

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra anorganické a organické chemie

Diplomová práce

**PŘÍPRAVA A HODNOCENÍ AKCELERANTŮ TRANSDERMÁLNÍ
PERMEACE ODVOZENÝCH OD TERPENŮ**

Monika Kopečná

Školitel: Doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Hradec Králové 2012

Tímto velmi děkuji své školitelce Doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D za vedení, pomoc a cenné rady při vypracování této diplomové práce. Děkuji také všem, kteří mi jakkoliv umožnili tuto práci uskutečnit a pracovníkům katedry za vstřícný přístup a ochotu.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracovávání čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Monika Kopečná

V Hradci Králové 2012

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
1 Úvod a cíl práce	7
2 Teoretická část	8
2.1 Transdermální podání léčiv	8
2.2 Kožní bariéra	9
2.3 Akceleranty transdermální permeace	11
2.4 Terpeny jako akceleranty transdermální permeace	12
3 Experimentální část	20
3.1 Syntéza	20
3.2 Permeační pokusy	32
3.3 HPLC stanovení vzorků	35
3.4 Analýza dat	36
4 Výsledky a diskuze	37
5 Závěr	47
6 Použité zkratky	48
7 Literatura	49

Abstrakt

Monika Kopečná

Příprava a hodnocení akceleraantů transdermální permeace odvozených od terpenů

Transdermální podání léčiv má ve srovnání s klasickými cestami řadu výhod. Díky němu se pro pacienty stává léčba řady nemocí snesitelnější a jednodušší. Další výhodou tohoto podání je možnost snadného přerušování léčby v případě výskytu jakýchkoliv problémů. Přínos plyne také ze skutečnosti, že léčivo podané transdermálně se vyhne gastro-intestinálnímu traktu, tudíž odpadá first-pass efekt a navíc i řada nežádoucích účinků plynoucích z podráždění tohoto traktu.

Problémem je, že většina léčiv není v dostatečném množství schopná projít kůží. Pro umožnění vyššího prostupu léčiv skrz kůži jsou používány látky zvané akceleranty transdermální permeace. Mezi látky se schopností zvyšovat propustnost kůže patří také některé přírodní terpeny, nebo synteticky připravené deriváty aminokyselin, například dodecylester 6-(dimethylamino)hexanové kyseliny (DDAK) (1) (2).

Cílem mé práce bylo zkombinovat tyto dva typy účinných akceleraantů, což znamenalo připravit estery 6-(dimethylamino)hexanové kyseliny s pěti vybranými terpeny (citronelol, menthol, borneol, farnesol a linalol) a poté zkoumat jejich permeační aktivitu *in vitro* za použití dvou modelových léčiv (theofylin a hydrokortison), lidské kůže a Franzových difúzních cel.

DDAK zvyšoval flux theofylinu přes kůži 23krát, u hydrokortisonu 37krát, koncentrace léčiv v kůži byla při použití DDAK oproti kontrole 5krát vyšší. U modelového léčiva theofylinu vykazoval určitou aktivitu ester citronelolu a také terpen farnesol, ale žádná z připravených látek nevykazovala lepší účinek než DDAK. Ovšem při použití lipofilnějšího hydrokortisonu jako modelového léčiva zvýšily ester citronelolu a borneolu prostup léčiva více než DDAK, a to 66krát (citronelylester) a 70krát (bornylester).

Spojením derivátu aminokyseliny a terpenických alkoholů se nám tedy pravděpodobně podařilo najít nové účinné akceleranty transdermální permeace. Slibnou látkou zasluhující si další zkoumání je především citronelyl-6-(dimethylamino)hexanoát.

Abstract

Monika Kopečná

Synthesis and evaluation of transdermal permeation enhancers based on terpenes

Transdermal drug delivery has many advantages over the conventional routes of administration. It could make a treatment of some diseases more acceptable for patients. Other advantage is a possibility of easy interruption of treatment in case of problems. And profit comes also from the fact that the drug doesn't pass through the gastro-intestinal tract, so it avoids the first-pass effect and doesn't irritate this tract, too.

But majority of drugs cannot cross the skin in sufficient amounts. To enable permeation of more drugs through the human skin, substances called transdermal permeation enhancers are used among others, some natural terpenes and amino acid derivatives such as dodecylester of 6-(dimethylamino)hexanoic acid (DDAK) are potent permeation enhancers (1) (2).

The purpose of my work was to combine these potent enhancers and prepare esters of 6-(dimethylamino)hexanoic acid with selected terpenes (menthol, citronellol, linalool, farnesol and borneol) and determine their permeation-enhancing activity *in vitro* using two model drugs (theophylline and hydrocortisone), human skin and Franz diffusion cell.

DDAK was able to increase skin flux of theophylline and hydrocortisone 23 and 37 times, respectively; their concentration in the skin was up to 5 times higher. In case of theophylline, citronellyl ester and farnesol reached similar activities but none of the newly prepared enhancers was better than DDAK. On the other hand, when using more lipophilic hydrocortisone as a model drug, bornyl and citronellyl esters were better enhancers than DDAK, reaching enhancement ratio values of 70 and 66, respectively.

In conclusion, we identified new highly potent permeation enhancers using a combination of amino acid derivatives and terpenic alcohols. In particular, citronellyl 6-(dimethylamino)hexanoate is a promising enhancer that warrants further study.

1 Úvod a cíl práce

Akceleranty transdermální permeace jsou bezesporu důležitým prvkem umožňujícím podání léčiv přes kůži, které má mnoho výhod oproti cestám klasickým. Přestože je v oblasti hledání nových látek urychlujících prostup látek přes kůži vyvíjeno značné úsilí, ideální látka zatím nebyla nalezena.

Mezi látky s prokázanou akcelerační aktivitou patří mimo jiné některé terpeny a dodecylester 6-(dimethylamino)hexanové kyseliny (DDAK) (3) (2). Cílem mé práce bylo spojit strukturní prvky těchto dvou skupin akceleračních – tedy připravit estery terpenů (citronelol, menthol, borneol, farnesol a linalol) s 6-(dimethylamino)hexanovou kyselinou a poté stanovit jejich vliv na permeaci dvou modelových léčiv (theofylinu a hydrokortisonu) přes lidskou kůži *in vitro*.

2 Teoretická část

2.1 Transdermální podání léčiv

Podání léčiv přes kůži je v současnosti středem velkého zájmu. A to jak pro využití v léčbě lokální, tak i systémové (4).

Důvodem tohoto zájmu je bezesporu řada výhod zmíněného způsobu podání léčiv, ve srovnání s klasickými cestami (perorální nebo injekční).

Transdermální podání léčiv:

- je moderní a spolehlivá cesta podání léčiv vhodná zejména pro látky, u nichž při perorálním podání hrozí snížená biodostupnost nebo vznik nežádoucích účinků vlivem kolísání plazmatických hladin
- zajišťuje stabilní hladiny koncentrace léčiva v plazmě, navíc se touto cestou léčivo vyhne trávicímu traktu, čímž odpadá řada nežádoucích účinků
- umožňuje rychlé přerušování příjmu léčiva do organismu v případě výskytu jakýchkoliv komplikací souvisejících s léčbou
- umožňuje méně časté podávání léčiv ve srovnání s perorálním podáním (5) (6).
- umožňuje podání léčiva i v případě, že pacient zvrací nebo je v bezvědomí
- je neinvazivní alternativou podání injekčního (7)

Ve výsledku vedou tyto faktory ke zvýšení compliance pacientů.

V současnosti existuje ve formě přípravků k transdermálnímu podání například skopolamin (proti nevolnosti v dopravních prostředcích), nikotin (při odvykání kouření), fentanyl (proti silným bolestem) a řada dalších látek (4).

Nicméně i transdermální podání léčiv má své nevýhody:

- riziko podráždění pokožky a vzniku alergické reakce v místě aplikace náplasti
- pro pacienty může být problémem vzhled náplasti a nošení náplasti jim může být nepříjemné
- nutné zmínit také poměrně vysoké náklady na výrobu náplastí (5)

Hlavní překážkou pro transdermální podání léčiv je kůže. Úkolem této přirozené bariéry je bránit vnitřní prostředí našeho organismu před okolním prostředím. Základní vlastností

kožní bariery je tedy neprostupnost pro většinu látek, není tudíž propustná ani pro většinu léčiv. Tento fakt vedl k hledání látek, které prostup léčiv kůži umožní-akcelerantů transdermální permeace (1).

2.2 Kožní bariéra

Kůži tvoří dvě vrstvy. Svrchnější vrstva se nazývá epidermis, hlubší pak dermis (8).

Dermis je složena z fibroblastů uložených v extracelulární matrix. Tuto vrstvu bohatě zásobuje kapilární síť a nachází se v ní četná nervová zakončení. Jsou zde uloženy také potní a mazové žlázy a vlasové folikuly.

Svrchnější epidermis není cévně zásobená. Sestává ze čtyř vrstev, z nichž každá reprezentuje odlišné stadium diferenciacce kožních buněk, které vznikají na bazální membráně a během svého vývoje migrují směrem k povrchu kůže. Nejhlubší vrstvou je stratum basale, následuje stratum spinosum, granulosum a nejsvrchnější stratum corneum, které má rozhodující vliv na propustnost kůže.

Stratum corneum je tvořeno odumřelými buňkami ve finálním stadiu diferenciacce, zvanými korneocyty, uloženými v lipidové matrix. Chemicky se stratum corneum skládá převážně z proteinů (75-80 %), dále z lipidů (5-15 %), zbytek tvoří další organické sloučeniny a voda, potřebné pro udržení hydratace kůže, její poddajnosti a vláčnosti (8) (9).

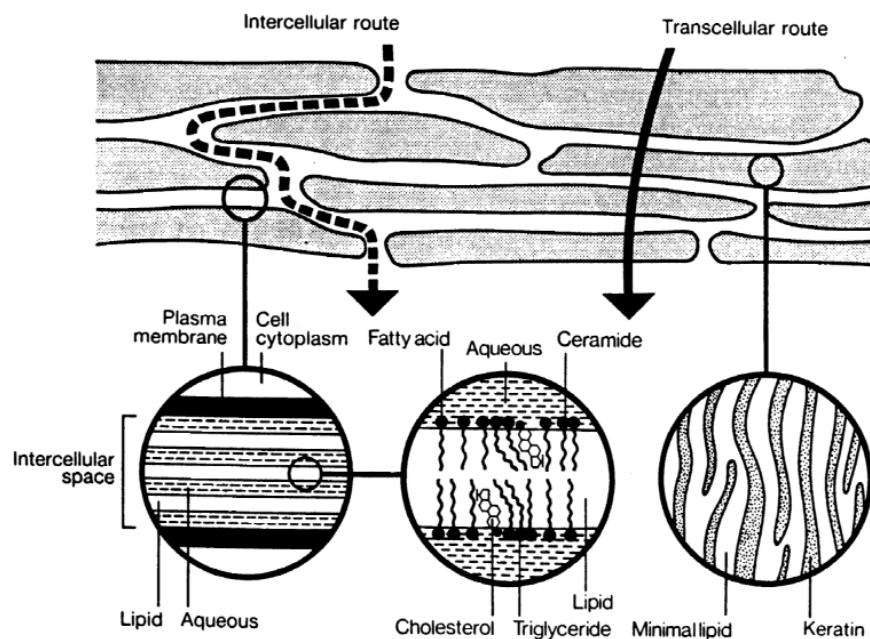
Korneocyty jsou proteinovou součástí stratum corneum. Jsou velmi odolné vůči chemikáliím a vysoce nerozpustné. Prostor mezi nimi těsně vyplňuje směs specifických lipidů s malým množstvím vody (lipidová matrix). Lipidy jsou tvořeny ceramidy (50%), cholesterolem (25%) a volnými mastnými kyselinami (10%). Zbytek tvoří estery cholesterolu a cholesterol sulfát. Lipidy se seskupují v dvouvrstevné lamely, ve kterých hydrofobní část molekuly směřuje dovnitř dvouvrstvy a hydrofilní část je orientována vně, do vodného prostředí. Tyto lamely se pak dále organizují do vrstev (9).

Stratum corneum tvoří rozhodující překážku pro prostup látek do lidského organismu. Pokud je tato rohová vrstva kůže odstraněna, je prostup malých hydrofilních nenabitých molekul zvýšen až tisíckrát (10).

I přes dokonalé uspořádání stratum corneum existují cesty, kterými lze kožní bariéru překonat. První možností je využití prostupu skrz folikuly nebo potní a mazové žlázy. Vzhledem k malé ploše těchto útvarů ale není podání touto cestou příliš efektivní. Lepší možností je proto přestup přímo přes stratum corneum. Urychlení prostupu látek skrz stratum corneum pomocí akceleratorů je teoreticky možné dvěma cestami: (obr. 1)

- intercelulární cesta spočívá v průniku mezi korneocyty-tudíž lipidovou složkou stratum corneum
- transcelulární cesta předpokládá průnik skrz korneocyty

Ve výsledku je i u transcelulární cesty nutné překonat vrstvy lipidů mezi jednotlivými korneocyty. Proto je obecně uznáváno, že rozhodujícím faktorem pro vstup látek je jejich schopnost projít lipidovou cestou (8).



Obr. 1. Struktura stratum corneum a předpokládané možnosti prostupu látek (11).

2.3 Akceleranty transdermální permeace

Akceleranty transdermální permeace jsou látky usnadňující prostup léčiv skrz kůži do systémového oběhu. V průběhu hledání vhodných substancí bylo nalezeno značné množství přírodních i syntetických látek s akceleračními schopnostmi (6) (3).

Akcelerant by měl ideálně mít tyto vlastnosti:

- rychlý, předvídatelný a opakovatelný efekt na permeaci
- nedráždivé, netoxické a nealergizující chování
- jednosměrný účinek, aby nedocházelo k nežádoucímu odvodu látek z těla
- neměl by mít vlastní farmakologickou aktivitu
- po odstranění akcelerantu by se měly bariérové vlastnosti kůže rychle a plně navrátit do původního stavu
- kompatibilita jak s vehikulem, tak s podávaným léčivem (1)

Obecně se aktivita dosud zkoumaných akcelerantů jeví dosti specificky ve vztahu ke konkrétnímu léčivu. V nejlepších případech je možno jeden akcelerant použít pro skupinu látek s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (např. podobná molekulová hmotnost a rozpustnost). Účinnost akcelerantů na permeaci je pro zvířecí kůži značně vyšší, než pro kůži lidskou. To platí hlavně pro kůži hlodavců. Pro efektivitu akcelerantu je důležitá jeho koncentrace, někdy účinkuje terpen nezředený, jindy se aktivita objeví až u určitého zředění (1).

Za akceleranty transdermální permeace jsou považovány především látky, které interagují se stratum corneum (9).

Mechanismus účinku akcelerantů na stratum corneum je pravděpodobně komplexní a spočívá v jednom nebo v kombinaci následujících efektů:

- rozrušení organizované struktury lipidů, méně rigidní struktura je propustnější
- ovlivnění desmozomů, které zajišťují soudržnost korneocytů
- interakce s intracelulárními proteiny korneocytů, nabobtnalými buňkami látky procházejí snáze
- optimalizace rozdělovacího koeficientu léčiva mezi léčivým přípravkem a kožními membránami (1) (6)

Prostup lipidovými dvojvrstvami ve stratum corneum usnadňují látky interagující s polární nebo hydrofobní částí molekul lipidů. Interakci s polární částí se vykazuje například ethanol nebo voda, s hydrofobní částí interagují molekuly obsahující dlouhé uhlovodíkové řetězce (8).

Optimální strukturu akcelerantu lze definovat jen těžko. Obecně by akcelerant měl mít strukturní a fyzikálně-chemické znaky podobné ceramidům (vlastním složkám stratum corneum). Nezbytná je pravděpodobně přítomnost polárních a současně i lipofilních fragmentů v molekule. Hydrofobní fragment by měl ideálně obsahovat nasycený a nevětvený uhlíkatý řetězec obsahující okolo 12 atomů uhlíku. Rozvětvením tohoto řetězce aktivita akcelerantu klesá (9).

2.4 Terpeny jako akceleranty transdermální permeace

Terpeny jsou látky rostlinného původu obsažené v silicích. Jejich struktura může být acyklická nebo cyklická, ve své molekule mohou obsahovat kyslík (alkoholy, ketony, aldehydy, étery, oxidy), ale mohou to být i látky bezkyslíkaté. Terpeny lze pokládat za polymery isoprenu – isoprenoidy (12). Jejich syntéza vychází z aktivované kyseliny octové (acetyl-CoA), která je biosyntetickou cestou přes kyselinu mevalonovou přeměňována na aktivní isopren (isopentenylidifosfát=IPP), základní stavební jednotku všech isoprenoidů, tedy i terpenů. IPP isomerizuje na dimethylallylpyrofosfát, spolu pak kondenzují a tvoří geranylidifosfát – základ monoterpenů. Přikondenzováním další molekuly IPP ke geranylidifosfátu pak vzniká farnesyldifosfát, základ pro seskviterpeny. Podle počtu isoprenových jednotek jsou tedy rozlišovány:

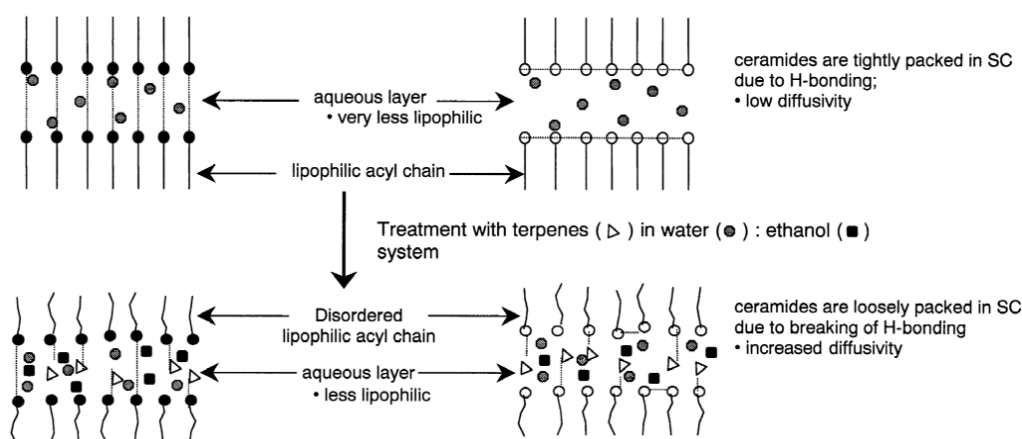
- hemiterpeny (1 isoprenová jednotka)
- monoterpeny (2 jednotky)
- seskviterpeny (3 jednotky)
- diterpeny (4 jednotky)
- triterpeny (6 jednotek)
- tetraterpeny (8 jednotek) (13)

Terpeny jsou látky odpradávná používané k léčebným účelům. V současnosti navíc nachází uplatnění i jako akceleranty transdermální permeace. Vůči pokožce jsou to látky

bezpečné, nedráždivé a netoxické. Jako skupina patří mezi jedny z neúčinnějších akcelerantů použitelných pro širokou škálu léčiv lipofilních i hydrofilních (3).

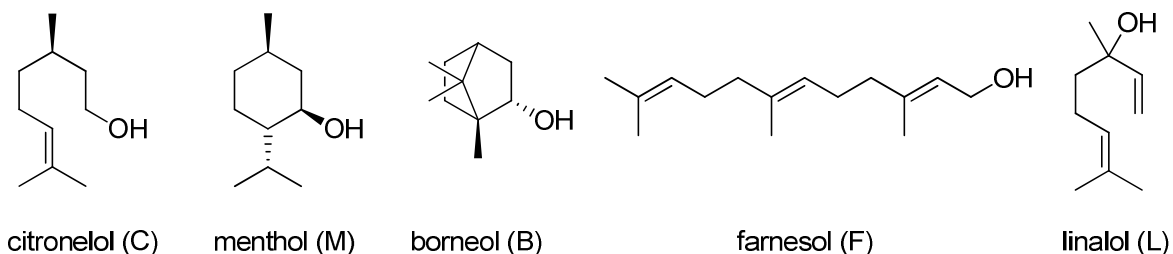
Obecně lze říci, že terpeny obsahující nepolární chemická uskupení usnadňují permeaci lipofilních léčiv, naopak terpeny s polárními skupinami (např. menthol) jsou účinné pro hydrofilní molekuly (1). Mechanismus účinku terpenů je pravděpodobně nejednotný (14). Jednotlivé terpeny různými způsoby narušují pravidelné uspořádání lipidových dvouvrstev stratum corneum. Tím je zvýšena fluidita těchto dvouvrstev a tedy i prostupnost kůže. Co se týče průniku do stratum corneum, terpeny nepronikají jen do lipidové matrix, ale částečně se hromadí i v proteinové složce stratum corneum - korneocytech (15). Přestože terpeny do korneocytů pronikají, jejich mechanismus účinku (vzhledem k poměrně vysoké lipofilitě molekuly) pravděpodobně nespočívá v interakci s proteiny korneocytů, ale jen v působení na lipidovou matrix (16).

Terpenické alkoholy interagují s polárními hlavami ceramidů stratum corneum. Amidové skupiny polárních hlav ceramidů jsou mezi sebou propojeny vodíkovými můstky, čímž je vytvořena organizovaná stabilní struktura lipidových dvouvrstev. Díky tomu, že kyslík alkoholické skupiny terpenů má vyšší elektronegativitu než amidový dusík ceramidů dochází k přeskupení vodíkových můstků, které se pak tvoří nejen mezi ceramidy, ale i mezi ceramidy a terpeny. Tím se naruší pravidelná struktura lipidových dvouvrstev (obr. 2). Narušení pravidelné struktury vede k vyšší fluiditě lipidové matrix a tedy i ke zvýšení propustnosti stratum corneum. Takto byl vysvětlen například akcelerační účinek terpenických alkoholů pro hydrofilní léčiva (17).



Obr. 2. Interakce terpenických alkoholů s ceramidy stratum corneum (17).

V mojí práci bylo použito pět terpenických alkoholů: citronelol, menthol, borneol, farnesol a linalol (obr. 3).



Obr. 3. Struktura použitých terpenů

Citronelol a farnesol jsou alifatické terpeny obsahující primární alkoholickou skupinu. Borneol a menthol jsou nasycené cyklické terpeny, jejich alkoholická skupina je sekundární. Linalol je opět lineární terpen, jeho alkoholická skupina je terciární.

Níže je v tabulkách 1-5 shrnuto, pro jaká léčiva byla zkoumána akcelerační aktivita jednotlivých terpenů. AP značí akcelerační poměr, tedy kolikrát terpen urychloval přístup léčiva oproti kontrole.

2.4.1 Citronelol

Citronelol je primární alifatický monoterpenický alkohol. Vyskytuje se například v okvětních lístcích růží např. *Rosa galica*, čel. *Rosaceae* a to buď jako volný alkohol nebo ve formě glykosidů (18). Další rostlinou obsahující ve své silici citronelol je *Cymbopogon winterianus*, čeledi *Poaceae* známá jako „citronela“. Silice této rostliny je používána pro své zklidňující a anxiolytické účinky (19).

Léčivo	Kůže	Pokus	Výsledky (AP)	Odkaz
Ondansetron- hydrochlorid	prasečí	28h	menthol (34) citronelol (31)	(20)

Tab. 1. Citronelol jako akcelerační poměr, AP značí akcelerační poměr.

2.4.2 Menthol

Menthol je monocyklický sekundární monoterpenický alkohol, řadí se k nejvíce prozkoumaným terpenům. Nejčastěji je získáván z rostlin rodu *Mentha*, čeledi *Lamiaceae*. Díky své příjemné chuti a vůni nachází široké uplatnění v potravinářství a kosmetice, jeho chladivý a lokálně anestetický účinek je pak využíván u kožních přípravků. V současnosti je menthol využíván i pro schopnost urychlovat přestup látek přes kožní bariéru (21) (22).

Léčivo	Kůže	Pokus	Výsledky (AP)	Odkaz
Anopyrin	prasečí	30h	menthol (11), 3-menthoxypropan-1,2-diol (3,5)	(23)
Azidothymidin	myši	24h	menthol (34), linalol (25)	(24)
Diklofenak	potkaní	8h	geraniol (19), nerolidol (14), menthol (11), thymol (4,7), limonen (3,5)	(25)
Ibuprofen	lidská	12h	cineol (4,1), <i>l,d</i> -menthol (2,9), <i>l</i> -menthol (2,7), thymol (2,1)	(26)
Imipramin-hydrochlorid	potkaní	24h	menthol (17), cineol (14), terpineol (12), menthon (9,8), karvon (6,3), pulegon (5,0)	(17)
Indometacin	prasečí	24h	menthol (11), 3-menthoxypropan-1,2-diol (2,7)	(23)
Ketoprofen	potkaní	24h	menthol 10% (61), azon (30), cinnamylalkohol (2,1)	(27)
Ondansetron-hydrochlorid	potkaní	24h	hledání optimální koncentrace mentholu	(28)
Ondansetron-hydrochlorid	prasečí	24h	menthol (34), citronelol (31)	(20)
Propranolol-hydrochlorid	myši	12h	1% terpen: menthol (904), linalol (178) 5% terpen: linalol (1141), menthol (904) 10% terpen: linalol (1267), menthol (852)	(29)
Tamoxifen	prasečí	10h	karvon (244), cineol (51), thymol (17), menthol (4,0)	(30)
Tiaprofenová kyselina	potkaní	24h	limonen (3,4), menthol (2,9), nerolidol (2,8)	(31)
Valsartan	potkaní	24h	menthol (5,9), linalol (5,4)	(32)
	lidská	24h	linalol (1,7), menthol (1,6)	
Zidovudin	potkaní	24h	cineol (60), menthol (53), pulegon (50), terpineol (48), menthon (44), karvon (34)	(16)

Tab. 2. Menthol jako akcelerační poměr, AP značí akcelerační poměr.

U ibuprofenu byly zkoušeny směsi akceleračního s léčivem v různých poměrech. Výsledek uvedený v tabulce je pro směs obsahující koncentraci ibuprofen:terpen (w/w) 50:50. Při koncentraci ibuprofen:terpen (w/w) 40:60 se pořadí účinnosti změnilo: thymol (13), cineol (2,6), *l*-menthol (2,55), *l,d*-menthol (1,3). Což jen potvrzuje výše uvedený fakt, že účinnost terpenů jako akceleračních je velmi závislá na jejich koncentraci (26).

U hydrochloridu ondansetronu bylo hledáno optimální složení gelu pro transdermální podání. Nejvýhodnější se ukázalo použití gelu připraveného s roztokem ethanol:voda (v/v) 60:40 a s přísadkou 8% (w/w) mentholu. Akcelerační poměr u gelu v tomto složení činil 13 (28).

2.4.3 Borneol

Borneol je bicyklický terpenický sekundární alkohol, vyskytuje se například v silici rostliny *Rosmarinus officinalis*, *Lamiaceae* (33). Další známou rostlinou obsahující silici s borneolem je *Valeriana officinalis*, *Valerianaceae*, jehož kořen je používán pro své sedativní účinky (34). V Japonsku je tradičně užíván při léčbě dráždivých kožních onemocnění pro svůj analgetický a lokálně anestetický účinek (35).

Léčivo	Kůže	Pokus	Výsledky (AP)	Odkaz
Propranolol-hydrochlorid	potkaní epidermis	24h	bisabolol (6,3), borneol (5,0), kafr (3,7)	(35)

Tab. 3. Borneol jako akcelerační poměr, AP značí akcelerační poměr.

2.4.4 Farnesol

Farnesol je seskviterpenický alifatický primární alkohol. Vyskytuje se například v již zmíněné citronele (*Cymbopogon winterianus*, *Poaceae*) (3). Zajímavá je jeho schopnost snižovat glykemii a lipidemii, která je teprve blíže zkoumána (36).

Léčivo	Kůže	Pokus	Výsledky (AP)	Odkaz
Diklofenak sodný	potkaní	24h	farnesol (6,6), karvon (4,4), nerolidol (2,6), menthon (1,0), limonenoxid (0,6)	(37)
Haloperidol	lidská epidermis	48h	farnesol (12)	(38)
Katechin	potkaní	24h	linalol (280), farnesol (141)	(39)

Tab. 4. Farnesol jako akcelerační poměr, AP značí akcelerační poměr.

U diklofenaku sodného byl opět potvrzen značný vliv koncentrace terpenů na míru akceleračního účinku. Údaje uvedené v tabulce platí pro koncentraci terpenů 0,25% (v/v). Pro 2,5% koncentraci se pořadí účinnosti změnilo: nerolidol (198), farnesol (78), karvon (14), methon (2,8), limonenoxid (1,8) (37).

2.4.5 Linalol

Linalol je alifatický terciární monoterpenický alkohol. Vyskytuje se například v silici rostliny *Coriandrum sativum*, *Apiaceae*, která je zkoumána pro své anxiolytické a sedativní účinky (3) (40). Je také součástí bergamotového oleje, což je silice získaná lisováním čerstvého oplodí rostliny *Citrus aurantii*, *Rutaceae*. Tato silice je pro svou vůni často využívána v kosmetice (34).

Léčivo	Kůže	Pokus	Výsledky (AP)	Odkaz
Azidothymidin	myší	24h	menthol (34), linalol (25)	(24)
Haloperidol	lidská epidermis	48h	karvakrol (12), terpineol (8,9), linalol (6,3)	(41)
Katechin	potkaní	24h	linalol (280), farnesol (141)	(39)
Propranolol-hydrochlorid	myší	12h	1% terpen: menthol (904), linalol (178) 5% terpen: linalol (1141), menthol (904) 10% terpen: linalol (1267), menthol (852)	(29)
Theofylin	potkaní	24h	linalol (22), terpineol (21), cineol (19), nerolidol (16)	(39)
Valsartan	potkaní	24h	menthol (5,9), linalol (5,4)	(32)
	lidská	24h	linalol (1,7), menthol (1,6)	

Tab. 5. Linalol jako akcelerant, AP značí akcelerační poměr.

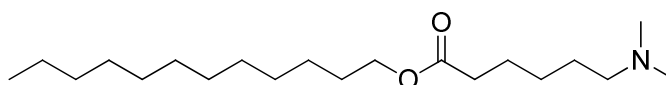
Přestože linalol vykazoval u haloperidolu signifikantní akcelerační účinek (akcelerační poměr 6,3), nebylo dosaženo prostupu léčiva v množství potřebném pro terapii. Nicméně terapeutických hladin bylo dosaženo při použití karvakrolu (akcelerační poměr 12) (41).

2.4.6 Dodecylester kyseliny 6-(dimethylamino)hexanové (DDAK)

Dalším akcelerantem týkajícím se mé práce je dodecylester kyseliny 6-(dimethylamino)hexanové (DDAK), obr. 4. DDAK vznikl spojením prvků dvou známých akcelerantů. Prvním prvkem je ionizovatelná polární dimethylaminová hlava - jako u 2-(dimethylamino)esteru kyseliny propanové (DDAIP), druhým z prvků pak pětiuhlíkatý spojovací řetězec mezi atomem dusíku a esterovým karbonylem – stejně jako u Transkarbamu 12 (42). DDAK má řadu výhodných vlastností:

- je to látka využitelná pro široké spektrum léčiv
- jeho toxicita je zanedbatelná
- účinek DDAK na kůži je reverzibilní (2)

Aktivita DDAK byla potvrzena pro adefovir (zvyšuje permeaci adefoviru i jeho kumulaci v kůži (43), dále pro theofylin a hydrokortison (2).



Obr. 4. Struktura DDAK

3 Experimentální část

3.1 Syntéza

Syntéza každé z pěti cílových látek sestávala vždy ze dvou kroků (Schéma 1). Oba kroky probíhaly za bezvodých podmínek v atmosféře dusíku. Průběh reakcí byl monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC).

V prvním kroku byly připraveny estery 6-bromhexanové kyseliny s konkrétními terpeny třemi odlišnými metodami.

U metody A reagoval terpen s chloridem 6-bromhexanové kyseliny v prostředí bezvodého chloroformu za vzniku produktu BC.

Metoda B se od metody A lišila přidavkem *N,N*-diisopropyl-*N*-ethylaminu (DIPEA) do reakční směsi (produkty BM, BB, BF).

U metody C byla acylace provedena reakcí terpenu s kyselinou 6-bromhexanovou v prostředí bezvodého chloroformu a za přidavku *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidu (WSC) a 4-dimethylaminopyridinu (DMAP). Touto metodou byl získán produkt BL.

Struktura všech produktů prvního kroku byla ověřena NMR spektry a získané látky byly poté použity do další reakce (druhý krok).

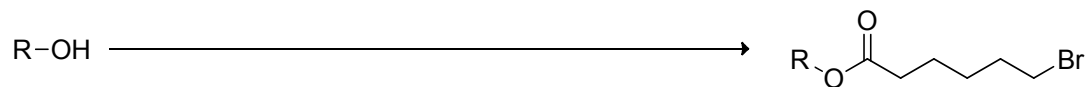
Druhý krok spočíval v substituci bromu v kyselinové části esterů získaných v prvním kroku dimethylamino skupinou, tato výměna probíhala pro všechny látky jednotným postupem. Konečné produkty byly získány reakcí esterů, vzniklých v prvním kroku, s několika ekvivalenty dimethylaminu (DMA). Reakce probíhaly v prostředí bezvodého tetrahydrofuranu (THF), za laboratorní teploty a pod inertní atmosférou dusíku.

Všechny reakce prvního kroku byly monitorovány pomocí TLC. Byly použity desky se silikagelem a mobilní fáze ve složení hexan: ethyl-acetát 9:1, nebo 19:1.

Struktura konečných produktů byla ověřena NMR, IČ a MS spektry.

SCHEMA 1

KROK 1



metoda A: $\text{Br(CH}_2\text{)}_5\text{COCl, CHCl}_3$, lab. t

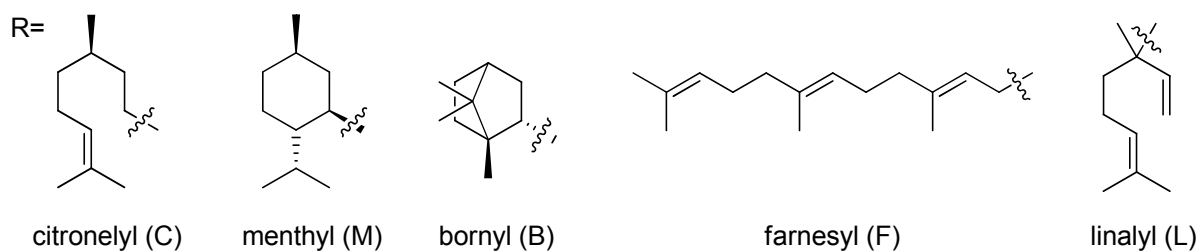
BC

metoda B: $\text{Br(CH}_2\text{)}_5\text{COCl, DIPEA, CHCl}_3$, lab. t

BM, BB, BF

metoda C: $\text{Br(CH}_2\text{)}_5\text{COOH, WSC, DMAP, CHCl}_3$, lab. t

BL

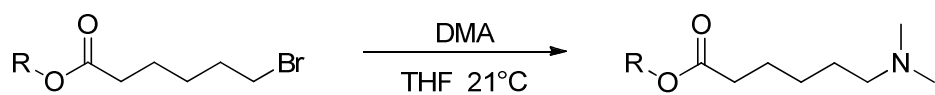


DIPEA: N,N-diisopropylethylamin

WSC: N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid

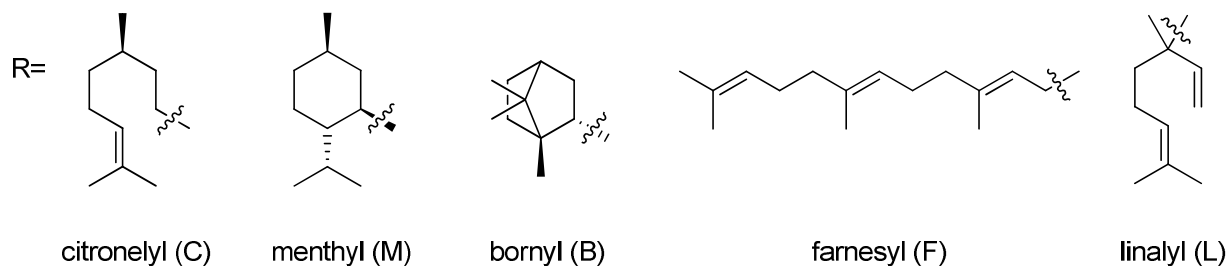
DMAP: 4-dimethylaminopyridin

KROK 2



BC, BM, BB, BF, BL

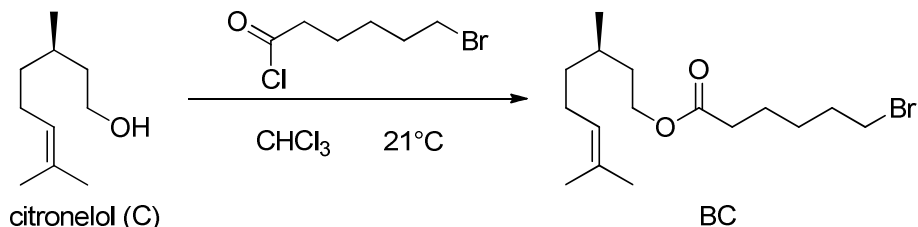
BCN, BMN, BBN, BFN, BLN



DMA: dimethylamin

3.1.1 Příprava esterů kyseliny 6-bromhexanové s terpeny

3.1.1.1 Citronelylester kyseliny 6-bromhexanové (BC)



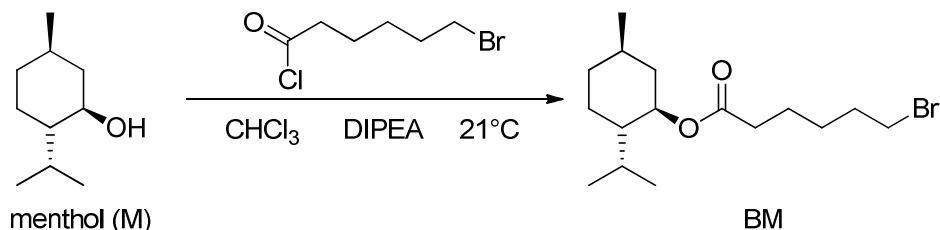
Reakce probíhala za bezvodých podmínek v atmosféře dusíku. Bylo použito 0,36 ml (2 mmol) citronelolu, rozpuštěného v 5 ml suchého chloroformu, k němuž se pomalu stříkačkou přes septum přikapalo 0,3 ml (2 mmol) chloridu kyseliny 6-bromhexanové. Po třech hodinách byl v reakční směsi pomocí TLC detekován produkt. Pro urychlení reakce byla směs na půl hodiny zahřáta na 60°C . Po vychladnutí bylo k reakční směsi přidáno 10 ml chloroformu a vše bylo vytřepáno s destilovanou vodou (3 x 15 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována přes vatku a zahuštěna na vakuové odparce.

Čištění produktu probíhalo sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl hexan/ethyl-acetát 19:1.

Produktem reakce byla čirá bezbarvá olejovitá látka, mol. hm. 333,31 g/mol. Výtěžek reakce činil 47 %. TLC: silikagel, mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 19:1, R_f 0,67.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 5,10-5,00(1H; m); 4,20-4,00 (2H; m); 3,40 (2H; t, $J=18,7$ Hz); 2,32 (2H; t, 31,9 Hz); 2,00-1,90 (2H; m); 1,90-1,80 (5H; m); 1,70-1,60 (6H; m); 1,60-1,30 (4H; m); 1,20-1,10 (2H; m); 1,00-0,85 (3H; d, $J=31,3$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 173,5; 131,3; 124,5; 77,4; 77,0; 76,6; 62,9; 36,9; 35,4; 34,1; 33,5; 32,4; 29,4; 27,6; 25,7; 25,3; 24,1; 19,4; 17,6 ppm. IR (ATR): ν_{max} 2958; 1732; 1458; 1379; 1255; 1183 cm^{-1} .

3.1.1.2 Mentylester kyseliny 6-bromhexanové (BM)

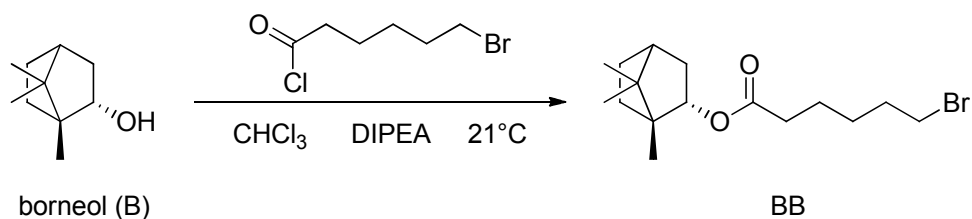


Reakce probíhala za bezvodých podmínek pod atmosférou dusíku. Reakční směs tvořilo 0,313 g (2 mmol) mentholu, rozpuštěného v 5 ml suchého chloroformu; 0,6 ml (4 mmol) DIPEA a na závěr stříkačkou pomalu přikapaných 0,3 ml (2 mmol) chloridu kyseliny 6-bromhexanové. Po jedné hodině byl ve směsi pomocí TLC detekován produkt. Reakční směs byla míchána ještě přes noc a po 24 hodinách ukončena. Poté bylo ke směsi přidáno 10 ml chloroformu a vše bylo vytřepáno s destilovanou vodou (3x15 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a zahuštěna na vakuové odparce. Čištění produktu probíhalo sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byla směs hexan/ethyl-acetát 19:1.

Byl získán čirý bezbarvý olejovitý produkt o mol. hm. 333,31 g/mol, výtěžek činil 23 %. TLC: silikagel, mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 19:1, R_f 0,77.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 4,70 (1H; dd, $J_1=11,1$ Hz, $J_2=4,4$ Hz); 3,40 (2H; t, $J=7,2$ Hz); 2,30 (2H; t, $J=7,0$ Hz); 2,00-1,90 (1H; m); 1,90-1,80 (3H; m); 1,70-1,60 (7H; m); 1,50-1,20 (4H; m); 1,10-0,90 (6H; m); 0,70 (3H; d, $J=7,3$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 173,0; 77,4; 77,0; 76,6; 74,0; 47,0; 40,9; 34,4; 34,2; 33,5; 32,4; 31,3; 27,6; 26,2; 24,2; 23,4; 22,0; 20,8; 16,3 ppm. IR (ATR): ν_{max} 2954; 1729; 1456; 1253; 1179 cm^{-1} .

3.1.1.3 Bornylester kyseliny 6-bromhexanové (BB)

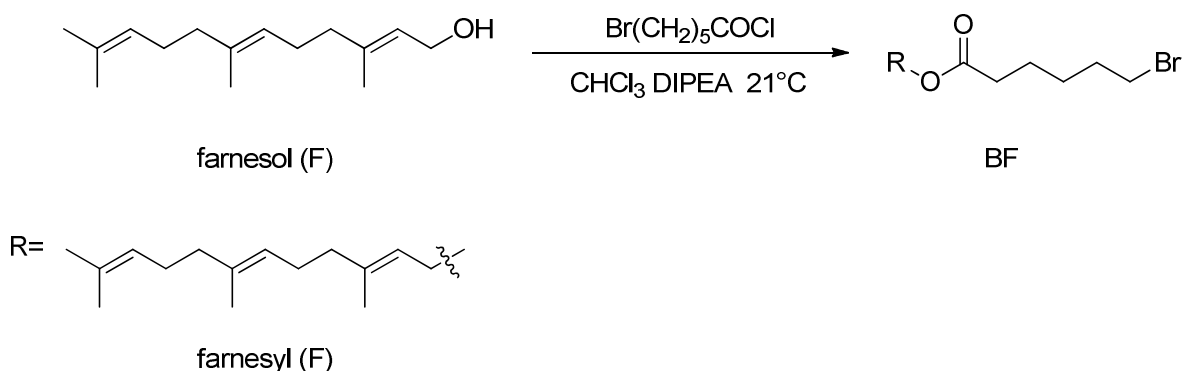


V reakční směsi bylo za bezvodých podmínek pod atmosférou dusíku rozpuštěno 0,309 g (2mmol) borneolu, v 5 ml bezvodého chloroformu. Poté bylo stříkačkou přidáno 0,67 ml (4 mmol) DIPEA a na závěr bylo stříkačkou pomalu přikapáno 0,3 ml (2 mmol) chloridu kyseliny 6-bromhexanové. Po jedné hodině byl v reakční směsi na TLC detekován produkt. Reakce byla ukončena po 2,5 hodinách. K reakční směsi bylo přidáno 10 ml chloroformu a vše bylo vytřepáno s destilovanou vodou (3x15 ml). Poté byla organická fáze vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a zahuštěna na vakuové odparce. Čištění produktu bylo provedeno sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází hexan/ethyl-acetát 19:1.

Byl získán čirý bezbarvý olejovitý produkt o mol. hm. 331,29 g/mol. Výtěžek reakce činil 32 %. TLC: silikagel, mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 19:1, R_f 0,70.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 4,90-4,85 (1H; m); 3,40 (2H; $J_1=2,8$ Hz, $J_2=6,6$ Hz); 2,40-2,30 (2H; m); 2,00-1,80 (2H; m); 1,80-1,60 (2H; m); 1,60-1,40 (2H; m); 1,40-1,10 (7H; m); 1,00-0,80 (9H; m). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 173,8; 80,9; 77,4; 77,0; 76,6; 48,7; 47,8; 44,8; 38,8; 34,4; 33,5; 32,4; 28,0; 27,7; 27,1; 27,0; 24,2; 20,1; 19,9; 19,7; 18,8; 13,5 ppm. IR (ATR): ν_{max} 2953; 1731; 1455; 1254; 1185; 1021 cm^{-1} .

3.1.1.4 Farnesylolester kyseliny 6-bromhexanové (BF)



Reakce probíhala v bezvodém prostředí pod ochrannou atmosférou dusíku. Bylo použito 0,50 ml (2mmol) farnesolu, rozpuštěného v 5 ml bezvodého chloroformu a 0,66 ml (4 mmol) DIPEA, na závěr bylo stříkačkou pomalu přikapáno 0,3 ml (2 mmol) chloridu kyseliny 6-bromhexanové. Reakční směs byla míchána přes noc, reakce ukončena po 24 hodinách. K obsahu v reakční baňce bylo přidáno 10 ml chloroformu, vše bylo vytřepáno s destilovanou vodou (3x15 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a zahuštěna na vakuové odparce.

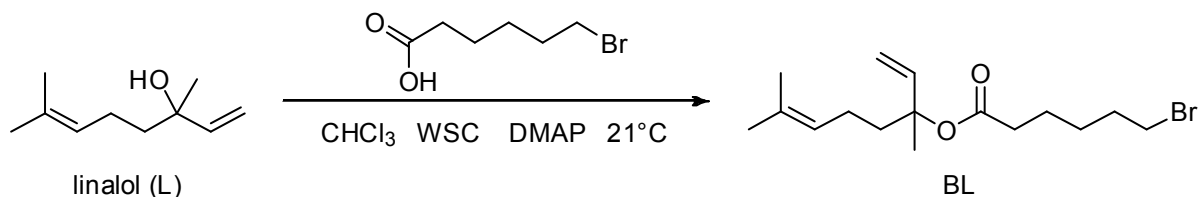
Čištění bylo provedeno sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází hexan/ethylacetát 19:1.

Byl získán čirý nažloutlý olejovitý produkt o mol. hm. 399,42. Výtěžek reakce činil 69 %.

TLC: silikagel, mobilní fáze hexan/ethylacetát 19:1, R_f 0,63.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 5,34 (1H; t, $J=4,9$ Hz); 5,10-5,05 (2H; m); 4,60 (2H; d, $J=7,3$ Hz); 3,40 (2H; t, $J=6,7$ Hz); 2,30 (2H; t, $J=7,0$ Hz); 2,15-1,95 (8H; m); 1,90-1,80 (11H; m); 1,80-1,60 (5H; m); 1,50-1,20 (2H; m). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 173,5; 142,6; 135,6; 131,6; 124,4; 123,6; 119,1; 61,3; 39,8; 39,7; 34,1; 33,5; 32,4; 27,6; 26,7; 26,4; 24,1; 23,6; 17,7; 16,5; 16,0 ppm. IR (ATR): ν_{max} 2939; 1732; 1376; 1169 cm^{-1} .

3.1.1.5 Linalylester kyseliny 6-bromhexanové (BL)



Reakce probíhala za bezvodých podmínek v atmosféře dusíku. Bylo použito 0,390 g (2 mmol) kyseliny 6-bromhexanové a 0,024 g (0,2 mmol) DMAP rozpuštěných v 5 ml bezvodého chloroformu, k tomuto roztoku bylo stříkačkou přidáno 0,36 ml (2 mmol) linalolu. Směs byla podchlazena na 0 °C a bylo pomalu stříkačkou přikapáno 0,35 ml (2 mmol) WSC. Po rozpuštění ledu byla reakce dále míchána za laboratorní teploty. Po 21 hodinách bylo na TLC zjištěno, že reakce probíhá, ale s malým výtěžkem. Proto byla reakční směs znovu podchlazena na 0 °C a bylo přidáno ještě 0,078 g (0,4 mmol) kyseliny 6-bromhexanové a 0,071 ml (0,4 mmol) WSC. Po 43 hodinách byla reakce ukončena. K reakční směsi bylo přidáno 10 ml chloroformu a vše bylo vytřepáno s 1M roztokem HCl (3x20 ml). Poté byla organická fáze ještě vytřepána s 20 ml destilované vody, zahuštěna na vakuové odparce a zahuštěný zbytek naadsorbován na 2 g silikagelu.

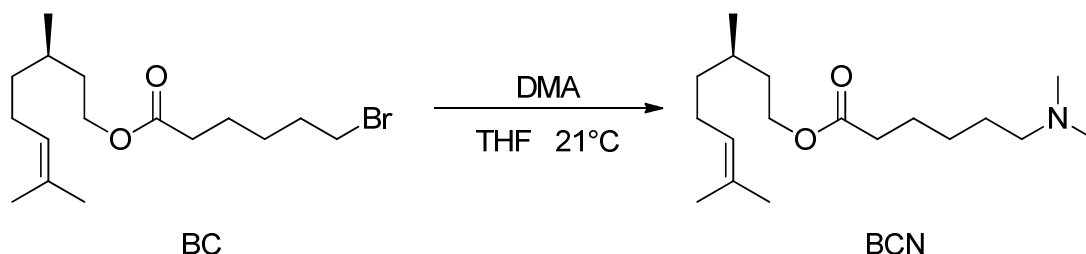
Čištění produktu bylo provedeno sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází hexan/ethyl-acetát 29:1.

Byl získán čirý bezbarvý olejovitý produkt o mol. hm. 331,29 g/mol. Výtěžek reakce činil 17 %. TLC: silikagel, mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 19:1, R_f 0,57.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 6,00 (1H; dd, J₁=11,0 Hz, J₂=17,5 Hz); 5,20-5,10 (3H; m); 3,40 (2H; t, J=7,1 Hz); 2,30 (2H; t, J=7,2 Hz); 2,00-1,70 (4H; m); 1,70-1,40 (15H; m). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 172,2; 141,8; 131,8; 123,8; 113,1; 82,8; 77,4; 77,0; 76,6; 39,8; 35,0; 33,5; 32,4; 27,6; 25,6; 24,2; 23,6; 22,3; 17,6 ppm. IR (ATR): ν_{max} 2937; 2859; 1735; 1462; 1165 cm⁻¹.

3.1.2 Substituce atomu bromu v kyselinové části esteru *N,N*-dimethylamino skupinou

3.1.2.1 Citronylester kyseliny 6-(dimethylamino)hexanové (BCN)

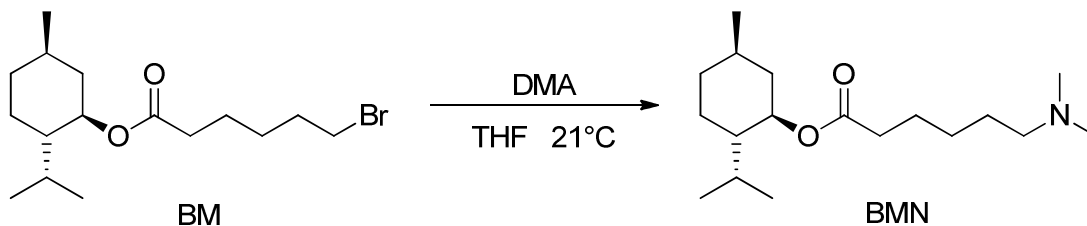


Do bezvodé reakce pod atmosférou dusíku bylo použito 1,77 ml (3,54 mmol) 2M roztoku DMA v tetrahydrofuranu, k němuž bylo stříkačkou pomalu přikapáno 0,295 g (0,886 mmol) produktu BC, rozpuštěného ve 2 ml bezvodého THF. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. Po 24 hodinách bylo na TLC zjištěno, že reakce probíhá, ale s malým výtěžkem, proto byla reakční směs na půl hodiny zahřáta k varu. Následně provedené TLC ukázalo, že je v reakční směsi stále poměrně dost výchozího esteru, proto byl přidán ještě jeden ekvivalent (0,886 mmol, to je 0,443 ml) DMA. Po 48 hodinách byla reakce ukončena a vzniklá sraženina odfiltrována. Reakční směs byla vytřepána s 0,1M HCl (3x10 ml). Vodné fáze byly spojeny a jejich pH upraveno pomocí triethylaminu (TEA) na hodnotu 7-8. Takto upravená směs obsahující i produkt byla ihned vytřepána s ethyl-acetátem (3x20 ml). Organické fáze byly spojeny a zbaveny rozpouštědla na vakuové odparce. Produkt byl poté hodinu vakuován v exsikatoru nad oxidem fosforečným, aby byl zbaven případné vlhkosti.

Byla získána nahnědlá čirá olejovitá látka o mol. hm. 297,48 g/mol. Výtěžek reakce činil 60 %. TLC: oxid hlinitý, mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 4:1, R_f 0,30.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 5,05 (1H; t, $J=7,1$ Hz); 4,10-4,05 (2H; m); 2,30-2,20 (8H; m); 2,00-1,90 (2H; m); 1,65 (3H; s); 1,60 (3H; s); 1,55-1,40 (5H; m); 1,35-1,25 (4H; m); 1,20-1,10 (4H; m); 0,9 (3H; d, $J=6,5$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 173,8; 131,3; 124,5; 77,4; 77,2; 77,0; 76,6; 62,8; 59,4; 45,2; 36,9; 35,4; 34,3; 29,4; 27,1; 26,9; 25,7; 25,3; 24,9; 19,4; 17,6 ppm. IR (ATR): ν_{max} 2930; 1736; 1458; 1378; 1173 cm^{-1} . MS (APCI, pos): m/z 298,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.2.2 Mentylester kyseliny 6-(dimethylamino)hexanové (BMN)



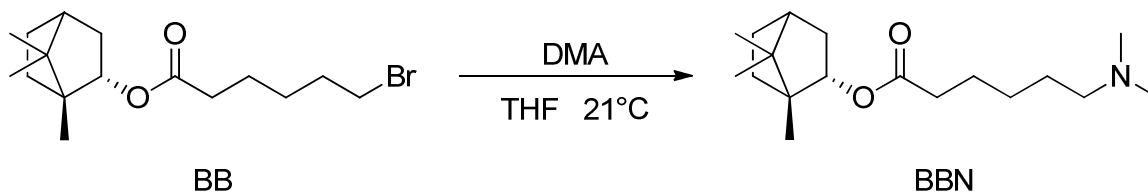
K 1,01 ml (2,015 mmol) DMA bylo za laboratorní teploty, bezvodých podmínek a pod atmosférou dusíku stříkačkou pomalu přikapáno 0,134 g (0,403 mmol) produktu BM, rozpuštěného ve 2 ml bezvodého THF. Po 24 hodinách bylo na TLC zjištěno, že reakce probíhá, ale ne v dostatečné míře, proto bylo přidáno 0,400 ml (0,800 mmol) DMA. Při další kontrole pomocí TLC se v reakční směsi stále vyskytovalo poměrně velké množství výchozího esteru. Proto bylo 48 hodin od nasazení reakce přidáno ještě jednou 0,400 ml (0,800 mmol) DMA. Po 72 hodinách byla reakce ukončena, reakční směs byla zfiltrována a zahuštěna na vakuové odparce.

Čištění produktu bylo provedeno sloupcovou chromatografií na oxidu hlinitém, mobilní fází ethyl-acetátem.

Byla získána žlutohnědá voskovitá porózní látka, mol. hm. 297,48 g/mol. Výtěžek reakce činil 77 %. TLC: oxid hlinitý, mobilní fáze ethyl-acetát, R_f 0,54.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 4,65 (1H; dt, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 10,3$ Hz); 3,00-2,90 (2H; m); 2,80 (6H; s); 2,30 (2H; t, $J = 7,6$ Hz); 1,95-1,75 (4H; m); 1,70-1,60 (4H; m); 1,50-1,30 (4H; m); 1,10-0,90 (3H; m); 0,90-0,80 (6H; m); 0,70 (3H; d, $J = 7,2$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 172,8; 77,4; 77,0; 76,6; 74,2; 57,7; 46,9; 42,8; 40,9; 34,1; 34,1; 31,3; 26,2; 26,1; 24,2; 24,0; 23,3; 22,0; 20,7; 16,2 ppm. IR (ATR): ν_{max} 2952; 2484; 1729; 1471; 1370; 1251; 1181 cm^{-1} . MS (APCI, pos): m/z 298,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.2.3 Bornylester kyseliny 6-(dimethylamino)hexanové (BBN)



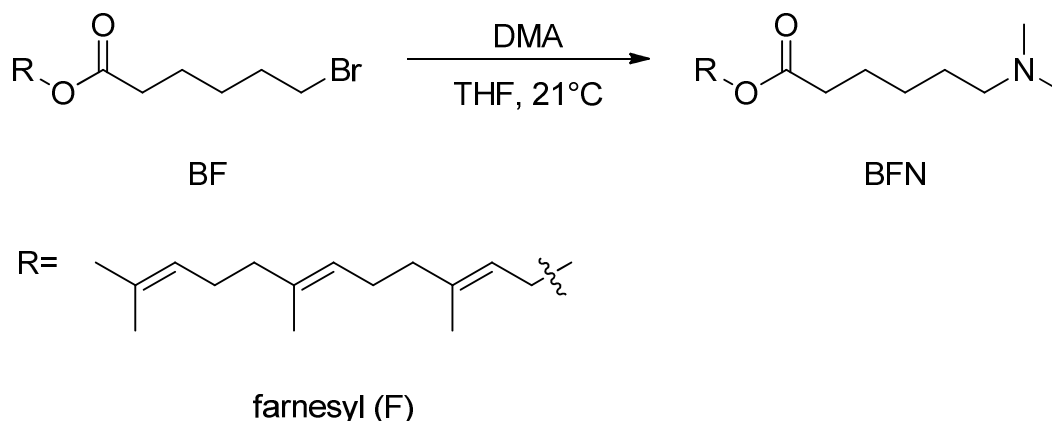
K 1,482 ml (2,964 mmol) DMA bylo za laboratorní teploty, bezvodých podmínek a pod atmosférou dusíku stříkačkou pomalu přikapáno 0,196 mg (0,593 mmol) látky BB, rozpuštěné ve 2 ml bezvodého THF. Po 24 hodinách bylo na TLC zjištěno, že reakce probíhá, ale ne v dostatečné míře. V reakční směsi se totiž nacházelo poměrně velké množství výchozích látek. Proto bylo přidáno 0,60 ml (1,200 mmol) DMA. Po 72 hodinách byla reakce ukončena, reakční směs zfiltrována a zahuštěna na vakuové odparce.

Čištění bylo provedeno sloupcovou chromatografií na oxidu hlinitém. Po prvních dvou chromatografiích, kdy byla použita mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 1:1 u prvního, a hexan/ethyl-acetát 1:3 u druhého pokusu o vyčištění produktu, byly v produktu znovu zjištěny nečistoty. Bylo tedy přistoupeno ke sloupcové chromatografii na silikagelu s mobilní fází aceton/TEA 100:1.

Byl získán žlutohnědý čirý olejovitý produkt, mol. hm. 295,47. Výtěžek reakce činil 21 %. TLC: oxid hlinitý, mobilní fáze ethyl-acetát, R_f 0,52.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 4,90-4,85 (1H; m); 2,30 (2H; t, $J=7,3$ Hz); 2,25-2,20 (8H; m); 1,95-1,90 (2H; m); 1,80-1,45 (7H; m); 1,35-1,15 (4H; m); 0,95-0,80 (9H; m). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 156,8; 80,7; 79,6; 77,2; 77,0; 76,7; 59,6; 48,7; 48,6; 47,7; 46,9; 45,4; 44,9; 38,8; 36,8; 34,6; 33,7; 28,0; 27,4; 27,3; 27,1; 27,0; 25,0; 20,1; 19,9; 19,7; 13,5; 11,4 ppm. IR (ATR): ν_{max} 2949; 2762; 1733; 1456; 1179 cm^{-1} . MS (APCI, pos): m/z 296,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.2.4 Farnesylolester kyseliny 6-(dimethylamino)hexanové (BFN)



Ke 2,68 ml (5,355 mmol) DMA bylo za laboratorní teploty pomalu stříkačkou přikapáno 534,7 mg (1,339 mmol) látky BF, rozpuštěné ve 2 ml bezvodého THF. Po 24 hodinách, bylo zjištěno, že reakční směs sice obsahuje produkt, ale také je v ní poměrně velké množství výchozí látky BF. Proto bylo přidáno 0,67 ml (1,34 mmol) DMA. Reakce byla ukončena po 72 hodinách. Reakční směs byla zfiltrována přes fritu a vytřepána s 0,1M HCl (3x 10 ml). Fáze s HCl byly spojeny a zneutralizovány pomocí TEA. Takto upravená vodná fáze pak byla ihned vytřepána s ethyl-acetátem (1x 30ml). Produkt přešel do organické fáze, která byla poté zahuštěna na vakuové odparce. Takto získaný produkt ale nebyl dle TLC čistý. Proto byla provedena sloupcová chromatografie na oxidu hlinitém, mobilní fází byl ethyl-acetát. Bohužel se směs úplně nerozdělila, proto byla provedena další sloupcová chromatografie na oxidu hlinitém. Mobilní fází byla směs hexan/ethyl-acetát 1:1,

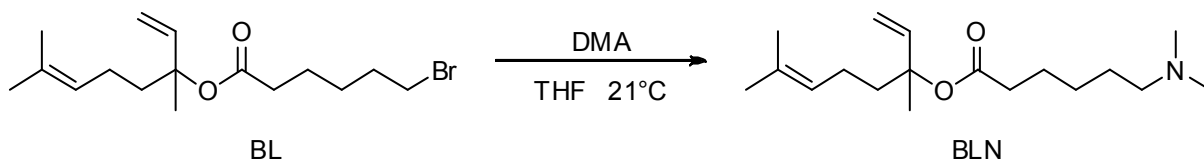
po vymytí nečistot z kolony byl postupně přidáván methanol až do vymytí produktu.

Byla získána žlutohnědá gelovitá látka, mol. hm. 363,59 g/mol. Výtěžek reakce činil 33 %.

TLC: oxid hlinitý, mobilní fáze ethyl-acetát, R_f 0,58.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 5,35-5,30 (1H; m); 5,10-5,05 (2H; m); 4,60 (2H; d, $J=7,1$ Hz); 2,30-2,20 (10H; m); 2,10-1,90 (8H; m); 1,75-1,760 (9H; m); 1,60-1,55 (5H; m); 1,50-1,45 (2H; m); 1,35-1,30 (2H; m). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 173,7; 142,5; 142,4; 142,1; 135,5; 135,4; 131,5; 131,3; 131,2; 124,4; 124,2; 124,2; 123,6; 123,4; 119,3; 119,2; 118,4; 77,3; 77,0; 76,8; 61,2; 61,0; 59,5; 45,4; 39,8; 39,7; 39,5; 34,3; 32,4; 32,1; 31,9; 27,3; 27,0; 26,8; 26,6; 26,4; 26,2; 26,1; 25,7; 25,0; 23,5; 23,3; 17,6; 17,6 ppm. IR (ATR): ν_{max} 2930; 2477; 1733; 1456; 1378; 1178 cm^{-1} . MS (APCI, pos): m/z 364,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.2.5 Linalylester kyseliny 6-(dimethylamino)hexanové (BLN)



Tato reakce neprobíhala pod dusíkem, jako všechny ostatní, ale pod atmosférou argonu, stejně jako ostatní reakce byla bezvodá. K 1,81 ml (3,622 mmol) DMA bylo stříkačkou pomalu přidáno 0,120 mg (0,362 mmol) látky BL, rozpuštěné ve 2 ml bezvodého THF. Po 4 hodinách bylo na TLC zjištěno, že produkt již vzniká. Reakce probíhala celkem 48 hodin, poté byla reakční směs zahuštěna na vakuové odparce a získaný zbytek rozpuštěn v 10 ml ethyl-acetátu. Následovalo vytřepání této směsi s nasyceným roztokem NaHCO_3 (3x 8 ml 10% roztoku NaHCO_3). Dále byla organická fáze vytřepána s 15 ml nasyceného roztoku NaCl , vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a zahuštěna na vakuové odparce.

Přečištění produktu bylo provedeno sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl zpočátku ethyl-acetát. Po vymytí nečistot ze sloupce byla mobilní fáze postupně změněna na 96% ethanol a poté na směs methanol/TEA 100:1. Produkt byl zbaven rozpouštědla na vakuové odparce a přes noc ponechán v evakuovaném exsikatoru nad koncentrovanou H_2SO_4 , aby byly z produktu odstraněny případné zbytky TEA.

Byl získán čirý žlutý olejovitý produkt, mol. hm. 295,47 g/mol. Výtěžek reakce činil 71 %. TLC: oxid hlinitý, mobilní fáze ethyl-acetát, R_f 0,52.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 5,95 (1H; dd, $J_1=11,3$ Hz, $J_2=17,5$ Hz); 5,15-5,05 (3H; m, triplet překrytý dalším signálem); 2,30-2,20 (10H; m, navzájem překryté dva dublety a jeden singlet); 2,00-1,90 (2H; m); 1,90-1,75 (2H; m); 1,70 (3H; s); 1,65-1,60 (2H; m); 1,60 (3H; s); 1,50 (3H; s); 1,50-1,40 (2H; m); 1,40-1,30 (2H; m). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 172,5; 142,0; 131,7; 123,8; 113,0; 82,6; 77,3; 77,0; 76,8; 59,6; 45,4; 39,8; 35,2; 27,4; 27,0; 25,6; 25,0; 23,6; 22,3; 17,5 ppm. IR (ATR): ν_{max} 2937; 2859; 2763; 1735; 1460; 1165 cm^{-1} . MS (APCI, pos): m/z 296,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.2 Permeační pokusy

Vliv syntetizovaných látek na prostup léčiv kožní bariérou byl studován permeačními pokusy. Pokusy probíhaly ve Franzových celách, jako pokusná membrána sloužila lidská kůže. Míra ovlivnění permeability kůže připravenými látkami byla sledována pomocí dvou modelových léčiv - theofylinu a hydrokortisonu. Jako kontrola sloužil při každém pokusu čistý vzorek léčiva, bez zkoumaných látek či standardů. Účinnost každé ze syntetizovaných látek byla navíc porovnávána s účinností původního terpenu. Celkově byl pokus proveden pro každou z látek či terpenů minimálně ve třech opakováních (tzn. minimálně tři cely), a to s každým z obou modelových léčiv.

3.2.1 Franzovy cely

Pro permeační pokusy byly použity Franzovy difúzní cely. Tyto cely se skládají ze skleněné horní (donorové) a spodní (akceptorové) části. Spodní část má vyvedené raménko, kterým lze v průběhu pokusu odebírat vzorky donorové fáze. Pro zajištění homogenity akceptorové fáze v průběhu pokusu byla ve spodních částech cel umístěna teflonová míchadla. Mezi skleněné části byla vložena dvě plexiskla-horní, donorové (tloušťka přibližně 0,50 cm), a spodní (tloušťka asi 0,20 cm). Plexiskla sloužila k fixaci kůže mezi skleněné části cely. Obě plexiskla v sobě měla kruhový otvor o ploše 1 cm², čímž byla na kůži vymezena permeační plocha. Kůže byla nejprve nařezána skalpelem na čtverce o rozměru 2x2 cm. Tyto čtverečky byly silikonovou vazelínou fixovány mezi plexiskla tak, aby dermální strana kůže směřovala do akceptorové fáze. Takto sestavené cely byly nakonec staženy gumičkou.

3.2.2 Kůže

Ke všem pokusům byla použita lidská kůže z oblasti břicha, získaná od pacientů podstupujících plastické operace. Odběr lidské kůže byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (č. 200609 S09P) a prováděn dle principů Helsinské Deklarace. Lidská kůže byla skalpelem zbavena tukové tkáně a uchovávána zmrazená.

3.2.3 Akceptorová fáze

Jako fáze, do které stanovované léčivo přes kůži prostupovalo, byl použit izotonický fosfátový pufr (PBS) o pH 7,4, který je vhodný pro HPLC analýzu a modelová léčiva jsou v něm dobře rozpustná. Pro přípravu pufru bylo naváženo 0,312 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2,865 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 8 g NaCl a 0,201 g KCl. To vše bylo rozpuštěno v 1000 ml vody pro HPLC. Po rozpuštění všech solí bylo stanoveno pH pufru. Hodnota pH byla případně upravena přidáním koncentrovaného roztoku NaOH nebo H_3PO_4 . Pro ochranu před mikrobiální kontaminací byl k pufru přidán gentamicin v množství 0,050 g na litr pufru.

3.2.4 Donorové vzorky a modelová léčiva

Jako modelová léčiva byly vybrány dvě látky:

- Theofylin (TH), $M_r=180,17$ g/mol
- Hydrokortison (HC), $M_r=362,47$ g/mol

Příprava vzorků spočívala ve vytvoření suspenze 5% TH nebo 2% HC v 60% vodném roztoku propylenglykolu. Na jeden mililitr této suspenze bylo přidáno vždy 30 mmol zkoumané látky nebo původního terpenu. Stejným způsobem byly připraveny i vzorky s DDAK a dodekanolem. DDAK je prokázaný akcelerační (1), tudíž při pokusech sloužil jako standard pro porovnání akcelerační aktivity připravených látek. Dodekanol je výchozí alkohol DDAK-stejně jako terpeny pro připravené látky. Jako kontrolní vzorky sloužila suspenze 5% TH nebo 2% HC v 60% roztoku propylenglykolu bez přídavku zkoumané látky či terpenu. Připravené suspenze byly, včetně kontrol, homogenizovány krátkým protřepem. Poté byly na 24 hodin umístěny do termostatu (32°C).

Při pokusu byl pomocí stanovení koncentrace modelového léčiva zjišťován také vliv zkoumaných látek i původních terpenů na rozpustnost léčiva v donorových vzorcích. Nejprve byl každý donorový vzorek převeden do plastové zkumavky, označen a uzavřen. Následovala centrifugace po dobu deseti minut při 10 000 otáčkách za minutu. Po zcentrifugování bylo z každého vzorku pipetou odebráno 20 μl čirého supernatantu. Takto získaný vzorek byl 500x naředěn PBS pufrem, převeden do skleněné vialky, která byla uzavřena víčkem s gumovým septem. Poté byla na HPLC přístroji stanovena koncentrace rozpuštěného modelového léčiva ve vzorcích. Pro každý z donorových vzorků bylo stanovení rozpustnosti provedeno ve třech opakováních.

3.2.5 Permeační pokusy

Pro permeační pokusy byly použity výše popsané Franzovy cely. Po jejich sestavení následovalo naplnění spodních (akceptorových) částí cel PBS pufrům o pH 7,4 (=akceptorová fáze). Pufr měl svými vlastnostmi simulovat krevní plazmu, cely jím byly naplněny po okraj raménka. Objem akceptorové fáze činil přibližně 16 ml. Jelikož se cely lišily svou velikostí, přesné objemy pufru byly zaznamenány pro každou celu, aby je pak bylo možno využít při výpočtech.

Takto připravené cely byly minimálně hodinu před nanesením vzorků vloženy do vodní lázně o teplotě 32°C, aby se akceptorová fáze vytemperovala na správnou teplotu a kůže se mohla dostatečně hydratovat.

Následovalo nanesení vzorků. Na svrchní část kůže bylo do prostoru vymezeného otvorem v donorovém plexiskle nanášeno vždy 150 µl vzorku. Vzorky byly před nanesením homogenizovány na třepačce. Aby se zabránilo odpařování rozpouštědla z nanášeného vzorku, bylo mezi horní skleněnou část cely a donorové plexisklo po nanesení vzorku vsunuto krycí sklíčko. Tímto byly cely připraveny a permeační pokus zahájen.

Odebírání vzorků bylo provedeno injekční stříkačkou, z každé cely. Odběry byly provedeny v časových intervalech 16, 20, 24, 36, 40, 44, 48 hodin pro léčivo theofylin, a v intervalech 20, 24, 28, 40, 44, 48, 52, 64 hodin pro léčivo hydrocortison. Bylo odebíráno vždy 300 µl akceptorové fáze. Odebraná akceptorová fáze byla nahrazena přidáním stejného množství čistého PBS pufru do akceptorové části cely, a to ihned po odběru. Odběry i doplňování akceptorové fáze probíhaly přes raménko vyvedené ze spodní části cely. Vzorek byl stříkačkou přenesen do skleněného insertu ve vialce, která byla uzavřena víčkem s teflonovým septem. V takto připravených vzorcích byly na HPLC přístroji stanoveny koncentrace modelového léčiva.

Po posledním odběru již do cel nebylo třeba doplňovat akceptorovou fázi, byl pouze odebrán vzorek. Následovalo rozebrání cel. V kůžích použitých při pokusu bylo ještě třeba stanovit koncentrace modelových léčiv. Proto byly po rozebrání cel kůže opláchnuty v PBS pufru, poté v 60% ethanolu a na závěr v destilované vodě. Následovalo osušení, vyseknutí exponované plochy z kůže, zvážení těchto výseků a jejich extrakce 5 ml mobilní fáze. Tato mobilní fáze měla shodné složení, jako mobilní fáze použitá pro HPLC analýzu příslušného modelového léčiva ve vzorcích odebraných během pokusu. Každý z výseků byl extrahován zvlášť, ve své vialce. Kůže byly po celou dobu vhodně značeny tak, aby

se zachovalo jejich přiřazení k jednotlivým vzorkům nanášeným při permeačních pokusech. Extrakce probíhala 48 hodin. Po ukončení extrakce byly odebrány vzorky mobilních fází z každé vialky. Vzorky byly zfiltrány přes vatu do skleněných vialek. Následně byla na HPLC přístroji stanovena koncentrace vyextrahovaného modelového léčiva z jednotlivých výseků kůží.

3.3 HPLC stanovení vzorků

3.3.1 Analytická metodika

Pro vyhodnocení vzorků z permeačních pokusů metodou HPLC byla přejata již dříve vypracovaná metodika.

Systém přístroje obsahuje dvě vysokotlaká čerpadla LC-20 AD s odplyňovačem DGU-20A3, autosampler SIL-20A HT, kolonový termostat CTO-20AC, diode array detektor SPD-M20A a komunikační modul CBM20-A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a integrační software LCsolutions verze 1.22.

Pro separaci TH byla použita kolona LiChroCART 250-4 s náplní LiChrospher 100 RP-18,5 μm (Merck, Darmstadt, SRN), při teplotě kolony 35°C. Mobilní fáze měla složení 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /methanol 3:2 (v/v), její průtok byl 1,2 ml/min (tlak okolo 20 MPa), nástřik 10 μl . Detekce: UV, vlnová délka 272 nm. Retenční čas se pohyboval okolo 3 minut (analýza trvala cca 3,6 min.).

K separaci HC byla použita kolona Discovery® s náplní HS C18,150 x 4,6 nm, 5 μm (Supelco), při teplotě 40°C. Mobilní fáze: THF/ H_2O /methanol 1:40:60 (v/v/v), její průtok: 1,2 ml/min, nástřik: 20 μl . Detekce: UV, vlnová délka 252 nm. Retenční čas se pohyboval okolo 3,1 minut, délka analýzy cca 4 minuty.

3.3.2 Kalibrační standardy

Kalibrační standardy byly připraveny naředěním zásobních roztoků HC nebo TH pomocí fosfátového pufru. Pro kalibraci byly použity vzorky o koncentraci léčiva 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10 mg/ml.

3.4 Analýza dat

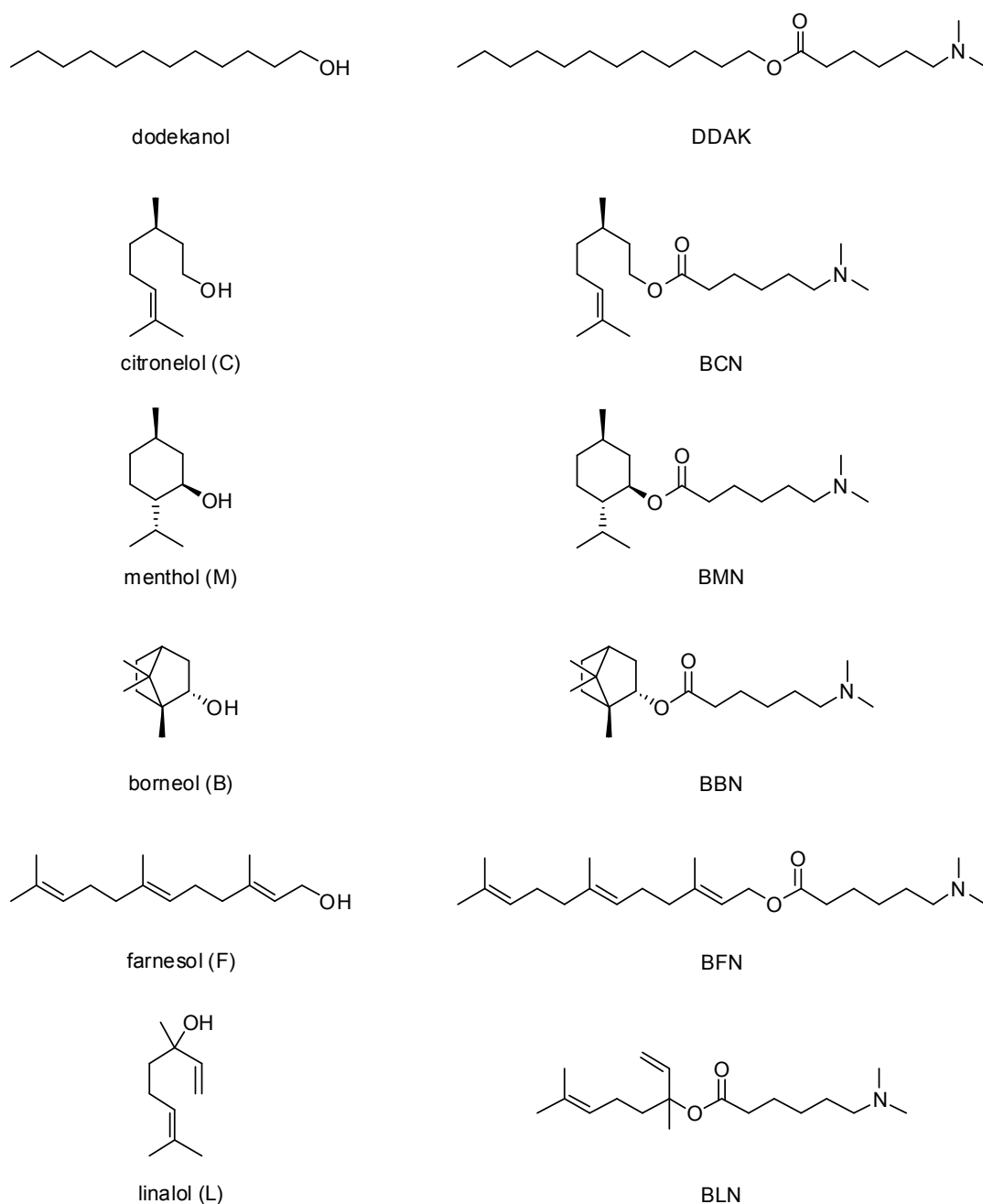
Kumulativní množství léčiva (permeantu), které prošlo skrz kůži do akceptorové fáze, bylo přepočítáno s ohledem na odběry a doplňování akceptorové fáze. Na zřetel byl vzat také přesný objem akceptorové fáze každé z cel. Hodnoty koncentrací byly vyneseny do grafu v závislosti na čase. Pro výpočet příslušných fluxů J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) byla použita oblast ustáleného toku permeantu (lineární oblast křivky). Flux byl odečten jako hodnota směrnice této přímky. Koncentrace léčiv v kůži jsou přepočítány na přesnou hmotnost vzorku tkáně.

Ke statistickému zpracování byl použit test ANOVA s Dunnettovým post testem (pro srovnání 3 a více skupin) a Studentův t-test (pro analýzu dvou skupin dat). Výsledky jsou prezentovány jako průměry \pm SEM (standardní chyba).

4 Výsledky a diskuze

4.1 Syntéza

Cílem mé práce bylo připravit estery kyseliny 6-(dimethylamino)hexanové s pěti terpenickými alkoholy (citronelol, menthol, farnesol, borneol, linalol). Struktury všech připravených látek, výchozích terpenických alkoholů, DDAK a dodekanolu shrnuje obr. 5.



Obr. 5. Struktury použitých látek

Příprava produktů vycházela z komerčně dostupných terpenů citronelolu, mentholu, borneolu, farnesolu a linalolu. Syntéza všech látek probíhala ve dvou krocích. V prvním kroku byla provedena acylace terpenických alkoholů chloridem 6-bromhexanové kyseliny, případně kyselinou 6-bromhexanovou. Druhý krok spočíval v substituci atomu bromu v připravených esterech dimethylamino skupinou. Všechny reakce probíhaly v bezvodém prostředí, pod atmosférou dusíku.

4.1.1 První krok

První krok probíhal třemi metodami. Metodou A byl připraven ester citronelolu BC a to reakcí s chloridem 6-bromhexanové kyseliny. Jelikož bylo po 24 hodinách na TLC zjištěno, že v reakční směsi je stále poměrně mnoho výchozích látek, byla směs 30 minut zahřáta na 60°C. Z následné TLC chromatografie vyplynulo, že zahřívání nemělo na reakci žádný vliv. Z toho důvodu už všechny další reakce probíhaly za laboratorní teploty. Z NMR analýzy přečištěného produktu vyplynulo, že nevznikl jen požadovaný ester, ale také produkt adice chlorovodíku, vznikajícího při reakci, na dvojnou vazbu esterifikovaného citronelolu. Proto byl produkt znovu přečištěn sloupcovou chromatografií. Výtěžek požadovaného esteru ve výsledku činil 47 %.

U metody B byl do reakční směsi přidán DIPEA aby jako báze vychytával vznikající chlorovodík. DIPEA byl vybrán kvůli rozměrným isopropylovým substituentům, které by měly snížit pravděpodobnost nežádoucí substituce bromu. Touto metodou byly připraveny estery mentholu BM (výtěžek 23%), borneolu BB (výtěžek 32%) a farnesolu BF (výtěžek 69 %). Ester linalolu se touto metodou nepodařilo připravit v dostatečném množství, pravděpodobně kvůli nízké reaktivitě způsobené terciárním charakterem jeho alkoholové skupiny. Proto bylo přistoupeno k metodě C, kdy acylace probíhala s kyselinou 6-bromhexanovou za použití kondenzačního činidla WSC. Toto činidlo zvyšuje reaktivitu karboxylu. Činidlo i z něj vznikající derivát močoviny jsou rozpustné ve vodě (na rozdíl od běžnějšího dicyklohexylkarbodiimidu a analogické dicyklohexylmočoviny), tudíž je při čištění reakční směsi lze snadno vytřepat s vodou. Metodou C byl získán ester linalolu BL a to ve výtěžku 17 %.

4.1.2 Druhý krok

Druhý krok probíhal pro všechny látky společným postupem. Estery terpenů s 6-bromhexanovou kyselinou připravené v prvním kroku byly podrobeny reakci s dimethylaminem, čímž došlo k substituci atomu bromu v kyselinové části esteru dimethylamino skupinou. Tyto reakce probíhaly ve výtěžcích 21 - 77 % v závislosti na připravované látce.

4.1.3 Čištění produktů

Izolace některých konečných produktů byla problematická. Produkt BCN se podařilo přečistit pouhým vytřepáním s 0,1M HCl, úpravou pH vodné fáze do alkalické reakce a zpětným vytřepáním produktu do ethyl-acetátu; získaný výtěžek činil 60 %.

U produktu BMN bylo přečištění úspěšně provedeno sloupcovou chromatografií na oxidu hlinitém mobilní fází ethyl-acetátem, výtěžek činil 77 %.

Látku BFN jsme se nejprve pokusili přečistit vytřepáváním s 0,1 molární HCl, stejně jako látku BCN. Takto získaný produkt ale nebyl dle TLC čistý. Proto byla provedena sloupcová chromatografie na oxidu hlinitém, mobilní fází ethyl-acetátem. Bohužel se směs úplně nerozdělila, proto byla provedena další sloupcová chromatografie na oxidu hlinitém, tentokrát mobilní fází hexan/ethyl-acetát 1:1. Po vymytí nečistot z kolony byl k mobilní fází postupně přidáván methanol až do vymytí produktu. Takto jsme nakonec získali výtěžek 33 %.

Obtíže provázely i izolaci produktu BBN, kdy se produkt nezdařilo přečistit dokonce ani dvěma sloupcovými chromatografiemi na oxidu hlinitém (mobilní fází byla směs hexan/ethyl-acetát 1:1 u prvního pokusu a hexan/ethyl-acetát 3:1 u pokusu druhého). Nakonec jsme přistoupili ke sloupcové chromatografii na silikagelu, kdy se mobilní fází aceton/TEA 100:1 podařilo získat čistý produkt, který ve výsledku činil 21 % teoretického výtěžku.

Po zkušenostech s izolací produktů BFN a BBN jsme u produktu BLN provedli přečištění sloupcovou chromatografií na silikagelu. Mobilní fází byl zpočátku ethyl-acetát, po vymytí nečistot ze sloupce byla mobilní fáze postupně změněná na 96% ethanol a následně na směs methanol/TEA 100:1. Byl získán výtěžek produktu 71 %.

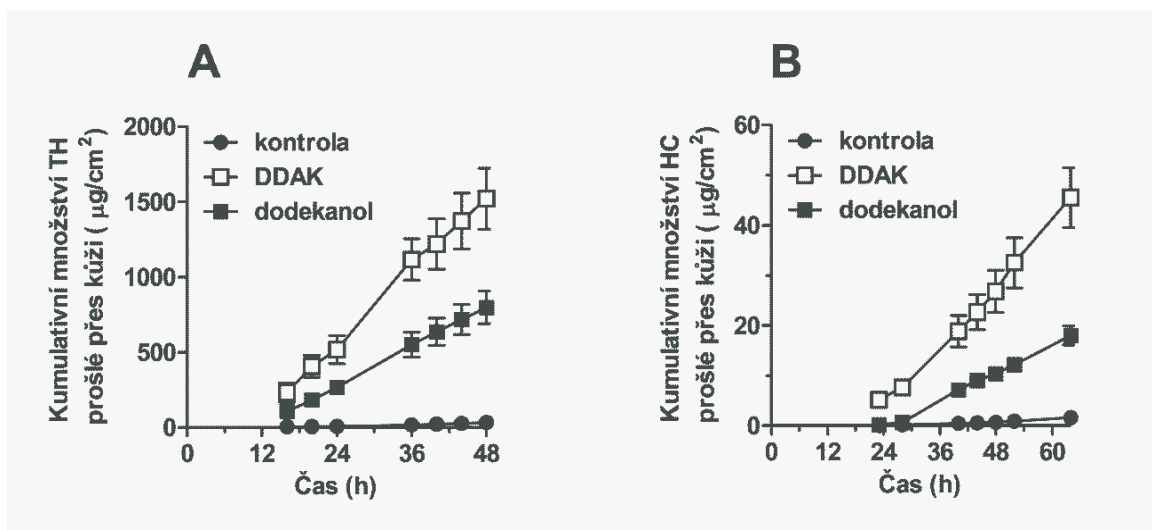
4.2 Permeační pokusy

Bylo připraveno pět esterů 6-(dimethylamino)hexanové kyseliny s terpenickými alkoholy. Vliv připravených esterů na permeaci byl zkoumán v permeačních pokusech ve Franzových difúzních celách za použití lidské kůže. Akceptorovou fází tvořil fosfátový pufr o pH 7,4, který svými vlastnostmi simuluje plazmu, obě modelová léčiva jsou v něm dostatečně rozpustná a snadno stanovitelná metodou HPLC. Jako modelová léčiva s rozdílnými fyzikálněchemickými vlastnostmi pro stanovení akceleračního účinku studovaných látek sloužil hydrokortison a theofylin. Hydrokortison je léčivo s poměrně velkou molekulou mající lipofilní vlastnosti ($\log P=1,6$). Molekula theofylinu je oproti tomu menší a její lipofilní vlastnosti jsou vyvážené ($\log P=0$). Koncentrace modelových léčiv ve vzorcích odebraných během permeačních pokusů byly stanoveny pomocí HPLC již dříve vyvinutými a validovanými metodami.

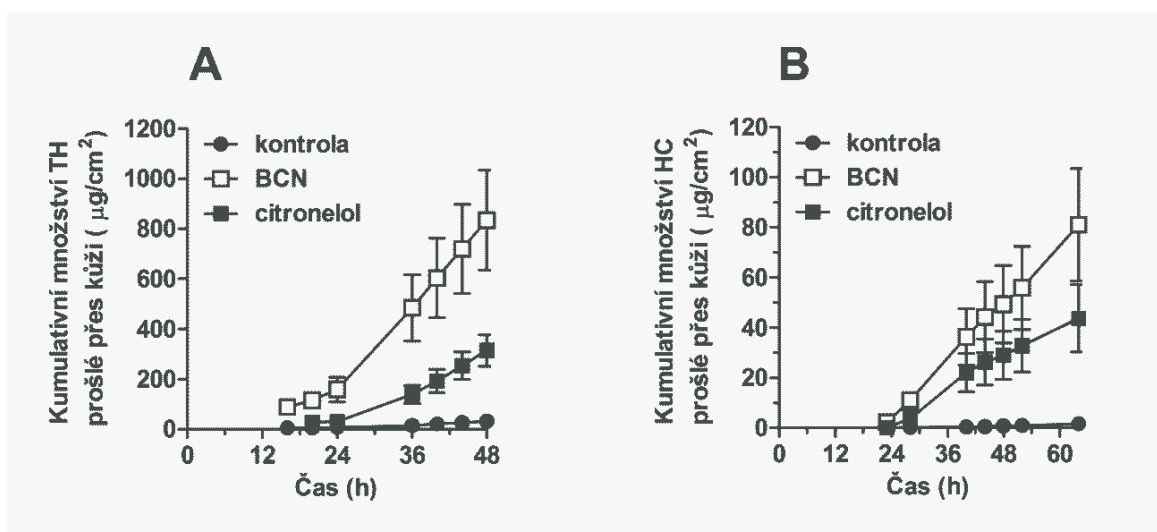
Byl sledován také vliv připravených látek na rozpustnost modelových léčiv v donorových vzorcích, abychom vyloučili, že pozorované zvýšení propustnosti kůže je způsobeno nárůstem termodynamické aktivity léčiva.

Po ukončení permeačních pokusů byla v použitých kůžích zjišťována koncentrace modelových léčiv, za účelem možnosti zjistit, zda látka zvyšuje kumulaci léčiva v kůži (penetraci), nebo spíše průchod léčiva skrz kůži (permeaci).

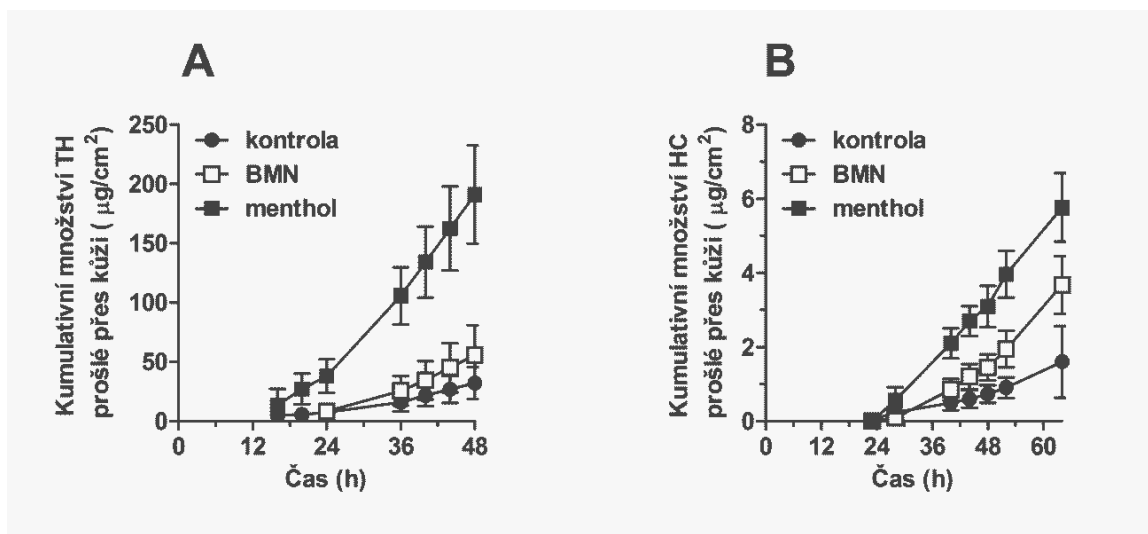
Výsledkem permeačních pokusů bylo získání permeačních profilů pro jednotlivé akceleranty, Tyto profily znázorňují závislost množství modelového léčiva, které prošlo skrz kůži na čase (obr. 6-11).



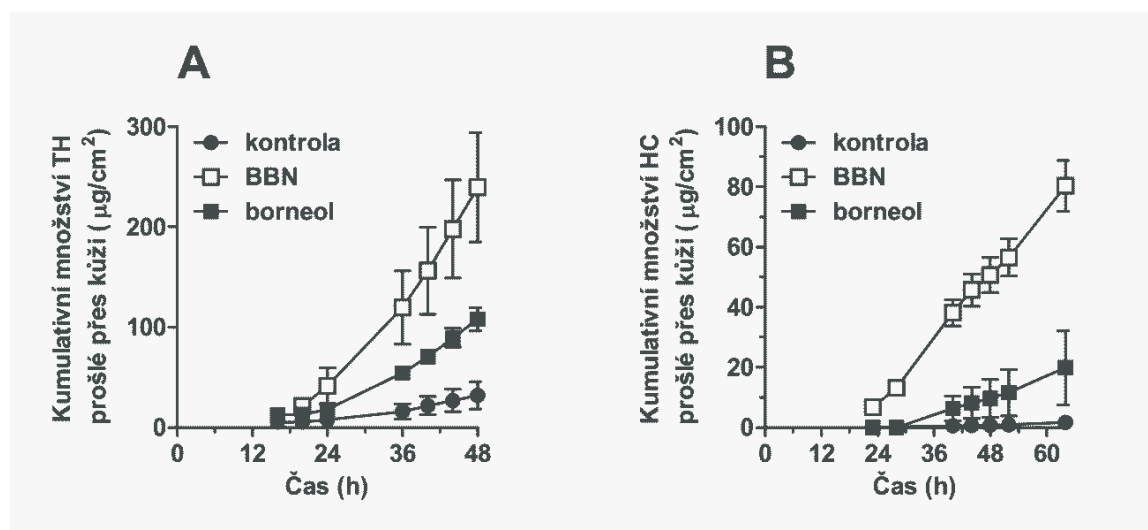
Obr. 6. Permeační profily modelových léčiv theofylinu (TH, 5% suspenze v 60% propylenglykolu; graf vlevo) a hydrokortisonu (HC, 2% suspenze v 60% propylenglykolu; graf vpravo) bez akceleraantu (kontrola) a s přidavkem DDAK a dodekanolu (oba 30 mM). $n \geq 3$.



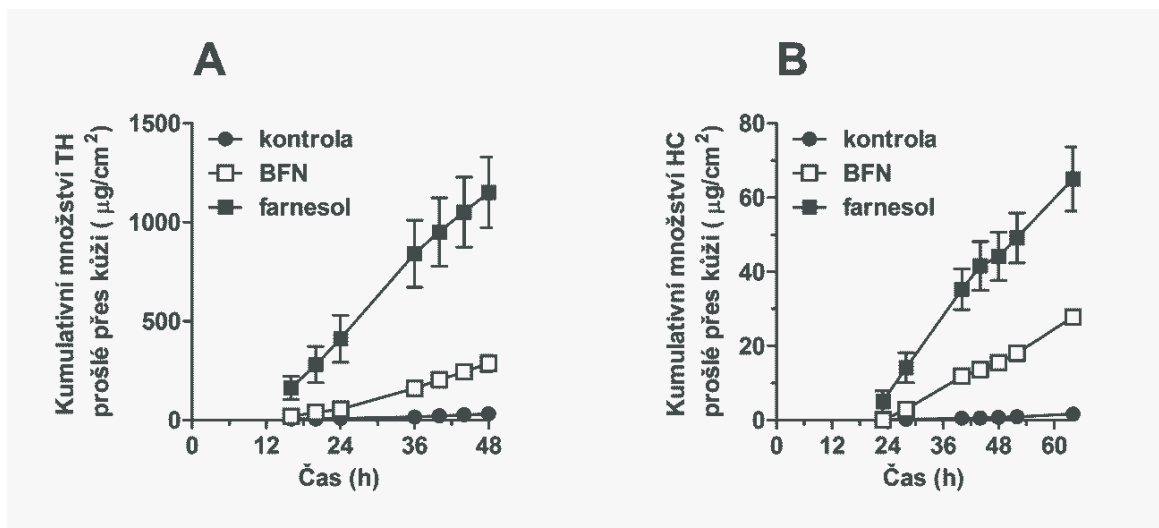
Obr. 7. Permeační profily modelových léčiv theofylinu (TH, 5% suspenze v 60% propylenglykolu; graf vlevo) a hydrokortisonu (HC, 2% suspenze v 60% propylenglykolu; graf vpravo) bez akceleraantu (kontrola) a s přidavkem BCN a citronelolu (oba 30 mM). $n \geq 3$.



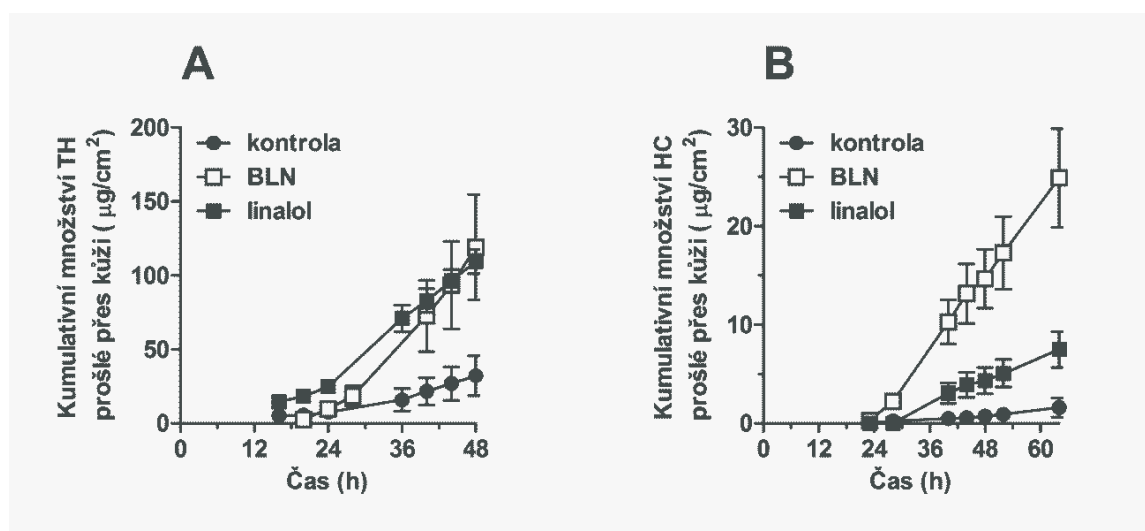
Obr. 8. Permeační profily modelových léčiv theofylinu (TH, 5% suspenze v 60% propylenglykolu; graf vlevo) a hydrokortisonu (HC, 2% suspenze v 60% propylenglykolu; graf vpravo) bez akcelarantu (kontrola) a s přidavkem BMN a mentholu (oba 30 mM). $n \geq 3$.



Obr. 9. Permeační profily modelových léčiv theofylinu (TH, 5% suspenze v 60% propylenglykolu; graf vlevo) a hydrokortisonu (HC, 2% suspenze v 60% propylenglykolu; graf vpravo) bez akcelarantu (kontrola) a s přidavkem BBN a borneolu (oba 30 mM). $n \geq 3$.



Obr. 10. Permeační profily modelových léčiv theofylinu (TH, 5% suspenze v 60% propylenglykolu; graf vlevo) a hydrokortisonu (HC, 2% suspenze v 60% propylenglykolu; graf vpravo) bez akcelarantu (kontrola) a s přidavkem BFN a farnesolu (oba 30 mM). $n \geq 3$.



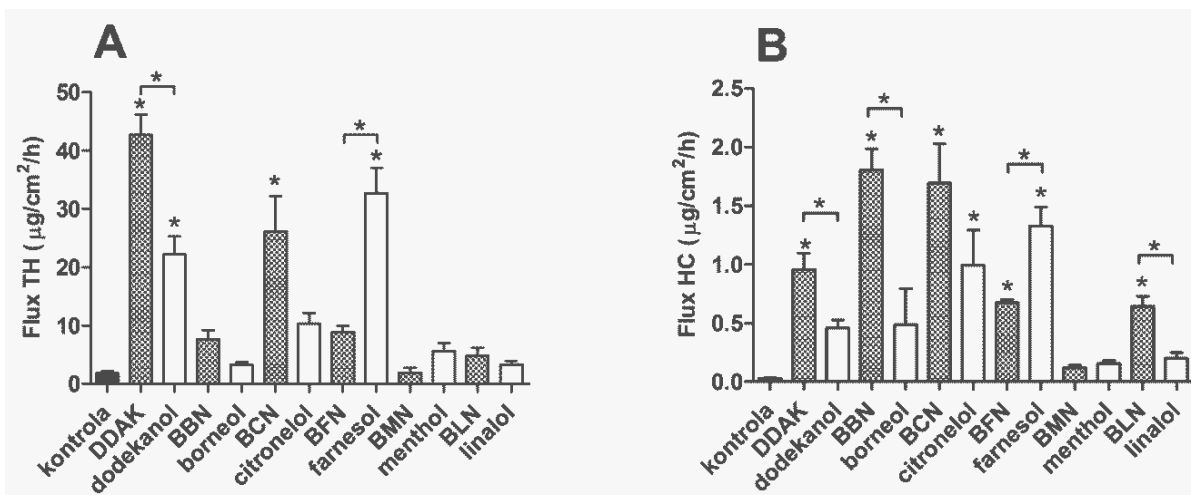
Obr. 11. Permeační profily modelových léčiv theofylinu (TH, 5% suspenze v 60% propylenglykolu; graf vlevo) a hydrokortisonu (HC, 2% suspenze v 60% propylenglykolu; graf vpravo) bez akcelarantu (kontrola) a s přidavkem BLN a linalolu (oba 30 mM). $n \geq 3$.

Směrnice přímek z permeačních profilů sloužily k výpočtu fluxu léčiva, tzn. množství léčiva, které prostoupí jednotkou plochy kůže za jednotku času. Účinnost každé z připravených látek byla srovnávána s původním terpenem, dodekanolem a DDAK. Jako kontrola sloužily vzorky obsahující pouze modelové léčivo v 60% roztoku propylenglykolu. Výsledky jsou shrnuty v grafech na obr 12, hodnoty fluxů obou modelových léčiv a akceleračních poměrů pro všechny zkoumané látky shrnuje tab. 6.

Hodnoty fluxu činily u kontrolních vzorků $1,9 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ pro theofylin a $26 \pm 7 \text{ng}/\text{cm}^2/\text{h}$ pro hydrokortison.

Pro léčivo theofylin vykazoval akcelerační účinek ester citronelolu BCN (hodnota fluxu $26,2 \pm 6,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, akcelerační poměr byl tedy 13,7). Tato hodnota však nepředčila účinek DDAK (flux theofylinu byl $42,7 \pm 3,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, akcelerační poměr 22,5). Zajímavá byla hodnota fluxu v přítomnosti farnesolu ($32,7 \pm 4,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, akcelerační poměr 17,2), což je vyšší hodnota, než účinek připraveného esteru BFN.

U modelového léčiva hydrokortisonu vykazovaly statisticky signifikantní zvýšení jeho fluxu čtyři připravené estery (BLN, BFN, BCN, BBN). Hodnota fluxu hydrokortisonu v přítomnosti DDAK byla $957 \pm 139 \text{ng}/\text{cm}^2/\text{h}$ (akcelerační poměr 36,8). Estery BFN a BLN tento flux nepředčily. Nicméně látky BCN a BBN zvyšovaly flux theofylinu více než DDAK, a to $1696 \pm 331 \text{ng}/\text{cm}^2/\text{h}$ (BCN) a $1805 \pm 182 \text{ng}/\text{cm}^2/\text{h}$ (BBN). Významný byl opět flux farnesolu ($1326 \pm 164 \text{ng}/\text{cm}^2/\text{h}$), který též předčil DDAK, stejně jako citronelol (flux $989 \pm 303 \text{ng}/\text{cm}^2/\text{h}$). Překvapivá byla velmi nízká hodnota fluxu u mentholu i jeho esteru s 6-(dimethylamino)hexanovou kyselinou.



Obr. 12. Srovnání hodnot fluxu modelových léčiv theofylinu (TH, 5% suspenze v 60% propylenglykolu; graf A) a hydrokortisonu (HC, 2% suspenze v 60% propylenglykolu; graf B) přes lidskou kůži bez akcelarantu (kontrola) a s přidavkem 30 mM připravených akcelarantů. $n \geq 3$; * značí statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou nebo mezi esterem a příslušným alkoholem na hladině významnosti $p < 0.05$.

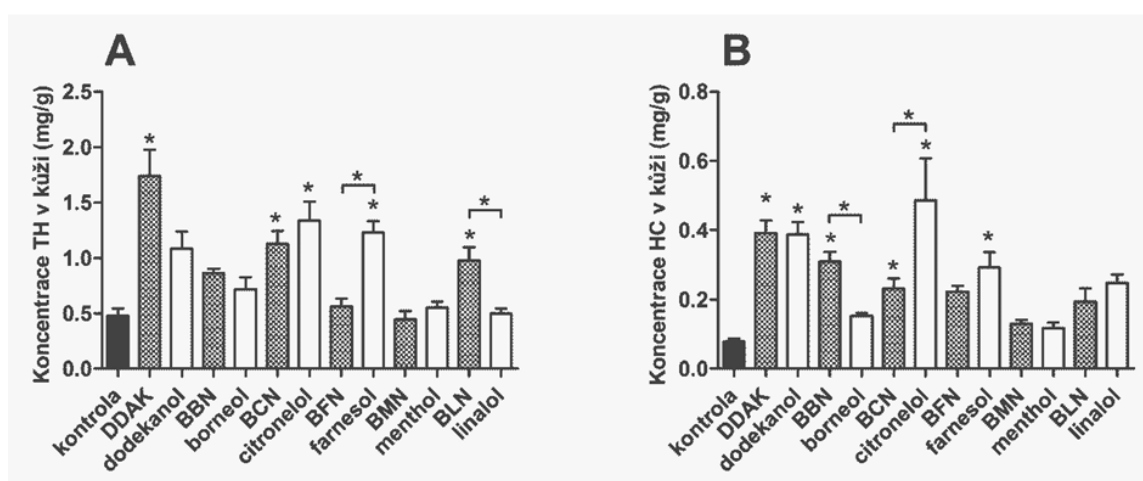
léčivo	Theofylin		Hydrokortison	
látka	flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	AP	flux [$\text{ng}/\text{cm}^2/\text{h}$]	AP
kontrola	$1,9 \pm 0,3$	-	26 ± 7	-
DDAK	$42,7 \pm 3,6$	22	957 ± 139	37
dodekanol	$22,2 \pm 3,0$	12	458 ± 69	17
BBN	$7,6 \pm 1,6$	4,0	1805 ± 182	69
borneol	$3,3 \pm 0,4$	1,7	488 ± 305	19
BCN	$26,2 \pm 6,0$	14	1696 ± 331	65
citronelol	$10,3 \pm 1,9$	5,4	989 ± 303	38
BFN	$8,8 \pm 1,1$	4,6	674 ± 26	26
farnesol	$32,7 \pm 4,3$	17	1326 ± 164	51
BMN	$1,9 \pm 0,8$	1,0	119 ± 20	4,6
menthol	$5,6 \pm 1,4$	3,0	154 ± 25	5,9
BLN	$4,8 \pm 1,4$	2,5	642 ± 83	25
linalol	$3,4 \pm 0,6$	1,8	202 ± 49	7,8

Tab. 6. Hodnoty fluxů a akceleračních poměrů všech látek pro theofylin i hydrokortison včetně kontrol. AP značí akcelerační poměr.

Koncentraci modelových léčiv v kůži po ukončení pokusu ukazují grafy A a B na obrázku 13.

Koncentrace modelového léčiva theofylinu v kůžích byly pro všechny zkoumané látky i jejich výchozí terpeny nižší, než při použití DDAK jako akceleraantu. Lze tedy vyvodit, že připravené látky mají vliv spíše na permeaci, než na penetraci a kumulaci theofylinu v lidské kůži.

Pro modelové léčivo hydrokortison způsobil citronelol vyšší kumulaci léčiva v kůži než u DDAK. U všech ostatních tepenů i připravených látek byla kumulace hydrokortisonu v kůži nižší, než při použití DDAK. Látky tedy i u hydrokortisonu spíše než penetraci a kumulaci zvyšují jeho permeaci přes kůži.



Obr. 13. Srovnání koncentrace modelových léčiv theofylinu (TH, 5% suspenze v 60% propylenglykolu; graf A) a hydrokortisonu (HC, 2% suspenze v 60% propylenglykolu; graf B) v lidské kůži bez akceleraantu (kontrola) a s přidavkem 30 mM připravených akceleraantů. $n \geq 3$; * značí statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou nebo mezi esterem a příslušným alkoholem na hladině významnosti $p < 0.05$.

5 Závěr

Bylo připraveno a studováno pět esterů 6-(dimethylamino)hexanové kyseliny s terpenickými alkoholy (citronelol, menthol, borneol, farnesol a linalol).

Pro modelové léčivo theofylin vykazoval ester citronelolu sice větší aktivitu než původní terpen, nepředčil však účinek DDAK, ostatní estery významně nepředčily účinek původních terpenů ani DDAK.

Pokud je jako modelové léčivo použit hydrokortison, ukazují se dvě z látek (ester borneolu - BBN a citronelolu - BCN) jako slibné akceleranty, účinnější než DDAK. Ostatní látky vykazovaly aktivitu nižší než DDAK.

Co se týče studia vlivu esterů na zvýšení koncentrace léčiv v kůži, ani jedna z připravených látek nezvyšovala penetraci více než DDAK a to ani u jednoho z modelových léčiv. Tudíž látky fungují spíše jako akceleranty permeace, než penetrace léčiv.

Závěrem lze říci, že jako nadějně akceleranty permeace, které si zaslouží další zkoumání, se jeví estery citronelolu (BCN) a borneolu (BBN).

6 Použité zkratky

AP akcelerační poměr

DDAK dodecylester 6-(dimethylamino)hexanové kyseliny

DIPEAN, *N*-diisopropylethylamin

DMA dimethylamin

DMAP 4-dimethylaminopyridin

HC hydrokortison

HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IČ infračervené spektrum

IPP isopentenylidifosfát

MS hmotnostní spektrometrie

NMR nukleární magnetická rezonance

PBS izotonický fosfátový pufr (pH 7,4)

PG propylenglykol

R_f retenční faktor

SEM standardní chyba

TEA triethylamin

TH theofylin

THF tetrahydrofuran

TLC tenkovrstvá chromatografie

UV ultrafialové spektrum

WSC *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid

7 Literatura

1. A. C. Williams, B. W. Barry. Penetration enhancers. *Adv. Drug Del. Rev.* 2004, Sv. 56, stránky 603-618.
2. J. Novotný, P. Kovaříková, M. Novotný, B. Janušová, A. Hrabálek, K. Vávrová. Dimethylamino acid esters as biodegradable and reversible transdermal permeation enhancers: effects of linking chain length, chirality and polyfluorination. *Pharm. Res.* 2009, Sv. 26, stránky 811-821.
3. M. Aquil, A. Ahad, Y. Sultana, A. Ali. Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discov. Today.* December 2007, Sv. 12, stránky 1061-1067.
4. Benson, H. A. E. Transdermal drug delivery: Penetration enhancement techniques. *Curr. Drug Deliv.* 2005, Sv. 2, stránky 23-33.
5. B.J. Thomas, B. C. Finnin. The transdermal revolution. *Drug Discov. Today.* 2004, Sv. 9, 16, stránky 697-703.
6. A. Hrabálek, P. Doležal, Z. Šklubalová et al. Akceleranty transdermální penetrace. *Chem. Listy.* 1999, Sv. 93, stránky 107-119.
7. B.C.Finnin, T.M.Morgan. Transdermal penetration enhancers: Applications, limitations, and potential. *J. Pharm. Sci.* 1999, Sv. 88, stránky 955-958.
8. T.M.Suhonen, J.A.Bouwstra, A.Urtti. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J. of Control. Rel.* 1999, Sv. 59, stránky 149-161.
9. A. Hrabálek, K. Vávrová. Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékařství.* 2005, Sv. 1, stránky 8-10.
10. B.W.Barry. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. of Pharm. Sci.* 2001, Sv. 14, stránky 101-114.
11. Barry, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Control. Release.* 1987, Sv. 6, stránky 85-97.
12. Nováček, F. *Fytochemické základy botaniky.* Olomouc : Fontána, 2009. 978-80-7336-457-1.
13. J. Hubík, J. Dušek, J. Spilková. *Farmakognosie I: obecná část a primární látky.* Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1989.
14. S. Songkro, G. Becket, T. Rades. The effects of p-menthane monoterpenes and related compounds on the percutaneous absorption of propranolol hydrochloride across newborn pig skin: II. Infrared spectroscopic and thermal analysis investigations. *S.T.P. Pharma Sciences.* 2003, Sv. 13, stránky 397-404.
15. P. A. Cornwell, B. W. Barry, J. A. Bouwstra, G. S. Gooris. Modes of action of terpene penetration enhancers in human skin; differential scanning calorimetry, small-angle X-ray diffraction and enhancer uptake studies. *Int. J. Pharmaceut.* 1996, Sv. 127, stránky 9-26.
16. S. T. K. Narishetty, R. Panchagnula. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes. *J. Control. Release.* 2004, Sv. 95, stránky 367-379.

17. A. K. Jain, N. S. Thomas, R. Panchagnula. Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride. I Effect of terpenes. *J. Control. Release.* 2002, Sv. 72, stránky 93-101.
18. Dunphy, P. J. Location and biosynthesis of monoterpenyl fatty acyl esters in rose petals. *Phytochem.* 2006, Sv. 67, stránky 1110-1119.
19. J. L. Quintans-Júnior, T. T. Souza, B. S. Leite, N.M.N. Lessaa, L.R. Bonjardim, M.R.V. Santos, P.B. Alves, A.F. Blank, A.R. Antonioli. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine.* 2008, Sv. 15, stránky 619-624.
20. H. Takadaa, E. Yonemochia, Ch. Iida, N. Ohtab, I. Hattab, K. Terada. Effect of various vehicles on skin permeation of ondansetron hydrochloride, and their mechanism of permeation enhancement. *Asian J. Pharm. Sci.* 2009, Sv. 4 (2), stránky 81-88.
21. B. Sapra, S. Jain, A. K. Tiwary. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: Mechanistic view. *AAPS J.* 2008, Sv. 10, stránky 120-132.
22. R. B. Croteau, E. M. Davis, K. L. Ringer, M. R. Wildung. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften.* 2005, Sv. 92, stránky 562-577.
23. M. Fujii, Y. Takeda, M. Yoshida, N. Utoguchi, M. Matsumoto, Y. Watanabe. Comparison of skin permeation enhancement by 3-l-menthoxypropane-1,2-diol and l-menthol: the permeation of indomethacin and antipyrine through Yucatan micropig skin and changes in infrared spectra and X-ray diffraction patterns of stratum corneum. *Int. J. Pharmaceut.* 2003, Sv. 258, stránky 217-223.
24. T. T. Kararli, C. F. Kirchoff, S. C. Penzotti, Jr. Enhancement of transdermal transport of azidothymidine (AZT) with novel terpene and terpene-like enhancers: in vivo-in vitro correlations. *J. Control. Release.* 1995, Sv. 34, stránky 43-51.
25. A. Arellano, S. Santoyo, C. Martin, P. Ygartua. Enhancing effect of terpenes on the in vitro percutaneous absorption of diclofenac sodium. *Int. J. Pharmaceut.* 1996, Sv. 130, stránky 141-145.
26. P. W. Stott, A. C. Williams, B. W. Barry. Transdermal delivery from eutectic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. *J. Control. Release.* 1998, Sv. 50, stránky 297-308.
27. P.- Ch. Wu, J.- S. Chang, Y.- B. Huang, Ch.- Y. Chai, Y.- H. Tsai. Evaluation of percutaneous absorption and skin irritation of ketoprofen through rat skin: in vitro and in vivo study. *Int. J. Pharmaceut.* 2001, Sv. 222, stránky 225-235.
28. Y. S. R. Krishnaiah, M. S. Kumar, V. Raju, M. Lakshmi, B.Rama. Penetration-enhancing effect of ethanolic solution of menthol on transdermal permeation of ondansetron hydrochloride across rat epidermis. *Drug Deliv.* 2008, Sv. 15, stránky 227-234.
29. J. R. Kunta, V. R. Goskonda, H. O. Brotherton. Effect of menthol and related terpenes on the percutaneous absorption of propranolol across excised hairless mouse skin. *J. Pharm. Sci.* 1997, Sv. 86, stránky 1369-1373.
30. S. Gao, J. Singh. In vitro percutaneous absorption enhancement of a lipophilic drug tamoxifen by terpenes. *J. Control. Release.* 1998, Sv. 51, stránky 193-199.
31. A. Okyar, M. Nuriyev, A. Yildiz, Z. Pala-Kara, N. Ozturk, E. Kaptan. The effect of terpenes on percutaneous absorption of tiaprofenic acid gel. *Arch. Pharm. Res.* 2010, Sv. 33, stránky 1781-1788.

32. M. Rizwan, M. Aqil, A. Ahad, Y. Sultana, M. M. Ali. Transdermal delivery of valsartan: I. effect of various terpenes. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2008, Sv. 34, stránky 618-626.
33. M. J. Péres-Alonso, A. Velasco-Negueruela, M. Emin Duru, M. Harmandar, J. L. Esteban. Composition of the Essential Oils of *Ocimum basilicum* var. *glabratum* and *Rosmarinus officinalis* from Turkey. *J. Essent. Oil Res.* 1995, Sv. 7, stránky 73-75.
34. J. Hubík, J. Dušek, A. Řezáčová et al. *Obecná farmakognosie II: sekundární látky*. Praha : Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1986.
35. Ying Cui, Lingzhi Li, Li Zhang, Jianyu Li, Jun Gu, Haiying Gong, Peng Guo, Wei Tong. Enhancement and mechanism of transdermal absorption of terpene- induced propranolol hydrochlorid. *Arch. Pharm. Res.* 2011, Sv. 34, stránky 1477-1485.
36. T. Gotto, Y-I. Kim, K. Funakoshi, A. Teraminami, T. Uemura, S. Hirai, J.- Y. Lee, M. Makishima, R. Nakata, H. Inoue, H. Senju, M. Matsunaga, F. Horio, N. Takahashi, T. Kawada. Farnesol, an isoprenoid, improves metabolic abnormalities in mice via both PPAR α -dependent and -independent pathways. *A. J. Physiol.- Endocrin. M.* 2011, Sv. 301, stránky E1022-E1032.
37. A. Nokhodchi, K. Sharabiani, M.R. Rashidi, T. Ghafourian. The effect of terpene concentrations on the skin penetration of diclofenac sodium. *Int. J. Pharmaceut.* 2007, Sv. 335, stránky 97-105.
38. L. Kang, X.Y. Liu, P.D. Sawant, P.C. Ho, Y.W. Chan, S.Y. Chan. SMGA gels for the skin permeation of haloperidol. *J. Control. Release.* 2005, Sv. 106, stránky 88-98.
39. J.- Y. Fang, T.- H. Tsai, Y.- Y. Lin, W.- W. Wong, a M.- N. Wang, J.- F. Huang. Transdermal delivery of tea catechins and theophylline enhanced by terpenes: a mechanistic study. *Biol. Pharm. Bull.* 2007, Sv. 30 (2), stránky 343-349.
40. M. Emamghoreishi, M. Khasaki, M. F. Aazam. *Coriandrum sativum*: evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus - maze. *J. Etnopharmacol.* 2005, Sv. 96, stránky 365-370.
41. H. K. Vaddi, P. C. Ho, Y. W. Chan, S. Y. Chan. Terpenes in ethanol: haloperidol permeation and partition through human skin and stratum corneum changes. *J. Control. Release.* 2002, Sv. 81, stránky 121-133.
42. K. Vávrová, P. Kovaříková, B. Školová, M. Líbalová, J. Roh, R. Čáp, A. Holý, A. Hrabálek. Enhanced topical and transdermal delivery of antineoplastic and antiviral acyclic nucleoside phosphonate cPr-PMEDAP. *Pharm. Res.* 2011, Sv. 28, stránky 3105-3115.
43. K. Vávrová, K. Lorencová, J. Novotný, A. Holý, A. Hrabálek. Permeation enhancer dodecyl 6-(dimethylamino)hexanoate increases transdermal and topical delivery of adefovir: Influence of pH, ion-pairing and skin species. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008, Sv. 70, stránky 901-907.