

SOLUBILIZACE A KOMPLEXACE ANTILEUKOTRIENICKÉHO LÉČIVA QUINLUKAST VE VODNÝCH ROZTOCÍCH CYKLODEXTRINŮ

KOPECKÝ F., KOPECKÁ B.¹

Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Katedra fyzikálnej chémie liečiv

¹Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie

SOUHRN

Solubilizace a komplexace antileukotrienického léčiva quinlukast ve vodných roztocích cyklodextrinů

Byla stanovena rozpustnost nového antileukotrienického léčiva quinlukast (kyselina 4-{[4-(2-chinolylmethoxy)fenyl]sulfanyl}benzoová) ve vodě a ve vodných roztocích α -cyclodextrinu (α -CD), β -cyclodextrinu (β -CD), hydroxypropyl- β -cyclodextrinu (HP- β -CD, průměrný stupeň substituce 0,8) a methyl- β -cyclodextrinu (M- β -CD, průměrný stupeň substituce 1,8). Stanovená rozpustnost quinlukastu ve vodě byla $0,081 \pm 0,008$ mmol/l ($3,12 \pm 0,30$ mg/100ml) a v roztocích β -CD se pozorovalo pouze nevýznamné zvýšení rozpustnosti quinlukastu. Tři dobře rozpustné cyklodextriny však byly solubilizačně účinné, ve vodných roztocích s nevelkou koncentrací cyklodextrinu 5 g/100 ml se pozorovalo 12násobné zvýšení rozpustnosti quinlukastu v případě M- β -CD a 10násobné zvýšení rozpustnosti v případě HP- β -CD a α -CD. Byly stanoveny fázové diagramy rozpustnosti quinlukastu ve vodných roztocích těchto cyklodextrinů (do 0,05 mol/l). V případě M- β -CD a HP- β -CD byly diagramy rozpustnosti lineární (A_L) a odpovídaly tvorbě rozpustného inkluzního komplexu quinlukast–cyclodextrin 1:1, s vyhodnocenými konstantami stability K_{11} 300 ± 35 l/mol (M- β -CD) resp. 260 ± 30 l/mol (HP- β -CD). Fázový diagram rozpustnosti quinlukastu ve vodných roztocích α -CD se vyznačoval výraznou pozitivní odchylkou od linearitu (A_P), solubilizační účinnost zředěných roztoků α -CD byla poměrně nízká, avšak progresivně vzrůstala s koncentrací α -CD. Při celkovém hodnocení se cyklodextriny α -CD, HP- β -CD a M- β -CD ukázaly být vhodnými solubilizéry quinlukastu do vodného roztoku.

K l í č o v á s l o v a: quinlukast – antileukotrienické léčivo – rozpustnost – solubilizace – cyklodextriny – inkluzní komplexy

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 137–140

SUMMARY

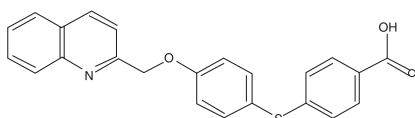
Solubilization and Complexation of the Antileukotrienic Drug Quinlukast in Aqueous Solutions of Cyclodextrins

Solubility of the new antileukotrienic drug quinlukast (4-{[4-(2-quinolylmethoxy)phenyl]sulfanyl}benzoic acid) was determined in water and in aqueous solutions of α -cyclodextrin (α -CD), β -cyclodextrin (β -CD), hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD, average degree of substitution 0.8), and methyl- β -cyclodextrin (M- β -CD, average degree of substitution 1.8). The determined solubility of quinlukast in water was 0.081 ± 0.008 mmol/l (3.12 ± 0.30 mg/100ml) and only an insignificant increase in quinlukast solubility was observed in aqueous solutions of β -CD. However, three well soluble cyclodextrins showed a marked solubilizing effect, in aqueous solutions with a moderate cyclodextrin concentration 5 g/100ml, a 12-fold increase in quinlukast solubility was observed in the case of M- β -CD, and a 10-fold increase in the case of both HP- β -CD and α -CD. Phase solubility diagrams of quinlukast in aqueous solutions of these cyclodextrins (up to 0.05 mol/l) were determined. In the cases of M- β -CD and HP- β -CD, the solubility diagrams were linear (A_L) and they corresponded to the formation of a soluble inclusion complex quinlukast – cyclodextrin 1:1 with the evaluated stability constants K_{11} 300 ± 35 l/mol and 260 ± 30 l/mol for M- β -CD and HP- β -CD, respectively. The phase solubility diagram of quinlukast in aqueous solutions of α -CD showed a marked positive deviation (A_P) from linearity, the solubilization efficiency of dilute α -CD solutions was relatively low but it increased progressively with the increasing α -CD concentration. In the overall evaluation, the cyclodextrins α -CD, HP- β -CD and M- β -CD appeared to be suitable for the quinlukast solubilization into aqueous solutions.

K e y w o r d s: quinlukast – antileukotrienic drug – solubility – solubilization – cyclodextrins – inclusion complexes

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 137–140

Má



Obr. 1. Quinlukast
kyselina 4-[[4-(2-chinolylmethoxy)fenyl]sulfonyl]benzoová,
 $C_{23}H_{17}NO_3S$

Jako původní sloučenina ze skupiny derivátů (arylsulfonyl)benzoových kyselin byl quinlukast připraven a charakterizován Kuchařem et al. ^{1, 2)} v rámci systematického výzkumu nových antileukotrienických a antiastmatických léčiv ³⁾. V uvedené skupině se quinlukast ukázal být slibnou sloučeninou vyznačující se kombinovaným účinkem s antileukotrienickou, protizánětlivou a antiastmatickou složkou ^{1, 2)} a v této souvislosti byla sledována i jeho biotransformace ⁴⁾. Vzhledem ke struktuře quinlukastu (obr. 1) lze u něj očekávat poměrně malou rozpustnost ve vodě, přičemž obtížná rozpustnost každého léčiva je nejen překážkou přípravy tekuté lékové formy, ale může být limitujícím faktorem absorpce léčiva z gastrointestinálního traktu ⁵⁾ i při podání tuhé lékové formy. Cílem předložené práce bylo proto zjistit rozpustnost quinlukastu ve vodě a ve vodných roztocích cyklodextrinů, používaných jako pomocné láky za účelem solubilizace hydrofobních léčiv ^{6–8)}. Pro studium jsme zvolili dva nativní cyklodextriny, α -cyklodextrin (α -CD) a β -cyklodextrin (β -CD) a dva chemicky modifikované deriváty druhého z nich, hydroxypropyl- β -cyklodextrin (HP- β -CD) a methyl- β -cyklodextrin (M- β -CD).

Cyklodextriny solubilizují organická léčiva především vratnou tvorbou inkluzních komplexů rozpustných ve vodě ^{6–8)}. Hydrofobní (lipofilní) část molekuly léčiva se přitom inkluje do centrální dutiny cyklodextrinu a vzniklý komplex bývá ve vodě rozpustnější než samotné léčivo. Součástí předložené práce bylo přitom vyhodnotit ze stanovených fázových diagramů rozpustnosti podle možnosti též stechiometrii a konstanty stability příslušných komplexů ^{6, 8–11)}, pokud je quinlukast s použitými cyklodextriny v roztoku vytváří. Cyklodextriny slouží jak pro přípravu roztoků málo rozpustných léčiv, tak i pro zlepšení jejich vlastností nebo uvolňování z tuhých lékových forem ^{5–8)}; určitou nevýhodou ovšem zůstává jejich vyšší cena spolu s nutností použít zpravidla větší přebytek cyklodextrinu vůči léčivu ^{6–11)}. Zpřísněná hodnocení pomocných látek však ukazují, že při porovnání např. s tenzidy představují právě cyklodextriny odvozené od škrobu poměrně bezpečný systém podávání léčiv včetně imunologické bezpečnosti ^{12, 13)}.

POKUSNÁ ČÁST

Chemikálie a přístroje

Quinlukast (obr. 1) (M_r 387,45) byl připraven ve Výzkumném ústavu pro farmacii a biochemii, Praha, zatímco použité cyklodextriny byly proveniencí Aldrich. Byly to dva nativní (nesubstituované) cyklodextriny, α -cyklodextrin (α -CD, M_r 972,9) a β -cyklodextrin (β -CD, M_r 1135,0) a dva chemicky

modifikované (nepravidelně substituované) cyklodextriny: hydroxypropyl- β -cyklodextrin s průměrným stupněm substituce 0,8 (HP- β -CD, průměrná M_r 1460) a methyl- β -cyklodextrin s průměrným stupněm substituce 1,8 (M- β -CD, označovaný též jako RAMEB, průměrná M_r 1310). Další potřebné chemikálie byly ethanol pro UV spektrofotometrii a deionizovaná voda. Spektrofotometrická stanovení v UV oblasti se prováděla na přístroji Specord M40 v parotěsných křemenných květáčích.

Stupněm substituce cyklodextrinů (údaje podle výrobce) se v této práci rozumí průměrný počet substituentů na jedné glukosové jednotce makrocyclické molekuly cyklodextrinu, přičemž molekula nejnižšího cyklodextrinu α -CD se skládá ze 6 glukosových jednotek, molekula β -CD a jeho derivátů ze 7 glukosových jednotek. Nativní α -CD a β -CD jsou v podstatě chemická individua ve formě krystalických hydrátů, α -CD je dobře rozpustný, avšak β -CD pouze mírně rozpustný ve vodě ^{6, 7)}. Naproti tomu nepravidelně substituované HP- β -CD a M- β -CD jsou amorfni a každý z nich představuje směs velkého počtu statisticky zastoupených izomerů a příbuzných derivátů, s čímž souvisí jejich mimořádně velká rozpustnost ve vodě ^{6, 7)}. Substance krystalických i amorfních cyklodextrinů se vyznačují charakteristickým obsahem vody (vlhkostí), která se opakovaně stanovovala vysušením malého vzorku ve vakuu při 110 °C, a roztoky se připravovaly navážením nesusušených substancí cyklodextrinů s korekcí na ztrátu hmotnosti sušením ^{9–11, 14)}.

Měření rozpustnosti quinlukastu

Rozpouštění quinlukastu ve vodě a ve vodných roztocích cyklodextrinů se sledovalo v závislosti na čase a koncentraci cyklodextrinu podobným postupem jako v předchozí solubilizací studii nimodipinu ^{9–11)}. Suspenze substance quinlukastu (25–100 mg) ve vodě nebo ve vodném roztoku cyklodextrinu (25–100 ml) se míchala při teplotě 25±1 °C a v určitých časových intervalech se opakovaně odebíraly 2–3 ml vzorků roztoku, v nichž se po přefiltrování přes skleněný filtr G4 a příslušné úpravě stanovovala koncentrace rozpuštěného quinlukastu. Rozpouštění se nejprve pokusně sledovalo v průběhu 11 dnů, ukázalo se však, že koncentrace rozpuštěného quinlukastu už od 4. dne nevykazuje statisticky významný trend, ale pouze kolísá kolem určité průměrné hodnoty, kterou lze považovat za rovnovážnou rozpustnost quinlukastu v daném mediu. Definitivní měření se proto prováděla po dobu 6 dnů s odběrem vzorků v jednodenních intervalech, přičemž koncentrace cyklodextrinů byly zvoleny v rozmezí 5–50 mmol/l nebo o něco větším, u nepříliš rozpustného β -CD pouze do 14 mmol/l, což se už blíží nasycenému roztoku β -CD. Příklad takto naměřených časových závislostí rozpouštění quinlukastu ve vodě a ve vodných roztocích HP- β -CD je na obrázku 2. Rozpustnost quinlukastu v roztocích cyklodextrinů se počítala jako průměr nejméně ze tří koncentrací stanovených ve 4.–6. dnu rozpouštění v daném mediu, v případě většího rozptylu se rozpouštění sledovalo delší dobu, nebo se měření příslušné časové křivky rozpouštění opakovalo tak, aby mohly být vyloučeny odlehlé hodnoty.

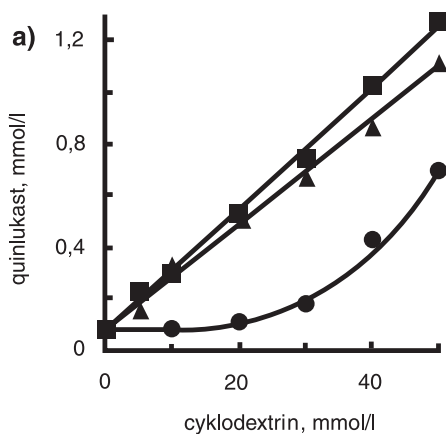
Stanovení quinlukastu

Ve vzorcích odebíraných roztoků se koncentrace quinlukastu stanovovala spektrofotometricky v UV oblasti při vlnové délce 285 nm, kde má quinlukast absorpční maximum, jehož poloha a velikost je jen málo ovlivněna přítomností ethanolu a cyklodextrinu. Potřebné kalibrační křivky quinlukastu se měřily ve vodných roztocích obsahujících příslušný cyklodextrin a navíc 5% ethanolu (v/v) pro rychlé rozpuštění quinlukastu. Přefiltrované odebírané vzorky (bez ethanolu) byly před měřením absorbance vždy upraveny na stejné koncentrace cyklodextrinu a ethanolu, jako byly v příslušných kalibračních roztocích, při měření rozpustnosti ve vodě nebyl použit cyklodextrin. Vzhledem k nízkým koncentracím stanoveného quinlukastu bylo nutné postupovat metodou konstantního přídavku.

VÝSLEDKY A DISKUZE

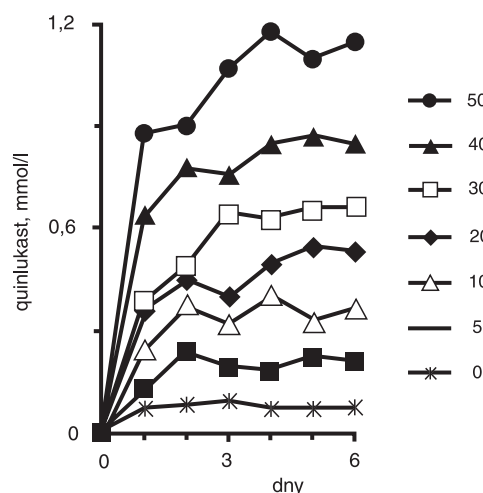
Rozpouštění quinlukastu ve vodě znázorňuje nejnižší křivka na obrázku 2 a ze tří takovýchto časových křivek rozpouštění byla vyhodnocena rozpustnost quinlukastu ve vodě $0,081 \pm 0,008$ mmol/l, přičemž se jedná o průměr z devíti stanovených hodnot. Podle dosaženého výsledku sice quinlukast nepatří k nejobtížněji rozpustným léčivům, nicméně snaha o zvýšení rozpustnosti za účelem zlepšení biologické dostupnosti je zde zcela na místě⁵⁾. Nejběžnějším cyclodextrinem používaným za tímto účelem je nativní β -CD, avšak i v roztoku s téměř nasycenou koncentrací β -CD 14 mmol/l se zjištěná rozpustnost quinlukastu $0,089 \pm 0,010$ mmol/l jen málo liší od rozpustnosti ve vodě. Příklady zjištěných rozpustností jsou uvedeny v tabulce 1, pro praktickou potřebu jsou zde vyjádřeny jako mg/100 ml.

I když se tedy v předložené práci β -CD nepříliš osvědčil, jeho dobře rozpustné deriváty HP- β -CD a M- β -CD se ukázaly být poměrně účinnými solubilizéry quinlukastu, v případě HP- β -CD to názorně ukazují křivky rozpouštění na obrázku 2. Vyhodnocené výsledky jsou pak souhrnně znázorněny na obrázku 3 ve formě fázového diagramu rozpustnosti quinlukastu ve vodných roztocích cyclodextrinů, představovaného závislostmi rozpustnosti quinlukastu na koncentraci příslušného cyclodextrinu. Každý bod diagramu rozpustnosti byl vyhodnocen z jedné nebo více křivek rozpouštění, podobných jaké jsou na obrázku 2. Pro porovnání jsou fázové diagramy rozpustnosti uvedeny ve dvou variantách, jak s koncentracemi mmol/l (obr. 3a), tak i s koncentracemi g/100 ml (obr. 3b). Diagramy rozpustnosti quinlukastu ve vodných roztocích HP- β -CD a M- β -CD jsou prakticky přímkové, v měřeném rozsahu rozpustnost quinlukastu vzrůstá úměrně s koncentrací těchto dobře rozpustných cyclodextrinů. Lze je proto označit jako fázové diagramy rozpustnosti typu A_L ^{6, 8)} a při zpracování metodou nejmenších čtverců ve formě lineárních funkcí byly charakterizovány koeficientem determinace R^2 0,98–0,999.



Tab. 1. Rozpustnost quinlukastu (Qu) při určité koncentraci cyclodextrinu (CD) a konstanta stability (K_{11}) komplexu quinlukast–cyclodextrin (1:1)

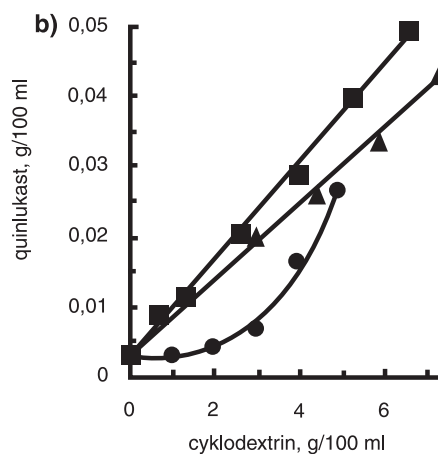
Cyclodextrin	koncentrace CD (g/100 ml)	rozpustnost Qu (mg/100 ml)	K_{11} (l/mol)
α -CD	5,0	$29,30 \pm 1,40$	–
β -CD	1,6	$3,45 \pm 0,40$	–
HP- β -CD	5,0	$30,40 \pm 1,30$	260 ± 30
M- β -CD	5,0	$37,60 \pm 1,60$	300 ± 35
rozpouštění ve vodě	0,0	$3,12 \pm 0,30$	–



Obr. 2. Časové závislosti rozpouštění quinlukastu ve vodě (0, nejnižší křivka) a ve vodných roztocích hydroxypropyl- β -cyclodextrinu při koncentracích HP- β -CD 5; 10; 20; 30; 40 a 50 mmol/l

Ve vodných roztocích nativního α -CD bylo při nízkých koncentracích tohoto cyclodextrinu zlepšení rozpustnosti quinlukastu podobně nevýznamné jako v případě β -CD, avšak při vyšších koncentracích lépe rozpustného α -CD rozpustnost quinlukastu vzrůstá progresivně.

V důsledku toho je na obrázku 3 závislost rozpustnosti quinlukastu na koncentraci α -CD znázorněná křivkou



Obr. 3. Fázové diagramy rozpustnosti quinlukastu ve vodných roztocích cyclodextrinů M- β -CD (čtverečky, horní křivka), HP- β -CD (trojúhelníky, prostřední křivka) a α -CD (kroužky, dolní křivka) s koncentracemi vyjádřenými ve formě mmol/l (3a) nebo g/100 ml (3b)

s pozitivní odchylkou od linearity, takže představuje fázový diagram rozpustnosti typu A_P ^{6, 8)}. Podle obrázku 3a, kde jsou koncentrace vyjádřeny v látkových jednotkách mmol/l, se největší účinnosti solubilizace vyznačuje M- β -CD, následovaný HP- β -CD a α -CD. Jestliže se však příslušné koncentrace vyjádří ve formě g/100 ml (resp. mg/100 ml), pak se α -CD jeví jako podstatně účinnější, takže při vyšších koncentracích dostihuje podle obrázku 3b solubilizační účinnost HP- β -CD. Výhodou α -CD je totiž nejnižší molekulární hmotnost ze všech cyklodextrinů, stanovený diagram rozpustnosti typu A_P je ovšem nevýhodný při nižších koncentracích α -CD. V každém případě je pro solubilizaci quinlukastu potřebný značný přebytek kteréhokoliv z uvažovaných cyklodextrinů, což ukazují i příklady hodnot rozpustnosti uvedené v tabulce 1, získané z fázových diagramů rozpustnosti. Podle tabulky 1 lze při vcelku přijatelné koncentraci cyklodextrinu 5 g/100 ml dosáhnout zhruba 12násobného zvýšení rozpustnosti quinlukastu pomocí M- β -CD a 10 násobného zvýšení pomocí HP- β -CD nebo α -CD.

Stanovené fázové diagramy rozpustnosti naznačují též způsob interakce quinlukastu s cyklodextriny. Nepatrná solubilizační účinnost nepříliš rozpustného β -CD znamená, že pokud vůbec vytváří quinlukast s β -CD komplex (asociát), pak tento komplex není podstatně rozpustnější než samotný quinlukast. Na druhé straně v případě dobře rozpustných M- β -CD a HP- β -CD naznačují lineární fázové diagramy rozpustnosti v roztocích s látkovým přebytkem cyklodextrinu (obr. 3a) solubilizační mechanismem tvorby rozpustného komplexu quinlukast–cyklodextrin v stechiometrickém poměru 1:1^{6, 8)}. Pro objemné strukturální útvary podobné molekule quinlukastu (obr. 1) je přitom tvorba inkluzního komplexu s β -cyklodextrinem nebo jeho deriváty v poměru 1:1 vcelku obvyklá. Konstantu stability K_{11} (asociační konstantu) takového komplexu lze zjistit ze vztahu^{6, 8)}:

$$K_{11} = a/(c_{0Q} (1-a)), \quad [1]$$

kde $a = \Delta c_Q / \Delta c_{CD}$ je směrnice příslušného lineárního fázového diagramu rozpustnosti, $c_{0Q} = 8,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l je výše uvedená změřená rozpustnost quinlukastu ve vodě a symboly c_Q , c_{CD} jsou koncentrace quinlukastu a cyklodextrinu (mol/l). Podmínkou použitelnosti rovnice [1] je $a < 1$, přičemž směrnice stanovených diagramů rozpustnosti vyhodnocené metodou nejmenších čtverců jsou $a = 0,0236$ v případě M- β -CD, resp. $a = 0,0207$ v případě HP- β -CD. Vypočítané výsledné konstanty stability komplexů quinlukastu s oběma těmito cyklodextriny jsou v tabulce 1. Z uvedených hodnot a , c_{0Q} lze popsáním postupem⁹⁾ dále vypočítat rozpustnost quinlukastu ve vodných roztocích M- β -CD nebo HP- β -CD v sledovaném koncentračním rozsahu. Nepříliš vysoké hodnoty konstant stability K_{11} v tabulce 1 znamenají, že uvažované komplexy quinlukastu s M- β -CD nebo HP- β -CD snadno vratně disociují na původní složky už zředěním roztoku¹⁵⁾, takže uvedené cyklodextriny nemohou snížit dostupnost quinlukastu.

Nelineární fázový diagram rozpustnosti typu A_P ⁸⁾, charakterizující rozpouštění quinlukastu ve vodných roztocích α -CD ukazuje, že se tyto složky spolu sdružují na více než

jeden druh komplexů (asociátů), a teprve komplex vznikající při vyšší koncentraci α -CD je výrazně rozpustnější, takže způsobuje solubilizaci. Jako nejnižší člen řady cyklodextrinů vytváří α -CD inkluzní komplexy se stechiometrií 1:1 zejména s látkami s alkylovou skupinou (např. s lokálními anestetiky^{14, 15)}), která stericky odpovídá menšímu průměru centrální dutiny α -CD^{6, 7)}. Naproti tomu úplná inkluze objemnějších částí molekuly quinlukastu do úzké centrální dutiny makrocyclu α -CD zřejmě není možná a částečná inkluze patrně vede k tvorbě asociátů s nejednotnou stechiometrií. Nelineární fázový diagram rozpustnosti typu A_P zároveň znamená, že při ředění se quinlukast uvolňuje z těchto asociátů ještě snáze než v případě diagramů A_L . Souhrnně lze tedy konstatovat, že tři ze zkoumaných cyklodextrinů, α -CD, HP- β -CD a M- β -CD poměrně dobře solubilizují quinlukast do vodného roztoku, zatímco β -CD se zde ukázal být solubilizačně málo účinný.

Práce byla podporována grantem č. 1/1184/04 Vědecké grantové agentury Ministerstva školství Slovenské republiky.

LITERATURA

1. Kuchař, M., Kmoníček, V., Panajotová, V. et al.: U.S. 6,303,612 B1, 2001; Chem. Abstr., 2000; 132, 49797.
2. Kuchař, M., Kmoníček, V., Panajotová, V. et al.: Collect. Czech. Chem. Commun., 2004; 69, 2098-2120.
3. Kuchař, M., Čulíková, K., Panajotová, V. et al.: Collect. Czech. Chem. Commun., 1998; 63, 103-114.
4. Wsól, V., Szotáková, B., Baliarová, V. et al.: Collect. Czech. Chem. Commun., 2004; 69, 689-702.
5. Hörter, D., Dressman, J. B.: Adv. Drug Delivery Rev., 2001; 46, 75-87.
6. Thompson, D. O.: Crit. Rev. Ther. Drug. Carr. Syst., 1997; 14, 1-104.
7. Zhang, M.-Q., Rees, D. C.: Exp. Opin. Ther. Patents, 1999; 9, 1697-1717.
8. Loftsson, T., Magnúsdóttir, A., Másson, M., Sigurjónsdóttir, J. F.: J. Pharm. Sci., 2002; 91, 2307-2316.
9. Kopecký, F., Kopecká, B., Kaclík, P.: Čes. slov. Farm., 2003; 52, 33-38.
10. Kopecký, F., Kopecká, B., Kaclík, P.: J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem., 2001; 39, 215-217.
11. Kopecký, F., Kopecká, B., Kaclík, P.: Čes. slov. Farm., 1999; 48, 287-290.
12. MacKenzie, C. R., Fawcett, J. P., Boulton, D. W., Tucker, I. G.: Int. J. Pharm., 1997; 159, 191-196.
13. Kamphorst, A. O., Mendes de Sá, I., Faria, A. M. C., Sinisterra, R. D.: Eur. J. Pharm. Biopharm., 2004; 57, 199-205.
14. Kopecký, F., Vojteková, M., Vrana, M., Čížová, K.: Collect. Czech. Chem. Commun., 2002; 67, 245-256.
15. Kopecký, F., Vojteková, M., Kaclík, P. et al.: J. Pharm. Pharmacol., 2004; 56, 581-587.

Došlo 11. 10. 2004.

Přijato ke zveřejnění 25. 11. 2004.

doc. RNDr. František Kopecký, CSc.
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, SR
e-mail: kopecky@fpharm.uniba.sk