

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

# **Diplomová práce**

**2006**

**MICHAL NOVOTNÝ**

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra anorganické a organické chemie**



**Syntéza a hodnocení derivátů dikarboxylových kyselin  
jako akcelerantů transdermální permeace**

**HRADEC KRÁLOVÉ**  
**2006**

**MICHAL NOVOTNÝ**

Za odborné konzultace děkuji PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D.

# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>2</b>
<b>1. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....</b>	<b>3</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Úvod.....</b>	<b>4</b>
2.1.1. <i>Struktura kůže.....</i>	<i>5</i>
2.1.2. <i>Bariérová funkce kůže – Stratum corneum.....</i>	<i>6</i>
2.1.3. <i>Ceramidy a volné mastné kyseliny.....</i>	<i>6</i>
2.1.4. <i>Cesty prostupu látek přes kůži.....</i>	<i>7</i>
<b>2.2. Akceleranty transdermální penetrace .....</b>	<b>8</b>
2.2.1. <i>Obecná definice akceleračních látek.....</i>	<i>8</i>
2.2.2. <i>Mechanismus účinku akceleračních látek.....</i>	<i>9</i>
2.2.3. <i>Přehled užívaných akceleračních látek.....</i>	<i>10</i>
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Chemikálie a instrumentální vybavení .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Syntéza .....</b>	<b>15</b>
3.2.1. <i>Deriváty kyseliny maleinové, fumarové a jantarové.....</i>	<i>15</i>
3.2.1.1. <i>Didodecylester kyseliny maleinové .....</i>	<i>16</i>
3.2.1.2. <i>Didodecylester kyseliny fumarové.....</i>	<i>17</i>
3.2.1.3. <i>Didodecylester kyseliny jantarové .....</i>	<i>17</i>
3.2.1.4. <i>Monododecylester kyseliny maleinové .....</i>	<i>18</i>
3.2.1.5. <i>Dodecylmethylester kyseliny maleinové.....</i>	<i>18</i>
3.2.1.6. <i>Dodecylmethylester kyseliny fumarové.....</i>	<i>19</i>
3.2.1.7. <i>Monododecylester kyseliny jantarové.....</i>	<i>19</i>
3.2.2. <i>Deriváty kyseliny L-vinné a mesovinné .....</i>	<i>20</i>
3.2.2.1. <i>Didodecylester kyseliny L-vinné .....</i>	<i>21</i>
3.2.2.2. <i>Didodecylester kyseliny mesovinné.....</i>	<i>22</i>
3.2.2.3. <i>Acetonid didodecylesteru kyseliny L-vinné.....</i>	<i>22</i>
3.2.2.4. <i>Acetonid didodecylesteru kyseliny mesovinné .....</i>	<i>23</i>
3.2.2.5. <i>Karbonát didodecylesteru kyseliny L-vinné.....</i>	<i>23</i>
3.2.2.6. <i>Karbonát didodecylesteru kyseliny mesovinné .....</i>	<i>24</i>
<b>3.3. Hodnocení akcelerační aktivity .....</b>	<b>25</b>
3.3.1. <i>Příprava kůže pro permeaci.....</i>	<i>25</i>
3.3.2. <i>Příprava donorových vzorků .....</i>	<i>25</i>
3.3.3. <i>Permeační experimenty .....</i>	<i>25</i>
3.3.4. <i>HPLC stanovení teofylinu.....</i>	<i>26</i>
3.3.5. <i>Zpracování dat.....</i>	<i>26</i>
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>27</b>
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>38</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>39</b>

## SEZNAM ZKRATEK

<b>AM</b> <b>V</b>	didodecylester acetonidu kyseliny mesovinné
<b>AP</b>	akcelerační poměr
<b>AV</b>	didodecylester acetonidu kyseliny vinné
<b>CM</b> <b>V</b>	didodecylester karbonátu kyseliny mesovinné
<b>CV</b>	didodecylester karbonátu kyseliny vinné
<b>ER</b>	akcelerační poměr (z angl. enhancement ratio)
<b>F</b>	didodecylester kyseliny fumarové
<b>F1</b>	dodecylmethylester kyseliny fumarové
<b>IPM</b>	izopropylmyristát
<b>IR</b>	infračervené spektrum (z angl. infrared spectrum)
<b>J</b>	didodecylester kyseliny jantarové
<b>JOH</b>	monododecylester kyseliny jantarové
<b>J<sub>th</sub></b>	flux theofylinu
<b>M</b>	didodecylester kyseliny maleinové
<b>M1</b>	dodecylmethylester kyseliny maleinové
<b>MO</b> <b>H</b>	monododecylester kyseliny maleinové
<b>MV</b>	didodecylester kyseliny mesovinné
<b>NM</b> <b>R</b>	nukleární magnetická rezonance
<b>PG</b>	propylenglykol
<b>SC</b>	stratum corneum
<b>V</b>	didodecylester kyseliny vinné

# 1. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo sledovat vztahy mezi strukturou a účinkem derivátů dikarboxylových kyselin jako potenciálních akceleračních transdermálních permeací.

V rámci syntetické části práce byla připravena série derivátů kyseliny maleinové, fumarové, jantarové, vinné a mesovinné. Tyto struktury byly zvoleny na základě předchozí práce<sup>1</sup>, v níž byly studovány syntetické analogy ceramidů. Nejlepších akceleračních aktivit bylo dosaženo s derivátem kyseliny maleinové. V této práci byla jako základ navržena zjednodušená forma této struktury – ester dikarboxylové kyseliny. Délka hydrofobní části byla zvolena na základě předchozích prací<sup>2</sup>, ze kterých vyplývá, že optimální délka řetězce akceleračního se pohybuje mezi 10 až 12 uhlíky.

Akcelerační aktivita připravených látek byla zkoumána in vitro pomocí Franzovy cely. Jako modelové léčivo byl použit theofylin a jako modelová membrána prasečí kůže plné tloušťky. Akcelerační byly studovány ze tří vehikul různé polarity.

Na základě získaných akceleračních aktivit jsem se pokusil zodpovědět několik následujících otázek: Jaký vliv má na akcelerační účinnost:

- jednoduchá či dvojná vazba v molekule kyseliny,
- *cis*- nebo *trans*-izomerie na dvojných vazbách kyseliny,
- prostorové uspořádání u diastereoizomerů,
- přítomnost jednoho či dvou hydrofobních řetězců.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Úvod<sup>3,4</sup>

Transdermální podání léčiv je systémové podání léčiv přes kůži do krevního či lymfatického oběhu. Důvodů, proč zvolit právě tento způsob aplikace, může být hned několik:

- vyloučení first-pass efektu po průchodu játry,
- vyloučení nežádoucího dráždění trávicího traktu,
- vyloučení fyzikálně-chemických interakcí s potravou či současně podávanými léky,
- možnost udržovat stabilnější hladinu léčiva v plazmě po dlouhou dobu,
- možnost rychlého přerušování přívodu léčiva (např. v případě nežádoucích účinků),
- menší traumatizace pacienta a zlepšení compliance,
- pro aplikaci není třeba školený zdravotnický personál.

Přestože dnes již není neporušená lidská kůže považována za neprostupnou bariéru, je transdermální penetrace pro většinu exogenních látek poměrně obtížná. K průniku skrze kůži by léčiva měla mít kombinaci následujících fyzikálně-chemických vlastností:

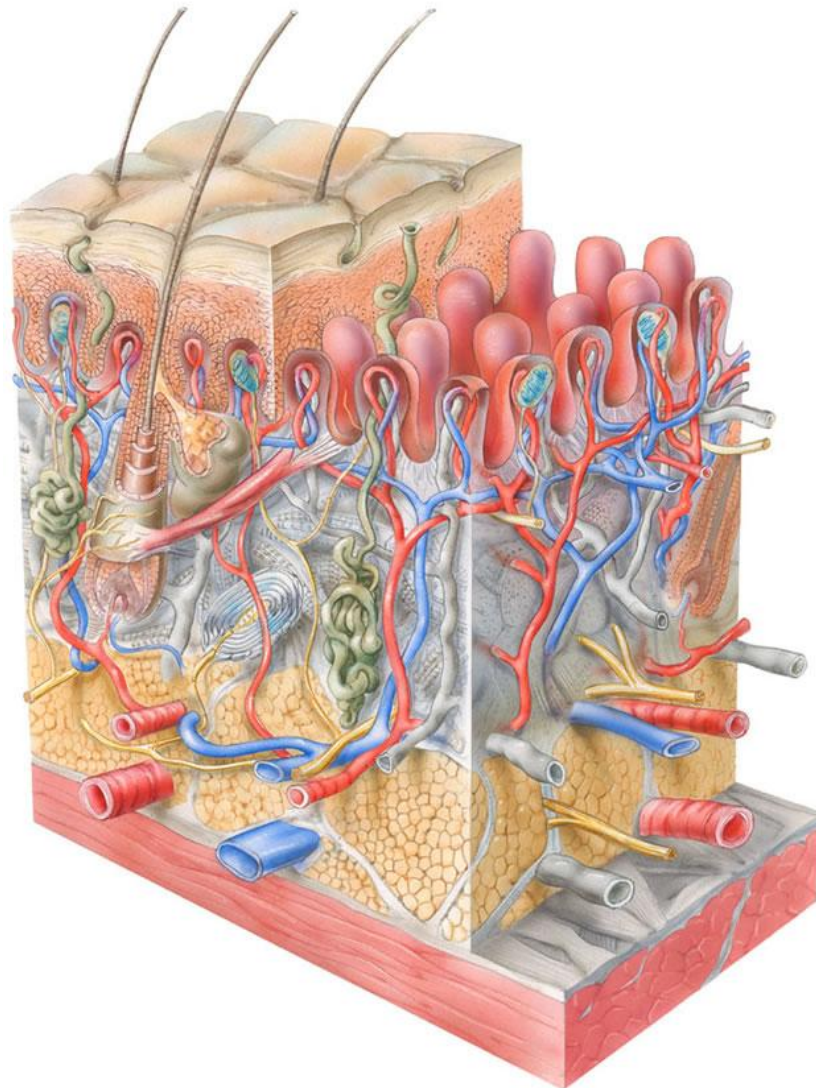
- nízká molekulová hmotnost (méně než 400 g/mol),
- vyvážená lipofilita,
- nízká teplota tání,
- denní terapeutická dávka by měla být nižší než 10 mg.

Většina léčiv však tyto požadavky nesplňuje. Jedna z možností k překonání kožní bariéry je použití akceleračních transdermálních penetračních činidel.

Možnost transdermální aplikace léčiv se ukazuje do budoucna jako velmi výhodná. V současné době jsou již v České republice registrovány přípravky pro transdermální podání (například moderní hormonální kontraceptivum Evra<sup>®</sup> v transdermální náplasti či vysoce účinné anodynum fentanyl v transdermálním přípravku Durogesic<sup>®</sup>). Dá se předpokládat, že další léčivé látky budou na českém trhu rychle přibývat.

### 2.1.1. Struktura kůže

Kůže (obrázek 1) savců je složena ze dvou hlavních vrstev – vnitřní dermis a vnější, nevaskularizované epidermis. **Dermis** je tvořena fibroblasty a extracelulární matrix; také je bohatě protkána kapilárami a nervovými zakončeními<sup>5</sup>. **Epidermis** je z 95 % tvořena keratinocyty, melanocyty, a dále Langerhansovými a Merkelovými buňkami. Epidermis se dělí na čtyři vrstvy: stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum a stratum corneum<sup>6</sup>. Buňky se v těchto vrstvách nacházejí v odlišných stádiích diference, ale všechny mají původ v buňce základní vrstvy a postupně se migrací dostávají na povrch kůže. V tomto směru se také snižuje koncentrace kyslíku a živin. Buňky se zplošťují, orgány se postupně rozpadají a dochází v nich k ukládání keratinu. Výsledkem procesu zvaného keratinizace je tvorba kožní bariéry<sup>7</sup>.



obrázek 1 – Struktura kůže<sup>8</sup>



### 2.1.2. Bariérová funkce kůže – Stratum corneum

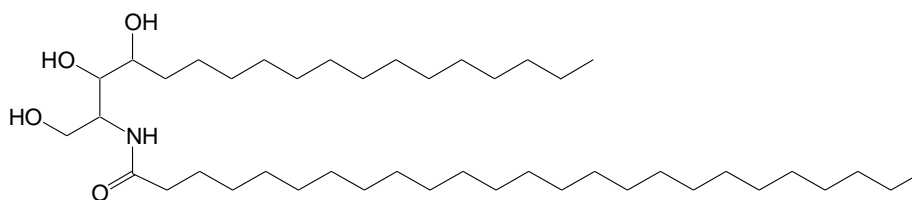
Bariérová funkce kůže je dána nejsvrchnější vrstvou epidermis – vrstvou zvanou stratum corneum (SC). Stratum corneum je tvořeno korneocyty (čili keratinocyty, jež jsou ve finální fázi diferenciaci) a lipidickou matrix<sup>9</sup>.

Lidské stratum corneum má obvykle 18–21 vrstev<sup>10</sup>. Sušinu tvoří z největší části proteiny (75–80 %), mezi nimiž převažuje intrakorneocytární  $\alpha$ -keratin a malý podíl  $\beta$ -keratinu. Zbytek je směsí lipidů (5–15 %) lokalizovaných v mezibuněčných prostorech. Složení lipidů není obvyklé. Na rozdíl od ostatních tkání je stratum corneum prakticky prosté fosfolipidů. Lipidová matrix v mezibuněčných prostorech stratum corneum se skládá převážně z ceramidů (50 %), cholesterolu (20 %) a mastných kyselin (10 %). Menší část tvoří estery cholesterolu a cholesterolulfátu. Zajímavostí je, že se složení liší podle části těla<sup>11</sup>.

Při onemocněních kůže nebo po extrakci lipidů z kůže dochází ke vzrůstu kožní propustnosti, a to oběma směry. Naopak aplikace topických lékových forem s obsahem kožních lipidů anebo jejich analogů může pomoci obnovit funkci kožní bariéry<sup>12,13</sup>.

### 2.1.3. Ceramidy a volné mastné kyseliny

Ceramidy (*I*) jsou jedny z nejdůležitějších lipidů odpovědných za tvorbu kožní bariéry<sup>14,15</sup>. Strukturálně jde o heterogenní skupinu, skládající se z 9 různých podtypů<sup>16</sup>. Základ molekuly ceramidu tvoří aminoalkohol sfingosin, fytosfingosin, nebo 6-hydroxysfingosinem s průměrnou délkou řetězce 18 uhlíků. Mastné kyseliny jsou připojeny na primární aminoskupinu aminoalkoholu v pozici 2, a sice pomocí amidické vazby. Mastné kyseliny mohou být nehydroxylovány,  $\alpha$ -hydroxylovány nebo  $\omega$ -hydroxylovány, jsou převážně nasycené, nerozvětvené a delší než 18 uhlíků<sup>17</sup>. Ceramidy jsou naprosto nezbytné pro správnou funkci kožní bariéry a stabilitu kůže jako takovou<sup>18</sup>.



*I* (Ceramid 3)

#### 2.1.4. Cesty prostupu látek přes kůži

Transdermální absorpce do systémové cirkulace zahrnuje vstup látek přes stratum corneum, živou epidermis a svrchní část dermis. Průnik přes kožní bariéru stratum corneum je limitujícím faktorem celého procesu; živá epidermis je hlavní bariérou pouze pro vstup extrémně lipofilních sloučenin<sup>19,20</sup>.

Existují tři potenciální možnosti, jak proniknout do systému přes kožní bariéru. Většina látek vstupuje přes stratum corneum. Zde můžeme uvažovat o dvou možnostech: *intracelulární vstup* (syn. transcelulární) přes korneocyty a *intercelulární vstup* (syn. paracelulární) přes intercelulární lipidy. Vzhledem k tomu, že je lipidická fáze stratum corneum kontinuální, musí látky, které vstupují skrze kůži, s touto fází interagovat.

Již několikrát byly popsány vztahy mezi mírou kožního vstupu různých sloučenin a jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Bylo dokázáno, že schopnost tvořit vodíkové vazby, velikost a lipofilita molekuly jsou jedny z nejdůležitějších faktorů determinujících vstup kůží<sup>21,22,23</sup>.

Menší část látek, zejména látky vysoce lipofilní a látky mající velkou molekulovou hmotnost, využívá k vstupu přes kožní bariéru vlasových folikulů, mazových a potních žlázek<sup>24</sup>. Ty tvoří asi 0,01–0,1% kožního povrchu, proto je jejich podíl na permeaci běžných látek malý.

## 2.2. Akceleranty transdermální penetrace

### 2.2.1. Obecná definice akceleraantů

Akceleranty transdermální penetrace slouží k usnadnění hluboké permeace léčiv přes kůži do přilehlých tkání nebo k systémovému podání léčiv po jejich přechodu přes kůži do krevního či lymfatického oběhu<sup>25</sup>.

B. W. Barry v roce 1983 vyslovil 10 základních požadavků na ideální akceleraanty<sup>26</sup>:

1. Nesmí být toxické, nesmí alergizovat a dráždit kůži v místě podání.
2. Nesmějí mít svůj vlastní farmakodynamický účinek.
3. Nástup účinku má být okamžitý a jeho délka musí být předpověditelná.
4. Po odstranění akceleraantu z kůže se musí rychle obnovit její bariérová vlastnost.
5. Urychlení přestupu léčiva musí být jednosměrné – endogenní látky nesmějí přecházet vně kůže.
6. Akceleraanty musí být kompatibilní s léčivem a dalšími pomocnými látkami.
7. Akceleraanty mají být dobrými rozpouštědly léčiv.
8. Musí dobře ulpívat na kůži a jejich přítomnost nesmí pacient nepříjemně pociťovat.
9. Mají být uplatnitelné v lotích, suspenzích, mastech, krémech, gelech, aerosolech a kožních náplastech.
10. Mají být bezbarvé, bez zápachu, bez chuti, kosmeticky přijatelné a ekonomicky dostupné.

K výše uvedenému je třeba ještě dodat, že pro bezpečné terapeutické použití by měl být znám mechanismus účinku akceleraantů. Prozatím žádná látka nesplňuje požadavky na ideální akceleraant, a proto u dosud známých látek volíme kompromis mezi terapeutickým indexem a rizikem nežádoucích účinků, jež se projevují jako místní iritace kůže či nevratná změna bariérových funkcí kůže. Z těchto důvodů se stále hledají nové, vhodnější látky. Jako příspěvek k této problematice je zamýšlena i tato diplomová práce.

### 2.2.2. *Mechanismus účinku akceleraantů*

Působení akceleraantů na kůži může být rozčleněno na dvě úrovně. První z nich je penetrace látek do místa účinku, tedy do stratum corneum a druhou je vlastní působení ve stratum corneum.

Přesný mechanismus účinku akceleraantů není dosud znám. Je však patrně založen na jejich nespecifických interakcích se strukturami kůže. Velmi prostá klasifikace akceleraantů transdermální permeace je založena na lipidově-proteinové rozdělovací teorii. Akceleraanty mohou reagovat ve stratum corneum s intracelulárním keratinem, jsou schopny měnit domény intercelulárních lipidů nebo mění rozdělovací rovnováhy mezi stratum corneum a léčivem<sup>27,28,29,30</sup>.

#### a) Interakce s intercelulárními lipidy

Většina akceleraantů, které jsou účinné v klinicky přijatelných koncentracích, interaguje s intercelulárními lipidovými doménami stratum corneum<sup>31</sup>. Malé polární molekuly mohou přerušit vodíkové vazby, které drží u sebe molekuly ceramidů. Amfifilní akceleraanty mají schopnost vmezeřit se mezi lipidové lamely, a to tak, že polární hlava se umístí do polární části a hydrofobní řetězce mezi hydrofobní řetězce lipidů. Toto má za následek narušení uspořádání lipidů a fluidizaci lamelární struktury, což vede ke snížení odporu kožní bariéry<sup>32</sup>. Některé akceleraanty (např. olejová kyselina nebo terpeny) mohou ve vyšších koncentracích zapříčinit rozdělení fází v lamelách<sup>33</sup>. Vzniklé póry se tak stanou prostupnější pro polární látky. Některá rozpouštědla, jako je ethanol nebo dimethylsulfoxid, působí extrakci lipidů<sup>34,35</sup>.

#### b) Interakce s proteinovými strukturami

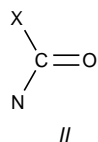
Tyto akceleraanty mohou ovlivňovat konformaci keratinu v korneocytech nebo proteinů v desmosomech. V porovnání s akceleraanty, které interagují s kožními lipidy, je jejich účinek poměrně slabý<sup>36</sup>. Nutno dodat, že většina konformačních změn proteinů je nevratných.

#### c) Ovlivnění rozdělovacích rovnováh

Některé akceleraanty, především malé molekuly, mají schopnost měnit rozdělovací rovnováhy mezi transdermálním systémem a stratum corneum, v rámci stratum corneum i mezi stratum corneum a živou epidermis a usnadňují tak prostup léčiva. Jedná se například o ethanol či propylenglykol.

### 2.2.3. Přehled užívaných akcelera<sup>37</sup>tů

Z pohledu chemického se jedná u akcelera<sup>37</sup>tů transdermální penetrace o skupinu velmi nejednotnou. Často však ve své molekule obsahují fragment přirozených hydratačních faktorů kůže. Nejjednodušší částí, vysledovanou v akceleračně účinných látkách, je fragment (II):



X zde představuje  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}-$ . V molekule by měl být přítomen také dlouhý (nejčastěji  $\text{C}_8$  až  $\text{C}_{20}$ ) přímý či rozvětvený alkylový nebo alkenylový řetězec, ve kterém mohou existovat izosterní obměny.

#### a) Alkoholy

Alkoholy jsou obvykle výbornými rozpouštědly léčiv, jsou tedy často součástí topických lékových forem, kde plní funkci jak rozpouštědla nebo kosolvens tak akcelera<sup>37</sup>ntu či koakcelera<sup>37</sup>ntu. Často jsou používány ve směsích s ostatními akcelera<sup>37</sup>nty. Nejjednodušším zástupcem je ethanol. Mechanismus účinku spočívá v extrakci lipidů z kůže. Ethanol však může ve vysokých koncentracích způsobit ireversibilní poškození kůže. Vyšší alkoholy se mohou vmezeřit mezi lipidy stratum corneum a narušit jejich uspořádání; optimální délka řetězce je 10–12 uhlíků<sup>2</sup>.

#### b) Polyoly

Polyoly jsou také používanými rozpouštědly léčiv a působí jako koakcelera<sup>37</sup>nty. Mechanismus jejich účinku spočívá jednak ve zvýšení koncentračního spádu léčiva na kůži a jednak při jejich prostupu do kůže také v náhradě vody vázané v mezibuněčném prostoru stratum corneum. Glycerol či propylenglykol mají často synergické účinky s amfifilními akcelera<sup>37</sup>nty, proto jedním z vehikul použitých pro studium akcelera<sup>37</sup>ční aktivity v této diplomové práci byl propylenglykol.

#### c) Sulfoxidy

Nejznámější látkou této skupiny je dimethylsulfoxid. Jde o výborné rozpouštědlo mnoha léčiv a má schopnost tvořit de<sup>37</sup>pa léčiva v kůži. Díky své polaritě také interaguje s hydrofilními skupinami lipidů, nahrazuje vodu v jejich hydratačních obalech a rozšiřuje tak hydrofilní oblasti mezibuněčného prostoru. Tím se usnadňuje průnik hydrofilních látek.

d) Mastné kyseliny<sup>39</sup>

Optimální délka nerozvětveného nasyceného řetězce mastných kyselin je 10 – 12 uhlíků, což zhruba odpovídá polovině délky ceramidů a mastných kyselin ve stratum corneum. Nenasycené deriváty v porovnání s nasycenými vykazují optimální délku řetězce 18 – 20 uhlíků.

Nejlépe je prozkoumáno působení kyseliny olejové. Ta svým E uspořádáním na dvojně vazbě, lokalizovaným uprostřed řetězce, narušuje organizované lipidové struktury, a tím zvyšuje jejich fluiditu. Druhá dvojná vazba v molekule obvykle přináší zvýšení urychlovací aktivity (např. kyselina linoleová), zatímco další dvojně vazby v molekule nemají již další efekt na urychlovací aktivitu (např. kyselina linolenová, arachidonová).

V testované skupině 5–14 uhlíkatých mastných kyselin a jejich izomerů, jak rozvětvených tak i nerozvětvených, byl popsán u všech látek stejný akcelerační efekt<sup>38</sup>.

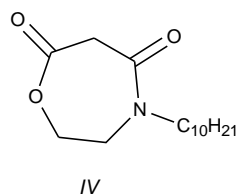
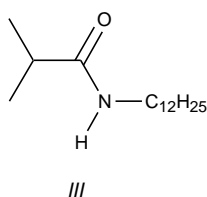
Porovnání akceleračních aktivit kyseliny olejové a kyseliny ricinolejové (12-hydroxyolejové) ukazuje, že hydroxylace řetězce má za následek ztrátu aktivity.

e) Amidy, aminy, laktamy<sup>39</sup>

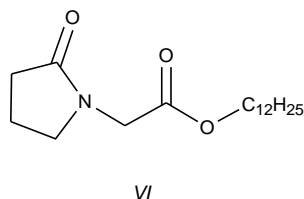
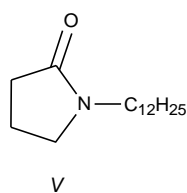
Z acyklických amidů vykazuje největší aktivitu N-dodecylizobutyramid (*III*) – je třikrát účinnější než Azone<sup>®</sup>, zatímco jeho N-substituované deriváty jsou méně aktivní. Zajímavostí je, že N,N-disubstituované acetamidy jsou účinnější než příslušné izobutyramidy. Dále můžeme říci, že přítomnost karboxylové skupiny u těchto sloučenin výrazně snižuje jejich akcelerační aktivitu.

Akcelerační aktivitu primárních, sekundárních, terciárních, cyklických a acyklických aminů porovnával Michniak<sup>40</sup>. Předlohou studovaným strukturám byly dodecylamin a didodecylamin. Aktivity N-substituovaných derivátů těchto aminů byly srovnatelné nebo nižší.

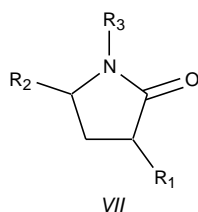
Ze série analog Azone<sup>®</sup> vykazoval význačný vzrůst aktivity pouze 4-decyl-1,4-oxazepan-5,7-dion (*IV*), zatímco aktivita jeho dodecylderivátu, s délkou řetězce jako má Azone<sup>®</sup>, byla velice nízká.



Z N-alkyl laktamů vykazoval největší aktivitu N-dodecyl derivát s pětičlenným laktamovým kruhem (V). Stejně tomu bylo i u derivátů – esterů s kyselinou octovou, kde největší akcelerační aktivitu (AP = 67) vykazovala látka (VI).

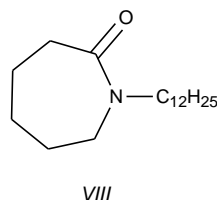


Důležitými zástupci skupiny laktamů jsou deriváty pyrrolidonu s obecným vzorcem (VII).



R<sub>1</sub> zde ve vzorci představuje vodík, alkyl nebo –OH skupinu, R<sub>2</sub> může být vodík, skupina -CH<sub>3</sub>, karboxyl, alkylkarboxyl (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>) a R<sub>3</sub> je vodík, alkyl (C<sub>1</sub> až C<sub>12</sub>), alkenyl či hydroxyethyl. Některé deriváty pyrrolidonu jsou součástí tzv. přirozeného hydratačního faktoru kůže, přičemž podporou hydratace dochází k usnadnění průniku léčiv. Jsou to také vynikající rozpouštědla léčiv.

Ve skupině ε-laktamů je nejprozkoumanější N-dodecyl-ε-kaprolaktam (VIII, N-dodecylazepan-2-on, Azone<sup>®</sup>):



Jedná se o lipofilní kapalinu dobře rozpustnou v kožních lipidech. Do systémové cirkulace se téměř neabsorbuje. Azone<sup>®</sup> je účinný akcelerační prostředek pro široký okruh látek hydrofilní i lipofilní povahy (s výjimkou vysoce lipofilních látek). Je použitelný pouze z polárního prostředí, v prostředí lipofilním je jeho účinek inhibován snížením termodynamické aktivity.

Mechanismus účinku Azone<sup>®</sup> spočívá v zakotvení jeho stabilní konformace (typu „soup-spoon“) vodíkovými můstky na vnější polární straně lipidické dvojvrstvy tak, že alkyl směřuje dovnitř a činí tuto dvojvrstvu více hydrofilní a méně viskózní. Azone<sup>®</sup> má na karbonylu elektronegativní oblast, ale nemá žádnou oblast elektropozitivní. Proto interkalace Azone<sup>®</sup> do dvojvrstvy zanechá nevyrovnané elektronegativní místo na ceramidu, čímž vznikne permeabilní defekt.

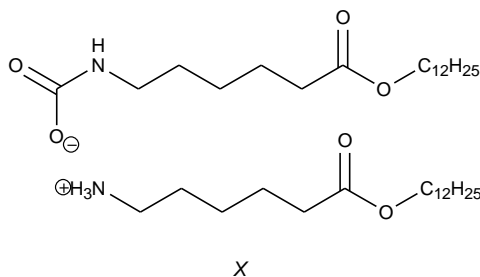
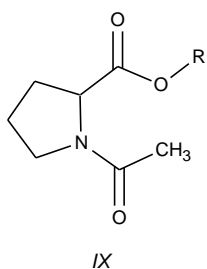
#### f) Aminokyseliny a jejich estery

Samotné L-aminokyseliny jsou popisovány jako akceleranty transdermální penetrace zejména pro steroidní látky. Působí pravděpodobně ovlivněním keratinové složky kůže.

Estery lysinu, u nichž je esterová část tvořena alkylem C<sub>5</sub> až C<sub>22</sub>, jsou použitelné nejen pro přestup látek přes kůži, ale i skrze sliznice včetně sliznice žaludeční.

Již v minulosti byla publikována práce zabývající se analogy ceramidů založených na aminokyselinách glycinu a serinu<sup>41</sup>. Deriváty glycinu vykazovaly největší aktivitu. Naopak u derivátů L-serinu znamenala při studiu akceleračních poměrů přítomnost hydroxymethyl skupiny významný pokles aktivity.

Z derivátů N-acetylprolinu (IX) s 5 – 18 uhlíkatými alkoholy, jež byly testovány na urychlení průniku léčiv kůží, se jako nejlepší ukázaly undecylester a dodecylester, které mají optimální délku řetězce a vyvážené hydrofilně-lipofilní vlastnosti. U oleylesteru je vysoká akcelerační aktivita dána přítomností *cis*-dvojně vazby.



Estery ω-aminokyselin byly navrženy jako acyklické analogy Azone<sup>®</sup>, které mohou být dále metabolizované na netoxické produkty. Aminoskupina esterů poskytuje možnost tvořit se vzdušným oxidem uhličitým sloučeniny struktury dvouřetězcových alkylamonium-alkylkarbamátů (X). Tyto sloučeniny jsou poměrně stabilní a lze je proto připravit s vysokým výtěžkem a čistotou

#### g) Deriváty močoviny

Močovina je další součástí přirozených hydratačních faktorů kůže a je již dlouho v dermatologii používána pro svůj hydratační efekt (do 7% koncentrace), jako keratolytikum (nad 7% koncentrace) a keratoplastikum. Jako akcelerační byla testována močovina samotná, tak i její deriváty a izosterní analoga.

Mechanismus účinku spočívá jednak v hydrataci stratum corneum, a při delším působení také v keratolytickém efektu, čímž je tedy usnadněna intercelulární i intracelulární permeace.



#### h) Ketony

Nižší alifatické ketony (například aceton) způsobují extrakci lipidů z kůže. Jejich použití je však spojeno s projevy dráždění. Při použití makrocyclických ketonů však dochází poměrně brzy k obnově fyziologických poměrů kůže, takže jejich dráždění není tak silné jako u výše zmiňovaného acetonu.

#### i) Povrchově aktivní látky

Laurylsulfát sodný působí několika mechanismy: váže se na intercelulární keratin korneocytů, částečně odstraňuje intercelulární lipidy a mění jejich uspořádání a zvyšuje také ztrátu vody. Jeho použití je omezeno dráždivými účinky.

#### j) Terpeny

Do této skupiny spadá velká škála látek různé chemické povahy a jejich směsi ve formě přírodních silic. Mezi účinné akceleranty patří například askaridol, geraniol, eukalyptol, L-menthol nebo D-limonen.

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Chemikálie a instrumentální vybavení

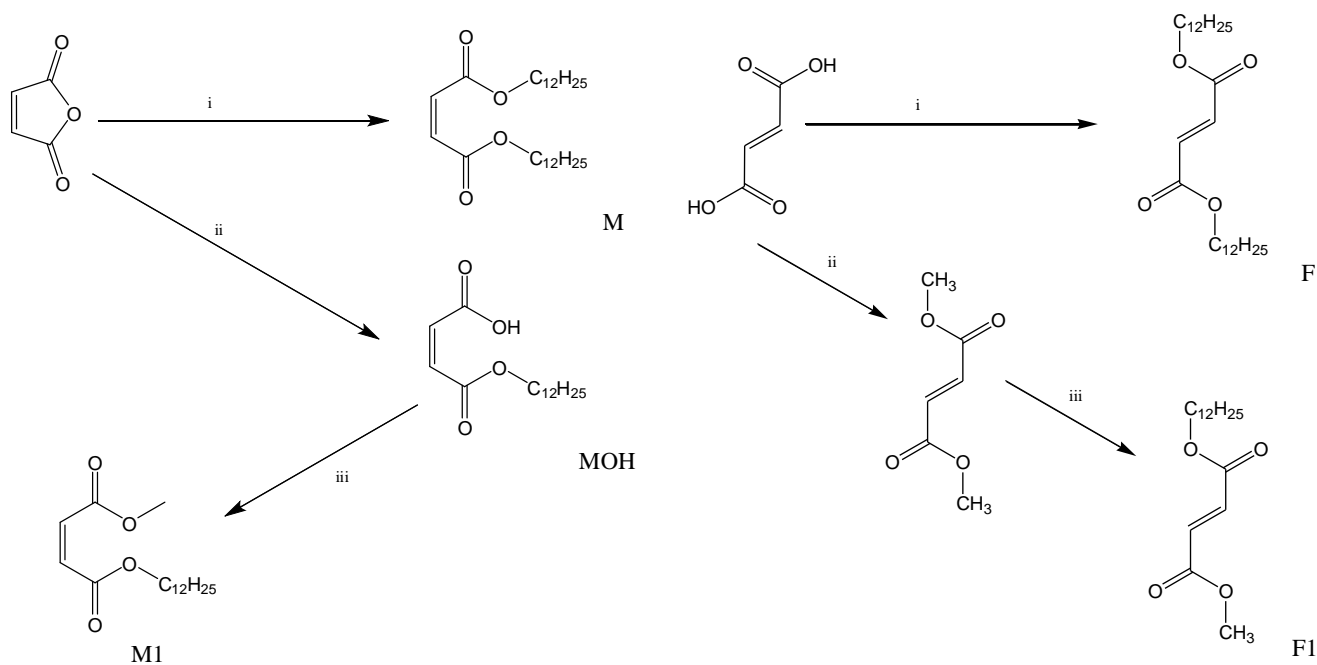
Všechny chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo). Silikagel 60 (230 – 400) pro sloupcovou chromatografii, TLC desky (silikagel 60 F<sub>254</sub>) a HPLC kolony byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Struktura a čistota syntetizovaných látek byla potvrzena FTIR (Nicolet Impact 400 Spektrofotometr) a <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektry (přístroj Varian Mercury-Vx BB 300 pracující na 300 MHz pro <sup>1</sup>H a 75 MHz pro <sup>13</sup>C spektra). Bod tání byl stanovován na Koflerově přístroji.

#### 3.2. Syntéza

##### 3.2.1. Deriváty kyseliny maleinové, fumarové a jantarové

Příprava je znázorněna na následujících schématech:



##### Schéma přípravy derivátů kyseliny maleinové

- HO-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; toluen; 130-140°C / 2h.
- HO-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>; chloroform; 130-140°C / 10min.
- HO-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>; methanol; thionylchlorid; -20°C / 2h.

##### Schéma přípravy derivátů kyseliny fumarové

- HO-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; toluen; 130-140°C / 2h.
- methanol; thionylchlorid; -20°C / 1h; RT / 12h.; toluen
- HO-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>; Ts-OH; toluen; 90°C

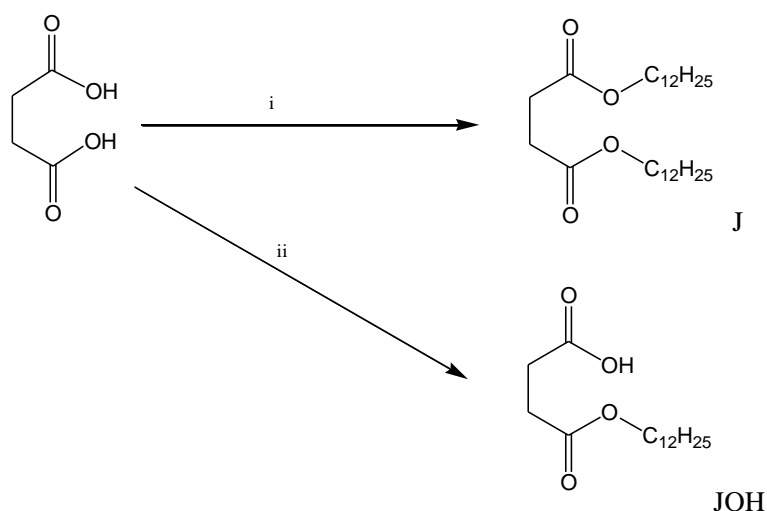
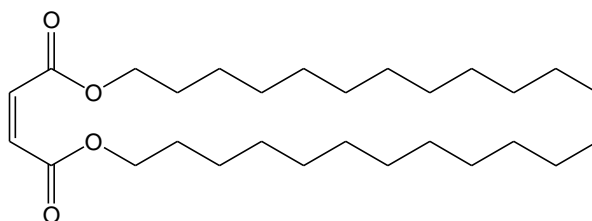


Schéma přípravy derivátů kyseliny jantarové

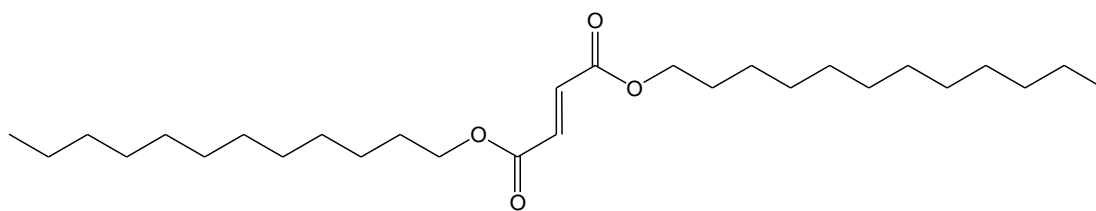
- i) HO-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; toluen; 130-140°C / 2h.  
 ii) HO-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>; 130-140°C / 10min.; chloroform;

3.2.1.1. Didodecylester kyseliny maleinové



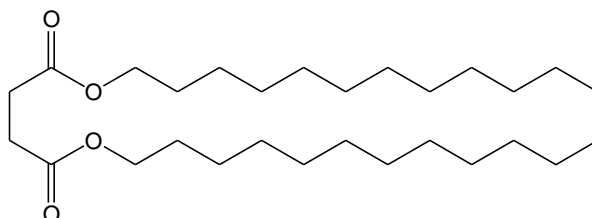
Označení: M; C<sub>28</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>; 452,72 g.mol<sup>-1</sup>; smícháním 4,4 mmol anhydridu kyseliny maleinové s 8,8 mmol dodekanolu a 50 ml toluenu a přidáním katalytického množství (0,44 mmol) koncentrované kyseliny sírové vznikla směs, která byla umístěna na olejovou lázeň o teplotě 130–140 °C. Konstantní teplota byla udržována po 4 hodiny a vzniklá voda odstraňována pomocí azeotropního nástavce. Vzniklá směs byla následně v dělicí nálevce vytřepána 2% roztokem NaHCO<sub>3</sub> a koncentrovaným roztokem NaCl. Organická fáze byla vysušena síranem sodným a zahuštěna na vakuové odparce. Produkt byl čištěn krystalizací z ethanolu a krystaly odfiltrovány a sušeny ve vakuu za přítomnosti P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; Výtěžek: 82 %; bílé krystaly; teplota tání 29–30 °C (28–30 °C)<sup>42</sup>; IR (KBr): ν<sub>max</sub> 2955, 2923, 2853, 1732, 1640, 1467, 1405, 1377, 1289, 1210, 1163, 721 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CHCl<sub>3</sub>): δ 6,23 (2H; s; 2 –CH=); 4,17 (4H; t; 2 –OCH<sub>2</sub>–; J= 7,38 Hz); 1,68-1,63 (4H; m; 2 –OCH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–); 1,30-1,25 (32H; m; 16 –CH<sub>2</sub>–); 0,88 (6H; t; 2 –CH<sub>3</sub>; J= 6,51 Hz); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CHCl<sub>3</sub>): δ 165,3; 129,7; 65,5; 31,9; 29,6; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 28,4; 25,8; 22,7; 14,1.

### 3.2.1.2. Didodecylester kyseliny fumarové



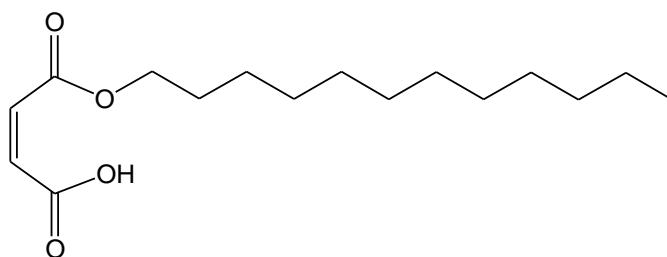
Označení: F;  $C_{28}H_{52}O_4$ ;  $452,72 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; do reakce bylo vloženo 11,0 mmol kyseliny fumarové, 22,1 mmol dodekanolu a následně přidáno 2,14 mmol koncentrované kyseliny sírové. Produkt byl připraven analogickým postupem jako látka M. Výtěžek: 74 %; bílé krystaly; teplota tání  $43\text{--}44 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $45\text{--}46 \text{ }^\circ\text{C}$ )<sup>43</sup>; IR (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  3083, 2958, 2917, 2850, 1707, 1474, 1322, 1314, 1177, 1012, 776, 718  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  6,84 (2H; s; 2  $-\text{CH}=\text{}$ ); 4,19 (4H; t; 2  $-\text{OCH}_2-$ ;  $J= 6,64 \text{ Hz}$ ); 1,70-1,60 (4H; m; 2  $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$ ); 1,32-1,25 (32H; m; 16  $-\text{CH}_2-$ ); 0,87 (6H; t; 2  $-\text{CH}_3$ ;  $J= 6,67 \text{ Hz}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  165,1; 133,6; 65,5; 31,9; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 28,4; 25,8; 22,7; 14,1.

### 3.2.1.3. Didodecylester kyseliny jantarové



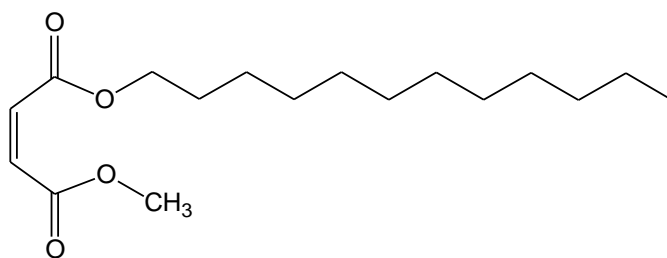
Označení: J;  $C_{28}H_{54}O_4$ ;  $454,73 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; do reakce bylo použito 4,4 mmol kyseliny jantarové, 26,29 mmol dodekanolu a přidáno 0,91 mmol koncentrované kyseliny sírové. Produkt byl připraven analogickým postupem jako látka M. Výtěžek: 60 %; bílé krystaly; teplota tání  $37\text{--}38 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $39\text{--}40 \text{ }^\circ\text{C}$ )<sup>44</sup>; IR (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  2955, 2918, 2871, 2850, 1726, 1765, 1170, 720  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  4,07 (4H; t; 2  $-\text{OCH}_2-$ ;  $J=6,56 \text{ Hz}$ ); 2,61 (4H; s; 2  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ); 1,63-1,56 (4H; m; 2  $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$ ); 1,29-1,25 (32H; m; 16  $-\text{CH}_2-$ ); 0,88 (6H; t; 2  $-\text{CH}_3$ ;  $J= 6,1\text{Hz}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  172,4; 64,9; 31,9; 29,6; 29,6; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 29,2; 28,6; 25,9; 22,7; 14,1.

### 3.2.1.4. Monododecylester kyseliny maleinové



Označení: MOH;  $C_{16}H_{28}O_4$ ;  $284,39 \text{ g.mol}^{-1}$ ; na reakci se podílelo 21,09 mmol anhydridu kyseliny maleinové a 21,09 mmol dodekanolu. Reakční směs byla míchána 10 minut při teplotě 130–140 °C bez přítomnosti rozpouštědla. Produkt byl krystalizován z hexanu a krystaly odfiltrovány a sušeny ve vakuu za přítomnosti  $P_2O_5$ ; Výtěžek: 78,3 %; bílé krystaly; teplota tání 54–55 °C (53–54 °C)<sup>45</sup>; IR (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  3435, 3066, 2955, 2920, 2851, 2602, 1723, 1647, 1477, 1424, 1218, 1167, 720  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  6,47-6,35 (2H; m; 2  $-\text{CH}=\text{}$ ); 4,27 (2H; t;  $-\text{OCH}_2-$ ;  $J= 6,60$ ); 1,75-1,66 (2H; m;  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ); 1,40-1,20 (18H; m; 9  $-\text{CH}_2-$ ); 0,87 (6H; t; 1  $-\text{CH}_3$ ;  $J= 5,94 \text{ Hz}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  167,9; 164,6; 136,5; 129,4; 67,3; 31,9; 29,6; 29,5; 29,4; 29,3; 29,1; 28,2; 25,7; 22,7; 14,1.

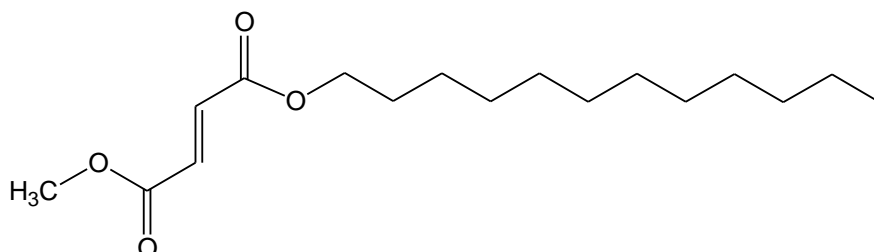
### 3.2.1.5. Dodecylmethylester kyseliny maleinové



Označení: M1;  $C_{17}H_{30}O_4$ ;  $298,42 \text{ g.mol}^{-1}$ ; do methanolu ochlazeného na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  bylo pomalu přikapáváno 6,7 mmol thionylchloridu. Po chvíli byl pomalu přikapáván roztok 6,7 mmol látky MOH rozpuštěné v methanolu. Směs byla při snížené teplotě míchána 2 hodiny. Poté bylo vypnuto chlazení a teplota pozvolna dosáhla hodnoty  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Produkt byl čištěn chromatograficky – mobilní fází byl petrolether/ethylacetát v poměru 9:1; Výtěžek: 55 %; olej; IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3022, 3019, 2955, 2927, 2855, 2401, 1727, 1647, 1467, 1438, 1400, 1379, 1300  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  6,24 (2H; s; 2  $-\text{CH}=\text{}$ ); 4,17 (2H; t; 2  $-\text{OCH}_2-$ ;  $J= 7,00 \text{ Hz}$ ); 3,78 (3H; s; 1  $-\text{O}-\text{CH}_3$ ); 1,68-1,61 (4H; m; 2  $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$ ); 1,36-1,25 (18H; m; 9  $-\text{CH}_2-$ ); 0,87 (6H; t; 1  $-\text{CH}_3$ ;  $J= 6,42 \text{ Hz}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,

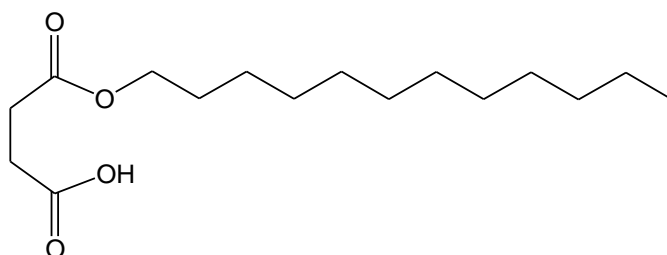
CHCl<sub>3</sub>):  $\delta$  165,1; 133,6; 65,5; 52,1; 31,9; 29,6; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 28,4; 25,8; 22,7; 14,1.

### 3.2.1.6. Dodecylmethylester kyseliny fumarové



Označení: F1; C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>; 298.42 g.mol<sup>-1</sup>; do methanolu ochlazeného na -20 °C bylo pomalu přikapáváno 27,7 mmol thionylchloridu. Po chvíli byl pomalu přikapáván roztok 13,8 mmol kyseliny fumarové rozpuštěné v methanolu. Směs byla při snížené teplotě míchána 1 hodinu. Poté bylo vypnuto chlazení a reakční směs pozvolna dosáhla laboratorní teploty. Směs byla míchána 12 hodin. Meziprodukt byl rozpuštěn v toluenu, odpařen na vakuové odparce a přefiltrován přes fritu se silikagelem. Dále bylo k čistému meziproduktu přidáno 13,2 mmol dodekanolu a katalytické množství kyseliny toluensulfonové. Byl přidán suchý toluen a reakční směs byla zahřívána na 90 °C. Potom byla zahuštěna na vakuové odparce, rozpuštěna v chloroformu a filtrována s aktivním uhlím. Produkt byl krystalizován z petroletheru. Krystaly byly sušeny ve vakuu za přítomnosti P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Výtěžek: 8 %; bílé krystaly; teplota tání 37–39 °C; IR (KBr):  $\nu_{\max}$  3082, 2960, 2917, 2850, 1707, 1474, 1323, 1313, 1117, 1011, 776, 718 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CHCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6,85 (2H; s; 2 -CH=); 4,19 (2H; t; 2 -OCH<sub>2</sub>-; J= 6,69 Hz); 1,70-1,60 (2H; m; 2 -OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,40-1,20 (18H; m; 9 -CH<sub>2</sub>-); 0,88 (6H; t; 1 -CH<sub>3</sub>; J= 6,63 Hz); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CHCl<sub>3</sub>):  $\delta$  165.1; 133,6; 65,5; 31,9; 29,6; 29,6; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 28,5; 25,9; 22,7; 14,1.

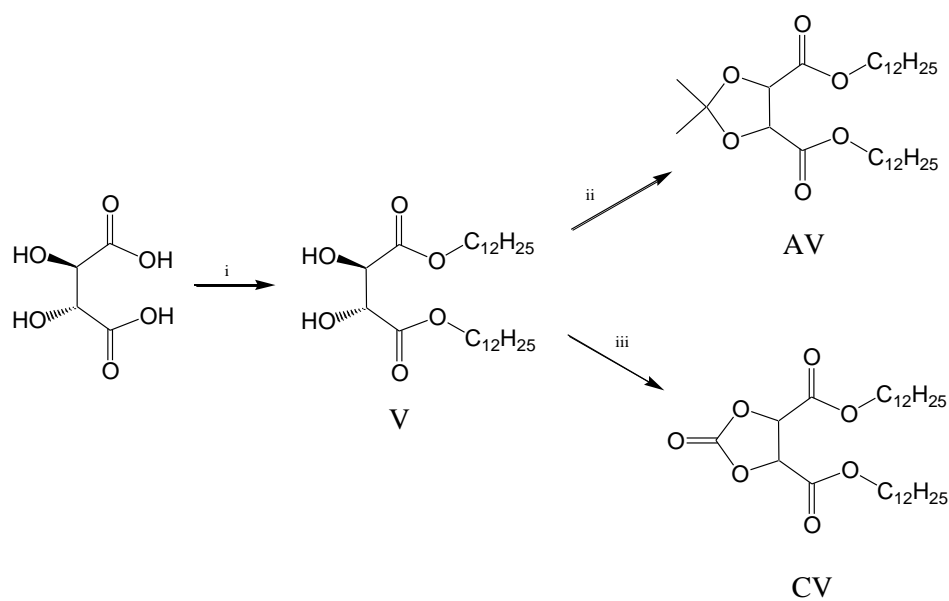
### 3.2.1.7. Monododecylester kyseliny jantarové



**Označení:** JOH;  $C_{16}H_{30}O_4$ ;  $286,41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; do reakce bylo vloženo 19,1 mmol anhydridu kyseliny jantarové a 17,44 mmol dodekanolu. Produkt byl připraven analogickým postupem jako u látky MOH; Výtěžek: 60,4 %; krystaly; teplota tání 45–46 °C (44–45 °C)<sup>46</sup>; IR (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  2958, 2918, 2850, 1727, 1692, 1471, 1364, 1255, 1194, 961, 719  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  4,09 (2H; t;  $-\text{OCH}_2-$ ;  $J= 6,72$ ); 2,70-2,60 (4H; m; 2  $-\text{CH}-$ ); 1,65-1,58 (2H; m;  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ); 1,40-1,20 (18H; m; 9  $-\text{CH}_2-$ ); 0,88 (3H; t; 1  $-\text{CH}_3$ ;  $J= 5,91 \text{ Hz}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  178,1; 172,2; 65,1; 31,9; 29,6; 29,6; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 28,9; 28,9; 28,5; 25,8; 22,7; 14,1.

### 3.2.2. Deriváty kyseliny L-vinné a mesovinné

Příprava derivátů kyseliny vinné a mesovinné je znázorněna na následujících schématech:



#### Schéma přípravy derivátů kyseliny vinné

- i) HO-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>; Ts-OH; 100°C / 2h.
- ii) 2,2-dimethoxypropan; dichlormethan; Ts-OH; RT / 2h.
- iii) dimethylkarbonát; NaOH; 60°C / 30min.

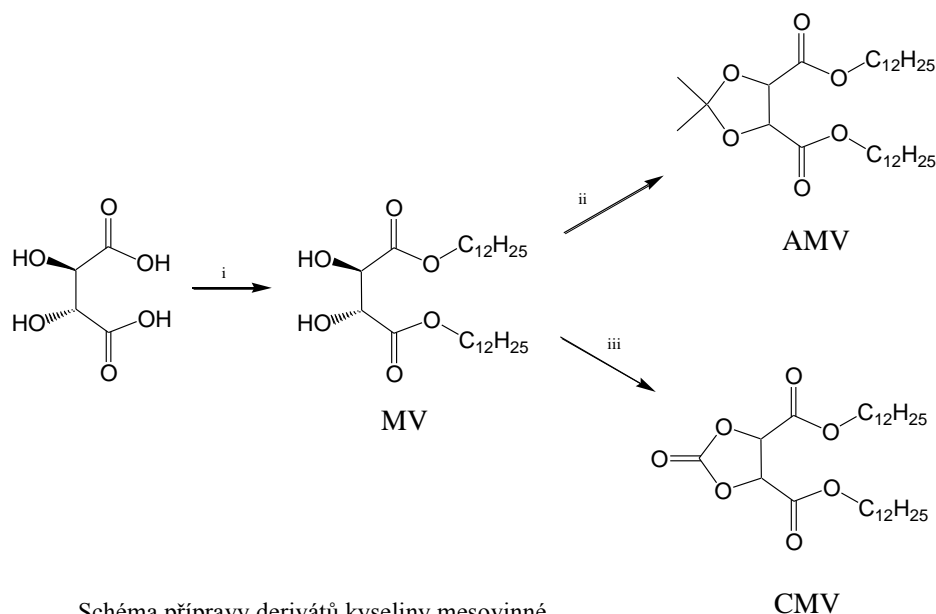
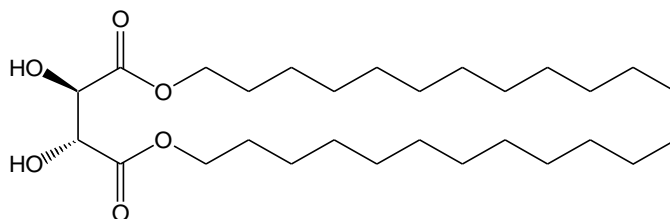


Schéma přípravy derivátů kyseliny mesovinné

- i) 1.  $\text{KMnO}_4$ , 18C6,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-50^\circ\text{C}$  / 3h.;  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 ii) 2,2-dimethoxypropan; Ts-OH; RT / 2h.  
 iii) dimethylkarbonát; Na;  $60^\circ\text{C}$  / 30min.

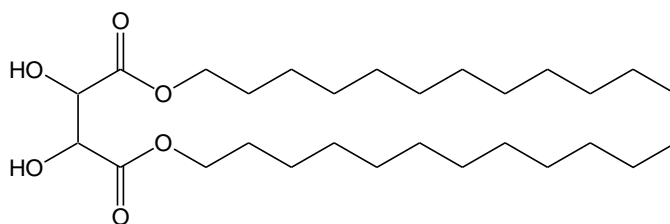
3.2.2.1. Didodecylester kyseliny L-vinné



Označení: V;  $\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{O}_6$ ;  $486,73 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; do reakce bylo vpraveno 10,2 mmol kyseliny L-vinné a 20,5 mmol dodekanolu. Bylo přidáno katalytické množství kyseliny toluensulfonové. Reakce probíhala 2 hodiny při  $100^\circ\text{C}$  na olejové lázni bez rozpouštědla. Směs byla zahuštěna a produkt čištěn z hexanu. Následně byl dosušen ve vakuu za přítomnosti  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Výtěžek: 52 %; bílé krystaly; teplota tání  $58\text{--}59^\circ\text{C}$ ; IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3535, 3033, 2957, 2927, 2855, 1740, 1467, 1257  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  4,52 (2H; s; 2 HO-CH); 4,25 (4H; t; 2 -OCH<sub>2</sub>-; J= 5,52 Hz); 3,1 (2H; s; 2 -OH); 1,74-1,62 (4H; m; 2 -OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,40-1,20 (32H; m; 16 -CH<sub>2</sub>-); 0,88 (6H; t; 2 -CH<sub>3</sub>; J= 6,42 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  171,6; 72,0; 66,6; 31,9; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,1; 28,5; 25,7; 22,7; 14,1.

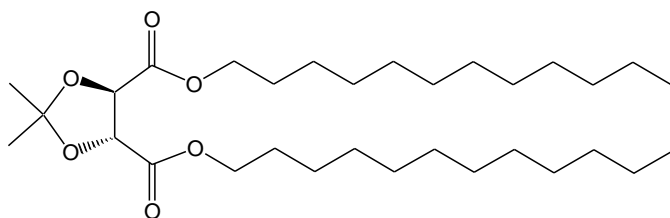


### 3.2.2.2. Didodecylester kyseliny mesovinné



Označení: MV;  $C_{28}H_{54}O_6$ ;  $486,72 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; 6,1 mmol produktu pod označením M bylo rozpuštěno v suchém dichlormethanu a ochlazeno na  $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Odděleně byl připraven roztok 2 mmol 18-crownetheru-6 a 6,9 mmol manganistanu draselného v 10 ml suchého dichlormethanu. Tato směs byla pomalu přikapávána do roztoku látky M. Reakční směs tmavě fialové barvy byla po 3 hodiny udržována na teplotě  $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Poté bylo vypnuto chlazení a teplota pozvolna dosáhla hodnoty  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po chvíli byl ke směsi přidán roztok  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  – barva se změnila na hnědou. V dělicí nálevce byla postupně za stálého třepání přikapávána koncentrovaná kyselina sírová, až do odbarvení směsi. Vzniklá bílá emulze se extrahovala dichlormethanem s kapkou ethanolu. Organická fáze byla vysušena síranem sodným, zahuštěna na vakuové odparce. Produkt byl čištěn chromatograficky za použití mobilní fáze petrolether/ethylacetát – 8:2. Produkt byl dosušen ve vakuu. Výtěžek: 73 %; nažloutlý olej; IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3532, 2957, 2927, 2855, 1740, 1467  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  4,55 (2H; s; 2 HO-CH); 4,18 (4H; t; 2 -OCH<sub>2</sub>-; J=6,45 Hz); 3,15 (2H; s; 2 -OH); 1,66-1,59 (4H; m; 2 -OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,29-1,25 (32H; m; 16 -CH<sub>2</sub>-); 0,87 (6H; t; 2 -CH<sub>3</sub>; J=6,60 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  171,1; 72,9; 66,5; 51,6; 31,9; 29,6; 29,6; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 28,4; 25,8; 22,7; 14,1.

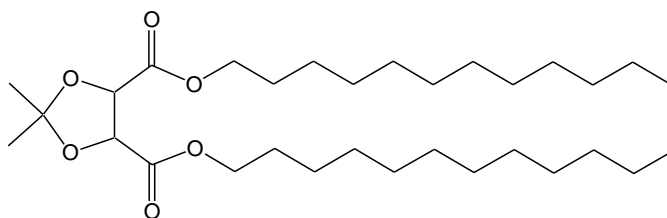
### 3.2.2.3. Acetonid didodecylesteru kyseliny L-vinné



Označení: AV;  $C_{31}H_{58}O_6$ ;  $526,80 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; 10,2 mmol produktu V a 20,5 mmol 2,2-dimethoxypropanu bylo rozpuštěno v 2,5 ml dichlormethanu. Bylo přidáno katalytické množství kyseliny toluensulfonové. Baňka byla uzavřena chlorkalciovým uzávěrem.

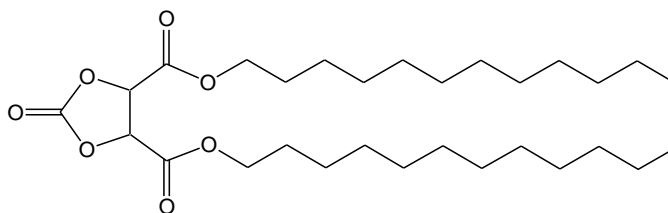
Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 2 hodin. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií - složení mobilní fáze bylo petrolether/ethylacetát v poměru 8:3. Výtěžek: 45 %; bílé krystaly; teplota tání 61-62 °C;  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  4,53 (2H; s; 2  $-\text{O}-\text{CH}-\text{COO}-$ ); 4,26 (4H; t; 2  $-\text{OCH}_2-$ ;  $J=6,68$  Hz); 1,78-1,56 (2H; m; 2  $-\text{CH}_3$ ); 1,56 (4H; s; 2  $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$ ); 1,40-1,20 (32H; m; 16  $-\text{CH}_2-$ ); 0,88 (6H; t; 2  $-\text{CH}_3$ ;  $J=6,60$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  171,6; 72,0; 66,6; 31,9; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 28,5; 25,7; 22,7; 14,1.

#### 3.2.2.4. Acetonid didodecylesteru kyseliny mesovinné



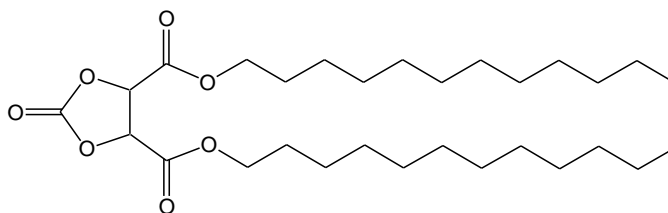
Označení: AMV;  $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{O}_6$ ;  $526,80 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; 10,2 mmol produktu MV a 20,5 mmol 2,2-dimethoxypropanu bylo rozpuštěno v 2,5 ml dichlormethanu. Další postup stejný jako u produktu AV. Složení mobilní fáze pro sloupcovou chromatografií bylo petrolether/ethylacetát v poměru 19:1. Výtěžek: 37 %; olej; IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3537, 3031, 2957, 2927, 2855, 1759, 1735, 1466, 1377  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  4,82 (2H; s; 2  $-\text{O}-\text{CH}-\text{COO}-$ ); 4,19-4,05 (4H; m; 2  $-\text{OCH}_2-$ ); 1,65 (6H; s; 2  $-\text{CH}_3$ ); 1,42 (4H; s; 2  $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$ ); 1,30-1,16 (32H; m; 16  $-\text{CH}_2-$ ); 0,88 (6H; t; 2  $-\text{CH}_3$ ;  $J=6,64$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  168,3; 112,9; 76,4; 65,8; 31,9; 29,7; 29,6; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 28,4; 26,6; 25,8; 25,8; 22,7; 14,1.

#### 3.2.2.5. Karbonát didodecylesteru kyseliny L-vinné



Označení: CV;  $C_{29}H_{52}O_7$ ;  $512,72 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; do reakce bylo vloženo 0,96 mmol V a 1,1 mmol dimethylkarbonátu. 0,2 mmol rozetřeného NaOH bylo velmi rychle přidáno do reakce. Do reakce bylo přidáno 15 ml toluenu a pod hlavou destilační kolony byla směs po 30 minut udržována při teplotě  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Následně byla teplota zvýšena na  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  a pomalu oddestilován vznikající methanol. Po ukončení reakce byla směs protřepána vodou, organická fáze byla vysušena síranem sodným. Vakuově zahuštěná směs byla čištěna chromatograficky. Produkt byl dosušen ve vakuu za přítomnosti  $P_2O_5$ . Výtěžek: 30 %; olej; IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3030, 2957, 2927, 2855, 1743, 1467, 1444,  $1276 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  4,15-4,09 (4H; m; 2  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ ); 3,77 (2H; s; 2  $-\text{OCH}-\text{COO}$ ); 1,68-1,59 (4H; m; 2  $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$ ); 1,40-1,20 (32H; m; 16  $-\text{CH}_2-$ ); 0,87 (6H; t; 2- $\text{CH}_3$ ;  $J=6,40 \text{ Hz}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  155,9; 155,4; 68,2; 68,0; 54,6; 31,9; 29,6; 29,5; 29,4; 29,3; 29,2; 29,2; 28,6; 28,2; 25,8; 25,6; 22,6; 14,1.

### 3.2.2.6. Karbonát didodecylesteru kyseliny mesovinné



Označení: CMV;  $C_{29}H_{52}O_7$ ;  $512,72 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; do reakce bylo vloženo 0,78 mmol MV a 1,33 mmol dimethylkarbonátu. 1,08 mmol čistého sodíku bylo velmi rychle přidáno do reakce. Další postup analogický jako u produktu CV. Výtěžek: 57 %; olej; IR (samotná látka):  $\nu_{\text{max}}$  2954, 2923, 2852, 2360, 2342, 1748, 1464,  $1263 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  4,14-4,09 (4H; m; 2  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ ); 3,78 (2H; s; 2  $-\text{OCH}-\text{COO}$ ); 1,68-1,59 (4H; m; 2  $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$ ); 1,25-1,11 (32H; m; 16  $-\text{CH}_2-$ ); 0,88 (6H; t; 2- $\text{CH}_3$ ;  $J=6,40 \text{ Hz}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ):  $\delta$  100,1; 68,3; 68,0; 54,6; 53,6; 31,9; 29,7; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 28,7; 25,9; 25,7; 22,7; 14,1.

### **3.3. Hodnocení akcelerační aktivity**

#### ***3.3.1. Příprava kůže pro permeace***

Studium akcelerační aktivity syntetizovaných látek bylo prováděno za použití prasečí kůže plné tloušťky. Prasečí uši byly získány na místních jatkách. Kůže z dorzální strany prasečích uší byla opatrně oddělena skalpelem od podložních tkání a přítomné chlupy byly odstraněny zastříhovačem. Poté byla kůže kvůli konzervaci při uchovávání namočena 5 minut v 0,05% roztoku azidu sodného. Takto ošetřená kůže byla vakuově uzavřena a uskladněna v mrazničce. Maximální doba skladovatelnosti je 2 měsíce při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### ***3.3.2. Příprava donorových vzorků***

Donorový vzorek byl připraven jako 5% suspenze theofylinu s 1 % testovaného urychlovače v příslušném vehikulu (voda, 60% propylenglykol, isopropylmyristát). Všechny donorové vzorky byly nasyceny příslušnými urychlovači ve výše uvedené koncentraci. Suspenze byla 5 minut míchána při  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a poté byla přenesena do termostatu a uskladněna 24 hodin při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Důvodem je navození rovnovážného stavu.

Dále bylo nutné si připravit kontrolní vzorek. Ten obsahoval 5 % theofylinu a byl připravován již uvedeným způsobem, stejně jako donorové vzorky.

#### ***3.3.3. Permeační experimenty***

Urychlovací schopnost látek syntetizovaných v této diplomové práci byla hodnocena *in vitro* za použití Franzových difúzních cel a theofylinu jako modelového permeantu.

Prasečí kůže byla těsně před použitím opatrně rozmrazena a nakrájena na kousky o velikosti zhruba  $2 \times 2\text{ cm}$ . Kůže byla umístěna do Franzových difúzních cel a upevněna tak aby vznikla plocha  $1\text{ cm}^2$ .

Každá z Franzových cel byla naplněna akceptorovou fází, skládající se z fosfátového pufru o pH 7.4 s přísadou 0.03 % azidu sodného (jako konzervacia) a NaCl. Byl změřen přesný objem akceptorové fáze (16–18 ml) každé z Franzových difúzních cel – tyto údaje byly zahrnuty do výpočtů. Cely byly umístěny na 30 minut do vodní lázně o teplotě  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  kvůli ustavení rovnováhy. Poté bylo 200  $\mu\text{l}$  donorového vzorku aplikováno na kůži do donorového kompartmentu ve Franzově cele. Vzorek byl přikryt krycím sklíčkem. V každém experimentu proběhly tři kontroly. Akceptorová fáze byla po celou dobu trvání experimentu míchána a temperována na teplotu  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  pomocí vodní lázně.

Poté byly v předurčeném čase v průběhu 48 hodin odebírány vzorky z Franzových difúzních cel. Jednotlivé porce měly objem 0,6 ml a vždy byly nahrazeny přesným objemem čerstvé akceptorové fáze.

### 3.3.4. HPLC stanovení teofylinu

Koncentrace theofylinu ve vzorcích akceptorové fáze byla stanovena pomocí HPLC za využití LCP vysokotlakého čerpadla (ECOM, Praha, Česká republika), autosampleru (ECOM, Praha, Česká republika), LiChroCART 250-4 kolony (LiChrospher 100, RP 18, 5 $\mu$ m, Merck, Darmstadt, Německo), SP 8440 UV detektoru (Spectra Physics) a softwaru CSW v.1.7. Methanol a 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v poměru 6:4 byl použit jako mobilní fáze. Průtoková rychlost byla nastavena na 1,2 ml/min. Eluát byl monitorován při 272 nm. Retenční čas teofylinu byl 3.3 $\pm$ 0.1 min.

### 3.3.5. Zpracování dat

Flux čili tok **J** ( $\mu$ g/cm<sup>2</sup>/hod) je definován jako množství permeujícího léčiva v  $\mu$ g, které pronikne plochou kůže o velikosti 1 cm<sup>2</sup> za 1 hodinu. Flux **J** permeujícího léčiva skrz stratum corneum lze popsat Fickovým prvním zákonem:

$$J = \frac{D \cdot c_{s,m}}{L} \cdot \frac{c_v}{c_{s,v}}$$

zde ve vzorci označuje **D** difúzní koeficient léčiva na membráně, **c<sub>s,m</sub>** rozpustnost látky na membráně, **L** šířku membrány, **c<sub>v</sub>** koncentraci látky rozpuštěné ve vehikulu, **c<sub>s,v</sub>** rozpustnost látky ve vehikulu.

**J<sub>24</sub>** ( $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) je kumulativní množství léčiva, které proniklo plochou 1 cm<sup>2</sup> za 24 hodin.

**AP** (akcelerační poměr) čili **ER** (enhancement ratio) vypovídá o efektivitě použitého akceleračního poměru. Definuje se jako poměr fluxu látky v přítomnosti akceleračního poměru (**J<sub>x</sub>**) a fluxu standardu tj. látky bez akceleračního poměru (**J<sub>0</sub>**):

$$AP = \frac{J_x}{J_0}$$

Všechny testované sloučeniny byly charakterizovány pomocí urychlovacího poměru (enhancement ratio, ER). Statistické zpracování bylo provedeno za použití Studentova *t*-testu.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo připravit sérii derivátů dikarboxylových kyselin a studovat jejich akcelerační aktivitu při permeaci theofylinu přes prasečí kůži *in vitro*. Výběr struktur vychází z předchozí práce<sup>1</sup>, v níž byl velmi účinný derivát kyseliny maleinové pod označením 12GM12. Délka hydrofobního řetězce byla vybrána na základě předchozích poznatků<sup>2</sup>.

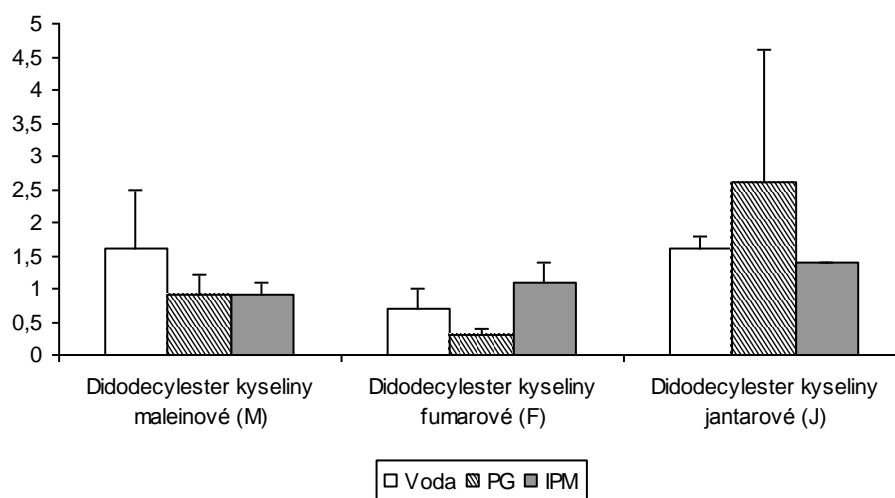
V diplomové práci jsem studoval, zda má na akcelerační aktivitu testovaných látek vliv přítomnosti dvojné vazby v molekule dikarboxylové kyseliny, jestli je rozdíl v aktivitách u *cis*-izomerů v porovnání s *trans*-izomery, zda se projevilo prostorové uspořádání testovaných diastereoizomerů na výsledných akceleračních poměrech a zda nacházíme podstatný rozdíl aktivit u derivátů se dvěma 12C řetězcem oproti látkám s jedním 12C řetězcem. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 1, 2 a 3.

Didodecylestery kyseliny maleinové (M), fumarové (F) a jantarové (J) byly připraveny reakcí příslušné dikarboxylové kyseliny či anhydridu s dodekanolem. Látka M byla připravena reakcí maleinanhydridu s 2 ekvivalenty dodekanolu s výtěžkem 82 %. U látky F byla výchozím reaktantem kyselina fumarová a také byly do reakce vloženy 2 ekvivalenty dodekanolu, přičemž reakce probíhala s výtěžkem 74 %. Syntéza látky J vycházela z kyseliny jantarové a pro reakci zde bylo použito 6 ekvivalentů dodekanolu. Výtěžek této reakce byl 60 %. Všechny tři didodecylestery M, F, J jsou v literatuře popsány látky. U kopolymerů založených na dialkylmaleátech byly studovány adhesivní vlastnosti<sup>47</sup> a dále byly látky M a F testovány jako potenciální inhibitory *Clostridium botulinum*<sup>48</sup>. Látka J byla testována na antinematodální aktivitu<sup>49</sup> a také u ní byly popsány hemolytické vlastnosti a vlastnosti způsobující lýzu mitochondrií v játrech při testech *in vitro* u kuřat<sup>50</sup>.

V předchozí práci<sup>1</sup> byl při studiu akceleračních aktivit velmi účinný derivát kyseliny maleinové pod označením 12GM12. Proto byl u didodecylesteru kyseliny maleinové pod označením M očekáván dobrý výsledek akcelerační aktivity. Očekávání se ale nepotvrdilo – látka M nedosáhla aktivit blížících se předložené struktury – látce 12GM12. Naopak, didodecylester kyseliny jantarové (AP = 0,6 z vody) a didodecylester kyseliny fumarové (AP = 0,2) mají účinnost dokonce sníženou.

Pokud srovnáme aktivity těchto tří látek navzájem (viz Graf 1), lze říci, že se u derivátů s dvojnou vazbou – didodecylesterů M a F – v porovnání s derivátem s jednoduchou vazbou – didodecylesterem kyseliny jantarové (J) neprokázal vliv na akcelerační účinnost. Vliv izomerie na dvojnou vazbu se u těchto látek prokázal. Didodecylester kyseliny maleinové (M), tj. látka s *cis*-izomerií, má v porovnání s *trans*-izomerem, didodecylesterem kyseliny fumarové (F), větší akcelerační aktivitu. Nutno podotknout, že rozdíl v aktivitách látek M a F v porovnání s látkou 12GM12 je zanedbatelný. Vzhledem k tomu, že není dosud přesně známa konfigurace dlouhých uhlíkatých řetězců ceramidů ve stratum corneum, byl by signifikantní rozdíl v aktivitách látek M a F (tj. látek s odlišnou konfigurací na dvojnou vazbu) jistě zajímavým výsledkem pro další studium.

Graf 1



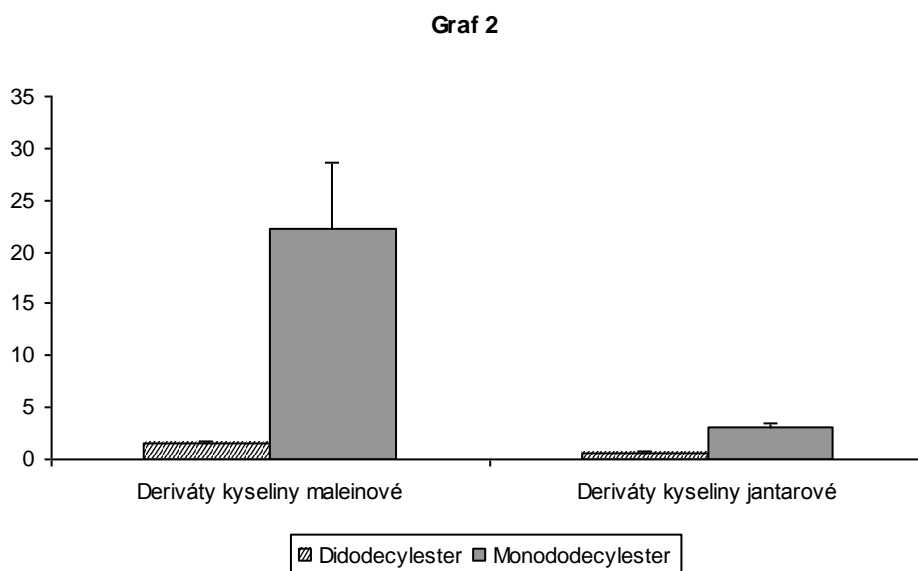
Graf 1: Porovnání aktivit didodecylesterů M, F, J z vodné suspenze, z 60% propylenglykolu (PG) a z izopropylmyristátu (IPM).

Vzhledem k nízké akcelerační aktivitě didodecylesterů dikarboxylových kyselin byla navržena obměna struktury diesteru. Dalšími studovanými látkami jsou proto monoestery dikarboxylových kyselin – monododecylester kyseliny maleinové (MOH) a monododecylester kyseliny jantarové (JOH). Výchozími reaktanty pro látky MOH a JOH byly příslušné anhydridy kyselin. Pro syntézu monoesteru MOH byl použit 1 ekvivalent dodekanolu, přičemž reakce probíhala s výtěžkem 78 %. U látky JOH reagovalo 0,9 ekvivalentu dodekanolu a výtěžek byl 60 %. U těchto reakcí byla zkrácena reakční doba v porovnání s předchozími reakcemi při syntéze diesterů. Obě látky MOH a JOH jsou popsány

v literatuře. U látky MOH byly studovány inhibiční vlastnosti na mikroorganismus *Clostridium botulinum*<sup>48</sup>. U látky JOH byly popsány hemolytické vlastnosti a vlastnosti způsobující lýzu mitochondrií v játrech při testech in vitro u kuřat<sup>50</sup>.

Látky byly testovány jak z vodné suspenze (viz Graf 2), tak z izopropylmyristátu (viz Graf 3). Na následujících dvou grafech je srovnání didodecylesterů kyseliny maleinové (M) a jantarové (J) s jejich příslušnými monododecylestery MOH a JOH.

Graf 2 vystihuje, jak změnou struktury – z diesteru na monoester – došlo k podstatnému zvýšení akcelerační aktivity. Monoester MOH má ze studovaných látek nejvyšší aktivitu (AP = 22,2). Deriváty kyseliny jantarové z vodné suspenze také vykazují změny v aktivitách. Z původně neaktivního diesteru J se aktivita monododecylesteru kyseliny jantarové zvýšila přibližně pětkrát.

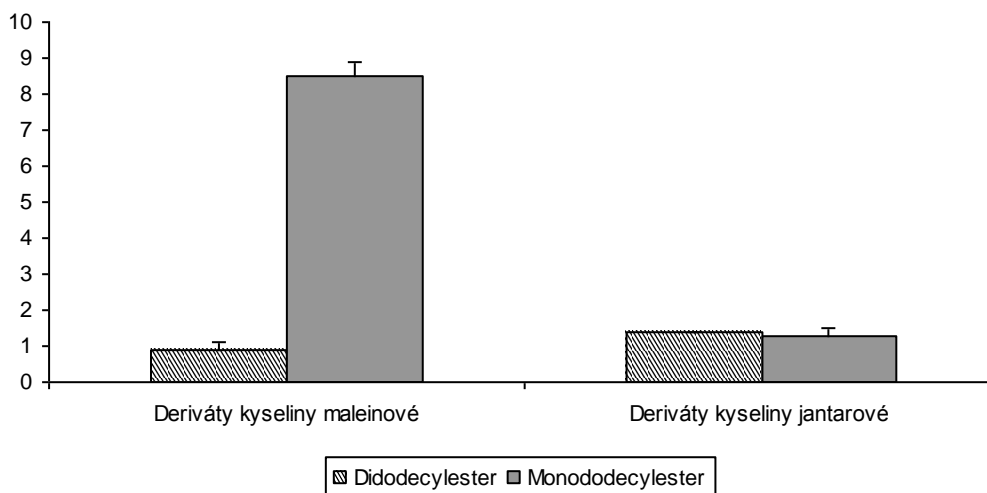


Graf 2: Srovnání aktivit didodecylesterů M, J s jejich příslušnými monododecylestery – MOH, JOH z vodné suspenze.

Na grafu 3 lze také vyčíst, že změna struktury didodecylesteru kyseliny maleinové přinesla zvýšení akceleračního poměru. Monododecylester této kyseliny (AP = 8,5) je 9,5krát účinnější než příslušný didodecylester. U derivátů kyseliny jantarové nedošlo v tomto prostředí ke změnám a aktivity obou látek si jsou velmi podobné.



Graf 3



Graf 3: Srovnání aktivit didodecylesterů M, J s jejich příslušnými monododecylestery – MOH, JOH z izopropylmyristátu.

Lze tedy shrnout, že strukturní obměna látek typu diesterů na monoestery významně ovlivňuje akcelerační schopnost. U derivátu MOH vzrostla aktivita oproti látce M přibližně třináctkrát. Jak se ukazuje, je i v tomto případě důležitým činitelem vzrůstu akceleračního poměru přítomnost dvojné vazby. Monododecylester kyseliny maleinové je (z obou testovaných prostředí) účinnější akcelerant než monoester JOH.

Monododecylester kyseliny fumarové se nepodařilo syntetizovat. NMR analýzou produktu syntézy byla potvrzena výchozí kyselina fumarová. Proto pro doplnění celé série látek se v budoucnosti počítá se syntézou a hodnocením in vitro aktivity i u monododecylesteru kyseliny fumarové.

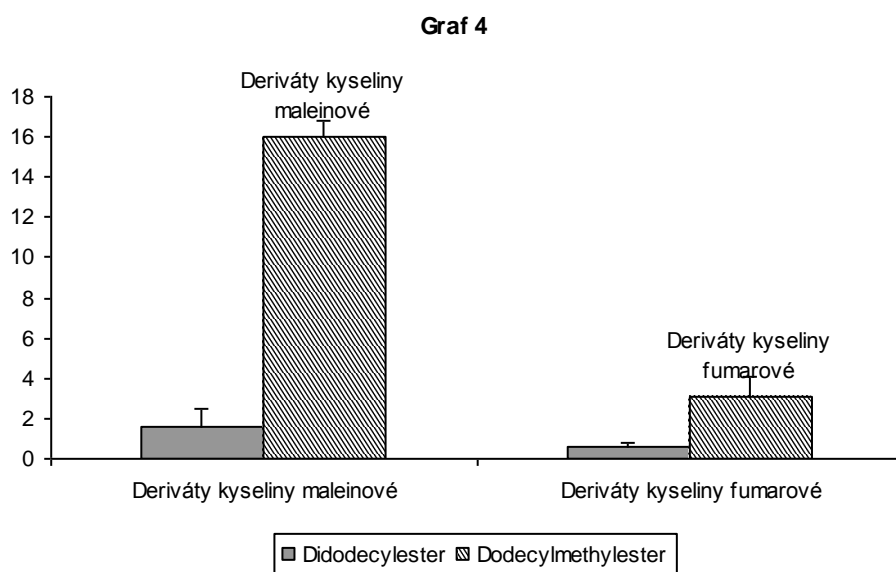
Při další syntéze se vycházelo z výsledků aktivit předchozích látek (monoesterů MOH a JOH). Ukázalo se, že odstranění jednoho 12C řetězce vede ke zvýšení účinnosti. Proto byla navržena dvojice dalších esterů. Jedná se o dodecylmethylestery F1 a M1. Výchozím reaktantem pro přípravu produktu M1 byla látka již dříve syntetizovaná – MOH. Reakce probíhala za nízké teploty, s výtěžkem 55 %. Pro syntézu látky F1 byla použita kyselina fumarová. Reakce probíhala přes meziprodukt – dimethylester kyseliny fumarové – s následnou transesterifikací jedné methylové skupiny. Teplota i reakční doba byly oproti syntéze M1 zvýšeny. Látky M1 a F1 jsou v popsány literatuře. Byl u nich studován

inhibiční vliv na *Clostridium botulinum* a vzájemné vztahy mezi jejich aktivitou a různými fyzikálně-chemickými konstantami<sup>51</sup>.

Při studiu akceleračních aktivit z prostředí izopropylmyristátu nevykazoval ani jeden z dodecylmethylesterů účinnost. Akcelerační poměry z prostředí vodné suspenze potvrzují předchozí zjištění. Pokud srovnáme oba dodecylmethylestery mezi sebou, zjistíme, že účinnější byl derivát kyseliny maleinové M1 (AP = 16,0). Z prostředí propylenglykolu byl AP derivátu M1 10,1.

Lze tedy konstatovat, že rozdílná délka hydrofobních uhlíkatých řetězců je pro aktivitu výhodná. Strukturní obměna na dodecylmethylderivát vedla ke zvýšení akcelerační aktivity oproti didodecylesteru kyseliny maleinové přibližně 10x a u derivátu kyseliny fumarové přibližně pětkrát. Vzhledem k tomu, že derivát kyseliny fumarové F1 vykazuje velmi nízké aktivity, lze poukázat na významný vliv *cis*-, *trans*-izomerie dvojně vazby

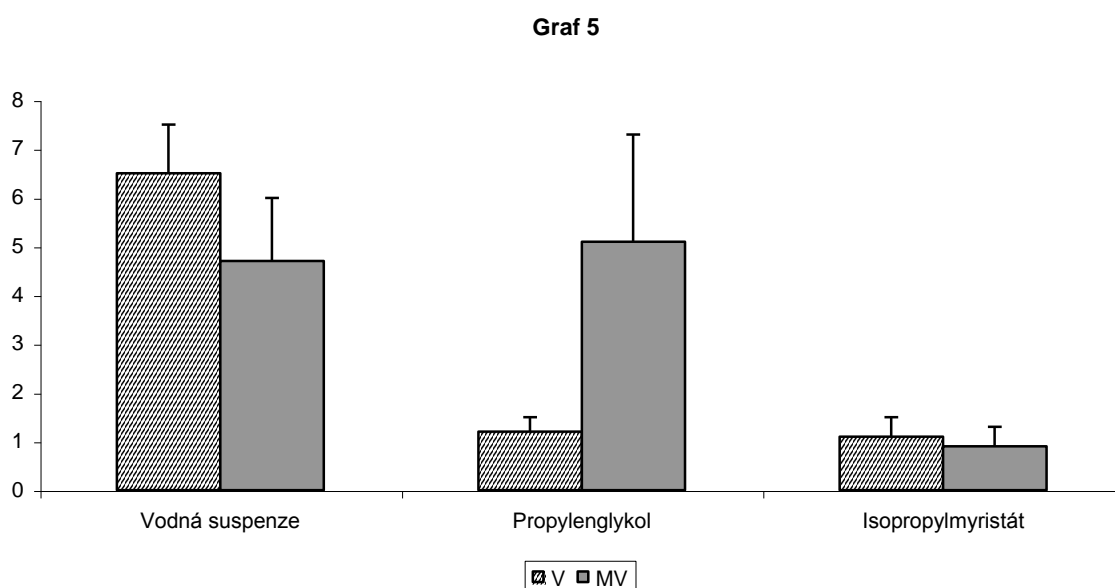
na akcelerační schopnost syntetizovaných látek. Dodecylmethylderivát M1 s *cis*-dvojnou vazbou je 5x účinnější než jeho *trans*-izomer dodecylmethylester F1 (viz Graf 4).



Graf 4: Srovnání aktivit didodecylesterů M, F s aktivitami dodecylmethylesterů M1 a F1 z vodné suspenze.

U těchto derivátů by v budoucnu bylo vhodné porovnat vliv jednoduché a dvojně vazby. Zajímavé by bylo studovat látky také z prostředí propylenglykolu a porovnat je mezi sebou, vzhledem k pozitivním výsledkům derivátu M1 v tomto prostředí.

Dalšími syntetizovanými a studovanými látkami byly estery kyselin L-vinné, mesovinné a jejich cyklické deriváty – acetonidy a karbonáty. Látka V byla připravena reakcí kyseliny L-vinné s 2 ekvivalenty dodekanolu za katalýzy. Vzhledem k uspokojivému výtěžku (52 %) nebylo nutné chránit hydroxylové skupiny. Didodecylester kyseliny mesovinné MV je teoreticky možné připravit analogicky jako V. V této diplomové práci byla však vyzkoušena metoda oxidace dvojné vazby diesteru M na *cis*-diol pomocí  $\text{KMnO}_4$  za fázové katalýzy. Reakce úspěšně proběhla s výtěžkem 73 %. V literatuře nejsou tyto látky dosud popsány.

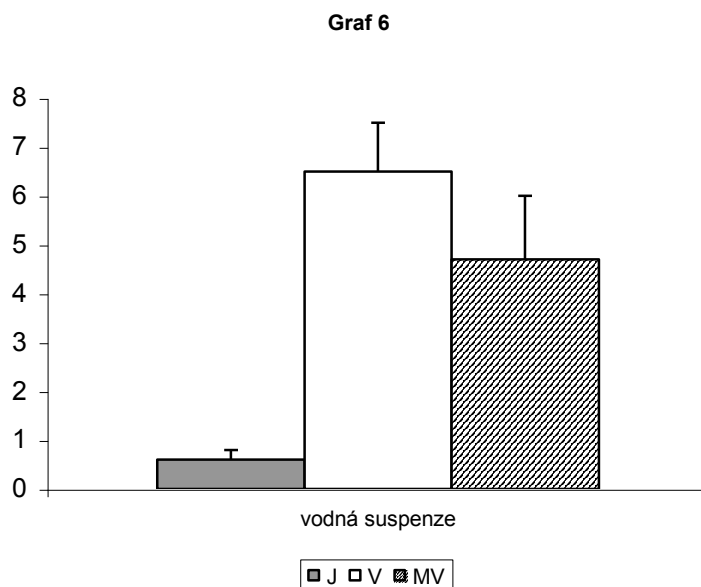


Graf 5: Porovnání aktivit didodecylesterů V a MV z prostředí vodné suspenze, z 60% PG a z IPM.

Z hlediska studia akceleračních schopností je chování těchto látek z různých prostředí odlišné. V prostředí isopropylmyristátu jsou tyto látky neúčinné.

Látky se od sebe zcela liší v prostředí vodné suspenze a prostředí propylenglykolu (Graf 5). Ve vodné suspenzi vykazuje vyšší akcelerační aktivitu derivát kyseliny vinné V (AP = 6,5) než derivát kyseliny mesovinné MV (AP = 4,7), zatímco v prostředí propylenglykolu je naopak 4x účinnější derivát kyseliny mesovinné (AP = 5,1). Vzhledem ke zjištěným hodnotám lze předpovídat rozdílnou interakci diastereoizomerů v těchto dvou vehikulech. Výsledek je zřejmě dán různou rozpustností jednotlivých diesterů. Je také možné uvažovat o synergickém působení amfifilního produktu MV a propylenglykolu.

Srovnání akceleračních účinností didodecylesterů J, V a MV z vodné suspenze je na grafu 6. Látky V a MV se od didodecylesteru J významně ve svých akceleračních aktivitách odlišují. Můžeme proto říci, že přítomnost hydroxylových skupin má pozitivní vliv na zvýšení akceleračních poměrů testovaných látek.



Graf 6: Porovnání aktivit didodecylesterů J,V a MV z prostředí vodné suspenze.

Z derivátů V a MV jsme vycházeli při přípravě acetonidů příslušných kyselin AV a AMV. Tyto látky jsme připravili reakcí s dimethoxypropanem s výtěžkem přibližně 40 %. Výtěžky obou produktů byly sice nižší, ale získali jsme potřebná množství pro permeační pokusy, a proto nebyly podmínky reakce dále optimalizovány. Ani jedna z látek nebyla dosud v literatuře popsána.

Akcelerační aktivity látek AV a AMV byly studovány z vodné suspenze a z 60% PG. Akcelerační poměry v obou prostředích nejsou u těchto derivátů významné.

Posledními z navržených látek, odvozených od kyselin vinné a mesovinné, jsou cyklické karbonáty CV a CMV. Pro reakci didodecylkarbonátu kyseliny vinné CV se vycházelo z produktu V, který reagoval s dimethylkarbonátem za katalýzy NaOH. Výtěžek byl 30 %. Syntéza didodecylesteru kyseliny mesovinné CMV vycházela z reakce MV

s dimethylkarbonátem za katalýzy Na. Výtěžek byl 57 %. Z reakcí vyplývá, že katalýza čistým sodíkem zvyšuje výtěžek. Ani jedna z látek není v literatuře doposud popsána.

Aktivita CV a CMV byla studována z vodného prostředí a z prostředí propylenglykolu. Látky nevykazují vzájemně větší odchylky. Jejich aktivity jsou nevýznamné.

Označení	n	$J_{th}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )	$AP \pm SD$	$lagT$ (h)
<b>kontrola</b>	12	1,9 $\pm$ 1,1	1,0 $\pm$ 0,6	16,4 $\pm$ 6,4
<b>M</b>	4	2,3 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,9	14,0 $\pm$ 2,0
<b>F</b>	4	1,1 $\pm$ 0,6	0,7 $\pm$ 0,3	14,5 $\pm$ 0,7
<b>J</b>	4	0,8 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 1,7
<b>V</b>	4	9,9 $\pm$ 3,5	6,5 $\pm$ 1,0	21,2 $\pm$ 3,2
<b>MV</b>	4	6,9 $\pm$ 1,8	4,7 $\pm$ 1,3	22,1 $\pm$ 1,9
<b>AV</b>	3	5,1 $\pm$ 1,4	2,2 $\pm$ 0,9	25,2 $\pm$ 2,1
<b>AMV</b>	3	7,4 $\pm$ 1,2	3,1 $\pm$ 0,4	24,7 $\pm$ 2,1
<b>CV</b>	3	1,3 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,1	25,1 $\pm$ 2,1
<b>CMV</b>	3	3,5 $\pm$ 2,2	1,4 $\pm$ 0,8	20,0 $\pm$ 7,8
<b>M1</b>	4	26,0 $\pm$ 1,0	16,0 $\pm$ 0,8	18,8 $\pm$ 5,8
<b>F1</b>	3	6,1 $\pm$ 1,9	3,1 $\pm$ 1,0	5,5 $\pm$ 2,1
<b>MOH</b>	2	44,1 $\pm$ 12,8	22,2 $\pm$ 6,5	13,8 $\pm$ 0,8
<b>JOH</b>	2	5,9 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 0,5	13,8 $\pm$ 1,3

Tabulka 1: Souhrnné výsledky akceleračních schopností syntetizovaných látek z vodné suspenze:

**n** – počet opakování,  **$J_{th}$**  – flux theofylinu, **AP** – akcelerační poměr, **lagT** – lag-Time, **SD** – směrodatná odchylka, \* – statisticky významné s  $p < 0,05$ .

<b>Označení</b>	<b>n</b>	<b>J<sub>th</sub> (µg/cm<sup>2</sup>/h)</b>	<b>AP±SD</b>	<b>lagT (h)</b>
<b>kontrola</b>	9	1,0±0,8	1,0±0,5	15,7±2,8
<b>M</b>	4	0,5±0,3	0,9±0,3	14,0±2,0
<b>F</b>	4	0,2±0,1	0,3±0,1	14,5±0,7
<b>J</b>	4	1,6±1,3	2,6±2,0	17,2±1,7
<b>V</b>	4	0,6±0,3	1,2±0,3	21,2±3,2
<b>MV</b>	4	2,3±0,9	5,1±2,2	22,1±1,9
<b>AV</b>	2	4,3±2,3	2,1±1,1	21,2±2,8
<b>AMV</b>	3	6,1±4,6	2,9±2,4	21,2±2,3
<b>CV</b>	3	7,0±2,7	3,4±1,4	18,4±1,6
<b>CMV</b>	3	2,6±1,2	1,2±0,6	21,7±2,2
<b>M1</b>	4	5,2±2,7	10,1±2,3	18,8±5,8

Tabulka 2: Souhrnné výsledky akceleračních schopností syntetizovaných látek z 60% propylenglykolu

<b>Označení</b>	<b>n</b>	<b>J<sub>th</sub> (µg/cm<sup>2</sup>/h)</b>	<b>AP±SD</b>	<b>lagT (h)</b>
<b>kontrola</b>	6	2,0±0,4	1,0±0,2	12,3±3,5
<b>M</b>	2	2,2±0,5	0,9±0,2	13,5±0,3
<b>F</b>	2	2,5±0,6	1,1±0,3	13,1±0,8
<b>J</b>	2	3,2±0,1	1,4±0,0	10,8±0,7
<b>V</b>	2	2,7±0,8	1,1±0,4	8,2±4,1
<b>MV</b>	2	2,1±1,0	0,9±0,4	10,2±0,5
<b>M1</b>	2	2,4±0,3	1,0±0,1	10,6±1,0
<b>F1</b>	3	5,9±4,4	1,5±0,4	13,8±1,8
<b>MOH</b>	2	14,8±0,8	8,5±0,4	13,2±0,5
<b>JOH</b>	2	2,3±0,4	1,3±0,2	7,7±2,2

Tabulka 3: Souhrnné výsledky akceleračních schopností syntetizovaných látek z isopropylmyristátu



## 5. ZÁVĚR

V diplomové práci jsem syntetizoval 13 látek, jejichž strukturním základem byly dikarboxylové kyseliny – maleinová, fumarová, jantarová, L-vinná a mesovinná. Připravil jsem připraveny estery výše uvedených kyselin a to konkrétně didodecylestery, monododecylestery a dodecylmethylestery. U hydroxykyselin jsem dále syntetizoval jejich cyklické deriváty – acetonidy a karbonáty.

V rámci experimentální části jsem u připravených látek studoval akcelerační aktivitu při prostupu modelového léčiva theofylinu přes prasečí kůži plné tloušťky *in vitro* za pomoci Franzovy cely z prostředí tří vehikul různé polariry. Byly to vodná suspenze, 60% propylenglykol a izopropylmyristát.

Studium akceleračních poměrů látek nám osvětluje vztah mezi strukturou látek a jejich účinností. Z výsledků akceleračních poměrů se nepotvrdil rozdílný vliv derivátů s jednoduchou a dvojnou vazbou na jejich účinnost. Výsledky při hodnocení derivátů s izomerií na dvojnou vazbu ukazují na to, že látky s *cis*-izomerií v porovnání s látkami s *trans*-izomerií vykazují vyšší akcelerační aktivity. Největších změn v akcelerační účinnosti jsem zaznamenal při změně struktury z diesteru na monoester. Zde se dá říci, že existuje vztah mezi počtem dlouhých hydrofobních řetězců v molekule a její akcelerační účinností. Monododecylestery a dodecylmethylestery v porovnání s didodecylestery jsou látky se zvýšenou akcelerační účinností. Dále jsem zaznamenal rozdíl aktivit u látek J, V a MV. Didodecylestery V a MV, tj. látky s hydroxylovými skupinami mají v porovnání s diesterem J akcelerační účinnost vyšší. Dá se usuzovat na pozitivní vliv přítomnosti hydroxylové skupiny při permeaci modelového léčiva. Vliv optické izomerie u diastereoizomerů V a MV se neprojevil, protože jejich aktivity jsou ve studovaných prostředích různé. Z toho lze tedy spíše usuzovat na vliv vehikula, než na vliv diastereoizomerie.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- <sup>1</sup> Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Doležal, P.; Šámalová, L.; Palát, K.; Zbytovská, I.; Holas, T.; Klimentová, J.: *Bioorg. Med. Chem.* **11**, **2003**, 5381 – 5390
- <sup>2</sup> Kannikannan, N.; Kandimalla, K. Lamba, S. S. Singh, M.: *Curr. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2351
- <sup>3</sup> Kanikkannan, N.: *Cur. Med. Chem.*, **2000**, *2*, 593 - 608
- <sup>4</sup> Flynn, G. L., Stewart, B.: *Drug. Dev. Res.*, **1988**, *13*, 169
- <sup>5</sup> Odland, G.F. In *Biochemistry and physiology of the skin*; Goldsmith, L.A., Ed.; Oxford University Press: New York, **1983**; pp. 3-63.
- <sup>6</sup> Menon, G.K. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, *54*, Suppl. 1, S3.
- <sup>7</sup> Agache, P.; Humbert, P., Eds. *Measuring the skin*, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, **2004**.
- <sup>8</sup> [http://www.scf-online.com/english/27\\_e/Images27\\_e/skin\\_verybig27\\_e.jpg](http://www.scf-online.com/english/27_e/Images27_e/skin_verybig27_e.jpg)
- <sup>9</sup> Williams, M.L.; Elias, P.M. *Arch. Dermatol. Res.*, **1993**, *129*, 626.
- <sup>10</sup> Ya-Xian, Z., Suetake, T.; Tagami, H. *Arch. Dermatol. Res.*, **1999**, *291*, 555.
- <sup>11</sup> Suhonen, M. T., Bouwstra J.A., Urtti A.: *Journal of Controlled Release*, **1999**, *59*, 149 – 161.
- <sup>12</sup> Mao-Qian, M.; Feingold, K.R. Elias, P.M. *Arch. Dermatol.*, **1993**, *129*, 728.
- <sup>13</sup> Vávrová, K., Zbytovská, J., Palát, K., Holas T., Klimentová, J., Hrabálek, A., Dolezal, P. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2004**, *21*, 581.
- <sup>14</sup> Schurer, N.Y., Elias, P.M. *J. Lipid Res.*, **1991**, *24*, 27.
- <sup>15</sup> Wertz, P.W., Downing, D.T. *J. Lipid Res.*, **1983**, *24*, 759.
- <sup>16</sup> Ponec, M., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, *54*, Suppl. 1, S19.
- <sup>17</sup> Weerheim, A., Ponec, M., *Arch. Dermatol. Res.*, **2001**, *293*, 191.
- <sup>18</sup> Wertz, P.W., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1996**, *19*, 283.
- <sup>19</sup> Flynn G.L. In *Percutaneous Absorption: Mechanisms-Methodology-Drug Delivery*; Bronaugh, R.L.; Mainbach, H.I. Ed. Marcel Dekker: New York, **1989**, pp. 27-51.
- <sup>20</sup> Kou, J.H.; Roy, S.D.; Du J.; Fujiki, J. *Pharm. Res.*, **1993**, *10*, 986.
- <sup>21</sup> Guy R.H.; Hadgraft, J. *Pharm. Res.*, **1988**, *5*, 753.
- <sup>22</sup> Potts R.O.; Guy, R.H. *Pharm. Res.*, **1995**, *12*, 1628.
- <sup>23</sup> Pugh, W.J.; Roberts, M.S.; Hadgraft, J. *Int. J. Pharm.*, **1996**, *138*, 149.
- <sup>24</sup> Barry, B.W. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2001**, *14*, 101.
- <sup>25</sup> Hrabálek, A.; Doležal, P.; Šklubalová, Z.; Farsa, O.; Krebs, A.: *Chem. Listy*, **1999**, *93*, 107-119.
- <sup>26</sup> Barry B. W.: *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*; M.Decker, New York, **1983**, str. 160 – 172.
- <sup>27</sup> Barry, B.W. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **1998**, *10*, 281.
- <sup>28</sup> Goodman, M., Barry, B.W. *Int. J. Pharm.*, **1989**, *57*, 29.
- <sup>29</sup> Barry, B.W. *J. Control. Release*, **1991**, *15*, 237
- <sup>30</sup> Barry, B.W. In *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals, and Applications*; Bronaugh, R.L.; Maibach, H.I.; Eds. CRC Press: Boca Raton, FL, **1991**; pp. 165 - 185
- <sup>31</sup> Barry, B.W. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2001**, *14*, 101
- <sup>32</sup> Moser, K.; Kriwet, K.; Naik, A.; Kalia, Y.N.; Guy, R.H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2001**, *52*, 103
- <sup>33</sup> Ongpipattanukul, B.; Burnette, R.R.; Potts R.O.; Francoeur, M.L. *Pharm. Res.*, **1991**, *8*, 350
- <sup>34</sup> Menczel, E.M. In *Percutaneous Penetrations Enhancers*; Smith E.W.; Maibach, H.I., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, **1995**; pp. 383 - 392
- <sup>35</sup> Menon, G.K.; Lee S.H.; Roberts, M.S.; Walters, K.A., Eds.; Marcel Dekker: New York; **1998**; pp. 757 - 751
- <sup>36</sup> Suhonen, T.M.; Bouwstra, J.A.; Urtti, A. *J. Control. Release*, **1999**, *59*, 149
- <sup>37</sup> Hrabálek, A.; Doležal, P.; Šklubalová, Z.; Farsa, O.; Krebs, A.: *Chem.listy*, **1999**, *93*, 107 - 119
- <sup>38</sup> Aungst, B.J.; *Pharm. Res.*, **1989**, *6*, 244
- <sup>39</sup> Vávrová, K.; Zbytovská, J.; Hrabálek, A.: *Cur. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 2273-2291
- <sup>40</sup> Michniak, B.B.; Player, M.R.; Godwin, D.A.; Phillips, C.A.; Sowell, J.W. *Sr Int. J. Pharm.*, **1995**, *116*, 201
- <sup>41</sup> Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Dolezal, P.; Holas, T.; Zbytovská, J.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2351
- <sup>42</sup> Patent; Geigy Chem.: US 3345327, *Chem.Abstr.*, **1967**, 67
- <sup>43</sup> Shereshefsky; Wall: *J. Am. Chem. Soc.*, **1944**, *66*, 1073
- <sup>44</sup> McGee et al.: *J. Chem. Eng. Data*, **1962**, *7*; 102
- <sup>45</sup> Ikeda et al.: *Chem.Abstr.*, **1976**, *85*, 7595
- <sup>46</sup> Patent; Konishiroku-Photo: DE 1940719, *Chem.Abstr.*, **1969**, *83*, 78563
- <sup>47</sup> Marco, C.; Mayence, G.; Mayence, A.: *Adhesion (London)*, **1977**, *1*, 107-19
- <sup>48</sup> Dymicky, M.; Smith, James L.; Bencivengo, M.: *U. S. Pat. Appl.*, US 611042, **1984**

---

<sup>49</sup> Kimura, Y.; Mori, M.; Hyeon, S.; Suzuki, A.; Mitsui, Y.: *Agricultural and Biological Chemistry*, **1981**, *45*, 249-251

<sup>50</sup> Ikumo, H.: *Journal of Nutrition*, **1980**, *110*, 2051-7

<sup>51</sup> Dymicky, M.; Bencivengo, M.; Buchanan, R. L.; Smith, J. L.: *Applied and Environmental Microbiology*, **1987**, *53*, 110-13