



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Viktor Škorjanc

**Kinetika otpuštanja hidroklorida
4-aminosalicilne kiseline iz biološki
prihvatljivih pH-ovisnih 4-pikolilamidnih
hidrogelatora male molekulske mase**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Tajane Preočanin u Laboratoriju za supramolekularnu kemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković pod komentorstvom doc. dr. sc. Tomislava Portade i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

Rad je izrađen u okviru projekata Hrvatske zaklade za znanost IP-2014-09-6972, Električno nabijanje međupovršina na granici čvrsta faza/vodena otopina elektrolita (voditeljica: prof. Tajana Preočanin) i IP-2018-01-6910, Sinteza supramolekulskih samoudruženih nanostrukture za izgradnju naprednih funkcionalnih materijala (voditelj: prof. dr. sc. Leo Frkanec).

Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu

PAS	4-aminosalicilna kiselina (<i>p</i> -aminosalicilna kiselina)
MAP	3-aminofenol (<i>m</i> -aminofenol)
UV	ultraljubičasto
Vis	vidljivo
MDR	rezistentni prema više lijekova (multi-drug resistant)
XDR	ekstenzivno rezistentni (extensively drug resistant)
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
DCC	<i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid
Boc	<i>tert</i> -butoksikarbonil
Me	metilna skupina
Et	etilna skupina
Ac	acetilna skupina
Ph	fenilna skupina
Bn	benzilna skupina

Sadržaj

§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Vrste gelatora.....	2
2.2. Kontrolirano otpuštanje aktivne tvari.....	2
2.3. Kinetika otpuštanja aktivne tvari.....	3
2.3.1. Model Ritgera i Peppasa.....	4
2.3.2. Weibullova raspodjela.....	5
2.3.3. Model Hellera i Bakera.....	5
2.4. Tuberkuloza.....	7
2.5. 4-aminosalicilna kiselina.....	9
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. Sinteza <i>N</i>-acilaminokiselina (1a–f).....	10
3.1.1. <i>N</i> -heptanoil- <i>D</i> -fenilglicin (1a).....	11
3.1.2. <i>N</i> -oktanoil- <i>D</i> -fenilglicin (1b).....	11
3.1.3. <i>N</i> -nonanoil- <i>D</i> -fenilglicin (1c).....	11
3.1.4. <i>N</i> -heptanoil- <i>L</i> -fenilalanin (1d).....	11
3.1.5. <i>N</i> -oktanoil- <i>L</i> -fenilalanin (1e).....	12
3.1.6. <i>N</i> -nonanoil- <i>L</i> -fenilalanin (1f).....	12
3.2. Boc-zaštićivanje 11-aminoundekanske kiseline.....	12
3.3. Priprava <i>tert</i>-butil-<i>N</i>-(10-[[piridin-4-il]metil]karbamoil)decil)karbamata.....	13
3.4. Uklanjanje Boc- zaštite sa spoja 3.....	13
3.5. Kondenzacija <i>N</i>-acilaminokiselina i 11-amino-<i>N</i>-(piridin-4-ilmetil)undekanamida.....	14
3.5.1. 11-(<i>N</i> -heptanoil- <i>D</i> -fenilglicilamino)- <i>N</i> -(piridin-4-ilmetil)undekanamid (5a).....	14
3.5.2. 11-(<i>N</i> -nonanoil- <i>D</i> -fenilglicilamino)- <i>N</i> -(piridin-4-ilmetil)undekanamid (5c).....	14
3.5.3. 11-(<i>N</i> -oktanoil- <i>D</i> -fenilglicilamino)- <i>N</i> -(piridin-4-ilmetil)undekanamid (5b).....	15
3.5.4. 11-(<i>N</i> -heptanoil- <i>L</i> -fenilalanilamino)- <i>N</i> -(piridin-4-ilmetil)undekanamid (5d).....	16
3.5.5. 11-(<i>N</i> -oktanoil- <i>L</i> -fenilalanilamino)- <i>N</i> -(piridin-4-ilmetil)undekanamid (5e).....	16
3.5.6. 11-(<i>N</i> -nonanoil- <i>L</i> -fenilalanilamino)- <i>N</i> -(piridin-4-ilmetil)undekanamid (5f).....	17
3.6. Priprava hidroklorida.....	17
3.7. Kinetika otpuštanja PAS iz hidrogela.....	17
3.7.1. UV-Vis spektri aktivne tvari, nusprodukta njenog raspada i gelatora.....	17
3.7.2. Baždarni dijagram.....	18
3.7.3. Kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela.....	18

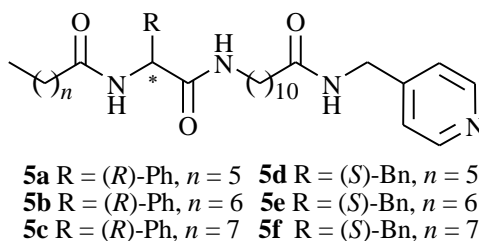
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Sinteza biološki prihvatljivih pH-ovisnih 4-pikolilamidnih hidrogelatora male molekulske mase	20
4.2. Kinetika otpuštanja PAS·HCl.....	22
4.2.1. UV-Vis spektri aktivne tvari, nusprodukta njezinog raspada i gelatora.....	22
4.2.2. Mjerenja kinetike otpuštanja	25
4.2.3. Primjena kinetičkih modela.....	30
§ 5. ZAKLJUČAK	38
§ 6. ZAHVALE.....	39
§ 7. POPIS LITERATURE	40
§ 8. DODATAK	XV
SAŽETAK.....	XVIII
SUMMARY.....	XIX

§ 1. UVOD

Iako su prvi lijekovi za tuberkulozu otkriveni prije više od 60 godina tuberkuloza je danas vodeći uzročnik smrti od jednog patogena, kotirajući iznad HIV-a.¹ Pojava sojeva uzročnika tuberkuloze otpornih na antibiotike (multi drug resistant, MDR) znatno je otežala borbu protiv ove bolesti.² 4-aminosalicilna kiselina (*p*-aminosalicilna kiselina, PAS) koristila se za liječenje tuberkuloze još od 1940-ih, no s vremenom su je iz uporabe istisnuli potentniji lijekovi. Pojavom MDR sojeva PAS se je ponovno počeo upotrebljavati u medicinske svrhe.³

PAS nije stabilan pri povišenoj temperaturi ili u vodenoj otopini pri $1,3 < \text{pH} < 5,3$. U tim uvjetima dolazi do dekarboksilacije PAS, čime nastaje 3-aminofenol (*m*-aminofenol, MAP), potencijalno otrovan spoj.⁴ PAS se najčešće unosi oralno i zbog toga je bitno spriječiti otpuštanje PAS u želudcu, gdje pH varira između 1,0 i 2,5⁵ te bi moglo doći do neželjenog nastanka MAP.

U sklopu ovog rada optimizirana je sinteza tri poznata biološki prihvatljiva pH-ovisna 4-pikolilamidna hidrogelatora male molekulske mase⁶ te su sintetizirana tri nova, strukturno slična spoja. 4-pikolilamidna podjedinica sintetiziranih spojeva protonira se u kiselim uvjetima ($\text{p}K_a \approx 2,8$). Protonirani oblik gelatora može tvoriti gel, dok deprotonirani ne može, što čini te hidrogelatore pH-ovisnima. Nakon što su željeni spojevi sintetizirani, UV-Vis spektroskopijom je praćena kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogelova sintetiziranih hidrogelatora pri $\text{pH} = 1,1$ i $\text{pH} = 7,2$. Na dobivene su rezultate primijenjeni matematički modeli kako bi se dobio uvid u mehanizam otpuštanja aktivne tvari.



Slika 1.1. Opća formula 4-pikolilamidnih hidrogelatora

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Vrste gelatora

Gel se definira kao nefluidna koloidna ili polimerna mreža građena od gelatora, (tvari koja može tvoriti gel), koja je cijelim volumenom prožeta fluidom.⁷

Gelatori se mogu klasificirati obzirom na njihovo porijeklo, konstituciju, vrstu interakcija koje tvore 3D mrežu molekula gelatora i medij koji geliraju. Prema porijeklu, gelatori se dijele na prirodne i sintetske. Većina prirodnih gelatora je makromolekulska i tvori gel međumolekulskim interakcijama, najčešće vodikovim vezama. Tu se ubrajaju tvari poput želatine, kolagena i agara.

Sintetski se gelovi, s obzirom na konstituciju, dijele na makromolekulske (polimerne) i molekulske. Makromolekule mogu tvoriti gelove kemijskim unakrsnim vezanjem ili fizičkim interakcijama. Gelovi nastali zahvaljujući snažnim kemijskim vezama ne mogu se ponovno otopiti, termalno su ireverzibilni (poliester, poliamid, polietilen...), dok su gelovi nastali slabim nekovalentnim interakcijama reverzibilni (poliakrilat, polimetakrilat...).

Gelovi nastali pomoću molekula male molekulske mase nazivaju se i supramolekulski gelovi. Molekule gelatora u supramolekulskom gelu udružene su raznim nekovalentnim interakcijama, poput vodikove veze, π - π -interakcija, hidrofobnih interakcija i van der Waalsovih sila. Supramolekulski gelovi u pravilu su termalno reverzibilni. Zagrijavanjem dolazi do pucanja slabih nekovalentnih interakcija i prelaska gela u sol.⁸

S obzirom na medij koji je geliran, gelovi se dijele na aerogelove, hidrogelove i organogelove, u kojima su fluidi koji tvore gel redom plin, voda i organska tekućina. Kserogel se sastoji od mreže gelatora iz koje je uklonjen sav gelirani medij.⁷

2.2. Kontrolirano otpuštanje aktivne tvari

Zbog nestabilnosti ili štetnosti aktivne tvari ili radi osiguravanja dovoljne koncentracije često je bitno da se aktivna tvar otpusti na ispravnoj lokaciji ili u ispravnome trenutku. U tu svrhu se razvijaju različiti sustavi za kontrolirano otpuštanje. U idealnom slučaju aktivna tvar prenosila bi se sustavom koji može detektirati signal uzrokovan bolešću i, s obzirom na intenzitet signala, otpustiti potrebnu količinu aktivne tvari. Kod takvog sustava brzina otpuštanja aktivne tvari bila bi povezana s fiziološkom potrebom mehanizmom povratne sprege.⁹

Hidrogelovi se intenzivno koriste u sustavima za kontrolirano otpuštanje aktivne tvari. Njihova uloga, između ostalog, može biti zaštita aktivne tvari od djelovanja kiseline ili utjecaja enzima. Do promjene strukture hidrogela, a time i različite brzine otpuštanja aktivne tvari, može doći zbog brojnih fizikalnih i kemijskih stimulansa. U fizikalne stimulanse ubrajaju se temperatura, električno polje, sastav otapala, svjetlo, tlak, zvuk i magnetsko polje, dok u kemijske stimulanse spadaju pH, ioni i molekulske prepoznavanje. Hidrogelovi osjetljivi na okolinu nazivaju se i *pametni* hidrogelovi.¹⁰ Hidrogelatori ovisni o pH redovito sadrže kisele (npr. karboksilna, sulfonska) ili bazične (npr. amino) skupine koje mogu primiti ili otpustiti proton uslijed promjene pH okoline.¹¹

2.3. Kinetika otpuštanja aktivne tvari

Na kinetiku otpuštanja aktivne tvari utječu fizikalni procesi (bubrenje matrice), fizikalno-kemijski procesi (erozija matrice, otapanje i rekristalizacija aktivne tvari, prijenos aktivne tvari (difuzija i konvekcija) i interakcija aktivne tvari s okosnicom matrice) i parametri sustava (početna raspodjela i koncentracija aktivne tvari unutar matrice, oblik matrice i njezine dimenzije). U različitim sustavima različiti će procesi imati prevladavajući utjecaj na kinetiku otpuštanja aktivne tvari.

Proces bubrenja karakterističan je za hidrofilne polimerne matrice. Taj se proces odvija na dodirnoj površini matrice s tekućom fazom. Zbog razlike u koncentraciji otapala u sustavu i izvan njega dolazi do prodiranja otapala u sustav i, posljedično, njegovog bubrenja. Otapalo prodire u matricu, mijenjajući njezinu strukturu, sve dok se ne uspostavi ravnoteža. Fizikalna veličina kojom se opisuje vrijeme potrebno za uspostavu ravnoteže naziva se relaksacijsko vrijeme, t_r , koje za pojedini sustav ovisi o koncentraciji otapala u matrici i temperaturi. Proces bubrenja nije trenutni, već se odvija gradijentno od vanjskih prema unutarnjim dijelovima sustava. Kinetika bubrenja, kao i ravnotežno stanje, definirani su razlikom u kemijskom potencijalu otapala u matrici i tekućoj fazi te viskoelastičnim opiranjem sustava povećanju volumena. Aktivna se tvar najčešće dostavlja u krutom obliku, zbog čega je bubrenje matrice (i otapanje aktivne tvari u otapalu) glavni pokretač otpuštanja u velikom broju sustava za otpuštanje aktivne tvari.¹²

Dok bubrenje izaziva povećanje volumena sustava, erozija može voditi do njegovog smanjenja. Erozijsku matricu mogu izazvati i fizikalni, i kemijski procesi, a matrica može erodirati površinski (heterogeno) i unutar materijala (homogeno).¹³ U slučaju površinske erozije, do erozije dolazi samo u vanjskom dijelu matrice, izloženom tekućoj fazi, dok u slučaju erozije

unutar materijala do erozije dolazi unutar cijele matrice degradacijom njene okosnice (npr. hidrolitički ili enzimski). Do površinske erozije može doći i zbog fizikalnih procesa. Tako npr. kod unakrsno umreženih polimernih sustava površinska erozija može jednostavno podrazumijevati „otpetljavanje“ umreženih lanaca.¹⁴

Prijenos aktivne tvari kroz matricu može biti uzrokovan difuzijom i konvekcijom. Konvekcija je najizraženija kod sustava kod kojih bubrenje ima značajnu ulogu, kao i kod sustava kod kojih dolazi do nastanka osmotskog tlaka, dok je difuzija glavni mehanizam prijenosa u ostalim slučajevima. Na brzinu difuzije aktivne tvari utječu razni parametri. Tako npr. unutarnja neuređenost matrične okosnice ima značajan utjecaj na brzinu otpuštanja aktivne tvari. U slučaju velike unutarnje neuređenosti, okosnica matrice može poprimiti fraktalnu geometriju koja značajno usporava difuziju aktivne tvari, a time i njezino otpuštanje.¹⁵ Fizikalne i kemijske interakcije okosnice matrice i aktivne tvari također imaju bitnu ulogu u određivanju brzine otpuštanja aktivne tvari. Tako difuzija aktivne tvari ovisi i o umreženosti sustava, veličini molekula aktivne tvari kao i o veličini pora unutar okosnice matrice,¹⁶ a svi ti parametri utječu na veličinu difuzijskog koeficijenta, D .¹⁷

Velik broj matematičkih modela predložen je kako bi se pobliže opisala mjerenja kinetike otpuštanja aktivne tvari iz različitih sustava. Primjena matematičkih modela na eksperimentalne podatke, kao i razvoj novih, sofisticiranijih modela omogućuje dublji uvid u procese koji utječu na brzinu otpuštanja aktivne tvari. K tome, primjena matematičkih modela omogućuje predviđanje kinetike otpuštanja iz sustava koji dosad nisu pripremljeni, što omogućuje ciljanu pripremu sustava za kontrolirano otpuštanje aktivne tvari.

Kontrolirano otpuštanje područje je koje se, zahvaljujući primjeni u farmaceutskoj industriji, intenzivno razvija te postoji velik broj preglednih članaka koji temeljito opisuju matematičke modele koji se primjenjuju za opis kinetike otpuštanja aktivne tvari. U literaturnom pregledu opisana su tri modela koja su primijenjena u ovom istraživanju prilikom obrade eksperimentalnih podataka.

2.3.1. Model Ritgera i Peppasa

Ritger i Peppas (1987.) predložili su jednostavnu empirijsku jednadžbu za opis kinetike otpuštanja aktivne tvari iz tanke plohe:¹⁸

$$\frac{\gamma}{\gamma_{\infty}} = kt^n \quad (1)$$

Pri čemu γ predstavlja trenutnu masenu koncentraciju aktivne tvari, γ_∞ ravnotežnu koncentraciju aktivne tvari, k konstantu koja ovisi o svojstvima sustava, a n difuzijski eksponent koji upućuje na mehanizam otpuštanja aktivne tvari. U slučaju da je $n = 0,5$, kinetika otpuštanja prati Fickove zakone difuzije te je difuzija aktivne tvari glavni pokretač njenog otpuštanja, dok za $n > 0,5$ kinetika otpuštanja odstupa od istih. Predložena empirijska jednadžba vrijedi kada je udio otpuštene aktivne tvari malen, odnosno $\gamma / \gamma_\infty \leq 0,6$, te za idealne uvjete otpuštanja. Eksperimentalni uvjeti mogu se aproksimirati idealnim ako je koncentracija aktivne tvari u tekućoj fazi dovoljno mala da ne utječe na brzinu otpuštanja. tj. ako je koncentracija aktivne tvari mnogo manja od koncentracije u zasićenoj otopini.

Ritger i Peppas pokazali su da u slučaju da je $n = 0,5$, rješavanjem Fickovih jednadžbi difuzije za tanku plohu i uvođenjem određenih pojednostavljenja može izvesti jednadžba:¹⁸

$$\frac{\gamma}{\gamma_\infty} = \frac{4}{l} \left(\frac{Dt}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

koja je također primjenjiva samo za vrijednosti $\gamma / \gamma_\infty \leq 0,6$. D je difuzijski koeficijent, za koji se pretpostavlja da je konstantan, a l je debljina plohe iz koje se aktivna tvar otpušta.

2.3.2. Weibullova raspodjela

Sigmoidni oblik krivulje otpuštanja aktivne tvari karakterističan je za sustave kod kojih, pored difuzije, erozija ima bitan utjecaj na kinetiku otpuštanja. Takvi sustavi mogu se opisati Weibullovom raspodjelom, čiju je upotrebu za opis kinetike otpuštanja aktivne tvari predložio Langenbucher (1972):^{19,20}

$$\frac{\gamma}{\gamma_\infty} = 1 - e^{-\frac{(t-t_{lag})^b}{t_{scale}}} \quad (3)$$

gdje je t_{lag} vrijeme potrebno da se aktivna tvar započne otpuštati, t_{scale} vrijeme potrebno da se otpusti 63,2 % aktivne tvari, a b je parametar koji karakterizira oblik krivulje. Ako je $b = 1$ radi se o eksponencijalnoj krivulji, za $b < 1$ riječ je o paraboličnoj krivulji, a za $b > 1$ riječ je o sigmoidnoj krivulji.

2.3.3. Model Hellera i Bakera

Heller i Baker²¹ predložili su jednostavan mehanistički model za opis sustava u kojem homogena erozija matrice i difuzija aktivne tvari imaju najveći utjecaj na kinetiku otpuštanja aktivne tvari. Svoj opis difuzije aktivne tvari iz pločaste polimerne matrice koja erodira hidrolitičkim cijepanjem polimerne okosnice zasnivaju na Higuchijevom modelu²² koji opisuje brzinu otpuštanja aktivne tvari difuzijom:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{A}{2} \sqrt{\frac{2Pc_0}{t}} \quad (4)$$

gdje je m masa otpuštene aktivne tvari, A površina obiju ploha polimera, c_0 početna koncentracija aktivne tvari u polimeru i P permeabilnost polimera prema aktivnoj tvari. Integriranjem ove jednadžbe dobiva se izraz analogan izrazu (2) za ovisnost udjela otpuštene aktivne tvari o vremenu kada difuzija aktivne tvari prati Fickove zakone difuzije.

U polimeru koji erodira situacija je nešto kompliciranija jer se permeabilnost polimera mijenja u ovisnosti o vremenu. Ta se ovisnost teško daje opisati, ali se može uvesti jednostavna pretpostavka prema kojoj je permeabilnost obrnuto proporcionalna broju veza koje se mogu hidrolitički pocijepati:

$$\frac{P}{P_0} = \frac{N}{N - Z} \quad (5)$$

ovdje je P_0 početna permeabilnost, N početni broj veza koji se može hidrolitički pocijepati, a Z broj veza koji je puknuo. U sljedećem koraku pretpostavlja se da brzina pucanja veza prati kinetiku prvog reda te je proporcionalna preostalom broju veza koje mogu puknuti:

$$\frac{dZ}{dt} = k(N - Z) \quad (6)$$

ovdje je k koeficijent brzine reakcije prvog reda. Integriranjem ovog izraza dobiva se izraz:

$$kt = \ln\left(\frac{N}{N - Z}\right) \quad (7)$$

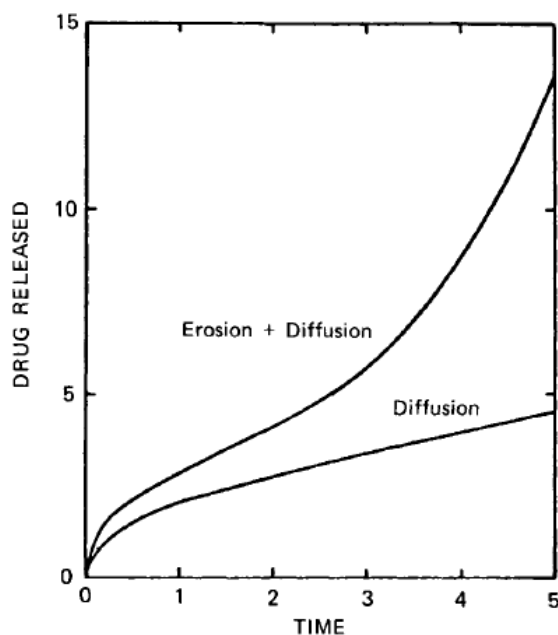
Povezivanjem jednadžbi (5) i (7) dobiva se izraz:

$$P = P_0 e^{kt} \quad (8)$$

Uvrštavanjem tog izraza u Higuchijev model dobiva se izraz Hellera i Bakera za brzinu otpuštanja aktivne tvari difuzijom iz pločaste polimerne matrice koja hidrolitički erodira:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{A}{2} \sqrt{\frac{2P_0 e^{kt} c_0}{t}} \quad (9)$$

Crtež integriranog oblika ove jednadžbe, zajedno s integriranim oblikom Higuchijevog modela, prikazan je na slici 2.1.



Slika 2.1. Teoretska krivulja za otpuštanje aktivne tvari iz tanke plohe difuzijom prema Higuchijevom modelu i difuzijom uz eroziju prema modelu Hellera i Bakera. Preuzeto iz ref. 21.

~

4-aminosalicilna kiselina odabrana je kao modelna aktivna tvar za praćenje kinetike otpuštanja iz hidrogela pri različitim pH zato što se u kiselom raspada na nepoželjni nusprodukt, 3-aminofenol, pa je poželjno spriječiti njezino otpuštanje u želudcu. Danas se PAS ponajprije koristi kao lijek za tuberkulozu izazvanu sojevima otpornim na lijekove prvog izbora. Stoga će u sljedeća dva potpoglavlja biti riječi o tuberkulozi i PAS.

2.4. Tuberkuloza

Mikobakterije *Myobacterium tuberculosis*, zajedno s *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* i *M. canetti* sačinjavaju kompleks *M. tuberculosis* i najčešći su uzročnik tuberkuloze. Iako su sve članice kompleksa *M. tuberculosis* obligatni patogeni te izazivaju tuberkulozu, one pokazuju različita fenotipska svojstva i parazitiraju na različitim domaćinima.²³ Bolest najčešće zahvaća pluća (pulmonarna tuberkuloza), no može zahvatiti i druge organe (ekstrapulmonarna tuberkuloza).¹ Simptomi uključuju one vezane uz specifični dio tijela zahvaćen bolešću, kao i nespecifične simptome poput vrućice, gubitka na masi i noćnog znojenja.²⁴ Pulmonarna tuberkuloza popraćena je i kroničnim kašljem, iskašljajem i hemoptizom.²⁵ Bolest se širi zrakom, preko osoba zaraženih pulmonarnom tuberkulozom. U više od 90 % zaraženih osoba patogen je sadržan kao asimptomatska latentna infekcija.

Procjenjuje se kako je vjerojatnost aktivne bolesti 5 % 18 mjeseci nakon zaraze i 5 % ostatak života. Oko 1,7 milijardi, 23 % svjetskog stanovništva ima latentnu infekciju i u riziku je od aktivacije.¹

Tuberkuloza je usko povezana s prenapučenošću i nedovoljnom ishranom, zbog čega se naziva bolešću siromašnih.^{24,26} Među ugrožene skupine spadaju HIV-pozitivne osobe, koje imaju dvadesetak puta veću vjerojatnost od zaraze,²⁷ dijabetičari, koji imaju oko tri puta veću vjerojatnost od zaraze^{28,29} i pušači s ugrubo dvostruko većom vjerojatnošću od zaraze tuberkulozom.^{30,31} Drugi faktori, poput intenzivne konzumacije alkohola,³² nedostatka vitamina D³³ i silikoze³⁴ također povećavaju rizik od obolijevanja. Oko 90 % slučajeva otpada na odrasle osobe. Među odraslom populacijom, omjer oboljelih muškaraca i žena iznosi približno 2 : 1.¹

Tijekom 19. stoljeća tuberkuloza je bila uzročnik i do 25 % smrtnih slučajeva u Europi. Društvenim i ekonomskim razvojem broj smrtnih slučajeva pao je do te mjere da se tuberkuloza u nekim dijelovima svijeta smatra bolešću prošlosti.²⁴ Ipak, iako su prvi lijekovi za tuberkulozu otkriveni prije više od 60 godina, tuberkuloza je danas vodeći uzročnik smrti od jednog patogena, kotirajući iznad HIV-a.¹ 2017. godine 1,3 milijuna ljudi preminulo je od tuberkuloze, uz oko 10 milijuna novooboljelih. Od tih 10 milijuna, dvije trećine slučajeva otpada na 8 država: Indiju (27 %), Kinu (9 %), Indoneziju (8 %), Filipine (6 %), Pakistan (5 %), Nigeriju (4 %), Bangladeš (4 %) i Južnoafričku Republiku (3 %). S druge strane, u Europi je zabilježeno samo 3 % novih slučajeva, kao i u Južnoj i Sjevernoj Americi zajedno.¹ Projekt WHO-a *End Tuberculosis* ima za cilj smanjiti godišnji broj umrlih od tuberkuloze za 95 %, a učestalost pojavljivanja bolesti (broj novih slučajeva na 100 000 stanovnika) za 90 % do 2035. godine u odnosu na godinu 2015.¹

Kroz protekla dva desetljeća došlo je do pojave rezistentnih sojeva tuberkuloze (multi-drug resistant, MDR) širom svijeta, nedugo zatim uslijedila je pojava ekstenzivno rezistentnih sojeva (extensively drug resistant, XDR), a zabilježeni su i slučajevi sojeva otpornih na sve poznate antituberkulinske lijekove.^{2,35,36} MDR tuberkuloza uzrokovana je *Mycobacterium tuberculosis* otpornom na izoniazid i rifampicin, lijekove prvog izbora, i zahtijeva tretman skupljim i toksičnijim lijekovima drugog izbora. XDR tuberkuloza uzrokovana je sojevima koji su, uz izoniazid i rifampicin, otporni i na barem tri od šest glavnih skupina lijekova drugog izbora (aminoglikozide, polipeptide, fluorokinolone, tioamide, cikloserine i *p*-aminosalicilnu kiselinu).³⁷ Zabilježeno je više epidemija vrlo fatalnih infekcija sojevima otpornim na lijekove.³⁸ Propisivanje neispravnih tretmana dovelo je do povećanja broja smrtnih slučajeva,

kao i daljnjeg širenja sojeva otpornih na lijekove. Procjenjuje se kako je 2017. godine 558 000 ljudi oboljelo od tuberkuloze otporne na rifampicin (RR), najefikasniji lijek prvog izbora, dok je među njima 82 % imalo MDR tuberkulozu. U tri države zabilježeno je gotovo pola svjetskih slučajeva MDR/RR tuberkuloze: Indiji (24 %), Kini (13 %) i Ruskoj Federaciji (10 %).¹

2.5. 4-aminosalicilna kiselina

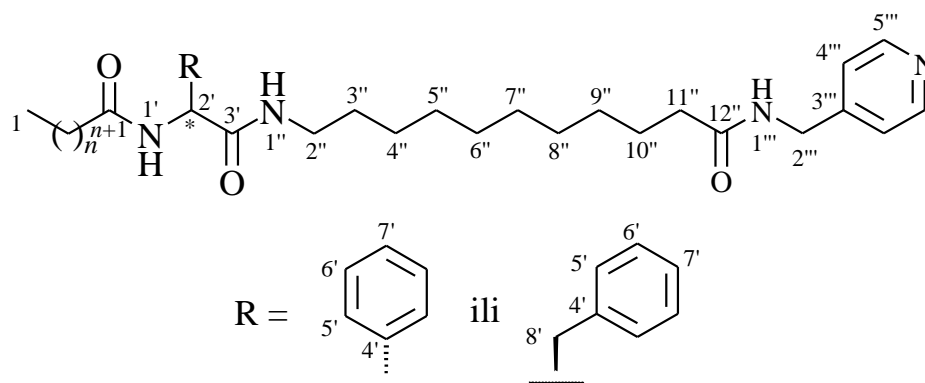
4-aminosalicilna kiselina (*p*-aminosalicilna kiselina, PAS) sintetizirana je još davne 1902.,³⁹ dok su njezina antituberkulinska svojstva otkrivena 1943.⁴⁰ Naime, nakon što je spoznato da salicilna kiselina ima stimulirajući učinak na unos kisika u *M. tuberculosis*,⁴¹ testirano je više od 50 derivata benzojeve kiseline u svrhu nalaženja kompetitivnog inhibitora koji će smanjiti metaboličku aktivnost *M. tuberculosis* te se PAS pokazao kao spoj s najvećom aktivnošću.⁴² Nakon uspješnih testiranja na životinjama i pacijentima, PAS je ušla u široku uporabu te su se različiti pripravci s PAS mogli naći na tržištu. Ipak, uvođenjem potentnijih lijekova poput etambutola i rifampicina i ponovnim otkrićem piranizamida, upotreba PAS smanjila se do te mjere da je, kada je spoznata proširenost MDR i XDR tuberkuloze, PAS bilo gotovo nemoguće naći na tržištu. Zato je 1994. u SAD-u uveden novi pripravak PAS za tretman MDR tuberkuloze u obliku granula otpornih na uvjete u želudcu, koji se i danas upotrebljava u SAD-u, Europi i brojnim drugim državama.⁴³

Sprječavanje otpuštanja PAS u želudcu smanjuje nastajanje 3-aminofenola (*m*-aminofenola, MAP), toksičnog nusprodukta dekarboksilacije PAS. PAS se raspada na MAP u vodenim otopinama pri $1,3 < \text{pH} < 5,3$ ili zagrijavanjem krutine.^{4,44} Vrijednosti pH u želudcu variraju između $1,0 < \text{pH} < 2,5$.⁵

Dva najbitnija načina biotransformacije PAS u organizmu su aciliranje amino-skupine i vezanje glicina na karboksilnu skupinu. Acetil-PAS ne pokazuje bakteriostatsku aktivnost protiv *M. tuberculosis*, dok antituberkulinska aktivnost glicin-PAS može varirati između 50 % i 75 % aktivnosti PAS. Soli PAS topljivije su u vodi te se lakše apsorbiraju od zwitteriona, zbog čega lakše zasite mogućnost crijeva i jetre za aciliranjem.⁴⁵ Ipak, unos soli PAS može izazivati pretjerano nakupljanje elektrolita, zbog čega se pripravci koji sadrže zwitterion često radije koriste.^{3,46}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker Avance 300 s unutarnjim standardom tetrametilsilanom (TMS). Kao otapalo korišten je deuterirani kloroform (CDCl_3). Spektri su asignirani prema sljedećoj shemi:

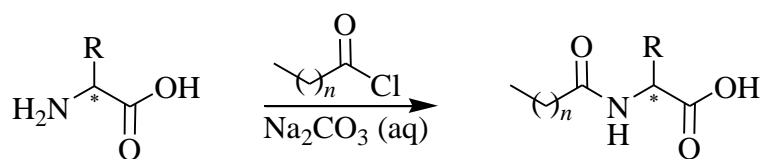


Shema 1. Opća shema za asigniranje spektara NMR.

Ako signal potječe od više različitih atoma, njihova je oznaka odijeljena zarezom odnosno, u slučaju više susjednih atoma, crticom. Gdje nije bilo moguće sa sigurnošću asignirati pojedini signal, navedeni su svi signali koji dolaze u obzir te odijeljeni veznikom ili, odnosno kosom crtom ako se radi o više susjednih atoma.

Preparativna tankoslojna kromatografija izvedena je na pločama silikagela Merck HF254.

3.1. Sinteza *N*-acilaminokiselina (1a–f)



D-fenilglicin R = (*R*)-Ph
L-fenilalanin R = (*S*)-Bn

1a R = (*R*)-Ph, *n* = 5 **1d** R = (*S*)-Bn, *n* = 5
1b R = (*R*)-Ph, *n* = 6 **1e** R = (*S*)-Bn, *n* = 6
1c R = (*R*)-Ph, *n* = 7 **1f** R = (*S*)-Bn, *n* = 7

Opći postupak: Aminokiselina (25,0 mmol) suspendirana je u vodenoj otopini natrijeva karbonata koncentracije 2,5 mol/L (50 mL) i ohlađena u ledenoj kupelji. Dobivenoj smjesi dokapavan je acil-halogenid (25,0 mmol) uz žustro miješanje. Nakon 5 min ledena je kupelj uklonjena. Reakcijska smjesa žustro je miješana pri sobnoj temperaturi sljedećih 30 min, nakon

čega je ponovno uronjena u ledenu kupelj. Klorovodična kiselina koncentracije 5,0 mol/L dodavana je u manjim obrocima do $\text{pH} \approx 1$ (oko 50 mL), pri čemu dolazi do oslobađanja CO_2 i taloženja produkta. Produkt je profiltriran pri sniženom tlaku i/ili ekstrahiran etil-acetatom, sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, nakon čega je otapalo upareno pri sniženom tlaku.

3.1.1. *N*-heptanoil-D-fenilglicin (**1a**)

Spoj **1a** pripremljen je reakcijom D-fenilglicina (3,780 g, 25,0 mmol) i heptanoil-klorida (3,85 mL, 25,0 mmol). Prilikom sinteze korištena je vodena otopina natrijeva karbonata koncentracije 2,5 mol/L (100 ml) i klorovodična kiselina koncentracije 5,0 mol/L (oko 100 ml). Suspenzija dobivena nakon neutralizacije pomoću klorovodične kiseline ekstrahirana je 3 puta s po 35 ml EtOAc. Spoj **1a** izoliran je kao bistro, bezbojno ulje koje stajanjem skrutne u tvar konzistencije voska (6,186 g, 94 %).

3.1.2. *N*-oktanoil-D-fenilglicin (**1b**)

Spoj **1b** pripremljen je reakcijom D-fenilglicina (3,780 g, 25,0 mmol) i oktanoil-klorida (4,28 mL, 25,0 mmol). Bijeli sirasti talog zaostao nakon filtriranja sušen je pri sniženom tlaku (5,822 g, 84 %).

3.1.3. *N*-nonanoil-D-fenilglicin (**1c**)

Spoj **1c** pripremljen je reakcijom D-fenilglicina (3,024 g, 20,0 mmol) i nonanoil-klorida (3,76 mL, 20,0 mmol). Prilikom sinteze korištena je vodena otopina Na_2CO_3 koncentracije 2,0 mol/L (100 ml) i vodena otopina HCl koncentracije 4,0 mol/L (oko 100 ml). Bijeli, ljepljivi talog dobiven neutralizacijom pomoću HCl nije profiltriran, već otopljen u 100 ml etil-acetata. Produkt zaostao u vodenom sloju ekstrahiran je 3 puta s 30 ml etil-acetata. Spojeni ekstrakti sušeni su nad Na_2SO_4 i upareni pri sniženom tlaku. Zaostaje prozirna, uljasta tekućina koja prilikom sušenja pri sniženom tlaku kristalizira (5,041 g, 87 %).

3.1.4. *N*-heptanoil-L-fenilalanin (**1d**)

Spoj **1d** pripremljen je reakcijom L-fenilalanina (4,130 g, 25,0 mmol) i heptanoil-klorida (3,85 mL, 25,0 mmol). Talog zaostao nakon neutralizacije pokušalo se otopiti u 80 ml etil-acetata, no zbog slabe topljivosti dobivena smjesa je profiltrirana, etil-acetatni ekstrakt sušen je nad Na_2SO_4 pa uparen pri sniženom tlaku. Bijeli talog zaostao nakon filtriranja je ispran destiliranom vodom, sušen pri sniženom tlaku i spojen s bijelom krutinom zaostalom nakon uparavanja etil-acetatnog ekstrakta (6,417 g, 93 %).

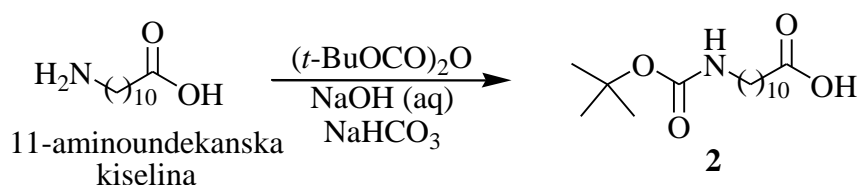
3.1.5. *N*-oktanoil-L-fenilalanin (**1e**)

Spoj **1e** pripravljen je reakcijom L-fenilalanina (4,130 g, 25,0 mmol) i oktanoil-klorida (4,28 mL, 25,0 mmol). Sitnozrnati bijeli talog zaostao nakon filtriranja sušen je pri sniženom tlaku (6,829 g, 94 %).

3.1.6. *N*-nonanoil-L-fenilalanin (**1f**)

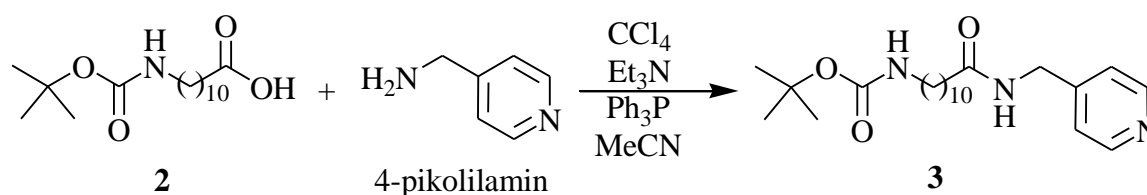
Spoj **1f** pripravljen je reakcijom L-fenilalanina (4,130 g, 25,0 mmol) i nonanoil-klorida (4,72 mL, 25,0 mmol). Prilikom neutralizacije dodano je 10 mL etil-acetata kako bi se spriječilo oslobađanje pjene. Nakon filtriranja dio produkta zaostao je na lijevku, dok je ostatak ekstrahiran s dodatnih 60 mL etil-acetata. Etil-acetatni ekstrakt je sušen nad Na₂SO₄ i uparen. Zaostaje bijela krutina koja je spojena s bijelim talogom zaostalim nakon filtriranja (7,3443 g, 96 %).

3.2. Boc-zaštićivanje 11-aminoundekanske kiseline



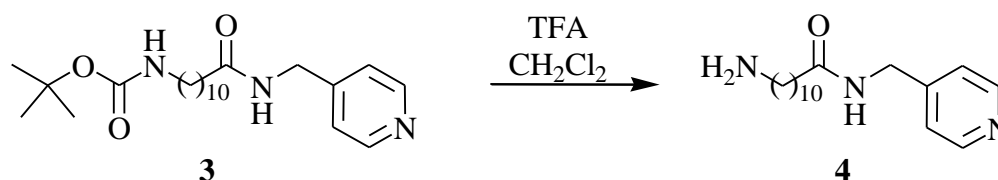
Spoj **2**, 11-[[*tert*-butoksi]karbonil]amino}undekanska kiselina, pripravljen je reakcijom 11-aminoundekanske kiseline (6,039 g, 30 mmol) i di-*tert*-butil-dikarbonata (6,546 g, 30 mmol). 11-aminoundekanska kiselina suspendirana je u smjesi dioksana (60 mL) i vode (30 mL). Nastaloj suspenziji dodana je natrijeva lužina koncentracije 1 mol/L (30 mL) i natrijev hidrogenkarbonat (2,520 g, 30 mmol). Dobivena smjesa uronjena je u ledenu kupelj, nakon čega je, uz žustro miješanje, dodan di-*tert*-butil-dikarbonat. Reakcijska smjesa izvađena je iz ledene kupelji nakon 5 min i miješana pri sobnoj temperaturi sljedećih 45 min, nakon čega je ponovno uronjena u ledenu kupelj. Otopina 1,1 mL konc. sumporne kiseline u 15 mL vode (20 mmol) dodana je u malim obrocima, a zatim vodena otopina kalijeva hidrogensulfata koncentracije 1 mol/L (oko 40 mL) do pH ≈ 3, pri čemu dolazi do taloženja produkta. Smjesa je profiltrirana, a produkt sušen pri sniženom tlaku, te izoliran u obliku bijelog taloga (8,740 g, 97 %).

3.3. Priprava *tert*-butil-*N*-(10-[[piridin-4-ilmetil]karbamoil]decil)karbamata



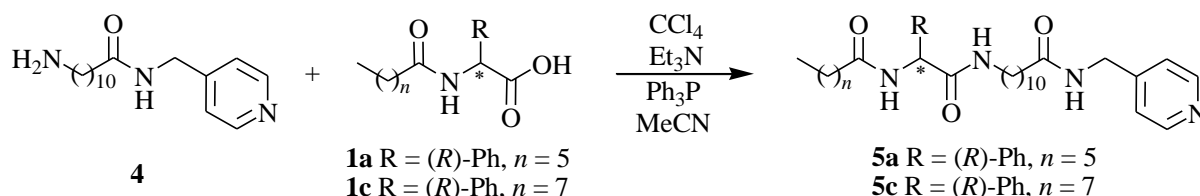
Spoj **3**, *tert*-butil-*N*-(10-[[piridin-4-ilmetil]karbamoil]decil)karbamata, pripravljen je reakcijom spoja **2** (8,0482 g, 26,7 mmol) i 4-pikolilamina (2,71 mL, 26,7 mmol). Spoj **2** i trifetilfosfin (8,403 g, 32,0 mmol) suspendirani su u 100 ml acetonitrila. Smjesa je zagrijana uranjanjem reakcijske tikvice u toplu vodu kako bi došlo do otapanja reaktanata. U bistru, toplu otopinu dodani su trietilamin (3,72 mL, 26,7 mmol) i tetraklorugljik (2,59 mL, 26,7 mmol). Topla je vodena kupelj zatim uklonjena, a reakcijska smjesa ostavljena preko noći uz miješanje. Sljedećeg jutra reakcijska je smjesa bila gusta suspenzija. Ohlađena je u ledenoj kupelji i profiltrirana pri sniženom tlaku. U lijevku zaostaje talog produkta. Talog je ispran vodom i eterom i sušen pri sniženom tlaku. Produkt je izoliran u obliku krutine krem boje (7,670 g, 73 %).

3.4. Uklanjanje Boc- zaštite sa spoja 3



Spoj **4**, 11-amino-*N*-(piridin-4-ilmetil)undekanamid pripravljen je iz spoja **3** (7,670 g, 19,6 mmol). Spoj **3** suspendiran je u 20 ml diklormetana. Dobivena smjesa uronjena je u ledenu kupelj, nakon čega je dokapana trifluoroctena kiselina (8 mL). Ledena kupelj je uklonjena, a reakcijska smjesa ostavljena preko noći uz miješanje. Iduće jutro uparen je acetonitril pri sniženom tlaku. Ostatku nakon uparavanja dodana je voda (50 mL) i eter (100 mL). Dobivena smjesa je izmućkana, nakon čega su slojevi odijeljeni. Vodenom sloju dokapavana je natrijeva lužina do prestanka taloženja produkta (pH ≈ 13). Smjesa je profiltrirana pri sniženom tlaku, talog ispran vodom i potom sušen pri sniženom tlaku. Produkt je izoliran u obliku bijele krutine (5,441 g, 95 %).

3.5. Kondenzacija *N*-acilaminokiselina i 11-amino-*N*-(piridin-4-ilmetil)undekanamida



Opći postupak: *N*-acilaminokiselina (1,00 mmol), spoj **4** (1,00 mmol) i trifenilfosfin (0,289 g, 1,10 mmol) suspendirani su u acetonitrilu (7 mL). Zatim su dodani trietilamin (0,101 g, 1,00 mmol) i tetraklorugljik (0,154 g, 1,00 mmol). Tako pripravljena reakcijska smjesa ostavljena je preko noći uz miješanje. Iduće juto reakcijska smjesa je gusta suspenzija. Talog produkta profiltriran je pri sniženom tlaku te ispran vodom i eterom, a potom pročišćen kromatografski.

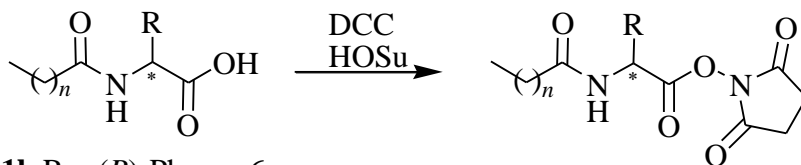
3.5.1. 11-(*N*-heptanoil-*D*-fenilglicilamino)-*N*-(piridin-4-ilmetil)undekanamid (**5a**)

Spoj **5a** pripremljen je reakcijom spoja **1a** (1,069 g, 4,06 mmol) i spoja **4** (1,1835 g, 4,06 mmol). Reakcijskoj smjesi dodan je trifenilfosfin (1,108 g, 4,50 mmol), acetonitril (40 mL), trietilamin (0,411 g, 4,06 mmol) i tetraklorugljik (0,625 g, 4,06 mmol). Sirovi produkt pročišćen je kromatografski na koloni promjera 1,5 cm i duljine 35 cm. Za nepokretnu fazu korišten je silikagel 60, a pokretna je gradijentno mijenjana od sustava diklormetan : metanol 30 : 1 do sustava diklormetan : metanol 5 : 1. Produkt je izoliran u obliku listićave krutine krem boje (1,006 g, 49 %). Spektroskopski podaci odgovaraju literaturno opisanima.⁶

3.5.2. 11-(*N*-nonanoil-*D*-fenilglicilamino)-*N*-(piridin-4-ilmetil)undekanamid (**5c**)

Spoj **5c** pripremljen je reakcijom spoja **1c** (0,291 g, 1,00 mmol) i spoja **4** (0,291 g, 1,00 mmol). Sirovi produkt pročišćen je na četiri ploče za preparativnu kromatografiju. Za pokretnu fazu korišten je sustav diklormetan : metanol 10 : 1. Skinuta je vrpca produkta, isprana sa smjesom diklormetan : metanol 1 : 1 te je otapalo upareno pri sniženom tlaku. Produkt je izoliran u obliku krutine krem boje (0,255, 46 %). Spektroskopski podaci odgovaraju literaturno opisanima.⁶

Ova se reakcija nažalost pokazala nereproducibilnom, te su zbog toga ostali spojevi iz te serije pripremljeni DCC-kondenzacijom:

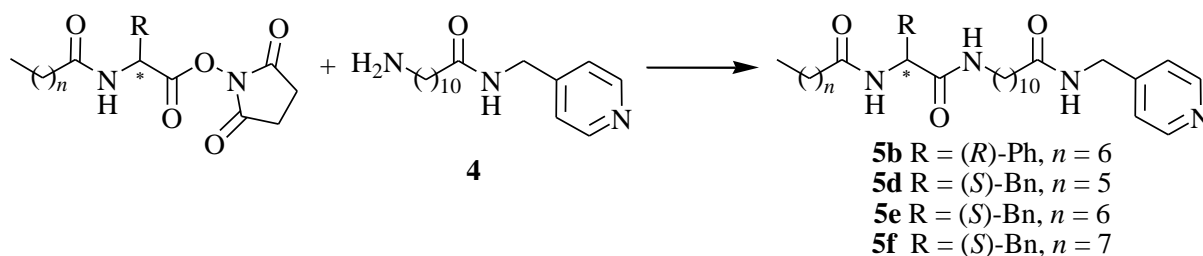


1b R = (*R*)-Ph, $n = 6$

1d R = (*S*)-Bn, $n = 5$

1e R = (*S*)-Bn, $n = 6$

1f R = (*S*)-Bn, $n = 7$



5b R = (*R*)-Ph, $n = 6$

5d R = (*S*)-Bn, $n = 5$

5e R = (*S*)-Bn, $n = 6$

5f R = (*S*)-Bn, $n = 7$

Opći postupak: Suspenziji *N*-acilaminokiseline (2,38 mmol) i *N*-hidroksisukcinimida (0,419 g, 3,64 mmol) u acetonitrilu (40 mL) dodana je suspenzija *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimida (0,490 g, 2,38 mmol) u acetonitrilu (30 mL). Reakcijska je smjesa ostavljena preko noći uz miješanje. Iduće jutro reakcijska smjesa je uparena do volumena od oko 50 mL i profiltrirana pri sniženom tlaku. Sukcinimidni ester nije izoliran iz matičnice, već je matičnici je dodan spoj **4** (0,5538 g, 1,90 mmol). Dobivena smjesa povremeno je zagrijavana uranjanjem tikvice u toplu vodenu kupelj kako bi se sav spoj **4** otopio. Ostavljeno preko vikenda uz miješanje. Talog produkta profiltriran je pri sniženom tlaku i ispran acetonitriлом.

3.5.3. 11-(*N*-oktanoil-D-fenilglicilamino)-*N*-(piridin-4-ilmetil)undekanamid (**5b**)

Prilikom priprave spoja **5b**, spoj **1b** (0,277 g, 1,00 mmol) i *N*-hidroksisukcinimid (0,115 g, 1,00 mmol) suspendirani su u smjesi 6 mL dioksana i 3 mL diklormetana. Dobivena smjesa uronjena je u ledenu kupelj, nakon čega je dodan *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (0,206 g, 1,00 mmol). Ostavljeno preko noći uz miješanje na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa zatim je profiltrirana, a matičnica uparena pri sniženom tlaku. Ostatak nakon uparavanja otopljen je u diklormetanu (4 mL) i dokapan u suspenziju spoja **4** (0,253 g, 0,869 mmol) u diklormetanu (5 mL) ohlađenu u ledenoj kupelji. Ostavljeno preko noći uz miješanje na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa izmučkana je redom s vodom, otopinom NaHCO₃, vodom i otopinom KHSO₄. Prilikom zadnjeg izmučkavanja nastaje bijeli želatinozni talog produkta koji je profiltriran pri sniženom tlaku, suspendiran u otopini NaHCO₃, ponovno profiltriran i ispran vodom. Produkt je izoliran u obliku bijelog taloga (0,248 g, 45 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 8,51 (d, $J = 5,9$ Hz, 2H, 5'''), 7,40 – 7,25 (m, 5H, 5'-7'), 7,17 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H, 4'''), 7,02 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, 1'), 6,52 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H, 1''), 6,33 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H, 1'''), 5,54 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, 2'), 4,42 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H, 2'''), 3,18 (dd, $J = 13,0, 6,7$ Hz, 2H, 2''), 2,23 (dd, $J = 15,3, 7,8$ Hz, 4H, 7, 11''), 1,72 – 1,54 (m, 4H, 6, 3''), 1,45 – 1,36 (m, 2H, 10''), 1,34 – 1,07 (m, 20H, 2-5, 4''-9''), 0,86 (t, $J = 6,5$ Hz, 3H, 1).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 173,43 (12''), 172,68 (8 ili 3'), 170,05 (8 ili 3'), 149,92 (5'''), 147,78 (3'''), 138,53 (4'), 128,84 (5'/6'), 128,12 (7'), 127,14 (5'/6'), 122,33 (4'''), 56,77 (2'), 42,23 (2'''), 39,77 (2''), 36,55 (7 ili 11''), 36,49 (7 ili 11'), 31,65 (2/6 ili 3''/10''), 29,20 (2/6 ili 3''/10''), 29,16 (2/6 ili 3''/10''), 28,99 (2/6 ili 3''/10''), 28,97 (2/6 ili 3''/10''), 26,60 (2/6 ili 3''/10''), 25,67 (2/6 ili 3''/10''), 25,56 (2/6 ili 3''/10''), 22,57 (2/6 ili 3''/10''), 14,06 (1).

3.5.4. 11-(*N*-heptanoil-*L*-fenilalanilamino)-*N*-(piridin-4-ilmetil)undekanamid (**5d**)

Spoj **5d** pripremljen je reakcijom spoja **1d** (0,659 g, 2,38 mmol) i spoja **4** (0,5538 g, 1,90 mmol). Talog produkta suspendiran je u malo acetonitrila i ponovno profiltriran, a zatim ispran eterom. Produkt je izoliran u obliku bijelog sitnozrnatog taloga (0,659 g, 63 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 8,53 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H, 5'''), 7,35 – 7,15 (m, 7H, 5'-7', 4'''), 6,32 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 1'), 6,12 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H, 1'''), 5,91 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H, 1''), 4,59 (dd, $J = 14,6, 7,9$ Hz, 1H, 2'), 4,45 (d, $J = 6,1$ Hz, 2H, 2'''), 3,18 – 2,91 (m, 4H, 8', 2''), 2,26 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 11''), 2,15 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, 6), 1,75 – 1,62 (m, 2H, 3''), 1,61 – 1,50 (m, 2H, 5), 1,36 – 1,15 (m, 20H, 2-4, 4''-10''), 0,87 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H, 1).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 173,35 (12''), 173,13 (7 ili 3'), 170,77 (7 ili 3'), 149,95 (5'''), 147,73 (3'''), 136,87 (4'), 129,24 (5'), 128,61 (6'), 126,93 (7'), 122,34 (4'''), 54,57 (2'), 42,27 (2'''), 39,44 (2''), 38,61 (8'), 36,59 (6, 11'), 31,50 (2/5 ili 3''/10''), 29,24 (2/5 ili 3''/10''), 29,18 (2/5 ili 3''/10''), 29,05 (2/5 ili 3''/10''), 28,83 (2/5 ili 3''/10''), 26,65 (2/5 ili 3''/10''), 25,66 (2/5 ili 3''/10''), 25,54 (2/5 ili 3''/10''), 22,46 (2/5 ili 3''/10''), 14,03 (1).

3.5.5. 11-(*N*-oktanoil-*L*-fenilalanilamino)-*N*-(piridin-4-ilmetil)undekanamid (**5e**)

Spoj **5e** pripremljen je reakcijom spoja **1e** (0,693 g, 2,38 mmol) i spoja **4** (0,5538 g, 1,90 mmol). Produkt je izoliran u obliku bijelog sitnozrnatog taloga (0,852 g, 79 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 8,54 (d, $J = 4,3$ Hz, 2H, 5'''), 7,33 – 7,13 (m, 7H, 5'-7', 4'''), 6,29 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, 1'), 6,06 (s, 1H, 1'''), 5,86 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, 1''), 4,58 (dd, $J = 14,8, 7,7$ Hz, 1H, 2'), 4,46 (d, $J = 5,9$ Hz, 2H, 2'''), 3,22 – 2,86 (m, 4H, 8', 2''), 2,26 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, 11''), 2,15 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 7), 1,76 – 1,62 (m, 2H, 3''), 1,61 – 1,49 (m, 2H, 6), 1,41 – 1,06 (m, 22H, 2-5, 4''-10''), 0,86 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, 1).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 173,32 (12"), 173,12 (7 ili 3'), 170,74 (7 ili 3'), 149,98 (5"), 147,69 (3"), 136,88 (4'), 129,24 (5'), 128,62 (6'), 126,94 (7'), 122,34 (4"), 54,58 (2'), 42,28 (2"), 39,44 (2"), 38,60 (8'), 36,60 (6, 11'), 31,64 (2/5 ili 3"/10"), 29,24 (2/6 ili 3"/10"), 29,17 (2/6 ili 3"/10"), 29,12 (2/6 ili 3"/10"), 29,04 (2/6 ili 3"/10"), 28,98 (2/6 ili 3"/10"), 26,65 (2/6 ili 3"/10"), 25,66 (2/6 ili 3"/10"), 25,58 (2/6 ili 3"/10"), 22,60 (2/6 ili 3"/10"), 14,07 (1).

3.5.6. 11-(*N*-nonanoil-*L*-fenilalanilamino)-*N*-(piridin-4-ilmetil)undekanamid (**5f**)

Prilikom pripreve spoja **5f**, u blago zagrijanu suspenziju spoja **1f** (0,959 g, 3,14 mmol) i *N*-hidroksisukcinimida (0,554 g, 4,81 mmol) u acetonitrilu (50 mL) dodana je suspenzija *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimida (0,646 g, 3,14 mmol) u acetonitrilu (20 mL). Ostavljeno preko noći uz miješanje. Iduće jutro reakcijska smjesa profiltrirana je pri sniženom tlaku. Matičnici je dodana suspenzija spoja **4** (0,731 g, 2,51 mmol) u acetonitrilu (30 mL). Reakcijska smjesa povremeno je zagrijavana uranjanjem tikvice u toplu vodu. Ostavljeno preko vikenda uz miješanje. Upareno pri sniženom tlaku do volumena od oko 70 mL. Talog produkta profiltriran je i ispran eterom. Produkt je izoliran u obliku bijelog taloga (1,210 g, 83 %). Spektroskopski podaci odgovaraju literaturno opisanimima.⁶

3.6. Priprava hidroklorida

Opći postupak: $3,63 \times 10^{-4}$ mol baze (**5a** – **5f**) otopljeno je u 2,5 mL 3 % HCl/MeOH. Otapalo je potom upareno pri sniženom tlaku. Volumen 3 % HCl/MeOH otprilike je određen tako da je množina dodane bude HCl peterostruko veća od množine izvagane baze.

3.7. Kinetika otpuštanja PAS iz hidrogela

Nakon što su sintetizirani željeni spojevi, napravljena su fizikalno-kemijska mjerenja kako bi se ispitala kinetika otpuštanja aktivne tvari iz pH-ovisnih hidrogelatora u otopinama različitih pH vrijednosti (pH = 1,1 i pH = 7,2). Otopina pH = 1,1 priređena je razrjeđivanjem 8,6 mL klorovodične kiseline ($w = 36,5$ %) vodom do oznake od 1,00 L. Otopina pH = 7,2 priređena je otapanjem 6,804 g KH_2PO_4 i 17,907 g Na_2HPO_4 u 1,00 L vode i dodatkom zasićene otopine NaOH do željenog pH. Svi UV-Vis spektri, baždarni dijagrami i kinetička mjerenja snimljeni su pomoću spektrometra Cary 50 tvrtke Varian sondom promjera 6 mm.

3.7.1. UV-Vis spektri aktivne tvari, nusprodukta njenog raspada i gelatora

Snimljen je UV-Vis spektar otopine PAS, MAP i gelatora (**5a**·HCl, **5d**·HCl) poznate koncentracije pri pH = 1,1 i pH = 7,2 s prekrivenim spektralnim područjem od 200 do 400 nm kako bi se odredila optimalna valna duljina za snimanje kinetike otpuštanja PAS. Spektri su

snimljeni s korakom 1 nm uz integracijsko vrijeme 0,2 s. Spektar MAP korišten je kako bi se nakon snimanja provjerilo dolazi li do nastajanja ovog nusprodukta.

3.7.2. Baždarni dijagram

Priredena je otopina 10,0 mg hidroklorida *p*-aminosalicilne kiseline (PAS·HCl) u 10 mL deionizirane vode. Alikvot od 0,75 ml nadopunjen je otopinom poznatog pH (1,1 ili 7,2) do oznake od 50 mL kako bi se priredila otopina masene koncentracije 15 mg/L. Razrjeđivanjem te otopine priređeni su uzorci masene koncentracije 3, 6, 9 i 12 mg/L. Snimljen je baždarni dijagram apsorpcijom elektromagnetskog zračenja valne duljine 300 nm (pH = 1,1) i 265 nm (pH = 7,2) s pet priređenih otopina masene koncentracije 3 – 15 mg/L.

3.7.3. Kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela

U svrhu mjerenja kinetike otpuštanja PAS iz hidrogela osmišljena je i usavršena nova metoda. Priredena je otopina 10,0 mg hidroklorida *p*-aminosalicilne kiseline (PAS·HCl) u 10 mL deionizirane vode. Otopine PAS·HCl uvijek su pripremane svježije jer njihovim duljim stajanjem dolazi do raspada na MAP i CO₂.⁴ $1,74 \times 10^{-5}$ mol gelatora (**5a**·HCl, **5d**·HCl) izvagano je u Eppendorfovju epruvetu promjera 9 mm, nakon čega je dodan alikvot od 1,00 mL priređene otopine PAS·HCl i epruveta začepljena. Smjesa je sonificirana oko 1 min na ultrazvučnoj kupelji i potom uronjena u vodenu kupelj ($\theta = 100$ °C) u kojoj je zagrijavana 1,5 min uz povremeno preokretanje radi ravnomjernijeg zagrijavanja. Nakon zagrijavanja, epruveta je ostavljena da uspravno stoji u vodi pri sobnoj temperaturi sljedećih 2 h kako bi došlo do formiranja gela. Epruveti je potom uklonjen čep te je pomoću parafilma učvršćena za držač od pleksiglasa. Držač je uronjen u termostatiranu posudu ($\theta = (25,0 \pm 0,1)$ °C) promjera 4 cm kojoj je prethodno dodano 70 mL otopine poznatog pH (1,1 ili 7,2) te je uključeno miješanje magnetskom miješalicom (120 okretaja / min). Snimana je apsorbancija svakih 5 s kroz 12 h, uz integracijsko vrijeme 0,2 s. Nakon snimanja kinetike otpuštanja snimljen je UV-Vis spektar otopine kako bi se provjerilo dolazi li do nastajanja MAP.



Slika 3.1. Aparatura za mjerenje otpuštanja aktivne tvari iz hidrogela.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ponoviti i optimizirati sintezu tri poznata pH-ovisna 4-pikolilamidna hidrogelatora, kao i sintetizirati tri nova, strukturno slična spoja, a potom ispitati kinetiku otpuštanja PAS iz hidrogelova sintetiziranih spojeva pri različitim pH. Sinteza gelatora provedena je u Laboratoriju za supramolekulsku kemiju Instituta Ruđer Bošković, a kinetička mjerenja na Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.

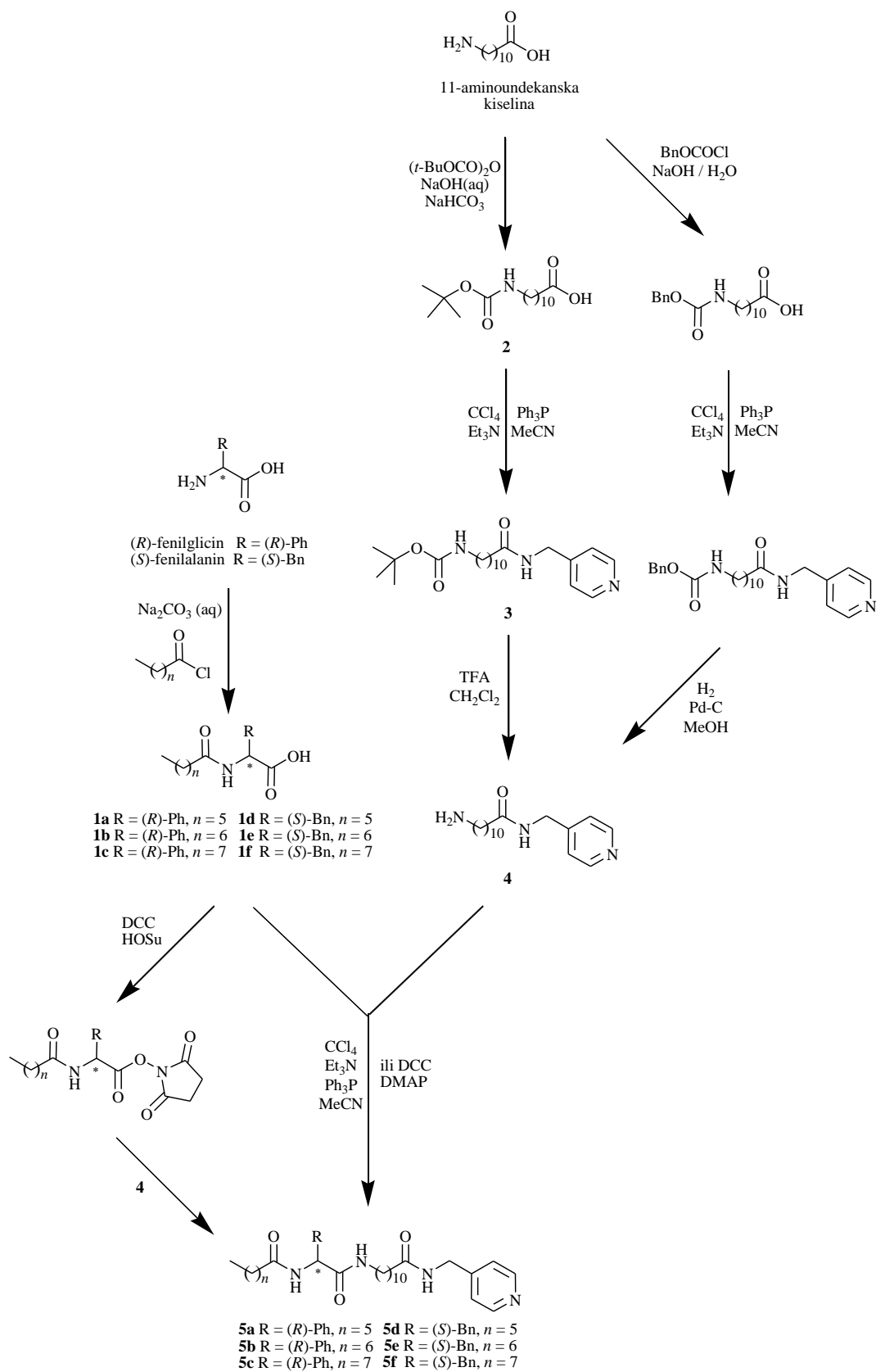
4.1. Sinteza biološki prihvatljivih pH-ovisnih 4-pikolilamidnih hidrogelatora male molekulske mase

Sintetizirano je šest biološki prihvatljivih pH-ovisnih 4-pikolilamidnih hidrogelatora male molekulske mase (**5a–5f**), od kojih spojevi **5b**, **5d**, **5e** dosad nisu opisani u literaturi. Sintetizirani spojevi građeni su od četiri podjedinice povezane amidnim vezama: 4-pikolilamina, 11-aminoundekanske kiseline, D-fenilglicina ili L-fenilalanina, te heptanske, oktanske ili nonanske kiseline.

Za sintezu željenih spojeva isprobani su različiti sintetski putevi. Kao zaštitna skupina amino-skupine 11-aminoundekanske kiseline korištena je *t*-butoksikarbonilna i benzoksikarbonilna skupina. Sinteza, izolacija i pročišćavanje spojeva zaštićenih *t*-butoksikarbonilnom skupinom pokazalo se jednostavnije, zbog čega je taj spoj odabran kao preferirana zaštitna skupina. Za sintezu spojeva **5a–5f** isprobane su tri različite metode:

- kondenzacija spoja **4** i spoja **1a–1f** pomoću trifenilfosfina, trietilamina i tetraklorugljika
- DCC-kondenzacija
- aktivacija spoja **1a–1f** pomoću *N*-hidroksisukcinimida i kondenzacija dobivenog sukcinimidnog estera sa spojem **4**.

Aktivacija *N*-acilaminokiseline pomoću *N*-hidroksisukcinimida pokazala se kao najpouzdanija metoda dobivanja spojeva **5a–5f**. U shemi su prikazane sve reakcije korištene za pripravu spojeva **5a–5f**.



Shema 2. Sinteza biološki prihvatljivih pH-ovisnih 4-pikolilamidnih hidrogelatora male molekulske mase

Nakon što su određene primjerene reakcije i prigodni reakcijski uvjeti, pristupilo se sintezi spojeva **5a–5f**. Spojevi su sintetizirani postupcima tipičnim za peptidnu kemiju, odnosno zaštićivanjem aminokiselina, kondenzacijom zaštićenih aminokiselina i deprotekcijom produkata kondenzacije. 11-aminoundekanska kiselina zaštićena je *t*-butoksikarbonilnom skupinom, nakon čega je povezana s 4-pikolilaminom pomoću trifenilfosfina, tetraklorugljika i trietilamina. *t*-butoksikarbonilna skupina potom je uklonjena dodatkom trifluoroctene kiseline kako bi se dobio spoj **4**. D-fenilglicin, odnosno L-fenilalanin povezan je s kloridom odgovarajuće karboksilne kiseline, dajući *N*-acilaminokiselinu, koja je potom aktivirana *N*-hidroksisukcinimidom i povezana sa spojem **4** ili je direktno povezana sa spojem **4** kondenzacijom pomoću trifenilfosfina, tetraklorugljika i trietilamina.

Pripravljani su i karakterizirani sljedeći spojevi koji dosada nisu opisani u literaturi:

- 11-(*N*-oktanoil-D-fenilglicilamino)-*N*-(piridin-4-ilmetil)undekanamid (**5b**)
- 11-(*N*-heptanoil-L-fenilalanilamino)-*N*-(piridin-4-ilmetil)undekanamid (**5d**)
- 11-(*N*-oktanoil-L-fenilalanilamino)-*N*-(piridin-4-ilmetil)undekanamid (**5e**)

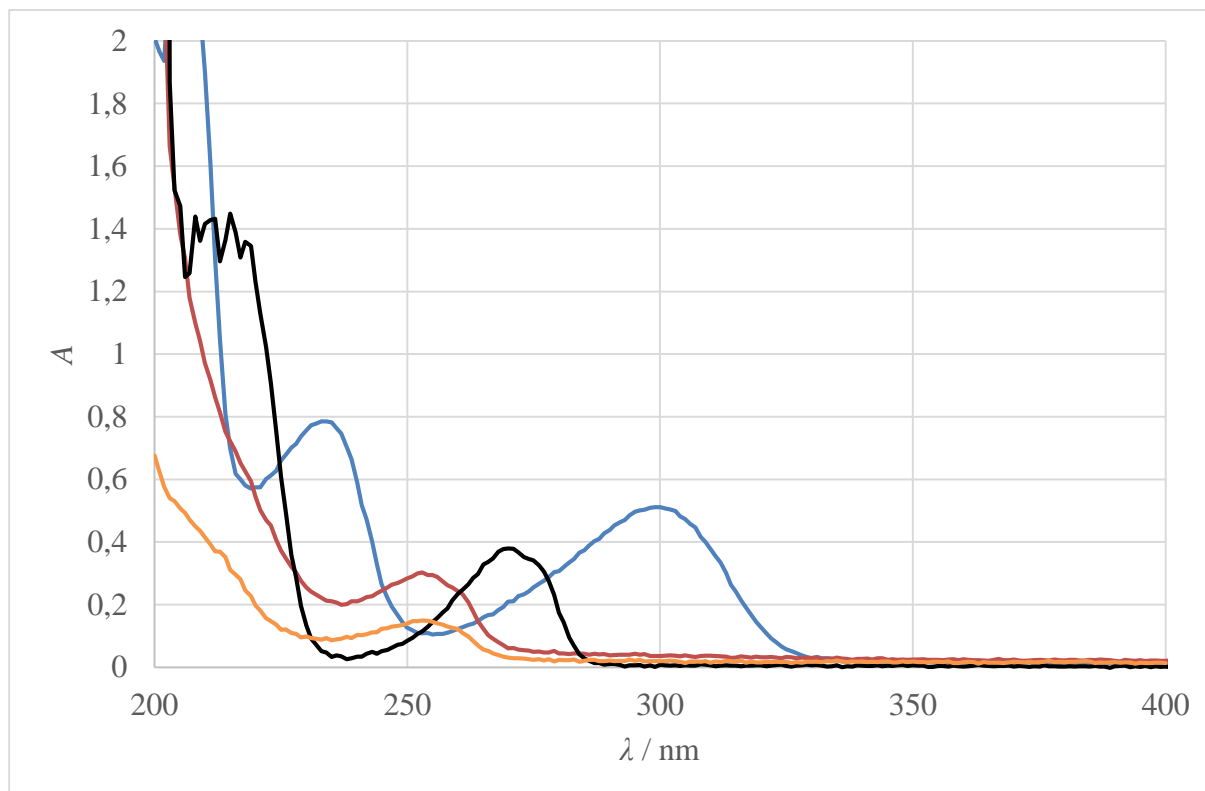
Struktura novih spojeva potvrđena je spektroskopijom NMR.

4.2. Kinetika otpuštanja PAS·HCl

Nakon što su željeni spojevi sintetizirani, pristupilo se fizikalno-kemijskim mjerenjima kinetike otpuštanja PAS iz hidrogela spojeva **5a**·HCl i **5d**·HCl pri pH = 1,1 i pH = 7,2. pH otopina u kojima je praćena kinetika otpuštanja PAS·HCl odabran je tako da odgovara pH vrijednosti u želudcu ($1,0 < \text{pH} < 2,5$) odnosno u tankom crijevu ($6,6 < \text{pH} < 7,5$)⁵. Obzirom da se PAS raspada na MAP pri $1,3 < \text{pH} < 5,3$ ⁴, niži pH odabran je tako da bude niži od 1,3, dok je viši proizvoljno uzet kao maksimalni kapacitet fosfatnog pufera. Mjerenjima geliranja pokazalo se da svaki od sintetiziranih spojeva može gelirati više od 1 mL vode, zbog čega je taj volumen odabran kao volumen vode koji se koristi za pripravu hidrogela.

4.2.1. UV-Vis spektri aktivne tvari, nusprodukta njezinog raspada i gelatora

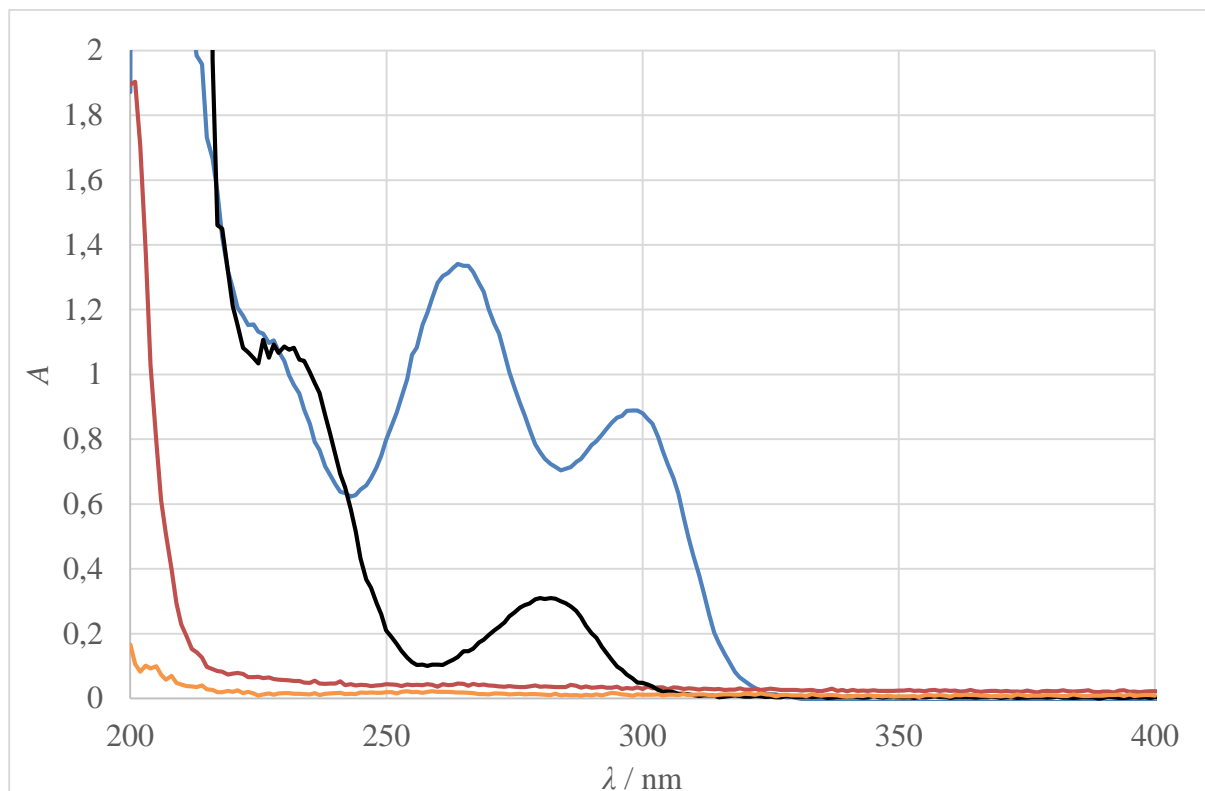
Prije početka kinetičkih mjerenja određena je valna duljina pri kojoj PAS apsorbira, a gelatori **5a**·HCl i **5d**·HCl ne apsorbiraju elektromagnetsko zračenje. U tu svrhu snimljeni su UV-Vis spektri PAS, gelatora **5a**·HCl i **5d**·HCl pri pH = 1,1 (slika 4.1.) i pH = 7,4 (slika 4.2.). Također je snimljen i spektar MAP, neželjenog produkta dekarboksilacije PAS, kako bi se provjerilo dolazi li prilikom pripreme hidrogela ili snimanja kinetike otpuštanja do raspada PAS.



Slika 4.1. UV-Vis spektri aktivne tvari, nusprodukta njenog raspada i gelatora: — PAS ($c = 1,10 \times 10^{-4}$ mol/L), — MAP ($c = 2,03 \times 10^{-4}$ mol/L), — **5a**·HCl ($c = 6,7 \times 10^{-5}$ mol/L) i — **5d**·HCl ($c = 3,5 \times 10^{-5}$ mol/L) pri pH = 1,1 i sobnoj temperaturi.

Na slici 4.1. vidljivo je da vodena otopina PAS pri pH = 1,1 u rasponu 220 nm – 400 nm ima dva maksimuma apsorpcije, jedan pri 300 nm, a drugi pri 234 nm. Kako pri valnoj duljini od 300 nm gelatori **5a**·HCl i **5d**·HCl ne apsorbiraju, ta je valna duljina odabrana za snimanje kinetike otpuštanja PAS.

Na slici 4.1. vidljivo je također da MAP ima izražen maksimum apsorpcije pri $\lambda = 270$ nm. Ako prilikom pripreve hidrogela ili prilikom snimanja kinetike otpuštanja PAS dolazi do raspada PAS, moći će se zamijetiti signal pri 270 nm.



Slika 4.2. UV-Vis spektri aktivne tvari, nusprodukta njenog raspada i gelatora: — PAS ($c = 9,5 \times 10^{-5}$ mol/L), — MAP ($c = 1,56 \times 10^{-4}$ mol/L), — **5a**·HCl ($c = 1,8 \times 10^{-5}$ mol/L) i — **5d**·HCl ($c = 3,0 \times 10^{-5}$ mol/L) pri pH = 7,2 i sobnoj temperaturi.

U apsorpcijskom spektru vodene otopine PAS pri pH 7,2 (slika 4.2.) također se pojavljuju dva maksimuma apsorpcije u rasponu 220 nm – 400 nm, jedan pri 299 nm, a drugi pri 265 nm. Kako je apsorpcijski maksimum pri $\lambda = 265$ nm intenzivniji, a apsorpcija gelatora **5a**·HCl i **5d**·HCl je zanemariva, pri toj valnoj duljini je snimana kinetika otpuštanja PAS iz hidrogela. Pri pH = 7,2 maksimum apsorpcije MAP poklapa se s minimumom apsorpcije PAS između dva maksimuma ($\lambda = 282$ nm). U slučaju da nastaje MAP, usporedbom UV-Vis spektra otopine nakon snimanja kinetike otpuštanja PAS i spektra čistog PAS bit će vidljivo smanjivanje „dola“ između apsorpcijskih maksimuma PAS pri 299 nm i 265 nm.

Nakon što su odabrane odgovarajuće valne duljine za praćenje kinetike otpuštanja PAS·HCl, snimljen je baždarni dijagram PAS pri $\lambda = 300$ nm (pH = 1,1) i $\lambda = 265$ nm (pH = 7,2).

4.2.2. Mjerenja kinetike otpuštanja

Kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela praćena je pomoću aparature osmišljene upravo za tu svrhu. Dizajn i izrada aparature opisani su u poglavlju 3.7.3., dok će sada biti napomenute neke od prednosti ovako osmišljenog dizajna aparature.

Kako je za formiranje gela gelator, zajedno s otapalom, potrebno zagrijati, kao nosač hidrogela izabrane su Eppendorfove epruvete. Eppendorfove epruvete mogu se začepiti, što omogućuje miješanje uzorka prilikom zagrijavanja i time ravnomjernije, a posljedično i kraće zagrijavanje. Povišena temperatura mogla bi ubrzati dekarboksilaciju PAS, zbog čega je bitno da se uzorak čim kraće zagrijava. Nadalje, gel se nije morao prenositi iz epruveta, već je bilo dovoljno ukloniti čep i uzorak je bio spreman za mjerenja. Time je osigurano da svi uzorci imaju jednaku dodirnu površinu s otapalom.

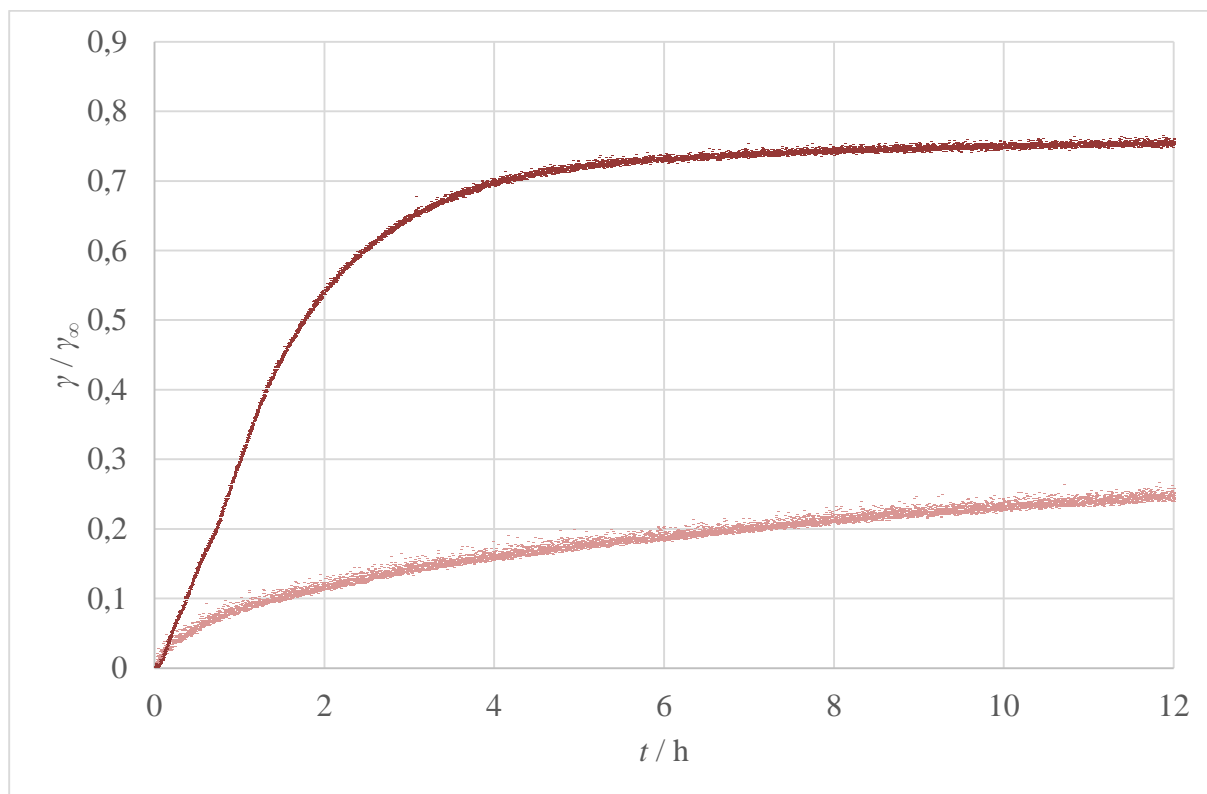
Kako bi se osiguralo brzo miješanje otpuštene tvari u otopini unutar reakcijske ćelije u sustav je dodana magnetska miješalica. Miješanje također utječe na brzinu otpuštanja aktivne tvari, zbog čega je brzina miješanja kontrolirana u svim eksperimentima te je iznosila 120 okretaja po minuti. Mala promjena u položaju magneta ili uzorka mogla bi promijeniti način na koji struji otapalo, a time i utjecati na brzinu otpuštanja aktivne tvari. Utjecaj konvekcije znatno je umanjen time što hidrogel nije bio direktno izložen otapalu, već je bio zaštićen stijenkama epruvete i nadslojen otapalom unutar epruvete.

Korištenje UV-Vis sonde znatno je pojednostavilo mjerenja i umanjilo ljudski faktor jer nije bilo potrebno uzimati uzorke otapala za mjerenja, već su mjerenja bilježena u stvarnom vremenu. Također, korištenje sonde omogućilo je prikupljanje velikog broja podataka u kratkim vremenskim intervalima.

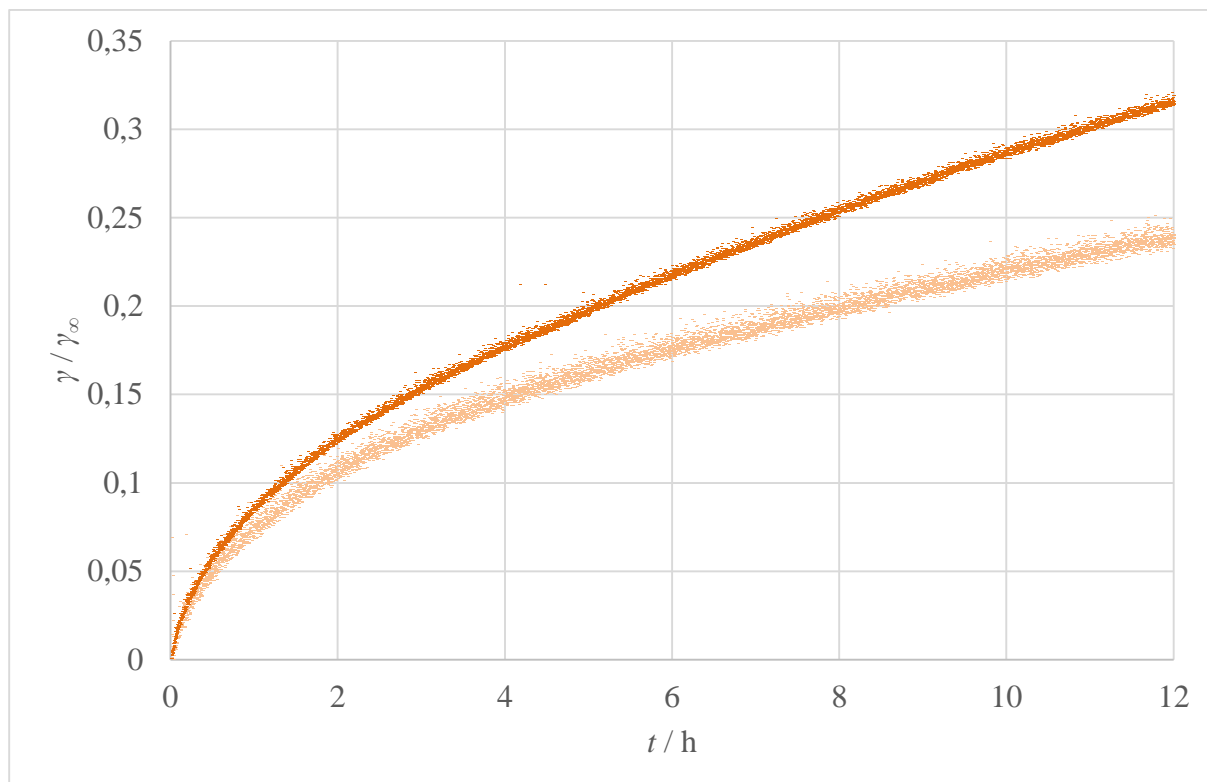
Prednosti ovakve izvedbe eksperimenta su:

- Jednostavno pripremanje termalno reverzibilnog hidrogela unutar Eppendorfove epruvete
- Poznata površina hidrogela u dodiru s otopinom
- Miješanje otopine u reakcijskoj ćeliji magnetom kako bi se osigurala ravnomjerna koncentracija otpuštene tvari
- Sloj otapala koji nadslojava hidrogel unutar Eppendorfove epruvete znatno smanjuje utjecaj konvekcije otapala na kinetiku otpuštanja aktivne tvari
- Podatci se prikupljaju u stvarnom vremenu, nije potrebno uzimati uzorke otopine.

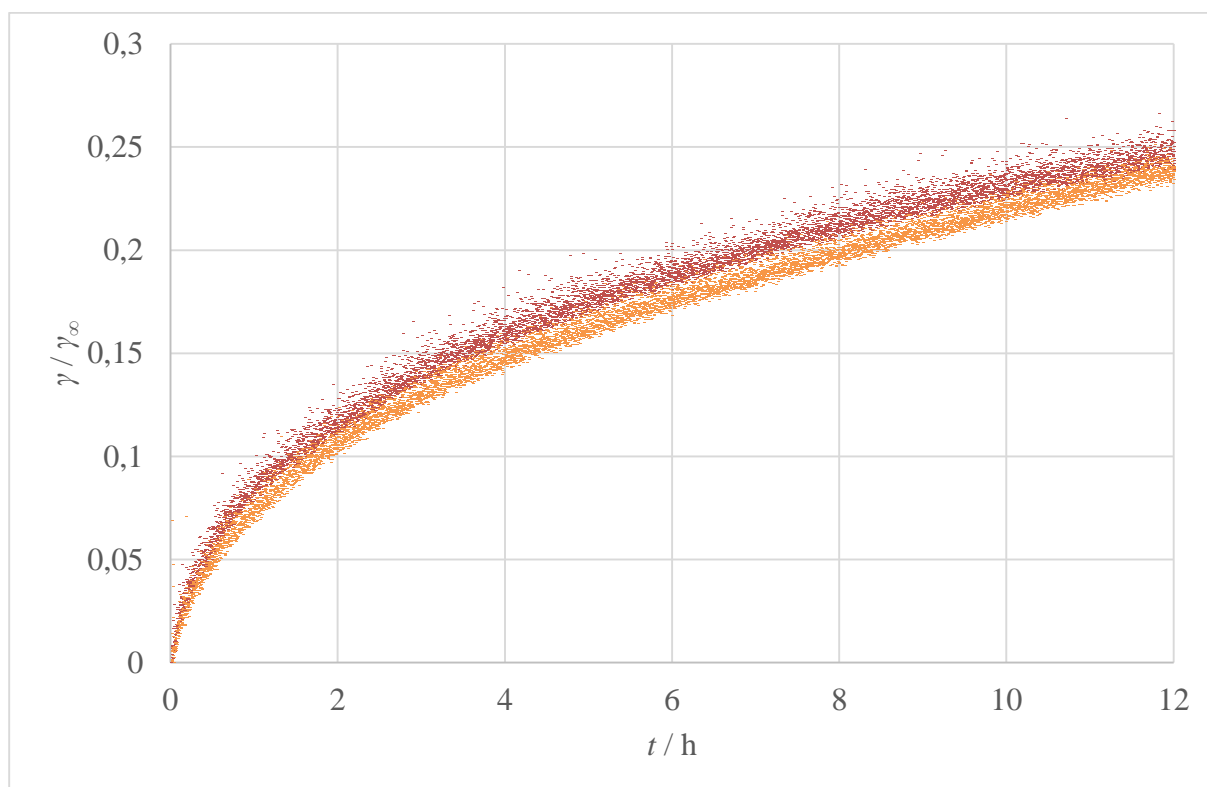
Nakon što je metoda optimizirana, snimljena je kinetika otpuštanja aktivne tvari iz hidrogela gelatora **5a**·HCl i **5d**·HCl pri pH = 1,1 i pH = 7,2. Svako mjerenje izvedeno je barem dvaput. Rezultati su prikazani kao ovisnost omjera trenutne i ravnotežne masene koncentracije otpuštenog PAS (γ / γ_{∞}) o vremenu na slikama 4.3. – 4.6.



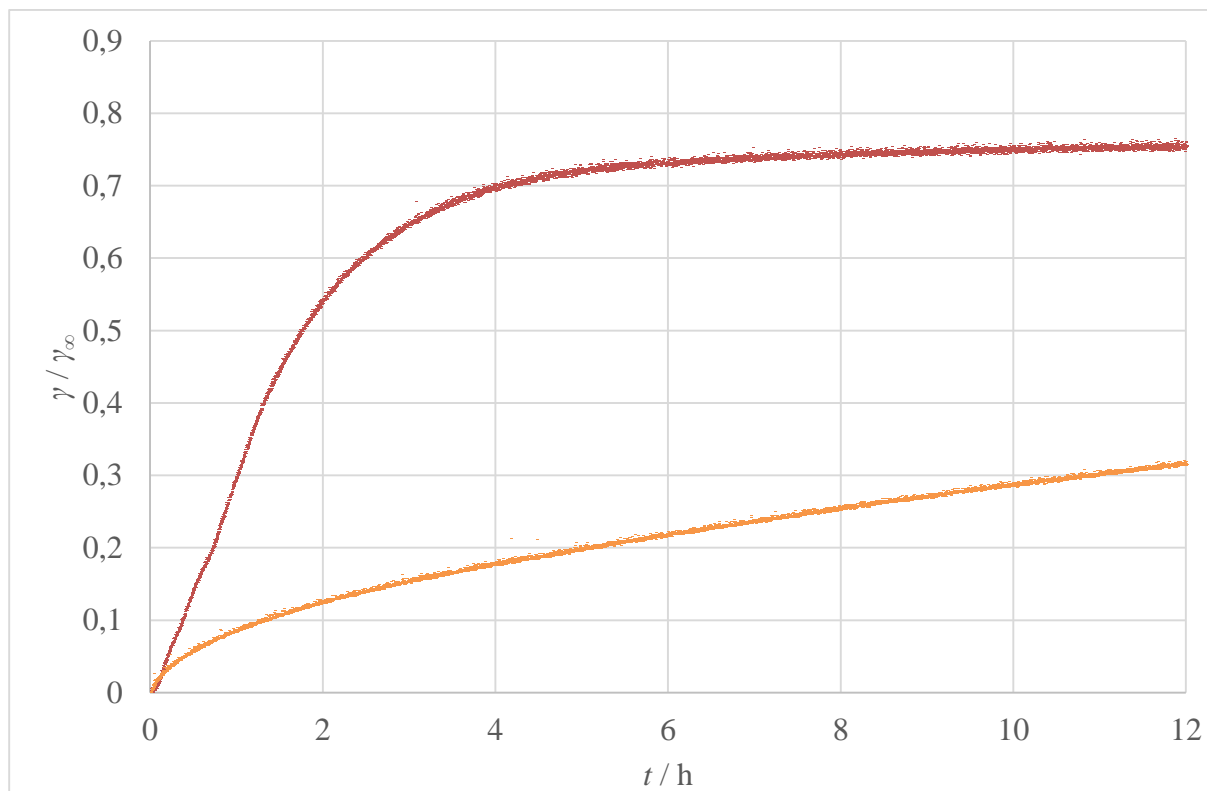
Slika 4.3. Kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri — pH = 1,1 i — pH = 7,2 i $\theta = (25,0 \pm 0,1)$.



Slika 4.4. Kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja **5d**·HCl pri — pH = 1,1 i — pH = 7,2 i $\theta = (25,0 \pm 0,1)$.



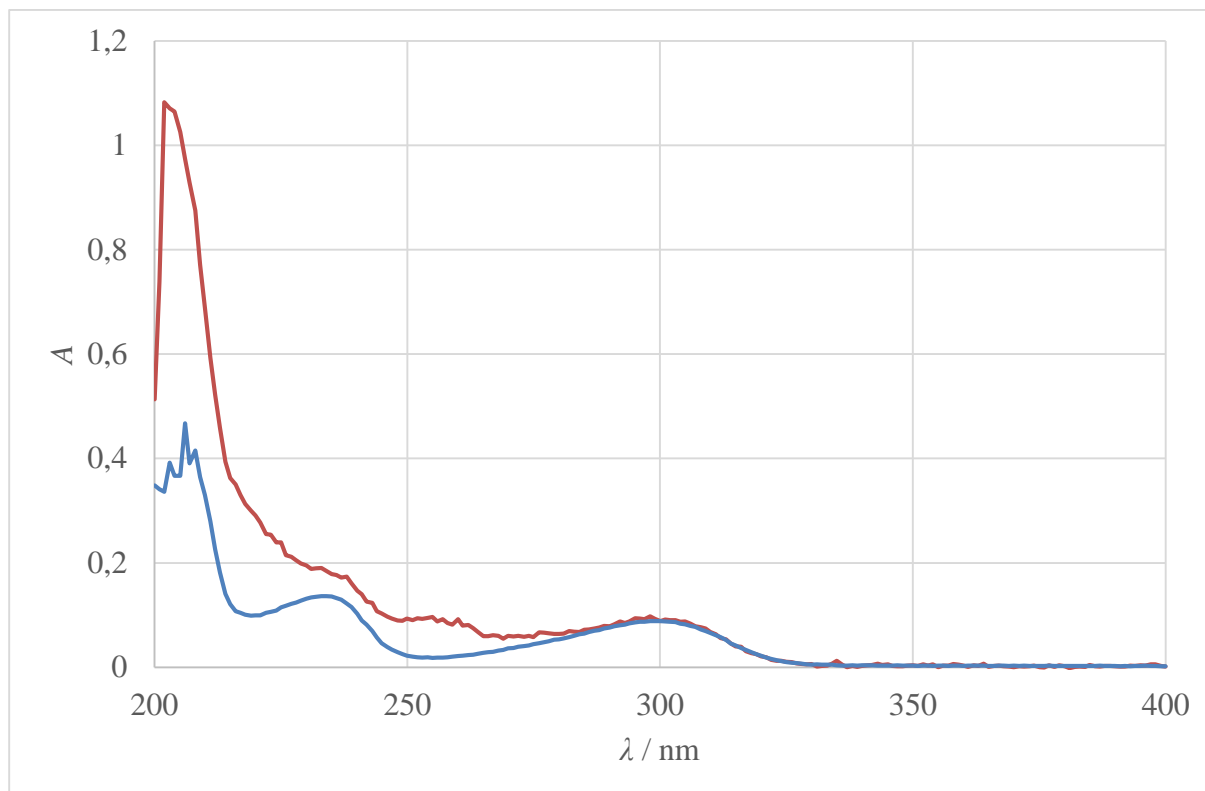
Slika 4.5. Kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja — **5a**·HCl i hidrogela spoja — **5d**·HCl pri pH = 1,1 i $\theta = (25,0 \pm 0,1)$.



Slika 4.6. Kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja — **5a**·HCl i hidrogela spoja — **5d**·HCl pri pH = 7,2 i $\theta = (25,0 \pm 0,1)$.

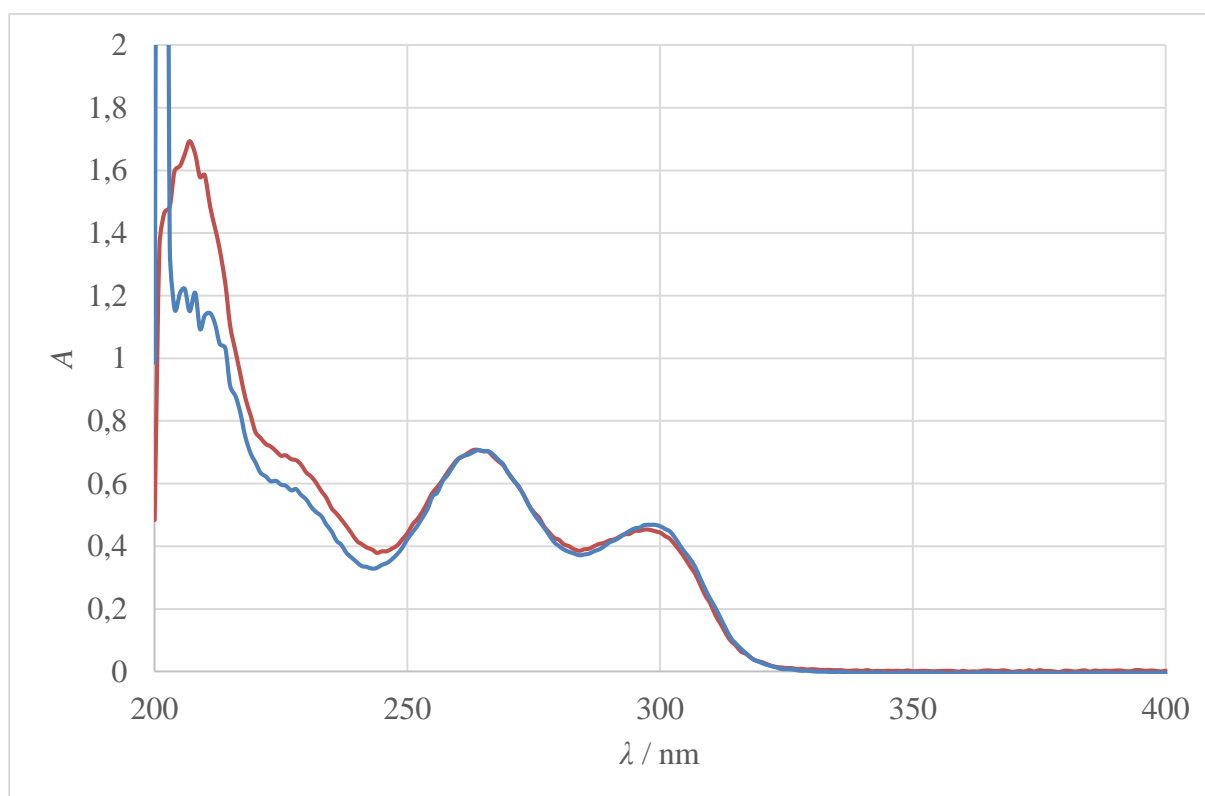
Na slici 4.3. vidljivo je da brzina otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja **5a**·HCl izrazito ovisi o pH otopine, dok je kod hidrogela spoja **5d**·HCl ovisnost brzine otpuštanja PAS·HCl o pH nešto manja (slika 4.4.). Također, vidljivo je kako hidrogelovi spojeva **5a**·HCl i **5d**·HCl pri pH = 1,1 pokazuju praktički isti oblik krivulje otpuštanja PAS·HCl (slika 4.5.), dok su krivulje otpuštanja PAS iz hidrogelova spojeva **5a**·HCl i **5d**·HCl pri pH = 7,2 u potpunosti različite te se PAS·HCl mnogo brže otpušta iz gelatora **5a**·HCl (slika 4.6.). Usporedbom slika 4.3. i 4.4. vidljivo je kako je otpuštanje PAS·HCl općenito brže pri pH 7,2. Gelator **5a**·HCl pokazuje željena svojstva, odnosno znatno brže otpuštanje aktivne tvari pri pH = 7,2 nego pri pH = 1,1.

Kako bi se provjerilo dolazi li do raspada PAS tijekom opisanog postupka pripreve hidrogela, i snimanja kinetike otpuštanja PAS·HCl nakon svakog snimanja kinetike otpuštanja snimljen je i UV-Vis spektar reakcijske smjese. Dobiveni spektri uspoređeni su sa spektrima čistog PAS na slikama 4.7. i 4.8.



Slika 4.7. UV-Vis spektar — reakcijske smjese pH = 1,1 nakon snimanja kinetike otpuštanja PAS iz hidrogela gelatora **5a**·HCl i spektar — PAS (pH = 1,1) pri sobnoj temperaturi. Spektar PAS skaliran je tako da apsorbancija PAS pri $\lambda = 300$ nm bude jednaka apsorbanciji reakcijske smjese.

Kako na slici 4.7. pri $\lambda = 270$ nm nije vidljiv signal koji bi odgovarao maksimumu apsorpcije MAP, za pretpostaviti je kako opisanim postupkom ne dolazi do nastajanja znatnijih količina MAP. Spektar reakcijske smjese pH = 1,1 nakon snimanja kinetike otpuštanja PAS iz hidrogela gelatora **5d**·HCl analogan je prikazanom te se može zaključiti da niti u hidrogelu tog spoja ne dolazi do nastajanja MAP.



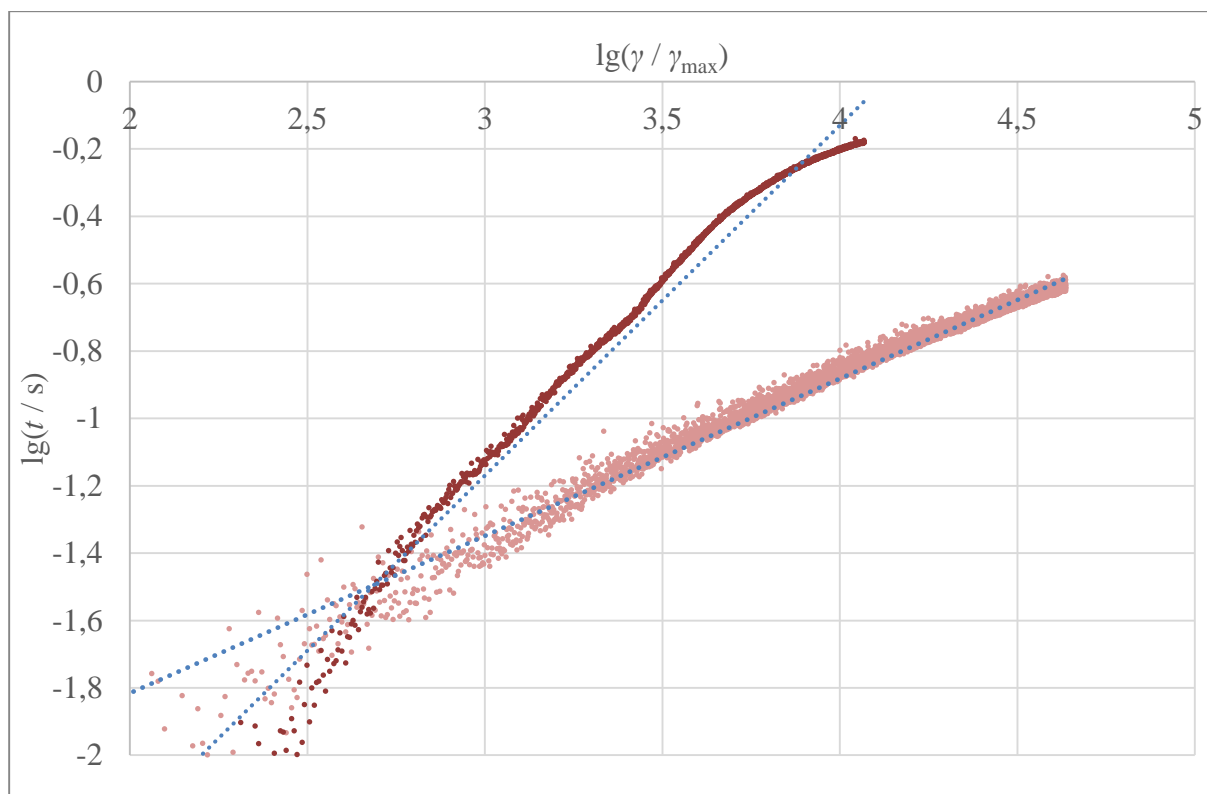
Slika 4.8. UV-Vis spektar — reakcijske smjese pH = 7,2 nakon snimanja kinetike otpuštanja PAS iz hidrogela gelatora **5a**·HCl i spektar — PAS (pH = 7,2) pri sobnoj temperaturi. Spektar PAS skaliran je tako da apsorbancija PAS pri $\lambda = 265$ nm bude jednaka apsorbanciji reakcijske smjese.

Na slici 4.8. vidljivo je kako nije došlo do smanjivanja „dola“ pri $\lambda = 282$ nm, između dva apsorpcijska maksimuma PAS, što upućuje da tijekom eksperimenta ne dolazi do raspada PAS. Spektar reakcijske smjese pH = 7,2 nakon snimanja kinetike otpuštanja PAS iz hidrogela gelatora **5d**·HCl analogan je onom prikazanom na slici 4.8.

4.2.3. Primjena kinetičkih modela

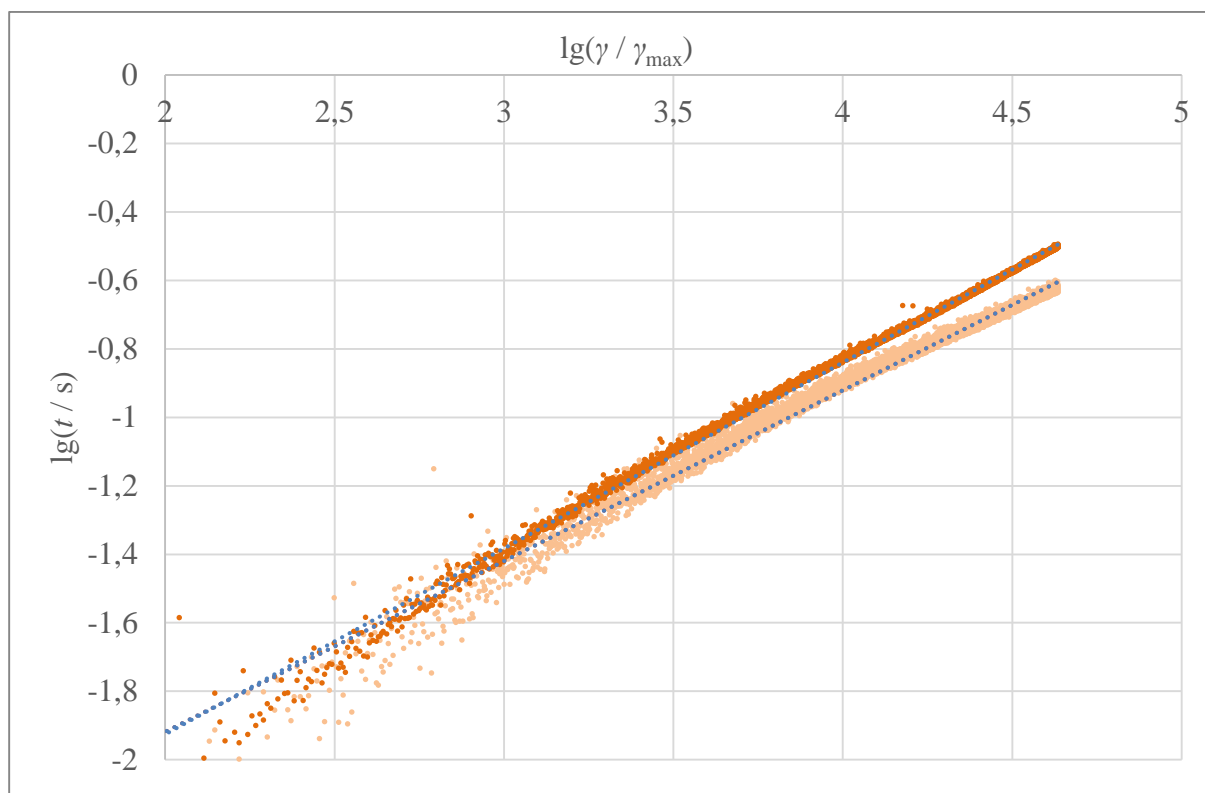
Nakon što su prikupljeni podaci o kinetici otpuštanja PAS, pristupilo se traženju odgovarajućeg modela koji bi bio u dobrom slaganju s izmjerenim vrijednostima u svrhu boljeg razumijevanja procesa koji su odgovorni za izgled krivulje ovisnosti udjela otpuštenog PAS o vremenu.

Kako bi se provjerila primjenjivost jednostavnog empirijskog modela Ritgera i Peppasa i odredio difuzijski eksponent (jednadžba (1)), koji je povezan s mehanizmom otpuštanja aktivne tvari, prikazana je ovisnost logaritma udjela otpuštene aktivne tvari o logaritmu vremena (slika 4.9. i 4.10.). Aktivna tvar u Eppendorfovoj epruveti može se uslijed difuzije kretati samo u smjeru otvora epruvete (nema radijalne difuzije zbog stijenki epruvete), zbog čega je sustav aproksimiran plohom prema modelu Ritgera i Peppasa.



Slika 4.9. Kinetika otpuštanja PAS iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri — pH = 1,1 i — pH = 7,2 prema empirijskom modelu Ritgera i Peppasa (jednadžba 1). Podatci za pH = 7,2 prikazani su do 195. min, kada udio otpuštene tvari postaje veći od 60 %.

Na slici 4.9. vidljivo je kako kinetika otpuštanja PAS iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri pH = 1,1 pokazuje vrlo dobro slaganje s modelom Ritgera i Peppasa, dok je pri pH = 7,2 slaganje s modelom nešto slabije, unatoč tome što podatci nakon $t = 195$ min nisu uzeti u obzir zbog ograničenosti modela do 60 % oslobođene aktivne tvari. Vrijednosti difuzijskih koeficijenata prikazane su u tablici 1.



Slika 4.10. Kinetika otpuštanja PAS iz hidrogela spoja **5d**·HCl pri — pH = 1,1 i — pH = 7,2 prema empirijskom modelu Ritgera i Peppasa (jednadžba 1).

Kinetika otpuštanja PAS iz hidrogela spoja **5d**·HCl pokazuje vrlo dobro slaganje s modelom Ritgera i Peppasa i pri pH = 1,1, i pri pH = 7,2 (slika 4.10.). Vrijednosti difuzijskih koeficijenata prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Difuzijski eksponenti priređenih hidrogelova pri $\theta = (25,0 \pm 0,1)$ prema empirijskom modelu Ritgera i Peppasa (jednadžba (1)).

gelator	pH	n
5a ·HCl	1,1	0,467
5a ·HCl	7,2	1,04
5d ·HCl	1,1	0,499
5d ·HCl	7,2	0,543

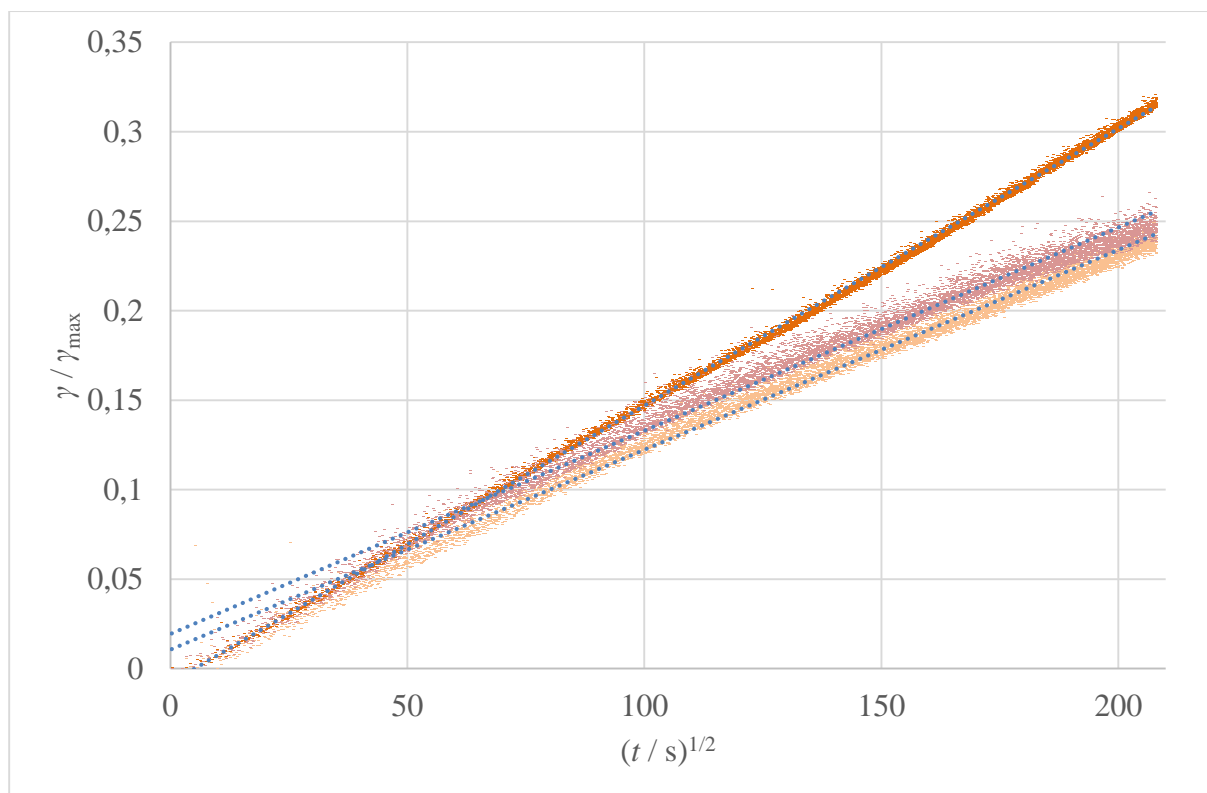
U tablici 1 vidljivo je kako difuzijski eksponent za hidrogel gelatora **5a**·HCl pri pH = 1,1 i hidrogel gelatora **5d**·HCl pri pH = 1,1 i pH = 7,2 iznosi približno 0,5, što upućuje na difuzijski mehanizam oslobađanja aktivne tvari koji prati Fickove zakone difuzije. Difuzijski eksponent

od 1,04, kao i slabije slaganje s ovim modelom, ukazuju na to da je otpuštanje aktivne tvari iz gelatora **5a**·HCl uputno opisati drugim modelom.

Za slučaj kada se za otpuštanje aktivne tvari može opisati Fickovim zakonom difuzije, jednadžba (2) Ritgera i Peppasa prilagođena je izvedbi mjerenja. Ova jednadžba može se primijeniti na kinetiku otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela gelatora **5a**·HCl pri pH = 1,1 i gelatora **5d**·HCl pri pH = 1,1 i pH = 7,2 (tablica 1, difuzijski eksponent oko 0,5). U ovom radu mjerena je kinetika otpuštanja iz Eppendorfove epruvete, a ne tanke plohe, stoga je umjesto veličine l uvrštena veličina l_{Epp} , gdje je l_{Epp} debljina sloja hidrogela u Eppendorfovoj epruveti. Kako Eppendorfova epruveta ima samo jedan slobodan kraj, vrijedi jednakost $l = 2l_{Epp}$. Uvrštavanjem ove jednakosti u jednadžbu (2) dobiva se izraz:

$$\frac{\gamma}{\gamma_{\infty}} = \frac{2}{l_{Epp}} \left(\frac{Dt}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

Kako bi se odredila konstanta difuzije, prikazane su ovisnosti γ / γ_{∞} o $t^{1/2}$.



Slika 4.11. Određivanje konstante disocijacije prema modelu Ritgera i Peppasa koji pretpostavlja difuziju aktivne tvari u skladu s Fickovim zakonima difuzije. Kinetika otpuštanja PAS iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri — pH = 1,1 i **5d**·HCl pri — pH = 1,1 i — pH = 7,2. $l_{Epp} = 2,3$ cm, $\theta = (25,0 \pm 0,1)$ °C.

Tablica 2. Konstante difuzije PAS iz hidrogelova pri $\theta = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ prema modelu Ritgera i Peppasa za otpuštanje aktivne tvari iz gela koje se može opisati Fickovim zakonima difuzije.

Gelator	pH	$D / \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
5a ·HCl	1,1	$5,4 \times 10^{-6}$
5d ·HCl	1,1	$5,2 \times 10^{-6}$
5d ·HCl	7,2	$1,00 \times 10^{-5}$

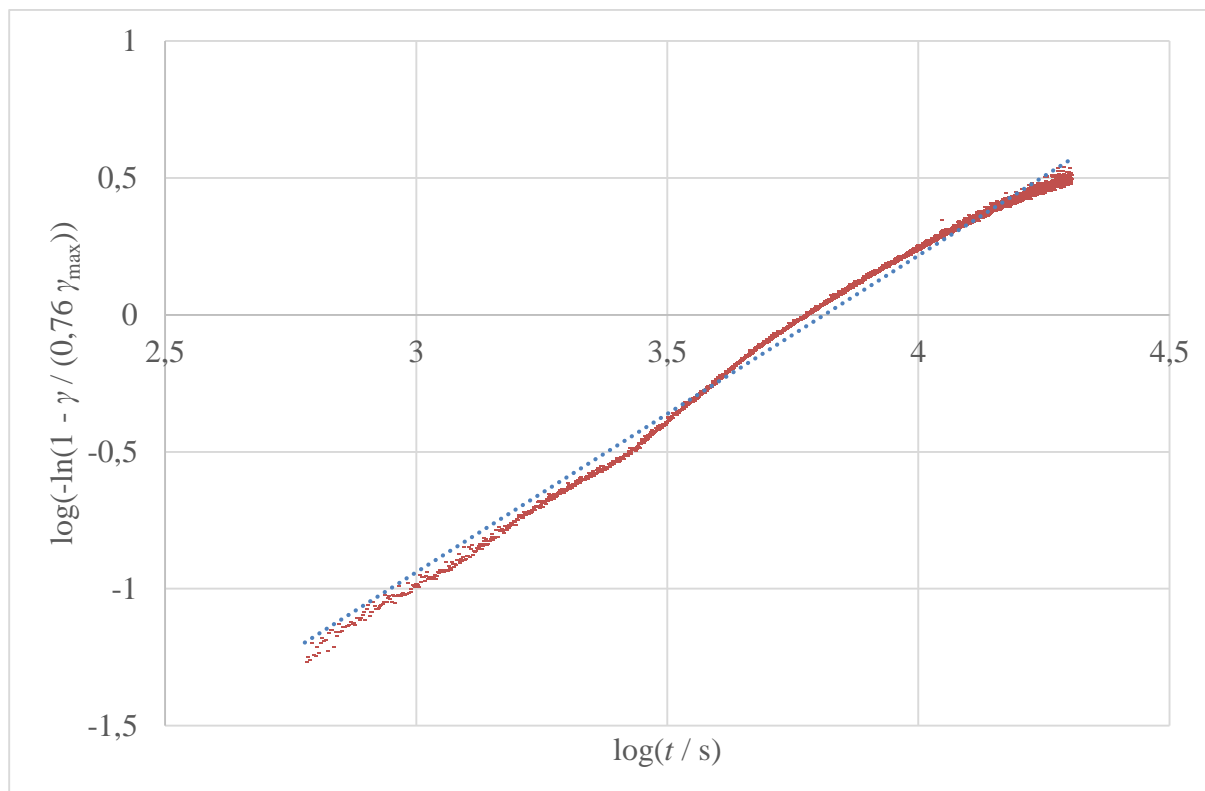
Čaplar i suradnici⁶ mjerili su konstantu difuzije metodom penetracije otapala s otopljenom obojenom molekulom male molarne mase u hidrogel spojeva strukture slične strukturi spojeva **5a**·HCl i **5b**·HCl te su dobili rezultate u rasponu $(2,31 \times 10^{-7} - 4,178 \times 10^{-5}) \text{cm}^2 / \text{s}$, što je u dobrom slaganju s rezultatima dobivenim ovom metodom (tablica 2).

Kako kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela gelatora **5a**·HCl ne prati Fickove zakone difuzije (difuzijski eksponent veći od 0,5) te najviše odstupa od empirijskog modela Hellera i Bakera, pretpostavilo se kako, uz difuziju, postoji još neki proces koji utječe na kinetiku otpuštanja. Krivulja ovisnosti udjela otpuštene PAS o vremenu za hidrogel gelatora **5a**·HCl ima sigmoidalan oblik, što je karakteristično za sustave u kojima, pored difuzije, erozija matrice utječe na brzinu otpuštanja aktivne tvari. Takav sustav može se opisati Weibullovom raspodjelom (jednadžba (3)). Kako bi se Weibullova raspodjela mogla primijeniti, potrebno je da vrijednost γ / γ_∞ teži k 1. U suprotnom, jednadžba se može korigirati pomoću vrijednosti kojoj omjer γ / γ_∞ teži. Ta vrijednost za gelator **5a**·HCl pri pH = 7,2 iznosi oko 0,76. Također, kako kod krivulje otpuštanja nije vidljiv vremenski odmak početka otpuštanja, t_{lag} , pretpostavljeno je da vrijedi $t_{\text{lag}} = 0$. Prilagodbom jednadžbe (3) eksperimentalnim podacima dobivena je jednadžba za kinetiku otpuštanja PAS iz gelatora **5a**·HCl prema Weibullovoj raspodjeli:

$$\frac{\gamma}{\gamma_\infty} = 0,76 \left(1 - e^{-\frac{t^b}{t_{\text{scale}}}} \right) \quad (11)$$

Logaritmiranjem jednadžbe (11) dobiva linearizirani izraz:

$$\log \left(-\ln \left(1 - \frac{\gamma}{0,76\gamma_\infty} \right) \right) = b \log \left(\frac{t}{s} \right) - \log \left(\frac{t_{\text{scale}}}{s} \right) \quad (12)$$



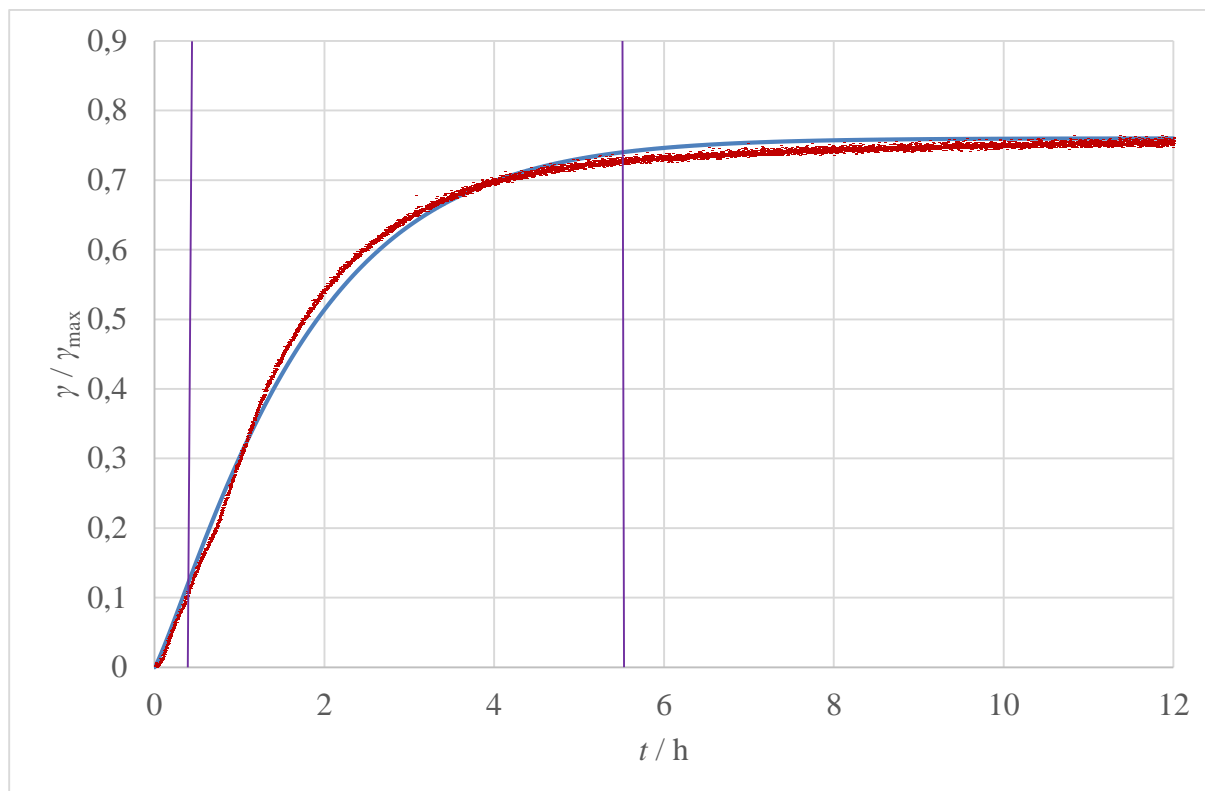
Slika 4.12. Određivanje parametara b i t_{scale} prema Weibullovoj raspodjeli. Kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri pH = 7,2 i $\theta = (25,0 \pm 0,1)$. Prilikom linearizacije nisu korištene vrijednosti izmjerene prije 10. i nakon 333. min.

Parametri b i t_{scale} izračunati su za kinetiku otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri pH = 7,2 i $\theta = (25,0 \pm 0,1)$ i iznose:

$$b = 1,16$$

$$t_{\text{scale}} = 2,57 \times 10^4 \text{ s} = 7,16 \text{ h}$$

Primjenom Weibullove raspodjele, kao i kod ostalih transformacija mijenjaju se izvorni odnosi veličina. Odstupanja od eksperimentalnih vrijednosti u gornjem i u donjem dijelu krivulje u Weibullovoj raspodjeli izrazito su naglašena u odnosu na odstupanja u srednjem dijelu krivulje.¹⁹ Kako bi se dobilo bolje slaganje eksperimentalne i teorijske krivulje u središnjem dijelu grafa, gdje je najveća brzina otpuštanja PAS, vrijednosti izmjerene nakon 333. min nisu korištene prilikom linearizacije. Vrijednosti prije 10. min također nisu uzete u obzir zbog njihovog velikog raspršenja. Kako bi se provjerilo slaganje modela s eksperimentalnim vrijednostima, pomoću izračunatih parametara prikazana je Weibullova krivulja zajedno s ovisnosti γ / γ_{∞} o t za kinetiku otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri pH = 7,2 i $\theta = (25,0 \pm 0,1)$.



Slika 4.13. Kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri pH = 7,2 i $\theta = (25,0 \pm 0,1)$. — eksperimentalni podatci, — vrijednosti izračunate prema Weibullovom modelu. Ljubičastim okomitim linijama naznačen je raspon vrijednosti koji je korišten prilikom linearizacije.

Na slici 4.13 vidljivo je kako Weibullov model jako dobro opisuje eksperimentalne podatke. Postoje i složeniji, mehanistički modeli koji bi mogli kvalitetnije opisati izmjerene vrijednosti i dati dublji uvid u procese zaslužne za ovakav izgled krivulje^{47,48}, ali njihova je primjena izvan dosega ovog rada. Jednostavnim mehanističkim modelom Hellera i Bakera²¹ ne može se opisati cijela krivulja otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri pH = 7,2 zato što kod ovog modela za velike t brzina otpuštanja aktivne tvari teži u beskonačnost. Ipak, model daje jasan uvid u to kako hidrolitičko cijepanje veza u polimernoj okosnici (ili u slučaju spoja **5a**·HCl supramolekulskoj okosnici) može utjecati na kinetiku otpuštanja aktivne tvari, stoga ga vrijedi prokomentirati.

Model Hellera i Bakera²¹ bazira se na Higuchijevom modelu²² za otpuštanje aktivne tvari difuzijom iz tanke plohe, uz pretpostavku da permeabilnost polimera raste proporcionalno broju veza koji je puknuo erozijom polimerne matrice. U slučaju hidrogela spoja **5a**·HCl, do erozije dolazi prodiranjem pufera (pH = 7,2) u gel i prevođenjem spoja **5a**·HCl u odgovarajuću

slobodnu bazu, **5a**. Hidroklorid spoja **5a** odličan je gelator i tvori matricu gela vežući se sa susjednim molekulama različitim nekovalentnim interakcijama, poput vodikove veze, π - π interakcija, van der Waalsovih sila itd. Prevođenjem hidroklorida u slobodnu bazu narušavaju se nekovalentne interakcije, a time i struktura gela, što omogućuje lakšu difuziju molekula PAS. Usporedbom slike 2.1. i slike 4.3. vidljivo je kako model Hellera i Bakera može vrlo dobro objasniti razlika u brzini otpuštanja PAS iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri pH = 1,1 i pH = 7,2.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovome radu optimizirana je sinteza tri prethodno sintetizirana 4-pikolilamidna pH-ovisna hidrogelatora male molekulske mase (**5a**, **5c**, **5f**) te su sintetizirana tri nova, strukturno slična spoja (**5b**, **5d**, **5e**). Prilikom sinteze željenih spojeva isprobani su različiti sintetski putevi te su određeni optimalni reakcijski uvjeti.

Nakon što su željeni spojevi sintetizirani, mjerena je kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogelova spojeva **5a**·HCl i **5d**·HCl u otopinama pH = 1,1 i pH = 7,2. Kinetička mjerenja pokazala su da je otpuštanje PAS·HCl iz oba sustava brže pri pH = 7,2 nego pri pH = 1,1, što bi se moglo korisno primijeniti za kontrolirano otpuštanje PAS·HCl, a razlika u brzini otpuštanja značajno je veća kod hidrogela spoja **5a**·HCl u odnosu na hidrogel spoja **5d**·HCl.

Kako bi se dobio uvid u mehanizam otpuštanja aktivne tvari iz priređenih sustava, na eksperimentalne podatke primijenjeni su matematički modeli. Kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri pH = 1,1 i hidrogela spoja **5d**·HCl pri pH = 1,1 i pH = 7,2 pokazuje dobro slaganje s modelom Ritgera i Peppasa za otpuštanje aktivne tvari mehanizmom difuzije koja prati Fickove zakone difuzije. Primjenom tog modela određen je koeficijent difuzije aktivne tvari za navedene sustave. Dobivene vrijednosti u skladu su s vrijednostima izmjerenim za hidrogelove gelatora slične strukture. Kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri pH = 7,2 opisana je Weibullovom raspodjelom, koja se može koristiti za opis kinetike otpuštanja iz sustava u kojima, uz difuziju, erozija hidrogela utječe na brzinu otpuštanja aktivne tvari. Do erozije hidrogela dolazi prodiranjem pufera pH = 7,2 koji prevodi molekulu **5a**·HCl u slobodnu bazu **5a**, čime dolazi do slabljenja međumolekulskih interakcija između molekula hidrogela i narušavanja strukture gela.

U daljnjim istraživanjima ispitat će se kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogelova preostalih četiri hidrogelatora.

§ 6. ZAHVALE

Hvala mentorima prof. dr. sc. Tajani Preočanin i doc. dr. sc. Tomislavu Portadi na iskazanom strpljenju, korisnim savjetima, ugodnoj atmosferi i uloženom trudu i vremenu.

Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Leu Frkanecu što mi je omogućio rad u Laboratoriju za supramolekularnu kemiju Instituta Ruđer Bošković.

Hvala obitelji, prijateljima i kolegama na pruženoj potpori.

§ 7. POPIS LITERATURE

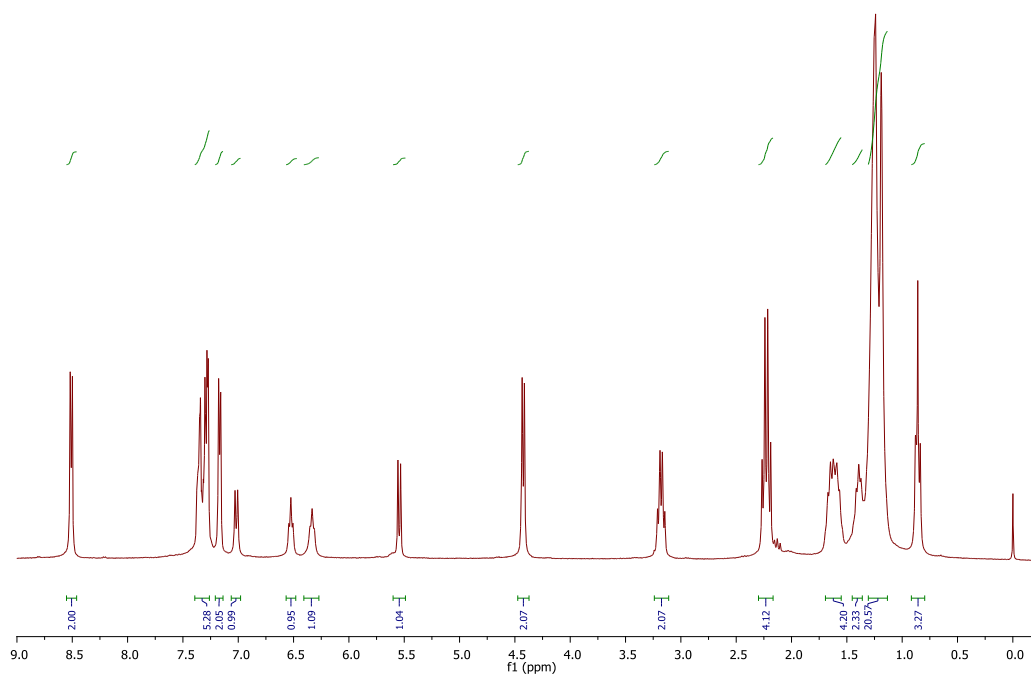
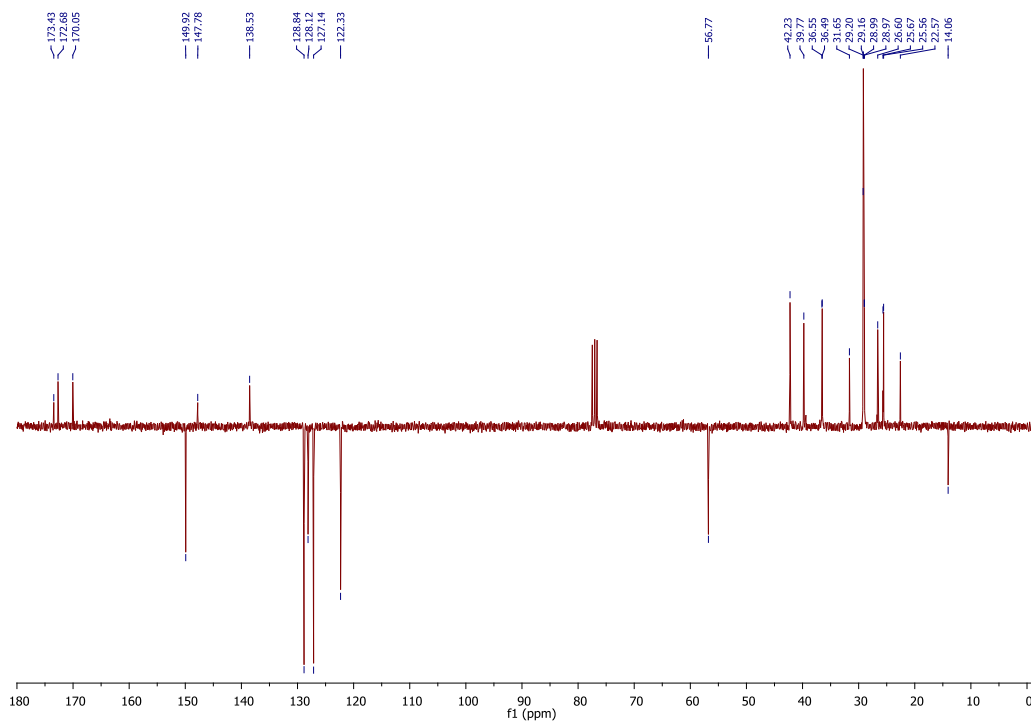
1. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2018*. (2018).
2. Gandhi, N. R. *et al.* Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet* **375**, 1830–1843 (2010).
3. Donald, P. R. & Diacon, A. H. Para-aminosalicylic acid: the return of an old friend. *Lancet Infect. Dis.* **15**, 1091–1099 (2015).
4. Rekker, R. F. & Nauta, W. T. The U. V. Absorption Spectra of p-Aminosalicylic Acid and some Related Compounds--IV. The Ampholytic Forms of p-Aminosalicylic Acid and some Structurally Related Compounds and their Decarboxylation. *J. Med. Pharm. Chem.* **2**, 281–297 (1960).
5. Evans, D. F. *et al.* Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* **29**, 1035–41 (1988).
6. Čaplar, V., Frkanec, L., Jokić, M., Portada, T., Makarević, J., Žinić, M & Jelčić, Ž. Gel Forming Compounds. (2008).
7. *Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature. Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature* (Royal Society of Chemistry, 2009).
doi:10.1039/9781847559425
8. Sangeetha, N. M. & Maitra, U. Supramolecular gels: Functions and uses. *Chem. Soc. Rev.* **34**, 821 (2005).
9. Yoshida, R., Sakai, K., Okano, T. & Sakurai, Y. Pulsatile drug delivery systems using hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **11**, 85–108 (1993).
10. Qiu, Y. & Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**, 321–339 (2001).
11. Firestone, B. A. & Siegel, R. A. Kinetics and mechanisms of water sorption in hydrophobic, ionizable copolymer gels. *J. Appl. Polym. Sci.* **43**, 901–914 (1991).
12. Grassi, M. & Grassi, G. Application of mathematical modeling in sustained release delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **11**, 1299–1321 (2014).
13. Siepmann, J. & Göpferich, A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **48**, 229–247 (2001).
14. Mallapragada, S. K. & Peppas, N. A. Crystal unfolding and chain disentanglement

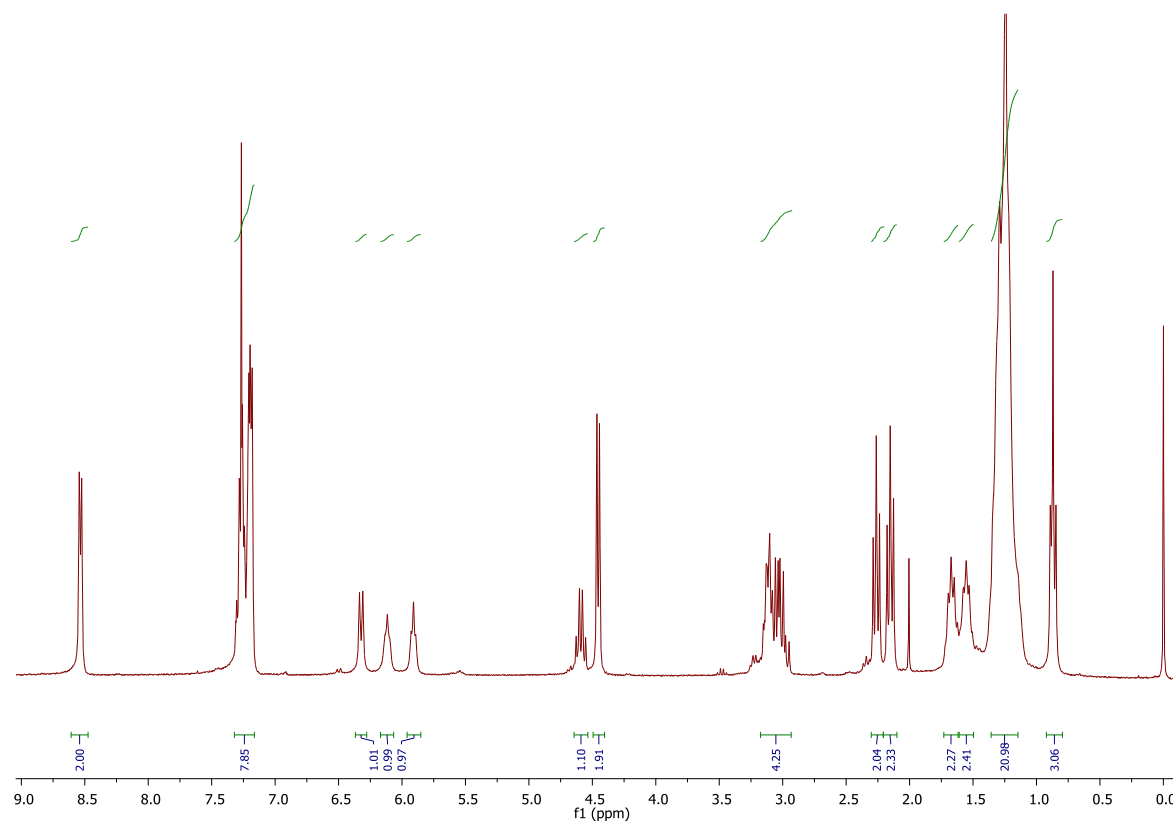
- during semicrystalline polymer dissolution. *AIChE J.* **43**, 870–876 (1997).
15. Grassi, M. *Understanding drug release and absorption mechanisms : a physical and mathematical approach.* (CRC Press, 2007).
 16. Singh, M., Lumpkin, J. A. & Rosenblatt, J. Mathematical modeling of drug release from hydrogel matrices via a diffusion coupled with desorption mechanism. *J. Control. Release* **32**, 17–25 (1994).
 17. Amsden, B. Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models. *Macromolecules* **31**, 8382–8395 (1998).
 18. Ritger, P. L. & Peppas, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release* **5**, 23–36 (1987).
 19. Langenbucher, F. Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *J. Pharm. Pharmacol.* **24**, 979–981 (1972).
 20. Arifin, D. Y., Lee, L. Y. & Wang, C.-H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1274–1325 (2006).
 21. Heller, J. & Baker, R. W. Theory and practice of controlled drug delivery from bioerodible polymers. in *Controlled Release of Bioactive Materials* 1–17 (Elsevier, 1980). doi:10.1016/b978-0-12-074450-3.50005-x
 22. Higuchi, T. Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension. *J. Pharm. Sci.* **50**, 874–875 (1961).
 23. Ahmad, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, 814943 (2011).
 24. Lawn, S. D. & Zumla, A. I. Tuberculosis. *Lancet* **378**, 57–72 (2011).
 25. Zumla, A., Raviglione, M., Hafner, R. & Fordham von Reyn, C. Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **368**, 745–755 (2013).
 26. Lönnroth, K. *et al.* Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development. *Lancet (London, England)* **375**, 1814–29 (2010).
 27. World Health Organization. *Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing.* (2009).
 28. Jeon, C. Y. & Murray, M. B. Diabetes Mellitus Increases the Risk of Active Tuberculosis: A Systematic Review of 13 Observational Studies. *PLoS Med.* **5**, e152

- (2008).
29. Dooley, K. E. & Chaisson, R. E. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. *Lancet. Infect. Dis.* **9**, 737–46 (2009).
 30. Bates, M. N. *et al.* Risk of Tuberculosis From Exposure to Tobacco Smoke. *Arch. Intern. Med.* **167**, 335 (2007).
 31. Lowe, C. R. An association between smoking and respiratory tuberculosis. *Br. Med. J.* **2**, 1081–6 (1956).
 32. Lönnroth, K., Williams, B. G., Stadlin, S., Jaramillo, E. & Dye, C. Alcohol use as a risk factor for tuberculosis – a systematic review. *BMC Public Health* **8**, 289 (2008).
 33. Huang, S.-J. *et al.* Vitamin D deficiency and the risk of tuberculosis: a meta-analysis. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 91–102 (2017).
 34. Cowie, R. L. The epidemiology of tuberculosis in gold miners with silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**, 1460–1462 (1994).
 35. Shah, N. S. *et al.* Worldwide Emergence of Extensively Drug-resistant Tuberculosis. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 380–387 (2007).
 36. Migliori, G. B., De Iaco, G., Besozzi, G., Centis, R. & Cirillo, D. M. First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. *Wkly. releases* **12**, 3194 (2007).
 37. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000-2004. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **55**, 301–5 (2006).
 38. Gandhi, N. R. *et al.* Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* **368**, 1575–1580 (2006).
 39. Seidel, H. & Bittner, J. C. Über Derivate der Nitroptalsäuren. *Monatshefte für Chemie* **23**, 415–436 (1902).
 40. Lehmann, J. Twenty Years Afterward. Historical Notes on the Discovery of the Antituberculosis Effect of Para-Aminosalicylic Acid (PAS) and the First Clinical Trials. *Am. Rev. Respir. Dis.* **90**, 953–6 (1964).
 41. Bernheim, F. The effect of salicylate on the oxygen uptake of the tubercle bacillus. *Science* **92**, 204 (1940).
 42. Lehmann, J. Para-Aminosalicylic acid in the Treatment of Tuberculosis. *Lancet* **247**, 15–16 (1946).

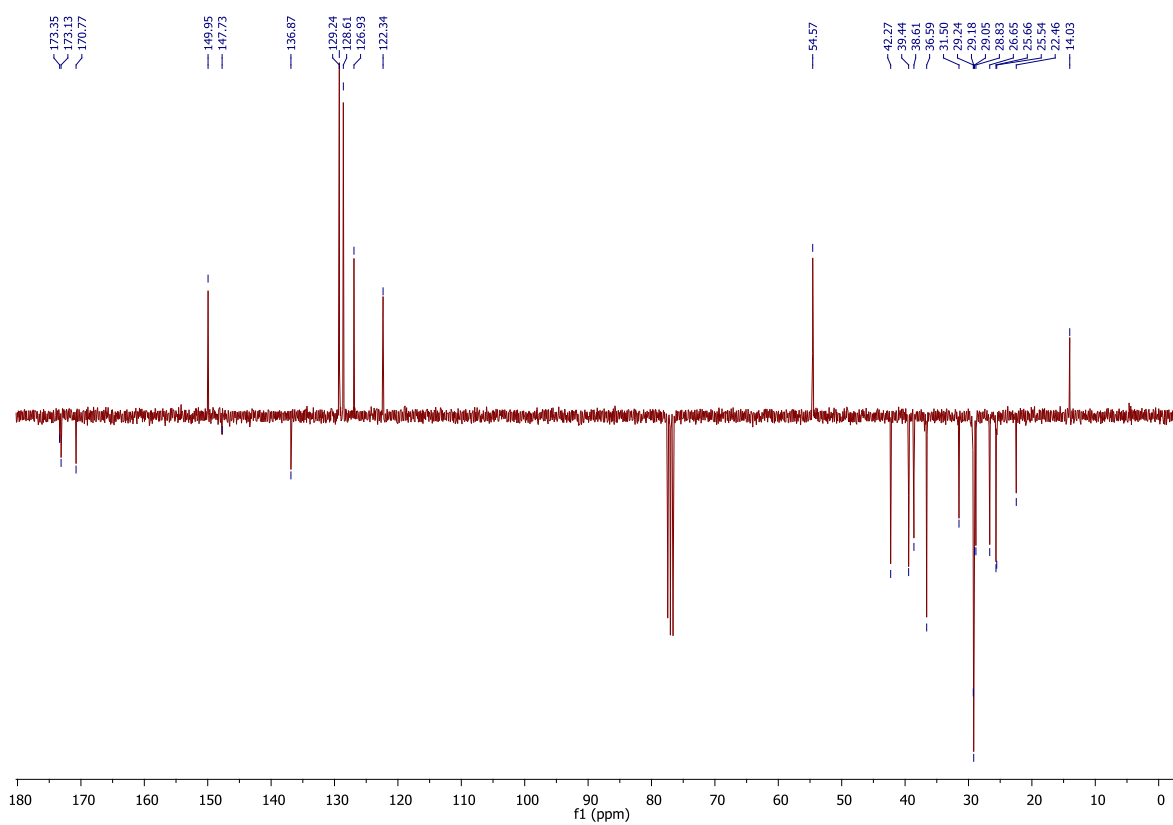
43. Kibleur, Y., Brochart, H., Schaaf, H. S., Diacon, A. H. & Donald, P. R. Dose Regimen of Para-Aminosalicylic Acid Gastro-Resistant Formulation (PAS-GR) in Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Clin. Drug Investig.* **34**, 269–276 (2014).
44. Wesolowski, M. The decarboxylation and thermal stability of p-amino-salicylic acid and its salts. *Thermochim. Acta* **21**, 243–253 (1977).
45. Lehmann, J. The role of the metabolism of p-aminosalicylic acid (PAS) in the treatment of tuberculosis. Interaction with the metabolism of isonicotinic acid hydrazide (INH) and the synthesis of cholesterol. *Scand. J. Respir. Dis.* **50**, 169–85 (1969).
46. Wan, S. H., Pentikainen, P. J. & Azarnoff, D. L. Bioavailability of aminosalicylic acid and its various salts in humans. 3. Absorption from tablets. *J. Pharm. Sci.* **63**, 708–11 (1974).
47. He, J., Zhong, C. & Mi, J. Modeling of Drug Release from Bioerodible Polymer Matrices. *Drug Deliv.* **12**, 251–259 (2005).
48. Zhang, M., Yang, Z., Chow, L. & Wang, C. Simulation of Drug Release from Biodegradable Polymeric Microspheres with Bulk and Surface Erosions. *J. Pharm. Sci.* **92**, 2040–2056 (2003).

§ 8. DODATAK

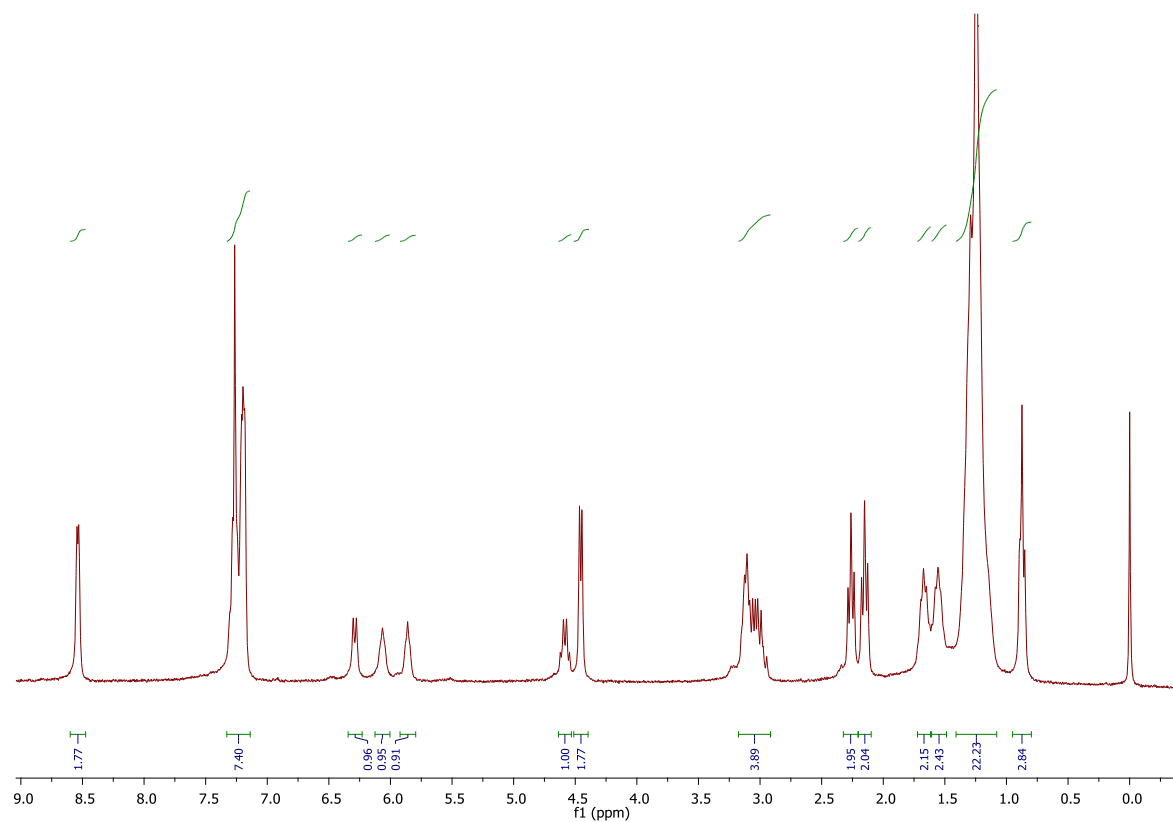
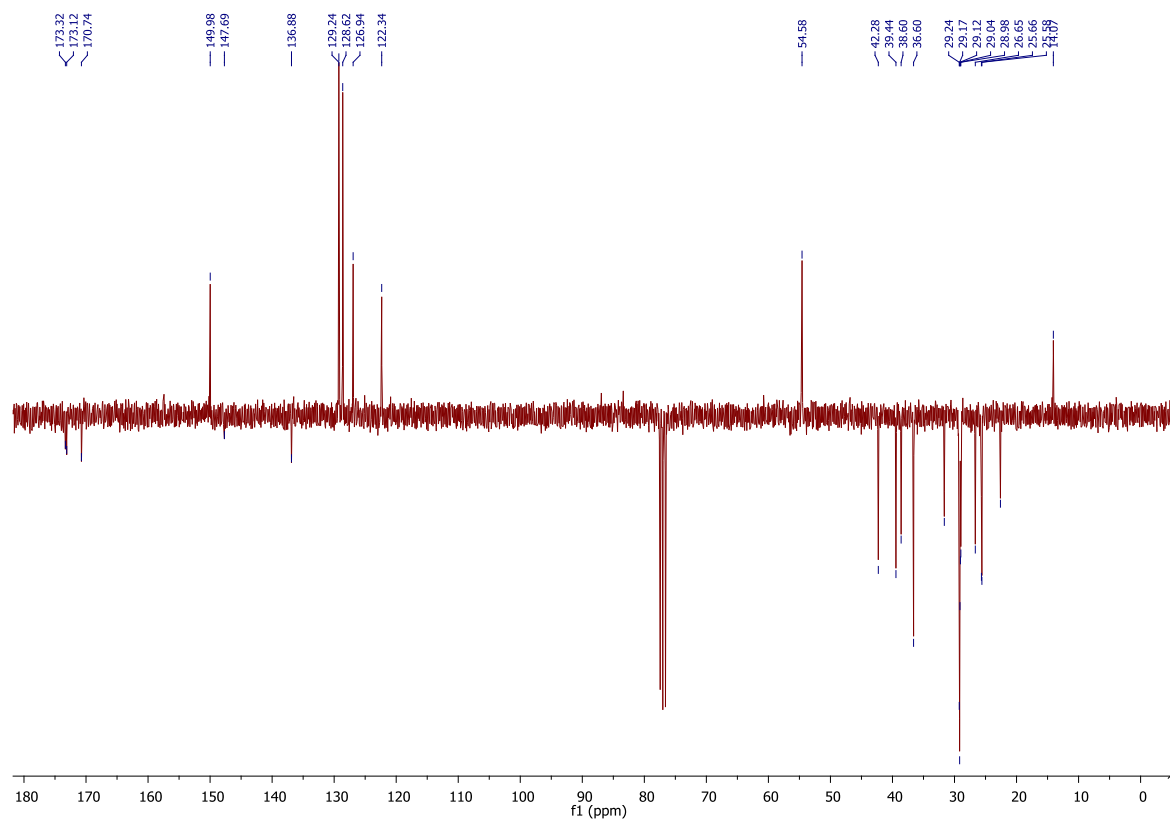
Slika 8.1. ^1H NMR spektar spoja **5b**.Slika 8.2. ^{13}C NMR spektar spoja **5b**.



Slika 8.3. ^1H NMR spektar spoja **5d**. Signal pri 2,00 pripada acetonitrilu.



Slika 8.4. ^{13}C NMR spektar spoja **5d**.

Slika 8.5. ^1H NMR spektar spoja **5e**.Slika 8.6. ^{13}C NMR spektar spoja **5e**.

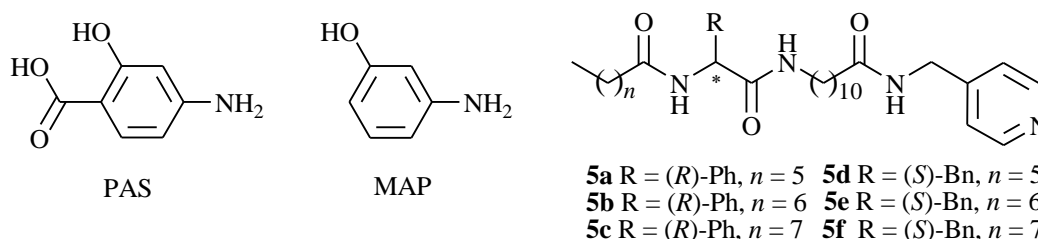
SAŽETAK

Kinetika otpuštanja hidroklorida 4-aminosalicilne kiseline iz biološki prihvatljivih pH-ovisnih 4-pikolilamidnih hidrogelatora male molekulske mase

Viktor Škorjanc

4-aminosalicilna kiselina (*p*-aminosalicilna kiselina, PAS) upotrebljava se još od 1940-ih za liječenje tuberkuloze. S vremenom su je iz uporabe istisnuli učinkovitiji lijekovi, no nastanak sojeva uzročnika tuberkuloze iznimno otpornih na antibiotike ponovno joj je dao na važnosti. Pri povišenoj temperaturi i u vodenim otopinama čiji je pH u rasponu od 1,3 do 5,3 PAS se raspada na 3-aminofenol (*m*-aminofenol, MAP), potencijalno otrovan spoj, zbog čega je bitno spriječiti otpuštanje PAS u želudcu.

U ovom je radu dizajniran, pripremljen i istraživani novi sustav za kontrolirano otpuštanje PAS temeljen na 4-pikolilamidnim hidrogelatorima čija su gelirajuća svojstva ovisna o pH medija. Optimizirana je sinteza spojeva **5a**, **5c** i **5f**, te su dizajnirani i sintetizirani novi spojevi **5b**, **5d** i **5e**.



Slika S1. Strukturne formule PAS, MAP i opća formula 4-pikolilamidnih hidrogelatora.

Praćena je kinetika otpuštanja PAS·HCl iz hidrogelova gelatora **5a**·HCl i **5d**·HCl u vodenim otopinama pri pH = 1,1 i pri pH = 7,2. Hidrogel dobiven zagrijavanjem vodene otopine PAS·HCl i hidrogelatora uronjen je u otopinu određenog pH te je, uz konstantno miješanje, UV-Vis-sondom praćena apsorbancija pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije PAS tijekom 12 h. Rezultati mjerenja ukazuju na to da je otpuštanje PAS·HCl iz oba sustava brže pri pH = 7,2. Razlika u brzini otpuštanja pri različitim pH znatno je veća kod hidrogela spoja **5a**·HCl.

Upotrebom matematičkih modela pokazano je da se PAS·HCl otpušta iz hidrogela gelatora **5a**·HCl pri pH = 1,1 i iz hidrogela gelatora **5d**·HCl pri pH = 1,1 i pH = 7,2 mehanizmom difuzije koja prati Fickove zakone difuzije. Izmjerene vrijednosti difuzijskih koeficijenata u skladu su s vrijednostima izmjerenim za gelatore slične strukture. Na kinetiku otpuštanja PAS·HCl iz hidrogela spoja **5a**·HCl pri pH = 7,2 uz difuziju aktivne tvari utječe i erozija hidrogela.

(42 stranice, 16 slika, 5 tablica, 2 sheme, 48 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Ključne riječi: hidrogel, kontrolirano otpuštanje, 4-aminosalicilna kiselina, hidrogelatori male molekulske mase

Mentor: prof. dr. sc. Tajana Preočanin

Komentor: doc. dr. sc. Tomislav Portada

SUMMARY

Kinetics of 4-aminosalicylic Acid Hydrochloride Release from Biologically Acceptable pH-dependent 4-picolylamide Low Molecular Weight Hydrogelators

Viktor Škorjanc

4-aminosalicylic acid (*p*-aminosalicylic acid, PAS) has been used since the 1940s for treating tuberculosis. Eventually, it was supplanted by more effective drugs, but the appearance of tuberculosis strains insensitive to antibiotics put PAS back into use. At higher temperatures and in aqueous solutions of pH in the range between 1.3 and 5.3 PAS degrades to 3-aminophenol (*m*-aminophenol, MAP), a potentially toxic compound. That is why it is important to prevent the release of PAS in the stomach.

A novel system for the controlled release of 4-aminosalicylic acid hydrochloride based on 4-picolylamide hydrogelators whose gelating properties depend on the pH of the medium was designed and analysed. The synthesis of compounds **5a**, **5c** and **5f** has been optimised, and novel compounds **5b**, **5d** and **5e** have been designed and synthesised.

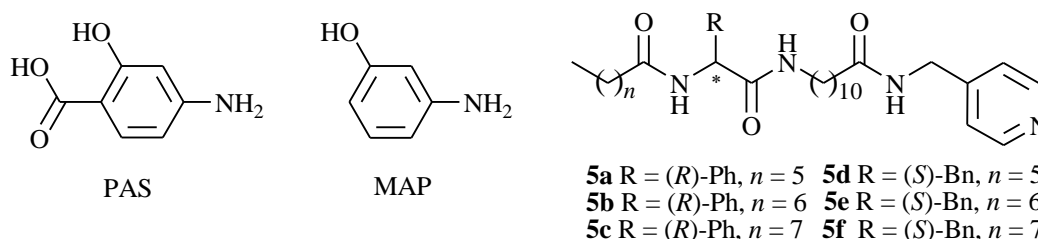


Figure S1. Structural formulae of PAS and MAP and the general formula of 4-picolylamide hydrogelators.

Kinetics of PAS·HCl release from hydrogels formed using compound **5a**·HCl or **5d**·HCl in aqueous solution at pH = 1.1 and pH = 7.2 was monitored. Hydrogel obtained by heating the aqueous solution of PAS·HCl and hydrogelator was immersed into a solution of a certain pH. Absorbance was monitored during 12 h at the wavelength of maximal absorbance of PAS by using a UV-Vis probe, with continuous stirring. The results indicate that the release of PAS·HCl at pH 7.2 is faster from both systems. Release kinetics from hydrogel of compound **5a**·HCl has a stronger dependence on the pH of the solution.

By using mathematical models, it is shown that PAS·HCl is released from hydrogel of gelator **5a**·HCl at pH = 1.1 and from hydrogel of gelator **5d**·HCl at pH = 1.1 and pH = 7.2 by the mechanism of Fickian diffusion. The measured values of diffusion coefficients are in accordance with the values measured for gelators of similar structures. The release kinetics of PAS·HCl from the hydrogel of the compound **5a**·HCl at pH = 7.2 is affected by both the diffusion of active substance and erosion of hydrogel.

(42 pages, 16 pictures, 5 tables, 2 schemes, 48 literaturnih navoda, original in Croatian)

Keywords: hydrogel, controlled release, 4-aminosalicylic acid, low molecular weight hydrogelators

Mentor: prof. dr. sc. Tajana Preočanin

Comentor: doc. dr. sc. Tomislav Portada