

# Analytické hodnotenie mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-izopropylamónium]fumarátu

IVAN MALÍK<sup>1</sup>, FILS ANDRIAMAINTY<sup>1</sup>, EVA SEDLÁROVÁ<sup>1</sup>, JOZEF ČIŽMÁRIK<sup>1</sup>, JANA GALIŠINOVÁ<sup>1</sup>, PETR MOKRÝ<sup>2</sup>, JOZEF CSÖLLEI<sup>2</sup>, JANKA KARLOVSKÁ<sup>3</sup>, MILOŠ LUKÁČ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra farmaceutickej chémie

<sup>2</sup>Veterinárna a farmaceutická univerzita v Brně, Farmaceutická fakulta, Ústav chemických léčiv

<sup>3</sup>Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Laboratórium NMR

<sup>4</sup>Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra chemickej teórie liečiv

Došlo 13. ledna 2011 / Prijato 23. února 2011

## SÚHRN

### Analytické hodnotenie mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-izopropylamónium]fumarátu

Predmetom prezentovanej práce je komplexné spektrálne a fyzikálno-chemické hodnotenie mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-izopropylamónium]fumarátu, potenciálneho ultrakrátko pôsobiaceho  $\beta_1$ -blokátora. Totožnosť študovanej substancie (pracovne označenej ako *UPB-1*) bola potvrdená <sup>1</sup>H- a <sup>13</sup>C-NMR spektrami ako aj IR spektrometriou. Medzi stanovené základné fyzikálno-chemické charakteristiky patrilo určenie teploty topenia, rozpustnosti v spektre rozpúšťadiel, overenie čistoty (adsorpčná chromatografia na tenkej vrstve), určenie povrchovej aktivity (Traubeho stalagmometrická metóda), acidobázické charakteristiky (hodnota  $pK_a$  pomocou alkalimetrickej titrácie), určenie hodnôt  $\log \varepsilon$  s využitím spektrofotometrie v UV/VIS oblasti, ako aj hodnotenie vplyvu kyslého a zásaditého prostredia na stabilitu študovanej látky. Ďalšími experimentálne stanovenými parametrami boli lipohydrofilné charakteristiky pomocou RP-HPLC ( $\log k'$ ), *shake flask* metódou stanovené hodnoty rozdeľovacích koeficientov  $P_{exp}$  (resp.  $\log P_{exp}$ ) v rôznych lipohydrofilných prostrediach. Na základe  $\log P_{exp}$  dát sa predikovala schopnosť látky prechádzať cez hemoencefalickú bariéru. Pre stanovenie obsahu *UPB-1* sa použila RP-HPLC (reversed-phase HPLC) metóda vnútorného štandardu a UV/VIS spektrofotometria pri vlnovej dĺžke 260 nm (vodné prostredie) a 258 nm (prostredie metanolu).

**Kľúčové slová:**  $\beta_1$ -blokátory – analytické hodnotenie – spektrálna a fyzikálno-chemická charakteristika – stanovenie obsahu

Čes. slov. Farm. 2011; 60, 84–93

## SUMMARY

### Analytical evaluation of mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-isopropylammonium]fumarate

The present paper deals with a complex spectral and physicochemical evaluation of mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-isopropylammonium]fumarate, a potential ultra-short acting  $\beta_1$ -blocker. The identity of the substance under study (labelled as *UPB-1*) was confirmed by <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra as well as IR spectrometry. The determined fundamental physicochemical characteristics included the determination of the melting point, solubility in a spectrum of solvents, verification of purity (adsorption thin-layer chromatography), determination of surface activity (Traube's stalagmometric method), acidobasic characteristics ( $pK_a$  value by means of alkalimetric titration), determination of  $\log \varepsilon$  values using spectrophotometry in UV/VIS region, as well as the evaluation of the effect of acid and basic media on the stability of the

#### Adresa pre korešpondenciu

PharmDr. Ivan Malík, PhD.

Katedra farmaceutickej chémie FaF UK

Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika

e-mail: malik@fpharm.uniba.sk

substance under the study. Other experimentally determined parameters were lipohydrophilic characteristics assayed by means of RP-HPLC ( $\log k'$ ), and the shake-flask method was employed to determine the values of the partition coefficients  $P_{\text{exp}}$  (resp.  $\log P_{\text{exp}}$ ) in different lipohydrophilic media. On the basis of  $\log P_{\text{exp}}$  data, the ability of the substance to penetrate the hematoencephalic barrier was predicted. To determine the *UPB-1* content, RP-HPLC (reversed-phase HPLC) method of the internal standard and UV/VIS spectrophotometry at the wavelength of 260 nm (aqueous medium) and 258 nm (methanol medium) were used.

**Key words:**  $\beta_1$ -blockers – analytic evaluation – spectral and physicochemical characteristic – content determination

Čes. slov. Farm. 2011; 60, 84–93

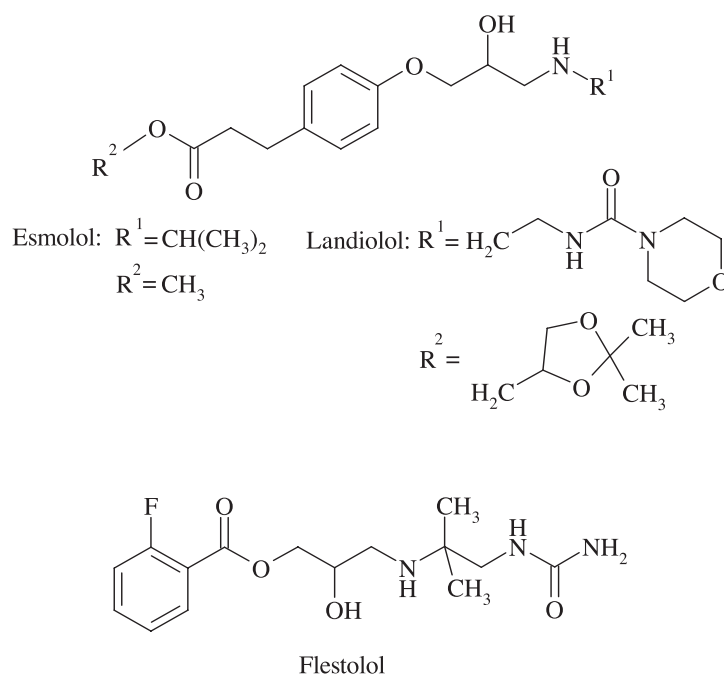
Má

## Úvod

Významné postavenie a s tým súvisiaci benefit  $\beta$ -blokátorov ( $\beta\text{B}$ ) v terapii hypertenzie, akútneho myokardiálneho infarktu ako aj chronického zlyhávania srdca je dlhodobou známa.  $\beta_1$ -Adrenergné antagonisty ( $\beta_1$ -AA), ako napríklad propranolol, sú preto využívané na kontrolu tachyarytmii a hypertenzie na jednotkách intenzívnej starostlivosti.  $\beta\text{B}$  sú pomerne bezpečné, relatívne lacné a účinné v monoterapii alebo aj v kombinácii s diuretikami, antagonistami vápnikových kanálov alebo s  $\alpha$ -blokátorami. Konvenčné  $\beta\text{B}$  sú však kontraindikované u pacientov s astmatickým ochorením a/alebo chronickou obštrukčnou chorobou pľúc kvôli súčasnému  $\beta_2$ -blokujuúcemu pôsobeniu, čo spôsobuje bronchokonstrikciu<sup>1-3</sup>). Okrem toho je ich používanie spojené aj s pomerne širokým spektrom nežiaducich účinkov – bradykardiou, hypotenziou, periférnou vazokonstrikciou, insomniou alebo aj depresiou. Preto sa projekcia nových potenciálnych  $\beta\text{B}$  sústreďuje na štruktúry s „unikátnymi“ metabolickými a farmakokinetickými vlastnosťami s polčasom eliminácie menej ako 10 minút. Zámerom je teda eliminovať už spomínané nežia-

duce účinky relatívne dlho pôsobiacich (rádovo v hodinách)  $\beta\text{B}$  s cieľom dosiahnuť a udržať ich klinickú účinnosť<sup>4</sup>). Prvým extenzívne študovaným a používaným ultrakrátko pôsobiacim  $\beta\text{B}$  bol kardioselektívny esmolol (obr. 1) s polčasom eliminácie 9 minút<sup>5</sup>), ktorý podlieha rýchlej hydrolýze nezávislej od renálnych alebo hepatálnych funkcií, čo je významným aspektom v prípadoch veľmi vážne chorých pacientov s multiorgánovým systémovým zlyhaním<sup>5</sup>). Landiolol (obr. 1), ďalší ultrakrátko pôsobiaci  $\beta\text{B}$ , je rýchlo metabolizovaný sérovými pseudocholinesterázami a karboxyestrázami v pečeni s polčasom eliminácie 4 min<sup>6</sup>). Neselektívny ultrakrátko pôsobiaci  $\beta\text{B}$  fleistolol (pracovný názov ACC-9089 (obr. 1), ktorý je rýchlo metabolizovaný na kyselinu *o*-fluórbenzoovú plazmatickými esterázami, má polčas eliminácie približne 6,5 minút<sup>7</sup>).

Predkladaná práca, analytické hodnotenie mono[ $\{3$ -[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl}-izopropylamónium]fumarátu (pracovne označeného ako *UPB-1*), ktoré bolo doplnené aj o niektoré dôležité a potrebné experimentálne stanovené charakteristiky kyseliny *p*-hydroxybenzoovej (pracovne označenej ako



Obr. 1. Chemická štruktúra najznámejších ultrakrátko pôsobiacich  $\beta$ -blokátorov

*p*-OHBA) ako vstupného reaktantu pri syntéze látky UPB-1, má za cieľ rozšíriť spektrum poznatkov o (potenciálnych) ultrakrátko pôsobiacich  $\beta$ B z hľadiska určenia ich spektrálnych a fyzikálno-chemických parametrov využiteľných nielen v rámci QSAR štúdií ale aj spätne v projekcii nových potenciálnych liečiv.

## POKUSNÁ ČASŤ

### SPEKTRÁLNA ČASŤ

#### <sup>1</sup>H- a <sup>13</sup>C-NMR spektrometria

*Použitá chemikálie:* Deuterovaná voda (rozpušťaadlo), ako vnútorný štandard bol použitý tetradeutero-3-trimetylsilylpropionát (Fluka AG, Buchs, Švajčiarsko; (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCD<sub>2</sub>COONa, *M<sub>r</sub>* = 172,27). Pripravili sa roztoky hodnotenej substancie UPB-1 s koncentráciou 2 mg/650  $\mu$ l D<sub>2</sub>O.

*Prístroje a zariadenia:* NMR spektrometer Varian Gemini 2000 (Varian, New Jersey, USA), magnet Oxford 300 MHz (Oxford, Veľká Británia).

*Parametre pri meraní <sup>1</sup>H-NMR spektier:* Rozsah = 13 – -1 ppm, aktivačný čas = 3 s, počet akvizícií = 32, delay = 1 s, pracovná teplota = 20 °C.

*Parametre pri meraní <sup>13</sup>C-NMR spektier:* Rozsah = 240 – -20 ppm, aktivačný čas = 1,815 s, počet akvizícií = 10 000, delay = 1 s, pracovná teplota = 20 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1,24 (t, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, *J* = 7,0 Hz); 1,29–1,34 (d-d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *J* = 6,5 Hz); 2,96–3,06 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3,24 (kvi, 1H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *J* = 6,4 Hz); 3,56–3,63 (kva, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, *J* = 7,0 Hz); 3,79 (t, 2H, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, *J* = 4,6 Hz); 4,15 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OAr, *J* = 4,7 Hz); 4,22–4,39 (m, 2H, (OH)CHCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>); 4,40–4,50 (m, 1H, CH(OH)); 6,63 (s, 1/2, fumarát, 1H, CH = CH); 6,90; 6,93 (d, 2H, OArH, *J* = 8,8 Hz); 7,56 (broad peak, 3H, (OH), NH<sub>2</sub><sup>+</sup>); 7,94; 7,97 (d, 2H, ArHCOO, *J* = 8,8 Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz)  $\delta$  (ppm): 15,13 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O); 19,30; 19,72 (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 48,05 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 50,47 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>); 65,30; 66,09; 66,90; 67,59; 68,70 ((OH)CHCH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 114,28 (2C, OCArC<sub>2</sub>); 122,08 (1C, ArCCOO); 131,72 (2C, ArC<sub>2</sub>CCOO); 136,12 (fumarát, CH = CH); 162,80 (1C, OArC); 166,06 (COO); 173,11 (fumarát, COO).

#### IR spektrometria

*Prístroje a zariadenia:* Spektrometer FTIR IMPACT 400D (NICOLET), merané technikou kapilárneho filmu alebo v KBr-tabletách v koncentrácii 2–3 mg látky UPB-1/800 mg KBr.

IR cm<sup>-1</sup>:  $\nu_{\text{as}}$ (C–H): 2975;  $\nu_{\text{s}}$ (C–H): 2875;  $\nu$ (C=O): 1704;  $\nu_{\text{as}}$ (C=C): 1606;  $\delta$ (N–H) 1508;  $\delta$ (CH<sub>2</sub>): 1462;  $\nu$ (C–N)<sub>sek. N</sub>: 1353, 1280;  $\nu$ (C–O–C): 1169 (1112);  $\nu$ (C–O)<sub>es</sub>: 1254, 1054;  $\gamma$ (C–H): 765, 659; v IR spektre nebola nepozorovaná vibrácia  $\nu$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>) – predpokladaná

približne okolo 2700;  $\delta$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>): 1600 – 1575 v prekryve;  $\nu$ (C–OH): skryté v oblasti 1450–1500.

#### Spektrofotometria v UV/VIS oblasti

*Použitá chemikálie:* Destilovaná voda, metanol *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR).

*Príprava roztokov:* Pripravili sa roztoky <sup>8)</sup> študovanej látky UPB-1 vo vode a v metanole s *c* = 1  $\times$  10<sup>-5</sup> mol.l<sup>-1</sup> ako aj roztok *p*-OHBA v metanole s *c* = 3  $\times$  10<sup>-5</sup> mol.l<sup>-1</sup>.

*Prístroje a zariadenia:* Analytické váhy Chyo JL-180 (Chyo Balance Corporation, Japonsko), UV/VIS spektrofotometer (8452 A, diode array spectrophotometer, typ Vectra 286/12) s kremennými kvetami hrúbky 1 cm, osobný počítač, vyhodnocovací softvér (HP 845  $\times$  UV-Visible System).

*Pracovný postup:* Absorpčné spektrum UPB-1 sa meralo v destilovanej vode ako aj v metanole, absorpčné spektrum *p*-OHBA bolo merané v metanole. Na základe Lambert-Beerovho zákona sa vypočítali hodnoty  $\epsilon$ , resp. log  $\epsilon$  pre všetky absorpčné maximá v oboch médiách.

UPB-1, vodné prostredie – UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm (absorbancia; log  $\epsilon$ ): 198 (1,17790; 5,07), 260 (0,76744; 4,89). UPB-1, metanolové prostredie – UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm (absorbancia; log  $\epsilon$ ): 210 (0,86716; 4,94), 258 (0,90437; 4,96). *p*-OHBA, metanolové prostredie – UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm (absorbancia; log  $\epsilon$ ): 214 (0,74230; 4,39), 252 (1,09170; 4,56).

### ANALYTICKÁ ČASŤ

#### Stanovenie teploty topenia

*Prístroje a zariadenia:* STUART SMP 11 (Lennox Laboratory Suppliers, Dublin, Írsko).

*Pracovný postup:* Teplota topenia UPB-1 bola stanovená po 24-h sušení v exsikatore nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> pri tlaku 10 kPa a laboratórnej teplote, jej nekorigované hodnoty sú uvedené v tabuľke 1.

#### Stanovenie rozpustnosti

*Použitá chemikálie:* Destilovaná voda, metanol *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR), lieh 96 % (Lachema, Brno, ČR), kyselina chlorovodíková s *c* = 0,1 mol.l<sup>-1</sup> (CentralChem, Bratislava, SR), hydroxid sodný s *c* = 0,1 mol.l<sup>-1</sup> (CentralChem, Bratislava, SR), chloroform *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR), acetón *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR), dietyléter *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR), dimetylsulfoxid *p.a.* (Lachema, Brno, ČR).

*Prístroje a zariadenia:* Analytické váhy Chyo JL-180 (Chyo Balance Corporation, Japonsko).

*Pracovný postup:* Rozpustnosť študovanej látky UPB-1 a *p*-OHBA bola stanovená <sup>9)</sup> podľa SL 1. Náväžok látky, resp. látok predstavoval jednotlivo 0,0100 g pre všetky rozpúšťadlá. Postupne sa hodnotila ich rozpustnosť v destilovanej vode, v metanole, v liehu 96 %, v kyseline chlorovodíkovej s *c* = 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, v hydroxide

Tab. 1. Základná charakteristika mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-izopropylamónium]fumarátu (pracovné označenie UPB-1)

Sumárny vzorec (báza)	$M_r$ (báza)	Sumárny vzorec (soľ)	$M_r$ (soľ)	$t_f$ (°C)
$C_{17}H_{27}NO_5$	325,41	$C_{25}H_{35}NO_{13}$	766,89	104–106

sodnom s  $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ , v chloroforme, v acetóne, v dietyléteri a v dimetylsulfoxide pri laboratórnej teplote. Objem pridávaných rozpúšťadiel bol adekvátne upravený vzhľadom na zvolený návažok.

#### Stanovenie hodnoty $R_f$ pomocou adsorpčnej chromatografie na tenkej vrstve

**Použité chemikálie:** Lieh 96 % (Lachema, Brno, ČR), benzén *p.a.* (Lachema, Brno, ČR), dietylamin *p.a.* (Merck, Schudart, SRN), petroléter *p.a.* (Lach-Ner, Neratovice, ČR), dietyléter *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR), acetón *p.a.* (Spolchim, Bratislava, SR), propán-1-ol *p.a.* (Plichem, Darmstadt, SRN), cyklohexán *p.a.* (Lach-Ner, Neratovice, ČR), chloroform *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR), toluén *p.a.* (Lachema, Brno, ČR), etylacetát *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR).

**Materiál, prístroje a zariadenia:** Silufol® UV<sub>254</sub> s vrstvou silikagélou s rozmermi 200 × 200 mm (nastrihaný na vhodne veľké časti), sklenené komory s rozmermi 190 × 180 × 80 mm, mikrokapilára (Hamilton Bonaduz, Švajčiarsko), UV-lampa (KRUS UV 240, 230VAC, Hamburg, SRN).

**Pracovný postup:** Na komerčne vyrábané fólie Silufol® UV<sub>254</sub> s vrstvou silikagélou sa na vyznačený štart mikrokapilárou naniesli 2  $\mu\text{l}$  1 % roztoku hodnotenej zlúčeniny UPB-1 a „štandardu“ *p-OHBA* v metanole *p.a.* Po ukončení vyvíjania sa chromatogramy sušili pri laboratórnej teplote a detegovali sa pod UV-lampou pri vlnovej dĺžke 254 nm<sup>8)</sup>. Výsledné hodnoty sú priemerom zo šiestich paralelných stanovení (pozri časť *Výsledky a diskusia*).

Skúšanými vyvíjacími sústavami boli:  $S_1$ : petroléter : dietyléter ( $\varphi = 1 : 2$  ako aj  $2 : 1$ );  $S_2$ : acetón : petroléter ( $\varphi = 2 : 3$ );  $S_3$ : acetón : toluén ( $\varphi = 1 : 2$ );  $S_4$ : acetón : toluén : dietylamin : chloroform ( $\varphi = 1 : 2 : 0,5 : 1$ );  $S_5$ : petroléter : dietylamin ( $\varphi = 8 : 2$  ako aj  $8 : 3$ );  $S_6$ : propán-1-ol : cyklohexán ( $\varphi = 1 : 1$ );  $S_7$ : etanol : benzén ( $\varphi = 10 : 3$ );  $S_8$ : chloroform : dietylamin ( $\varphi = 6 : 0,1$ );  $S_9$ : propán-1-ol : cyklohexán : dietylamin ( $\varphi = 5 : 5 : 0,1$  ako aj  $5 : 5 : 1$ );  $S_{10}$ : acetón : petroléter : dietylamin ( $\varphi = 8 : 8 : 0,1$  ako aj  $8 : 8 : 1$ );  $S_{11}$ : etanol : benzén : dietylamin ( $\varphi = 10 : 3 : 0,1$ );  $S_{12}$ : chloroform : cyklohexán : dietylamin ( $\varphi = 6 : 3 : 1$ );  $S_{13}$ : hexán : etylacetát ( $\varphi = 7 : 3$ ). Najoptimálnejšie hodnoty  $R_f$  pre UPB-1 a *p-OHBA* boli získané v sústave  $S_{11}$ .

#### Stanovenie povrchového napätia

**Použité chemikálie:** Destilovaná voda, metanol *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR).

**Prístroje a zariadenia:** Analytické váhy Chyo JL-180 (Chyo Balance Corporation, Japonsko), sklenený Traubeho stalagmometer (Kavalier, ČR).

**Pracovný postup:** Povrchové napätie UPB-1 bolo stanovené, podobne ako v práci<sup>8)</sup>, nepriamou stalagmometrickou metódou počítania kvapiek. Použitý bol sklenený Traubeho stalagmometer (Kavalier, ČR). Pripravil sa roztok UPB-1 s  $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ . Ako referenčná kvapalina sa použila destilovaná voda, ktorej povrchové napätie je  $0,07259 \text{ N.m}^{-1}$  pri teplote  $t = 21 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### Stanovenie disociačnej konštanty

**Použité chemikálie:** Destilovaná voda, hydroxid sodný s  $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  (CentralChem, Bratislava, SR), metanol *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR).

**Prístroje a zariadenia:** Analytické váhy Chyo JL-180 (Chyo Balance Corporation, Japonsko), automatická byreta OP 930, digitálny pH-meter (HANNH Instruments HI 221, SRN), mikropipeta, elektromagnetické miešadlo (Laboratorní přístroje, Praha, ČR).

**Príprava roztokov:** Roztok hodnotenej látky UPB-1 bol pripravený rozpustením 0,025 g substancie v destilovanej vode na objem 50,0 ml; *p-OHBA* bola rozpustená (0,025 g) v zmesi destilovaná voda : metanol ( $\varphi = 3 : 2$ ) na objem 50,0 ml.

**Pracovný postup:** Disociačná konštantá UPB-1 (ako aj *p-OHBA*) bola stanovená potenciometricky alkalimetrickou titráciou pomocou automatickej byrety OP 930 spojennej s digitálnym pH-metrom. Konštantný prídavok odmerného roztoku hydroxidu sodného s  $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  predstavoval 0,005 ml. Titrácia prebiehala pri teplote 21  $^\circ\text{C}$ . Zaznamenali sa hodnoty pH titrovaného roztoku, resp. roztokov v závislosti od pridaného množstva hydroxidu sodného. Po ukončení titrácie sa interpolačným stupňom podľa Hahna zistila presná spotreba odmerného roztoku a hodnota pri polovičnej spotrebe<sup>8)</sup>. Z priebehu potenciometrickej titrácie sa podľa vhodnej polynomickej funkcie v programe Statistica 8.0 (Stat Soft, Tulsa, USA) pomocou

Tab. 2. Retenčný faktor  $k'$  študovanej substancie UPB-1 a *p*-OHBA získaný z RP-HPLC v prostredí 90% metanolu

Pracovné označenie		$k'$				log $k'$			
UPB-1	I.*	II.	III.	Priemer	I.	II.	III.	Priemer	
	0,85	0,85	0,85	0,85	-0,071	-0,071	-0,071	-0,071	
<i>p</i> -OHBA	0,01	0,01	0,01	0,01	-2,153	-2,153	-2,153	-2,153	

\*číslo merania

Tab. 3. Retenčný faktor  $k'$  študovanej substancie UPB-1 a *p*-OHBA získaný z RP-HPLC v prostredí 95% metanolu

Pracovné označenie		$k'$			log $k'$				
UPB-1	I.*	II.	III.	priemer	I.	II.	III.	priemer	
	1,03	1,03	1,03	1,03	0,015	0,015	0,015	0,015	
<i>p</i> -OHBA	0,32	0,32	0,32	0,32	-2,643	-2,643	-2,643	-2,643	

\*číslo merania

$V_{1/2}$  vypočítala disociačná konštanta. Výsledná hodnota  $pK_a$  pre UPB-1 ako aj *p*-OHBA v časti Výsledky a diskusia je prezentovaná ako priemer troch paralelných stanovení.

#### Stanovenie logaritmu retenčného faktora $k'$ z RP-HPLC

**Použité chemikálie:** Dusitan sodný s  $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ , metanol *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR), natriumacetát (Lachema, Brno, ČR) na úpravu hodnoty pH mobilnej fázy.

**Prístroje a zariadenia:** Chromatograf s vysokotlakovou pumpou Delta Chrom SDS 030, (WATREX, SR), slučkový dávkovač s 20- $\mu\text{l}$  slučkou (WATREX, SR), kolóna s nepolárnou chemicky viazanou fázou Separon SGX C<sub>18</sub> 7  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4 mm (Lachema, Brno, ČR), prietokový UV-detektor Delta Chrom UVD 200 (WATREX, SR).

**Pracovný postup:** Hodnota retenčného faktora  $k'$  (v literatúre uvádzaný aj ako kapacitný faktor  $k'$ ) bola stanovená podľa práce<sup>10)</sup> na kvapalinovom chromatografe s vysokotlakovou pumpou, so slučkovým dávkovačom, nepolárnou chemicky viazanou fázou a prietokovým UV-detektorom. Pre študovanú látku UPB-1 a „štandard“ *p*-OHBA boli použité dve mobilné fázy s rozdielnym percentuálnym zastúpením metanolu, t.j. 90 % a 95 % (pripravené z metanolu *p. a.* a destilovanej vody).

##### Chromatografické podmienky:

A. Mobilná fáza (pH = 6,0) – 90 % metanol upravený vodným roztokom natriumacetátu; prietoková rýchlosť – 0,6 ml.min<sup>-1</sup>; tlak – 7,9 MPa; vlnová dĺžka – 260 nm; pracovná teplota – 21 až 22 °C.

B. Mobilná fáza (pH = 6,0) – 95 % metanol upravený vodným roztokom natriumacetátu; prietoková rýchlosť – 0,6 ml.min<sup>-1</sup>; tlak – 5,9 MPa; vlnová dĺžka – 260 nm; pracovná teplota – 21 až 22 °C.

Mŕtvy čas kolóny ( $t_0$ ) sa stanovil roztokom dusitanu sodného s  $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ , ktorý mal v použitom systéme nulovú retenciu. Hodnota(-y) log  $k'$  boli vypočítané zo

vzťahu:  $\log k' = \log [(t_R - t_0) / t_0]$ , kde  $t_0$  je retenčný čas roztoku dusitanu sodného s  $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  a  $t_R$  je retenčný čas roztoku vzorky<sup>10)</sup>.

Roztoky UPB-1 a *p*-OHBA boli pripravené rozpustením 0,005 g príslušnej substancie v metanole a upravené na objem 25,0 ml. Po odvzdušnení mobilnej fázy bol chromatografický systém premývaný približne 20 min. Prvé dva nástreky bol roztok dusitanu sodného, potom sa aplikovali roztoky študovaných látok (20  $\mu\text{l}$ ). Každá vzorka bola aplikovaná trikrát<sup>10)</sup>, pre výpočet sa použila priemerná hodnota  $t_R$ . Získané hodnoty sú uvedené v tabuľkách 2 a 3.

#### Stanovenie rozdeľovacieho koeficientu a výpočet niektorých molekulových deskriptorov

**Použité chemikálie:** Oktán-1-ol *p.a.* (Merck, Schuhardt, SRN), heptán *p.a.* (Mikrochem, Bratislava, SR), cyklohexán *p.a.* (Lach-Ner, Neratovice, ČR), roztok kyseliny citrónovej s  $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  (Chemapol, Praha, ČR), hydrogenfosforečnan disodný *p.a.* s  $c = 0,2 \text{ mol.l}^{-1}$  (Lachema, Brno, ČR).

**Prístroje a zariadenia:** Analytické váhy Chyo JL-180 (Chyo Balance Corporation, Japonsko), mechanická trepačka (Laboratórní přístroje, Praha, ČR), UV/VIS spektrofotometer (pozri UV/VIS spektrofotometriu).

**Priprava roztokov:** Tlmivý roztok s hodnotou pH = 7,2 sa pripravil zmiešaním 20,8 ml roztoku kyseliny citrónovej a 195,2 ml roztoku hydrogenfosforečnanu disodného, a potom sa hodnota pH upravila na 7,4. Základný roztok skúšanej látky UPB-1 sa pripravil navážením 0,100 g zlúčeniny a preniesol sa do 50-ml odmernej banky. Rozpustil sa v 30–40 ml tlmivého roztoku<sup>8, 10)</sup> a po ochladení sa doplnil týmto roztokom na objem 50 ml.

**Pracovný postup:** Rozdeľovací koeficient  $P_{\text{exp}}$  študovanej zlúčeniny UPB-1 bol stanovený experimentálne klasickou *shake flask* metódou jej vytrepaním medzi dve nemiešateľné fázy tak, ako sa postupovalo aj v prácach<sup>8, 10)</sup>. Lipofilnú fázou reprezentoval postupne oktán-1-ol, heptán, cyklohexán a ako vodná fáza bol použitý tlmivý fosforečnanový roztok (TFR) s hodnotou

$pH = 7,4$ . U analyzovanej substance *UPB-1* sa vykonali v každom deliacom systéme tri paralelné stanovenia.

**Výpočet niektorých molekulových deskriptorov.** Hodnota polárneho povrchu molekuly (PSA) a počtu akceptorov vodíkov ( $n_{acc}$ ) pre *UPB-1* (forma bázy) bola generovaná programom ChemBioDraw Ultra 11 (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, USA); PSA = 77,02;  $n_{acc} = 6$ .

#### Stabilita študovanej substance *UPB-1*

##### **Pôsobenie kyslého prostredia (kyselina chlorovodíková $s\ c = 0,1\ mol.l^{-1}$ )**

**Použité chemikálie:** Metanol *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR), lieh 96 % *p.a.* (Lachema, Brno, ČR), benzén *p.a.* (Lachema, Brno, ČR), dietylamin *p.a.* (Merck, Schudart, SRN).

**Pracovný postup:** Pripravilo sa 5 ml 1 % metanolového(-ých) roztoku(-ov) *UPB-1* a „štandardu“ *p-OHBA*, z ktorých sa odobral 1 ml, pridal sa 1 ml kyseliny chlorovodíkovej  $s\ c = 0,1\ mol.l^{-1}$ . Po 5 min sa roztoky hodnotili chromatograficky na TLC. Na fóliu Silufol UV<sub>254</sub> sa 1,5 cm od spodného okraja nanieslo 5  $\mu$ l roztokov *UPB-1* a *p-OHBA*. Po vyvinutí vo vyvíjacej sústave  $S_{11}$  sa chromatogram vysušil a detegoval pod UV-lampou pri 254 nm. Získané hodnoty  $R_f$  (priemer troch paralelných stanovení) sú uvedené v tabuľke 4.

Tab. 4. Hodnotenie stability *UPB-1* v kyslom a zásaditom prostredí pomocou adsorpčnej TLC

Pracovné označenie	Prostredie HCl* ( $c = 0,1\ mol.l^{-1}$ )	Prostredie NaOH* ( $c = 0,1\ mol.l^{-1}$ )
<i>UPB-1</i>	0,34	0,32
<i>p-OHBA</i>	0,69	0,65
X1	0,49	0,45
X2	0,83	0,81

\*hodnoty  $R_f$  určené v sústave  $S_{11}$ : etanol : benzén : dietylamin ( $\phi = 10 : 3 : 0,1$ )

##### **Pôsobenie zásaditého prostredia (hydroxid sodný $s\ c = 0,1\ mol.l^{-1}$ )**

**Pracovný postup:** Rovnako ako v prípade hodnotenia stability v kyslom prostredí, ale namiesto kyseliny chlorovodíkovej  $s\ c = 0,1\ mol.l^{-1}$  sa použil hydroxid

sodný s rovnakou koncentráciou. Získané hodnoty  $R_f$  (priemer troch paralelných stanovení) sú uvedené v tabuľke 4.

#### **Pôsobenie UV/VIS žiarenia**

**Pracovný postup:** Pripravil sa vodný a metanolový roztok *UPB-1*  $s\ c = 1 \times 10^{-5}\ mol.l^{-1}$ . V priebehu 1 h sa v 5-min intervaloch sledovali (prípadné) posuny vo vlnových dĺžkach absorpčných maxim ako aj (prípadné) zmeny v absorbanciách pri jednotlivých absorpčných maximách v obidvoch zvolených prostrediach.

#### **Stanovenie obsahu *UPB-1***

##### **Stanovenie obsahu *UPB-1* v UV/VIS oblasti spektra**

**Prístroje a zariadenia:** Pozri UV/VIS spektrofotometriu.

**Pracovný postup:** Pripravil sa 0,002 % roztok, resp. roztoky *UPB-1* vo vode ako aj v metanole, ktorých spektrum sa zaznamenalo v oblasti 190–400 nm proti čistému rozpúšťadlu. Zo zásobného roztoku (0,002 %) *UPB-1* sa odpipetovalo postupne 2, 4, 6, 8, 10 ml do piatich 10-ml odmerných baniek. Všetky odmerné banky sa doplnili po značku vodou, resp. metanolom a zaznamenala sa absorbancia takto pripravených roztokov<sup>8)</sup>. Z nameraných hodnôt  $A$  ( $\log A$ ) sa zostrojila kalibračná krivka; vo vodnom prostredí pri vlnovej dĺžke  $\lambda_{max} = 260\ nm$ , v metanolovom prostredí pri  $\lambda_{max} = 258\ nm$ . Hodnoty koncentrácií, absorbancií a  $\log A$  sú uvedené v tabuľke 5.

**Vyhodnotenie výsledkov:** Obsah *UPB-1* sa stanovil z funkcie priamky ( $y = a x + b$ ). Po zostrojení kalibračnej krivky a štatistickom vyhodnotení jednotlivé symboly znamenajú:  $y = A$  (absorbancia),  $b = a_0$  (úsek na osi  $y$ ),  $a = a_1$  (smernica priamky),  $x = c$ . Z týchto vzťahov vyplýva, že koncentrácia sa vypočíta podľa vzťahu:  $c = (A - a_0)/a_1$ .

##### **Stanovenie obsahu *UPB-1* RP-HPLC metódou vnútorného štandardu**

**Použité chemikálie:** Metanol UV (Lachema, Brno, ČR), natriumacetát tavený čistý (Spolana, Neratovice, ČR), vnútorný štandard – *p-OHBA*.

**Prístroje a zariadenia:** Pozri stanovenie retenčného faktora  $k'$  pomocou RP-HPLC.

**Chromatografické podmienky:** Mobilná fáza ( $pH = 6,0$ ) – 90 % metanol upravený roztokom natriumacetátu;

Tab. 5. Parametre potrebné na zostrojenie kalibračnej krivky pre stanovenie obsahu *UPB-1* vo vodnom a metanolovom prostredí pomocou UV/VIS spektrometrie

$c\ (mol.l^{-1})$	Destilovaná voda			Metanol		
	$\lambda\ (nm)$	$A$	$\log A$	$\lambda\ (nm)$	$A$	$\log A$
$5,200 \times 10^{-6}$	260	0,21428	-0,66902	258	0,23018	-0,63793
$1,040 \times 10^{-5}$	260	0,43454	-0,36197	258	0,45654	-0,34052
$1,560 \times 10^{-5}$	260	0,61581	-0,21055	258	0,68297	-0,16560
$2,080 \times 10^{-5}$	260	0,82121	-0,08555	258	0,89954	-0,04598
$2,607 \times 10^{-5}$	260	1,04250	0,01808	258	1,10730	0,04427

Tab. 6. Parametre potrebné na zostrojenie kalibračnej krivky pre stanovenie obsahu UPB-1 pomocou RP-HPLC

V* (ml)	c (mol.l <sup>-1</sup> )	P <sub>1</sub> (UPB-1)**	P <sub>2</sub> (p-OHBA)**	P <sub>1</sub> /P <sub>2</sub>
1	4,1726 × 10 <sup>-5</sup>	2412,0939	5954,6342	0,405078
2	8,3452 × 10 <sup>-5</sup>	4606,6765	6002,8474	0,767415
3	1,2518 × 10 <sup>-4</sup>	8857,8866	6026,6103	1,469796
4	1,6691 × 10 <sup>-4</sup>	12062,7966	6127,9547	1,968487
6	2,5036 × 10 <sup>-4</sup>	17551,8224	6120,5693	2,867678

\*objem pridaného základného roztoku UPB-1 (0,02 g/25 ml)

\*\*plocha príslušných píkov formovaných UPB-1 (P<sub>1</sub>) a p-OHBA (P<sub>2</sub>)

prietoková rýchlosť – 0,6 ml.min<sup>-1</sup>; tlak – 7,7 MPa; vlnová dĺžka – 248 nm; pracovná teplota – 21 °C.

**Pracovný postup:** Pripravil sa roztok UPB-1 navážením množstva 0,02 g substancie, ktoré sa kvantitatívne prenieslo do 25-ml odmernej banky a rozpustilo sa v metanole (zásobný roztok). Z tohto zásobného roztoku sa odpipetovalo do 25-ml odmerných baniek postupne po 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 ml, pridalo sa 5 ml vnútorného štandardu (pripraveného navážením 0,01 g p-OHBA, ktoré sa kvantitatívne prenieslo do 25-ml odmernej banky a doplnilo sa po značku metanolom) a doplnilo sa metanolom po značku <sup>10</sup>. Pomocou dávkovacieho ventilu sa z takto pripravených roztokov na kolónu nanášal objem 20 µl.

**Vyhodnotenie výsledkov:** Z pamäti počítača bol vyvolaný záznam analýzy vzorky, integrovali a opísali sa plochy zodpovedajúce analyzovanej látke (P<sub>1</sub>) a jej vnútornému štandardu (P<sub>2</sub>). Výsledky analýz <sup>10</sup> sa vypočítali z pomeru plôch píkov P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> (tab. 6).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnotená zlúčenina s pracovným označením UPB-1, chemicky mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-izopropylamónium]fumarát, bola pripravená na ústave chemických liečiv FaF VFU v Brne. Ide o bielu kryštalickú látku, ktorej chemická štruktúra, sumárny vzorec (bázická forma ako aj forma soli), M<sub>r</sub> a interval teploty topenia (nekorigovaná hodnota) sú uvedené v tabuľke 1. Súbežne s UPB-1 bola pre porovnanie študovaná aj kyselina p-hydroxybenzoová (p-OHBA) ako vstupná reagentka použitá pri syntéze UPB-1.

Chemická štruktúra UPB-1 bola potvrdená príslušnými spektrálnymi metódami. V <sup>1</sup>H- a <sup>13</sup>C-NMR spektre boli identifikované signály, ktoré prislúchali alkylovým reťazcom, resp. jednotlivým atómom uhlíka v lipofilnej časti ako aj v bázickej oblasti molekuly. Taktiež bol identifikovaný a priradený signál protónu OH-skupiny (v 2-hydroxypropán-1,3-diolovom zoskupení), signály protónov aromatického jadra ako aj signály, ktoré identifikovali aniónovú zložku – fumarát (pozri spektrálnu charakteristiku v *Pokusnej časti*). Pomocou IR spektrometrie bola potvrdená prítomnosť alkylového substituenta, lipofilného aromatického jadra, karboxylovej, resp. oxoskupiny a bázického fragmentu. Pás IR spektra valenčnej vibrácie (C = O)-sku-

piny pri 1704 cm<sup>-1</sup> sa môže pri UPB-1 využiť pre kvantitatívne hodnotenie.

Na základe štúdia rozpustnosti je UPB-1 relatívne hydrofilná – je veľmi ľahko rozpustná v kyseline chlorovodíkovej s c = 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, ľahko rozpustná v destilovanej vode, v hydroxide sodnom s c = 0,1 mol.l<sup>-1</sup> a v dimetylsulfoxide, mierne rozpustná v metanole, v liehu 96 % a v chloroforme a veľmi ťažko rozpustná v acetóne a v dietyléteri. Na porovnanie ako aj z pohľadu ďalšieho fyzikálno-chemického hodnotenia bola určená aj rozpustnosť p-OHBA. Tá je veľmi ľahko rozpustná v metanole, v liehu 96 %, v dimetylsulfoxide a v acetóne, ľahko rozpustná v dietyléteri a v hydroxide sodnom s c = 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, mierne rozpustná v kyseline chlorovodíkovej s c = 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, ťažko rozpustná v destilovanej vode a v chloroforme.

Na orientačné hodnotenie čistoty UPB-1 bola okrem RP-HPLC použitá adsorpčná chromatografia na tenkej vrstve – delenie látok na adsorpčnom princípe sa uskutočnilo na platniach Silufolu®, vyvíjanie prebiehalo do vzdialenosti 10 cm. Súčasne s UPB-1 bola chromatograficky hodnotená aj p-OHBA. Z mnohých vyskúšaných dvoj- a trojzložkových vyvíjajúcich sústav bola ako najvhodnejšia vyhodnotená sústava S<sub>11</sub>: etanol : benzén : dietylamin (φ = 10 : 3 : 0,1). V systéme S<sub>11</sub> nastalo jednoznačné oddelenie ohraničených škvŕn prislúchajúcich UPB-1 (R<sub>f</sub> = 0,29) a p-OHBA (R<sub>f</sub> = 0,58), pričom na príslušnom „stĺpci“ UPB-1 neboli pozorované iné škvŕny.

Povrchové napätie bolo študované nepriamou Traubeho stalagmometrickou metódou počítania kvapiek – UPB-1 (γ = 0,06954 N.m<sup>-1</sup>) ako aj p-OHBA (γ = 0,06969 N . m<sup>-1</sup>) boli mierne povrchovoaktívne, pričom povrchovoaktívnejšia bola substancie UPB-1.

Na štúdium acidobázických vlastností bola použitá metóda alkalimetrickej titrácie (roztok hydroxidu sodného s c = 0,1 mol.l<sup>-1</sup>) pri potenciometrickej indikácii bodu ekvivalencie. Študovaná zlúčenina UPB-1 mala mierne kyslý charakter (pK<sub>a</sub> = 5,71), pre porovnanie (resp. určitú „verifikáciu“ stanovenia pK<sub>a</sub>) bola určená aj disociačná konštanta p-OHBA, ktorej hodnota predstavovala 4,38 (tri paralelné stanovenia); literatúra <sup>11, 12</sup> uvádza údaj 4,48–4,54.

Pri štúdiu spektier v UV/VIS oblasti vykazovala UPB-1 dve absorpčné maximá (viď Pokusná časť). Vo vodnom roztoku sú to maximá pri λ<sub>1max</sub> = 198 nm a λ<sub>2max</sub> = 260 nm, v prostredí metanolu nastal mierny posun – absorpčné maximá boli zistené pri λ<sub>1max</sub> = 210 nm a λ<sub>2max</sub> = 258 nm. V porovnaní s absorpč-

Tab. 7. Parametre lineárnej regresie pre stanovenie obsahu UPB-1

Metóda stanovenia	$a (\pm s_a)$	$b (\pm s_b)$	$F$	$n$
UV/VIS spektrofotometria (vodné prostredie)	39187 ( $\pm$ 683)	0,01 ( $\pm$ 0,01)	3288	5
UV/VIS spektrofotometria (metanolové prostredie)	42139 ( $\pm$ 514)	0,02 ( $\pm$ 0,01)	6728	5
RP-HPLC	12142 ( $\pm$ 596)	-0,13 ( $\pm$ 0,09)	415	6

$a$  – regresný koeficient, smernica priamky;  $b$  – regresný koeficient, posunutie priamky na osi  $y$ ;  $s_a$ ,  $s_b$  – smerodajná odchýlka regresného koeficienta  $a$  alebo  $b$ ;  $F$  –  $F$ -test na testovanie štatistických hypotéz (štatistická indukcia);  $n$  – počet prípadov

ným spektrom  $p$ -OHBA (absorpčné maximá pri  $\lambda_{1\max} = 214$  nm a  $\lambda_{2\max} = 252$  nm v metanole) je možné pozorovať mierny posun obidvoch maxim, ktorý je spôsobený charakterom substituenta na hydroxylovej skupine v  $p$ -polohe aromatického jadra ako aj substitúciou v esterovej časti molekuly.

Ako experimentálne stanovené parametre lipofility látky UPB-1 a  $p$ -OHBA boli určené retenčné faktory  $k'$ , resp.  $\log k'$  v sústavách s rozdielnym percentuálnym zastúpením metanolu ako súčasťou mobilnej fázy a rozdeľovacie koeficienty v troch rozdielnych rozdeľovacích systémoch. Rozdielna miera lipofility UPB-1 a  $p$ -OHBA sa odzrkadlila v hodnotách  $\log k'$  v oboch systémoch (viď tab. 2 a 3); v 90 % metanole boli zistené takéto retenčné charakteristiky:  $\log k'_{UPB-1} = -0,071$ ;  $\log k'_{p-OHBA} = -2,153$ ; v 95% metanole boli získané tieto údaje:  $\log k'_{UPB-1} = 0,015$ ;  $\log k'_{p-OHBA} = -2,643$ .

Hodnoty  $\log P_{\text{exp}}$  pre UPB-1 boli určené klasickou *shake flask* metódou; pre určenie koncentrácie látky vo vodnej fáze sa využila UV/VIS spektrofotometria. V rozdeľovacom systéme oktán-1-ol/TFR (oktán-1-ol je amfiprotný  $H$ -donor a  $H$ -akceptor) predstavoval  $\log P_{\text{exp}}$  hodnotu 1,70; v sústave heptán/TFR bola hodnota  $\log P_{\text{exp}} = 1,66$ ; a v systéme cyklohexán/TFR  $\log P_{\text{exp}} = 1,62$  (cyklohexán je relatívne inertným médiom oproti vodnému prostrediu, resp. TFR). Kyselina  $p$ -hydroxybenzoová je látkou hydrofilnejšou s  $\log P_{\text{exp}} = 1,37$ . Tento údaj bol prevzatý z literatúry<sup>13)</sup>, keďže nebolo možné korektne  $p$ -OHBA rozpustiť v destilovanej vode, a tak stanoviť jej  $\log P_{\text{exp}}$  spôsobom *shake flask*.

V rámci projekcie a komplexného štúdia potenciálneho liečiva je dôležité určiť, či kandidát na liečivo je schopný preniknúť hematoencefalickou bariérou (blood-brain barrier, BBB). Relatívne vysoká miera schopnosti permeovať cez BBB je potrebná pri liečivách, ktoré majú ciele ovplyvňovať CNS. Na druhej strane nízka miera permeácie cez BBB je žiaduca pre minimalizáciu vedľajších účinkov spojených s ovplyvnením CNS. Kvantitatívne je možné tento stupeň vyjadriť ako pomer rovnovážnych koncentrácií substancie v mozgu ( $c_{\text{mozog}}$ ) a v krvi ( $c_{\text{krv}}$ ), t.j. ako  $\log(c_{\text{mozog}}/c_{\text{krv}})$  alebo  $\log BB$ <sup>14)</sup>. Rozdelenie látky do nepolárnych oblastí mozgu odzrkadľuje hodnota  $\log P_{\text{exp}}$  v systéme cyklohexán/TFR ( $\log P_{\text{exp c}}$ ), zatiaľ čo údaj  $\log P_{\text{exp}}$  stanovený v systéme oktán-1-ol/TFR ( $\log P_{\text{exp o}}$ ) vyjadruje väzbu na proteíny v periférnom krvnom riečišti<sup>15)</sup>. Vo všeobecnosti platí, že látka má tým hydrofilnejší charakter, čím je jej priemerná hodnota  $\log P_{\text{exp o-c}}$  (t.j. rozdiel medzi  $\log P_{\text{exp o}}$  a  $\log P_{\text{exp c}}$ ) pozitívnejšia; to znamená, že ochotnejšie tvorí vodíkové väzby, v menšej miere preniká do nepolárnych oblastí moz-

gu a je v organizme distribuovaná prednostne do krvi. Hodnota  $\log P_{\text{exp o-c}} = 0,08$  pre UPB-1 teda indikuje, že tá minimálne prechádza cez hematoencefalickú bariéru do nepolárnych oblastí mozgu. Implementácia stanovených hodnôt príslušných rozdeľovacích koeficientov do Youngovho modelu<sup>16)</sup>, v rámci ktorého hodnota  $\log BB$  koreluje s  $\log P_{\text{exp o-c}}$  podľa vzťahu:  $\log BB = 0,889 - 0,485 \times \log P_{\text{exp o-c}}$  však priniesla jednoznačnejšie tvrdenie – hodnota  $\log BB$  pre UPB-1 predstavovala 0,850. Na druhej strane sa však pre pomerne široké spektrum zlúčenín Youngov model ukázal ako nevyhovujúci. Preto sa v predkladanej práci použili aj iné, detailnejšie schémy predikcie schopnosti UPB-1 prechádzať cez BBB.

Kaliszan<sup>17)</sup> navrhol pre koreláciu  $\log P_{\text{exp o-c}}$  a  $\log BB$  vzťah, v ktorom bola ako aditívna veličina implementovaná aj  $M_r$ :

$\log BB = -0,088 + 0,272 \times \log P_{\text{exp o-c}} - 0,00112 \times M_r$ ; podľa tohto modelu je hodnota  $\log BB$  látky UPB-1 -0,925.

Dôležitými faktormi ovplyvňujúcimi  $\log BB$  sú veľkosť a povrch molekuly ako aj tvorba vodíkových väzieb. Z týchto deskriptorov sa relatívne najväčší význam prisudzuje práve polárnemu povrchu molekuly (polar surface area, PSA), ktorý sa uplatňuje aj v modeli Keldera<sup>18)</sup> charakterizovaného vzťahom:

$\log BB = 1,330 - 0,032 \times PSA$  ( $\log BB$  pre UPB-1 je -1,135) a Clarka<sup>19)</sup> definovaného nasledujúcou rovnicou:  $\log BB = 0,550 - 0,016 \times PSA$  ( $\log BB$  pre UPB-1 je -0,682).

Na báze Clarkovej metódy bol založený aj prístup Pana<sup>20)</sup>, predstavoval relatívne jednoduchý vzťah, v ktorom však pôvodne absentovali niektoré relevantné štatistické ukazovatele:

$\log BB = 0,064 + 0,200 \times \log P_{\text{exp o}} - 0,010 \times PSA$ . Pre UPB-1 je podľa tohto modelu hodnota  $\log BB$  -0,366.

Podľa Abrahamovho a Weathersbyho modelu predikcie<sup>21)</sup>  $\log BB$  platí nasledovný vzťah:

$\log BB = 0,119 + 0,350 \times \log P_{\text{exp o}} - 0,00502 \times M_r$ . Po dosadení príslušných parametrov je hodnota  $\log BB$  v tomto prípade -0,920.

Niektorí autori implementovali do QSAR modelov predikujúcich  $\log BB$  aj schopnosť látky vytvárať väzby vodíkovým mostíkom. Feher<sup>22)</sup> navrhol nasledujúci model:  $\log BB = 0,4275 - 0,0017 \times PSA + 0,1092 \times \log P - 0,3873 \times n_{\text{acc}}$ , v ktorom  $\log P = \log P_{\text{exp o}}$  a  $n_{\text{acc}}$  bol počet akceptorov vodíkov v molekule vo vodnom prostredí (pre bázičnú formu UPB-1 je to šesť akceptorov). Z tohto pohľadu bola hodnota  $\log BB$  pre UPB-1 -1,842. Pri komplexnejšom pohľade na získané výsledky je možné predpokladať, že študovaná zlúčenina bude s vysokou



pravdepodobnosťou preferovať väzbu na proteíny krvného riečišťa pred prechodom cez hematoencefalickú bariéru.

Hodnota  $\log P_{\text{exp o-h}}$  (rozdiel medzi hodnotami  $\log P_{\text{exp}}$  v systéme oktán-1-ol/TFR a v rozdeľovacej sústave heptán/TFR) predstavovala 0,04; to znamená, že študovaná zlúčenina je veľmi slabým donorom protónu.

Z hľadiska hodnotenia stability *UPB-1* v kyslom ako aj v zásaditom prostredí – kyselina chlorovodíková, hydroxid sodný; obe médiá s  $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  – pomocou adsorpčnej chromatografie na tenkej vrstve možno konštatovať, že *UPB-1* nie je pri laboratórnej teplote v týchto prostrediach stabilná. Na chromatograme(-och) sa na „stĺpci“ *UPB-1* okrem jej „vlastnej“ škvry objavili v oboch prostrediach aj ohraničené škvry prislúchajúce jednak *p-OHBA* (ktorá bola zároveň nanášaná na chromatogram ako referenčná substancia), ako aj ďalším „štiepnym“ produktom vznikajúcim pri rozklade *UPB-1* – zlúčeninám pracovne označeným ako „ $X_1$ “ a „ $X_2$ “. Pravdepodobne nastalo vplyvom príslušného prostredia parciálne štiepenie molekuly *UPB-1* v jej esterovej časti alebo v alkoxylovom zoskupení v lipofilnom fragmente (viď tab. 4). Pri hodnotení vplyvu UV/VIS žiarenia na vodný a metanolový roztok *UPB-1* bolo zistené, že v priebehu 1 h nedošlo k zmene hodnôt absorbancií pri jednotlivých absorpčných maximách a v časovom intervale 1 h ani k ich posunu.

Na „metodickú prípravu“ pre (prípadné) stanovenie obsahu *UPB-1* v konkrétnej liekovej forme alebo v telových tekutinách možno využiť UV/VIS spektrofotometriu alebo RP-HPLC. Látka *UPB-1* bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke druhého absorpčného maxima, teda pri  $\lambda_{2\text{max}} = 260 \text{ nm}$  (pre vodné prostredie), resp. pri  $\lambda_{2\text{max}} = 258 \text{ nm}$  (pre prostredie metanolu). Na základe získaných údajov bola zostrojená kalibračná krivka, výsledkom stanovenia bolo formulovanie regresnej rovnice v tvare:  $y = 39187x + 0,0138$ ;  $R^2 = 0,9991$  (vodné prostredie, viď tab. 5); resp.  $y = 42139x + 0,0173$ ;  $R^2 = 0,999$  (metanolové prostredie, viď tab. 5). V prezentovaných rovniaciach parameter  $y$  predstavuje absorbanciu,  $x$  vyjadruje koncentráciu stanovovanej látky v  $\text{mol.l}^{-1}$ .

Pri výbere mobilnej fázy (MF) pri stanovení obsahu *UPB-1* pomocou RP-HPLC sa vychádzalo z vlastností rozpúšťadiel, ktoré sú uvedené v Rohrschneiderovom rade <sup>23)</sup>, kde sú zohľadnené nukleofilné, elektrofilné vlastnosti rozpúšťadiel a zároveň aj ich možnosti tvorby vodíkových väzieb s molekulami separovaných látok. Vhodnou MF pre delenie látky sa ukázal metanol 90 %. Regresná rovnica má nasledujúci tvar:  $y = 12141x + 0,1255$ ;  $R^2 = 0,993$ ; parameter  $y$  predstavuje pomer plôch píkov študovanej látky *UPB-1* a vnútorného štandardu (*p-OHBA*),  $x$  vyjadruje koncentráciu stanovovanej látky v  $\text{mol.l}^{-1}$ . Ďalšie parametre lineárnej regresie sú uvedené v tabuľke 7.

Experimentálne získané spektrálne a fyzikálno-chemické deskriptory charakterizujúce mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-izopropylamónium]fumarát predstavujú cenný príspevok pre budúcu QSAR-analýzu v skupine ultrakrátko pôsobiacich antagonistov  $\beta_1$ -adrenergických receptorov. V ďalších štúdiách

sa bude pozornosť venovať spektrálnym identifikačným charakteristikám a stanoveniu fyzikálno-chemických konštant štruktúrne podobných zlúčenín, v ktorých molekule bude, v porovnaní s *UPB-1*, modifikovaný alkoxylový reťazec v lipofilnej časti a izopropylový fragment viazaný na atóme dusíka v bázeckej časti molekuly.

## LITERATÚRA

1. Yamakage, M., Iwasaki, S., Jeong, S.-W., Satoh, J.-I., Namiki, A.: Beta-1 selective adrenergic antagonist landiolol and esmolol can be safely used in patients with airway hyperreactivity. *Heart and Lung* 2009; 38, 48–55.
2. Bekker, A., Sorour, K., Miller, S.: The use of cardioselective  $\beta$ -blockers in a patient with idiopathic hypertrophic subaortic stenosis and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Anesth.* 2002; 14, 589–591.
3. Jindal, D., Coumar, M. S., Nandakumar, K., Bodhankar, S. L., Purohit, P. G., Mahadik, K. R., Bruni, G., Collavoli, E., Massarelli, P.: Synthesis,  $\beta$ -adrenergic blocking activity and  $\beta$ -receptor binding affinities of 1-substituted-3-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-propan-2-ol oxalates. *Farmaco* 2003; 58, 557–562.
4. Kitamura, A., Sakamoto, A., Inoue, T., Ogawa, R.: Efficacy of an ultrashort-acting  $\beta$ -adrenoceptor blocker (ONO-1101) in attenuating cardiovascular responses to endotracheal intubation. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1997; 51, 467–471.
5. Gray, R. J.: Managing critically ill patients with esmolol. An ultra short-acting beta-adrenergic blocker. *Chest* 1988; 93, 398–403.
6. Atarashi, H., Kuruma, A., Yashima, M., Saitoh, H., Ino, T., Endoh, Y., Hayakawa, H.: Pharmacokinetics of landiolol hydrochloride, a new ultra-short-acting beta-blocker, in patients with cardiac arrhythmias. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2000; 68, 143–150.
7. Achari, R., Hulse, J. D., Drissel, D., Matier, W. L.: Pharmacokinetics of fleistolol in man: preliminary data. *Br. J. clin. Pharmacol.* 1985; 20, 691–694.
8. Malík, I., Sedlářová, E., Čížmárik, J., Andriamainty, F., Csöllei, J.: Štúdium fyzikálno-chemických vlastností derivátov kyseliny 4-alkoxyfenylkarbámovej s bázeckou časťou tvorenou substituovaným *N*-fenylypiperazínom. *Farm. Obzor* 2005; 74, 211–215.
9. Slovenský liekopis, zväzok 1. 1. vyd. Bratislava: Herba 1997; s. 22.
10. Malík, I., Sedlářová, E., Csöllei, J.: Analytické hodnotenie 1-(dipropylamino-3-piperidino-propán-1-yl)-3-pentyloxyfenylkarbamátu (CK-3635). *Čes. a Slov. Farm.* 2004; 53, 256–260.
11. Databáza ZirChrom: Dissociation constants of organic acids and bases. <http://www.zirchrom.com/organic.htm> (29.11.2010)
12. Databáza chemicalland21.com: *p*-Hydroxybenzoic acid. <http://www.chemicalland21.com/lifescience/phar/p-HYDROXYBENZOIC%20ACID.htm> (29.11.2010)
13. UNEP Publications: 4-Hydroxybenzoic acid. CAS No: 99-96-7. <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/99967.pdf> (29.11.2010)
14. Fu, X.-Ch., Chen, Ch.-X., Liang, W.-Q., Yu, Q.-S.: Predicting blood-brain barrier penetration of drugs by polar molecular surface area and molecular volume. *Acta Pharmacol. Sin.* 2001; 22, 663–668.
15. Tsai, R.-S., El Tayar, N., Carrupt, P.-A., Testa, B.: Physicochemical properties and transport behaviour of

- piribedil: Considerations on its membrane-crossing potential. *Int. J. Pharm.* 1992; 80, 39–49.
16. **Young, R. C., Mitchell, R. C., Brown, T. H., Ganellin, C. R., Griffiths, R., Jones, M., Rana, K. K., Saunders, D., Smith, L. R., Sore, N. E., Wilks, T. J.:** Development of a new physicochemical model for brain penetration and its application to the design of centrally acting H<sub>2</sub> receptor histamine antagonists. *J. Med. Chem.* 1988; 31, 656–671.
  17. **Kaliszan, R., Markuszewski, M.:** Brain/blood distribution described by a combination of partition coefficient and molecular mass. *Int. J. Pharm.* 1996; 145, 9–16.
  18. **Kelder, J., Grootenhuys, P. D. J., Bayada, D. M., Delbressine, L. P. C., Ploemen, J.-P.:** Polar molecular surface as dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm. Res.* 1999; 16, 1514–1519.
  19. **Clark, D. E.:** Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration. *J. Pharm. Sci.* 1999; 88, 815–821.
  20. **Pan, D., Iyer, M., Liu, J.:** Constructing optimum blood barrier QSAR models using a combination of 4D-molecular similarity measures and cluster analysis. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2004; 44, 2083–2098.
  21. **Abraham, M. H., Weathersby, P. K.:** Hydrogen bonding. 30. Solubility of gases and vapors in biological liquids and tissues. *J. Pharm. Sci.* 1994; 83, 1450–1456.
  22. **Feher, M., Sourial, E., Schmidt, J. M.:** A simple model for the prediction of blood-brain partitioning. *Int. J. Pharm.* 2000; 201, 239–247.
  23. **West, S.D., Mowrey, D. H.:** Characterization of reversed-phase HPLC solvent selectivity for the prediction of adjusted retention indices and resolution. *J. Chromatogr. Sci.* 1991; 29, 497–502.

## NOVÉ KNIHY

Mučaji, P., Nagy, M. **Saponíny, výskyt, vlastnosti a možnosti využitia vo farmácii.** Martin: Osveta 2010; 136 s.

Recenzované dielo je u nás prakticky prvou monografiou o saponínoch, ktoré tvoria dôležitú skupinu obsahových látok približne v 100 čeladiach rastlín.

Autori, páni doc. PharmDr. Pavel Mučaji, PhD. a prof. Ing. Milan Nagy, CSc., vysokoškolskí učitelia Katedry farmakognózie a botaniky Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, sa v tomto diele po úvodných kapitolách venujú základným definíciám, klasifikácii a charakteristike najdôležitejších zástupcov saponínov, ďalej popisujú ich biosyntézu, hlavné vlastnosti a význam, aký hrajú tieto látky v živote rastlín.

V ďalšom popisujú drogy s obsahom saponínov, ktoré sú v Slovenskom liekopise v I. Vydaní, s expektoračným, diuretickým, antiexsudatívnym, adaptogénnym a protizápalovým účinkom. Následne potom pozornosť

venujú priemyselne významným saponínovým drogám a komplexne popisujú ich biologické účinky.

V závere monografie autori uvádzajú izoláciu, analýzu a stanovenie obsahu a identifikáciu saponínov.

Analýza obsahu monografie ukazuje, že je v nej vhodne dodržaná rovnováha medzi teoretickými poznatkami a praktickou aplikáciou využitia saponínov vo farmaceutickom, kozmetickom a potravinárskom priemysle s upozornením nielen na ich pozitívne, ale i negatívne účinky. Cenné sú aj informácie o saponínoch vyskytujúcich sa v morských živočíchoch, ktoré tvoria mimoriadne perspektívnu oblasť zdrojov nových látok z tejto skupiny. Pre svoju konzistentnú a komplexnú formu spracovania základných informácií a údajov som presvedčený, že táto monografia bude nenahraditeľnou príručkou vedeckých pracovníkov, doktorandov, ale i študentov pracujúcich a zaujímavujúcich sa o tieto prírodné látky.

J. Čižmárik