

# Syntéza a základné fyzikálno-chemické vlastnosti 1-[3-(Y-alkoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(2-metylfenyl)-piperazíniumchloridov

IVAN MALÍK<sup>1</sup>, EVA SEDLÁROVÁ<sup>1</sup>, FILS ANDRIAMAINTY<sup>1</sup>, JANA GALIŠINOVÁ<sup>1</sup>, JOZEF CSÖLLEI<sup>2</sup>, JÁN VANČO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Univerzita Komenského Bratislava, Farmaceutická fakulta, Katedra farmaceutickej chémie

<sup>2</sup>Veterinárna a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav chemických liečiv

Došlo 24. února 2011 / Prijato 30. března 2011

## SOUHRN

### Syntéza a základné fyzikálno-chemické vlastnosti 1-[3-(Y-alkoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(2-metylfenyl)piperazíniumchloridov

V rámci komplexného štúdia vzťahov medzi chemickou štruktúrou, fyzikálno-chemickými vlastnosťami a biologickou (antiarytmickou, antihypertenzívnou) aktivitou duálne pôsobiacich zlúčenín boli pripravené 1-[3-(Y-alkoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(2-metylfenyl)piperazíniumchloridy s pracovným označením **7a–7d**. Chemická štruktúra príslušných bázičiek foriem (**7a2C–7d2C**) a monochloridov (**7a–7d**) bola potvrdená <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS a IR spektrálnou ako aj elementárnou analýzou. Medzi stanovené základné fyzikálno-chemické charakteristiky patrilo určenie teploty topenia, rozpustnosti v spektre rozpúšťadiel, overenie čistoty (adsorpčná chromatografia na tenkej vrstve), určenie povrchovej aktivity (Traubeho stalagmometrická metóda), acidobázičiek charakteristik (hodnoty pK<sub>a</sub> pomocou alkalimetrickej titrácie) a určenie hodnôt log ε s využitím spektrofotometrie v UV/VIS oblasti. Medzi ďalšie experimentálne stanovené parametre patrili lipohydrofilné charakteristiky pomocou chromatografie na tenkej vrstve s obráteným systémom fáz (R<sub>M</sub>), RP-HPLC (log k'), shake flask metódou stanovené hodnoty rozdeľovacích koeficientov P<sub>exp</sub> (resp. log P<sub>exp</sub>) v systéme oktán-1-ol/tlmičivý fosforečnanový roztok.

**Kľúčové slová:** duálne α- a β-blokátory – N-fenylpiperazín – spektrálna charakteristika – acidobázičiek vlastnosti – lipofilita

Čes. slov. Farm., 2011; 60, 137–143

## SUMMARY

### Synthesis and basic physicochemical properties of 1-[3-(Y-alkoxyphenylcarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(2-methylphenyl)piperazinium chlorides

1-[3-(Y-Alkoxyphenylcarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(2-methylphenyl)piperazinium chlorides (labelled as **7a–7d**) were prepared within a complex study of the relationships between the chemical structure, physicochemical properties and biological (antiarrhythmic, antihypertensive) activity of dual acting compounds. Chemical structures of basic forms (labelled as **7a2C–7d2C**) and appropriate monochlorides (labelled as **7a–7d**) were confirmed by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS and IR spectral and elemental analysis. The estimated physicochemical parameters included the melting point data, solubility profile in various media, purity checking (adsorption thin-layer chromatography), surface activity determination (Traube stalagmometric method), acidobasic characteristics (pK<sub>a</sub> value determination by alkalimetric titration) as well as the log ε values estimation by UV/VIS spectrophotometry. Other experimental values under consideration were lipohydrophilic characteristics using reversed-phase thin-layer chromatography (R<sub>M</sub> readouts) RP-HPLC (log k' data) and the log P<sub>exp</sub> estimated in octan-1-ol/phosphate buffer medium.

#### Adresa pre korešpondenciu:

PharmDr. Ivan Malík, PhD.

Katedra farmaceutickej chémie FaF UK

Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika

e-mail: malik@fpharm.uniba.sk

**Key words:** dual acting  $\alpha$ - and  $\beta$ -blockers – *N*-phenylpiperazine – spectral characteristics – acidobasic properties – lipophilicity

Čes. slov. Farm., 2011; 60, 137–143

Má

## Úvod

V terapii hypertenzie sa uplatňujú a kombinujú liečivá s rôznym mechanizmom pôsobenia; redukcia krvného tlaku (KT) určitou kaskádou reakcií však veľmi často spúšťa aktiváciu iných procesov, ktoré sa manifestujú zvýšením hodnoty KT. Používaním vazodilatačne pôsobiacich liečiv sa môže následne objaviť reflexná stimulácia myokardu, ktorá je spojená so zvýšením kardiálneho outputu <sup>1)</sup>. Kombinácia viacerých antihypertenzívne aktívnych substancií však môže priniesť komplikácie, ktoré súvisia s rozdielnym nástupom a trvaním účinku jednotlivých liečiv alebo s ich vzájomnými interakciami. Preto sa v terapii hypertenzie uplatňujú liečivá s duálnym pôsobením, ktorým sa vyznačujú niektoré klasické antagonisty  $\beta$ -adrenergných receptorov arylaminoetanolového alebo aryloxyaminopropanolového typu, ako napríklad labetalol typický antagonistickou aktivitou proti  $\alpha_1$ -ako aj  $\beta_1$  a  $\beta_2$ -adrenoceptorom <sup>2, 3)</sup>, celiprolol, ktorý pôsobí ako selektívny antagonist  $\beta_1$ - a  $\alpha_2$ -adrenoceptorov a vazodilatátor – prostredníctvom aktivácie  $\beta_2$ -adrenoceptorov v hladkej svalovine ako aj uvoľňovania oxidu dusnatého z endotelu a atriálneho natriuretického peptidu <sup>4)</sup>. Karvedilol je neselektívnym  $\beta$ -blokátom s vazodilatačnou aktivitou nastupujúcou po blokáde vaskulárnych  $\alpha_1$ -adrenoceptorov <sup>4-6)</sup>. Výrazné ovplyvnenie  $\alpha$ -adrenoceptorového systému je príznačné aj pre štruktúry s inkorporovaným (substituovaným) fenylpiperazínovým fragmentom. Pre naftopidil je charakteristické vazodilatačné pôsobenie determinované okrem iného aj selektívnou blokádou  $\alpha_1$ -adrenoceptorového podtypu

bez tzv. *first-dose* fenoménu, ktorý je typický napríklad pre prazosín <sup>7)</sup>. Postsynaptickou  $\alpha_1$ -adrenoceptorovou antagonistickou aktivitou sa vyznačuje ďalšie liečivo fenylpiperazínového typu, urapidil, ktorého pôsobením dochádza k poklesu KT znížením periférnej vaskulárnej rezistencie <sup>8, 9)</sup>. Cieľom práce bola príprava, spektrálna charakterizácia a stanovenie základných fyzikálno-chemických parametrov nových originálnych potenciálne antihypertenzívne účinkujúcich zlúčenín, 1-[3-(Y-alkoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(2-metylfenyl)piperazíniumchloridov (Y-alkoxy = 3- alebo 4-metoxi-, resp. etoxyskupina) s pracovným označením **7a–7d**, s potenciálnou multireceptorovou aktivitou.

## POKUSNÁ ČASŤ

### Syntetická a spektrálna časť

Rozpúšťadlá a chemikálie boli dodané od spoločností Sigma-Aldrich Chemie (Mníchov, SRN) a Lach-Ner (Neratovice, ČR) a boli použité bez ďalšej purifikácie.

Zlúčeniny **7a–7d** boli pripravené reakciou príslušného 2,3-epoxypropán-1-ylesteru kyseliny 3- alebo 4-alkoxyfenylkarbámovej (alkoxy = metoxy alebo etoxy; 0,1 mol), príprava a spektrálna charakteristika epoxyzlúčenín (EZ) je detailne uvedená v práci <sup>10)</sup>, a bázekej zložky, 1-(2-metylfenyl)piperazínu (MFP; 0,1 mol). EZ boli rozpustené v minimálnom množstve etanolu,

Tab. 1. Elementárna analýza a hodnoty  $R_f$  z adsorpčnej chromatografie na tenkej vrstve pre látky **7a–7d**

Prac. ozn.	C (%)		H (%)		N (%)		$S_1 (R_f)^*$	$S_2 (R_f)$	$S_3 (R_f)$
	Teoret.	Prakt.	Teoret.	Prakt.	Teoret.	Prakt.			
<b>7a</b>	60,61	60,26	6,94	7,06	9,64	9,39	0,42	0,28	0,35
<b>7b</b>	61,39	61,26	7,17	7,21	9,34	9,36	0,47	0,39	0,39
<b>7c</b>	60,61	60,44	6,94	6,95	9,64	9,53	0,44	0,21	0,36
<b>7d</b>	61,39	61,04	7,17	6,90	9,34	9,35	0,50	0,29	0,37

\*hodnoty  $R_f$  stanovené v sústave  $S_1$  pre bázecké formy **7a2C–7d2C**

Tab. 2. Absorpčné pásy IR spektra ( $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ) finálnych zlúčenín **7a–7d**

Prac. ozn.	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{N}^+-\text{H})$	$\nu(\text{C-H})$	$\delta(\text{N-H})$	$\delta(\text{CH}_2)$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=C})$	$\nu(\text{C-O-C})$ Ar-O-Alk	
<b>7a</b>	3245	2600	2974	1545	1448	1718	1595	1237	1053
<b>7b</b>	3242	2600	2975	1545	1447	1719	1595	1236	1053
<b>7c</b>	3252	2597	2957	1513	1445	1732	1598	1218	1080
<b>7d</b>	3252	2608	2953	1513	1445	1732	1598	1218	1080

Tab. 3. Základná charakteristika 1-[3-(Y-alkoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(2-metylfenyl)piperazíniumchloridov

Pracovné označenie	R	Sumárny Vzorec	$M_r$	Výťažnosť (%)	$t_f$ (°C)
7a	3-OCH <sub>3</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> N <sub>3</sub> Cl	435,95	74	186–189
7b	3-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub> N <sub>3</sub> Cl	449,98	75	172–174
7c	4-OCH <sub>3</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> N <sub>3</sub> Cl	435,95	67	181–184
7d	4-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub> N <sub>3</sub> Cl	449,98	68	189–192

Tab. 4. <sup>1</sup>H-NMR charakteristika pripravených báz 7a2C–7d2C

<sup>1</sup> H-NMR (200 MHz, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) δ (ppm)	
7a2C	2,30 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 2,51 (t, 4H, H-10, H-12); 2,90 (t, 4H, H-11, H-13); 3,81 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ); 4,05 (m, 1H, H-8); 4,31 (d, 2H, <sup>b</sup> J <sub>8,9</sub> = 3,00 Hz, H-9); 4,36 (d, 2H, <sup>b</sup> J <sub>7,8</sub> = 3,00 Hz, H-7); 6,85 (s, 1H, OH) vs 7,30 (s, 1H, OH); 6,87 – 7,10 (m, 8H, ArH); 7,40 (s, 1H, NH, H-6)
7b2C	1,40 (s, 3H, O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 2,30 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 2,52 (t, 4H, H-10, H-12); 2,95 (t, 4H, H-11, H-13); 4,04 (q, 2H, O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 4,14 (m, 1H, H-8); 4,30 (d, 2H, <sup>b</sup> J <sub>8,9</sub> = 2,80 Hz, H-9); 4,36 (d, 2H, <sup>b</sup> J <sub>7,8</sub> = 2,80 Hz, H-7); 6,81 (s, 1H, OH) vs 7,24 (s, 1H, OH); 6,87 – 7,00 (m, 8H, ArH); 7,39 (s, 1H, NH, H-6)
7c2C	2,30 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 2,49 (t, 4H, H-10, H-12); 2,93 (t, 4H, H-11, H-13); 3,79 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ); 4,05 (m, 1H, H-8); 4,30 (d, 2H, <sup>b</sup> J <sub>8,9</sub> = 2,80 Hz, H-9); 4,36 (d, 2H, <sup>b</sup> J <sub>7,8</sub> = 2,80 Hz, H-7); 6,70 (s, 1H, OH) vs 7,10 (s, 1H, OH); 6,72 – 6,84 (m, 8H, ArH); 7,42 (s, 1H, NH, H-6)
7d2C	1,45 (s, 3H, O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 2,30 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 2,85 (t, 4H, H-10, H-12); 3,04 (t, 4H, H-11, H-13); 3,96 (q, 2H, O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 4,09 (m, 1H, H-8); 4,33 (d, 2H, <sup>b</sup> J <sub>8,9</sub> = 2,80 Hz, H-9); 4,39 (d, 2H, <sup>b</sup> J <sub>7,8</sub> = 2,80 Hz, H-7); 6,95–7,15 (m, 8H, ArH); 6,90 (s, 1H, OH) vs 7,15 (s, 1H, OH); 7,45 (s, 1H, NH, H-6)

a potom bolo pridané ekvimolárne množstvo MFP. Reakčná zmes bola zahrievaná pri teplote varu rozpúšťadla pod spätným chladičom na olejovom kúpeli 9 h. Po vychladnutí bol etanol vákuovo oddestilovaný, surový produkt bol po rozpustení v chloroforme pretrepaný s vodou a dôkladne vysušený s bezvodým uhličitanom horečnatým. Po odfiltrovaní uhličitanu a oddestilovaní chloroformu boli vzniknuté bázy s pracovným označením 7a2C–7d2C prečistené kryštalizáciou z propán-2-olu. Totožnosť a čistota pripravených báz bola potvrdená <sup>1</sup>H-NMR a <sup>13</sup>C-NMR spektrometriou ako aj chromatografiou na tenkej vrstve v sústave S<sub>1</sub>; acetón : petroleter (φ = 2 : 3), hodnoty R<sub>f</sub> sú uvedené v tabuľke 1. Finálne látky boli pripravené pridaním nasýteného éterového roztoku chlorovodíka a boli prečistené kryštalizáciou z propán-2-olu.

Totožnosť a čistota konečných zlúčenín 7a–7d bola potvrdená elementárnou analýzou, chromatografiou na tenkej vrstve silikagélu (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt, SRN) v sústavách S<sub>2</sub>; petroleter : dietylamin (φ = 8 : 3) a S<sub>3</sub>; chloroform : cyklohexán : dietylamin (φ = 6 : 3 : 1) ako aj hmotnostnou spektrálnou analýzou a IR spektrami (tab. 2).

Teplota topenia zlúčenín 7a–7d (tab. 3) bola stanovená na prístroji STUART SMP 11 (Lennox Laboratory Suppliers, Dublin, Írsko) po 24-h sušení v exsikatore nad

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> pri tlaku 10 kPa (membránová výveva KNF Laboport N810FT.18) a laboratórnej teplote, jej hodnota nie je korigovaná.

<sup>1</sup>H-NMR spektrá (tab. 4) bázičských foriem 7a2C–7d2C boli zmerané na prístroji FT-NMR spektrometer Varian Gemini 2000 (Varian, Palo Alto, USA) s pracovnou frekvenciou 200 MHz v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylsilán (TMS, δ = 0,0 ppm).

<sup>13</sup>C-NMR spektrá (tab. 5) bázičských foriem 7a2C–7d2C boli merané na rovnakom prístroji ako <sup>1</sup>H-NMR pri pracovnej frekvencii 50 MHz. Vzorky boli merané v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, štandardom bol signál CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (77,0 ppm).

Hmotnostné spektrá (MS) látok 7a–7d boli zmerané na prístroji Agilent 1100 LC/MSD VL Trap (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Ich metanolové roztoky boli aplikované do hmotnostného spektrometra lineárnou mechanickou pumpou (KD Scientific, Holliston, USA) rýchlosťou 200 μl · min<sup>-1</sup>, prietok nebulizačného plynu (N<sub>2</sub>) bol 5 l · min<sup>-1</sup>, tlak 40 psi. Teplota sušiacého plynu v nebulizátore bola 200 °C, napätie na kapiláre malo hodnotu 3,5 kV. Meranie sa vykonalo v pozitívnom móde za ionizácie elektrosprejom (ESI-MS) pri atmosférickom tlaku. Snímané rozpätie hmôt bolo v intervale od 15 – 800 m/z.

Tab. 5.  $^{13}\text{C}$  NMR charakteristika pripravených báz 7a2C–7d2C

$^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz, $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) $\delta$ (ppm)	
<b>7a2C</b>	160,2; 153,4; 151,2; 139,0; 132,7; 131,1; 129,7; 126,6; 123,3; 119,1; 111,0; 110,0; 105,2; 67,3; 65,5; 63,6; 60,1; 53,9; 51,9; 17,6
<b>7b2C</b>	160,1; 153,4; 151,0; 137,0; 132,1; 131,0; 129,6; 126,3; 123,0; 119,3; 111,1; 110,1; 105,2; 67,2; 65,4; 63,6; 60,1; 53,8; 51,7; 17,7; 14,7
<b>7c2C</b>	159,9; 153,2; 151,3; 139,1; 132,6; 131,0; 129,6; 126,6; 123,2; 119,0; 110,9; 110,0; 105,1; 67,3; 65,4; 63,5; 60,0; 53,8; 51,9; 17,6
<b>7d2C</b>	159,9; 153,3; 151,0; 136,9; 132,1; 130,9; 129,4; 126,3; 122,8; 119,3; 110,9; 110,0; 105,1; 67,3; 65,3; 63,5; 60,1; 53,8; 51,8; 17,6; 14,6

Tab. 6. UV spektrá študovaných látok 7a–7d vo vodnom a v metanолоvom prostredí

Prac. ozn.	Dest. voda, $\lambda_x$ (nm), $\epsilon_z$ ( $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ), x, z = 1, 2, 3						Metanol, $\lambda_x$ (nm), $\epsilon_z$ ( $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ), x, z = 1, 2, 3					
	$\lambda_1$	$\log \epsilon_1$	$\lambda_2$	$\log \epsilon_2$	$\lambda_3$	$\log \epsilon_3$	$\lambda_1$	$\log \epsilon_1$	$\lambda_2$	$\log \epsilon_2$	$\lambda_3$	$\log \epsilon_3$
<b>7a</b>	206	4,60	236	4,26	276	3,47	210	4,66	238	4,17	278	3,31
<b>7b</b>	204	4,69	236	4,32	276	3,58	212	4,70	238	4,43	278	3,73
<b>7c</b>	200	4,69	238	4,35	276	3,44	212	4,69	238	4,27	278	3,67
<b>7d</b>	198	4,70	238	4,36	278	3,43	212	4,68	238	4,35	278	3,59

Spektrá v IR oblasti (viz tab. 2) zlúčenín **7a–7d** boli zmerané na prístroji FT-IR spektrofotometer Nicolet Model Impact 410 (Nicolet Instrument, Madison, USA) v tabletách KBr v koncentrácii 2–3 mg látky na 200 mg KBr v strednej oblasti IR spektra v intervale 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ .

Elektrónové absorpčné spektrá (tab. 6) substancií **7a–7d** sa zaznamenali na UV/VIS spektrofotometri (8452 A, Diode Array Spectrophotometer, typ Vectra 286/12, Hewlett Packard, Bratislava – pobočka spoločnosti, SR) vo vodnom ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a v metanолоvom ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) prostredí v oblasti 190 až 350 nm.

#### Analytická časť

Elementárna analýza finálnych látok **7a–7d** (viz tab. 1) bola vykonaná na prístroji Elemental Analyser EA1108 (Carlo Erba Instruments, Wigan, Veľká Británia). Po aplikovaní vzorky nastalo jej spálenie v kolóne pri teplote 1800  $^{\circ}\text{C}$  na katalyzátore  $\text{WO}_3$  za vzniku  $\text{NO}_x$ ,  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , ktoré boli unášané nosným plynom do redukčnej časti kolóny. Plyny boli po redukcii nesené na kolónu, kde sa eluovali v poradí:  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ . Po výstupe z kolóny sa detegovali tepelno-vodivostným detektorom.

Rozpustnosť pripravených zlúčenín **7a–7d** bola hodnotená v destilovanej vode, v metanole *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR), v liehu 96 % (Lachema, Brno, ČR) a v chloroforme *p.a.* (CentralChem, Bratislava, SR) podľa <sup>11)</sup>.

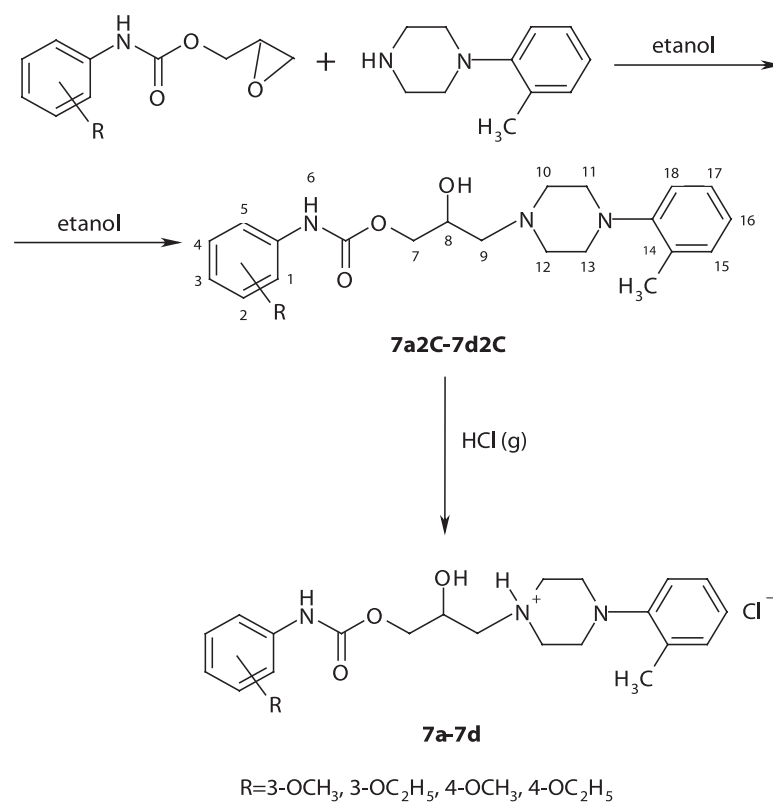
Povrchové napätie pripravených látok **7a–7d** (vodné roztoky s  $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) bolo stanovené podľa práce <sup>12)</sup> nepriamou stalagmometrickou metódou počítania kvapiek formovaných z konštantného objemu roztokov hodnotených látok pri teplote 21  $^{\circ}\text{C}$  (tab. 7). Použitý bol sklenený Traubeho stalagmometer (Kavalier, Sázava, ČR). Ako referenčná kvapalina sa použila destilovaná voda, ktorej povrchové napätie pri teplote  $t = 21 \text{ }^{\circ}\text{C}$  je  $\gamma = 0,07259 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ .

Tab. 7. Základné fyzikálno-chemické parametre študovaných látok 7a–7d

Prac. ozn.	$\gamma$ ( $\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$ )	$\text{p}K_a$	$R_M$	$\log k'$	$\log P_{\text{exp}}$
<b>7a</b>	0,0685	7,20	-0,79	-0,252	3,44
<b>7b</b>	0,0695	7,10	-0,55	-0,244	3,60
<b>7c</b>	0,0686	7,33	-0,90	-0,284	3,47
<b>7d</b>	0,0687	7,37	-0,65	-0,276	3,65

Disociačná konštanta zosyntetizovaných zlúčenín **7a–7d** bola stanovená potenciometricky alkalimetrickou titráciou pomocou automatickej byrety OP 930 spojennej s digitálnym pH-metrom (Hanna Instruments, Kiel, SRN). Konštantný prídavok odmerného roztoku hydroxidov sodného s  $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  predstavoval 0,005 ml. Roztoky hodnotených látok boli pripravené navážením 0,05 g príslušnej substancie a rozpustením v 20,0 ml metanolu a boli doplnené destilovanou vodou na objem 50,0 ml. Titrácia prebiehala pri teplote 21  $^{\circ}\text{C}$ . Zaznamenali sa hodnoty pH titrovaného roztoku, resp. roztokov v závislosti od pridaného množstva hydroxidov sodného. Po ukončení titrácie sa interpolačným stupňom podľa Hahna zistila presná spotreba odmerného roztoku a hodnota pri polovičnej spotrebe <sup>13)</sup>. Z priebehu potenciometrickej titrácie sa podľa vhodnej polynomickej funkcie v programe Statistica 8.0 (Stat Soft, Tulsa, USA) pomocou  $V_{1/2}$  vypočítala disociačná konštanta. Výsledná hodnota  $\text{p}K_a$  zosyntetizovaných substancií po vykonaní korekcie na objem metanolu v titračnom prostredí (-0,14) je prezentovaná ako priemer troch paralelných stanovení (tab. 7).

Pre chromatografickú analýzu pripravených látok **7a–7d** na tenkej vrstve založenej na rozdeľovacom princípe sa použili komerčne vyrábané platne Silica gel 60  $F_{254}$  (Merck, Darmstadt, SRN) s vrstvou silikagélu s rozmermi 200  $\times$  200 mm (nastrihané na vhodné veľké prúžky), ktoré boli vopred impregnované postupne 3%, 5% alebo 7% roztokom silikónového oleja v heptáne



Obr. 1. Schéma prípravy 1-[3-(*Y*-alkoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(2-metylfenyl)piperazíniumchloridov (**7a-7d**); číslovanie skeletu zlúčenín **7a2C-7d2C** z hľadiska <sup>1</sup>H-NMR spektrometrie

(Lachema, Brno, ČR). Po vysušení platní pri laboratórnej teplote počas 20 min prebiehal chromatografický proces v komorách sytených 5 min vyvíjacou sústavou  $S_{4\text{ RP-TLC}}$ : kyselina chlorovodíková s  $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ : aceton ( $\varphi = 4 : 1$ ). Z látok sa pripravili 1% roztoky v metanole, na platne sa nanášali mikrokapilárou (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Švajčiarsko) 2  $\mu\text{l}$  roztoku. Detekcia škvrín na chromatograme bola vykonaná nad parami jódu. Najvhodnejšie hodnoty  $R_F$  resp.  $R_M$  boli získané s použitím 5% silikónového oleja v heptáne (tab. 7).

Hodnota(-y) *retenčného faktora*  $k'$  (v literatúre uvádzaný aj ako kapacitný faktor  $k'$ ) zlúčenín **7a-7d** bola(-li) stanovená(-né) na kvapalinovom chromatografe s vysokotlakovou pumpou Delta Chrom SDS 030 (Watrex, Bratislava, SR) so slučkovým dávkovačom s 20  $\mu\text{l}$  slučkou (Watrex, Bratislava, SR), kolónou s nepolárnou chemicky viazanou fázou Separon SGX C<sub>18</sub> 7  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4 mm (Lachema, Brno, ČR) a prietokovým UV detektorom Delta Chrom UVD 200 (Watrex, Bratislava, SR). Pre pripravené látky boli použité postupne tri rôzne mobilné fázy s rozdielnym percentuálnym zastúpením metanolu – 98 %, 95 %, 90 % (pripraveného z metanolu *p.a.* a destilovanej vody). Ako vhodná sa ukázala mobilná fáza s 95% zastúpením metanolu.

Chromatografické podmienky: mobilná fáza ( $\text{pH} = 6,0$ ) – 95% metanol upravený vodným roztokom natriumacetátu, prietoková rýchlosť – 0,6 ml/min, tlak – 6,4 MPa, vlnová dĺžka – 248 nm, pracovná teplota – 21 až 22 °C.

Mŕtvý čas kolóny ( $t_0$ ) sa stanovil roztokom dusitanu sodného s  $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , ktorý mal v použitom systéme nulovú retenciu. Hodnoty  $\log k'$  (viz tab. 7) boli vypočítané zo vzťahu:  $\log k' = \log [(t_R - t_0)/t_0]$ , kde  $t_0$  je retenčný čas roztoku dusitanu sodného 0,1 mol  $\cdot$  l<sup>-1</sup> a  $t_R$  je retenčný čas roztoku vzorky a sú priemernou hodnotou z troch stanovení<sup>13)</sup>. Roztoky študovaných látok boli pripravené rozpustením 0,0050 g konkrétnej zlúčeniny v metanole a upravené na objem 25,0 ml. Po odvdzdušnení mobilnej fázy bol chromatografický systém premývavý približne 20 min. Prvé dva nástreky bol roztok dusitanu sodného, potom sa aplikovali roztoky hodnotených látok **7a-7d** (20  $\mu\text{l}$ ). Každá vzorka bola aplikovaná dvakrát, pre výpočet sa použila priemerná hodnota  $t_R$ .

*Rozdeľovací koeficient*  $P_{\text{exp}}$  študovaných zlúčenín **7a-7d** bol stanovený experimentálne klasickou *shake flask* metódou ich vytrepávaním medzi dve nemiešateľné fázy (tab. 7). Lipofilnú fázu reprezentoval oktán-1-ol (Merck, Darmstadt, SRN), ako vodná fáza bol použitý tlmivý fosforečnanový roztok (TFR) s  $\text{pH} = 7,2$  pripravený z hydrogenfosforečnanu disodného, *p.a.* (Slavus, Bratislava, SR) s  $c = 0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a z kyseliny citrónovej čistej (Chemapol, Praha, ČR) s  $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Pracovalo sa so základnými roztokmi zlúčenín **7a-7d**, ktoré boli pripravené rozpustením 0,0020 g príslušnej látky v odmernej banke s obsahom 50,0 ml vo TFR. Z 10,0 ml základného roztoku študovaných látok sa do 10-ml odmernej banky odpipetovalo 1,0 ml a doplnilo sa TFR po značku, nakoniec bolo po zmeraní absorbancie  $A_1$  pridané 0,1 ml oktán-1-olu. Po vytrepaní a ustálení fáz sa spektrofotometricky vyhodnotila koncentrácia hodno-

tených substancí vo vodnej vrstve v ultrafialovej oblasti spektra pri vlnovej dĺžke druhého absorpčného maxima (zmeranie absorbcie  $A_2$ ). Experimentálne rozdeľovacie koeficienty študovaných látok  $P_{\text{exp}}$  sa počítali z molaritných koncentračných údajov vodnej vrstvy<sup>13)</sup>.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci štúdia vzťahov medzi chemickou štruktúrou, fyzikálno-chemickými vlastnosťami a biologickou (antiarytmickou, antihypertenzívnou) aktivitou duálne pôsobiacich zlúčenín boli pripravené 1-[3-(Y-alkoxyfenylyl)karbamoyloxy]-2-hydroxypropyl]-4-(2-metylfenyl)piperazíniumchloridy (Y-alkoxy = 3- alebo 4-metoxy-, resp. etoxyskupina) s pracovným označením **7a–7d**. V porovnaní so sériou látok, ktoré boli spektrálne a fyzikálno-chemicky charakterizované v publikáciách<sup>10, 13, 14)</sup>, bol ako bázičný reaktant pri syntéze použitý 1-(2-metylfenyl)piperazín (MFP). Výťažnosť chemických reakcií prípravy finálnych zlúčenín **7a–7d** bola relatívne uspokojivá (67–75 %). Chemická štruktúra ich príslušných bázičných foriem s pracovným označením **7a2C–7d2C** bola potvrdená <sup>1</sup>H-NMR a <sup>13</sup>C-NMR spektrálnou analýzou (pozri schému prípravy), hmotnostné spektrá konečných látok **7a–7d** potvrdili prítomnosť molekuleového iónu príslušného monochloridu a pomocou IR-spektrometrie boli identifikované jednotlivé funkčné skupiny.

Vzhľadom k tomu, že pripravené bázy **7a2C–7d2C** obsahovali dve disubstituované aromatické jadrá, bolo možné pozorovať signály protónov v oblasti 6,72 až 7,15 ppm. Nakoľko je aromatický skelet substituovaný v *meta*-, resp. v *para*-polohe, signály boli štiepené interakciou so susednými protónmi. Signály piperazínu a metylénová skupina na  $C_9$  boli súčasťou širokého multipletu, ktorý bol indikovaný v rozmedzí 2,49–4,33 ppm (viz tab. 4). Vodíku H-8 (pozri schému prípravy) prislúchal pre jednotlivé štruktúry **7a2C–7d2C** posun v oblasti 4,05–4,14 ppm; vodíku hydroxylovej funkčnej skupiny posun v intervale 6,70–7,30 ppm. Metylová skupina viazaná na aromatické jadro v bázičnej časti molekuly mala posun 2,30 ppm. Zároveň boli identifikované aj vodíky metylových a metylénových skupín postranného alkoxylového reťazca (3,79–3,81 ppm, resp. 4,04–4,09 ppm). Predpokladaná štruktúra substancí **7a2C–7d2C** bola potvrdená aj analýzou <sup>13</sup>C-NMR spektier. Uhlíkom aromatických jadier prislúchali signály v rozmedzí 110,0–160,2 ppm. V intervale 51,9–67,3 ppm sa nachádzali signály pre uhlíky piperazínu a 2-hydroxypropán-1,3-diylového spojovacieho reťazca. Uhlíku oxoskupiny karbamátu bol priradený signál s chemickým posunom 153,2–153,4 ppm. Narastaním vzdialenosti uhlíka od kyslíka v alkoxylovom reťazci dochádzalo k znižovaniu hodnôt chemického posunu signálov prislúchajúcich uhlíkov. Metylová skupina v bázičnej časti molekuly mala posun 17,6–17,7 ppm (viz tab. 5).

Analýza hmotnostných spektier pripravených látok **7a–7d** poukázala na existenciu zodpovedajúceho mole-

kulového iónu  $[M + H]^+$  – **7a**:  $m/z = 400,2$ ; **7b**:  $m/z = 414,3$ ; **7c**:  $m/z = 400,2$ ; **7d**:  $m/z = 414,3$ .

Prítomnosť charakteristických funkčných skupín študovaných molekúl **7a–7d** sa prejavila aj v priebehu IR spektier. NH-Skupine,  $\nu(N-H)$ , bol priradený interval 3242–3252  $\text{cm}^{-1}$ , resp. pre  $\delta(N-H)$  to bolo rozpätie 1545–1513  $\text{cm}^{-1}$ . Kľúčové skupiny, resp. fragmenty hodnotených látok, t. j., karbonylová skupina ako aj aromatický skelet, mali interval príslušného typu vibrácií 1730–1718  $\text{cm}^{-1}$ , resp. 1598–1595  $\text{cm}^{-1}$ . Hodnoty vibrácií pre karbonylovú skupinu  $\nu(C=O)$  sa so stúpajúcou  $M_r$  prakticky nemenili (viz tab. 2).

Pripravené finálne látky **7a–7d** vykazovali, ako deriváty benzénu<sup>15)</sup>, vo vodnom aj v metanole prostredí tri absorpčné pásy (viz tab. 6). Druhý lokálne excitačný pás bol pri študovaných zlúčeninách vo vodnom prostredí pozorovaný v časti 198–206 nm ( $\lambda_{1\text{max}}$ ; pri 210 až 212 nm v metanole), *charge-transfer* pás (C-T) v oblasti 236–238 nm ( $\lambda_{2\text{max}}$ ; pri 238 nm v metanole) a prvý lokálne excitačný pás v intervale 276–278 nm ( $\lambda_{3\text{max}}$ ; pri 278 nm v metanole).

Percentuálne zastúpenie uhlíka, vodíka a dusíka sa pri substancích **7a–7d** nelíšilo o viac ako  $\pm 0,4$  % v porovnaní s teoretickými hodnotami (viz tab. 1). Z experimentálne stanovených údajov vyplynulo, že finálne zlúčeniny boli pripravené vo forme monochloridov.

Nekorigované hodnoty teploty topenia (viz tab. 3) látok **7a–7d**, stanovené po 24-h sušení v exsíkátore nad  $P_2O_5$  pri tlaku 10 kPa a laboratórnej teplote, sa pohybovali v relatívne úzkom intervale.

Pri určení rozpustnosti predstavoval, vzhľadom na obmedzené množstvo zlúčenín, návažok študovaných látok 0,10 g pre stanovenie rozpustnosti v destilovanej vode a 0,01 g pre určenie rozpustnosti v liehu 96 % a v chloroforme. Hodnotenú látku **7a–7d** boli v destilovanej vode veľmi ťažko rozpustné. V prostredí liehu 96 % vykazovali miernu rozpustnosť, v chloroforme boli prakticky nerozpustné. Relatívne ťažkú rozpustnosť pripravených solí vo vode je možné vysvetliť prítomnosťou (substituovaného) aromatického jadra v bázičnej časti molekuly.

Na orientačné hodnotenie čistoty konečných substancí **7a–7d** bola použitá adsorpčná chromatografia na tenkej vrstve; z mnohých vyskúšaných dvoj- a trojzložkových vyvíjacích sústav boli optimálne hodnoty  $R_f$  získané v sústave  $S_2$ : petroléter : dietylamin ( $\varphi = 8 : 3$ ), resp.  $S_3$ : chloroform : cyklohexán : dietylamin ( $\varphi = 6 : 3 : 1$ ). V obidvoch vyvíjacích systémoch s nárastom hodnôt  $M_r$  došlo aj k nárastu  $R_f$  (viz tab. 1). Polohová izoméria postranného alkoxyly sa prejavila v sústave  $S_2$  – *meta*-deriváty mali vyššie hodnoty  $R_f$  ako *para*-štruktúry.

Povrchové napätie bolo študované nepriamo Traubeho stalagmometrickou metódou počítania kvapiek. Hodnotenú zlúčeninu **7a–7d** boli mierne povrchovo aktívne (viz tab. 7), pričom neboli pozorované prakticky žiadne rozdiely medzi *meta*- a *para*-substituovanými polohovými izomérmami.

Na štúdium acidobázičných vlastností bola využitá alkalimetrická titrácia pri potenciometrickej indikácii bodu ekvivalencie. Keďže v molekule hodnotených látok

**7a–7d** je substituované aromatické jadro viazané priamo na atóm dusíka piperazín-1,4-diylového skeletu, nastáva konjugácia voľného elektrónového páru atómu dusíka s aromatickým kruhom, čím dochádza k zníženiu zásaditosti. Pri reakcii s nasýteným éterovým roztokom chlorovodíka došlo k protonizácii len jedného atómu dusíka, podobne ako pri látkach študovaných v prácach<sup>13, 14</sup>. Hodnotené zlúčeniny, príslušné monochloridy, mali v podstate neutrálny charakter, hodnota  $pK_a$  sa pohybovala v rámci študovanej série v intervale 7,10–7,37 (viz tab. 7); prejavil sa mierny rozdiel v hodnotách  $pK_a$  *meta*- a *para*-substituovaných polohových izomérov. Látky, v ktorých štruktúre bol substituent 2'-CH<sub>3</sub> v bázičkom fragmente nahradený 2'-F, 4'-F alebo 3'-CF<sub>3</sub> skupinou<sup>10, 13, 14</sup> pri identickej lipofilnej časti molekuly (Y-alkoxyfenylkarbamoyloxylový skelet), mali nižšie hodnoty  $pK_a$ .

Ako experimentálne stanovené parametre lipofility finálnych substancií **7a–7d** boli určené hodnoty  $R_M$  z chromatografie na tenkej vrstve s obráteným systémom fáz, retenčné faktory  $k'$  z RP-HPLC a rozdeľovacie koeficienty  $\log P_{exp}$  stanovené *shake flask* metódou v systéme oktán-1-ol/TFR. So stúpajúcou  $M_r$  došlo k nárastu hodnôt  $R_M$ ,  $\log k'$  ako aj  $\log P_{exp}$  (viz tab. 7). Podľa  $R_M$  a  $\log k'$ -výstupov boli *meta*-deriváty mierne lipofilnejšie ako *para*-substituované zlúčeniny, údaje  $\log P_{exp}$  indikovali približne rovnakú lipofilitu zodpovedajúcich polohových izomérov. Pri porovnaní lipofility látok **7a–7d** so štruktúrami hodnotenými v publikáciách<sup>13, 14</sup> sa ukázalo, že vyššie hodnoty  $R_M$ ,  $\log k'$  a  $\log P_{exp}$  boli podľa očakávania získané, pri rovnakom prístrojovom vybavení a pri rovnakých experimentálnych podmienkach, pre substancie s 2'-F, 4'-F ale najmä s 3'-CF<sub>3</sub> skupinou viazanou na aromatickom jadre v bázičkej časti molekuly.

Prezentované spektrálne a fyzikálno-chemické parametre 1-[3-(Y-alkoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(2-metylfenyl)piperazíniumchloridov (**7a–7d**) rozširujú spektrum poznatkov o zlúčeninách s potenciálnou schopnosťou ovplyvňovať funkcie kardiovaskulárneho systému prostredníctvom (možného) pôsobenia na  $\alpha$ -a súčasne  $\beta$ -adrenergny receptorový systém. Po predpokladanom budúcom farmakologickom hodnotení sú získané údaje využiteľné v rámci komplexných QSAR-analýz.

## LITERATÚRA

- Louis, W. J., McNeil, J. J., Drummer, O. H.: The pharmacology of combined alpha – beta-blockade I. Drugs 1984; 28, 16–34.
- Cope, D. H. P., Crawford, M. C.: Labetalol in controlled hypotension. Administration of labetalol when adequate hypotension is difficult to achieve. Br. J. Anaesth. 1979; 51, 359–365.
- Mehvar, R., Brocks, D. R.: Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 2001; 4, 185–200.
- Toda, N.: Vasodilating  $\beta$ -adrenoceptor blockers as cardiovascular therapeutics. Pharmacology & Therapeutics 2003; 100, 215–234.
- Ruffolo, R. R., Gellai, M., Hieble, J. P., Willette, R. N., Nichols, A. J.: The pharmacology of carvedilol. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1990; 38, 82–88.
- Nichols, A. J., Gellai, M., Ruffolo, R. R.: Studies on the mechanism of arterial vasodilatation produced by the novel antihypertensive agent, carvedilol. Fund. Clin. Pharmacol. 1991; 5, 25–38.
- 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 anti-hypertensive drug, in patients with hepatic dysfunction. Postgrad. Med. J. 1994; 70, 363–366.
- Kirsten, R., Nelson, K., Molz, K.-H., Haerlin, R., Steinijans, V.W.: Pharmacodynamics and pharmacokinetics of urapidil in hypertensive patients: a crossover study comparing infusion with an infusion-capsule combination. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1987; 32, 61–65.
- Wacker, J. R., Wagner, B. K., Briese, V., Schauf, B., Heilmann, L., Bartz, C., Hopp, H.: Antihypertensive therapy in patients with pre-eclampsia: A prospective randomised multicentre study comparing dihydralazine with urapidil. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2006; 127, 160–165.
- Malík, I., Sedlárová, E., Račanská, E., Čižmárik, J., Kurfürst, P.: Synthesis, physico-chemical properties and biological activity of 1-(4-fluorophenyl)-4-[3-(2-,3- and 4-alkoxyphenylcarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]piperazinium chlorides. Sci. Pharm. 2004; 72, 283–291.
- Slovenský liekopis, zväzok 1. 1. vyd. Bratislava: Herba 1997; s. 22.
- Malík, I., Sedlárová, E., Csöllei, J.: Analytické hodnotenie 1-(dipropylamino-3-piperidino-propán-1-yl)-3-pentyloxyfenylkarbamátu (CK-3635). Čes. a Slov. Farm. 2004; 53, 256–260.
- Malík, I., Sedlárová, E., Čižmárik, J., Andriamainty, F., Csöllei, J.: Štúdium fyzikálno-chemických vlastností derivátov kyseliny 4-alkoxyfenylkarbámovej s bázičkou časťou tvorenou substituovaným N-fenylpiperazínom. Farm. Obzor 2005; 74, 211–215.
- Malík, I., Sedlárová, E., Čižmárik, J., Andriamainty, F., Csöllei, J.: Štúdium fyzikálno-chemických vlastností derivátov kyseliny 2-, 3-, 4-alkoxyfenylkarbámovej s bázičkou časťou tvorenou substituovaným N-fenylpiperazínom. Čes. slov. Farm. 2005; 54, 235–239.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J.: Spectrometric identification of organic compounds. 7. vyd. Hoboken: John Wiley and Sons 2005; 502 s.