

PŮVODNÍ PRÁCE

Analytický profil 1-[3-(3-propoxy-fenylkarbamoyloxy)-2-hydroxy-propyl]-4-(3-trifluórmetylfenyl)piperazíniumchloridu

IVAN MALÍK

Univerzita Komenského Bratislava, Farmaceutická fakulta, Katedra farmaceutickej chémie

Došlo 18. července 2011 / Prijato 22. srpna 2011

SÚHRN

Analytický profil 1-[3-(3-propoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(3-trifluórmetyl-fenyl)piperazíniumchloridu

Predmetom práce bolo doplnenie niektorých experimentálne stanovených fyzikálno-chemických deskriptorov 1-[3-(3-propoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(3-trifluórmetylfenyl)piperazíniumchloridu (pracovne označeného ako *8e*), účinnej, relatívne vysokolipofilnej zlúčeniny proti netuberkulóznemu *M. kansasii* My 235/80. Identita látky *8e* bola potvrdená ^1H - a ^{13}C -NMR spektrami, spektrometriou v IR oblasti ako aj elementárnou analýzou. Výstup z hmotnostnej spektrometrie potvrdil existenciu molekulového iónu $[\text{M} + \text{H}]^+$. Čistota hodnotenej zlúčeniny *8e* bola overená pomocou adsorpčnej chromatografie na tenkej vrstve, stabilita jej vodných a metanolových roztokov bola hodnotená pri pôsobení UV/VIS žiarenia. Hodnoty niektorých základných fyzikálno-chemických charakteristík molekuly *8e* stanovených v predchádzajúcich publikáciách (pK_a , $\log P_{\text{exp}}$) boli korelované s konštantami, ktoré prislúchajú niektorým v praxi používaným antimykobakteriálne aktívnym molekulám (izoniazid, pyrazínamid, kyselina *para*-aminosalicylová, etiónamid, streptomycín). Pre stanovenie obsahu molekuly *8e* sa použila RP-HPLC (reversed-phase HPLC) metóda vnútorného štandardu a UV/VIS spektrofotometria pri vlnovej dĺžke 238 nm (vodné prostredie) a 244 nm (prostredie metanolu).

Kľúčové slová: netuberkulózne mykobaktérie – analytické hodnotenie – fenyلكarbamáty – *N*-fenylpiperazín

Čes. slov. Farm., 2011; 60, 283–289

SUMMARY

Analytical profile of 1-[3-(3-propoxyphenylcarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(3-trifluoromethylphenyl)piperazinium chloride

The purpose of the paper was the completing of the experimentally estimated physicochemical descriptors spectrum of 1-[3-(3-propoxyphenylcarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(3-trifluoromethylphenyl)piperazinium chloride (labelled as *8e*), an effective, highly lipophilic compound against non-tuberculous *M. kansasii* My 235/80. The identity of the structure *8e* was verified by ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data, IR spectrometry and by elemental analysis as well. The readout from mass spectrometry confirmed an existence of the molecular ion $[\text{M} + \text{H}]^+$. The purity of the evaluated compound *8e* was checked by absorption thin-layer chromatography, the stability of its aqueous and methanolic solutions was investigated under UV/VIS light. The values of some physicochemical descriptors assigned to *8e*, which had been previously published (pK_a , $\log P_{\text{exp}}$),

Adresa pro korespondenci:

PharmDr. Ivan Malík, PhD.

Katedra farmaceutickej chémie FaF UK

Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika

e-mail: malik@fpharm.uniba.sk

were correlated with the constants associated with some antimycobacterially active molecules which are commonly used in therapeutic practice (isoniazid, pyrazinamide, *para*-aminosalicylic acid, ethionamide, streptomycin). For the content determination of the molecule of *8e*, RP-HPLC (reversed-phase HPLC) method with an internal standard and UV/VIS spectrophotometry at the wavelength of 238 nm (aqueous medium) and at 244 nm (methanolic medium) were used.

Key words: non-tuberculous mycobacteria – analytical evaluation – phenylcarbamates – *N*-phenylpiperazine

Čes. slov. Farm., 2011; 60, 283–289

Má

Úvod

Netuberkulózne formy mykobaktérií (*non-tuberculous mycobacteria*, NTM) sú voľne žijúce saprofyty, ktoré pôsobia pri „vhodných“ podmienkach ako iniciátor mnohých vážnych, prevažne infekčných ochorení, akými sú napríklad infekcie pľúc, mäkkých tkanív, kostí, svalov, ale aj cystickej fibrózy¹⁾. NTM sú tradične delené na tzv. pomaly rastúce (*slowly growing Mycobacteria*), kde patrí napríklad *Mycobacterium* (*M.*) *avium*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. lentiflavium* alebo *M. xenopi* a tzv. rýchlo rastúce (*rapidly growing Mycobacteria*), ktoré reprezentuje *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. smegmatis*, *M. mucogenicum* alebo *M. chelonae*²⁾. V ostatných rokoch sa zvyšuje incidencia a prevalencia NTM napriek skutočnosti, že prenos NTM medzi postihnutými osobami nebol dokázaný³⁾.

V súčasnosti je známych približne 125 druhov NTM, z ktorých je asi 60 považovaných za patogénnych pre človeka. *M. kansasii* je oportunistickým intracelulárnym patogénom, ktorý podľa DNA analýz zahŕňa približne 5–7 podtypov, z ktorých je najrozšírenejší podtyp^{1, 4, 5)}. Tento patogén je považovaný za vysokovirulentnú formu NTM, jeho výskyt je relatívne častý aj u osôb s neporušenou imunitou, ale najmä u imunodeficientných pacientov, ďalej sa objavuje pri chemoterapeutickej liečbe, pri orgánovej transplantácii alebo u pacientov na dialýze^{1, 6, 7)}.

Komplex *M. avium* (KMA) je tvorený minimálne dvoma typmi: *M. avium* (významný patogén „pôsobiaci“ pri diseminovaných ochoreniach) a *M. intracellulare* (najmä ako patogén respiračného systému) s dokázanou genetickou variabilitou. Podľa American Thoracic Society je ubikvitný KMA najčastejším mykobakteriálnym komplexom (na druhom mieste je *M. kansasii*) zapríčiniť manifestovanie rôznych zdravotných komplikácií u obyvateľstva, akými sú pľúcne ochorenia, lymfadenitída, abscesy poranení alebo kožné vredy, a to u pacientov s imunodeficienciou⁵⁾, zdanlivo zdravých ľudí ale aj u osôb s nenarušeným imunitným systémom^{8, 9)}.

Liečba takýchto infekčných stavov môže byť v dôsledku obmedzeného spektra v praxi aplikovateľných a účinných antimikrobík komplikovanejšia ako terapeutické zvládnutie ochorení, ktoré spôsobuje tuberkulózne *M. tuberculosis*⁵⁾. V súčasnosti je preto potrebné neustále projektovať, pripravovať a analyzovať nové, účinné a antimikobakteriálne rýchlo pôsobiace liečivá s vhodným toxikologickým profilom.

Predmetom predkladané publikácie je vypracovanie, resp. doplnenie analytického profilu 1-[3-(3-propoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(3-trifluormetyl-

fenyl)piperazíniumchloridu, vysokolipofilnej látky s pracovným označením *8e*, ktorá bola pripravená v rámci syntézy, komplexného fyzikálno-chemického a biologického hodnotenia fenyلكarbamátových štruktúr s inkorporovaným, variabilne substituovaným, *N*-fenylpiperazínovým fragmentom. Pri určovaní jej antimykobakteriálneho profilu sa ukázalo, že predstavuje efektívnejšie pôsobiacu zlúčeninu¹⁰⁾ proti netuberkulóznemu mykobakteriálnemu kmeňu *M. kansasii* My 235/80 (*MIC* = 16 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 14-dňovej inkubácii, resp. 32 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 21-dňovej inkubácii) v porovnaní s použitým štandardom, isoniazidom (INH; *MIC* > 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 14-dňovej ako aj po 21-dňovej inkubácii). Hodnoty *MIC* látky *8e* proti *M. avium* My 330/88 však neboli experimentálne stanovené z dôvodu jej relatívnej nízkej rozpustnosti alebo pre minimálny rast mykobaktéria¹⁰⁾. Molekula *8e* je zároveň menej účinná proti *M. tuberculosis* (*MIC* = 16, resp. 32 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) ako použitý INH¹¹⁾ (*MIC* = 0,5; resp. 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$).

Pre zlúčeninu *8e* možno predpokladať aj niekoľko ďalších farmakologických účinkov – okrem iného antagonistické ovplyvnenie α -adrenergických receptorov a vaskulárnu blokádu β_1 -adrenergických receptorov, čo navodzuje vazodilatáciu, ako je to v prípade pôsobenia karvedilolu¹²⁾. Okrem toho antagonistické pôsobenie na α_1 -adrenergických receptoroch bude pravdepodobne zvýraznené prítomnosťou substituovaného *N*-fenylpiperazínového jadra v molekule, ktoré je prítomné aj v štruktúre naftopidilu¹³⁾. Schopnosť látky *8e* ovplyvňovať funkcie kardiovaskulárneho systému však nebola doposiaľ experimentálne skúmaná.

POKUSNÁ ČASŤ

SPEKTRÁLNA ČASŤ

¹H- a ¹³C-NMR spektrometria

Použitá chemikálie: Deuteriochloroform (rozpúšťadlo), ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylsilán (Merck Chemicals Slovensko, Bratislava, SR). Pripravili sa roztoky hodnotenej substancie *8e* s koncentráciou 2 mg/650 μl CH₂Cl₂.

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

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

Parametre pri meraní ^{13}C -NMR spektier: Rozsah = 240 – -20 ppm, aktivačný čas = 1,815 s, počet akvizícií = 10 000, delay = 1 s, pracovná teplota = 20 °C.

^1H -NMR spektrálna charakteristika látky **8e** bola publikovaná v práci¹⁴⁾: ^1H -NMR (300 MHz) δ (ppm): 1,01 (t, 3H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2,60 (t, 4H, **H-9**, **H-11**); 2,80 (t, 4H, **H-10**, **H-12**); 3,01 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,28 (t, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,10 (m, 1H, **H-7**); 4,33 (d, 2H, $^3J_{8,9} = 2,90$ Hz, **H-8**); 4,35 (d, 2H, $^3J_{7,8} = 2,90$ Hz, **H-6**); 6,80 (s, 1H, OH) vs. 7,00 (s, 1H, OH); 6,85 – 7,10 (m, 8H, ArH); 7,45 (s, 1H, NHCOO , **H-5**); 11,05 (s, 1H, NH^+ , **H-17**).

^{13}C -NMR (75 MHz) δ (ppm): 10,35 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 22,33 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 48,81 (uhlík piperazínu); 53,15 (uhlík piperazínu); 60,01 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$ -piperazín); 65,62 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$); 68,21 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 67,21 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$ -piperazín); 108,55 (ArC); 110,21 (ArC); 112,10 (ArC); 113,01 (ArC); 115,24 (ArC); 119,37 (ArC); 124,75 (ArCCF₃); 128,35 (ArC); 129,37 (ArC); (ArC); 130,51 (ArC); 136,20 (ArCNHCOO); 152,63 (ArC); 153,36 (NHCOO); 160,42 (ArCOCH₂CH₂CH₃).

IR spektrometria

Prístroje a zariadenia: Spektrometer FT-IR Impact 400D (Nicolet), merané v tabletách KBr v koncentrácii 2 – 3 mg látky **8e**/800 mg KBr.

IR cm^{-1} : $\nu(\text{N-H})$: 3248; $\nu(\text{N}^+-\text{H})$: 2605; $\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$: 2975; $\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$: 2870; $\nu(\text{C=O})$: 1728; $\nu_{\text{as}}(\text{C=C})$: 1596; $\delta(\text{N-H})$: 1549; $\delta(\text{CH}_2)$: 1450; $\nu_{\text{as}}(\text{C-Ar-O-Calk})$: 1232 (1077); $\gamma(\text{C-H})$: 763, 669.

Spektrofotometria v UV/VIS oblasti

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

Príprava roztokov: Pripravili sa roztoky študovanej látky **8e** s $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ vo vode a v metanole.

Prístroje a zariadenia, pracovný postup: Sú charakterizované v práci¹⁴⁾. Podľa Lambert-Beerovho zákona sa vypočítali hodnoty ϵ , resp. $\log \epsilon$ pre všetky absorpčné maximá v oboch mediách.

Vodné prostredie – UV λ_{max} nm ($\log \epsilon$): 206 (4,69), 238 (4,45), 278 (3,67). Metanolové prostredie – UV λ_{max} nm ($\log \epsilon$): 212 (4,68), 244 (4,36), 282 (3,59).

Hmotnostná spektrometria

Hmotnostné spektrum (MS) molekuly **8e** bolo zmerané na prístroji Agilent 1100 LC/MSD VL Trap (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Detailné informácie o podmienkach merania a pracovnom postupe sú publikované v práci¹⁴⁾. Snímané rozpätie hmôt bolo v intervale 15–800 m/z .

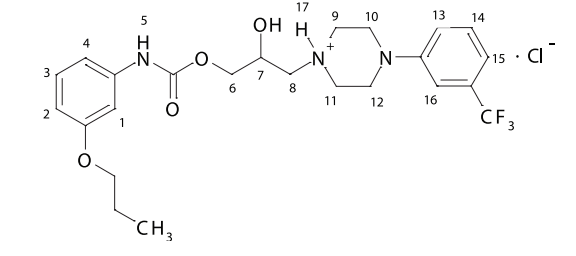
ANALYTICKÁ ČASŤ

Stanovenie teploty topenia

Prístroje a zariadenia, pracovný postup: Sú charakte-

rizované v práci¹⁵⁾. Nekorigovaná hodnota teploty topenia látky **8e** je uvedená v tabuľke 1.

Tab. 1. Základná charakteristika 4-(3-trifluórmetylfenyl)-1-[-3-(3-propoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]piperazíniumchloridu

			
Prac. ozn.*	Sumárny vzorec	Mr	t_f (°C)
8e	$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_4$	517,97	163–166

Vo vzorci je vyznačené číslovanie skeletu z hľadiska ^1H -NMR spektrometrie.

Elementárna analýza

Prístrojové vybavenie a pracovný postup pri určení obsahu dusíka, uhlíka a vodíka (tab. 2) pre molekulu **8e** je uvedený v publikácii¹⁵⁾.

Tab. 2. Elementárna analýza látky **8e**

Prac. ozn.	C (%)		H (%)		N (%)	
	teoret.	prakt.	teoret.	prakt.	teoret.	prakt.
8e	55,65	55,29	6,03	5,94	8,11	8,23

Stanovenie rozpustnosti

Použité chemikálie, prístroje a zariadenia, pracovný postup: Sú publikované v práci¹⁵⁾. Rozpustnosť študovanej látky **8e** bola stanovená podľa Európskeho liekopisu 6.0¹⁶⁾.

Stanovenie hodnoty R_f pomocou adsorpčnej chromatografie na tenkej vrstve

Použité chemikálie: Chloroform *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR), dietylamín *p.a.* (Merck, Schudart, SRN), cyklohexán *p.a.* (Lach-Ner, Neratovice, ČR).

Materiál, prístroje a zariadenia: Silufol[®] UV₂₅₄ 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, 230V AC, Hamburg, SRN).

Pracovný postup: Na komerčne vyrábané fólie Silufol[®] UV₂₅₄ s vrstvou silikagélou sa na vyznačený štart mikrokapilárou naniesli 2 μl 1% roztoku hodnotenej zlúčeniny **8e** a medziproduktu jej syntézy, t.j. 2,3-epo-

Tab. 3. Základné fyzikálno-chemické parametre hodnotenej zlúčeniny 8e, ktoré boli publikované v prácach ^{15, 17)}

Prac. ozn.	$\gamma(\text{N}\cdot\text{m}^{-1})$	$\text{p}K_a$	R_M	$\log k'^*$	$\log P_{\text{exp o}}^{**}$	$\log P_{\text{exp c}}^{**}$	$\log P_{\text{exp h}}^{**}$
8e	0,0370	5,21	0,23	-0,268	3,92	1,50	1,31

*hodnota $\log k'$ stanovená v RP-HPLC-systéme s mobilnou fázou tvorenou 94% metanolom; **hodnoty rozdeľovacích koeficientov (resp. $\log P_{\text{exp}}$) stanovených v rozdeľovacích sústavách oktán-1-ol/TFR ($\log P_{\text{exp o}}$), cyklohexán/TFR ($\log P_{\text{exp c}}$) a heptán/TFR ($\log P_{\text{exp h}}$)

Tab. 4. Parametre potrebné na zostrojenie kalibračnej krivky pre stanovenie obsahu látky 8e vo vodnom (pri $\lambda_{2\text{max}} = 238 \text{ nm}$) a v metanole (pri $\lambda_{2\text{max}} = 244 \text{ nm}$) prostredím pomocou UV/VIS spektrofotometrie

c (mol.l ⁻¹)	Voda		Metanol	
	A	$\log A$	A	$\log A$
$7,722 \times 10^{-6}$	0,22591	-0,64606	0,24862	-0,60446
$1,544 \times 10^{-5}$	0,44687	-0,34982	0,46481	-0,33272
$2,317 \times 10^{-5}$	0,63458	-0,19751	0,69634	-0,15718
$3,089 \times 10^{-5}$	0,84328	-0,07403	0,90523	-0,04324
$3,861 \times 10^{-5}$	1,05964	0,2516	1,12987	0,05303

xypropán-1-ylesteru kyseliny 3-propoxyfenylkarbámovej (s pracovným označením *Epoxid-33*), v metanole *p.a.* Po ukončení vyvíjania sa chromatogramy sušili pri laboratórnej teplote a detegovali sa pod UV-lampou pri vlnovej dĺžke 254 nm. Výsledné hodnoty sú priemerom zo šiestich paralelných stanovení (pozri časť *Výsledky a diskusia*). Ako vhodnou vyvíjacou sústavou pre TLC-hodnotenie sa ukázal systém S: chloroform : cyklohexán : dietylamin ($\phi = 6 : 3 : 1$).

Stanovenie povrchového napätia a disociačnej konštanty

Použité chemikálie, prístroje a zariadenia, pracovný postup: Sú publikované v práci¹⁵⁾. Hodnoty povrchového napätia (γ) a disociačnej konštanty ($\text{p}K_a$) sú prezentované v tabuľke 3.

Stanovenie logaritmu retenčného (kapacitného) faktora „ k' “ ($\log k'$) z RP-HPLC a rozdeľovacieho koeficientu P_{exp} ($\log P_{\text{exp}}$) v rôznych lipohydrofílných systémoch

Použité chemikálie, prístroje a zariadenia, pracovný postup, chromatografické podmienky (RP-HPLC), výber lipofílnych prostredí pre shake-flask metódu stanovenia P_{exp} sú publikované v prácach^{15, 17)}. Hodnoty experimentálne stanovených parametrov lipofility sú uvedené v tabuľke 3.

Štúdium stability v UV/VIS oblasti

Prístroje a zariadenia: Pozri UV/VIS spektrofotometriu v rámci spektrálnej časti.

Pracovný postup: Pripravil sa vodný a metanolevý roztok látky 8e s $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. V priebehu 1 h sa v 5-min intervaloch sledovali (prípadné) posuny vo vlnových dĺžkach absorpčných maxím

ako aj (prípadné) zmeny v absorbanciách pri jednotlivých absorpčných maximách v obidvoch zvolených prostrediach.

Stanovenie obsahu

Stanovenie obsahu látky 8e v UV/VIS oblasti spektra

Prístroje a zariadenia: Pozri UV/VIS spektrofotometriu v rámci spektrálnej časti.

Pracovný postup: Pripravil sa 0,002% zásobný(-é) roztok(-y) zlúčeniny 8e vo vode ako aj v metanole, ktorého(-ých) spektrum sa zaznamenalo v oblasti 190 až 400 nm proti čistému rozpúšťadlu. Z konkrétneho zásobného roztoku sa odpipetovalo postupne 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 absorbancia takto pripravených roztokov¹⁸⁾. Z nameraných hodnôt A sa zostrojila kalibračná krivka; vo vodnom prostredí pri vlnovej dĺžke $\lambda_{\text{max}} = 238 \text{ nm}$, v metanole pri $\lambda_{\text{max}} = 244 \text{ nm}$. Hodnoty príslušných koncentrácií a absorbancií A sú uvedené v tabuľke 4.

Vyhodnotenie výsledkov: Obsah zlúčeniny 8e sa stanovil z funkcie priamky ($y = a \cdot x + b$). Po zostrojení kalibračnej krivky a štatistickom vyhodnotení v programe OriginPro ver. 8 SR0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) 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 látky 8e pomocou RP-HPLC metódy vnútorného štandardu

Použité chemikálie: Metanol UV (Lachema, Brno, ČR), natriumacetát tavený čistý (Spolana, Neratovice, ČR), vnútorný štandard – kyselina *para*-metoxyfenyloctová pre syntézu (Merck Chemicals Slovensko, Bratislava, SR).

Tab. 5. Parametre potrebné na zostrojenie kalibračnej krivky pre stanovenie obsahu látky 8e pomocou RP-HPLC

V* (ml)	c (mol.l ⁻¹)	P ₁ (8e)**	P ₂ **	P ₁ /P ₂
1	3,861 × 10 ⁻⁵	2235,039	5831,250	0,383286
2	7,722 × 10 ⁻⁵	4571,367	5965,321	0,766324
3	1,158 × 10 ⁻⁴	8528,139	6051,924	1,409162
4	1,544 × 10 ⁻⁴	11001,565	6184,764	1,778817
6	2,317 × 10 ⁻⁴	16045,763	6029,265	2,661313

*objem pridaného základného roztoku 8e (0,05 %)

**plocha príslušných píkov formovaných látkou 8e (P₁) a vnútorným štandardom – kyselinou para-metoxifynyloctovou (P₂)

Prístroje a zariadenia, chromatografické podmienky sú publikované v práci¹⁵⁾.

Pracovný postup: Pripravil sa 0,05 % zásobný roztok látky 8e v metanole, z ktorého sa kvantitatívne prenieslo do 25-ml odmerných baniek postupne po 1, 2, 3, 4 a 6 ml, do každej 25-odmernej banky sa pridalo 1,5 ml vnútorného štandardu (0,10% metanolvý roztok kyseliny para-metoxifynyloctovej) a doplnilo sa metanolom po značku¹⁹⁾. Pomocou dávkovacieho ventilu sa z takto pripravených roztokov nanášal na kolónu objem 20 µl.

Vyhodnotenie výsledkov: Z pamäti počítača bol vyvolaný záznam analýzy vzorky, integrovali a opísali sa plochy zodpovedajúce analyzovanej látke (P₁) a jej vnútornému štandardu (P₂). Výsledky analýz sa vypočítali z pomeru plôch píkov P₁/P₂ (tab. 5).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Syntéza študovanej látky bola publikovaná v práci¹⁴⁾, molekula 8e bola pripravená reakciou 2,3-epoxypropán-1-ylesteru kyseliny 3-propoxyfenylkarbámovej (pracovne označený ako *Epoxid-33*) a bázeickej zložky, 1-(3-trifluórmetyl)fenylpiperazínu. Chemická štruktúra analyzovanej zlúčeniny 8e bola potvrdená ¹H- ako aj ¹³C-NMR spektrometriou. V ¹H- a ¹³C-NMR spektrách boli dokázané atómy vodíka a uhlíka *meta*-propoxysubstituenta, 2-hydroxypropán-1,3-diylového zoskupenia, karbamátovej funkčnej skupiny, piperazín-1,4-diyly, prítomných aromatických jadier spolu s atómom uhlíka trifluórmetylovej skupiny viazanej na *N*-fenylpiperazínové jadro. V IR spektre hodnotenej molekuly boli identifikované vlnóty zodpovedajúce *meta*-propoxyskupine, aromatickým kruhom v lipofilnej ako aj v solitvornej časti molekuly, NH-skupine karbamátového zoskupenia, arylalkyléteri ako aj karbonylu. Pás IR spektra valenčnej vibrácie (C=O)-skupiny pri 1728 cm⁻¹ sa môže pri látke 8e využiť pre kvantitatívne hodnotenie.

Schopnosť zlúčeniny absorbovať žiarenie v ultrafialovej a viditeľnej časti spektra závisí predovšetkým od jej elektrónovej štruktúry. Analyzovaná molekula 8e vykazovala v UV/VIS oblasti vo vodnom ako aj v metanole prostredí tri absorpčné pásy. Podobne je to aj v prípade nesubstituovaného benzénu, ktorého absorpčné

maximá sú pri 184 nm ($\epsilon_{1\max} = 60\,000\text{ m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$, $\log \epsilon_{1\max} = 4,79$), 204 nm ($\epsilon_{2\max} = 7900\text{ m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$, $\log \epsilon_{2\max} = 3,90$) a 256 nm ($\epsilon_{3\max} = 200\text{ m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$, $\log \epsilon_{3\max} = 2,30$). Substitúcia auxochrómnych skupinami na benzénovom kruhu znamená posun jednotlivých maxím smerom k vyšším vlnovým dĺžkam²⁰⁾. Druhý lokálne excitálny pás látky 8e bol vo vodnom prostredí pozorovaný pri 206 nm ($\lambda_{\max}$; pri 212 nm v metanole), *charge-transfer* pás (C-T) pri 238 nm ($\lambda_{2\max}$; pri 244 nm v metanole) a prvý lokálne excitálny pás pri 278 nm ($\epsilon_{3\max}$; pri 282 nm v metanole).

Hmotnostné spektrum je charakteristické pre každú látku a môže byť použité ako „odtlačok palca“ (*fingerprint*) na jej identifikáciu buď porovnaním s už známym spektrom alebo priamo jeho interpretáciou²¹⁾. Analýza MS študovanej zlúčeniny 8e poukázala na existenciu zodpovedajúceho molekulového iónu [M + H]⁺, ktorého hodnota *m/z* = 482,2.

Vypočítaný a experimentálne stanovený percentuálny obsah uhlíka, vodíka a dusíka sa pre látku 8e nelíšil o viac ako ± 0,40 % (tab. 2). Z nameraných údajov súčasne nepriamo vyplynulo, že látka 8e bola pripravená ako monochlorid.

Hodnotená zlúčenina 8e je vysokolipofilnou štruktúrou, ktorá je veľmi ťažko rozpustná v destilovanej vode, dobre rozpustná v metanole, mierne rozpustná v liehu 96% a prakticky nerozpustná v chloroforme. Na orientačné hodnotenie jej čistoty 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 so zlúčeninou 8e bol chromatograficky hodnotený aj medziprodukt syntézy – *Epoxid-33*. Vo vyvíjacej sústave *S* (pozri experimentálnu časť) nastalo jednoznačné oddelenie ohraničených škvrn prislúchajúcich štruktúre 8e (*R_f* = 0,38) a *Epoxidu-33* (*R_f* = 0,59), pričom na príslušnom „stĺpci“ látky 8e neboli pozorované iné škvrny.

Študovaná molekula 8e má schopnosť výrazným spôsobom znižovať povrchové napätie¹⁵⁾, je teda povrchovoaktívnou látkou (tab. 3).

Hodnotená zlúčenina 8e má mierne kyslý charakter¹⁵⁾, v jej štruktúre je protonizovaný len jeden atóm dusíka piperazín-1,4-diylového skeletu, ktorému prislúcha *pK_a* = 5,21. Tento údaj je vyšší ako sú prvé dve hodnoty disociačných konštánt izoniazidu²²⁾ (*pK_{a1}* = 2,0; *pK_{a2}* = 3,5 a *pK_{a3}* = 10,8). Nižšie hodnoty *pK_a*

majú aj niektoré iné v praxi používané antimykobakteriálne účinné látky ²²⁾ – pyrazínamid ($pK_a = 0,50$), kyselina *para*-aminosalicylová ($pK_{a1} = 1,78$; $pK_{a2} = 3,63$) alebo etiónamid ($pK_a = 4,37$). Streptomycínu prislúchajú naopak vyššie hodnoty disociačných konštant²²⁾ ako má látka *8e* ($pK_{a1} = 7,84$; $pK_{a2} = 11,54$).

Skelet bunkovej steny jednotlivých mykobaktérií pozostáva, okrem iného, z troch hlavných, navzájom kovalentne pospájaných podjednotiek, ktorými sú arabinogalaktán (AG), peptidoglykán (PGN) a mykolové kyseliny. Kyselina murámová, ako časť PGN, je *N*-glykolylátovaná (konjugovaná) na kyselinu *N*-glykolylmurámovú. Najtypickejšou črtou stavby konkrétnej mykobakteriálnej bunkovej steny je však to, že až 60 % jej hmotnosti tvoria lipidy a kyselina mykolová²³⁾. Makrolidové, tetracyklínové, fluórchinolónové štruktúry alebo rifamycíny sú vysokolipofilné molekuly, ktoré pravdepodobne využívajú lipidovú dvojvrstvu cez prechod bunkovou stenou mykobaktérií²³⁾.

Preto je z hľadiska možného mechanizmu antimykobakteriálneho pôsobenia študovanej látky *8e* poznanie miery jej lipofility jedným z kľúčových faktorov. Ako vyplýva z údajov sumarizovaných v tabuľke 3 ($\log k'$, $\log P_{exp}$), substancia *8e* je vysokolipofilnou štruktúrou, ktorej hodnota $\log P_{exp}$ stanovená v systéme oktán-1-ol/TFR je vyššia ako rozdeľovací koeficient izoniazidu²⁴⁾ (-0,64), pyrazínamidu²⁵⁾ (-1,89), kyseliny *para*-aminosalicylovej²⁶⁾ (1,01), etiónamidu²⁷⁾ (0,71) alebo vysokohydrofilného streptomycínu²⁸⁾ (-8,01).

Pri hodnotení vplyvu UV/VIS žiarenia na vodný a metanolvý roztok zlúčeniny *8e* bolo zistené, že v priebehu 1 h nedošlo k zmene hodnôt absorpcií pri jednotlivých absorpčných maximách a v rovnakom časovom intervale ani k ich posunu.

Pre (prípadné) stanovenie obsahu zlúčeniny *8e* v konkrétnej liekovej forme alebo v telových tekutinách možno využiť UV/VIS spektrofotometriu alebo RP-HPLC. Obsah látky *8e* bol stanovený spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke druhého absorpčného maxima, teda pri $\lambda_{2max} = 238$ nm (pre vodné prostredie), resp. pri $\lambda_{2max} = 244$ nm (pre prostredie metanolu).

Na základe získaných údajov bola zostrojená kalibračná krivka, výsledkom stanovenia obsahu látky *8e* vo vodnom prostredí (tab. 4) bolo formulovanie regresnej rovnice v tvare: $y = 26724(\pm 372)x + 0,0229$ ($\pm 0,0095$); $R^2 = 0,999$, $F = 5172$, $n = 5$, resp. pre stanovenie obsahu v prostredí metanolu platilo: $y = 28526 (\pm 216)x + 0,0281(\pm 0,0055)$; $R^2 = 0,9998$, $F = 17412$, $n = 5$.

V uvedených koreláciách parameter y predstavuje absorbanciu, x vyjadruje koncentráciu stanovovanej látky v mol.l⁻¹, F je hodnota F -testu na testovanie štatistických hypotéz (štatistická indukcia), n je počet prípadov.

Pri stanovení obsahu látky *8e* pomocou RP-HPLC sa vhodnou mobilnou fázou pre jej delenie ukázal metanol 94 %. Formulovaná regresná rovnica mala nasledujúci tvar: $y = 111951(\pm 519)x - 0,0767(\pm 0,0728)$; $R^2 = 0,994$, $F = 530$, $n = 5$. Parameter y predstavuje pomer plôch píkov študovanej látky *8e* a vnútorného štandardu (kyselina *para*-metoxyfenyloctová), x vyjadruje koncentráciu stanovovanej látky v mol.l⁻¹.

Experimentálne údaje sumarizované v tejto práci budú v budúcnosti slúžiť ako príspevok pre ďalšie komplexné hodnotenie vzťahov medzi chemickou štruktúrou a biologickou (antimykobakteriálnou) aktivitou (QSAR) v skupine bázičných esterov alkoxyfenylkarbámovej kyseliny.

LITERATÚRA

1. Chou, Y.-H., Hsu, M.-S., Sheng, W.-H., Chang, S.-Ch.: Disseminated *Mycobacterium kansasii* infection associated with hemophagocytic syndrome. Int. J. Infect. Dis. 2010; 14, 262–264.
2. McGrath, E. E., Anderson, P. B.: The therapeutic approach to non-tuberculous mycobacterial infection of the lung. Pulm. Pharmacol. Ther. 2010; 23, 389–396.
3. McGrath, E. E., Anderson, P. B.: Increased prevalence of non-tuberculous mycobacteria infection. Lancet 2007; 370, 28.
4. Taillard, C., Greub, G., Weber, R., Pfyffer, G. E., Bodmer, T., Zimmerli, S., Frei, R., Bassetti, S., Rohner, P., Piffaretti, J. C., Bernasconi, E., Bille, J., Telenti, A., Prod'homme, G.: Clinical implications of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity: Swiss National Survey. J. Clin. Microbiol. 2003; 41, 1240–1244.
5. Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, Ch., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademarco, M. F., Iseman, M., Olivier, K., Ruoss, S., von Reyn, C. F., Wallace, Jr., R. J., Winthrop, K.: An official ATS/IDSA statement: Diagnosis and treatment and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007; 175, 367–416.
6. Campo, R. E., Campo, C. E.: *Mycobacterium kansasii* disease in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis. 1997; 24, 1233–1238.
7. Arend, S. M., Cerdá de Palou, E., de Haas, P., Janssen, R., Hoeve M. A., Verhard, E. M., Ottenhoff, T. H., van Soolingen, D., van Dissel, J. T.: Pneumonia caused by *Mycobacterium kansasii* in a series of patients without recognised immune defect. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10, 738–748.
8. Tateishi, Y., Hirayama, Y., Ozeki, Y., Nishiuchi, Y., Yoshimura, M., Kang, J., Shibata, A., Hirata, K., Kitada, S., Maekura, R., Ogura, H., Kobayashi, K., Matsumoto, S.: Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immunocompetent patients. Microbial Pathogenesis 2009; 46, 6–12.
9. Shen, M.-Ch., Shin-Jung Lee, S., Huang, T.-S., Liu, Y.-Ch.: Clinical significance of isolation of *Mycobacterium avium* complex from respiratory specimens. J. Formos. Med. Assoc. 2010; 109, 517–523.
10. Waisser, K., Doležal, R., Čižmárik, J., Malík, I., Kaustová, J.: The antimycobacterial derivatives against potential pathogenic strains: 2-Hydroxy-3-(4-phenylpiperazin-1-yl)-propylphenylcarbamates. Sci. Pharm. 2007; 75, 55–61.
11. Waisser, K., Doležal, R., Čižmárik, J., Malík, I., Kaustová, J.: The potential antituberculotics of the series of 2-hydroxy-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)-propylphenylcarbamates. Folia Pharm. Univ. Carol. 2007; 35–36, 45–48.
12. Ruffolo, R. R., Feuerstein, G. Z.: Pharmacology of carvedilol: rationale for use in hypertension, coronary artery disease, and congestive heart failure. Cardiovasc. Drugs Ther. 1997; 11(Suppl. 1), 247–256.

13. **Farthing, M. J. G., Alstead, E. M., Abrams, S. M. L., Haug, G., Johnston, A., Hermann, R., Niebch, G., Ruus, P., Molz, K. H., Turner, P.:** Pharmacokinetics of naftopidil, a novel antihypertensive drug, in patients with hepatic dysfunction. *Postgrad. Med. J.* 1994; 70, 363–366.
14. **Malík, I., Sedlářová, E., Csöllei, J., Andriamainty, F., Kurfürst, P., Vančo, J.:** Synthesis, spectral description, and lipophilicity parameters determination of phenyl-carbamic acid derivatives with integrated *N*-phenyl-piperazine moiety in the structure. *Chem. pap.* 2006; 60, 42–47.
15. **Malík, I., Sedlářová, E., Čižmárik, J., Andriamainty, F., Csöllei, J.:** Štúdium fyzikálno-chemických vlastností derivátov kyseliny 2-, 3-, 4-alkoxyfenylkarbámovej s bázičkou častou tvorenou substituovaným *N*-fenyl-piperazínom. *Čes. slov. Farm.* 2005; 54, 235–239.
16. **European Pharmacopoeia, 6th Ed.** European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg: Druckerei C.H. Beck 2007; s. 5.
17. **Sedlářová, E., Malík, I., Andriamainty, F., Kečková, S., Csöllei, J.:** Štúdium lipofility derivátov kyseliny fenylkarbámovej s bázičkou častou tvorenou substituovaným *N*-fenylpiperazínom. *Farm. Obzor* 2007; 74, 86–90.
18. **Malík, I., Andriamainty, F., Sedlářová, E., Čižmárik, J., Gališinová, J., Mokřý, 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.
19. **Sedlářová, E., Malík, I., Csöllei, J., Andriamainty, F.:** Analytické hodnotenie 1-(4-fluórfenyl)-4-[3-(3-propoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]piperazínium-chloridu (látka 6f). *Čes. slov. Farm.* 2005; 54, 270–274.
20. **Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J.:** *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 7th Ed. New York, London, Sydney, Toronto: John Wiley and Sons 2005; 512 s.
21. **Herbert, Ch. G., Johnstone, R. A. W.:** *Mass Spectrometry Basics*. Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press 2003; 474 s.
22. **Lemke, T. L., Williams, D. A., Roche, V. F., Zito, S. W.:** *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 6th Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business 2008; 1377 s.
23. **Liu, J., Barry, C. E., Nikaido, H.:** Cell wall: physical structure and permeability. In: Ratledge, C., Dale, J. eds. *Mycobacteria, molecular biology and virulence*. Oxford: Blackwell Science 1992.
24. **TB Alliance:** Isoniazid. *Tuberculosis* 2008; 88, 112–116.
25. **TB Alliance:** Pyrazinamide. *Tuberculosis* 2008; 88, 141–144.
26. **TB Alliance:** *Para*-aminosalicylic acid. *Tuberculosis* 2008; 88, 137–138.
27. **TB Alliance:** Ethionamide. *Tuberculosis* 2008; 88, 106–108.
28. **TB Alliance:** Streptomycin. *Tuberculosis* 2008; 88, 162–163.

Reakce na článek „Měření viskozity a konzistence dle ČL 2009“ (Čes. slov. Farm., 2011; 60, 241–246)

SOUHRN

Článek reaguje na kritiku lékopisných článků publikovanou v příspěvku E. Šnejdrové a P. Pohlové (Čes. slov. Farm., 2011; 60, 241–246). Zmíněné články byly již téměř rok před publikací jejich práce revidovány a většina vytýkaných nedostatků byla odstraněna v ČL 2009 – Doplněk 2010 se závazností od 1. 9. 2010.

SUMMARY

Response to the paper “Viscosity and consistence measurements following Ph.B. 2009” (Čes. Slov. Farm., 2011; 60, 241–246)

The paper responds to the paper entitled Viscosity and consistence measurements following Ph.B. 2009 by E. Šnejdrová and P. Pohlová published in this journal (Čes. Slov. Farm., 2011; 60, 241–246). The pharmacopoeia texts which were criticized had been revised about a year before the publication of their paper and the majority of mistakes were corrected in Ph.B. 2009 – Add. 2010 valid from 1 September 2010.

Má.

V minulém čísle tohoto časopisu byl uveřejněn článek Evy Šnejdrové a Petry Pohlové, v němž byla měřena viskozita vybraných polymerních látek a konzistence vybraných mast'ových základů a mastí podle Českého lékopisu 2009 (dále ČL 2009). „Cílem bylo kriticky zhodnotit požadavky lékopisu na viskozitu a konzistenci a navrhnout úpravy lékopisných postupů ... (citováno podle abstraktu)“. Pokud šlo o měření viskozity, autorky pracovaly s ČL 2009, jehož Evropská část je překladem základního díla 6. vydání Evropského lékopisu (dále Ph. Eur.) a jeho prvních dvou doplňků. Evropská lékopisná komise (dále ELK) články pomocných látek postupně upravuje ve spolupráci s americkou a japonskou lékopisnou komisí v rámci mezinárodní harmonizace. Články týkající se různých derivátů celulosy byly tímto kolegiem zhodnoceny, na základě toho revidovány a revize byly publikovány v doplňku 6.3 Ph. Eur. Jejich překlad byl zveřejněn v ČL 2009 – Doplněk 2010 a v něm je většina vytýkaných nedostatků již odstraněna. Závaznost ČL 2009 – Doplněk 2010 byla stanovena od 1. 9. 2010, tedy přibližně 10 měsíců před odesláním rukopisu práce do redakce. Autorky tedy publikovaly kritiku již neplatných znění článků.

V případě měření konzistence penetrometricky byl chybný překlad způsobu vyjadřování výsledků opraven v ČL 2009 – Doplněk 2011 (závazný od 1. 9. 2011).

ČL je na Ph. Eur. navázán od roku 1998, kdy Česká republika přistoupila k mezinárodní Úmluvě pro vypracování Evropského lékopisu. Lékopisná komise ministerstva zdravotnictví (dále LK MZ) od té doby připravuje české překlady textů Ph. Eur. k vydávání v pravidelných intervalech ve snaze udržet pro odbornou veřejnost aktuální a dostupné informace o platných textech této komplexní farmaceutické normy. Ph. Eur. vychází pravidelně třikrát ročně, komplex českých překladů vychází vždy jedenkrát ročně a zahrnuje texty platné v příslušném roce. Od úplného vydání ČL 2009 vychází již doplňky, zpravidla s platností od 1. září. Závaznost stanovuje ministerstvo zdravotnictví (dále MZ) na základě zmocnění § 11 písm. c) a d) zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů. ČL (a jeho doplňky) je tedy závazný ze zákona, a to pro všechny oblasti farmacie. O vydání a závaznosti nového lékopisu (doplňku) informuje MZ ve Věstníku MZ a Státní ústav pro kontrolu léčiv na své internetové stránce, kde je současně zveřejněn i jeho obsah. Vlastní texty překladů jsou zveřejňovány v knižní i elektronické podobě v publikacích vydávaných nakladatelstvím Grada Publishing. Pro vědecké a odborné účely poskytuje sekretariát LK MZ na vyžádání texty v originále (v angličtině či francouzštině, jak jsou vydávány), či jejich překlady do češtiny, a to i v předstihu, před jejich vydáním.

Sekretariát LK MZ přijímá a vítá jakákoli upozornění na chyby či nejasnosti v překladech (zpravidla je však získává přímou cestou, ne formou publikace v odborném tisku), ty pak opravuje v nejbližším vydání ČL, je-li to třeba. Chyby v metodice článků řeší LK MZ ve spolupráci s ELK, kde má své zastoupení, formou žádostí o revize článků či statí; tyto žádosti je třeba doložit experimentální validovanou studií. Lékopisné metodiky je možné nahradit jinými vhodnějšími metodami, ovšem je třeba validovanou studií prokázat, že bude-li použita lékopisná metodika, dosáhne se stejných výsledků.

doc. PharmDr. Miloš Macháček, CSc.
předseda Lékopisné komise MZ ČR
RNDr. Hana Lomská
tajemnice Lékopisné komise MZ ČR