

Az NMR spektroszkópia 40 éve Debrecenben

SZILÁGYI László,^{a*} KÖVÉR Katalin,^b BATTÁ Gyula,^a BÁNYAI István,^c és TÓTH Imre^b

Debreceni Egyetem, Szerves Kémiai-^a Szervetlen- és Analitikai Kémiai-^b, Kolloid- és Környezetkémiai^c Tanszékek,
4010. Debrecen Pf. 20

1. Bevezetés

A címben jelzett jó emberöltőnyi idő során a Debreceni Egyetem (korábban Kossuth Lajos Tudományegyetem) kémiai tanszékeinek munkatársai NMR spektroszkópiai témakörben mintegy félezer közleményt publikáltak (rutin alkalmazásokat nem számítva). Az alábbi összefoglaló célja messze nem a teljes áttekintés (már csak terjedelmi okokból sem lehet az), hanem – mondjuk – egy madártávlati kép felvázolása némi történeti perspektívával, amely a fontosabb kutatási irányokat néhány példa felvillantásával kísérli meg bemutatni.

Az NMR spektroszkópia egyedülálló potenciálját kémiai szerkezeti problémák megoldására a kémikusok – első sorban a szerves kémikusok – korán felismerték. A legendás Varian A60 megjelenését (1961-ben) követő pár éven belül az USA-ban és Európában nem volt említésre méltó szerves kémiai intézet / laboratórium, ahol ne működött volna NMR spektrométer. Az új technika bevezetése a Bognár Rezső akadémikus irányította Szerves Kémiai tanszéken is napirendre került a 60-as évek 2. felétől, azonban a tanszékvezetőnek csak 1971-re sikerült megfelelő támogatást szereznie, hogy megkezdhesse működését az ország első 100 MHz-es NMR spektrométere (JEOL MH-100). A Szerves Kémiai tanszékre telepített laboratórium megszervezésével és működtetésével Bognár prof. Szilágyi Lászlót bízta meg, aki akkor tért vissza Strasbourg-i tanulmányútról, ahol a későbbi Nobel-díjas Jean-Marie Lehn laboratóriumában mélyítette el ismereteit a nagy léptékkel fejlődő NMR módszer területén.

2. Műszerezettség, kutatói háttér, oktatás

A tanszéki labort rövidesen elárasztották igényeikkel nemcsak a tanszék és az MTA Antibiotikumkémiai kutatócsoport (amelyet szintén Bognár prof. vezetett) munkatársai, hanem a KLTE többi kémiai tanszékéről, külső egyetemi (pl. DOTE) és más intézmények (pl. iparvállalatok: Alkaloida, Biogal, Chinoin, ÉMV, stb.) részéről érkező megkeresések is. 2-3 éven keresztül ez volt az ország egyetlen laborja, ahol 100 MHz-es méréseket lehetett végezni (a KKKI-ben 1973-ban telepítették a Varian XL-100-ast). A rutin mérés-szolgáltatás nagy és egyre növekvő feladatainak ellátásán túl, ill. ahhoz kapcsolódóan a laborvezető feladata volt az működtetés technikai, és részben anyagi-financiális feltételeinek biztosítása is.

Rövidesen felmerült az NMR-spektroszkópia oktatásának igénye, ami 1974-től kezdődően egy kötelező féléves kurzus, ill. gyakorlat formájában valósult meg. Ezt segítette a nemsokára elkészült két egyetemi jegyzet,^{8,9} illetve később

egy, az elméleti aspektusokkal foglalkozó könyvfejezet is.¹⁰

Az MH-100 mintegy 10 éven keresztül az egyetlen nagyfelbontású NMR-berendezés volt az Egyetemen, ill. a régióban, de a 200 MHz-es spektrométer üzembe helyezését (l. alább) követően is kb. 6 évig volt használatban rutin igények kielégítésére. A kb. másfél évtized során mintegy 100 ezer spektrumfelvételt készítettünk.

A Szervetlen és Analitikai Kémiai tanszéken ebben az időben induló relaxometriai vizsgálatokhoz beszerettek egy 8 MHz-es, később pedig egy Bruker MQ 20 MiniSpec berendezést. Ezek a célkészülékek kizárólag relaxációs idő mérésére alkalmasak; a spektrális felbontás fogalma ezen alkalmazások esetén nem értelmezhető.

Az NMR metodikában áttörést jelentett az impulzus-Fourier módszer (FT NMR) bevezetése a 70-es évek elején, majd a 2D (ill. többdimenziós) spektroszkópia elve kb. 1977-től. Ezek a fejlemények egyértelművé tették a fejlesztés szükségességét, és ennek előkészítése 1977-ben el is kezdődött. Nem gondoltuk volna, hogy ez 4 évig fog tartani, de a kitarító fáradozások, a kémiai tanszékek összefogása, egyes iparvállalatok (Biogal, Alkaloida), valamint az OMFB támogatása eredményeképpen 1981-ben egy szép augusztusi napon lélegzetvisszafojtva figyelhettük az ország első szupravezető mágnesének gerjesztési munkálatait (az igazsághoz tartozik, hogy a 2. szupravezető mágnesset 2 héten belül helyezték üzembe az EGIS Gyógyszergyárban). A Bruker WP-200SY NMR spektrométer ezt követően több, mint negyed századon át szolgálta a debreceni kémiát és a velünk kooperáló partnereket. Érdemes feljegyezni, mert jellemzi a kort és az akkori viszonyokat, hogy sokan óvtak bennünket a szupravezető technika kockázataitól: a cseppfolyós He beszerzése u.i. nehézkes és kiszámíthatatlan és/vagy igen drága volt akkoriban. E nehézség leküzdésében döntő segítséget jelentett a He-cseppfolyósító berendezés léte Debrecenben, az ATOMKI-ban. A kockázatok csökkentésére az ATOMKI közreműködésével megépítettünk egy He-visszanyerő berendezést, amely azóta is működik – egyébként az országban egyedülálló módon.

Ez az időszak az NMR-csoport örvendetes gyarapodásának időszaka is volt. Ez nemcsak a korszerű, új spektrométert és a széles távlatokat nyitó új NMR-technológiát (FT, 2D, l. fent), az elhelyezést szolgáló új laborhelyiséget, hanem a személyi feltételek ugrásszerű javulását is jelentette. Ekkor csatlakozott a csoporthoz a jelen összefoglaló két társszerzője (K. K és B. Gy), és a technikai létszám is nőtt egy fővel (Sajnálatos módon, később ellenkező irányú

*Tel.: 52 512 900/22589; e-mail: lszilagy@tigris.klte.hu

változások következtek be átszervezés és létszámcsökkentés miatt). A feladatok is jelentősen megnövekedtek: meg kellett teremteni a folyamatos üzemeltetés feltételeit (cseppfolyós He- és -nitrogén ellátás), az új technológiai adottságokhoz igazodva fejleszteni és átszervezni a mérésszolgáltatást (pl. a 24 órás mérési lehetőségek kihasználása), az oktatást, kielégíteni az ipari társtulajdonosok (Alkaloida, Biogal), és más külső felhasználók igényeit, stb. A 90-es évek elejétől gyakorlati kurzusokat is indítottunk az 1D-, később a 2D méréstechnika elsajátítására és haladó szintű elméleti oktatással is bővült a képzési paletta.

A műszerállomány fejlesztésében jelentős előrelépés következett be 1995-ben a Bruker Avance DRX-500 típusú 500 MHz-es spektrométer üzembe helyezésével. A beszerzés anyagi fedezetét saját erő mellett az OMFB és egy európai pályázati támogatás biztosította. A berendezés a kor technológiai színvonalának megfelelően háromcsatornás, gradiens egységgel, több mérőfejjel, multinukleáris konfigurációban áll folyamatos üzemben a kutatók rendelkezésére. A spektrométert 2008-ban egy AVANCE II konzol beszerzésével – saját pályázati forrásainkra támaszkodva – újítottuk fel. 2009-től a debreceni NMR laboratórium egy FP7-es pályázat keretében (East-NMR, <http://www.eastnmr.eu/>; www.chem.science.unideb.hu/eastnmr/index.html) európai mérésszolgáltató központként (DEBNMR) is működik. Az elmúlt két év alatt európai országból érkeztek hozzánk kutatók és vették igénybe mérésszolgáltatásainkat valamint szakmai/szakértői segítségünket.

Az 500-assal nagyjából egy időben, a Fizikai-kémiai és a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékek összefogásával került beszerzésre egy használt Bruker AM 360 MHz-es spektrométer. A beüzemelés nem kevés veszéllyel járt, ugyanakkor a fentebb említett gyakorlati kurzusokat is továbbfejlesztettük, kibővítettük a 360-as bevonásával (pl. dinamikus NMR módszerek, doktorképzés). Az NMR méréstechnika gyakorlati oktatása, ill. a kibővült műszerpark lehetővé tette, hogy 1997-től elindítsuk az ország első „önkiszolgáló” NMR laboratóriumát, ahol a hallgatók, doktoranduszok, oktatók-kutatók önállóan végeznek méréseket. Az AM típust 2000-ben DRX 360-asra újítottuk fel, és egy (Dombi György szívességéből, Szegedről átvett) használt AM 400-assal is gyarapodott a laboratórium. Utóbbi nemrég DRX típusra korszerűsítettük, és egy gradiens mérőfej hozzáadásával korszerű folyadékfázisú, további bővítéssel (MAS mérőfej + megfelelő r.f. egység) pedig nagyfelbontású szilárdtest NMR mérésekre is alkalmassá tettük a készüléket.

3. Kutatási témák

A laborvezető alapvető célkitűzése kezdettől fogva az NMR spektroszkópiai kutatás elindítása volt, ez irányú ambícióját azonban csak a kötelező napi rutin szorításában tudta – többé-kevésbé – kielégíteni. Az első kutatási témát nyílt láncú szénhidrát-származékok konformációs vizsgálata jelentette,¹ ezt több hasonló tanulmány követte. Az NMR spektrumanalízis pontosságának és megbízhatóságának növelésére az akkor modern iteratív számítógépes

eljárásokat is bevetették.^{2,3} A kor számítástechnikai színvonalát tekintve ez nem kevés erőfeszítéssel járt. Az NMR módszer nemcsak a molekulaszervezet, hanem a molekuláris mozgások (dinamika) vizsgálatára is alkalmas, igen széles (ca. 10^{-12} - 10^2 s) tartományban. A Lehn-laborban elsajátított deutérium-relaxációs módszer innovatív alkalmazását jelentette a lizozim – NAc-glükózamin (NAcGlc) enzim-inhibitor komplex dinamikájának tanulmányozása.⁴ Kezdeti kísérletek történtek az NMR-spektroszkópia biofizikai alkalmazására is.^{5,6} A “100-as korszak” legjelentősebb eredménye a cisztein-aldehid reakciók sztereokémiai vizsgálata, dinamikus NMR és deutériumjelzés segítségével.⁷

3.1 NMR metodikai fejlesztések

3.1.1 Relaxációs méréstechnikák

A folyadékfázisú NMR méréstechnikai fejlesztéseink hajtóereje az elmúlt évek alatt mit sem változott: elsődleges cél az érzékenység és a felbontás javítása, valamint a spektrumok kiértékelését zavaró jelek kiszűrése. Módszereket dolgoztunk ki a homo- és heteronukleáris dipoláris relaxáción alapuló mag Overhauser hatás (NOE) mérésére, melynek eredményeként lehetővé vált proton-proton ill. proton-szén távolságok korábbinál pontosabb meghatározása.¹¹⁻¹³ Kimutattuk az irodalomban először, hogy heteronukleáris NOE esetén is felléphet spin-diffúzió eredményeként három-spin (indirekt) effektus,^{14,15}. Kvantitatív ^{13}C - ^1H NOE spektroszkópia¹⁶ bevezetésével 0.1 Å pontossággal határoztunk meg proton-szén távolságokat. Bizonyítottuk, hogy ez a jelenség felhasználható oligoszacharidok szekvenálására is.¹⁷ A molekulák szerkezeti és dinamikai tulajdonságainak szétválasztása jelentős kihívás az NMR spektroszkópia számára.¹⁸ A trehalóz diszacharid és a ubiquitin fehérje példáján bemutatva javasoltuk a Lipari-Szabó féle NMR relaxációs dinamikai módszer kiterjesztését.¹⁹ Igazoltuk, hogy relaxációs interferencia effektusok mérésével a szokásos dinamikai paramétereken kívül meghatározható a kémiai eltolódás anizotrópiája (CSA) és a geometriai faktor is. A módszer alkalmazhatóságához új, hatásos 1-és 2D mérési szekvenciákat vezettünk be.^{20,21} Módszereinket alkalmaztuk fehérjék szerkezeti és dinamikai vizsgálatára (3.2 fejezet).

3.1.2 Spin-spin csatolásokkal kapcsolatos új technikák

A fontos térszerkezeti információt hordozó homo- és heteronukleáris skaláris spin-spin csatolások pontos és gyors meghatározására érzékeny, egy- és kétdimenziós NMR módszereket fejlesztettünk ki.²²⁻²⁵ A többkötéses heteronukleáris csatolások mérésére kidolgoztunk egy, a korábbinál általánosabban alkalmazható módszert, az ún. CPMG-HSQMBC technikát. A kísérlet eredményeként tisztán abszorpciós fázisú multipletteket kapunk, amelyekből a csatolási állandók pontosan és megbízhatóan kimérhetők. A módszer alkalmazhatóságát különböző bonyolultságú molekulák (szacharóz, sztrichnin, tengeri baktériumból izolált makrolid) proton-szén (ill. egyéb molekulák proton-nitrogén, proton-foszfor, stb.) csatolásainak meghatározásával bizonyítottuk.^{26,27} Egy további módosításnak köszönhetően (adiabatikus impulzusok, CPMG csökkentett teljesítményen) olyan

magok heteronukleáris csatolásai is pontosan mérhetők, amelyek kémiai eltolódása erősen hőfokfüggő (pl. ^{77}Se).²⁸

A fehérjék másodlagos szerkezetére jellemző $^3J_{\text{HN},\alpha}$ homonukleáris csatolási állandók mérésére a J -modulált TROSY módszert javasoltuk.²⁹ Az érzékenység további növelésére sáv-szelektív H_α lecsatolást alkalmaztunk, ami különösen nagyobb méretű fehérjék (MW > 30 kDa) vizsgálata esetén ígéretes. Proton-detektáláson alapuló INADEQUATE/ADEQUATE kísérleteket fejlesztettünk ki egy- és többkötés ^{13}C - ^{13}C skaláris spin-spin csatolások meghatározására. A módszer előnye a jelentős érzékenység növelés, valamint lehetőséget nyújt az egy- és többkötés csatolási állandók egyidejű meghatározására.³⁰⁻³² Alkalmazhatóságát számos mono- és diszacharid példáján bizonyítottuk, megmérve azok összes lehetséges ^{13}C - ^{13}C csatolási állandóit. A ^{13}C - ^{13}C multiplettek számítógépes elemzésével 2 Hz-nél kisebb csatolási állandók is mérhetők. Az egykötéses, maradék dipoláris csatolási állandók ($^1D_{\text{X,H}}$) pontosabb és érzékenyebb mérésére az indirekt, X dimenzióban csatolt HSQC-GBIRD^r változatot vezettük be.^{33,34} Ez a kísérlet az összes távolható $^nJ_{\text{X,H}}$ csatolást megszünteti, így a kívánt csatolási állandó egy éles dublettből határozható meg, lehetőséget adva az orientált közeg által okozott kis effektusok mérésére. A TROSY esetén ugyanezzel a módszerrel további felbontás- és érzékenység növekedést értünk el.³⁵

A szoros csatolások (másodrendű effektusok) hatását tanulmányoztuk 2D heteronukleáris skaláris és dipoláris korrelációs spektrumokra. Kimutattuk, hogy pl. szénhidrátok spektrumaiban különös figyelmet kell fordítani a szoros csatolástól származó járulékos jelekre. Ezen csúcsok elnyomására egy általános módszert javasoltunk ami növeli a korrelációs jelhozzárendelés megbízhatóságát.³⁶⁻³⁹ Tallium-cianid rendszerek oldatfázisú egyensúlyát először vizsgáltuk 2D-EXSY technikával majd a teljes csere mátrix értékelésével jutottunk mechanisztikus következtetésekre.⁴⁰ Összefoglaló közlemény⁴¹ írtunk a heteronukleáris NOE elméleti és kísérleti témakörében.

3.2 Alkalmazások

3.2.1 Szerves kémiai alkalmazások

3.2.1.1 „Kis” molekulák

Szénhidrátok

A „kis” molekulákkal kapcsolatos NMR-kutatások tipikusan a molekulaszervezet (konstitúció, konfiguráció, konformáció) meghatározását célozzák általában oldatfázisban. A feladat megoldásának sine qua non-ja az egyértelmű („ab initio”) NMR-jelhozzárendelés (^1H , ^{13}C , esetleg ^{15}N , és egyéb magok). Ez már viszonylag kis molekulák esetén sem triviális. Nyugodtan állíthatjuk, hogy a 80-as évek elején megjelenő 2D-módszerek forradalmi változást hoztak ezen a területen; a WP-200SY (l. fent) telepítésével ez a technika számunkra is elérhetővé vált, és alkalmazását rövidesen be is mutattuk egy diszacharid példáján.⁴² Ezt követően számos esetben alkalmaztuk a modern NMR módszereket szénhidrátok szerkezetvizsgálatára. Álljon itt erre néhány kiragadott példa.

Összefüggést mutattunk ki az egy-kötéses ^1H - ^{13}C csatolási állandók és a térszerkezet között piranóz-gyűrűs származékokban.⁴³ Multinukleáris (^1H , ^{13}C , ^{15}N) mérések segítségével tisztáztuk a gyűrű-lánc tautoméria és a protonálódás szerepét aldóz-aminoguanidin-⁴⁴ és egyéb⁴⁵ származékokban. Elsőként közöltük a gyógyszerként alkalmazott aminoglikozid antibiotikum, a tobramicin teljes, ab-initio ^1H - és ^{13}C NMR jelhozzárendelését 2D-módszerek és iteratív számítógépes analízis segítségével,⁴⁶ majd erre támaszkodva mikroszkópikus protonálódási állandókat mértünk NMR- és potenciometria kombinálásával.⁴⁷ Vizsgáltuk az ugyancsak aminoglikozid antibiotikum-családba tartozó apramicin konformációját,⁴⁸ és rámutattunk a relaxációs módszerekben rejlő lehetőségekre a térszerkezet meghatározásában.⁴⁹ Hidantocidin-analóg származékokban a szerkezetmeghatározásban fontos kémiai eltolódás-⁵⁰ ill. proton-szén csatolási állandókra vonatkozó szabályokat állapítottunk meg.^{50,51} Kidolgoztunk, és oligoszacharid példákra mutattunk be egy általánosan alkalmazható NMR módszert sáv-szelektív jel-elnyomásra átfedő 2D spektrumok egyszerűsítése céljából.⁵² Új típusú, diszulfid-interglikozidos kötést tartalmazó diszacharidok konformációját vizsgáltuk ROESY módszerrel.⁵³ Részletesen vizsgáltuk ^1H - ^{13}C csatolások alkalmazhatóságát ketozidok anomer konfigurációjának meghatározására, és rámutattunk a módszer korlátaira.⁵⁴

Oligoszacharidok kötéstípusának meghatározására bevezettük a távolható (LR-COSY) $^4J_{\text{HCOCH}}$ proton-proton^{55,56} és a (2D-DEPT) $^3J_{\text{HCOCH}}$ proton-szén⁵⁷ csatolásokon alapuló módszereket.⁵⁸ Utóbbi proton-detektált változata lett a legelterjedtebb szekvencia meghatározási eljárás.⁵⁹ Oligoszacharidok szerkezetvizsgálatára 1D „kémiai eltolódás szelektív filter” technikát javasoltunk.⁶⁰ A *Shigella sonnei* O-specifikus poliszacharidjának helikális konformációját kompenzált off-rezonancia ROESY technikával és a $^3J_{\text{HCOCH}}$ csatolások alapján határoztuk meg.⁶¹ Vizsgáltuk a növények fagyástűrő képességében fontos szerepet játszó trehalóz konformációját $^3J_{\text{HCOCH}}$ csatolások segítségével. Az ún. Lipari-Szabó analízis kiterjesztésével megállapítottuk, hogy a fagyási fázisátmenetet megelőzően hirtelen megnövekszik a trehalóz molekulák belső mozgékonyága.¹⁸ Heteronukleáris $^3J_{\text{HCOCH}}$ csatolások alapján valószínűsítettük, hogy vizes oldatban sem a trehalózban, sem a szacharózban nincsenek perzisztens H-hidak.⁶² Meghatároztuk továbbá az OH-konformer-populációkat és az irodalomban eddig le nem írt Karplu paramétereket $^3J_{\text{HCOCH}}$ csatolásokra.⁶³ A neuraminsav és polimerjének (kolominsav) ^1H és ^{13}C kémiai eltolódási anizotrópiáját határoztuk meg CSA/DD relaxációs interferencia mérésekből oldatfázisban.⁶⁴ Relaxációs interferenciák mágneses térerősség-függését kihasználva jellemeztük a metil- β -D-glükopiranozid hidroximetil- csoportjának belső mozgásait.⁶⁵ Az NMR szénhidrátkémiai alkalmazásait korábban egy magyar,⁶⁶ nemrég pedig egy nemzetközi monográfiába⁶⁷ felkérésre írt cikkben ismertettük.

Peptidek, glikopeptidek, antibiotikumok

A 90-es években egyre elterjedtebbé vált az NMR-adatokra támaszkodó számítógépes molekulamodellés alkalmazása a konformációs analízisben. Ezt a módszert számos új, biológiailag hatásos peptid – pl. enkefalin-,

oxytocin-, gastrin-, deltorfin- és endomorfín-származékok – szerkezetmeghatározására alkalmaztuk hazai és amerikai (USA) kutatókkal együttműködésben⁶⁸⁻⁷⁸ A vizsgált peptidok oldatbeli térszerkezetének ismeretében meghatároztuk a farmakofór-csoportoknak a receptor által megkívánt térbeli elrendeződését. A kapott eredmények alátámasztják a korábbi, kémiai szerkezet-hatás összefüggés számítások (QSAR) alapján felállított bioaktív szerkezet-modellt. Hasonló módszerekkel kimutattuk, hogy még olyan, viszonylag "merev" molekulák esetén is, mint a ciklopeptidok, több konformer egyidejű jelenlétével kell számolni oldatban.⁷⁹ Az aromás-amid (Ar-HN), aromás-HC (π -HC) gyenge poláris kölcsönhatások hélix-stabilizáló szerepét tanulmányoztuk lineáris peptidokban NMR, CD adatok és molekuladinamikai számítások alapján.⁸⁰

Sejtfal glikopeptidok konformációját horvát-német,⁸¹ ill. szlovén partnerekkel kooperálva tanulmányoztuk.⁸² Egy endotoxikus sokk elleni ciklopeptid konformációját transzfer-NOE / molekuláris modellezés módszerrel határoztuk meg ugyancsak szlovén együttműködésben.⁸³ Dél-afrikai partnerekkel pedig egy rákfajtából izolált kardioaktív nonapeptid, (CCAP)⁸⁴ illetve a maláriaszúnyog (*Anopheles*), repülési képességét szabályozó neuropeptid oldatkonformációját vizsgáltuk hasonló módszerrel vizes-ill. membránanalóg fázis körülményei között (Mugumbate, G; Jackson, G.E.; Kövér, K.E.; Szilágyi, L. *Peptides*, **2011**, közlésre előkészítve).

A flavofungin, egy 32-tagú pentaén makrociklusos lakton 11 királis C-atommal: az „ab initio” 2D jelhozzárendelés alapján mért csatolási állandók ill. a deutérium izotópeffektusok mérése révén sikerült a konformációs és H-kötéses viszonyokat részletesen feltérképezünk.⁸⁵ Az ugyancsak a polién-makrolidok családjába tartozó oligomicinok esetében hasonló közelítést alkalmazva lehetőség nyílt az oldatkonformáció és a szilárd fázisú (Rtg-diffrakciós) szerkezet összehasonlítására.⁸⁶ Heteronukleáris NOE mágnesezettség átvitel segítségével igazoltuk a vankomicin antibiotikum hatásmechanizmusát.⁸⁷ A Gauze-Intézetben (Moszkva) izolált új glikopeptid antibiotikum (eremomicin) szerkezetét határoztuk meg magyar-orosz kooperációban. A teljes NMR jelhozzárendelését követően vizsgáltuk molekuláris dinamikát és sejtfal-analóg peptid kötődést.⁸⁸ A risztocetin-A antiparallel dimerjének ellentétes oldalain található kötő helyek eltérő affinitással kötődnek a sejtfal analóg ¹³C jelzett D-Ala-D-Ala peptidhoz.⁸⁹ Ez összhangban van a ligandum kötődés és a dimerizáció anti-kooperativitásával. ¹⁵N jelzett eremomicin esetében víz telítés-átvitellel igazoltuk, hogy a víz kiszorítása a kötőhelyről fontos a kötődés értelmezéséhez (kooperativitás).⁹⁰ Az eremomicin hidrofób, illetve „elrontott” kötőhelyű származékainak hatásmechanizmusát vizsgáltuk glikopeptidre érzékeny és rezisztens baktérium törzsek esetén.⁹¹ Teljes ¹H, ¹³C és ¹⁵N NMR jelhozzárendelést adtunk négy alapvető glikopeptid antibiotikum aglikonjára (Vankomicin, Eremomicin, Teicoplanin és Risztocetin-A).⁹² Teicoplanin és risztocetin aglikon származékokban egyes esetekben az antibakteriális aktivitás jelentős növekedését észleltünk rezisztens és nem-rezisztens törzsekben. A hatás növekedést a multivalencia elv alapján, az antibiotikum micellák képződésével értelmeztük, amit DOSY és STD kísérletekkel igazoltunk.⁹³

3.2.1.2 Fehérjék, egyéb polimerek, fehérje – kis molekula kölcsönhatások

Az új 2D (később nD) NMR technológia teljesítő képessége a fehérjék szerkezetének atomi szintű meghatározásában csúcsonosodott ki. A fehérje-NMR alapjait a később Nobel-díjjal jutalmazott Kurt Wüthrich fektette le; a módszer lényegét egy összefoglaló cikkben ismertettük.⁹⁴ Szilágyi L. a kaliforniai Stanford Egyetemen tett tanulmányútja során került kapcsolatba a tématerülettel.⁹⁵ Itt ismerte fel a nagy érdeklődést kiváltó összefüggést az NMR kémiai eltolódások és a fehérjék másodlagos szerkezete között,⁹⁶ majd később elkészítette a tématerület első monografikus összegzését is.⁹⁷ A lizozim EI-komplexek (l. fent:4) molekuláris dinamikájának részletesebb vizsgálatát többszörösen deutérium-jelzett GlcNAc-származékok felhasználásával folytattuk.⁹⁸ Spanyol-olasz együttműködés keretében vizsgáltuk a humán tumorterápiában ígéretesnek mutatkozó hasnyálmirigy RNáz fehérjét (HP-RNáz).⁹⁹ Az általunk kifejlesztett relaxációs technikák (l. fent) alkalmazásával egyértelműen igazoltuk, hogy a különböző másodlagos szerkezeti elemek (α -hélix, β -redő) belső flexibilitása eltérő. A számított globális korrelációs idő alapján feltételeztük a fehérje dimerizálódását, amit megerősítettek a diffúziós NMR (DOSY) és az ultracentrifugás mérések is.¹⁰⁰

Az idegi szabályozásokban szerepet játszó Calretinin fehérje (CR) szerkezetét és tulajdonságait lengyel-magyar együttműködés keretében vizsgáltuk az ún. „moduláris” közelítéssel. 2D-TROSY technikával megállapítottuk, hogy a CR-I-II és a CR-III-VI modulok ugyanazt a szerkezetet alkotják komplexükben mint a kovalensen kötött teljes calretinin.^{101,102} Jellemeztük a CR-I-II modul Ca²⁺ és H⁺ kötő sajátságait.¹⁰³ A PAF antifungális fehérje térszerkezetét 3D-NMR módszerekkel,¹⁰⁴ (az első „debreceni” fehérje szerkezet a pdb adatbankban, kódja: 2kcn) belső dinamikáját Lipari-Szabó szerint határoztuk meg. A három diszulfid híddal feltekeredett PAF szerkezetét két ortogonális β -redő, valamint a felszínén elhelyezkedő számos bázikus lizin jellemzi, amelyek növelik a PAF toxikusságát fonalas gombákban.

Telítés-átviteli differencia (STD) kísérleteket dolgoztunk ki fehérje-ligandum kölcsönhatások kimutatására könnyűvízes közegben.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ A hasonló kémiai szerkezetű ligandumok kompetíciós titrálása esetén fellépő jelátfedési problémák kiküszöbölésére új izotóp-szerkesztett/szűrt STD kísérleteket javasoltunk¹⁰⁷ és ezzel a módszerrel meghatároztuk egy szénhidrát - fehérje (malektin) komplex egyensúlyi állandóját. Kidolgoztunk továbbá egy hatékony csoport-szelektív (group-selective, GS) telítési módszert, amellyel a ¹⁵N-izotóppal jelölt fehérje valamennyi amid-proton átmenete egyidejűleg telíthető akkor is, amikor azok átfednek a ligandum rezonanciajeleivel.¹⁰⁶ A GS-szekvencián alapuló telítés 'kémiai szelektivitása' – azaz az NH, alifás ill. aromás H-ek szelektív gerjesztése – lehetőséget ad a ligandum-fehérje kölcsönhatás szerkezeti jellemzőinek a fehérje oldaláról való feltérképezéséhez és pontosabb megismeréséhez is.¹⁰⁸ STD kísérletekkel tanulmányoztuk a XIII-as véralvadási faktor (FXIII) és különböző peptid inhibitorok kölcsönhatásának szerkezeti részleteit, amelyek jó egyezést mutattak a számítógépes szimulációval kapott eredményekkel.¹⁰⁹ Ugyancsak STD módszerrel vizsgáltuk

oligovalens diszulfid-glikozidok kötődését a Concanavalin-A lektin-fehérjéhez indiai együttműködés keretében.¹¹⁰

DOSY technikával megállapítottuk hogy egyes guanozin molekulák nem vizes közegben G4 kvartettek létrejöttével lineáris szupramolekulákat alkotnak,¹¹¹ amelyek képesek kis molekulák „befogására”. NMR eredményeink összhangban voltak a transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM) és fényszórás kísérletekkel.

3.2.2 NMR a koordinációs kémiában

Az 1970-es évek elején Nagypál István és munkatársai NMR relaxometriai vizsgálatokat elevenítettek fel az NMR „hőskorából”.^{112,113} Elméleti-kinetikai és matematikai módszerek alkalmazásával kidolgozták a sok-komponensű egyensúlyi rendszerek relaxometriás elemzését, a víz-protonok T_2 relaxáció-sebességének mérésével.¹¹⁴ A réz aminosav komplexével kezdték,¹¹⁵ majd vanadil-¹¹⁶ és a króm(II) ionok¹¹⁷ teljes egyensúlyi dinamikáját elemezték. Debrecenben Brücher Ernő kutatócsoportja kezdte el a nagyfelbontású ^1H NMR alkalmazását a koordinációs kémiában.¹¹⁸ A ritkaföldfém-kémiában elért eredményekről egy külön cikk olvasható a MKF jelen számában (Brücher-Tircsó-Tóth).

Első közelítésben egy fémion (M)-szerves ligandum (L) alkotta kémiai egység elvileg semmiben sem különbözik egy szerves vagy elemorganikus molekulától, így annak NMR spektroszkópiás vizsgálata is alkalmazható a jól bevált „szerves NMR” technikák bármelyike, lásd 3.2.1. alfejezetben írottakat a jelek hozzárendeléséről. Azonban az ML_n komplexek reverzibilis, dinamikus egyensúlyi lépések során képződnek, ezt a mérési adatok értelmezésénél figyelembe kell venni.¹¹⁹

3.2.2.1 Fémkomplexek egyensúlyainak dinamikája nagyfelbontású NMR mérésekkel

Az 1980-as évek kezdetétől alakult ki az együttműködés a Debreceni Egyetem (akkor KLTE) Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéke és a stockholmi Királyi Műszaki Egyetem (KTH) Szervetlen Kémiai Tanszéke között, amelyben a szervetlen vegyületek multinukleáris NMR vizsgálatait tűztük ki célul. A kezdetektől debreceni kutatók vettek részt benne, és a svéd partnerekkel együtt alapították és alakították a „stockholmi dinamikus NMR iskolát”, amelynek helyszínét az NMR készülékek rendelkezésre állása és a jobb kutatási körülmények határozták meg.^{120,121} A kezdetekben teljes jeleket analízissel és a spektrumok teljes szimulációjával jellemeztük a dinamikai rendszereket. Olyan régóta ismert koordinációs kémiai rendszerek leírását egészítettük ki dinamikai adatokkal, mint a Ti^{3+} - Cl^- és Br^- rendszerek.^{122,123} Hasonló teljességgel írhatók le a koordinációs kémiai rendszerek a „lassú csere” körülményei között 1D és 2D mágneszettség átviteli technikákkal. Ezzel a módszerrel sikerült tisztáznunk a Ti^{3+} és CN^- rendszer egyensúlyi dinamikáját 1D és 2D ^{205}Ti - és ^{13}C -NMR módszerekkel,¹²⁴ valamint az irodalomban elsőként közölt 2D ^{205}Ti NMR spektrumokat is felhasználva.⁴⁰ Ez utóbbinak az adott kor technikai barványa mellett érdekes kinetikai vonatkozása, hogy az ún. „kém-mag” technikával sikerült igazolni, hogy egy lépésben csak egy ligandum cserélődik a ligandumcsere reakciók során.

A technikai és számítási fejlesztések után fontos komplex egyensúlyi rendszerek dinamikai vizsgálata következett. Multinukleáris (^{17}O -, ^{13}C - ^{27}Al - ^{19}F -NMR) 1D és 2D jeleket elemzés és mágneszettség-átviteli technikákkal tisztáztuk a UO_2^{2+} és CO_3^{2-} hárommagvú komplexek valamint az Al^{3+} - F^- és az Al^{3+} - citrát rendszerek egyensúlyát, szerkezetét és dinamikáját vizes oldatban.^{125,126} A Rh^{3+} -akva komplexek protoncsere dinamikájának kvantatív meghatározására elsőként két térerőn mért jeleket elemzést alkalmaztunk, aminek segítségével azonosítottuk a protonok mozgását a szoros belső szférából a kinetikailag stabilis külső szférába.¹²⁷

Az orvosi mágneses rezonancia képalkotás (MRI) térhódításával a kilencvenes években megnövekedett az érdeklődés a ritkaföldfém kémia iránt (ami elsősorban a paramágneses gadolinium(III) komplexekre irányult),¹²⁸ egyúttal még fontosabbak lettek az NMR vizsgálatok. Hőmérsékletfüggő 1D és 2D ^1H NMR vizsgálatokkal meghatároztuk különböző fémionok (K^+ , Bi^{3+} és Ln^{3+}) DOTA származékokkal és poliamino-polikarbonsavakkal képezett komplexei belső mozgásának dinamikáját.^{129,130} Megállapítottuk, hogy a belső mozgásoknak jelentős szerepe van mind a ligandum kicserélődési reakciók kinetikájában, mind a kontraszthatás mértékében.

3.2.2.2 Multinukleáris NMR vizsgálatok főcsoport-elemek és d-mező fémionok komplexekében

A FT-NMR készülékek megjelenésével a hazai kutatásainkban is gyakoribbá vált a fentiekhez képest „más”- vagy „X-“ (többnyire fém) - magokon történő mérés. Az egyes magok érzékenysége nagyon eltérő, emellett a kvadrupólus magok esetében limitáló tényező, hogy a gyors relaxációval együtt járó jelszélesedés a nem szimmetrikus komplexek detektálását gyakran megnehezíti, sőt lehetetlenné is teheti. Az alábbiakban kiragadott példákat mutatunk be, a kínáló sokféle csoportosítási lehetőség közül a mért X-mag növekvő tömegszáma szerint haladva, távirati stílusban szemléltetjük a „multinuklearitást” nyújtotta előnyöket.

^{11}B ($I=3/2$) A Győri Béla és Emri József csoportja az ^1H és ^{13}C NMR mellett intenzíven használták a ^{11}B NMR-t is az új vegyületeik, pl. az amin-cianokarboxiboránok jellemzésére.^{131,132}

^{14}N ($I=1$), ^{15}N ($I=1/2$). ^{14}N NMR segítségével szervetlen nagyipari termékek (műtrágyák) REACH minősítését dolgoztuk ki. ^{15}N NMR HSQC vizsgálatokkal a PAMAM dendrimerek protonálódási helyeit sikerült azonosítani.

^{17}O ($I=3/2$) Hőmérsékletfüggő ^{17}O NMR spektroszkópiával az U(IV) és az U(VI) akva komplexek, valamint a Mn(III) különböző porfirin komplexek vízcsere kinetikáját írtuk le, és javaslatot tettünk a mechanizmusra.¹³³⁻¹³⁵ Kihasnálva azt, hogy az ún. -il oxigén atomok NMR jelének kémiai eltolódása igen érzékenyen tükrözi a fémion belső koordinációs szférájának változásait, értékes egyensúlyi, szerkezeti és dinamikai adatokhoz jutottunk UO_2^{2+} -karbonát,^{136,137} az ipari jelentőséggel bíró Mo(VI)-foszfát/ vagy szulfát/ vagy klorid - hidrogénperoxid alkotta heteropoli(per) oxalátok,^{138,139} a Mo(VI)- hidroxámsav,¹⁴⁰ és a V(V)- szerves ligandum - hidrogénperoxid rendszerek speciációjára vonatkozóan.¹⁴¹

¹⁹F (I=1/2) Kihhasználva a ¹⁹F mag kivételesen jó érzékenységét, újvizsgáltuk és részletesen leírtuk az Al³⁺-F⁻ rendszer egyensúlyi és ligandumcsere reakcióit.^{142,143} Hasonlóan eredményes volt az Al³⁺-H⁺-oxalát-fluorid négykomponensű rendszer vizsgálata, beleértve a környezetkémia vonatkozásokat is.¹²⁶

²⁷Al (I=5/2). Egyensúlyi vizsgálatok során a szimmetrikus Al(H₂O)₆³⁺ ill. Al(OH)₄⁻ jelének intenzitása kvantitatíve mérhető, de esetenként további (torzult oktaéderes szerkezetű) részecskék is detektálhatók, így elvégezhető a potenciometrián alapuló modellek "validálása".^{144,145,126,146,147}

³¹P (I = 1/2) Joó Ferenc és mtsai több Rh- és Ru- foszfin komplex – fontos hidrogézőző homogén katalizátor rendszerek – speciációját, szerkezetét derítették fel ¹H és ³¹P NMR spektrumok elemzésével, értelmezték az összefüggést a szelektivitás és a szerkezet között.¹⁴⁸ Svéd együttműködésben bonyolult hetero-poli(peroxo)metallátok részletes egyensúlyi vizsgálatait követően 1D és 2D ³¹P csere-spekroszkópia segítségével a kötések élettartamát tudtuk megbecsülni, a csere-reakciók mechanizmusára tettünk javaslatot.¹³⁹ Az Al(III)-glifozát rendszerben nagyszámú izomert detektáltunk ³¹P NMR-rel, ezek energetikai viszonyait és az izomerizáció mechanizmusát DFT számolásokkal is jellemeztük.¹⁴⁷

³⁵Cl (I=3/2) Brücher és mtsai relaxációs mérésekkel igazolták, hogy a perklorát anion nem képez ionpárt a Lu³⁺ ionnal aceton-víz elegyben.¹²⁰

⁴³Ca (I=7/2) Relaxációs vizsgálatokkal sikerült megállapítanunk, hogy a humán transzglutamináz enzimeknek az ismert kötőhely mellett egy gyengébb kalcium kötőhelye is létezik.¹⁴⁹

⁵¹V (I = 5/2) ⁵¹V NMR-rel megállapítottuk, hogy ionos folyadékokban a vanadát ionok erős kölcsönhatásban vannak az oldószerrel, képesek felbontani a BF₄⁻ aniont és vanádium fluoro komplex képződik.¹⁵⁰

⁷¹Ga (I = 3/2) Hasonlóan a ²⁷Al NMR-hez, a szimmetrikus Ga(H₂O)₆³⁺ ill. Ga(OH)₄⁻ jele jól mérhető, ami pl. lehetővé teszi igen nagy stabilitási állandóknak hidroxid kompetíciós reakció segítségével történő meghatározását. (Tóth, I., Baranyai, Zs. *et al.* közlésre beküldve)

¹⁰³Rh (I = 1/2) Svéd együttműködésben igazoltuk két metastabilis ródium hidroxokomplex szerkezetét oldatban.¹⁵¹

¹⁹⁵Pt (I = 1/2) Stockholmi kollégákkal együtt, egyéb módszerek mellett, ¹⁹⁵Pt NMR spektrumokkal igazoltuk a fém-fém kötést tartalmazó kétmagvú [(CN)₅Pt-Tl(CN)_{n-1}]⁽ⁿ⁻¹⁾⁻ (n= 1-4, I-IV) és hárommagvú [(CN)₅Pt-Tl-Pt(CN)₅]³⁻ (V) komplexek képződését és szerkezetét, valamint ezekből termikus ill. fotoaktiválással előállítható [Pt(CN)₅(H₂O)]⁻ ill. [(CN)₅Pt-Pt(CN)₅]⁴⁻ új komplexek összetételét és szerkezetét oldatban.¹⁵²

²⁰⁵Tl (I = 1/2) A nagyon jó érzékenységű magon végzett mérések alapvető szerepet játszottak a Tl(III)-cianokomplexek egyensúlyi és dinamikai jellemzésében,^{153,124} majd a Pt-Tl fém-fém kötést tartalmazó rendszerek vizsgálataiban. Megállapítottuk, hogy az I-V komplexek valódi reverzibilis egyensúlyi reakciók során képződnek, meghatároztuk a stabilitási állandókat. A fém-fém kötést jelzik a ¹J(¹⁹⁵Pt-²⁰⁵Tl) = 25-71 kHz értékű, rendhagyóan nagy spin-spin csatolási állandók. (A 71 kHz sokáig a legnagyobb ilyen állandó volt!) ¹³CN⁻-dal készült minták segítségével meghatároztuk és értelmeztük a szokatlan ²J(¹³C-²⁰⁵Tl) >> ¹J(¹³C-²⁰⁵Tl) viszonyt. A teljes spin-spin csatolási séma

alapján a komplexek térszerkezete egyértelműen megadható volt.^{154,155,152,156,157} Sikerült az egyszerű Tl³⁺-komplexek szerkezete és ²⁰⁵Tl CSA relaxációs sebességei között is szerkezetfelderítésre alkalmas korrelációt találni.

Köszönetnyilvánítás

A publikáció elkészítését az OTKA (NK-68578, KK-nak; és CK-77515, BGy-nak) illetve a TÁMOP, (4.2.2-08/1-2008-0012, B.I-nak; és 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007, T.I.-nek) támogatta. Utóbbi projekt az Új Magyarország Fejlesztési Terven keresztül az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Hivatkozások

1. Szilágyi, L.; Bognár, R.; Farkas, I. *Carbohydr. Res.* **1973**, *26*, 305-313.
2. Szilágyi, L.; Györgydeák, Z. *Carbohydr. Res.* **1976**, *48*, 159-169.
3. Bognár, R.; Tökés, A. L.; Szilágyi, L. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1975**, *86*, 269-277.
4. Szilágyi, L.; Harangi, J.; Radics, L. *Biophys. Chem.* **1977**, *6*, 201-211.
5. Kónya, L.; Jóna, I.; Kövér, A.; Szilágyi, L. *Studia Biophys.* **1976**, *56*, 39-40.
6. Gáspár, R.; Szilágyi, L.; Damjanovich, S. *Studia Biophys.* **1977**, *62*, 217-222.
7. Szilágyi, L.; Györgydeák, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 427-432.
8. Szilágyi, L. *Mágneses rezonancia*; Kossuth Egyetemi Kiadó: Debrecen, **1977**.
9. Szilágyi, L. *1H-NMR spektrumok*; Kossuth Egyetemi Kiadó: Debrecen, **1979**.
10. Szilágyi, L.; Sándor, P. In *Molekulaspektroszkópia*; Kovács, I.; Szőke, J. Eds.; Akad. Kiadó: Budapest, **1987**; pp. 658-718.
11. Kövér, K. E. *J. Magn. Reson.* **1984**, *59*, 485-488.
12. Kövér, K. E.; Batta, G. *Progr. NMR Spectrosc.* **1987**, *19*, 223-266.
13. Kövér, K. E.; Batta, G. *J. Magn. Reson.* **1988**, *79*, 206-210.
14. Kövér, K. E.; Batta, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5829-5830.
15. Kövér, K. E.; Batta, G. *J. Magn. Reson.* **1986**, *69*, 519-522.
16. Batta, G.; Kövér, K. E.; Madi, Z. *J. Magn. Reson.* **1987**, *73*, 477-486.
17. Kövér, K. E.; Batta, G. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1986**, 647-648.
18. Batta, G.; Kövér, K. E.; Gervay, J.; Hornyak, M.; Roberts, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1336-1345.
19. Kövér, K. E.; Batta, G. *J. Magn. Reson.* **2001**, *150*, 137-146.
20. Batta, G.; Kövér, K. E.; Kowalewski, J. *J. Magn. Reson.* **1999**, *136*, 37-46.
21. Kövér, K. E.; Batta, G.; Hruby, V. J. *J. Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 828-836.
22. Kövér, K. E.; Prakash, O.; Hruby, V. J. *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, *103*, 92-96.
23. Kövér, K. E.; Hruby, V. J.; Uhrin, D. *J. Magn. Reson.* **1997**, *129*, 125-129.
24. Kövér, K. E.; Uhrin, D.; Hruby, V. J. *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 162-168.
25. Uhrin, D.; Batta, G.; Hruby, V. J.; Barlow, P. N.; Kövér, K. E. *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 155-161.
26. Williamson, R. T.; Marquez, B. L.; Gerwick, W. H.; Kövér, K. E. *J. Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 265-273.
27. Kövér, K. E.; Batta, G.; Fehér, K. *J. Magn. Reson.* **2006**, *181*, 89-97.

28. Kövér, K. E.; Ambati, A. K.; Rusakov, Y. Y.; Krivdin, L. B.; Illyés, T.-Z.; Szilágyi, L. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, közlés alatt
29. Kövér, K. E.; Batta, G. *J. Magn. Reson.* **2001**, *151*, 60-64.
30. Kövér, K. E.; Forgó, P. *J. Magn. Reson.* **2004**, *166*, 47-52.
31. Pham, T. N.; Kövér, K. E.; Jin, L.; Uhrin, D. *J. Magn. Reson.* **2005**, *176*, 199-206.
32. Jin, L.; Kövér, K. E.; Lenoir, M. R.; Uhrin, D. *J. Magn. Reson.* **2008**, *190*, 171-182.
33. Kövér, K. E.; Fehér, K. *J. Magn. Reson.* **2004**, *168*, 307-313.
34. Fehér, K.; Berger, S.; Kövér, K. E. *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 340-346.
35. Kövér, K. E.; Batta, G. *J. Magn. Reson.* **2004**, *170*, 184-190.
36. Kövér, K. E.; Batta, G. *J. Magn. Reson.* **1987**, *74*, 397-405.
37. Kövér, K. E.; Batta, G. *J. Magn. Reson.* **1990**, *86*, 384-390.
38. Kövér, K. E.; Batta, G. *J. Magn. Reson.* **1991**, *92*, 152-157.
39. Kövér, K. E.; Batta, G. *J. Magn. Reson.* **1999**, *138*, 89-97.
40. Batta, G.; Bányai, I.; Glaser, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6782-6785.
41. Kövér, K. E.; Batta, G. *Progr. NMR Spectrosc.* **1987**, *19*, 223-266.
42. Szilágyi, L. *Carbohydrate Research* **1983**, *118*, 269-275.
43. Szilágyi, L.; Györgydeák, Z. *Carbohydr. Res.* **1985**, *143*, 21-41.
44. Szilágyi, L.; Györgydeák, Z.; Duddeck, H. *Carbohydr. Res.* **1986**, *158*, 67-79.
45. Szilágyi, L.; Illyés, T. Z.; Györgydeák, Z.; Szabó, G.; Karácsony, A. *Arkivoc* **2004**, 243-252.
46. Szilágyi, L. *Carbohydr. Res.* **1987**, *170*, 1-17.
47. Szilágyi, L.; Pusztahelyi, Z. S.; Jakab, S.; Kovács, I. *Carbohydr. Res.* **1993**, *247*, 99-109.
48. Szilágyi, L.; Pusztahelyi, Z. S. *Magn. Reson. Chem.* **1992**, *30*, 107-117.
49. Szilágyi, L.; Forgó, P. *Carbohydr. Res.* **1993**, *247*, 129-144.
50. Ósz, E.; Szilágyi, L.; Marton, J. *J. Mol. Struct.* **1998**, *442*, 267-274.
51. Ósz, E.; Szilágyi, L.; Marton, J. *J. Mol. Struct.* **1999**, *475*, 295-295.
52. Kövér, K. E.; Fehér, K.; Szilágyi, L.; Borbás, A.; Herczegh, P.; Lipták, A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 393-396.
53. Szilágyi, L.; Illyés, T. Z.; Herczegh, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3901-3903.
54. Májér, G.; Borbás, A.; Illyés, T.-Z.; Szilágyi, L.; Bényei, A.; Lipták, A. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1393-1404.
55. Batta, G.; Lipták, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 248-250.
56. Batta, G.; Kövér, K. E. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1987**, *25*, 125-128.
57. Batta, G.; Lipták, A. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1985**, 368-370.
58. Batta, G.; Kövér, K. E. *Magn. Reson. Chem.* **1988**, *26*, 852-859.
59. Hricovini, M.; Tvaroska, I.; Uhrin, D.; Batta, G. *J. Carbohydr. Chem.* **1989**, *8*, 389-394.
60. Batta, G.; Kövér, K. E. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3535-3544.
61. Batta, G.; Lipták, A.; Schneerson, R.; Pozsgay, V. *Carbohydr. Res.* **1997**, *305*, 93-99.
62. Batta, G.; Kövér, K. E. *Carbohydrate Research* **1999**, *320*, 267-272.
63. Kövér, K. E.; Beke, T.; Lipták, A.; Perczel, A. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 540-550.
64. Batta, G.; Gervay, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 368-374.
65. Kövér, K. E.; Batta, G.; Kowalewski, J.; Ghalebani, L.; Kruk, D. *J. Magn. Reson.* **2004**, *167*, 273-281.
66. Szilágyi, L. *Magy. Kém. Foly.* **2004**, *109-110*, 136-142.
67. Kövér, K. E.; Szilágyi, L.; Batta, G.; Uhrin, D.; Jiménez-Barbero, J. In *Comprehensive Natural Products II. Chemistry and Biology* Mander, L.; Lui, H. Eds.; Elsevier: Oxford, **2010**; pp. 197-246.
68. Collins, N.; FlippenAnderson, J. L.; Haaseth, R. C.; Deschamps, J. R.; George, C.; Kövér, K. E.; Hruby, V. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2143-2152.
69. Nikiforovich, G. V.; Kövér, K. E.; Kolodziej, S. A.; Nock, B.; George, C.; Deschamps, J. R.; Flippen-Anderson, J. L.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 959-969.
70. Qian, X. H.; Shenderovich, M. D.; Kövér, K. E.; Davis, P.; Horvath, R.; Zalewska, T.; Yamamura, H. I.; Porreca, F.; Hruby, V. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7280-7290.
71. Shenderovich, M. D.; Kövér, K. E.; Wilke, S.; Collins, N.; Hruby, V. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5833-5846.
72. Jinfa, Y.; Kövér, K. E.; Gu, X.; Han, G.; Vagner, J.; Xiong, C.; Zhang, J.; Trivedi, D. B.; Kavarana, M.; Hruby, V. J. *Biopolymers* **2003**, *71*, 328-328.
73. Tömböly, C.; Kövér, K. E.; Péter, A.; Tourwe, D.; Biyashev, D.; Benyhe, S.; Borsodi, A.; Al-Khrasani, M.; Ronai, A. Z.; Tóth, G. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 735-743.
74. Hruby, V. J.; Ying, J. F.; Gu, X. Y.; Cai, M. Y.; Vagner, J.; Trivedi, D. B.; Kövér, K. E. *Biopolymers* **2005**, *80*, 584-584.
75. Lovas, S.; Ahmed, S.; Kövér, K. E.; Murphy, R. F. *Biopolymers* **2005**, *80*, 587-587.
76. Agnes, R. S.; Ying, J. F.; Kövér, K. E.; Lee, Y. S.; Davis, P.; Ma, S. W.; Badghisi, H.; Porreca, F.; Lai, J.; Hruby, V. J. *Peptides* **2008**, *29*, 1413-1423.
77. Keresztes, A.; Szűcs, M.; Borics, A.; Kövér, K. E.; Forró, E.; Fülöp, F.; Tömböly, C.; Péter, A.; Pahi, A.; Fábrián, G.; Murányi, M.; Tóth, G. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4270-4279.
78. Tömböly, C.; Ballet, S.; Feytens, D.; Kövér, K. E.; Borics, A.; Lovas, S.; Al-Khrasani, M.; Furst, Z.; Tóth, G.; Benyhe, S.; Tourwe, D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 173-177.
79. Nikiforovich, G. V.; Kövér, K. E.; Zhang, W. J.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3262-3273.
80. Tóth, G.; Kövér, K. E.; Murphy, R. F.; Lovas, S. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 9287-9296.
81. Matter, H.; Szilágyi, L.; Forgó, P.; Marinic, Z.; Klaic, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2212-2223.
82. Fehér, K.; Pristovsek, P.; Szilágyi, L.; Ljevakovic, D.; Tomasic, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3133-3140.
83. Pristovsek, P.; Fehér, K.; Szilágyi, L.; Kidric, J. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1666-1670.
84. Jackson, G. E.; Mabula, A. N.; Stone, S. R.; Gade, G.; Kövér, K. E.; Szilágyi, L.; van der Spoel, D. *Peptides* **2009**, *30*, 557-564.
85. Szilágyi, L.; Sándor, P. *Magn. Reson. Chem.* **1990**, *28*, 963-972.
86. Szilágyi, L.; Fehér, K. *J. Mol. Struct.* **1998**, *471*, 195-207.
87. Batta, G.; Kövér, K. E.; Székely, Z.; Sztaricskai, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2757-2758.
88. Batta, G.; Sztaricskai, F.; Kövér, K. E.; Rudel, C.; Berdnikova, T. F. *J. Antibiotics* **1991**, *44*, 1208-1221.
89. Batta, G.; Cristofaro, M. F.; Sharman, G. J.; Williams, D. H. *Chem. Commun.* **1996**, 101-103.
90. Batta, G.; Sztaricskai, F.; Makarova, M. O.; Gladkikh, E. G.; Pogozheva, V. V.; Berdnikova, T. F. *Chem. Commun.* **2001**, 501-502.
91. Printsevskaya, S. S.; Pavlov, A. Y.; Olsufyeva, E. N.; Mirchink, E. P.; Isakova, E. B.; Reznikova, M. I.; Goldman, R. C.; Branstrom, A. A.; Baizman, E. R.; Longley, C. B.; Sztaricskai, F.; Batta, G.; Preobrazhenskaya, M. N. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1340-1347.
92. Sztaricskai, F.; Batta, G.; Herczegh, P.; Balázs, A.; Jekő, J.; Róth, E.; Szabó, P. T.; Kardos, S.; Rozgonyi, F.; Boda, Z. *J. Antibiotics* **2006**, *59*, 564-582.
93. Pintér, G.; Batta, G.; Kéki, S.; Mándi, A.; Komáromi, I.; Takács-Novák, K.; Sztaricskai, F.; Róth, E.; Ostorházi, E.; Rozgonyi, F.; Naesens, L.; Herczegh, P. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6053-6061.

94. Szilágyi, L. In *Steric Aspects of Biomolecular Interactions*; Náray-Szabó, G.; Simon, K. Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL., 1987; pp. 45-87.
95. Arrowsmith, C. H.; Treat-Clemons, L.; Szilágyi, L.; Pachter, R.; Jardetzky, O. *Makromol. Chem.-Macromol. Symp.* **1990**, *34*, 33-46.
96. Szilágyi, L.; Jardetzky, O. *J. Magn. Reson.* **1989**, *83*, 441-449.
97. Szilágyi, L. *Progr. NMR Spectrosc.* **1995**, *27*, 325-443.
98. Szilágyi, L.; Forgó, P. *Biophys. Chem.* **1991**, *40*, 89-96.
99. El-Joubary, A.; Bruix, M.; Santoro, J.; Cafaro, V.; Scognamiglio, R.; Di Donato, A.; D'Alessio, G.; Kövér, K. E.; Batta, G.; Szilágyi, L.; Rico, M. *J. Biomol. NMR* **1999**, *15*, 265-266.
100. Kövér, K. E.; Bruix, M.; Santoro, J.; Batta, G.; Laurents, D. V.; Rico, M. *J. Mol. Biol.* **2008**, *379*, 953-965.
101. Palczewska, M.; Groves, P.; Ambrus, A.; Kaleta, A.; Kövér, K. E.; Batta, G.; Kuznicki, J. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6229-6237.
102. Palczewska, M.; Groves, P.; Batta, G.; Heise, B.; Kuznicki, J. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 180-184.
103. Palczewska, M.; Batta, G.; Groves, P.; Linse, S.; Kuznicki, J. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 1879-1887.
104. Batta, G.; Barna, T.; Gáspári, Z.; Sándor, S.; Kövér, K. E.; Binder, U.; Sarg, B.; Kaiserer, L.; Chhillar, A. K.; Eigentler, A.; Leiter, E.; Hegedüs, N.; Pócsi, I.; Lindner, H.; Marx, F. *FEBS J.* **2009**, *276*, 2875-2890.
105. Groves, P.; Kövér, K. E.; Andre, S.; Bandorowicz-Pikula, J.; Batta, G.; Bruix, M.; Buchet, R.; Canales, A.; Canada, F. J.; Gabius, H. J.; Laurents, D. V.; Naranjo, J. R.; Palczewska, M.; Pikula, S.; Rial, E.; Strzelecka-Kiliszek, A.; Jimenez-Barbero, J. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 745-748.
106. Kövér, K. E.; Groves, P.; Jimenez-Barbero, J.; Batta, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11579-11582.
107. Fehér, K.; Groves, P.; Batta, G.; Jimenez-Barbero, J.; Muhle-Goll, C.; Kövér, K. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17148-17153.
108. Kövér, K. E.; Wéber, E.; Martinek, T. A.; Monostori, E.; Batta, G. *Chembiochem* **2010**, *11*, 2182-2187.
109. Péntes, K.; Kövér, K. E.; Fazakas, F.; Haramura, G.; Muszbek, L. *J. Thrombosis Haemostasis* **2009**, *7*, 627-633.
110. Murthy, B. N.; Sinha, S.; Suroliá, A.; Jayaraman, N.; Szilágyi, L.; Szabó, I.; Kövér, K. E. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 1758-1763.
111. Pintér, G.; Batta, G.; Horváth, P.; Lóki, I.; Kurtán, T.; Antus, S.; Kéki, S.; Zsuga, M.; Nagy, G.; Aradi, J.; Gunda, T.; Herczegh, P. *Langmuir* **2007**, *23*, 5283-5285.
112. Nagypál, I.; Farkas, E.; Gergely, A. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1975**, *37*, 2145-2149.
113. Gergely, A.; Farkas, E.; Nagypál, I.; Kas, E. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1978**, *40*, 1709-1713.
114. Debreczeni, F.; Nagypál, I. *J. Magn. Reson.* **1980**, *37*, 363-364.
115. Nagypál, I.; Debreczeni, F.; Connick, R. E. *Inorg. Chim. Acta-Articles* **1981**, *48*, 225-231.
116. Fábrián, I.; Nagypál, I. *Inorg. Chim. Acta-Articles* **1982**, *62*, 193-199.
117. Nagypál, I.; Micskei, K.; Debreczeni, F. *Inorg. Chim. Acta-Letters* **1983**, *77*, L161-L163.
118. Brücher, E.; Tóth, I. *Magy. Kém. Foly.* **1978**, *84*, 362.
119. Bodor, A.; Bányai, I.; Tóth, I. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *228*, 175.
120. Brücher, E.; Glaser, J.; Grenthe, I.; Puigdomenech, I. *Inorg. Chim. Acta-F-Block Elem. Articles Lett.* **1985**, *109*, 111-116.
121. Grenthe, I.; Tóth, I. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 2405-2407.
122. Bányai, I.; Glaser, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3186-3194.
123. Bányai, I.; Glaser, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4703-4710.
124. Bányai, I.; Glaser, J.; Losonczy, J. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 5900-5908.
125. Bodor, A.; Bányai, I.; Zékány, L.; Tóth, I. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *228*, 163-173.
126. Bodor, A.; Tóth, I.; Bányai, I.; Zékány, L. S.; Sjöberg, S. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2003**, *67*, 2793.
127. Bányai, I.; Glaser, J.; Read, M. C.; Sandstrom, M. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2423-2429.
128. Tóth, E.; Brücher, E.; Lázár, I.; Tóth, I. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4070.
129. Csajbók, E.; Baranyai, Z.; Bányai, I.; Brücher, E.; Király, R.; Müller-Fahrnow, A.; Platzek, J.; Raduchel, B.; Schafer, M. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 2342-2349.
130. Csajbók, E.; Bányai, I.; Brücher, E. *Dalton Trans.* **2004**, 2152-2156.
131. Györi, B.; Berente, Z. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 1770-1778.
132. Györi, B.; Lazar, I.; Berente, Z.; Kiraly, R.; Benyei, A. *J. Organometall. Chem.* **2004**, *689*, 3567-3581.
133. Farkas, I.; Bányai, I.; Szabó, Z.; Wahlgren, U.; Grenthe, I. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 799-805.
134. Farkas, I.; Grenthe, I.; Bányai, I. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 1201-1206.
135. Budimir, A.; Kalmár, J.; Fábrián, I.; Lente, G.; Bányai, I.; Batinic-Haberle, I.; Birus, M. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 4405-4410.
136. Brücher, E.; Glaser, J.; Tóth, I. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 2239.
137. Bányai, I.; Glaser, J.; Micskei, K.; Tóth, I.; Zékány, L. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 3785.
138. Pettersson, L.; Andersson, I.; Taube, F.; Tóth, I.; Hashimoto, M.; Howarth, O. W. *Dalton Trans.* **2003**, 146.
139. Taube, F.; Andersson, I.; Angus-Dunne, S.; Bodor, A.; Tóth, I.; Pettersson, L. *Dalton Trans.* **2003**, 2512.
140. Farkas, E.; Csóka, H.; Tóth, I. *Dalton Trans.* **2003**, 1645.
141. Andersson, I.; Gorzsás, A.; Kerecsi, C.; Tóth, I.; Pettersson, L. *Dalton Trans.* **2005**, 3658.
142. Bodor, A.; Tóth, I.; Bányai, I.; Szabó, Z.; Hefter, G. T. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 2530.
143. Hefter, G.; Bodor, A.; Tóth, I. *Austral. J. Chem.* **2000**, *53*, 625.
144. Farkas, E.; Kozma, E.; Kiss, T.; Tóth, I.; Kurzak, B. *JCS Dalton Trans.* **1995**, 477.
145. Kiss, T.; Sóvágó, I.; Tóth, I.; Lakatos, A.; Bertani, R.; Tapparo, A.; Bombi, G.; Martin, R. B. *JCS-Dalton Trans.* **1997**, 1967.
146. Józai, R.; Kerekes, I.; Satoshi, I.; Sawada, K.; Zékány, L.; Tóth, I. *Dalton Trans.* **2006**, -, 3221.
147. Purgel, M.; Takács, Z.; Jonsson, C. M.; Nagy, L.; Andersson, I.; Bányai, I.; Pápai, I.; Persson, P.; Sjöberg, S.; Tóth, I. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 1426.
148. Papp, G.; Horváth, H.; Kathó, L.; Joó, F. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 566-573.
149. Ambrus, A.; Bányai, I.; Weiss, M. S.; Hilgenfeld, R.; Keresztessy, Z.; Muszbek, L.; Fésüs, L. *J. Biomol. Struct. Dynamics* **2001**, *19*, 59-+.
150. Bányai, I.; Conte, V.; Pettersson, L.; Silvagni, A. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 5373-5381.
151. Read, M. C.; Glaser, J.; Sandstrom, M.; Tóth, I. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4155.
152. Malariik, M.; Glaser, J.; Tóth, I. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 5452.
153. Blixt, J.; Györi, B.; Glaser, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7784-7791.
154. Berg, K. E.; Glaser, J.; Read, M. C.; Tóth, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7550.
155. Malariik, M.; Berg, K.; Glaser, J.; Sandstrom, M.; Tóth, I. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2910.
156. Malariik, M.; Glaser, J.; Tóth, I.; da Silva, M. W.; Zékány, L. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1998**, 565.
157. Jalilehvand, F.; Malariik, M.; Sandstrom, M.; Mink, J.; Persson, I.; Persson, P.; Tóth, I.; Glaser, J. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3889.

40 years of NMR at the Department of Chemistry, University of Debrecen

This review retraces the history of NMR-related research and education in this institution. The first NMR spectrometer, a 100 MHz Jeol instrument (MH-100) was installed in 1971 at the Department of Organic Chemistry, Lajos Kossuth University (to become later University of Debrecen). Application of the novel technique to solve chemical problems soon started and the first paper on carbohydrate conformational studies was published in 1973. Research in the first decade focused on the structural studies of small organic molecules such as carbohydrates and other products, natural or synthetic in origin. The scope was necessarily limited by the hardware (analog electronics, proton spectra only) and the methodology available (1D measurements) at that time.

Routine service was launched at the same time and the laboratory (operated by a faculty member and a technician, both half-time) got overwhelmed by requests not just from the Organic Chemistry but from other departments of the Faculty of Science, the Medical Faculty, external institutions and from the industry as well.

The need to teach the method to chemistry students soon became evident and a two-semester course was set up and incorporated into the chemistry curricula from the mid-seventies onward. This was aided by two textbooks written by L. Szilágyi, the lecturer of the courses.

Installation of a 200 MHz spectrometer (Bruker WP-200SY) in 1981, also at the Department of Organic Chemistry, marked the beginning of an important new development in NMR-related research, education and service. The multinuclear facility and the 2D methodology that became available with the new instrument significantly extended the scope of all of these activities. Two of the co-authors of the present review (K. E. Kövér and Gy. Batta) joined the group and research was initiated into the development of NMR methodology by devising new pulse sequences and/or improving existing ones for better performance (see below). The next significant step in hardware development was marked by the installation, at the end of 1995, of a 500 MHz spectrometer (Bruker Avance DRX 500), a three-channel device equipped with gradient facility and several probeheads; this was recently upgraded for an Avance-II type. The instrument park was further extended by an AM 360 and an AM 400 instruments, both used; these got also upgraded with DRX-type consoles and the latter one with MAS solid state accessory.

The research topics that have been and are being elaborated upon currently are varied and cover a broad area from pulse sequence development to applications including study of structures and dynamics of a broad spectrum of chemical systems in solution

state. Research into improving NMR experimental techniques is unique to the Debrecen school, other NMR groups in the country being mostly involved in the applications of existing methodology. Methodological developments have been focused to two areas, relaxation techniques and novel methods to measure spin-spin couplings. Thus, improved pulse sequences, based on heteronuclear scalar and dipolar correlation, were proposed to eliminate strong coupling effects in 2D correlation spectra, or to measure heteronuclear NOEs with enhanced sensitivity. New 1D- and 2D pulse sequences were developed to deal with relaxation interference phenomena; this has enabled, i.e., to determine chemical shift anisotropies (CSA) in solution. Several new or improved pulse sequences were devised and tested to measure homo- and heteronuclear scalar coupling constants with enhanced accuracy and sensitivity in solution or in partially ordered systems (residual dipolar couplings). Some of these developments were especially aimed for applications to macromolecular systems, such as the J-modulated TROSY or the recently introduced STD sequences based on isotope-filtering or group-selective saturation to deal with spectral overlap.

On the applications side one of the major areas has been and continues to be a focus of NMR-related research in the Chemistry departments is the study of the structure and dynamics of small to medium sized organic molecules, either synthetic or of natural origin. A huge number of molecules have been investigated during the cover period of this review; carbohydrates, from mono- to oligosaccharides, peptides and various antibiotics deserve special mention. Among large molecular systems we have been studying various aspects of structure and dynamics of proteins and protein – small molecule interaction.

Further NMR-related research in Debrecen pertains to applications in coordination chemistry. Notable achievements include equilibrium dynamics and structural aspects of a large number of various complexes of main group elements and transition metals that have been elucidated using multinuclear NMR techniques. I. Bányai and I. Tóth have to get major credit for the developments in this field.

Members of the NMR group maintain extensive international relationships and are involved in collaborative projects with researchers in Europe, Asia, and overseas. We are participating, since 2009, in the EAST-NMR (FP7) initiative providing transnational access and research expertise in liquid state NMR for research groups in Europe. During the review period some 500 NMR-related papers were published (routine applications excluded) and the aim of this summary was to give a bird's eye view by listing a representative selection of this important output.