

Syntéza alkylesterů kyseliny 2-{3-[4-(4-fluorfenyl)-piperazin-1-yl]-2-hydroxy-propoxy}-fenylkarbamové a *in vitro* hodnocení jejich β -antiadrenergní a vazodilatační aktivity

GONĚC T.¹, RAČANSKÁ E.², CSÖLLEI J.¹

¹Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav chemických léčiv

²Univerzita Komenského v Bratislavě, Farmaceutická fakulta, Katedra farmakologie a toxikologie

Došlo 18. dubna 2008 / Přijato 30. dubna 2008

SOUHRN

Syntéza alkylesterů kyseliny 2-{3-[4-(4-fluorfenyl)-piperazin-1-yl]-2-hydroxy-propoxy}-fenylkarbamové a *in vitro* hodnocení jejich β -antiadrenergní a vazodilatační aktivity

Ve snaze získat látky příznivě ovlivňující patologicky změněné kardiovaskulární funkce, jako je hypertenze a ischemická choroba srdeční, byla připravena nová série látek ze skupiny aryloxyaminopropanolů. Čtyři z těchto látek lišící se substitucí fenylkarbamátu (methyl, ethyl, propyl, butyl) byly vybrány pro základní farmakologické hodnocení *in vitro*. Všechny látky snižovaly v pokusech na izolovaných spontánně tepajících předsíních morčete v konc. $1,0 \cdot 10^{-6}$ základní tepovou frekvenci (7,6–13,6 %) a inhibovaly pozitivně chronotropní efekt isoprenalinu ($pA_2 = 6,28–6,81$). Látky vykazovaly pouze mírnou relaxaci KCl prekontrahovaných potkaních aortálních preparátů (až při koncentraci $1,0 \cdot 10^{-5}$). Sloučeniny s propyl- a butyl- substitucí se jeví být účinnější než methyl- a ethyl- deriváty.

Klíčová slova: aryloxyaminopropanoly – β -antiadrenergní aktivita – izolovaná předsíň – izolovaná aorta

Čes. slov. Farm., 2008; 57, 115–118

SUMMARY

Synthesis of 2-{3-[4-(4-fluorophenyl)-1-piperazinyl]-2-hydroxy-propoxy}-phenylcarbamic acid alkylesters and *in vitro* evaluation of their β -antiadrenergic and vasodilative activities

In effort to obtain effective compounds able to favourably influence pathologically changed cardiovascular functions, such as hypertension and ischemic cardiac disease, a new series of aryloxyaminopropanols were synthesized. Four of the compounds, which differ in the alkyl substitution of phenylcarbamate (methyl, ethyl, propyl, butyl), were chosen for basic *in vitro* pharmacological analyses. In experiments on the isolated spontaneously beating guinea pig atria all compounds at conc. of $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ decreased the basic heart rate (7.6–13.6%) and inhibited the positive chronotropic effect of isoprenaline ($pA_2 = 6.28–6.81$). The compounds manifest only a slight relaxation effect on KCl pre-contracted aortal strips of rats (not until conc. of $1,0 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹). The compounds with propyl and butyl substitution appear more effective than the methyl and ethyl derivatives.

Key words: aryloxyaminopropanols – β -antiadrenergic – isolated atria – isolated aorta

Čes. slov. Farm., 2008; 57, 115–118

Má

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Tomáš Goněc
Ústav chemických léčiv VFU FaF
Palackého 1–3, 612 42 Brno
e-mail: tgonec@vfu.cz

Úvod

Arteriální hypertenze je nejčastějším onemocněním kardiovaskulárního systému s 25% prevalencí v populaci dospělých. Neléčená hypertenze mnohonásobně zvyšuje riziko ischemické choroby srdeční, infarktu myokardu a zejména mozkové ischemie, onemocnění s nejvyšší mortalitou vůbec. Esenciální hypertenze je způsobena patologickým zvýšením tonu sympatické složky vegetativního nervového systému, a proto se k její terapii používají především látky antagonizující adrenergní receptory tohoto systému. Základní strukturou antagonizující β -adrenergní receptory je aryloxyaminopropanol, případně arylaminoethanol. Látky obsahující ve své struktuře substituovaný fenylpiperazin (urapidil, naftipidil) pak výrazně antagonizují α -adrenergní receptory. Klinicky využívané sloučeniny s kombinovaným účinkem na α i β adrenergní receptory jsou v současnosti labetalol, karvedilol a celiprolol¹⁻³⁾.

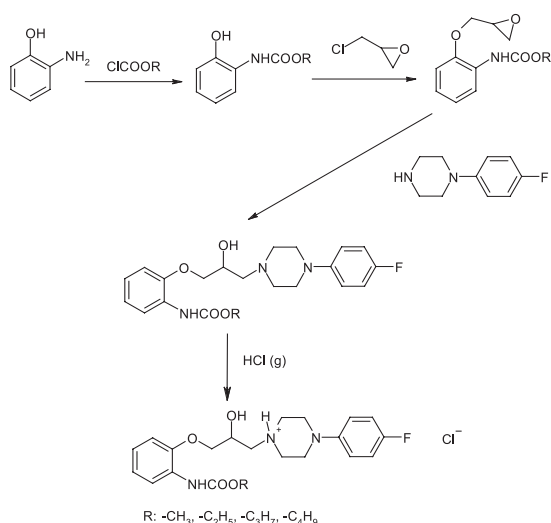
Snaha o nalezení látky s kombinovaným antihypertenzním účinkem vyústila v přípravu sérií látek ze skupiny jak arylaminoethanolu, tak aryloxyaminopropanolu, obsahujících ve své struktuře substituované fenylpiperaziny. 4-fluoro substituce fenylpiperazinu navíc vykazovala výrazné vazodilatační účinky (na rozdíl od 2-methoxy- substituce)⁴⁻⁶⁾. Cílem práce byla proto příprava čtyř dalších sloučenin s 4-fluorfenylpiperazinem v bazické části molekuly a alkylkarbamátovou skupinou v poloze 2 fenylového jádra a *in vitro* zhodnocení jejich β -antiadrenergní a vazodilatační aktivity.

POKUSNÁ ČÁST

Syntetická část

Rozpouštědla a chemikálie byly dodány od koncernu Sigma-Aldrich (GE) a firmy Lachner (CZ) a byly použity bez dalšího přečištění.

Látky UCHL 11-UCHL 14 byly připraveny třístupňovou syntézou (obr. 1). Alkylestery kyseliny 2-hydroxyfenylkarbamové byly připraveny reakcí 2-aminofenolu (0,2 mol) s odpovídajícími



Obr. 1. Schéma syntézy látek

alkylestery kyseliny chlormravenčí (0,1 mol) v prostředí diethyletheru. Alkylestery kyseliny 2-[(2,3-epoxy)-propoxy]-fenylkarbamové byly připraveny reakcí alkylesteru kyseliny 2-hydroxyfenylkarbamové (0,1 mol) s 1-chlor-2,3-epoxypropanem (0,3 mol) v zásaditěm prostředí hydroxidu draselného. Metody byly již dříve popsány⁷⁾. Konečné látky byly připraveny reakcí příslušné epoxysloučeniny (0,01 mol) s 1-(4-fluorfenyl)-piperazinem (0,01 mol) v prostředí 2-propanolu. Směs byla zahřívána 6 hodin při teplotě varu rozpouštědla. Rozpouštědlo bylo vakuově oddestilováno, surový produkt rozpuštěn v diethyletheru a přidáním nasyceného etherického roztoku chlorovodíku byly získány amorfní sraženiny příslušných hydrochloridů, jež byly následně rekrystalizovány z ethanolu.

Teploty tání byly stanoveny na Kofflerově bloku po vysušení nad P₂O₅ za sníženého tlaku. Nejsou korigovány.

NMR spektra byla změřena na přístroji Varian Gemini 200 (¹H 200 MHz, ¹³C 50,3 MHz). Chemické posuny jsou uvedeny v ppm (δ) v poměru k tetramethylsilanu jako vnitřnímu standardu.

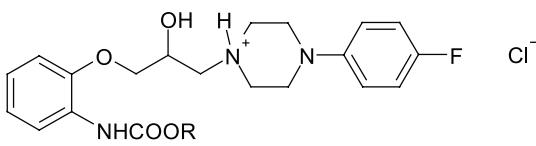
Infračervená spektra byla změřena na IČ spektrofotometru NICOLET Model Impact 410, v rozsahu vlnových délek 4000–400 cm⁻¹. Vzorky byly měřeny v pevné formě, připravené lisováním do tablety s KBr v koncentraci 1,0–1,5 mg látky na 400 mg KBr.

Biologická část

Antagonistický účinek nově syntetizovaných látek na pozitivně chronotropní efekt β -adrenergního agonisty isoprenalinu byl sledován na izolovaných, spontánně tepajících předsíních morčat. Pravá předsíň srdce z morčete byla napojena na izometrický snímač v Tyrodově roztoku (složení v mmol.l⁻¹: NaCl 137,0; KCl 2,7; NaHCO₃ 25,0; MgCl₂ 1,0; NaH₂PO₄ 0,42; CaCl₂ 1,9 a glukosa 11,0) při teplotě 30 °C pod stálým napětím 1 g a provzdušňována pneumoxidem (O₂ + 5% CO₂). Po 30 minutách stabilizace preparátu byl kumulativně přidáván isoprenalin ve formě hydrochloridu (Sigma-Aldrich, GE) v koncentracích 10⁻¹² až 10⁻⁶ mol.l⁻¹ a po každém přidání byly zaznamenány změny tepové frekvence. Po propláchnutí a ustálení preparátu byla do lázně podána testovaná látka v koncentraci 10⁻⁶ mol.l⁻¹ a po 20 min znovu kumulativně aplikován isoprenalin. Afinita k isoprenalinu byla vyjádřena jako jeho střední efektivní koncentrace (EC₅₀). Míra antagonistického působení testovaných látek byla vypočítána z posunu křivek závislosti účinku na koncentraci jako disociační konstanta pA₂⁸⁾. Relativní změny tepové frekvence předsíní byly hodnoceny vzhledem k počátečním hodnotám v pětiminutových intervalech po aplikaci testované látky. Pro porovnání účinku byl použit jako standard β -adrenergní antagonist a celiprolol ve formě hydrochloridu (Rhône-Poulenc Rorer, FR) v koncentraci 10⁻⁷ mol.l⁻¹.

Vazodilatační účinek nově syntetizovaných látek byl sledován na izolovaných a KCl prekontrahovaných aortách potkanů. Dospělí potkaní kmene Wistar o hmotnosti 240–300 g byli anestetizováni *i.p.* aplikací pentobarbitalu (50 mg.kg⁻¹) a následně byla izolována aorta. Nařezané kroužky (4 mm) byly upevněny k snímači pro izometrické měření v orgánové lázni naplněné Krebs-Henseleitovým roztokem (složení v mmol.l⁻¹: NaCl 118,0; KCl 4,7; NaHCO₃ 25,0; MgSO₄ 1,6; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 2,5 a glukosa 11,0) při teplotě 37 °C pod stálým napětím 1 g a provzdušňovány pneumoxidem. Po 2 hodinách stabilizace preparátu byl přidán vodný roztok KCl (50 mmol.l⁻¹), který navodil depolarizaci buněčné membrány doprovázenou otevřením pomalých napěťově řízených vápníkových kanálů a vniknutím Ca²⁺ do buňky. Po ustálení napětí preparátu byly kumulativně přidávány testované látky v koncentracích 10⁻⁷ až 10⁻⁵ mol.l⁻¹ a zaznamenány změny napětí aorty na lineárním zapisovači (Laboratorní přístroje, Praha). Při maximální relaxaci byl k preparátu aplikován roztok CaCl₂ o koncentraci 8.10⁻³ mol.l⁻¹ a zaznamenána následná kontrakce. Pro porovnání účinku byla použita vasodilatační působící prostřednictvím inhibice účinku Ca²⁺ v buňce hladkého svalstva, tj. verapam-

Tab. 1. Připravené látky a jejich charakteristika

					
Pracovní název	R:	sumární vzorec	Mr	t.t. (°C)	výtěžek (%)
UHL 11	-CH ₃	C ₂₁ H ₂₇ FCIN ₃ O ₄	439,96	189–193	79
UHL 12	-C ₂ H ₅	C ₂₂ H ₂₉ FCIN ₃ O ₄	453,99	189–195	76
UHL 13	-C ₃ H ₇	C ₂₃ H ₃₁ FCIN ₃ O ₄	468,02	155–159	70
UHL 14	-C ₄ H ₉	C ₂₄ H ₃₃ FCIN ₃ O ₄	482,05	165–169	68

Tab. 2. ¹H NMR charakteristika připravených látek

¹ H NMR (200 MHz, DMSO D ₆) δ(ppm):	
UHL 11	3,08–3,52 (m; 6H; -CHOH-CH ₂ N, 2,6- piperazin); 3,52–3,80 (m; 7H; -COOCH ₃ , 3,5 piperazin); 3,82–4,04 (m; 2H; -OCH ₂ CHOH-); 4,42–4,60 (m; 1H; -CHOH-); 6,16 (s; 1H; -CHOH-); 6,85–7,20 (m; 7H; arom.H); 7,80 (d; 1H; J = 7,3 Hz; 6'arom.H Ar-NHCOOR); 8,73 (s; 1H; -NHCO-); 10,89 (s; 1H; NH ⁺)
UHL 12	1,26 (t; 3H; J = 7,0 Hz; -CH ₂ CH ₃); 3,12–3,50 (m; 6H; -CHOH-CH ₂ N, 2,6- piperazin); 3,50–3,80 (m; 4H; 3,5 piperazin); 3,80–4,04 (m; 2H; -OCH ₂ CHOH-); 4,15 (q; 2H; J = 7,0 Hz; -CH ₂ CH ₃); 4,45–4,64 (m; 1H; -CHOH-); 6,16 (s; 1H; -CHOH-); 6,85–7,20 (m; 7H; arom.H); 7,82 (d; 1H; J = 7,3 Hz; 6'arom.H Ar-NHCOOR); 8,67 (s; 1H; -NHCO-); 10,91 (s; 1H; NH ⁺)
UHL 13	0,92 (t; 3H; J = 7,3 Hz; -CH ₂ CH ₂ CH ₃); 1,55–1,75 (m; 2H; -CH ₂ CH ₂ CH ₃); 3,10–3,50 (m; 6H; -CHOH-CH ₂ N, 2,6- piperazin); 3,50–3,85 (m; 4H; 3,5 piperazin); 3,85–4,12 (m; 4H; -OCH ₂ CHOH-, -CH ₂ CH ₂ CH ₃); 4,45–4,61 (m; 1H; -CHOH-); 6,18 (s; 1H; -CHOH-); 6,85–7,20 (m; 7H; arom.H); 7,80 (d; 1H; J = 7,3 Hz; 6'arom.H Ar-NHCOOR); 8,68 (s; 1H; -NHCO-); 10,85 (s; 1H; NH ⁺)
UHL 14	0,91 (t; 3H; J = 7,1 Hz; -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃); 1,28–1,44 (m; 2H; -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃); 1,53–1,70 (m; 2H; -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃); 3,15–3,50 (m; 6H; -CHOH-CH ₂ N, 2,6- piperazin); 3,50–3,84 (m; 4H; 3,5 piperazin); 3,84–4,05 (m; 2H; -OCH ₂ CHOH-); 4,10 (t; 2H; J = 6,6 Hz; -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃); 4,43–4,61 (m; 1H; -CHOH-); 6,18 (s; 1H; -CHOH-); 6,85–7,20 (m; 7H; arom.H); 7,81 (d; 1H; J = 7,3 Hz; 6'arom.H Ar-NHCOOR); 8,68 (s; 1H; -NHCO-); 10,90 (s; 1H; NH ⁺)

Tab. 3. ¹³C NMR charakteristika připravených látek

¹³ C NMR (50,3 MHz, DMSO D ₆) δ (ppm):	
UHL 11	158,82; 154,09; 154,03; 148,08; 146,39; 127,41; 123,50; 120,72; 120,49; 117,72; 117,57; 115,56; 115,12; 112,07; 70,76; 63,99; 57,84; 51,99; 51,61; 51,09; 45,81
UHL 12	158,79; 154,07; 153,57; 148,00; 146,39; 127,49; 123,36; 120,68; 120,39; 117,69; 117,54; 115,53; 115,09; 112,00; 70,77; 64,02; 60,21; 57,83; 51,97; 51,14; 45,83; 14,37
UHL 13	158,79; 154,09; 153,69; 148,03; 146,30; 127,44; 123,41; 120,68; 120,51; 117,69; 117,54; 115,53; 115,11; 112,03; 70,73; 65,78; 63,94; 57,81; 52,03; 51,09; 45,80; 21,76; 10,05
UHL 14	158,81; 154,10; 153,71; 148,03; 146,38; 127,47; 123,42; 120,69; 120,51; 117,70; 117,55; 115,56; 115,12; 112,04; 70,76; 64,01; 57,84; 52,03; 51,12; 45,78; 30,49; 18,42; 13,42

mil hydrochlorid (Sigma-Aldrich, GE) a flunarizin dihydrochlorid (VÚL, Modra, SR).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Syntetická část

Byly připraveny čtyři nové látky, alkylestery kyseliny 2-{3-[4-(4-fluorfenyl)-piperazin-1-yl]-2-hydroxy-propoxy}-fenykarbamové lišící se navzájem délkou alifatického řetězce. Základní charakteristiku nově syntetizovaných látek uvádí tabulka 1. Struktura látek byla potvrzena ¹H NMR (tab. 2) a ¹³C NMR (tab. 3) spektroskopii.

V infračervené oblasti spektra látky vykazují charakteristické vibrační pásy (tab. 4).

Tab. 4. Absorpční pásy IČ spektra v (cm⁻¹)

látka	N-H	C = O	HN-CO	C _{AR} -O	C _{ALIF} -O
UHL 11	3264	1722	1524	1234	1064
UHL 12	3270	1714	1525	1233	1063
UHL 13	3268	1709	1523	1236	1065
UHL 14	3275	1722	1523	1238	1071

Biologická část

Hodnoty EC₅₀, pA₂ a hodnoty relativních změn tepové frekvence uvádějí tabulky 5 a 6. Jak ukazují hodnoty pA₂, všechny testované látky vykazují β-antiadrenergní aktivitu, která je přibližně 16- až 57násobně nižší než aktivita celi-prololu, přičemž se mírně zvyšuje s velikostí alkyly karbamátu. Rozdíly mezi jednotlivými deriváty však nebyly statisticky významné. Podobnou aktivitu vykazují i strukturálně příbuzné látky hodnocené dříve ^{5, 6}.

Tab. 5. Antiisoprenalinové působení testovaných látek. Hodnoty EC_{50} a pA_2 . Výsledky jsou průměrem ze 6 měření $\pm$ S.E.M.

Látka	koncentrace (mol.l ⁻¹)	EC_{50} kontroly (mol.l ⁻¹)	EC_{50} testované látky (mol.l ⁻¹)	pA_2
UCHL 11	1,0.10 ⁻⁶	6,46 $\pm$ 3,05.10 ⁻¹⁰	1,87 $\pm$ 1,05.10 ⁻⁹	6,28 $\pm$ 0,31
UCHL 12	1,0.10 ⁻⁶	6,07 $\pm$ 1,88.10 ⁻¹⁰	3,22 $\pm$ 1,87.10 ⁻⁹	6,61 $\pm$ 0,15
UCHL 13	1,0.10 ⁻⁶	4,58 $\pm$ 2,51.10 ⁻¹⁰	3,45 $\pm$ 1,30.10 ⁻⁹	6,81 $\pm$ 0,24
UCHL 14	1,0.10 ⁻⁶	2,40 $\pm$ 1,04.10 ⁻⁹	1,62 $\pm$ 0,46.10 ⁻⁸	6,76 $\pm$ 0,08
celiprolol	1,0.10 ⁻⁷	1,14 $\pm$ 0,49.10 ⁻⁹	1,35 $\pm$ 0,39.10 ⁻⁸	8,03 $\pm$ 0,20

Tab. 6. Hodnoty relativních změn tepové frekvence po aplikaci látek. Výsledky jsou průměrem ze 6 měření $\pm$ S.E.M.

Látka	koncentrace (mol.l ⁻¹)	tepová frekvence (%)			
		5 min	10 min	15 min	20 min
UCHL 11	1,0.10 ⁻⁶	103,4 $\pm$ 3,6	99,4 $\pm$ 3,6	96,4 $\pm$ 3,4	92,4 $\pm$ 3,9
UCHL 12	1,0.10 ⁻⁶	100,2 $\pm$ 1,8	93,8 $\pm$ 3,2	92,7 $\pm$ 3,7	90,0 $\pm$ 2,1
UCHL 13	1,0.10 ⁻⁶	93,2 $\pm$ 2,1	88,4 $\pm$ 2,2	91,6 $\pm$ 5,2	88,2 $\pm$ 1,8
UCHL 14	1,0.10 ⁻⁶	102,2 $\pm$ 5,2	96,4 $\pm$ 4,6	91,1 $\pm$ 4,4	86,4 $\pm$ 3,9
Celiprolol	1,0.10 ⁻⁷	98,5 $\pm$ 1,0	95,4 $\pm$ 1,1	90,6 $\pm$ 1,3	86,6 $\pm$ 0,9

Tab. 7. Relaxační efekt testovaných látek na KCl depolarizované izolované aorty potkanů. Výsledky jsou průměrem ze 7 měření $\pm$ S.E.M.

koncentrace (mol.l ⁻¹)	Relaxace testovanou látkou (%)			kontrakce CaCl ₂ (%)
	1,0.10 ⁻⁷	1,0.10 ⁻⁶	1,0.10 ⁻⁵	8,0.10 ⁻³
UCHL 11	1,2 $\pm$ 1,2	4,1 $\pm$ 2,9	31,1 $\pm$ 6,9	47,3 $\pm$ 10,8
UCHL 12	1,2 $\pm$ 1,2	2,5 $\pm$ 2,5	61,7 $\pm$ 7,2	79,0 $\pm$ 14,4
UCHL 13	1,5 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 2,9	85,3 $\pm$ 10,5	63,1 $\pm$ 12,6
UCHL 14	1,7 $\pm$ 1,2	5,6 $\pm$ 4,1	87,7 $\pm$ 8,1	54,5 $\pm$ 14,3
flunarizin	20,7 $\pm$ 4,3	38,9 $\pm$ 4,9	74,3 $\pm$ 9,9	61,6 $\pm$ 10,2
verapamil	6,7 $\pm$ 1,9	33,4 $\pm$ 3,8	69,0 $\pm$ 4,7	42,8 $\pm$ 14,3

Všechny látky přidávané k izolovanému myokardiálnímu preparátu v koncentraci 10⁻⁶ mol.l⁻¹ snižovaly tepovou frekvenci v průměru o 7,6–13,6 %. Tento pokles byl pozvolný, rozvíjející se v průběhu sledovaných 20 min. Intenzita negativní chronotropie se prohlubovala se zvětšujícím se substituentem od metylu po butyl. Účinek látek na TF je u látek s větším substituentem (UCHL 13 a 14) porovnatelný s celiprololem, který byl však podán v desetinásobně nižší koncentraci (10⁻⁷ mol.l⁻¹) (tab. 6).

Míru relaxace izolované aorty potkanů prekontrahované KCl uvádí tabulka 7. Všechny látky podávané kumulativně vykazovaly výraznou relaxaci až v koncentraci 10⁻⁵ mol.l⁻¹, na rozdíl od verapamilu a flunarizinu, u kterých se relaxace projevila už v 100násobně nižších koncentracích. Ve srovnání s 4-alkylkarbamátovým polohovým izomerem⁵⁾ se jeví 2-substituce fenyly jako méně výhodná a oproti benzofuranovým analogům⁶⁾ vykazují látky výrazně nižší vazodilatační efekt. Vzhledem ke skutečnosti, že po přidání roztoku CaCl₂ došlo opět ke kontrakci aorty, je pravděpodobné, že sledované látky působí přímo inhibičně na účinky Ca²⁺ v hladké svalovině aorty.

Ze získaných výsledků vyplývá, že látky s většími substituenty na jádře, tj. s propyl (UCHL 13) a butylkarbamátovou substitucí (UCHL 14), mají vyšší schopnost ovlivňovat základní kardiovaskulární funkce. Obě látky potvrdily schopnost specificky inhibovat pozitivně chronotropní

účinky izoprenalinu na srdci i působit vazodilatačně. Proto se v našich dalších experimentech budeme věnovat studiu jejich účinků v podmínkách *in vivo* u intaktních zvířat a sledovat jejich potenciální antihypertenzní aktivitu.

LITERATURA

1. Fölsch, U. R., Kochisek, K., Schmidt, R. F.: Patologická fyziologie. Praha, Grada Publishing, 2003, 138–143.
2. Lülmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: Farmakologie a toxikologie. Praha, Grada Publishing, 2004, 97–121.
3. Marek, J. et.al.: Farmakoterapie vnitřních nemocí. Praha, Grada Publishing, 2005, 87–110.
4. Čelková, H., Csöllei, J., Čížmarík, J. et al.: Čes. slov. Farm., 1996; 45, 255–259.
5. Mlynárová, J., Čelková, H., Račanská, E.: Čes. slov. Farm., 1996; 45, 260–264.
6. Račanská, E., Kurfürst, P., Csöllei, J., Švec, P.: Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae, 2004; 51, 182–191.
7. Csöllei, J., Borovanský, A., Beneš, L. et al.: Čes. slov. Farm., 1982; 31, 229–235.
8. Van Rosum, J. N.: Arch. Int. Pharmacol. Ther., 1963; 143, 299–330.