

## PŮVODNÍ PRÁCE

## Štúdium lokálnych anestetík: Časť 204\*

Determinácia kritických micelových koncentrácií vybraných *m*-alkoxysubstituovaných pyrrolidínoetylerov kyseliny fenylylkarbámovej využitím pyrénu ako sondy

## Study of local anaesthetics: Part 204\*

Determination of critical micelle concentrations of selected derivatives of pyrrolidino-*m*-alkoxyphenylcarbamic acid using pyrene as a probe

Jana Gališinová • Fils Andriamainty • Jozef Čižmárik • Eva Kontseková • Ivan Malík

Došlo 4. listopadu 2013 / Prijato 13. prosince 2013

## Súhrn

Pomocou absorpčnej spektroskopie v UV/VIS oblasti spektra využitím pyrénu ako sondy boli determinované hodnoty kritických micelových koncentrácií študovaných *m*-alkoxysubstituovaných pyrrolidínoetylerov kyseliny fenylylkarbámovej vo vodných prostrediach pri teplote 25 °C. Sledovali sa nezatižené pyrénové píky v absorpčných spektrách skúmaných derivátov v prítomnosti pyrénu, a to pri vlnových dĺžkach 336 a 320 nm pri látkach VIII Z, XIV Z a XVII Z, a navyše pri 308 nm pri látke XXIX Z. Kritické micelové koncentrácie boli stanovené zo závislostí súčtu absorbancií nezatižených pyrénových píkov od koncentrácie surfaktantu v roztoku, ktoré mali sigmoidálny priebeh Boltzmannovho typu. Hodnoty determinovaných cmc záviseli exponenciálne od počtu atómov uhlíka *n* v hydrofóbnom reťazci. Zo závislosti  $\ln(\text{cmc})$  od *n*, ktorej rovnica bola  $\ln(\text{cmc}) = -0,146 - 0,691n$ , sa vypočítala hodnota voľnej Gibbsovej energie prenosu jednej

metylénovej skupiny alkoxyreťazca z vodnej fázy do vnútra micely:  $\delta\Delta G(\text{CH}_2) = (-0,691 \pm 0,023)RT$ . Na základe dosiahnutých výsledkov možno predpokladať, že študované deriváty vytvárajú v roztoku sférické micely.

**Kľúčové slová:** *m*-alkoxysubstituované pyrrolidínoetyl-estery kyseliny fenylylkarbámovej • kritická micelová koncentrácia • pyrénová absorpcia • sigmoidálna-Boltzmannova rovnica

## Summary

The critical micelle concentrations of the studied derivatives of pyrrolidino-*m*-alkoxyphenylcarbamic acid in aqueous media at 25 °C were determined using the UV/VIS absorption spectroscopy method with pyrene as a probe. In the absorption spectra of the derivatives and pyrene, there were examined unmasked pyrene peaks, at wavelength of 336 and 320 nm for VIII Z, XIV Z and XVII Z, and in addition at 308 nm for XXIX Z. The critical micelle concentrations were defined from the plots of the sum of the unmasked pyrene peaks against the surfactant concentration that had a sigmoidal character of Boltzmann type. The cmc values of the derivatives were exponentially dependent on the number of carbons in the hydrophobic chain. From the plot of  $\ln(\text{cmc})$  against the number of carbons *n* with the equation  $\ln(\text{cmc}) = -0,146 - 0,691n$ , the value of the Gibbs free energy of transfer of each methylene group of the alkoxy chain from the aqueous phase into the internal hydrophobic volume of micelle was also defined:  $\delta\Delta G(\text{CH}_2) = (-0,691 \pm 0,023)RT$ . Building on the obtained results, the spherical micelle forming in the solution can be assumed.

**Keywords:** derivatives of pyrrolidino-*m*-alkoxyphenylcarbamic acid • critical micelle concentration • pyrene absorption • sigmoidal-Boltzmann equation

\*Časť 203: J. Bioequiv. Availab. 2013; 5(4), 161–164.

## Úvod

Proces asociácie surfaktantov do micel, vezikúl a membrán má veľmi dôležitú funkciu v rôznych oblastiach vedy a výskumu od biologických systémov až po technické aplikácie.

Micely sférické, cylindrické alebo planárne (dvojvrstvé alebo platničkové) sú nestabilnými jednotkami vytvorenými nekovalentnou agregáciou jednotlivých monomérov surfaktantu. Objem vytvorených micel je ovplyvňovaný zmenami chemickej štruktúry surfaktantu a zmenami vlastností roztoku, ako sú teplota, iónová sila, zloženie surfaktantu (v prípade zmiešaných micel) a vo všeobecnosti koncentrácia surfaktantu a pH. Najmä v závislosti od stavu roztoku a od povahy surfaktantu sú sférické micely schopné narásť jednodimenzionálne do cylindrických micel alebo dvojdimenzionálne do dvojvrstvových alebo platničkových micel. Zväčšovanie micel je riadené hlavne polárnymi skupinami surfaktantu, keďže jednodimenzionálny rast má za následok približovanie polárnych skupín surfaktantu bližšie k sebe tak, aby sa znížila dosiahnuteľná plocha na molekulu surfaktantu na micelovom povrchu<sup>1,2)</sup>.

Vo vodných roztokoch týchto micelových štruktúr molekuly surfaktantu smerujú svojimi polárnymi skupinami smerom k vodnej fáze a ich hydrofóbne časti smerom von z vodného roztoku. U iónových micel medzifázová oblasť medzi vodnou a micelovou fázou obsahuje iónové polárne skupiny, Sternova vrstva elektrickej dvojvrstvy koreluje týmto skupinám a približne polovica protiónov je spojená s micelami a vodou. Zvyšné protióny sú uzavreté v Gouy-Chapmanovej dvojvrstve, ktorá siaha ďalej do vodnej fázy. V prítomnosti elektrolytov je veľkosť dvojvrstvy funkciou iónovej sily roztoku a môže byť mimoriadne stlačená<sup>3)</sup>. Ďalšou pozoruhodnou vlastnosťou micel je, že vodná fáza penetruje do micely za hydrofilné polárne skupiny a niektoré prvé metylénové hydrofóbne časti blízko polárnej skupiny sú hydratované. Z tohto dôvodu môžeme oddeliť vnútornú plochu micely na vonkajšie centrum penetrované vodou a na vnútorné centrum úplne vode neprístupné<sup>2)</sup>.

Existuje viacero metód ako nukleárna magnetická rezonancia, meranie povrchového napätia, konduktometria, kalorimetria, meranie rozptylu svetla a iné, ktoré sa používajú na determináciu kritickej micelovej koncentrácie (cmc)<sup>4-9)</sup>, agregáčného čísla a na určenie termodynamických parametrov procesu agregácie surfaktantu

v roztoku<sup>10-12)</sup>. Okrem týchto spomenutých sa na stanovenie cmc aplikujú aj spektrálne techniky v UV/VIS oblasti spektra ako absorpčné i fluorescenčné metódy využívajúce rozličné molekuly ako sondy<sup>13, 14)</sup>.

Pyrén sa stal jedným z najviac študovaných organických molekúl v zmysle jeho fotofyzikálnych vlastností a tieto štúdie udelili pyrénovej štruktúre status zlatého štandardu ako molekulovej sondy mikroprostredia<sup>15)</sup>.

Všeobecne hydrofóbne sondy vstupujú do micelového jadra a hydrofilné sondy sa nachádzajú na micelovom povrchu<sup>16)</sup>. Takouto inkorporáciou sa menia intenzity, resp. pomer intenzít pík v charakteristickom (absorpčnom i fluorescenčnom) spektre sondy<sup>13, 14)</sup>.

Pyrolidínoetylestery *o*-, *m*-, *p*-alkoxysubstituovanej kyseliny fenylylkarbámovej<sup>17)</sup> sú potenciálne liečivá so značnou povrchovou a infiltračnou lokálne anestetickou aktivitou. Tieto látky majú amfifilnú štruktúru a v roztokoch sú povrchovo-aktívne. Základné parametre agregácie *o*-derivátov v roztoku boli popísané v práci<sup>21)</sup> a ich najaktívnejšieho derivátu v práci<sup>22)</sup>. U lokálnych anestetík pri povrchovej a infiltračnej anestézii na nervovom vlákne alebo na sliznici dochádza k zmene aplikačnej iónovej formy liečiva na neiónovú a k zmene micel.

Predložená štúdia je zameraná na determináciu kritickej micelovej koncentrácie vybraných *m*-alkoxysubstituovaných pyrolidínoetylestero kyseliny fenylylkarbámovej vo vodnom prostredí pomocou absorpčnej spektroskopie v UV/VIS oblasti spektra využitím pyrénu ako sondy.

## Pokusná časť

### Chemikálie

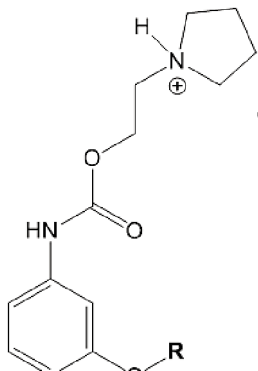
Študované látky, *m*-alkoxysubstituované pyrolidínoetylestery kyseliny fenylylkarbámovej (tab. 1), patria medzi kationové surfaktanty s lokálne anestetickým účinkom a boli syntetizované podľa práce<sup>17)</sup>.

Pyrén, puriss. p.a., pre fluorescenciu,  $\geq 99,0\%$  ( $M_r = 202,25$ ) pochádza z firmy Sigma-Aldrich (Švajčiarsko) a etanol UV,  $\sim 96\%$  (v/v) ( $M_r = 46,07$ ) z firmy Fisher (Slovensko).

### Prístroje

UV/VIS spektrofotometer Spekol 1300 Analytic Jena AG (Nemecko); ultrazvukový kúpeľ Bandelin Sonorex (Nemecko); analytické váhy KERN ABS/ABJ (Nemecko).

Tab. 1. Študované deriváty a ich molekulové hmotnosti

|  | Látka  | Substituent R                    | $M_r$  |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------------------------|--------|
|                                                                                     | VIII Z | -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>   | 328,83 |
|                                                                                     | XIV Z  | -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>  | 356,89 |
|                                                                                     | XVII Z | -C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 370,91 |
|                                                                                     | XXIX Z | -C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 427,02 |

### Pracovný postup

Bol pripravený zásobný roztok pyrénu s koncentráciou 0,0012 mol/l rozpustením výpočtom zisteného množstva pyrénu v etanole UV pomocou ultrazvuku (15 min). Experimentálny 2 μmol/l pyrénový roztok sa získal zriedením zásobného roztoku nasledujúcim postupom: 5 μl pyrénového roztoku do 3 ml roztoku vzorky. Takto nízka koncentrácia etanolu vo vzorke (0,17 %) nie je schopná ovplyvniť správanie sa surfaktantu v roztoku<sup>13)</sup>.

Zásobné roztoky študovaných látok s objemom 3 ml sa pripravili rozpustením výpočtom stanoveného množstva látky vo vode a k meranému roztoku surfaktantu sa pridalo 5 μl roztoku pyrénu. Postupným riedením priamo v kyvette boli pripravené roztoky s nižšími koncentraciami vo vhodne zvolených intervaloch, a to takým spôsobom, aby sa zachovala 2 μmol/l koncentrácia pyrénu v meranom roztoku.

Pomocou spektrofotometra boli merané absorpčné spektrá každej koncentrácie roztoku študovanej látky v prítomnosti pyrénu v rozmedzí 200–400 nm pri teplote 25 °C proti zodpovedajúcemu porovnávaciemu roztoku. V absorpčných spektrách sa sledovali nezastienené hlavné pyrénové píky; pri látkach VIII Z, XIV Z, XVII Z boli nezastienené pri vlnových dĺžkach 336 a 320 nm, pri látke XXIX Z navyše pri 308 nm.

### Výsledky a diskusia

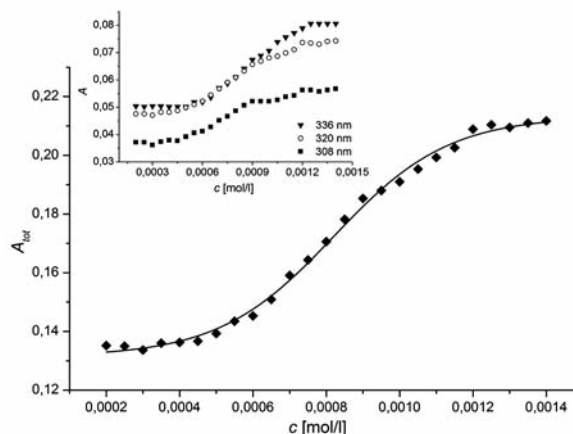
Hodnoty kritických micelových koncentrácií boli stanovené zo závislostí súčtu absorbancií nezastretých pyrénových pík  $A_{tot}$  od koncentrácie  $c$  surfaktantu v roztoku. Závislosť mala charakteristický sigmoidálny priebeh Boltzmannovho typu so stúpajúcou tendenciou, ktorú popisuje rovnica:

$$A_{tot} = \frac{(a_i - a_f)}{1 + e^{(x - x_0)/\Delta x}} + a_f$$

kde  $a_i$  a  $a_f$  sú iniciálne a konečné (angl. final) asymptoty sigmoidy,  $x$  ako nezávislá premenná je koncentráciou surfaktantu,  $x_0$  je stred sigmoidy a  $\Delta x$  nezávislé rozmedzie, kde dochádza k náhlej zmene<sup>13, 18)</sup>.

Pre ilustráciu uvádzame graf závislosti  $A_{tot}$  od  $c$  látky XXIX Z vo vodnom prostredí pri teplote 25 °C (graf 1).

Sigmoidálna funkcia poskytuje dve hodnoty  $X_1$  a  $X_2$ , jednu pri  $x_0$  a ďalšiu pri  $(x_0 + 2x)$ . Pomer  $x_0/\Delta x$  je návo-dom pre rozlíšenie, ktorá z nich je považovaná za cmc. Pre amfifilné systémy, ktorých  $(x_0/\Delta x) < 10$ , je kritickou micelovou koncentráciou hodnota  $X_1$ , a pre systémy, kde  $(x_0/\Delta x) > 10$ , je  $cmc = X_2$ <sup>13, 14)</sup>. Parametre funkcií (počet



Graf 1. Závislosť súčtu absorbancií hlavných pyrénových pík ( $A_{tot}$ ) od koncentrácie ( $c$ ) látky XXIX Z vo vodnom prostredí pri 25 °C

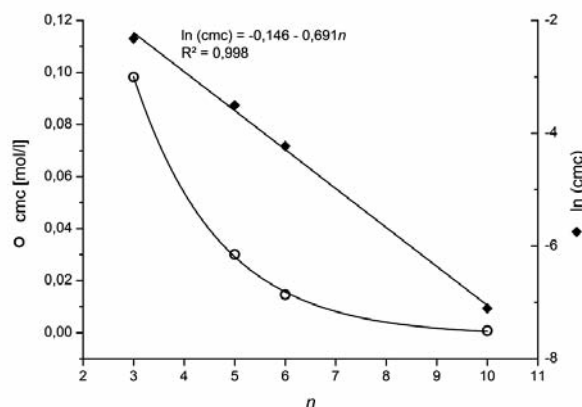
Vnútorný graf: závislosť absorbancie ( $A$ ) jednotlivých pyrénových pík (336 nm, 320 nm a 308 nm) od koncentrácie surfaktantu

fitovaných bodov  $z$ ,  $x_0$ ,  $\Delta x$ , pomer  $x_0/\Delta x$ , koeficient determinácie  $R^2$ ,  $\chi^2$ , hodnoty  $X_1$ ,  $X_2$ ) a determinované hodnoty cmc skúmaných derivátov uvádza tabuľka 2.

Hodnoty stanovených kritických micelových koncentrácií študovaných  $m$ -alkoxysubstituovaných pyrolidínoetylerov kyseliny fenylykarbámovej závisia exponenciálne od počtu atómov uhlíka  $n$  v hydrofóbnom reťazci, resp. hodnoty  $\ln(cmc)$  závisia od  $n$  lineárne podľa rovnice:

$$\ln(cmc) = A - Bn^{3, 19);}$$

$$\ln(cmc) = -0,146 - 0,691n \text{ (graf 2).}$$



Graf 2. Závislosť hodnôt cmc a  $\ln(cmc)$  od počtu atómov uhlíka  $n$  v hydrofóbnom reťazci študovaných pyrolidínoetylerov  $m$ -alkoxysubstituovanej kyseliny fenylykarbámovej

Tab. 2. Parametre sigmoidálnych funkcií s determinovanými hodnotami cmc skúmaných pyrolidínoetylerov  $m$ -alkoxysubstituovanej kyseliny fenylykarbámovej pri 25 °C

| Látka  | $n$ | $z$ | $x_0$   | $\Delta x$           | $x_0/\Delta x$ | $R^2$ | $\chi^2$             | $X_1$<br>(mol/l)     | $X_2$<br>(mol/l)     | cmc<br>(mol/l)                         |
|--------|-----|-----|---------|----------------------|----------------|-------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------------|
| VIII Z | 3   | 67  | 0,09818 | $4,38 \cdot 10^{-2}$ | 2,24           | 0,997 | $3,27 \cdot 10^{-4}$ | $9,82 \cdot 10^{-2}$ | $1,86 \cdot 10^{-1}$ | <b><math>9,82 \cdot 10^{-2}</math></b> |
| XIV Z  | 5   | 28  | 0,03008 | $9,70 \cdot 10^{-3}$ | 3,10           | 0,997 | $1,16 \cdot 10^{-5}$ | $3,01 \cdot 10^{-2}$ | $4,95 \cdot 10^{-2}$ | <b><math>3,01 \cdot 10^{-2}</math></b> |
| XVII Z | 6   | 27  | 0,01458 | $4,02 \cdot 10^{-3}$ | 3,63           | 0,999 | $3,74 \cdot 10^{-6}$ | $1,46 \cdot 10^{-2}$ | $2,26 \cdot 10^{-2}$ | <b><math>1,46 \cdot 10^{-2}</math></b> |
| XXIX Z | 10  | 25  | 0,00082 | $1,57 \cdot 10^{-4}$ | 5,23           | 0,996 | $3,24 \cdot 10^{-6}$ | $8,20 \cdot 10^{-4}$ | $1,13 \cdot 10^{-3}$ | <b><math>8,20 \cdot 10^{-4}</math></b> |

Voľná Gibbsova energia prenosu jednej metylénovej skupiny alkoxyreťazca z vodnej fázy do vnútra micely je charakterizovaná vzťahom:

$$\delta\Delta G(\text{CH}_2) = -BRT,$$

kde parameter  $B$  predstavuje príspevok každej metylénovej skupiny ku kritickej micelovej koncentrácii a je smernicou závislosti  $\ln(\text{cmc})$  od  $n$ ,  $R$  je molová plynová konštanta a  $T$  je termodynamická teplota<sup>20)</sup>.  $\delta\Delta G(\text{CH}_2)$  študovaných derivátov mala pri teplote 25 °C hodnotu  $(-0,691 \pm 0,023)RT$ .

V porovnaní s  $o$ -derivátmi týchto látok<sup>21, 22)</sup> bola aj u skúmaných  $m$ -derivátov dokázaná schopnosť asociácie molekúl v roztoku a tvorba micel.

Stret záujmov: žiadny.

## Literatúra

- Chevalier Y., Zemb T. The structure of micelles and microemulsions. Rep. Prog. Phys. 1990; 53, 279.
- Puvvada S., Blankschtein D. Molecular thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior and phase separation of micellar solutions. I. Application to nonionic surfactants. J. Chem. Phys. 1990; 92, 3710–3724.
- Rosen M. J. Surfactants and Interfacial Phenomena. 3. vyd. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. 2004.
- Zakharova L. Y., Gaysin N. K., Gnezdilov O. I., Bashirov F. I., Kashapov R. R., Zhiltsova E. P., Pashirova T. N., Lukashenko S. S. Micellization of alkylated 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane by nuclear magnetic resonance technique using pulsed gradient of static magnetic field. J. Mol. Liq. 2012; 167, 89–93.
- Nyuta K., Yoshimura T., Esumi K. Surface tension and micellization properties of heterogemini surfactants containing quaternary ammonium salt and sulfobetaine moiety. J. Colloid Interface Sci. 2006; 301, 267–273.
- Sajid A. M., Abdul R. M., Khan F., Al-Lohedan H. A., Kabir-ud-Din. Interaction of amphiphilic drug amitriptyline hydrochloride with -cyclodextrin as studied by conductometry, surface tensiometry and viscometry. J. Mol. Liq. 2012; 167, 115–118.
- Bai G., Lopes A., Bastos M. Thermodynamics of micellization of alkylimidazolium surfactants in aqueous solution. J. Chem. Thermodyn. 2008; 40, 1509–1516.
- Moulik, S. P., Mitra, D. Amphiphile self-aggregation: an attempt to reconcile the agreement-disagreement between the enthalpies of micellization determined by the van't Hoff and Calorimetry methods. J. Colloid Interface Sci. 2009; 337, 569–578.
- Sarac B., Bester-Rogac M. Temperature and salt-induced micellization of dodecyltrimethylammonium chloride in aqueous solution: a thermodynamic study. J. Colloid Interface Sci. 2009; 338, 216–221.
- Das D., Ismail K. Aggregation and adsorption properties of sodium dodecyl sulfate in water-acetamide mixtures. J. Colloid Interface Sci. 2008; 327, 198–203.
- Javadian S., Gharibi H., Sohrabi B., Bijanzadeh H., Safarpour M. A., Behjatmanesh-Ardakanid R. Determination of the physico-chemical parameters and aggregation number of surfactant in micelles in binary alcohol-water mixtures. J. Mol. Liq. 2008; 137, 74–79.
- Dong B., Zhao X., Zheng L., Zhang J., Li N., Inoue T. Aggregation behavior of long-chain imidazolium ionic liquids in aqueous solution: Micellization and characterization of micelle microenvironment. Colloids Surf. A: Physicochem. Engin. Asp. 2008; 317, 666–672.
- Basu Ray G., Chakraborty I., Moulik S. P. Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity. J. Colloid Interface Sci. 2006; 294, 248–254.
- Aguiar J., Carpena P., Molina-Bolívar J. A., Carnero Ruiz C. J. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. J. Colloid Interface Sci. 2003; 258, 116–122.
- Vullev V. I., Jiang H., Jones G. Excimer sensing. In: Topics in fluorescence spectroscopy. vol. 10. advanced concepts in fluorescence spectroscopy. Part B: Macromolecular sensing. New York: Springer Science + Business Media, Inc. 2005; 211–231.
- Moroi Y. Micelles. Theoretical and applied aspects. New York: Plenum Press 1992.
- Čižmárik J., Polášek E., Švec P., Račanská E. Štúdium lokálnych anestetík CX.: Príprava, aktivita a rozdeľovacie koeficienty pyrolidínoylesterov 2-, 3- a 4-alkoxy-substituovaných kyselín fenylnkarbámových. Čes. slov. Farm. 1993; 42, 88–91.
- Barbero N., Quagliotto P., Barolo C., Artuso E., Buscaino R., Viscardi G. Characterization of monomeric and gemini cationic amphiphilic molecules by fluorescence intensity and anisotropy. Part 2. Dyes Pigm. 2009; 83, 396–402.
- Andriamainty F., Čižmárik J., Uhríková D., Balgavý P. Study of local anesthetics. Part 168. Critical micelle concentration of alkoxy homologs of local anesthetic heptacainium chloride determined by ion selective electrode. Sci. Pharm. 2005; 73, 17–25.
- Silvério S. C., Rodríguez O., Teixeira J. A., Macedo E. A. Gibbs free energy of transfer of a methylene group on {UCON + (sodium or potassium) phosphate salts} aqueous two-phase systems: Hydrophobicity effects. J. Chem. Thermodyn. 2010; 42, 1063–1069.
- Čižmárik J., Andriamainty F., Malík I., Sedlárová E. Štúdium lokálnych anestetík. Časť 178. Micelizácia pyrolidínoylesterov 2-alkoxy-substituovanej kyseliny fenylnkarbámovej. Farm. Obzor 2007; 76, 263–267.
- Andriamainty F., Čižmárik J., Malík I. Štúdium lokálnych anestetík. Časť 190. Micelizácie a termodynamické parametre N-[2-(2-heptyloxyfenylnkarbamoyloxy)-etyl]-pyrolidíniumchloridu vo vodnom roztoku KF. Farm. Obzor 2009; 78, 129–133.