

## PŮVODNÍ PRÁCE

**Analytický profil 1-[3-(3-propoxy-fenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(3-trifluórmetylfenyl)piperazíniumchloridu**

IVAN MALÍK

Univerzita Komenského Bratislava, Farmaceutická fakulta, Katedra farmaceutickej chémie

Došlo 18. července 2011 / Prijato 22. srpna 2011

## SÚHRN

**Analytický profil 1-[3-(3-propoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]-4-(3-trifluórmetylfenyl)piperazíniumchloridu**

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

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

Čes. slov. Farm., 2011; 60, 283–289

## SUMMARY

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

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

**Adresa pro korespondenci:**

PharmDr. Ivan Malík, PhD.

Katedra farmaceutickej chémie FaF UK

Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika

e-mail: malik@fpharm.uniba.sk

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

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

Čes. slov. Farm., 2011; 60, 283–289

Má

## Úvod

Netuberkulózne formy mykobaktérií (*non-tuberculous mycobacteria*, NTM) sú voľne žijúce saprofyty, ktoré pôsobia pri „vhodných“ podmienkach ako iniciátor mnohých vážnych, prevažne infekčných ochorení, akými sú napríklad infekcie pľúc, mäkkých tkanív, kostí, svalov, ale aj cystickej fibrózy<sup>1</sup>. NTM sú tradične delené na tzv. pomaly rastúce (*slowly growing Mycobacteria*), kde patrí napríklad *Mycobacterium (M.) avium*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. lentiflavium* alebo *M. xenopi* a tzv. rýchlo rastúce (*rapidly growing Mycobacteria*), ktoré reprezentuje *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. smegmatis*, *M. mucogenicum* alebo *M. chelonae*<sup>2</sup>. V ostatných rokoch sa zvyšuje incidencia a prevalencia NTM napriek skutočnosti, že prenos NTM medzi postihnutými osobami nebol dokázaný<sup>3</sup>.

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

Komplex *M. avium* (KMA) je tvorený minimálne dvoma typmi: *M. avium* (významný patogén „pôsobiaci“ pri diseminovaných ochoreniach) a *M. intracellulare* (najmä ako patogén respiračného systému) s dokázanou genetickou variabilitou. Podľa American Thoracic Society je ubikvitný KMA najčastejším mykobakteriálnym komplexom (na druhom mieste je *M. kansasii*) zapríčínujúcim manifestovanie rôznych zdravotných komplikácií u obyvateľstva, akými sú pľúcne ochorenia, lymfadenitída, abscesy poranení alebo kožné vredy, a to u pacientov s imunodeficienciou<sup>5</sup>, zdanlivo zdravých ľudí ale aj u osôb s nenarušeným imunitným systémom<sup>8,9</sup>.

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

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

fenyl)piperazíniumchloridu, vysokolipofilnej látky s pracovným označením *8e*, ktorá bola pripravená v rámci syntézy, komplexného fyzikálno-chemického a biologického hodnotenia fenylylkarbamátových štruktúr s inkorporovaným, variabilne substituovaným, *N*-fenylpiperazínovým fragmentom. Pri určovaní jej antimykobakteriálneho profilu sa ukázalo, že predstavuje efektívnejšie pôsobiacu zlúčeninu<sup>10</sup> proti netuberkulóznemu mykobakteriálnemu kmeňu *M. kansasii* My 235/80 (*MIC* = 16  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 14-dňovej inkubácii, resp. 32  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 21-dňovej inkubácii) v porovnaní s použitým štandardom, izoniazidom (INH; *MIC* > 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 14-dňovej ako aj po 21-dňovej inkubácii). Hodnoty *MIC* látky *8e* proti *M. avium* My 330/88 však neboli experimentálne stanovené z dôvodu jej relatívnej nízkej rozpustnosti alebo pre minimálny rast mykobaktéria<sup>10</sup>. Molekula *8e* je zároveň menej účinná proti *M. tuberculosis* (*MIC* = 16, resp. 32  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) ako použitý INH<sup>11</sup> (*MIC* = 0,5; resp. 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ).

Pre zlúčeninu *8e* možno predpokladať aj niekoľko ďalších farmakologických účinkov – okrem iného antagonistické ovplyvnenie  $\alpha$ -adrenergických receptorov a vazodilatáciu, čo navodzuje vazodilatáciu, ako je to v prípade pôsobenia karvedilolu<sup>12</sup>. Okrem toho antagonistické pôsobenie na  $\alpha_1$ -adrenergických receptoroch bude pravdepodobne zvýraznené prítomnosťou substituovaného *N*-fenylpiperazínového jadra v molekule, ktoré je prítomné aj v štruktúre naftopidilu<sup>13</sup>. Schopnosť látky *8e* ovplyvňovať funkcie kardiovaskulárneho systému však nebola doposiaľ experimentálne skúmaná.

## POKUSNA ČASŤ

## SPEKTRÁLNA ČASŤ

### <sup>1</sup>H- a <sup>13</sup>C-NMR spektrometria

Použitá chemikálie: Deuteriochloroform (rozpúšťadlo), ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylsilán (Merck Chemicals Slovensko, Bratislava, SR). Pripravili sa roztoky hodnotenej substancie *8e* s koncentráciou 2 mg/650  $\mu\text{l}$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

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

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

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

$^1\text{H-NMR}$  spektrálna charakteristika látky **8e** bola publikovaná v práci<sup>14</sup>):  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1,01 (t, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 2,60 (t, 4H, **H-9**, **H-11**); 2,80 (t, 4H, **H-10**, **H-12**); 3,01 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 3,28 (t, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 4,10 (m, 1H, **H-7**); 4,33 (d, 2H,  $^{\beta}J_{8,9} = 2,90$  Hz, **H-8**); 4,35 (d, 2H,  $^{\beta}J_{7,8} = 2,90$  Hz, **H-6**); 6,80 (s, 1H, **OH**) vs. 7,00 (s, 1H, **OH**); 6,85 – 7,10 (m, 8H, **ArH**); 7,45 (s, 1H, **NHCOO**, **H-5**); 11,05 (s, 1H, **NH**<sup>+</sup>, **H-17**).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz)  $\delta$  (ppm): 10,35 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 22,33 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 48,81 (uhlík piperazínu); 53,15 (uhlík piperazínu); 60,01 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$ -piperazín); 65,62 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$ ); 68,21 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 67,21 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$ -piperazín); 108,55 (**ArC**); 110,21 (**ArC**); 112,10 (**ArC**); 113,01 (**ArC**); 115,24 (**ArC**); 119,37 (**ArC**); 124,75 (**ArCCF**<sub>3</sub>); 128,35 (**ArC**); 129,37 (**ArC**); (**ArC**); 130,51 (**ArC**); 136,20 (**ArCNHCOO**); 152,63 (**ArC**); 153,36 (**NHCOO**); 160,42 (**ArCOCH**<sub>2</sub>**CH**<sub>2</sub>**CH**<sub>3</sub>).

#### IR spektrometria

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

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

#### Spektrofotometria v UV/VIS oblasti

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

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

Prístroje a zariadenia, pracovný postup: Sú charakterizované v práci<sup>14</sup>). Podľa Lambert-Beerovho zákona sa vypočítali hodnoty  $\epsilon$ , resp.  $\log \epsilon$  pre všetky absorpčné maximá v oboch médiách.

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

#### Hmotnostná spektrometria

Hmotnostné spektrum (MS) molekuly **8e** bolo zmerané na prístroji Agilent 1100 LC/MSD VL Trap (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Detailné informácie o podmienkach merania a pracovnom postupe sú publikované v práci<sup>14</sup>). Snímané rozpätie hmôt bolo v intervale 15–800 *m/z*.

### ANALYTICKÁ ČASŤ

#### Stanovenie teploty topenia

Prístroje a zariadenia, pracovný postup: Sú charakte-

rizované v práci<sup>15</sup>). Nekorigovaná hodnota teploty topenia látky **8e** je uvedená v tabuľke 1.

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

Prac. ozn.*	Sumárny vzorec	Mr	<i>t</i> <sub>f</sub> (°C)
<b>8e</b>	$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_4$	517,97	163–166

Vo vzorci je vyznačené číslovanie skeletu z hľadiska  $^1\text{H-NMR}$  spektrometrie.

#### Elementárna analýza

Prístrojové vybavenie a pracovný postup pri určení obsahu dusíka, uhlíka a vodíka (tab. 2) pre molekulu **8e** je uvedený v publikácii<sup>15</sup>).

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

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

#### Stanovenie rozpustnosti

Použité chemikálie, prístroje a zariadenia, pracovný postup: Sú publikované v práci<sup>15</sup>). Rozpustnosť študovanej látky **8e** bola stanovená podľa Európskeho liekopisu 6.0<sup>16</sup>).

#### Stanovenie hodnoty $R_f$ pomocou adsorpčnej chromatografie na tenkej vrstve

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

Materiál, prístroje a zariadenia: Silufol<sup>®</sup> UV<sub>254</sub> s vrstvou silikagélou s rozmermi 200 × 200 mm (nastrihaný na vhodné veľké časti), sklenené komory s rozmermi 190 × 180 × 80 mm, mikrokapilára (Hamilton Bonaduz, Švajčiarsko), UV-lampa (KRUS UV 240, 230V AC, Hamburg, SRN).

Pracovný postup: Na komerčne vyrábané fólie Silufol<sup>®</sup> UV<sub>254</sub> s vrstvou silikagélou sa na vyznačený štart mikrokapilárou naniesli 2  $\mu\text{l}$  1% roztoku hodnotenej zlúčeniny **8e** a medziproduktu jej syntézy, t.j. 2,3-epo-

Tab. 3. Základné fyzikálno-chemické parametre hodnotenej zlúčeniny 8e, ktoré boli publikované v prácach <sup>15,17)</sup>

Prac. ozn.	$\gamma$ (N.m <sup>-1</sup> )	pK <sub>a</sub>	R <sub>M</sub>	log k <sup>*</sup>	log P <sub>exp o</sub> <sup>**</sup>	log P <sub>exp c</sub> <sup>**</sup>	log P <sub>exp h</sub> <sup>**</sup>
8e	0,0370	5,21	0,23	-0,268	3,92	1,50	1,31

\*hodnota log k<sup>\*</sup> stanovená v RP-HPLC-systéme s mobilnou fázou tvorenou 94% metanolom; \*\*hodnoty rozdeľovacích koeficientov (resp. log P<sub>exp</sub>) stanovených v rozdeľovacích sústavách oktán-1-ol/TFR (log P<sub>exp o</sub>), cyklohexán/TFR (log P<sub>exp c</sub>) a heptán/TFR (log P<sub>exp h</sub>).

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

c (mol.l <sup>-1</sup> )	Voda		Metanol	
	A	log A	A	log A
7,722 × 10 <sup>-6</sup>	0,22591	-0,64606	0,24862	-0,60446
1,544 × 10 <sup>-5</sup>	0,44687	-0,34982	0,46481	-0,33272
2,317 × 10 <sup>-5</sup>	0,63458	-0,19751	0,69634	-0,15718
3,089 × 10 <sup>-5</sup>	0,84328	-0,07403	0,90523	-0,04324
3,861 × 10 <sup>-5</sup>	1,05964	0,2516	1,12987	0,05303

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

#### Stanovenie povrchového napätia a disociačnej konštanty

*Použité chemikálie, prístroje a zariadenia, pracovný postup:* Sú publikované v práci<sup>15)</sup>. Hodnoty povrchového napätia ( $\gamma$ ) a disociačnej konštanty (pK<sub>a</sub>) sú prezentované v tabuľke 3.

#### Stanovenie logaritmu retenčného (kapacitného) faktora „k“ (log k<sup>\*</sup>) z RP-HPLC a rozdeľovacieho koeficientu P<sub>exp</sub> (log P<sub>exp</sub>) v rôznych lipohydrofilných systémoch

*Použité chemikálie, prístroje a zariadenia, pracovný postup, chromatografické podmienky (RP-HPLC), výber lipofiných prostredí pre shake-flask metódu stanovenia P<sub>exp</sub>* sú publikované v prácach<sup>15,17)</sup>. Hodnoty experimentálne stanovených parametrov lipofility sú uvedené v tabuľke 3.

#### Štúdium stability v UV/VIS oblasti

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

*Pracovný postup:* Pripravil sa vodný a metanoleový roztok látky 8e s c = 5 × 10<sup>-5</sup> mol.l<sup>-1</sup>. V priebehu 1 h sa v 5-min intervaloch sledovali (prípadné) posuny vo vlnových dĺžkach absorpčných maxím

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

#### Stanovenie obsahu

##### Stanovenie obsahu látky 8e v UV/VIS oblasti spektra

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

*Pracovný postup:* Pripravil sa 0,002% zásobný(-é) roztok(-y) zlúčeniny 8e vo vode ako aj v metanole, ktorého(-ých) spektrum sa zaznamenalo v oblasti 190 až 400 nm proti čistému rozpúšťadlu. Z konkrétneho zásobného roztoku sa odpipetovalo postupne 2, 4, 6, 8 a 10 ml do piatich 10-ml odmerných baniek. Všetky odmerné banky sa doplnili po značku vodou, resp. metanolom a zaznamenala sa absorbancia takto pripravených roztokov<sup>18)</sup>. Z nameraných hodnôt A sa zostrojila kalibračná krivka; vo vodnom prostredí pri vlnovej dĺžke  $\lambda_{max} = 238$  nm, v metanole pri  $\lambda_{max} = 244$  nm. Hodnoty príslušných koncentrácií a absorbiácií A sú uvedené v tabuľke 4.

*Vyhodnotenie výsledkov:* Obsah zlúčeniny 8e sa stanovil z funkcie priamky ( $y = a x + b$ ). Po zostrojení kalibračnej krivky a štatistickom vyhodnotení v programe OriginPro ver. 8 SR0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) jednotlivé symboly znamenajú:  $y = A$  (absorbancia),  $b = a_0$  (úsek na osi y),  $a = a_1$  (smernica priamky),  $x = c$ . Z týchto vzťahov vyplýva, že koncentrácia sa vypočíta podľa vzťahu:  $c = (A - a_0) / a_1$ .

##### Stanovenie obsahu látky 8e pomocou RP-HPLC metódy vnútorného štandardu

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



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

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

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

\*\*plocha príslušných píkov formovaných látkou *8e* (P<sub>1</sub>) a vnútorným štandardom – kyselinou *para*-metoxyfenyloctovou (P<sub>2</sub>)

Prístroje a zariadenia, chromatografické podmienky sú publikované v práci<sup>15)</sup>.

Pracovný postup: Pripravil sa 0,05 % zásobný roztok látky *8e* v metanole, z ktorého sa kvantitatívne prenieslo do 25-ml odmerných baniek postupne po 1, 2, 3, 4 a 6 ml, do každej 25-odmernej banky sa pridalo 1,5 ml vnútorného štandardu (0,10% metanolový roztok kyseliny *para*-metoxyfenyloctovej) a doplnilo sa metanolom po značku<sup>19)</sup>. Pomocou dávkovacieho ventilu sa z takto pripravených roztokov nanášal na kolónu objem 20 µl.

Vyhodnotenie výsledkov: Z pamäti počítača bol vyvolaný záznam analýzy vzorky, integrovali a opísali sa plochy zodpovedajúce analyzovanej látke (P<sub>1</sub>) a jej vnútornému štandardu (P<sub>2</sub>). Výsledky analýz sa vypočítali z pomeru plôch píkov P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> (tab. 5).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Syntéza študovanej látky bola publikovaná v práci<sup>14)</sup>, molekula *8e* bola pripravená reakciou 2,3-epoxypropán-1-ylesteru kyseliny 3-propoxyfenylkarbámovej (pracovne označený ako *Epoxid-33*) a bázičkej zložky, 1-(3-trifluórmetyl)fenylpiperazínu. Chemická štruktúra analyzovanej zlúčeniny *8e* bola potvrdená <sup>1</sup>H- ako aj <sup>13</sup>C-NMR spektrometriou. V <sup>1</sup>H- a <sup>13</sup>C-NMR spektrách boli dokázané atómy vodíka a uhlíka *meta*-propoxysubstituenta, 2-hydroxypropán-1,3-diylového zoskupenia, karbamátovej funkčnej skupiny, piperazín-1,4-diyly, prítomných aromatických jadier spolu s atómom uhlíka trifluórmetylovej skupiny viazanej na *N*-fenylpiperazínové jadro. V IR spektre hodnotenej molekuly boli identifikované vlnočty zodpovedajúce *meta*-propoxyskupine, aromatickým kruhom v lipofilnej ako aj v solitvornej časti molekuly, NH-skupine karbamátového zoskupenia, arylalkyléteri ako aj karbonylu. Pás IR spektra valenčnej vibrácie (C=O)-skupiny pri 1728 cm<sup>-1</sup> sa môže pri látke *8e* využiť pre kvantitatívne hodnotenie.

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

maximá sú pri 184 nm ( $\epsilon_{1\max} = 60\,000\text{ m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\log \epsilon_{1\max} = 4,79$ ), 204 nm ( $\epsilon_{2\max} = 7900\text{ m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\log \epsilon_{2\max} = 3,90$ ) a 256 nm ( $\epsilon_{3\max} = 200\text{ m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\log \epsilon_{3\max} = 2,30$ ). Substitúcia auxochrómnymi skupinami na benzénovom kruhu znamená posun jednotlivých maxím smerom k vyšším vlnovým dĺžkam<sup>20)</sup>. Druhý lokálne excitálny pás látky *8e* bol vo vodnom prostredí pozorovaný pri 206 nm ( $\lambda_{\max}$ ; pri 212 nm v metanole), *charge-transfer* pás (C-T) pri 238 nm ( $\lambda_{2\max}$ ; pri 244 nm v metanole) a prvý lokálne excitálny pás pri 278 nm ( $\epsilon_{3\max}$ ; pri 282 nm v metanole).

Hmotnostné spektrum je charakteristické pre každú látku a môže byť použité ako „odtlačok palca“ (*fingerprint*) na jej identifikáciu buď porovnaním s už známym spektrom alebo priamo jeho interpretáciou<sup>21)</sup>. Analýza MS študovanej zlúčeniny *8e* poukázala na existenciu zodpovedajúceho molekulového iónu [M + H]<sup>+</sup>, ktorého hodnota *m/z* = 482,2.

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

Hodnotená zlúčenina *8e* je vysokolipofilnou štruktúrou, ktorá je veľmi ťažko rozpustná v destilovanej vode, dobre rozpustná v metanole, mierne rozpustná v liehu 96% a prakticky nerozpustná v chloroforme. Na orientačné hodnotenie jej čistoty bola okrem RP-HPLC použitá adsorpčná chromatografia na tenkej vrstve – delenie látok na adsorpčnom princípe sa uskutočnilo na platniach Silufolu®, vyvíjanie prebiehalo do vzdialenosti 10 cm. Súčasne so zlúčeninou *8e* bol chromatograficky hodnotený aj medziprodukt syntézy – *Epoxid-33*. Vo vyvíjacej sústave *S* (pozri experimentálnu časť) nastalo jednoznačné oddelenie ohraničených škvŕn prislúchajúcich štruktúre *8e* (*R<sub>f</sub>* = 0,38) a *Epoxidu-33* (*R<sub>f</sub>* = 0,59), pričom na príslušnom „stĺpci“ látky *8e* neboli pozorované iné škvŕny.

Študovaná molekula *8e* má schopnosť výrazným spôsobom znižovať povrchové napätie<sup>15)</sup>, je teda povrchovoaktívnou látkou (tab. 3).

Hodnotená zlúčenina *8e* má mierne kyslý charakter<sup>15)</sup>, v jej štruktúre je protonizovaný len jeden atóm dusíka piperazín-1,4-diylového skeletu, ktorému prislúcha *pK<sub>a</sub>* = 5,21. Tento údaj je vyšší ako sú prvé dve hodnoty disociačných konštánt izoniazid<sup>22)</sup> (*pK<sub>a1</sub>* = 2,0; *pK<sub>a2</sub>* = 3,5 a *pK<sub>a3</sub>* = 10,8). Nižšie hodnoty *pK<sub>a</sub>*

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

Skelet bunkovej steny jednotlivých mykobaktérií pozostáva, okrem iného, z troch hlavných, navzájom kovalentne pospájaných podjednotiek, ktorými sú arabinogalaktán (AG), peptidoglykán (PGN) a mykolové kyseliny. Kyselina murámová, ako časť PGN, je *N*-glykolylátovaná (konjugovaná) na kyselinu *N*-glykolylmurámovú. Najtypickejšou črtou stavby konkrétnej mykobakteriálnej bunkovej steny je však to, že až 60 % jej hmotnosti tvoria lipidy a kyselina mykolová<sup>23)</sup>. Makrolidové, tetracyklínové, fluórchinolónové štruktúry alebo rifamycíny sú vysokolipofilné molekuly, ktoré pravdepodobne využívajú lipidovú dvojvrstvu cez prechod bunkovou stenou mykobaktérií<sup>23)</sup>.

Preto je z hľadiska možného mechanizmu antimykobakteriálneho pôsobenia študovanej látky *de* poznanie miery jej lipofily jedným z kľúčových faktorov. Ako vyplýva z údajov sumarizovaných v tabuľke 3 ( $\log k'$ ,  $\log P_{exp}$ ), substancia *de* je vysokolipofilnou štruktúrou, ktorej hodnota  $\log P_{exp}$  stanovená v systéme oktán-1-ol/TFR je vyššia ako rozdeľovací koeficient izoniazidu<sup>24)</sup> (-0,64), pyrazínamidu<sup>25)</sup> (-1,89), kyseliny *para*-aminosalicylovej<sup>26)</sup> (1,01), etiónamidu<sup>27)</sup> (0,71) alebo vysokohydrofilného streptomycínu<sup>28)</sup> (-8,01).

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

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

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

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

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

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

## LITERATÚRA

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

13. **Farthing, M. J. G., Alstead, E. M., Abrams, S. M. L., Haug, G., Johnston, A., Hermann, R., Niebch, G., Ruus, P., Molz, K. H., Turner, P.:** Pharmacokinetics of naftopidil, a novel antihypertensive drug, in patients with hepatic dysfunction. *Postgrad. Med. J.* 1994; 70, 363–366.
14. **Malík, I., Sedlářová, E., Csöllei, J., Andriamainty, F., Kurfürst, P., Vančo, J.:** Synthesis, spectral description, and lipophilicity parameters determination of phenyl-carbamic acid derivatives with integrated *N*-phenyl-piperazine moiety in the structure. *Chem. pap.* 2006; 60, 42–47.
15. **Malík, I., Sedlářová, E., Čižmárik, J., Andriamainty, F., Csöllei, J.:** Štúdium fyzikálno-chemických vlastností derivátov kyseliny 2-, 3-, 4-alkoxyfenylkarbámovej s bázičkou časťou tvorenou substituovaným *N*-fenylpiperazínom. *Čes. slov. Farm.* 2005; 54, 235–239.
16. **European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> Ed.** European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg: Druckerei C.H. Beck 2007; s. 5.
17. **Sedlářová, E., Malík, I., Andriamainty, F., Kečková, S., Csöllei, J.:** Štúdium lipofility derivátov kyseliny fenylkarbámovej s bázičkou časťou tvorenou substituovaným *N*-fenylpiperazínom. *Farm. Obzor* 2007; 74, 86–90.
18. **Malík, I., Andriamainty, F., Sedlářová, E., Čižmárik, J., Gališínová, J., Mokry, P., Csöllei, J., Karlovska, J., Lukáč, M.:** Analytické hodnotenie mono[3-[4-(2-etoxyetoxy)-benzoyloxy]-2-hydroxypropyl]-izopropylamónium]fumarátu. *Čes. slov. Farm.* 2011; 60, 84–93.
19. **Sedlářová, E., Malík, I., Csöllei, J., Andriamainty, F.:** Analytické hodnotenie 1-(4-fluórfenyl)-4-[3-(3-propoxyfenylkarbamoyloxy)-2-hydroxypropyl]piperazíniumchloridu (látka 6f). *Čes. slov. Farm.* 2005; 54, 270–274.
20. **Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J.:** *Spectrometric Identification of Organic Compounds.* 7<sup>th</sup> Ed. New York, London, Sydney, Toronto: John Wiley and Sons 2005; 512 s.
21. **Herbert, Ch. G., Johnstone, R. A. W.:** *Mass Spectrometry Basics.* Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press 2003; 474 s.
22. **Lemke, T. L., Williams, D. A., Roche, V. F., Zito, S. W.:** *Foye's Principles of Medicinal Chemistry.* 6<sup>th</sup> Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business 2008; 1377 s.
23. **Liu, J., Barry, C. E., Nikaido, H.:** Cell wall: physical structure and permeability. In: Ratledge, C., Dale, J. eds. *Mycobacteria, molecular biology and virulence.* Oxford: Blackwell Science 1992.
24. **TB Alliance:** Isoniazid. *Tuberculosis* 2008; 88, 112–116.
25. **TB Alliance:** Pyrazinamide. *Tuberculosis* 2008; 88, 141–144.
26. **TB Alliance:** *Para*-aminosalicylic acid. *Tuberculosis* 2008; 88, 137–138.
27. **TB Alliance:** Ethionamide. *Tuberculosis* 2008; 88, 106–108.
28. **TB Alliance:** Streptomycin. *Tuberculosis* 2008; 88, 162–163.

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

### SOUHRN

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

### SUMMARY

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

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

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

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

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

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

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