

## PŮVODNÍ PRÁCE

**Analytické hodnotenie mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-*tert*-butylamónium]fumarátu****Analytical profile of mono[3-[4-(2-ethoxyethoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-*tert*-butylammonium] fumarate****Ivan Malík • Lenka Mitterová • Fils Andriamainty • Petr Mokřý • Miloš Lukáč • Jozef Csöllei • Jana Gališínová • Janka Karlovská**

Došlo 25. srpna 2011/ Přijato 17. října 2011

**Súhrn**

Predmetom publikácie je komplexné spektrálne a fyzikálno-chemické hodnotenie mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-*tert*-butylamónium]fumarátu, potenciálneho ultrakrátko pôsobiaceho blokátora  $\beta_1$ -adrenergických receptorov. Totožnosť hodnotenej zlúčeniny (pracovne označenej ako *UPB-2*) bola potvrdená  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR a IR spektrami. V rámci stanovenia základných fyzikálno-chemických charakteristík bola určená hodnota teploty topenia, rozpustnosť v spektre rozpúšťadiel, čistota (adsorpčná chromatografia na tenkej vrstve), povrchová aktivita (nepriama Traubeho stalagmometrická metóda), acidobázické charakteristiky (hodnota  $\text{p}K_a$  stanovená alkalimetrickou titráciou), hodnoty  $\log \varepsilon$  (spektrofotometricky v UV/VIS oblasti), ako aj hodnotenie vplyvu kyslého a zásaditého prostredia na stabilitu *UPB-2*. Ďalšími experimentálne stanovenými parametrami boli lipohydrofilné deskriptory určené pomocou RP-HPLC ( $\log k'$ ), *shake flask* metódou stanovené hodnoty rozdeľovacích koeficientov  $P_{\text{exp}}$  (resp.  $\log P_{\text{exp}}$ ) v rôznych rozdeľovacích systémoch. Na základe  $\log P_{\text{exp}}$ -údajov bola predpovedaná schopnosť *UPB-2* prechádzať cez hematoencefalickú bariéru. Pre stanovenie obsahu *UPB-2* bola aplikovaná 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

**Summary**

The present paper aims at a complex spectral and physicochemical evaluation of mono[3-[4-(2-ethoxyethoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-*tert*-butylammonium] fumarate, the potential ultra-short acting blocker of  $\beta_1$ -adrenergic receptors. The identity of the evaluated compound (labelled as *UPB-2*) was confirmed by  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR and IR spectral data as well. The estimated physicochemical parameters included melting point data, solubility in various media, purity checking (adsorption thin-layer chromatography), surface activity determination (non-direct Traube stalagmometric method), acidobasic characteristics ( $\text{p}K_a$  value determination by alkalimetric titration),  $\log \varepsilon$  values estimation (spectrophotometrically in UV/VIS region) and a study of the influence of acidic and alkaline media towards the stability of *UPB-2*. Other experimentally estimated values were lipohydrophilic descriptors using RP-HPLC ( $\log k'$ ) and the  $\log P_{\text{exp}}$ s in various lipohydrophilic media by the shake flask method. Based on the  $\log P_{\text{exp}}$  readouts, the ability to permeate across the brain-blood barrier was predicted. For the content determination of *UPB-2* the RP-HPLC (reversed-phase HPLC), the method of an internal standard and UV/VIS spectrophotometry at the wavelength of 260 nm (aqueous medium) and at 258 nm (methanolic medium) was applied.

**Key words:**  $\beta_1$ -blockers • analytical evaluation • spectral and physicochemical properties • content determination

PharmDr. Ivan Malík (✉) • L. Mitterová • F. Andriamainty • J. Gališínová  
Katedra farmaceutickej chémie, Farmaceutická fakulta  
Univerzity Komenského  
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika  
e-mail: malik@fpharm.uniba.sk

P. Mokřý • J. Csöllei  
Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární  
a farmaceutická univerzita Brno

M. Lukáč  
Katedra chemickej teórie liečiv, Farmaceutická fakulta,  
Univerzita Komenského v Bratislave

J. Karlovská  
Laboratórium NMR, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského  
v Bratislave

## Úvod

Používanie niektorých antagonistov  $\beta$ -adrenergických receptorov ( $\beta$ -blokátorov,  $\beta$ B) pri liečbe pacientov s akútnou myokardiálnou ischémiou môže viesť k srdcovému zlyhaniu, sínusovej bradykardii, progresívnej atrioventrikulárnej blokáde alebo k bronchospazmom<sup>1)</sup>. Spomínané komplikácie nie sú často pred samotnou terapiou s  $\beta$ B predpovedateľné, môžu byť dôsledkom priamej depresie myokardu a jeho funkcií ako aj špecializovaných konduktívnych tkanív. Zároveň relatívne dlhé pôsobenie štandardných  $\beta$ B znemožňuje pohotovú elimináciu takýchto nežiaducich účinkov<sup>1, 2)</sup>. Preto snaha výskumných tímov smerovala a smeruje k projekcii, príprave a hodnoteniu takých  $\beta$ B, ktoré by sa vyznačovali okamžitým nástupom účinku, možnosťou titrovania dávky a relatívne krátkou dobou trvania ich pôsobenia. Esmolol je hydrofilným kardioselektívnym antagonistom  $\beta_1$ -adrenergických receptorov ( $\beta_1/\beta_2 = 33$ ) bez vnútornej sympatomimetického aktivity s polčasom eliminácie ( $T_{1/2}$ ) približne 9 minút. Tento relatívne krátky  $T_{1/2}$  je spôsobený hydrolýzou prítomnej esterovej väzby sérovými a tkanivovými esterázami<sup>3, 4)</sup>. Časovo limitované trvanie účinku esmololu umožňuje pri intravenózne aplikácii rýchle titrovanie dávky pre dosiahnutie optimálnej  $\beta$ -adrenergickej blokády<sup>1)</sup>. Vo vysokých dávkach však môže spôsobiť priamu kardiodepresiu, hypotenziu a srdcové zlyhanie<sup>3, 4)</sup>. Ešte kratší  $T_{1/2}$  (približne 4 minúty) je prisudzovaný landiololu, vysokoselektívnemu  $\beta$ B ( $\beta_1/\beta_2 = 255$ ), ktorý v porovnaní s esmololom<sup>5)</sup> vykazuje *in vivo* deväťnásobne účinnejšiu blokádu  $\beta$ -adrenergických receptorov a *in vitro* osemnásobne vyššiu kardioselektivitu. Súčasne má landiolol aj rýchlejší nástup účinku ako aj elimináciu pri miernejšom negatívnom inotropnom pôsobení<sup>6, 7)</sup>.

Cieľom predkladanej práce, analytického hodnotenia mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-*tert*-butylamónium]fumarátu (pracovne označeného ako UPB-2) je rozšíriť spektrum poznatkov o (potenciálnych) ultrakrátko pôsobiach  $\beta$ B z hľadiska určenia ich spektrálnych a fyzikálno-chemických parametrov využiteľných nielen v rámci QSAR štúdií, ale aj spätne v projekcii nových potenciálnych liečiv ovplyvňujúcich kardiovaskulárne funkcie.

## Experimentálna časť

### Spektrálna časť

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

##### Použitie chemikálie

Deuterovaná voda (rozpúšťadlo), ako vnútorný štandard bol použitý tetradeutero-3-trimetylsilylpropionát (Fluka AG, Buchs, Švajčiarsko;  $(\text{CH}_3)_3\text{SiCD}_2\text{COONa}$ ,  $M_r = 172,27$ ). Pripravili sa roztoky hodnotenej substancie UPB-2 s koncentráciou 2 mg/650  $\mu\text{l}$  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,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $J = 7,0$  Hz); 1,34 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 2,96–3,02 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2^+\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 3,55–3,62 (kva, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $J = 7,0$  Hz); 3,79 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $J = 4,7$  Hz); 4,15 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAr}$ ,  $J = 4,8$  Hz); 4,25–4,39 (m, 2H,  $(\text{OH})\text{CHCH}_2\text{NH}_2^+$ ); 4,40–4,50 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{OH})$ ); 6,67 (s,  $1/2$ , fumarát, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ); 6,90; 6,93 (d, 2H,  $\text{OArH}$ ,  $J = 8,9$  Hz); 6,70–7,20 (broad peak, 3H,  $(\text{OH})$ ,  $\text{NH}_2^+$ ); 7,95; 7,98 (d, 2H,  $\text{ArHCOO}$ ,  $J = 8,9$  Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz)  $\delta$  (ppm): 15,14 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ); 26,10 ( $\text{NH}_2^+\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 45,60 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2^+$ ); 55,51 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 65,49 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ); 66,21 ( $\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})$ ); 66,89 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OAr}$ ); 67,59 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OAr}$ ); 68,70 ( $\text{CH}(\text{OH})$ ); 114,27 (2C,  $\text{OArC}_2$ ); 122,12 (1C,  $\text{ArCCOO}$ ); 131,74 (2C,  $\text{ArC}_2\text{CCOO}$ ); 136,35 (fumarát,  $\text{CH}=\text{CH}$ ); 162,76 (1C,  $\text{OArC}$ ); 166,03 (COO); 173,11 (fumarát, COO).

### IR spektrometria

#### Prístroje a zariadenia

Spektrometer FT-IR Impact 400D (Nicolet), merané v tabletách bromidu draselného v koncentrácii 2–3 mg látky/800 mg KBr.

IR  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{H})$ : 2972;  $\nu_{\text{s}}(\text{C}-\text{H})$ : 2864;  $\nu(\text{C}=\text{O})$ : 1699;  $\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{C})$ : 1607;  $\delta(\text{N}-\text{H})$ : 1508;  $\delta(\text{CH}_2)$ : 1457;  $\nu(\text{C}-\text{N})_{\text{sek. N}}$ : 1353, 1280;  $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ : 1171 (1118);  $\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{es}}$ : 1251, 1053;  $\gamma(\text{C}-\text{H})$ : 767, 660; v IR spektre nebola nepozorovaná vibrácia  $\nu(\text{NH}_2^+)$  predpokladaná približne okolo 2700;  $\delta(\text{NH}_2^+)$ : 1600–1575 v prekryve;  $\nu(\text{C}-\text{OH})$ : skryté v oblasti 1450–1500.

### Spektrofotometria v UV/VIS oblasti

#### Použitie chemikálie

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

#### Priprava roztokov

Pripravili sa vodné a metanolové roztoky<sup>8)</sup> študovanej látky UPB-2 s  $c = 1 \times 10^{-5}$  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-2 sa meralo v destilovanej vode ako aj v metanole. Na základe Lambert-Beevovho zákona sa vypočítali hodnoty  $\epsilon$ , resp.  $\log \epsilon$  pre

všetky absorpčné maximá v obidvoch zvolených médiách.

UPB-2, vodné prostredie – UV  $\lambda_{\max}$  nm (absorbancia; log  $\epsilon$ ): 198 (1,29180; 5,11), 260 (0,88861; 4,95). UPB-2, metanolové prostredie – UV  $\lambda_{\max}$  nm (absorbancia; log  $\epsilon$ ): 210 (0,87086; 4,94), 258 (0,89619; 4,95).

### Analytická časť

#### Stanovenie teploty topenia

##### Prístroje a zariadenia

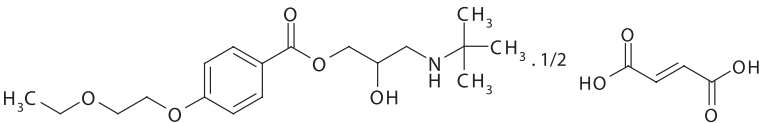
STUART SMP 11 (Lennox Laboratory Suppliers, Dublin, Írsko).

#### 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.* (Pli-chem, 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).

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

|  |              |                       |             |            |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------|-------------|------------|
| Sumárny vzorec (báza)                                                              | $M_r$ (báza) | Sumárny vzorec (sol)  | $M_r$ (sol) | $t_f$ (°C) |
| $C_{18}H_{29}NO_5$                                                                 | 339,43       | $C_{26}H_{37}NO_{13}$ | 794,93      | 150–153    |

##### Pracovný postup

Teplota topenia UPB-2 bola stanovená po 24-h sušení v exsíkátore nad  $P_2O_5$  pri tlaku 10 kPa a laboratórnej teplote, jej hodnoty sú uvedené v tabuľke 1.

#### Stanovenie rozpustnosti

##### Použité chemikálie

Destilovaná voda, metanol *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR), lieh 96 % (Lachema, Brno, ČR), kyselina chlorovodíková s  $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  (CentralChem, Bratislava, SR), hydroxid sodný s  $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  (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-2 bola stanovená podľa SL 1<sup>9)</sup>. Návažok látky predstavoval jednotlivo 0,0100 g pre všetky rozpúšťadlá. Postupne sa hodnotila jej rozpustnosť v destilovanej vode, v metanole, v liehu 96 %, v kyseline chlorovodíkovej s  $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ , v hydroxide 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.

##### Materiál, prístroje a zariadenia

Silufol® UV<sub>254</sub> s vrstvou silikagélou s rozmermi 200 × 200 mm (nastrihaný na vhodné 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  $\mu$ l 1 % metanolových roztokov hodnotenej zlúčeniny UPB-2 a kyseliny *p*-hydroxybenzoovej (*p*-OHBA) ako „štandardu“, vstupnej substancie pri syntéze UPB-2. 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 ( $\varphi = 7 : 3$ ). Optimálne hodnoty  $R_f$  pre UPB-2 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-2* 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-2* 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  $t = 21^\circ \text{C}$ .

**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).

**Priprava roztokov**

Roztok hodnotenej látky *UPB-2* bol pripravený rozpustením 0,025 g substancie v destilovanej vode na objem 50,0 ml.

**Pracovný postup**

Disociačná konštantá *UPB-2* bola stanovená potenciometricky alkalimetrickou titráciou s použitím 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 Sta-

tistica 8.0 (Stat Soft, Tulsa, USA) pomocou  $V_{1/2}$  vypočítala disociačná konštantá. Výsledná hodnota  $pK_a$  pre *UPB-2* je v časti *Výsledky a diskusia* 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 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  $C_{18}$  7  $\mu\text{m}$ ,  $250 \times 4 \text{ mm}$  (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-2* 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 – 90% metanol upravený vodným roztokom natriumacetátu; prietoková rýchlosť –  $0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ ; tlak – 7,9 MPa; vlnová dĺžka – 260 nm; pracovná teplota –  $21\text{--}22^\circ \text{C}$ .

B. Mobilná fáza – 95% metanol upravený vodným roztokom natriumacetátu; prietoková rýchlosť –  $0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ ; tlak – 5,9 MPa; vlnová dĺžka – 260 nm; pracovná teplota –  $21\text{--}22^\circ \text{C}$ .

Mŕtvy čas kolóny ( $t_0$ ) sa stanovil roztokom dusitanu sodného s  $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ , ktorý mal v použítom 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-2* boli pripravené rozpustením 0,005 g látky v metanole a upravené na objem 25,0 ml. Po odvzdušnení mobilnej fázy bol chromatografický systém premývaný približne 20 minút. Prvé dva nástreky bol roztok dusitanu sodného, potom sa aplikovali roztoky

Tab. 2. Hodnota retenčného faktora  $k'$  ( $\log k'$ ) študovanej substancie *UPB-2* získaného z RP-HPLC v prostredí 90 % a 95 % metanolu

| Mobilná fáza |      | $k'$ |      |         |        | $\log k'$ |        |         |  |
|--------------|------|------|------|---------|--------|-----------|--------|---------|--|
|              | I.*  | II.  | III. | Priemer | I.     | II.       | III.   | Priemer |  |
| 90 % metanol | 0,94 | 0,94 | 0,94 | 0,94    | -0,027 | -0,027    | -0,027 | -0,027  |  |
| 95 % metanol | 1,09 | 1,09 | 1,09 | 1,09    | 0,037  | 0,037     | 0,037  | 0,037   |  |

\*číslo merania

hodnotenej látky (20  $\mu$ l). Každá vzorka bola aplikovaná trikrát<sup>10)</sup>, pre výpočet sa použila priemerná hodnota  $t_R$ . Získané hodnoty sú uvedené v tabuľke 2.

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

##### Použité chemikálie

Oktán-1-ol *p.a.* (Merck, Schudardt, 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).

##### Príprava 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-2 sa pripravil navážením 0,100 g zlúčeniny, jej prenesením do 50-ml odmernej banky a rozpustením v 30–40 ml tlmivého roztoku<sup>8, 10)</sup>. Po ochladení sa banka týmto roztokom doplnila na objem 50 ml.

##### Pracovný postup

Rozdeľovací koeficient  $P_{\text{exp}}$  študovanej zlúčeniny UPB-2 bol stanovený experimentálne klasickou *shake flask* metódou jej vytrepaním medzi dve nemiešateľné fázy tak, ako sa postupovalo aj v publikáciách<sup>8, 10)</sup>. Lipofilnú fázu reprezentoval postupne oktán-1-ol, heptán, cyklohexán a ako vodná fáza bol použitý tlmivý fosforečnanový roztok (TFR) s hodnotou  $pH = 7,4$ . U analyzovanej substancie UPB-2 sa vykonali v každom deliacom systéme tri paralelné stanovenia.

##### Výpočet niektorých molekulových deskriptorov

Hodnota polárneho povrchu molekuly (PSA) a počtu akceptorov vodíkov ( $n_{\text{acc}}$ ) pre UPB-2 (forma bázy) bola generovaná programom ChemBioDraw Ultra 11 (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, USA); PSA = 77,02;  $n_{\text{acc}} = 6$ .

#### Stabilita študovanej substancie UPB-2

##### Pôsobenie kyslého prostredia

(kyselina chlorovodíková  $s\ c = 0,1\ \text{mol.l}^{-1}$ )

##### 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, Schudardt, SRN).

##### Pracovný postup

Pripravilo sa 5 ml 1 % metanolového(-ých) roztoku(-ov) UPB-2 a „štandardu“ *p-OHBA*, z ktorých sa odobral 1 ml, pridal sa 1 ml kyseliny chlorovodíkovej

$s\ c = 0,1\ \text{mol.l}^{-1}$ . 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-2 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 diskusnej časti.

##### Pôsobenie zásaditého prostredia

(hydroxid sodný  $s\ c = 0,1\ \text{mol.l}^{-1}$ )

##### Pracovný postup

Rovnako ako pri hodnotení stability v kyslom prostredí, ale namiesto kyseliny chlorovodíkovej  $s\ c = 0,1\ \text{mol.l}^{-1}$  sa použil hydroxid sodný s rovnakou koncentráciou. Získané hodnoty  $R_f$  (priemer troch paralelných stanovení) sú uvedené v diskusnej časti.

##### Pôsobenie UV/VIS žiarenia

##### Pracovný postup

Pripravil sa vodný a metanolový roztok UPB-2  $s\ c = 1 \times 10^{-5}\ \text{mol.l}^{-1}$ . V priebehu 1 h sa v 5-min intervaloch sledovali (prípadné) posuny vo vlnových dĺžkach absorpčných maxím ako aj (prípadné) zmeny v absorpciách pri jednotlivých absorpčných maximách v obidvoch zvolených prostrediach.

#### Stanovenie obsahu UPB-2

##### Stanovenie obsahu UPB-2 v UV/VIS oblasti spektra

##### Prístroje a zariadenia

Pozri UV/VIS spektrofotometriu.

##### Pracovný postup

Pripravil sa 0,002% roztok, resp. roztoky UPB-2 vo vode ako aj v metanole, ktorých spektrum sa zaznamenalo v oblasti 190–400 nm proti čistému rozpúšťadlu. Zo zásobného roztoku (0,002 %) UPB-2 sa jednotlivé odpietovalo 2, 4, 6, 8 a 10 ml do piatich 10-ml odmerných baniek. Všetky odmerné banky sa doplnili po značku vodou, resp. metanolom a zaznamenala sa hodnota absorbie (A) takto pripravených roztokov<sup>8)</sup>. Z nameraných hodnôt A sa zostrojila kalibračná krivka; vo vodnom prostredí pri vlnovej dĺžke  $\lambda_{\text{max}} = 260\ \text{nm}$ , v metanolovom prostredí pri  $\lambda_{\text{max}} = 258\ \text{nm}$ . Hodnoty koncentrácií, A a  $\log A$  sú uvedené v tabuľke 3.

Tab. 3. Parametre potrebné na zostrojenie kalibračnej krivky pre stanovenie obsahu UPB-2 vo vodnom ( $\lambda_{\text{max}} = 260\ \text{nm}$ ) a v metanolovom ( $\lambda_{\text{max}} = 258\ \text{nm}$ ) prostredí pomocou UV/VIS spektrofotometrie

| c (mol.l <sup>-1</sup> ) | Voda    |          | Metanol |          |
|--------------------------|---------|----------|---------|----------|
|                          | A       | log A    | A       | log A    |
| $5,032 \times 10^{-6}$   | 0,17863 | -0,74805 | 0,22121 | -0,65520 |
| $1,006 \times 10^{-5}$   | 0,35753 | -0,44669 | 0,42111 | -0,37560 |
| $1,510 \times 10^{-5}$   | 0,52896 | -0,27658 | 0,66821 | -0,17509 |
| $2,013 \times 10^{-5}$   | 0,72459 | -0,13991 | 0,88243 | -0,05432 |
| $2,516 \times 10^{-5}$   | 0,89706 | -0,04718 | 1,09780 | 0,04052  |

**Vyhodnotenie výsledkov**

Obsah *UPB-2* sa stanovil z funkcie priamky ( $y = a \cdot x + b$ ). Po zostrojení kalibračnej krivky a štatistickom vyhodnotení jednotlivé symboly znamenali:  $y = A$  (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:  $c = (A - a_0) / a_1$ . V získaných regresných rovniciach hodnota  $F$  je  $F$ -testom na testovanie štatistických hypotéz (štatistická indukcia) a  $n$  znamená počet prípadov.

**Stanovenie obsahu *UPB-2* 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 – 90% metanol upravený roztokom natriumacetátu; 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 zásobný roztok *UPB-2* navážením množstva 0,020 g substance, ktoré sa kvantitatívne prenieslo do 25-ml odmernej banky a rozpustilo sa v metanole. Z tohto roztoku sa odpipetovalo do piatich 25-ml odmerných baniek postupne po 1, 2, 3, 4 a 6 ml, pridalo sa 5 ml vnútorného štandardu (pripraveného navážením 0,010 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 ml.

**Vyhodnotenie výsledkov**

Z pamäti počítača bol vyvolaný záznam analýzy vzorky, integrovali a opísali sa plochy zodpovedajúce analyzovanej látke ( $P_1$ ) a jej vnútornému štandardu ( $P_2$ ). Výsledky analýz<sup>(10)</sup> sa vypočítali z pomeru plôch pík  $P_1/P_2$  (tab. 4).

**Výsledky a diskusia**

V predchádzajúcej publikácii<sup>(11)</sup> bola komplexne hodnotená zlúčenina s potenciálnym ultrakrátkym antagonistickým pôsobením na  $\beta$ -adrenergne receptory s pracovným označením *UPB-1*, v ktorej štruktúre bola bázička časť tvorená izopropylamóniovou skupinou. Podobne ako *UPB-1* aj *UPB-2*, chemicky mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-*tert*-butylamónium]fumarát, ktorej vypracovanie analytického profilu je predmetom tejto publikácie, bola pripravená na Ústave chemických liečiv FaF VFU v Brne. Jedná sa o bielu kryštalickú látku, ktorej chemická štruktúra,

Tab. 4. Parametre potrebné na zostrojení kalibračnej krivky pre stanovenie obsahu *UPB-2* pomocou RP-HPLC

| V*<br>(ml) | c<br>(mol.l <sup>-1</sup> ) | P <sub>1</sub><br>( <i>UPB-2</i> )** | P <sub>2</sub><br>( <i>p-OHBA</i> )** | P <sub>1</sub> /P <sub>2</sub> |
|------------|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| 1          | $4,0255 \times 10^{-5}$     | 2412,0939                            | 6596,0096                             | 0,365690                       |
| 2          | $8,0510 \times 10^{-5}$     | 4610,5067                            | 6607,1205                             | 0,697809                       |
| 3          | $1,2077 \times 10^{-4}$     | 6937,9024                            | 6601,0513                             | 1,051030                       |
| 4          | $1,6102 \times 10^{-4}$     | 9096,8383                            | 6612,0330                             | 1,375800                       |
| 6          | $2,4153 \times 10^{-4}$     | 12568,7334                           | 6687,8938                             | 1,879326                       |

\*Objem pridaného základného roztoku *UPB-2* (0,0200 g/25 ml)

\*\*Plocha príslušných pík formovaných *UPB-2* ( $P_1$ ) a *p-OHBA* ( $P_2$ )

sumárny vzorec (bázička forma ako aj forma soli),  $M_r$  a interval teploty topenia sú prezentované v tabuľke 1. Pri syntéze *UPB-2* bola použitá ako vstupná reagentia kyselina *p*-hydroxybenzoová (*p-OHBA*), ktorej niektoré experimentálne stanovené fyzikálno-chemické parametre boli už sumarizované v práci<sup>(11)</sup> a ktorá bola aj v tomto prípade využitá pri orientačnom hodnotení čistoty látky *UPB-2* pomocou adsorpčnej chromatografie na tenkej vrstve, pri stabilitných skúškach ako aj pri stanovení jej obsahu s využitím RP-HPLC.

Totožnosť hodnotenej zlúčeniny *UPB-2* bola potvrdená príslušnými spektrálnymi metódami. V <sup>1</sup>H- a <sup>13</sup>C-NMR spektre boli identifikované signály, ktoré prislúchali alkylovým fragmentom, resp. jednotlivým atómom vodíka a uhlíka v lipofilnej ako aj v bázičkej oblasti molekuly. V <sup>1</sup>H-NMR spektre boli v intervale 6,70 až 7,20 ppm pozorované signály troch protónov, u ktorých možno predpokladať, že zodpovedajú signálom protónu OH-skupiny v spojovacom 2-hydroxypropán-1,3-diyllovom reťazci a protónom NH<sub>2</sub><sup>+</sup>-skupiny. V <sup>1</sup>H- a <sup>13</sup>C-NMR-výstupoch boli identifikované a priradené signály protónov a atómov uhlíka tvoriacich aromatický skelet molekuly ako aj príslušný fumarátový anión.

Analýza IR spektier potvrdila prítomnosť *tert*-butylového substituenta, lipofilného aromatického jadra ako aj karboxylu. Pás IR spektra valenčnej vibrácie (C=O)-skupiny pri 1699 cm<sup>-1</sup> sa môže pri *UPB-2* využiť pre kvantitatívne hodnotenie, pri *UPB-1* bol tento pás pozorovaný pri 1704 cm<sup>-1</sup>.

*UPB-2* je pomerne hydrofilnou zlúčeninou; je ľahko rozpustná v kyseline chlorovodíkovej s  $c = 0,1$  mol.l<sup>-1</sup>, v hydroxide sodnom s  $c = 0,1$  mol.l<sup>-1</sup> a v dimetylsulfoxide, dobre rozpustná v destilovanej vode, mierne rozpustná v metanole a v liehu 96 %, ťažko rozpustná v chloroforme a veľmi ťažko rozpustná v acetóne a v dietyléteri. Mierne zvýšenie lipofility hodnotenej štruktúry *UPB-2* v porovnaní s *UPB-1*, t.j. zámene izopropylu (*UPB-1*) za terciárny butyl (*UPB-2*), však spôsobilo, že *UPB-2* je relatívne ťažšie rozpustná v niektorých zvolených rozpúšťadlách ako *UPB-1*.

Na orientačné hodnotenie čistoty *UPB-2* bola okrem RP-HPLC použitá adsorpčná chromatografia na tenkej vrstve. Súčasne s *UPB-2* bola chromatograficky hodnotená aj *p-OHBA*. Z mnohých vyskúšaných dvoj- a trojzložkových vyvíjacích sústav bola ako najvhodnejšia vyhodnotená sústava  $S_{11}$ : etanol : benzén : dietylamin ( $\phi = 10 : 3 : 0,1$ ). V systéme  $S_{11}$  nastalo jednoznačné

oddelenie ohraničených škvŕn prislúchajúcich *UPB-2* ( $R_f = 0,34$ ) a *p-OHBA* ( $R_f = 0,58$ ), pričom na príslušnom „stĺpci“ *UPB-2* neboli pozorované iné škvŕny. V identickej vyvíjacej sústave a pri rovnakých laboratórnych podmienkach bola pre *UPB-1*<sup>11)</sup> stanovená nižšia hodnota  $R_f$  (0,29).

Povrchové napätie bolo študované nepriamou Traubeho stalagmometrickou metódou počítania kvapiek. Nárast lipofily spôsobil, že *UPB-2* ( $\gamma = 0,06867 \text{ N.m}^{-1}$ ) je mierne povrchovoaktívnejšou zlúčeninou ako *UPB-1* ( $\gamma = 0,06954 \text{ N.m}^{-1}$ ) pri zachovaní rovnakých experimentálnych podmienok.

Na štúdium acidobázických vlastností bola použitá metóda alkalimetrickej titrácie (roztok hydroxidu sodného  $s = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ ) pri potenciometrickej indikácii bodu ekvivalencie. Študovaná zlúčenina *UPB-2* mala mierne kyslý charakter, o čom svedčí stanovená hodnota  $pK_a = 5,56$ . Zámena izopropylu za terciárny butyl znamenala pokles hodnoty  $pK_a$  – pre *UPB-1* bola v práci<sup>11)</sup> experimentálne určená hodnota  $pK_a = 5,71$ .

Pri štúdiu spektier v UV/VIS oblasti vykazovala *UPB-2* dve absorpčné maximá. Vo vodnom roztoku sú to maximá pri  $\lambda_{1\text{max}} = 198 \text{ nm}$  a  $\lambda_{2\text{max}} = 260 \text{ nm}$ , v prostredí metanolu nastal mierny posun – absorpčné maximá boli zistené pri  $\lambda_{1\text{max}} = 210 \text{ nm}$  a  $\lambda_{2\text{max}} = 258 \text{ nm}$ . Modifikácia bázykej časti molekuly nemala vplyv na posun jednotlivých absorpčných maxím, keďže identické hodnoty boli indikované aj pre *UPB-1*<sup>11)</sup>.

Pri látke *UPB-2* bola charakterizovaná aj jej lipofilita prostredníctvom určenia retenčných faktorov  $k'$ , resp.  $\log k'$  v sústavách s rozdielnym percentuálnym zastúpením metanolu ako súčasťou mobilnej fázy a rozdeľovacích koeficientov v troch rozdielnych rozdeľovacích systémoch.

Rozdielna miera lipofily *UPB-2* a *UPB-1*<sup>11)</sup> sa odrážala v hodnotách  $\log k'$  v oboch systémoch (tab. 2); v 90 % metanole boli zistené takéto retenčné charakteristiky:  $\log k'_{UPB-1} = -0,071$ ;  $\log k'_{UPB-2} = -0,027$ ; v 95 % metanole boli získané tieto údaje:  $\log k'_{UPB-1} = 0,015$ ;  $\log k'_{UPB-2} = 0,037$ . Pre porovnanie sú uvádzané aj stanovené hodnoty  $\log k'$  prislúchajúce *p-OHBA*:  $-2,153$  (v 90 % metanole) a  $-2,643$  (v 95 % metanole).

Hodnoty  $\log P_{\text{exp}}$  pre *UPB-2* boli určené klasickou *shake flask* metódou; pre určenie koncentrácie látky vo vodnej fáze sa využila UV/VIS spektrofotometria. V zvolených rozdeľovacích sústavách bol pozorovaný minimálny rozdiel v stanovených hodnotách  $\log P_{\text{exp}}$ . V rozdeľovacom systéme oktán-1-ol/TFR predstavoval  $\log P_{\text{exp}}$  hodnotu 1,92 (pre *UPB-1* to bola hodnota 1,70); v sústave heptán/TFR bola hodnota  $\log P_{\text{exp}} = 2,00$  (pre *UPB-1* predstavoval tento parameter hodnotu 1,66) a v systéme cyklohexán/TFR  $\log P_{\text{exp}} = 2,03$  (pre *UPB-1* to bolo 1,62). Ako dokumentujú tieto výsledky, štruktúrny rozdiel medzi *UPB-2* a *UPB-1* sa pomerne výrazne odrážal aj v hodnotách rozdeľovacích koeficientov určených vo všetkých troch systémoch.

Nežiaduce účinky  $\beta B$  spojené so stimuláciou CNS sú známe dlhodobo – bežne je pozorovaná letargia, útlm, únava, menej často sa vyskytujú vážnejšie stavy spojené s užívaním  $\beta B$ , ako napríklad depresie, živé sny, halucinácie, delírium, paranooidné psychózy alebo schizofrénia<sup>12)</sup>. Schopnosť  $\beta B$  pasívne prechádzať cez hematoen-

cefalickú bariéru (blood-brain barrier, BBB) je determinovaná, okrem iných faktorov, mierou ich lipofily. Relatívna afinita  $\beta B$  proti krvnému riečištu a mozgovému tkanivu je vyjadriteľná vzťahom:

$$\log BB = \log \left( \frac{C_{\text{mozog}}}{C_{\text{krv}}} \right)$$

kde parametre  $C_{\text{mozog}}$  a  $C_{\text{krv}}$  predstavujú rovnovážne koncentrácie liečiva v mozgu a v krvi<sup>13)</sup>. Distribúciu liečiva do nepolárnych oblastí mozgu odráža hodnota  $\log P_{\text{exp}}$  stanovená pre systém cyklohexán/TFR ( $\log P_{\text{exp c}}$ ), zatiaľ čo hodnota  $\log P_{\text{exp}}$  stanovená v rozdeľovacej sústave oktán-1-ol/TFR ( $\log P_{\text{exp o}}$ ) vyjadruje väzbu na proteíny v periférnom krvnom riečišti<sup>14)</sup>. Zlúčenina má tým hydrofilnejší charakter, čím je jej 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 mozgu a je v organizme distribuovaná prednostne do krvi. Hodnota  $\log P_{\text{exp o-c}} = -0,11$  pre *UPB-2* teda indikuje, že u nej existuje určitý predpoklad permeácie cez hematoencefalickú bariéru práve do nepolárnych oblastí mozgu.

Pre predikciu schopnosti *UPB-2* prechádzať cez BBB bolo zvolených niekoľko modelov a schém. V Youngovom modeli<sup>15)</sup> vyjadreného vzťahom:

$$\log BB = 0,889 - 0,485 \times \log P_{\text{exp o-c}}$$

hodnota  $\log BB$  pre *UPB-2* predstavovala 0,942, čo by znamenalo jej preferenčnú interakciu s mozgovým tkanivom. Hlavnou nevýhodou Youngovej schémy je pomerne limitovaný počet zlúčenín ako aj ich výber v pôvodnom *training* súbore, preto sa v rámci tejto práce aplikovali aj iné možnosti predikcie prechodu *UPB-2* cez BBB.

Podľa Kaliszana<sup>16)</sup> pre koreláciu  $\log P_{\text{exp o-c}}$  a  $\log BB$  platí vzťah, v ktorom bola ako aditívna veličina implementovaná aj  $M_r$ :  $\log BB = 0,888 + 0,272 \times \log P_{\text{exp o-c}} - 0,00112 \times M_r$ ;

podľa tohto modelu je hodnota  $\log BB$  látky *UPB-2*  $-1,008$ .

Hodnota polárneho povrchu molekuly (polar surface area, PSA), je zakomponovaná aj v modeloch Keldera<sup>17)</sup> charakterizovaného vzťahom:  $\log BB = 1,330 - 0,032 \times PSA$  ( $\log BB$  pre *UPB-2* je  $-1,135$ ) a Clarka<sup>18)</sup> definovaného rovnicou:  $\log BB = 0,550 - 0,016 \times PSA$  ( $\log BB$  pre *UPB-2* je  $-0,682$ ).

Pri aplikovaní Panovej<sup>19)</sup> schémy:  $\log BB = 0,064 + 0,200 \times \log P_{\text{exp o}} - 0,010 \times PSA$  bola hodnota  $\log BB$  pre látku *UPB-2*  $-0,322$ .

Podľa Abrahamovho a Weathersbyho modelu predikcie<sup>20)</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 bola hodnota  $\log BB$  v tomto prípade  $-3,200$ .

Feher<sup>21)</sup> navrhol model, v ktorom zohľadnil aj schopnosť látky vytvárať väzby vodíkovým mostíkom:  $\log BB = 0,4275 - 0,0017 \times PSA + 0,1092 \times \log P - 0,3873 \times n_{\text{acc}}$ , v ktorom  $\log P = \log P_{\text{exp o}}$  a  $n_{\text{acc}}$  bol počet akceptorov vodíkov v molekule vo vodnom prostredí (pre bázyckú formu *UPB-2* je to šesť akceptorov). Vypočítaná hodnota  $\log BB$  pre *UPB-2* bola  $-1,818$ .

Podľa Crucianiho et al.<sup>22)</sup> je liečivo schopné prestupovať hematoencefalickou bariérou vtedy, ak je jeho hodnota  $\log BB$  vyššia ako  $-0,300$ . V prípade, ak nadobúda spomínaný parameter menšiu hodnotu ako  $-0,300$ , potom liečivo nie je schopné vstupovať do mozgového tkaniva. Na základe získaných údajov z jednotlivých prediktorových modelov možno predpokladať, že hodnotená zlúčenina *UPB-2* bude s vysokou pravdepodobnosťou preferovať väzbu na proteíny krvného riečišťa pred prechodom cez hematoencefalickú bariéru (okrem výstupu z Youngovej schémy predikcie) podobne ako jej izopropylový analóg, *UPB-1*<sup>11)</sup>.

Podľa hodnoty  $\log P_{\text{exp o-h}}$  (rozdiel medzi hodnotami  $\log P_{\text{exp}}$  v systéme oktán-1-ol/TFR a v rozdeľovacej sústave heptán/TFR) pre látku *UPB-2* ( $-0,08$ ) možno usudzovať, že tá je ešte slabším donorom protónu ako *UPB-1* ( $0,04$ ).

Kyslé ako aj zásadité prostredie spôsobilo nestabilitu látky *UPB-2*, pri chromatografickom hodnotení (adsorpčná TLC) sa na chromatograme(-och) v „línii“ *UPB-2* okrem jej „vlastnej“ škvrny objavili v oboch prostrediach aj ohraničené škvrny prislúchajúce jednak *p-OHBA* (ktorá bola súčasne nanášaná na chromatogram ako referenčná substancia), ako aj ďalším „štiepnym“ produktom vznikajúcim pri rozklade *UPB-2* – zlúčeninám s pracovným označením  $X_1$  a  $X_2$ . V kyslom prostredí boli určené z chromatogramov tieto  $R_f$  hodnoty:  $0,35$  (pre látku *UPB-2*),  $0,68$  (*p-OHBA*),  $0,48$  ( $X_1$ ) a  $0,80$  ( $X_2$ ); hodnoty  $R_f$  spomínaných látok pri pôsobení zásaditého média boli len nepatrne nižšie:  $0,33$  (*UPB-2*),  $0,65$  (*p-OHBA*),  $0,45$  ( $X_1$ ) a  $0,78$  ( $X_2$ ). Pravdepodobne nastalo vplyvom príslušného prostredia parciálne štiepenie molekuly *UPB-2* v jej esterovej časti alebo v alkoxylovom zoskupení v lipofilnom fragmente. Rovnako tomu bolo aj pri hodnotení stability látky *UPB-1* v publikácii<sup>11)</sup>.

UV/VIS žiarenie nemalo v priebehu 1 h negatívny vplyv na stabilitu vodného a metanolového roztoku *UPB-2*; nedošlo k zmene hodnôt absorpcií pri konkrétnych absorpčných maximách a ani k ich posunu. Identický záver<sup>11)</sup> bol formulovaný aj pri hodnotení látky *UPB-1*.

Na „metodickú prípravu“ pre (možné) stanovenie obsahu *UPB-2* v konkrétnej liekovej forme alebo v telových tekutinách možno využiť spektrálne (UV/VIS spektrofotometriu) alebo aj chromatografické (RP-HPLC) metódy. Zlúčenina *UPB-2* bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke druhého absorpčného maxima, t.j. pri  $\lambda_{2\text{max}} = 260$  nm (pre vodné prostredie), resp. pri  $\lambda_{2\text{max}} = 258$  nm (pre prostredie metanolu). Na základe získaných údajov bola zostrojená kalibračná krivka, výsledkom stanovenia vo vodnom prostredí bolo formulovanie rovnice lineárnej regresie v tvare:  $y = 35844(\pm 405)x - 0,0038(\pm 0,0061)$ ;  $R^2 = 0,999$ ;  $F = 7831$ ;  $n = 5$  (tab. 3); resp. pre stanovenie obsahu v metanolovom prostredí:  $y = 44003(\pm 715)x - 0,0061(\pm 0,0119)$ ;  $R^2 = 0,999$ ;  $F = 3783$ ;  $n = 5$  (tab. 3). V týchto rovniciach parameter  $y$  predstavoval absorbanciu,  $x$  vyjadroval koncentráciu stanovovanej látky v mol.l<sup>-1</sup>.

Vhodnou mobilnou fázou pre analýzu *UPB-2* pomocou vysokoúčinnnej chromatografie s obráteným systémom fáz sa ukázal metanol 90 %. Pre stanovenie obsahu *UPB-2* pomocou RP-HPLC (tab. 4) mala formulovaná

regresná rovnica nasledujúci tvar:  $y = 7571(\pm 347)x + 0,0986(\pm 0,0571)$ ;  $R^2 = 0,992$ ;  $F = 477$ ;  $n = 5$ ; parameter  $y$  znamenal pomer plôch píkov študovanej látky *UPB-2* a vnútorného štandardu (*p-OHBA*),  $x$  vyjadroval koncentráciu stanovovanej látky v mol.l<sup>-1</sup>.

V ďalších štúdiách sa bude pozornosť venovať spektrálnym identifikačným charakteristikám a stanoveniu niektorých fyzikálno-chemických konštánt štruktúrne podobných zlúčenín, v ktorých molekule bude, v porovnaní s *UPB-2*, variabilne substituovaná lipofilná časť molekuly. Všetky experimentálne získané údaje budú v budúcnosti slúžiť ako zdrojový súbor informácií pre komplexné hodnotenie vzťahov medzi chemickou štruktúrou a biologickou aktivitou.

Konflikt záujmov: žiadny.

## Literatúra

1. Kirshenbaum J. M., Kloner R. A., Antman E. M., Braunwald E. Use of an ultra short-acting  $\beta$ -blocker in patients with acute myocardial ischemia. *Circulation* 1985; 72, 873–880.
2. Frishman W., Silverman R., Strom J., Elkayam U., Sonnenblick E. Clinical pharmacology of the new beta-adrenergic blocking drugs. Part 4. Adverse effects. Choosing a beta-adrenoceptor blocker. *Am Heart* 1979; 98, 256–262.
3. Yacobi A., Kartzinell R., Lai C. M., Sum C. Y. Esmolol: A pharmacokinetic profile of a new cardioselective beta-blocking agent. *J Pharm Sci* 1983; 72, 710–711.
4. Sum C. Y., Yacobi A., Kartzinell R., Stampfli H., Davis C. S., Lai C. M. Kinetics of esmolol, an ultra short-acting beta-blocker, and of its major metabolite. *Clin Pharmacol Ther* 1983; 34, 427–434.
5. Yasuda T., Kamiya H., Tanaka Y., Watanabe G. Ultra-short-acting cardioselective beta-blockade attenuates postischemic cardiac dysfunction in the isolated rat heart. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; 19, 647–652.
6. Uraoka M., Nakajima Y., Kurita T., Suzuki A., Takata K., Sato S. Landiolol, an ultra short acting  $\beta_1$ -blocker, improves pulmonary edema after cardiopulmonary resuscitation with epinephrine in rats. *J Anesth* 2010; 24, 67–72.
7. Shiotsuka J., Sanui M., Lefor A. Safe use of landiolol hydrochloride in patient with marked pseudocholinesterase deficiency. *J Anesth* 2010; 24, 309–310.
8. Malík I., Sedlářová E., Čížmárik J., Andriamainty F., Csöllei J.: Štúdium fyzikálno-chemických vlastností derivátov kyseliny 4-alkoxyfenylkarbámovej s bázičnou 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-(di-propylamino-3-piperidino-propán-1-yl)-3-pentyloxy-fenylkarbamátu (CK-3635). *Čes slov Farm* 2004; 53, 256–260.
11. Malík I., Andriamainty F., Sedlářová E., Čížmárik J., Gališínová J., Mokry P., Csöllei J., Karlovská J., Lukáč, M. Analytické hodnotenie mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-izopropylamónium]fumarátu. *Čes slov Farm* 2011; 60, 84–93.
12. Fisher A. A., Davis M., Jeffery I. Acute delirium induced by metoprolol. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16, 161–165.
13. Kaznessis Y. N. A review of methods for computational prediction of blood-brain partitioning. *Curr Med Chem Cent Nerv Syst Agents* 2005; 5, 185–191.
14. Tsai R.-S., El Tayar N., Carrupt P.-A., Testa B. Physicochemical properties and transport behaviour of pibedil: Considerations on its membrane-crossing potential. *Int J Pharm* 1992; 80, 39–49.
15. 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 H2 receptor histamine antagonists. *J Med Chem* 1988; 31, 656–671.

16. **Kaliszan R., Markuszewski M.** Brain/blood distribution described by a combination of partition coefficient and molecular mass. *Int J Pharm* 1996; 145, 9–16.
17. **Kelder J., Grootenhuis 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.
18. **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.
19. **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.
20. **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.
21. **Feher M., Sourial E., Schmidt J. M.** A simple model for the prediction of blood-brain partitioning. *Int J Pharm* 2000; 201, 239–247.
22. **Cruciani G., Pastor M., Guba W.** VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11, 29–39.

## NOVÉ KNIHY

Nagy M., Grančai D., Mučaji P. **Farmakogózia. Biogénéza prírodných látok.**  
Martin: Vydavateľstvo Osveta 2011, 238 s. ISBN 978-80-8063-368-4.

Recenzované dielo je prvou časťou projektovanej dvojdielnej učebnice farmakognózie pre študentov farmaceutickej fakulty. Cieľom tohto prvého zväzku je zovšeobecniť v ostatnom čase nazhromaždené poznatky, ktoré evidujeme v oblasti vzniku primárnych a sekundárnych metabolitov a prírodných látok.

Autori diela prof. Ing. Milan Nagy, CSc., prof. RNDr. Daniel Grančai, CSc., a doc. PharmDr. Pavel Mučaji, PhD., sú dlhoroční, skúsení a kvalifikovaní učitelia Katedry farmakognózie a botaniky Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského (FaF UK) v Bratislave.

Obsah učebnice je rozdelený logicky a podľa zásad racionálnej pedagogiky. Po v úvode stručne vysvetleno poslanie učebnice a použitých skratiek sa autori tiež zaoberajú históriou fytotherapie a farmakognózie. V ďal-

šej časti potom popisujú základy farmakognostickej terminológie a systému klasifikácie zlúčenín.

Jadro učebnice tvoria kapitoly o biogénéze vzniku sacharidov, terpenov, polyketidov, šikimátov, alkaloidov, xantínových derivátov, kapsaicinoidov, betalaínov, kyanogénnych glykozidov, glukozinolátov, cysteín-S-oxidov a tiosulfinátov. Vznik týchto typov zlúčenín popisujú stručne slovne a názornými biochemickými schémami, v ktorých sú najdôležitejšie medziprodukty, funkčné skupiny a enzýmy aj odlišené farebne. Táto kombinácia umožní študentovi lepšie a hlbšie pochopiť študovanú materiu. Cenou devízou učebnice je obšírny zoznam použitej literatúry pokrokov v tejto oblasti za posledné obdobie.

Zovšeobecňujú obsah recenzovanej učebnice možno konštatovať, že jej náplň tvorí vynikajúci teoretický základ pre štúdium modernej dynamicky vyvíjajúcej sa farmakognózie.

J. Čižmárik