

Određivanje pKa vrijednosti odabranih spojeva prisutnih u valerijani, *Valeriana officinalis* L.

Čavlek, Aleksandra

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:415790>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Aleksandra Čavlek

Određivanje pKa vrijednosti odabranih spojeva prisutnih u valerijani,

***Valeriana officinalis* L.**

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Ana Amić

Osijek, 2022.

Sažetak

Valerijana, *Valeriana officinalis* L., zelena je trajnica koja se koristi u liječenju različitih stanja i bolesti čovjeka još od antičke Grčke i Rima. Može narasti do 150 cm u visinu, listovi su najčešće smješteni na višim dijelovima biljke. Cvjetovi valerijane mogu biti bijeli ili ružičasti, dok je plod valerijane maleni oraščić veličine do 0,5 cm. U cijeloj biljci valerijane do sada je identificirano oko 150 spojeva, ali još uvijek nije u potpunosti utvrđeno njihovo djelovanje. Budući da spojevi još nisu u potpunosti istraženi, pretpostavka je da se djelovanje preparata od valerijane temelji na sinergističkom učinku pojedinih spojeva ove biljke. Valerijana se danas najčešće koristi kod problema s nesanicom te nervozom. pKa vrijednost je logaritamska vrijednost konstante disocijacije. Pomoću pKa vrijednosti može se odrediti ili modificirati ponašanje tvari koje nas zanima, a pKa se može odrediti eksperimentalno i računalno. U ovom radu, računalno je određena pKa odabranih spojeva valerijane te je utvrđena promjena sumarnog naboja i protoniranih stanja u ovisnosti o pH medija za svaki ispitani spoj.

Ključne riječi: valerijana, pKa, ACD, valerenska kiselina, hidroksivalerenska kiselina, acetoksivalerenska kiselina

Abstract

Valerian, *Valeriana officinalis* L., is a green perennial plant used in the treatment of various conditions and illnesses since ancient Greece and Rome. It can grow up to 150 cm in height, the leaves are usually in the higher part of the plant. Valerian flowers can be white or pink while the fruit is in the form of a little nut and has a size up to 0.5 cm. Around 150 different compounds have been discovered in the valerian plant, but their activity has not been fully elucidated yet. Since these compounds have not been fully investigated yet, the effect of the valerian preparations is assumed to be a result of synergistic effect of individual components of this plant. Nowadays, valerian is commonly used for insomnia and anxiety treatment. pKa value is the logarithmic value of the dissociation constant. pKa may help in determining or modifying the activity of studied compound, and is determined experimentally and computationally. In this thesis, pKa of selected compounds found in valerian was computationally determined. Also, net charges and protonation charges vs pH were analysed for chosen compounds.

Key words: valerian, pKa, ACD, valerenic acid, hydroxyvalerenic acid, acetoxyvalerenic acid

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Valerijana, <i>Valeriana officinalis</i> L.	2
2.1.1. Kemijski sastav valerijane	4
2.1.1.1. Alkaloidi u valerijani	5
2.1.1.2. Organske kiseline i terpeni u valerijani	7
2.1.1.3. Valepotrijati u valerijani	9
2.1.2. Utjecaj pojedinih spojeva iz valerijane na GABA	11
2.1.3. Primjena valerijane	13
2.2. pKa	14
2.2.1. Učinak pKa vrijednosti	15
2.2.2. Metode određivanja pKa	17
2.2.2.1. Kratki pregled eksperimentalnih metoda određivanja pKa	17
2.2.2.2. Kratki pregled računalnih metoda određivanja pKa	21
3. MATERIJALI I METODE	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Valerenska kiselina.....	27
4.2. Hidroksivalerenska kiselina	34
4.3. Acetoksivalerenska kiselina	44
5. ZAKLJUČAK	51
6. LITERATurna VRELA	52

1. UVOD

Valerijana ili ljekoviti odoljen, *Valeriana officinalis* L., je ljekovita trajnica iz porodice kozokrvnica (Caprifoliaceae) čiji su glavni dijelovi biljke korijen, stabljika, listovi, bijeli ili ružičasti cvijet te malen plod oraščić. Korijen je dio biljke koji se najčešće koristi u pripravcima valerijane. Najviše je rasprostranjena u Europi i Aziji te je prenesena na područje Sjeverne Amerike [1].

Biljka je bogata djelatnim komponentama, a glavne djelatne komponente se mogu podijeliti na alkaloide, organske kiseline, terpene te valepotrijate. Pojedine djelatne komponente valerijane mogu reagirati s neurotransmitterom γ -aminomaslačnom kiselinom (engl. *Gamma-Aminobutric Acid*, GABA) [2, 3]. Valerijana se koristi kod pacijenata koji imaju problema sa spavanjem, imaju osjećaj uznemirenosti ili tjeskobe. Može se uzimati nakon što pacijent prestane uzimati benzodiazepine jer se smatra prirodnim benzodiazepinom [1].

pKa vrijednost je negativan logaritam konstante disocijacije kiseline prema kojoj se određuje je li kiselina ili baza slaba ili jaka [4]. pKa vrijednost se može odrediti eksperimentalno pomoću potenciometrijske metode, nuklearne magnetske rezonance, UV/VIS spektroskopije ili elektroforeze [5]. Potenciometrijska metoda je jedna među češće korištenim metodama za određivanje pKa vrijednosti zbog svoje jednostavnosti i brzine određivanja pKa. Nuklearna magnetska rezonanca je metoda koja nije prvotno zamišljena za računanje pKa, nego za određivanja mjesta protoniranja ili deprotoniranja spoja [5, 6]. UV/VIS spektroskopija je metoda koja se temelji na mjerenju apsorpcije elektromagnetskog zračenja [7]. Dok su programi pomoću kojih se može odrediti pKa vrijednost *Marvin*, *Epik*, *Jaguar*, *ACD/pKa* i brojni drugi.

Cilj ovog rada je prikazati sistematiku i osnovne karakteristike biljke valerijane, proučiti njezin kemijski sastav, odrediti glavne djelatne komponente te odabranim tvarima izračunati pKa vrijednosti pomoću programa ACD/pKa. Odabrani spojevi bili su valerenska kiselina, hidrosivalerenska i acetoksivalerenska kiselina. Za odabrane spojeve utvrđene su promjene sumarnog naboja, protonacijskih stanja i stanja ionogenih skupina u ovisnosti o pH medija.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Valerijana, *Valeriana officinalis* L.

Valerijana (Slika 1.), *Valeriana officinalis* L., je višegodišnja zeljasta, samonikla ili uzgojena biljka [1]. Glavni dijelovi biljke su korijen, stabljika, listovi, cvjetovi i plod. Stabljika valerijane je gola ili više-manje dlakava, a biljka može narasti do 150 cm [8].



Slika 1. Biljka valerijana [9].

Valerijana pripada carstvu Plantae (biljke), koljenu Spermatophyta (sjemenjače), razredu Dicotyledonae (dvosupnice), redu Dipsacales (češljugovine), porodici Caprifoliaceae (kozokrvnice) te rodu Valeriana (odoljen). Ova biljka je rasprostranjena na području cijele Europe i Azije, a na područje Sjeverne Amerike su je prenijeli istraživači prilikom osvajanja i istraživanja [1, 8].



Slika 2. a) Korijen valerijane [10], b) listovi valerijane [8].

Korijen valerijane (Slika 2. a)) je svjetlo sive do smeđe boje [8]. Podanak je kratak, jedva deblji od stabljike [1]. Stabljika valerijane je uspravna, pojedinačna i izbrazdana. Listovi (Slika 2. b)) valerijane su perasto razdvojeni, sa 6-10 pari listića koji se nalaze na višim dijelovima biljke [1, 8].

Cvjetovi (Slika 3.) su mali, bijeli ili ružičasti i skupljeni u gustoj glavici. Valerijana cvate tijekom ljeta, u lipnju i srpnju. Plod valerijane je oraščić duljine do 0,5 cm [8].



Slika 3. Cvat valerijane [11].

Valerijana se koristi u razne svrhe još od antičke Grčke i Rima, a vjeruje se da je biljka dobila ime po rimskom caru Publiju Luciniju Valerijanu. Hipokrat je među prvima opisao svojstva valerijane [12], a Dioskorid je preporatima sa suhim korijenom valerijane (Slika 4.) liječio bolesti poput epilepsije, ubrzanog lupanja srca, problema s probavom i urinarnih infekcija [1]. Galen, rimski liječnik i filozof, preporučao je valerijanu za liječenje nesаницe, što je i danas jedna od glavnih indikacija za korištenje preparata od valerijane [12].



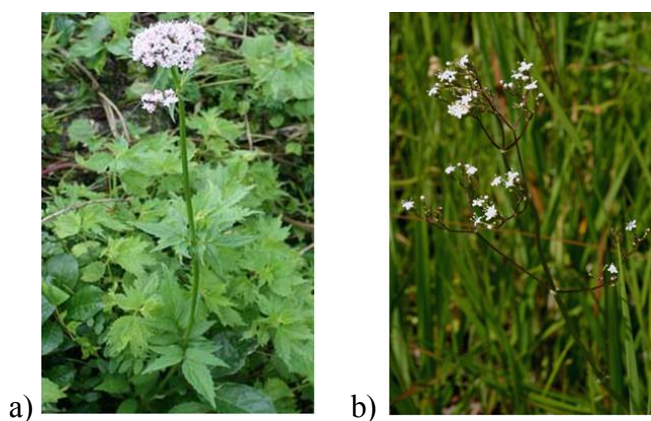
Slika 4. Suhi korijen valerijane [13].

Do 18. stoljeća se valerijana široko koristila kao sedativ i za liječenje živčanih poremećaja. Koristila se još za liječenje glavobolje, anksioznosti, visokog krvnog tlaka i

menstrualnih grčeva. Valerijanu su u prošlosti koristila i djeca koja su imala problema s učenjem ili ponašanjem [12].

U 20. stoljeću, tijekom prvog svjetskog rata, valerijanu su koristili vojnici koji su bili na prvoj liniji obrane tijekom granatiranja kako bi se spriječila pojava šoka kod njih. U drugom svjetskom ratu, valerijanu su koristili civili tijekom zračnih napada [12]. Tijekom 80-tih godina prošlog stoljeća, valerijana je postala neizostavan lijek u liječenju napetosti u nekoliko zemalja Europe, poput Belgije, Francuske, Njemačke, Rusije, Velike Britanije i Švicarske [12].

Osim ove vrste valerijane, u tradicionalnoj kineskoj i japanskoj medicini koristi se *V. fauriei* Briq. (Slika 5. a)) koja se koristi kao sedativ, spazmolitik, antidepresiv i za liječenje epilepsije. U afričkoj tradicionalnoj medicini koristi se *V. capensis* Thunb. (Slika 5. b)), također za liječenje epilepsije i sličnih bolesti [12].



Slika 5. a) *V. fauriei* Briq. [14] i b) *V. capensis* Thunb. [15].

2.1.1. Kemijski sastav valerijane

Do danas je iz ove biljke izolirano i identificirano preko 150 spojeva od kojih su mnogi bioaktivni i imaju utjecaj na zdravlje i organizam. Još nije sa sigurnošću utvrđeno koja djelatna komponenta u pripravcima valerijane (budući da se radi o smjesi aktivnih tvari) ima kakav učinak, pa se smatra da je učinak valerijane zapravo posljedica sinergističkog djelovanja pojedinih komponenata. U sastavu valerijane mogu postojati male razlike ukoliko se vrsta uzgaja na različitim područjima, uvjetima i načinu uzgoja, metodama prerade i uvjetima skladištenja. Poznate farmakološki djelatne komponente koje su prisutne u valerijani su alkaloidi, terpeni, organske kiseline i njihovi derivati te valepotrijati [2].

2.1.1.1. Alkaloidi u valerijani

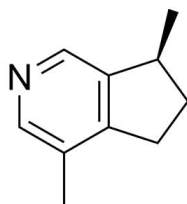
Alkaloidi su spojevi, biljnog ili životinjskog podrijetla, koji u svom sastavu sadrže dušik. Mogu nastati sintezom iz aminokiselina, terpena ili steroida. Alkaloidi su česti kemijski spojevi u porodicama poput Rutaceae (rutovke), Ranunculaceae (žabnjakovke), Liliaceae (liljanovke), Solanaceae (pomoćnice), Papaveraceae (makovke) i sl. Rijetko su slobodni u biljkama te su više prisutni u obliku soli koje su vezane na organske kiseline poput jabučne, vinske ili limunske kiseline. Iako u biljkama mogu biti prisutni različiti oblici alkaloida, najčešće prevladava samo jedan [16].

Alkaloidi su bijeli, sitno kristalni prašci ili tekućine, ljutog ili gorkog okusa, netopljivi u vodi, ali topljivi u organskim otapalima (npr. eter ili kloroform) i anorganskim kiselinama. Kod alkaloidnih soli vrijedi suprotno, alkaloidne soli su topljive u vodi, ali nisu topljive u anorganskim otapalima. Većina alkaloida su optički aktivni, što znači da zakreću ravninu polarizirane svjetlosti. Alkaloide karakterizira njihova složena struktura, zbog koje za velik broj alkaloida još nije u potpunosti objašnjena struktura [16].

Uporaba alkaloida u farmaceutskoj industriji je smanjena zbog pojave i korištenja sintetskih lijekova, ali se još koriste kao prirodni lijekovi. Pri upotrebi alkaloida treba biti oprezan jer pojedini alkaloidi mogu biti toksični i štetni te mogu djelovati kao narkotici, hipnotici, sedativi ili analgetici [16]. Alkaloidi u valerijani su prisutni u mali količinama, najčešće u rasponu od 0,01 % do 0,05 %. Alkaloidi koji su prisutni su aktinidin, valerianin te α -metil-pirol-ke-ton [17].

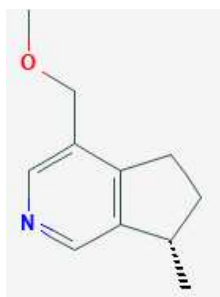
Aktinidin ($C_{10}H_{13}N$) je lako hlapljiv psihoaktivni alkaloid koji pripada skupini organskih spojeva poznatih pod imenom metilpiridini. Ovaj organski spoj sadrži piridinski prsten na koji su vezane dvije metilne skupine (Slika 6.), a nađen je u eteričnom ulju korijena valerijane [2].

Osim u eteričnom ulju, može se naći u kiviiju (*Actinidia chinensis* Planch.) i različitim vrstama čaja (crni, biljni, zeleni, crveni čaj) [18]. Može se biosintetizirati iz aminokiseline lizina i kinolinske kiseline [19]. Točka vrenja aktinidina je pri 223,23 °C, a topljivost u vodi pri 25 °C iznosi 2648 mg/mL. Molarna masa iznosi 147,2169 g/mol [18].



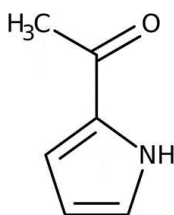
Slika 6. Struktura aktinidina [20].

Pregledom znanstvene literature može se naći malo informacija o valerianinu (Slika 7.), iako je strukturno sličan aktinidinu [2]. Valerianin ($C_{11}H_{15}NO$) pripada skupini organskih spojeva poznatijih kao derivati piridina. Piridini i derivati su komponente koje sadrže piridinski prsten. Molarna masa valerianina iznosi 177, 2429 g/mol. Osim u valeriani, valerianin se može pronaći u biljnom, crnom, zelenom i crvenom čaju [21].



Slika 7. Struktura valerianina [22].

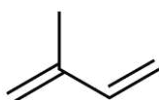
Alkaloid α -metil-pirol-keton (Slika 8.) je još jedan spoj o kojemu se može naći jako malo informacija [2]. Molarna masa α -metil-pirol-ketona (C_6H_7NO) iznosi 109,13 g/mol. Točka tališta je u intervalu 88-91 °C, a točka vrelišta je pri 220 °C [23]. Sándor i sur. (1970) su istraživali ovaj spoj kako bi utvrdili njegov ima učinak na središnji živčani sustav [24].



Slika 8. Struktura α -metil-pirol-ketona [23].

2.1.1.2. Organske kiseline i terpeni u valerijani

Organske kiseline i terpeni su prisutni u hlapljivom ulju valerijane u količini oko 0,2-2,8 % [2]. Terpeni su prirodni, hlapljivi, organski spojevi koji biljci daju miris, okus i određeno farmakološko djelovanje. Terpeni u biljkama imaju ulogu signalnih spojeva, odbijaju predatore i privlače pojedine insekte (za oprašivanje), a mogu djelovati i kao faktori rasta tj. kao fitohormoni. Osnovnu strukturnu jedinicu terpena čini 2-metilbutanska jedinica (izoprenska jedinica) koja sadrži 5 ugljikovih atoma (Slika 9.) [25].



Slika 9. Struktura izoprena [26].

Terpeni se mogu podijeliti u skupine prema broju ugljikovih atoma, pa tako razlikujemo hemiterpene (C₅), monoterpene (C₁₀), seskviterpene (C₁₅), diterpene (C₂₀), sestereni (C₂₅), triterpeni (C₃₀), tertraterpeni (C₄₀) i politerpeni (> C₄₀). Svaka skupina se može podijeliti u manje podskupine prema broju prstena od kojih je sačinjen terpen. Ovisno o funkcionalnoj skupini koju sadrže, terpeni mogu biti različiti ugljikovi spojevi poput ugljikovodika, alkohola, fenola, aldehida, ketona, karboksilnih kiselina ili estera. Terpeni koji su najviše prisutni u valerijani su monoterpeni i seskviterpini [25].

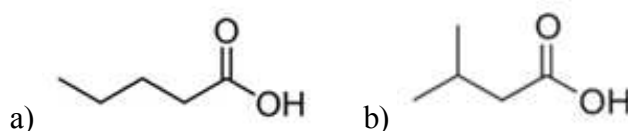
Monoterpeni su terpeni koji u svojoj strukturi sadrže 10 ugljikovih atoma tj. dvije jedinice po 5 ugljikovih atoma. Najčešće su sastavni dijelovi eteričnih ulja i začina te u začинима mogu činiti do 5 % suhe tvari [25].

Seskviterpeni su terpeni koji sadrže 15 ugljikovih atoma te se nalaze u višim frakcijama eteričnih ulja. Mogu se klasificirati u četiri skupine ovisno o broju prstena u strukturi. U biljkama djeluju kao fitoaleksini tj. biljni antibiotici koje biljke same proizvode prilikom napada mikroorganizama u svrhu obrane [25].

Valerinska kiselina ili pentanska kiselina (C₅H₁₀O₂) je ravnolančana kiselina s 5 ugljikovih atoma (Slika 10. a)). Iako ima neugodan miris, hlapivi esteri valerinske kiseline imaju ugodan miris te se koriste u parfemima i kozmetici [2]. Molarna masa valerinske kiseline iznosi 102,1317 g/mol. Točka taljenja nalazi se pri -34 °C, topljivost u vodi iznosi 24 mg/mL [27].

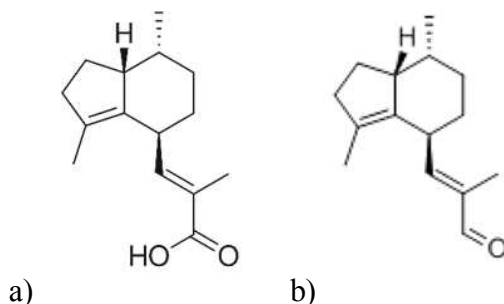
Izovalerinska kiselina ili 3-metilbutanska kiselina ($C_5H_{10}O_2$) je prirodna masna kiselina koja se nalazi u velikom broju biljaka i eteričnih ulja (Slika 10. b)). Bistra je bezbojna tekućina, slabo je topljiva u vodi, a dobro u većini organskih otapala. Molarna masa ima isti iznos kao i valerinska kiselina jer je izovalerinska kiselina izomer valerinske kiseline. Točka taljenja je pri $-29,3\text{ }^{\circ}C$, točka vrelišta pri $175\text{ }^{\circ}C$. Topljivost u vodi iznosi $40,7\text{ mg/mL}$ [28].

Izovalerinska kiselina je također neugodnog mirisa (odgovorna za karakterističan miris valerijane, kao i bornil izovalerenat). Dugo se smatralo kako nema značajnije farmakološko i toksikološko djelovanje kao i valerinska kiselina [2]. Međutim, Ribeiro i sur. (2007) su utvrdili da ova kiselina smanjuje aktivnost ATPaze u sinaptičkim membranama cerebralnog korteksa te je na neki način uključena u patofiziologiju neuroloških poremećaja u pacijenata s izovaleričnom acidemijom [29].



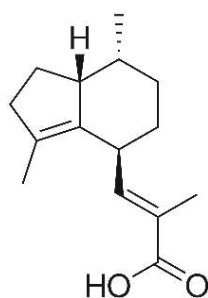
Slika 10. Struktura a) valerinske kiseline [30] i b) izovalerinske kiseline [31].

Valerenska kiselina (Slika 11. a.)) i aldehyd valerenal (Slika 11. b.)) su farmakološki aktivni monoterpeni. Pretpostavlja se da valerijana, odnosno preparati na bazi valerijane, djeluje putem mehanizma γ -aminomaslačne kiseline (GABA). Valerenska kiselina je identificirana kao $GABA_a$ modularni receptor i poznato je da može prodrijeti u središnji živčani sustav pasivnom difuzijom [2].



Slika 11. Struktura a) valerenske kiseline [32] i b) valererala [33].

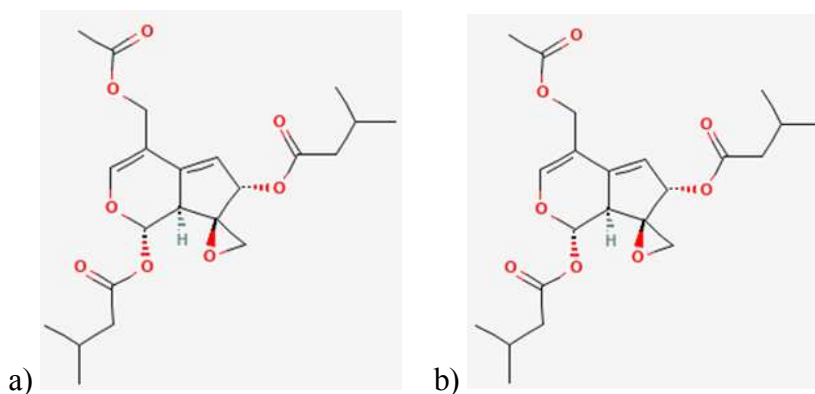
Valerenska kiselina, acetoksivalerenska kiselina (Slika 12.) i valerenal (aldehid) su aktivni inhibitori pojačivača nuklearnog faktora kapa-lakog lanca aktiviranih B stanica (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF-κB) [2]. Jacobo-Herrera i sur. (2006) su istraživali učinke ekstrakta valerijane na neurofiziološke patologije koje su povezane sa NF-κB. Korijen *V. officinalis* L. se ekstrahirao hladnom maceracijom pomoću etil-acetata na sobnoj temperaturi. Nakon toga je otapalo uklonjeno pomoću rotouparivača te je dobiven suhi ekstrakt koji se čuvao na -20 °C. Iz suhog ekstrakta izolirane su tri komponente: acetoksivalerenska kiselina, valerenal i valerenska kiselina. Rezultati istraživanja su pokazali da neuroprotektivni učinak ekstrakta valerijane ovisi o prisutnosti glija stanica, za koje je prethodno dokazano da se aktiviraju nakon ozljede mozga ili nastanka neurodegenerativnih bolesti. Pri koncentraciji 100 μg/mL acetoksivalerenska kiselina je smanjila aktivnost NF-κB za 4 %, valerenska kiselina za 25 % (s tim da nije pokazala citotoksičan učinak), dok valerenal pri ovoj koncentraciji nije pokazao inhibicijski učinak [34].



Slika 12. Struktura acetoksivalerenske kiseline [35].

2.1.1.3. Valepotrijati u valerijani

Valepotrijati su esterificirani iridoidni monoterpeni. Njihovo ime potječe od valerijana-epoksi-triestera jer u strukturi sadrže polihidroksiciklopentanske pirane s karboksilnom kiselinom, poput octene, valerinske, izovalerinske, β-metilvalerinske ili β-hidroksiizovalerinske kiseline. Valepotrijati se dijele u dva razreda – monoenske i dienske derivate. Glavni monoenski derivat koji se može pronaći u sastavu valerijane je didrovaltrat (Slika 13. a.)), a glavni dienski valepotrijat je valtrat (Slika 13. b.)) [5].



Slika 13. Struktura a) didrovaltrata [36] i b) valtrata [37].

Njihova količina može varirati od vrste do vrste te podzemni dijelovi valerijane obično sadrže veće koncentracije valepotrijata nego ostali dijelovi biljke. Valepotrijati su nestabilni spojevi koji su osjetljivi na temperaturu te dodatak kiseline i baze [5].

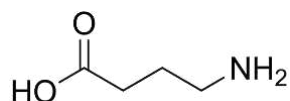
Valepotrijati pokazuju snažno citotoksično djelovanje na stanice jetre štakora. Toksičnost ovisi o spoju valepotrijata te o dozi u kojoj se on primjenjuje, a do smrti stanice može doći 24-72 sata nakon inkubacije. Utvrđeno je da je valtrat dva puta toksičniji u odnosu na didrovaltrat. Naime, izlaganje kultiviranih stanica jetre valtratu koncentracije 40 μM uzrokuje smrt stanica, dok su stanice izložene didrovaltratu koncentracije 80 μM još uvijek normalne [38].

Ovakva teza je potaknula Keochanthala-Bounthanh i sur. (1993) da provedu istraživanje utjecaja valtrata i didrovaltrata na staničnu kulturu hepatoma štakora (engl. *Hepatoma Tissue Culture*, HTC). Suspenzija stanica s dodanim goveđim serumom je inkubirana pri temperaturi 37 °C, a gustoća stanica iznosila je $3 \cdot 10^5$ stanica u mL. Potom je u staničnu kulturu dodan valtrat (40 μM) ili didrovaltrat (80 μM) te se sustav inkubirao 15 sati. Nakon inkubacije, rezultati djelovanja valtrata i didrovaltrata su bili praćeni pod elektronskim mikroskopom. Autori su uočili da su stanice tretirane s valtratom promijenile oblik, veličinu i površinu već nakon 5 sati inkubacije. Nakon 15 sati inkubacije, 80 % stanica se odvojilo od potpore i plutalo je u mediju. Kod didrovaltrata nije došlo do tako značajne promjene, nego su se stanice samo smanjile ali su ostale pričvršćene na podlogu. Valtrat i didrovaltrat su hibrofobne molekule te mogu lako prolaziti kroz staničnu membranu i izazvati štetne promjene u stanici. Prisutnost dviju dvostrukih veza na C3–C4 i C5–C6 u strukturi valtrata i jedne dvostruke veze na području C3–C4 kod didrovaltrata daje različita fizikalno-kemijska svojstva ovih spojeva [38].

Valepotrijati mogu imati citotoksično, mutageno i kancerogeno djelovanje *in vitro* te se zbog utvrđene toksičnosti ne koriste ni u fitomedicini [39]. Bos i sur. (1998) su istraživali citotoksičnost pojedinih spojeva iz valerijane na dvije različite kulture ljudskih tumorskih stanica – na staničnu liniju karcinoma debelog crijeva (engl. *human colorectal cell line*, COLO 320) i na staničnu liniju mikrocelularnog karcinoma pluća (engl. *human small-cell lung cancer cell line*, GLC 4). Rezultati su pokazali da dienski valepotrijati (valtrat, izoltrat) imaju najveću toksičnost, dok su monoenski valepotrijati (didrovaltrat, izovaleroksihidroksidivaltrat) pokazali 2-3 puta manju toksičnost. Istraživanje je pokazalo da izovaltral, koji nastaje iz izovaltrata, ima veću citotoksičnost od valepotrijata [40].

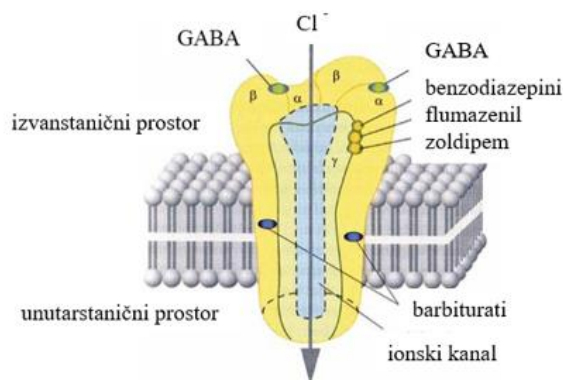
2.1.2. Utjecaj pojedinih spojeva iz valerijane na GABA

Zbog duge povijesti upotrebe valerijane kao sedativa, antikonvulziva, lijeka za liječenje migrene i ublažavanje bolova, većina provedenih znanstvenih istraživanja je bila usmjerenja na interakcije djelatnih komponenata valerijane s GABA-om [2]. GABA je neurotransmiter koji u svojoj strukturi ima amino skupinu, a smatra se jednim od najvažnijih neurotransmitera (Slika 14.). Uloga GABA-e je da smanji neuronsku podražljivost tako što se suprotstavlja djelovanju neurotransmitera glutamata i tako regulira neurološku aktivnost. GABA može djelovati kao hormon budući da ima određeni učinak i van središnjeg živčanog sustava [3].



Slika 14. Struktura γ -aminomaslačne kiseline, GABA [41].

GABA receptori su receptori za γ -aminomaslačnu kiselinu. GABA receptori se još nazivaju benzodiazepinski receptori. GABA receptori se nalaze u svim regijama mozga [42]. Identificirani su GABA_a, GABA_b i GABA_c receptori. GABA_a receptori pripadaju obitelji ligand-ovisnih ionskih kanala. To su transmembranski proteini koji se sastoje od 5 proteinskih podjedinica između kojih se nalazi pora koja je selektivno propusna za ione klora (Slika 15.) [3].



Slika 15. Model makromolekularnog kompleksa GABA_a [43].

GABA_a receptori imaju u svom sastavu kanal kroz koji prolaze ioni, dok GABA_b receptori djeluju preko drugog glasnika na ionski kanal koji nije u blizini receptora. GABA_b receptori su heterodimeri. Heterodimere čine dvije podjedinice: GABA_{b1} i GABA_{b2} [3]. Vežanjem lijeka na GABA_a receptore, dolazi do bolje propusnosti ionskog kanala za kloridne ione, dok kod GABA_b receptora dolazi do smanjenja postsinaptičke podražljivosti, smanjuje se moždana aktivnost i dobiva se poriv za spavanjem [42]. GABA_c receptori su specifični jer ih, zbog njihove veće osjetljivosti, mogu aktivirati puno manje koncentracije liganda u odnosu na GABA_a receptore. Vežanjem γ -aminomaslačne kiseline na GABA_c, dolazi do dužeg otvaranja kanala, ali sporijeg prolaska iona klora kroz kanal [3].

Valerenska kiselina je modulator GABA_a receptora. Međutim, tvari poput valerenske kiseline i njezinih derivata, poput acetoksivalerenske kiseline i hidroksivalerenske kiseline moraju prijeći krvno-moždanu barijeru kako bi stupili u interakciju s receptorima u mozgu [2]. Neuhaus i sur. (2008) su proveli istraživanje u kojem su pratili prolaznost valerenske kiseline i njezinih derivata kroz krvno-moždanu barijeru. Transport valerenske kiseline, acetoksivalerenske kiseline i hidroksivalerenske kiseline je uspoređen s propusnosti krvno-moždane barijere za GABA_a modulator diazepam, za koji je dokazano da prodire u središnji živčani pasivnom difuzijom. Neuhaus i sur. Pokazali su da navedene kiseline prodiru znatno sporije kroz krvno-moždanu barijeru nego diazepam. Kroz krvno-moždanu barijeru je najsporije prošla valerenska kiselina. Hidroksivalerenska kiselina je brže od valerenske kiseline prošla barijeru, a najbrže je prošla acetoksivalerenska kiselina [44].

2.1.3. Primjena valerijane

Valerijana se koristi u liječenju poremećaja spavanja (najčešće nesanice), uznemirenosti i tjeskobe te kao mirisni relaksant. Često se koristi kao prijelazni lijek nakon prekida uzimanja benzodiazepina, a smatra se i alternativnom benzodiazepina. Iako se preporuča za liječenje epilepsije, njena učinkovitost u ovom slučaju nije potvrđena istraživanjima. Primjena valerijane u pojedinaca je dovela do pojave nuspojava poput uznemirenosti, glavobolje i noćnih strahova. Smatra se da je uzrok ovih nuspojava nemogućnost metaboliziranja pojedinih komponenata preparata od valerijane zbog nedostatka određenih enzima [1].

Valerijana se najčešće primjenjuje u dozi 400-900 mg 30-60 minuta prije spavanja [45-48] ili 450 mg valerijane tri puta dnevno [49]. Ukoliko se valerijana koristi za smanjenje stresa, potrebno je uzeti 100 mg valerijane 90 minuta prije pojave događaja koji bi mogao uzrokovati stres jer anksiolitičko (smirujuće) djelovanje počinje 30 minuta nakon uzetog preparata [50, 51].

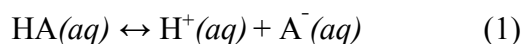
Valerijana se tradicionalno koristila u liječenju crijeva, grčeva i nervoznog želuca. Zbog gorkog okusa, valerijana se koristila za poboljšanje apetita i probave [1].

Smatra se da valerijana ima učinak i na dismenoreju zbog antispazmatskog djelovanja [1]. Mirabli i sur. (2009) ispitali su učinak valerijane na dismenoreju. U ispitivanju je sudjelovalo 100 studentica od kojih je 49 studentica uzimalo valerijanu, a 51 studentica je uzimala placebo. Studentice su uzimale valerijanu u dozi od 255 mg tri puta dnevno tijekom prva tri dana menstruacije tijekom dva uzastopna menstrualna ciklusa. Na početku i tijekom ciklusa, učinak se nije razlikovao između grupa, ali je smanjenje bolova bilo izraženije kod osoba koje su uzimale valerijanu [52].

Iako je valerijana ocjenjena kao učinkovita i sigurna za uporabu, s njom valja biti na oprezu zbog malog broja istraživanja i zbog kratkog vremena trajanja provedenih istraživanja. Dugotrajno korištenje valerijane se ne preporuča za bilo koju indikaciju, a vodeni i alkoholni ekstrakti valerijane mogu imati i štetno djelovanje. Zabilježen je i slučaj predoziranja kada je pacijent progutao 25 g korijena valerijane u prahu. Osoba koja se predozirala pokazivala je slabe simptome koji su uključivali umor, grčeve u trbuhu i tremor, koji su se povukli unutar 24 sata od predoziranja [1].

2.2. pKa

pKa vrijednost se definira kao negativan logaritam konstante disocijacije kiseline ili baze [4]. Disocijacija kiseline HA može se zapisati prema jednadžbi (1):



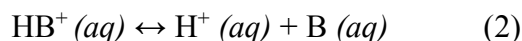
pa se pKa vrijednost za kiselinu može izračunati prema formuli (1):

$$pKa = -\log\left(\frac{[\text{H}^+]\cdot[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right) \quad (1)$$

gdje je HA jednoprotionska kiselina, H^+ vodikov kation, A^- anion jednoprotionske kiseline, pKa konstanta disocijacije kiseline, $[\text{H}^+]$, $[\text{A}^-]$, $[\text{HA}]$ koncentracije vodikovog kationa, aniona jednoprotionske kiseline i koncentracija jednoprotionske kiseline [4].

Kiseline koje imaju nisku pKa vrijednost su jače od kiselina s višim pKa vrijednostima. Pri niskoj pH vrijednosti prevladava visoka koncentracija HA molekula, a niska koncentracija aniona (A^-), dok je pri visokim vrijednostima pH, situacija obrnuta [4].

Disocijacija baze HB^+ može se zapisati prema jednadžbi (2):



pa se pKa vrijednost za bazu može izračunati prema formuli (2):

$$pKa = -\log\left(\frac{[\text{H}^+]\cdot[\text{B}]}{[\text{HB}^+]}\right), \quad (2)$$

gdje je HB^+ oznaka konjugirane kiseline, H^+ vodikov kation (kiselina), B baza, pKa konstanta disocijacije baze, $[\text{HB}^+]$, $[\text{H}^+]$, $[\text{B}]$ koncentracije konjugirane kiseline, vodikovog kationa (kiselina), baze [4].

Baze koje imaju višu pKa vrijednost su jače od baza s nižim pKa vrijednostima. Pri niskoj pH vrijednostima, postoji niža koncentracija baze (B) i viša koncentracija konjugirane kiseline (HB^+) [4].

Vrijednost pKa se može povezati s pH vrijednosti preko Henderson-Hasselbalchove jednadžbe koja se koristi za otkrivanje ponašanja lijekova. Henderson-Hasselbalchove jednadžba (3) za kiseline glasi:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{ili} \quad \frac{[HA]}{[A^-]} = 10^{(pK_a - pH)} \quad (3)$$

Henderson-Hasselbalchova jednadžba (4) za baze glasi [4]:

$$pH = pK_a + \log \frac{[B]}{[HB^+]} \quad \text{ili} \quad \frac{[HB^+]}{[B]} = 10^{(pK_a - pH)} \quad (4).$$

2.2.1 Učinak pKa vrijednosti

pKa vrijednost pojedinih molekula može imati utjecaj na učinkovitost i farmakokinetiku lijekova te na toksičnost istih. Prilikom uzimanja lijekova, dolazi do interakcija na ciljnom mjestu prilikom čega dolazi do konformacijskih promjena aktivne tvari lijeka koje mogu pridonijeti boljem djelovanju lijeka ili mogu smanjiti djelovanje uzetog lijeka [53].

Pomoću pKa vrijednosti se određuje stupanj ionizacije koji ima učinak na topljivost lijeka i njegovu propusnost kroz membrane (utjecaj na farmakokinetiku). Ionizirane molekule imaju bolju topljivost u vodenom mediju od neutralnih molekula jer su polarnije [4]. Veza između neutralnih i nabijenih vrsta je dana prema Henderson-Hasselbachovoj jednadžbi koja se razlikuje za kiseline (jednadžba (5)) i baze (jednadžba (6)):

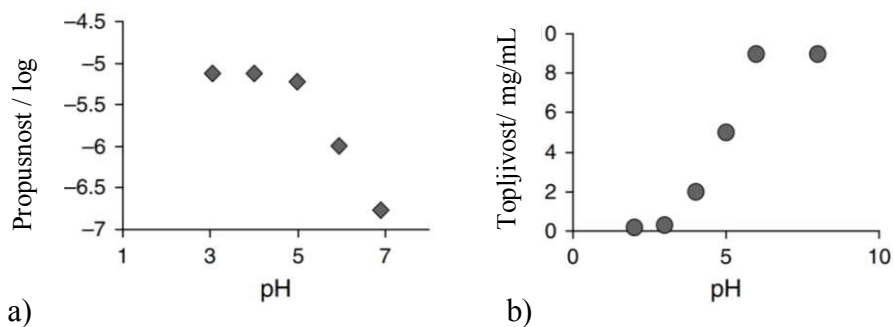
$$S = S_0(1 + 10^{(pH - pK_a)}) \quad (5)$$

$$S = S_0(1 + 10^{(pK_a - pH)}) \quad (6)$$

gdje S predstavlja topljivost nabijenih vrsta, a S_0 topljivost neutralne vrste. Topljivost se mijenja s promjenama u pH i pKa vrijednostima [53].

Molekule koje su ionizirane imaju manju sposobnost prolaznosti kroz membranu jer se smatra da neutralne molekule mogu lakše proći kroz membranu pasivnom difuzijom. Vrijednost pKa je važna u medicinskoj kemiji kod apsorpcije lijekova jer pojmovi topljivosti i propusnosti imaju suprotan učinak. Na slikama 16. a) i 16. b) je prikazano ponašanje kisele

komponente čija je $pK_a = 5$. Na slici 16. a) je prikazana ovisnost logaritma propusnosti kisele komponente o pH. Vidljiv je pad vrijednosti logaritma propusnosti s povećanjem pH vrijednosti. Na slici 16. b). prikazana je ovisnost topljivosti (mg/mL) kisele komponente o pH. Topljivost se povećava s povećanjem pH vrijednosti otopine [4].



Slika 16. Graf ovisnosti a) logaritma propusnosti kroz membranu o pH te b) topljivosti (mg/mL) o pH [4].

Ovisno o supstituentu koji se dodaje na spoj, dolazi do promjene u elektronskoj gustoći. Jakost kiseline se može povećati dodatkom halogena ili neke druge elektron odvlačeće skupine (npr. karboksilna, cijano, nitro skupina). Jakost baze se smanjuje vezanjem aromatske skupine (npr. anilin) jer je nespareni elektronski par delokaliziran u aromatskom prstenu. Također se jakost baze smanjuje dodatkom alifatske skupine [4].

Promjena pK_a vrijednosti pojedinih lijekova može uzrokovati određene promjene u farmakološkom mehanizmu u organizmu koje mogu biti štetne. Na primjer, povećanje bazičnosti povezano je s povećanim blokiranjem hERG ionskih kanala (engl. *human Ether-à-go-go-Related Gene*, hERG, gen koji kodira alfa podjedinicu kalijevih ionskih kanala [54], ali se kratica hERG često odnosi na sam ionski kanal koji je značajan jer doprinosi električnoj aktivnosti srca), što posljedično dovodi do srčane aritmije. Protivno, povećanje kiselosti u određenim lokacijama dovodi do smanjenog blokiranja hERG kanala [53].

Inhibicija citokroma P450 (engl. *cytochrome*, CYP), koja može dovesti do lijek-lijek interakcija, pod utjecajem je bazičnosti točno određenih amina u strukturi molekule. Utvrđeno je da smanjenje pK_a određenih amina (koji sudjeluju u ovom tipu vezanja) može dovesti do smanjenja CYP inhibicije [53].

2.2.2. Metode određivanja pKa

Najčešće metode pomoću kojih se može eksperimentalno odrediti pKa vrijednost su potenciometrija, nuklearna magnetska rezonancija, elektroforeza i UV/VIS spektrometrija. Ostale metode pomoću kojih se može odrediti pKa vrijednost su: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, kalorimetrija, voltometrija, masena spektroskopija, flouometrija i dr. [6, 5]. Osim eksperimentalno, pKa se može predvidjeti i računalno. pKa vrijednost se računalno može odrediti pomoću različitih programa, kao što su primjerice *Marvin*, *Epik*, *Jaguar*, *ACD/pKa* i dr. [55, 56].

2.2.2.1. Kratki pregled eksperimentalnih metoda određivanja pKa

Potenciometrijska titracija je jedna od najčešćih metoda za određivanje pKa vrijednosti zbog svoje jednostavnosti. Tijekom potenciometrijske titracije, dodaje se određeni volumen titranta otopini analita. Nakon dodatka analita, promjena potencijala se mjeri pomoću dvije elektrode, indikatorske i referentne elektrode. One se često mogu spojiti pa se takva elektroda tada naziva kombinirana pH elektroda [6].

Konstanta disocijacije za kiseline se računa tako da je $\text{pH} = \text{pKa}$ kada je reakcija poluneutralizirana, tj. kada je pola molekula koje sudjeluju u reakciji neutralizirano, a druga polovica nije. Točka ekvivalencije se određuje iz krivulje titracije kada dođe do najveće promjene u pH vrijednosti s malom promjenom volumena. Može se zaključiti da je promjena elektrodnog potencijala proporcionalna promjeni pH vrijednosti tijekom izvođenja titracije [5].

Pomoću potenciometrijske titracije može se mjeriti koncentracija analita do 10^{-4} M, međutim postoje metode koje mogu mjeriti još niže koncentracije analita u otopini. Prednosti korištenja potenciometrijske metode za određivanje pKa vrijednosti uz jednostavnost su: mogućnost primjene za analizu obojenih i bezbojnih otopina, laka dostupnost, cjenovno dostupni uređaji te pouzdanost, dok su mane ove metode korištenje vrlo čistih spojeva i pufera te velika količina uzorka u odnosu na druge metode (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i kapilarna elektroforeza). Problem kod određivanja pKa vrijednosti ovom metodom može biti i slaba topljivost analita u vodi. Topljivost se može povećati ako se analit miješa s različitim otapalima, ali su rezultati u tom slučaju većinom netočni [6].

Nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) se prvobitno koristila za određivanje mjesta deprotoniranja kiseline ili protoniranja baze te se

tek kasnije počela koristiti za određivanje pKa vrijednosti. Grunwald i sur. (1957) određivali su pKa vrijednost primarnih, sekundarnih i tercijarnih amina pomoću NMR-a. Pratili su kemijski pomak protona iz metilnih skupina ($-\text{CH}_3$) kao funkciju pH. Rezultati su pokazali povezanost kemijskog pomaka i kiselobaznog omjera. Dobivena je sigmoidalna krivulja iz koje se može izračunati pKa [6].

Prednost NMR-a je mogućnost mjerenja pKa vrijednosti određenih smjesa čak i kada su prisutne nečistoće jer se ne promatra ukupna koncentracija kao kod potenciometrijske titracije. Prilikom praćenja kemijskog pomaka karakteristične skupine, prati se samo ta skupina, pa se tako može pratiti i pKa karakteristične skupine [6].

Za određivanje pKa vrijednosti mogu se primjenjivati ^1C , ^{13}C ili ^{31}P NMR [6]. Za određivanje pKa vrijednosti šećera se koriste ^1H i ^{13}C NMR i nemaju posebne prohtjeve jer određivanje kemijskog pomaka s pH ne zahtjeva izolaciju pojedinih anomera šećera i interkonverzija nema utjecaj na promjenu pKa. Za određivanje pKa vrijednosti proteina ili kompleksa proteina koristi se ^{15}N NMR. Dodatkom slobodnog izotopa dušika dolazi do brze izmjene između proteina koji imaju običan dušik i izotop dušika [5].

Pomoću ove metode može se odrediti pKa vrijednost složenijim molekulama poput enzima. Određivanjem pKa vrijednosti pomoću NMR metode moguće su i pogreške koje nastaju zbog nepreciznog određivanja kemijskog pomaka i pH vrijednosti. Te pogreške nastaju u računu, a ne eksperimentalnim mjerenjem. Tijekom NMR mjerenja, u obzir se mora uzeti i energija jer prilikom vibracija molekula može doći do povećanja temperature i porasta energije. Određivanje pKa vrijednosti pomoću NMR je skup proces, a ova metoda je odlična za određivanje pKa kod specifičnih mjesta enzima gdje može doći do protonacije ili deprotonacije [6].

U elektroforezi, nabijene čestice se nalaze pod utjecajem električnog polja. Prilikom migriranja u električnom polju, nabijene čestice se gibaju brzinom koja je proporcionalna omjeru veličine čestice i njihovog naboja. Omjer brzine čestice (v_i) i električnog polja (E) u kojem se ta čestica giba nazvan je elektroforetska mobilnost (m_i) koja je dana formulom (3):

$$m_i = \frac{v_i}{E} \quad (3)$$

Određivanje pKa vrijednosti elektroforezom ovisi o pokretljivosti protoniranih i neprotoniranih oblika komponente koja se analizira. Kada su protonirani i neprotonirani

oblik analita u ravnoteži, tada se neto mobilnost može povezati sa stupnjem disocijacije analita prema jednadžbi (7):

$$m_{eff} = (1 - \alpha) \cdot m_0 + \alpha \cdot m_d \quad (7)$$

gdje je m_{eff} efektivna mobilnost, m_d mobilnost potpuno deprotoniranog oblika analita, m_0 mobilnost neprotoniranog oblika analita. Obzirom na preciznost, ova metoda se može svrstati u rang s potenciometrijskom titracijom [6].

Prednosti ove metode su brojne. Za analizu je potrebna mala količina uzorka, a elektroforezom se mogu razdvojiti i zagađeni uzorci, odnosno uzorak se može očistiti. Aparatura koja se koristi je lako dostupna i lako se koristi za automatski rad pa je elektroforeza brza metoda koja nema potrebu za velikim preinakama u aparaturi. Mana ove metode je priprema puferских otopina od kojih svaka mora imati točno određenu pH vrijednost te se mora paziti da puferске otopine i analit ne stupaju u interakciju [6].

Određivanje pKa vrijednosti pomoću kapilarne elektroforeza se temelji na pokretljivosti ionizirane komponente u nizu otopina jednake ionske jakosti i različite pH vrijednosti. Kada komponenta nije ionizirana tj. kada je komponenta nenabijena, komponenta ima nultu mobilnost, dok ionizirano stanje ima maksimalnu mobilnost [7]. Srednja mobilnost za jednovalentnu slabu kiselinu je dana formulom (4):

$$\mu_{eff} = x_i \cdot \mu_{epi} \quad (4)$$

gdje je μ_{eff} srednja mobilnost, x_i molni udio anionskog oblika jednovalentne slabe kiseline, μ_{epi} elektroforetska mobilnost aniona. Ne postoji ograničenje broja iona koji su uključeni u ravnotežu pa se efektivna mobilnost može zapisati pomoću formule (5):

$$\mu_{eff} = \sum_i x_i \cdot \mu_{epi} \quad (5)$$

Udio aniona u kiselini može se prikazati jednadžbom (8) i jednadžbom (9):

$$x_{A^-} = \frac{K_a}{[H^+] + K_a} \quad (8)$$

$$x_{A^-} = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a + pH)}} \quad (9)$$

gdje je x_A - molni udio aniona u kiselini, pK/pK_a je konstanta disocijacije kiseline, $[H^+]$ koncentracija vodikovih iona u otopini [7].

Prema izrazu (9), efektivna mobilnost se može izraziti pomoću jednadžbe (10):

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_{eff} \cdot 10^{-pK_a}}{10^{-pK_a} + 10^{-pH}} \quad (10)$$

Vrijednosti pK_a se mogu dobiti prilagođavanjem efektivne mobilnosti kao funkcije pH za odgovarajuću skupinu [7].

Efektivna elektroforetska mobilnost slabih kiselina i baza je pod utjecajem čimbenika koji mogu utjecati na konstantu ravnoteže ili na pokretljivost. Kod određivanja pK_a vrijednosti ovom metodom moraju se koristiti otopine elektrolita s različitim pH vrijednostima te moraju imati nisku i konstantnu ionsku jakost. Puferi koji se koriste u elektroforezi moraju imati apsorbciju na niskim valnim duljinama, moraju biti dobro topljivi u vodi, imati dug rok trajanja i visoku čistoću, a najčešće se koriste acetatni, fosfatni, boratni puferi i zwitter-ionske otopine. Pomoću efektivne elektroforeze je moguće odrediti pK_a vrijednosti čak i nestabilnim spojevima, a tijekom jednog mjerenja može se obraditi 50 uzoraka [7].

UV/VIS spektroskopija može se primjenjivati kao alternativna metoda potencijometriji jer omogućava analizu manju topljivih tvari i može detektirati analit prisutan u koncentraciji manjoj od 10^{-6} M. Podaci kod UV/VIS spektroskopije se dobiju bilježenjem podataka tijekom titracije pomoću spektrofotometra s nizom dioda. Tijekom titracije dolazi do promjene u apsorbciji te u koncentraciji protoniranih i neprotoniranih oblika analita. Kada dođe do najveće promjene u apsorbciji, tada je pK_a jednaka pH . Vrijednost pK_a se može odrediti iz prve derivacije promjene apsorbcije u vremenu ili usporedbom različitih spektara. Kod analize tvari pomoću UV/VIS spektroskopije, tvar mora biti čista. Ako tvar sadrži nečistoće, dobiveni rezultati mogu biti kao da je tvar čista samo ako prisutne nečistoće ne apsorbiraju u UV/VIS području [7].

Podaci dobiveni na jednoj valnoj duljini dobiju se analizom uzorka puferskih otopina s poznatim pH vrijednostima iz kojih se može odrediti pK_a . Za korištenje ove metode, važno je poznavanje molarnih apsorpcijskih koeficijenata protoniranih i deprotoniranih oblika analita. Razvijen je spektrometrijski pristup na više valnih duljina pomoću kojih se može

utvrditi konstanta disocijacije kiselina na temelji kiselo-bazne ravnoteže ako se reakcija sastoji od dva koraka ionizacije [7].

2.2.2.2. Kratki pregled računalnih metoda određivanja pKa

U slučaju računalnog predviđanja pKa, pKa vrijednost organskih spojeva može se predvidjeti pomoću empirijske i kvantno-kemijske metode. Empirijske metode su brze metode, dok kvantno-kemijske metode imaju veću točnost jer se računaju pomoću kvantno-mehaničkih deskriptora, ali za njihovo računanje je potrebno više vremena u odnosu na empirijske metode [55].

Marvin (ChemAxon) program uzima u obzir empirijski izračunate fizikalno-kemijske parametre (uglavnom Mullikenove parcijalne naboje) koji se dobiju iz regresijskih jednadžbi specifičnih za mjesto ionizacije. Koriste se tri vrste izračunatih parametara: intermolekulske interakcije, parcijalni naboji, polarizibilnost, za utvrđivanje pKa konstante molekula prema jednadžbi (11):

$$pKa = a \cdot Q + b \cdot P + c \cdot S + d \cdot S + d \quad (11)$$

gdje su Q i P djelomični naboj i inkrement (rast) polarizibilnosti, S je zbroj inkremenata koji su specifični za strukturu (npr. steričke deformacije i/ili vodikove veze), a, b, c, d su specifični regresijski koeficijenti za mjesto ionizacije [55].

Ovi dobiveni podaci za pKa se računaju iz regresijskih jednadžbi koje su specifične za ionizaciju. Zatim se izračunava omjer mikrovrsta kako bi se izračunala pKa vrijednosti atomima molekule. Važno je odrediti i makro-pKa vrijednosti jer su one dobivene iz teoretskih odnosa koji su između makro- i mikro-pKa vrijednosti. Kada molekula ima više atoma koji se mogu ionizirati, važno je razlikovati mikro- i makro-kiselinske konstante disocijacije. Konstanta disocijacije mikrokiseline se dobiva iz ravnotežne koncentracije konjugiranog para kiseline i baze, a konstanta disocijacije makrokiseline se računa iz zakona očuvanja mase i naboja [55].

pKa aktivne grupe može se izračunati prema jednadžbi (12)

$$K_{a,i} = \frac{\sum_j c_j^i}{\sum_j c_k^{i-1}} [H^+] \quad (12)$$

gdje je $[H^+]$ koncentracija protona u vodenoj otopini, c_j^i je koncentracija j-mikrovrste koje su otpustile protone i protone iz potpuno protonirane molekule, c_k^{i-1} je koncentracija k-mikrovrsta koje su otpustile (i-1) proton iz potpuno protonirane molekule. Omjer c_j^i i c_k^{i-1} se naziva raspodjela mikrovrsta mikroionizacijskih konstanti [56].

Epik program se koristi za predviđanje pKa vrijednosti i protonacije spojeva. Za potrebe ovog programa, koristi se teorija kiselina i baza prema Brønstedu i Lowryju jer se takve reakcije sastoje od jednostavnog dodavanja ili uklanjanja protona maloj organskoj molekuli (Lewisova teorija se ne koristi u ovoj metodi). *Epik* podržava kombinaciju dva usko povezana linearna pristupa na temelju Hammettove jednadžbe za aromatske molekule i Taftove jednadžbe za alifatske molekule za predviđanje pKa vrijednosti kiselina i baza. Hammettova i Taftova jednadžba su namijenjene za predviđanje mikroskopske (atomske) pKa vrijednosti [55].

Na temelju pKa vrijednosti proton se može dodati ili ukloniti iz molekule na različitim lokacijama. U nastaloj protonaciji, naknadne ionizacije mogu biti održive, međutim njihove se pKa vrijednosti obično promjene u usporedbi s onim izračunatim prije nego što je molekula ionizirana. *Epik* koristi takav pristup da se generiraju protonacijska stanja u kojima se procjenjuju pKa vrijednosti, stanje protonacije se prilagođava i cijeli proces se ponavlja. Protonacijska stanja koja nisu bitna se izdvajaju da bi cijeli proces bio učinkovit, a rezultat je usmjeren na relevantne strukture [57].

Efektivna izomerizacija putem sekvencijalne protonacije i deprotonacije može generirati sve tautomere za molekulu. Postoji mnogo tautomera kojima bi se prva ionizacija eliminirala iz daljnje prerade jer imaju malu vjerojatnost postojanja. Da se taj problem ublaži, program koristi i predložak za tautomerizaciju koja se temelji na drugom programu, *LigPrep*. U bazi podataka postoji više od 200 izomeriziranih vrsta [57].

Jedan od izazova za Hammettov i Taftov pristup je da većina baza podataka zabilježe molekulu kao jednu Lewisovu strukturu, sa svim prikazima jednostrukih i dvostrukih veza i formalnim nabojem. Molekule s aromatskim prstenom se prikazuju kao kombinacija više različitih rezonantnih Lewisovih struktura. Lewisove strukture u bazama podataka daju informacije o raspodijeli naboja, ali nije svaka struktura standardna i može se razlikovati u različitim bazama podataka [57].

Epik koristi dobro utvrđene i komplementarne metode kako bi se procijenila pKa vrijednost za male organske i alifatske molekule. Formalna jednadžba (13) koja se koristi za procjenu pKa kiseline ili bazične osnovne funkcionalne skupine glasi:

$$pKa_i = pKa_i^0 + s_i - \rho \sum_j \sigma_j \quad (13)$$

gdje je pKa_i pKa vrijednost molekule koja je predmet interesa, pKa_i^0 stalna vrijednost pKa vrijednosti, s je statistički faktor, ρ parametar odziva koji pokazuje koliko je precizno određena pKa vrijednost funkcionalne skupine, σ parametar koji pokazuje gdje je smješten supstituent, da li je smješten na alifatskom dijelu molekule ili u aromatskom prstenu. Ako je smješten na aromatskom prstenu, tada supstituent može biti smješten u *orto*-, *meta*- ili *para*-položaju. s (jednadžba (14)) je statistički faktor koji objašnjava razlike u broju atoma vodika koji su ekvivalentni onom broju koji je uključen u ionizaciju:

$$s = -\log \left(\frac{n_a}{n_b} \right) \quad (14)$$

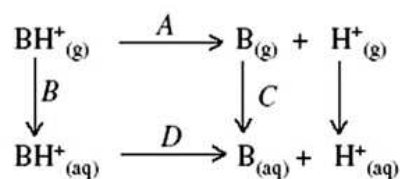
gdje je s statistički faktor, n_a broj vodikovih atoma kada je spoj u kiselom obliku, n_b broj vodikovih atoma kada je spoj u lužnatom obliku [57].

Jaguar je *ab initio* kvantno-kemijski program kojim se može predvidjeti struktura malih i velikih molekula. Predviđanje pKa vrijednosti je jedan od ključnih zadataka u praksi za računalni dizajn lijekova, u organskim sintezama te primjenama u znanosti o materijalima (katalitički procesi, skladištenje i generiranje energije, nanoelektronika). Predviđanje pKa na temelju *ab initio* izračuna i dalje ostaje problem čak i uz veći pristup teorijskih metoda [58]. *Jaguar* računa pKa vrijednosti pomoću termodinamičkog ciklusa (Slika 17.) i jednadžbe (15) [55]:

$$pK_a = \frac{1}{2.3 RT} D \quad (15)$$

gdje je R opća plinska konstanta ($R=8,314$ J/Kmol), T termodinamička temperatura, D slobodna energija koja se oslobodi u koraku D , a ta energija se računa kao promjena u slobodnoj energiji u drugim koracima ciklusa prema relaciji (16)

$$D = A + C - B \quad (16).$$



Slika 17. Prikaz termodinamičkog ciklusa koji se koristi za računanje pKa vrijednosti u *Jaguar* programu [55].

Izračunati rezultati djelomično ovise o konformaciji ciljne molekule, prvo je potrebno provesti konformacijsku pretragu *MacroModelom*. Preporuča se korištenje konformera s najnižom energijom koji se može pronaći za dalje izračune pKa vrijednosti. *Jaguar* izračunava mikroskopske (atomske) pKa vrijednost, ali ne makroskopske (eksperimentalne) pKa vrijednosti. Da se dobije makroskopska pKa vrijednost za poliprotionsku molekulu, *Schrödinger* predlaže pokretanje 2^n stanja, gdje je n broj bliskih pKa vrijednosti za poliprotionsku molekulu te se prati titracijska krivulja. U slučaju dviju ekvivalentnih mjesta za protonaciju i deprotonaciju, potrebno je uvesti statistički korekcijski faktor koji proizlazi iz povećane entropije odgovarajućih vrsta. Korekcija iznosi + 0,6 (log 2^2) ili - 0,6 te se dodaje rezultatu dobivenom iz modula predviđanja pKa [55].

Program *ADC/pKa* može se koristiti za računanje pKa vrijednosti organskih spojeva kod standardnih uvjeta, za vizualizaciju mjesta kod kojih se događa ionizacija, crtanje grafa ovisnosti distribucije ionskih vrsta kao funkcije pH i sl. [59].

Biološki aktivni spojevi se ne smatraju neutralnim vrstama i njihova se ionizacijska stanja opisuju pomoću pKa vrijednosti. Program *ACD/pKa* računa točne konstante disocijacije pri 25 °C za organske i anorganske spojeve. Točnost računa pKa vrijednosti varira između $\pm 0,2$ pKa jedinice za jednostavnije spojeve, dok je točnost za složenije strukture spojeva iznosi $\pm 0,5$ pKa jedinice. Interna baza podataka *ACD/pKa* sadrži preko 15 900 kemijskih struktura s pridruženim pKa vrijednostima. Podaci iz programa su dio međunarodne korporacije *BioByte* što čini bazu podataka jednu od najvećih komercijalno dostupnih eksperimentalnih pKa baza podataka [60].

Prilikom otkrića novog spoja važno je odrediti njegove karakteristike i određene vrijednosti, ključno je imati način na koji se predviđaju ti podatci. Program *ACD/pKa* nudi dva alata pomoću kojih se mogu odrediti te vrijednosti: pomoću uvježbavanja sustava s eksperimentalnim pKa vrijednostima i prilagođenih Hammett/Taftovih jednadžbi za

određene nove kemijske klase. Program omogućuje korisnicima definiranje novog centra ionizacije i točke vezanja za varijabilni supstituent i postavljanje relevantne Hammett-Taftove jednadžbe za definiranje i poboljšanje točnosti predviđanja pKa za druge kemijske spojeve [60].

Program se bazira na linearnim odnosima slobodne energije (engl. *Linear Free Energy Relationships*, LFER) primjenom Hammettove jednadžbe (17)

$$pK_a = pK_a^0 + \Delta(pK_a) \quad (17)$$

gdje je pK_a^0 konstanta ionizacije za matičnu molekulu, $\Delta(pK_a)$ je suma utjecaja svih ostalih funkcionalnih skupina na odgovarajuću pKa vrijednost [56].

3. MATERIJALI I METODE

U radu su računalnim pristupom određene pKa vrijednosti odabranih spojeva prisutnih u valerijani i preparatima od valerijane. U tu svrhu korišten je program *ACD/Labs Percepta 14.51.0*. ACD/Labs je platforma softvera za *in silico* studije, odnosno za izračune molekularnih svojstava kemijskih spojeva. Između ostalog, ACD/pKa precizno predviđa konstante kisele disocijacije izravno iz strukture spoja. Pomoću ovog softvera mogu se izračunati pKa organskih spojeva pri standardnim uvjetima, vizualizirati svi centri ionizacije spoja te odrediti distribucija svi ioniziranih mikrovrsta spoja (kao funkcija pH, odnosno u ovisnosti o pH medija) [61].

Predviđanja se temelje na bazi podataka ugrađenoj u softver, a koja sadrži podatke za preko 20 000 spojeva. Softver se temelji na dva algoritma – ACD/pKa Classic algoritmu (*default calculator*) i GALAS algoritmu (*Global, Adjusted Locally According to Similarity*). pKa se predviđa pri standardnim uvjetima u vodenom mediju. ACD/pKa Classic algoritam se temelji na bazi podataka sačinjenoj od podataka za preko 17 000 spojeva i preko 32 000 pKa vrijednosti. Jednadžbe Hammettovog tipa za glavne ionizabilne funkcijske skupine i pažljivo određene konstante supstituenta (parametar σ) glavne su komponente na kojima se temelji predviđanje pKa vrijednosti ovim algoritmom. Pri izračunima također se uzimaju u obzir tautomerna ravnoteža, utjecaj vode kao otapala, rezonancijski učinci te α - i β -nezasićeni sustavi [62].

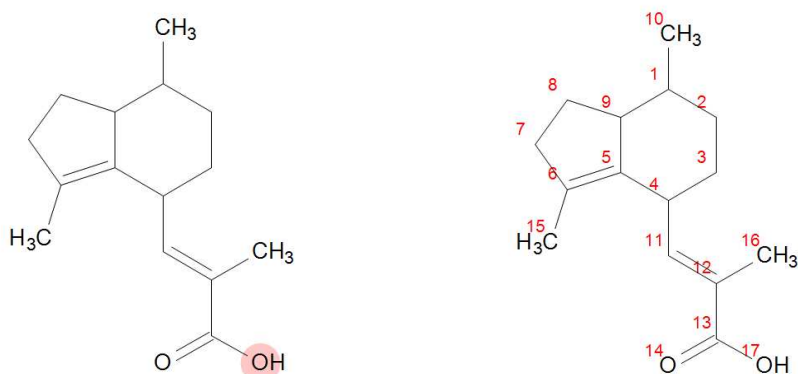
GALAS algoritam je model koji se temelji na bazi podataka sačinjenoj od podataka za preko 17 500 spojeva s više od 20 000 centara ionizacije. Baza podataka, sačinjena od centara ionizacije, konstanti interakcije i metoda izračuna interakcije, koristi se za simulaciju svih protoniranih stanja molekule i njihove distribucije pri različitim pH vrijednostima. Ovim algoritmom dobiju se podaci kao što su sumarni molekularni naboj, distribucija protoniranih stanja i prosječni naboj ionizacijskih centara molekule kao funkcije pH [62].

Odabrana su tri spoja – valerenska kiselina, hidroksivalerenska kiselina i acetoksivalerenska kiselina. Pregledom znanstvene literature, za ove spojeve nisu pronađene eksperimentalno određene pKa vrijednosti. Strukture spojeva prikazane su na Slici 11. a), Slici 12. i Slikama 18.-23.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Valerenska kiselina

Predviđene vrijednosti za pKa i ionizacijske frakcije valerenske kiseline dobivene upotrebom Classic algoritma prikazane su u nastavku teksta. Dan je računalni protokol na kojem se temelje rezultati dobiveni ovim algoritmom. Strukture koje su pri tome korištene su prikazane u nastavku teksta (Slika 18. i kasnije slike molekularnih fragmenata na kojima se temelje izračuni).



Slika 18. Valerenska kiselina s označenim najkiselijim dijelom molekule i numeracijom atoma.

Najjači kiseli pKa: $4,9 \pm 0,2$

Nema bazičnog pKa.

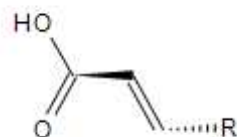
$4,9 \pm 0,2$ (Atom broj: 17)

Računalni protokol

Disocijacijsko stanje 1

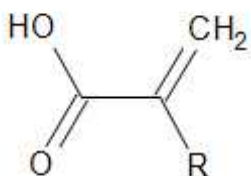
$$pK_{a_{\text{calc}}} = pK_{a_0} + \Delta(pK_a)$$

Izračun pK_{a_0} :



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednačbom.

$$pK_a = 4.455 - 2.608 \times \sigma_{\text{Ind}} - 2.0 \times \sigma_{\text{Res}} \quad n=19, r=0.9957, \text{StD}=0.0790$$



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednačbom.

$$pK_a = 4.233 - 4.876 \times \sigma_{\text{Ind}} - 1.893 \times \sigma_{\text{Res}} \quad n=5, r=0.9954, \text{StD}=0.1100$$

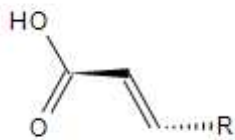
Krajnja vrijednost pK_{a_0} :

$$pK_{a_0} = \Sigma pK_{a_{0i}} / n = (4.455 + 4.233) / 2 = 4.344$$

Izračun $\Delta(pK_a)$:

$$\Delta(pK_a)_1 = 0.184 \quad \text{iz:}$$

Jednadžba za reakcijski centar:



$$\text{pKa} = 4.455 - 2.608 \times \sigma_{\text{Ind}} - 2.0 \times \sigma_{\text{Res}} \quad n=19, r=0.9957, \text{StD}=0.0790$$

Supstituent ima:

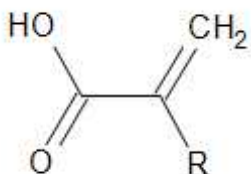
$$(\text{calc}) \sigma_{\text{Ind}} = 0.04; \sigma_{\text{Res}} = -0.14$$

Krajnja jednadžba za $\Delta(\text{pKa})_1$:

$$\Delta(\text{pKa})_1 = -2.608 \times \sigma_{\text{Ind}} - 2.0 \times \sigma_{\text{Res}} = 0.184$$

$$\Delta(\text{pKa})_2 = 0.352 \quad \text{iz:}$$

Jednadžba za reakcijski centar:



$$\text{pKa} = 4.233 - 4.876 \times \sigma_{\text{Ind}} - 1.893 \times \sigma_{\text{Res}} \quad n=5, r=0.9954, \text{StD}=0.1100$$

Supstituent ima:

$$(\text{exp}) \sigma_{\text{Ind}} = -0.01; \sigma_{\text{Res}} = -0.16$$

Krajnja jednadžba za $\Delta(\text{pKa})_2$:

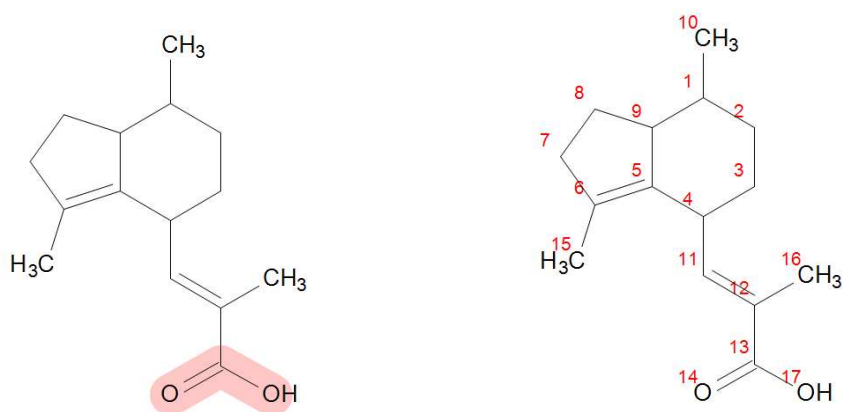
$$\Delta(\text{pKa})_2 = -4.876 \times \sigma_{\text{Ind}} - 1.893 \times \sigma_{\text{Res}} = 0.352$$

Ukupna suma za $\Delta(\text{pK}_a)$:

$$\Delta(\text{pK}_a) = \sum \Delta(\text{pK}_a)_i = 0.184 + 0.352 = 0.536$$

$$\text{pK}_{a\text{calc}} = 4.344 + 0.536 = 4.880$$

Predviđene vrijednosti za pK_a i ionizacijske frakcije valerenske kiseline dobivene upotrebom GALAS algoritma prikazane su u nastavku teksta. Slika 19. prikazuje numeraciju atoma i funkcijsku skupinu na kojoj je bio naglasak prilikom izračuna upotrebom GALAS algoritma.



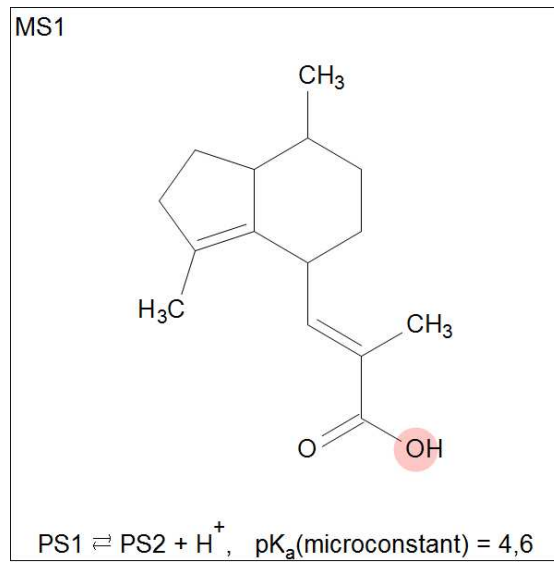
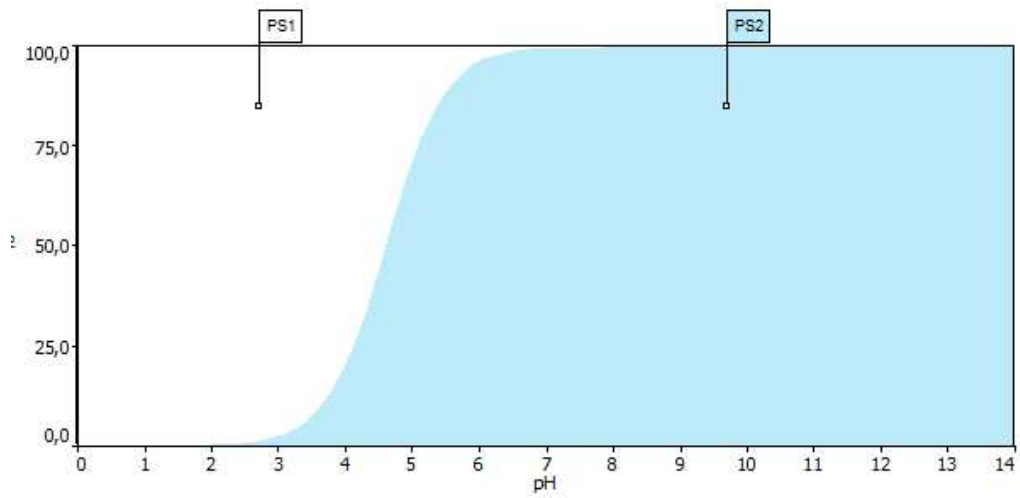
Slika 19. Struktura valerenske kiseline s označenom funkcijskom skupinom i numeracijom atoma.

Najjača kiselina pK_a : $4,6 \pm 0,4$

Nema bazične pK_a .

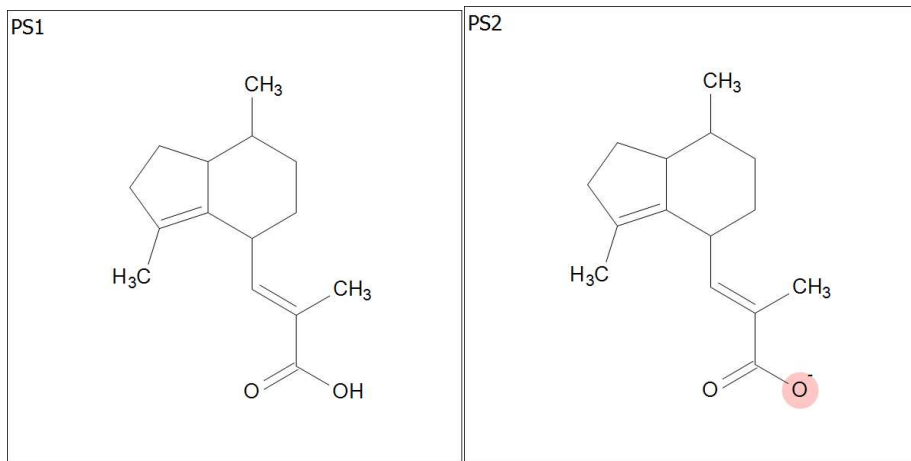
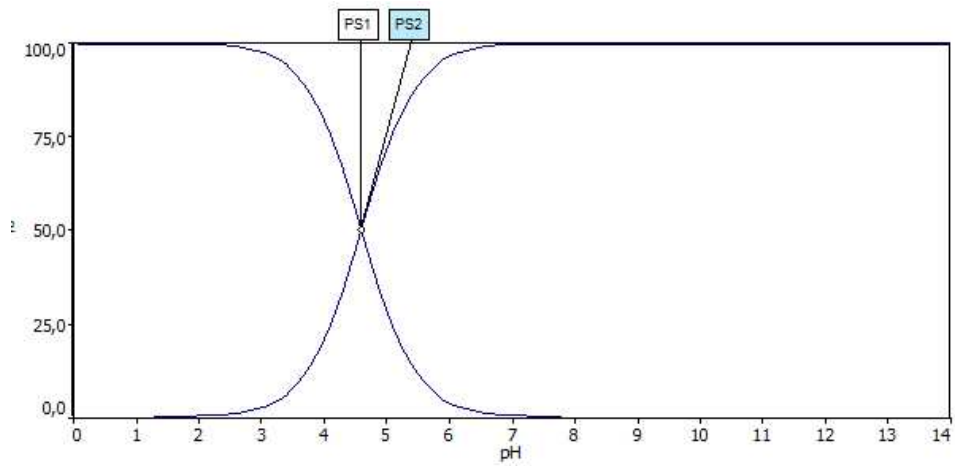
$4,6 \pm 0,4$ (Atom broj: 17), 100% MS1

Sumarni naboj vs pH



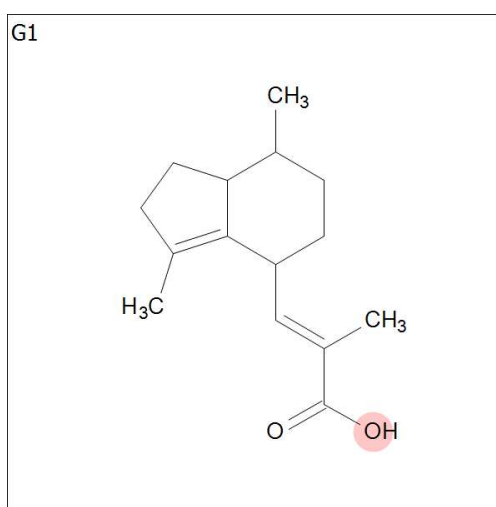
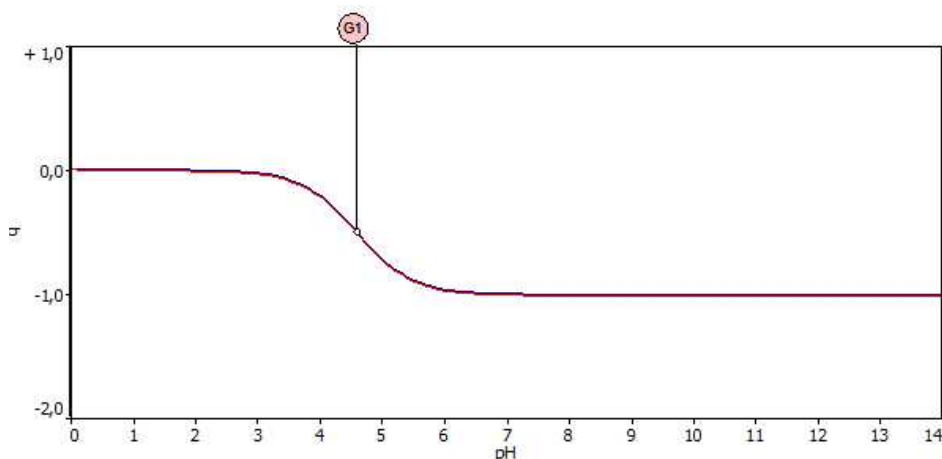
	1,7	2	3	4	4,6	5	6	6,5	7	7,4	8	9	10	11
q = -1	0,00	0,00	0,02	0,20	0,50	0,72	0,96	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
q = 0	1,00	1,00	0,98	0,80	0,50	0,28	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Protonacijska stanja vs pH



	1,7	2	3	4	4,6	5	6	6,5	7	7,4	8	9	10	11
PS1	1,00	1,00	0,98	0,80	0,50	0,28	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PS2	0,00	0,00	0,02	0,20	0,50	0,72	0,96	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Stanja ionogenih skupina vs pH

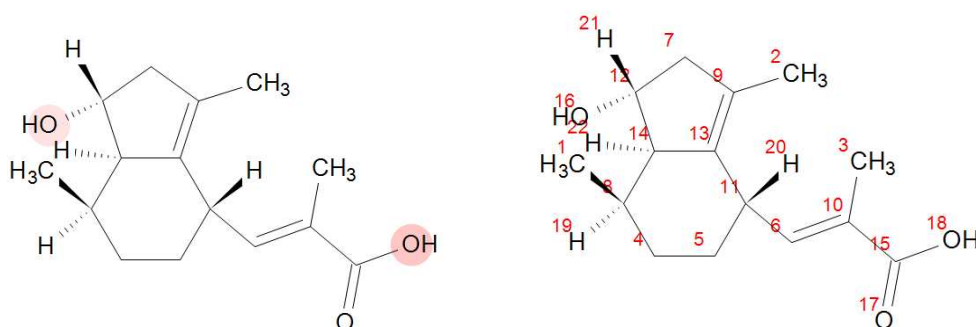


	1,7	2	3	4	4,6	5	6	6,5	7	7,4	8	9	10	11
G1	0,00	0,00	-0,02	-0,20	-0,50	-0,72	-0,96	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
TC	0,00	0,00	-0,02	-0,20	-0,50	-0,72	-0,96	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00

Za valerensku kiselinu se mogu naći teoretski podaci o vrijednosti pKa. Prema *DrugBank*, pKa iznosi 4,85 [63], a prema *Hazardous Substances Data Bank* u vodi pKa iznosi 4,842 pri 25 °C [64]. U oba dva slučaja radi se o citiranju istog izvornika. Prema *ChemAxon*, najkiseliji pKa za valerensku kiselinu je 5,06 [65]. U radu Kulikov (2012) objavljena je vrijednost pKa = 4,84, koja je dobivena računalno, primjenom programa *ACDLabs 10* [66]. Predviđene pKa pomoću *ACD/pKa* ne odudaraju značajno od prethodno objavljenih te su im slične (4,88).

4.2. Hidroksivalerenska kiselina

Predviđene vrijednosti za pKa i ionizacijske frakcije hidroksivalerenske kiseline dobivene upotrebom Classic algoritma prikazane su u nastavku teksta. Dan je računalni protokol na kojem se temelje rezultati dobiveni ovim algoritmom. Strukture koje su pri tome korištene su prikazane u nastavku teksta (Slika 20. i kasnije slike molekularnih fragmenata na kojima se temelje izračuni).



Slika 20. Hidroksivalerenska kiselina s označenim najkiselijim dijelovima molekule i numeracijom atoma.

Najjači kiseli pKa: $4,9 \pm 0,2$

Nema bazičnog pKa.

$4,9 \pm 0,2$ (Atom broj: 18)

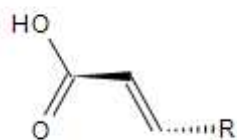
$14,7 \pm 0,7$ (Atom broj: 16)

Računalni protokol

Disocijacijsko stanje 1

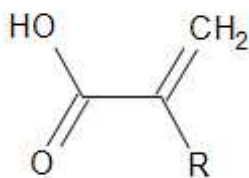
$$pK_{a_{calc}} = pK_{a_0} + \Delta(pK_a)$$

Izračun pK_{a_0} :



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksponencijalnom jednačbom.

$$pK_a = 4.455 - 2.608 \times \sigma_{Ind} - 2.0 \times \sigma_{Res} \quad n=19, r=0.9957, StD=0.0790$$



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksponencijalnom jednačbom.

$$pK_a = 4.233 - 4.876 \times \sigma_{Ind} - 1.893 \times \sigma_{Res} \quad n=5, r=0.9954, StD=0.1100$$

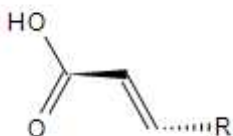
Krajnja vrijednost pK_{a_0} :

$$pK_{a_0} = \Sigma pK_{a_{0i}} / n = (4.455 + 4.233) / 2 = 4.344$$

Izračun $\Delta(pK_a)$:

$$\Delta(pK_a)_1 = 0.184 \quad \text{iz:}$$

Jednadžba za reakcijski centar:



$$\text{pKa} = 4.455 - 2.608 \times \sigma_{\text{Ind}} - 2.0 \times \sigma_{\text{Res}} \quad n=19, r=0.9957, \text{StD}=0.0790$$

Supstituent ima:

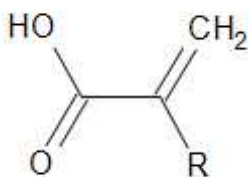
$$(\text{calc}) \sigma_{\text{Ind}} = 0.04; \sigma_{\text{Res}} = -0.14$$

Krajnja jednadžba $\Delta(\text{pKa})_1$:

$$\Delta(\text{pKa})_1 = -2.608 \times \sigma_{\text{Ind}} - 2.0 \times \sigma_{\text{Res}} = 0.184$$

$$\Delta(\text{pKa})_2 = 0.352 \quad \text{iz:}$$

Jednadžba za reakcijski centar:



$$\text{pKa} = 4.233 - 4.876 \times \sigma_{\text{Ind}} - 1.893 \times \sigma_{\text{Res}} \quad n=5, r=0.9954, \text{StD}=0.1100$$

Supstituent ima:

$$(\text{exp}) \sigma_{\text{Ind}} = -0.01; \sigma_{\text{Res}} = -0.16$$

Krajnja jednadžba za $\Delta(\text{pKa})_2$:

$$\Delta(\text{pKa})_2 = -4.876 \times \sigma_{\text{Ind}} - 1.893 \times \sigma_{\text{Res}} = 0.352$$

Ukupna suma za $\Delta(\text{pKa})$:

$$\Delta(\text{pKa}) = \Sigma\Delta(\text{pKa})_i = 0.184 + 0.352 = 0.536$$

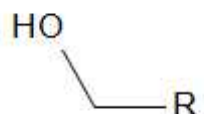
$$\text{pKa}_{\text{calc}} = 4.344 + 0.536 = 4.880$$

Disocijacijsko stanje 2

$$\text{pKa}_{\text{calc}} = \text{pKa}_0 + \Delta(\text{pKa})$$

Izračun pKa_0 :

Poseban protokol za cijepanje prstena je primijenjen pri izračunu pKa_0 . U izračunu je korišten fragment:



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednadžbom.

$$\text{pKa} = 15.172 - 6.772 \times \sigma_{\text{Ind}} \quad n=7, r=0.9959, \text{StD}=0.0980$$

Krajnja vrijednost pKa_0 :

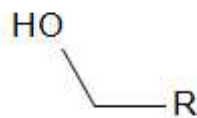
$$\text{pKa}_0 = 14.668$$

Izračun $\Delta(\text{pKa})$:

$$\Delta(\text{pKa})_1 = 0.015 \quad \text{iz:}$$

Za zamjenu u nearomatskom prstenu je određena jednadžba:

$\Delta(\text{pKa}) = -\rho \times \sigma_{\text{Ind}}$ gdje je $\rho = \rho^0 \times 0.4^n$ ρ^0 – vrijednost bez vodljivosti prstenaste strukture, n – izračunat Exner-Fiedlerovom metodom za vodljivost prstenaste strukture



Krajnja jednađba za $\Delta(\text{pKa})$:

$$\Delta(\text{pKa}) = 13.89 \times 0.4^{2.17} \times \sigma_{\text{Ind}}$$

Supstituent ima:

$$(\text{exp}) \sigma_{\text{Ind}} = -0.01$$

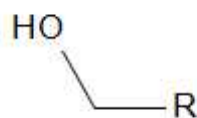
Krajnja jednađba za $\Delta(\text{pKa})_1$:

$$\Delta(\text{pKa})_1 = 13.89 \times 0.4^{2.17} \times \sigma_{\text{Ind}} = 0.015$$

$$\Delta(\text{pKa})_2 = -0.036 \quad \text{iz:}$$

Za zamjenu u nearomatskom prstenu je određena jednađba:

$\Delta(\text{pKa}) = -\rho \times \sigma_{\text{Ind}}$ gdje je $\rho = \rho^0 \times 0.4^n$ ρ^0 – vrijednost bez vodljivosti sustava, n – izračunat Exner-Fiedlerovom metodom za vodljivost prstenaste strukture



Krajnja jednađba $\Delta(\text{pKa})$:

$$\Delta(\text{pKa}) = 13.89 \times 0.4^{2.76} \times \sigma_{\text{Ind}}$$

Supstituent ima:

$$(\text{calc}) \sigma_{\text{Ind}} = 0.04$$

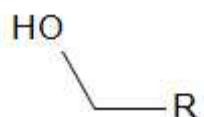
Krajnja jednažba za $\Delta(\text{pKa})_2$:

$$\Delta(\text{pKa})_2 = 13.89 \times 0.4^{2.76} \times \sigma_{\text{Ind}} = -0.036$$

$$\Delta(\text{pKa})_3 = 0.010 \quad \text{iz:}$$

Za zamjenu u nearomatskom prstenu je određena jednažba:

$\Delta(\text{pKa}) = -\rho \times \sigma_{\text{Ind}}$ where $\rho = \rho^0 \times 0.4^n$ ρ^0 - vrijednost bez vodljivosti sustava, n – izračunat Exner-Fiedlerovom metodom za vodljivost prstenaste strukture.

**Krajnja jednažba za $\Delta(\text{pKa})$:**

$$\Delta(\text{pKa}) = 13.89 \times 0.4^{2.55} \times \sigma_{\text{Ind}}$$

Supstituent ima:

$$(\text{exp}) \sigma_{\text{Ind}} = -0.01$$

Krajnja jednažba $\Delta(\text{pKa})_3$:

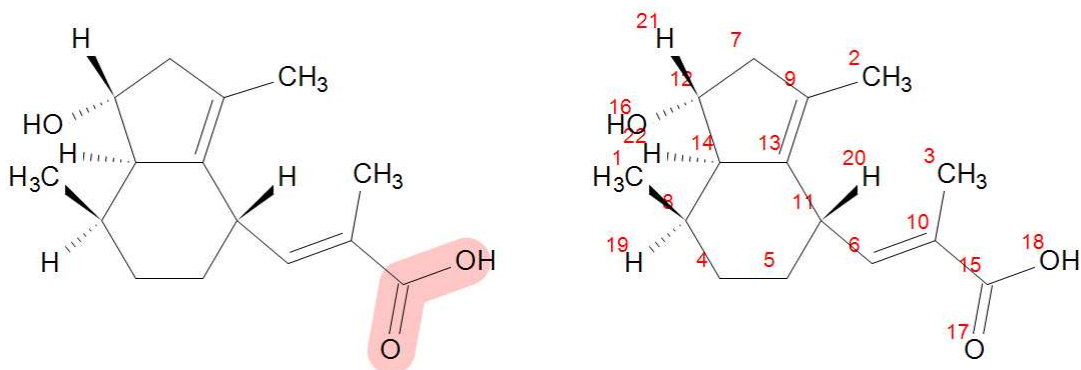
$$\Delta(\text{pKa})_3 = 13.89 \times 0.4^{2.55} \times \sigma_{\text{Ind}} = 0.010$$

Ukupna suma za $\Delta(\text{pKa})$:

$$\Delta(\text{pKa}) = \Sigma \Delta(\text{pKa})_i = 0.015 - 0.036 + 0.010 = -0.011$$

$$\text{pKa}_{\text{calc}} = 14.668 - 0.011 = 14.657$$

Predviđene vrijednosti za pKa i ionizacijske frakcije hidroksivalerenske kiseline dobivene upotrebom GALAS algoritma prikazane su u nastavku teksta. Slika 21. prikazuje numeraciju atoma i funkcijsku skupinu na kojoj je bio naglasak prilikom izračuna upotrebom GALAS algoritma.



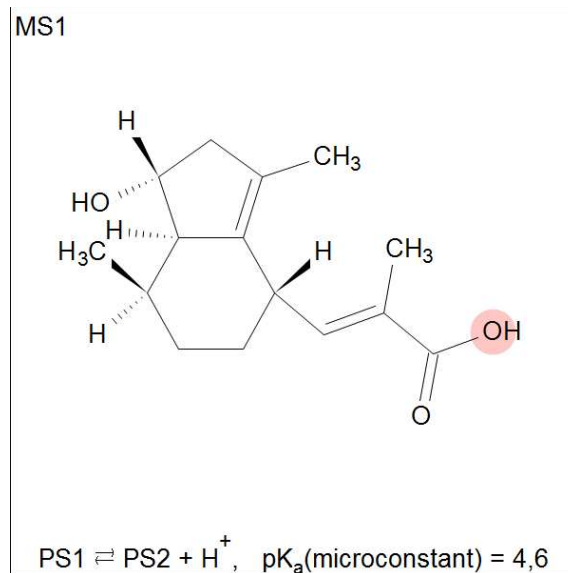
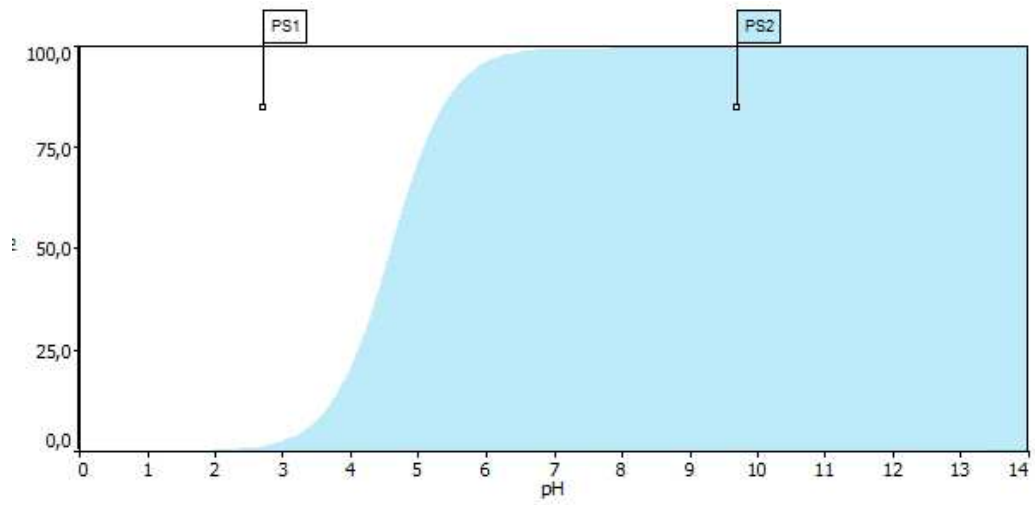
Slika 21. Hidroksivalerenska kiselina s označenom funkcijskom karboksilnom skupinom i numeracijom atoma.

Najjača kiselina pKa: $4,6 \pm 0,4$

Nema bazična pKa.

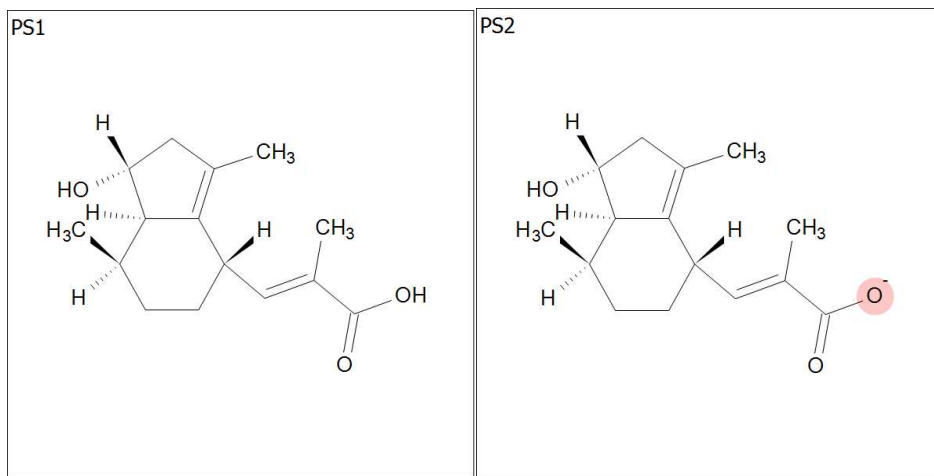
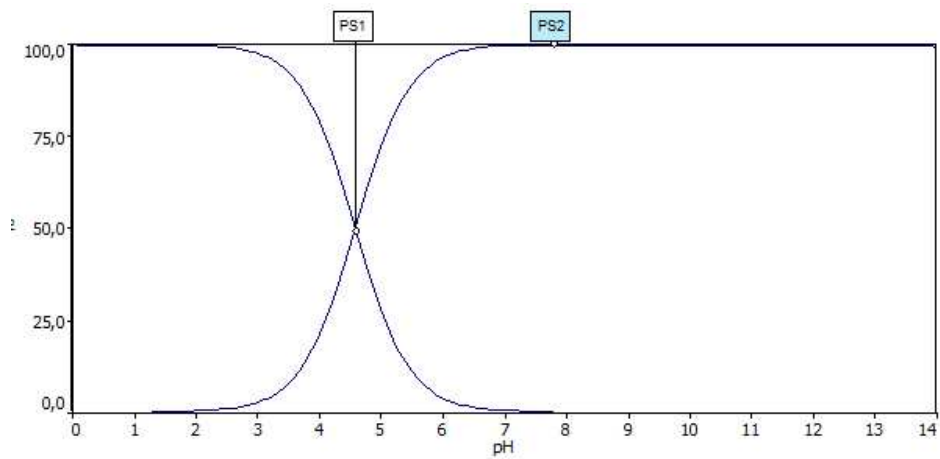
$4,6 \pm 0,4$ (Atom br.: 18), 100% MS1

Sumarni naboj vs pH



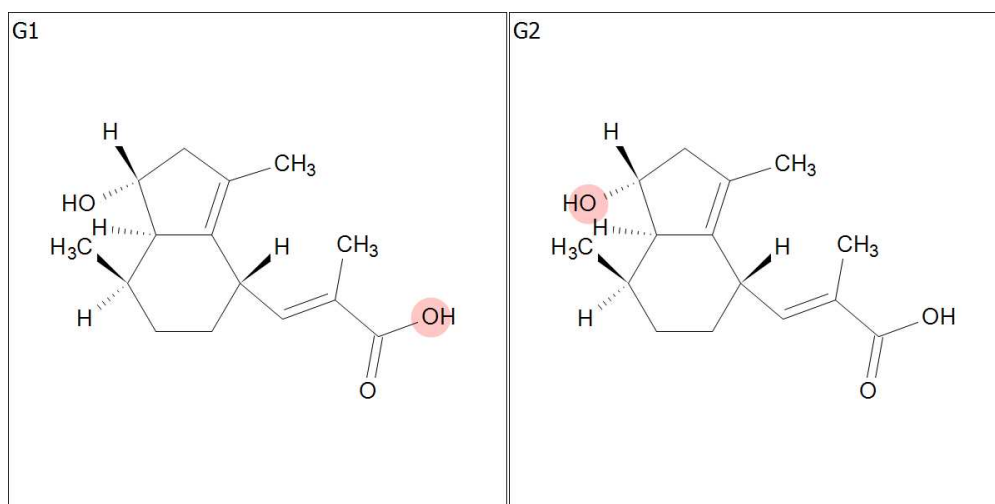
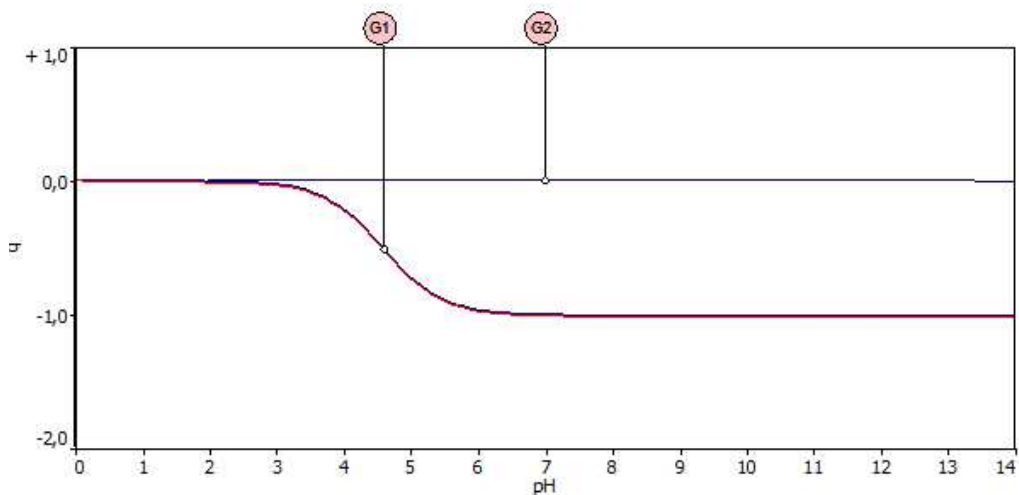
	1,7	2	3	4	4,6	5	6	6,5	7	7,4	8	9	10	11
q = -2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
q = -1	0,00	0,00	0,03	0,21	0,51	0,72	0,96	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
q = 0	1,00	1,00	0,97	0,79	0,49	0,28	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Protonacijska stanja vs pH



	1,7	2	3	4	4,6	5	6	6,5	7	7,4	8	9	10	11
PS1	1,00	1,00	0,97	0,79	0,49	0,28	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PS2	0,00	0,00	0,03	0,21	0,51	0,72	0,96	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Stanja ionogenih skupina vs pH

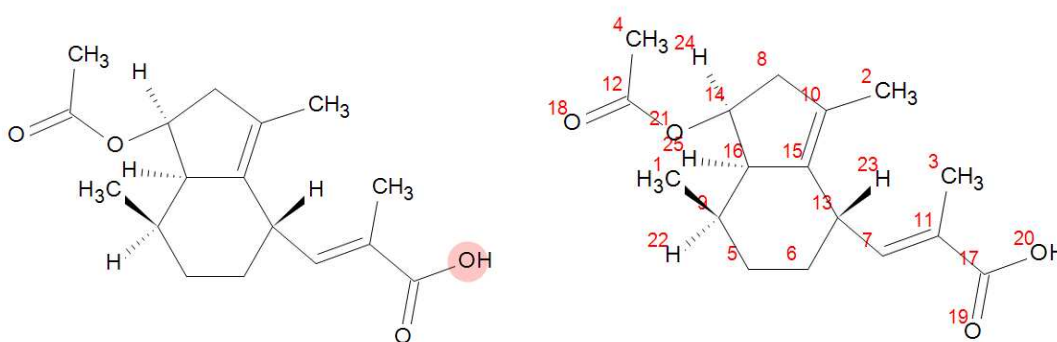


	1,7	2	3	4	4,6	5	6	6,5	7	7,4	8	9	10	11
G1	0,00	0,00	-0,03	-0,21	-0,51	-0,72	-0,96	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
G2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TC	0,00	0,00	-0,03	-0,21	-0,51	-0,72	-0,96	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00

Za hidroksivalerensku kiselinu se mogu naći teoretski podaci o vrijednosti pKa, međutim podaci su oskudni. U radu Kulikov (2012) objavljena je vrijednost pKa1 = 4,84 i pKa2 = 14,65, dobivene pomoću *ACDLabs 10* [66]. Predviđene pKa pomoću *ACD/pKa* ne odudaraju značajno od prethodno objavljenih te su im slične (4,9 i 14,7).

4.3. Acetoksivalerenska kiselina

Predviđene vrijednosti za pKa i ionizacijska frakcije acetoksivalerenske kiseline dobivene upotrebom Classic algoritma prikazane su u nastavku teksta. Dan je računalni protokol na kojem se temelje rezultati dobiveni ovim algoritmom, strukture koje su pri tome korištene su prikazane u nastavku teksta (Slika 22. i kasnije slike molekularnih fragmenata na kojima se temelje izračuni).



Slika 22. Acetoksivalerenska kiselina s označenim najkiselijim dijelom molekule i numeracijom atoma.

Najjači kiseli pKa: $4,9 \pm 0,2$

Nema bazičnog pKa.

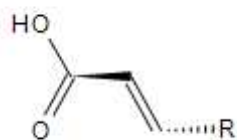
$4,9 \pm 0,2$ (Atom broj: 20)

Računalni protokol

Disocijacijsko stanje 1

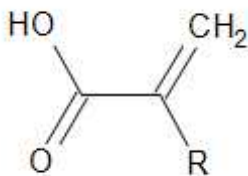
$$pK_{a_{calc}} = pK_{a_0} + \Delta(pK_a)$$

Izračun pK_{a_0} :



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksponencijalnom jednačbom.

$$pK_a = 4.455 - 2.608 \times \sigma_{Ind} - 2.0 \times \sigma_{Res} \quad n=19, r=0.9957, StD=0.0790$$



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksponencijalnom jednačbom.

$$pK_a = 4.233 - 4.876 \times \sigma_{Ind} - 1.893 \times \sigma_{Res} \quad n=5, r=0.9954, StD=0.1100$$

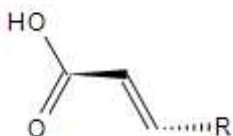
Krajnja vrijednost pK_{a_0} :

$$pK_{a_0} = \Sigma pK_{a_{0i}} / n = (4.455 + 4.233) / 2 = 4.344$$

Izračun $\Delta(pK_a)$:

$$\Delta(pK_a)_1 = 0.184 \quad \text{iz:}$$

Jednadžba za reakcijski centar:



$$\text{pKa} = 4.455 - 2.608 \times \sigma_{\text{Ind}} - 2.0 \times \sigma_{\text{Res}} \quad n=19, r=0.9957, \text{StD}=0.0790$$

Supstituent ima:

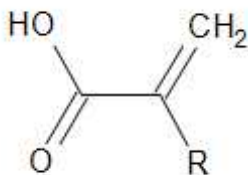
$$(\text{calc}) \sigma_{\text{Ind}} = 0.04; \sigma_{\text{Res}} = -0.14$$

Krajnja jednadžba za $\Delta(\text{pKa})_1$:

$$\Delta(\text{pKa})_1 = -2.608 \times \sigma_{\text{Ind}} - 2.0 \times \sigma_{\text{Res}} = 0.184$$

$$\Delta(\text{pKa})_2 = 0.352 \quad \text{iz:}$$

Jednadžba za reakcijski centar:



$$\text{pKa} = 4.233 - 4.876 \times \sigma_{\text{Ind}} - 1.893 \times \sigma_{\text{Res}} \quad n=5, r=0.9954, \text{StD}=0.1100$$

Supstituent ima:

$$(\text{exp}) \sigma_{\text{Ind}} = -0.01; \sigma_{\text{Res}} = -0.16$$

Krajnja jednadžba za $\Delta(\text{pKa})_2$:

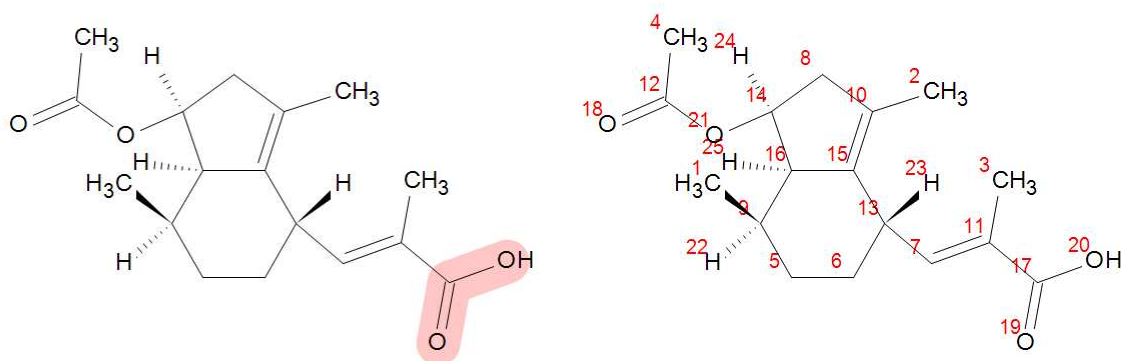
$$\Delta(\text{pKa})_2 = -4.876 \times \sigma_{\text{Ind}} - 1.893 \times \sigma_{\text{Res}} = 0.352$$

Ukupna suma za $\Delta(\text{pKa})$:

$$\Delta(\text{pKa}) = \sum \Delta(\text{pKa})_i = 0.184 + 0.352 = 0.536$$

$$\text{pKa}_{\text{calc}} = 4.344 + 0.536 = 4.880$$

Predviđene vrijednosti za pKa i ionizacijske frakcije acetoksivalerenske kiseline dobivene upotrebom GALAS algoritma prikazane su u nastavku teksta. Slika 23. prikazuje numeraciju atoma i funkcijsku skupinu na kojoj je bio naglasak prilikom izračuna upotrebom GALAS algoritma.



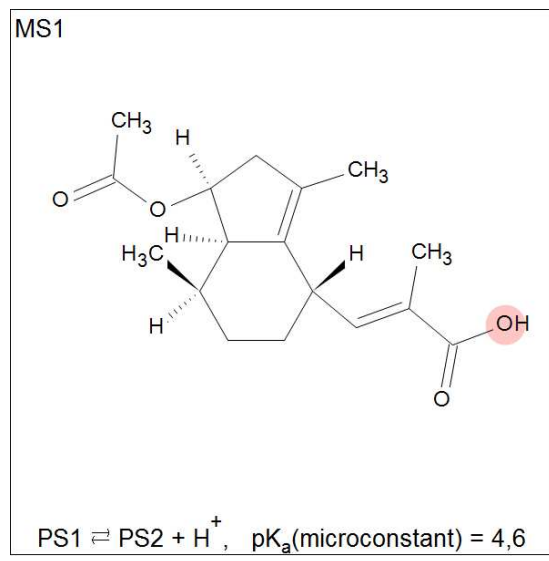
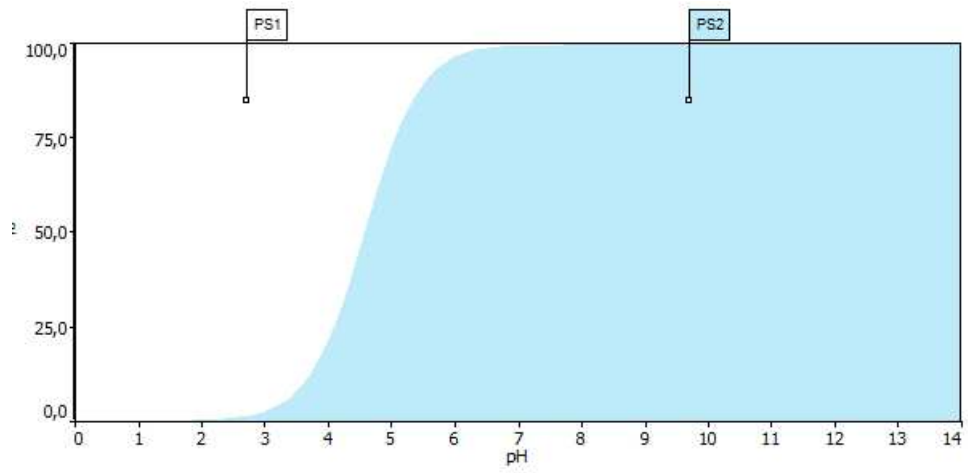
Slika 23. Struktura acetoksivalerenske kiseline s označenom funkcijskom skupinom i numeracijom atoma.

Najjače kisela pKa: $4,6 \pm 0,4$

Nema bazične pKa.

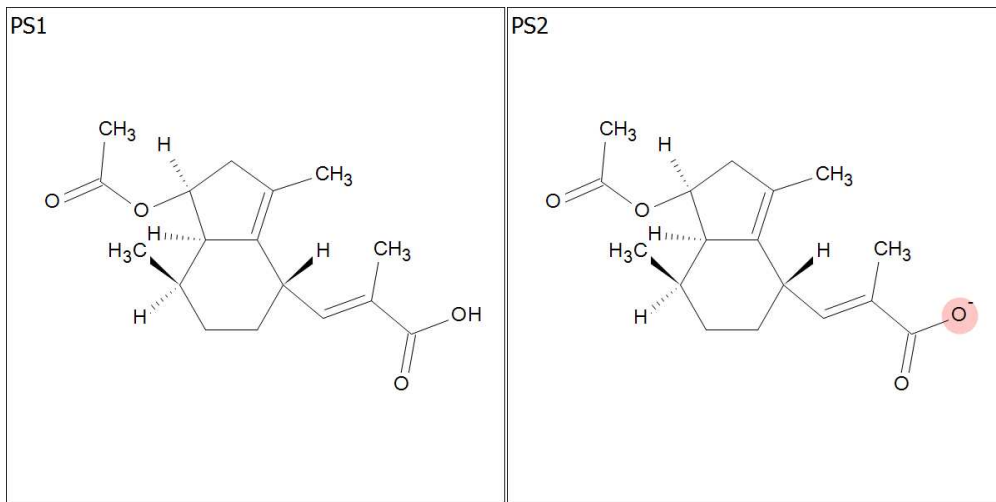
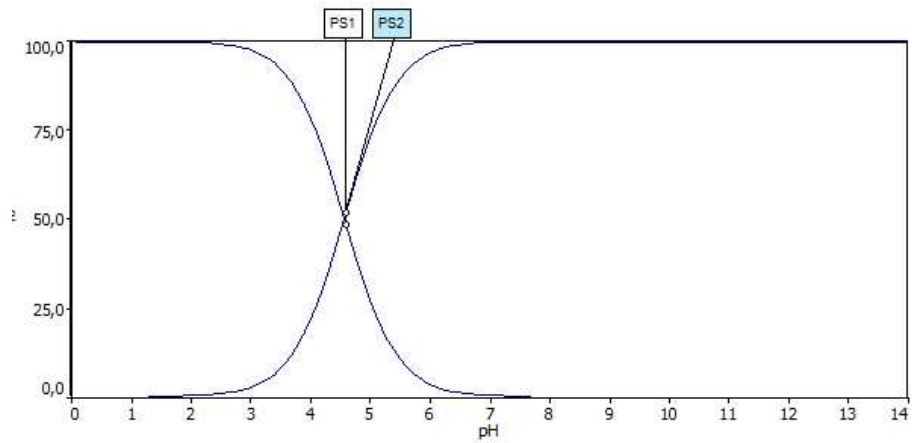
$4,6 \pm 0,4$ (Atom broj: 20), 100% MS1

Sumarni naboj vs pH



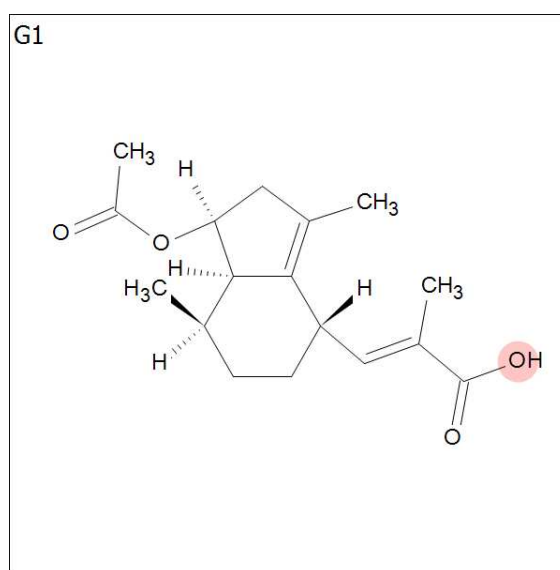
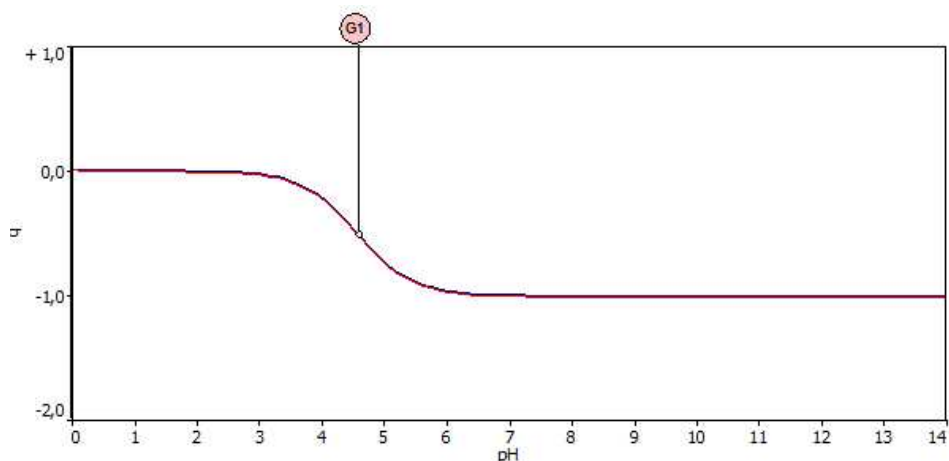
	1,7	2	3	4	4,6	5	6	6,5	7	7,4	8	9	10	11
q = -1	0,00	0,00	0,03	0,21	0,52	0,73	0,96	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
q = 0	1,00	1,00	0,97	0,79	0,48	0,27	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Protonacijska stanja vs pH



	1,7	2	3	4	4,6	5	6	6,5	7	7,4	8	9	10	11
PS1	1,00	1,00	0,97	0,79	0,48	0,27	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PS2	0,00	0,00	0,03	0,21	0,52	0,73	0,96	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Stanja ionogenih skupina vs pH



	1,7	2	3	4	4,6	5	6	6,5	7	7,4	8	9	10	11
G1	0,00	0,00	-0,03	-0,21	-0,52	-0,73	-0,96	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
TC	0,00	0,00	-0,03	-0,21	-0,52	-0,73	-0,96	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00

Za acetoksivalerensku kiselinu se mogu naći teoretski podaci o vrijednosti pKa, međutim podaci su oskudni. U radu Kulikov (2012) objavljena je vrijednost pKa= 4,84, dobivena pomoću *ACDLabs 10* [66]. Osim toga, pregledom literature pronađena je još jedna predviđena pKa = 4.88 ± 0,19 [67]. Predviđena pKa pomoću *ACD/pKa* ne odudara značajno od prethodno objavljenih nego im je slična (4,88).

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je prikazan protokol za računalno određivanje vrijednosti pKa primjenom programa *ACD/pKa*. Valerenskoj, hidroksivalerenskoj i acetoksivalerenskoj kiselini, spojevima izoliranim iz biljke valerijane, *V. officinalis* L., računalno su predviđene pKa vrijednosti te promjene sumarnog naboja, protonacijska stanja i stanja ionogenih skupina u ovisnosti o pH medija.

Korištenjem *ADC/pKa* Classic algoritma kod valerenske kiseline je najkiseliji dio molekule na hidroksilnoj skupini kod atoma broj 17. Valerenska kiselina ima najjače kiselu pKa vrijednost od $4,9 \pm 0,2$, a računalno određena pKa vrijednost za atom broj 17 iznosi 4,880. Kod hidroksivalerenske kiseline ističu se dva kiselna dijela molekule – na atomima broj 16 i broj 18, odnosno u slučaju ovog spoja radi se o dva stupnja disocijacije. Hidrovalerenska kiselina ima najjače kiselu pKa vrijednost od $4,9 \pm 0,2$. pKa vrijednost za atom broj 18 iznosi $4,9 \pm 0,2$, a računalno određena vrijednost iznosi 4,880 (kao kod valerenske kiseline). pKa vrijednost za atom broj 16 iznosi $14,7 \pm 0,7$, a računalno određena vrijednost iznosi 14,657. Acetoksivalerenska kiselina ima također najjače kiseli pKa pri $4,9 \pm 0,2$, kao što je bio slučaj kod valerenske i hidroksivalerenske kiseline. pKa vrijednost za atom 20, koji je najkiseliji, iznosi $4,9 \pm 0,2$, a računalno određena vrijednost iznosi 4,880. Bazični pKa za sva tri spoja nije utvrđen.

ACD/pKa GALAS algoritam predviđa sumarni naboj molekule vs pH, protonacijska stanja vs pH, te stanja ionogenih skupina vs pH. Pomoću rezultata mogu se utvrditi stupnjevi disocijacije, vrsta koja je prisutna pri određenom pH, a pomoću dobivenih rezultata može se dodatno izračunati molarni udio svake vrste pri nekom pH. U slučaju valerenske kiseline, vidimo da je u pitanju jedan stupanj protonacije/deprotonacije. pKa je pri 4,6. Koje su to vrste prikazano je na slikama PS1 i PS2, na kojima se jasno vidi da se radi o karboksilnoj skupini na atomu 13. U slučaju hidroksivalerenske kiseline, vide se dvije kisele funkcijske skupine – karboksilna i hidroksilna. Međutim, pri pH = 4,6 nalazi se pKa za karboksilnu skupinu dok vrste vezane za protonaciju/deprotonaciju hidroksilne skupine (atom 16) nisu utvrđene. Za acetoksivalerensku kiselinu, dobiveni rezultati ukazuju na pKa pri pH = 4,6, a odnose se na atom broj 20. Radi se o gotovo identičnoj situaciji kao u slučaju valerenske kiseline, što obzirom na slične strukture ova dva spoja nije neočekivano.

6. LITERATURNA VRELA

- [1] C. N. Lanje, S. R. Patil, A. M. Wankhade, *Am. J. Pharm. Tech R.* **10** (2020), 149-173.
- [2] J. Patočka, J. Jakl, *J Appl Biomed* **8** (2010), 11-18.
- [3] R. Bilić, *GABA sustav u zdravlju i bolesti*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2019.
- [4] E. H. Kerns, L. Di, *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*, Academic Press, Cambridge, 2008.
- [5] B. Pathare, V. Tambe, V. Patil, *Int J Pharm Pharm Sci* **6** (2014), 26-34.
- [6] J. Reijenga, A. van Hoof, A. van Loon, B. Teunissen, *Anal Chem Insight* **8** (2013), 53-71.
- [7] S. Babić, A. J. M. Horvat, D. Mutavdžić Pavlović, M. Kaštelan-Macan, *Trends Anal. Chem* **26** (2007), 1043-1061.
- [8] <https://www.plantea.com.hr/valerijana> (18. 7. 2022.).
- [9] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:156_Valeriana_officinalis_L.jpg (22. 9. 2022.).
- [10] <https://www.shutterstock.com/image-photo/fresh-valerian-root-valeriana-officinalis-drug-1605376804> (22. 9. 2022.).
- [11] <https://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2015/12/valerijana-13.jpg> (27. 8. 2022.).
- [12] K. Murti, M. Kaushik, Y. Sangwan, A. Kaushik, *PhOL* **3** (2011), 641-646.
- [13] https://hr.wikipedia.org/wiki/Ljekoviti_odoljen (27. 8. 2022.).
- [14] <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Valeriana+fauriei> (8. 9. 2022.).
- [15] https://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/image-display.php?species_id=156940&image_id=1 (8. 9. 2022.).
- [16] T. Nikolić, *Izolacija alkaloida iz prirodnih spojeva*, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, 2010.
- [17] J. A. Duke, C. J. Duke, *Handbook of Medicinal Herbs*, CRC-Press, Boca Raton, 1985.
- [18] <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0030346> (10. 9. 2022.).
- [19] H. Auda, G. R. Waller, E. J. Eisenbraun, *J. Biol. Chem.* **242** (1967), 4157-4160.
- [20] <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Actinidine.png> (21. 7. 2022.).
- [21] <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0033484> (10. 9. 2022.).
- [22] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Valerianine#section=2D-Structure> (27. 8. 2022.).

- [23] <https://www.fishersci.ch/shop/products/2-acetylpyrrole-99-acros-organics-2/p-3756531> (21. 7. 2022.).
- [24] P. Sándor, A. G. Kovách, K. B. Horváth, G. B. Szentpétery, O. Clauder, *Drug Res.* **20** (1970), 29-32.
- [25] M. Subotić, *Terpeni – prirodni organski spojevi*, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2016.
- [26] <https://bs.wikipedia.org/wiki/Izopren#/media/Datoteka:Isoprene.svg> (21. 7. 2022.).
- [27] <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000892> (10. 9. 2022.).
- [28] <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000718> (10. 9. 2022.).
- [29] C. A. Rubeuro, F. Balestro, V. Grando, M. Wajner, *Cell Mol. Neurobiol.* **27** (2007), 529-540.
- [30] https://www.wikiwand.com/sh/Pentanska_kiselina (21. 7. 2022.).
- [31] https://sh.wikipedia.org/wiki/3-Metilbutanska_kiselina (21. 7. 2022.).
- [32] https://sh.wikipedia.org/wiki/Valerenska_kiselina (21. 7. 2022.).
- [33] https://www.buyersguidechem.com/chemical_supplier/Valerenal (8. 9. 2022.).
- [34] N. J. Jacobo-Herrera, N. Vartiainen, P. Bremner, S. Gibbons, J. Koistinaho, M. Heinrich, *Phytother. Res.* **20** (2006), 917-919.
- [35] https://sr.wikipedia.org/wiki/Valerenska_kiselina (23. 9. 2022.).
- [36] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Didrovaltrate#section=2D-Structure> (11. 9. 2022.).
- [37] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Valtrate#section=2D-Structure> (11. 9. 2022.).
- [38] C. Keochanthala-Bounthan, J. P. Beck, M. Haag-Berrurier, R. Anton, *Phytother. Res.* **7** (1993), 124-127.
- [39] R. Bos, H. J. Woerdenbag, N. Pras, *J. Chromatogr. A* **967** (2002), 131-146.
- [40] R. Bos, H. Hendriks, J. J. C. Scheffer, H. J. Woerdenbag, *Phytomedicine* **5** (1998), 219-225.
- [41] https://hr.wikipedia.org/wiki/Gama-aminomasla%C4%8Dna_kiselina (21. 7. 2022.).
- [42] J. Jablan, J. Kordovan, M. Jug, I. Mucalo, *Farm. Glas.* **71** (2015), 215-228.
- [43] https://www.researchgate.net/publication/281728663_Insomnia_pharmacotherapy (21. 7. 2022.).
- [44] W. Neuhaus, G. Trauner, D. Gruber, S. Oelzant, W. Klepal, B. Kopp, C. R. Noe, *Planta Med* **74** (2008), 1338-1344.

- [45] P. D. Leathwood, F. Chauffard, E. Heck, R. Munoz-Box, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **17** (1982), 65-71.
- [46] O. Lindahl, L. Lindwall, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **32** (1989), 1065-1066.
- [47] P. Leathwood, F. Chauffard, *Planta Med.* **51** (1985), 144-148.
- [48] G. Balderer, A. A. Borbély, *Psychopharmacology* **87** (1985), 406-409.
- [49] H. Schulz, C. Stolz, J. Müller, *Pharmacopsychiat.* **27** (1994), 147-151.
- [50] R. Kohlen, W. Oswald, *Pharmacopsychiat.* **21** (1988), 447-448.
- [51] S. L. Plushner, *Am J of Health-Sys Pharm* **57** (2000), 328-335.
- [52] P. Mirabi, M. Dolatian, F. Mojab, H. A. Majd, *Int J Gynaecol Obstet* **115** (2011), 285-288.
- [53] L. Di, E. H. Kerns, *Drug-Like Properties (Second Edition)*, Academic Press, Cambridge, 2016.
- [54] J. I. Vandenberg, M. D. Perry, M. J. Perrin, S. A. Mann, Y. Ke, A. P. Hill, *Physiol Rev* **92** (2012), 1393-1478.
- [55] M. Tutone, A. Lauria, A. M. Almerica, *Interdiscip Sci Comput Life Sci* **8** (2015), 177-185.
- [56] O. Toure, C.-G. Dussap, A. Lebert, *Oil Gas Sci. Technol. – Rev. IFP Energies nouvelles* **68** (2013), 281-297.
- [57] J. C. Shelley, A. Cholleti, L. L. Frye, J. R. Greenwood, M. R. Timlin, M. Uchimaya, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **12** (2007), 681-691.
- [58] A. D. Bochevarov, E. Harder, T. F. Hughes, J. R. Greenwood, D. A. Braden, D. M. Philipp, D. Rinaldo, M. D. Halls, J. Zhang, R. A. Friesner, *Int. J. Quantum Chem.* **113** (2013), 2110-2142.
- [59] <https://www.acdlabs.com/products/percepta-platform/physchem-suite/pka> (23. 9. 2022.).
- [60] ACD/Labs Products Catalog 2008/2007.
- [61] <https://www.acdlabs.com/products/percepta-platform/physchem-suite/pka/> (27. 9. 2022.).
- [62] https://www.acdlabs.com/products/percepta-platform/physchem-suite/pka/#pka_calculations (27. 9. 2022.).
- [63] <https://go.drugbank.com/drugs/DB02406> (28. 9. 2022.).
- [64] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/5390#section=LogP> (28. 9. 2022.).
- [65] <https://foodb.ca/compounds/FDB001309> (28. 9. 2022.).
- [66] A. U. Kulikov, *Chrom. Res. Int.* **2012** (2012), 564243.

[67] <https://www.guidechem.com/encyclopedia/acetoxvalerenic-acid-dic1592697.html>
(28 .9. 2022.).