

**PRACA
DOKTORSKA**

Polska Akademia Nauk
Instytut Chemii Fizycznej



Małgorzata Koźbiał

**Opis własności fizykochemicznych pochodnych acyklowiruru
i ich kompleksów z wybranymi cyklodekstrynami**

A-21-7
K-d-139
K-g-152

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

H. Ni. Koź

Dr hab. Pawła Gierycza

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.432/11



90000000160899

Warszawa 2011

Institut Chemii Fizycznej
Polska Akademia Nauk



B. 432/11

Podziękowania

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi, Dr hab. Pawłowi Gieryczowi, za wielką życzliwość i pomoc podczas przygotowania tej pracy.

W życzliwej pamięci zachowuję Prof. Dr hab. Wojciecha Zielenkiewicza za to, że przekonał mnie do przygotowania pracy doktorskiej oraz pomógł mi wybrać jej temat.

Dziękuję też Prof. Bożennie Golankiewicz za przekazanie nam związków chemicznych, które są przedmiotem badań opisanych w mojej pracy doktorskiej.

Szczególnie dziękuję Dr hab. Jarosławowi Poznańskiemu za pomoc w interpretacji wyników pomiarów ^1H NMR oraz obliczeń metodami mechaniki i dynamiki molekularnej, a także za udostępnienie programu do obliczeń pKa.

Dziękuję również wszystkim koleżankom i kolegom z zakładu Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych, za pomoc i życzliwą atmosferę w czasie przygotowywania tej pracy.

Dziękuję mojej rodzinie za wspieranie mnie w dążeniu do przygotowania i obrony pracy doktorskiej.

Spis treści.....	3
Summary.....	6
Wykaz skrótów i symboli.....	7
1. Część Literaturowa.....	12
1.1 Budowa i właściwości substancji wykazujących aktywność antywirusową.....	12
1.1.1 Acyklowir - jego własności chemiczne i aktywność antywirusowa.....	12
1.1.2 Pochodne acyklowiru i ich zastosowanie w farmacji.....	14
1.1.3 Tricykliczne pochodne acyklowiru.....	20
1.1.3.1 Struktury i aktywność antywirusowa tricyklicznych pochodnych acyklowiru.....	20
1.1.3.2 Właściwości fizykochemiczne acyklowiru, gancyklowiru i ich pochodnych.....	27
1.1.3.2.1 Właściwości spektralne.....	27
1.1.3.2.2 Właściwości termodynamiczne.....	32
1.1.3.2.3 Badania fizykochemiczne acyklowiru i jego pochodnych w stanie stałym...38	
1.2 Właściwości substancji o znaczeniu farmaceutycznym w kompleksach z cyklodekstrynami.....	41
1.2.1 Charakterystyka najczęściej stosowanych cyklodekstryn.....	42
1.2.2 Kompleksy cyklodekstryn z substancjami aktywnymi biologicznie.....	46
1.2.3 Metody badania kompleksów cyklodekstryn z lekami.....	48
1.2.4 Kompleksy acyklowiru i jego pochodnych z cyklodekstrynami.....	54
2. Część eksperymentalna.....	57
2.1 Odczynniki.....	57
2.2 Aparatura i techniki badawcze.....	59
2.2.1 Badania rozpuszczalności acyklowiru, gancyklowiru oraz wybranych pochodnych.....	59
2.2.1.1 Wyznaczanie rozpuszczalności badanych substancji w wodzie, wodzie nasyconej 1-oktanołem, oktanolu i oktanolu nasyconym wodą.....	59
2.2.1.2 Wyznaczanie rozpuszczalności badanych substancji w buforze fosforanowym o pH równym 5.5 i 7.0. oraz buforowanych roztworach cyklodekstryn.....	60

2.2.1.3 Wyznaczanie rozpuszczalności 6-Fe-O-Me-TACV w n-oktanolu nasyconym buforem fosforanowym oraz roztworach buforowych nasyconych oktanołem zawierających 2×10^{-2} (mol kg ⁻¹) HP-β-CD lub niezawierających cyklodekstryny.....	61
2.2.2 Wyznaczanie wartości pKa wybranych substancji, dla których prowadzono badania rozpuszczalności w roztworach cyklodekstryn.....	61
2.2.3 Wyznaczanie współczynnika podziału pochodnych acyklowiru pomiędzy wodę i 1-oktanol.....	61
2.2.3.1 Wyznaczanie współczynników podziału 6-Fe-O-Me-TACV pomiędzy fazę wodną i organiczną (1-oktanol) w obecności cyklodekstryn.....	62
2.2.4 Termograwimetria.....	62
2.2.5 Pomiary metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej (Differential Scanning Calorimetry – DSC).....	62
2.2.6 Pomiary metodą ¹ H NMR.....	63
2.2.7 Optymalizacja struktury kompleksów metodami mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej.....	63
2.3 Otrzymane wyniki i ich dyskusja.....	64
2.3.1 Badania Rozpuszczalności wybranych pochodnych acyklowiru w wodzie i oktanolu.....	64
2.3.2 Badania rozpuszczalności wybranych trójcyklicznych pochodnych acyklowiru w buforowanych roztworach cyklodekstryn.....	70
2.3.2.1 Wyznaczanie rozpuszczalności pochodnych acyklowiru w roztworach hydroksypropylo-β-cyklodekstryny (HP-β-CD) oraz stałych trwałości kompleksów HP-β-CD z tymi pochodnymi.....	71
2.3.2.2 Wyznaczanie parametrów termodynamicznych procesu kompleksowania dla kompleksów wybranej pochodnej acyklowiru (6-Fe-O-Me-TACV) z HP-β-CD.....	80
2.3.2.3 Wyznaczanie rozpuszczalności 6-Fe-O-Me-TACV w roztworach różnych cyklodekstryn (β-CD, Me-β-CD, HP-γ-CD) oraz wyznaczenie stałych trwałości kompleksów z tymi cyklodekstrynami.....	89
2.3.3 Badania ekstrakcyjne trójcyklicznych pochodnych acyklowiru.....	101
2.3.3.1 Wyznaczanie współczynników podziału trójcyklicznych pochodnych acyklowiru pomiędzy fazę wodną i 1-oktanol.....	101

2.3.3.2 Badania ekstrakcji 6-Fe-O-Me-TACV z roztworu wodnego do 1-oktanolu w obecności cyklodekstryn.....	104
2.3.4 Badania ¹ H NMR.....	108
2.3.5 Wyznaczanie wartości pKa dla pochodnych acyklowiru.....	111
2.3.6 Badania pochodnych acyklowiru, gancyklowiru i pochodnych acyklowiru oraz ich kompleksów z cyklodekstrynami w stanie stałym metodami analizy termicznej (TGA i DSC).....	116
2.3.6.1 Wyznaczanie temperatury topnienia oraz entalpii topnienia acyklowiru i jego pochodnych metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC).....	116
2.3.6.2 Wyznaczanie przebiegów DSC dla kompleksów poszczególnych pochodnych acyklowiru oraz hydroksypropylo-β-cyklodekstryny w stanie stałym oraz odpowiadających im mieszanin fizycznych.....	117
2.3.6.3 Wyznaczanie zawartości wody w cząsteczkach cyklodekstryn metodą termogravimetrii (TGA).....	119
2.3.7 Inne badania trójcyklicznych pochodnych acyklowiru.....	120
2.3.8 Modelowanie kompleksów pochodnych acyklowiru z β-CD i γ-CD.....	120
2.3.9 Wnioski.....	125
2.4 Podsumowanie.....	127
3. Literatura.....	129
4. Załącznik.....	135

Summary

The discovery of acyclovir (ACV), the first potent and selective antiviral drug, has stimulated the synthesis of its analogues. The modification of the acyclic side chain creates several new compounds of significant antiviral activity e.g. gancyclovir or pencyclovir. The next step was the modification of the guanine moiety of acyclovir which resulted in the obtaining of several compounds with appreciable antiviral activity.

The subjects of my research are tricyclic analogs of ACV, obtained by modification of its guanine moiety (synthesized by Prof. B. Golankiewicz and co-workers in Institute of Bioorganic Chemistry PAN) and their cyclodextrin complexes. Tricyclic acyclovir derivatives have different physicochemical properties, but their biological activity although changed, is still present.

The aim of my doctoral thesis is to determine physicochemical properties of studied compounds by solubility, solvent–solvent extraction experiments and thermal analysis. The solubility in water and 1-octanol (at different temperatures and pH values of solution), partition coefficient between water and organic phase, melting temperatures and molar enthalpies of fusion have been determined. To study the stability, structures and thermal characterization of inclusion complexes between tricyclic acyclovir derivatives and chosen cyclodextrins the Higuchi-Connors solubility method, ^1H NMR, differential scanning calorimetry (DSC) measurements and molecular modeling calculations have been used. The results of these experiments enabled for confirmation of inclusion complexes formation, determination of their stability constants and optimization of structure of complexes.

This doctoral thesis consists of the description of measurements, apparatus used, experimental data and calculated results. The literature data containing antiviral drug structures and physicochemical properties, cyclodextrin complexes with antiviral drugs and methods used in cyclodextrin inclusion complexes study were also included to this thesis. At the end of the thesis there are certain conclusions proving that the usage of cyclodextrin changes positively properties of studied compounds, e.g. enhances their solubility in aqueous solutions.

Wykaz skrótów

Terminy medyczne

ACV - acyklowir

CMV - cytomegalowirus

GCV - gancyklowir

HBV - wirus zapalenia wątroby typu B

HEPT - lek antywirusowy

HIV - wirus nabytego braku odporności

HSV-1 - wirus opryszczki pospolitej

HSV-2 - wirus opryszczki narządów płciowych

IC₅₀ - stężenie danego leku, które powoduje zahamowanie replikacji wirusa o 50%.

MKC-442 - lek antywirusowy

MIC₅₀ - minimalne stężenie inhibicji lub stężenie substancji konieczne do zredukowania cytopatogeności wywołanej przez wirusa o 50%

EC₅₀ - efektywne stężenie substancji redukujące replikacje wirusa o 50%

TMV - wirus mozaiki tytoniu

VZV - wirus ospy wietrznej i półpaśca

Skrócone nazwy grup funkcyjnych

Ac - grupa acylowa

Fe - grupa fenylova

Me - grupa metylova

Naft - grupa naftylova

Acyklowir, gancyklowir i pochodne acyklowiru

ACV - acyklowir, 9-[(2-hydroksyetoksy)metylo] guanina

8-Br-ACV - 8-bromo-9-[(2-hydroksyetoksy)metylo] guanina

GCV - gancyklowir, 9-[(1,3-dihydroksy-2-propoksy)metylo]guanina

TACV - 3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna

6-Me-TACV - 6-metylo-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna

2-Br-6-Me-TACV - 2-bromo-6-metylo-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna

6-t-but-TACV - 6-t-But-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo [1,2-a]puryna

6-Fe-TACV - 6-fenilo-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo [1,2-a]puryna

6-Fe-Fe-TACV - 6-(4-bifenylo)-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna

6-Br-Fe-TACV - 6-(4-bromofenilo)-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna

6-Fe-O-Me-TACV 6-(4-metoksyfenilo)-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna

6-Naft-TACV - 6-(2-naftylo)-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna

Cyklodekstryny

α -CD - α -cyklodekstryna

β -CD - β -cyklodekstryna

γ -CD - γ -cyklodekstryna

HP- α -CD - hydroksypropylo- α -cyklodekstryna

HP- β -CD - hydroksypropylo- β -cyklodekstryna

HP- γ -CD - hydroksypropylo- γ -cyklodekstryna

M- β -CD - metylo- β -cyklodekstryna

Techniki instrumentalne

DSC - skaningowa kalorymetria różnicowa

^1H NMR- spektroskopia Magnetycznego Rezonansu Jądrowego

IR - spektroskopia w podczerwieni

TG - termograwimetria

OPLS - typ pola siłowego w obliczeniach optymalizacji struktury cząsteczek metodą mechaniki molekularnej

Symbole występujące w badaniach i obliczeniach fizykochemicznych

A - absorbancja przy danym pH

A_1 - absorbancja formy nieprotonowanej

A_2 - absorbancja formy protonowanej

a i b - współczynniki liczbowe

A_L - liniowa zależność pomiędzy rozpuszczalnością danej substancji w roztworze zawierającym cyklodekstryny, a stężeniem cyklodekstryny

A_P, A_N - nieliniowe typy zależności pomiędzy rozpuszczalnością danej substancji w roztworze zawierającym cyklodekstryny, a stężeniem cyklodekstryny

B_I, B_S - typy zależności pomiędzy rozpuszczalnością danej substancji w roztworze zawierającym cyklodekstryny, a stężeniem cyklodekstryny, (gdy rozpuszczalność danej substancji maleje)

C - stężenie molowe danej substancji

C_{CD} - stężenie molowe cyklodekstryny

$C_{HP-\beta-CD}$ - stężenie hydroksypropylo- β -cyklodekstryny

$C_{\beta-CD}$ - stężenie β -cyklodekstryny

$C_{Me-\beta-CD}$ - stężenie metylo- β -cyklodekstryny

$C_{HP-\gamma-CD}$ - stężenie hydroksypropylo- γ -cyklodekstryny

C_{TACV} - stężenie TACV

$C_{2-Br-6-Me-TACV}$ - stężenie 2-Br-6-Me-TACV

$C_{6-t-But-TACV}$ - stężenie 6-t-But-TACV

$C_{6-Fe-TACV}$ - stężenie 6-Fe-TACV

$C_{6-Fe-Fe-TACV}$ - stężenie 6-Fe-Fe-TACV

$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ - stężenie 6-Fe-O-Me-TACV

$C_{6-Naft-TACV}$ - stężenie 6-Naft-TACV

C_o - stężenie danej substancji w 1-oktanolu lub fazie oktanolowej

C_w - stężenie danej substancji w wodzie

C_0 - stężenie danej substancji w roztworze, który nie zawierał cyklodekstryny?

C_s - stężenie substancji przy danym stężeniu cyklodekstryny

$C_{p,2}^o$ - cząstkowe molowe ciepło właściwe

$C_{p,\phi}$ - pozorne molowe ciepło właściwe

d - gęstość roztworu

ΔE_{kom} - energia tworzenia kompleksu inkluzyjnego po optymalizacji struktury metodami mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej

E_{kom} - energia kompleksu inkluzyjnego po optymalizacji struktury metodami mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej

E_s - energia cząsteczki pochodnej acyklowiru po optymalizacji struktury metodami mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej

E_{CD} - energia czasteczki cyklodekstryny po optymalizacji struktury metodami mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej

ΔH - zmiana entalpii

ΔG - zmiana potencjału termodynamicznego

ΔS - zmiana entropii

ϵ_b – molowy współczynnik ekstynkcji danej substancji w buforze fosforanowym

ϵ_o – molowy współczynnik ekstynkcji danej substancji w 1- oktanolu

ϵ_w – molowy współczynnik ekstynkcji danej substancji w wodzie

ϕ^F - wydajność kwantowa fluorescencji

λ_{max}^{em} - długość fali maksimum fluorescencji

λ_{max} - długość fali maksimum absorpcji

ν_{exc} – liczba falowa wzbudzenia

K_s – stała trwałości

$k_{o/w}$ – współczynnik podziału danej substancji pomiędzy fazę 1-oktanolową i fazę wodną

mp - temperatura topnienia

pH - ujemny logarytm stężenia jonów hydroniowych

pKa - ujemny logarytm stałej protonowania

P - współczynnik podziału wyrażony, jako stosunek stężenia w fazie oktanolowej do stężenia w fazie wodnej, (C_o/C_w).

$P_{o/b}$ – współczynnik podziału danej substancji pomiędzy fazę organiczną i wodną

S_w - rozpuszczalność badanych związków w wodzie

S_f - Entropia topnienia

ΔS_{kom} - zmiana powierzchni kompleksu otrzymanego w wyniku modelowania struktury kompleksu inkluzyjnego cyklodekstryny z daną pochodną acyklowiru, metodami mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej

S_{kom} - powierzchnia kompleksu po optymalizacji metodami mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej

S_s - powierzchnia czasteczki pochodnej acyklowiru po optymalizacji metodą mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej

S_{CD} - powierzchnia cyklodekstryny po optymalizacji metodą mechaniki molekularnej

ΔS_s - wielkość powierzchni (danej pochodnej acyklowiru), która bierze bezpośrednio udział w kompleksowaniu, po optymalizacji metodami mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej

S_{s1} - wielkość powierzchni tej cząsteczki po usunięciu cyklodekstryny ze struktury kompleksu

S_{s2} - wielkość powierzchni tej cząsteczki w obecności cyklodekstryny w kompleksie.

V_{ϕ} - pozorne objętości molowe

V_2^o - cząstkowa objętość molowa

$[S]$ - stężenie substancji rozpuszczonej

$[CD]$ - stężenie cyklodekstryny

$[S_o]$ - stężenie danej substancji w roztworze niezawierającym cyklodekstryny

$[S_t]$ - całkowite stężenie substancji w roztworze cyklodekstryny

$[CD]_t$ - całkowite stężenie

$[D_t]$ - całkowite stężenie leku w roztworze

1. Część Literaturowa

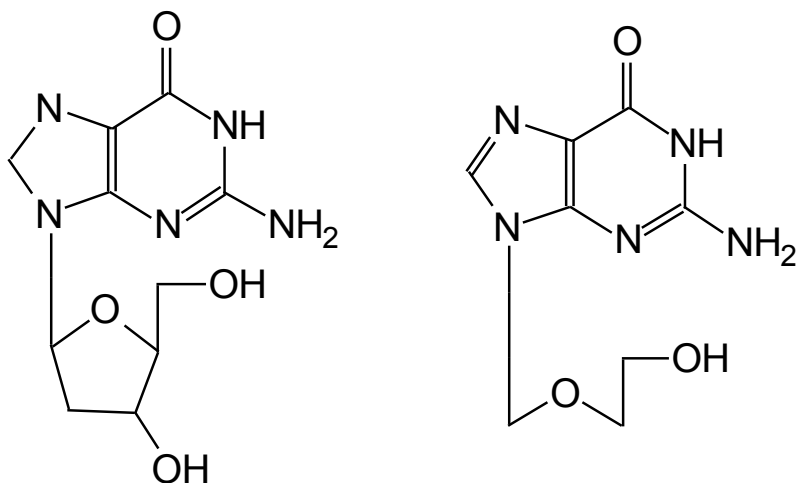
Historia leków antywirusowych sięga lat pięćdziesiątych XX wieku, chociaż pierwszy wirus został odkryty pod koniec XIX wieku. Był to wirus mozaiki tytoniowej (TMV), powodujący plamy na liściach tytoniu. W roku 1892 Iwanowski, a w 1889 Beijerinck zaobserwowali, że istnieje czynnik powodujący tę chorobę u roślin. Wirus TMV został otrzymany w postaci krystalicznej przez Stanleya [1] w 1935 roku. Obecnie w literaturze można znaleźć wiele publikacji na temat leków antywirusowych, jednak ich własności fizykochemiczne oraz kompleksy z cyklodekstrynami są opisane jedynie w niewielu publikacjach, zostaną one omówione w tym rozdziale.

1.1 Budowa i właściwości substancji wykazujących aktywność antywirusową

Na początku XX wieku stwierdzono, że niektóre choroby, występujące u ludzi i zwierząt, mogą być spowodowane zakażeniami wirusami; jednak medycyna długo nie potrafiła znaleźć sposobu leczenia tych chorób. Przez kilkadziesiąt lat intensywnie poszukiwano substancji, które skutecznie zwalczałyby zakażenia powodowane przez wirusy, zarówno wśród substancji naturalnych jak i syntetycznych. Zaprojektowano wiele substancji o różnych strukturach i przeprowadzono ich syntezy. Niektóre z nich, szczególnie te będące syntetycznymi analogami nukleozydów, okazały się skutecznymi lekami antywirusowymi.

1.1.1 Acyklowir - jego własności chemiczne i aktywność antywirusowa

Obecnie istnieją dwa sposoby walki z chorobami wirusowymi, jeden poprzez stosowanie szczepionek lub leków zwiększających odporność organizmu, a drugi poprzez stosowanie leków, których działanie polega na zablokowaniu możliwości replikacji wirusa w organizmie. Do pierwszej grupy, obok szczepionek, należy grupa interferonów [1], natomiast do drugiej zsyntezowany w 1977 roku przez Elliota i współpracowników acyklowir (ACV), który nadal jest jednym z częściej stosowanych leków antywirusowych [2-4]. Stwierdzono wysoką aktywność antywirusową acyklowiru w stosunku do wirusów opryszczki (HSV-1 i HSV-2) oraz ospy wietrznej i półpaśca (VZV), jednocześnie przy małej toksyczności dla człowieka. Acyklowir jest analogiem nukleozydu 2'-deoksyguanozyny, w którym podstawnik cukrowy – pierścień rybozy został zastąpiony łańcuchem cukrowym. Struktury guanozyny **1** oraz acyklowiru **2** przedstawia rysunek 1.1.



1 2'- guanozyna

2 acyklowir (ACV)

Rys. 1.1. Porównanie struktury nukleozydu 2'guanozyny (1) i acyklowiru (2).

Mechanizm działania acyklowiru jest znany i opisany w szeregu artykułów [6-11]. Jednym z nich jest praca zbiorowa w języku polskim p.t. „Leki stosowane w leczeniu zakażeń herpeswirusami ludzi” [11]. Według przedstawionego w tej pracy mechanizmu cząsteczka acyklowiru jest wprowadzana do komórki za pomocą białka transportującego nukleozydy np. deoksyguanozyny. Wewnątrz komórki zakażonej wirusem acyklowir ulega przekształceniu w biologicznie aktywną pochodną fosforanową, poprzez fosforylację grupy hydroksylowej łańcucha cukrowego. Proces ten jest możliwy tylko przy udziale swoistej dla wirusa kinazy tymidowej. Ponieważ acyklowir nie jest odpowiednim substratem dla kinaz komórki gospodarza, dlatego lek jest selektywnie aktywowany głównie w komórkach zakażonych. Powstający monofosforan jest następnie przekształcany przez kinazy komórkowe w difosforan i dalej w trifosforan acykloguanozyny, który jest substratem dla wirusowej polimerazy DNA. Po wprowadzeniu przez polimerazę wirusa zmodyfikowanego nukleozydu do łańcucha DNA, dalsze jego wydłużanie nie jest możliwe, w konsekwencji synteza DNA zostaje zakończona. Trifosforan acyklowiru blokuje aktywność polimerazy DNA wirusów 20 razy skuteczniej niż polimerazy DNA komórek gospodarza. Z tego powodu czynna postać acyklowiru jest znacznie rzadziej wprowadzana do genomu gospodarza niż do materiału genetycznego wirusa, więc toksyczność działania acyklowiru nie jest wysoka [5-8,11].

Acyklowir został zarejestrowany, jako lek w 1982 roku i obecnie jest stosowany głównie w postaci tabletek oraz maści [11]. Badania fizykochemiczne acyklowiru wykazały niską rozpuszczalność acyklowiru w wodzie co ogranicza absorpcję tej substancji przez komórki przy doustnym i dożylnym podawaniu tego leku [11-13]. Acyklowir wchłania się z

przewodu pokarmowego, w 15-30%, co jest wartością wystarczającą, aby uzyskać stężenie terapeutyczne w surowicy krwi. Ważną jego zaletą jest zdolność wnikania do tkanek i płynu mózgowo-rdzeniowego oraz innych płynów ustrojowych [11]. W celu rozszerzenia bioaktywności, obniżenia toksyczności oraz zwiększenia rozpuszczalności w wodzie prowadzono różne modyfikacje cząsteczki acyklowiru, polegające na przyłączaniu różnych grup funkcyjnych do łańcucha cukrowego. W wyniku tych prac otrzymano nowe leki, które są obecnie stosowane w terapii antywirusowej [11]. Przykłady pochodnych acyklowiru zarejestrowanych jako leki antywirusowe opisano w rozdziale 1.1.2.

1.1.2 Pochodne acyklowiru i ich zastosowanie w farmacji

Poszukiwanie nowych leków antywirusowych było spowodowane faktem odkrycia nowych bardzo groźnych wirusów takich, jak np. HIV i konieczności znalezienia sposobu leczenia zakażonych nimi chorych. Jedną z metod poszukiwania nowych leków jest chemiczna modyfikacja cząsteczek już istniejących leków takich jak acyklowir. Pierwsze pochodne acyklowiru, zarejestrowane jako leki, zostały otrzymane w wyniku przyłączenia dodatkowych grup funkcyjnych do łańcucha cukrowego. Taką pochodną był zsyntezowany w 1982 przez Verheydena i Martina, gancyklowir (**3**), który został zarejestrowany, jako lek w 1994 roku [11,14]. Gancyklowir jest strukturalnie podobny do acyklowiru, różni się tylko dodatkowym podstawnikiem hydroksylowym, który odpowiada grupie 3'OH, występującej w deoksyrybonuklozydach. Powoduje to jednak zmianę właściwości biologicznych, wykazuje on 100 razy wyższą aktywność w stosunku do wirusa cytomegalii, ale też większą toksyczność niż acyklowir [7].

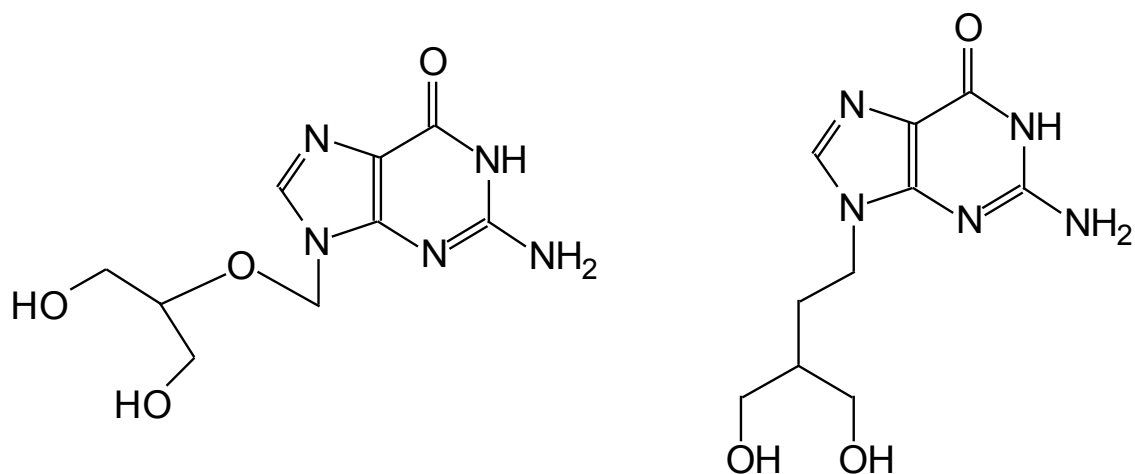
Mechanizm działania acyklowiru i gancyklowiru jest podobny; jednak fosforylacja, której ulega tylko jedna z grup hydroksylowych gancyklowiru, jest łatwiejsza niż w przypadku acyklowiru. Stwierdzono też, że tylko jeden enancjomer fosforanu gancyklowiru (S) jest w stanie hamować replikację herpeswirusów, podczas gdy (R) enancjomer pozostaje nieaktywny [5,15].

Gancyklowir jest stosowany głównie w leczeniu zakażenia wirusem cytomegalii. Stwierdzono również wysoką aktywność tego leku w stosunku do wirusa Epsteina-Barra, wirusa zapalenia wątroby typu B, ludzkiego herpes wirusa typu 6 oraz przeciw zmutowanym szczepom wirusa opryszczki, wobec których acyklowir jest nieaktywny [11]. Gancyklowir podany doustnie wchłania się jedynie w 5-10%, dobrze wnika do tkanek i ośrodkowego

układu nerwowego, jednak wykazuje szkodliwe dla organizmu interakcje z wieloma lekami [15, 16].

Innym przykładem pochodnej acyklowiru o podobnym mechanizmie działania jak acyklowir, jest otrzymany poprzez dołączenie podstawników do łańcucha cukrowego pencyklowir [11, 17] zarejestrowany jako lek w 1994 roku. Badania kliniczne wykazały, że w leczeniu zakażeń ospy wietrznej i półpaśca jego skuteczność jest porównywalna z acyklowirem. Po podaniu doustnym lek jest stosunkowo słabo wchłaniany, jego biodostępność wynosi około 5% [18-20].

Struktury pochodnych acyklowiru, o podobnym mechanizmie działania, które są zarejestrowane jako leki, przedstawia rysunek 1.2.



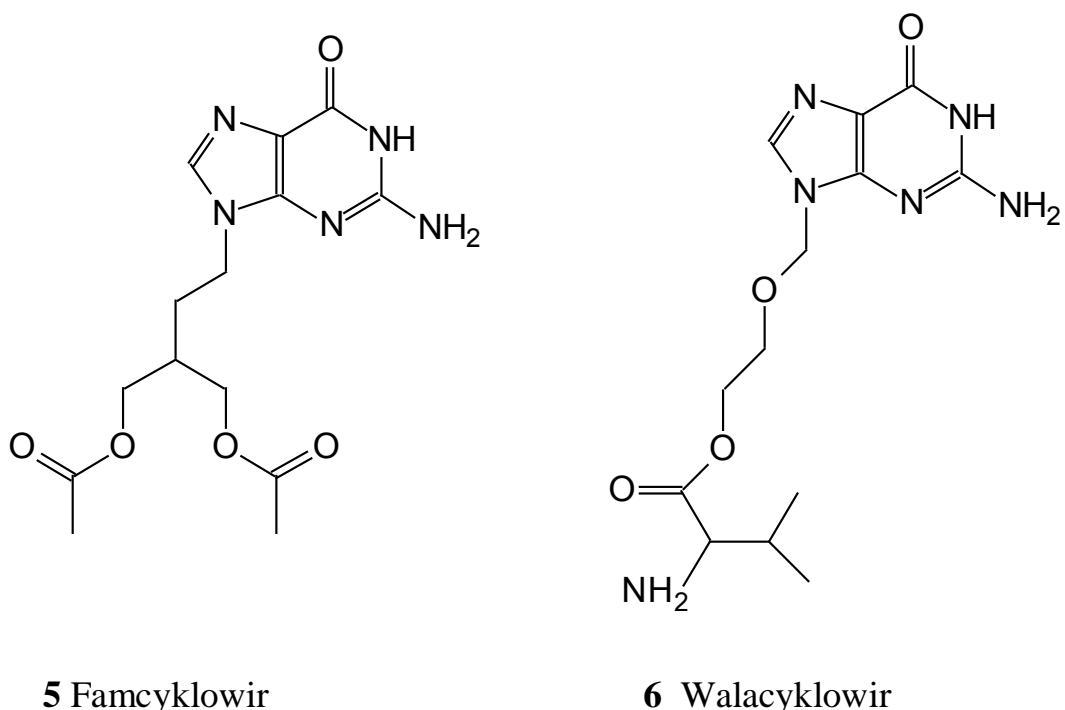
3 Gancyklowir

4 Pencyklowir

Rys. 1.2. Struktury pochodnych acyklowiru stosowanych jako leki, które otrzymano poprzez modyfikację łańcucha cukrowego acyklowiru.

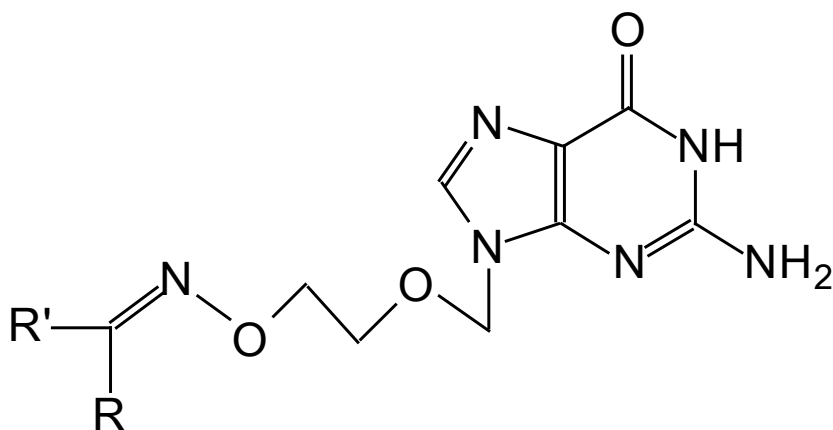
Jedną z metod poprawiania biodostępności biologicznej leków jest opracowywanie tzw. Pro-leków (prekursorów), które mają niską bioaktywność lub nie posiadają jej wcale, jednak uzyskują ją w wyniku przemian metabolicznych w organizmach ludzi lub zwierząt [11]. Słaba biodostępność acyklowiru po podaniu doustnym spowodowała konieczność poszukiwania nowych pochodnych, które charakteryzowałyby się większą skutecznością i łatwością aplikacji. Zsyntezowano wiele pochodnych, w tym pochodne estrowe acyklowiru i gancyklowiru. Wśród tych pochodnych najkorzystniejsze właściwości wykazywał L-walinowy ester acyklowiru [11] – walacyklowir. Podawany doustnie szybko wchłania się z

przewodu pokarmowego i jest prawie całkowicie metabolizowany do acyklowiru i waliny [21-24]. Dalszy mechanizm działania acyklowiru jest taki jak opisano powyżej. Przystawalność acyklowiru po doustnym podaniu jego L-walinowego estru wynosi 54% i jest czterokrotnie wyższa niż przy zastosowaniu acyklowiru. Podawanie walacyklowiru przyczynia się do skuteczniejszego zwalczania zakażeń herpeswirusami, dlatego stosowany jest u pacjentów po przeszczepach oraz zakażonych wirusem HIV [24]. Podobne własności posiada walagancyklowir - ester walinowy gancyklowiru [11]. Innym przykładem takiej pochodnej jest pro-lek famcyklowir [11], który powstał w wyniku etryfikacji pencyklowiru. Famcyklowir jest dobrze wchłaniany w przewodzie pokarmowym i szybko metabolizowany do pencyklowiru. Przy podaniu doustnym jego biodostępność wynosi 77%. Podobnie jak walacyklowir jest on stosowany w leczeniu zakażeń herpeswirusami chorych z niedoborami immunologicznymi [25,26]. Struktury pro-leków, które są pochodnymi estrowymi acyklowiru przedstawia rysunek 1.3



Rys. 1.3. Pro-leki, estrowe pochodne acyklowiru i pencyklowiru, zarejestrowane jako leki w terapii antywirusowej [11].

Przykładem innej grupy związków, posiadających aktywność antywirusową są otrzymane przez Macchię i współpracowników [27] pochodne acyklowiru, w których do grupy OH w łańcuchu cukrowym dołączono różne podstawniki metyleno-aminoksove. Struktury tych związków przedstawia rys. 1.4.



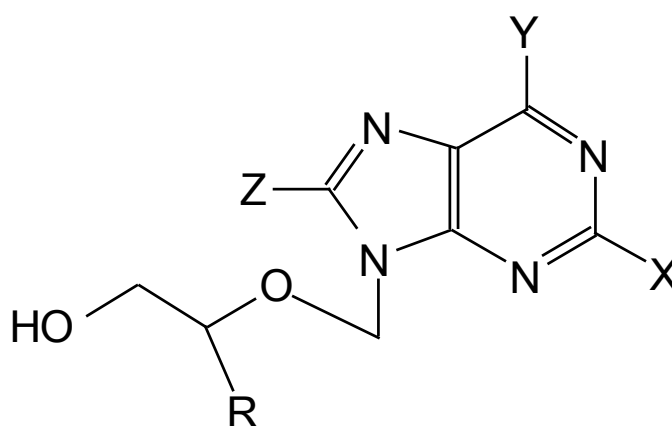
Substancja	R	R'	% Inhibicji ($10 \times 10^{-6} \text{ mol kg}^{-1}$)	IC ₅₀ (μM)
7	H	C ₂ H ₅	50	10
8	CH ₃	CH ₃	0	
9	CH ₃	C ₂ H ₅	55	7.3
10	-	c-C ₄ H ₈	60	5.1
11	H	Fe	0	
12	CH ₃	Fe	40	
2	ACV			0.05

Rys. 1.4. Pochodne acyklowiru, których mechanizm działania jest inny niż acyklowiru i ich właściwości antywirusowe. Aktywność antywirusowa w stosunku do wirusa HSV-1 wyrażono jako procent inhibicji replikacji wirusa przy stężeniu substancji antywirusowej równym ($10 \times 10^{-6} \text{ mol kg}^{-1}$). IC₅₀ oznacza stężenie danego leku, które powoduje zahamowanie replikacji wirusa o 50%.

Pochodne acyklowiru, których struktury pokazano na rysunku 1.4 wykazują aktywność w stosunku do herpeswirusów pomimo, braku grupy hydroksylowej. Mechanizm działania tych substancji jest inny niż acyklowiru, ponieważ nie jest możliwa wewnątrzkomórkowa fosforylacja, która w przypadku acyklowiru jest jednym z etapów prowadzących do zahamowania replikacji wirusa. Taka modyfikacja łańcucha cukrowego substancji przedstawionych na rysunku 1.4 umożliwiła zbadanie wpływu różnych grup funkcyjnych na lipofilowość i właściwości antywirusowe analogów acyklowiru. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że są one biologicznie aktywne, jednak ich właściwości antywirusowe są niższe niż acyklowiru. Wyjątkiem jest pochodna posiadająca 2

podstawniki metylowe, która nie wykazuje aktywności w stosunku do wirusów. Dokładny mechanizm aktywności antywirusowej w przypadku tych substancji nie jest jeszcze znany. Znane są również inne substancje aktywne w stosunku do HIV-1, które nie wymagają etapu fosforylacji do skutecznej inhibicji replikacji wirusa [28]. Są to pochodne znanego luku antywirusowego HEPT takie jak np MKC-442, posiadające znaczącą aktywność antywirusową w stosunku do wirusa HIV-1 mimo braku grupy hydroksylowej zdolnej do ulegania fosforylacji [29,30]. Innym przykładem modyfikacji łańcucha cukrowego acyklowiru jest fosforylacja grupy hydroksylowej. Tak otrzymane pochodne [31] mogą łatwiej ulegać dalszym przemianom, gdyż nie wymagają wstępnego etapu fosforylacji zachodzącej w organizmach żywych. Stwierdzono, że są one aktywne w stosunku do podstawowych wirusów HSV, HBV, HIV i CMV. Tego typu związki oraz ich aktywność antywirusowa jest przedmiotem patentu zgłoszonego przez Gosselina i Imbacha w 1997 [31].

Poszukiwania nowych leków antywirusowych prowadzone były również w kierunku wprowadzenia podstawników alkilowych, aminowych, hydroksylowych oraz halogenkowych do części guaninowej cząsteczki acyklowiru i gancyklowiru, przy niezmienionej strukturze łańcucha cukrowego [32,33]. Tego typu syntezy miały na celu otrzymanie substancji o zmienionych właściwościach fizykochemicznych, których mechanizm działania antywirusowego byłby podobny do sposobu działania wyjściowych leków. Przykładowe struktury takich związków otrzymane przez De Clerq [33] przedstawia rysunek 1.5.



Substancja	R	X	Y	Z
13	H	H	OH	H
14	H	H	NH ₂	H
15	H	H	N(CH ₃) ₂	H
16	H	NH ₂	Cl	H
17	Ac	H	Cl	H
18	Ac	Cl	Cl	H
19	Ac	NH ₂	Cl	H
20	H	NH ₂	OH	CH ₃
21	H	NH ₂	OH	Cl
22	H	NH ₂	OH	Br
23	H	NH ₂	OH	I
24	H	NH ₂	OH	OH
25	H	NH ₂	OH	NH ₂
26	H	NH ₂	OH	NHCH ₃
27	H	NH ₂	OH	N(CH ₃) ₂
28	H	NH ₂	OH	N(CH ₂) ₅

Rys. 1.5. Struktury związków otrzymanych w wyniku przyłączenia grup funkcyjnych do części guaninowej acyklowiru.

Większość substancji, których struktury przedstawia rysunek 1.5 wykazuje aktywność antywirusową w stosunku do wirusów HSV-1 i HSV-2. Aktywność antywirusowa związków **13-28** jest niższa niż acyklowiru, jednak są one znacznie mniej od niego toksyczne.

Przedstawione w tej części pracy substancje **2-28** należą do grupy analogów nukleozydów, która ma bardzo istotne znaczenie w leczeniu zakażeń herpeswirusowych. Niektóre z nich są stosowane jako leki, które cechuje duża aktywność terapeutyczna oraz wysoka selektywność działania. Wykazują jednak efekty uboczne, stąd też konieczność poszukiwania nowych substancji - potencjalnych leków. Prowadzone w tym kierunku badania mają na celu syntezę nowych leków oraz wykorzystanie substancji naturalnych uzyskiwanych z roślin, grzybów czy gąbek [34]. Jednak mimo zsyntezowania dużej liczby, czasem bardzo skomplikowanych strukturalnie, związków, tylko niewielka grupa znajduje zastosowanie w terapii antywirusowej.

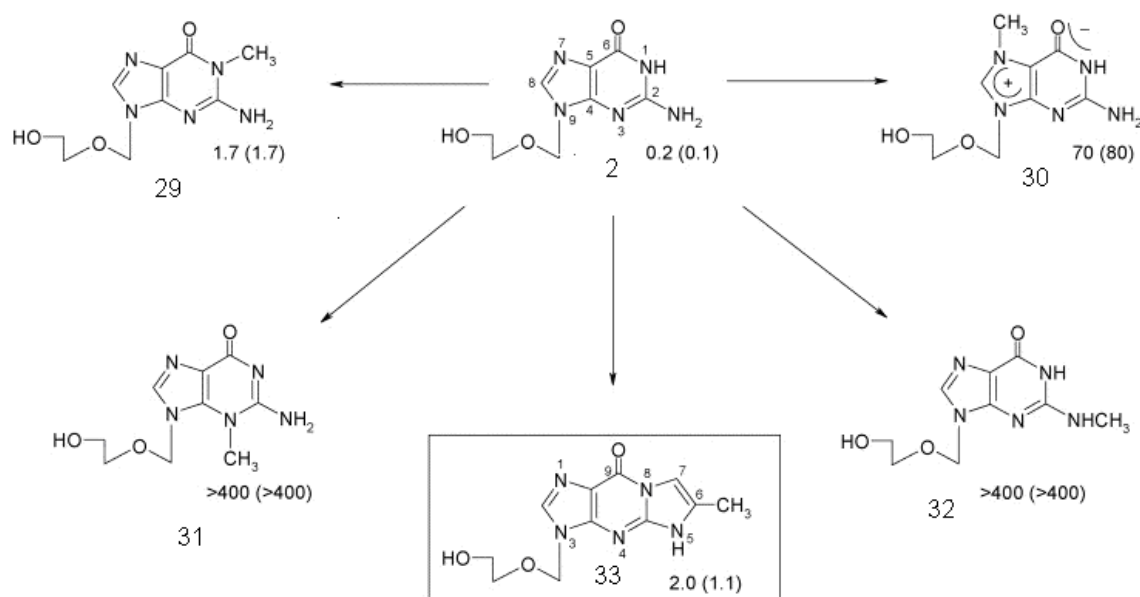
1.1.3 Tricykliczne pochodne acyklowiru

Przykładem grupy związków, pochodnych acyklowiru, są jego tricykliczne pochodne otrzymane w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, w zespole prof. B. Golankiewicz. Substancje te są przedmiotem mojej pracy. Pierwsze próby syntezy tricyklicznych pochodnych acyklowiru i sprawdzenie ich właściwości antywirusowych przeprowadzono w 1985 roku [35], jednak temat ten został rozwinięty później dopiero przez prof. B. Golankiewicz i jej współpracowników [36].

1.1.3.1 Struktury i aktywność antywirusowa tricyklicznych pochodnych acyklowiru.

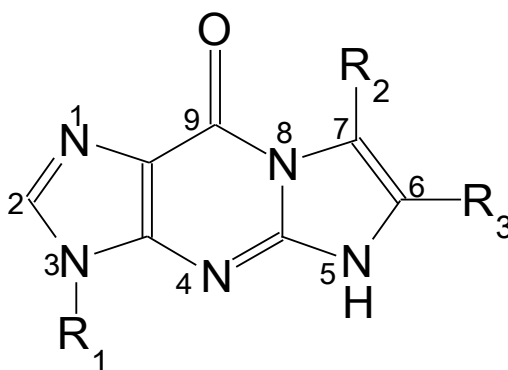
Grupa tricyklicznych pochodnych acyklowiru, otrzymana w zespole prof. Golankiewicz [36] powstała w wyniku modyfikacji części guaninowej acyklowiru, przy jednoczesnym zachowaniu struktury łańcucha cukrowego. Aktywność antywirusowa tych związków wynika z podobnego łańcucha przemian, jakim ulega cząsteczka acyklowiru w zakażonych komórkach. Struktury i właściwości antywirusowe zostały przedstawione w krótkiej pracy przeglądowej p.t. „Tricyclic nucleoside analogues as antiherpes agents, Mini – review”, której autorami są B. Golankiewicz and Tomasz Ostrowski [36]. Opisy syntezy tricyklicznych pochodnych acyklowiru oraz bardziej szczegółowe informacje na temat właściwości antywirusowych tych związków przedstawiają liczne publikacje zespołu prof. B. Golankiewicz [37-43].

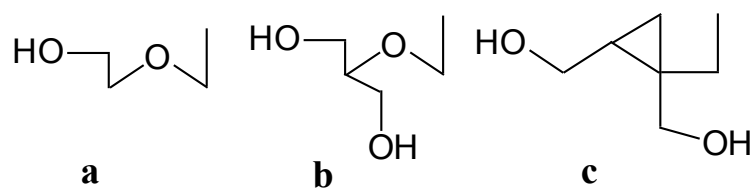
Przed rozpoczęciem syntezy tricyklicznych pochodnych acyklowiru postanowiono sprawdzić rolę atomów azotu, znajdujących się w strukturze acyklowiru, podczas przemian prowadzących do zahamowania aktywności wirusów przez ten lek. W tym celu wykonano szereg syntez, w wyniku, których otrzymano pochodne acyklowiru posiadające grupy metylowe, przyłączone do różnych atomów azotu [36]. Struktury tak zmodyfikowanych pochodnych acyklowiru przedstawia rysunek 1.6.



Rys. 1.6. Pochodne acyklowiru, w których grupy metylowe przyłączono do różnych atomów azotu w cząsteczce acyklowiru w celu zbadania ich udziału w mechanizmie blokowania replikacji wirusów oraz ich aktywność antywirusowa w stosunku do wirusów HSV (w nawiasie) wyrażona jako wartość minimalnego stężenia inhibicji ($\mu\text{g dm}^{-3}$).

Po zbadaniu ich aktywności antywirusowej stwierdzono, że występuje następująca sekwencja wpływu udziału atomów azotu w procesie zahamowania replikacji wirusów. $N(3) \geq N(2) > N(7) > N(1)$. Oznaczenia atomów azotu są zgodne z numeracją przedstawioną na rysunku 1.6. Stwierdzono, że wśród pochodnych acyklowiru przedstawionych na rysunku 1.6, najlepszą aktywność antywirusową, porównywalną z aktywnością acyklowiru wykazuje pochodna **30**, w której zablokowano atom azotu w pozycji 7 oraz tricykliczna pochodna **33** posiadająca podstawnik metylowy w pozycji 6, w której zablokowano atomy azotu w pozycji 1 i 2. Informacje uzyskane podczas tych badań wykorzystano do zaprojektowania szeregu tricyklicznych pochodnych posiadających trzy typy łańcucha cukrowego. Struktury tych związków są przedstawione na rysunku 1.7.





Substancja	R ₁	R ₂	R ₃
34	a	H	H
35	b	H	H
36	c	H	H
33	a	H	Me
37	a	H	Fe
38	a	H	4-Fe-Fe
39	b	H	Fe
40	b	H	4-Fe-Fe
41	a	H	4-Me-O-Fe
42	a	Me	Fe
43	b	H	4-Me-O-Fe
44	b	Me	Fe
45	a	H	2-Me-O-Fe
46	a	H	2-Naft
47	a	H	4-H-O-Fe
48	a	H	4-H ₂ N-Fe
49	a	H	4-(Fe-O-COO)Fe
50	b	H	4-(Fe-O-COO)Fe
51	a	H	4-Ac-O-Fe
52	a	H	4-Ibu-O-Fe
53	b	H	4-HO-Fe
54	b	H	4-HO-CH ₂ -Fe-Fe
55	c	H	Fe
56	c	H	4-Me-O-Fe
57	a	Me	4-F-Fe

Rys. 1.7. Struktury tricyklicznych pochodnych acyklowiru otrzymane przez Prof. B.Golankiewicz i współpracowników [36].

Analizując aktywność antywirusową przedstawionych związków stwierdzono, że podstawienie grup funkcyjnych w dodatkowym pierścieniu pochodnej, zwiększa aktywność antywirusową. Na selektywność i aktywność antywirusową danego związku wpływają usytuowanie i rodzaj danego podstawnika oraz struktura łańcucha cukrowego. Podstawienie grupy fenylowej lub bifenylowej w pozycji 6 powoduje duży wzrost właściwości antywirusowych, szczególnie w przypadku pochodnych gancyklowiru [36]. Analizując wpływ struktury podstawnika aromatycznego na aktywność antywirusową można stwierdzić, że najbardziej korzystne są te, w których, dodatkowe grupy są przyłączone w pozycji para. Inne podstawienia gwałtownie obniżają te własności. Podstawienie podstawników aromatycznych w pozycji 6 wzmacnia również fluorescencję tych związków [44,45], co może mieć duże znaczenie dla diagnostyki obecności wirusa w organizmach ludzkich oraz monitorowania stężenia leków antywirusowych w płynach biologicznych. Opis właściwości fluorescencyjnych tricyklicznych pochodnych acyklowiru będzie podany w rozdziale poświęconym własnościom fizykochemicznym tych substancji. Ze względów leczniczych oraz diagnostycznych pożądane są substancje wykazujące zarówno aktywność antywirusową jak i dobre właściwości fluorescencyjne. Stosując takie kryteria wobec związków, których struktury przedstawia rysunek 1.7, zrobiono zestawienie, uwzględniając wcześniej otrzymane dane dotyczące aktywności antywirusowej oraz właściwości fluorescencyjnych potencjalnych leków [37-45]. To zestawienie przedstawia tabela 1.1, a ich aktywność w stosunku do acyklowiru **2** i gancyklowiru **3** tabela 1.2. Analizując dane zawarte w tabeli 1.1 można stwierdzić, że pochodne acyklowiru **49** oraz gancyklowiru **50** posiadające podstawniki fenylo,4-fenoksykarbonyloksy-, usytuowane w pozycji 6, posiadają najlepszą kombinację aktywności antywirusowej oraz właściwości fluorescencyjnych. Te pochodne, podobnie jak substancje **51-53**, w organizmach żywych ulegają rozkładowi pod wpływem enzymów do wyjściowych tricyklicznych pochodnych acyklowiru i gancyklowiru. Związki te mogą stanowić nową grupę pro-leków, posiadających nie zablokowaną grupę -OH w łańcuchu cukrowym niezbędną do dalszych przemian prowadzących do zahamowania replikacji wirusa. Innym interesującym związkiem jest tricykliczna pochodna acyklowiru **57**, która nie wykazuje fluorescencji. Posiada ona podstawnik fluoroarylowy, który powoduje, ta pochodna może być znaczącym substratem w procesach prowadzących do zahamowania replikacji wirusa, badanych metodą ^{19}F NMR [36].

Tabela 1.1. Wybrane tricykliczne pochodne acyklowiru i gancyklowiru posiadające najlepszą kombinację aktywności antywirusowych i fluorescencji [36]. Aktywność antywirusowa została wyrażona w postaci minimalnego stężenia inhibicji replikacji wirusa o 50% (MIC₅₀) lub efektywnego stężenia redukującego aktywność antywirusową o 50% (EC₅₀). Zdolności fluorescencyjne danej substancji wyraża wydajność kwantowa danej substancji (ϕ^F) oraz długość fali przy której występuje maksimum fluorescencji ($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$).

Substancja	MIC ₅₀ ^a (μmol dm ⁻³) różnego typu herpeswirusów								EC ₅₀ ^b (μM dm ⁻³)		Fluorescencja	
	HSV-1 (KOS)	HSV-1 (F)	HSV-1 (McIntyre)	HSV-2 (G)	HSV-2 (196)	HSV-2 (Lyons)	CMV (Davis)	CMV (AD-169)	VZV (YS)	VZV (OKA)	ϕ^F	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (nm)
2^d	0.089	0.018	0.311	0.400	0.044	0.040	nd	58.61	1.69	0.800	nf	
37^d	1.23	2.15	0.615	4.00	0.615	2.15	510	>300	4.30	4.00	0.079	392 ^e
2^f	0.577	0.355	0.577	0.844	0.311	1.24	nd	nd	nd	nd	nf	
41^f	0.281	0.197	0.084	0.422	0.563	0.563	nd	nd	nd	nd	0.095	359 ^g
42^f	0.324	0.118	0.177	0.471	0.295	0.206	nd	nd	nd	nd	0.007	366 ^g
45^f	5.40	5.40	5.40	5.40	27.02	27.02	nd	nd	nd	nd	0.222	369 ^g
46^f	15.45	25.57	25.57	17.05	42.62	25.57	nd	nd	nd	nd	0.536	404 ^g
2^h	0.341	0.341	0.341	0.242	1.00	1.00	nd	nd	nd	nd	nf	
51^h	0.601	0.200	0.200	0.601	0.200	0.200	nd	nd	nd	nd	0.434	384 ^g
52^h	0.560	0.311	0.187	0.622	0.933	0.933	nd	nd	nd	nd	0.400	383 ^g
49^h	0.832	0.166	0.166	0.830	0.832	0.832	nd	nd	nd	nd	0.541	388 ^g
47^h	0.675	0.225	0.225	0.675	0.375	0.225	nd	nd	nd	nd	0.070	369 ^g

2 ⁱ	0.568	0.342	1.71	1.71	0.342	0.342	nd	nd	nd	nd	nf	
57 ⁱ	1.08	1.08	1.08	5.37	5.37	5.37	nd	nd	nd	nd	nf	
3 ^d	0.012	0.016	0.016	0.078	0.157	0.016	3.53	5.88	5.49	1.96	nf	
39 ^d	0.056	0.014	0.014	0.844	0.056	0.014	19.70	56.28	8.44	1.13	0.084	396 ^e
3 ^f	0.024	0.016	0.024	0.039	0.078	0.157	nd	nd	nd	nd	nf	
43 ^f	0.013	0.013	0.013	0.078	0.208	0.052	nd	nd	nd	nd	0.037	357 ^g
44 ^f	0.054	0.014	0.014	0.081	0.014	0.054	nd	nd	nd	nd	0.021	371 ^g
3 ^h	0.030	0.045	0.040	0.060	0.100	0.045	nd	nd	nd	nd	nf	
50 ^h	0.008	0.031	0.781	0.417	0.781	0.156	nd	nd	nd	nd	0.480	388 ^g
53 ^h	0.041	0.041	0.207	0.960	0.207	0.207	nd	nd	nd	nd	0.081	371 ^g
3 ^j	0.005	nd	nd	0.015	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nf	
54 ^j	0.166	nd	nd	0.832	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.150	428 ^k
2 ^l	2.40	nd	nd	16.00	nd	nd	nd	nd	3.20	1.40	nf	
3 ^l	0.480	nd	nd	3.20	nd	nd	nd	nd	nd	1.20	nf	
55 ^l	0.960	nd	nd	6.40	nd	nd	nd	nd	0.710	1.03	0.092	411 ^e
56 ^l	1.28	nd	nd	6.40	nd	nd	nd	nd	0.400	0.950	0.045	386 ^e

nd - nie było wyznaczane, nf – nie wykazuje fluorescencji, ^a minimalne stężenie inhibicji lub stężenie substancji konieczne do zredukowania cytopatogenności wywołanej przez wirusa o 50%, ^b efektywne stężenie substancji redukujące replikację wirusa o 50%, ^c wydajność kwantowa fluorescencji, ^d [38], ^e widmo mierzone w wodzie, wzbudzenie przy 305 nm, ^f [39], ^g widmo mierzone w metanolu, wzbudzenie przy 305 nm, ^h [44], ⁱ [41], ^j [45], ^k widmo mierzone w H₂O – MeOH 10:1, wzbudzenie przy 340 nm, ^l [42].

Tabela. 1.2. Porównanie aktywności biologicznej tricyklicznych analogów acyklowiru i gancyklowiru z macierzystymi substancjami [36]. Wartości podane w tabeli oznaczają ile razy aktywność antywirusowa danej substancji jest niższa lub wyższa (+) niż aktywność acyklowiru i gancyklowiru. Aktywności acyklowiru i gancyklowiru są podane w tabeli 1.1

Substancja	HSV-1 (KOS)	HSV-1 (F)	HSV-1 (McIntyre)	HSV-2 (G)	HSV-2 (196)	HSV-2 (Lyons)	VZV (YS)	VZV (OKA)
37	14	120	2	10	14	54	2.5	5
41	+2	+2	+7	+2	2	+2	nd	nd
42	+2	+3	+3	+2	1	+6	nd	nd
51	2	+2	+2	2.5	+5	+5	nd	nd
52	2	1	+2	3	1	1	nd	nd
49	2	+2	+2	3	1	1	nd	nd
47	2	+1.5	+1.5	3	+3	+4	nd	nd
57	2	3	+2	3	16	16	nd	nd
39	5	1	1	11	+3	1	1.5	+2
43	+2	1	+2	2	3	+3	nd	nd
44	2	1	+2	2	+6	+3	nd	nd
50	+4	+1.5	20	7	8	3.5	nd	nd
54	35	nd	nd	56	nd	nd	nd	nd
55	7.5	nd	nd	7	nd	nd	2	3
56	10	nd	nd	7	nd	nd	1	3

1.1.3.2 Właściwości fizykochemiczne acyklowiru, gancyklowiru i ich pochodnych.

Określenie właściwości fizykochemicznych acyklowiru, gancyklowiru oraz ich pochodnych jest ważne ze względu na poznanie mechanizmu działania oraz możliwości zwiększenia aktywności poprzez modyfikację ich cząsteczek. Dodatkowe grupy funkcyjne mają wpływ na lipofilowość cząsteczek, zmieniając zarówno rozpuszczalność w płynach ustrojowych jak i możliwość przenikania przez błony komórkowe. Dodatkowe grupy funkcyjne zmieniają też własności spektralne, ważne ze względu na możliwość śledzenia mechanizmów biologicznych w warunkach laboratoryjnych poprzez obserwację zmian absorbancji lub fluorescencji roztworów w tkankach. Możliwa jest też kontrola stężenia leków w płynach ustrojowych oraz różnego rodzaju badania właściwości fizykochemicznych, np. wyznaczanie rozpuszczalności w różnych rozpuszczalnikach, gdzie stężenia wyznaczone są najczęściej spektrofotometrycznie.

Przedmiotem badań są również inne ważne właściwości fizykochemiczne tych substancji, takie jak:

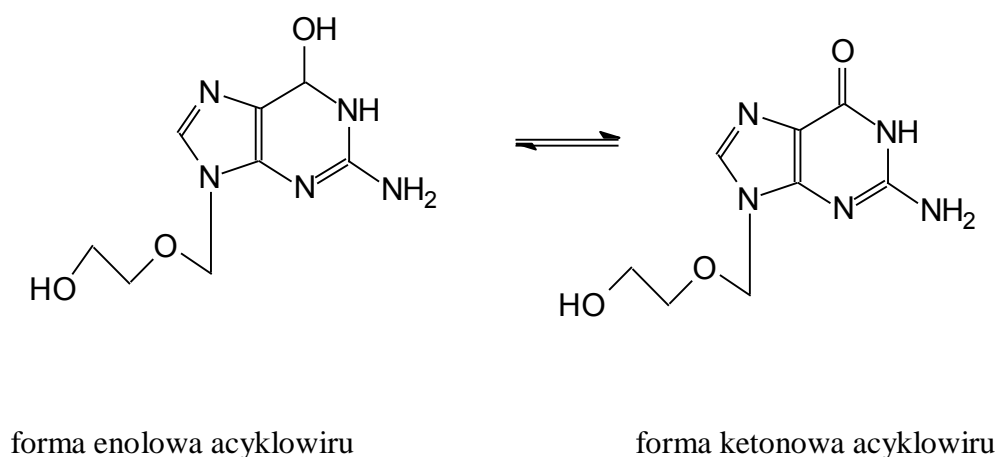
- rozpuszczalność w różnych rozpuszczalnikach i temperaturach
- współczynnik podziału pomiędzy fazę wodną i organiczną
- temperatura i entalpia topnienia,
- ciepło właściwe
- gęstość w różnych temperaturach.

Wyznaczenie wartości fizykochemicznych dla zarejestrowanych lub potencjalnych leków pozwala na optymalizację sposobu podawania leku oraz opracowanie odpowiednich metod analitycznych sprawdzających czystość leku w procesie produkcji. Literatura [45-52] opisująca właściwości fizykochemiczne acyklowiru i jego pochodnych jest stosunkowo uboga i ogranicza się do kilku poświęconych temu tematowi prac oraz krótkich wzmianek w pracach opisujących syntezę i aktywność antywirusową. W pracach tych podano jedynie własności fizykochemiczne umożliwiające identyfikację chemiczną otrzymanych związków, takie jak temperatury topnienia czy położenie sygnałów NMR [37-43].

1.1.3.2.1 Właściwości spektralne acyklowiru i jego pochodnych.

Poznanie własności spektralnych acyklowiru i jego pochodnych jest ważne ze względu na możliwość detekcji stężenia tych związków metodą spektrofotometryczną lub spektrofluorometryczną. Ważna jest też możliwość identyfikacji cząsteczek pochodnych acyklowiru metodą ^1H NMR.

Dane dotyczące przebiegu widma acyklowiru oraz charakterystykę widm pochodnych octanowych acyklowiru w różnych rozpuszczalnikach, takich jak woda, acetonitryl i chlorek metylenu, przedstawia praca M. Plass i współpracowników [47]. Widma absorpcyjne tych związków w różnych rozpuszczalnikach różnią się między sobą, gdyż acyklowir może występować w roztworach w dwóch formach tautometrycznych, enolowej i ketonowej [47], których struktury przedstawia rysunek 1.8.

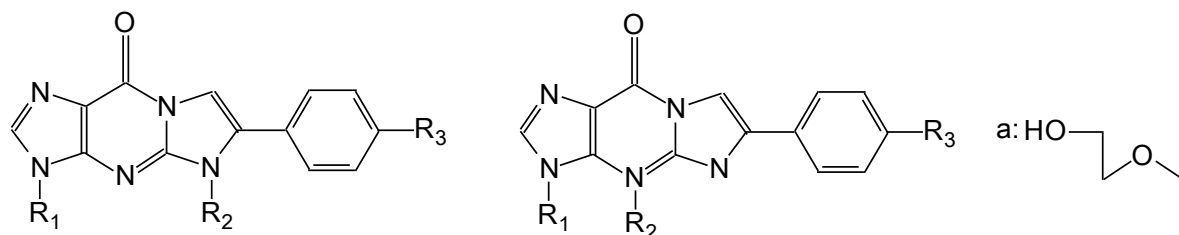


Rys. 1.8. Struktury tautomeryczne acyklowiru (enolowa i ketonowa).

Silnym chromoforem w cząsteczce acyklowiru jest pierścień purynowy, posiadający system sprzężonych elektronów π , który podczas badań spektroskopowych umożliwia obserwację, intensywnych sygnałów pochodzących od cząsteczki acyklowiru nawet w stężeniu ok. 10^{-6} (mol dm^{-3}). Tautomerizm keto-enol wpływa na system elektronów π pierścienia purynowego, a więc na kształt widm acyklowiru. Widma acyklowiru w roztworach wodnych zawierają piki obecne zarówno w niepolarnym chlorku metylenu jak i polarnym acetonitrylu co świadczy o obecności obydwu form tautometrycznych będących w równowadze w roztworze wodnym. Badania $^1\text{H NMR}$ [47] pozwoliły na stwierdzenie, że w wodnym roztworze nasyconym stosunek stężenia formy enolowej i ketonowej jest równy jedności. Na podstawie widm acyklowiru w acetonitrylu oraz chlorku metylenu stwierdzono że, w acetonitrylu występuje głównie forma ketonowa, a w chlorku metylenu głównie forma enolowa [47]. Widma pochodnych octanowych acyklowiru (w różnych rozpuszczalnikach) nie wskazywały na występowanie dwóch form tautometrycznych.

Właściwości spektralne tricyklicznych pochodnych syntezowanych w grupie prof. Golankiewicz zostały opisane w pracach dotyczących własności antywirusowych tych związków [36,44,45]; poświęcono im też jedna pracę przeglądową [46]. Celem tej pracy była charakterystyka właściwości absorpcyjnych i fluoroscencyjnych tricyklicznych pochodnych acyklowiru, których

struktury przedstawia rysunek 1.9, w rozpuszczalnikach o różnej polarności, oraz w roztworach wodnych o różnych wartościach pH

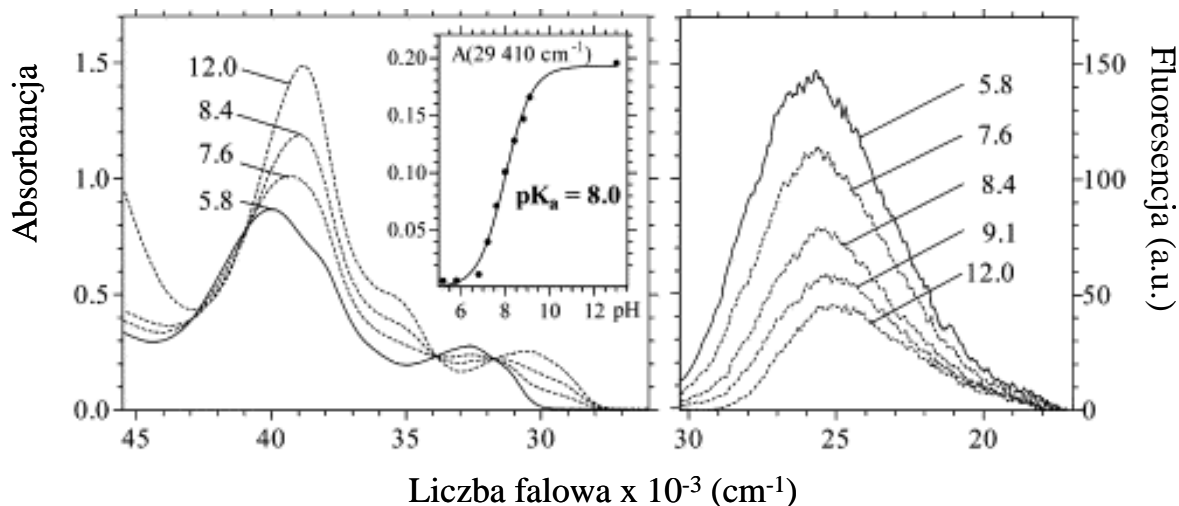


Substancja	R ₁	R ₂	R ₃	Substancja	R ₁	R ₂	R ₃
58	a	CH ₃	H	62	a	CH ₃	H
59	CH ₃	CH ₃	H	63	CH ₃	CH ₃	H
37	a	H	H	64	CH ₃	H	H
60	CH ₃	H	H				
61	a	H	OCOCH(CH ₃) ₂				

Rys. 1.9. Struktury tricyklicznych pochodnych acyklowiru [46].

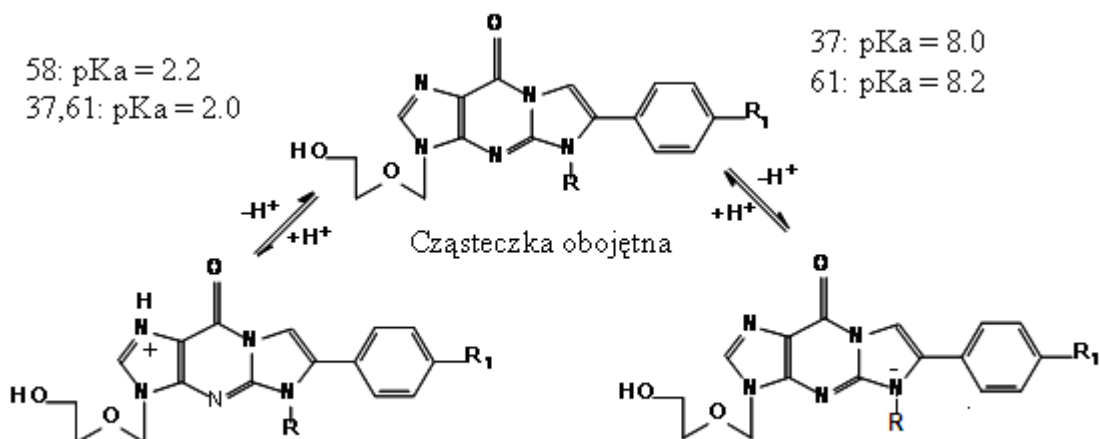
Widma absorbcyjne i emisyjne substancji przedstawionych na rysunku 1.9 mierzono w organicznych rozpuszczalnikach protycznych takich jak CH₃OH, n-C₄H₉OH oraz aprotycznych CH₃CN, 1,4-dioksan, a także w roztworach wodnych o pH = 5.8. Lekko kwaśne roztwory wodne zostały wybrane, aby zapobiec deprotonacji substancji **37** i **61**, oraz, żeby mieć pewność, że wszystkie badane substancje występują wyłącznie w formie obojętnej. Wybór rozpuszczalników ograniczony był niską rozpuszczalnością badanych związków. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że wartości molowych współczynników ekstynkcji tylko w niewielkim stopniu są zależne od polarności rozpuszczalnika, nie są też zależne od oddziaływań z rozpuszczalnikami aprotycznymi. Publikacja zawiera szczegółowe dane dotyczące położenie maksimów widm i wartości absorpcji i fluorescencji w tych maksimach dla badanych substancji w różnych rozpuszczalnikach [46]. Na podstawie przedstawionych wyników badań fluorescencyjnych można zaobserwować przesunięcia widm emisyjnych badanych substancji przy zmianie rozpuszczalnika. Autorzy badali również widma trójcyklicznych pochodnych acyklowiru w roztworach buforowych o różnym pH, w celu sprawdzenia możliwości monitorowania stężenia tych substancji, w płynach ustrojowych metodami spektralnymi oraz wyznaczenia zależności widm

absorpcyjnych i emisyjnych od pH. Przykładowe widma absorpcyjne oraz emisyjne jednej z tricyklicznej pochodnej acyklowiru (**37** na rysunku 1.9) zmierzone w roztworach wodnych o różnym pH oraz wyznaczona na ich podstawie wartość pKa przedstawione są na rysunku 1.10.



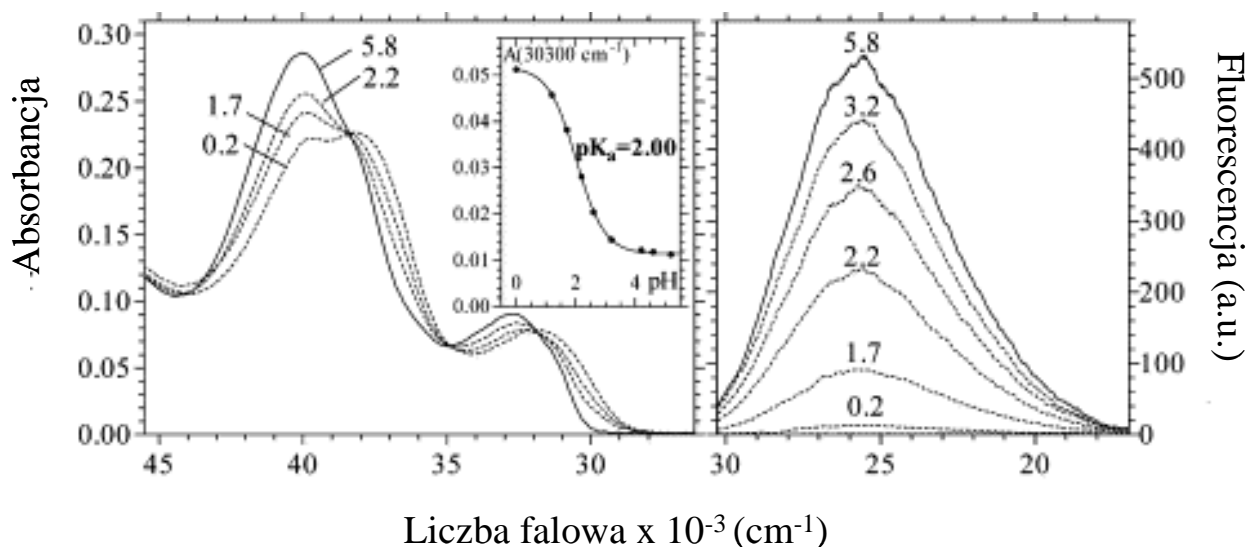
Rys. 1.10. Widma UV i fluorescencja substancji **37** otrzymane przy wyznaczonych zasadowych pH oraz krzywa miareczkowania spektrofotometrycznego otrzymana na podstawie wartości absorbancji dla liczby falowej $29\,410\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{exc}}=31\,750\text{ cm}^{-1}$ [46].

Otrzymane widma pokazują, że wraz ze wzrostem wartości pH jedno z maksimum przesuwają się w kierunku czerwieni, drugie zanika, pojawia się też nowe pasmo przy około $35\,710\text{ cm}^{-1}$. Na rysunku widoczne są dwa punkty izobestyczne przy $31\,750$ i $33\,840\text{ cm}^{-1}$. Zmiany widma obserwowane przy zasadowych pH związane są z deprotonacją cząsteczki **37**. Wyliczona stała protonacji pKa wynosi 8.0. Widma emisyjne przedstawione na rysunku pokazują, że wraz ze wzrostem pH intensywność fluorescencji spada a maksimum przesuwają się w kierunku dłuższych długości fali, co wynika z powstawania anionu, którego fluorescencja jest znacznie niższa niż fluorescencja obojętnej formy tej substancji. Schemat protonacji i deprotonacji badanej cząsteczki przy zmianie pH pokazuje rysunek 1.11.



Rys. 1.11. Schemat protonowania i deprotonacji trójcyklicznych pochodnych zachodzących przy zmianie pH roztworu [46].

Przy obniżaniu wartości pH roztworu obserwujemy inny charakter zmian widm absorpcyjnych i emisyjnych zmierzonych dla substancji **37**. Rysunek 1.12 przedstawia serię widm tej substancji zmierzonych w roztworach kwaśnych.



Rys. 1.12. Widma absorpcyjne i fluorescencja jednej z tricyklicznych pochodnych acyklowiru (**37** na rysunku 1.9) oraz wartości absorbancji przy liczbie falowej równej $30\,300\text{ cm}^{-1}$ na podstawie, których wyznaczono stałą protonowania.

Autorzy podają, że widma substancji oznaczonych na rysunku 1.8 jako **58** i **61** mają podobny charakter, co wynika z tego, że ulegają one protonacji lub deprotonacji w podobny sposób jak cząsteczka **37**. Widma emisyjne pokazują, że wraz ze wzrostem kwasowości roztworu maleje

intensywność fluorescencji. Wartości stałych pKa dla tych substancji leżą w zakresie 2-2.2. Z opisanych tu badań wynika konieczność uwzględniania obecności różnych form pochodnych acyklowiru w roztworach wodnych przy wyznaczaniu właściwości tych substancji.

1.1.3.2.2 Właściwości termodynamiczne

Właściwości termodynamiczne acyklowiru oraz jego pochodnych w roztworach i stanie stałym są opisane w niewielu publikacjach [48-51]; najczęściej w pracach omawiających syntezę tych substancji podawane są tylko wartości temperatur topnienia służące do ich identyfikacji lub parametry analizy chromatograficznej. Stosunkowo niewiele prac omawia badania rozpuszczalności pochodnych acyklowiru w wodzie, w różnych temperaturach. A. Kristl [48] w swojej publikacji dotyczącej acyklowiru i jego pochodnych octanowych podaje wartości rozpuszczalności tych substancji w wybranych wyższych alkoholach takich jak heptanol, oktanol i nonanol a także w wodzie. Autorzy wyznaczyli rozpuszczalności badanych substancji w czystych alkoholach i w wodzie oraz w wodzie nasyconej alkoholem i alkoholu nasyconym wodą. Otrzymane wyniki porównali ze współczynnikami podziału tych substancji pomiędzy fazę wodną i organiczną. Korzystając z wyznaczonych rozpuszczalności i wartości temperatur topnienia oraz entalpii topnienia wyznaczonych metodą DSC, obliczono współczynniki aktywności badanych związków w roztworach wodnych oraz organicznych. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że acyklowir oraz jego octanowe pochodne najlepiej rozpuszczają się w wodzie oraz w wodzie nasyconej alkoholami. Rozpuszczalność tych związków w wyższych alkoholach jest znacznie niższa a wynika to z hydrofilowego charakteru acyklowiru i jego pochodnych octanowych. Wyznaczone współczynniki podziału tych substancji pomiędzy fazę wodną i organiczną, którą stanowią wyższe alkohole, mają zbliżone wartości, a ich wartości wyrażone jako $\log P$ ułożone są według sekwencji:

$\log P$ heptanol > $\log P$ octanol > $\log P$ nonanol.

Inna praca tego autora [49] przedstawia próby oszacowania rozpuszczalności acyklowiru oraz jego octanowych pochodnych na podstawie równania Jalkowskiego i Valvani, w którym do obliczenia rozpuszczalności niezbędne są wartości współczynnika podziału oraz temperatury topnienia. Równanie Jalkowskiego – Valvani przedstawione jest poniżej.

$$\log S_w \approx -1.00 \log P - 1.11 \frac{\Delta S_f (mp - 25)}{1364} + 0.54 \quad (1.1)$$

gdzie:

S_w - rozpuszczalność badanych związków w wodzie w (mol dm^{-3}),

ΔS_f - Entropia topnienia ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

mp – temperatura topnienia ($^{\circ}\text{C}$),

P - współczynnik podziału wyrażony, jako stosunek stężenia w fazie oktanolowej do stężenia w fazie wodnej, (C_o/C_w).

Wyniki przeprowadzonych badań [49] i obliczeń pokazują, że rozpuszczalność acyklowiru oraz jego pochodnych octanowych nie może być wyznaczana przy użyciu równania Jalkowskiego - Galvani, gdyż wyniki odbiegają znacznie od wartości wyznaczanych doświadczalnie.

Kolejnym przykładem badań, których przedmiotem są roztwory acyklowiru oraz jego pochodnych, są prace zespołu prof. W. Zielenkiewicza. Celem tego zespołu było wyznaczenie wielkości termodynamicznych roztworów tych substancji [50,51]. Przedmiotem badań pierwszej pracy była tricykliczna pochodna acyklowiru **33** posiadająca podstawnik metylowy w pozycji 6. Związek ten charakteryzuje się stosunkowo dobrą rozpuszczalnością w wodzie, co umożliwia sporządzenie roztworów o stężeniach umożliwiających przeprowadzenie badań densymetrycznych i kalorymetrycznych. Na podstawie tych badań wyznaczono pozorne objętości molowe roztworów o różnych stężeniach badanej substancji w temperaturach 25, 35 i 45 $^{\circ}\text{C}$, a także entalpię sublimacji i entalpię rozpuszczania. Na podstawie otrzymanych danych wyznaczono entalpię hydratacji. Tabela 1.3 przedstawia pozorne molowe objętości roztworów badanej substancji wyznaczone w czasie tych badań.

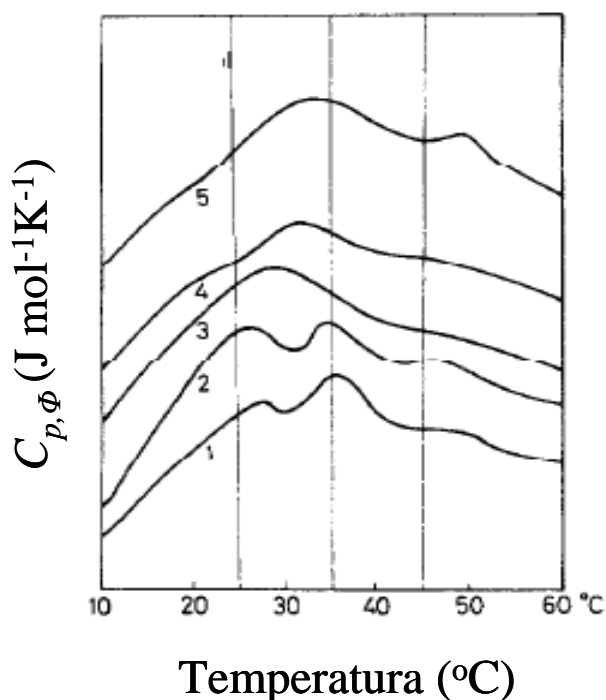
Tabela 1.3. Gęstości (d) i pozorne objętości molowe (V_{ϕ}) tricyklicznej pochodnej acyklowiru **33** w roztworach wodnych w różnych temperaturach [50].

stężenie (mol kg^{-1})	25 $^{\circ}\text{C}$		35 $^{\circ}\text{C}$		45 $^{\circ}\text{C}$	
	d (g cm^{-3})	V_{ϕ} ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)	d (g cm^{-3})	V_{ϕ} ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)	d (g cm^{-3})	V_{ϕ} ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)
0.008237	0.997859	164.1	0.994840	165.1	0.991010	166.4
0.010086	0.998052	163.1	0.995033	164.0	0.991190	166.4
0.012504	0.998290	163.4	0.995260	165.1	0.991411	167.5
0.013369	0.998572	163.6	0.995339	165.5	0.991494	167.6
0.015195	0.998572	162.5	0.995534	164.4	0.991684	166.6
0.018331	0.998881	162.8	0.995853	163.9	0.991990	166.4

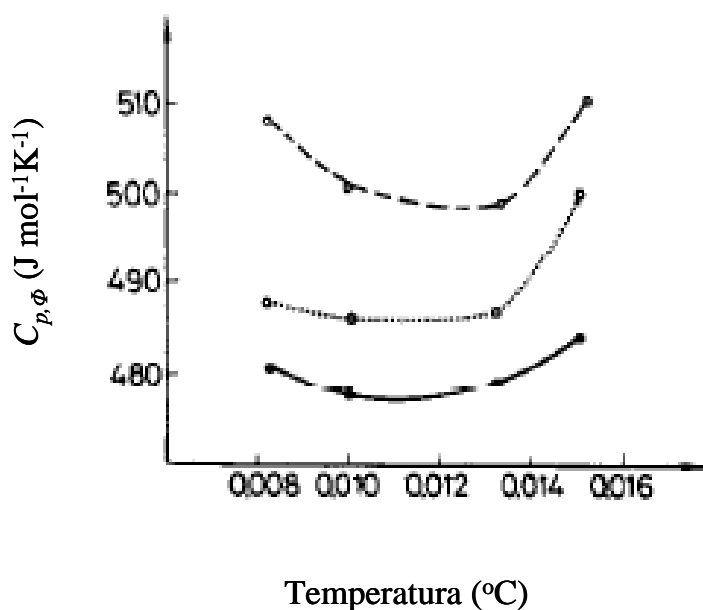
Badania kalorymetryczne roztworów pochodnej acyklowiru pozwoliły na wyznaczenie wartości molowego ciepła właściwego w zależności od temperatury oraz wartości ciepła rozpuszczania. Rysunki 1.13 i 1.14 przedstawiają przebiegi DSC roztworów wodnych pochodnej **33** oraz zależność C_p od stężenia substancji w badanych roztworach, a tabela 1.4 entalpie rozpuszczania tej substancji w 25°C.

Tabela 1.4. Wartości entalpii rozpuszczania tricyklicznej pochodnej acyklowiru **33** w wodzie w 25°C [50].

stężenie (mol kg ⁻¹)	masa substancji x 10 ⁻³ (g)	Masa wody (g)	Entalpia rozpuszczania (kJ mol ⁻¹)
0.000338	5.71	64.2190	24.9
0.000363	6.15	64.3502	25.8
0.000389	6.57	64.0340	24.4
0.000378	6.38	64.0526	24.6



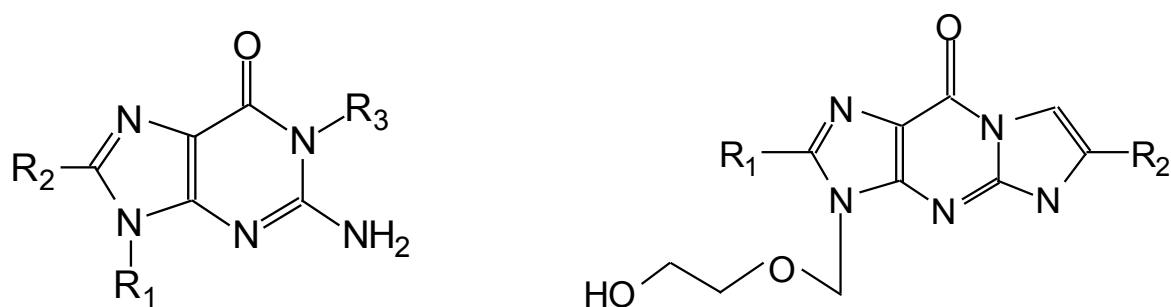
Rys. 1.13. Przebiegi DSC dla różnych stężeń pochodnej acyklowiru **33**[50], 1- 8.237 x 10⁻³ (mol kg⁻¹), 2- 10.086 x 10⁻³ (mol kg⁻¹), 3- 12.504 x 10⁻³ (mol kg⁻¹), 4- 13.386 x 10⁻³ (mol kg⁻¹), 5- 15.195 x 10⁻³ (mol kg⁻¹).



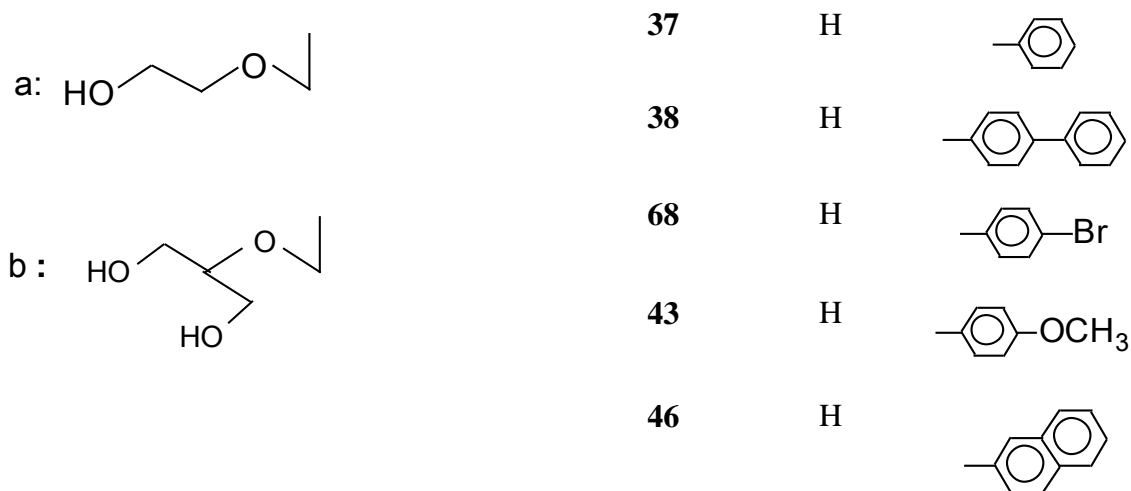
Rys. 1.14. Zależność pozornego molowego ciepła właściwego $C_{p,\phi}$ od stężenia badanej substancji w 25°C (-), 35°C (---) i 45°C (···) [50].

Wyznaczone wartości gęstości, standardowej entalpii rozpuszczania i energii hydratacji tricyklicznej pochodnej acyklowiru **33**, posiadającej aktywność antywirusową może być wykorzystana do dalszych badań tej substancji.

Tematem kolejnej pracy prof. Zielenkiewicza i współpracowników [51] była szersza grupa związków, które są obecnie stosowanymi lub potencjalnymi lekami antywirusowymi. Struktury tych związków przedstawia rysunek 1.15. Są wśród nich acyklowir **2**, gancyklowir **3** i pochodne acyklowiru o różnej budowie.



Substancja	R ₁	R ₂	R ₃	Substancja	R ₁	R ₂
2	a	H	H	34	H	H
65	a	Br	H	33	H	CH ₃
3	b	H	H	66	Br	CH ₃
29	a	H	CH ₃	67	H	C(CH ₃) ₃



Rys. 1.15. Struktury acyklowiru i jego pochodnych [51].

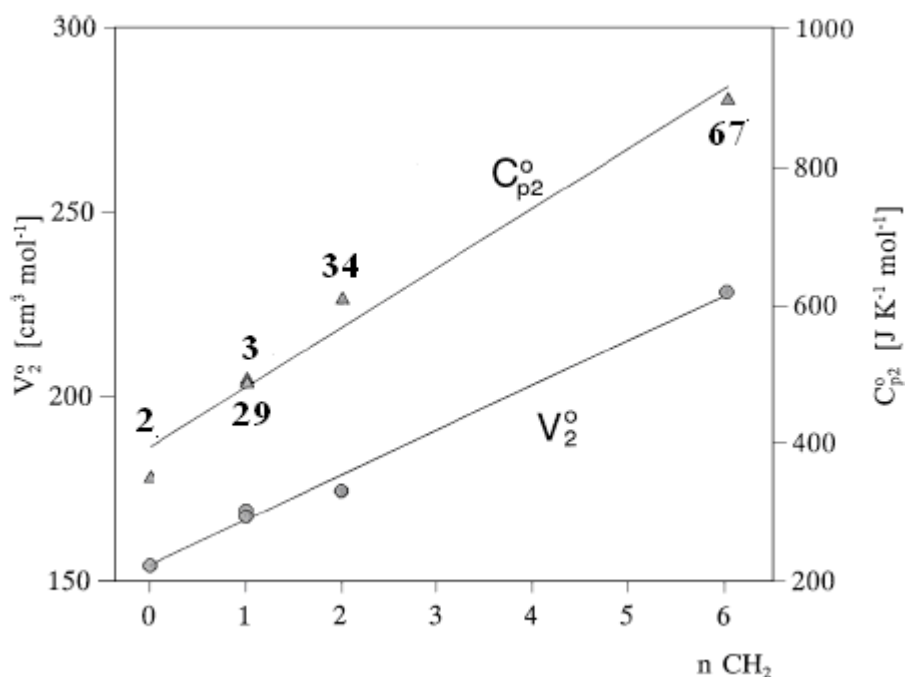
W ramach przeprowadzonych badań eksperymentalnych tych substancji wyznaczono gęstości roztworów wodnych oraz pozorną objętość molową, a także ciepło właściwe wybranych związków, charakteryzujących się wystarczającą rozpuszczalnością w wodzie. Dane te przedstawia tabela 1.5.

Tabela 1.5. Eksperymentalnie wyznaczone wartości gęstości (d), pozornej (V_ϕ) i cząstkowej (V_ϕ^o) objętości molowej oraz pozornego ($C_{p\phi}$) i cząstkowego ($C_{p,2}^o$) molowego ciepła właściwego acyklowiru i jego analogów w wodzie w 25°C [51].

Substancja	C (mol kg ⁻¹)	d (g cm ⁻³)	V_ϕ (cm ³ mol ⁻¹)	V_ϕ^o (cm ³ mol ⁻¹)	$C_{p\phi}$ (J mol ⁻¹ kg ⁻¹)	$C_{p,2}^o$ (J mol ⁻¹ kg ⁻¹)
2	0.000401	0.997075	157.9			391.5 ± 0.8
	0.000550	0.997086	150.7			
	0.000631	0.997091	155.6		388.3	
	0.003001	0.997260	151.7			
	0.003099	0.997267	153.8		392.8	
	0.005690	0.997452	153.7			
	0.005736	0.997455	154.6	154.0 ± 5.8	393.3	
34	0.002225	0.997220	174.3		608.9	
	0.002592	0.997249	174.8		611.8	
	0.002657	0.997254	173.3		611.0	
	0.002754	0.997261	174.3		610.0	

	0.002811	0.997265	174.0			
	0.002863	0.997269	174.8	174.5 ± 1.0		610.4 ± 0.3
67	0.002760	0.997262	227.7		899.2	
	0.002777	0.997259	227.3			
	0.002799	0.997256	229.1		902.2	
	0.002834	0.997234	229.7		895.6	
	0.002865	0.997267	229.2			899.0 ± 0.9
	0.002983	0.997277	228.9	228.6 ± 0.2		
3	0.009914	0.997864	167.9		496.7	
	0.010001	0.997872	169.6			
	0.010002	0.997872	169.3		489.7	
	0.012499	0.998087	169.4	169.2 ± 0.5	493.2	493.2 ± 1.0
33	0.002736	0.997256	166.9			
	0.005011	0.997420	168.9		490.0	
	0.006156	0.997502	166.6		490.8	
	0.006940	0.997559	166.6		488.9	
	0.007848	0.997624	168.0	167.5 ± 0.8	480.0	487.4 ± 1.2

Dane zawarte w tabeli 1.5 pokazują, że wartości objętości właściwej oraz ciepła właściwego zależą w dużym stopniu od liczby grup $-\text{CH}_2$ w cząsteczce. Biorąc to pod uwagę, obliczono udziały odpowiadające jednej grupie $-\text{CH}_2$, a na tej podstawie wyznaczono równania, umożliwiające wyznaczenie wartości objętości oraz ciepła właściwego dla substancji, dla których nie było to możliwe ze względu na ich niska rozpuszczalność w wodzie. Otrzymane doświadczalnie wartości cząstkowych objętości molowych i molowego ciepła właściwego dla acyklowiru (**2**) i wybranych jego pochodnych (**33**, **34**, **67**) oraz gancyklowiru (**3**) w zależności od liczby grup CH_2 w cząsteczce zostały przedstawione na rysunku 1.15.



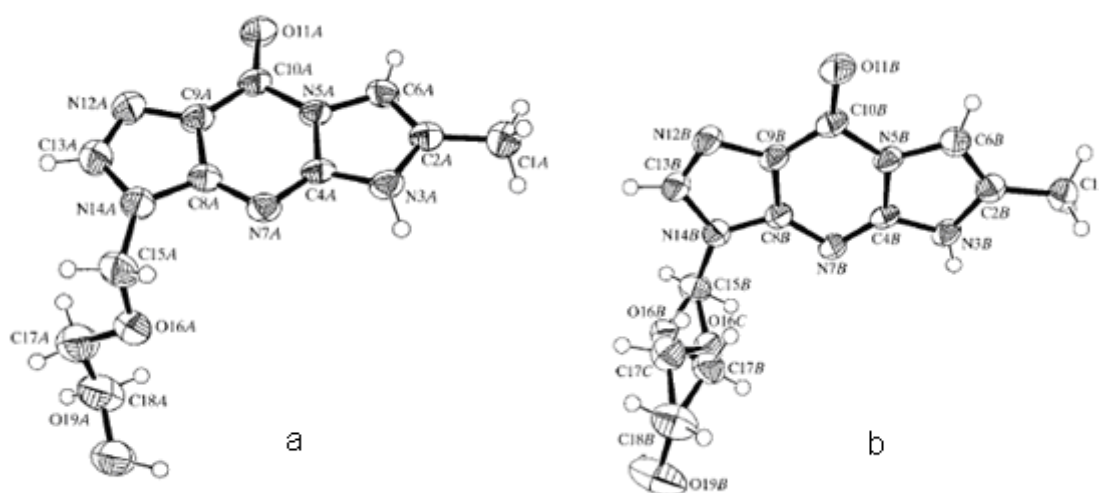
Rys. 1.16. Zależność cząstkowych objętości molowych (C_{p2}^o) i cząstkowego molowego ciepła właściwego (V_2^o) substancji: **2, 3, 29, 34, 67** od liczby grup $-CH_2$ w cząsteczce [51].

Oprócz opisanych powyżej prac, nieliczne dane termodynamiczne związane np. z analizą chromatograficzną, można znaleźć jedynie w pracach dotyczących syntezy pochodnych acyklowiru [36-45].

1.1.3.2.3 Badania fizykochemiczne acyklowiru i jego pochodnych w stanie stałym.

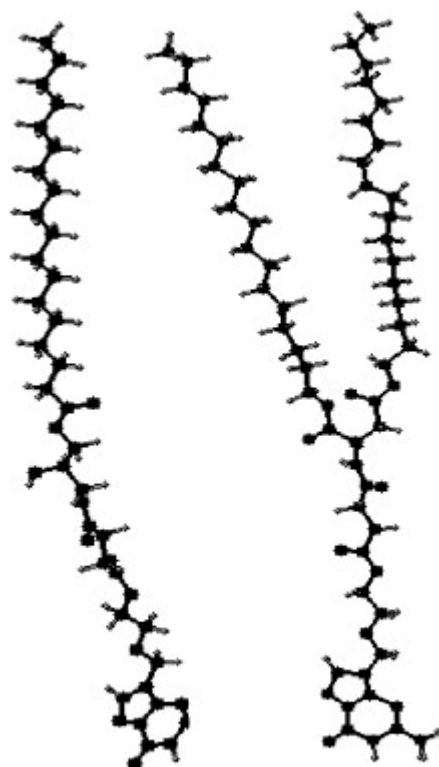
Badania acyklowiru i jego pochodnych w stanie stałym nie są szeroko opisywane w literaturze. W pracach dotyczących syntezy i aktywności antywirusowej badanych związków [32-45], znaleźć można jedynie krótkie wzmianki dotyczące temperatury topnienia i widm IR, służących do identyfikacji badanych substancji. Praca A. Kristla i współpracowników [52] jest jedną z publikacji opisujących badania acyklowiru w stanie stałym. Opisano w niej wyniki analizy termicznej, dyfrakcji proszkowej oraz IR, otrzymane dla bezwodnej i uwodnionej formy acyklowiru [52]. W pracy tej stwierdzono, że stosunek cząsteczek acyklowiru do cząsteczek wody w hydratowanej postaci acyklowiru wynosi 3:2. Analiza termiczna bezwodnego acyklowiru pokazała, że istnieją dwie formy krystaliczne tego związku, jedna nietrwała otrzymywana przy ogrzewaniu poniżej 150°C, druga trwała otrzymywana przy ogrzewaniu powyżej 150°C, która pokazuje przejście fazowe w ciele stałym przy temperaturze 172°C. Autorzy na podstawie tych badań stwierdzili, że acyklowir może występować w formie pseudopolimorficznego i polimorficznego solwatu.

Innym przykładem badań w stanie stałym jest analiza dyfraktometryczna krystalicznej formy metylowej tricyklicznej pochodnej acyklowiru **33**, będącej już przedmiotem opisanych wcześniej badań termodynamicznych [50,53]. Autorzy wyznaczyli strukturę krystaliczną tej pochodnej, z której wynika, że ta pochodna acyklowiru w stanie krystalicznym występuje w postaci dwóch konformerów. Woda zaobserwowana w strukturze krystalicznej znajduje się pomiędzy cząsteczkami pochodnej acyklowiru. Na podstawie badań dyfraktometrycznych stwierdzono, że pomiędzy badaną cząsteczką, a cząsteczkami wody istnieje skomplikowana sieć wiązań wodorowych, która może także istnieć w roztworze wodnym tej substancji. Struktury krystaliczne dwóch konformerów pochodnej **33** przedstawia rysunek 1.17.



Rys. 1.17. Struktury dwóch konformerów (a) i (b) występujących w strukturze krystalicznej tricyklicznej pochodnej acyklowiru **33** [53].

Inna ciekawa praca, której autorami są Jin i współpracownicy [54], dotyczy pochodnych acyklowiru, otrzymanych poprzez przyłączenie do jego cząsteczki długich łańcuchów stearylowych, glicerylowych lub bursztynowych. Autorzy przeprowadzili badania warstw Lngmuir'a na powierzchni woda - powietrze zawierających te pochodne acyklowiru. Struktury cząsteczek tych pochodnych przedstawia rysunek 1.18.

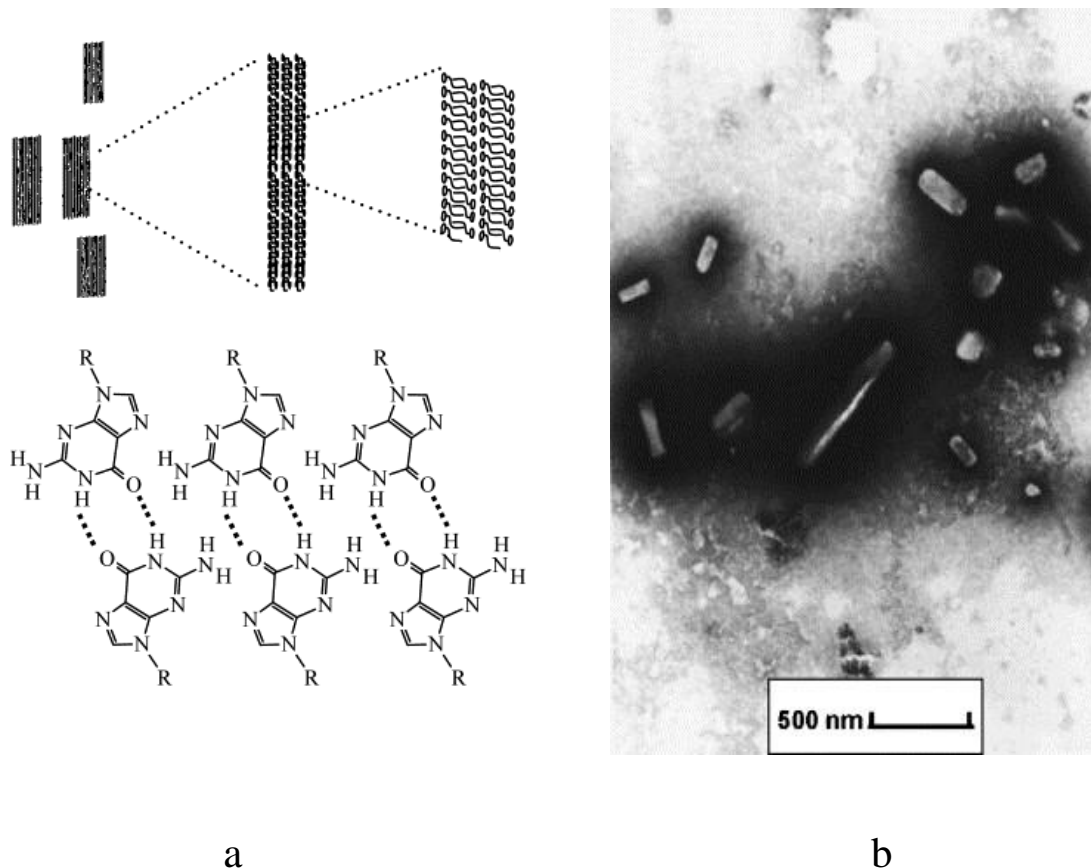


69

70

Rys. 1.18. Model przedstawiający cząsteczki pochodnych acyklowiru posiadające długie łańcuchy [54].

W wyniku samoorganizacji pochodnych acyklowiru, posiadających długie łańcuchy węglowe (**69** i **70**), w roztworze tetrahydrofuranu otrzymano nanocząstki tych substancji. Następnie wyznaczono ich wymiary, zmierzono potencjał Zeta oraz wykonano analizę termalną metodą DSC. Mechanizm agregacji cząsteczek tych związków przedstawia rysunek 1.19a, a kształt i wymiary otrzymanych nanocząstek przedstawia rysunek 1.19b.



Rys. 1.19. Mechanizm samoagregacji pochodnych acyklowiru posiadających długie łańcuchy alkilowe (a), oraz kształt i wymiary otrzymanych nanocząstek (b) [54].

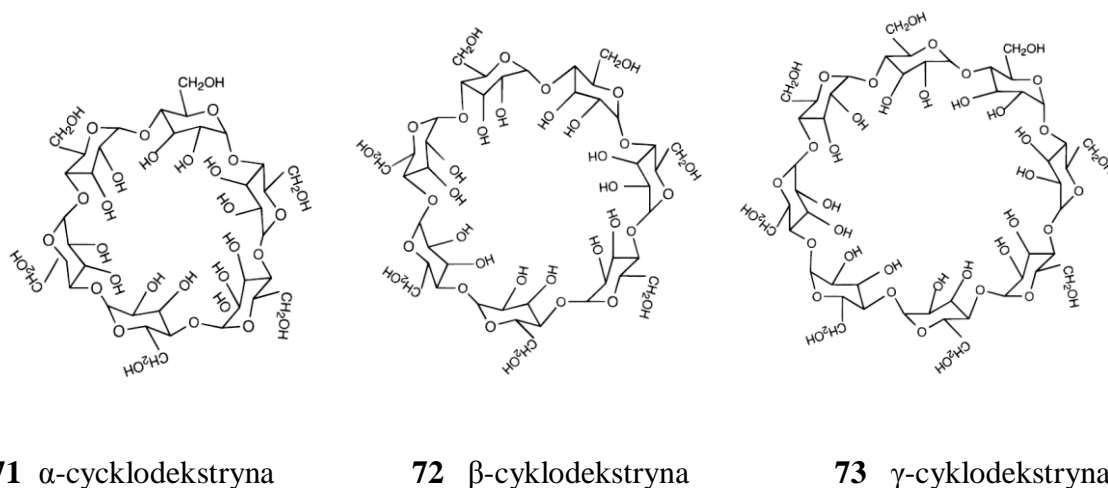
Wyniki badań przeprowadzonych przez autorów opisywanej pracy mogą znaleźć zastosowanie w farmacji do otrzymywania leków antywirusowych w postaci nanocząstek.

1.2 Właściwości substancji o znaczeniu farmaceutycznym w kompleksach z cyklodekstrynami

Wiele substancji wykazujących aktywność biologiczną to związki organiczne często o bardzo niskiej rozpuszczalności w roztworach wodnych, co utrudnia wnikanie do organizmu pacjenta. Kompleksowanie tych substancji poprzez cyklodekstryny może znacząco zmienić właściwości tych substancji, zwiększyć ich trwałość oraz rozpuszczalność w roztworach wodnych, zmniejszyć toksycność, ułatwić wnikanie do płynów ustrojowych i tkanek pacjenta.

1.2.1 Charakterystyka najczęściej stosowanych cyklodekstryn

Cyklodekstryny są cyklicznymi oligomerami złożonymi z różnej liczby jednostek glukozowych. Są one otrzymywane w wyniku fermentacji skrobi ziemniaczanej. Najczęściej stosowane są cyklodekstryny zbudowane z 6 (α -cyklodekstryna), 7 (β -cyklodekstryna), lub 8 (γ -cyklodekstryna) jednostek glukozowych. Cyklodekstryny są dobrze rozpuszczalne w wodzie, ponieważ wolne grupy hydroksylowe są skierowane na zewnątrz cząsteczki, a luka makrocykliczna cząsteczki cyklodekstryny o kształcie torusa jest lekko hydrofobowa [55,56]. Cyklodekstryny mogą tworzyć kompleksy inkluzyjne z różnego typu cząsteczkami organicznymi zmieniając ich własności fizykochemiczne [56,57]. Struktury podstawowych cyklodekstryn przedstawia rysunek 1.20.



Rys. 1.20. Struktury naturalnie otrzymywanych cyklodekstryn.

Podstawowe własności fizykochemiczne naturalnych cyklodekstryn są zawarte w szeregu prac przeglądowych [56-61]. Przykładowe dane fizykochemiczne dla podstawowych cyklodekstryn zawarte w pracach przeglądowych K. A. Connorsa [57] i E.M.M. Del Valle [61], przedstawione są w tabeli 1.6.

Tabela 1.6. Podstawowe własności fizykochemiczne naturalnie otrzymywanych cyklodekstryn [57, 61].

właściwość	cyklodekstryna		
	α	β	γ
liczba jednostek glukozowych	6	7	8
wzór cząsteczkowy	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
ciężar cząsteczkowy	972.85	1134.99	1297.14
średnica wnęki (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
wysokość torusa (Å)	7.9	7.9	7.9
Objętość wnęki (Å ³)	174	262	427
skręcalność właściwa α_D , °	+150.5	+162.0	+177.4
Ciepło właściwe (forma bezwodna, ciało stałe) (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	1153	1342	1568
Ciepło właściwe (roztwór wodny, nieskończone rozcieńczenie) (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	1431	1783	2070
pKa (25°C)	12.33	12.20	12.08
ΔH° jonizacji (kcal mol ⁻¹)	8.36	9.98	11.22
ΔS° jonizacji (kcal mol ⁻¹)	-28.3	-22.4	-17.6
rozpuszczalność, woda 25°C (mol dm ⁻³)	0.1211	0.0163	0.168
ΔH° rozpuszczania (kcal mol ⁻¹)	7.67	8.31	7.73
ΔS° rozpuszczania (cal mol ⁻¹)	13.8	11.7	14.7

Bardziej szczegółowe dane dotyczące zachowania się cyklodekstryn podczas analizy metodą NMR opisuje praca przeglądowa H.J. Schneidera [62], a podczas analizy termicznej F.Giordano [63].

Właściwości fizykochemiczne cyklodekstryn opisane są zarówno w wielu pracach przeglądowych jak i pojedynczych publikacjach [64-72]. Prace [64-69] dotyczą właściwości termicznych cyklodekstryn w stanie stałym oraz ich hydratów wyznaczonych na podstawie analizy wykonanej metodami TG i DSC. Publikacje [70-72] opisują właściwości roztworów wodnych α i

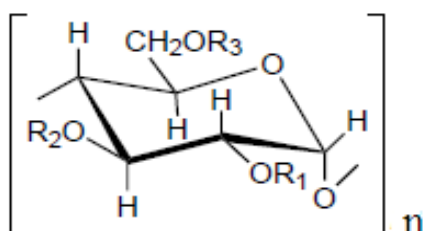
β -cyklodekstryny takie jak pozorna objętość molowa i pozorne ciepło właściwe [70], współczynnik dyfuzji, gęstość i lepkość roztworów [71], natomiast [72] zachowanie naturalnych cyklodekstryn oraz ich pochodnych podczas analizy chromatograficznej, wykonanej metodą HPLC.

Głównymi zaletami naturalnych cyklodekstryn jest:

- dobrze zdefiniowana struktura, zawierająca wiele potencjalnych miejsc wiążących, umożliwiających chemiczne modyfikacje
- dostępność cyklodekstryn o różnych wielkościach luki makrocyklicznych
- niska toksyczność i niska aktywność farmaceutyczna
- dobra rozpuszczalność w wodzie
- możliwość tworzenia kompleksów inkluzyjnych z różnymi związkami organicznymi, w tym lekami.

W celu zmiany właściwości fizykochemicznych cyklodekstryn przeprowadzono modyfikacje ich cząsteczek polegające na przyłączeniu różnych grup funkcyjnych do grup hydroksylowych cyklodekstryny. Dużym zainteresowaniem cieszą się pochodne cyklodekstryn, charakteryzujące się wysoką rozpuszczalnością w wodzie. Są to pochodne metylowe, hydroksypropylowe, sulfonoalkilowe i sulfonowe. Właściwości fizykochemiczne tych pochodnych opisuje praca przeglądowa L. Sente [73] oraz wiele prac szczegółowych takich jak [74-76]. Analizując właściwości dobrze rozpuszczalnych w wodzie pochodnych α -, β - i γ -cyklodekstryny, można stwierdzić, że szczególnie interesujące są pochodne hydroksypropylowe [58,60,77-93], które często znajdują zastosowanie w farmacji oraz pochodne metylowe, używane w chemii analitycznej do rozdzielania izomerów optycznych podczas analizy chromatograficznej substancji chiralnych [56]. Przykłady najczęściej stosowanych pochodnych naturalnych cyklodekstryn przedstawia tabela 1.7 [58].

Tabela 1.7. Struktury różnych pochodnych cyklodekstryn



- n = 6: α -cyklodekstryna
- n = 7: β -cyklodekstryna
- n = 8: γ -cyklodekstryna
- n = 9: δ -cyklodekstryna

Cyklodekstryny	R ₁	R ₂	R ₃
Pochodne hydrofilowe			
Metylowane cyklodekstryny			
3-mono-O-metylocyklodekstryny	H	CH ₃	H
2,6-di-O-metylocyklodekstryny	CH ₃	H	CH ₃
2,3,6-tri-O-metylocyklodekstryny	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Losowo metylowane cyklodekstryny	R ₁ , R ₂ , R ₃ = H lub CH ₃		
Hydroksy-alkilowane cyklodekstryny			
2-hydroksyetylowane cyklodekstryny	R ₁ , R ₂ , R ₃ = H lub CH ₂ CH ₂ OH		
2-hydroksypropylowane cyklodekstryny	R ₁ , R ₂ , R ₃ = H lub CH ₂ CH(OH)CH ₃		
2,3-dihydroksypropylowane cyklodekstryny	R ₁ , R ₂ , R ₃ = H lub CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH		
Rozgałęzione cyklodekstryny			
6-O-glukozylocyklodekstryny	H	H	H lub glukoza
6-O-maltozylocyklodekstryny	H	H	H lub maltoza
6-O-dimaltozylocyklodekstryny	H	H	H lub (maltoza) ₂
Pochodne hydrofobowe			
Alkilowane cyklodekstryny			
2,6-di-O-etylocyklodekstryny	C ₂ H ₅	H	
2,3,6-tri-O-etylocyklodekstryny	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
Acylowane cyklodekstryny			
2,3-di-heksanoilocyklodekstryny	COC ₅ H ₁₁	COC ₅ H ₁₁	H
2,3,6-tri-O-acetylocyklodekstryny	COCH ₃	COCH ₃	COCH ₃
2,3,6-tri-O-propanoilocyklodekstryny	COC ₂ H ₅	COC ₂ H ₅	COC ₂ H ₅
2,3,6-tri-O-butanoilocyklodekstryny	COC ₃ H ₇	COC ₃ H ₇	COC ₃ H ₇
2,3,6-tri-O-walerylocyklodekstryny	COC ₄ H ₉	COC ₄ H ₉	COC ₄ H ₉
2,3,6-tri-O-heksanoilocyklodekstryny	COC ₅ H ₁₁	COC ₅ H ₁₁	COC ₅ H ₁₁
2,3,6-tri-O-oktanoilocyklodekstryny	COC ₇ H ₁₅	COC ₇ H ₁₅	COC ₇ H ₁₅
Pochodne jonizowalne			
Anionowe cyklodekstryny			
6-O-karboksymetylowane cyklodekstryny	H	H	H lub CH ₂ COONa
6-O-karboksymetylo-O-etylocyklodekstryny	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H, C ₂ H ₅ lub CH ₂ COONa
Siarczany cyklodekstryny	R ₁ , R ₂ , R ₃ = H lub SO ₃ Na		
Sulfobutylowane cyklodekstryny	R ₁ , R ₂ , R ₃ = H lub (CH ₂) ₄ SO ₃ Na		

Zaprezentowane tu cyklodekstryny i ich pochodne dzięki swojej zdolności do tworzenia kompleksów inkluzyjnych znalazły szerokie zastosowanie w farmacji [58,60,73,94] przemyśle kosmetycznym i spożywczym [94], a także w chemii analitycznej [56]. Szczególnie duże znaczenie ma zastosowanie cyklodekstryn w farmacji.

1.2.2 Kompleksy cyklodekstryn z substancjami aktywnymi biologicznie

Obecnie kompleksy inkluzyjne cyklodekstryn z substancjami zarejestrowanymi jako leki są bardzo intensywnie badane. Substancje aktywnie czynne zainkludowane we wnęce cyklodekstryny mają inne własności fizykochemiczne niż wolne cząsteczki. Podawanie pacjentom leku w postaci kompleksu z cyklodekstryną ma korzystny wpływ na metabolizm danej substancji w organizmie. [60,95]. Przykłady takich leków przedstawia tabela 1.8.

Tabela 1.8. Przykłady dostępnych handlowo leków w postaci kompleksów cyklodekstrynowych [95]. Nazwy substancji czynnych zostały zapisane w języku angielskim ze względu na brak polskich odpowiedników dla niektórych z nich.

cyklodekstryna	Substancja czynna	Nazwa handlowa	Obszar, na którym lek został zarejestrowany
α -cyklodekstryna			
	Alprostadil	Prostavastin	Europa, Japonia, USA
	Cefotiam hexetil HCl	Pansporin	Japonia
β -cyklodekstryna			
	Benexate	Ulgut, Lonmiel	Japan
	Dexamethasone	Glymesason	Japan
	Iodine	Mena-Gargle	Japan
	Nicotine	Nicorette	Europa
	Nimesulide	Nimedex, Mesulid	Europa
	Nitroglycerin	Nitrophen	Japonia
	Omeprazol	Omebeta	Europa
	PGE ₂	Prostamon E	Japonia
	Piroxicam	Brexin	Europa
	Tiaprofenic acid	Surgamyl	Europa
2-hydroxypropylo-	Cisapride	Propulsid	Europa

β -cyklodekstryna			
	Hydrocortisone	Dexocort	Europa
	Indomethacin	Indocid	Europa
	Intraconazole	Sporanox	Europa
	Mitomycin	Mitozyrtex	Europa, USA
Losowo etylowana β -cyklodekstryna	17 β -Estradiol	Aerodiol	Europa
	Chloramphenicol	Clorocil	Europa
Eter sulfobutylowy β -cyklodekstryny	Voriconazole	Vfend	Europa, USA
	Ziprasidone maleate	Geodon, Zeldox	Europa, USA
2-hydroxypropylo- γ -cyklodekstryna	Diclofenac sodium	Voltaren	Europa

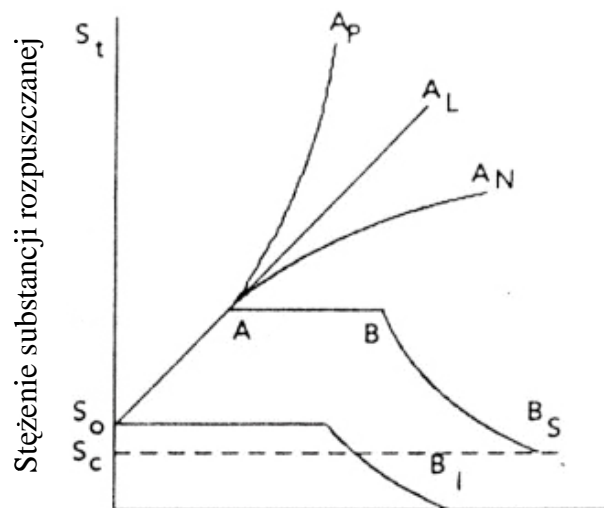
Korzyści wynikające z zastosowania leków w postaci kompleksów cyklodekstrynowych są następujące:

- zwiększenie rozpuszczalności leków w roztworach wodnych
- podwyższenie bioaktywności
- redukcja efektów niepożądanych
- zwiększanie stabilności leków

Powstawanie kompleksów cyklodekstryn z lekami polega na inkluzji danego leku lub jego hydrofobowej części w luce cyklodekstryny. Jest to możliwe głównie dzięki oddziaływaniom hydrofobowym, van der Waalsa, a także oddziaływaniom elektrostatycznym i powstawaniu wiązań wodorowych [55,56]. Obserwacja powstawania kompleksów inkluzyjnych oraz badania ich trwałości może być prowadzona różnymi metodami, które będą opisane poniżej.

1.2.3 Metody badania kompleksów cyklodekstryn z lekami

Kompleksy inkluzyjne cyklodekstryn z lekami są badane różnymi sposobami [96]. Często stosowane są metody bezpośrednie takie jak: miareczkowanie spektrofotometryczne, spektrofluorometryczne, NMR [57,62,97], czy mikrokalorymetryczne [98-100]. W czasie tych pomiarów obserwujemy bezpośrednio zmianę mierzonych wartości w wyniku powstawania kompleksów inkluzyjnych. Inne, bardziej złożone, metody dzięki, którym można monitorować powstawanie kompleksów to chromatografia cieczowa [56], metody rozpuszczalnościowe [57], ekstrakcyjne [101], a także badania kompleksów inkluzyjnych w stanie stałym metodami analizy termicznej [63] oraz krystalograficznej [102-115]. W tym rozdziale bardziej szczegółowo będzie omówiona metoda rozpuszczalnościowa opracowana przez Higuchi i Connorsa [116,117]. Metoda ta jest szeroko stosowana w badaniach kompleksów inkluzyjnych cyklodekstryn z lekami, które mają niską rozpuszczalność w wodzie [58,60,61,82,87,90,118-124]. Polega ona na wyznaczeniu rozpuszczalności badanej substancji w roztworach cyklodekstryny o zmiennym stężeniu. Przyjmuje się, że wzrost rozpuszczalności danej substancji w obecności cyklodekstryn wynika z powstawania kompleksów inkluzyjnych. Zależności stężenia substancji inkludowanej od stężenia cyklodekstryny mogą mieć różny przebieg. Wyróżniamy dwa typy tych zależności: A i B. Typ A otrzymujemy, gdy powstające kompleksy mają wyższą rozpuszczalność niż wyjściowa substancja, natomiast typ B kompleksy mają niższą lub ograniczoną rozpuszczalność. Wśród różnych typów zależności można wyróżnić zależność A_L , świadczącą o liniowej zależności wzrostu stężenia danej substancji od wzrostu stężenia cyklodekstryny. Różne typy zależności stężenia badanej substancji od stężenia cyklodekstryny przedstawia rysunek 1.21.



Stężenie cyklodekstryny

Rys. 1.21. Typy zależności całkowitego stężenia rozpuszczanych substancji (S_t) od stężenia cyklodekstryny. S_o oznacza rozpuszczalność substancji w roztworze niezawierającym cyklodekstryny, S_t całkowitą rozpuszczalność substancji w roztworze, która jest sumą rozpuszczalności substancji wolnej oraz w postaci kompleksu, S_c rozpuszczalność kompleksu (w przypadku gdy rozpuszczalność kompleksu jest niższa niż rozpuszczalność czystej substancji). Symbole A_p , A_L , A_N , B_I , B_S , oznaczają typy zależności rozpuszczalności danej substancji od stężenia cyklodekstryny zgodnie z klasyfikacją podaną przez J. Connorsa [117].

Zależności typu A otrzymujemy przy zastosowaniu dobrze rozpuszczalnych cyklodekstryn, takich jak pochodne hydroksypropylowe, natomiast typ B dla niektórych kompleksów β -cyklodekstryny. Typ A_L jest pierwszego rzędu ze względu na cyklodekstrynę, natomiast może być wyższego rzędu ze względu na rozpuszczany lek. Powstają wtedy kompleksy o stechiometrii lek:cyklodekstryna (S:L) 1:1, 2:1, 3:1 itd. Jeśli nachylenie prostej jest większe od 1 to oznacza powstawanie kompleksów o wyższej stechiometrii ze względu na lek, natomiast nachylenie mniejsze od jedności najczęściej oznacza powstawanie kompleksów o stechiometrii 1:1. Zależności typu A_p , oznaczają powstawanie kompleksów o wyższej stechiometrii ze względu na cyklodekstrynę, odchylenie od prostej jest najczęściej obserwowane przy wyższych stężeniach cyklodekstryn [61,116,117]. Korzystając z otrzymanych zależności możemy oszacować stałe trwałości kompleksów inkluzyjnych cyklodekstryny z danym lekiem. Takie obliczenia są możliwe, gdy otrzymujemy zależności typu A_L . lub A_p . W tym przypadku trwałości K_s powstających kompleksów można zapisać jako:

$$K_s = \frac{[S_m CD_n]}{[S]^m [CD]^n} \quad (1.2)$$

Gdzie:

$[S_m CD_n]$ - stężenie kompleksu o stechiometrii m:n

$[S]$ - stężenie substancji rozpuszczanej

[CD]- stężenie cyklodekstryny

[S_o] - stężenie danej substancji w roztworze niezawierającym cyklodekstryny

[S_t] - całkowite stężenie substancji w roztworze cyklodekstryny

[CD]_t - całkowite stężenie cyklodekstryny w roztworze

Całkowite stężenie rozpuszczanego leku lub cyklodekstryny w roztworze oznacza sumę stężeń danej substancji w postaci wolnej i skompleksowanej.

Gdy przyjmiemy, że

$$[S] = S_o \quad (1.3)$$

$$[S]_t = S_o + m[S_m CD_n] \quad (1.4)$$

$$[CD]_t = [CD] + n[S_m CD_n] \quad (1.5)$$

to stężenie substancji rozpuszczanej [S], cyklodekstryny [CD] oraz kompleksu, [S_mCD_n] można zapisać, jako:

$$[S_m CD_n] = \frac{[S]_t - S_o}{m} \quad (1.6)$$

$$[CD] = [CD]_t - n[S_m CD_n] \quad (1.7)$$

Jeżeli rozpuszczalność substancji rozpuszczanej w roztworach cyklodekstryny można opisać zależnością liniową, to w roztworze powstają kompleksy inkluzyjne zawierające tylko jedną cząsteczkę cyklodekstryny (n=1), więc całkowite stężenie leku w roztworze [D]_t można zapisać jako:

$$[D]_t = \frac{mK_s S_o^m [CD]_t}{1 + K_s S_o^m} + S_o \quad (1.8)$$

Jeśli wykreślimy zależność [D]_t od [CD]_t to dla wykresu liniowego typu:

$$C_s = a + bC_{CD} \quad (1.9)$$

otrzymamy:

$$a = S_o \quad (1.10)$$

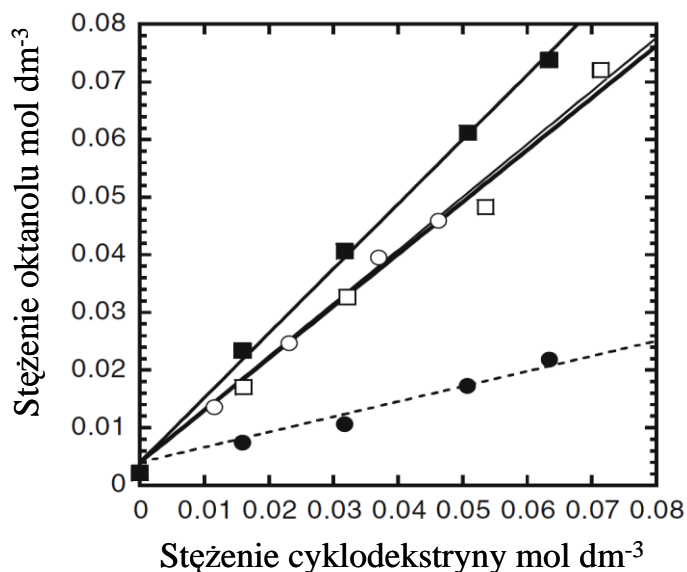
$$b = \frac{mK_s S_o^m}{1 + K_s S_o^m} \quad (1.11)$$

Dla kompleksów danej substancji z cyklodekstryną o stechiometrii 1:1, stała trwałości K_s może być wyznaczona jako:

$$K_s = \frac{b}{S_o(1-b)} \quad (1.12)$$

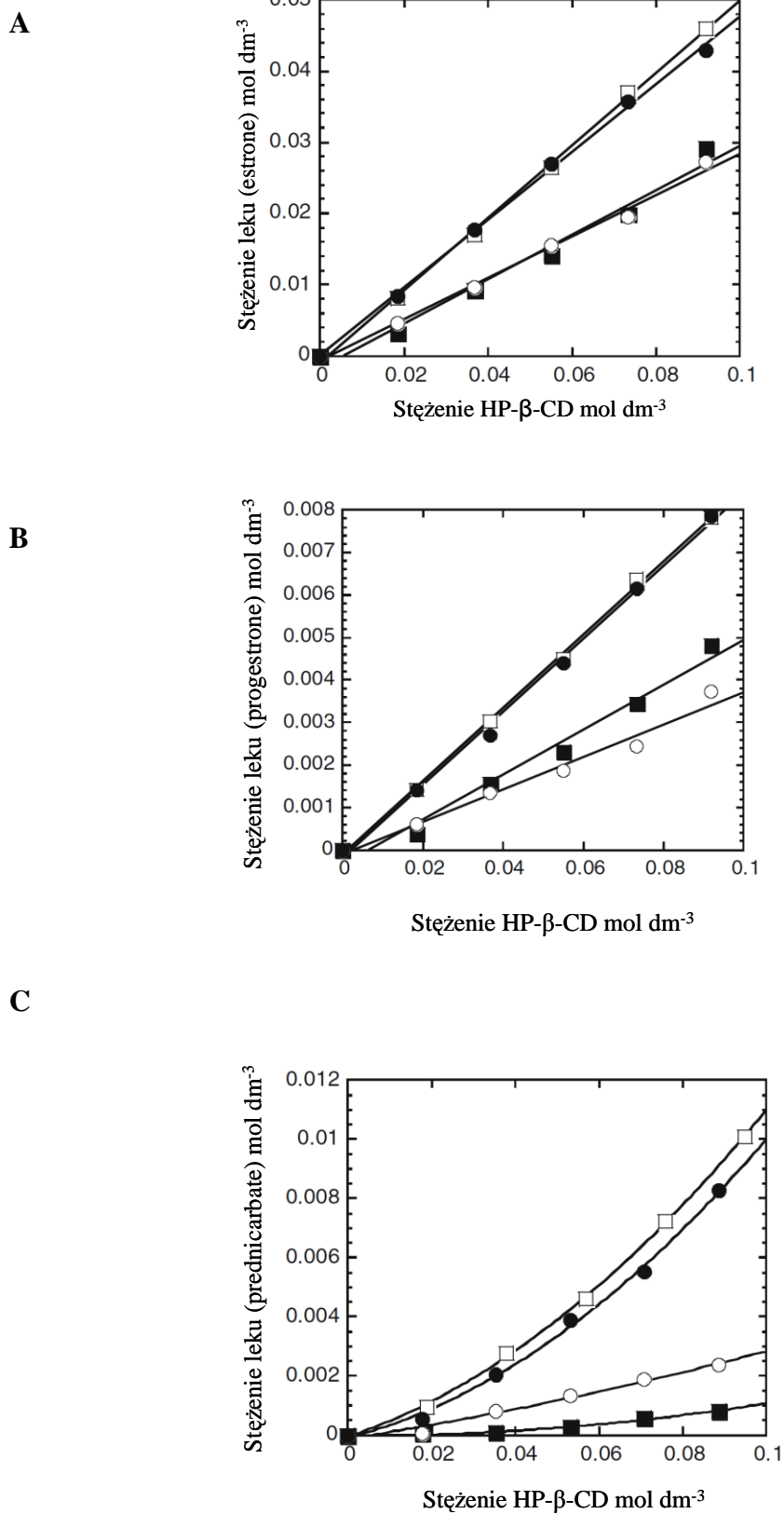
Wyznaczanie stałych trwałości kompleksów inkluzyjnych metodą rozpuszczalnościową jest często stosowane w badaniach trwałości kompleksów cyklodekstryny ze słabo rozpuszczalnymi lekami, takimi jak acyklowir i jego pochodne. Dokładność wyznaczania stałych jest jednak mniejsza niż w metodach bezpośrednich, takich jak np. miareczkowanie kalorymetryczne, spektrofotometryczne czy NMR. Na błąd wyznaczania stałej trwałości kompleksów cyklodekstryn z trudno rozpuszczalnymi lekami w roztworach wodnych tą metodą ma wpływ agregacja cyklodekstryn oraz możliwość tworzenia się kompleksów nieinkluzyjnych pomiędzy badanymi substancjami. Porównanie wykresów zależności rozpuszczalności trudno rozpuszczalnych leków od stężenia cyklodekstryny w roztworze, dla wielu trudno rozpuszczalnych leków [125] pokazuje, że dla zależności liniowych wartość odciętej a , różni się od doświadczalnie wyznaczonej wartości S_0 , co może mieć duży wpływ na wartość stałej trwałości K_s wyznaczonej według wzoru 1.12. Dyskusja na ten temat jest przedmiotem pracy T. Loftssona i współpracowników [125]. Autorzy sugerują, że w przypadku metody rozpuszczalnościowej, zamiast stałej trwałości powinno się wyznaczać tzw. efektywność kompleksowania, wyrażoną, jako stosunek stężenia cyklodekstryny, w postaci kompleksu do stężenia niezwiązanej cyklodekstryny. Efektywność kompleksowania obliczana na podstawie nachylenia prostej nie zależy od wartości S_0 , co pozwala na bardziej dokładne wyznaczenie jej wartości na podstawie danych trzymanyh podczas badań rozpuszczalnościowych. Analizując prace opisujące badania rozpuszczalności różnych substancji w roztworach cyklodekstryn można zauważyć, że sugestia zawarta w pracy T. Loftssona, nie została przyjęta i nadal wyznaczana jest stała trwałości kompleksów, a nie efektywność kompleksowania [118-124].

Innym ciekawym kierunkiem badań kompleksów trudno rozpuszczalnych substancji o znaczeniu biologicznym z cyklodekstrynami jest wyznaczanie rozpuszczalności tych substancji w wodzie nasyconej rozpuszczalnikami organicznymi. Badania prowadzone przez M. Massona i współpracowników [126], pokazują, że rozpuszczalniki organiczne używane często w technikach separacyjnych takich jak oktanol, chloroform, heksan, mogą być kompleksowane przez cyklodekstryny. Autorzy stwierdzili, że spośród wymienionych rozpuszczalników oktanol jest najmocniej wiązany przez metylowe, hydroksypropylowe oraz sulfobutylowe pochodne β - i γ -cyklodekstryny, które były przedmiotem badań. Pozostałe ww. rozpuszczalniki są słabiej wiązane przez cyklodekstryny. Powstawanie kompleksów inkluzyjnych oktanolu z różnymi pochodnymi cyklodekstryn powoduje zwiększenie rozpuszczalności oktanolu w roztworach wodnych. Zależności rozpuszczalności oktanolu w roztworach wodnych zawierających cyklodekstryny o różnym stężeniu otrzymane przez M. Massona przedstawia rysunek 1.22.



Rys. 1.22. Rozpuszczalność oktanolu w roztworach hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (\square), przypadkowo metylowanej- β -cyklodekstryny (\blacksquare), sulfobutylowanej- β -cyklodekstryny (\circ), hydroksypropylowanej- γ -cyklodekstryny (\bullet) [126].

Wiązanie oktanolu przez przez cyklodekstryny powoduje, że efektywność tworzenia się kompleksów inkluzyjnych z innymi obecnymi w roztworze jest mniejsza. Autorzy zbadali rozpuszczalność trzech trudno rozpuszczalnych leków w roztworach wodnych hydroksypropylo- β -cyklodekstryny nasyconych oktanolem, chloroformem i heksanem i porównali otrzymane wyniki z roztworem tej cyklodekstryny, który nie zawierał rozpuszczalników organicznych. Stwierdzono, że dodanie rozpuszczalników organicznych w różnym stopniu wpływa na wzrost rozpuszczalności badanych substancji. Najmniejszy wzrost rozpuszczalności leków uzyskano jeśli roztwór cyklodekstryny nasycono oktanolem, co wynika z konkurencyjnego wiązania oktanolu w luce cyklodekstryny. Obecność słabo wiązanego heksanu w roztworach cyklodekstryny powoduje niewielkie zmiany rozpuszczalności leków, natomiast chloroform obniża ich rozpuszczalność bardziej niż heksan, jednak w mniejszym stopniu niż oktanol. Wykresy zależności rozpuszczalności tych leków w roztworach wodnych hydroksypropylo- β -cyklodekstryny nasyconych ww. rozpuszczalnikami organicznymi oraz współczynniki podziału tych substancji pomiędzy fazę wodną zawierającą HP- β -CD o różnym stężeniu i fazę oktanolową przedstawia rys. 1.23 (A, B, C)



Rys. 1.23. Rozpuszczalność leków sterydowych, A-estrone, B-progesterone, C-prednicarbate, w wodnych roztworach HP- β -CD (\square), oraz wodnych roztworach HP- β -CD nasyconych rozpuszczalnikami organicznym: oktanolem (\blacksquare), chloroformem (\circ), heksanem (\bullet)

1.2.4 Kompleksy acyklowiru i jego pochodnych z cyklodekstrynami

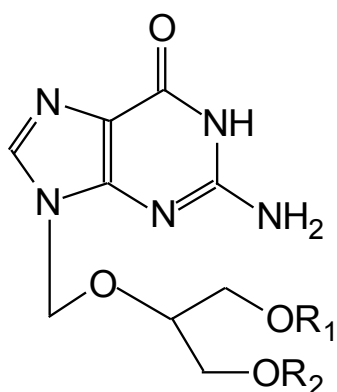
Acyklowir i jego pochodne, w tym pochodne tricykliczne, charakteryzują się stosunkową niską rozpuszczalnością w roztworach wodnych. Dla celów terapeutycznych korzystny byłby wzrost rozpuszczalności tych związków w roztworach wodnych, spowodowany powstawaniem kompleksów inkluzyjnych z cyklodekstrynami. Jednak w literaturze można znaleźć niewiele doniesień na temat kompleksów inkluzyjnych pochodnych acyklowiru z cyklodekstrynami. Badania, których przedmiotem były kompleksy acyklowiru z β -cyklodekstryną prowadzone metodą rozpuszczalnościową [127] oraz miareczkowania ^1H NMR [128] wskazują, że kompleksy acyklowiru z β -cyklodekstryną mają bardzo niską stałą trwałości. Wartość stałej trwałości K_s tych kompleksów, wyznaczona metodą rozpuszczalnościową, wynosi $22 \text{ (mol}^{-1}\text{dm}^3)$ [127]. Na podstawie metody miareczkowania ^1H NMR nie było możliwe dokładne wyznaczenie stałej trwałości, dlatego oszacowano, że wartość K_s , leży w zakresie $10 - 100 \text{ (mol}^{-1}\text{dm}^3)$. W czasie tych badań oszacowano również stałą trwałość kompleksów gancyklowiru i 8-bromo-acyklowiru z β -cyklodekstryną jako leżące w zakresie 50-100 oraz 10-50. Badania prowadzone były w wodzie w 25°C . Autorzy badań kompleksów acyklowiru z β -cyklodekstryną metodą rozpuszczalnościową [127] przeprowadzili również badania *in vivo* w celu zbadania aktywności biologicznej kompleksów acyklowiru [129]. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pomimo bardzo niskiej stałej trwałości takich kompleksów, bioaktywność acyklowiru w kompleksie oraz mieszaninie acyklowiru i jego kompleksu z cyklodekstryną jest znacznie wyższa niż czystego acyklowiru.

Autorzy kolejnej pracy opisującej sposób wyznaczania stałych trwałości kompleksów acyklowiru i kofeiny z β -cyklodekstryną, E. Aicart i E. Junquera [130], otrzymali wyniki znacznie odbiegające od podanych w innych pracach. Wartości stałej trwałości kompleksu β -cyklodekstryny z acyklowirem - obliczone na podstawie danych otrzymanych podczas miareczkowania fluorymetrycznego - leżą w zakresie $605-764 \text{ (dm}^3 \text{ mol}^{-1})$ (w zależności od długości fali emitowanego promieniowania) i są wielokrotnie wyższe niż te opisane w innych publikacjach. Prawdopodobny błąd wynika z nie uwzględnienia wszystkich czynników wpływających na zmianę intensywności fluorescencji podczas miareczkowania.

W literaturze można również znaleźć prace opisujące wzrost rozpuszczalności acyklowiru w roztworach wodnych wynikający z wiązania tego leku przez podstawione cyklodekstryny. Przykładem takiego artykułu jest praca T. Loftssona [131] opisująca 2-krotny wzrost rozpuszczalności acyklowiru w 50%w/w $\{0.7 \text{ (mol dm}^{-3})\}$ roztworze HP- β -CD. Badania prowadzono w ten sposób, że zawiesinę danego leku w wodnym roztworze HP- β -CD poddawano

działaniom ultradźwięków, a następnie równoważono przez 48 godzin. Stężenie acyklowiru po rozcieńczeniu próbki metanolem oznaczano metodą HPLC. Podczas wstępnych badań rozpuszczalności acyklowiru w wodnych roztworach HP- β -CD, o podobnym jak w pracy Loftssona stopniu podstawienia, prowadzonych w ramach tej pracy nie stwierdzono widocznego wzrostu rozpuszczalności. Być może ta różnica wynika z bardzo wysokiego stężenia cyklodekstryny, zastosowanego przez Loftssona [131], przy którym wzrost rozpuszczalności acyklowiru może mieć charakter nieliniowy, wynikający z możliwości powstawania zarówno inkluzyjnych jak i nieinkluzyjnych kompleksów tego leku z cyklodekstryną.

Kolejna praca na ten temat [132] opisuje badania kompleksów potencjalnych pro-leków, pochodnych gancyklowiru z hydroksypropylo- β -cyklodekstryną oraz ich wnikanie *in vitro* do wyizolowanej rogówki królika. Struktury badanych substancji przedstawia rysunek 1.24.



Substancja	R ₁	R ₂
3	H	H
74	H	COCH ₃
75	H	COCH ₂ CH ₃
76	H	CO(CH ₂) ₂ CH ₃
77	H	CO(CH ₂) ₃ CH ₃
78	COCH ₂ CH ₃	COCH ₂ CH ₃
79	CO(CH ₂) ₂ CH ₃	CO(CH ₂) ₂ CH ₃

Rys. 1.24. Struktury badanych pochodnych gancyklowiru [132].

Badania trwałości kompleksów pochodnych gancyklowiru **74** - **79** z hydroksypropyl- β -cyklodekstryną prowadzono wyznaczając ich rozpuszczalność w roztworach wodnych o pH = 7.4 zawierających cyklodekstrynę, w 34°C. Na podstawie wyników tych pomiarów otrzymano stałe

trwałości mieszczące się w granicach 12-106 ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$). Dane dotyczące wyznaczonych rozpuszczalności badanych substancji w roztworach cyklodekstryn, współczynników podziału oraz obliczone stałe trwałości powstających kompleksów przedstawia tabela 1.9.

Tabela 1.9. Rozpuszczalność, współczynnik podziału oktanol/roztwór buforowy ($P_{o/b}$) i stałe trwałości (K_s) kompleksów badanych pochodnych z hydroksypropylo- β -cyklodekstryną [132].

Substancja	$\text{Log } P_{o/b}$	Rozpuszczalność $\times 10^{-3}$ (mol dm^{-3})			K_s ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$)
		0% CD	5% CD	10% CD	
74	-1.08	12.22	16.91	20.71	12.02
75	-0.92	10.51	15.61	21.02	18.71
76	-0.30	5.60	9.82	13.31	24.42
77	-0.07	3.71	8.91	14.03	50.03
78	-0.23	6.01	13.37	18.07	39.71
79	0.59	0.42	1.92	3.03	106.71

Przeprowadzone badania [132] wskazują na wzrost stężenia pochodnych gancyklowiru w roztworach wodnych oraz na prowadzoną *in vitro* permeację tych pro-leków przez wyizolowaną rogówkę królika. Kolejna praca dotycząca kompleksów pochodnych acyklowiru z cyklodekstrynami opisuje prowadzone *in vitro* badania absorpcji acyklowiru w postaci kompleksów z α , β , γ -cyklodekstryną oraz metylo i hydroksypropylo- β -cyklodekstryną przez tkanki nosa [133]. Stwierdzono, że wszystkie używane cyklodekstryny podwyższyły absorpcję acyklowiru. Najwyższy wzrost zaobserwowano przy zastosowaniu hydroksypropylo- β -cyklodekstryny i metylo- β -cyklodekstryny, a najniższy przy zastosowaniu β -cyklodekstryny.

W literaturze można też znaleźć inne nieliczne wzmianki świadczące o tym, że były badane kompleksy acyklowiru z β -cyklodekstryną [95], chociaż zaprezentowane tu prace wskazują, że acyklowir, gancyklowir i ich pochodne mają większą aktywność biologiczną w postaci kompleksów z cyklodekstryną, niż jako czyste substancje [133].

Opisane tu badania wskazują, że szersze zastosowanie w medycynie leków antywirusowych w postaci kompleksów cyklodekstrynowych może być bardzo korzystne terapeutycznie nawet, jeśli stałe trwałości tych kompleksów nie są wysokie.

2. Część eksperymentalna

Charakteryzacja nowych związków chemicznych, szczególnie takich, które zostały zaprojektowane, jako potencjalne leki, wymaga wielu szczegółowych badań zarówno biologicznych jak i fizykochemicznych. Wyniki tych badań wskazują czy dana substancja charakteryzuje się bioaktywnością oraz jakie są jej podstawowe właściwości fizykochemiczne, np. rozpuszczalność w wodzie oraz rozpuszczalnikach organicznych czy współczynnik podziału pomiędzy fazę wodną i organiczną. Te parametry są ważne, gdyż mają wpływ na zachowanie substancji w płynach ustrojowych oraz wnikanie do wnętrza komórek w organizmach żywych. **Jednym z celów tej pracy było wyznaczenie rozpuszczalności substancji będących jej przedmiotem w roztworach wodnych oraz organicznych, a także otrzymanie współczynników podziału tych związków pomiędzy fazę wodną i organiczną.**

Ważnym zagadnieniem związanym z otrzymywaniem potencjalnych leków jest opracowanie procedur analitycznych, umożliwiających kontrolę czystości tych substancji. Do metod stosowanych podczas analizy czystości leków należą m.in. skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC) oraz metody spektroskopowe, np. NMR. Te metody zostały zastosowane również w mojej pracy do charakteryzacji badanych substancji oraz ich kompleksów z cyklodekstrynami.

Niniejsza praca dotyczy substancji stosowanych obecnie jako leki antywirusowe: acyklowiru i gancyklowiru oraz ich pochodnych, które powstały poprzez modyfikację grupy guaninowej, w tym pochodnych tricyklicznych o stwierdzonej już aktywności antywirusowej [36]. Zostały one wybrane z dużej grupy pochodnych acyklowiru zsyntezowanych w Instytucie Chemii Bioorganicznej w zespole prof. B. Golankiewicz [36-44].

2.1 Odczynniki

Przedmiotem pracy są następujące substancje:

1. **ACV** (acyklowir): 9-[(2-hydroksyetoksy)metylo] guanina (**2** w rozdziale 1)
2. **8-Br-ACV**: 8-bromo-9-[(2-hydroksyetoksy)metylo] guanina (**65** w rozdziale 1)
3. **GCV**, (gancyklowir): 9-[(1,3-dihydrokso-2-propoksy)metylo]guanina (**3** w rozdziale 1)
4. **TACV**: 3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna (**34** w rozdziale 1)
5. **6-Me-TACV**: 6-metylo-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo [1,2-a]puryna (**33** w rozdziale 1)

- 6. 2-Br-6-Me-TACV:** 2-bromo-6-metylo-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna (**66** w rozdziale 1)
- 7. 6-t-but-TACV:** 6-t-But-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna (**67** w rozdziale 1)
- 8. 6-Fe-TACV:** 6-fenylo-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna (**37** w rozdziale 1)
- 9. 6-Fe-Fe-TACV:** 6-(4-bifenylo)-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo [1,2-a]puryna (**38** w rozdziale 1)
- 10. 6-Br-Fe-TACV:** 6-(4-bromofenylo)-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna (**68** w rozdziale 1)
- 11. 6-Fe-O-Me-TACV** 6-(4-metoksyfenylo)-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a]puryna (**43** w rozdziale 1)
- 12: 6-Naft-TACV** 6-(2-naftylo)-3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-9-okso-5H-imidazolo[1,2-a] puryna (**46** w rozdziale 1).

Wszystkie wymienione powyżej substancje, zsyntezowano w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, przez zespół profesor Bożenny Golankiewicz - w sposób opisany w literaturze [36-44], są krystaliczne i jednorodne, co zostało potwierdzone podczas badań chromatograficznych i ¹H NMR. Czystość substancji wynosząca powyżej 99 % została również potwierdzona analizą TGA i DSC. Wyżej wymienione związki były kompleksowane przez następujące cyklodekstryny:

- 13. HP-β-CD:** hydroksypropylo-β-cyklodekstrynę o nazwie Encapsin HPB R81216 firmy Jansen o stopniu podstawienia grupami hydroksypropylowymi 4.5 i zawartości wody około 7%.
- 14. β-CD:** β-cyklodekstrynę firmy Aldrich i zawartości wody około 10% (**72** w rozdziale 1).
- 15. M-β-CD:** metylo-β-cyklodekstrynę firmy Aldrich o stopniu podstawienia 12.6 i zawartości wody około 6%
- 16. HP-γ-CD:** hydroksypropylo-γ-cyklodekstrynę firmy Aldrich o stopniu podstawienia 4.2 i zawartości wody około 6%
- 17. α-CD:** α-cyklodekstrynę () firmy Aldrich i zawartości wody około 9% (**71** w rozdziale 1)
- 18. HP-α-CD:** hydroksypropylo-α-cyklodekstrynę firmy Aldrich o stopniu podstawienia 4.2 i zawartości wody około 7%
- 19. γ-CD:** γ-cyklodekstrynę firmy Aldrich i zawartości wody około 4% (**73** w rozdziale 1).
- Cyklodekstryny te były używane do dalszych badań bez wcześniejszego oczyszczania.

Do sporządzania buforów używano fosforanów KH_2PO_4 i Na_2HPO_4 firmy POCH Gliwice o czystości do analiz. Woda używana do sporządzenia roztworów była destylowana i dejonizowana za pomocą systemu Mili-Q firmy Millipore USA.

Do miareczkowania (wyznaczanie pKa) używano gotowych roztworów mianowanych $0.1 \text{ (mol dm}^{-3}\text{)}$ firmy Chempur (Piekary Śląskie, Polska).

2.2 Aparatura i techniki badawcze

Do badań substancji, które były przedmiotem pracy wykorzystano wiele metod oraz technik badawczych. Zastosowane metody, omówione w dalszej części rozdziału 2.2, pozwoliły na poznanie właściwości fizykochemicznych tych substancji oraz ich kompleksów z cyklodekstrynami.

2.2.1 Badania rozpuszczalności acyklowiru, gancyklowiru oraz wybranych pochodnych

Rozpuszczalność acyklowiru, gancyklowiru oraz trójcyklicznych pochodnych acyklowiru, wyznaczano w roztworach wodnych, roztworach buforowych o $\text{pH} = 5.5$ oraz $\text{pH} = 7.0$, a także roztworach wodnych nasyconych oktanołem, w oktanolu oraz oktanolu nasyconym wodą. Wybór rozpuszczalników wynikał z konieczności sprawdzenia rozpuszczalności substancji, które są lekami lub potencjalnymi lekami w roztworach, mogących służyć za model płynów ustrojowych czy komórek skóry człowieka. Wyznaczono też rozpuszczalność wybranych pochodnych acyklowiru w wodnych roztworach cyklodekstryn w celu sprawdzenia możliwości powstawania kompleksów inkluzyjnych pomiędzy tymi pochodnymi a cyklodekstrynami, a przez to zwiększania rozpuszczalności tych substancji roztworach wodnych.

2.2.1.1 Wyznaczanie rozpuszczalności w wodzie, wodzie nasyconej 1-oktanołem, 1-oktanolu i 1-oktanolu nasyconym wodą.

Do szklanych ampulek o pojemności 15 cm^3 pakowano po 10mg badanej substancji, dodawano 10ml wody dejonizowanej (Millipore) i umieszczano w termostacie o pojemności 60 dm^3 . Wyjątkowo dla związku **6-Me-TACV (4)** naważka wynosiła 80 mg ze względu na dużo wyższą rozpuszczalność stwierdzoną podczas wstępnych badań. Temperatura w termostacie była utrzymywana z dokładnością $\pm 0.1^\circ\text{C}$. Ampułki były intensywnie wytrząsane przez 4 dni w celu osiągnięcia równowagi termodynamicznej, cały czas sprawdzano czy w ampułkach znajduje się substancja w stanie stałym. Stwierdzono, że po 4 dniach stężenie wszystkich badanych roztworów osiągnęło wartość maksymalną. Po 4 dniach wytrząsania próbki były odwirowywane. Stężenie

badanych związków w otrzymanych roztworach nasyconych określano spektrofotometrycznie, używając spektrofotometru UV-VIS Carry 1E firmy Varian. Podczas wyznaczania stężenia każdy pomiar powtarzano trzykrotnie. Badania rozpuszczalności pochodnych acyklowiru w wodzie prowadzono w temperaturach 25°C, 35°C i 45°C. Taką samą procedurę zastosowano do określania rozpuszczalności w 1-oktanolu, wodzie nasyconej 1-oktanołem oraz 1-oktanolu nasyconym wodą. Wodę nasyconą 1-oktanołem oraz 1-oktanol nasycony wodą przygotowywano wcześniej z roztworu dwufazowego i utrzymywano w temperaturze pomiaru.

2.2.1.2 Wyznaczanie rozpuszczalności w buforze fosforanowym o pH równym 5.5 i 7.0 oraz buforowanych roztworach cyklodekstryn.

W plastikowych ampulkach o pojemności 2 cm³ umieszczano po 3mg badanych substancji i dodawano po 1.5 ml buforu lub roztworu odpowiedniej cyklodekstryny o określonym stężeniu z zakresu 10⁻³ do 2x10⁻² (mol kg⁻¹). Roztwory buforowe o pH = 5.5 lub 7.0 sporządzano mieszając roztwory fosforanów KH₂PO₄ oraz Na₂HPO₄ o stężeniu 0.066 (mol dm⁻³). pH sprawdzano korzystając z pH-metru firmy Kettler Toledo MP 220 wyposażonego w elektrodę uniwersalną oraz czujnik temperatury. Otrzymane zawiesiny umieszczano w wykonanym w IChF PAN termostacie wodnym o pojemności 60 dm³, który wyposażony był w wytrząsarke. Temperatura pomiaru była utrzymywana z dokładnością do 0.1°C. W czasie wytrząsania mierzono stężenie badanych substancji w roztworze w celu wyznaczenia czasu po jakim ustala się równowaga, pamiętając jednocześnie o tym, aby w naczynkach przez cały czas pomiaru znajdowała się badana substancja w stanie stałym. Stwierdzono, że dla każdej z używanych cyklodekstryn po 7 dniach wytrząsania w danej temperaturze stężenie badanych substancji nie zmienia się, dotyczyło to wszystkich roztworów o różnych stężeniach cyklodekstryny. Po uzyskaniu roztworów nasyconych próbki odwirowywano, a następnie spektrofotometrycznie wyznaczano ich stężenie, korzystając ze spektrofotometru Shimadzu UV 2401 PC. Każdy pomiar powtarzany był, conajmniej trzykrotnie. Stężenie obliczano korzystając z wcześniej wyznaczonych współczynników ekstynkcji dla danego roztworu buforowego. Współczynniki ekstynkcji dla wszystkich badanych substancji w wodzie oraz roztworach buforowych wybranych do dalszych badań z cyklodekstrynami przedstawia tabela 2.1 w rozdziale zawierającym wyniki badań.

2.2.1.3 Wyznaczanie rozpuszczalności 6-Fe-O-Me-TACV w n-oktanolu nasyconym buforem fosforanowym oraz roztworach buforowych nasyconych oktanołem zawierających 2×10^{-2} (mol kg^{-1}) HP- β -CD lub niezawierających cyklodekstryny.

Rozpuszczalności te wyznaczano w analogiczny sposób jak poprzednio. Cyklodekstrynę rozpuszczano w przygotowanym wcześniej buforze fosforanowym nasyconym 1-oktanołem. Do tak przygotowanego roztworu dodawano pochodną acyklowiru i wytrząsano do momentu osiągnięcia równowagi. Stężenia **6-Fe-O-Me-TACV** w roztworach buforów i oktanolu były wyznaczane spektrofotometrycznie.

2.2.2 Wyznaczanie wartości pKa wybranych substancji, dla których prowadzono badania rozpuszczalności w roztworach cyklodekstryn.

Badane substancje mogą ulegać protonacji ze względu na obecność atomów azotu w swojej strukturze. Jonizacja cząsteczki wpływa na wartość absorbancji oraz kształt widma w zakresie UV-VIS, a także na równowagę kompleksowania przez cyklodekstryny, stąd wynika konieczność wyznaczenia stałych pKa. Wartości stałych protonowania pKa wyznaczano na podstawie miareczkowania pH-metrycznego i spektrofotometrycznego wodnych roztworów wybranych tricyklicznych pochodnych acyklowiru, używając wodnych roztworów HCl oraz NaOH o stężeniu 0.01 (mol dm^{-3}). Otrzymane wartości absorbancji i pH wykorzystano do wyznaczenia krzywych miareczkowania, i na ich podstawie wartości pKa. Wyznaczone wartości pKa, przykładowe krzywe miareczkowania oraz otrzymane widma UV-VIS dla różnych wartości pH, będą omówione w dalszej części pracy.

2.2.3 Wyznaczanie współczynnika podziału pochodnych acyklowiru pomiędzy wodę i 1-oktanol

Współczynnik podziału acyklowiru, gancyklowiru oraz pochodnych acyklowiru wyznaczano podczas ekstrakcji tych substancji z wody do 1-oktanolu. Pomiarzy prowadzono w ten sposób, że w szklanych ampułkach o pojemności 15 cm^3 umieszczano 5ml roztworu danej substancji o stężeniu równym połowie stężenia roztworu nasyconego, dodawano 5 ml 1-oktanolu, a następnie umieszczano w termostacie i wytrząsano przez 2 dni w temperaturze 25°C. W badaniach korzystano z tego samego termostatu (produkcji IChF PAN), zawierającego również wytrząsarke, co podczas wyznaczania rozpuszczalności pochodnych acyklowiru. Stężenie danej substancji w poszczególnych fazach wyznaczano spektrofotometrycznie.

2.2.3.1 Wyznaczanie współczynników podziału 6-Fe-O-Me-TACV pomiędzy fazę wodną i organiczną (1-oktanol) w obecności cyklodekstryn

Badania ekstrakcji **6-Fe-O-Me-TACV** z roztworu wodnego do 1-oktanolu prowadzone były w temperaturach 25°C i 37°C poprzez wytrząsanie w termostatowanych probówkach po 3ml roztworu wodnego **6-Fe-O-Me-TACV** z 3 ml 1-oktanolu. Roztworem wodnym były buforowane roztwory (bufor fosforanowy pH 5.5 oraz 7.0) lub same roztwory buforowe zawierające różne cyklodekstryny (HP-β-CD, M-β -CD, β-CD, HP- γ-CD) o stężeniu 10⁻² (mol kg⁻¹).

Roztwory **6-Fe-O-Me-TACV** zawierające cyklodekstryny zostały przygotowane poprzez kilkudniowe wytrząsanie badanej substancji w roztworze cyklodekstryny tak, aby uzyskać maksymalne stężenie tej substancji w fazie wodnej. Ekstrakcja była prowadzona przez kilka dni w termostatowanym urządzeniu wytrząsającym aż do uzyskania równowagi. Następnie po odwirowaniu sprawdzano stężenie, zarówno w fazie 1-oktanolowej jak i w fazie wodnej. Stężenia **6-Fe-O-Me-TACV** w roztworach buforów i 1-oktanolu były wyznaczane spektrofotometrycznie. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono współczynniki podziału $k_{o/w}$ badanej substancji w 25°C i 37°C.

2.2.4 Termograwimetria

Wyznaczanie zawartości wody w używanych do badań cyklodekstrynach w stanie stałym prowadzono metodą termograwimetryczną używając analizatora firmy DuPont Instruments TGA 951, w zakresie 25-200°C lub 25-300°C. Próbki cyklodekstryn o masie około 10 mg ogrzewano z szybkością 10° na minutę w strumieniu argonu. Analizę zawartości wody w cyklodekstrynie prowadzono w ten sposób, że daną próbkę ogrzewano dwukrotnie, początkowo do 200°C, a następnie zmniejszono temperaturę do 25°C i ogrzewano do 300°C. Wyniki tych analiz będą pokazane i omówione w dziale dotyczącym analizy termicznej.

2.2.5 Pomiary metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej (Differential Scanning Calorimetry - DSC)

Badania metodą DSC prowadzono w celu wyznaczenia temperatury topnienia oraz entalpii topnienia, przy użyciu analizatora termicznego firmy DuPont Instruments model 9900A wyposażonego w celkę DSC typu 910. Próbki stałe o masie 5-10 mg umieszczano w otwartych naczynkach aluminiowych i ogrzewano z szybkością 10° na minutę w strumieniu argonu w zakresie 25-300°C. Analizowane próbki to pochodne acyklowiru, cyklodekstryny, mieszaniny fizyczne tych substancji z HP-β-CD zawierające 10% wagowych pochodnych acyklowiru oraz

kompleksy badanych substancji z HP- β -CD. Kompleksy w stanie stałym otrzymywano poprzez odparowanie roztworu wodnego danej cyklodekstryny i badanej substancji, zawierającej 10-krotny nadmiar cyklodekstryny. Kalorymetr DSC był kalibrowany przy użyciu próbek indu.

2.2.6 Pomiary metodą ^1H NMR

Widma ^1H NMR wybranych substancji wykonano w celu potwierdzenia tworzenia się kompleksów pomiędzy pochodną acyklowiru i cyklodekstryną oraz sprawdzenia, w jaki sposób dana substancja jest inkludowana do luki cyklodekstryny. Pomiary prowadzono w 25°C używając spektrometru typu Unity Plus firmy Varian o częstotliwości 500 MHz. Wybrane tricykliczne pochodne acyklowiru rozpuszczono w czystej D_2O [stężenie wynosiło 5×10^{-5} (mol kg^{-1})] lub roztworach cyklodekstryny o stężeniu 5×10^{-5} (mol kg^{-1}). Widma opracowywano korzystając z programu MestRe-C wersja

3a [134]. Oryginalne widma były uzupełniane zerami do 32 tysięcy punktów. W celu poprawienia stosunku sygnału do szumu został użyty filtr Lorentza powodujący poszerzenie linii o 1 Hz.

2.2.7 Optymalizacja struktury kompleksów metodami mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej

Symulacje metodą mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej prowadzono w celu wyznaczenia architektury kompleksów wybranych tricyklicznych pochodnych acyklowiru z cyklodekstrynami. Do obliczeń wybrano β - i γ -cyklodekstrynę. Modelowanie wykonywano używając struktur cyklodekstryn oraz pochodnych acyklowiru pochodzących z bazy struktur krystalograficznych Cambridge [53,105,135]. Optymalne struktury otrzymywano w wyniku obliczeń składających się z kolejnych cykli optymalizacji geometrii kompleksu w próżni metodą mechaniki molekularnej [pole sił OPLS, algorytm Polaka-Ribiere, kryterium zbieżności 0.001 (kcal mol^{-1})] oraz dynamiki molekularnej (w zakresie temperatur: grzanie od 0 do 600K, a następnie chłodzenie od 600 do 300K co 10K). Czas grzania 0.2 ps, czas chłodzenia 0.2 ps czas modelowania 0.4 ps co 0.001 ps. Dla każdego układu przeprowadzono po 100 cykli obliczeniowych optymalizacji kolejno metodą mechaniki molekularnej oraz symulacji metodą dynamiki molekularnej. Po przeprowadzeniu serii obliczeń wybierano struktury o najmniejszej energii, następnie wyznaczano powierzchnie cyklodekstryny oraz badanej substancji w danym kompleksie.

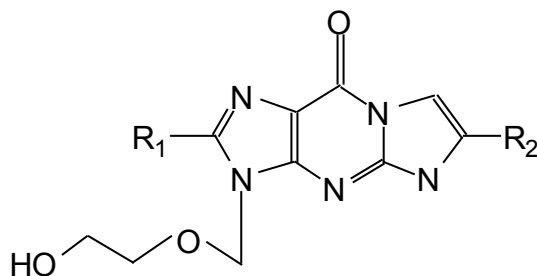
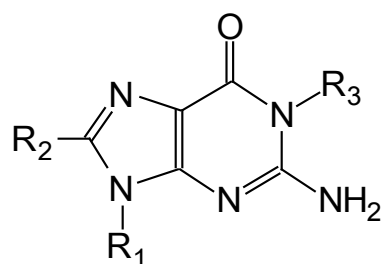
2.3 Otrzymane wyniki i ich dyskusja

Wyniki otrzymane na podstawie przeprowadzonych badań eksperymentalnych oraz wykonane na ich podstawie obliczenia, przedstawione w tym rozdziale, pozwoliły na charakteryzację pochodnych acyklowiru oraz ich kompleksów z cyklodekstrynami. Ponieważ przedmiotem badań była grupa związków, różniących się budową, umożliwiło to dyskusję wpływu poszczególnych grup funkcyjnych na właściwości fizykochemiczne tych substancji oraz trwałość ich kompleksów z cyklodekstrynami.

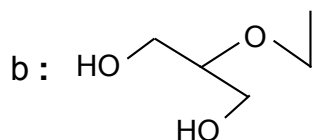
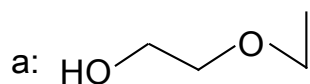
2.3.1 Rozpuszczalność wybranych pochodnych acyklowiru w wodzie i oktanolu.

Acyklowir 9-[(2-hydroxyethoxy)methyl] guanine (ACV) oraz gancyklowir 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine (GCV) są szeroko stosowanymi lekami antywirusowymi, dlatego też poznanie ich własności fizykochemicznych ma duże znaczenie zarówno dla procesu produkcji jak i poznania mechanizmu absorpcji przez organizm człowieka. Z wcześniejszych danych dotyczących tych leków wiadomo [51], że ich rozpuszczalność jest niska, co powoduje niską absorpcję przez organizmy żywe [127]. Zsyntezowane w zespole Profesor Golankiewicz pochodne acyklowiru mają odmienne od substancji wyjściowych właściwości fizykochemiczne, w tym również rozpuszczalność, przy szerszych właściwościach antywirusowych.

Do badań rozpuszczalności wybrano acyklowir i jego analog podstawiony bromem w pozycji 2, gancyklowir oraz grupę tricyklicznych pochodnych acyklowiru, otrzymanych poprzez przyłączenie mostka etenowego do atomów azotu części guaninowej. Wybór tych związków pozwalał na zbadanie wpływu modyfikacji cząsteczki acyklowiru polegającej na zmianie budowy części cukrowej, wprowadzeniu dodatkowego pierścienia czy różnego typu podstawników halogenowych, alkilowych i aromatycznych na ich właściwości fizykochemiczne. Wybrane do badań tricykliczne pochodne acyklowiru (**4-12**) mają różne podstawniki: alkilowe o różnej wielkości i hydrofobowości (**5, 7**), halogenowe (**6**) oraz różnego typu grupy aromatyczne (**8-12**). Taki dobór substancji pozwala na ocenę, które ze związków najlepiej spełniają warunki stawiane potencjalnym lekom, tzn. mają zarówno odpowiednie właściwości fizykochemiczne (np. rozpuszczalność w roztworach wodnych), jak i odpowiednią aktywność antywirusową. Struktury badanych związków przedstawia rysunek 2.1.



	Substancja	R ₁	R ₂
1	ACV	a	H
2	Br-ACV	R ₁	Br
3	GCV	b	H



	Substancja	R ₁	R ₂
4	TACV	H	H
5	6-Me-TACV	H	CH ₃
6	2Br-6-Me-TACV	Br	CH ₃
7	6-t-But-TACV	H	C(CH ₃) ₃
8	6-Fe-TACV	H	
9	6-Fe-Fe-TACV	H	
10	6-Br-F-TACV	H	
11	6-Fe-O-Me-TACV	H	
12	6-Naft-TACV	H	

Rys. 2.1. Struktury i nazwy substancji, które były przedmiotem badań opisanych w tej pracy.

Molowe współczynniki ekstynkcji (ϵ_w) substancji **1-12**, w wodzie, buforze fosforanowym o pH = 5.5 i pH = 7.0 (ϵ_b) i 1-oktanolu (ϵ_o) dla wybranych do dalszych badań tricyklicznych pochodnych acyklowiru przedstawia tabela 2.1.

Tabela 2.1. Współczynniki ekstynkcji związków **1-12** w wodzie (ε_w), 1-oktanolu (ε_o) oraz buforze (ε_b) fosforanowym o pH = 5.5 i pH = 7.0.

L.p.	Nazwa związku	woda		bufor fosforanowy		1-oktanol	
		λ_{max} (nm)	$\varepsilon_w \times 10^4$ (dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)	pH=5.5	pH=7.0	λ_{max} (nm)	$\varepsilon_o \times 10^4$ (dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)
				$\varepsilon_b \times 10^4$ (dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)	$\varepsilon_b \times 10^4$ (dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)		
1	ACV	251	1.34			257	0.689
2	Br-ACV	259	1.49			257	0.299
3	GCV	251	1.20			254	0.379
4	TACV	226	3.21	3.29	3.12	284	0.690
		284	1.10	1.28	1.19		
5	6-Me-TACV	230	2.57			261	0.654
		284	0.865			283	0.734
6	2-Br-6-Me-TACV	235	3.27	3.32	3.30	285	1.51
		284	1.31	1.36	1.35	232	2.83
7	6-t-But-TACV	230	3.62	3.63	3.72	283	1.39
		284	1.17	1.22	1.26		
8	6-Fe-TACV	250	1.79	2.20	2.38	254	1.69
		306	0.553	0.78	0.76	309	0.507
9	6-Fe-Fe-TACV	249	2.08	3.31	3.35	254	1.57
		306	0.647	1.02	0.90	309	0.518
10	6-Br-Fe-TACV	256	294			260	4.07
		309	0.977			316	1.26
11	6-Fe-O-Me-TACV	259	2.95	3.47	3.39	264	1.03
		306	1.20	1.40	1.37	309	0.436
12	6-Naft-TACV	254	3.13	3.44	3.42	258	5.83
		315	0.76	0.94	0.94	322	1.41

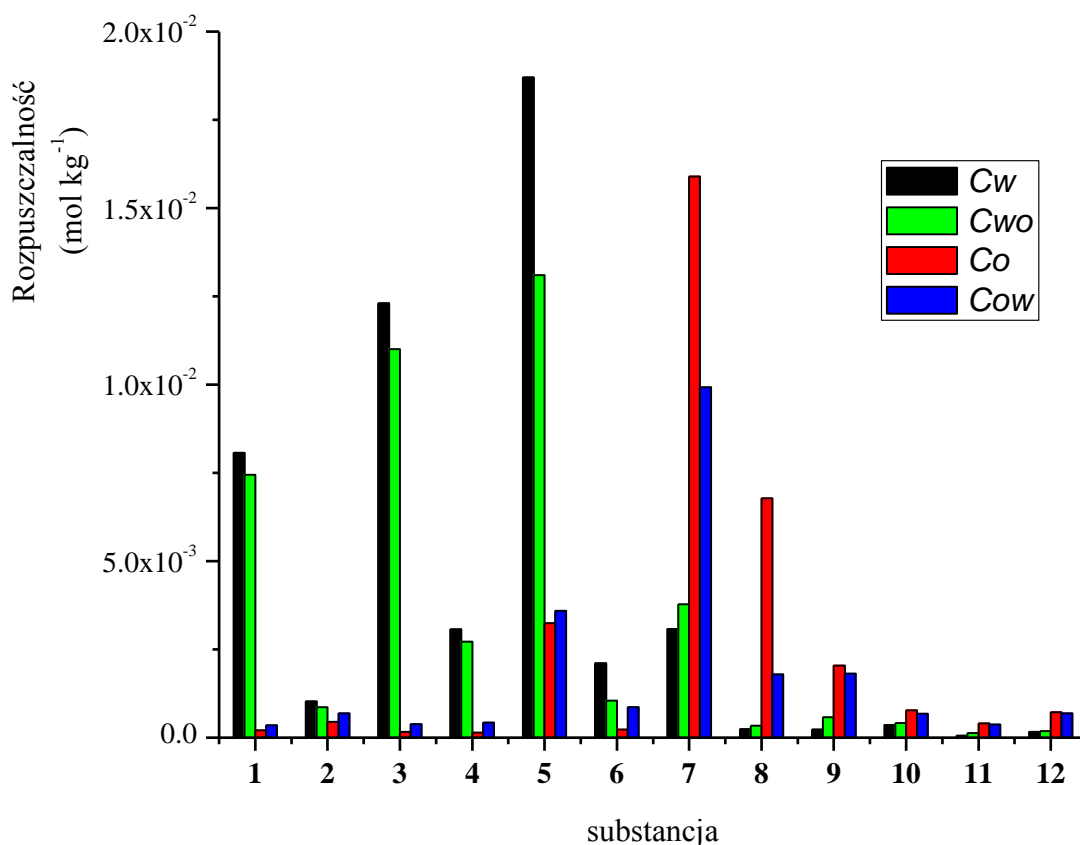
Badania rozpuszczalności prowadzono w wodzie, wodzie nasyconej 1-oktanołem, 1-oktanolu oraz 1-oktanolu nasyconym wodą. Procedura prowadzenia tych badań została opisana w rozdziale 2.2.1. Po wykonaniu wstępnych pomiarów okazało się, że jeden z badanych związków 6-Me-TACV (**5**) ma dużo wyższą rozpuszczalność niż pozostałe badane związki, stąd też masa substancji stałej wzięta do wytrząsania wynosiła w tym przypadku 80 mg. Badania rozpuszczalności pochodnych acyklowiru w wodzie prowadzono w temperaturach 25°C, 35°C i 45°C.

W badaniach aktywności leków obok rozpuszczalności w wodzie, ważna jest też rozpuszczalność w 1-oktanolu, który stanowi model warstwy lipidowej. Rozpuszczalność w 1-oktanolu i współczynnik podziału woda – 1-oktanol są też miarą lipofilowości danej substancji.

Dlatego też, dla badanych substancji wyznaczono również rozpuszczalność w 1-oktanolu, a także w wodzie nasyconej 1-oktanołem oraz 1-oktanolu nasyconego wodą. Te badania prowadzono w 25°C, w analogiczny sposób jak badania rozpuszczalności w wodzie. Otrzymane wyniki przedstawia tabela 2.2 oraz rysunek 2.2.

Tabela 2.2. Rozpuszczalność substancji **1-12** w wodzie (C_w), wodzie nasyconej 1-oktanołem (C_{wo}), w 1-oktanolu (C_o) oraz 1-oktanolu nasyconym wodą (C_{ow}) w temperaturze 25°C.

L.p.	Nazwa związku	$C_w \times 10^{-4}$ (mol kg ⁻¹)	$C_{wo} \times 10^{-4}$ (mol kg ⁻¹)	$C_o \times 10^{-4}$ (mol kg ⁻¹)	$C_{ow} \times 10^{-4}$ (mol kg ⁻¹)
1	ACV	80.70	74.40	2.12	3.53
2	Br-ACV	10.30	8.59	4.43	6.89
3	GCV	123.00	110.00	1.66	3.83
4	TACV	30.70	27.20	1.40	4.27
5	6-Me-TACV	187.00	131.00	32.40	35.90
6	2-Br-6-Me-TACV	21.10	10.51	2.27	8.58
7	6-t-But-TACV	30.80	37.80	159.00	99.20
8	6-Fe-TACV	2.38	3.34	67.80	17.91
9	6-Fe-Fe-TACV	2.29	5.83	20.40	18.10
10	6-Br-Fe-TACV	3.64	4.12	7.80	6.81
11	6-Fe-O-Me-TACV	0.53	1.35	4.03	3.74
12	6-Naft-TACV	1.66	1.91	7.25	6.84



Rys. 2.2. Rozpuszczalność badanych związków **1-12** w wodzie (C_w), wodzie nasyconej 1-oktanołem, (C_{wo}), 1-oktanolu (C_o) i 1-oktanolu nasyconym wodą (C_{ow}).

Otrzymane dane pokazują, że acyklowir (**1**) oraz gancyklowir (**2**) mają znacząco wyższą rozpuszczalność {równą około 10^{-2} (mol dm^{-3})} w wodzie niż bromoacyklowir (**2**) i jego tricykliczne pochodne **4-11**. Rozpuszczalność ACV i GCV w 1-oktanolu jest bardzo niska, niższa niż pozostałych badanych związków. Natomiast analizując bromoacyklowir (**2**) oraz grupę tricyklicznych pochodnych acyklowiru, można zauważyć, że ich rozpuszczalność w wodzie jest znacznie niższa niż ACV i GCV i jest rzędu 10^{-3} (mol dm^{-3}) dla związków posiadających alkilowe oraz halogenowe podstawniki oraz 10^{-4} lub nawet 10^{-5} (mol dm^{-3}) dla tricyklicznych pochodnych posiadających podstawniki aromatyczne. Rozpuszczalność w 1-oktanolu dla **ACV (1)**, **Br-ACV (2)**, **GCV (3)** oraz **TACV (4)**, **Me-TACV (5)**, **2-Br-6Me-TACV (6)** jest niższa niż rozpuszczalność w wodzie, natomiast tricykliczne pochodne acyklowiru z podstawnikami aromatycznymi oraz tert-butyłowym lepiej rozpuszczają się w oktanolu niż w wodzie. Wyjątkiem wśród pochodnych tricyklicznych jest 6-Me-TACV (**5**), którego rozpuszczalność w wodzie jest wyższa niż wyjściowego acyklowiru i wynosi około 2×10^{-2} (mol dm^{-3}), a rozpuszczalność w 1-oktanolu jest kilka razy niższa niż rozpuszczalność w wodzie. Wynika to z obecności małego

podstawnika metylowego, który utrudnia agregację cząsteczek tego związku w wodzie. Podobne zależności obserwowane są dla uracylu i jego metylowej pochodnej tyminy, której rozpuszczalność w wodzie jest znacznie wyższa [136]. Nasylenie wody 1-oktanołem powoduje spadek rozpuszczalności w wodzie związków, które rozpuszczają się w niej lepiej niż w 1-oktanolu oraz wzrost rozpuszczalności tych, które lepiej rozpuszczają się w 1-oktanolu. Podobnie nasylenie 1-oktanolu wodą powoduje niewielki spadek rozpuszczalności tych związków, które lepiej rozpuszczają się w 1-oktanolu i niewielki wzrost rozpuszczalności tych związków, które lepiej rozpuszczają się w wodzie.

Rozpuszczalność związków **1-12** była również wyznaczona dla temperatur 35°C i 45°C. Otrzymane wyniki przedstawia tabela 2.3.

Tabela 2.3. Rozpuszczalność związków **1-12** w wodzie (C_w) w temperaturach 25, 35 i 45°C.

L.p.	Nazwa związku	$C_w \times 10^{-4}$ (mol dm ⁻³)		
		25°C	35°C	45°C
1	ACV	80.7	162.0	197.0
2	Br-ACV	10.3	19.0	24.9
3	GCV	123.0	218.0	229.0
4	TACV	30.7	59.1	67.5
5	6-Me-TACV	187	266.0	324.0
6	2-Br-6-Me-TACV	21.1	23.6	25.9
7	6-t-But-TACV	30.8	204.0	319.0
8	6-Fe-TACV	2.38	5.17	7.28
9	6-Fe-Fe-TACV	2.29	5.54	6.58
10	6-Br-Fe-TACV	3.64	8.98	12.8
11	6-Fe-O-Me-TACV	0.529	1.44	4.65
12	6-Naft-TACV	1.66	2.56	2.65

Po analizie temperaturowych zależności rozpuszczalności acyklowiru i jego pochodnych oraz gancyklowiru w wodzie można stwierdzić, że we wszystkich przypadkach rozpuszczalność rośnie wraz ze wzrostem temperatury.

Podane wyżej dane wskazują, że wszystkie badane substancje mają niską rozpuszczalność w wodzie, w tym szczególnie tricykliczne pochodne acyklowiru posiadające podstawniki aromatyczne, których rozpuszczalność w wodzie w 25°C jest rzędu $10^{-4} - 10^{-5}$ (mol dm⁻³). Jest to bardzo niekorzystne ze względu na potencjalne zastosowanie w farmacji, gdyż niska rozpuszczalność w wodzie utrudnia absorpcję tych substancji przez organizmy żywe i obniża aktywność antywirusową tych związków. [127,129]. Przykładem może być **6-Fe-O-Me-TACV (11)**, wykazujący aktywność w stosunku do szerokiego spektrum wirusów [36], którego rozpuszczalność w wodzie w 25°C wynosi 5.3×10^{-5} (mol dm⁻³).

Zwiększenie rozpuszczalności tych związków byłoby bardzo korzystne. Analizując struktury badanych związków, można zauważyć, że ich cząsteczki mają płaską budowę z podstawnikami alkilowymi lub aromatycznymi w pozycji para-. Taka budowa sugeruje zastosowanie cyklodekstryn, które dobrze rozpuszczają się w wodzie [55-59,73], a jednocześnie mogą zwiększać rozpuszczalność trudno rozpuszczalnych substancji poprzez inkluzję grup hydrofobowych do wnętrza luki cyklodekstryny [55-59]. Naturalne cyklodekstryny są nietoksyczne, podobnie jak ich kompleksy z lekami, co jest szczególnie ważne w przypadku potencjalnych leków [55-59].

2.3.2 Badania rozpuszczalności wybranych, tricyklicznych pochodnych acyklowiru w roztworach cyklodekstryn

Z literatury [57,60] wiadomo, że zastosowanie cyklodekstryn może również zwiększać stabilność danej substancji oraz jej aktywność biologiczną poprzez utworzenie kompleksu inkluzyjnego z cyklodekstryną. Znane są prace dotyczące zastosowania β -cyklodekstryny w celu zwiększenia rozpuszczalności acyklowiru [127], jednak w tym przypadku zaobserwowano jedynie minimalne zwiększenie ich rozpuszczalności. Nieco lepsze wyniki zaobserwowano w przypadku zastosowania hydroksypropylo- β -cyklodekstryny [132] w celu zwiększenia rozpuszczalności w wodzie pochodnych gancyklowiru podstawionych w łańcuch cukrowym.

Dotychczas nie badano możliwości zastosowania cyklodekstryn w celu zwiększania rozpuszczalności w wodzie pochodnych acyklowiru, które są przedmiotem tej pracy.

Analiza wymiarów luki podstawowych cyklodekstryn i struktur badanych związków sugeruje, że mogą one tworzyć kompleksy inkluzyjne z cyklodekstrynami o większych wielkościach luki, takich jak β - lub γ - cyklodekstryna.

2.3.2.1 Wyznaczanie rozpuszczalności pochodnych acyklowiru w roztworach hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP- β -CD) oraz stałych trwałości kompleksów HP- β -CD z tymi pochodnymi

Wstępne badania, obejmujące α -, β -, γ -cyklodekstrynę oraz ich hydroksypropylowe pochodne wykazały, że najlepsze rezultaty otrzymano dla hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP- β -CD). Do dalszych badań, mających na celu zwiększenie rozpuszczalności pochodnych acyklowiru w roztworach wodnych w wyniku kompleksowania przez hydroksypropylo- β -cyklodekstrynę, wybrano tricykliczną pochodną acyklowiru **TACV (4)** oraz jej podstawione analogi o podstawnikach alkilowych i halogenowych – **2-Br-6-Me-TACV (5)** i **6-t-But-TACV (7)** oraz aromatycznych: **6-Fe-TACV (8)**, **6-Fe-Fe-TACV (9)**, **6-Fe-O-Me-TACV (11)**, **6-Naft-TACV (12)**. Związki te charakteryzują się bardzo niską rozpuszczalnością, przy dobrej aktywności antywirusowej, stąd też konieczność znalezienia metody zwiększenia ich rozpuszczalności w roztworach wodnych. Ze względu na wartości pH występujące w organizmie człowieka badania prowadzono w buforowanych roztworach wodnych o pH = 7.0 zbliżonym do pH płynów ustrojowych oraz pH = 5.5 odpowiadającym pH skóry. Badania rozpuszczalności prowadzono w dwóch temperaturach: standardowej 25°C oraz fizjologicznej 37°C. Procedury doświadczalne były podobne jak w przypadku wyznaczania rozpuszczalności w wodzie, zmniejszono tylko objętość próbek ze względu na konieczność używania dużych ilości HP- β -CD, której koszt jest wysoki. Szczegółowe procedury wyznaczania rozpuszczalności podano powyżej.

Próbki wytrząsano przez 7 dni, ponieważ w czasie wstępnych pomiarów stwierdzono, że w tym czasie została osiągnięta równowaga procesu rozpuszczania we wszystkich roztworach z badanego zakresu stężeń cyklodekstryny. Po zakończeniu wytrząsania próbki odwirowywano, a następnie spektrofotometrycznie oznaczano w nich stężenie badanej substancji, korzystając ze spektrofotometru Shimadzu UV-VIS 2401 PC, wyposażonego w termostatowany moduł pomiarowy. Otrzymane wyniki zostały przedstawione w tabeli 2.4.

Tabela 2.4. Rozpuszczalność wybranych tricyklicznych pochodnych acyklowiru w buforowanych roztworach HP- β -CD o pH=5.5 i pH = 7.0 w temperaturach 25°C i 37°C.

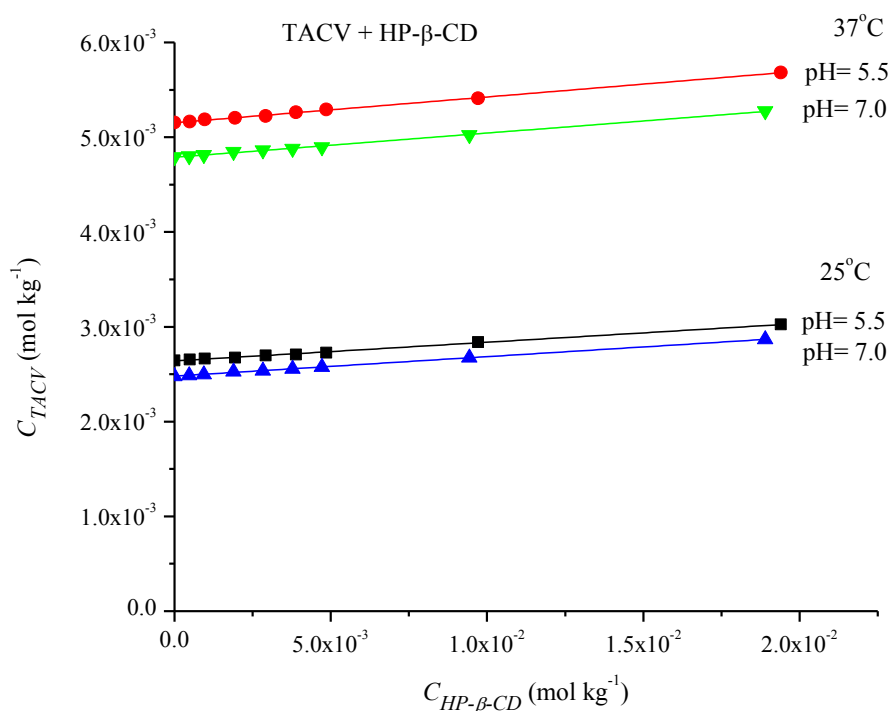
pH = 5.5			pH = 7.0		
$C_{HP-\beta-CD}$ $\times 10^{-3}$ (mol kg ⁻¹)	25.0°C $C_s \times 10^{-3}$ (mol kg ⁻¹)	37.0°C $C_s \times 10^{-3}$ (mol kg ⁻¹)	$C_{HP-\beta-CD}$ $\times 10^{-3}$ (mol kg ⁻¹)	25.0°C $C_s \times 10^{-3}$ (mol kg ⁻¹)	37.0°C $C_s \times 10^{-3}$ (mol kg ⁻¹)
TACV (4)					
0.0	2,64	5,16	0.0	2,48	4,79
0.48	2,65	5,16	0.47	2,49	4,80
0.97	2,66	5,19	0.94	2,50	4,81
1,94	2,68	5,20	1,89	2,53	4,85
2,92	2,70	5,22	2,83	2,54	4,86
3,89	2,71	5,26	3,78	2,56	4,88
4,86	2,73	5,29	4,72	2,58	4,90
9,72	2,84	5,41	9,44	2,67	5,02
19.40	3.02	5,68	18.90	2,87	5,28
2-Br-6-Me-T ACV (6)					
0	1.18	2.36	0	1.03	2.02
0.49	1.20	2.39	0.47	1.04	2.02
0.97	1.22	2.39	0.94	1.06	2.04
1.94	1.24	2.44	1.89	1.09	2.08
2.92	1.26	2.54	2.83	1.10	2.12
3.89	1.28	2.59	3.78	1.12	2.13
4.86	1.32	2.63	4.72	1.16	2.16
9.72	1.44	2.95	9.44	1.27	2.31
19.40	1.70	3.50	1.89	1.51	2.63

6-t-But-TACV (7)						
0	3,90	7,02		0	4,26	7,75
0.98	4,45	8,80		0.98	4,50	8,30
1,95	5,01	9,54		1,95	4,65	8,82
3,90	5,42	10,70		3,90	4,79	9,43
5,85	5,50	10,90		5,85	4,93	9,63
7,80	5,55	11,10		7,80	4,98	9,77
9,75	5,60	11,20		9,75	5,04	9,85
19.50	5,70	11,30		1,95	5,10	9,91
6-Fe-TACV (8)						
0.00	0,19	0,34		0,00	0,26	0,34
0.98	0,20	0,38		0,97	0,27	0,38
1,95	0,25	0,39		0,19	0,30	0,39
3,90	0,28	0,47		0,39	0,36	0,49
5,90	0,32	0,54		0,58	0,40	0,55
7,80	0,35	0,58		0,77	0,45	0,60
9,75	0,38	0,68		0,97	0,49	0,66
19.50	0,63	1,03		1,93	0,78	1,03
6-Fe-Fe -TACV (9)						
0	0,23	0,50		0	0,27	0,61
0.94	0,24	0,54		0.99	0,29	0,63
1,88	0,26	0,57		1,97	0,31	0,69
3,76	0,30	0,61		3,94	0,36	0,73
5,64	0,32	0,66		5,91	0,45	0,82
7,52	0,37	0,70		7,88	0,50	0,89
9,4	0,40	0,79		9,85	0,57	0,98
18.80	0,64	1,07		19.70	0,81	1,37

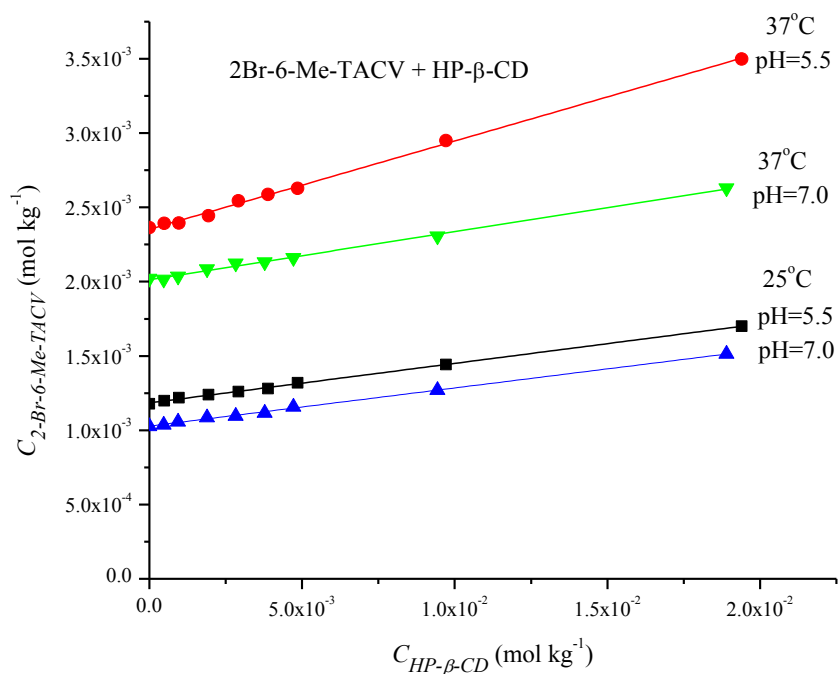
6-Naft-TACV (12)						
0,00	0,026	0,034		0,00	0,026	0,042
0,98	0,039	0,045		0,97	0,041	0,053
1,95	0,048	0,050		1,94	0,050	0,063
3,9	0,065	0,066		3,88	0,067	0,096
5,85	0,080	0,091		5,82	0,084	0,123
7,80	0,104	0,110		7,76	0,106	0,144
9,75	0,113	0,122		9,72	0,127	0,171
1,95	0,200	0,216		1,94	0,210	0,290

Tabela nie zawiera danych dla **6-Fe-O-Me-TACV (11)**, gdyż ze względu na bardzo wysoką aktywność antywirusową, badania rozpuszczalności tego związku w roztworach cyklodekstryn rozszerzono, uwzględniając szerszy zakres temperatur oraz zastosowanie innych cyklodekstryn. Będą one zaprezentowane w dalszej części pracy.

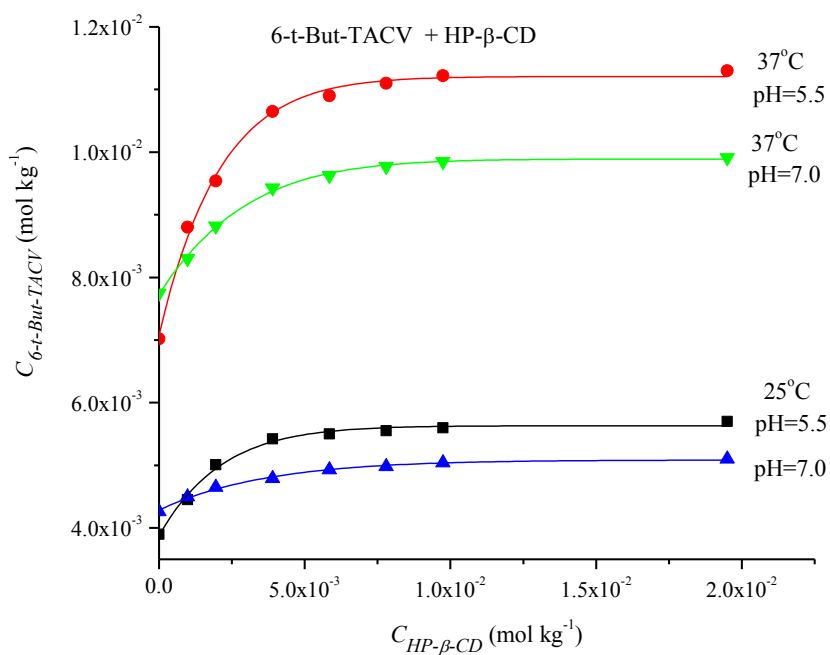
Na podstawie danych dotyczących rozpuszczalności związków zawartych w tabeli 2.4 wykreślono wykresy zależności stężenia danej substancji od stężenia roztworu HP- β -CD. Zależności te w zastosowanym zakresie stężeń cyklodekstryny mają liniowy przebieg - A_L wg klasyfikacji Connors'a [57,117]. Wyjątkiem są zależności otrzymane podczas badań **t-But-TACV (7)**, które nie są liniowe (rys. 2.5) Wykresy zależności stężenia roztworu nasyconego badanej substancji w roztworach HP- β -CD przedstawiają rysunki 2.3-2.8.



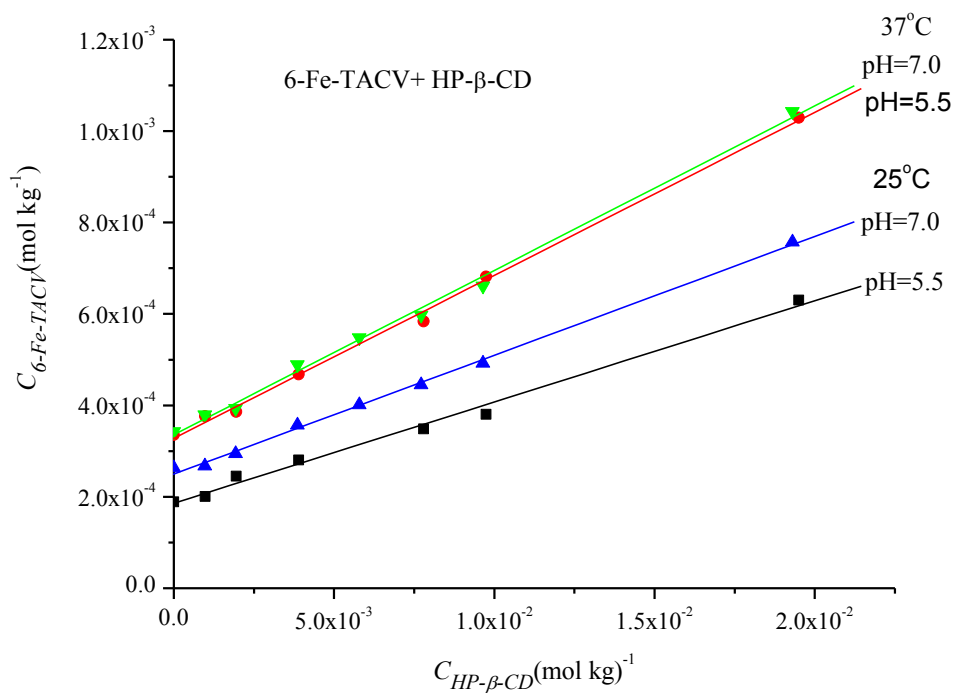
Rys. 2.3. Zależność rozpuszczalności TACV (4) w buforowanych roztworach HP-β-CD o pH = 5.5 oraz pH = 7.0 od stężenia cyklodekstryny w temperaturach 25°C i 37°C.



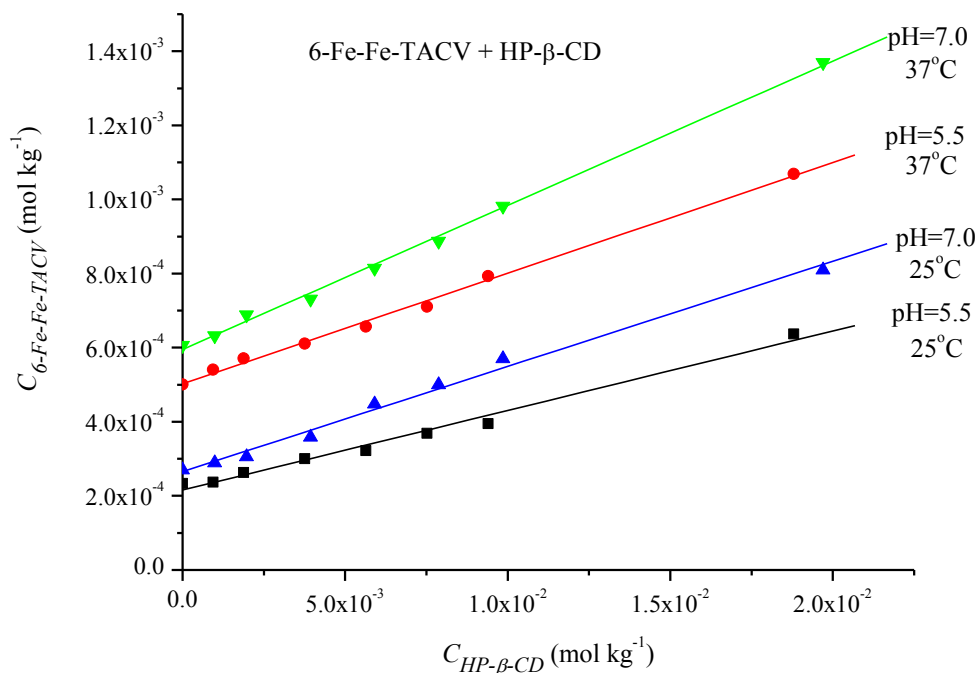
Rys. 2.4. Zależność rozpuszczalności 2-Br-6-Me-TACV (6) w buforowanych roztworach HP-β-CD o pH = 5.5 oraz pH = 7.0 od stężenia cyklodekstryny w temperaturach 25°C i 37°C.



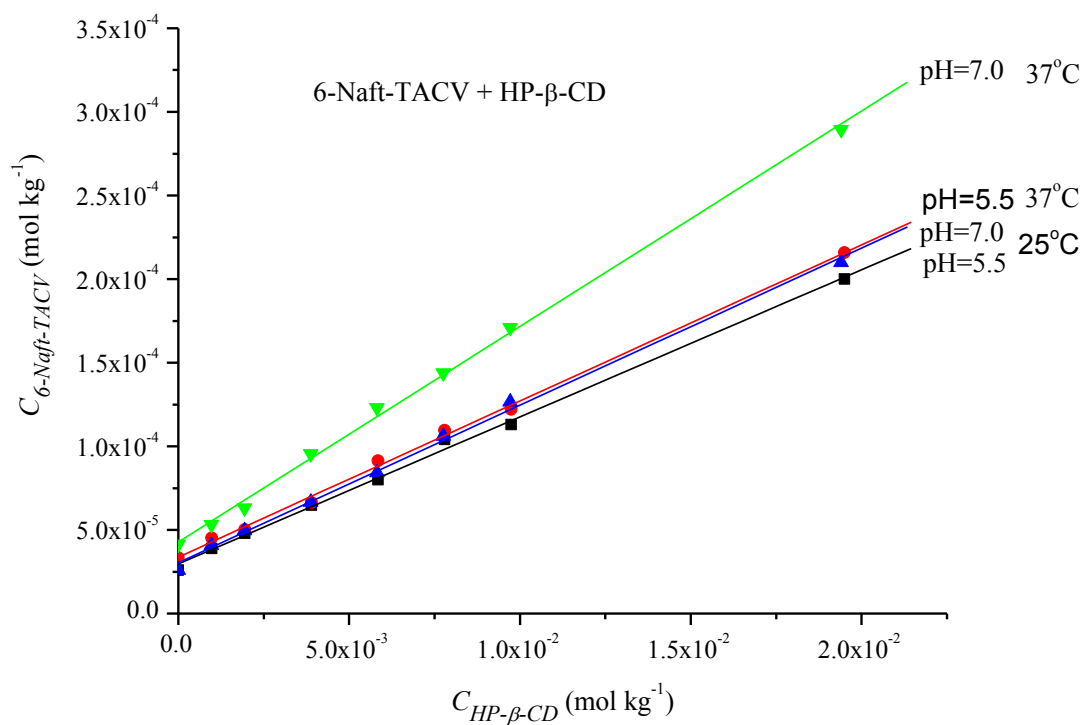
Rys. 2.5. Zależność rozpuszczalności **6-t-But-TACV** (7) w buforowanych roztworach HP-β-CD o pH = 5.5 oraz pH = 7.0 od stężenia cyklodekstryny w temperaturach 25°C i 37°C.



Rys. 2.6. Zależność rozpuszczalności **6-Fe-TACV** (8) w buforowanych roztworach HP-β-CD o pH = 5.5 i pH = 7.0 od stężenia cyklodekstryny w temperaturach 25°C i 37°C.



Rys. 2.7. Zależność rozpuszczalności **6-Fe-Fe-TACV (9)** w buforowanych roztworach HP-β-CD o pH = 5.5 i pH = 7.0 od stężenia cyklodekstryny w temperaturach 25°C i 37°C.



Rys. 2.8. Zależność rozpuszczalności **6-Naft-TACV** w buforowanych roztworach HP-β-CD o pH = 5.5 i pH = 7.0 od stężenia cyklodekstryny w temperaturach 25°C i 37°C.

Rysunki 2.3-2.8 pokazują wzrost rozpuszczalności badanej substancji wraz ze wzrostem stężenia cyklodekstryny, co świadczy o inkluzji części hydrofobowej cząsteczek pochodnych acyklowiru w luce cyklodekstryny.

Proste otrzymane na podstawie danych zamieszczonych w tabeli 2.4 można opisać równaniem:

$$C_s = a + bC_{HP-\beta-CD} \quad (2.1)$$

Wartości zawartych w równaniu (2.1) współczynników a i b wyznaczonych na podstawie danych zawartych w tabeli 2.4, przedstawia tabela 2.5.

Tabela 2.5. Współczynniki a i b równania (2.1) wyznaczone na podstawie badań rozpuszczalności wybranych tricyklicznych pochodnych acyklowiru w buforowanych roztworach HP- β -CD.

Substancja	T (°C)	pH = 5.5		pH = 7.0	
		a	b	a	b
TACV	25°C	2.64 x 10 ⁻³	1.98 x 10 ⁻²	2.48 x 10 ⁻³	2.05 x 10 ⁻²
	37°C	5.15 x 10 ⁻³	2.72 x 10 ⁻²	4.79 x 10 ⁻³	2.56 x 10 ⁻²
2-Br-6-Me-TACV	25°C	1.18 x 10 ⁻³	2.66 x 10 ⁻²	1.03 x 10 ⁻³	2.57 x 10 ⁻²
	37°C	2.35 x 10 ⁻³	5.94 x 10 ⁻²	2.01 x 10 ⁻³	3.23 x 10 ⁻²
6-t-But-TACV	25°C	-	-	-	-
	37°C	-	-	-	-
6-Fe-TACV	25°C	1.86 x 10 ⁻⁴	2.22 x 10 ⁻²	2.50 x 10 ⁻⁴	2.60 x 10 ⁻²
	37°C	3.27 x 10 ⁻⁴	3.57 x 10 ⁻²	3.36 x 10 ⁻⁴	3.60 x 10 ⁻²
6-Fe-Fe-TACV	25°C	2.18 x 10 ⁻⁴	2.12 x 10 ⁻²	2.65 x 10 ⁻⁴	2.84 x 10 ⁻²
	37°C	5.03 x 10 ⁻⁴	2.98 x 10 ⁻²	5,95 x 10 ⁻⁴	3.89 x 10 ⁻²
6-Naft-TACV	25°C	2.99 x 10 ⁻⁵	0.88 x 10 ⁻²	3.05 x 10 ⁻⁵	0.94 x 10 ⁻²
	37°C	3.37 x 10 ⁻⁵	0.93 x 10 ⁻²	4.29 x 10 ⁻⁵	1.29 x 10 ⁻²

Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono wzrost rozpuszczalności badanych związków w roztworze HP- β -CD o stężeniu 2 x 10⁻² (mol kg⁻¹) w stosunku do rozpuszczalności w buforze C_s/C_0 oraz stałe trwałości K_s powstających kompleksów inkluzyjnych. Stałe trwałości obliczano na podstawie metody Higuchi - Connors [57, 116, 117] według wzoru:

$$K_s = \frac{b}{C_0(1-b)} \quad (2.2)$$

gdzie:

b - nachylenie prostej opisującej zależność stężenia danego związku w funkcji stężenia cyklodekstryny,

C_0 - rozpuszczalność danego związku w roztworze, który nie zawiera cyklodekstryny

Wartości stałych trwałości K_s kompleksów z HP- β -CD związków przedstawionych w tabeli 2.4 oraz wzrost rozpuszczalności C_s/C_0 przedstawia tabela 2.6.

Tabela 2.6. Wartości wzrostu rozpuszczalności C_s/C_0 oraz stałych wartości K_s otrzymane na podstawie pomiarów rozpuszczalności badanych substancji w buforowanych roztworach HP- β -CD o pH = 5.5 i pH = 7.0 w temperaturze 25°C i 37°C.

Substancja	pH = 5.5				pH = 7			
	K_s (dm ³ mol ⁻¹)		C_s/C_0		K_s (dm ³ mol ⁻¹)		C_s/C_0	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
TACV	8.0	6.0	1.11	1.1	8.0	6.0	1.1	1.1
2-Br-6-Me-TACV	27	26	1.4	1.5	26	17	1.5	1.3
6-t-But-TACV	-	-	1.5	1.6	-	-	1.2	1.3
6-Fe-TACV	122	113	3.3	3.0	107	105	3.1	3.0
6-Fe-Fe-TACV	100	61	2.8	2.1	110	68	3.0	2.3
6-2-Naft- TACV	297	279	7.7	6.4	311	305	8.1	6.9

Otrzymane wyniki wskazują, że większy wzrost rozpuszczalności oraz większe wartości stałych trwałości otrzymano dla pochodnych posiadających podstawniki aromatyczne w pozycji para. Takie cząsteczki mogą być inkludowane do wnętrza hydrofobowej luki cyklodekstryny. Stałe trwałości rzędu 100 do 300 sugerują powstawanie niezbyt silnych kompleksów jednak w przypadku potencjalnych leków jest to korzystne, gdyż mogą one być stosunkowo łatwo uwalniane w organizmie pacjenta.

Wybrana do bardziej szczegółowych badań tricykliczna pochodna acyklowiru **6-Fe-O-Me-TACV (11)** ma szczególnie niską rozpuszczalność w wodzie i roztworach buforowych rzędu 10⁻⁵ mola kg⁻¹, przy jednoczesnej dobrej aktywności antywirusowej w stosunku do szerokiego spektrum

wirusów [36]. Z tego względu bardzo ważne jest znalezienie metody zwiększającej jej rozpuszczalność w roztworach wodnych, a przez to absorpcję tego potencjalnego leku przez organizmy żywe.

Dla **6-Fe-O-Me-TACV** wykonano szereg badań wstępnych na podstawie, których stwierdzono wzrost rozpuszczalności tej substancji w roztworach cyklodekstryn. Najlepsze rezultaty, podobnie jak w przypadku wcześniej opisanych tricyklicznych pochodnych acyklowiru, uzyskano stosując HP- β -CD. Badania rozpuszczalności **6-Fe-O-Me-TACV** prowadzono w sposób opisany powyżej w zakresie temperatur od 25°C do 45°C, co umożliwiło wyznaczenie zależności stałych trwałości kompleksów **6-Fe-OMe-TACV** z HP- β -CD od temperatury i parametrów termodynamicznych procesu kompleksowania na podstawie zależności van't Hoffa.

Rozpuszczalności **6-Fe-O-Me-TACV** wyznaczano w roztworach buforowych hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP- β -CD) o pH = 5.5 i pH = 7.0. Początkowo badania były prowadzone w temperaturach 25°C i 37°C. Roztwory nasycone ze względu na **6-Fe-O-Me-TaCV** dla wybranych stężeń HPBCD z zakresu od 10^{-3} do 2×10^{-2} (mol kg⁻¹) uzyskano podczas kilkudniowego wytrząsania stałego **6-Fe-O-Me-TACV** w danym roztworze HP- β -CD. Wykreślono zależności stężenia badanej substancji w zależności od stężenia cyklodekstryny w roztworze. W badanym zakresie stężeń cyklodekstryny, zależności te były prostoliniowe. Na podstawie nachylenia otrzymanych prostych oraz wartości rozpuszczalności badanej substancji w roztworze, który nie zawierał cyklodekstryny zostały wyznaczone stałe trwałości powstających w roztworze kompleksów metodą Higuchi-Connors [32,42,43] przy założeniu, że wzrost rozpuszczalności związany jest z tworzeniem się kompleksów inkluzyjnych pomiędzy badanym związkiem i cyklodekstryną, a rozpuszczalność kompleksu jest wyższa niż wyjściowego związku. Dla kompleksów o stechiometrii 1:1 stała trwałości może być wyznaczona na podstawie podanego wcześniej równania 2.2.

2.3.2.2 Wyznaczanie parametrów termodynamicznych procesu kompleksowania dla kompleksów wybranej pochodnej acyklowiru 6-Fe-O-Me-TACV z HP- β -CD

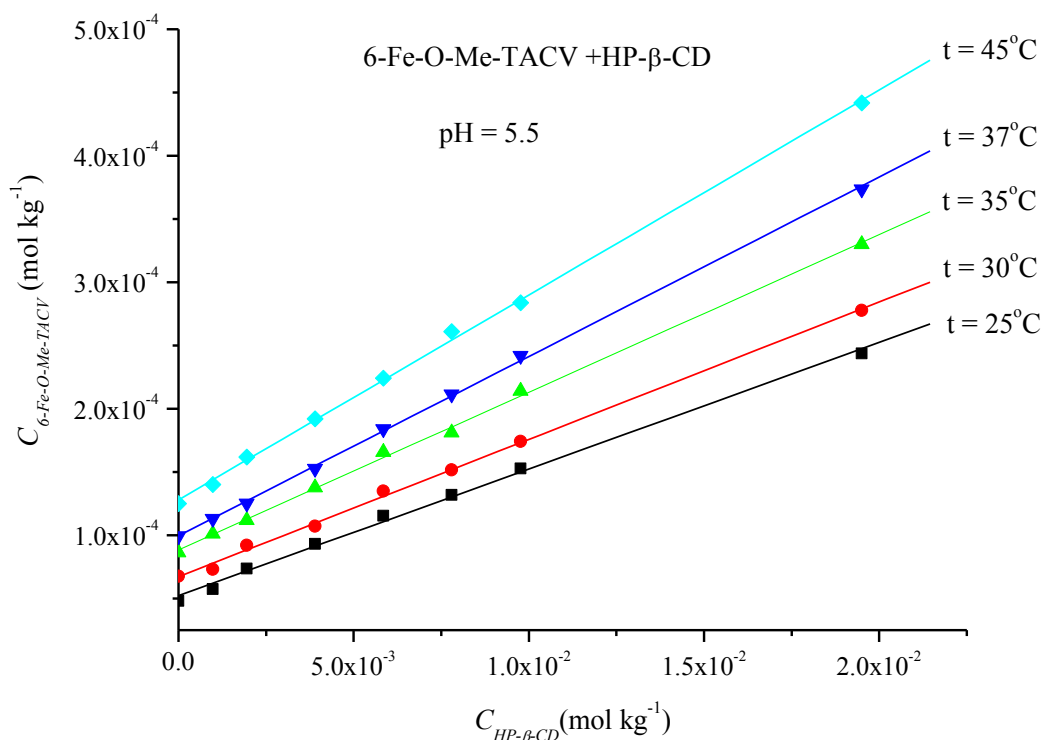
W celu wyznaczenia wielkości termodynamicznych procesu tworzenia się kompleksów inkluzyjnych ΔH i ΔS , przeprowadzono dalsze badania w szerszym zakresie temperatur: od 25°C do 45°C. Dla każdej z badanych temperatur wyznaczono stałą trwałości a następnie na podstawie równań Gibbsa i van't Hoffa:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.3)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_s \quad (2.4)$$

$$\ln K_s = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2.5)$$

wyznaczono wartości ΔH i ΔS dla procesu kompleksowania **6-Fe-O-Me-TACV** przez HP- β -CD. Na rysunku 2.9 przedstawiono zależności stężenia **6-Fe-O-Me-TACV** w buforowanych roztworach HP- β -CD (bufor fosforanowy, pH = 5.5) od stężenia cyklodekstryny i temperatury.



Rys. 2.9. Wykres zależności stężenia **6-Fe-O-Me-TACV** (11) od stężenia HP- β -CD w roztworach buforowych o pH = 5.5 w różnych temperaturach z zakresu 25°C do 45°C.

Wartości liczbowe, na podstawie których sporządzono wykres i parametry prostych a i b (równanie 2.1) przedstawiają tabele 2.7 i 2.8.

Tabela 2.7. Rozpuszczalność **6-Fe-O-Me-TACV (11)** w buforowanych (bufor fosforanowy pH = 5.5) roztworach hydroksylpropylo- β -cyklodekstryny o różnym stężeniu i dla różnych temperatur.

l.p.	$C_{HP-\beta-CH}$ (mol kg ⁻¹)	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ (mol kg ⁻¹)				
		25°C	30°C	35°C	37°C	45°C
1	0	4.81 x 10 ⁻⁵	6.75 x 10 ⁻⁵	8.63 x 10 ⁻⁵	9.94 x 10 ⁻⁵	1.25 x 10 ⁻⁴
2	9.77 x 10 ⁻⁴	5.75 x 10 ⁻⁵	7.30 x 10 ⁻⁵	1.01 x 10 ⁻⁴	1.13 x 10 ⁻⁴	1.40 x 10 ⁻⁴
3	1.95 x 10 ⁻³	7.35 x 10 ⁻⁵	9.21 x 10 ⁻⁵	1.12 x 10 ⁻⁴	1.25 x 10 ⁻⁴	1.62 x 10 ⁻⁴
4	3.90 x 10 ⁻³	9.32 x 10 ⁻⁵	1.07 x 10 ⁻⁴	1.38 x 10 ⁻⁴	1.53 x 10 ⁻⁴	1.92 x 10 ⁻⁴
5	5.85 x 10 ⁻³	1.15 x 10 ⁻⁴	1.35 x 10 ⁻⁴	1.66 x 10 ⁻⁴	1.84 x 10 ⁻⁴	2.24 x 10 ⁻⁴
6	7.80 x 10 ⁻³	1.32 x 10 ⁻⁴	1.52 x 10 ⁻⁴	1.81 x 10 ⁻⁴	2.12 x 10 ⁻⁴	2.61 x 10 ⁻⁴
7	9.77 x 10 ⁻³	1.53 x 10 ⁻⁴	1.74 x 10 ⁻⁴	2.14 x 10 ⁻⁴	2.42 x 10 ⁻⁴	2.84 x 10 ⁻⁴
8	1.95 x 10 ⁻²	2.44 x 10 ⁻⁴	2.78 x 10 ⁻⁴	3.30 x 10 ⁻⁴	3.74 x 10 ⁻⁴	4.42 x 10 ⁻⁴

Tabela 2.8. Parametry a oraz b równania prostych opisujących zależność stężenia badanego związku $C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ (mol kg⁻¹) od stężenia HP- β -CD w różnych temperaturach 25°C – 45°C.

Temperatura (°C)	Parametr	
	a	b
25	5.23 x 10 ⁻⁵	1.00 x 10 ⁻²
30	6.72 x 10 ⁻⁵	1.09 x 10 ⁻²
35	8.49 x 10 ⁻⁵	1.25 x 10 ⁻²
37	9.95 x 10 ⁻⁵	1.41 x 10 ⁻²
45	1.28 x 10 ⁻⁴	1.62 x 10 ⁻²

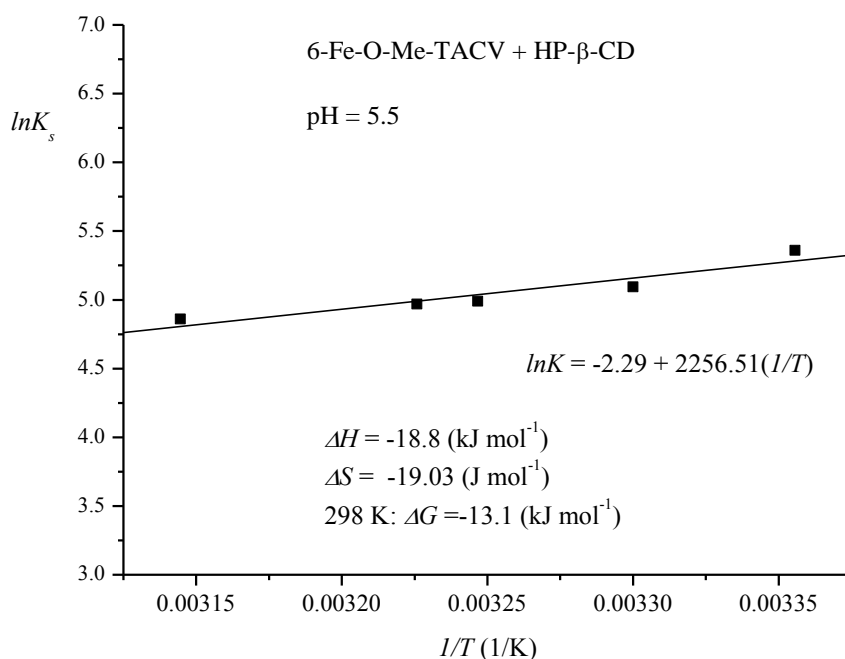
Parametry prostych otrzymane na podstawie badań rozpuszczalności zostały wykorzystane do obliczenia stałych trwałości kompleksów **6-Fe-O-Me-TACV (11)** z HP- β -CD.

Tabela 2.9 przedstawia wartości stałych trwałości K_s oraz wzrost rozpuszczalności badanej substancji zaobserwowany podczas badań rozpuszczalności w roztworach cyklodekstryny o stężeniu 2x10⁻² (mol kg⁻¹) w różnych temperaturach.

Tabela 2.9. Stałe trwałości K_s kompleksów **6-Fe-O-Me-TACV (11)** z HP- β -CD w temperaturach 25°C – 45°C wyznaczone na podstawie pomiarów wykonanych w buforze fosforanowym o pH = 5.5 oraz wzrost rozpuszczalności C_s/C_o obliczone na podstawie pomiarów rozpuszczalności. (C_s - stężenie badanego związku w roztworze HP- β -CD o stężeniu 2×10^{-2} (mol kg⁻¹), a C_o – stężenie tego związku w roztworze buforu).

Temperatura (°C)	pH = 5.5	
	K_s (dm ³ mol ⁻¹)	C_s/C_o
25	213	5.07
30	163	4.19
35	147	3.82
37	144	3.76
45	129	3.54

Na podstawie równania 2.5 oraz wykresu zależności $\ln K_s$ od $(1/T)$ przedstawionego na rysunku 2.10 wyznaczono parametry termodynamiczne procesu tworzenia się kompleksu pomiędzy **6-Fe-O-Me-TACV** a HP- β -CD. Mają one następujące wartości: $\Delta H = -18.75$ kJ mol⁻¹, $\Delta S = -19.03$ J mol⁻¹ oraz $\Delta G = -13.1$ kJ mol⁻¹.



Rys. 2.10. Zależność $\ln K_s$ od $(1/T)$ dla kompleksów **6-Fe-O-Me-TACV (11)** z HP-β-CD.

W tabeli 2.10 podane zostały wartości ΔG obliczone dla **6-Fe-O-Me-TACV (11)** na podstawie zależności (2.3) i (2.4) w oparciu o badania rozpuszczalności prowadzone w różnych temperaturach w buforze fosforanowym o pH = 5.5.

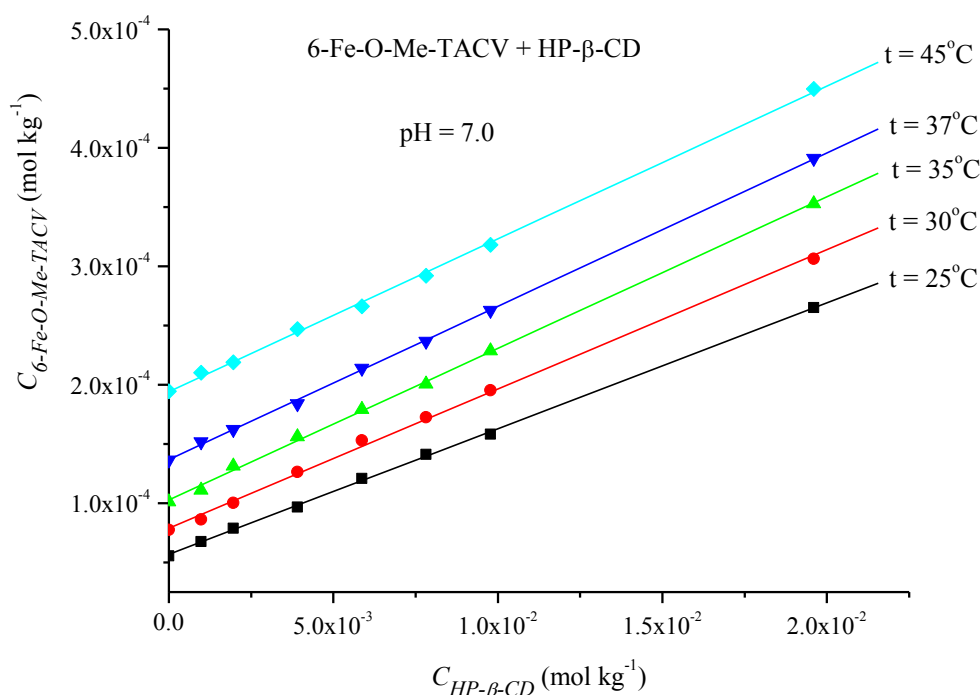
Tabela 2.10. Wartości ΔG obliczone dla **6-Fe-O-Me-TACV (11)** na podstawie badań rozpuszczalności prowadzonych w różnych temperaturach w buforze fosforanowym o pH = 5.5.

Temperatura (°C)	Stała Trwałości K_s (dm ³ mol ⁻¹)	$\Delta G = -RT \ln K$ (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta S$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ (kJ mol ⁻¹)
25	213	-13.28	-18.75	-5.67	-13.08
30	163	-12.83	-18.75	-5.77	-12.98
35	147	-12.77	-18.75	-5.86	-12.89
37	144	-12.80	-18.75	-5.90	-12.85
45	129	-12.84	-18.75	-6.05	-12.70

Powyższe porównanie wartości ΔG zostało wykonane w celu sprawdzenia poprawności aproksymacji graficznej zależności $\ln K = f(1/T)$ i wyznaczania parametrów termodynamicznych na

podstawie tej zależności. Wartości ΔG obliczone na podstawie zależności $\Delta G = -RT \ln K$ oraz $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ różnią się w niewielkim stopniu, co sugeruje prawidłowość wyznaczenia parametrów termodynamicznych procesu tworzenia się kompleksów inkluzyjnych pomiędzy **6-Fe-O-Me-TACV** i HP- β -CD. Podobne wnioski można wyciągnąć na podstawie takich samych zależności dla pomiarów prowadzonych w pH = 7.0, które przedstawia tabela nr 2.14 w dalszej części pracy.

Badania rozpuszczalności **6-Fe-O-Me-TACV** w różnych temperaturach wykonano również w roztworze buforowym o pH = 7.0. Przy opracowaniu wyników doświadczalnych wykorzystano te same zależności i procedury, które zastosowano dla pomiarów wykonanych w pH = 5.5. Uzyskane doświadczalnie wartości stężeń **6-Fe-O-Me-TACV** w roztworach buforowych (bufor fosforanowy pH 7.0) HP- β -CD o różnym stężeniu i w różnych temperaturach przedstawia rysunek 2.11.



Rys. 2.11. Wykres zależności stężenia **6-Fe-O-Me-TACV** (11) od stężenia HP- β -CD w roztworach buforowych o pH = 7.0, w różnych temperaturach.

Wartości liczbowe, na podstawie, których sporządzono wykres 2.11 - przedstawia tabela 2.11, a parametry a i b prostych przedstawionych na rysunku 2.11- tabela 2.12.

Tabela 2.11. Rozpuszczalność **6-Fe-O-Me - TACV (11)** w buforowanych (bufor fosforanowy pH = 7.0) roztworach hydroksylpropylo- β -cyklodekstryny o różnym stężeniu i dla różnych temperatur.

l.p.	$C_{HP-\beta-CD}$ (mol kg ⁻¹)	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ (mol kg ⁻¹)				
		25 (°C)	30 (°C)	35 (°C)	37 (°C)	45 (°C)
1	0	5.55×10^{-5}	7.74×10^{-5}	1.01×10^{-4}	1.36×10^{-4}	1.95×10^{-4}
2	9.78×10^{-4}	6.77×10^{-5}	8.63×10^{-5}	1.11×10^{-4}	1.52×10^{-4}	2.10×10^{-4}
3	1.96×10^{-3}	7.90×10^{-5}	1.00×10^{-4}	1.31×10^{-4}	1.62×10^{-4}	2.19×10^{-4}
4	3.91×10^{-3}	9.67×10^{-5}	1.26×10^{-4}	1.56×10^{-4}	1.84×10^{-4}	2.47×10^{-4}
5	5.87×10^{-3}	1.21×10^{-4}	1.53×10^{-4}	1.79×10^{-4}	2.14×10^{-4}	2.66×10^{-4}
6	7.82×10^{-3}	1.41×10^{-4}	1.73×10^{-4}	2.01×10^{-4}	2.37×10^{-4}	2.92×10^{-4}
7	9.78×10^{-3}	1.58×10^{-4}	1.95×10^{-4}	2.29×10^{-4}	2.63×10^{-4}	3.18×10^{-4}
8	1.96×10^{-2}	2.65×10^{-4}	3.06×10^{-4}	3.53×10^{-4}	3.91×10^{-4}	4.50×10^{-4}

Tabela 2.12. Parametry a oraz b równania prostych opisujących zależność stężenia badanego związku $C_{6-Fe-O-Me-TACV}$, (mol kg⁻¹) od stężenia HP- β -CD w różnych temperaturach z zakresu 25°C – 45°C i przy pH roztworu równym 7.0.

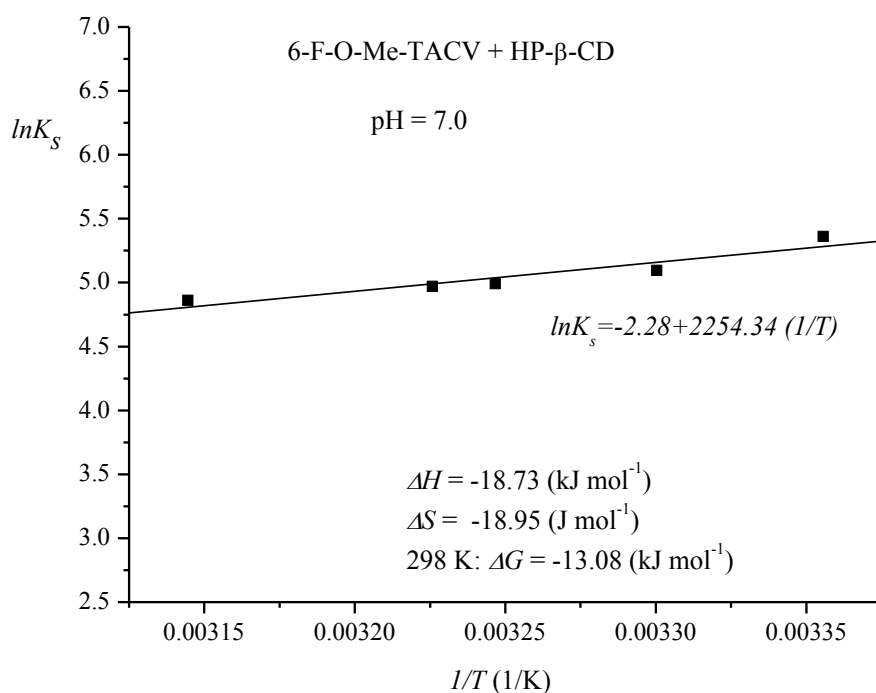
Temperatura (°C)	Parametr	
	a	b
25	5.68×10^{-5}	1.06×10^{-2}
30	7.89×10^{-5}	1.18×10^{-2}
35	1.03×10^{-4}	1.28×10^{-2}
37	1.37×10^{-4}	1.30×10^{-2}
45	1.94×10^{-4}	1.30×10^{-2}

Stałe równowagi K_s (stałe trwałości kompleksów inkluzyjnych) otrzymane na podstawie zależności (2.5) przedstawia tabela 2.13.

Tabela 2.13. Stałe trwałości K_s kompleksów **6-Fe-O-Me-TACV** z HP- β -CD w różnych temperaturach z zakresu 25°C – 45°C obliczone na podstawie pomiarów rozpuszczalności w buforze fosforanowym pH = 7.0 oraz C_s/C_o obliczone na podstawie pomiarów rozpuszczalności. (C_s - stężenie badanego związku w roztworze HP- β -CD o stężeniu 2×10^{-2} (mol kg⁻¹) a C_o – stężenie tego związku w roztworze buforu).

Temperatura (°C)	Stała trwałości K_s (dm ³ mol ⁻¹)	Wzrost rozpuszczalności C_s/C_o
25	189	4.77
30	151	3.95
35	126	3.50
37	96	2.88
45	67	2.31

Korzystając z wartości stałych trwałości w różnych temperaturach, obliczonych na podstawie danych doświadczalnych, wyznaczono zależność liniową $\ln K = f(1/T)$. a następnie korzystając z otrzymanych wartości parametrów prostej a i b wyznaczono wartości ΔH i ΔS dla procesu tworzenia się kompleksów inkluzyjnych pomiędzy **6-Fe-O-Me-TACV** i HP- β -CD, które dla danych doświadczalnych przedstawionych powyżej posiadają następujące wartości: $\Delta H = -18.73$ (kJ mol⁻¹), $\Delta S = -18.95$ (J mol⁻¹). Na ich podstawie obliczono $\Delta G = -13.08$ (kJ mol⁻¹). Wykres zależności $\ln K = f(1/T)$ przedstawia rysunek 2.12.



Rys. 2.12. Wykres zależności $\ln(K_s)$ od $(1/T)$ dla procesu tworzenia się kompleksów inkluzyjnych pomiędzy **6-Fe-O-Me-TACV** i HP-β-CD otrzymany na podstawie badania rozpuszczalności w różnych temperaturach z zakresu 25°C – 45°C.

Na podstawie wyznaczonych wartości wielkości termodynamicznych obliczono wartości ΔG procesu tworzenia się kompleksów pomiędzy **6-Fe-O-Me-TACV** i HP-β-CD w różnych temperaturach i porównano je z tymi otrzymanymi z równania (2.4). Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 2.14.

Tabela 2.14. Wartości ΔG obliczone na podstawie zależności (2.3) i (2.4) na podstawie badań rozpuszczalności prowadzonych w różnych temperaturach w buforze fosforanowym o pH = 7.0

Temperatura (°C)	Stała Trwałości K_s (dm ³ mol ⁻¹)	$\Delta G = -RT \ln K$ (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta S$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ (kJ mol ⁻¹)
25	189	-12,98	-18.73	-5.65	-13.08
30	151	-12.63	-18.73	-5.74	-13.00
35	126	-12.39	-18.73	-5.84	-12.89
37	96	-11.76	-18.73	-5.87	-12.86
45	67	-11.11	-18.73	-6.03	-12.7

Porównując dane zawarte w tabelach 2.10 i 2.14 można zauważyć, że wartości parametrów termodynamicznych wyznaczonych dla pH = 5.5 oraz pH = 7.0 niewiele się różnią, wynika to z faktu, że w roztworach o pH równym 5.5 i pH równym 7.0 stopień protonacji cząsteczki **6-Fe-O-Me-TACV** jest zbliżony. W obydwu przypadkach ΔH , mają wartości ujemne podobnie jak ΔS oraz ΔG . Proces jest sterowany entalpowo, natomiast entropia związana ze zmianami konformacyjnymi przeciwdziała kompleksowaniu.

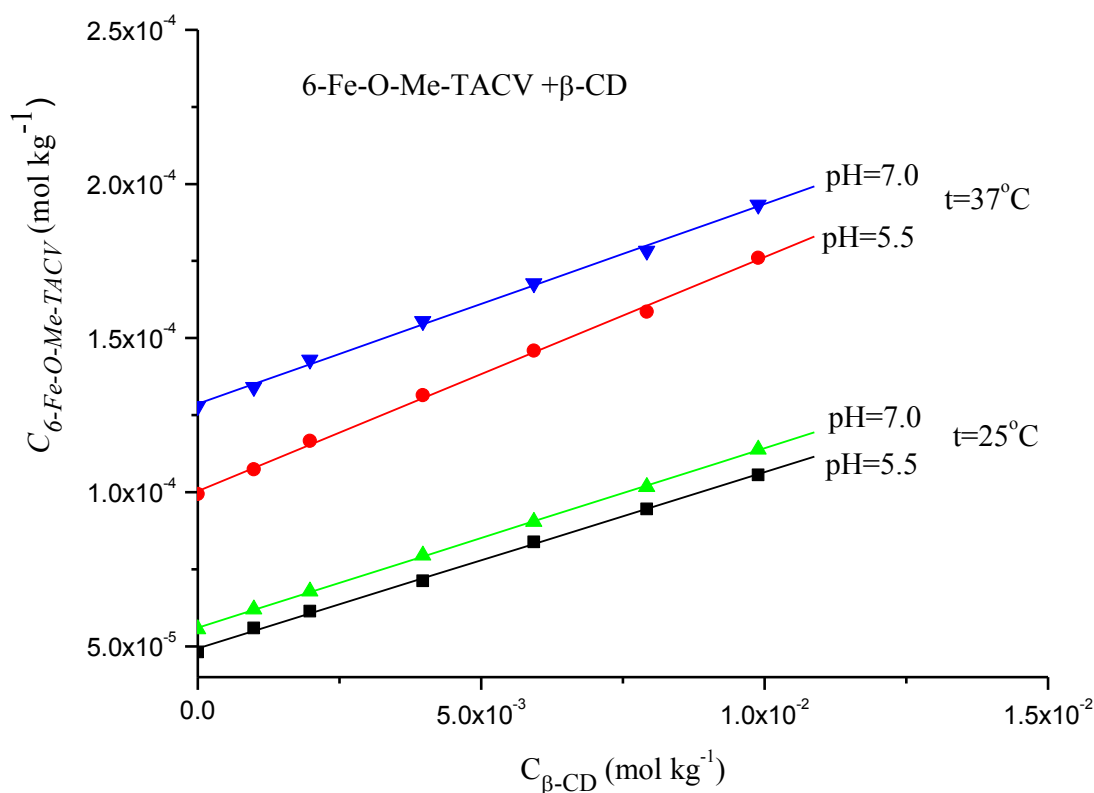
2.3.2.3 Wyznaczanie rozpuszczalności 6-Fe-O-Me-TACV w roztworach różnych cyklodekstryn (β -CD, Me- β -CD, HP- γ -CD) oraz wyznaczanie stałych trwałości kompleksów z tymi cyklodekstrynami.

Przeprowadzono również badania rozpuszczalności **6-Fe-O-Me-TACV** w roztworach innych cyklodekstryn o różnych rozmiarach luki oraz rodzajach podstawników. Stężenie **6-Fe-O-Me-TACV** było stałe i wynosiło 2×10^{-2} (mol kg⁻¹). Badane były następujące cyklodekstryny: α -CD, hydroksypropylo- α -CD (HP- α -CD), β -CD, hydroksypropylo- β -CD (HP- β -CD), γ -CD, hydroksypropylo- γ -CD (HP- γ -CD) oraz Metylo- β -CD (M- β -CD) i trimetylo- β -CD (TM β -CD). Cyklodekstryny rozpuszczone były w buforze fosforanowym o pH 5.5 oraz 7.0. Badania prowadzono w 25°C. Otrzymane wyniki pokazały znaczący wzrost rozpuszczalności **6-Fe-O-Me-TACV** w roztworach cyklodekstryn o większych rozmiarach luki tzn. β i γ . Jednak największy wzrost otrzymano dla HP- β -CD.

Do dalszych badań wybrano więc następujące cyklodekstryny: β -CD, M- β -CD oraz HP- γ -CD. Wyznaczono rozpuszczalność **6-Fe-O-Me-TACV** w roztworach wybranych cyklodekstryn o różnych stężeniach z zakresu 10^{-3} do 2×10^{-2} (mol kg^{-1}) w temperaturach 25°C i 37°C i przy pH badanych roztworów 5.5 oraz 7.0. Na podstawie otrzymanych wyników określono stałe trwałości powstających kompleksów inkluzyjnych. Stężenia **6-Fe-O-Me-TACV** oznaczano spektrofotometrycznie. Otrzymane wyniki przedstawione są na rysunkach 2.13 – 2.15 i w tabelach 2.15 – 2.23.

β -CD

Na podstawie wstępnie przeprowadzonych pomiarów stwierdzono, że w roztworach β -cyklodekstryny następuje wzrost stężenia badanego związku w stosunku do roztworu, który nie zawiera cyklodekstryny. Dane doświadczalne otrzymane podczas pomiarów rozpuszczalności przedstawione zostały na rysunku 2.13 i w tabeli 2.15.



Rys. 2.13. Wykres zależności stężenia **6-Fe-O-Me-TACV** od stężenia β -CD w roztworach buforowych o pH = 5.5 i pH = 7.0 w temperaturach 25°C i 37°C .

Tabela 2.15. Rozpuszczalność **6-Fe-O-Me-TACV** w buforowanych (bufor fosforanowy pH = 5.5 i pH = 7.0) roztworach β -cyklodekstryny o różnym stężeniu w 25°C i 37°C.

l.p.	$C_{\beta-CD}$ (mol kg ⁻¹)	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ (mol kg ⁻¹)			
		pH = 5.5		pH = 7.0	
		25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
1	0	4.82 x 10 ⁻⁵	9.94 x 10 ⁻⁵	5.55 x 10 ⁻⁵	1.28 x 10 ⁻⁴
2	9.89 x 10 ⁻⁴	5.59 x 10 ⁻⁵	1.07 x 10 ⁻⁴	6.20 x 10 ⁻⁵	1.34 x 10 ⁻⁴
3	1.98 x 10 ⁻³	6.13 x 10 ⁻⁵	1.17 x 10 ⁻⁴	6.78 x 10 ⁻⁵	1.43 x 10 ⁻⁴
4	3.97 x 10 ⁻³	7.12 x 10 ⁻⁵	1.31 x 10 ⁻⁴	7.94 x 10 ⁻⁵	1.55 x 10 ⁻⁴
5	5.93 x 10 ⁻³	8.38 x 10 ⁻⁵	1.46 x 10 ⁻⁴	9.04 x 10 ⁻⁵	1.68 x 10 ⁻⁴
6	7.92 x 10 ⁻³	9.46 x 10 ⁻⁵	1.59 x 10 ⁻⁴	1.02 x 10 ⁻⁴	1.78 x 10 ⁻⁴
7	9.89 x 10 ⁻³	1.06 x 10 ⁻⁴	1.76 x 10 ⁻⁴	1.14 x 10 ⁻⁴	1.93 x 10 ⁻⁴

Parametry prostych a i b przedstawia tabela 2.16, a wartości stałych trwałości (K_s) i wzrost rozpuszczalności w roztworach cyklodekstryny w stosunku do roztworu, który nie zawierał cyklodekstryny (C_s/C_o) przedstawia tabela 2.17.

Tabela 2.16. Parametry a oraz b równania prostych opisujących zależność stężenia badanego związku $C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ (mol kg⁻¹) od stężenia β -CD w temperaturach 25°C i 37°C i przy pH = 5.5 i pH = 7.0.

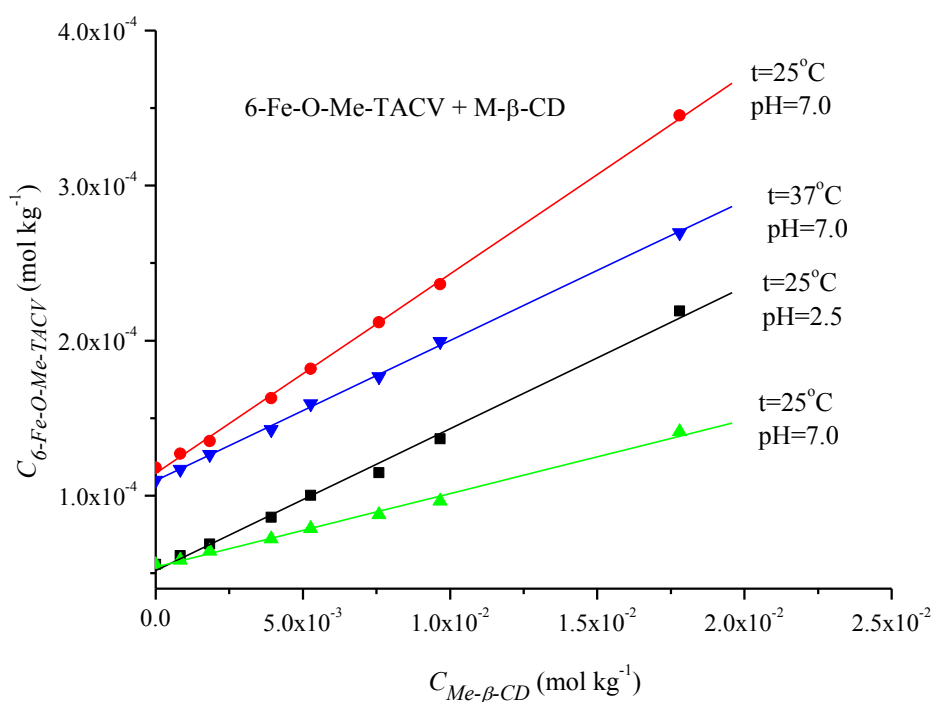
Temperatura (°C)	Parametr			
	pH = 5.5		pH = 7.0	
	a	b	a	b
25	4.93 x 10 ⁻⁵	5.72 x 10 ⁻³	5.60 x 10 ⁻⁵	5.83 x 10 ⁻³
37	1.00 x 10 ⁻⁴	7.59 x 10 ⁻³	1.29 x 10 ⁻⁴	6.48 x 10 ⁻³

Tabela 2.17. Stałe trwałości K_s kompleksów **6-Fe-O-Me-TACV** z β -CD obliczone na podstawie pomiarów rozpuszczalności w buforze fosforanowym o pH=5.5 i pH = 7.0 w temperaturach 25°C – 37°C oraz wzrost rozpuszczalności (C_s/C_0) badanego związku w roztworze cyklodekstryny o stężeniu 2×10^{-2} (mol kg⁻¹) w stosunku do roztworu buforowego, który zawierał cyklodekstryny.

Temperatura (°C)	pH = 5.5		pH = 7.0	
	K_s (dm ³ mol)	C_s/C_0	K_s (dm ³ mol)	C_s/C_0
25	116	2.2	105	2.05
37	76	1.85	51	1.51

M- β -CD

Na podstawie wstępnych badań stwierdzono podwyższenie rozpuszczalności **6-Fe-O-Me-TACV** w roztworach metylo- β -cyklodekstryny w stosunku do roztworu, który nie zawierał cyklodekstryny. Zależność rozpuszczalności badanego związku w roztworach metylo- β -cyklodekstryny od stężenia cyklodekstryny przedstawiono na rysunku 2.14



Rys. 2.14. Wykres zależności stężenia **6-Fe-O-Me-TACV** od stężenia Me- β -CD w roztworach buforowych o pH = 5.5 i pH = 7.0 w temperaturach 25°C i 37°C.

Dane na podstawie których wykreślono proste przedstawione na rysunku 2.14 zawiera tabela 2.18.

Tabela 2.18. Rozpuszczalność **6-Fe-O-Me - TACV** w buforowanych (bufor fosforanowy pH = 5.5 i pH = 7.0) roztworach Me- β -CD o różnym stężeniu w temperaturach 25°C i 37°C.

l.p.	$C_{M-\beta-CD}$ (mol kg ⁻¹)	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ (mol kg ⁻¹)			
		pH = 5.5		pH = 7.0	
		25°C	37°C	25°C	37°C
1	0	5.55 x 10 ⁻⁵	1.18 x 10 ⁻⁴	5.55 x 10 ⁻⁵	1.10 x 10 ⁻⁴
2	8.39 x 10 ⁻⁴	6.12 x 10 ⁻⁵	1.27 x 10 ⁻⁴	5.83 x 10 ⁻⁵	1.17 x 10 ⁻⁴
3	1.84 x 10 ⁻⁴	6.88 x 10 ⁻⁵	1.35 x 10 ⁻⁴	6.41 x 10 ⁻⁵	1.27 x 10 ⁻⁴
4	3.92 x 10 ⁻⁴	8.60 x 10 ⁻⁵	1.63 x 10 ⁻⁴	7.22 x 10 ⁻⁵	1.43 x 10 ⁻⁴
5	5.27 x 10 ⁻⁴	1.00 x 10 ⁻⁴	1.82 x 10 ⁻⁴	7.88 x 10 ⁻⁵	1.59 x 10 ⁻⁴
6	7.58 x 10 ⁻⁴	1.15 x 10 ⁻⁴	2.12 x 10 ⁻⁴	8.76 x 10 ⁻⁵	1.77 x 10 ⁻⁴
7	9.66 x 10 ⁻⁴	1.37 x 10 ⁻⁴	2.36 x 10 ⁻⁴	9.64 x 10 ⁻⁵	1.99 x 10 ⁻⁴
8	1.78 x 10 ⁻³	2.19 x 10 ⁻⁴	3.45 x 10 ⁻⁴	1.41 x 10 ⁻⁴	2.70 x 10 ⁻⁴

Tabela 2.19 zawiera parametry prostych a i b a tabela 2.20 wartości stałych trwałości K_s oraz wzrost rozpuszczalności 6-Fe-O-Me-TACV (C_s/C_0) w roztworach Me- β -CD.

Tabela 2.19. Parametry a i b równania prostych opisujących zależność stężenia badanego związku $C_{6-Fe-O-Me-TACV}$, od stężenia Me- β -CD w temperaturach 25°C i 37°C i przy pH roztworu równym 5.5 i 7.0.

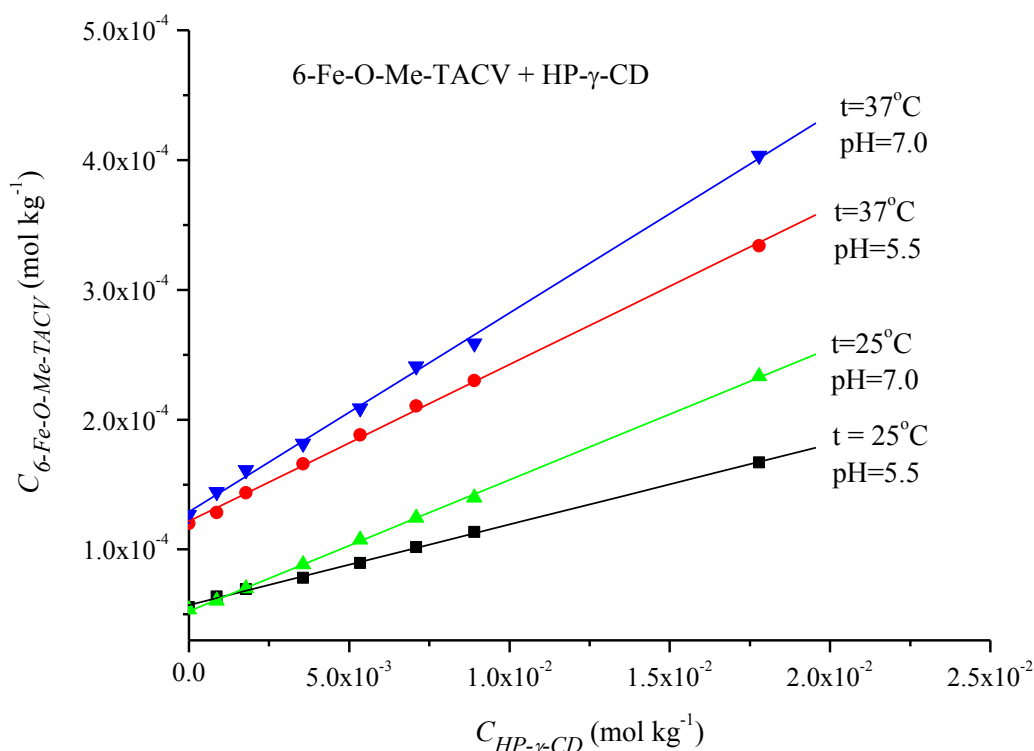
Temperatura (°C)	Parametry równania (2)			
	pH = 5.5		pH = 7.0	
	a	b	a	b
25	5.16×10^{-5}	9.15×10^{-3}	5.39×10^{-5}	4.74×10^{-3}
37	1.14×10^{-4}	1.29×10^{-2}	1.10×10^{-4}	9.03×10^{-3}

Tabela 2.20. Stałe trwałości K_s kompleksów **6-Fe-O-Me-TACV** z Me- β -CD obliczone na podstawie pomiarów rozpuszczalności w buforze fosforanowym o pH = 5.5 i pH = 7.0 w temperaturach 25°C – 37°C oraz wzrost rozpuszczalności (C_s/C_0) badanego związku w roztworze cyklodekstryny o stężeniu 2×10^{-2} (mol kg⁻¹) w stosunku do roztworu buforowego bez cyklodekstryny.

Temperatura (°C)	pH = 5.5		pH = 7.0	
	K_s	C_s/C_0	K_s	C_s/C_0
	(dm ³ mol ⁻¹)		(dm ⁻³ mol ⁻¹)	
25	174	3.90	88	2.54
37	113	2.92	83	2.45

HP- γ -CD

Podczas wstępnych badań stwierdzono zwiększenie rozpuszczalności **6-Fe-O-Me-TACV** również w roztworach HP- γ -CD. Wyniki badań rozpuszczalności badanego związku w buforowanych roztworach HP- γ -CD o różnych stężeniach w 25°C i 37°C przy pH = 5.5 oraz pH = 7.0 przedstawione są na rysunku 2.15 oraz w tabeli 2.21.



Rys. 2.15. Wykres zależności stężenia **6-Fe-O-Me-TACV** od stężenia HP- γ -CD w roztworach buforowych o pH = 5.5 i pH = 7.0 w temperaturach 25°C i 37°C.

Tabela 2.21. Rozpuszczalność **6-Fe-O-Me-TACV** w buforowanych (bufor fosforanowy pH = 5.5 i pH = 7.0) roztworach HP- γ -CD o różnym stężeniu w 25°C i 37°C.

l.p.	$C_{HP-\gamma-CD}$ (mol kg ⁻¹)	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ (mol kg ⁻¹)			
		pH = 5.5		pH = 7.0	
		25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
1	0	5.55×10^{-5}	1.20×10^{-4}	5.37×10^{-5}	1.27×10^{-4}
2	8.73×10^{-4}	6.37×10^{-5}	1.28×10^{-4}	6.05×10^{-5}	1.44×10^{-4}
3	1.78×10^{-3}	6.95×10^{-5}	1.44×10^{-4}	7.00×10^{-5}	1.61×10^{-4}
4	3.56×10^{-3}	7.82×10^{-5}	1.66×10^{-4}	8.84×10^{-5}	1.82×10^{-4}
5	5.34×10^{-3}	8.96×10^{-5}	1.88×10^{-4}	1.08×10^{-4}	2.09×10^{-4}
6	7.09×10^{-3}	1.02×10^{-4}	2.11×10^{-4}	1.24×10^{-4}	2.41×10^{-4}

7	8.90×10^{-3}	1.13×10^{-4}	2.30×10^{-4}	1.40×10^{-4}	2.59×10^{-4}
8	1.78×10^{-2}	1.67×10^{-4}	3.34×10^{-4}	2.33×10^{-4}	4.04×10^{-4}

Tabela 2.22 zawiera parametry prostych a i b natomiast tabela 2.23 wartości stałych trwałości K_s oraz wzrost rozpuszczalności (C_s/C_0) badanego związku w roztworze cyklodekstryny o stężeniu 2×10^{-2} (mol kg⁻¹) w stosunku do roztworu buforowego bez cyklodekstryny w 25°C i 37°C.

Tabela 2.22. Parametry a i b równania prostych opisujących zależność stężenia badanego związku $C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ od stężenia HP- γ -CD w temperaturach 25°C i 37°C i przy pH roztworu równym 5.5 i 7.0.

Temperatura (°C)	Parametr			
	pH = 5.5		pH = 7.0	
	a	b	a	b
25	5.72×10^{-5}	6.20×10^{-3}	5.23×10^{-5}	1.01×10^{-2}
37	1.22×10^{-4}	1.20×10^{-2}	1.29×10^{-4}	1.53×10^{-2}

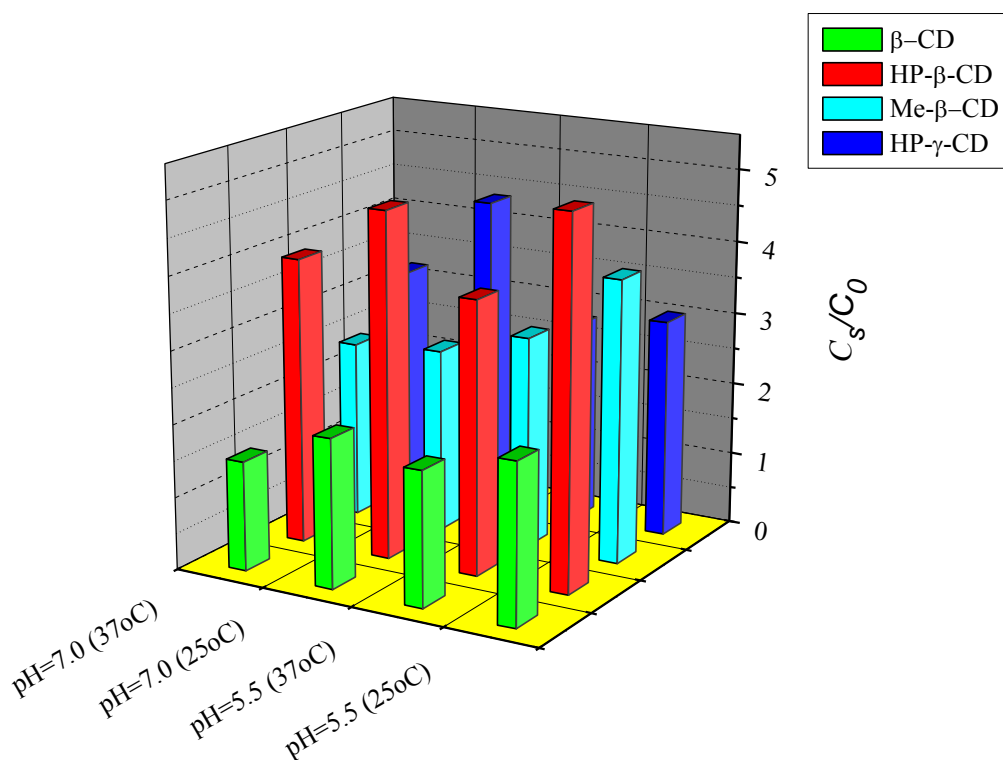
Tabela 2.23. Stałe trwałości K_s kompleksów **6-Fe-O-Me-TACV** z HP- γ -CD obliczone na podstawie pomiarów rozpuszczalności w buforze fosforanowym o pH = 5.5 i pH = 7.0 w temperaturach 25°C – 37°C oraz wzrost rozpuszczalności (C_s/C_0) badanego związku w roztworze cyklodekstryny o stężeniu 2×10^{-2} (mol kg⁻¹) w stosunku do roztworu buforowego bez cyklodekstryny.

Temperatura (°C)	pH = 5.5		pH = 7.0	
	K_s (dm ³ mol ⁻¹)	C_s/C_0	K_s (dm ³ mol ⁻¹)	C_s/C_0
25	109	3.01	196	4.34
37	99	2.78	120	3.18

W celu porównania wzrostu rozpuszczalności **6-Fe-O-Me-TACV** w tabeli 2.24 zebrano wartości wzrostu rozpuszczalności oraz wartości stałych trwałości, świadczących o udziale kompleksowania w podwyższaniu rozpuszczalności. Dane zebrane w tabeli 2.24 zaprezentowane są również na rysunku 2.16.

Tabela 2.24. Zestawienie wartości stałych trwałości kompleksów **6-Fe-O-Me-TACV** z wybranymi cyklodekstrynami oraz wzrostu rozpuszczalności C_s/C_0 pochodnej acyklowiru w buforowanych roztworach tych cyklodekstryn o stężeniu 2×10^{-2} (mol kg^{-1})

Cyklodekstryna	T(°C)	pH = 5.5		pH = 7.0	
		K_s ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$)	C_s/C_0	K_s ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$)	C_s/C_0
β-CD	25	116	2.20	105	2.05
	37	76	1.85	51	1.51
HP- β-CD	25	213	5.07	189	4.77
	37	144	3.76	151	3.95
Me- β-CD	25	174	3.90	88	2.54
	37	113	2.92	83	2.45
HP-γ-CD	25	109	3.01	196	4.38
	37	99	2.78	120	3.18



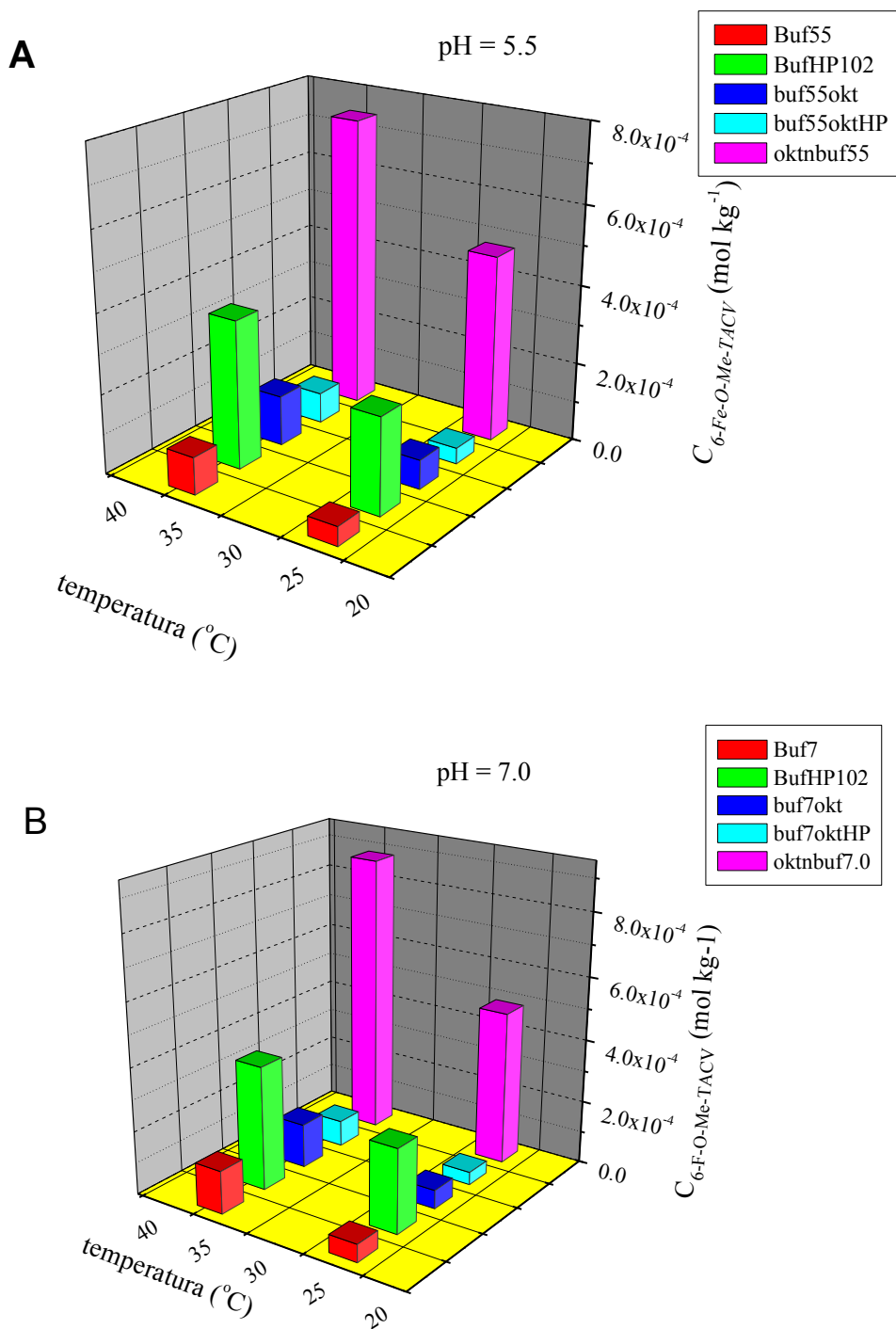
Rys. 2.16. Porównanie wzrostu rozpuszczalności (C_s/C_0) **6-Fe-O-Me-TACV** w roztworach badanych cyklodekstryn o stężeniu 2×10^{-2} (mol kg^{-1}).

Z danych zawartych w tabeli 2.24 oraz na rysunku 2.16 wynika, że najwyższe stałe trwałości oraz wzrost rozpuszczalności osiągnięto stosując HP- β -CD, jednak również inne podstawione β -cyklodekstryny, których przykładem jest Me- β -CD, mogą kompleksować tę pochodną acyklowiru. Są one jednocześnie bardziej efektywne niż niepodstawiona β -CD. Wy tłumaczeniem tego zjawiska może być fakt, że podstawniki wydłużają lukę cyklodekstrynową, czego wynikiem jest bardziej skuteczne kompleksowanie cząsteczki **6-Fe-O-Me-TACV**, która ma płaską liniową budowę. Z powyższych danych wynika również, że cyklodekstryny o większych rozmiarach luki takie, jak γ -cyklodekstryna i jej pochodne, mogą skutecznie kompleksować tę pochodną acyklowiru a przez to podwyższać jej rozpuszczalność w roztworach wodnych.

W celu określenia wpływu 1-oktanolu na rozpuszczalność badanej pochodnej w roztworze cyklodekstryny wykonano badania rozpuszczalności **6-Fe-O-Me-TACV** w buforze o pH = 5.5 i pH = 7.0 nasyconym oktanolem, buforach nasyconym oktanolem jednocześnie zawierającym HP- β -CD oraz w 1-oktanolu nasyconym danym buforem, a następnie te dane porównano z rozpuszczalnością w odpowiednim buforze oraz buforze zawierającym HP- β -CD. Wyniki tych badań zawiera tabela 2.25 oraz rysunek 2.17 (A i B).

Tabela 2.25. Porównanie rozpuszczalności **6-Fe-O-Me-TACV** w buforze fosforanowym o pH = 5.5 i pH = 7.0, buforze fosforanowym zawierającym 2×10^{-2} (mol kg⁻¹) HP-β-CD, buforze nasyconym 1-oktanołem, buforze nasyconym 1-oktanołem zawierającym HP-β-CD oraz 1-oktanolu nasyconym buforem.

Skład roztworu	<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} (mol kg ⁻¹)			
	pH = 5.5		pH = 7.0	
	25°C	37°C	25°C	37°C
Bufor	4.82×10^{-5}	9.94×10^{-5}	5.50×10^{-5}	1.36×10^{-4}
Bufor + HP-β-CD	2.44×10^{-4}	3.74×10^{-4}	2.65×10^{-4}	3.91×10^{-4}
Bufor nas. okt.	7.42×10^{-5}	1.27×10^{-4}	5.87×10^{-5}	1.39×10^{-4}
Bufor nas. okt. + HP-β-CD	4.03×10^{-5}	7.70×10^{-5}	4.03×10^{-5}	8.06×10^{-5}
Oktanol nas. buf.	4.73×10^{-4}	7.41×10^{-4}	4.85×10^{-5}	8.82×10^{-4}



Rys. 2.17. Porównanie rozpuszczalności **6-Fe-O-Me-TACV** w buforze fosforanowym o pH = 5.5 (A) i pH = 7.0 (B) zawierającym 2×10^{-2} (mol kg⁻¹), buforze nasyconym 1-oktanołem, buforze nasyconym 1-oktanołem zawierającym HP-β-CD oraz 1-oktanolu nasyconym buforem.

Tricykliczne pochodne acyklowiru, posiadające podstawniki aromatyczne, są słabo rozpuszczalne w wodzie oraz roztworach wodnych natomiast są dobrze rozpuszczalne w 1-oktanolu. Zastosowanie HP-β-CD powoduje wzrost rozpuszczalności tych pochodnych w roztworach wodnych, jednak po dodaniu 1-oktanolu do wodnego roztworu cyklodekstryny

rozpuszczalność spada. Powodem takiego zjawiska prawdopodobnie jest konkurencyjne wiązanie 1-oktanolu przez cyklodekstrynę [126]. Podobne zależności można zaobserwować wyznaczając rozpuszczalność **6-Fe-O-Me-TACV** w roztworze wodnym HP-β-CD nasyconym 1-oktanołem. Rozpuszczalność **6-Fe-O-Me-TACV** znacząco maleje w stosunku do roztworu cyklodekstryny, który nie zawierał 1-oktanolu. Te zależności ilustrują dane zawarte w tabeli 2.25 oraz na rysunku 2.17. Fakt zwiększania rozpuszczalności tricyklicznych pochodnych acyklowiru w roztworach wodnych poprzez kompleksowanie ich przez HP-β-CD oraz łatwe uwalnianie ich przy kontakcie z 1-oktanołem może mieć znaczenie podczas dostarczania tych substancji, które są potencjalnymi lekami, do komórek w organizmach żywych.

2.3.3 Badania ekstrakcyjne tricyklicznych pochodnych acyklowiru

Proces ekstrakcji woda - 1-oktanol jest modelem procesów zachodzących w organizmach żywych na granicy faz, które stanowią płyny ustrojowe oraz błona komórkowa. W tym przypadku współczynnik podziału pokazuje zdolność danej substancji do wnikania do błony komórkowej.

2.3.3.1 Wyznaczanie współczynników podziału tricyklicznych pochodnych acyklowiru pomiędzy fazę wodną i 1-oktanol

Badania ekstrakcyjne prowadzono w celu wyznaczenia współczynników podziału pomiędzy fazę organiczną i wodną.

Współczynnik podziału został wyznaczony, jako:

$$k_{o/w} = \frac{C_o}{C_w} \quad (2.6)$$

gdzie: C_o – stężenie danej substancji w fazie 1-oktanolowej

C_w - stężenie danej substancji w fazie wodnej.

Podczas eksperymentów ekstrakcyjnych stwierdzono, że współczynniki podziału danej substancji nie zależą od początkowego stężenia tej substancji w fazie wodnej. Współczynniki podziału acyklowiru, gancyklowiru oraz pochodnych acyklowiru **1-12** oraz wartości ilorazów rozpuszczalności w 1-oktanolu do rozpuszczalności w wodzie i rozpuszczalności w 1-oktanolu nasyconym wodą do rozpuszczalności w wodzie nasyconej 1-oktanołem przedstawia tabela 2.26. Wartości tych ilorazów wyznaczono na podstawie danych rozpuszczalności zawartych w tabeli 2.2.

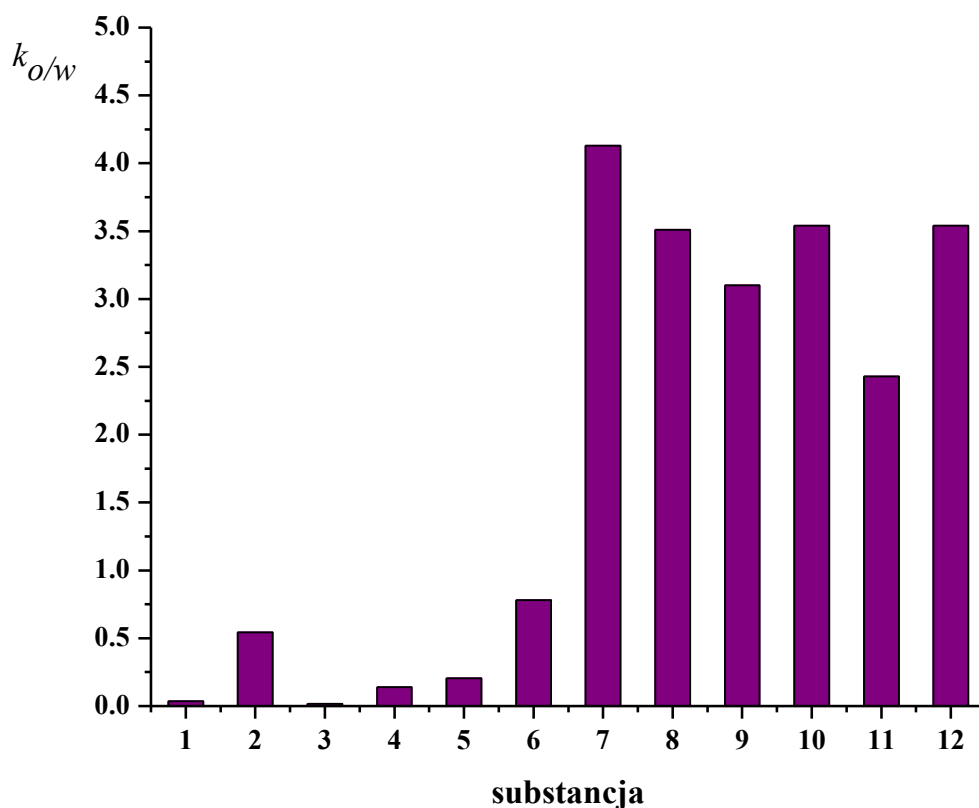
Tabela 2.26. Współczynniki podziału 1-oktanol – woda ($k_{o/w}$) dla substancji **1-12**, stosunek rozpuszczalności tych substancji w 1-oktanolu do rozpuszczalności w wodzie (C_o/C_w) i rozpuszczalności w 1-oktanolu nasyconym wodą do rozpuszczalności w wodzie nasyconej 1-oktanołem (C_{ow}/C_{wo}).

L.p.	Nazwa związku	$k_{o/w}$	C_o/C_w	C_{ow}/C_{wo}
1	ACV	0.036	0.026	0.048
2	Br-ACV	0.544	0.430	0.802
3	GCV	0.017	0.013	0.035
4	TACV	0.138	0.046	0.157
5	6-Me-TACV	0.205	0.173	0.274
6	2-Br-6-Me-TACV	0.780	0.108	0.816
7	6-t-But-TACV	4.13	5.16	2.62
8	6-Fe-TACV	3.51	28.40	5.36
9	6-Fe-Fe-TACV	3.10	8.90	3.10
10	6-Br-Fe-TACV	3.54	2.14	1.65
11	6-Fe-O-Me-TACV	2.43	7.62	2.84
12	6-Naft-TACV	3.54	4.37	3.58

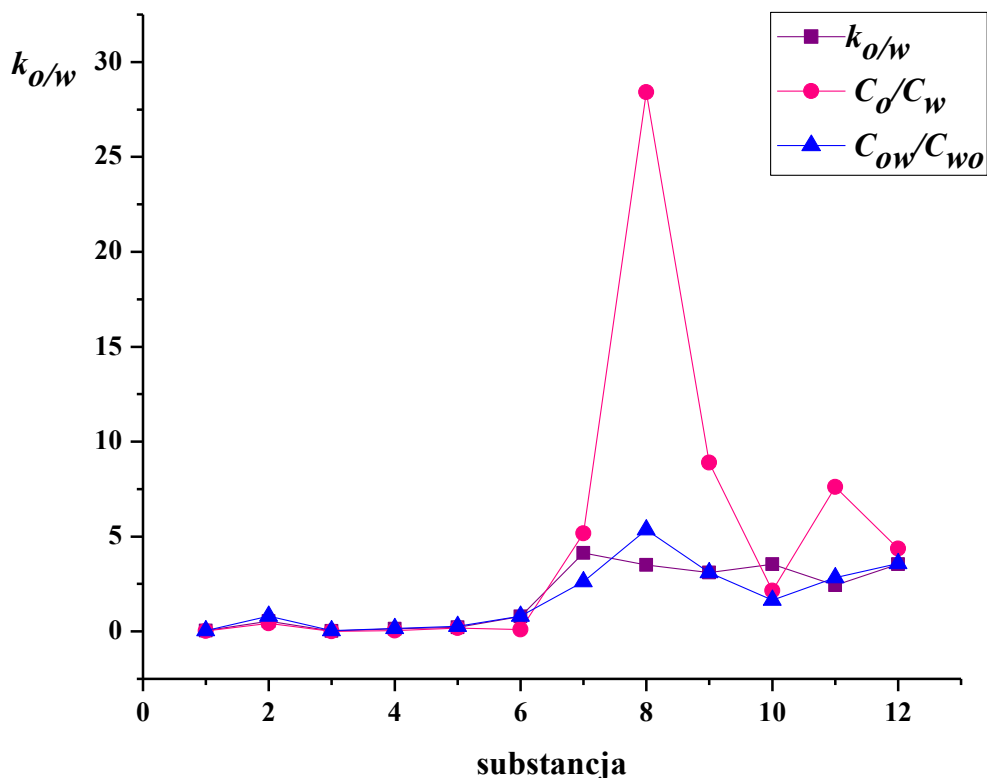
Na podstawie danych zawartych w tabeli 2.26 można zauważyć, że współczynniki podziału substancji **1-12** wykazują podobną zależność jak rozpuszczalność tych substancji w 1-oktanolu lub 1-oktanolu nasyconym wodą, (tabela 2.2 i rysunek 2.2). Substancje **1-6**, tzn. acyklowir, gancyklowir oraz pochodne acyklowiru posiadające podstawniki alkilowe lub halogenkowe mają współczynniki podziału 1-oktanol – woda mniejsze od jedności. Współczynniki podziału acyklowiru oraz gancyklowiru, stosowanych jako leki, są wyjątkowo niskie i nie przekraczają 0.01. Z definicji współczynnika podziału wynika, że przy kontakcie fazy wodnej z fazą organiczną ich stężenie w fazie wodnej jest większe niż w fazie organicznej. Ma to odniesienie do absorpcji tych substancji z płynów ustrojowych do komórek przez błonę komórkową. Absorpcja leku, która w przypadku jest niska może znacząco obniżać efekt terapeutyczny [127]. Substancje **8-12** posiadające podstawniki aromatyczne mają współczynniki podziału większe od jedności, więc ich przejście z fazy wodnej do fazy 1-oktanolowej jest łatwiejsze. Do tej grupy należy również tricykliczna pochodna acyklowiru 6-t-But-TACV (**7**), której duży, hydrofobowy, podstawnik tert-

butylowy ułatwia transfer z fazy wodnej do fazy 1-oktanolowej. Wartości współczynników podziału 1-oktanol-woda dla substancji **1-12** przedstawia rysunek 2.18.

Tabela 2.26 obok współczynników podziału zawiera również wartości ilorazów rozpuszczalności danych substancji w 1-oktanolu do rozpuszczalności w wodzie, oraz rozpuszczalności w 1-oktanolu nasyconym woda do rozpuszczalności w wodzie nasyconej 1-oktanołem. Wartości te wyznaczono na podstawie zawartych w tabeli 2.2 danych otrzymanych podczas pomiarów rozpuszczalności wykonanych w 25°C. Porównanie wartości współczynników podziału oraz ilorazów rozpuszczalności ilustruje rysunek 2.19. Wynika z niego, że dla substancji **1-12**, stosunek rozpuszczalności w 1-oktanolu nasyconym wodą do rozpuszczalności w wodzie nasyconej 1-oktanołem ma bardziej zbliżone wartości do współczynnika podziału niż stosunek rozpuszczalności badanych substancji w czystych rozpuszczalnikach. Porównanie wartości współczynników podziału oraz stosunku rozpuszczalności substancji **1-12** w wodzie nasyconej 1-oktanołem oraz 1-oktanolu nasyconym wodą pokazuje, że na podstawie wyznaczonych rozpuszczalności można oszacować możliwość transferu danej substancji z fazy wodnej do fazy organicznej, bez przeprowadzania badań ekstrakcyjnych.



Rys. 2.18. Współczynniki podziału 1-oktanol –woda substancji **1-12** wyznaczone w 25°C.

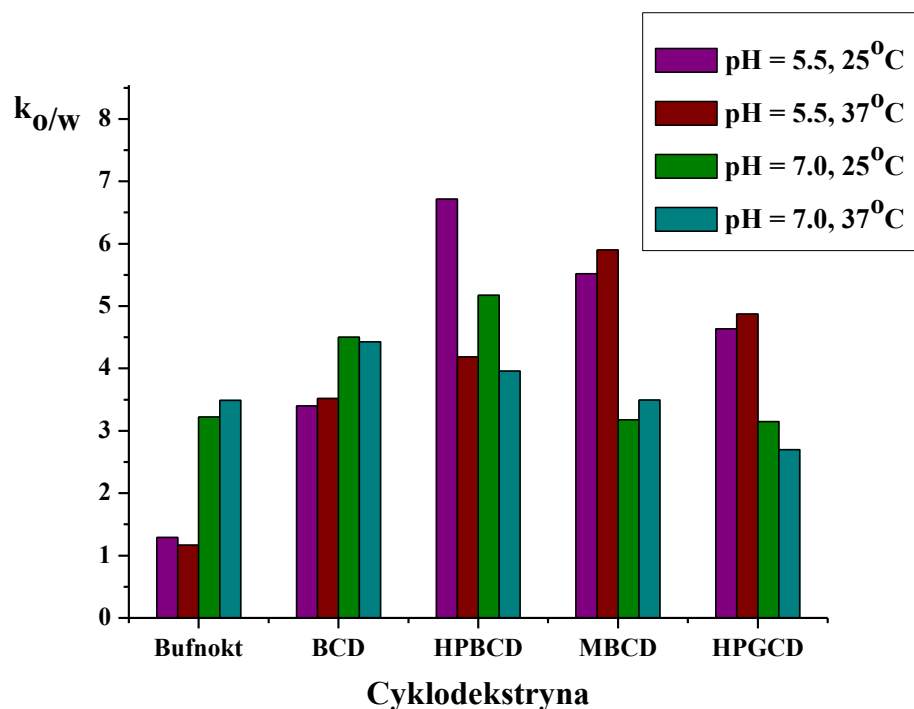


Rys. 2.19. Porównanie wartości współczynników podziału 1-oktanol – woda ($k_{o/w}$) substancji 1-12 z wartościami ilorazów rozpuszczalności tych substancji w 1-oktanolu do rozpuszczalności w wodzie (C_o/C_w) oraz rozpuszczalności w 1-oktanolu nasyconym wodą do rozpuszczalności w wodzie nasyconej 1-oktanołem (C_{ow}/C_{wo}). Dane przedstawione na wykresie wyznaczone w czasie pomiarów prowadzonych w 25°C.

2.3.3.2 Badania ekstrakcji 6-Fe-O-Me-TACV z roztworu wodnego do 1-oktanolu w obecności cyklodekstryn

Badania ekstrakcji 6-Fe-O-Me-TACV z roztworu buforowego o pH =5.5 lub pH =7.0 do 1-oktanolu prowadzone były w temperaturach 25°C i 37°C w obecności, β -CD, HP- β -CD, Me- β -CD oraz HP- γ -CD. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono współczynniki podziału $K_{ok/w}$ badanej substancji w 25°C i 37°C. W wyniku tak przeprowadzonych badań można uzyskać wyższe stężenia danego związku (leku) w fazie organicznej, np. błonie komórkowej, gdyż obecność cyklodekstryny umożliwia uzyskanie wyższych stężeń w fazie wodnej, a następnie poprzez inkluzję 1-oktanolu, substancja jest łatwo uwalniana z luki cyklodekstrynowej do fazy organicznej. Proces ten wspomaga przechodzenie pochodnych acyklowiru z fazy wodnej do fazy organicznej.

Wyniki badań zostały przedstawione w postaci tabel i wykresów. Rysunek 2.20 przedstawia wartości współczynników podziału oktanol-woda ($k_{o/w}$) 6-Fe-O-Me-TACV z fazy wodnej zawierającej różne cyklodekstryny do fazy 1-oktanolowej. Wartości współczynników podziału przedstawiają tabele 2.27 i 2.28.



Rys. 2.20. Współczynniki podziału ($k_{o/w}$) 6-Fe-O-Me-TACV pomiędzy fazę 1-oktanolową i fazę wodną podczas ekstrakcji prowadzonej w 25°C lub 37°C, gdy fazę wodną stanowiły roztwory buforowe (bufor fosforanowy pH = 5.5 i pH = 7.0), lub te same roztwory buforowe zawierające wybrane cyklodekstryny o stężeniu 10^{-2} (mol kg^{-1}), a fazę organiczną stanowił 1-oktanol.

Badania ekstrakcyjne wskazują, że podczas ekstrakcji z udziałem cyklodekstryn obserwujemy wyższe współczynniki podziału pomiędzy fazę organiczną i fazę wodną dla pochodnej acyklowiru 6-Fe-O-Me-TACV niż przypadku zastosowania czystego buforu lub buforu nasyconego 1-oktanołem. Przy zastosowaniu HP- β -CD, która najefektywniej kompleksuje 6-Fe-O-Me-TACV, obserwujemy wpływ temperatury na wartość współczynników podziału - w 25°C osiągają one wyższe wartości niż w 37°C. Może to być związane z silniejszym kompleksowaniem 1-oktanolu w 25°C i wynikającym z tego łatwiejszym uwalnianiem pochodnej acyklowiru w tej temperaturze niż w 37°C.

Tabela 2.27. Stężenia **6-Fe-O-Me-TACV** ($C_{6-Fe-O-Me-TACV}$) w fazie wodnej i n-oktanolu oraz współczynniki podziału badanego związku pomiędzy te dwie fazy. Fazę wodną stanowił bufor fosforanowy o pH = 5.5 lub bufor zawierający wybrane cyklodekstryny. Tabela zawiera również stężenie badanego związku ($C_{6-Fe-O-Me-TACV}$) oraz cyklodekstryny (C_{CD}) w fazie wodnej przed rozpoczęciem ekstrakcji.

Skład fazy wodnej pH = 5.5	C_{CD} w fazie wodnej (mol kg ⁻¹)	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ (początkowe) w fazie wodnej (mol kg ⁻¹)	t = 25°C			t = 37°C		
			$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ faza wodna (mol kg ⁻¹)	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ n-oktanol (mol kg ⁻¹)	$k_{o/w}$	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ faza wodna (mol kg ⁻¹)	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ n-oktanol (mol kg ⁻¹)	$k_{o/w}$
Buf. n. okt	0.0	4.42 x 10 ⁻⁵	1.93 x 10 ⁻⁵	2.48 x 10 ⁻⁵	1.29	2.04 x 10 ⁻⁵	2.38 x 10 ⁻⁵	1.17
Buf + β-CD	9.97 x 10 ⁻³	8.25 x 10 ⁻⁵	1.87 x 10 ⁻⁵	6.37 x 10 ⁻⁵	3.40	2.08 x 10 ⁻⁵	7.32 x 10 ⁻⁵	3.52
Buf+ HP-β-CD	9.96 x 10 ⁻³	1.20 x 10 ⁻⁴	1.55 x 10 ⁻⁵	1.04 x 10 ⁻⁵	6.71	2.31 x 10 ⁻⁵	9.66 x 10 ⁻⁵	4.18
Buf + M-β-CD	9.87 x 10 ⁻³	9.97 x 10 ⁻⁵	1.53 x 10 ⁻⁵	8.44 x 10 ⁻⁵	5.52	1.46 x 10 ⁻⁵	8.62 x 10 ⁻⁵	5.9
Buf+ HP-γ-CD	9.82 x 10 ⁻³	7.12 x 10 ⁻⁵	1.26 x 10 ⁻⁵	5.86 x 10 ⁻⁵	4.64	1.21 x 10 ⁻⁵	5.91 x 10 ⁻⁵	4.87

Tabela 2.28. Stężenia **6-Fe-O-Me-TACV** ($C_{6-Fe-O-Me-TACV}$) w fazie wodnej i 1-oktanolowej oraz współczynniki podziału ($k_{ok/w}$) badanego związku pomiędzy te dwie fazy. Fazę wodną stanowił bufor fosforanowy o pH = 7.0 lub bufor zawierający wybrane cyklodekstryny. Tabela zawiera również stężenie badanego związku ($C_{6-Fe-O-Me-TACV}$) oraz cyklodekstryny (C_{CD}) w fazie wodnej przed rozpoczęciem ekstrakcji.

Skład fazy wodnej pH = 7.0	C_{CD} w fazie wodnej (mol kg ⁻¹)	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ początkowe w fazie wodnej (mol kg ⁻¹)	t = 25°C			t = 37°C		
			$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ faza wodna (mol kg ⁻¹)	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ oktanol (mol kg ⁻¹)	$k_{o/w}$	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ faza wodna (mol kg ⁻¹)	$C_{6-Fe-O-Me-TACV}$ n-oktanol (mol kg ⁻¹)	$k_{o/w}$
Buf. n. okt	0.00	4.73 x 10 ⁻⁵	1.08 x 10 ⁻⁵	3.48 x 10 ⁻⁵	3.22	1.05 x 10 ⁻⁵	3.67 x 10 ⁻⁵	3.49
Buf + β-CD	9.99 x 10 ⁻³	7.76 x 10 ⁻⁵	1.42 x 10 ⁻⁵	6.37 x 10 ⁻⁵	4.50	1.43 x 10 ⁻⁵	6.33 x 10 ⁻⁵	4.43
Buf+ HP-β-CD	9.95 x 10 ⁻³	1.21 x 10 ⁻⁴	2.01 x 10 ⁻⁵	1.04 x 10 ⁻⁴	5.17	2.44 x 10 ⁻⁵	9.64 x 10 ⁻⁵	3.96
Buf + M-β-CD	9.82 x 10 ⁻³	1.18 x 10 ⁻⁴	2.66 x 10 ⁻⁵	8.44 x 10 ⁻⁵	3.18	2.63 x 10 ⁻⁵	9.19 x 10 ⁻⁵	3.49
Buf+ HP-γ-CD	9.89 x 10 ⁻³	7.28 x 10 ⁻⁵	1.86 x 10 ⁻⁵	5.86 x 10 ⁻⁵	3.15	1.97 x 10 ⁻⁵	5.31 x 10 ⁻⁵	2.70

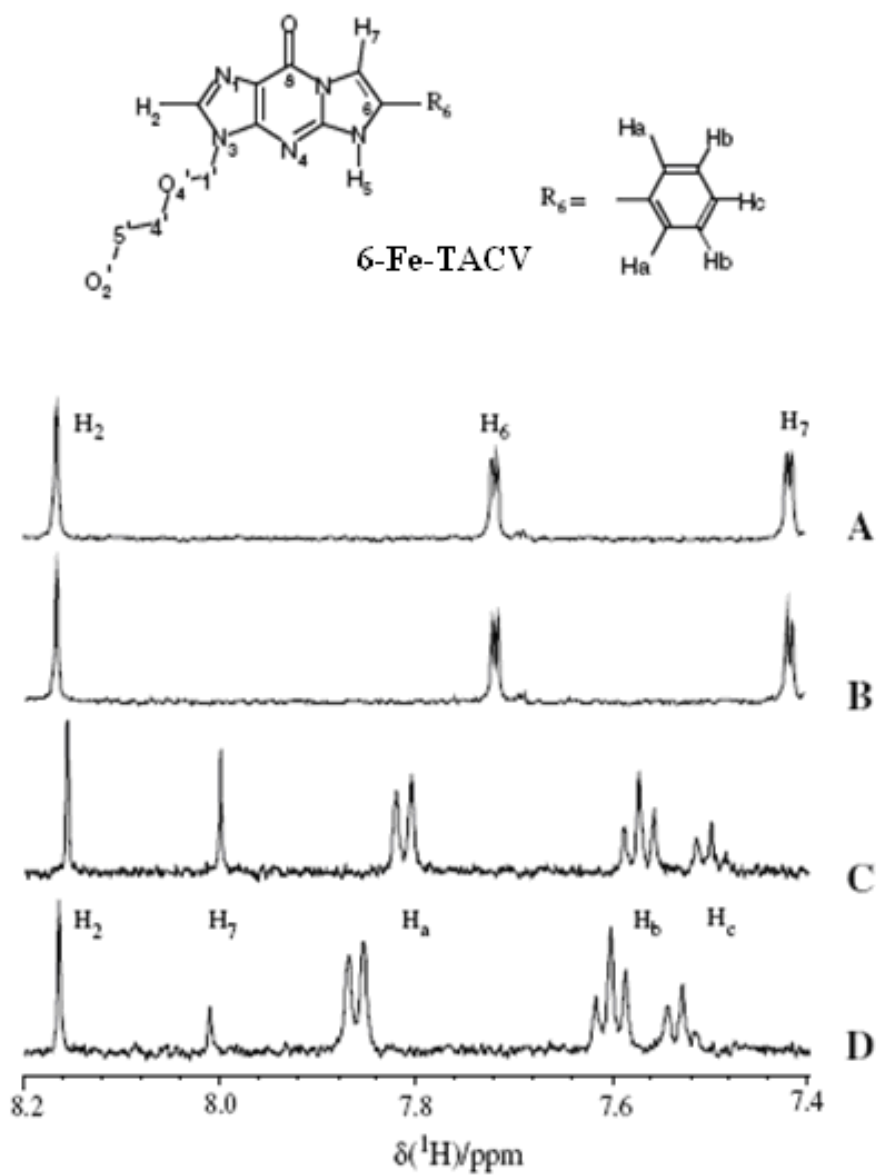
W przypadku pozostałych cyklodekstryn oraz buforów obserwujemy większą zależność współczynników podziału od pH tzn. formy w jakiej występuje substancja niż od temperatury. Podczas ekstrakcji z buforu nasyconego 1-oktanołem oraz buforu zawierającego β -CD, większe współczynniki podziału uzyskujemy dla pH = 7.0, a gdy faza wodna zawiera Me- β -CD lub HP- γ -CD większe współczynniki podziału obserwujemy przy pH = 5.5. Takie rezultaty wynikają z wielu różnych czynników fizykochemicznych. Ustalenie ich wpływu na wielkość współczynników podziału wymaga dalszych szczegółowych badań, które nie były przedmiotem tej pracy. Ogólnie możemy stwierdzić, że podczas ekstrakcji z roztworu wodnego do 1-oktanolu, tricyklicznej pochodnej acyklowiru **6-Fe-O-Me-TACV**, charakteryzującej się bardzo niską rozpuszczalnością w fazie wodnej, zastosowanie cyklodekstryn umożliwia osiągnięcie wyższych stężeń w fazie organicznej niż wtedy, gdy cyklodekstryny nie były stosowane. Ma to szczególnie duże znaczenie w przypadku substancji, które są potencjalnymi lekami, a niska rozpuszczalność w roztworach wodnych ogranicza absorpcję tej substancji przez komórki w organizmach żywych.

2.3.4 Badania ^1H NMR.

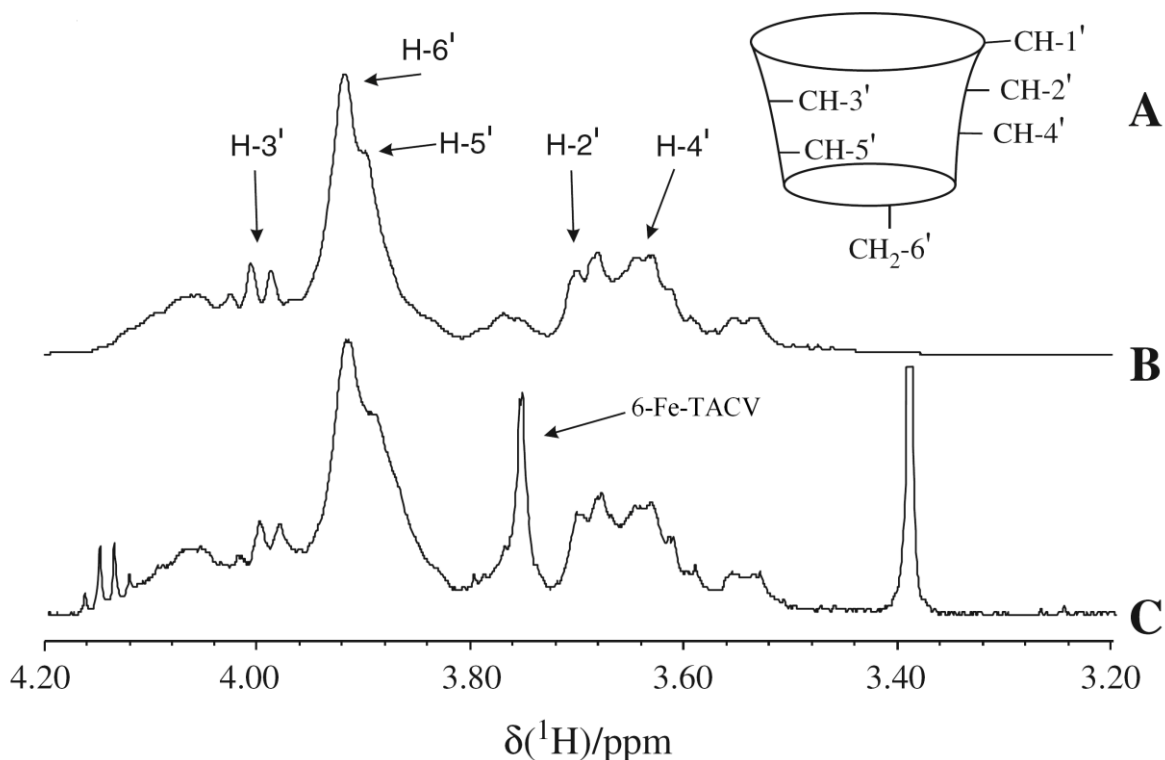
Badania ^1H NMR w D_2O przeprowadzono w celu potwierdzenia tworzenia się kompleksów inkluzyjnych wybranych cyklodekstryn z tricyklicznymi pochodnymi acyklowiru, będącymi przedmiotem tej pracy. Dużym problemem było uzyskanie roztworów o odpowiednim do badań stężeniu w przypadku pochodnych posiadających podstawniki aromatyczne ze względu na bardzo niską rozpuszczalność w D_2O . Badania ^1H NMR prowadzono dla roztworów **TACV**, **6-t-But-TACV**, **6-Fe-TACV** o stężeniu 5×10^{-5} (mol kg^{-1}) oraz **6-Fe-O-Me-TACV** o stężeniu 2×10^{-5} (mol kg^{-1}) oraz cyklodekstryn HP- β -CD i β -CD o stężeniach 5×10^{-5} oraz 5×10^{-4} (mol kg^{-1}), a także roztworów zawierających zarówno cyklodekstryny w w/w stężeniach jak i pochodne acyklowiru.

W roztworach HP- β -CD zaobserwowano przesunięcia sygnałów, pochodzące od badanych związków jak i od cyklodekstryny, świadczące o tworzeniu się kompleksów inkluzyjnych, natomiast nie zaobserwowano widocznych zmian sygnałów w roztworach β -CD, która tworzy słabsze kompleksy z badanymi związkami. W przypadku **TACV** oraz **6-t-But-TACV** zaobserwowano bardzo niewielkie przesunięcia sygnałów pochodzących od pochodnej acyklowiru oraz cyklodekstryny świadczące o płytkiej inkluzji tych związków w luce cyklodekstryny. Podczas badań roztworów zawierających **6-Fe-TACV** oraz HP- β -CD przesunięcia sygnałów pochodzących od pochodnej acyklowiru oraz cyklodekstryny są

większe i wskazują na inkluzję podstawnika fenylowego do luki HP- β -CD . Zależności te pokazane są na rysunkach 2.21 i 2.22.



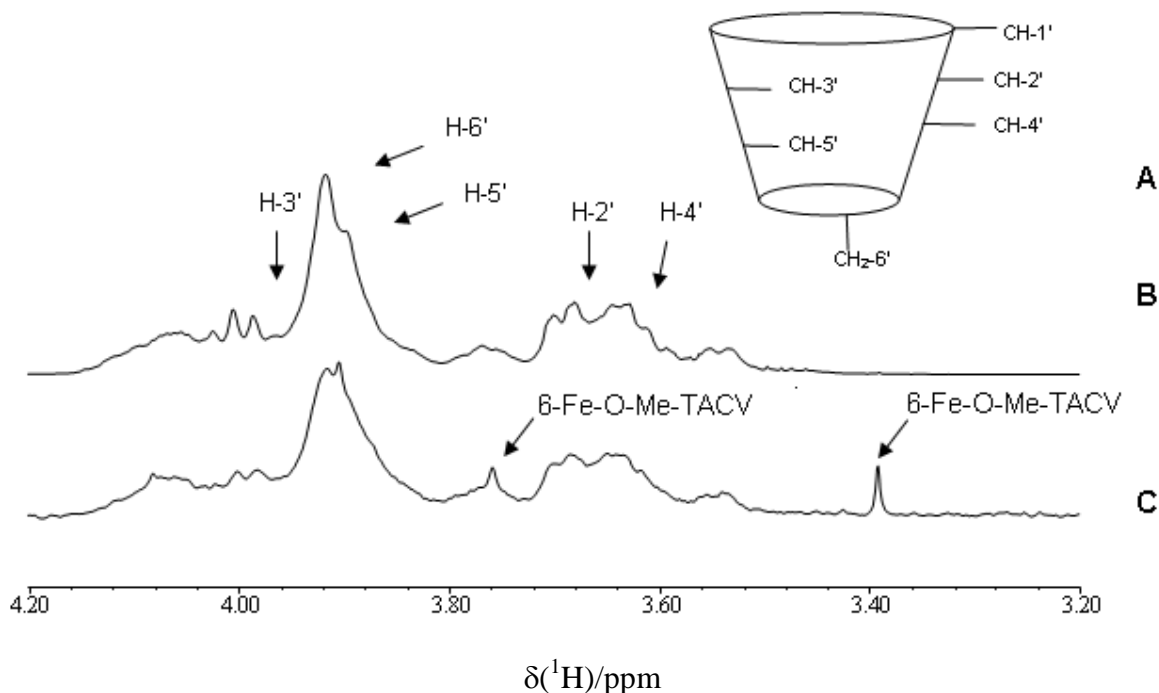
Rys. 2.21. Widma ^1H NMR roztworów **TACV**(A) oraz **6-Fe-TACV** (C) w D_2O o stężeniu 5×10^{-5} (mol kg^{-1}) zarejestrowane w 25°C oraz ich mieszanin z HP- β -CD o stechiometrii o 1:1 (B i D).



Rys. 2.22. Schematyczna lokalizacja alifatycznych protonów w pierścieniu makrocyklicznym HP-β-CD (A) oraz widma ¹H NMR tej cyklodekstryny o stężeniu 5×10^{-5} (mol kg⁻¹) w D₂O w 25°C (B) oraz jej mieszaniny z **6-Fe-TACV** o stechiometrii 1:1.

Rysunek 2.22 pokazuje brak oddziaływań **6-Fe-TACV** z protonami 1', 2', 4', znajdującymi na zewnątrz luki cyklodekstryny oraz oddziaływania z protonami 3' i 5' znajdującymi się wewnątrz luki.

Podobne oddziaływania zaobserwowano dla roztworów zawierających mieszaninę **6-Fe-O-Me-TACV** oraz HP-β-CD. Zmiany sygnałów pochodzących od protonów zlokalizowanych wewnątrz luki makrocyklicznej cyklodekstryny (3 i 5') świadczą o obecności kompleksu inkluzyjnego pomiędzy **6-Fe-O-Me-TACV** oraz HP-β-CD w roztworze D₂O. Niestety, zbyt niska rozpuszczalność tej substancji w D₂O uniemożliwiła obserwację przesunięć sygnałów protonów pochodzących od **6-Fe-O-Me-TACV**. Widma ¹H NMR roztworów zawierających **6-Fe-O-Me-TACV** oraz HP-β-CD przedstawia rysunek 2.23.



Rys. 2.23. Schematyczna lokalizacja alifatycznych protonów w pierścieniu makrocyklicznym HP-β-CD (A) oraz widma ¹H NMR tej cyklodekstryny o stężeniu 5×10^{-5} (mol kg⁻¹) w D₂O w 25°C (B) oraz jej mieszaniny z **6-Fe-O-Me-TACV** o stężeniu 2×10^{-5} (mol kg⁻¹) (C).

Przedstawione widma potwierdzają obecność kompleksów inkluzyjnych w roztworach zawierających cyklodekstryny oraz badane tricykliczne pochodne acyklowiru. W przypadku niepodstawionej pochodnej oraz posiadającej podstawnik alkilowy kompleksowanie jest słabe, a wiązana cząsteczka jest tylko częściowo umiejscowiona w luce cyklodekstryny. Stwierdzono również, że w przypadku pochodnych posiadających podstawniki aromatyczne, są one wiązane w luce cyklodekstryny, co umożliwia rozpuszczenie tej cząsteczki. Przedstawione w tej części pracy wyniki potwierdzają wyniki badań rozpuszczalnościowych.

2.3.5 Wyznaczanie wartości pKa dla pochodnych acyklowiru

Wyznaczenie wartości pKa dla danej substancji jest bardzo istotne, gdyż stopień jonizacji wpływa na jej własności fizykochemiczne. Podczas wyznaczania współczynników ekstynkcji w roztworach buforowych o pH = 5.5 oraz pH = 7.0 stwierdzono ich zależność od pH, stąd też wartości pKa zostały wyznaczone metodą miareczkowania spektrofotometrycznego roztworu danej substancji poprzez dodawanie roztworu HCl lub NaOH i pomiar pH dla każdego punktu pomiarowego. Na podstawie zmian absorbancji danej substancji w zależności od pH wyznaczono wartości pKa. Obliczenia prowadzono metodą

opracowaną przez dr hab. J. Poznańskiego w oparciu o superpozycję całych widm. Algorytm zakłada, że widmo dla danego pH jest kombinacją liniową widm założonych form protonowanych i nieprotonowanych zgodnie z zależnością:

$$A = aA_1 + bA_2 \quad (2.7)$$

gdzie:

A - absorbancja przy danym pH

A_1 – absorbancja formy nieprotonowanej

A_2 – absorbancja formy protonowanej

a i b – współczynniki liczbowe

Przy takim założeniu wyrażenie:

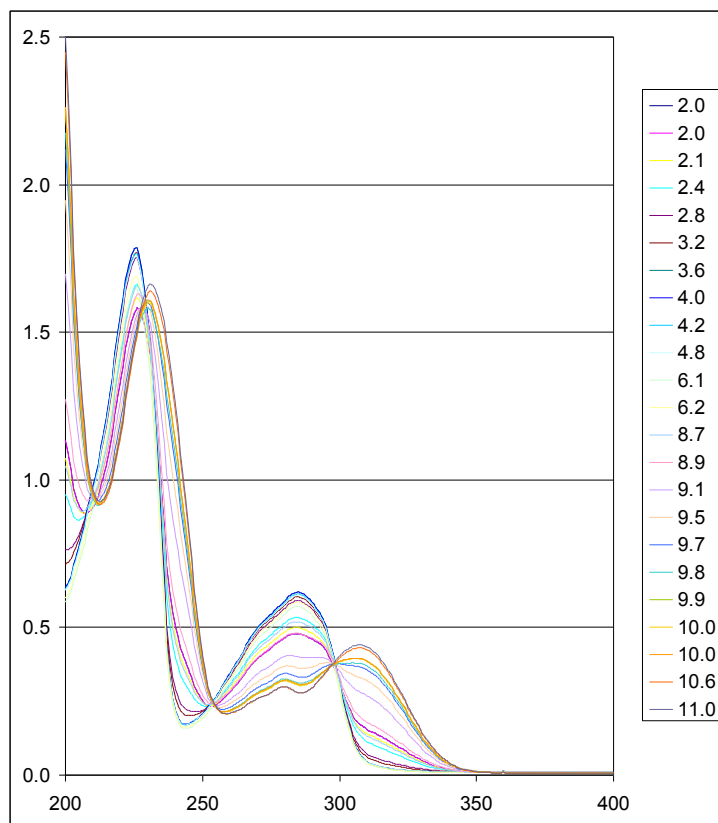
$$\frac{a}{a+b} \quad (2.8)$$

jest miarą udziału jednej z form w całkowitej absorbancji. Taka metoda pozwala na kompensację niedokładności pomiarowych. Wyznaczona doświadczalnie zależność $A=f(pH)$ jest dopasowywana do zależności:

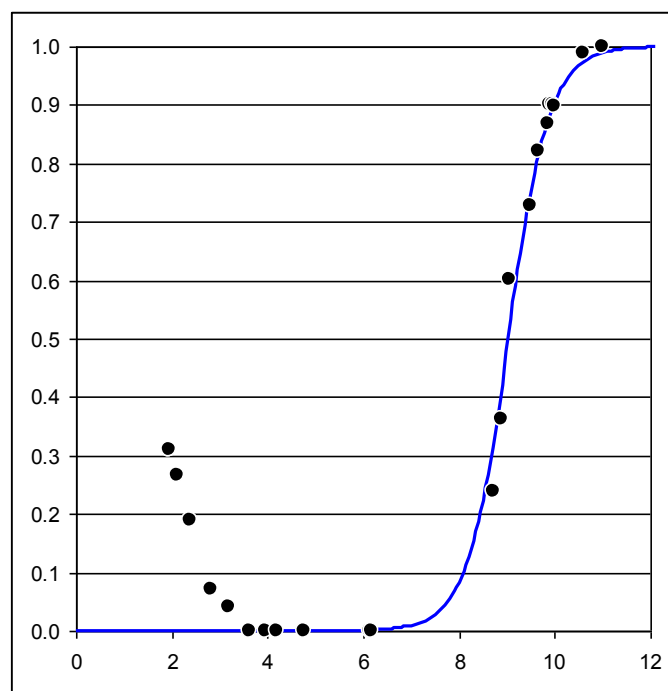
$$A = \frac{1}{1 + 10^{pH - pKa}} \quad (2.9)$$

Korzystając z tego równania i posługując się metodą najmniejszych kwadratów otrzymujemy wartości pKa i oszacowanie błędów. Analiza zależności $A=f(pH)$ pozwala na zidentyfikowanie obszarów pH, w których występuje inna równowaga protonowania. Pozwala to na optymalny wybór widm obu form jonowych.

Miareczkowania wykonano dla tricyklicznych pochodnych acyklowiru, których rozpuszczalność badano w roztworze HP- β -CD. Widma otrzymane podczas miareczkowania oraz otrzymane krzywe miareczkowania dla wybranych substancji przedstawiają rysunki 2.24-2.27.

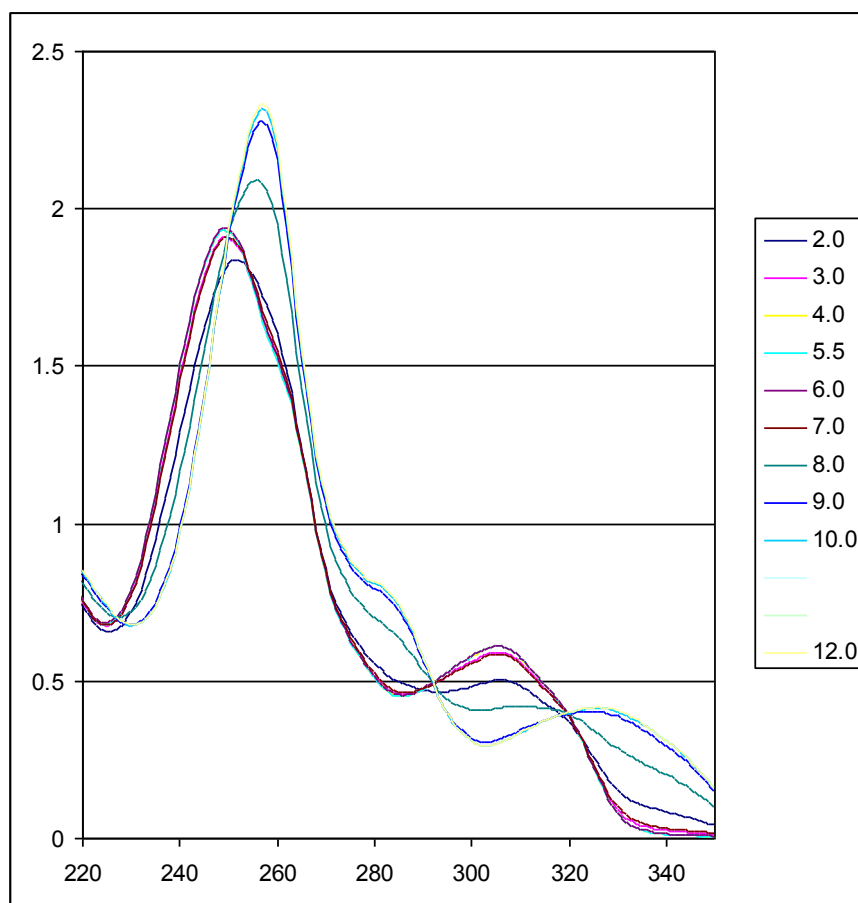


Rys. 2.24. Widma UV tricyklicznej pochodnej acykloviru **TACV (4)** uzyskane przy różnych wartościach pH roztworu wodnego.

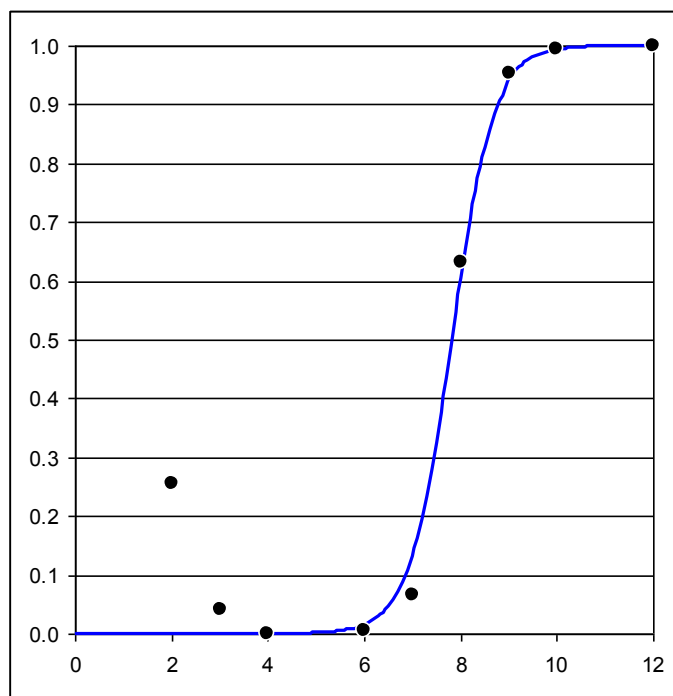


Rys. 2.25. Krzywa miareczkowania **TACV (4)** otrzymana na podstawie widm pokazanych na rysunku 2.24.

Widma uzyskane dla tricyklicznych pochodnych posiadających podstawniki alkilowe lub halogenowe, mają taki sam charakter jak widma dla niepodstawionego TACV (4), natomiast widma substancji posiadających podstawniki aromatyczne mają inny charakter. Przykładowe widma otrzymane dla tricyklicznej pochodnej 6-Fe-TACV (8) oraz otrzymaną na ich podstawie krzywą miareczkowania przedstawiają rysunki 2.26 i 2.27.



Rys. 2.26. Widma UV tricyklicznej pochodnej acykloviru posiadającej podstawnik fenylowy 6-Fe-TACV (8) uzyskane przy różnych wartościach pH roztworu wodnego.



Rys. 2.27. Krzywa miareczkowania **6-Fe-TACV (8)** otrzymana na podstawie widm pokazanych na rysunku 2.26.

Wyznaczone tą metoda wartości pKa dla wybranych tricyklicznych pochodnych acyklowiru o różnych podstawnikach przedstawia tabela 2.29.

Tabela 2.29. wartości pKa dla wybranych tricyklicznych pochodnych acyklowiru.

	Substancja	pKa ₁	pKa ₂
4	TACV	2.27(±0.20);	9.07(±0.04)
6	2-Br-6-Me-TACV	-	9.14(±0.06)
7	6-t-But-TACV	1.85(±0.17)	9.60(±0.06)
8	6-Fe-TACV	1.71(±0.25)	7.97(±0.07) 8.0 [46]
11	6-Fe-O-Me-TACV	1.75(±0.20)	8.2 (±0.08)
12	6-2-Naft- TACV	1.87(±0.13)	8.10(±0.10)

Dane zawarte w tabeli 2.28 pokazują, że na podstawie danych spektrofotometrycznych możemy wyznaczyć dwie stałe protonowania, których pKa wynoszą w przybliżeniu 2 i 9 dla tricyklicznej pochodnej acyklowiru **TACV (4)** oraz jej analogów podstawionych grupami

alkilowymi i halogenkowymi oraz 2 i 8 dla dla pochodnych posiadających grupy aromatyczne. Wprowadzenie grupy alkilowej lub halogenowej nieznacznie obniża pierwszą stałą i nieznacznie podwyższa drugą stałą, a grupy aromatycznej obniża obydwie stałe protonowania.

2.3.6 Badania acyklowiru, gancyklowiru i pochodnych acyklowiru oraz ich kompleksów z cyklodekstrynami w stanie stałym - metodami analizy termicznej (TGA i DSC)

Badania acyklowiru gancyklowiru i oraz pochodnych acyklowiru oraz ich kompleksów z cyklodekstrynami prowadzono w celu wyznaczenia temperatury topnienia oraz entalpii topnienia tych substancji.

2.3.6.1 Wyznaczanie temperatury topnienia oraz entalpii topnienia acyklowiru i jego pochodnych metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC)

Wyznaczanie temperatur topnienia oraz entalpii topnienia poszczególnych substancji jest ważne, ze względu na możliwość identyfikacji danej substancji oraz formy w jakiej została otrzymana, dlatego analiza DSC jest jedną z obowiązkowych analiz danej partii substancji w przemyśle farmaceutycznym.

Dla wszystkich badanych substancji wykonano przebiegi DSC w celu wyznaczenia temperatury topnienia oraz entalpii topnienia. Otrzymane wyniki zostały przedstawione w tabeli 2.30.

Tabela 2.30. Temperatury topnienia oraz entalpie topnienia dla substancji **1-12**, będących przedmiotem tej pracy.

L.p.	Nazwa związku	Temperatura Topnienia (°C)	Entalpia topnienia (kJ mol ⁻¹)
1	ACV	248.7	26.86
2	Br-ACV	197.7	36.44
3	GCV	236.0	37.88
4	TACV	247.2	43.39
5	6-Me-TACV	192.2	36.06

6	2-Br-6-Me-TACV	201.5	50.94
7	6-t-But-TACV	205.3	38.04
8	6-Fe-TACV	234.8	38.6
9	6-Fe-Fe-TACV	232.5	45.43
10	6-Br-Fe-TACV	Dekompozycja termiczna	-
11	6-Fe-O-Me-TACV	234.1	48.41
12	6-Naft-TACV	220.8	37.64

Analizując wartości temperatur topnienia i entalpii topnienia dla grupy związków, które są przedmiotem tej pracy widzimy, że najwyższe temperatury topnienia, równe odpowiednio 248.7°C oraz 247.2°C mają związki niepodstawione takie jak ACV i TACV. Nieznacznie niższą temperaturę topnienia 236°C, obserwujemy dla GCV, który jest analogiem ACV, który posiada bardziej rozgałęziony łańcuch cukrowy. Najniższe temperatury topnienia obserwujemy dla związków posiadających grupy alkilowe i halogenowe. Temperatury topnienia takich związków leżą w zakresie od 197.7°C (Br-ACV) do 205.3 (6-t-But-TACV). Natomiast związki posiadające podstawniki aromatyczne mają niższe temperatury topnienia niż związki niepodstawione, ale wyższe niż pochodne posiadające podstawniki aromatyczne. Ich temperatury topnienia leżą w zakresie od 220.8°C (6-Naft-TACV) do 234.8°C (6-Fe-TACV). Zależności dotyczące temperatur topnienia w badanej grupie związków nie dotyczą wartości entalpii topnienia, które są wyższe dla związków o większej masie atomowej. Jeden z badanych związków 6-Br-Fe-TACV uległ dekompozycji termicznej poniżej temperatury topnienia.

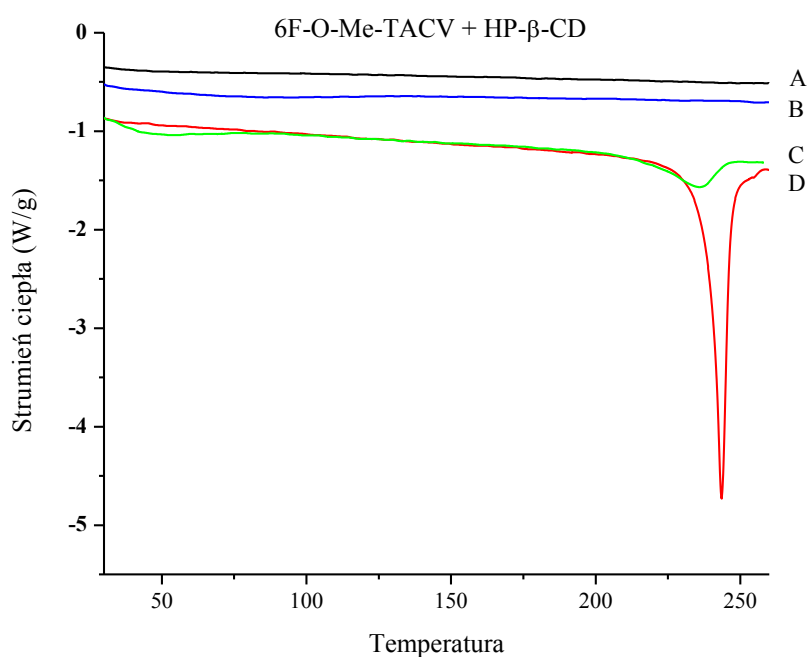
Wartości temperatury oraz entalpii topnienia używane są w różnych w korelacjach i równaniach stosowanych w obliczeniach fizykochemicznych [48, 49].

2.3.6.2 Wyznaczanie przebiegów DSC dla kompleksów poszczególnych pochodnych acyklowiru oraz hydroksypropylo-β-cyklodekstryny w stanie stałym oraz odpowiadających im mieszanin fizycznych.

Dla substancji, które są kompleksowane przez cyklodekstryny wyznaczono dwa przebiegi DSC – pierwszy dla mieszaniny fizycznej zawierającej 10% wagowych pochodnej acyklowiru oraz 90% HP-β-CD, drugi dla kompleksów w stanie stałym, otrzymanych

poprzez rozpuszczenie danej substancji w wodnym roztworze HP- β -CD, a następnie odparowanie wody.

Przebiegi te porównano z przebiegami dla cyklodekstryny oraz czystej pochodnej acyklowiru. Dla próbek zawierających cyklodekstrynę wykonywano zawsze dwa przebiegi, pierwszy do 150°C, aby usunąć wodę z próbek cyklodekstryny, a następny do 300°C. Przykładowe zestawienie przebiegów dla jednej z pochodnych acyklowiru **6-Fe-O-Me-TACV** przedstawia rysunek 2.28.

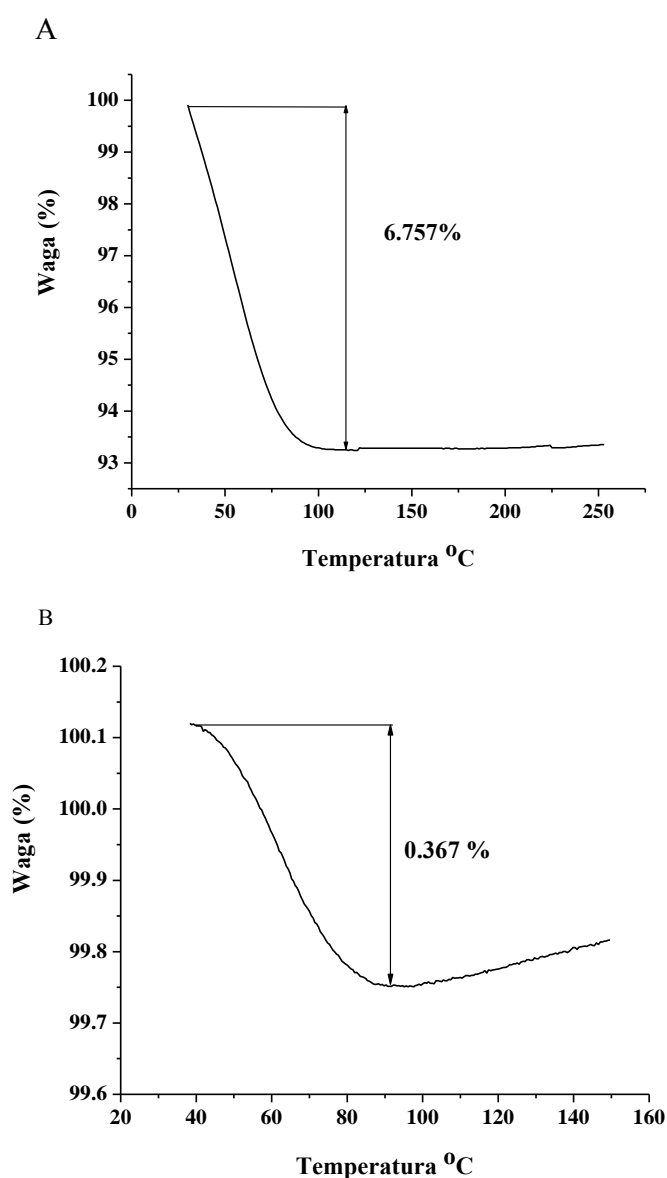


Rys. 2.28. Przebiegi DSC HP- β -CD (A), Kompleksu HP- β -CD z **6-Fe-O-Me-TACV** (B), mieszaniny fizycznej HP- β -CD i **6-Fe-O-Me-TACV** (C) oraz czystego **6-Fe-Me-TACV** (D).

Analiza DSC dla **6-Fe-O-Me-TACV** pokazuje pik związany z topnieniem tego związku przy temperaturze 243.5°C o entalpii topnienia 48 (kJ/mol), który nie jest obserwowany w próbce zawierającej kompleks. Niestety, nie jest możliwa obserwacja badanych próbek powyżej 250°C, ponieważ HP- β -CD ulega rozkładowi, stąd nie jest możliwe ustalenie temperatury topnienia kompleksu w tych warunkach pomiarowych. Podobne rezultaty, tzn brak charakterystycznego piku topnienia, uzyskano dla kompleksów innych tricyklicznych pochodnych acyklowiru.

2.3.6.3 Wyznaczanie zawartości wody w cząsteczkach cyklodekstryn metodą termogravimetrii (TG).

Przed wykonaniem przebiegów DSC wykonano badania termogravimetryczne badanych substancji i stwierdzono obecność wody w cząsteczce cyklodekstryn oraz ich kompleksach z pochodnymi acyklowiru. Przebiegi TGA dla HP- β -CD przedstawia rysunek 2.29. Informacje dotyczące zawartości wody w cząsteczkach cyklodekstryn podane są w rozdziale 2.1 zawierającym charakterystykę cyklodekstryn używanych podczas przygotowania tej pracy.



Rys. 2.29. Dwa kolejne przebiegi TGA dla tej samej próbki HP- β -CD, prowadzone w zakresie: pierwszy przebieg do 200°C (A), a drugi do 250°C (B).

Na podstawie przebiegów pokazanych na rysunku 2.29 można zauważyć, że początkowa zawartość wody w próbce cyklodekstryny wynosiła około 7% wagowych. Drugi przebieg pokazuje, że woda została trwale usunięta. Pozostało ok. około 0.3% wody - ta zawartość nie zmienia się w kolejnych przebiegach TGA.

2.3.7 Inne badania trójcyklicznych pochodnych acyklowiru

Prowadzono również próby bezpośredniego wyznaczenia efektów cieplnych procesu kompleksowania poprzez zastosowanie kalorymetrii miareczkującej ITC w 25°C. Niestety te próby nie powiodły się ze względu na słabą rozpuszczalność **6-Fe-O-Me-TACV** w roztworach buforowych. Efekty cieplne, uzyskiwane w wyniku kolejnych wstrzyknięć, były zbyt małe, aby można wnioskować o kompleksowaniu, dlatego też dalsze pomiary miały za zadanie wyznaczenie całkowitego efektu cieplnego procesu kompleksowania. Badania przeprowadzono korzystając z kalorymetru ITC. Do roztworu nasyconego **6-Fe-O-Me-TACV** w buforze fosforanowym o stężeniu równym 3.22×10^{-5} (mol kg⁻¹) wstrzyknięto roztwór HP-β-CD o stężeniu 10^{-3} (mol kg⁻¹) w postaci 2 wstrzyknięć po 100 μl. Po zsumowaniu efektów cieplnych kompleksowania oraz odjęciu efektów rozcieńczenia otrzymano entalpię kompleksowania równą $\Delta H = -11.72$ kJ/mol, dla pomiaru wykonanego w buforze o pH = 7.

Inne prowadzone badania to miareczkowanie spektrofotometryczne oraz spektrofluometryczne roztworu **6-Fe-O-Me-TACV** roztworem HP-β-CD. Niestety zaobserwowane efekty były zbyt małe, aby można było przeprowadzić obliczenia.

2.3.8 Modelowanie kompleksów pochodnych acyklowiru z β-CD i γ-CD

Metody obliczeniowe, które pozwalają wyznaczyć strukturę danej cząsteczki lub kompleksu są stosowane w sytuacji, gdy nie jest to możliwe metodami eksperymentalnymi. Do obliczeń wykorzystywane są metody mechaniki molekularnej oraz dynamiki molekularnej. Mechanika molekularna jest metodą obliczeniową, w której do modelowania układów molekularnych wykorzystuje się mechanikę klasyczną. W tej metodzie energia potencjalna układu cząsteczek jest wyznaczana za pomocą odpowiedniego pola siłowego. W założeniach tej metody każda cząsteczka ma przypisany określony promień, polaryzowalność oraz ładunek, a wiązania traktowane są jako oscylatory harmoniczne [137]. Podstawowym zastosowaniem mechaniki molekularnej jest minimalizacja energii cząsteczki w celu znalezienia zestawu konformacji układu cząsteczek o najniższej energii.

Inną, często stosowaną w chemii, metodą obliczeniową, która zajmuje się symulacją ruchu molekuł lub układu molekuł jest dynamika molekularna. Jest to metoda polegająca na komputerowej symulacji przestrzeni fazowej dla układu cząsteczek poprzez całkowanie równań ruchu Newtona, lub bardziej kompleksowych metodach uwzględniających oddziaływania pomiędzy elementami układu. Dynamika molekularna pozwala na poznanie struktury i oddziaływań w układach cząsteczek, również dużych biomolekuł takich, jak np. białka [137].

Zastosowanie metod mechaniki molekularnej oraz dynamiki molekularnej do badań kompleksów tricyklicznych pochodnych acyklowiru z cyklodekstrynami wynika z trudności określenia struktury tych kompleksów metodami eksperymentalnymi takimi jak NMR czy metody krystalograficzne. Obliczenia prowadzone metodami mechaniki molekularnej oraz dynamiki molekularnej w próżni miały za zadanie znalezienie najbardziej prawdopodobnej struktury danego kompleksu, a następnie na jej podstawie wyznaczenie energii procesu tworzenia się kompleksów inkluzyjnych. Energię kompleksowania obliczano jako różnicę pomiędzy sumą energii optymalizacji geometrii struktur cyklodekstryny oraz pochodnej acyklowiru i energii optymalizacji struktury kompleksu. Zależność tę przedstawia równanie 2.10.

$$\Delta E_{kom} = E_{kom} - (E_s + E_{CD}) \quad (2.10)$$

gdzie:

ΔE_{kom} – energia tworzenia kompleksu inkluzyjnego pomiędzy daną pochodną acyklowiru a cyklodekstryną, E_{kom} , E_s i E_{CD} wartości energii otrzymane w wyniku optymalizacji struktur kompleksu, czystej substancji oraz cyklodekstryny.

Inną miarą siły wiązania kompleksu jest różnica powierzchni wolnych substancji oraz związanych w kompleksie. Takie obliczenia były prowadzone na podstawie otrzymanych struktur. Sumaryczna zmiana powierzchni obydwu substancji biorących udział w powstawaniu kompleksu inkluzyjnego, tzn. danej pochodnej acyklowiru oraz cyklodekstryny, oraz wielkości powierzchni obydwu związków, które nie biorą udziału w kompleksowaniu zostały obliczone jako:

$$\Delta S_{kom} = S_{kom} - (S_s + S_{CD}) \quad (2.11)$$

gdzie:

ΔS_{kom} – zmiana powierzchni otrzymanego w wyniku modelowania kompleksu inkluzyjnego cyklodekstryny z daną pochodną acyklowiru, S_{kom} , S_s i S_{CD} powierzchnie otrzymane w wyniku optymalizacji struktury kompleksu, danej pochodnej acyklowiru oraz cyklodekstryny.

W celu analizy wpływu kompleksowania na rozpuszczalność trojcyklicznych pochodnych acyklowiru wyznaczono wielkości powierzchni poszczególnych pochodnych acyklowiru, która została bezpośrednio zainkludowana w luce cyklodekstryny. Wielkości tych powierzchni obliczono jako:

$$\Delta S_s = S_{s1} - S_{s2} \quad (2.12)$$

gdzie:

ΔS_s – wielkość powierzchni danej pochodnej acyklowiru która bierze bezpośrednio udział w kompleksowaniu po optymalizacji, S_{s1} - wielkość powierzchni tej cząsteczki po usunięciu ze struktury cyklodekstryny i S_{s2} w obecności cyklodekstryny.

W analogiczny sposób obliczono też wielkości powierzchni ΔS_{CD} , ΔS_{CD1} i ΔS_{CD2} cząsteczki cyklodekstryny, biorącej udział w wiązaniu danej pochodnej acyklowiru. Wartości energii kompleksowania otrzymane na podstawie obliczeń metodami mechaniki oraz dynamiki molekularnej, a także wartości zmiany powierzchni substancji i cyklodekstryny w wyniku kompleksowania przedstawia tabela 2.31.

Zarówno struktury pochodnych acyklowiru, jak i cyklodekstryn pochodzą z bazy struktur krystalograficznych Cambridge [53,105,135]. Do badań wybrano niepodstawione cyklodekstryny β -CD i γ -CD, gdyż używane do badań podstawione cyklodekstryny nie miały ściśle określonej struktury (były tzw. „przypadkowo” podstawione), stąd trudno dobrać dla nich właściwą strukturę krystaliczną. Dane przedstawione w tabeli 2.31 wyznaczono na podstawie uśrednionych danych z 10 struktur o najniższej energii, wybranych spośród 100 struktur otrzymanych dla każdego z układów.

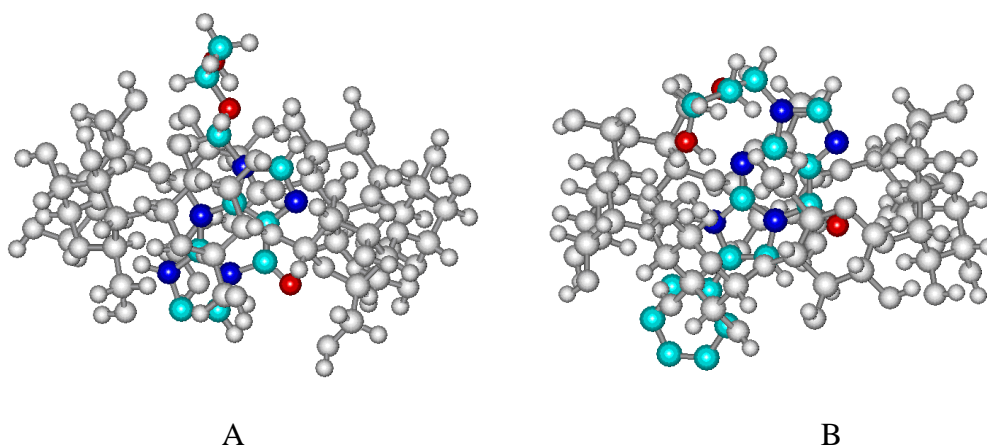
Tabela 2.31. Wielkości energii kompleksowania oraz zmiany powierzchni substancji biorących udział w powstawaniu kompleksu inkluzyjnego, wyznaczone na podstawie obliczeń metodami mechaniki molekularnej oraz dynamiki molekularnej.

	Substancja	CD	ΔE_{kom} (kJ mol ⁻¹)	ΔS_{kom} (Å ²)	ΔS_s (Å ²)	ΔS_{CD} (Å ²)
4	TACV	β-CD	-180.00	-377.2	278.9	179.8
6	2-Br-6-Me-TACV	β-CD	-173.42	-434.8	302.9	214.3
7	6-t-But-TACV	β-CD	-186.90	-517.9	342.4	243.0
8	6-Fe-TACV	β-CD	-184.36	-486.0	325.5	241.9
9	6-Fe-Fe-TACV	β-CD	-181.31	-512.3	338.6	261.7
11	6-Fe-O-Me-TACV	β-CD	-202.22	-491.1	345.0	253.1
11	6-Fe-O-Me-TACV	γ-CD	-143.17	-583.1	344.1	258.4
12	6-Naft- TACV	β-CD	-209.91	-536.1	362.4	249.4

Dane zawarte w tabeli 2.31 pokazują, że dla kompleksów β-cyklodekstryny z pochodnymi acyklowiru, które są przedmiotem tej pracy, większe wartości energii kompleksowania (ΔE_{kom}) otrzymano dla związków posiadających podstawniki aromatyczne. Wyjątkiem jest kompleks β-cyklodekstryny z 6-t-But-TACV, dla którego wartość energii kompleksowania jest zbliżona do wyznaczonej dla kompleksów pochodnych z podstawnikami aromatycznymi. Podobne zależności można zaobserwować analizując różnicę pomiędzy sumą powierzchni pojedynczych cząsteczek wchodzących w skład danego kompleksu inkluzyjnego oraz powierzchnią tego kompleksu (ΔS_{kom}). Sekwencja tych wartości nie jest idealnie zgodna z sekwencją wartości stałych trwałości kompleksów trojcyklicznych pochodnych acyklowiru z HP-β-CD, jednak ogólne zależności są podobne. Zarówno wyniki badań rozpuszczalnościowych jak i obliczenia pokazują, że silniej kompleksowane są tricykliczne pochodne acyklowiru posiadające podstawniki aromatyczne. Bardziej szczegółowe wnioski można by było podać w przypadku, gdyby badania eksperymentalne oraz symulacje matematyczne dotyczyły kompleksów pochodnych acyklowiru z tą samą cyklodekstryną. W naszym przypadku nie było to możliwe, gdyż struktura hydroksypropylo-β-cyklodekstryny (HP-β-CD), której używano podczas badań, nie była ściśle zdefiniowana. Cząsteczki β-cyklodekstryny (β-CD) oraz jej pochodnej hydroksypropylo-β-cyklodekstryny (HP-β-CD) są zbudowane z 7 jednostek glukozowych, czyli mają podobną wielkość luki makrocyklicznej,

Bardziej szczegółowe porównania, wyznaczonych na podstawie danych doświadczalnych wartości stałych trwałości kompleksów pomiędzy wybranymi pochodnymi acyklowiru i cyklodekstrynami oraz wartości energii kompleksowania i zmiany powierzchni gościa i gospodarza tworzących kompleks otrzymanych podstawie symulacji komputerowych byłyby możliwe gdyby obliczenia prowadzono dla tej samej cyklodekstryny. Cząsteczki β -cyklodekstryny i hydroksypropylo- β -cyklodekstryny są zbudowane z takiej samej liczby jednostek glukozowych i mają podobną wielkość luki makrocyklicznej, jednak selektywność tych dwu cyklodekstryn może być różna. Podstawniki hydroksypropylowe zwiększają głębokość luki cyklodekstrynowej co może ułatwiać kompleksowanie szczególnie „dłuższych cząsteczek”, takich, które mają podstawniki w pozycji para-, ale jednocześnie utrudniają kompleksowanym cząsteczkom dostęp do luki. Z wstępnych pomiarów eksperymentalnych wiadomo, że opisana w tej pracy grupa pochodnych acyklowiru, jest kompleksowana przez β -CD jednak stałe trwałości mają niższe wartości niż te wyznaczone dla HP- β -CD. Innym ważnym czynnikiem wpływającym na tworzenie się kompleksów inkluzyjnych cyklodekstryn w roztworach, a który nie został uwzględniony podczas modelowania jest obecność wody.

Jednak pomimo tych wszystkich uproszczeń, które zostały zastosowane podczas modelowania, w stosunku do układu rzeczywistego otrzymane rezultaty pokazują ogólne tendencje, które zostały zaobserwowane w układach rzeczywistych. Zarówno wartości energii kompleksowania jak i zmiany powierzchni są większe dla tych substancji, które mają wyższe stałe trwałości np. dla **6-Fe-O-Me-TACV** lub **6-Naft-TACV**. W przypadku zastosowania podstawionych cyklodekstryn o ściśle zdefiniowanej strukturze te zależności byłyby bardziej dokładne. Rysunek 2.30 pokazuje przykładowe struktury kompleksów otrzymane podczas modelowania .



Rys. 2.30. Struktury kompleksów **TACV** (A) i **6-Fe-TACV** (B) z β -CD otrzymane w wyniku obliczeń metodami mechaniki molekularnej oraz dynamiki molekularnej w próżni.

2.3.9 Wnioski

1. Tricykliczne pochodne acyklowiru mają niższą rozpuszczalność w wodzie niż acyklowir i gancyklowir, ale wyższą rozpuszczalność w 1-oktanolu. Wyjątkiem jest **6-Me-TACV**, która zachowuje się podobnie jak acyklowir i gancyklowir.
2. Rozpuszczalność tricyklicznych pochodnych acyklowiru w roztworach wodnych zależy od tego czy są podstawione i jakie mają podstawniki. Pochodne posiadające podstawniki alkilowe **2-Br-6-Me-TACV** oraz **6-t-But-TACV** mają podobną rozpuszczalność jak niepodstawiona **TACV**, a te posiadające podstawniki aromatyczne mają o rząd niższą rozpuszczalność w wodzie i roztworach wodnych.
3. Obecność hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP- β -CD) powoduje wzrost rozpuszczalności (C_s/C_o) badanych tricyklicznych pochodnych acyklowiru w roztworach wodnych. Dla pochodnych posiadających podstawniki alkilowe zwiększenie rozpuszczalności jest niewielkie i leży w granicach od 1.1 do 1.6 - w 25°C i przy stężeniu cyklodekstryny równym 2×10^{-2} (mol kg⁻¹). Dla pochodnych posiadających podstawniki aromatyczne wzrost rozpuszczalności jest większy; przy tym samym stężeniu cyklodekstryny leży w granicach od 2.1 do 8.1.
4. Wzrost rozpuszczalności pochodnych posiadających podstawniki aromatyczne wynika z powstawania kompleksów inkluzyjnych, w których podstawniki aromatyczne są zainkludowane wewnątrz luki cyklodekstryny.
5. Analizując dane dotyczące rozpuszczalności jednej z pochodnych acyklowiru **6-Fe-O-Me-TACV** w roztworach różnych cyklodekstryn można stwierdzić, że najwyższy wzrost (C_s/C_o) równy 4.8 dla pH = 5.5 i 5.07 dla pH = 7.0) osiągnięto stosując HP- β -CD, prawdopodobnie dzięki dobremu dopasowaniu cząsteczki **6-Fe-O-Me-TACV** do luki cyklodekstryny.
6. Z badań rozpuszczalności wynika również, że stosując inne podstawione β - i γ -cyklodekstryny otrzymujemy wzrost rozpuszczalności tej pochodnej (**6-Fe-O-Me-TACV**) w roztworach wodnych, co związane jest z tworzeniem się kompleksów inkluzyjnych.
7. Podczas badań rozpuszczalności pochodnych acyklowiru, prowadzonych w wodnych roztworach o pH = 5.5 i pH = 7.0 Zawierających cyklodekstryny, zaobserwowano, że rozpuszczalność różni się w niewielkim stopniu, co wynika ze zbliżonych wartości stopnia jonizacji tych substancji w obydwu roztworach.
8. W buforowanych roztworach cyklodekstryn, gdzie bufor został wcześniej nasycony 1-oktanołem, rozpuszczalność pochodnych acyklowiru jest znacznie niższa niż w przypadku nienasyconego 1-oktanołem. Wynika to z konkurencyjnego wiązania 1-oktanolu przez

cyklodekstrynę, co umożliwia uwalnianie tych substancji w organizmach żywych, np. w obecności lipidów.

9. Podczas badań ekstrakcyjnych stwierdzono, że zastosowanie wodnego roztworu cyklodekstryny jako fazy wodnej, powoduje dostarczenie dużo większej ilości danej pochodnej acyklowiru do fazy organicznej, którą był 1-oktanol, niż w przypadku zastosowania czystego buforu. Cyklodekstryna zwiększa rozpuszczalność w roztworze wodnym słabo rozpuszczalnych pochodnych acyklowiru, a jednocześnie na granicy faz łatwo uwalnia zainkludowaną pochodną acyklowiru do fazy 1-oktanolowej w wyniku konkurencyjnego kompleksowania 1-oktanolu.

9. Badania ^1H NMR potwierdzają tworzenie się kompleksów inkluzyjnych pomiędzy tricyklicznymi pochodnymi acyklowiru i HP- β -CD, przy czym oddziaływania pomiędzy kompleksowana pochodną, a cyklodekstryną są silniejsze dla pochodnych posiadających podstawniki aromatyczne.

10. Analiza DSC potwierdza istnienie kompleksów inkluzyjnych pomiędzy tricyklicznymi pochodnymi acyklowiru a HP- β -CD w stanie stałym. Podczas analizy kompleksów otrzymanych w wyniku odparowania roztworu cyklodekstryny, zawierającego jednocześnie daną pochodną acyklowiru, w badanym zakresie temperatur nie obserwujemy pików topnienia tej pochodnej, chociaż mieszanina fizyczna tych substancji zawiera takie piki.

11. Obliczenia optymalizacji struktur kompleksów pochodnych acyklowiru z cyklodekstrynami potwierdzają zależności otrzymane na podstawie danych doświadczalnych i pokazują, które substancje z grupy trojcyklicznych pochodnych acyklowiru są silniej wiązane przez cyklodekstryny o danej wielkości luki.

2.4 Podsumowanie

Substancje, które są przedmiotem pracy zostały zaprojektowane jako potencjalne leki antywirusowe [36]. W wyniku badań biologicznych potwierdzono ich aktywność antywirusowa w stosunku do szerokiej grupy wirusów [36], jednak ich wyjątkowo słaba rozpuszczalność w roztworach wodnych rzędu od 10^{-3} do 10^{-5} (mol kg^{-1}), powoduje niską absorpcję tych związków przez organizmy żywe i ogranicza zastosowanie w farmacji. Szczególnie dotyczy to substancji posiadających podstawniki aromatyczne, które często mają bardzo szeroką aktywność antywirusową tak jak np. **6-Fe-O-Me-TACV**. Zastosowanie cyklodekstryn, które są nieszkodliwe dla organizmów żywych umożliwia zwiększenie rozpuszczalności badanych pochodnych acyklowiru, co może skutkować skuteczniejszym dostarczeniem tego leku do komórek. Średnie wartości stałych trwałości powstających kompleksów inkluzyjnych wskazują, że mogą one łatwo uwalniać lek w organizmie, co jest bardzo korzystnym zjawiskiem. Przeprowadzone badania ekstrakcyjne pokazują, że takie uwalnianie jest wymuszone przez konkurencyjne kompleksowanie 1-oktanolu. Przeprowadzone badania dotyczyły tylko niewielkiej grupy cyklodekstryn, jednak nawet te wskazują na możliwość zastosowania tych związków w procesie przygotowania leków zawierających tricykliczne pochodne acyklowiru. W badaniach fizykochemicznych oraz biologicznych dotyczących opisanych tutaj związków oraz innych tricyklicznych pochodnych acyklowiru nie stosowano dotychczas cyklodekstryn, stąd część wyników eksperymentalnych opisanych w tej pracy została wykorzystana do opracowania zgłoszenia patentowego, które zostało już wstępnie zarejestrowane. Przedstawione powyżej wyniki badań eksperymentalnych i obliczeń zostały opublikowane w postaci 2 publikacji oraz jednego patentu. Były też przedmiotem 2 wystąpień konferencyjnych i 2 posterów, których listę zamieszczam poniżej.

Zgłoszenie patentowe

„Sposób zwiększania rozpuszczalności pochodnych acyklowiru”

Bożenna Golankiewicz², Małgorzata Koźbiał¹, Wojciech Zielenkiewicz¹, Paweł Gierycz¹.

¹Instytut Chemii Fizycznej PAN, ul Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

²Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Publikacje:

1. W. Zielenkiewicz, B. Golankiewicz, G.L. Perlovich, M. Koźbiał - „Aqueous Solubilities, Infinite Dilution Activity Coefficients and Octanol-water Partition Coefficients of Tricyclic Analogs of Acyclovir”, J. Solution Chem., 28 (1999) 731-745.

2. Wojciech Zielenkiewicz, Małgorzata Koźbiał, Bożenna Golankiewicz, Jarosław Poznański, "Enhancement of aqueous solubility of tricyclic acyclovir derivatives by their complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin." J. Therm. Anal. Cal. 101 (2010) 555-560.

Komunikaty:

1. B.Golankiewicz, M. Koźbiał, W. Zielenkiewicz „The Enhancement of Aqueous Solubility of Tricyclic Acyclovir Derivatives by Complexation with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin” na konferencji 20th International Conference on Chemical Thermodynamics” Warszawa 2008.

2. W. Zielenkiewicz, B.Golankiewicz, M. Koźbiał “Complexation study of tricyclic acyclovir derivatives by cyclodextrins “10th Conference on Calorimetry and Thermal Analysis of the Polish Society of Calorimetry and Thermal Analysis” Zakopane 2009

3. W. Zielenkiewicz, M.Koźbiał “Thermodynamic study of drug complexation “IV International Symposium On Medical Physics” Szczyrk 2009

Postery

1. W. Zielenkiewicz, M.Koźbiał“Solubility of tricyclic acyclovir derivatives in cyclodextrin solutions” prezentowany podczas 31st International Conference on Solution Chemistry, Innsbruck 2009.

2. Małgorzata Koźbiał, Paweł Gierycz “Thermodynamics studies of cyclodextrins inclusion complexes with bioactive tricyclic acyclovir derivative” - VI International Krutyň Summer School 2010, “SUPRAMOLECULAR CHEMISTRY IN MATERIALS SCIENCE” Krutyň 2010.

3. Literatura

1. Encyklopedia powszechna PWN, wyd.3, Warszawa 1987
2. W. Halota, M. Pawłowska, M. Andrejczyn, *Przegl. Epidemiol.* **58**, 2004, 405
3. G.B Elion, P.A. Furman, J.A.Fyfe, P.De Miranda, L. Beauchamp, H.J.Schaeffer, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 1977, 5716
4. H. J. Schaeffer, L. Beauchamp, P. De Miranda, G. B. Elion, D. Bauer, J. P. Collins, *Nature*, **272**, 1978, 583
5. H. H. Balfour, *N. Engl. J. Med.*, **340**, 1999, 1255
6. J. A. Fyfe, P. M. Keller, P. A. Furman R. L. Miller, G. B. Elion, *J. Biol. Chem.*, **253**, 1978, 8721
7. D. F. Smee, J.C. Martin, J. P. Verheyden, T. R. Matthews, *Antimicrob. Agents Chemoter.*, **23**, 1983, 676
8. G. B. Ellion, *Am. J. Med.*, **73**, 1982, 7
9. P. A. Furman, M. H. St. Clair, J.A. Fyfe, J. L. Rideout, P. M. Keller, G. B. Elion, *J. Virol.*, **32**, 1979, 72
10. A. K. Datta, B.M. Colby, J. E. Shaw, J. S. Pagano, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1980, 5163
11. T. Dzieciatkowski, A. Rola, A. Majewska, M. Solarska, M. Łuczak, *Post. Mikrobiol.*, **46**, 2007, 211
12. Y. Hamada, N. Nambu, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1975, 1205
13. O. I. Corrigan, C. T. Stanley, *J. Pharm. Pharmacol.*, **34**, 1982, 621
14. J. K. Podlewski, A. Chwalibogowska-Podlowska, R. Adamowicz: *Leki współczesnej terapii*. Wyd. XVIII. Warszawa: Split Trading, 2007. ISBN 83-85632-95-6
15. B. Bean, *Clin. Microbiol. Rev.*, **5**, 1992, 146
16. D. W. Kimberlin, *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, **3**, 2001, 224
17. L. M. Beauchamp, S. F. Onr, P. De Miranda, *Antivir. Chem. Chemother.*, **3**, 1992, 157
18. S. Safrin, L. Phan, *Antimicrob, Agents Chemother.* **37**, 1993, 2241
19. M. D. Moomaw, P. Cornea, R. C. Rathbun, K. A. Wendel, *Expert Rev. Anti, Infect. Ther.*, **1**, 2003, 283
20. A. Weinberg, B. J. Bate, H.B. Masters, A. Schneider, *Antimicrob. Agents Chemiother.*, **36**, 2002, 2037
21. B. S. Anand, J. Patel, A. K. Mitra, *J. Pharmacol. Experiment. Therap.*, **304**, 2003, 781
22. S. Weller, M. R. Blum, M. Doucette, T. Burnette, D. M. Cedeberg, P. Miranda,

- M. L. Smiley, 1993, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **54**, 1993, 595.
23. B. S. Anand, A. K. Mitra, *Pharm. Res.*, **19**, 2002, 1194
 24. K. R. Beutner, *Antiviral Research* **28**, 1995, 281
 25. L. Naesens, E. De Clercq, *Herpes*, **8**, 2001, 12
 26. R. S. Whitley, *Herpes*, **13**, 2006, 53
 27. M. Macchia, G. Antonelli, F. Calvani, V. Di Bussolo, F. Minutolo, E. Orlandini, R. Tesoro, O. Turriziani, *Il Farmaco* **55**, 2000, 104
 28. M. Baba, H. Tanaka, E. De Clercq, R. Pauwels, J. Balzarini, D. Schols, H. Nakashima, C.F. Perno, R.T. Walker, T. Miyasaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 1989, 1375.
 29. K. Danel, E. Larsen, E.B. Pedersen, B.F. Vestergaard, C. Nielsen, *J. Med. Chem.*, **39**, 1996, 2427.
 30. S. Yuasa, Y. Sadakata, H. Takashima, K. Sekiya, N. Inouye, M. Ubasawa, M. Baba, *Pharmacol.*, **44**, 1993, 895.
 31. G. Gosselin, J. L. Imbach, „Acyclovir derivatives as antiviral agents”, USA patent nr 5627185, zarejestrowany 6.05.1997.
 32. M. J. Robins, P.W. Hatfield, *Can. J. Chem.*, **60**, 1982, 547
 33. M. J. Robinson, P. W. Hatfield, J. Balzarini, E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, **27**, 1984, 1486
 34. E. Krawczyk, M. Łuczak, *Post. Mikrobiol.*, **44**, 2005, 239
 35. L. M. Beauchamp, B. L. Dolmatch, H. J. Schaeffer, P. Collins, D. J. Bauer, P.M. Keller, J. A. Fyfe, *J. Med. Chem.*, **28**, 1985, 982
 36. B. Golankiewicz, T. Ostrowski, *Antiviral Res.*, **71**, 2006, 134
 37. J. Boryski, B. Golankiewicz, E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, **34**, 1991, 2380
 38. B. Golankiewicz, T. Ostrowski, J. Boryski, E. De Clercq, *J. Chem. Soc. Perkin Trans., I* 1991, 589
 39. B. Golankiewicz, T. Ostrowski, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, **37**, 1994, 3187
 40. B. Golankiewicz, T. Ostrowski, T. Gośliński, P. Januszczak, J. Seidler, D. Baranowski, E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, **44**, 2001, 4284
 41. T. Goslinski, B. Golankiewicz, E. De Clercq, J. Balzarini, *J. Med. Chem.*, **45**, 2002, 5052
 42. T. Ostrowski, B. Golankiewicz, E. De Clercq, J. Balzarini, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 2005, 2089
 43. T. Ostrowski, B. Golankiewicz, E. De Clercq, J. Balzarini, *Bioorg. Med. Chem.*,

- 14**, 2006, 3535
44. T. Gośliński, B. Golankiewicz, , E. De Clercq, J. Balzarini, *J. Med. Chem.*, **45**, 2002, 5052
45. T. Gośliński, G. Wenska, B. Golankiewicz, J. Balzarini, E. De Clercq, *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* **22**, 2003, 911
46. G. Wenska, J. Koput, M. Insińska-Rak , B. Golankiewicz , T. Gośliński, T. Ostrowski, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **163**, 2004, 171
47. M. Plass, A. Kristl, M. H. Abraham, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**, 1999, 2641
48. A. Kristl *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **92**, 1996, 1721
49. A. Kristl, *J. Pharm. Sci.*, **88**, 1999, 109
50. A. Zielenkiewicz, G.L.Perlovich, B.Golankiewicz, *J. Therm. Anal. Cal.*, **54**, 1998, 237
51. A. Zielenkiewicz, B. Golankiewicz, W. Zielenkiewicz, *J. Sol. Chem.*, **30**, 2001, 575
52. A. Kristl, S. Srcic, F. Vrecer, B. Sustar, D.Vojnovic, *Int. J. Pharm.*, **139**, 1996, 231
53. K. Suwińska, B.Golankiewicz, W. Zielenkiewicz, *Acta Cryst.*, **C57**, 2001, 767
54. Yiguang Jin a, b, *, Yingxin Qiao b, Miao Li a, Ping Ai a, Xinpu Houb, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **42**, 2005, 45
55. J.Szejtli, *Cyclodextrin and their inclusion complexes*. Akademi Kiado, Budapest 1982.
56. H. Dodziuk, *Cyclodextrin and their complexes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA Weinheim.
57. K. A. Connors, *Chem. Rev.*, **97**, 1997,1325
58. K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, *Chem. Rev.*, **98**, 1998, 2045
59. J. Szejtli, *Chem. Rev.*, **98**, 1998,1743
60. T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1996, 1017
61. E.M.M. Del Valle, *Process Biochem.*, **39**, 2004, 1033
62. H. J. Schneider, F. Hacket, V. Rudiger, *Chem. Rev.*, **98**, 1998, 1755
63. F. Giordano, C. Novak, J.R. Moyano, *Termochim. Acta*, **380**, 2001, 123
64. C. de Brauer, M. P. Merlin, P. Germain, T. Guerandel, *J. Incl. Phen. and Macro. Chem.*, **37**, 2000, 75
65. M. Bilal, C. de Brauer, P. Claudy, P. Germain, J. M. Letoffe, *Termochim. Acta*, **249**, 1995, 63
66. A. Marini, V. Berbenni, G. Bruni, R. Riccardi, M. Villa, *J. Therm. Anal.*, **50**, 1997, 137
67. A. Marini, V. Berbenni, G. Bruni, V. Massarotti, P.Mustarelli, *J. Phys. Chem.*, **103**, 1995, 7532
68. Z. Ehen, F. Giordano, J. Sztatiz, L. Jicsinszky, Cs. Novák, *J. Therm. Anal. Cal.*,

69. A. Szafranek, J. Therm. Anal. Cal., **50**, 1997, 137
70. M. L. Origlia-Luster, T. G. Call, E. M. Woolley, J. Chem. Therm., **2001**, 33, 1587
71. L. Paduano, R. Sartorio, V. Vitagliano, L. Costantino, J. Sol. Chem., **19**, 1990, 72.
72. A. Bielejewska, M. Koźbiał, R. Nowakowski, K. Duszczyk, D. Sybilska, Anal. Chimica Acta, **300**, 1995, 201
73. L. Szente, J. Szejtli, Adv. Drug Delivery Rev., **36**, 1999, 17
74. K. Miyajima, T. Mukai, M. Nakagaki, M. Otargi, Bull. Chem. Soc. Jpn., **59**, 1986, 59
75. J. Frank, J. F. Holzwarth, W. Saenger, Langmuir **18**, 2002, 5974
76. G. Cardoso-Mohedano, S. Perez-Casas, J. Chem. Eng. Data, **49**, 2004, 1699
77. R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, R.K. Khar, AAPS Pharm. Sci. Tech., **6**, 2005, artykuł 43
78. V. J. Stella, R. A. Rajewski, Pharm. Res., **14**, 1997, 556
79. M. V. Rekharsky and Y. Inoue, Rev., **98**, 1998, 1875
80. S. Baboota, M. Dhaliwal, K. Kohli, AAPS Pharm. Sci. Tech., **6**, 2005, artykuł 14
81. M. E. Brewster, R. Vandecruys, J. Peeters, P. Neeskens, G. Verreckb, T Loftsson, Eur. J. Pharm. Sci., **34**, 2008, 94
82. J. Peeters, P. Neeskens, J.P. Tollenaere, P. Van Remoortere, M.E. Brewster. J. Pharm. Sci., **91**, 2002, 1414.
83. A. Magnusdottir, M. Masson and T. Loftsson J. Incl. Phenom. Macro. Chem., **44**, 2002, 213
84. J L. H. Johnson, Y. He, A. Jain, S. H. Yalkowsky, AAPS Pharm. Sci. Tech., **7**, 2006, artykuł 18
85. Y. He, P. Li, S. H. Yalkowsky, Intern. J. Pharm., **264**, 2003, 25
86. W. Zielenkiewicz, I. V. Terekhova, M. Koźbiał, M. Wszelaka-Rylik, R. S. Kumeev J. Phys. Org. Chem., **21**, 2008, 1859
87. W. Zielenkiewicz, I.V. Terekhova, M. Koźbiał, R.S. Kumeev, J. Therm. Anal. Cal., **101**, 2010, 595
88. K. Miyake, T. Irie, H. Arima, F. Hirayama, K. Uekama, M. Hirano, Y. Okamoto, Int. J. Pharm., **179**, 1999, 237
89. J. Taraszewska, K. Migut, M. Koźbiał, J. Phys. Org. Chem., **16**, 2003, 121
90. J. Taraszewska, M. Koźbiał, J. Incl. Phenom. Macrocylic. Chem., **53**, 2005, 155
91. W. Zielenkiewicz, I.V. Terekhova, M. Koźbiał, J. Poznański R.S. Kumeev, J. Phys. Org. Chem., **20**, 2007, 656
92. G. Zoppetti, N. Puppini, M. Pizzutti, A. Fini, T. Giovani, S. Comini, J. Incl. Phenom.

- Macrocycl. Chem., **57**, 2007, 283
93. N. Kasliwal, J. S. Negi, J. Incl. Phenom., 2011, DOI: 10.1007/s10847-011-9933-60
94. A. R. Hedges, Chem. Rev., **98**, 1998, 2035.
95. T. Loftsson, M. E. Brewster M. Masson, Am. J. Drug Deliv., **2**, 2004, 261
96. R. Singh, N. Bharti, J. Madan, S. N. Hiremath, J. Pharm. Sci. Tech., **2**, 2010, 171
97. W. Zhao, J. Chao, R. Du, S. Huang, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.,
2011, DOI 10.1007/s10847-011-9930-9
98. T. G. Anderson, A. Tan, P. Ganz, J. Seelig, Biochem., **43**, 2004, 2251
99. A. C. Illapakurthy, C. M. Wyandt, S. P. Stodghill, Eur. J. Pharm. Biopharm., **59**,
2005, 325
100. I. V. Terekhova, T. V. Volkova, G. L. Perlovich, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., **55**,
2006, 335
101. K. Balogh, N. Szaniszló, K. H-Otta, E. Fenyvesi, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.,
57, 2007, 457
102. A. M. C. Myles, D. J. Barlow, G. France, M. J. Lawrence, Biochim. Biophys. Acta, **1199**
1994, 27
103. T. Steiner, W. Saenger, Carbohydrate Research **275**, 1995, 73
104. T. Steiner, W. Saenger, Carbohydrate Research **282**, 1996, 53
105. C. Betzel, W. Saenger, B. E. Hingerty, G. M. Brown J. Am. Chem. Soc., **106**,
1984, 7545
106. K. Linder, and W. Saenger, Carbohydr. Res., **107**, 1982, 7
107. K. Harata, K. Uekama, M. Otagiri, F. Hirayama, Y. Oratai, Bull. Chem. Soc. Jpn.,
58, 1985, 1234
108. K. Harata, Bull. Chem. Soc. Jpn., **57**, 1984, 2596
109. K. Harata, Bull. Chem. Soc. Jpn., **55**, 1982, 2315
110. J. A. Hamilton, Carbohydr. Res., **142**, 1985, 21
111. J. A. Hamilton, M. N. Sabesan, L. K. Steinrauf, Carbohydr. Res., **89**, 1981, 33
112. J. A. Hamilton, M. N. Sabesan, Carbohydr. Res., **102**, 1982, 31
113. M. B. Hursthouse, C. Z. Smith, M. Thornton-Pett, J. H. P. Utlely, J. Chem. Soc. Chem.
Comm., 1982, 881
114. F. Nishioka, T. Nakanishi, K. Fujiwara, K. Tomita, J. Incl. Phenom., **2**, 1984, 701
115. J. A. Hamilton, M. N. Sabesan, Acta. Cryst. B38, 1982, 3063
116. T. Higuchi, K. A. Connors, Adv. Anal. Chem. Instrum., **4**, 1965, 117
117. K. A. Connors, Binding Constants. The measurement of Molecular Complex Stability.

John Willey & Sons, USA

118. P. Chaudhari, P. Sharma, N. Barhate, P. Kulkarni, C. Mistry, *Current Sci.*, **92**, 2007, 1586
119. A. Sule, L. Szente, F. Csempesz, *J. Pharm. Sciences*, DOI 10.1002/jps
120. M. E. Brewster, R. Vandecruys, J. Peeters, P. Neeskens, G. Verreckb, T. Loftsson, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **34**, 2008, 94
121. H. Hamada, K. Ishihara, N. Nakajima, *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 2006, 369
122. M. M. Al Omari · M. B. Zughul · J. E. D. Davies · A. A. Badwan, *J. Sol. Chem.*, **37**, 2008, 875
123. N. Ono, F. Hirayama, H. Arima, and K. Uekama, *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 2001, 78
124. Y. He, P. Li, S. H. Yalkowsky, *Int. J. Pharm.*, **264**, 2003, 25
125. T. Loftsson, D. Hreinsdottir, M. Masson, *Int. J. Pharm.*, **302**, 2005, 18
126. M. Masson, F. J. Karlsson, M. Valdimarsdottir, K. Magnusdottir, T. Loftsson, *J. Incl. Phenom. Macrocyc. Chem.*, **57**, 2007, 481.
127. Carlos von Plessing Rossel, Jacqueline Sepúlveda Carreño, Mario Rodríguez-Baeza, Joel Bernabé Alderete, *Química Nova*, **23**, 2000, 749
128. R. Świerzewski, J. Poznański, B. Golankiewicz, W. Zielenkiewicz, *J. Mol. Liq.*, **95**, 2002, 339
129. Javiana Luengo, Teobaldo Aranguiz, Jacqueline Sepulveda, Luis Hernandez, Carlos von Plessing, *J. Pharm. Sci.*, **91**, **2002**, 2593
130. E. Aicart, E. Junquera, *J. Incl. Phenom. Macrocyc. Chem.*, **47**, 2003, 161
131. T. Loftsson, *Acta, Pharm. Nord.*, **1**, 1989, 186
132. G. S. Tirucherai, A. K. Mitra, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **4**, 2003, Article 45
133. M. Chavanpatil, P.R. Vavia, *J. Inclusion Phenom. Macroc. Chem.*, **44**, 2002, 137
134. MestRe-C 2.3a Departamento de Química Organica, Universidad de Santiago de Compostela. www.mestrec.com (30.12.2010)
135. K. Harata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 1987, 2763
136. J. Alvarez, R. Biltonen, *Biopolymers*, **12**, 1973, 1828
137. L. Piela, *Idee chemii kwantowej*, PWN, Warszawa 2006

4. Załącznik

Załącznik zawiera dane korelacyjne prostych opisujących zależności stężenia danej pochodnej acyklowiru od stężenia cyklodekstryny.

Dane korelacyjne do rysunku 2.3.

dane pomiarowe	współrzędna przecięcia osi y (a)		współczynnik kierunkowy prostej (b)		R ²	Odchylenie standardowe
	wartość x 10 ⁻³	błąd Standardowy x 10 ⁻⁶	wartość x 10 ⁻²	błąd standardowy x 10 ⁻⁴	wartość	wartość x 10 ⁻⁶
C_{TACV} pH =5.5, 25°C	2,64	2.11	1,98	2.77	0.9993	4.85
C_{TACV} pH =5.5, 37°C	5,15	3.48	2,702	4.57	0.9990	8.00
C_{TACV} pH =7.0, 25°C	2,48	1.84	2,050	2.47	0.9995	4.22
C_{TACV} pH =7.0, 37°C	4,79	3.49	2,557	4.70	0.9988	8.01

Dane korelacyjne do rysunku 2.4.

dane pomiarowe	współrzędna przecięcia osi y (a)		współczynnik kierunkowy prostej (b)		R ²	Odchylenie standardowe
	wartość x 10 ⁻³	błąd standardowy x 10 ⁻⁶	wartość x 10 ⁻²	błąd standardowy x 10 ⁻⁴	wartość	wartość x 10 ⁻⁶
$C_{2-Br-6-MeTACV}$ pH =5.5, 25°C	1,18	2.55	2,657	3.35	0.9994	5.86
$C_{2-Br-6-MeTACV}$ pH =5.5, 37°C	2,35	7.31	5,938	9.58	0.9991	16.77
$C_{2-Br-6-MeTACV}$ pH =7.0, 25°C	1,03	2.81	2,565	3.79	0.9992	6.46
$C_{2-Br-6-MeTACV}$ pH =7.0, 37°C	2,02	5.15	3,231	6.94	0.9984	11.82

Dane korelacyjne do rysunku 2.6.

dane pomiarowe	współrzędna przecięcia osi y (a)		współczynnik kierunkowy prostej (b)		R ²	odchylenie standardowe
	wartość x 10 ⁻⁴	błąd standardowy x 10 ⁻⁶	wartość x 10 ⁻²	błąd standardowy x 10 ⁻⁴	wartość	wartość x 10 ⁻⁶
<i>C</i> _{6-Fe-TACV} pH =5.5, 25°C	1.86	7.87	2,215	8.83	0.99605	14.80
<i>C</i> _{6-Fe-TACV} pH =5.5, 37°C	3.27	7.29	3,566	8.17	0.9987	13.71
<i>C</i> _{6-Fe-TACV} pH =7.0, 25°C	2.50	4.39	2,601	5.17	0.9982	8.57
<i>C</i> _{6-Fe-TACV} pH =7.0, 37°C	3.35	7.83	3,595	9.21	0.99804	15.28

Dane korelacyjne do rysunku 2.7.

dane pomiarowe	współrzędna przecięcia osi y (a)		współczynnik kierunkowy prostej (b)		R ²	odchylenie standardowe
	wartość x 10 ⁻⁴	błąd standardowy x 10 ⁻⁶	wartość x 10 ⁻²	błąd standardowy x 10 ⁻⁴	wartość	wartość x 10 ⁻⁵
<i>C</i> _{6-Fe-Fe-TACV} pH =5.5, 25°C	2.18	8.01	2,146	9.67	0.9940	1.563
<i>C</i> _{6-Fe-Fe-TACV} pH =5.5, 37°C	5.03	6.11	2,983	7.38	0.9982	1.192
<i>C</i> _{6-Fe-Fe-TACV} pH =7.0, 25°C	2.65	9.08	2,839	10,5	0.9960	1.772
<i>C</i> _{6-Fe-Fe-TACV} pH =7.0, 37°C	5.95	6.97	3,892	8.03	0.9987	1.361

Dane korelacyjne do rysunku 2.8.

dane pomiarowe	współrzędna przecięcia osi y (a)		współczynnik kierunkowy prostej (b)		R ²	odchylenie standardowe
	wartość x 10 ⁻⁵	błąd standardowy x 10 ⁻⁶	wartość x 10 ⁻²	błąd standardowy x 10 ⁻⁴	wartość	wartość x 10 ⁻⁶
<i>C</i> ₆ -Naft-TACV pH =5.5. 25°C	2.99	1.58	0.879	1.84	0.9987	3.08
<i>C</i> ₆ -Naft-TACV pH =5.5. 37°C	3.37	1.42	0.934	1.65	0.9991	2.77
<i>C</i> ₆ -Naft-TACV pH =7.0. 25°C	3.05	1.65	0.941	1.92	0.9988	3.21
<i>C</i> ₆ -Naft-TACV pH =7.0. 37°C	4.29	1.91	1.289	2.23	0.9991	3.72

Dane korelacyjne do rysunku 2.9.

dane pomiarowe	współrzędna przecięcia osi y (a)		współczynnik kierunkowy prostej (b)		R ²	Odchylenie standardowe
	wartość x 10 ⁻⁵	błąd standardowy x 10 ⁻⁶	wartość x 10 ⁻²	błąd standardowy x 10 ⁻⁴	wartość	wartość x 10 ⁻⁶
<i>C</i> ₆ -Fe-O-Me-TACV pH =5.5, 25°C	5.23	1.97	1.001	2.29	0.9984	3.84
<i>C</i> ₆ -Fe-O-Me-TACV pH =5.5, 30°C	6.72	1.64	1.086	1.91	0.9991	3.20
<i>C</i> ₆ -Fe-O-Me-TACV pH =5.5, 35°C	8.49	1.70	1.245	1.98	0.9993	3.23
<i>C</i> ₆ -Fe-O-Me-TACV pH =5.5, 37°C	9.95	1.23	1.418	1.43	0.9997	2.40
<i>C</i> ₆ -Fe-O-Me-TACV pH =5.5, 45°C	12.794	1.92	1.621	2.24	0.9994	3.76

Dane korelacyjne do rysunku 2.11.

dane pomiarowe	współrzędna przecięcia osi y (a)		współczynnik kierunkowy prostej (b)		R ²	Odchylenie standardowe
	wartość x 10 ⁻⁵	błąd standardowy x 10 ⁻⁶	wartość x 10 ⁻²	błąd standardowy x 10 ⁻⁴	wartość	wartość x 10 ⁻⁶
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH =7.0, 25°C	5.68	0.86	1.061	1.00	0.9997	1.67
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH =7.0, 30°C	7.89	1.69	1.176	1.96	0.9992	3.30
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH =7.0, 35°C	10.27	1.51	1.279	1.75	0.9994	2.95
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH =7.0, 37°C	13.67	0.96	1.295	1.12	0.9998	1.88
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH =7.0, 45°C	19.41	1.51	1.291	1.75	0.9995	2.95

Dane korelacyjne dane korelacyjne do rysunku 2.13.

dane pomiarowe	współrzędna przecięcia osi y (a)		współczynnik kierunkowy prostej (b)		R ²	Odchylenie standardowe
	wartość x 10 ⁻⁵	błąd standardowy x 10 ⁻⁷	wartość x 10 ⁻³	błąd standardowy x 10 ⁻⁵	wartość	wartość x 10 ⁻⁶
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH=5.5, 25°C	4.93	5.353	5.72	9.63	0.9993	0.87
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH=5.5, 37°C	10.04	7.64	7.59	13.73	0.9992	1.24
<i>C</i> _{6-F-O-Me-TACV} pH=7.0, 25°C	5.60	2.43	5.83	4.37	0.9999	0.40
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH=7.0, 37°C	12.87	7.93	6.48	1.43	0.9988	1.29

Dane korelacyjne dane korelacyjne do rysunku 2.14.

dane pomiarowe	współrzędna przecięcia osi y (a)		współczynnik kierunkowy prostej (b)		R ²	odchylenie standardowe
	wartość x 10 ⁻⁵	błąd standardowy x 10 ⁻⁶	wartość x 10 ⁻²	błąd standardowy x 10 ⁻⁴	wartość	wartość x 10 ⁻⁶
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH = 5.5, 25°C	5.16	2.03	0.915	2.53	0.9977	3.92
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH = 5.5, 37°C	11.44	1.31	1.285	16.34	0.9995	2.53
<i>C</i> _{6-F-O-Me-TACV} pH = 7.0, 25°C	5.39	1.13	0.474	14.13	0.9974	2.19
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH = 7.0, 37°C	10.97	0.90	0.903	1.12	0.9995	1.74

Dane korelacyjne dane korelacyjne do rysunku 2.15.

dane pomiarowe	współrzędna przecięcia osi y (a)		współczynnik kierunkowy prostej (b)		R ²	odchylenie standardowe
	wartość x 10 ⁻⁵	błąd standardowy x 10 ⁻⁶	wartość x 10 ⁻²	błąd standardowy x 10 ⁻⁴	wartość	wartość x 10 ⁻⁶
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH = 5.5, 25°C	5.72	0.63	0.619	0.80	0.9995	1.22
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH = 5.5, 37°C	12.17	13.46	1.207	1.72	0.9994	2.63
<i>C</i> _{6-F-O-Me-TACV} pH = 7.0, 25°C	5.23	0.71	1.013	0.90	0.9998	1.38
<i>C</i> _{6-Fe-O-Me-TACV} pH = 7.0, 37°C	12.90	2.7	1.531	2.65	0.9991	4.05



B. 432/11

F-B.432/11



90000000160899