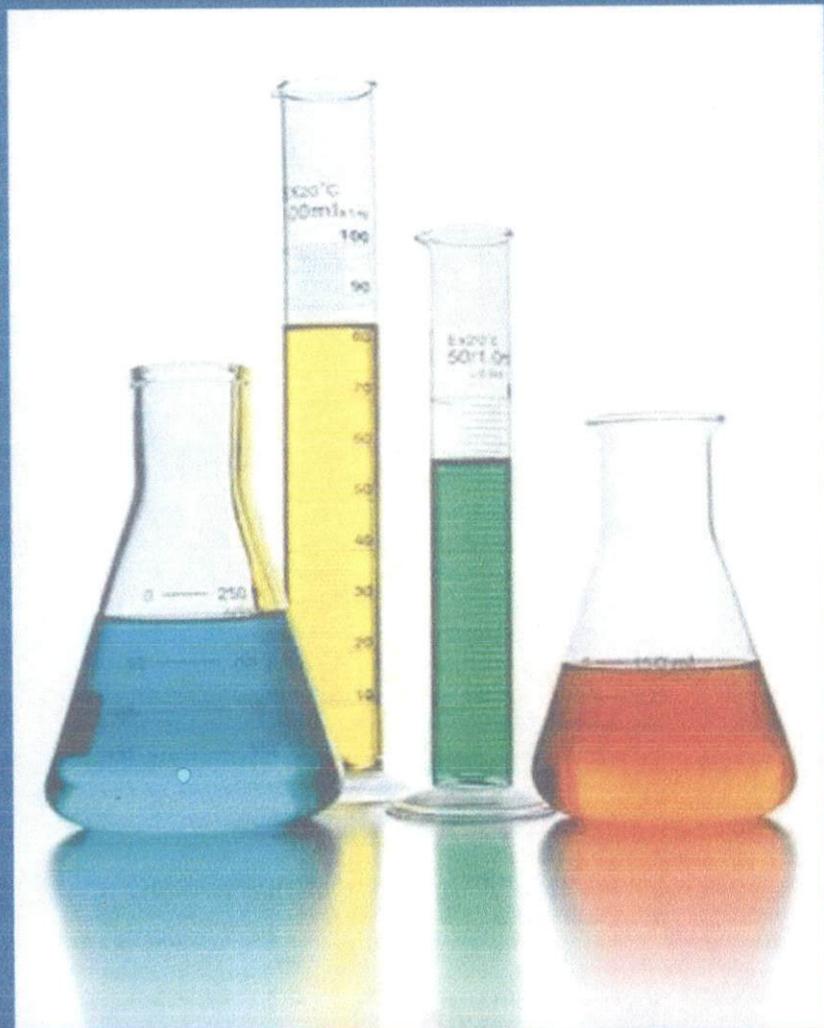


# Berkala Ilmiah Kimia Farmasi

VOL. 2 NO. 2, November 2013



**PENERBIT**  
**DEPARTEMEN KIMIA FARMASI**  
**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA**



**Ketua :**  
**Anggota:**

Dr. Marcellino Rudyanto, Apt. M.S  
Prof. Dr. Sudjarwo, Apt., MS  
Dr. Juni Ekowati, Apt., M.Si

**Redaksi Pelaksana:**

Tri Widiandani, Apt., S.Si., Sp.FRS  
Dr. Riesta Primaharinastiti, Apt., M.Si  
M. Faris Adrianto, Apt., S.Farm., M.Farm  
Kustiawan (*uploader*)

**Alamat Redaksi:**

Fakultas Farmasi Universitas Airlangga  
Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya 60286  
Telp. 031-5033710, Fax. 031-5020514  
e-mail: bikfar.ffua@yahoo.com

DAFTAR ISI

- Uji Aktivitas Analgesik Senyawa Baru Turunan Parasetamol pada Mencit (*Mus Musculus*) dengan Metode *Hot Plate*  
**Tri Widiandani, Siswandono, Suko Hardjono, Istifada, Risma Zahra**.....
- Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri untuk Penetapan Kadar Kolkisin dalam Infus Daun Kembang Sungsang (*Gloriosa Superba* Linn.)  
**Auliya Hilmi, Sudjarwo, Asri Darmawati** .....
- Penetapan Kadar Formalin dalam Ayam Potong yang Diambil di Pasar Tradisional Surabaya Timur  
**Sudjarwo, Asri Darmawati, Vivi Wahyu Hariyanti**.....
- Pemodelan Molekul dan Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas Sitotoksik Turunan Benzoinurea sebagai Antitumor  
**Suzana, Melanny Ika. S, Kholis Amalia N., Juni Ekowati, Marcellino Rudyanto, Hadi Poerwono, Tutuk Budiati** .....
- Kandungan Salisilat Bebas Dalam Tablet Asetosal yang Beredar di Surabaya  
**Febri Annuryanti, Juniar Moechtar, Asri Darmawati**.....
- Pemanfaatan Daun Trembesi (*Samanea saman*) dalam Mengadsorpsi Logam Berat Timbal  
**Kasan Suwignyo, Amirudin Prawita, Juniar Moechtar**.....
- Perbandingan Aktivitas Penekan Susunan Saraf Pusat Senyawa Baru N-Benzoinfenilurea dan 4-Nitrobenzoinfenilurea  
**Bambang Tri Purwanto**.....

Gambar sampul:  
*Seperangkat Alat Gelas yang biasa Digunakan di Laboratorium Kimia (www.laboratoryequipment.com)*

## PERBANDINGAN AKTIVITAS PENEKAN SUSUNAN SARAF PUSAT SENYAWA BARU N-BENZOILFENILUREA DAN 4-NITROBENZOILFENILUREA

**BAMBANG TRI PURWANTO**

Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Email : [bbg\\_tony@yahoo.com](mailto:bbg_tony@yahoo.com)

### ABSTRACT

*Activity test of the central nervous system and synthesis from the new compound N-benzoylphenylurea and 4-nitrobenzoylphenylurea has been done. The Schotten Baumann method was used for the reaction between N-phenylurea and benzoyl chloride derivatives. The CNS depressant activity test was done for the N-benzoylphenylurea compound and 4-nitrobenzoylphenylurea by Barbituric Sleeping Time (BST) method.*

*The yield of the N-benzoylphenylurea was 86% , had a white crystal , the 4-nitrobenzoylphenylurea was a yellow brown crystal and yield was 65%. Both of them gave one spot in Thin Layer Chromatography with two different eluent and the compounds melting point was different from the N-phenylurea and showed greater. The structure identification from the all novel compounds were analysed by UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR and MS, the result showed that the new compound were N-benzoylphenylurea and 4-nitrobenzoylphenylurea .*

*The CNS depressant activity test from N-benzoylphenylurea and 4-nitrobenzoylphenylurea had a greater activity if compare with the standard compound bromisoval.*

**Keywords :** N-benzoylphenylurea and 4-nitrobenzoylphenylurea ; CNS depressant activity.

### PENDAHULUAN

Pengembangan senyawa bahan aktif yang memiliki aktivitas farmakologi yang lebih baik dibandingkan dengan senyawa asalnya perlu mendapatkan perhatian. Hal ini adalah untuk memperoleh senyawa bahan aktif baru yang akan dapat dijadikan calon bahan obat baru guna menunjang kesehatan masyarakat. Untuk memperoleh senyawa baru yang akan berpotensi sebagai calon obat baru diperlukan suatu proses sintesis secara kimia dengan harapan akan diperoleh senyawa baru yang relatif murni dan memiliki aktivitas farmakologis yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan senyawa induknya (Burger, 2003; Korolkovas, 2008)

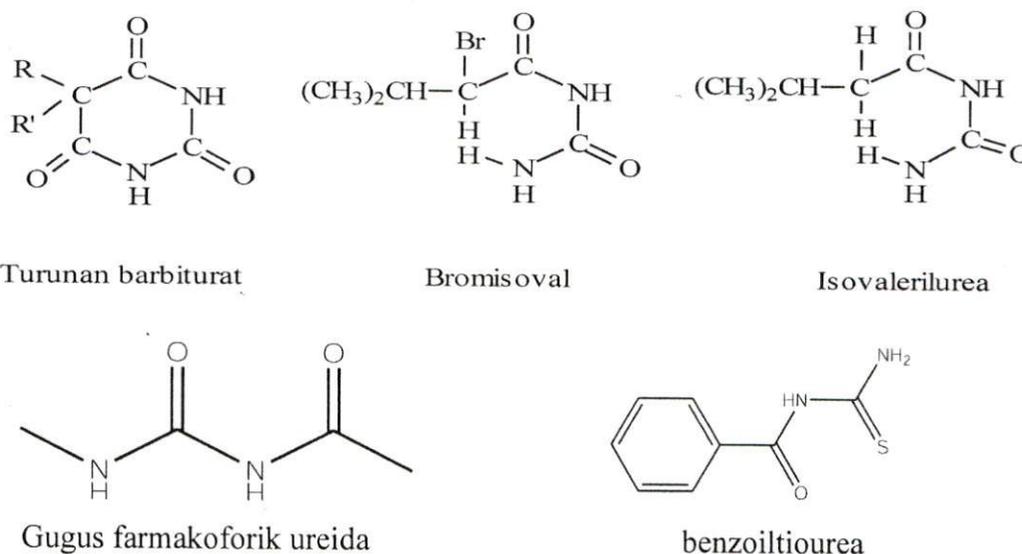
Pengembangan senyawa bahan aktif dapat dilakukan melalui berbagai macam metode (utamanya melalui reaksi sintesis), yang mana reaksi sintesis tersebut dapat merupakan reaksi satu tahapan ataupun beberapa tahapan reaksi. Metode reaksi sintesis satu tahap memiliki keunggulan bila dibandingkan dengan metode reaksi sintesis yang melalui beberapa tahapan reaksi, karena senyawa target akan langsung bisa diperoleh.

Selama ini urea hanya dikenal sebagai bahan aktif yang digunakan sebagai pupuk tanaman, dan sudah dapat di produksi oleh industri di Indonesia, ternyata pada pengembangan selanjutnya dengan menggunakan bahan aktif urea sebagai bahan dasar akan menghasilkan senyawa bahan aktif yang memiliki aktivitas farmakologis yang beragam antara lain sebagai penekan susunan saraf pusat dan sebagai anti kanker.

Beberapa turunan urea yang telah berhasil dibuat dan memiliki aktivitas farmakologis sebagai penekan susunan saraf antara lain, isovalerilurea yang telah berhasil dibuat oleh Reksodadipodjo (1981), bromasilurea dibuat oleh Tjipta Surasa (1991), benzoilurea yang telah dibuat oleh Siswandono (1999), benzoiltiourea yang dibuat oleh Suzanna (2004), dan turunan benzoiltiourea yang telah berhasil dibuat oleh Dini (2007).

Aktivitas sebagai penekan susunan saraf dari senyawa – senyawa aktif tersebut karena adanya gugus farmakoforik yang dimiliki oleh senyawa bahan aktif yaitu adanya gugus ureida asiklik, ternyata gugus tersebut dimiliki juga oleh senyawa obat golongan penekan susunan saraf yaitu asam barbiturat. Struktur senyawa aktif yang memiliki

gugus farmakoforik ureida asiklik dapat dilihat pada gambar1.



**Gambar 1** : Struktur senyawa aktif penekan susunan saraf dengan gugus farmakoforik ureida asiklik

Pengembangan lebih lanjut senyawa aktif turunan urea adalah senyawa N-benzoilfenilurea, yang juga memiliki gugus farmakofor ureida asiklik, senyawa turunan baru N-benzoilfenilurea diperoleh dari reaksi satu tahap melalui metode Schotten-Baumann. Senyawa turunan baru N-benzoilfenilurea yang telah berhasil disintesis adalah N-benzoilfenilurea, 4-nitrobenzoil-fenilurea. Masing-masing senyawa tersebut akan memiliki aktivitas penekan susunan saraf pusat yang berbeda sehingga untuk mengetahui aktivitas farmakologis sebagai penekan susunan saraf perlu dilakukan uji aktivitas penekan susunan saraf pusat melalui metode *Barbituric Sleeping Time* (BST). Melalui uji aktivitas penekan susunan saraf pusat ini dapat diketahui perbandingan aktivitas penekan susunan saraf pusat dari senyawa aktif turunan baru N-benzoilfenilurea, sehingga akan diperoleh data informasi senyawa aktif baru turunan N-benzoilfenilurea yang memiliki aktivitas penekan susunan saraf pusat tertinggi.

## METODE PENELITIAN

### 1. Sintesis senyawa aktif N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea

Bambang Tri Purwanto, 1991, telah berhasil membuat senyawa turunan ampisilin yaitu *p*-

bromobenzoilampisilin dengan menggunakan metode Schotten-Baumann, yaitu dengan mereaksikan antara senyawa ampisilin dengan senyawa *p*-bromobenzoilklorida.

Siswandono, 1999, juga menggunakan metode Schotten Baumann dalam mereaksikan senyawa urea dengan senyawa turunan benzoilklorida sehingga diperoleh senyawa baru N-benzoilurea. Dalam melakukan proses sintesis N-benzoilfenilurea dilakukan dengan metode terpilih Schoten Baumann, yaitu dengan mereaksikan senyawa N-fenilurea dengan turunan benzoilklorida dan 4-nitrobenzoil klorida, dengan jumlah yang sama banyak (0,01 mol) menggunakan pelarut tetrahidrofuran. Pencampuran reaksi tersebut dilakukan pada suhu dingin selama 60 menit, kemudian di refluks selama 7 jam. Selanjutnya dipisahkan dan ditambahkan larutan jenuh natrium bikarbonat sampai terbentuk Kristal (McMurry, 2008).

### 2. Uji kemurnian senyawa turunan N-benzoilfenilurea

#### a. Kromatografi Lapis Tipis

Untuk mengetahui kemurnian dari senyawa hasil sintesis dilakukan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan 2 macam pelarut yang berbeda.

#### b. Penentuan Titik Lebur

Kemurnian senyawa hasil sintesis dapat pula ditentukan dari titik leburnya. Senyawa hasil sintesis ditentukan titik leburnya dengan alat *Melting Point apparatus*

### 3. Identifikasi Struktur senyawa hasil sintesis

Identifikasi struktur molekul senyawa hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR dan spektrometer massa

#### 4. Uji aktivitas penekan susunan saraf

Metode uji aktivitas penekan susunan saraf pusat adalah *Barbituric Sleeping Time* (BST), karena metode ini merupakan metode standar dalam uji aktivitas penekan susunan saraf pusat. Metode BST terdiri dari dua tahapan, yaitu penentuan waktu aktivitas puncak dari senyawa uji, yang merupakan waktu tidur terlama dari hewan coba mencit, kemudian dilakukan uji potensiasi senyawa uji pada waktu aktivitas puncak dengan memberikan senyawa induksi thiopental. (Vida, 2003; Vogel, 2008; Achliya, 2005)

## HASIL DAN DISKUSI

### Sintesis dan identifikasi struktur senyawa aktif N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoil-fenilurea

Hasil sintesis senyawa N-benzoilfenilurea berupa Kristal putih berbentuk jarum dengan rendemen sebesar 86%, senyawa 4-nitrobenzoilfenilurea berupa Kristal kuning kecoklatan dengan rendemen 65%. Dari besaran rendemen yang dihasilkan pada reaksi sintesis tersebut, menunjukkan bahwa metode Schotten-Bauman telah terpilih dan layak sebagai metode sintesis yang tepat untuk melakukan sintesis senyawa aktif N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea.

Identifikasi struktur senyawa aktif N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea dapat dilihat pada analisis berikut ini.

Pada tahapan selanjutnya dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) pada senyawa hasil sintesis turunan N-benzoilfenilurea dengan menggunakan 2 macam pelarut yang berbeda. (n-heksana : aseton = 4 : 2 dan n-heksana : etil asetat

Hewan coba yang digunakan adalah mencit putih (*Mus musculus*) berumur 2-3 bulan dengan berat antara 20 – 30 gr, galur Blab C, jantan, tanpa cacat fisik, yang diperoleh dari laboratorium hewan Universitas Airlangga.

Pada uji aktivitas penekan susunan saraf pusat senyawa uji turunan N-benzoilfenilurea tahap pertama dilakukan penentuan waktu aktivitas puncak yang dimulai dari menit ke 15, 30, 45, 60, 75, 90 dan 120 dengan menggunakan satu dosis. Tahapan selanjutnya adalah penentuan uji potensiasi dengan menggunakan 5 macam dosis (10, 25, 50, 100 dan 200 mg/kgBB) yang diberikan secara *intra peritoneal* (i.p). Sebagai senyawa pembanding digunakan senyawa bromisoval (senyawa turunan urea yang sudah beredar dan digunakan dalam praktek oleh para klinisi) dengan pemberian dosis yang sama, sedangkan sebagai senyawa penginduksi digunakan senyawa thiopental. Replikasi terhadap uji aktivitas penekan susunan saraf pusat ini dilakukan sebanyak 10 kali.

= 4 : 2). Hasil KLT dari senyawa N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea memberikan noda tunggal dengan harga R<sub>f</sub> yang berbeda dengan senyawa asal N-fenilurea. Hal di atas menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis berupa senyawa N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea yang diinginkan telah terbentuk dan relatif murni dan juga telah berbeda dengan senyawa asal.

Pada uji analisis titik lebur senyawa hasil sintesis N-benzoilfenilurea memiliki titik lebur ( 195°C), senyawa 4-nitrobenzoilfenilurea ( 147°C), yang berbeda dengan titik lebur senyawa asal N-fenilurea (145°C). Pada uji titik lebur ini telah terbukti bahwa senyawa hasil sintesis N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea sudah terbentuk dan memiliki kemurnian yang relatif tinggi karena tidak ditemukan adanya zat pengotor lain di dalam nya.

Pada karakterisasi struktur, senyawa hasil sintesis N-benzoilfenilurea, UV (methanol), λ<sub>maks</sub> (nm) = 204, 232, 272 (sh); IR (pellet KBr), 3240 cm<sup>-1</sup> (NH sekunder), 1698 cm<sup>-1</sup> (-CO), 1600 cm<sup>-1</sup> (C=C arom); <sup>1</sup>H-NMR (pelarut DMSO-d<sub>6</sub>), 7,00 – 8,10 ,m,

(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 10,60, s, (NH), 11,20,s, (NH); MS (EI) , 240 (M)<sup>+</sup>, 93 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH)<sup>+</sup>, 137 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NHCONH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>

Senyawa 4-nitrobenzoilfenilurea, UV(methanol), λ<sub>maks</sub> (nm) = 262; IR (pellet KBr), 3468 cm<sup>-1</sup> (NH sekunder), 2965 cm<sup>-1</sup> (C-H alkana), 1669 cm<sup>-1</sup> (CO), 1552 dan 1581 cm<sup>-1</sup> (C=C aromatis);

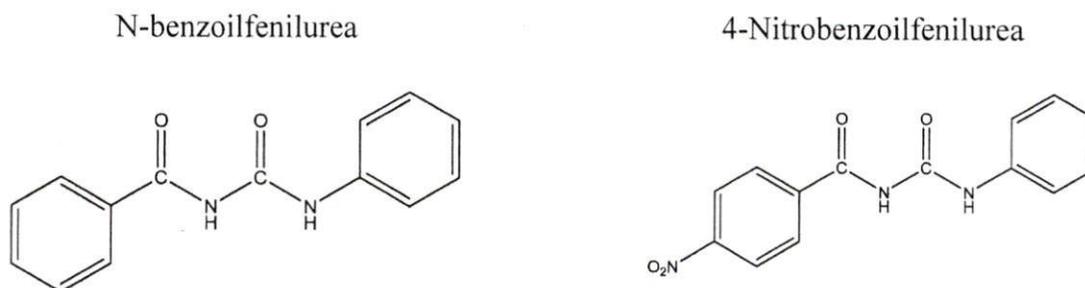
<sup>1</sup>HNMR (pelarut DMSO-d<sub>6</sub>), 7,00 – 8,60 ,m, (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 10,40,s,(NH);10,60, s, (NH); MS (EI), 295(M)<sup>+</sup>;166 (NH<sub>2</sub>CO(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)NO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>;120 (CONHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sup>+</sup>; 150 (COC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>

Senyawa asal N-fenilurea, UV, λ<sub>maks</sub> (nm) = 204, 238; IR, 3428 cm<sup>-1</sup> (NH primer), 1655 cm<sup>-1</sup> (CO), 1553 cm<sup>-1</sup> (C=C aromatis); HNMR (pelarut DMSO-d<sub>6</sub>), 6,80 – 8,00, m, (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,60,s, (NH), 6,20, s, (NH), 8,60,s, (NH<sub>2</sub>).

Pada karakterisasi struktur dengan berbagai instrumen spektrofotometer terlihat bahwa struktur senyawa hasil sintesis N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea telah berbeda dengan senyawa asal N-fenilurea, terutama pada jumlah atom

hidrogen yang terdapat pada senyawa hasil sintesis N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea dengan senyawa asal N-fenilurea (<sup>1</sup>H-NMR) dan adanya 2 puncak gugus karbonil senyawa hasil sintesis N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea (IR). Pada karakterisasi struktur dengan spektrometer massa menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis N-benzoilfenilurea pun sudah berbeda dengan senyawa asal N-fenil urea terutama terlihat dari bobot molekul masing-masing senyawa hasil sintesis dan hasil karakterisasi struktur untuk semua senyawa hasil sintesis N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea telah sesuai dengan yang ditunjukkan oleh pustaka (Pavia, 2009; Silverstein, 2009), sehingga berdasarkan karakterisasi struktur dapat dipastikan senyawa hasil sintesis telah terbentuk yaitu senyawa N-benzoilfenilurea, senyawa 4-nitrobenzoilfenilurea. Struktur masing-masing senyawa hasil sintesis ini dapat dilihat pada gambar 4. dibawah ini.

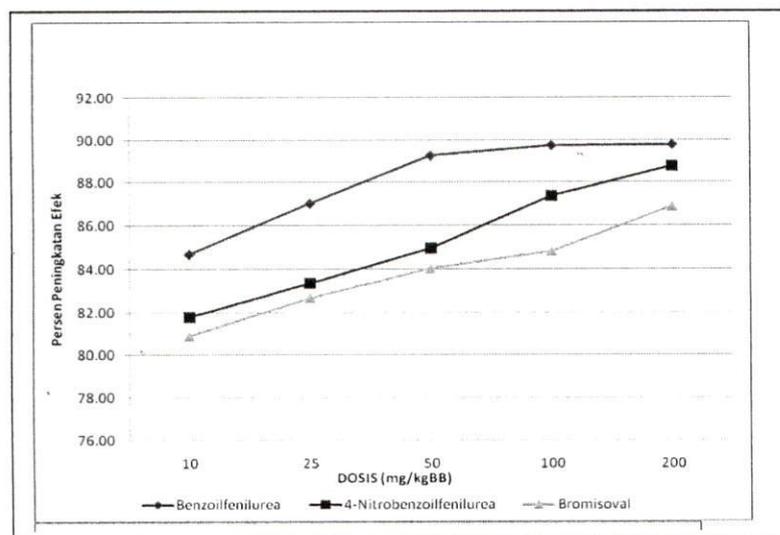
**Gambar 4** : Senyawa hasil sintesis N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea



**1. Uji aktivitas penekan susunan saraf pusat senyawa aktif N-benzoilfenilurea dan turunannya**

Uji Aktivitas penekan susunan saraf pusat dilakukan dengan menggunakan metode *Barbituric Sleeping Time* (BST). Uji Aktivitas penekan susunan saraf pusat tahap awal, senyawa hasil sintesis memiliki waktu aktivitas puncak pada waktu menit ke 30

dengan waktu lama tidur mencit terpanjang, sedang waktu aktivitas puncak untuk senyawa pembanding bromisoval pada menit ke 60 menunjukkan waktu tidur mencit yang terpanjang. Untuk uji potensiasi dengan senyawa penginduksi thiopental, yang diberikan secara *intra peritoneal* dengan 5 macam dosis dapat dilihat pada gambar 5 berikut ini.



**Gambar 5 :** Perbandingan aktivitas penekan susunan saraf pusat dari N-benzoilfenilurea, 4-nitrobenzoilfenilurea dan pembandingan bromisoval

Berdasarkan gambar 5 terlihat bahwa aktivitas senyawa N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea memiliki aktivitas penekan susunan saraf pusat yang lebih tinggi dari pembandingan senyawa bromisoval pada dosis yang sama, hal tersebut disebabkan adanya penambahan gugus benzoil menyebabkan senyawa menjadi bersifat lebih non polar sehingga sangat mudah dalam penembusan ke dalam membran biologis. Berdasarkan hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis yang diperoleh dapat dikembangkan menjadi senyawa calon obat baru penekan susunan saraf pusat.

#### KESIMPULAN

Senyawa hasil sintesis N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea telah terbentuk dan memiliki aktivitas penekan susunan saraf yang lebih tinggi dibanding dengan bromisoval.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

1. Kepada Prof. Dr. Siswandono, MS, Apt, Guru Besar dalam bidang Kimia Medisinal dari Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan penulis dalam melakukan penelitian ini.
2. Kepada Prof. Dr. Purwanto, Apt, Guru Besar dalam bidang Biokimia dari Universitas Airlangga

yang telah memberikan semangat bagi penulis dalam mengerjakan penelitian ini

3. Kepada Prof. Dr. Honda, Guru Besar dalam bidang Sintesis Organik dari Universitas Hoshi, Tokyo, Jepang, yang telah menganalisis senyawa ini dengan spektrometer massa dan memberikan kemudahan tanpa biaya.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Achliya GS, Wadodkar SG, Dorle AK, 2005, Evaluation of CNS activity of *Bramhi Ghrita*, *Indian Journal of Pharmacology*, Vol.37, hal.33-36.
- Bambang Tri Purwanto, 1991, *Sintesis dan Uji Aktivitas Antibakteri N-para-bromobenzoilampisilin terhadap S.aureus ATCC 7500 dan E.coli ATCC 7500*, Tesis Magister, Program Pascasarjana UGM.
- Bambang Soekardjo, 1989, *Sintesis dan hubungan struktur dengan aktivitas in vitro dari suatu seri turunan benzoil-N-ampisilin baru*, Disertasi Doktor, Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Burger A, 2003. *A Guide to the Chemical Basis of Drug Design*. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore : John Wiley & Sons, pp. 163-164.
- Foye W, Lemke TL, William DA, 2002, *Principles of Medicinal Chemistry*, 5th Ed, Lippincott.

- Isaacson EI, 2004, Central Nervous System Depressants. In (Delgado JN, Remers AW, eds). *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 9<sup>th</sup> ed., Philadelphia, Toronto : J.B. Lippincott Company, pp. 363-373.
- Korolkovas A, 2008. *Essentials of Medicinal Chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore : John Wiley & Sons, pp. 590-597, 692-697.
- McMurry JM, 2008. *Organic Chemistry*. Cornell University, 7th Ed., Monterey, California : Thomson Brokes/Cole Publishing Company, pp. 359-407, 916-972.
- Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, 2009. *Introduction to Spectroscopy*, 4th Ed., Departement of Chemistry Western Washington University, Bellingham Washington, Thomson Brookes/Cole, Belmont, USA.
- Reksohadiprodjo MS, 1981. *Transformation of Fusel Oil from Indonesian Alcohol Factories into Products of Higher Value*. Unpublished Doctor Dissertation, Gadjah Mada University, pp. 134, 145-152.
- Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC, 2009. *Spectroscopy of Organic Compounds*, 7<sup>th</sup> ed., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore : John Wiley & Sons Inc., pp. 3-43, 95-174, 181-248, 305-329.
- Siswandono, dan Bambang Soekardjo, 2000. *Kimia Medisinal*, Surabaya : Airlangga University Press.
- Siswandono, 1999, **Modifikasi struktur dan hubungan kuantitatif struktur – aktivitas senyawa baru turunan benzoilurea**, disertasi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya
- Suzana, Budiati T, Ekowati J, (2004), **Sintesis senyawa turunan benzoiltiurea dan uji aktivitas sebagai penekan sistem saraf pusat pada mencit (*Mus musculus*)**, Laporan Penelitian Dosen muda, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Tjiptasurasa, 1991. *Komponen minyak fusel Indonesia, isolasi dan oksidasinya, sintesis dan evaluasi farmakokimia beberapa senyawa turunannya*, Desertasi Doktor, tidak dipublikasikan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Vida JA, 2003. **Central Nervous System Drugs : Sedatives-Hypnotics**. In (Wolff ME, ed). Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery 6<sup>th</sup> ed., Philadelphia, London : Lea & Febiger, pp. 147-156, 163-164.
- Vogels, AI, 1989, **Textbook of Practical Organic Chemistry**, fifth ed, Longman Scientific and technical, New York.pp.
- Vogel, GH, 2008, **Drug Discovery and Evaluation : Pharmacological Assays**, 3rd Ed, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, p.710.