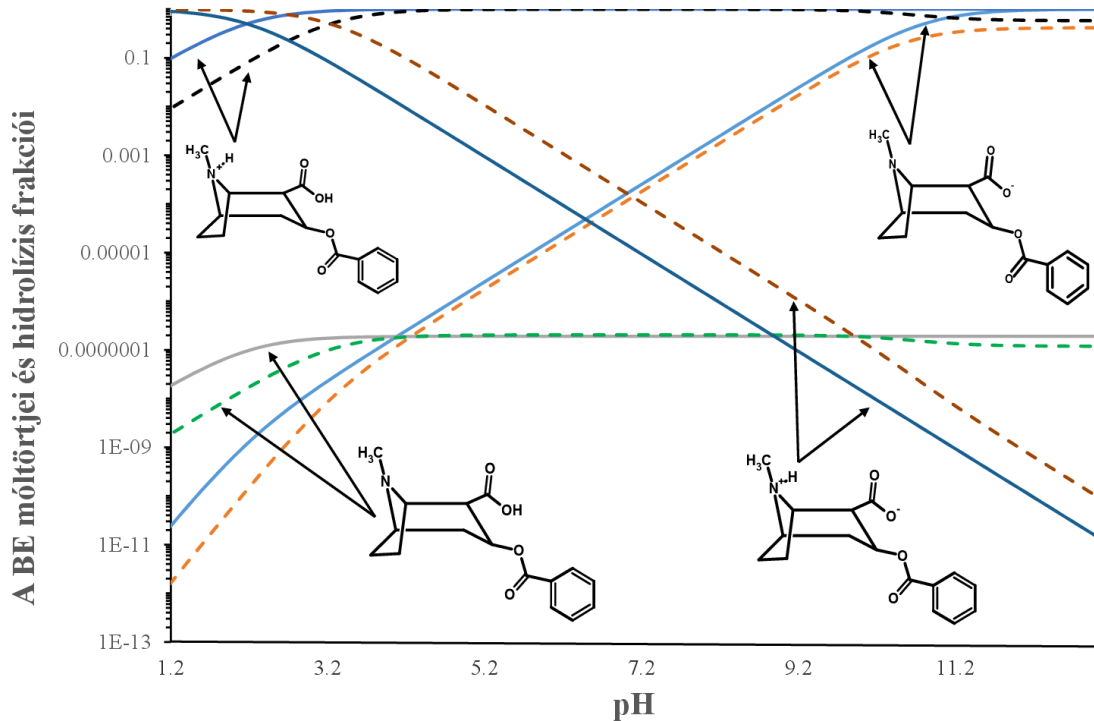
A hármas helyzetben tehát lassúbb a hidrolízis sebessége, aminek két fő oka van: az egyik az aromás gyűrű +K effektusa, a másik pedig a gyűrű méretéből adódó sztérikus gátlás, mert a hidroxid-ionok nehezebben tudnak nukleofil támadást indítani az észtercsoport irányába.

A legnagyobb különbség a kokain protonált formájának kettes helyzetben történő hidrolízisének sebessége és a benzoilekgonin anionos formájának hidrolízis sebessége között van. Az előbbi ugyanis 330-szor gyorsabban hidrolizál.

A benzoilekgonin hidrolízis frakcióinak meghatározása

A 6-acetilmorfinhoz hasonlóan oldatban a benzoilekgonin is négy protonáltsági állapotban fordulhat elő. A különböző protonáltsági állapotban lévő molekulák hidrolízishez való hozzájárulását a 29. ábra tartalmazza. Az ábrázolás alapjául a (48) – (50) egyenletek szolgálnak. Az anionos és az ikerionos részecske hidrolízishez való

hozzájárulása $\text{pH}=7,2\pm 0,1$ -nél a leginkább összemérhető, de még így is kisebb, mint a kationos forma hozzájárulása a hidrolízishez.



29. ábra: A benzoilekgonin móltörtjei (folytonos vonal) és hidrolízis frakciói (szaggatott vonal)

5.3 Metilfenidát

5.3.1 Protonálódási állandók

A metilfenidát és fő metabolitja - a ritalinsav - protonálódási állandó értékeit a 17. táblázat tartalmazza. A karbonsav észteresítése $0,68 \log K$ egységgel csökkenti le a nitrogén atom bázicitását. Ha a mikroállandókat hasonlítjuk össze (például k^N és k_0^N) láthatjuk, hogy az egyik csoport protonálódása $0,67 \log K$ egységgel csökkenti a nitrogén bázicitását.

5.3.2 Hidrolízis sebességi állandók

A metilfenidát részecske-specifikus sebességi állandói a 19. táblázatban találhatóak. Protonálódás hatására csökken az elektronsűrűség és a kötéseerősség, így az észtercsoport érzékenyebbé válik nukleofil támadásokkal szemben, ezért a protonált

forma több mint 80-szor gyorsabban hidrolizál, mint a szemleges részecske.

6. Következtetések

Doktori munkám során három észter típusú farmakon hidrolízis kinetikáját térképeztem fel, amelyek a következők: metilfenidát, kokain és heroin. Kettő közülük (a heroin és a kokain) két észter- és egy protonálható csoportot tartalmaznak, ezért bomlásuk során mind szimultán, mind konszekutív folyamatokat is figyelembe kell venni.

Kutató munkám eredményeképpen szubmolekuláris szinten magyarázhatóvá vált számos eddig csak empirikusan ismert tény a kokain, a heroin illetve a metilfenidát biokémiai szerepével kapcsolatban. Legfontosabb tudományos eredményeim és az ezekből levonható következtetések az alábbiakban foglalhatóak össze:

Meghatároztam a kokain, a heroin, a metilfenidát és származékaik makroszkopikus protonálódási állandóit ^1H NMR-pH titrálással. Deduktív módszer segítségével meghatároztam az alábbi molekulák mikroszkopikus protonálódási állandó értékeit szintén ^1H NMR-pH titrálással: 6-acetilmorfin, morfin, benzoilekgonin, ekgonin és ritalinsav. Az ekgonin vázas észterek protonálódási állandóit direkt potenciometriás módszerrel is meghatároztuk, mivel az irodalomban főleg a benzoilekgoninra vonatkozóan ellentmondásos adatokat találtam. Minden mérést $37\text{ }^\circ\text{C}$ -n és $I=0,15\text{ M}$ ionerősség mellett végeztem.

A morfinán vázas vegyületek esetében megállapítottam, hogy egy acetylcsoport bevitele - akár 3-as akár 6-os helyzetbe - minden esetben csökkenti az aminocsoport bázicitását.

Az ekgonin vázas vegyületek esetén a benzoilekgonin protonálódási állandói hasonlítanak az α -aminosavak protonálódási állandó értékeihez [148]. A jelenség magyarázata az, hogy a terciér amino- és a karboxilcsoport térben nagyon közel helyezkedik el egymáshoz és egy intramolekuláris hidrogén-híd jöhet létre a két funkciós csoport között.

Megállapítottam továbbá, hogy mind a kettes, mind pedig a hármas helyzetben történő észteresítés a vegyület bázicitását csökkenti.

Meghatároztam egy pszichoaktív szer, a metilfenidát illetve két kemény drog, a kokain és a heroin részecske- és oldallánc-specifikus hidrolízis sebességi állandóit.

A heroin és a kokain is egy protonálható és két észtercsoportot tartalmaznak. Hidrolízisük során keletkező közttermékek szintén rendelkeznek egy észtercsoporttal. Először a közttermékek részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandóit határoztam meg: a 3-acetilmorfinét és a 6-acetilmorfinét illetve a benzoilekgoninét és az ekgonin-metilészterét. Ezután sor került a heroin és a kokain részecske- és oldallánc-specifikus hidrolízis sebességi állandóinak a meghatározására is.

A heroin és származékai esetében megvizsgáltam a molekula protonáltsági állapotának és acetilcsoportok számának szerepét a hidrolízis sebességére. Az ekgonin észtereknél megvizsgáltam a protonáltsági állapotok, a szterikus effektusok és az oldalláncok szerepét a hidrolízis sebességére.

A metilfenidát egy észtercsoportot tartalmaz, azonban jelentős különbség adódott a semleges és a protonált forma hidrolízisének sebessége között.

Összességében elmondható, hogy protonálódás hatására csökken az elektronsűrűség, a hidrolízis sebessége pedig minden esetben gyorsabb lesz.

A sebességet továbbá az oldalláncok is jelentősen befolyásolják, mert egy nagy térkitöltésű csoport (pl. benzoil) hatására a nukleofil támadás „nehezebbé” válik, bimolekuláris reakció révén a tetraédes intermedier kialakulása is lassúbb lesz, ami a hidrolízis sebességének csökkenéséhez vezet.

A vegyületek részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandóinak a meghatározásának elméleti és gyakorlati jelentősége van.

Elméleti szinten most először kíséreltük meg a szimultán és konszekutív folyamatok együttes kezelését több észtercsoportot tartalmazó vegyületek esetén, meghatározva azokat az intramolekuláris tényezőket, amik az észtercsoport környékén lévő elektroneeloszlást befolyásolják, így hatással vannak a hidrolízis sebességére.

A sebességi állandók meghatározásának gyakorlati jelentősége abban rejlik, hogy információt szolgáltat a molekulák hidrogénion kötő képességéről, így jobban

értelmezhetők a farmakokinetikai illetve farmakodinámiás tulajdonságok, főleg az észterázokhoz való kötődés.

7. Összefoglalás

Doktori munkám során három észter típusú kábítószer molekula hidrolízis kinetikáját térképeztem fel részecske-és oldallánc-specifikus vonatkozásban 37 °C-on.

A vegyületek protonálódási makroállandóit ^1H NMR-pH titrálással, míg a mikroállandókat csökkentett protonálható csoporttal rendelkező származékvegyületek felhasználásával, deduktív módszerrel határoztam meg.

Mágneses magrezonancia spektroszkópiával elvégeztem a metilfenidát, a morfinán vázas észterek (3-acetilmorfin és 6-acetilmorfin) illetve az ekgonin vázas észterek (ekgonin-metilészter és benzoilekgonin) hidrolízis kinetikájának vizsgálatát. Ezek után sor került a heroin és a kokain észterhidrolízis kinetikájának a vizsgálatára is.

A heroin esetében megállapítottam, hogy a hidrolízis sebességét a molekula szerkezete, protonáltsági állapota, illetve az észtercsoportok száma nagymértékben befolyásolja. Ezeknek a tényezőknek az együttes következménye, hogy a hármas helyzetben lévő acetyl csoport hidrolízisének sebessége jóval nagyobb, mint a hatos helyzetű acetyl csoport hidrolízisének a sebessége.

A kokainnál a kettes helyzetben lévő metilészter gyorsabban hidrolizál, mint a hármas helyzetben lévő benzoilcsoport. A hidrolízis sebességét nem csak szerkezeti tényezők, hanem szterikus okok is befolyásolhatják.

A 6-acetilmorfinnál és a benzoilekgoninnál bevezettem a hidrolízis frakciók, egy új fizikai kémiai paraméter fogalmát, amik az adott protonáltsági állapotban lévő molekulák móltörtjeiből és a részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandókból állnak.

A metilfenidát esetében a protonált forma nyolcvanszor gyorsabban hidrolizál, mint a semleges részecske.

8. Summary

In my PhD thesis three ester type molecules were investigated in the terms of protonation- and hydrolysis rate constants.

Methylphenidate, the active agent of Ritalin, is a central nervous system (CNS) stimulant that is used in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and narcolepsy. The molecule contains one ester group and it can exist in two protonation states. Its species-specific hydrolysis is described with two hydrolysis rate constants. The protonated form hydrolyses 80 times faster than the non-charged form.

Cocaine and heroin, the two notorious hard drugs both bear two ester groups and one protonation site.

The hydroxide-catalyzed non-enzymatic, simultaneous and consecutive hydrolyses of diacetylmorphine (DAM, heroin) and cocaine are quantified in terms of 10 site- and species-specific rate constants in connection with also 10 site- and species-specific acid-base equilibrium constants, comprising all the 12 coexisting species in solution. The characterization of the species- and site-specific hydrolysis rate constants involves the major and minor decomposition pathways: via 6-acetylmorphine and 3-acetylmorphine, respectively, and morphine, the final product in the case of heroin; benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, respectively and ecgonine in the case of cocaine.

We determined that, the hydrolysis of morphine esters is 18 -120 times faster at site 3 than at site 6, depending on the status of the amino group and the rest of the molecule.

Ecgonine esters have been found to hydrolyze 10 - 250 times faster at site 2 than at site 3, depending on the status of the amino site and the rest of the molecule.

Hydrolysis rate constants are interpreted in terms of intramolecular inductive effects and the concomitant local electron densities. Hydrolysis fraction, a new physico-chemical parameter is introduced and determined to quantify the contribution of the individual microspecies to the overall hydrolysis.

9. Irodalomjegyzék

1. Gyires K, Fürst, Zs. A farmakológia alapjai. Medicina, Budapest, 2011: 460
2. Cockcroft DW. (2008) Methacholine Challenge Methods. Chest, 134 (4):678-680.
3. Cockcroft DW. (2010) Direct Challenge Tests: Airway Hyperresponsiveness in Asthma: its Measurement and Clinical Significance. Chest, 138 (2_suppl):18S-24S.
4. Wu K-M. (2009) A New Classification of Prodrugs: Regulatory Perspectives. Pharmaceuticals, 2 (3):77.
5. Bagshawe KD, Sharma S, Begent RH. (2004) Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT) for Cancer. Expert Opin. Biol. Ther., 11 (1744-7682 (Electronic)):
6. Greco O, Dachs GU. (2001) Gene Directed Enzyme/prodrug Therapy of Cancer: Historical Appraisal and Future Prospectives. J. Cell. Pysiol., 187 (22-36):
7. Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Jarvinen T, Savolainen J. (2008) Prodrugs: Design and Clinical Applications. Nat Rev Drug Discov, 7 (3):255-270.
8. <http://www.bayer.com/en/felix-hoffmann.aspx>. 2017. 04. 03
9. Sinkula AA, Morozowich W, Rowe EL. (1973) Chemical Modification of Clindamycin: Synthesis and Evaluation of Selected Esters. Journal of pharmaceutical sciences, 62 (7):1106-1111.
10. Davey TF. (1958) Progress with New Antileprosy Drugs. International Journal of Leprosy, 26 (4):299-304.
11. Sawynok J. (1986) The Therapeutic Use of Heroin: a Review of the Pharmacological Literature. Can J Physiol Pharmacol, 64 (1):1-6.
12. van den Brink WH, V.M., Van Ree, J. M. (2003) Medical Prescription of Heroin to Treatment Resistant Heroin Addicts: Two Randomised Controlled Trials. Journal of Drug Issues, 29 587-608.
13. van den Brink W, van Ree JM. (2003) Pharmacological Treatments for Heroin and Cocaine Addiction. Eur Neuropsychopharmacol, 13 (6):476-87.

14. Klous MG, Van den Brink W, Van Ree JM, Beijnen JH. (2005) Development of Pharmaceutical Heroin Preparations for Medical Co-prescription to Opioid Dependent Patients. *Drug Alcohol Depend*, 80 (3):283-95.
15. Riviere JE, Papich MG, *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2013: Wiley. 320-324.
16. Brzezinski MR, Spink BJ, Dean RA, Berkman CE, Cashman JR, Bosron WF. (1997) Human Liver Carboxylesterase hCE-1: Binding Specificity for Cocaine, Heroin, and Their Metabolites and Analogs. *Drug Metabolism and Disposition*, 25 (9):1089-1096.
17. Salmon AY, Goren Z, Avissar Y, Soreq H. (1999) Human Erythrocyte but not Brain Acetylcholinesterase Hydrolyses Heroin to Morphine. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26 (8):596-600.
18. Lockridge O, Mottershaw-Jackson N, Eckerson HW, La Du BN. (1980) Hydrolysis of Diacetylmorphine (Heroin) by Human Serum Cholinesterase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 215 (1):1-8.
19. White JM, Irvine RJ. (1999) Mechanisms of Fatal Opioid Overdose. *Addiction*, 94 (7):961-72.
20. Selley DE, Cao CC, Sexton T, Schwegel JA, Martin TJ, Childers SR. (2001) Mu Opioid Receptor-mediated G-protein Activation by Heroin Metabolites: Evidence for Greater Efficacy of 6-monoacetylmorphine Compared with Morphine. *Biochem Pharmacol*, 62 (4):447-55.
21. Brown GP, Yang K, King MA, Rossi GC, Leventhal L, Chang A, Pasternak GW. (1997) 3-Methoxynaltrexone, a Selective Heroin/morphine-6beta-glucuronide Antagonist. *FEBS Lett*, 412 (1):35-8.
22. Rossi GC, Leventhal L, Pan YX, Cole J, Su W, Bodnar RJ, Pasternak GW. (1997) Antisense Mapping of MOR-1 in Rats: Distinguishing Between Morphine and Morphine-6beta-glucuronide Antinociception. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 281 (1):109-14.
23. Pomara C, Cassano T, D'Errico S, Bello S, Romano AD, Riezzo I, Serviddio G. (2012) Data Available on the Extent of Cocaine Use and Dependence: Biochemistry, Pharmacologic Effects and Global Burden of Disease of Cocaine Abusers. *Current Medicinal Chemistry*, 19 (33):5647-5657.

24. <http://www.drugabuse.gov/related-topics/trends-statistics/overdose-death-rates>. 2017. 04. 03
25. Barnett G, Hawks R, Resnick R. (1981) Cocaine Pharmacokinetics in Humans. *Journal of Ethnopharmacology*, 3 (2–3):353-366.
26. Zhan C-G, Gao D. (2005) Catalytic Mechanism and Energy Barriers for Butyrylcholinesterase-Catalyzed Hydrolysis of Cocaine. *Biophysical Journal*, 89 (6):3863-3872.
27. Xue L, Hou S, Yang W, Fang L, Zheng F, Zhan C-G. (2013) Catalytic Activities of a Cocaine Hydrolase Engineered from Human Butyrylcholinesterase Against (+)- and (-)-Cocaine. *Chemico-Biological Interactions*, 203 (1):57-62.
28. Kolbrich EA, Barnes AJ, Gorelick DA, Boyd SJ, Cone EJ, Huestis MA. (2006) Major and Minor Metabolites of Cocaine in Human Plasma Following Controlled Subcutaneous Cocaine Administration. *Journal of analytical toxicology*, 30 (8):501-10.
29. McCance EF, Price LH, Kosten T, Jatlow PI. (1995) Cocaethylene: Pharmacology, Physiology and Behavioral Effects in Humans. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 274 (1):215-223.
30. Wilson LD, Jeromin J, Garvey L, Dorbandt A. (2001) Cocaine, Ethanol, and Cocaethylene Cardiotoxicity in an Animal Model of Cocaine and Ethanol Abuse. *Academic Emergency Medicine*, 8 (3):211-222.
31. Reith MEA, Meisler BE, Sershen H, Lajtha A. (1986) Structural Requirements for Cocaine Congeners to Interact with Dopamine and Serotonin Uptake Sites in Mouse Brain and to Induce Stereotyped Behavior. *Biochemical Pharmacology*, 35 (7):1123-1129.
32. Ritz MC, Cone EJ, Kuhar MJ. (1990) Cocaine Inhibition of Ligand Binding at Dopamine, Norepinephrine and Serotonin Transporters: A Structure-activity Study. *Life Sciences*, 46 (9):635-645.
33. Davies HML, Saikali E, Sexton T, Childers SR. (1993) Novel 2-substituted Cocaine Analogs: Binding Properties at Dopamine Transport Sites in Rat Striatum. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 244 (1):93-97.

34. Kozikowski AP, Roberti M, Johnson KM, Bergmann JS, Ball RG. (1993) SAR of Cocaine: Further Exploration of Structural Variations at the C-2 Center Provides Compounds of Subnanomolar Binding Potency. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 3 (6):1327-1332.
35. Carrera MRoA, Meijler MM, Janda KD. (2004) Cocaine Pharmacology and Current Pharmacotherapies for its Abuse. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12 (19):5019-5030.
36. Shorer Z, Bachner Y, Guy T, Melzer I. (2013) Effect of Single Dose Methylphenidate on Walking and Postural Stability Under Single- and Dual-Task Conditions in Older Adults—A Double-Blind Randomized Control Trial. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 68 (10):1271-1280.
37. Sun Z, Murry DJ, Sanghani SP, Davis WI, Kedishvili NY, Zou Q, Hurley TD, Bosron WF. (2004) Methylphenidate is Stereoselectively Hydrolyzed by Human Carboxylesterase CES1A1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 310 (2):469-76.
38. Kimko HC, Cross JT, Abernethy DR. (1999) Pharmacokinetics and Clinical Effectiveness of Methylphenidate. *Clinical pharmacokinetics*, 37 (6):457-70.
39. Ingold CK, *Structure and Mechanism in Organic Chemistry*. 1953, Ithaca: Cornell University Press.
40. Long FA, Purchase M. (1950) The Kinetics of Hydrolysis of β -Propiolactone in Acid, Neutral and Basic Solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 72 (7):3267-3273.
41. Müller P, Siegfried B. (1974) S_N2 Reactions with Carboxylic Esters. Selective Cleavage of Methyl Esters. *Helvetica Chimica Acta*, 57 (4):987-994.
42. Barclay LRC, Hall ND, Cooke GA. (1962) Mechanism of Alkaline Hydrolysis of Hindered Aromatic Esters, The $B_{A1}2$ Mechanism. *Canadian Journal of Chemistry*, 40 (10):1981-1985.
43. Bunton CA, Comyns AE, Graham J, Quayle JR. (1955) Preparation and Hydrolysis of Some Esters of 2, 4, 6-triphenylbenzoic Acid. Part II. The Mechanisms of Hydrolysis. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, (0):3817-3824.

44. Moore JA, Schwab JM. (1991) Unprecedented Observation of Lactone Hydrolysis by the $A_{Al}2$ Mechanism. *Tetrahedron Letters*, 32 (21):2331-2334.
45. McClelland RA. (1975) $A_{Al}2$ Hydrolysis of 2,6-dimethylbenzimidate Esters in Sulfuric Acid Solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 97 (11):3177-3181.
46. Bruckner G. (1980) *Szerves kémia*. I-1 615-621.
47. March J, Smith MB, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*. 2007, Hoboken: John Wiley and Sons.
48. Yates K. (1971) Kinetics of Ester Hydrolysis in Concentrated Acid. *Accounts of Chemical Research*, 4 (4):136-144.
49. Komiyama M, Bender ML. (1980) The Cyclodextrin-accelerated Cleavage of Thiocarboxylic S-Esters. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 53 (4):1073-1076.
50. Tang SP, Zhou Y, Chen H, Zhao CY, Mao ZW, Ji LN. (2009) Ester Hydrolysis by a Cyclodextrin Dimer Catalyst with a Tridentate N,N',N''-zinc Linking Group. *Chemistry, an Asian Journal*, 4 (8):1354-1360.
51. Olah GA, Husain A, Singh BP, Mehrotra AK. (1983) Synthetic Methods and Reactions. 112. Synthetic Transformations with Trichloromethylsilane/sodium Iodide Reagent. *The Journal of Organic Chemistry*, 48 (21):3667-3672.
52. Olah GA, Narang SC. (1982) Iodotrimethylsilane-A Versatile Synthetic Reagent. *Tetrahedron*, 38 (15):2225-2277.
53. Basu MK, Sarkar DC, Ranu BC. (1989) A Mild and Selective Method of Ester Hydrolysis. *Synthetic Communications*, 19 (3-4):627-631.
54. Ranu BC, Dutta P, Sarkar A. (2000) An Efficient and General Method for Ester Hydrolysis on the Surface of Silica Gel Catalyzed by Indium Triiodide Under Microwave Irradiation. *Synthetic Communications*, 30 (22):4167-4171.
55. Sellergren B, Karmalkar RN, Shea KJ. (2000) Enantioselective Ester Hydrolysis Catalyzed by Imprinted Polymers. 2§,¶. *The Journal of Organic Chemistry*, 65 (13):4009-4027.
56. Sellergren B, Shea KJ. (1994) Enantioselective Ester Hydrolysis Catalyzed by Imprinted Polymers. *Tetrahedron: Asymmetry*, 5 (8):1403-1406.

57. Ramesh C, Mahender G, Ravindranath N, Das B. (2003) A Mild, Highly Selective and Remarkably Easy Procedure for Deprotection of Aromatic Acetates Using Ammonium Acetate as a Neutral Catalyst in Aqueous Medium. *Tetrahedron*, 59 (7):1049-1054.
58. Das B, Banerjee J, Ramu R, Pal R, Ravindranath N, Ramesh C. (2003) Efficient, Selective Deprotection of Aromatic Acetates Catalyzed by Amberlyst-15 or Iodine. *Tetrahedron Letters*, 44 (29):5465-5468.
59. Varma RS, Varma M, Chatterjee AK. (1993) Microwave-assisted Deacetylation on Alumina: A Simple Deprotection Method. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (9):999-1000.
60. <http://enzyme.expasy.org/EC/3.1.-.->. 2017. 04. 04
61. Montella IR, Schama R, Valle D. (2012) The Classification of Esterases: An Important Gene Family Involved in Insecticide Resistance--A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107 (4):437-449.
62. Pohanka M. (2011) Cholinesterases, a Target of Pharmacology and Toxicology. *Biomed. Pap. Med. Univ. Palacky Olomuc Czech Repub.*, 155 (3):219-229.
63. Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolov F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, Sussman JL, Verschueren KHG, Goldman A. (1992) The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5 (3):197-211.
64. Cygler M, Schrag JD, Sussman JL, Harel M, Silman I, Gentry MK, Doctor BP. (1993) Relationship Between Sequence Conservation and Three-dimensional Structure in a Large Family of Esterases, Lipases, and Related Proteins. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 2 (3):366-382.
65. Tripathi R, Srivastava, U.C. (2008) Acetylcholinesterase: A Versatile Enzyme of Nervous System. *Annals of Neurosciences*, 15 (4):106-111.
66. Milkani E, Lambert CR, McGimpsey WG. (2011) Direct Detection of Acetylcholinesterase Inhibitor Binding with an Enzyme-based Surface Plasmon Resonance Sensor. *Analytical Biochemistry*, 408 (2):212-219.
67. Wiwner W, Hoffman, R. S.,. (2004) Nerve Agents: A Comprehensive Review. *Journal of Intensive Care Medicine*, 19 (1):22-37.
68. Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL. (1993) An Electrostatic Mechanism for Substrate Guidance Down the Aromatic Gorge of

- Acetylcholinesterase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90 (11):5128-5132.
69. Weiner L, Shnyrov VI, Konstantinovskii L, Roth E, Ashani Y, Silman I. (2009) Stabilization of *Torpedo Californica* Acetylcholinesterase by Reversible Inhibitors. *Biochemistry*, 48 (3):563-574.
 70. Zhang HY, Tang XC. (2000) Huperzine B, A Novel Acetylcholinesterase Inhibitor, Attenuates Hydrogen Peroxide Induced Injury in PC12 Cells. *Neurosci. Lett.*, 292 (1):41-44.
 71. Adler M, Filbert MG. (1990) Role of Butyrylcholinesterase in Canine Tracheal Smooth Muscle Function. *FEBS Lett.*, 267 (1):107-110.
 72. Giacobini E. (2001) Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase: A Valid Alternative for Therapy of Alzheimer's Disease? *Drugs Aqinq.*, 18 (12):891-898.
 73. Greig NH, Lahiri D, Sambamurti K. (2002) Butyrylcholinesterase: An Important New Target in Alzheimer's Disease Therapy. *Int. Physiogeriatr.*, 14 (1):77-91.
 74. Bartorelli L, Giraldi C, Saccardo M, Cammarata S, Bottini G, Fasanaro A, Trequattrini A. (2005) Effects of Switching From an AChE Inhibitor to a Dual AChE-BuChE Inhibitor in Patients with Alzheimer's Disease. *Curr. Med. Res. Opin.*, 21 (11):1809-1818.
 75. Humerickhouse R, Lohrbach K, Li L, Bosron WF, Dolan ME. (2000) Characterization of CPT-11 Hydrolysis by Human Liver Carboxylesterase Isoforms hCE-1 and hCE-2. *Cancer Research*, 60 (5):1189-1192.
 76. Xu G, Zhang W, Ma MK, McLeod HL. (2002) Human Carboxylesterase 2 Is Commonly Expressed in Tumor Tissue and Is Correlated with Activation of Irinotecan. *Clinical Cancer Research*, 8 (8):2605-2611.
 77. Orihashi K, Tojo H, Okawa K, Tashima Y, Morita T, Kondoh G. (2012) Mammalian Carboxylesterase (CES) Releases GPI-anchored Proteins from the Cell Surface Upon Lipid Raft Fluidization. *Biol. Chem.*, 393 (3):169-176.
 78. Imai T. (2006) Human Carboxylesterase Isozymes: Catalytic Properties and Rational Drug Design. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 21 (3):173-185.
 79. Rajkovic M, G., Rumora, L., Barisic, K., (2011) The Paraoxonase 1,2 and 3. *Biochemia Medica*, 21 (2):122-130.

80. Alwarfaly S, Abdulsid A, Hanretty K, Lyall F. (2014) Paraoxonase 2 Protein is Spatially Expressed in the Human Placenta and Selectively Reduced in Labour. *PLoS One*, 9 (5):e96754.
81. Costa LG, de Laat R, Dao K, Pellacani C, Cole TB, Furlong CE. (2014) Paraoxonase-2 (PON2) in Brain and its Potential Role in Neuroprotection. *NeuroToxicology*, 43 3-9.
82. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. (2001) Paraoxonase-2 Is a Ubiquitously Expressed Protein with Antioxidant Properties and Is Capable of Preventing Cell-mediated Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (48):44444-44449.
83. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. (2001) Human Paraoxonase-3 Is an HDL-Associated Enzyme With Biological Activity Similar to Paraoxonase-1 Protein but Is Not Regulated by Oxidized Lipids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21 (4):542-547.
84. Altaner C, Saake B, Puls J. (2003) Specificity of an *Aspergillus Niger* Esterase Deacetylating Cellulose Acetate. *Cellulose*, 10 (1):85-95.
85. Larson RA, Weber EJ, Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry. 1994: Taylor & Francis. 103-108.
86. Compton RG, Bamford CH, Tipper† CFH, Ester Formation and Hydrolysis and Related Reactions. 1972: Elsevier Science.
87. Hammett LP. (1937) The Effect of Structure upon the Reactions of Organic Compounds. Benzene Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 59 (1):96-103.
88. Taft RW. (1953) Linear Steric Energy Relationships. *Journal of the American Chemical Society*, 75 (18):4538-4539.
89. Winstein S, Grunwald E, Jones HW. (1951) The Correlation of Solvolysis Rates and the Classification of Solvolysis Reactions into Mechanistic Categories. *Journal of the American Chemical Society*, 73 (6):2700-2707.

90. Yukawa Y, Tsuno Y. (1959) Resonance Effect in Hammett Relationship. II. Sigma Constants in Electrophilic Reactions and their Intercorrelation. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 32 (9):965-971.
91. Swain CG, Lupton EC. (1968) Field and Resonance Components of Substituent Effects. *Journal of the American Chemical Society*, 90 (16):4328-4337.
92. Perrin D, *pKa Prediction for Organic Acids and Bases*. 2013: Springer Netherlands. 16.
93. Bell RP, Lindars FJ. (1954) Kinetics of the Acid and Alkaline Hydrolysis of Ethoxycarbonylmethyltriethylammonium Chloride. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, (0):4601-4604.
94. Gallagher GA, Miller JG, Day AR. (1957) Solvent Effects and Ester Interchange in Basic Hydrolysis of Esters. *Journal of the American Chemical Society*, 79 (16):4324-4327.
95. Mabey W, Mill T. (1978) Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 7 (2):383-415.
96. Athawale VD, *Experimental Physical Chemistry*. 2007: New Age International (P) Limited. 69-89.
97. Castañeda-Agulló M, Del Castillo LM. (1958) Simultaneous Hydrolyses of Esters and Proteins at Saturation Levels. *The Journal of General Physiology*, 41 (3):485-500.
98. Jones JM, Raleigh MD, Pentel PR, Harmon TM, Keyler DE, Rimmel RP, Birnbaum AK. (2013) Stability of Heroin, 6-monoacetylmorphine, and Morphine in Biological Samples and Validation of an LC-MS Assay for Delayed Analyses of Pharmacokinetic Samples in Rats. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 74 291-297.
99. Noszal B, Visky D. K, M. (2006) Characterization of Ester Hydrolysis in Terms of Microscopic Rate Constants. *Journal of Physical Chemistry B*, 110 (29):14507-14514.
100. Wawer I, Diehl B, Holzgrabe U, *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. 2011: Elsevier Science. 480-484.

101. Rabi II, Zacharias JR, Millman S, Kusch P. (1938) A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment. *Physical Review*, 53 (4):318-318.
102. Ferdous AJ, Dickinson NA, Waigh RD. (1991) ¹H NMR as an Analytical Tool for the Investigation of Hydrolysis Rates: a Method for the Rapid Evaluation of the Shelf-life of Aqueous Solutions of Drugs with Ester Groups. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43 (12):860-862.
103. Ferdous AJ, Waigh RD. (1993) Application of the WATR Technique for Water Suppression in ¹H NMR Spectroscopy in Determination of The Kinetics of Hydrolysis of Neostigmine Bromide in Aqueous Solution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45 (6):559-562.
104. Lundberg D, Holmberg K. (2004) Nuclear Magnetic Resonance Studies on Hydrolysis Kinetics and Micellar Growth in Solutions of Surface-active Betaine Esters. *Journal of Surfactants and Detergents*, 7 (3):239-246.
105. Deshmukh M, Chao P, Kutscher HL, Gao D, Sinko PJ. (2010) A Series of α -Amino Acid Ester Prodrugs of Camptothecin: In Vitro Hydrolysis and A549 Human Lung Carcinoma Cell Cytotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53 (3):1038-1047.
106. Ashraf Z, Imran M, Amin S. (2011) Synthesis, Characterization and in vitro Hydrolysis Studies of Ester and Amide Prodrugs of Dexibuprofen. *Medicinal Chemistry Research*, 21 (11):3361-3368.
107. Sigel H, Zuberbühler AD, Yamauchi O. (1991) Comments on Potentiometric pH Titrations and the Relationship Between pH-meter Reading and Hydrogen Ion Concentration. *Analytica Chimica Acta*, 255 (1):63-72.
108. Bjerrum J, Rasmussen SE. (1952) Metal Amine Formation in Aquosus Solution VIII. Acid-base, Cis-trans, and Complex Equilibria in the Cobalt(III)-ethylenediamine system. *Acta Chemica Scandinavica*, 6 1265-1284.
109. Pathare B, Tambe V, Patil V. (2014) A Review on Various Analytical Methods Used in Determination of Dissociation Constant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6 (8):26-34.
110. Sohár P, Mágneses magrezonancia spektroszkópia I. Az NMR spektroszkópia elmélete. 1971: Tankönyvkiadó. 39-42.

111. Gutowsky HS, Saika A. (1953) Dissociation, Chemical Exchange, and the Proton Magnetic Resonance in Some Aqueous Electrolytes. *The Journal of Chemical Physics*, 21 (10):1688-1694.
112. Grunwald E, Loewenstein A, Meiboom S. (1957) Application of Nuclear Magnetic Resonance to the Study of Acid-Base Equilibria. *The Journal of Chemical Physics*, 27 (3):641-642.
113. Loewenstein A, Roberts JD. (1960) The Ionization of Citric Acid Studied by the Nuclear Magnetic Resonance Technique¹. *Journal of the American Chemical Society*, 82 (11):2705-2710.
114. Rabenstein DL, Hari S, Kaerner A. (1997) Determination of Acid Dissociation Constants of Peptide Side-chain Functional Groups by Two-dimensional NMR. *Analytical Chemistry*, 69 (21):4310-4316.
115. Wang J, Rabenstein DL. (2007) Determination of Residue-specific Acid Dissociation Constants for Peptides by Band-selective Homonuclear-decoupled (1)H NMR. *Analytical Chemistry*, 79 (17):6799-6803.
116. Szakács Z, Hägele G. (2004) Accurate Determination of Low pK Values by 1H NMR Titration. *Talanta*, 62 (4):819-825.
117. Szakács Z, Hägele G, Tyka R. (2004) 1H/31P NMR pH Indicator Series to Eliminate the Glass Electrode in NMR Spectroscopic pKa Determinations. *Analytica Chimica Acta*, 522 (2):247-258.
118. Orgovan G, Noszal B. (2010) Electrodeless, Accurate pH Determination in Highly Basic Media Using a New Set of (1)H NMR pH Indicators. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 54 (5):958-964.
119. Wegscheider R. (1895) Untersuchungen über die Hemipinsäure und die Esterbildung. *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften*, 16 (1):75-152.
120. Szakacs Z, Kraszni M, Noszal B. (2004) Determination of Microscopic Acid-base Parameters from NMR-pH Titrations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (2):1428-1448.
121. Elson EL, Edsall JT. (1962) Raman Spectra and Sulfhydryl Ionization Constants of Thioglycolic Acid and Cysteine*. *Biochemistry*, 1 (1):1-7.

122. Bouwsma OJ, Stewart JT, Capomacchia AC. (1978) Characterization of Pharmacologically Important Prototropic Species Derived from a Pyridinemethanol Antimalarial by Electronic Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *Journal of pharmaceutical sciences*, 67 (9):1224-1228.
123. Razzano G, Rizzo V, Vigevani A. (1990) Determination of Phenolic Ionization Constants of Anthracyclines with Modified Substitution Pattern of Anthraquinone Chromophore. *Farmaco*, 45 (2):215-222.
124. Noszál B. (1990) Acid-base Properties of Bioligands. *Biocoordination Chemistry: Coordination Equilibria in Biologically Active Systems*, 18-55.
125. Burger K, Sipos P, Véber M, Horváth I, Noszál B, Löw M. (1988) Formation Microequilibria of Proton, Calcium and Magnesium Complexes of the γ -carboxyglutamate Ion and Related Compounds. *Inorganica Chimica Acta*, 152 (4):233-239.
126. Neuberger A. (1936) Dissociation Constants and Structures of Glutamic Acid and its Esters. *Biochemical Journal*, 30 (11):2085-2094.
127. Noszál B, Sandor P. (1989) Rota-microspeciation of Aspartic Acid and Asparagine. *Analytical Chemistry*, 61 (23):2631-2637.
128. Szilágyi L, Pusztahelyi ZS, Jakab S, Kovács I. (1993) Microscopic Protonation Constants in Tobramycin. An NMR and pH Study With the Aid of Partially N-acetylated Derivatives. *Carbohydrate Research*, 247 99-109.
129. Zapała L, Woźnicka E, Kalembkiewicz J. (2014) Tautomeric and Microscopic Protonation Equilibria of Anthranilic Acid and Its Derivatives. *Journal of Solution Chemistry*, 43 (6):1167-1183.
130. Váradi A, Hosztafi S, Le Rouzic V, Tóth G, Urai Á, Noszál B, Pasternak GW, Grinnell SG, Majumdar S. (2013) Novel 6 β -acylaminomorphinans with Analgesic Activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69 786-789.
131. Wright CI. (1941) The Enzymatic Deacetylation of Heroin and Closely Related Morphine Derivatives by Blood Serum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, (71):164-177.
132. Visky D, Kraszni M, Hosztafi S, Noszál B. (2000) Species-Specific Hydrolysis Kinetics of N-Methylated Heroin Derivatives. *Helvetica Chimica Acta*, 83 (2):364-372.

133. Bell MR, Archer S. (1960) L(+)-2-Tropinone. *Journal of the American Chemical Society*, 82 (17):4642-4644.
134. Fodor G, Kovacs O. (1953) The Stereochemistry of the Tropane Alkaloids. Part II. The Configurations of the Cocaines. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, (0):724-727.
135. Findlay SP. (1954) The Three-dimensional Structure of the Cocaines. Part I. Cocaine and Pseudococaine. *Journal of the American Chemical Society*, 76 (11):2855-2862.
136. Martinet F, Huy CP, Tomas A, Scherrmann JM, Galons H. (1997) Regioselective Hydrolysis of Cocaine and A Convenient Acylation Procedure by Benzoyllecgonine. *Synthetic Communications*, 27 (19):3485-3490.
137. Wynn JE, Somers LM, Benzoyllecgonine, Ecgonine and Ecgonidine Derivatives. 1998, Google Patents.
138. Volgyi G, Ruiz R, Box K, Comer J, Bosch E, Takacs-Novak K. (2007) Potentiometric and Spectrophotometric pKa Determination of Water-insoluble Compounds: Validation Study in a New Cosolvent System. *Analytica Chimica Acta*, 583 (2):1873-4324
139. Orgovan G, Tihanyi K, Noszal B. (2009) NMR Analysis, Protonation Equilibria and Decomposition Kinetics of Tolperisone. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 50 (5):718-723.
140. Noszal B, Visky D, Kraszni M. (2006) Characterization of Ester Hydrolysis in Terms of Microscopic Rate Constants. *J Phys Chem B*, 110 (29):14507-14.
141. Zhan C-G, Deng S-X, Skiba JG, Hayes BA, Tschampel SM, Shields GC, Landry DW. (2005) First-principle Studies of Intermolecular and Intramolecular Catalysis of Protonated Cocaine. *Journal of Computational Chemistry*, 26 (10):980-986.
142. Jeanville PM, Estapé ES, Needham SR, Cole MJ. (2000) Rapid Confirmation/quantitation of Cocaine and Benzoyllecgonine in Urine Utilizing High Performance Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11 (3):257-263.
143. Maria João Valente FC, Maria de Lourdes Bastos, Márcia Carvalho and Paula Guedes de Pinho, *Gas Chromatography - Biochemicals, Narcotics and Essential*

- Oils. Chromatographic Methodologies for Analysis of Cocaine and Its Metabolites in Biological Matrices. 2012.
144. da Costa JL, Tonin FG, Zanolli LA, Chasin AA, Tavares MF. (2009) Simple Method for Determination of Cocaine and Main Metabolites in Urine by CE Coupled to MS. *Electrophoresis*, 30 (12):2238-44.
 145. Brittain HG, Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology: Critical Compilation of pKa Values for Pharmaceutical Substances. 2007: Elsevier Science. 86.
 146. Levine B, Principles of Forensic Toxicology. 2003: AACCC Press. 74.
 147. Fülöp F, Noszál B, Szász G, Novák K, Gyógyszerészi kémia. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2010: 596.
 148. Berg JM, J.L. T, L. S, Appendix: Acid-base Properties, in Biochemistry. 5th Edition. 2002, W.H. Freeman and Company: New York.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1 A disszertáció alapját képező publikációk

1. **Levente Szöcs**, Gábor Orgován, Gergő Tóth, Márta Kraszni, Lajos Gergő, Sándor Hosztafi, Béla Noszál. (2016) Site-and Species-specific Hydrolysis Rates of Heroin.
Eur J Pharm Sci, **89**:105-114 **IF:3,756**
2. **Levente Szöcs**, Ákos Urai, Gergely Völgyi, Gergő Tóth, Sándor Hosztafi, Béla Noszál (2017) Site-and Species-specific Hydrolysis Rates of Cocaine.
J Pharm Biomed Anal, **145**:372-378 **IF:3,255**

10.2 A disszertáció alapját nem képező közlemények

1. Rusu Aura, Gergo Toth, **Levente Szöcs**, József Kökösi, Márta Kraszni, Árpád Gyéresi, Béla Noszál. (2012) Triprotic Site-specific Acid-base Equilibria and Related Properties of Fluoroquinolone Antibacterials
J Pharm Biomed Anal, **66**:50-57 **IF:2,979**
2. Zoltán-István Szabó, **Levente Szöcs**, Daniela-Lucia Muntean, Béla Noszál, Gergő Tóth. (2016) Chiral Separation of Uncharged Pomalidomide Enantiomers Using Carboxymethyl-beta-cyclodextrin: A Validated Capillary Electrophoretic Method
Chirality, **28** (3):199-203 **IF:1,886**
3. Zoltán-István Szabó, Foroughbakhshfásaei Mohammadhassan, **Levente Szöcs**, József Nagy, Balázs Komjáti, Béla Noszál, Gergő Tóth. (2016) Stereoselective Interactions and Liquid Chromatographic Enantioseparation of Thalidomide on Cyclodextrin-bonded Stationary Phases
J Incl Phenom Macrocycl Chem, **85** (3):227-236 **IF:1,488**
4. Zoltán-István Szabó, **Levente Szöcs**, Balázs Komjáti, József Nagy, Béla Noszál, Gergő Tóth. (2016) LC-MS Enantioseparation of Pomalidomide on

Cyclodextrin-bonded Chiral Stationary Phases and Elucidation of Chiral Recognition Mechanisms by NMR Spectroscopy and Molecular Modeling
J Sep Sci, **39**(15):2941-2949 **IF:2,737**

5. Ákos Urai, András Váradi, **Levente Szöcs**, Balázs Komjáti, Valerie Le Rouzic, Amanda Hunkele, Gavril W. Pasternak, Susruta Majumdar, Sándor Hosztafi: Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Selective MOR Agonist 6 β -Pyridinyl Amidomorphines Exhibiting Long-lasting Antinociception
Med Chem Comm, 2017, 8, 152-157 **IF: 2,319**

6. Zoltán-István Szabó, Réka Gál, **Levente Szöcs**, Róbert Ludmerczki, Daniela-Lucia Muntean, Béla Noszál, Gergő Tóth: Validated capillary electrophoretic method for the enantiomeric quality control of R-praziquantel
Electrophoresis, 2017, in press **IF: 2,482**

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Noszál Bélának doktori munkám irányításáért.

Köszönöm Dr. Tóth Gergőnek és Dr. Orgován Gábornak az NMR mérésekben nyújtott segítségért.

Külön köszönet illeti meg Dr. Hosztafi Sándort és Urai Ákost a modellvegyületek szintézisében nyújtott segítségért.

Köszönöm Dr. Völgyi Gergelynek az értékes konzultációkat és a potenciometriás titrálásokban való segítséget.

Köszönöm Dr. Gergó Lajosnak a matematikai levezetésekben nyújtott segítségét.

Hálával tartozom a Gyógyszerészi Kémiai Intézet valamennyi munkatársának a baráti atmoszféra megteremtéséért.

Végül, de kiemeltet szeretném hálás köszönetemet kifejezni Családomnak, hogy nyugodt, szeretetteljes háttérrel biztosítottak számomra.