

**Univerzita Karlova**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra farmaceutické technologie**



**Stanovení rozpustnosti malých molekul s potenciální  
radioprotektivní aktivitou**

*Determination of solubility of small molecules with potential  
radioprotective activity*

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Jan Marek, Ph.D.

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 9. května 2025

Jan Petřík

## Poděkování

Rád bych srdečně poděkoval všem, kteří se podíleli na vypracování této diplomové práce.

Za vedení diplomové práce bych rád poděkoval konzultantovi PharmDr. Janu Markovi, Ph.D. z Centra biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové, a svému školiteli PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. Velké poděkování patří RNDr. Natálii Živné za cenné a odborné rady a pomoc při vypracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat vedoucímu Centra biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové, prof. PharmDr. Ondřeji Soukupovi, Ph.D., a jeho kolegům, kteří mi umožnili vypracování diplomové práce na jejich pracovišti.

Poděkování patří i mé rodině a přátelům za neustálou podporu a pomoc nejen při zpracování této práce, ale i během celého studia.

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Jan Marek, Ph.D.

Posluchač: Jan Petřík

Název diplomové práce: Stanovení rozpustnosti malých molekul s potenciální radioprotektivní aktivitou

Rozpustnost léčiv je kritická pro jejich účinnost a biologickou dostupnost. Představuje limitující faktor při základním testování cytotoxicity a dalších biologických testů ve výzkumu a vývoji léčiv. Cílem práce bylo stanovit rozpustnost vybrané série potenciálních radioprotektivních látek ve vodném médiu pomocí spektrofotometrické metody a zhodnotit vliv struktury, konkrétně obměny substituentů, na rozpustnost molekul. Rozpustnost byla porovnávána se základní látkou i v rámci strukturně příbuzných skupin. Dále byl využit webový nástroj SwissADME k *in silico* predikci rozpustnosti měřených látek pro porovnání s výsledky *in vitro*. Všechny měřené látky můžeme z pohledu klasifikace označit za vysoce rozpustné. Stanovené hodnoty rozpustnosti zpravidla neodpovídají předpokladům. Ukazuje se, že substituenty a funkční skupiny mohou mít neočekávaný vliv na rozpustnost pravděpodobně prostřednictvím ovlivnění ionizace, velikosti a tvaru molekuly, energie krystalové mřížky, polarizovatelnosti. V případě *in silico* rozpustnosti odpovídá vliv substituentů na rozpustnost očekáváním, a proto u měřených látek nedochází ke korelaci mezi *in vitro* a *in silico* rozpustností. Práce rovněž poukazuje na limity *in silico* predikce rozpustnosti. Potvrdilo se zvýšení rozpustnosti ve vodě převedením volné baze na hydrochloridovou sůl. Překvapivé poznatky o vlivu substituentů na rozpustnost mohou pomoci při navrhování nových nebo při modifikaci a optimalizaci struktur stávajících malých molekul.

**Klíčová slova:** *in silico*, *in vitro*, lipofilita, rozpustnost, spektrofotometrie, struktura

# Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Consultant: PharmDr. Jan Marek, Ph.D.

Student: Jan Petřík

Title of Thesis: Determination of solubility of small molecules with potential radioprotective activity

The solubility of drugs is critical for their efficacy and bioavailability. It represents a limiting factor in basic cytotoxicity testing and other biological assays in drug research and development. The aim of this thesis was to determine the solubility of a selected series of potential radioprotective compounds in an aqueous medium using a spectrophotometric method and to evaluate the influence of structure, specifically the variation of substituents, on the solubility of the molecules. Solubility was compared with a parent compound as well as within structurally related groups. Furthermore, the SwissADME web tool was used for *in silico* prediction of the solubility of the tested compounds to compare with *in vitro* results. All tested compounds can be classified as highly soluble according to classification criteria. The determined solubility values generally do not correspond to expectations. It appears that substituents and functional groups may have unexpected effects on solubility, likely through their influence on ionization, molecular size and shape, crystal lattice energy, polarity and polarizability. In the case of *in silico* solubility, the effect of substituents on solubility corresponds to expectations, and therefore, no correlation was observed between *in vitro* and *in silico* solubility for the tested compounds. The thesis also highlights the limitations of *in silico* solubility prediction. An increase in water solubility was confirmed upon conversion of the free base to its hydrochloride salt. Surprising findings regarding the influence of substituents on solubility may support the design, modification, and optimization of existing small molecules or in the development of new ones.

**Keywords:** *in silico*, *in vitro*, lipophilicity, solubility, spectrophotometry, structure

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| Seznam zkratek .....  | 8  |
| 1 Úvod.....   | 10 |
| 2 Teoretická část .....   | 12 |
| 2.1 Rozpustnost.....  | 12 |
| 2.2 Faktory ovlivňující rozpustnost .....                       | 18 |
| 2.2.1 Teplota a tlak .....                                      | 18 |
| 2.2.2 pH a $pK_A$ .....   | 19 |
| 2.2.3 Vlastnosti rozpouštěné látky .....                        | 23 |
| 2.2.3.1 Velikost, tvar a povrch částic .....                    | 23 |
| 2.2.3.2 Lipofilita.....   | 24 |
| 2.2.3.3 Teplota tání a krystalická struktura.....               | 30 |
| 2.2.3.4 Substituenty a funkční skupiny .....                    | 34 |
| 2.2.4 Vlastnosti rozpouštědla.....                              | 41 |
| 2.3 Metody měření rozpustnosti .....                            | 42 |
| 2.3.1 Metody měření kinetické rozpustnosti.....                 | 43 |
| 2.3.1.1 Stanovení rozpustnosti pomocí UV spektrofotometrie..... | 44 |
| 2.3.2 Metody měření termodynamické rozpustnosti .....           | 47 |
| 2.3.2.1 Metoda třepací baňky.....                               | 48 |
| 3 Cíl práce.....  | 50 |
| 4 Experimentální část.....                                      | 51 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.1   | Měřené látky .....                                       | 51 |
| 4.2   | Použité instrumentální vybavení.....                     | 51 |
| 4.3   | Pracovní postup.....                                     | 51 |
| 4.3.1 | Stanovení absorpčního maxima .....                       | 51 |
| 4.3.2 | Stanovení kalibrační přímky .....                        | 52 |
| 4.3.3 | Příprava a stanovení koncentrace nasyceného roztoku..... | 53 |
| 4.4   | Vyhodnocení výsledků .....                               | 53 |
| 5     | Výsledky .....   | 57 |
| 6     | Diskuse.....   | 63 |
| 7     | Závěr .....  | 77 |
| 8     | Seznam tabulek .....                                     | 78 |
| 9     | Seznam grafů .....                                       | 79 |
| 10    | Seznam obrázků.....                                      | 80 |
| 11    | Seznam rovnic.....                                       | 81 |
| 12    | Použitá literatura .....                                 | 82 |

## Seznam zkratk

|               |   |
|---------------|---|
| ADMET         | absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece, toxicita   |
| AHV           | akceptor vodíkových vazeb   |
| BAV           | biologická dostupnost (z angl. bioavailability)   |
| BCS           | biofarmaceutický klasifikační systém (z angl. Biopharmaceutical Classification System)                                  |
| BDDCS         | Biofarmaceutický klasifikační systém distribuce léčiv (z angl. Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) |
| CBV FNHK      | Centrum biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové  |
| CLND          | chemiluminiscenční detektor dusíku (z angl. chemiluminescent nitrogen detector)   |
| clog <i>P</i> | kalkulovaný (z angl. calculated) log <i>P</i>   |
| ČL            | Český lékopis   |
| DMSO          | dimethylsulfoxid  |
| DHV           | donor vodíkových vazeb  |
| EMA           | Evropská léková agentura (z angl. European Medicines Agency)  |
| FDA           | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and Drug Administration)   |
| GIT           | gastrointestinální trakt  |
| HEB           | hematoencefalická bariéra   |

|        |   |
|--------|---|
| HPLC   | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High Performance Liquid Chromatography) |
| HTS    | vysokokapacitní screening (z angl. High Throughput Screening)                           |
| IR     | infračervený (z angl. infrared)   |
| MS     | hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)                                    |
| p.o.   | perorální   |
| TPSA   | topologický polární povrch (z angl. Topological Polar Surface Area)                     |
| $t_f$  | teplota tání  |
| UV     | ultrafialové (z angl. ultraviolet)  |
| UV/VIS | ultrafialovo/viditelná (z angl. ultraviolet/visible)                                    |
| WHO    | Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)                     |

# 1 Úvod

Rozpustnost léčiv je kritická pro jejich účinnost a biologickou dostupnost (BAV, bioavailability). Pokud léčivo není dostatečně rozpustné ve vodě nebo jiných tělních tekutinách, může být problém s jeho vstřebáváním do krevního oběhu nebo jeho podáním v případě intravenózní injekce, což může vést k nedostatečné terapeutické odpovědi. Rozpustnost přímo ovlivňuje farmakokinetiku léčiva, tedy jak rychle a efektivně dosáhne požadovaného místa v těle, ale také ovlivňuje jeho účinek v organismu, tedy farmakodynamiku léčiva. Problémy s nízkou rozpustností jsou běžné u mnoha nových molekul léčiv, a proto se při jejich vývoji využívají různé technologie ke zlepšení jejich rozpustnosti, jako je např. nanoenkapsulace a použití povrchově aktivních látek. [1, 2] Rozpustnost hraje klíčovou roli při vývoji a formulaci nových látek, protože bez dostatečné rozpustnosti může být léčivo neúčinné nebo může vyžadovat vyšší dávky a častější podávání, což může zvýšit riziko vedlejších účinků. Zlepšení rozpustnosti může snížit riziko toxicity a zvýšit bezpečnost léčiva. [1]

Na rozpustnost léčiv má vliv struktura sloučeniny, forma sloučeniny zavedená do roztoku a složení a fyzikální vlastnosti roztoku. Vlivem toho se rozpustnost může lišit v závislosti na matrici (např. pufr s pH 7,4, simulovaná střevní tekutina apod.). Faktory ovlivňující rozpustnost ukazují možné způsoby ke zlepšení rozpustnosti a jejich znalost je velmi důležitá při vývoji nových léčivých molekul. [3]

Stanovení rozpustnosti vyžaduje dobře vyvinutou a pečlivě provedenou metodu. Ke stanovení rozpustnosti ve výzkumu a vývoji léčiv se používají jak *in vitro*, tak *in silico* metody. Výběr vhodné metody závisí na konkrétním výzkumném úkolu, jelikož existuje řada metod poskytujících odlišné informace o rozpustnosti s odlišnou rychlostí stanovení. [3] Tato diplomová práce se zaměřuje na stanovení rozpustnosti malých molekul s potenciální radioprotektivní aktivitou vycházejících ze série substituovaných piperazinů syntetizovaných výzkumným týmem Centra biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové (CBV FNHK). K analýze byla použita ultrafialovo/viditelná (UV/VIS, ultraviolet/visible) spektrofotometrie. Jedná se o široce využívanou metodu umožňující kvantifikaci látek na základě jejich absorpčních vlastností v ultrafialové (UV, ultraviolet) a viditelné oblasti spektra. [4] UV/VIS spektrofotometrie je jednoduchá, rychlá, cenově efektivní, ekologická, bezpečná a také

přesná a reprodukovatelná metoda měření rozpustnosti látek ve vodě, jejíž limitací je nutnost přítomnosti chromoforu ve struktuře sloučeniny. [5]

## 2 Teoretická část

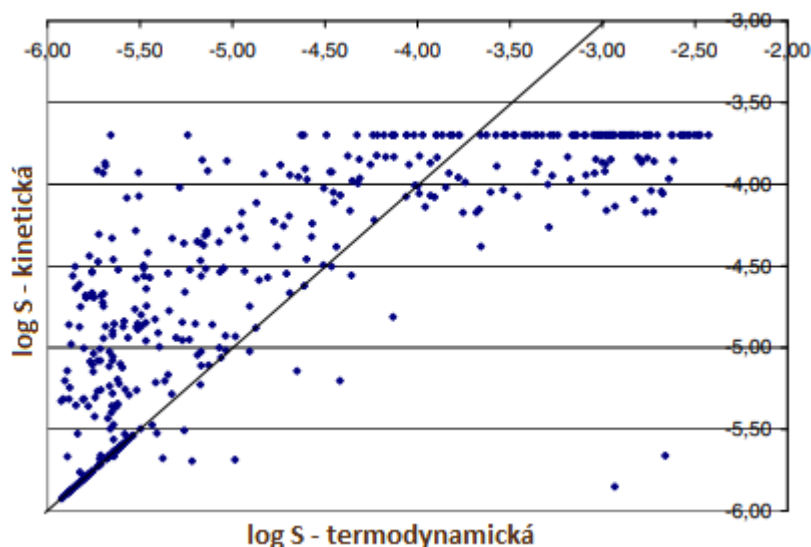
### 2.1 Rozpustnost

Rozpustnost můžeme definovat jako nejvyšší koncentraci, které je sloučenina schopna dosáhnout v čistém rozpouštědle za daných podmínek (zejména teploty a tlaku). Jedná se o koncentraci, ve které je rozpouštědlo v rovnováze s pevnou fází; vzniká tak nasycený roztok. [3, 6, 7] „Kvantitativně definujeme rozpustnost jako koncentraci rozpuštěné látky v nasyceném roztoku při dané teplotě. Kvalitativně ji lze popsat jako spontánní interakci dvou nebo více látek, která vede ke vzniku homogenní molekulární disperze.“ [6] Pokud bychom přidali větší množství látky, než je potřebné k dosažení nasycené koncentrace, tak se přebytečné množství látky už nebude dále rozpouštět, vytvoří sediment a koncentrace roztoku bude konstantní. [7] Rozpustnost se vyjadřuje obdobně jako koncentrace. Můžeme ji vyjádřit jako množství látky rozpuštěné v určitém objemu rozpouštědla konkrétně mg/ml, g/l nebo  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , dále ji lze vyjádřit jako molaritu ( $\text{mol}/\text{l}$ ) nebo molalitu ( $\text{mol}/\text{kg}$ ) nebo hmotnostním zlomkem ( $\text{g}/100\text{g}$ ). [6, 7]

Pro pozorovatele je důležité rozlišovat mezi termodynamickou neboli rovnovážnou a kinetickou rozpustností látek, protože jejich hodnota je odlišná. Zásadním rozdílem mezi termodynamickou a kinetickou rozpustností je způsob, jakou jsou měřeny a v jaké fázi vývoje léčiv se využívají. Kinetická rozpustnost je měřena za podmínek, kdy je sloučenina nejdříve rozpuštěna v organickém rozpouštědle (např. dimethylsulfoxid – DMSO) a až poté přidána do vodného prostředí. U kinetické rozpustnosti je typické, že není dosaženo rovnováhy s přebytkem pevné sloučeniny. [3, 8–10] Kinetická rozpustnost je používána v raném výzkumu léčiv, kde slouží k rychlému odhadu potenciální absorpce sloučeniny, ke stanovení vztahů mezi strukturou a rozpustností a také k diagnostice problémů v biologických testech. [3, 10] Měření kinetické rozpustnosti je výhodné z několika důvodů. Sloučeniny v *in vitro* výzkumu jsou často používány ve formě zásobních roztoků v DMSO, koncentrace DMSO ve finální směsi rozpouštědel je pouze v jednotkách procent. [10] Udržet nízkou koncentraci DMSO je důležité, pokud je cílem stanovit skutečnou rozpustnost ve vodném prostředí, protože DMSO jako kosolvent zvyšuje rozpustnost méně rozpustných látek. [9, 10] Obvykle jsou testy prováděny ve srovnatelném časovém rozmezí, řádově v minutách až hodinách. Metody měření kinetické rozpustnosti vyžadují méně než 1 mg látky, což je výhodné, jelikož v raných

fázích výzkumu máme k dispozici pouze omezené množství syntetizovaných látek. [10] Zároveň můžeme tyto metody automatizovat, což zvyšuje efektivitu a umožňuje rychlé získání velkého množství dat tzv. vysokokapacitní screening (HTS, High Throughput Screening). [9, 10] Koncentrace v testech jsou řádově v mikromolární oblasti. [3] Pokud bychom prováděli testy kinetické rozpustnosti v delším časovém rozmezí, tak jeví tendenci více odpovídat výsledkům testů termodynamické rozpustnosti. [10]

Termodynamická rozpustnost se stanovuje za podmínek, kdy je vodné rozpouštědlo přidáno ke sloučenině ve formě pevné látky. Typicky dochází k ustálení rovnováhy mezi rozpuštěnou látkou a přebytkem pevné látky, a proto je přebytek v původní formě pevné látky vždy přítomen v kontaktu s vodnou fází. Testy jsou prováděny po delší dobu (obvykle 24 – 72 hodin) a za neustálého míchání, aby bylo zajištěno dosažení rovnováhy. [3, 10] V testech jsou používány vyšší koncentrace než u kinetické rozpustnosti, obvykle v mg/ml. Termodynamická rozpustnost je závislá na krystalické formě látky. Využíváme ji v pozdních fázích výzkumu, při vývoji lékových formulací a také slouží k přípravě podkladů k regulačnímu schválení. [3] Zpravidla je kinetická rozpustnost vyšší než termodynamická. [3, 8, 9] Důkazem je studie porovnávací rozpustnost 465 strukturálně různorodých sloučenin. Z Grafu 1 lze vidět, že většina látek má kinetickou rozpustnost stejnou nebo vyšší v porovnání s termodynamickou. U řady látek s nízkou rozpustností (log S, tedy logaritmus rozpustnosti, v oblastech mezi – 5 a – 6,0, tedy s rozpustností řádově  $10^{-5}$  až  $10^{-6}$  mol/l) je dobrá korelace mezi termodynamickou a kinetickou rozpustností. Nicméně u velkého množství sloučenin je kinetická rozpustnost o jeden, dva nebo i více řádů vyšší než termodynamická. Příkladem jsou látky s kinetickou rozpustností  $\log S = -3,7$  a termodynamickou rozpustností  $\log S$  okolo – 5. [9]



*Graf 1: Porovnání kinetické a termodynamické rozpustnosti souboru 465 strukturálně různorodých sloučenin. Rozpustnost je vyjádřena v mol/l na logaritmické stupnici.  $\log S - \text{kinetická} = -3,7$  představuje horní hranici detekčního rozsahu testu kinetické rozpustnosti. Proto sloučeniny, u kterých je kinetická rozpustnost uvedena jako  $\log S = -3,7$ , mohou vykazovat i vyšší kinetickou rozpustnost. Převzato a upraveno z [9].*

Kinetická rozpustnost obvykle převyšuje termodynamickou z několika důvodů. Při testech kinetické rozpustnosti jsou sloučeniny nejdříve rozpuštěny v roztoku DMSO, a proto není potřeba překonávat energii krystalové mřížky k rozpuštění. Přídavek DMSO ve vodném roztoku zvyšuje rozpustnost. [3] Testy kinetické rozpustnosti probíhají poměrně rychle a není čas na vytvoření nejstabilnějších polymorfních krystalů s nízkou rozpustností. [3, 8, 9] Rozdíl v rozpustnosti je závislý i na krystalické formě látky. [8, 9] U většiny sloučenin, u kterých byl zbytek pevné fáze po testech termodynamické rozpustnosti určen jako amorfní, se kinetická i termodynamická rozpustnost vztahují k amorfní formě. Naopak u sloučenin, kde byl zbytek pevné fáze charakterizován jako krystalický, odpovídá termodynamická rozpustnost krystalické formě, ale kinetická rozpustnost odpovídá formě amorfní, což objasňuje výraznější rozdíly v hodnotách rozpustnosti změřených oběma metodami. [9] Využití testů kinetické nebo termodynamické rozpustnosti závisí na účelu využití výsledných hodnot. Kinetickou rozpustnost využíváme v raných fázích výzkumu. Naopak termodynamická rozpustnost je zásadní při vývoji léčiv a představuje zlatý standard k optimalizaci sloučenin z pohledu rozpustnosti. [3, 8, 10]

Evropský lékopis, tedy i Český lékopis (ČL), rozděluje látky do sedmi tříd na základě objemu rozpouštědla v mililitrech, který je potřebný pro rozpuštění jednoho gramu látky při teplotě 15 °C až 25 °C (Tabulka 1). ČL dále definuje pojmy „částečně rozpustný“, kdy se rozpustí pouze některé ze složek směsi, a „mísitelný“. Pojem „mísitelný“ označuje kapaliny, které lze mísit v každém poměru s daným rozpouštědlem. [11]

*Tabulka 1: Třídy rozpustnosti dle ČL 2023 (kapitola 5.11, strana 1665). Převzato a upraveno z [11].*

| Popisný výraz          | Přibližný objem rozpouštědla v mililitrech na gram látky |
|------------------------|--|
| velmi snadno rozpustný | méně než 1   |
| snadno rozpustný       | 1 až 10  |
| dobře rozpustný        | 10 až 30   |
| mírně rozpustný        | 30 až 100  |
| těžce rozpustný        | 100 až 1000  |
| velmi těžce rozpustný  | 1000 až 10 000   |
| prakticky nerozpustný  | více než 10 000  |

Lékopisné rozdělení rozpustnosti je vhodné z fyzikálně-chemického hlediska, nicméně z farmakologického hlediska lze toto rozdělení použít pouze omezeně, protože nebere v potaz terapeutickou dávku. V reakci na tuto skutečnost byl vyvinut **Biofarmaceutický klasifikační systém** (BCS, Biopharmaceutical Classification System), protože samotná rozpustnost není dostačujícím parametrem k určení BAV léčiv. [12]

Výše zmíněný systém rozděluje léčiva do čtyř tříd na základě rozpustnosti ve vodě a intestinální permeability (Tabulka 2). [13] Léčivo je považováno za vysoce rozpustné, pokud se jeho nejvyšší terapeutická dávka rozpustí v 250 ml a méně vodného média v rozmezí pH 1 – 6,8 (dle některých zdrojů 1 – 7,5) při teplotě  $37 \pm 1$  °C. Jako vysoce permeabilní látky chápeme léčiva, u kterých dojde k absorpci 85 % nebo více z podané

dávky (dle některých zdrojů 90 % a více). [14–16] U p.o. (perorálně) podávaných léčiv je pro nás důležitá i disoluce. Jedná se o proces, při kterém přechází pevná fáze do fáze roztoku. Během disoluce se uvolňují molekuly léčiva z pevné fáze a vstupují do fáze roztoku. [6] Dalším hodnoceným parametrem je rychlost rozpouštění. Léčivo považujeme za rychle se rozpouštějící, pokud se uvolní 85 % a více do 30 minut. Pokud dojde k uvolnění 85 % a více do 15 minut, tak označujeme léčivo jako velmi rychle se rozpouštějící. [14]

Tabulka 2: Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS). Převzato a upraveno z [13].

| Třída | Rozpustnost | Permeabilita |
|-------|-------------|--------------|
| I     | vysoká      | vysoká       |
| II    | nízká       | vysoká       |
| III   | vysoká      | nízká        |
| IV    | nízká       | nízká        |

BCS je využíván zejména pro regulační účely, ale i v preklinických a klinických studiích. [16–18] Při vývoji léčiv využíváme BCS k optimalizaci farmakokinetiky, na kterou má významný vliv rozpustnost a permeabilita. Důraz je kladen na absorpci ve střevě po p.o. podání, čímž dochází i ke zvýšení BAV. Existuje i řada dalších faktorů, které ovlivňují absorpci léčiv, jako jsou transportní mechanismy, vlastnosti a funkce biologických membrán a další fyziologické faktory, a jejich pochopení nám umožňuje vytvářet predikční modely a zlepšit dodávku léčiv do organismu. Cílem využití BCS ve vývoji léčiv je snížit počet nových chemických entit, jejichž vývoj selže v pozdních preklinických a klinických fázích. [18, 19]

V rámci regulačních procesů je BCS využíván ke schvalování léčiv, kde umožňuje regulačním autoritám u určitých tříd léčiv používat *in vitro* disoluční testy namísto *in vivo* bioekvivalenčních studií tzv. biowaiver. [19] Výjimka zahrnuje p.o. pevné lékové formy s okamžitým uvolňováním. [20] Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration), Světová zdravotnická organizace (WHO, World

Health Organization) a Evropská léková agentura (EMA, European Medicines Agency) umožňují zjednodušené schválení na základě BCS léčivům z třídy I (vysoká rozpustnost, vysoká permeabilita) s rychlým rozpouštěním. EMA a WHO rozšířily výjimku na léčiva z třídy III (vysoká rozpustnost, nízká permeabilita), pokud jsou velmi rychle se rozpouštějící. [19–21] WHO má navíc rozšířenou výjimku i na některá slabě kyselá léčiva třídy II (nízká rozpustnost, vysoká permeabilita), protože jejich rozpustnost je ovlivněna hodnotou pH v tenkém střevě. [16, 19, 21]

Problémem je, že řada léčiv používaných v současné farmakoterapii spadá do třídy BCS II (nízká rozpustnost, vysoká permeabilita) nebo IV (nízká rozpustnost, nízká permeabilita). Léčiva z těchto tříd jsou prakticky nerozpustná ve vodném prostředí gastrointestinálního traktu (GIT). Následkem je zhoršená systémová absorpce účinné látky po p.o. podání, a tím snižovaná BAV. [22] V reakci na tuto skutečnost vznikla řada chemických, fyzikálních a technologických modifikací ke zlepšení rozpustnosti léčiv. [12, 19, 22] BCS je široce využívaný systém ke klasifikaci léčiv, nicméně později vznikl i další systém, který zohledňuje hlavní cestu eliminace léčiv namísto permeability. Systém se nazývá **Biofarmaceutický klasifikační systém distribuce léčiv** (BDDCS, Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) a rozděluje léčiva do čtyř tříd na základě rozpustnosti ve vodě a úrovně metabolismu (Tabulka 3). Studie ustanovující BDDCS zjistila, že léčiva tříd BCS I a II jsou vysoce metabolizována. Naopak léčiva tříd BCS III a IV jsou primárně vylučována v nezměněné podobě renální nebo biliární eliminací. BDDCS by mělo snižovat regulační zátěž pro sloučeniny třídy I a předvídat absorpční a distribuční charakteristiky léčiv všech čtyř tříd. [23]

Tabulka 3: Biofarmaceutický klasifikační systém distribuce léčiv (BDDCS) + převládající způsoby eliminace a efekt transportérů. Převzato a upraveno z [23].

| Třída | Rozpustnost | Metabolismus | Převládající způsoby eliminace | Efekt transportérů |
|-------|-------------|--------------|--------------------------------|--------------------|
| I     | vysoká      | rozsáhlý     | metabolismus                   | minimální          |
| II    | nízká       | rozsáhlý     | metabolismus                   | eflux              |
| III   | vysoká      | špatný       | ren./bil. eliminace*           | absorpce           |
| IV    | nízká       | špatný       | ren/bil. eliminace*            | absorpce + eflux   |

\*renální nebo biliární eliminace

## 2.2 Faktory ovlivňující rozpustnost

Existuje řada faktorů ovlivňujících rozpustnost. Mezi tyto faktory řadíme tlak, teplotu, pH, vlastnosti rozpouštěné látky, vlastnosti rozpouštědla, další složky roztoku (kosolventy, elektrolyty atd.) a metody měření rozpustnosti. [3]

### 2.2.1 Teplota a tlak

Teplota hraje klíčovou roli v ovlivňování rozpustnosti léčiv. Obecně platí, že s rostoucí teplotou se rozpustnost většiny pevných látek zvyšuje, protože dochází k absorpci tepla. Teplo dodává energii molekulám rozpouštědla a způsobuje tak rychlejší a účinnější rozpouštění. Přesto existují látky, u kterých dochází k opačnému jevu, tedy při vyšších teplotách se rozpustnost sníží. [24, 25]

V závislosti na termodynamice rozpouštění rozlišujeme endotermní a exotermní rozpouštění. Při endotermním rozpouštění, kdy dochází k pohlcení tepla při rozpouštění a reakční teplo  $\Delta H$  je pozitivní, se rozpustnost s rostoucí teplotou zvyšuje, např. dusičnan draselný ve vodě. Naopak při exotermním rozpouštění, kdy dochází k uvolnění tepla při rozpouštění a  $\Delta H$  je negativní, se rozpustnost s rostoucí teplotou snižuje, např. octan vápenatý ve vodě. [24, 25] Zvyšování rozpustnosti s rostoucí teplotou dokazuje studie na

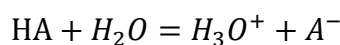
čtyřech léčivech testovaných ve vodě a pěti dalších organických rozpouštědlech. Z výsledků je patrné zvýšení rozpustnosti léčiv zvýšením teploty rozpouštědla z 24,85 °C na 36,85 °C a následně až na 39,85 °C. [26]

Tlak ovlivňuje rozpustnost léčiv v případech, kdy se jedná o plyny. U pevných a kapalných látek je vliv tlaku na rozpustnost zanedbatelný, protože jejich objemové změny při rozpouštění jsou malé. Nicméně u plynů zvýšení tlaku zvyšuje rozpustnost. Podle Henryho zákona je rozpustnost plynu v kapalině za dané teploty přímo úměrná tlaku plynu nad kapalinou. [24, 27]

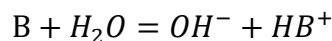
## 2.2.2 pH a pK<sub>A</sub>

Rozpustnost léčiv je závislá na pH prostředí (rozpouštědla) a disociační konstantě léčiv (pro kyseliny K<sub>A</sub> a pro zásady K<sub>B</sub>). Disociační konstanta je obvykle vyjádřena jako hodnota pK (pK<sub>A</sub>, případně pK<sub>B</sub>), která se vypočte jako záporný dekadický logaritmus disociační konstanty za dané teploty (obvykle 25 °C). [25] Hodnota pK<sub>A</sub> je pH, při kterém jsou koncentrace neionizované a ionizované formy monoprotického léčiva v roztoku stejné, tedy 50 % je ionizováno a 50 % neionizováno. [28]

V současnosti je většina léčiv slabými elektrolyty obsahujícími kyselou nebo zásaditou funkční skupinu. Rozpustnost slabých kyselin a zásad je silně závislá na pH vodného rozpouštědla. Při změně pH dochází k ovlivnění míry ionizace a poměru ionizované a neionizované formy léčiva v roztoku. Obecně platí, že ionizovaná forma léčiva má vyšší rozpustnost ve vodě než forma neionizovaná. [3, 24, 25, 29] Léčiva mají nejnižší rozpustnost v neionizované formě, která se označuje jako „intrinsic solubility“ S<sub>0</sub> (vnitřní rozpustnost). [3, 29] Celková rozpustnost léčiva při určitém pH je součtem vnitřní rozpustnosti neutrální části molekuly v roztoku a rozpustnosti nabitě části molekuly v roztoku. Tuto skutečnost můžeme matematicky vyjádřit a stanovit rovnici pro výpočet rozpustnosti léčiva S (Rovnice 6 a Rovnice 7) při určitém pH za podmínky, že známe hodnoty S<sub>0</sub> a pK<sub>A</sub>. Ionizace léčiv ve vodě probíhá dle následujících reakcí (viz Rovnice 1 a Rovnice 2):



*Rovnice 1: Reakce kyseliny a vody za vzniku anionu kyseliny a oxoniového kationu*



*Rovnice 2: Reakce zásady a vody za vzniku kationu zásady a hydroxidového anionu*

V rovnovážném stavu můžeme popsat rozpustnost  $S$  jednomocných kyselin (Rovnice 3) a zásad (Rovnice 4) následovně:

$$S = [HA] + [A^-]$$

*Rovnice 3: Rozpustnost jednomocných kyselin v rovnovážném stavu*

$$S = [B] + [HB^+]$$

*Rovnice 4: Rozpustnost jednomocných zásad v rovnovážném stavu*

Poté matematicky upravíme Henderson-Hasselbalchovu rovnici (Rovnice 5) a získáme rovnice pro výpočet rozpustnosti kyselin (Rovnice 6) nebo zásad (Rovnice 7) na základě znalosti vnitřní rozpustnosti  $S_0$  a  $pK_A$  látky a  $pH$  prostředí.

$$pH = pK_A + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

*Rovnice 5: Henderson-Hasselbalchova rovnice*

$$S = S_0(1 + 10^{pH-pK_A})$$

*Rovnice 6: Výpočet rozpustnosti kyselin na základě znalosti  $S_0$ ,  $pH$  a  $pK_A$*

$$S = S_0(1 + 10^{pK_A-pH})$$

*Rovnice 7: Výpočet rozpustnosti zásad na základě znalosti  $S_0$ ,  $pH$  a  $pK_A$*

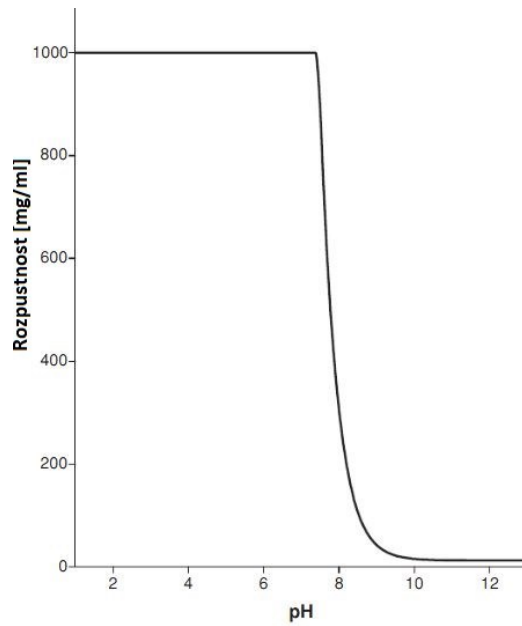
Z rovnice vyplývá, že rozpustnost se mění lineárně s  $S_0$  a exponenciálně v závislosti na rozdílu mezi  $pH$  a  $pK_A$ . [3, 29] Příklad vlivu vnitřní rozpustnosti a  $pK_A$  kyselin na celkovou rozpustnost je uveden v Tabulce 4. Pokud se podíváme na barbital a amobarbital, tak vidíme, že mají stejné  $pK_A$ , ale odlišnou vnitřní rozpustnost. Proto má barbital celkovou rozpustnost při  $pH$  9 vyšší oproti amobarbitalu. Naopak naproxen a fenytoin mají velmi podobnou vnitřní rozpustnost, ale odlišné hodnoty  $pK_A$ . Vlivem tohoto rozdílu má naproxen mnohonásobně vyšší rozpustnost při  $pH$  9 oproti fenytoinu,

jelikož s rozdílem mezi pH a  $pK_A$ , který je při pH 9 větší u naproxenu, roste rozpustnost exponenciálně. [3, 30]

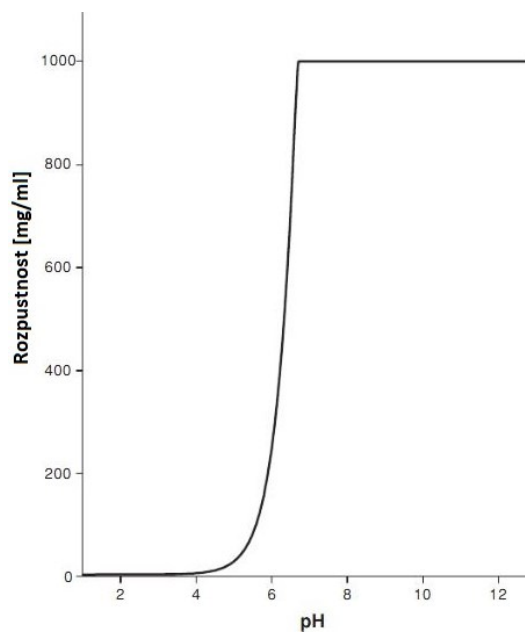
*Tabulka 4: Příklady závislosti mezi vnitřní rozpustností, pH a  $pK_A$ . Převzato a upraveno z [3].*

| <b>Léčivo</b> | <b><math>pK_A</math></b> | <b>Vnitřní rozpustnost<br/>[mg/ml]</b> | <b>Rozpustnost při pH 9<br/>[mg/ml]</b> |
|---------------|--------------------------|--|---|
| barbital      | 7,9                      | 7,0                                    | 95                                      |
| amobarbital   | 7,9                      | 1,2                                    | 15                                      |
| naproxen      | 4,6                      | 0,016                                  | 430                                     |
| fenytoin      | 8,3                      | 0,02                                   | 0,12                                    |

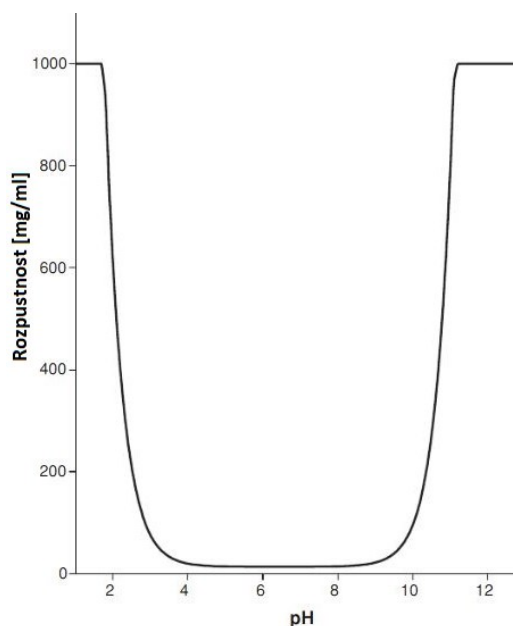
Rozpustnost slabých zásad se zvyšuje s poklesem pH pod hodnotu  $pK_A$  (viz Graf 2), naopak u slabých kyselin se rozpustnost zvyšuje se zvýšením pH nad hodnotu  $pK_A$  (viz Graf 3). [25, 28, 29] Nicméně v případě léčiv obsahujících více než jednu ionizovatelnou funkční skupinu bývá závislost rozpustnosti ve vodě na pH komplikovanější (viz Graf 4). [25] Dle studie rozpustnosti pH-dependentních léčiv ve vodě, konkrétně flufenamová kyselina, mefenamová kyselina, niflumová kyselina, sodná sůl diklofenaku, sodná sůl kyseliny meklofenamové, bylo dokázáno, že rozpustnost se zvyšuje s rostoucím pH a teplotou. [28]



*Graf 2: Vypočtená závislost rozpustnosti benzylaminu ve vodě na pH, vytvořená pomocí programu PhysChem 7.0. Převzato a upraveno z [25].*



*Graf 3: Vypočtená závislost rozpustnosti benzoové kyseliny ve vodě na pH, vytvořená pomocí programu PhysChem 7.0. Převzato a upraveno z [25].*



Graf 4: Vypočtená závislost rozpustnosti 4-(aminomethyl)benzoové kyseliny ve vodě na pH, vytvořená pomocí programu PhysChem 7.0. Převzato a upraveno z [25].

Důležité je, že i malé změny v pH mohou způsobit změny v koncentracích ionizovaných a neionizovaných forem v roztoku a významně ovlivnit rozpustnost léčiv. [29] V různých fyziologických tekutinách jsou odlišné hodnoty pH, a proto je pH důležitým faktorem ovlivňujícím rozpustnost léčiv zejména při podání do GIT. [3, 25] Ovlivnění pH pomocí pufrů a pufrovacích látek se používá pro stabilizaci farmaceutických látek i pro zvýšení rozpustnosti špatně rozpustných léčiv. [3, 31]

### 2.2.3 Vlastnosti rozpouštěné látky

Vlastnosti rozpouštěné látky jsou důležitými faktory ovlivňujícími rozpustnost. Patří mezi ně velikost, tvar a povrch částic léčiva, lipofilita (obvykle vyjádřena jako  $\log P$ ), molární hmotnost  $M$  a molekulová hmotnost  $M_r$ , teplota tání, krystalická struktura (amorfní/polymorfní), přítomnost substituentů a funkčních skupin, polarita a  $pK_A$ , které bylo řešeno v Podkapitole 2.2.2. [3, 6, 24, 32, 33]

#### 2.2.3.1 Velikost, tvar a povrch částic

Obecně platí, že čím menší jsou částice, tím vyšší je jejich rozpustnost. Snížení jejich velikosti vede ke zvětšení celkového i specifického povrchu látky. Větší specifický povrch zlepšuje kontakt mezi rozpouštěnou látkou a rozpouštědlem, což podporuje

rozpustnost a zároveň urychluje proces rozpouštění. Existuje řada metod, které slouží ke zmenšení velikosti částic za účelem zvýšení BAV. [6, 24, 32, 33] Nicméně při dosažení určité velikosti částic bude způsobovat další zmenšování velikosti snížení rozpustnosti, protože mezi menšími částicemi vzniká více interpartikulárních vazeb a zvyšují se interakce mezi jednotlivými částicemi, což může vést k agregaci částic. [24]

Rozpustnost ovlivňuje i tvar částic, který je určen konfigurací molekuly a typem uspořádání krystalu. Molekuly mohou být symetrické a asymetrické, kdy rozpustnost mají obvykle vyšší asymetrické molekuly. Symetrické molekuly jsou více kompaktní a mají vyšší energii krystalové mřížky, proto vyžadují více energie k rozpuštění látky v rozpouštědle a důsledkem je nižší rozpustnost. [6, 24] Příkladem je porovnání rozpustnosti  $\alpha$ -alaninu a  $\alpha$ -aminomáselné kyseliny. Aminokyselina  $\alpha$ -alanin vytváří kompaktní krystal s vysokou energií krystalové mřížky a důsledkem je nízká rozpustnost. Naproti tomu molekuly  $\alpha$ -aminomáselné kyseliny se do krystalu formují méně efektivně, jelikož kyselina má uhlovodíkový postranní řetězec o jeden uhlík delší a nižší energii krystalové mřížky než  $\alpha$ -alanin. Důsledkem je vyšší rozpustnost  $\alpha$ -aminomáselné kyseliny (1,80 mol/l) v porovnání s  $\alpha$ -alaninem (1,66 mol/l) ve vodě při 25 °C. [6]

### 2.2.3.2 Lipofilita

Lipofilita je významným faktorem ovlivňujícím absorpci, distribuci, metabolismus, exkreci a toxicitu (ADMET) a je klíčová pro farmakologickou účinnost léčiv. Výhodou je možnost rychle lipofilitu změřit nebo vypočítat. Má vliv na řadu vlastností ovlivňujících absorpci léčiva jako je rozpustnost a permeabilita. [3, 34]

Lipofilita je vlastnost sloučeniny, která představuje schopnost látky začlenit se do nepolární lipidové matrice. [3] Základními parametry vyjadřujícími lipofilitu molekuly, tedy rozdělení sloučeniny mezi vzájemně nemísitelnou lipofilní a hydrofilní fázi, jsou  $\log P$ , kalkulované  $\log P$  ( $\text{clog}P$ ,  $\text{calculated log}P$ ) a  $\log D$ . Jako nepolární fáze je obvykle používán oktanol a jako polární fáze voda nebo vodný pufr. [3, 6, 35] Hodnota  $\log P$  je logaritmus rozdělovacího koeficientu organické fáze (např.  $n$ -oktanol) a vodné fáze při pH, ve kterém jsou všechny molekuly látky v neutrální formě. Naproti tomu hodnota  $\log D$  je logaritmus rozdělovacího koeficientu organické fáze a vodné fáze při specifickém pH, kdy je přítomna neionizovaná i ionizovaná forma léčiva. [3, 35] Předchozí parametry lze vypočítat pomocí jednoduchých rovnic (Rovnice 10 a Rovnice 11), které vycházejí

z rozdělovacího koeficientu (Rovnice 8 a Rovnice 9), který je vyjádřen jako podíl koncentrace látky v organické fázi a koncentrace látky ve fázi vodné. [3, 36]

$$P_{o/w} = \frac{[\text{látka}]_o}{[\text{substance}]_w}$$

*Rovnice 8: Výpočet rozdělovacího koeficientu pro logP, získáno z [3, 36].*

$$D_{o/w} = \frac{[\text{substance}]_o^{\text{ion.}} + [\text{substance}]_o^{\text{neion.}}}{[\text{substance}]_w^{\text{ion.}} + [\text{substance}]_w^{\text{neion.}}}$$

*Rovnice 9: Výpočet rozdělovacího koeficientu pro logD, získáno z [3, 36].*

$$\log P = \log \frac{[\text{substance}]_o}{[\text{substance}]_w}$$

*Rovnice 10: Výpočet logP, získáno z [3, 36].*

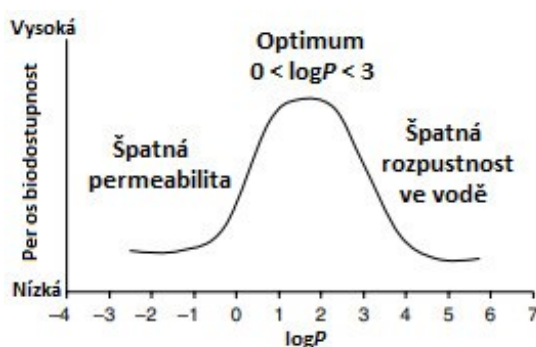
$$\log D = \log \frac{[\text{substance}]_o^{\text{ion.}} + [\text{substance}]_o^{\text{neion.}}}{[\text{substance}]_w^{\text{ion.}} + [\text{substance}]_w^{\text{neion.}}}$$

*Rovnice 11: Výpočet logD, získáno z [3, 36].*

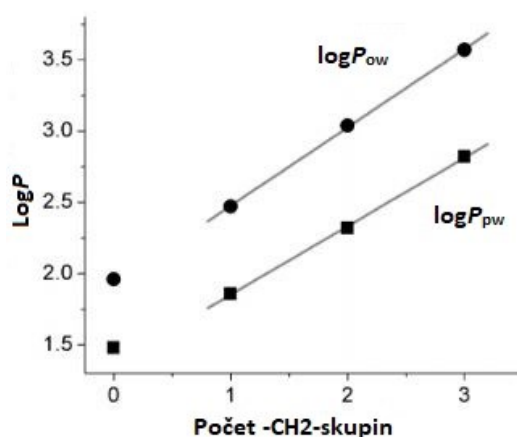
Rozdílem mezi logP a clogP je způsob získání výsledných hodnot, kdy clogP je vypočtené logP pomocí specifických softwarů jako je např. program ChemDraw. [35, 37] Naopak hodnota logP se získává experimentálně např. metodou třepací lahve nebo pomocí kapalinové chromatografie. [38] Výhodou clogP je rychlejší způsob získání odhadované lipofility molekuly v raných fázích vývoje léčiv. [34, 35] Problémem clogP je, že i u neutrálních sloučenin bývají jeho hodnoty získané různými programy odlišné. [39] Výsledná hodnota clogP je zjednodušená, protože nezohledňuje chiralitu, tedy 3D informace o struktuře molekuly. [40] Kvůli tomu bývají hodnoty často nepřesné a mohou vznikat falešně pozitivní výsledky, které mohou způsobit, že nadějně sloučeniny jsou zavrhnuty a nevhodné sloučeniny dále pokračují ve výzkumu. Nicméně oba parametry, logP i clogP, jsou užitečné ve vývoji léčiv. [35, 37]

Nejdůležitější je pro nás správná interpretace hodnot logP. Ideální hodnota logP je větší než 0 (obvykle okolo 1) a zároveň menší než 3, případně 5 (viz Graf 5). Obecně platí, že se zvyšující se hodnotou logP klesá rozpustnost látky ve vodě a se snižující se hodnotou logP se zhoršuje prostupnost látek skrze biologické membrány. Kromě špatné

rozpuštěnosti ve vodě, a s tím související nízké absorpce, mohou vysoké hodnoty  $\log P$ , tedy vysoká lipofilita, způsobovat nežádoucí účinky léčiv, metabolické zatížení, rychlý metabolický rozklad, vysokou vazbu na plazmatické bílkoviny a akumulaci ve tkáních. Na druhou stranu musíme zohlednit důležitost vyšší lipofility u léčiv, která působí intracelulárně nebo mají cíl působit v centrálním nervovém systému, a tedy musejí efektivně prostoupit skrze lipidové membrány a biologické bariéry. [3, 6, 35, 41] Závislost  $\log P$  na lipofilitě molekuly, konkrétně na počtu methylenových skupin, vyjadřuje Graf 6, kde můžeme vidět lineární korelaci mezi  $\log P$  a počtem methylenových skupin v alkyl 4-hydroxybenzoátu. [42]



Graf 5: Hypotetický příklad, jak dokáže  $\log P$  ovlivnit p.o. BAV u série sloučenin. Absorpce pasivní difúzí po p.o. podání je považována za optimální pro sloučeniny s mírným  $\log P$  a klesá u sloučenin s vyššími nebo nižšími hodnotami  $\log P$ . Přečteno a upraveno z [3].



Graf 6: Lineární korelace mezi hodnotami  $\log P$  a počtem methylenových skupin v alkyl 4-hydroxybenzoátu. Přečteno a upraveno z [42].

Interpretace hodnoty  $\log D$  je podobná jako u  $\log P$ , ale je třeba zohlednit, že závisí na pH vodného prostředí,  $pK_A$  látky a tom, zda je sloučenina kyselina nebo zásada. Na zmíněných proměnných závisí poměr ionizované a neionizované formy léčiva. [3, 43] Pokud je známa hodnota  $\log P$  a  $pK_A$ , tak lze vypočítat  $\log D$  při daném pH (např. 7,4) bazických léčiv pomocí Rovnice 12. [43]

$$\log D_{7,4} = \log P + \log(1 + 10^{pK_A - 7,4})$$

*Rovnice 12: Výpočet  $\log D$  bazických léčiv při pH 7,4, získáno z [43].*

Platí, že ionty mají vyšší afinitu k polární vodné fázi nežli neionizované molekuly. V případě léčiv s bazickou skupinou se hodnota  $\log D$  bude zvyšovat s rostoucím pH pufru, protože se mění poměr neutrální molekuly B a kationu  $BH^+$ . [3, 42] Naopak u kyselin se hodnota  $\log D$  bude zvyšovat se snižujícím se pH pufru. [3]

Vliv  $\log P$  na rozpustnost ve vodě a intestinální permeabilitu je součástí **Lipinského pravidla tzv. pravidla pěti**. Pravidlo pěti zahrnuje kromě  $\log P$  ( $c\log P$ ) také molekulovou hmotnost, počet donorů vodíkových vazeb (DHV, vyjádřen jako součet OH- a  $NH_x$ -skupin) a počet akceptorů vodíkových vazeb (AHV, vyjádřen jako součet atomů dusíku a kyslíku). Sloučeniny, které jsou substráty biologických transportérů (aktivní transportéry a metabolické procesy ve střevní stěně ovlivňující BAV), jsou výjimkou z pravidla. Pravidlo pěti se skládá ze čtyř parametrů, jejichž hodnota je pět nebo je násobkem pěti. Pokud jsou splněny dva parametry z následujících, tak má léčivo vyšší riziko špatné absorpce, tedy horší rozpustnosti a permeability po p.o. podání [44]:

- Počet DHV > 5
- Počet AHV > 10
- Molekulová hmotnost > 500
- $\log P > 5$

Parametry pravidla jsou založeny na podloženém fyzikálně-chemickém základu. Molekulová hmotnost souvisí s velikostí molekuly. S rostoucí velikostí molekuly roste i molekulová hmotnost a rozpustnost se snižuje, protože je potřeba, aby ve vodě (rozpuštědla) vznikla větší dutina, která zajistí rozpuštění látky. Zvýšení molekulové hmotnosti snižuje permeabilitu skrze intestinální a hematoencefalickou bariéru (HEB),

jelikož větší molekuly neprocházejí těsně spojenými buňkami bariér tak snadno jako molekuly menší. Vlivem vyšší velikosti molekuly je snížena i pasivní difúze skrze buněčnou membránu. Obecně lze říci, že léčiva s vyšší molekulovou hmotností mají tendence být méně aktivní po p.o. podání nežli léčiva s nižší molekulovou hmotností. [3, 44]

Vliv DHV a AHV je spojen s tvorbou vodíkových vazeb mezi donorem a akceptorem. Donor i akceptor jsou vysoce elektronegativní prvky. Jedná se zejména o kyslík a dusík, případně i fluor. Donor je molekula obsahující atom vodíku s částečným kladným nábojem vzniklým vlivem polarizace vazby. Naopak akceptor obsahuje volný elektronový pár a díky němu má částečný negativní náboj. Mezi částečně pozitivním nábojem atomu vodíku a částečně negativním nábojem atomu elektronegativního prvku se vytvoří vodíková vazba. Tvorba vodíkových vazeb zvyšuje rozpustnost látek ve vodě, čímž se snižuje schopnost léčiva projít skrze lipidovou dvojvrstvou membránu, protože se vodíkové vazby nejprve musí přerušit. Vlivem příliš vysokého počtu DHV nebo AHV dochází ke zhoršení intestinální absorpce. [3, 27, 44, 45] Vyšší počet DHV a AHV také významně snižuje přestup skrz HEB. [45] Problémem AHV je, že jejich vyjádření jako součet atomů dusíku a kyslíku je pouze hrubým měřítkem schopnosti přijímat vodíkové vazby. Schopnost přijímat vodíkové vazby se liší mezi jednotlivými atomy v závislosti na struktuře molekuly. Příkladem je rozdíl mezi pyrrolem a pyridinem, kdy se dusíky v obou látkách pomocí jednoduché součtu atomů dusíku a kyslíku považují za shodné akceptory. Nicméně dusík v pyridinu je dobrým akceptorem a naopak dusík v pyrrolu je akceptorem mnohem horším. [44] Rozdíl spočívá v tom, že volný elektronový pár na dusíku v pyrrolu se podílí na aromaticitě heterocyklu, zatímco v pyridinu zůstává mimo aromaticitu cyklu. [46] V kontrastu s AHV jsou DHV. U donorů je dobrá korelace mezi součtem  $\text{NH}_x$  a OH skupin a schopností tvořit vodíkové vazby. [44]

Pravidlo pěti stanovil Ch. A. Lipinski ve studii publikované roku 1997, která zahrnovala několik tisíc léčiv. Studovaná léčiva prošla první fází klinických studií a postoupila do druhé fáze, což bylo předpokladem pro dostatečnou absorpci, a tedy adekvátní fyzikálně-chemické vlastnosti. Lipinski a kolektiv předpokládali, že špatně rozpustná a permeabilní léčiva byla vyřazena v první fázi klinických studií. U studovaných léčiv byly vypočteny právě čtyři výše zmíněné parametry, které jsou spojovány s rozpustností a permeabilitou a na základě výsledků a pozorování se

ustanovilo pravidlo. Nicméně ne všechny p.o. podávaná léčiva splňují pravidlo pěti. Jedná se o malé množství terapeutických skupin, jako jsou antibiotika, antimykotika, vitamíny a kardioglykosidy, protože obsahují strukturální prvky umožňující biologický transport. [44] Biologické transportéry mohou buď zvyšovat, nebo snižovat absorpci látek pomocí aktivního transportu nebo efluxem. [3]

Studie z roku 2000 ukazuje tendenci vyvíjet léčiva s parametry nevyhovujícími pravidlu pěti např. léčiva s vyšší molekulovou hmotností a  $\log P$ . Jedná se o léčiva s horší rozpustností ve vodě a intestinální permeabilitou, ale s cílem zajistit vyšší účinnost na složitější biologické cíle. [47] Tento trend podporuje i závěr ze setkání vědců z roku 2016. Řada nových léčiv má špatnou rozpustnost ve vodě, často v důsledku vysoké lipofility ( $\log P > 5$ ), jelikož vyšší lipofilita je spojována s farmakologickou aktivitou. Jako příklad uvedl doktor Lipinski protinádorové léčivo navitoclax, které porušuje tři parametry z pravidla pěti (molekulová hmotnost 975,  $\log P$  přibližně 10, 11 AHV). I přesto se podařilo vědcům navitoclax úspěšně formulovat do účinné p.o. lékové formy a postoupil do druhé fáze klinických studií. [41] Neočekávaná p.o. aktivita navitoclaxu je z velké části způsobena lymfatickou absorpcí. [48] Od září 2020 je navitoclax ve třetí fázi klinických studií. [49] Na setkání vědců bylo uvedeno doktorem Porterem, že léčiva s vyšší lipofilitou a špatnou rozpustností ve vodě lze formulovat do lipidických formulací umožňující samotný vývoj léčiva a zároveň i zvýšení BAV po p.o. podání. Následně zmínil myšlenku, že by mohlo být vhodné zkoumat i přínosy lipofilnějších látek, které by bylo možné zakomponovat do lipidických formulací. Jedním z hlavních problémů přípravy lipidických formulací je nemožnost v nich rozpustit dostatečnou dávku léčiva kvůli nedostatečné lipofilitě. Na druhou stranu je nutné mít na paměti, že se zvyšující se lipofilitou se zvyšuje i riziko toxicity. Proto je podle Portera ideálním řešením dočasné zvýšení lipofility pomocí lipofilních komplexů, lipofilních solí nebo lipofilních proléčiv. Jedná se o technologie, které zvýší možnost použít lipidické formulace jako systém pro dodání léčiv, ale s nižším rizikem zvýšené toxicity. [41]

Pravidlo pěti je široce využívanou mnemotechnickou pomůckou k určení, zda látka pravděpodobně bude mít vhodnou farmakokinetiku pro p.o. podávání, ale neřekne nám nic o farmakologické aktivitě léčiv jako je afinita k biologickým receptorům. Slouží k odhadu rozpustnosti a permeability látek ve výzkumu a vývoji léčiv, kde se používá jako nástroj k hodnocení a navrhování p.o. účinných molekul. [3, 44, 47] Kromě pravidla

pěti existují i další pravidla, z nichž významné je **Veberovo pravidlo**. Toto pravidlo vychází z analýzy strukturních vlastností sloučenin, které mají vliv na BAV po p.o. podání u potkanů. Studie odhalila pozitivní vliv zvyšující se molekulární rigidity vyjádřené jako počet rotovatelných vazeb a negativní vliv zvyšujícího se polárního povrchu na p.o. BAV u potkanů. [50] Polární povrch je součet povrchů polárních atomů (jako je kyslík, dusík a připojené vodíky) v molekule. Platí, že čím větší je polární povrch molekuly, tím menší bude procento absorpce. [51] Za přijatelnou BAV u potkanů po p.o. podání bereme BAV větší než 20-40 %. Pro její dosažení musí být splněny následující kritéria:

- Počet rotovatelných vazeb  $\leq 10$
- Polární povrch  $\leq 140 \text{ \AA}^2$ , nebo počet DHV a AHV  $\leq 12$

Pokud jsou splněny tyto parametry, tak lze s vysokou pravděpodobností předpokládat dobrou p.o. BAV u potkanů. Obecně platí, že počet rotovatelných vazeb se zvyšuje s rostoucí molekulovou hmotností. Obdobně je to i u polárního povrchu a DHV a AHV, které se také zvyšují s rostoucí molekulovou hmotností, ale data jsou v tomto případě slabší. [50] Všechna pravidla jsou využívána k rychlému, poměrně účinnému a efektivnímu zhodnocení drug-like vlastností sloučenin s určitou farmakologickou aktivitou ve výzkumu a vývoji léčiv. Jako drug-like jsou definovány sloučeniny, které mají dostatečně přijatelné vlastnosti ADMET, aby mohly projít skrze první fázi klinických zkoušek. [3, 47] V dnešní době se jako drug-like vlastnosti berou všechny parametry mající vliv na ADMET, ne pouze fyzikálně-chemické vlastnosti. Optimalizace drug-like vlastností sloučenin (např. rozpustnost ve vodě a intestinální permeabilita) s využitím pravidel je velmi důležitá, jelikož zvyšuje úspěšnost vývoje nových léčiv. [3]

### 2.2.3.3 Teplota tání a krystalická struktura

Většina nových léčiv je charakteristická špatnou rozpustností ve vodě jako důsledek vysoké lipofility a vysoké teploty tání ( $t_t$ ). [41, 52] Vliv lipofility a krystalové mřížky na rozpustnost lze vyjádřit obecnou rovnicí rozpustnosti (Rovnice 13), ve které je vliv krystalové mřížky vyjádřen jako  $t_t$  a vliv lipofility jako  $\log P$ . [41]

$$\log S = 0,5 - 0,01(t_t - 25) - \log P$$

*Rovnice 13: Obecná rovnice rozpustnosti, získáno z [53].*

V Rovnici 13 je  $S$  molární rozpustnost (mol/l),  $t_t$  ve stupních Celsia a  $P$  je rozdělovací koeficient  $n$ -oktanol/voda. Touto rovnicí získáme odhadovanou rozpustnost ve vodě organických neelektrolytů v kapalném nebo pevném skupenství. Získaná rozpustnost je tzv. „intrinsic“ (vnitřní) rozpustnost. [3, 53] Výhodou obecné rovnice rozpustnosti je možnost jednoduchého a spolehlivého výpočtu rozpustnosti neelektrolytů s využitím pouze dvou parametrů. [54] Teplota tání je teplota, při které koexistuje kapalná a pevná fáze látky v rovnováze za daného tlaku. Při  $t_t$  začíná přechod látky z pevného skupenství na kapalné. [27] Se zvyšující se  $t_t$  se snižuje odhadovaná rozpustnost látek ve vodě. [6] Z rovnice vyplývá, že rozpustnost bude snížena desetkrát, pokud se  $\log P$  zvýší o jedna nebo se  $t_t$  zvýší o 100 °C. [3]

Vliv  $t_t$  na rozpustnost prokazuje i studie, ve které bylo testováno několik desítek sloučenin a vliv jejich vlastností na rozpustnost. Studie prokázala, že sloučeniny s vyšší  $t_t$  (nad 140 °C) mají rozpustnost nižší, než by se očekávalo dle jejich hodnot  $\log P$ . Naopak látky s nižší  $t_t$  bývají více rozpustné ve vodě. [55]

Na  $t_t$  mají vliv další parametry ovlivňující rozpustnost léčiv jako jsou DHV, AHV a flexibilita nebo rigidita molekuly vyjádřená jako počet rotovatelných vazeb. Vliv těchto parametrů souvisí se stabilitou krystalové mřížky, jelikož vytvoření vodíkových vazeb vede ke stabilizaci mřížky a zvýšení  $t_t$  a naopak vyšší flexibilita molekuly, tedy zvýšení počtu rotovatelných vazeb, vede ke snížení  $t_t$ . [55, 56] Studie dokazuje vliv zvýšení počtu DHV a AHV na zvýšení  $t_t$ , kdy významnější efekt na zvýšení  $t_t$  mají donory. [56] Vliv všech (mimo i v rámci krystalů) vodíkových vazeb na rozpustnost vyjadřuje Abrahamova rovnice rozpustnosti ve vodě. Z Abrahamovy rovnice rozpustnosti vyplývá, že rozpustnost se obecně zvyšuje se zvyšujícím se počtem vodíkových vazeb a snižuje se se zvyšujícím se počtem krystalických vodíkových vazeb. [10] Přestože  $t_t$  může představovat dobrou předpověď pro rozpustnost látky, tak dominantní příspěvek v rámci obecné rovnice rozpustnosti bude mít vždy  $\log P$ . [57] Nicméně můžeme říci, že u látek s  $\log P < 2$  je rozpustnost primárně ovlivněna krystalovou mřížkou, zatímco u sloučenin s  $\log P > 2$  hraje klíčovou roli lipofilita molekuly. Pokud bude mít látka vysokou  $t_t$  i vysokou lipofilitu, tak se oba faktory budou společně podílet na nízké rozpustnosti ve

vodě. [41] Teplota tání je indikátorem obtížnosti, s jakou se molekula uvolňuje z krystalové mřížky. [56] Pokud má látka vyšší  $t_f$ , tak má pevnější a stabilnější krystalickou strukturu, což vede k horší rozpustnosti ve vodě. Aby došlo k rozpuštění látky, tak musí být nejprve překonána energie krystalové mřížky a následuje uvolnění molekul látky z krystalu. [3, 6, 58]

Obecně lze říci, že krystalické formy mají vyšší  $t_f$  než amorfni formy. Amorfni formy pevných látek jsou tvořeny přirozeně neuspořádanými molekulami. Mezi jednotlivými molekulami jsou minimální interakce snadno narušitelné rozpouštědlem. Vlivem toho mají amorfni látky nižší  $t_f$  a lepší rozpustnost nežli krystalické formy. Krystaly jsou formovány molekulami látky pomocí různě silných atraktivních nebo repulsních intermolekulárních interakcí jako jsou van der Waalovy síly,  $\pi$ - $\pi$  interakce a elektrostatické interakce, dále silnější vodíkové vazby a mnohem silnější iontové interakce. Krystalová mřížka je tvořena body, které představují umístění opakujících se strukturních jednotek krystalu (atomy, molekuly nebo skupiny atomů, molekul nebo iontů), jenž jsou navzájem spojeny intermolekulárními interakcemi. Součet energií všech intermolekulárních interakcí v rámci krystalu se označuje jako energie krystalové mřížky. Čím vyšší je energie krystalové mřížky, tím vyšší je stabilita krystalu a tedy nižší rozpustnost ve vodě. Asi 80 % farmaceutických sloučenin se může vyskytovat ve více než jedné krystalické formě. Schopnost látky vyskytovat se ve více než jedné krystalické formě se nazývá polymorfie. Polymorfie může ovlivnit  $t_f$ , rozpustnost, rychlost rozpouštění a vlivem toho i BAV léčiva. Polymorfni látka s nejvyšší energií krystalové mřížky bude nejvíce stabilní a bude nejméně rozpustná. Méně stabilní (metastabilní) polymorfni formy mají tendenci spontánně přecházet do termodynamicky stabilnějších forem, což může komplikovat jejich formulaci. [25, 27, 59, 60]

Důležité je, že jednotlivé polymorfni formy se mezi sebou v rozpustnosti liší relativně mírně, což dokazuje studie sledující vliv polymorfie na rozpustnost u 55 látek. Ve studii byl sledován poměr rozpustnosti mezi jednotlivými polymorfy látek v porovnání s jejím nejméně rozpustným polymorfem. Výsledkem studie byl průměrný poměr rozpustnosti polymorfů 1,7, případně 2, pokud je započtena i jedna výjimka, premafloxacin, u které je neobvykle vysoký poměr rozpustnosti mezi polymorfy. [61] Naproti tomu rozdíl v rozpustnosti mezi polymorfni a amorfni formou látky je podstatně větší. Studie sledující rozdíl vlivu mezi polymorfy a amorfny na rozpustnost ukazuje, že

amorfni formy látek jsou obvykle několikanásobně rozpustnější než polymorfni formy. [62] Obdobné důkazy přináší i další studie sledující rozdíl mezi rozpustností amorfni formy famotidinu a jeho krystalickou formou. [63] Vliv amorfni formy a polymorfni forem tadalafilu na rozpustnost nám také dokazuje, že rozdíl v rozpustnosti mezi polymorfy není signifikantní, a naopak jeho amorfni forma je několikanásobně rozpustnější než formy krystalické. [64] I když amorfni látky, případně méně stabilní polymorfni látky, mají vyšší rozpustnost, tak jejich problém představuje riziko částečné rekrystalizace na více stabilní krystalické formy během měření rozpustnosti, ale i během formulace. [25, 60, 62, 65]

Kromě polymorfů a amorfů existují i solvatomorfni látky. Solvatomorfni látky mají ve své krystalické struktuře zakomponované molekuly rozpouštědla. Pokud je včleněným rozpouštědlem voda, tak se jedná o hydráty. Hydratované krystaly jsou obvykle méně rozpustné ve vodě oproti bezvodým krystalickým formám téže látky vlivem snížené dostupnosti míst látky k interakci s vodou. Ale pokud bychom použili na rozpuštění hydrátu jiné rozpouštědlo mísitelné s vodou, tak by rozpustnost hydrátu byla vyšší než u nesolvatované formy. [25, 60] Vliv solvatomorfni látek na rozpustnost ukazuje studie sledující poměr rozpustnosti bezvodé formy a hydrátu. Výsledkem studie je důkaz vyšší rozpustnosti bezvodých forem ve vodě, kdy poměr rozpustnosti bezvodé formy a hydrátu většiny sledovaných látek byl přibližně dva nebo méně, ale objevily se i případy s vyšším poměrem např. niklosamid s poměrem 22,9. Nicméně existují i případy, kdy hydrát má vyšší rozpustnost nežli bezvodá látka. [61]

Izolace a formulace vysoce energetických polymorfů nebo amorfů má potenciál pro zlepšení BAV ve vodě špatně rozpustných léčiv v porovnání s nejvíce stabilní krystalickou formou látky. Nicméně je důležité zároveň zajistit stabilitu metastabilních forem, aby nedošlo k samovolné změně na stabilnější formu, k čemu se využívají stabilizační agens jako jsou např. polymery a z nich vytvořené pevné disperzní systémy. [60]

Jak už bylo zmíněno v Podkapitole 2.2.3.1 Velikost, tvar a povrch částic, tak na energii krystalové mřížky má vliv i tvar molekuly. Krystaly tvořené symetrickými molekulami mají vyšší  $t_d$  a jsou méně rozpustné ve vodě nežli krystaly tvořené méně symetrickými až asymetrickými molekulami stejné struktury. [66] Na energii krystalové

mřížky má vliv také aromaticita molekuly. Vysoce aromatické planární molekuly mají vysokou energii krystalové mřížky a uvolnění molekuly z krystalu je obtížnější. Důsledkem je nižší rozpustnost krystalů tvořených aromatickými molekulami ve vodě. [67]

Dalším faktorem ovlivňujícím rozpustnost vlivem na krystalickou strukturu je chiralita. Dva enantiomery mohou krystalizovat ve více formách odlišných od sebe ale i od racemátu. Podle Wallachova pravidla jsou krystaly racemátu stabilnější a hustší než jejich chirální protějšky. Příkladem je rozdíl v energii krystalové mřížky, tím pádem i  $t_f$ , mezi S-ketoprofenem s  $t_f$  72 °C a RS-ketoprofenem s  $t_f$  94 °C, kde lze vidět vyšší stabilitu a  $t_f$  u racemátu. Rozdíl ovlivňuje rozpustnost ve vodě, která je 2,3 mg/ml u S-ketoprofenu a 1,4 mg/ml u RS-ketoprofenu. [3] Z praktického hlediska je důležité mít na paměti, že použití látek s nízkou  $t_f$  (okolo 60 °C) je považováno za problematické z důvodu obtížnější zpracovatelnosti do konvenčních pevných lékových forem. Za optimální  $t_f$  je brána teplota nad 100 °C. Teploty ve výrobních zařízeních, jako jsou granulátory a tabletovací lisy, mohou přesahovat 40 °C, ale při fluidní granulaci nebo během sušení mohou teploty dosahovat i překračovat teploty 80 °C. [6]

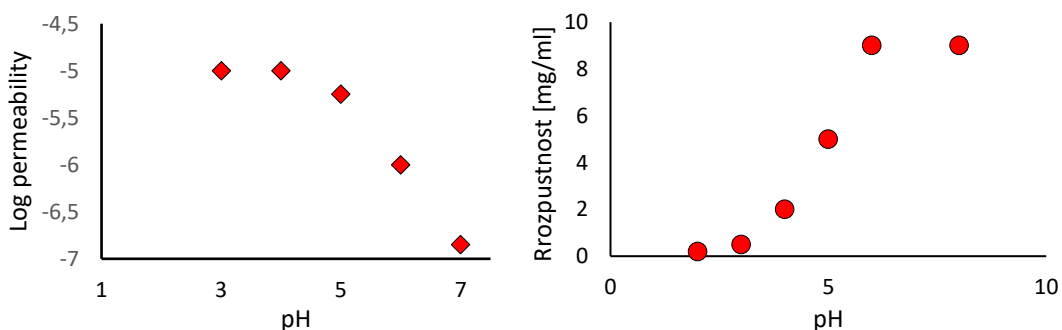
#### **2.2.3.4 Substituenty a funkční skupiny**

Substituenty a funkční skupiny mají významný vliv na rozpustnost léčiv. Jejich vliv je dán ovlivněním fyzikálně-chemických vlastností molekul jako je lipofilita, polarita, krystalická struktura, tvorba vodíkových vazeb a ovlivňují ionizaci léčiv. Při hodnocení rozpustnosti látky je nutné brát v potaz přítomnost všech substituentů v molekule léčiva a jejich vliv na rozpustnost. Výsledný vliv dané funkční skupiny je ovlivněn přítomností dalších sousedních nebo okolních funkčních skupin. Ke zhodnocení vlivu substituentů na rozpustnost je vhodné je rozdělit na hydrofilní a lipofilní. [46]

Hydrofilní funkční skupiny přispívají k rozpustnosti ve vodě. Rozpustnost ve vodě je mimo jiné důležitá k dostatečné solvataci a disoluci léčiva ve vodném prostředí tělních tekutin po p.o. podání a také nám umožňuje podávat léčiva intravenózně. Mezi hydrofilní funkční skupiny patří skupiny schopné vytvářet vodíkové vazby a

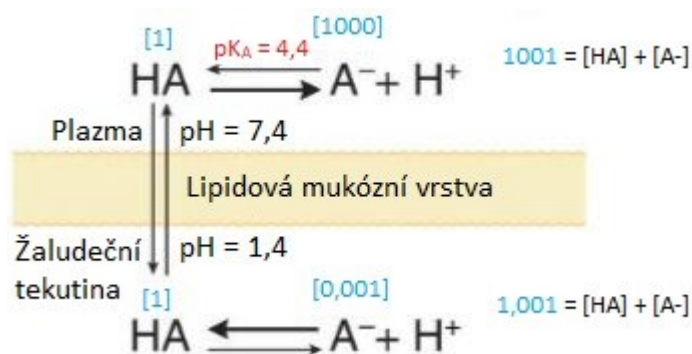
ionizace. [46] Vliv vodíkových vazeb na rozpustnost byl diskutován v předchozích částech textu.

Skupiny schopné ionizace jsou kyselé nebo zásadité funkční skupiny a ionizací získají negativní nebo pozitivní náboj. Ionizace zvyšuje rozpustnost ve vodě díky tvorbě ion-dipól interakcí mezi funkční skupinou a vodou. [46] Kromě rozpustnosti ovlivňuje ionizace i permeabilitu skrze lipidové membrány. Ionizovaná léčiva mají horší permeabilitu pomocí pasivní difúze nežli neutrální molekuly, jelikož neutrální molekuly jsou více lipofilní, tedy mají vyšší hodnotu  $\log P$ . Vliv na permeabilitu slabých elektrolytů má  $pK_A$  látky a pH prostředí. Výpočet poměru ionizované a neionizované formy léčiva vychází z Henderson-Hasselbalchovy rovnice (Rovnice 5). [3, 46, 68] Obecně můžeme říci, že vysoce permeabilní léčiva mají často nízkou rozpustnost ve vodě. Naopak vysoce rozpustná léčiva mají často nižší permeabilitu, což může být způsobeno ionizací mající opačný vliv na tyto vlastnosti. Jako příklad můžeme uvést léčivo kyselé povahy s hodnotou  $pK_A$  5, u kterého dochází k poklesu permeability se zvyšujícím se pH a naopak rozpustnost se s rostoucím pH zvyšuje (viz Graf 7). [3]



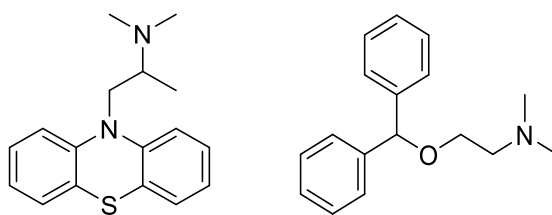
Graf 7: Profil permeability a rozpustnosti kyselé látky s hodnotou  $pK_A$  5. Převzato a upraveno z [3].

Pro farmakokinetiku léčiv je významným jevem tzv. ion trapping. Při něm dochází ke kumulaci kyselých léčiv na více bazické straně membrány a bazických léčiv na kyselejší straně membrány vlivem ionizace léčiv. Příkladem je slabá kyselina ( $pK_A = 4,4$ ), která odlišně disociuje v plazmě a žaludeční tekutině (viz Obrázek 1). V žaludeční tekutině prakticky nedochází k disociaci, ale v plazmě k disociaci dochází kvůli vyššímu pH. Neutrální forma HA může volně přecházet přes membránu. Modrá čísla v hranatých závorkách vyjadřují relativní rovnovážné koncentrace HA a  $A^-$  získané z Rovnice 5. [68]

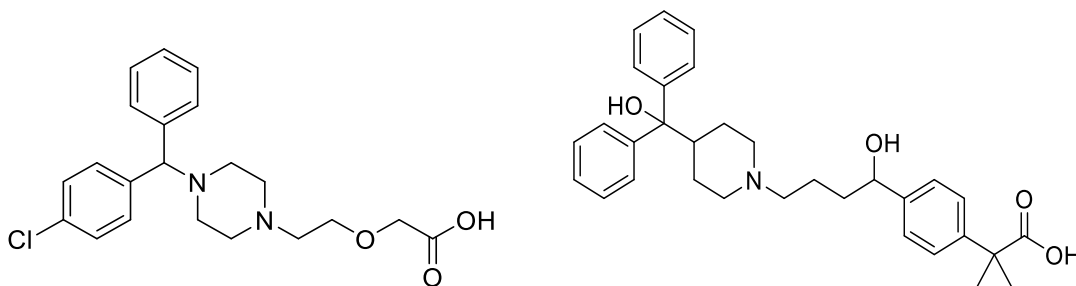


Obrázek 1: Vliv pH na distribuci slabé kyseliny ( $pK_A = 4,4$ ) mezi plazmou a žaludeční tekutinou oddělenými lipidovou bariérou. Převzato a upraveno z [68].

Význam ionizace léčiv souvisí i s prostupem léčiv přes HEB. Ionizovaná léčiva neprostupují přes HEB, což je významné u  $H_1$ -antihistaminik druhé generace. Problémem první generace  $H_1$ -antihistaminik, jako je promethazin a difenhydramin (Obrázek 2), je jejich sedativní účinek, který bývá u druhé generace minimální nebo žádný. [46, 68, 69] Jedním z důvodů nižšího sedativního účinku u druhé generace  $H_1$ -antihistaminik (např. fexofenadin a cetirizin, viz Obrázek 3) je přítomnost hydrofilních funkčních skupin. [46, 70] Struktura  $H_1$ -antihistaminik je obvykle složena z aromatického jádra, alifatických řetězců nebo kruhů a alespoň jednoho terciárního aminu. [46] Ale druhá generace navíc obsahuje karboxylové skupiny nebo aminoskupiny. [70] Přítomnost ionizovatelných funkčních skupin zvyšuje rozpustnost ve vodě, čímž se snižuje schopnost prostupu skrze HEB. [46, 68] Konkrétně fexofenadin má při fyziologickém pH poměr ionizované a neionizované formy léčiva 40:1. [69] Vysoká koncentrace ionizované formy fexofenadinu může snižovat vstup přes membrány. [69, 70] Rozdíly najdeme i mezi jednotlivými zástupci druhé generace. Ve srovnání s ostatními  $H_1$ -antihistaminiky druhé generace vykazuje cetirizin výraznější sedativní účinky. [69] Nicméně nižší vstup přes HEB nesouvisí pouze s ionizací a hydrofilitou molekuly. Významným faktorem snižujícím vstup druhé generace  $H_1$ -antihistaminik přes HEB je eflux pomocí P-glykoproteinu. [69, 70]

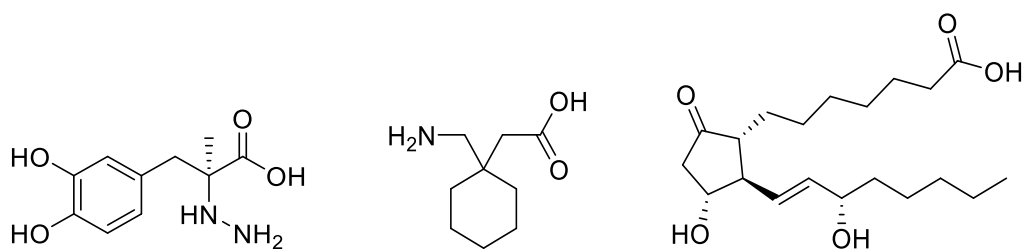


Obrázek 2:  $H_1$ -antihistaminika první generace: promethazin (vlevo) a difenhydramin (vpravo). Převzato a upraveno z [71, 72] v ChemDraw 23.1.2.



Obrázek 3:  $H_1$ -antihistaminika druhé generace: cetirizin (vlevo) a fexofenadin (vpravo). Převzato a upraveno z [46] v ChemDraw 23.1.2.

Kyselé funkční skupiny mají schopnost darovat (ztratit) proton, a proto musí mít atom vodíku se schopností odštěpit se. Zároveň je nutné, aby zbývající atomy měly možnost rezonanční delokalizace, tedy schopnost funkční skupiny rozptýlit náboj mezi dva a více atomů, čímž dojde ke stabilizaci konjugované zásady. Ke vzniku rezonančních struktur dochází pokud jsou elektrony sdíleny mezi skupinou atomů, které mají sousední dvojně vazby a volné elektronové páry. Zásadním parametrem určujícím sílu kyselin je hodnota  $pK_A$ . Čím nižší je hodnota  $pK_A$ , tím je kyselina silnější. Mezi kyselé funkční skupiny řadíme karboxylové kyseliny,  $\beta$ -dikarbonyly, imidy, sulfonamidy, sulfonylmočovinu, fenoly, sulfonové kyseliny, fosfonové kyseliny, tetrazoly, thioly, sulfáty, fosfáty a fosfonáty. Jako konkrétní příklad lze uvést léčiva s karboxylovou skupinou jako je karbidopa, gabapentin a alprostadil (Obrázek 4). [46]



Obrázek 4: Karbidopa, gabapentin a alprostadil (zleva). Převzato a upraveno z [73–75] v ChemDraw 23.1.2.

Výsledná hodnota  $pK_A$  kyselých i bazických skupin je ovlivněna přítomností elektron odtahujících nebo elektron poskytujících skupin v molekule léčiva. [3, 46] Obvyklé rozmezí hodnot  $pK_A$  vybraných kyselých skupin je uvedeno v Tabulce 5. Nicméně v přítomnosti elektron odtahujících skupin v molekule se síla kyselých látek zvyšuje. Mezi elektron odtahující skupiny patří skupiny jako halogeny, trifluoromethyl, nitro skupina, hydroxylová skupina, nitrilová (kyano) skupina, karbonyly (aldehydy, ketony), amidy, estery, sulfonamidy, ethery (např. methoxy) a ionizované bazické skupiny. Na druhé straně existují elektron poskytující skupiny snižující sílu kyselin. Jedná se o skupiny jako jsou aromatické hydroxyly, aromatické aminy, aromatické thioly, aromatické ethery, ionizované kyselé skupiny a alkylové skupiny. Elektronové efekty se nazývají též jako indukční. Výsledný indukční efekt závisí na elektronegativitě skupiny. Čím vyšší je elektronegativita, tím silnější je schopnost přitahovat elektrony, tedy elektron odtahující schopnost resp. záporný indukční efekt. Nejvyšší elektronegativitu má fluor, následuje kyslík, chlor, dusík, brom a jod. Kromě indukce má vliv na elektronovou hustotu i rezonance. Příkladem vlivu rezonance na elektronovou hustotu je fenolová skupina, která může sdílet elektrony na aromatické jádro. Dochází ke sdílení elektronů atomem kyslíku na aromatické jádro a negativní náboj je sdílen na atomech uhlíku aromatického jádra v *o*- a *p*-polohách vzhledem k fenolové skupině. Na druhé straně je příkladem nitrilová skupina, která odtahuje elektrony z aromatického jádra a získává negativní náboj a aromatické jádro získá náboj pozitivní v *o*- nebo *p*-polohách vzhledem k nitrilové skupině. [46]

Jako příklad vlivu substituentů na  $pK_A$  můžeme použít výše zmíněná léčiva s karboxylovou skupinou. Obvyklé rozmezí  $pK_A$  karboxylových kyselin je mezi 2,5 až 5. [46] Karbidopa má  $pK_A$  2,32. [73] Hodnota je nižší, jelikož v blízkosti karboxylové skupiny je přítomna skupina hydrazinová. Hydrazinová skupina je bazická se schopností

odtahovat elektrony, což vede ke snížení  $pK_A$ . [46] Gabapentin má dvě hodnoty  $pK_A$ . První hodnota je 3,68 pro kyselenou karboxylovou skupinu a druhá hodnota je 10,70 pro bazický primární amin. [74] Gabapentin má karboxylovou skupinu, které má ve své blízkosti pouze alkylovou skupinu. Alkylový řetězec poskytuje elektrony karboxylové skupině, čímž dochází ke snížení kyselosti. [46] Karboxylová skupina alprostadilu s hodnotou  $pK_A$  4,87 je ovlivněna stejným způsobem jako u gabapentinu. [46, 75]

Tabulka 5: Vybrané kyselé a zásadité funkční skupiny a jejich rozmezí  $pK_A$ . Převzato a upraveno z [46].

| Funkční skupina                          | Rozmezí $pK_A$ |
|--|----------------|
| Karboxylové kyseliny                     | 2,5 – 5        |
| $\beta$ -dikarbyonyly (včetně imidů)     | 4,5 – 8,5      |
| Fenoly                                   | 9 – 10         |
| Alifatické aminy                         | 9 – 11         |
| Alicyklické aminy (nasycené heterocykly) | 9 – 11         |
| Aromatické aminy (aniliny)               | 2 – 5          |
| Aromatické heterocykly obsahující dusík  | 1 – 6          |

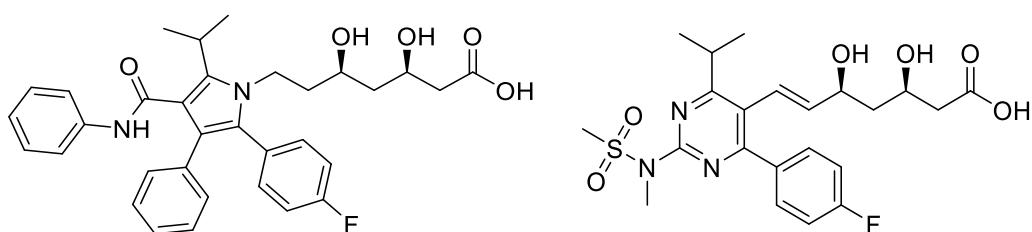
Zásadité funkční skupiny jsou schopny přijmout proton, pro jehož navázání je důležitá přítomnost volného elektronového páru zpravidla na atomu dusíku. Síla zásad se vyjadřuje pomocí hodnoty  $pK_A$  jejich konjugované kyseliny. Čím vyšší je hodnota  $pK_A$ , tím silnější je zásada a slabší konjugovaná kyselina. Naopak čím nižší je hodnota  $pK_A$ , tím slabší je zásada a silnější konjugovaná kyselina. Mezi typické zásadité funkční skupiny patří primární, sekundární a terciární alifatické aminy, aromatické aminy a alicyklické aminy. Alifatické aminy rozdělujeme na primární, sekundární a terciární podle počtu alkylových řetězců navázaných na atom dusíku. Alicyklické aminy mají atom dusíku součástí nasyceného heterocyklu a mohou být buď sekundární, nebo terciární. Pokud porovnáváme rozdíl v bazicitě (viz Tabulka 5) jednotlivých aminů je nutné

zohlednit přítomnost dalších elektron odtahujících nebo elektron poskytujících funkčních skupin v molekule léčiva a sterické efekty. Elektron poskytující skupiny, tedy skupiny s kladným indukčním efektem jako je alkylová skupina (např. methyl a ethyl) posouvají elektrony směrem k aminu, čímž zvyšují jeho bazicitu. Proto jsou sekundární aminy více bazické nežli primární. U terciárních aminů dochází k omezení přístupu protonu k volnému elektronové páru vlivem sterických efektů alkylových skupin, a proto jsou primární i sekundární aminy více bazické nežli terciární. Nejméně bazické jsou aromatické aminy neboli aniliny, protože dochází k začlenění volného elektronového páru do rezonance s aromatickým jádrem. Bazicita klesá v řadě  $R_2-NH > R_1-NH_2 > R_3-N > Ar-NH_2$ . V přítomnosti elektron odtahujících skupin v blízkosti aminů dochází ke snížení jejich bazicity. [46]

Kromě aminů se typicky vyskytují v léčivech i bazické heterocykly, které jsou zpravidla méně bazické v porovnání s alifatickými a alicyklickými aminy. Jejich hodnota  $pK_A$  je závislá na velikosti heterocyklu, na přítomnosti dalších heteroatomů a funkčních skupin. Pětičlenné cykly nebo kondenzované cykly s pětičlenným cyklem obsahující pouze jeden dusíkový atom jako je např. pyrrol a indol nejsou bazické, protože volný elektronový pár dusíku je začleněn do aromaticity cyklu. Ale u imidazolu obsahujícího dva atomy dusíku zůstává jeden volný elektronový pár pro vazbu protonu, a proto má vyšší bazicitu než pyrrol a indol. Šestičlenné cykly nebo kondenzované cykly se šestičlenným cyklem obsahující pouze jeden dusíkový atom jako je pyridin a chinolin jsou více bazické oproti pyrrolu a indolu, jelikož volný elektronový pár dusíku se neúčastní aromaticity cyklu. [46]

Lipofilní funkční skupiny zvyšují rozpustnost léčiv v lipidech. Jedná se o skupiny neschopné ionizace nebo tvorby vodíkových vazeb. Mezi typické lipofilní funkční skupiny patří nesubstituované aromatické cykly, alkylové skupiny, alicyklické kruhy a halogeny s výjimkou fluoru. [46] Fluor zvyšuje lipofilitu molekuly, ale může vystupovat jako AHV a tím zvyšovat rozpustnost ve vodě. [46, 76] K esterům, etherům, fenolům a anilinům můžeme přistupovat jako ke skupinám s hydrofilními i lipofilními vlastnostmi, které závisí zejména na atomech a skupinách k nim navázaným. Kyslík, případně dusík u anilinů se může podílet na tvorbě vodíkových vazeb a přispívat k rozpustnosti ve vodě. Navíc u fenolů a anilinů může docházet i k ionizaci. Nicméně alkylové řetězce a aromatické kruhy těchto skupin zvyšují lipofilitu látek. [46]

Vliv substituentů a funkčních skupin si můžeme ukázat na skupině inhibitorů HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A) reduktázy neboli statinů. Statiny rozdělujeme na lipofilní jako je atorvastatin a na hydrofilní jako je rosuvastatin (viz Obrázek 5). Atorvastatin má hodnotu  $\text{clog}P$  4,13 a rosuvastatin 0,42. [46] Rozdíly v rozpustnosti statinů jsou výrazně ovlivněny přítomností nebo absencí polárních a hydrofilních skupin na jejich převážně hydrofobních skeletech. [77] Rosuvastatin je hydrofilnější kvůli přítomnosti polární hydroxylové skupiny a methylsulfonamidové skupiny. [78] Struktura statinů ovlivňuje jejich farmakokinetiku jako je např. BAV, biologický poločas a způsob eliminace, ale i účinnost snižování hladiny LDL cholesterolu. Nejúčinnější ve snížení hladin LDL cholesterolu je rosuvastatin, který má i nejdelší biologický poločas, konkrétně 19 hodin. [77, 78]



Obrázek 5: Inhibitory HMG-CoA reduktázy – atorvastatin (vlevo) a rosuvastatin (vpravo). Převzato a upraveno z [78] v ChemDraw 23.1.2.

## 2.2.4 Vlastnosti rozpouštědla

Mezi vlastnosti rozpouštědla ovlivňující rozpustnost patří polarita a pH média, jehož vliv byl řešen v předchozích částech textu. [3, 33] Zpravidla platí, že voda jako polární rozpouštědlo je dobrým rozpouštědlem solí, cukrů a dalších podobných sloučenin. Zatímco minerální oleje a další nepolární rozpouštědla se používají k rozpouštění nepolárních sloučenin, tedy látek obvykle jen slabě rozpustných ve vodě. [6] Jedná se o tzv. pravidlo „podobné se rozpouští v podobném“, které je založeno na polaritě sloučenin. [6, 33]

Polární molekuly jsou molekuly s permanentním elektrickým dipólovým momentem, který vzniká na podkladě částečných nábojů na atomech molekuly vznikajících zejména v důsledku rozdílů v elektronegativitě vzájemně vázaných atomů. Rozdílná elektronegativita atomů způsobuje nerovnoměrnou distribuci elektronů na kovalentní vazbě. Energeticky výhodná je přítomnost elektronového páru blíže

k jednomu z atomů, což je podkladem pro vznik polární vazby, ve které je elektronový pár nerovnoměrně sdílen mezi dvěma atomy. Příkladem je fluorovodík, který je polární, jelikož fluor jako vysoce elektronegativní atom nese parciální negativní náboj a vodík nese parciální pozitivní náboj. Platí, že čím vyšší je rozdíl v elektronegativitě, tím vyšší je polární charakter vazby. Rozdíl u fluorovodíku je 1,8. Ale rozdíl v elektronegativitě mezi uhlíkem a vodíkem je pouze 0,4 a vazba C-H je považována za nepolární. Proto látky s rozdílem v elektronegativitě menším než 0,4 označujeme jako nepolární a látky s rozdílem větším než 0,4 jako polární. [27] Polární molekuly mezi sebou interagují prostřednictvím dipól-dipól intermolekulárních sil a vodíkových vazeb, kdy významnější jsou interakce pomocí vodíkových vazeb. [6]

S polaritou vazeb souvisí i relativní permitivita média, taktéž nazývaná jako dielektrická konstanta, která může mít významný vliv na sílu interakcí mezi ionty v roztoku. Relativní permitivita je vysoká, pokud je molekula polární. [27] Například voda má hodnotu relativní permitivity 78,5, tedy více než další rozpouštědla jako je např. methanol nebo aceton. [6] Z tohoto důvodu dochází ve vodě ke snížení interiontové interakční energie téměř o dva řády oproti její hodnotě ve vakuu. [27] Nepolární rozpouštědla mají nízkou relativní permitivitu a nejsou schopna snížit přitažlivost mezi ionty slabých i silných elektrolytů, tedy odštěpit proton, a proto se označují jako tzv. aprotická rozpouštědla. Jedná se např. o tetrachlormethan, benzen a minerální oleje. Pro rozpustnost je také důležitý celkový poměr polárních a nepolárních skupin v molekule. Příkladem jsou alkoholy, u kterých se s prodlužováním nepolárního uhlovodíkového řetězce snižuje jejich rozpustnost ve vodě. [6]

## **2.3 Metody měření rozpustnosti**

*In vitro* metody měření rozpustnosti rozdělujeme dle typu získané hodnoty rozpustnosti na kinetické a termodynamické. [3, 79] Rozdíl mezi kinetickou a termodynamickou rozpustností a jejich využitím byl vysvětlen v úvodní části textu v Kapitole 2.1. Neexistuje pouze jedna hodnota rozpustnosti pro danou sloučeninu, protože hodnota rozpustnosti závisí na podmínkách v roztoku jako je pH, použité rozpouštědlo (např. voda), kosolventy (např. DMSO), další aditiva (např. lipidy, surfaktanty), iontová síla, časové rozmezí měření rozpustnosti a teplota. Tedy i samotné stanovení rozpustnosti je faktorem ovlivňujícím výslednou hodnotu *in vitro*

rozpustnosti. [3, 10] V určitých případech se využívají modifikované metody měření rozpustnosti přizpůsobené pro přesné stanovení rozpustnosti za specifických podmínek (např. různá vodná vehikula) a splňují tak konkrétní potřeby vědeckých týmů. [3]

### 2.3.1 Metody měření kinetické rozpustnosti

Při stanovení kinetické rozpustnosti se nejprve rozpustí pevná látka v organickém rozpouštědle (např. DMSO) za vzniku koncentrovaného roztoku (např. 10 mg/ml nebo 30 mM). Následně se malé množství zásobního roztoku měřené látky v DMSO (např. 10  $\mu$ l) přidá do vodného pufru (např. 990  $\mu$ l fosfátového pufru s pH 7,4) a směs se promíchá. V tomto případě je obsah DMSO 1 % a cílová rozpustnost je 100 mg/ml. [3] Dochází k precipitaci měřené látky. [8, 79] Jsou možné oba způsoby smísení roztoků, tedy přidání zásobního roztoku látky v DMSO k vodnému pufru i naopak, přičemž první postup je běžnější. [8]

Po určitém časovém rozmezí (např. 0,5 – 20 hodin v závislosti na požadovaném výsledku) se od kapalně fáze oddělí nerozpuštěné částice filtrací. K filtraci se používají mikrofiltry s membránou tvořenou např. hydrofilním polykarbonátem nebo hydrofilním polyvinylidenfluoridem mající minimální nespecifickou vazbu. [3] Filtrace pomocí těchto filtrů je rychlejší než metody založené na centrifugaci. Nicméně i centrifugace s následným použitím supernatantu poskytuje výsledky srovnatelné s filtračními metodami. [17] Poté je filtrát, případně supernatant analyzován pomocí UV/VIS spektrofotometru, vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS, Mass Spectrometry) nebo UV detekcí (HPLC-UV), nebo chemiluminiscenčního detektoru dusíku (CLND, chemiluminescent nitrogen detector) a je stanovena koncentrace látky v nasyceném roztoku. [3, 17, 79] Stanovení kinetické rozpustnosti je obvykle automatizováno použitím 96-jamkové mikrotitrační destičky, 96-jamkové filtrační destičky a robotické platformy pro manipulaci s kapalinami, což umožňuje rychlé a reprodukovatelné stanovení rozpustnosti. [3]

Mezi metody měření kinetické rozpustnosti řadíme metody přímé jako je UV spektrofotometrie a nepřímé jako je nefelometrie a turbidimetrie. Přímé metody stanovují koncentraci látky rozpuštěné v roztoku, ale metody nepřímé měří precipitát tvořený nerozpuštěnou látkou. [3] Jak přímé, tak nepřímé metody jsou schopny poskytovat

srovnatelné výsledky. [17] Přehled vybraných metod stanovení rozpustnosti ve vodě je uveden v Tabulce 6. [79]

### 2.3.1.1 Stanovení rozpustnosti pomocí UV spektrofotometrie

Jedná se o přímou metodu stanovující koncentraci sloučeniny rozpuštěné v roztoku pomocí UV spektrofotometru. Nejprve se malý objem látky v koncentrovaném roztoku DMSO přidá do jamky 96-jamkové destičky obsahující vodný pufr a směs se promíchá. Pro zamezení odpařování se roztok přikryje a udržuje se při dané teplotě po stanovené časové rozmezí. Pokud sloučenina není zcela rozpustná, dojde k jejímu vysrážení. Nerozpuštěné částice se následně odstraní filtrací. Absorbance filtrátu i standardního roztoku o známé koncentraci se měří pomocí UV spektrofotometru. Poté je vypočtena rozpustnost látky ve vodě na základě standardu, jelikož koncentrace je úměrná absorpanci podle Lambert-Beerova zákona (Rovnice 14). [3]

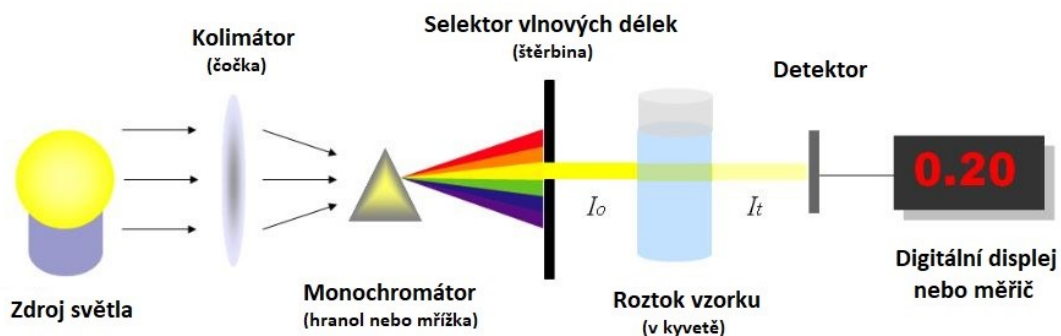
Základem stanovení rozpustnosti pomocí spektrofotometrie je Lambert-Beerův zákon vyjadřující lineární závislost mezi absorpancí a koncentrací látky. Proto můžeme Lambert-Beerův zákon aplikovat pouze, pokud je závislost skutečně lineární. [4] Matematicky ho lze vyjádřit:

$$A = \epsilon lc$$

*Rovnice 14: Lambert-Beerův zákon, kde  $A$  je absorbance,  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient v  $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $l$  je délka optické dráhy resp. tloušťka vrstvy květy v cm a  $c$  je molární koncentrace v  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Získáno z [4].*

Spektrofotometrie je metoda založená na stanovení množství světla absorbovaného látkou při průchodu monochromatického světla na základě jeho intenzity před a po průchodu vzorkem. Základním principem je, že každá sloučenina absorbuje nebo propouští světlo resp. elektromagnetické záření při průchodu danou látkou. [4] UV/VIS spektrofotometrie sleduje absorpci světelné energie nebo elektromagnetického záření excitující elektrony ze základního stavu do prvního singletového excitovaného stavu sloučeniny. [80] Jedná se o velmi užitečnou metodu kvantitativní analýzy, využívanou zejména ke stanovení koncentrace látek. [4]

Spektrofotometr je přístroj měřící množství fotonů absorbovaných po průchodu vzorkem. V závislosti na rozsahu vlnových délek světelného zdroje rozlišujeme UV/VIS spektrofotometr a infračervený (IR, infrared) spektrofotometr. UV/VIS spektrofotometr využívá světlo v UV rozsahu (185 – 400 nm) a viditelném rozsahu (400 – 700 nm) elektromagnetického spektra. IR spektrofotometr využívá světlo v IR rozsahu (700 – 15000 nm) elektromagnetického spektra. [4] Každý UV/VIS spektrofotometr (viz Obrázek 6) se skládá ze zdroje světla jako je např. deuteriová výbojka, monochromátoru zajišťujícího vznik monochromatického světla, kyvety nebo destičky se vzorkem a fotoelektrického detektoru. Navíc může být přítomen tzv. kolimátor, což je čočka usměrňující paprsek světla a také selektor vlnový délek (štěrbina), pokud není součástí monochromátoru. Dále rozlišujeme jednopaprskové a dvoupaprskové spektrofotometry. Dvoupaprskové spektrofotometry umožňují měřit referenční i analyzovaný vzorek zároveň, což zajišťuje větší přesnost nežli využití jednopaprskových, u kterých je nutné nejdříve změřit referenční vzorek a až po něm vzorek analyzovaný. [4, 80] Existují i tzv. simultánní přístroje, které neobsahují monochromátor mezi vzorkem a zdrojem světla. Místo toho využívají detektor s diodovým polem, který umožňuje současně detekovat absorpenci na všech vlnových délkách. Simultánní přístroje jsou obvykle mnohem rychlejší a efektivnější. [80]



Obrázek 6: Základní uspořádání spektrofotometrů. Převzato a upraveno z [4].

Limitací UV/VIS spektrofotometrie je nutnost přítomnosti chromoforu ve struktuře měřené látky. Pokud není chromofor přítomen, tak UV/VIS spektrofotometrii nelze použít. [5, 79, 81] U takových látek se používají metody založené na HPLC, nefelometrii nebo potenciometrii. [5] Avšak absence chromoforu nepředstavuje závažnou nevýhodu, protože přítomnost chromoforu je typická pro velkou většinu látek, jelikož

obsahují aromatické nebo heteroaromatické systémy. [81] UV-VIS spektrofotometrie je vhodná ke stanovení rozpustnosti kapalin a roztoků. Pokud vzorek obsahuje pevné částice, tak se jedná se o suspenzi a při analýze dochází k rozptýlení světla pevnými částicemi, což zkresluje výsledky. Proto je nutné odstranit pevné částice filtrací, případně centrifugací. Nicméně lze využít speciální difrakční zařízení k analýze pevných vzorků i suspenzí, i když se nejedná o běžný postup v praxi. [80] V porovnání s nefelometrií je spektrofotometrie citlivější metodou, což dokazují studie stanovující limitní koncentraci pro nefelometrické stanovení na přibližně 20 nebo 54  $\mu\text{M}$ . Při nižších koncentracích látky není dostatek pevných částic vedoucích k rozptýlení světla s intenzitou vyvolávající detekovatelný signál. [81, 82] Limitní koncentrace pro spektrofotometrické stanovení je dle studie 0,5  $\mu\text{M}$  a pro HPLC stanovení dokonce 0,008  $\mu\text{M}$ , a proto je HPLC metoda nejcitlivější. Při HTS se koncentrace látek pohybují v oblastech 1  $\mu\text{M}$  a více, proto i UV/VIS spektrofotometrie poskytuje dostatečné informace o rozpustnosti testovaných látek. [81]

Spektrofotometrie stejně jako HPLC metoda vyžaduje filtraci, nicméně samotná analýza je mnohem rychlejší. Například stanovení UV spektra v oblasti 250 – 400 nm probíhá přibližně 5 s, což bývá dostatečné rozmezí spektra při stanovování rozpustnosti ve vodě, jelikož většina sloučenin v HTS obsahuje mezi jedním až třemi aromatickými nebo heteroaromatickými kruhy vedoucími k absorpčnímu maximu v oblastech mezi 260 – 300 nm. V porovnání s HPLC metodou, kde stanovení jednoho chromatogramu trvalo přibližně 19 minut, je UV/VIS spektrofotometrie mnohem rychlejší. Kromě vhodné zvolené vlnové délky je nezbytný i správný objem roztoku v 96-jamkové destičce, který je přibližně 300  $\mu\text{l}$ . Typická kalibrační křivka se získá z koncentrační řady z 8 zředěných roztoků o známé koncentraci látky. Důležitý je také korelační koeficient získaný opakovanými měřeními s 8 odlišnými koncentracemi. Korelační koeficient ukazující dobrou linearitu by měl mít hodnotu mezi 0,99 až 0,9999. Vysoký korelační koeficient umožňuje použít i koncentrační řady s menším počtem zředěných roztoků, což usnadňuje a urychluje měření. Při spektrofotometrických testech nelze rozlišit přítomnost nečistot, které mohou ovlivnit výslednou rozpustnost ve vodě. Avšak u HPLC stanovení jsou snadno odhaleny. V závislosti na kvalitě sloučeniny se může jednat o kritický problém. Pokud byla čistota sloučenin ověřena v dřívější fázi nebo paralelně, tak zpravidla není nutné ověřovat čistotu opakovaně. V případě, že je čistota nebo stabilita látek v roztoku

neznámá, tak je při stanovování rozpustnosti ve vodě nutné věnovat pozornost komplikacím s tím spojených. [81]

Dále je důležité zohlednit, že každé rozpouštědlo má vlastní mezní vlnovou délku absorpce v UV/VIS oblasti, tzv. cut-off. Jedná se o vlnovou délku, pod kterou rozpouštědlo samo absorbuje veškeré světlo. Při výběru rozpouštědla je zásadní tento faktor zohlednit, např. voda má mezní vlnovou délku v oblasti 180 nm. Pokud je mezní vlnová délka rozpouštědla a oblast absorpce měření látky blízká, tak je vhodné zvolit jiné rozpouštědlo. Mezní vlnovou délku mají i kyvety nebo destičky, které jsou tvořeny různými materiály. Křemenné kyvety mají mezní vlnovou délku přibližně 160 nm a používají se u látek absorbujících v UV oblasti. Nicméně skleněné kyvety mají mezní vlnovou délku přibližně 300 nm, a proto nejsou vhodné pro použití v UV oblasti. [80]

UV/VIS spektrofotometrie je široce využívaná, jednoduchá, rychlá, cenově efektivní, ekologická, bezpečná a také přesná a reprodukovatelná metoda měření rozpustnosti látek ve vodě. [5]

### **2.3.2 Metody měření termodynamické rozpustnosti**

Při stanovení termodynamické rozpustnosti se přidává vodný pufr k pevné látce. Následně je vzorek míchán po delší dobu (obvykle 24 – 72 hodin), aby bylo dosaženo rovnováhy mezi rozpuštěnou a pevnou formou látky. [3, 10] Rozpustnost je ovlivněna i rozpouštěním z původní pevné formy sloučeniny a následnou precipitací pevných nebo krystalických forem látky. Mezi primárně používané metody (viz Tabulka 6) patří metoda třepací baňky a metoda založená na potenciometrii. Termodynamická rozpustnost je zásadní při studiu látek, které se podávají ve formě pevné látky nebo suspenze, kde rozpouštění sloučeniny z pevné formy látky v GIT přímo ovlivňuje ADMET i účinnost. Z tohoto důvodu se obvykle k jejímu stanovení používají různé vodné roztoky. [3] Pokud jsou testy kinetické rozpustnosti prováděny po delší časové rozmezí, tedy místo několika minut jsou látky testovány hodiny až dny, tak jeví tendenci odpovídat hodnotám testů termodynamické rozpustnosti. [10, 83]

### 2.3.2.1 Metoda třepací baňky

Metoda třepací baňky je zlatým standardem pro stanovení termodynamické rozpustnosti. [3, 10] Nejprve je sloučenina se známými vlastnostmi pevné fáze přidána v nadbytku do vodného roztoku v baňce a vznikající suspenze je třepána při definované teplotě a rychlosti po definovanou dobu bez úpravy nebo s úpravou pH. Vzorky jsou odebírány buď v jednom nebo několika časových bodech. Přebytek pevné látky je odstraněn filtrací nebo centrifugací. Poté se změří pH filtrátu a filtrát se kvantifikuje pomocí analytických metod jako je HPLC-MS nebo HPLC-UV. Klasická metoda třepací baňky je časově náročná, zdlouhavá a pomalá metoda s řadou manuálních kroků, které jsou náchylné k chybovosti, a proto farmaceutické společnosti hledají možnosti modifikace této metody umožňující HTS. [17, 83] Automatizovaná HTS verze metody třepací baňky poskytující podobné informace o rozpustnosti jako klasická metoda, by byla velmi přínosná. Možné je využití automatizovaného zařízení k navážení pevných látek umožňující rozdělení malých množství sloučenin v práškové formě do jednotlivých jamek 96-jamkové destičky. Pokud je v kombinaci s robotickou platformou pro manipulaci s kapalinami, tak vzniká HTS systém ke stanovení termodynamické rozpustnosti. [83] Dále se využívá sonifikace a vortexové míchání ke zkrácení doby ustálení. [3] Existují i další modifikace této metody (viz Tabulka 6). [79]

Tabulka 6: Metodologie pro stanovení vodné rozpustnosti ve výzkumu a vývoji léčiv.  
Převzato a upraveno z [79].

| Typ metody             | Metoda   |  | Kapacita                         | Vzorek                              |
|------------------------|--|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| Kinetická              | Přímá<br>(mikrofiltrace<br>nebo<br>centrifugace) | UV   | vysoká                           | 20 – 100 µl<br>zásobního<br>roztoku |
|                        |  | CLND<br>HPLC   | vysoká<br>střední                |                                     |
|                        | Nepřímá<br>(precipitační)                        | Nefelometrie   | vysoká                           | 0,1 – 1 mg                          |
|                        |  | Turbidimetrie  | střední                          |                                     |
| Termodynamická         | Třepací baňka                                    | Konvenční  | nízká                            | 10 – 100 mg                         |
|                        |  | Miniaturizovaná  | nízká/střední                    | 2 – 15 mg                           |
|                        | Miniaturizovaná<br>HTS třepací<br>baňka          | Dávkování<br>pevné látky na<br>destičce  | střední                          | 5 mg                                |
|                        |  | Odstranění<br>rozpouštědla<br>lyofilizací nebo<br>odpařováním<br>Částečná<br>rovnováha | střední/vysoká<br>střední/vysoká | 100 µl<br>zásobního<br>roztoku      |
|                        | Disoluce   | Mikrodisoluce  | nízká/střední                    | 10 – 100 µg                         |
|                        |  | Facilitovaná<br>disoluční metoda   | nízká                            | 10 – 100 mg                         |
| Potenciometrie         | Dvoufázová<br>titrace                            | nízká  | 50 µg – 200<br>mg                |                                     |
|                        | Dosažení<br>rovnováhy                            | nízká  | 10 – 100 mg                      |                                     |
| Miniaturní<br>zařízení | -  | nízká  | 10 mg                            |                                     |

### 3 Cíl práce

Cílem experimentální části diplomové práce je hodnotit rozpustnost vybrané série potenciálních radioprotektivních látek připravených v CBV FNHK. Rozpustnost bude stanovena pomocí spektrofotometrické metody, kdy bude hodnocen vliv struktury (obměny substituentů) na rozpustnost molekuly ve vodném médiu. Dále bude využit webový nástroj SwissADME k *in silico* predikci rozpustnosti měřených látek pro porovnání s výsledky *in vitro*.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Měřené látky

Měřené látky jsou malé molekuly s potenciální radioprotektivní aktivitou vycházející ze série substituovaných piperazinů, které byly syntetizovány výzkumným týmem v CBV FNHK. Konkrétně se jedná o 20 derivátů 1-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-3-fenoxypropan-2-olu (viz Tabulka 7), dále o tři deriváty 1-(4-(2-(hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-3-aminofenylpropan-2-olu a jeden derivát 1-(4-(2-(hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-3-thiofenylpropan-2-olu (viz Tabulka 8). [84–86] Většina látek byla měřena pouze ve formě hydrochloridové soli. Nicméně čtyři látky byly kvůli porovnání měřeny před převedením i po převedení na hydrochlorid.

### 4.2 Použité instrumentální vybavení

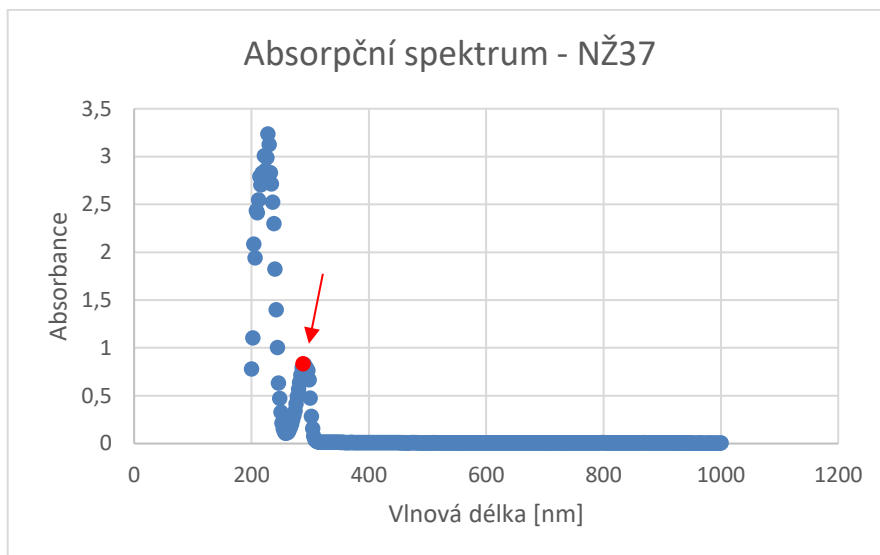
- spektrofotometr „Tecan Spark“ v kombinaci se softwarem Sparkcontrol v3.2, Tecan Trading AG, Švýcarsko
- laboratorní centrifuga „Eppendorf MiniSpin plus“, Eppendorf SE, Německo
- ultrazvuková lázeň „Sonorex Super“, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Německo
- mikropipety – 10-100  $\mu\text{L}$  a 100-1000  $\mu\text{L}$
- 96-jamková UV destička „Corningstar UV Plate, 96-Well, Flat-bottom“, Corning Inc., USA
- mikrozkuhavky Eppendorf, Eppendorf SE, Německo
- analytické váhy Sartorius, Sartorius AG, Německo

### 4.3 Pracovní postup

#### 4.3.1 Stanovení absorpčního maxima

Byly připraveny zásobní roztoky měřených látek v destilované vodě o koncentraci 1 mg/ml a 10 mg/ml. Následně bylo odebráno do UV destičky čisté rozpouštědlo tzv. blank a zásobní roztok 1 mg/ml v triplikátu. Ve spektrofotometru bylo změřeno absorpční spektrum (viz Graf 8) a následně stanoveno absorpční maximum. Pokud

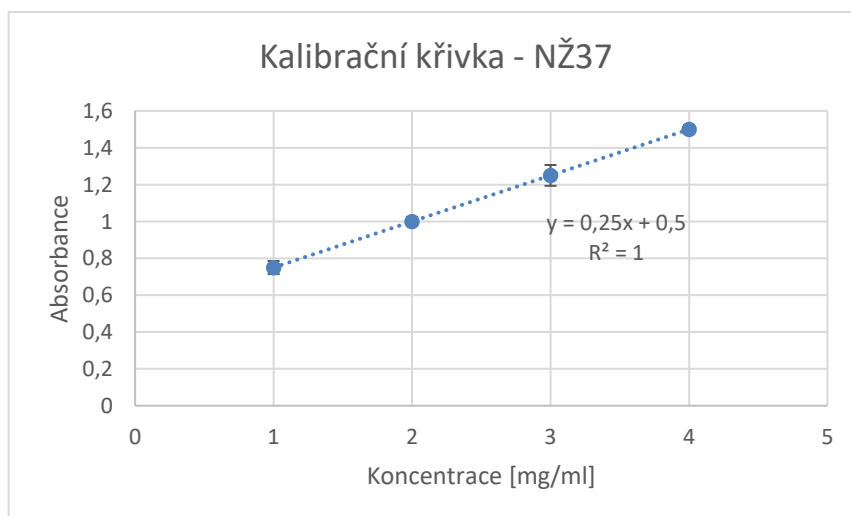
absorbance v absorpčním maximu nabývala hodnoty větší než dva, tak musel být zásobní roztok zředěn a znovu změřen, aby bylo zjištěno o jakých koncentracích připravit koncentrační řadu, aby byla zajištěna linearita absorbance.



Graf 8: Absorpční spektrum látky NŽ37, červeně označeno absorpční maximum

#### 4.3.2 Stanovení kalibrační přímky

Poté byla připravena koncentrační řada ze čtyř zředěných roztoků o známé koncentraci látky. Byla změřena absorbance zředěných roztoků v absorpčním maximu měřené látky. Následně byla sestrojena kalibrační křivka (viz Graf 9). Z kalibrační křivky byla získána rovnice kalibrační přímky a korelační koeficient  $R^2$ .



Graf 9: Kalibrační křivka látky NŽ37

### 4.3.3 Příprava a stanovení koncentrace nasyceného roztoku

Nasycený roztok byl připraven přidáváním měřené látky do stanoveného objemu rozpouštědla, dokud se látka přestala rozpouštět. Následně byl roztok s nerozpuštěnou složkou vložen do ultrazvuku po dobu tří minut. Pokud došlo k úplnému rozpuštění sloučeniny, byla přidána další látka. Po dosažení limitu rozpustnosti byl vzorek centrifugován při  $rcf$  (relativní odstředivá síla) 14,1 po dobu 5 min s cílem oddělit nerozpuštěnou látku od nasyceného roztoku. Supernatant byl zředěn, aby absorbance nabývala hodnot mezi 0,5 až 1, obvykle 100x až 1000x, a byla změřena hodnota absorbance zředěného nasyceného roztoku v triplikátu. Koncentrace nasyceného roztoku byla vypočtena pomocí Rovnice 16, která byla získána úpravou Rovnice 15.

$$x = (y - b)/a$$

*Rovnice 15: Upravená rovnice kalibrační přímky*

$$c = (A - b)/a$$

*Rovnice 16: Rovnice pro výpočet koncentrace měřené látky*

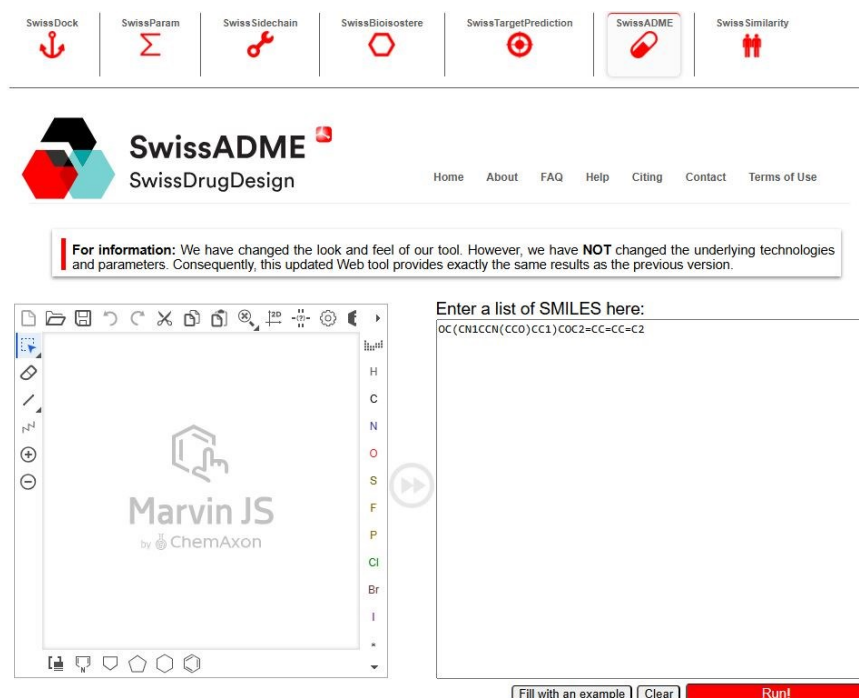
Získaná koncentrace byla vynásobena ředěním a získali jsme hodnotu rozpustnosti měřené látky v mg/ml.

## 4.4 Vyhodnocení výsledků

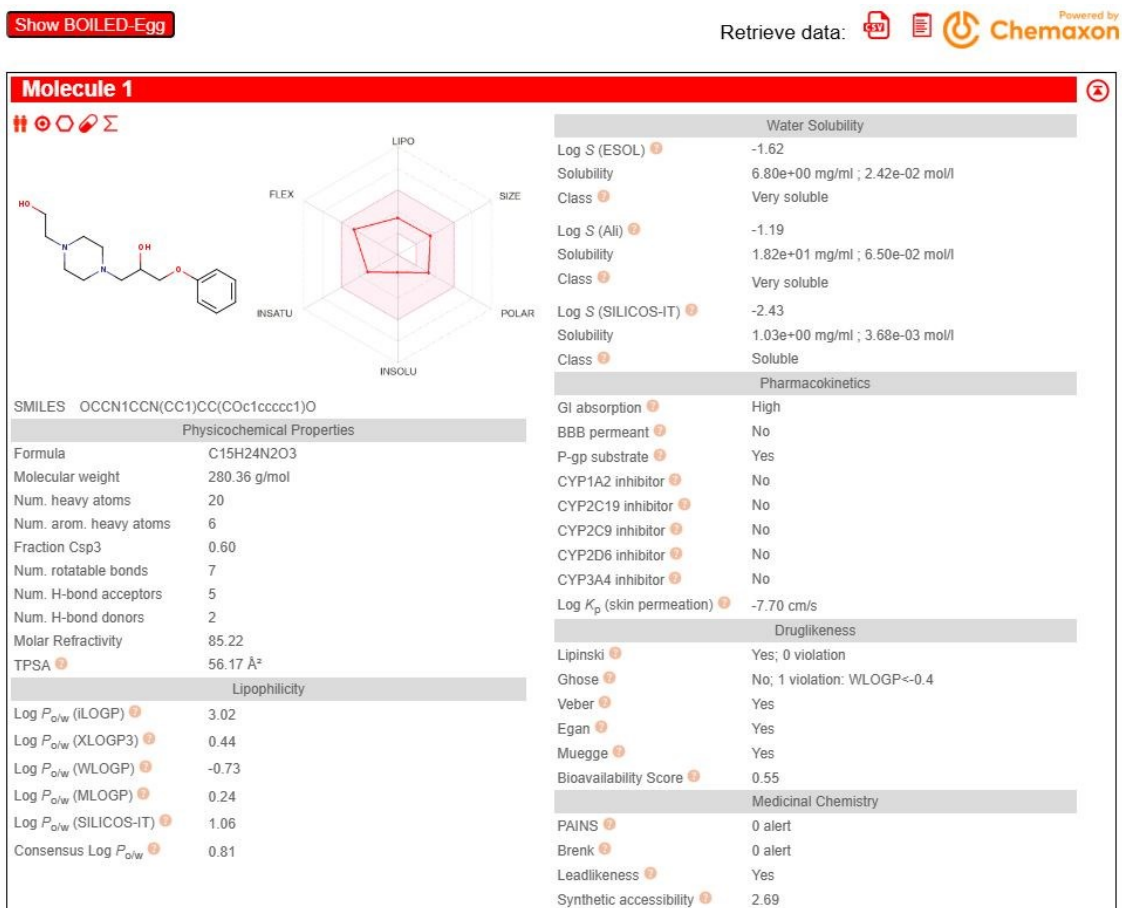
K měření absorbance byl využit software **Sparkcontrol v3.2** v kombinaci se spektrofotometrem „Tecan Spark“. Ke zpracování výsledků a sestavení grafů byl použit **Microsoft Excel verze 2410**. Nakreslení struktur látek a stanovení molekulové hmotnosti bylo provedeno s využitím **ChemDraw 23.1.2**. K získání vlastností a *in silico* rozpustnosti měřených látek v neutrální formě (viz Tabulka 10) byl použit volně dostupný webový nástroj **SwissADME** provozovaný Skupinou molekulárního modelování Univerzity v Lausanne (Molecular Modelling Group of the University of Lausanne) a Švýcarským institutem pro bioinformatiku (Swiss Institute of Bioinformatic). SwissADME je součástí většího pracovního prostoru SwissDrugDesign, který integruje další nástroje pro počítačově podporovaný návrh léčiv, jako jsou SwissDock (molekulární

dokování), SwissTargetPrediction (predikce biologických cílů) nebo SwissSimilarity (virtuální screening léčiv). [87, 88]

SwissADME představuje snadno použitelný nástroj k analýze molekul v rámci odhadu farmakokinetiky, fyzikálně-chemických vlastností, drug-like charakteristik a rozpustnosti ve vodě. [88] Nejprve je nutné vytvořit nebo nahrát již vytvořenou strukturu látky a převést ji na SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System), případně lze použít dříve vytvořený SMILES (viz Obrázek 7). Následně se vygeneruje výčet informací o molekule (viz Obrázek 8). Počet rotovatelných vazeb a počet AHV a DHV je získán ze struktury látek. Polární povrch je spočítán fragmentační technikou nazývanou topologický polární povrch (TPSA), který bere síru a fosfor jako polární atomy. Ke zhodnocení lipofility molekuly bylo využito konsenzuální  $\log P$ . Jedná se o aritmetický průměr pěti metod výpočtu  $\log P$ , konkrétně iLOGP, XLOGP3, WLOGP, MLOGP a SILICOS-IT. [88] K získání rozpustnosti ve vodě využívá dvě topologické metody a třetím způsobem je prediktor rozpustnosti SILICOS-IT. Obě topologické metody (ESOL a Ali) se liší od obecné rovnice rozpustnosti (Rovnice 13) tím, že k výpočtu nevyužívají teplotu tání, protože se jedná o obtížně předvídatelný parametr. [88]



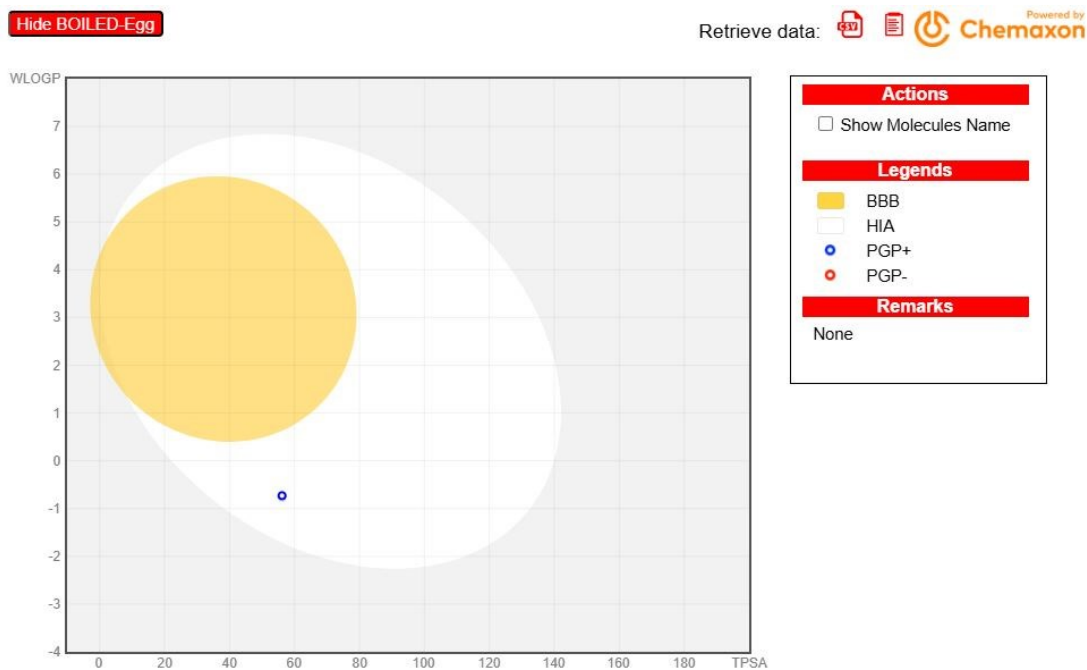
Obrázek 7: Webový nástroj SwissADME – výchozí rozhraní. Můžeme vidět možnost vytvoření nebo nahrání struktury měřené látky a následné převedení na SMILES, případně lze rovnou vložit SMILES. Získáno z [87].



Obrázek 8: Webový nástroj SwissADME – vygenerované informace o měřené látce JM24.1. Získáno z [87].

Pro porovnání s experimentálními hodnotami rozpustnosti ve vodě byla zvolena topologická metoda ESOL (estimated solubility). Metoda ESOL je vhodná, protože se jedná o model zahrnující parametry, které byly rozebírány v teoretické části a část z nich je i v Tabulce 10. Jedná se o  $clogP$ , molární hmotnost, rotovatelné vazby, počet AHV a DHV, polární povrch a také aromatický podíl a podíl neuhlíkových atomů. [89] V rámci oblasti farmakokinetiky byla zhodnocena pouze pravděpodobná GIT absorpce a permeace skrze HEB, jejichž odhad vychází z modelu BOILED-Egg. Tento model lze zobrazit pomocí SwissADME kliknutím na tlačítko „Show BOILED-Egg“. BOILED-Egg (viz Obrázek 9) představuje intuitivní grafický model hodnotící pasivní absorpci v GIT a průnik do mozku na základě polohy molekul v grafu závislosti WLOGP na TPSA. Bílá oblast („bílek“) označuje vysokou pravděpodobnost pasivní absorpce v GIT. Žlutá oblast („žloutek“) označuje vysokou pravděpodobnost průniku přes HEB. Důležité je, že bílá a žlutá oblast se vzájemně nevylučují. Body představující léčiva mohou mít

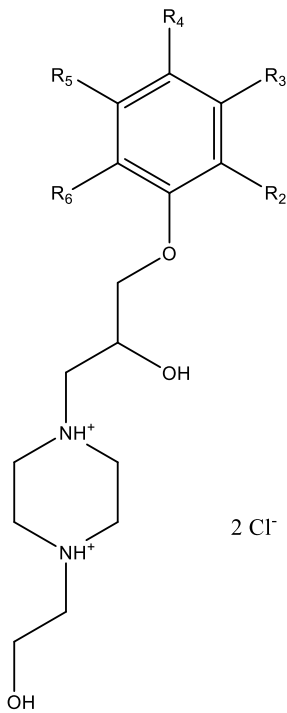
modrou nebo červenou barvu. Modrou barvu mají v případě aktivního efluxu P-glykoproteinem (PGP+) a červenou pokud se nejedná o substráty P-glykoproteinu (PGP-). [88, 90]

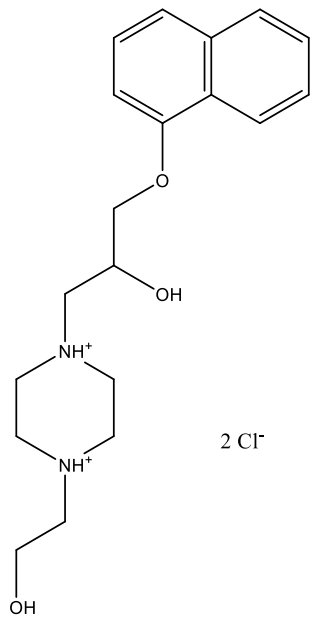


Obrázek 9: Webový nástroj SwissADME – prediktivní model BOILED-Egg látky JM24.1. Látka je pravděpodobně absorbována z GIT, ale nepřestupuje přes HEB a pravděpodobně se jedná o substrát P-glykoproteinu. Získáno z [87].

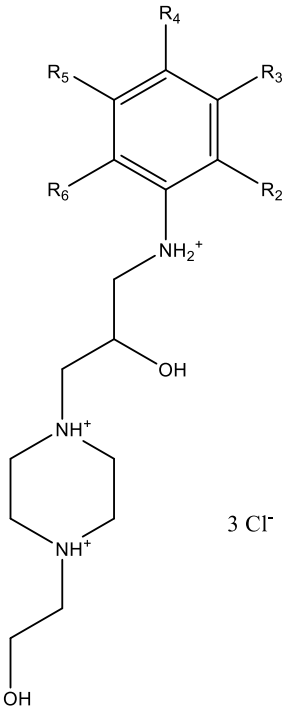
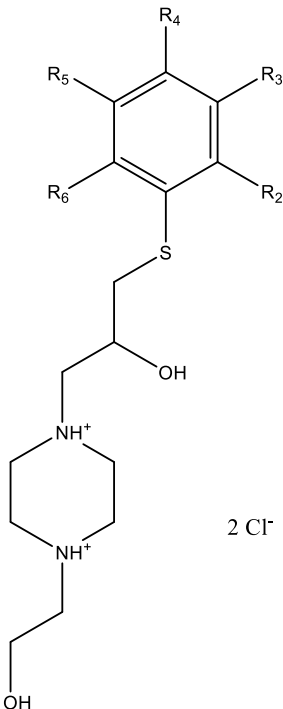
## 5 Výsledky

Tabulka 7: Měřené látky 1

| Obecný vzorec  | Substituenty (R <sub>2</sub> – R <sub>6</sub> ) | Značení [publikace]           | M [g/mol] |
|--|---|-------------------------------|-----------|
|  | -/-   | JM24.1·2Cl <sup>-</sup> [84]  | 353,28    |
|  | 2-isopropyl-5-methyl                            | JM26.1·2Cl <sup>-</sup> [75]  | 409,39    |
|  | 4-allyl-2-methoxy                               | JM31.1·2Cl <sup>-</sup> [84]  | 423,38    |
|  | 2-methoxy                                       | JM32.1·2Cl <sup>-</sup> [84]  | 383,31    |
|  | 2-methoxy                                       | JM32.1 [84]                   | 312,40    |
|  | 3-methoxy                                       | R17·2Cl <sup>-</sup>          | 383,31    |
|  | 3-methoxy                                       | R17                           | 312,40    |
|  | 4-methoxy                                       | R22·2Cl <sup>-</sup>          | 383,31    |
|  | 2,6-dimethoxy                                   | JM30.1·2Cl <sup>-</sup> [84]  | 413,34    |
|  | 2-methoxy-4-nitro                               | NŽ25·2Cl <sup>-</sup> [84]    | 428,31    |
|  | 4-methoxy-2-nitro                               | NŽ67·2Cl <sup>-</sup> [85]    | 428,31    |
|  | 4-(4-fluorofenoxy)                              | NŽ58/69·2Cl <sup>-</sup> [85] | 463,37    |
|  | 3-chloro  | NŽ46/47·2Cl <sup>-</sup> [85] | 387,73    |
|  | 3,4-dichloro                                    | NŽ36·2Cl <sup>-</sup>         | 422,17    |
|  | 2,4,5-trichloro                                 | NŽ37·2Cl <sup>-</sup> [85]    | 456,61    |
|  | 2,4,5-trichloro                                 | NŽ37 [85]                     | 385,71    |
|  | 4-fluoro  | NŽ38·2Cl <sup>-</sup> [85]    | 371,27    |
|  | 3,4,5-trifluoro                                 | NŽ40·2Cl <sup>-</sup>         | 407,26    |
|  | 3,4,5-trifluoro                                 | NŽ40                          | 336,35    |
|  | 2-chloro-4-fluoro                               | NŽ39·2Cl <sup>-</sup>         | 405,72    |
|  | 2-fluoro-4-nitro                                | NŽ48/49·2Cl <sup>-</sup> [85] | 416,27    |

|  |                                       |  |                  |
|--|---------------------------------------|--|------------------|
|  | 4-chloro-3-nitro<br>4-chloro-3-methyl | NŽ68·2Cl <sup>-</sup> [85]<br>JM23.1·2Cl <sup>-</sup> [86] | 432,72<br>401,75 |
|  | 1-naft-(1)-yl                         | JM4.1·2Cl <sup>-</sup> [84]                                | 403,34           |

Tabulka 8: Měřené látky 2

| Obecný vzorec   | Substituenty (R <sub>2</sub> – R <sub>6</sub> )         | Značení [publikace]   | M [g·mol <sup>-1</sup> ]                  |
|---|---|---|---|
|   | <p>-/-</p> <p>2-methoxy-4-nitro</p> <p>3,4-dichloro</p> | <p>JM56.1·3Cl<sup>-</sup> [86]</p> <p>NŽ76·3Cl<sup>-</sup></p> <p>NŽ489·3Cl<sup>-</sup></p> | <p>388,76</p> <p>463,78</p> <p>457,64</p> |
|  | <p>-/-</p>  | <p>NŽ428·2Cl<sup>-</sup></p>  | <p>369,35</p>                             |

Tabulka 9: Parametry získané během stanovení rozpustnosti měřených látek

| Látka                    | Abs. max. [nm] | a      | b        | R <sup>2</sup> | A zředěného nasyceného roztoku | Rozpustnost [mg/ml] |
|--------------------------|----------------|--------|----------|----------------|--------------------------------|---------------------|
| JM24.1·2Cl <sup>-</sup>  | 268            | 1,1287 | 0,0775   | 0,9966         | 0,596                          | 459,6 ± 6,1         |
| JM26.1·2Cl <sup>-</sup>  | 272            | 1,4355 | - 0,1196 | 0,9971         | 0,987                          | 770,7 ± 1,8         |
| JM31.1·2Cl <sup>-</sup>  | 278            | 1,2537 | 0,1359   | 0,9942         | 1,008                          | 695,4 ± 9,8         |
| JM4.1·2Cl <sup>-</sup>   | 290            | 2,2332 | 0,1336   | 0,9971         | 0,214                          | 36,2 ± 1,3          |
| JM32.1·2Cl <sup>-</sup>  | 272            | 1,6843 | - 0,0454 | 0,9992         | 1,224                          | 753,8 ± 26,5        |
| JM32.1                   | 273            | 2,3359 | - 0,0298 | 0,9977         | 1,122                          | 493,0 ± 3,3         |
| R17·2Cl <sup>-</sup>     | 272            | 1,5223 | 0,0393   | 0,9984         | 1,226                          | ≥ 779,3 ± 22,7*     |
| R17                      | 272            | 1,7344 | 0,0549   | 0,9993         | 1,085                          | 594,0 ± 7,0         |
| R22·2Cl <sup>-</sup>     | 286            | 1,7522 | 0,0523   | 0,9992         | 1,008                          | 545,6 ± 2,2         |
| JM30.1·2Cl <sup>-</sup>  | 266            | 0,3833 | 0,0612   | 0,9954         | 0,318                          | 670,9 ± 4,6         |
| NŽ25·2Cl <sup>-</sup>    | 342            | 5,1224 | 0,0875   | 0,9994         | 1,420                          | 520,4 ± 6,9         |
| NŽ67·2Cl <sup>-</sup>    | 364            | 1,6066 | - 0,0406 | 0,9994         | 1,201                          | 773,1 ± 13,8        |
| NŽ58/69·2Cl <sup>-</sup> | 274            | 1,6215 | - 0,0146 | 0,9988         | 1,046                          | 654,0 ± 7,0         |
| NŽ46/47·2Cl <sup>-</sup> | 272            | 1,1373 | 0,0598   | 0,9990         | 0,956                          | 787,9 ± 17,0        |
| NŽ36·2Cl <sup>-</sup>    | 282            | 0,5231 | 0,0633   | 0,9989         | 1,412                          | 515,5 ± 6,6         |
| NŽ37·2Cl <sup>-</sup>    | 288            | 0,7683 | 0,1314   | 0,9974         | 0,785                          | 850,8 ± 21,2        |
| NŽ37                     | 288            | 0,2500 | 0,5000   | 1,0000         | 0,574                          | 295,9 ± 33,9        |
| NŽ38·2Cl <sup>-</sup>    | 276            | 1,1585 | - 0,0001 | 0,9893         | 0,345                          | 298,1 ± 2,9         |
| NŽ40·2Cl <sup>-</sup>    | 266            | 0,7767 | 0,0726   | 0,9996         | 0,759                          | 879,6 ± 11,3        |
| NŽ40                     | 268            | 0,8984 | 0,2364   | 0,9964         | 0,479                          | 269,5 ± 14,6        |
| NŽ39·2Cl <sup>-</sup>    | 278            | 1,1944 | 0,1064   | 0,9991         | 1,368                          | 1056,1 ± 12,3       |

|                          |     |        |        |        |       |              |
|--------------------------|-----|--------|--------|--------|-------|--------------|
| NŽ48/49·2Cl <sup>-</sup> | 312 | 6,0774 | 0,0337 | 1,0000 | 0,533 | 821,3 ± 10,9 |
| NŽ68·2Cl <sup>-</sup>    | 334 | 0,9560 | 0,0179 | 0,9987 | 1,180 | 607,6 ± 2,6  |
| JM23.1·2Cl <sup>-</sup>  | 278 | 0,6344 | 0,1104 | 0,9907 | 0,737 | 988,3 ± 14,5 |
| JM56.1·3Cl <sup>-</sup>  | 286 | 1,3038 | 0,1064 | 0,9970 | 0,214 | 82,5 ± 1,1   |
| NŽ76·3Cl <sup>-</sup>    | 418 | 11,018 | 0,0332 | 0,9965 | 0,882 | 770,2 ± 4,9  |
| NŽ489·3Cl <sup>-</sup>   | 306 | 1,3245 | 0,0487 | 0,9967 | 0,126 | 58,4 ± 0,8   |
| NŽ428·2Cl <sup>-**</sup> | -   | -      | -      | -      | -     | -            |

Vysvětlivky: Abs. max. – absorpční maximum, a – lineární koeficient rovnice kalibrační přímky, b – absolutní člen rovnice kalibrační přímky, R<sup>2</sup> – korelační koeficient, A – absorbance

\* ≥ z důvodu nedostatku látky pro přesné měření

\*\* nelze určit absorpční maximum, protože dochází k interferenci absorbance destičky a absorbance měřené látky

Tabulka 10: Vlastnosti měřených látek ovlivňující rozpustnost a jejich rozpustnost in silico v neutrální formě. Získáno prostřednictvím SwissADME [87].

| Látka  | AHV | DHV | ClogP | Rotovatelné vazby | TPSA [Å <sup>2</sup> ] | Vypočtená rozpustnost [mg/ml] (ESOL) |
|--------|-----|-----|-------|-------------------|------------------------|--------------------------------------|
| JM24.1 | 5   | 2   | 0,81  | 7                 | 56,17                  | 6,80                                 |
| JM26.1 | 5   | 2   | 2,05  | 8                 | 56,17                  | 0,53                                 |
| JM31.1 | 6   | 2   | 1,60  | 10                | 65,40                  | 1,21                                 |
| JM4.1  | 5   | 2   | 1,67  | 7                 | 56,17                  | 0,467                                |
| JM32.1 | 6   | 2   | 0,93  | 8                 | 65,40                  | 1,87                                 |
| R17    | 6   | 2   | 0,74  | 8                 | 65,40                  | 6,24                                 |
| R22    | 6   | 2   | 0,75  | 8                 | 65,40                  | 6,24                                 |

|         |   |   |        |   |        |       |
|---------|---|---|--------|---|--------|-------|
| JM30.1  | 7 | 2 | 0,74   | 9 | 74,63  | 5,64  |
| NŽ25    | 8 | 2 | - 0,09 | 9 | 111,22 | 5,92  |
| NŽ67    | 8 | 2 | - 0,03 | 9 | 111,22 | 5,92  |
| NŽ58/69 | 7 | 2 | 2,40   | 9 | 65,40  | 0,201 |
| NŽ46/47 | 5 | 2 | 1,30   | 7 | 56,17  | 1,92  |
| NŽ36    | 5 | 2 | 1,77   | 7 | 56,17  | 0,533 |
| NŽ37    | 5 | 2 | 2,30   | 7 | 56,17  | 0,149 |
| NŽ38    | 6 | 2 | 1,14   | 7 | 56,17  | 4,96  |
| NŽ40    | 8 | 2 | 1,72   | 7 | 56,17  | 2,59  |
| NŽ39    | 6 | 2 | 1,58   | 7 | 56,17  | 1,39  |
| NŽ48/49 | 8 | 2 | 0,30   | 8 | 101,99 | 4,75  |
| NŽ68    | 7 | 2 | 0,53   | 8 | 101,99 | 1,83  |
| JM23.1  | 5 | 2 | 1,63   | 7 | 56,17  | 0,994 |
| JM56.1  | 4 | 3 | 0,66   | 7 | 58,97  | 6,77  |
| NŽ76    | 7 | 3 | - 0,12 | 9 | 114,02 | 5,90  |
| NŽ489   | 5 | 3 | 0,80   | 7 | 63,55  | 0,525 |
| NŽ428   | 4 | 2 | 1,22   | 7 | 72,24  | 2,61  |

Vysvětlivky: AHV – akceptor vodíkových vazeb, DHV – donor vodíkových vazeb,  
ClogP – kalkulovaný logP, TPSA – topologický polární povrch

## 6 Diskuse

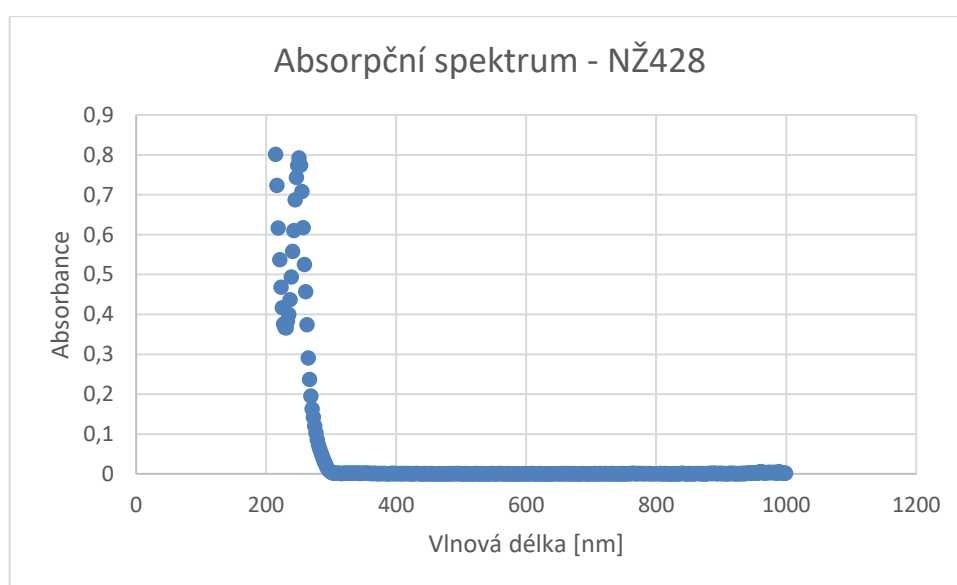
K vyhodnocení rozpustnosti bylo využito klasifikační rozmezí rozpustnosti doporučované týmům zabývajícím se objevováním nových léčiv (Tabulka 11). Jedná se o klasifikaci rozpustnosti sloužící jako doporučení ukazující na možné komplikace při p.o. absorpci účinných látek u lidí. [3] Absorpce je silně závislá na rozpustnosti a permeabilitě. Na základě korelace mezi rozpustností, permeabilitou a účinnou dávkou můžeme určit minimální rozpustnost nezbytnou pro kompletní absorpci. Pokud látka má průměrnou účinnou dávku (1 mg/kg) a průměrnou permeabilitu je vyžadována minimální rozpustnost 52 µg/ml pro kompletní absorpci. Pokud by permeabilita byla nízká, tak je požadována rozpustnost alespoň 207 µg/ml. Jestliže látka má vyšší účinnou dávku (10 mg/kg) a průměrnou permeabilitu je nutné, aby dosahovala rozpustnosti alespoň 520 µg/ml. [3, 47] Na základě výše zmíněného klasifikačního rozmezí můžeme označit všechny měřené látky na základě *in vitro* i *in silico* rozpustnosti za vysoce rozpustné a vzájemně je mezi sebou porovnat v oblasti vysoké rozpustnosti. Pokud bychom vycházeli z tříd rozpustnosti dle ČL2023 (Tabulka 1), tak většina měřených látek bude zařazena do tříd „snadno rozpustné“ (1 – 10 ml rozpouštědla na 1 g látky) nebo „dobře rozpustné“ (10 – 30 ml rozpouštědla na 1 g látky). Látku **NŽ39·2Cl** můžeme zařadit dle ČL do třídy „velmi snadno rozpustné“ (méně než 1 ml rozpouštědla na 1 g látky) a látka **JM23.1·2Cl** se nachází na pomezí mezi třídou „velmi snadno rozpustné“ a „snadno rozpustné“.

Tabulka 11: Klasifikační rozmezí rozpustnosti. Převzato a upraveno z [3].

| Rozpustnost [µg/ml] | Popisný výraz       |
|---------------------|---------------------|
| < 10 µg/ml          | nízká rozpustnost   |
| 10 – 60 µg/ml       | střední rozpustnost |
| > 60 µg/ml          | vysoká rozpustnost  |

Měřené látky jsou tvořeny piperazinem, který je velmi dobře rozpustný ve vodě (321 mg/ml dle ESOL [87]), a na něj navázanými řetězci snižujícími jeho rozpustnost. V první řadě byla porovnána rozpustnost základních struktur měřených látek, tedy bez

substituované aromatické části molekuly. Jedná se o látky **JM24.1**, **JM56.1** a **NŽ428**. Rozdíl mezi molekulami je pouze v přítomnosti jednoho, resp. dvou atomů v případě **JM56.1** s aromatickou částí vycházející z anilinu. Aromatická část látky **JM24.1** vychází z fenolu a látky **NŽ428** vychází z thiofenolu. Tento rozdíl má vliv na absorpční maxima základních látek, kdy u **JM24.1·2Cl<sup>-</sup>** je absorpční maximum 268 nm a u **JM56.1·3Cl<sup>-</sup>** se posouvá absorpční maximum na 286 nm (viz Tabulka 9). U sloučeniny **NŽ428·2Cl<sup>-</sup>** dochází k posunu absorpčního maxima do oblasti, kde nebylo možné touto metodikou experimentálně stanovit rozpustnost ve vodě, jelikož dochází k interferenci absorpance látky a absorpance UV destičky a nelze určit absorpční maximum (viz Graf 10).



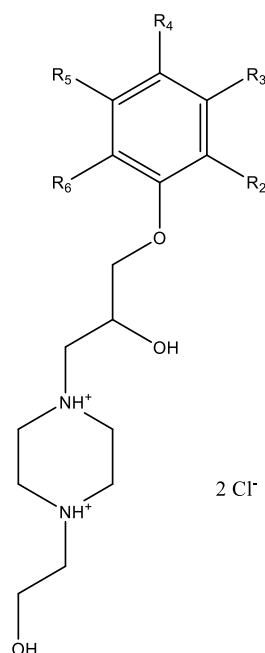
Graf 10: Absorpční spektrum látky NŽ428

U základních látek **JM24.1** a **JM56.1** byla stanovena rozpustnost ve formě hydrochloridu. Rozpustnost látky **JM24.1·2Cl<sup>-</sup>** je 459,6 mg/ml a **JM56.1·3Cl<sup>-</sup>** 82,5 mg/ml (viz Tabulka 9). Rozdíl v rozpustnosti je poměrně velký a naopak byla očekávána vyšší rozpustnost u látky **JM56.1·3Cl<sup>-</sup>**, protože vychází z anilinu a má o jeden ionizovaný dusík více. Je důležité si uvědomit, že zvýšení rozpustnosti převedením na sůl nezvyšuje rozpustnost u každé látky úměrně, což může být také důvod rozdílu mezi jednotlivými experimentálními hodnotami. Příkladem je rozdíl rozpustnosti pseudoefedrinu a pseudoefedrin-hydrochloridu s rozpustností 0,02 mg/ml a 2000 mg/ml v porovnání s cetirizinem a cetirizin-dihydrochloridem s rozpustností 0,03 mg/ml a 300 mg/ml. Jak pseudoefedrin, tak cetirizin jsou ve formě hydrochloridové soli, ale u cetirizinu je rozpustnost zvýšena stokrát a u pseudoefedrinu tisíckrát. [3] Při porovnání

experimentálních hodnot rozpustnosti měřených látek s rozpustností ve vodě *in silico* je vidět zvýšení rozpustnosti látek převedením na hydrochlorid. Vypočtená rozpustnost látek **JM24.1** a **JM56.1** je prakticky totožná, konkrétně 6,80 mg/ml u **JM24.1** a 6,77 mg/ml u **JM56.1** (viz Tabulka 10). Vypočtená rozpustnost látky **NŽ428** je 2,61 mg/ml, tedy o něco nižší než u předchozích sloučenin. Nižší rozpustnost **NŽ428** je způsobena atomem síry, který je méně elektronegativní v porovnání s kyslíkem a dusíkem. Vytváří tak nižší dipól, a proto síra a skupiny obsahující síru (např. thiolová skupina) tvoří slabší vodíkové vazby, jelikož jsou slabšími AHV a DHV a jsou méně rozpustné ve vodě. [46] Rozdíl v rozpustnosti mezi látkami lze vidět i na hodnotě  $clogP$ , která je o něco vyšší u **NŽ428**. Dle SwissADME jsou látky **JM24.1** a **JM56.1** v třídě rozpustnosti velmi rozpustné a látka **NŽ428** je rozpustná.

Na základě parametrů uvedených v Tabulce 10 a molární hmotnosti (viz Tabulka 7 a Tabulka 8) všechny měřené látky vyhovují parametrům Lipinského i Veberova pravidla, a proto je u nich očekávána dobrá rozpustnost a dobrá GIT absorpce. Dle modelu BOILED-Egg budou mít látky pravděpodobně dobrou GIT absorpci a přes HEB neprostoupí s výjimkou čtyř látek (**JM26.1**, **NŽ37**, **NŽ40**, **NŽ58/69**), u kterých existuje pravděpodobnost přestupu přes HEB.

Základní látkou sloučenin, jejichž aromatická část vychází z fenolu (Obrázek 10), je **JM24.1** s nesubstituovanou aromatickou částí molekuly tvořenou fenolem. Nejprve byla porovnána rozpustnost a vliv struktury na rozpustnost fenolových derivátů (viz Tabulka 7) se základní látkou **JM24.1** s *in vitro* rozpustností 459,6 mg/ml ve formě soli a *in silico* rozpustností 6,80 mg/ml a zároveň vzájemně mezi vybranými fenolovými deriváty.



Obrázek 10: Obecný vzorec látek s aromatickou částí molekuly vycházející z fenolu

Látka **JM26.1** má navíc od výchozí struktury v *o*-poloze aromatické části molekuly ( $R_2$ ) vycházející z fenolu isopropyl a v *m*-poloze aromatické části ( $R_5$ ) methyl. Na základě struktury bylo očekáváno u látky **JM26.1** snížení rozpustnosti oproti základní látce **JM24.1**. Nicméně experimentální hodnota rozpustnosti u **JM26.1·2Cl<sup>-</sup>** je 770,7 mg/ml, tedy o 311,1 mg/ml vyšší než u **JM24.1·2Cl<sup>-</sup>**. Při porovnání rozpustnosti *in silico* má nižší rozpustnost **JM26.1**, což odpovídá naší predikci. Neshodný výsledek mezi experimentální a vypočtenou rozpustností může být z několika důvodů. Jedním z důvodů může být omezenost *in silico* modelů stanovení rozpustnosti. Navázání methylových skupin vede zpravidla ke zvýšení lipofility a snížení rozpustnosti ve vodě. [76] Ale v určitých případech způsobí navázání methylových skupin zvýšení rozpustnosti ve vodě snížením energie krystalové mřížky, tím že methylové skupiny brání intermolekulárním interakcím zvyšujícím energii krystalové mřížky. [76, 91] Konkrétní příklad zvýšení rozpustnosti navázáním methylových skupin můžeme vidět u antibakteriálních sulfonamidů. Substituce pyrimidinové kruhu sulfadiazinu nejdříve jednou a poté dvěma methylovými skupinami způsobuje zvýšení rozpustnosti ve vodě. [76] Kromě energie krystalové mřížky má vliv na omezenost *in silico* modelů i teplota, závislost elektrolytů na pH a vliv polymorfních forem látek. [92] Obdobný vliv na rozpustnost bude pravděpodobně i při navázání isopropylu. Dalším důvodem nepredikovatelného rozdílu v rozpustnosti může být nepřesnost nebo omezení spojené s experimentální metodou

používanou ke stanovení rozpustnosti. Na základě struktury je zřejmé, že látka **JM26.1** má vyšší  $\text{clog}P$  než **JM24.1** (viz Tabulka 10). U látky **JM26.1** existuje dle modelu BOILED-Egg pravděpodobnost prostupu přes HEB, nicméně látka je substrátem P-glykoproteinu, a proto bychom neočekávali průnik látky do mozku.

Další látkou je **JM31.1**, jejíž aromatická část vychází z fenolu a v *o*-poloze aromatické části ( $R_2$ ) má navázanou methoxy skupinu a v *p*-poloze ( $R_4$ ) allyl. I u této látky bychom na základě struktury očekávali nižší rozpustnost v porovnání se základní látkou **JM24.1**, jelikož je substituována dvěma skupinami zvyšujícími lipofilitu molekuly. Nicméně látka **JM31.1·2Cl<sup>-</sup>** s rozpustností 695,4 mg/ml má vyšší rozpustnost o 235,8 mg/ml v porovnání s **JM24.1·2Cl<sup>-</sup>**. *In silico* rozpustnost také koreluje s předchozím případem, kdy **JM31.1** má rozpustnost nižší než **JM24.1**. Neshoda mezi experimentálními a vypočtenými hodnotami rozpustnosti je pravděpodobně způsobena stejnými vlivy jako u látky **JM26.1**. Můžeme usoudit, že allylová a methoxy skupina mohou narušit krystalinitu molekuly a snížit energii krystalové mřížky, což vede ke zvýšení rozpustnosti ve vodě.

Dále byly porovnány tři látky se stejným substituentem, který je u každé látky v jiné poloze aromatické části molekuly vycházející z fenolu a byl zhodnocen vliv polohy substituentu na rozpustnost a lipofilitu molekuly. Jedná se o látky **JM32.1** s methoxy skupinou v *o*-poloze ( $R_2$ ), **R17** s methoxy skupinou v *m*-poloze ( $R_3$ ) a **R22** s methoxy skupinou v *p*-poloze ( $R_4$ ). I u těchto látek dochází ke zvýšení *in vitro* rozpustnosti v porovnání se základní látkou **JM24.1·2Cl<sup>-</sup>**, což je pravděpodobně způsobeno vlivem na krystalinitu molekuly. Naopak *in silico* rozpustnost je u těchto látek nižší v porovnání se základní látkou. Z těchto tří látek má nejvyšší experimentálně změřenou rozpustnost látka **R17·2Cl<sup>-</sup>** ( $\geq 779,3$  mg/ml), poté **JM32.1·2Cl<sup>-</sup>** (753,8 mg/ml) a nejnižší rozpustnost má **R22·2Cl<sup>-</sup>** (545,6 mg/ml). U látek **JM32.1** a **R17** byla stanovena rozpustnost experimentálně i bez převedení na hydrochlorid. I zde byla naměřena vyšší experimentální rozpustnost u sloučeniny **R17** (594,0 mg/ml vs. **JM32.1** 493,0 mg/ml). Současně lze vidět zvýšení rozpustnosti látek převedením na sůl – hydrochlorid. Nicméně rozpustnost *in silico* nekoreluje s experimentálními výsledky, jelikož vykazuje stejnou rozpustnost pro látky **R17** a **R22** a nejnižší rozpustnost u látky **JM32.1**. Vliv polohy methoxy skupiny na rozpustnost je z výsledků zřejmý. Pro zvýšení rozpustnosti ve vodě je dle experimentálních hodnot nejméně výhodná *p*-poloha. Naopak nejvýhodnější pro

zvýšení rozpustnosti je methoxy skupina v *m*-poloze. Vliv polohy substituentů na rozpustnost ukazují i studie alkylačních agens založených na substituovaném indolu. U dvou studovaných sloučenin je odlišná pouze poloha substituentu na indolovém jádře (pozice 7 vs. pozice 6) a rozpustnost je nižší o 1000  $\mu\text{M}$  u látky se substituentem v poloze 7. [93] Poloha substituentu je nejspíše důležitá kvůli rozdílnému uspořádání krystalové mřížky. [3, 91] Methoxy skupina může ovlivňovat rozpustnost látek sterickými efekty a také elektron poskytujícím efektem v případě vazby na aromatickém jádře. [46, 94] Kyslík v methoxy skupině může vystupovat jako AHV a podílet se na tvorbě vodíkových vazeb a zvyšovat tak hydrataci molekuly nebo narušovat krystalickou strukturu. Na druhou stranu methoxy skupina může zvýšit  $\log P$  molekuly a vést ke snížení rozpustnosti. [91, 95] Z výše uvedeného vyplývá, že vliv methoxy skupiny na rozpustnost je různý a závisí na konkrétní struktuře molekuly. U látek **JM32.1**, **R17** a **R22** poloha methoxy skupiny ovlivňuje také hodnotu  $\text{clog}P$ , která je trochu vyšší u **JM32.1** a u **R17** a **R22** se téměř shoduje. Zajímavé je, že sloučeniny **R17** a **R22** mají dokonce nižší  $\text{clog}P$  než základní látka **JM24.1**.

Pro zhodnocení vlivu methoxy skupiny na lipofilitu a rozpustnost ve vodě porovnáme i látku **JM31.1** s látkou **JM32.1**. Sloučenina **JM32.1** má stejně jako **JM31.1** v *o*-poloze aromatické části ( $R_2$ ) methoxy skupinu, ale narušil od látky **JM31.1** nemá v *p*-poloze ( $R_4$ ) allyl. S ohledem na strukturu by látka **JM32.1** měla mít vyšší rozpustnost, protože je méně lipofilní, což se potvrdilo. Látka **JM32.1·2Cl<sup>-</sup>** s rozpustností 753,8 mg/ml má vyšší experimentální hodnotu rozpustnosti než **JM31.1·2Cl<sup>-</sup>** s rozpustností 695,4 mg/ml o 58,4 mg/ml a vypočtená rozpustnost je také vyšší u **JM32.1**. Na základě  $\text{clog}P$  lze pozorovat pouze malý vliv methoxy skupiny na lipofilitu, který můžeme vidět při porovnání **JM32.1** s  $\text{clog}P$  0,93 se základní látkou **JM24.1** s  $\text{clog}P$  0,81. Naopak u sloučeniny **JM31.1** obsahující allyl je  $\text{clog}P$  1,60.

Látka **JM30.1** má navázané dvě methoxy skupiny v *o*-polohách ( $R_2$  a  $R_6$ ) na aromatické části molekuly vycházející z fenolu. Na základě předchozích výsledků bychom očekávali zvýšení rozpustnosti v porovnání se základní látkou **JM24.1**, ale v porovnání se sloučeninami obsahujícími pouze jednu methoxy skupinu (**JM32.1**, **R17**, **R22**) bychom očekávali rozpustnost nižší. Experimentální hodnota rozpustnosti látky **JM30.1·2Cl<sup>-</sup>** je 670,9 mg/ml. Očekávané zvýšení rozpustnosti oproti základní látce se potvrdilo. Také se potvrdilo snížení rozpustnosti v porovnání s **JM32.1·2Cl<sup>-</sup>** a

**R17·2Cl**. Nicméně látka **R22·2Cl** s jednou methoxy skupinou v *p*-poloze má nižší rozpustnost než **JM30.1·2Cl**, což ukazuje na nevýhodu substituce *p*-polohy methoxy skupinou pro zvýšení rozpustnosti. *In silico* rozpustnost nekoreluje s experimentálními hodnotami, jelikož na jejich základě je látka **JM30.1** méně rozpustná než základní látka **JM24.1** a také než **R17** a **R22** a lépe rozpustná než **JM32.1**. Kvůli přítomnosti druhé methoxy skupiny u **JM30.1** má na vypočtenou rozpustnost oproti ostatním látkám vliv mírně vyšší TPSA a více AHV. Na neshodu mezi experimentální hodnotou a *in silico* hodnotou rozpustnosti ve vodě mají pravděpodobně vliv obdobné faktory jako v předchozích případech.

Sloučeniny **NŽ25** a **NŽ67** mají aromatickou část molekuly vycházející z fenolu se substituovanou nitro skupinou a methoxy skupinou. U látky **NŽ25** je nitro skupina navázána v *p*-poloze ( $R_4$ ) a methoxy skupina v *o*-poloze ( $R_2$ ) a naopak u látky **NŽ67** je nitro skupina navázána v *o*-poloze ( $R_2$ ) a methoxy skupina v *p*-poloze ( $R_4$ ). Na základě struktury a předchozích zkušenostech bylo očekáváno zvýšení rozpustnosti u obou látek vzhledem k základní látce **JM24.1**, neboť se předpokládá narušení krystalické struktury navázáním substituentů. U látky **NŽ25·2Cl** byla naměřena rozpustnost 520,4 mg/ml a u látky **NŽ67·2Cl** 773,1 mg/ml, tedy více než u základní látky **JM24.1·2Cl**. Nicméně podle vypočtené rozpustnosti je základní látka **JM24.1** rozpustnější pouze o 0,88 mg/ml, což je zanedbatelný rozdíl. Nedochází ke korelaci mezi vypočtenou a experimentální hodnotou. Vliv nitro skupiny na rozpustnost ve vodě může být pozitivní i negativní s ohledem na strukturu látky. Nitro skupina není hydrofilní, ale polární skupina, jelikož má velký dipólový moment. Ne všechny polární skupiny jsou hydrofilní. Nitro skupina je tvořena atomem dusíku a dvěma atomy kyslíku, které ale netvoří nebo tvoří velmi slabé vodíkové vazby. Podobné vlastnosti mají i karbonylové a esterové skupiny. [96] Z hlediska experimentálních hodnot je více rozpustná látka **NŽ67·2Cl** než **NŽ25·2Cl** s největší pravděpodobností kvůli vlivu polohy substituentů. Ovšem dle vypočtené rozpustnosti je rozpustnost substancí **NŽ67** a **NŽ25** identická. Výsledky mohou být zkresleny limitací námi použité metody měření rozpustnosti nebo omezeností *in silico* modelů ke stanovení rozpustnosti.

Měřené látky **NŽ46/47**, **NŽ36** a **NŽ37** mají chlorem substituovanou aromatickou část molekuly vycházející z fenolu. Látka **NŽ46/47** má navázaný chlor v *m*-poloze aromatické části ( $R_3$ ), látka **NŽ36** v *m*-poloze a *p*-poloze ( $R_3$  a  $R_4$ ) a látka **NŽ37** v

*o*-poloze, *m*-poloze a *p*-poloze (R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> a R<sub>5</sub>). Na základě struktury bylo u všech tří látek očekáváno snížení rozpustnosti v porovnání se základní látkou **JM24.1**. Substituce molekul chlorem zvyšuje lipofilitu molekuly, což by mělo vést ke snížení rozpustnosti ve vodě. Při navázání jednoho atomu chloru u **NŽ46/47**, dvou atomů chloru u **NŽ36** a následně tří atomů chloru u **NŽ37** by mělo dojít k postupnému poklesu rozpustnosti ve vodě. Rozpustnost *in silico* potvrzuje hypotézu, kdy dochází k postupnému zvýšení *clogP* a snížení rozpustnosti ve vodě v řadě **JM24.1** (základní látka), **NŽ46/47**, **NŽ36** a **NŽ37**. Nicméně v analogii předchozích experimentálních výsledků i u látek **NŽ46/47·2Cl** (788,0 mg/ml), **NŽ36·2Cl** (515,5 mg/ml) a **NŽ37·2Cl** (850,8 mg/ml) došlo ke zvýšení rozpustnosti ve vodě v porovnání s **JM24.1·2Cl**. Zároveň nejvíce rozpustnou z výše zmíněných je látka **NŽ37·2Cl** s trichlorsubstituovanou aromatickou částí molekuly a nejméně rozpustná je látka **NŽ36·2Cl** s dichlorsubstituovanou aromatickou částí molekuly. Jedná se o neobvyklý jev, kdy substituce molekuly třetím chlorem způsobí zvýšení rozpustnosti. Obecně je neobvyklé zvýšení rozpustnosti po navázání halogenu, konkrétně chloru. Zvýšení rozpustnosti po halogenaci molekuly ukazuje i studie sledující rozpustnost 6037 molekulárních párů, tedy dvojic lišících se pouze tím, že v jedné z nich je nahrazen atom vodíku halogenem. Největší část studovaných látek byla substituována chlorem, poté fluorem, poté bromem a nejméně jodem. U 67,7 % látek došlo po halogenaci ke snížení rozpustnosti ve vodě, u 12,4 % látek nedošlo ke změně v rozpustnosti a u 19,9 % látek došlo k nečekanému zvýšení rozpustnosti ve vodě. Největší vliv na rozpustnost měl jod, následovaný chlorem, bromem a fluorem. Zvýšení rozpustnosti po halogenaci souvisí pravděpodobně se změnou polarity a polarizovatelnosti. Vliv může mít také ionizace, velikost a tvar molekuly a energie krystalové mřížky. [97] Dle modelu BOILED-Egg existuje u látky **NŽ37** pravděpodobnost přestupu do mozku, nicméně se jedná o substrát P-glykoproteinu, což snižuje tuto pravděpodobnost.

Následující měřené látky mají aromatickou část molekuly vycházející z fenolu substituovanou fluorem. Jedná se o látky **NŽ38** s fluorem navázaným v *p*-poloze (R<sub>4</sub>) aromatické části molekuly a **NŽ40** s navázanými fluory v *m*-polohách a *p*-poloze (R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> a R<sub>5</sub>) aromatické části molekuly. Fluor stejně jako chlor způsobuje zvýšení lipofility a snížení rozpustnosti ve vodě. Nicméně v analogii chlorovaných látek bychom očekávali spíše zvýšení rozpustnosti v porovnání se základní látkou **JM24.1**. K většímu snížení rozpustnosti by mělo dojít při navázání tří atomů fluoru, tedy u látky **NŽ40**. Rozpustnost

*in silico* odpovídá snížení rozpustnosti v porovnání se základní látkou a zároveň potvrzuje i větší snížení rozpustnosti u látky **NŽ40**. Jinak je tomu u experimentálních hodnot, kdy u látky **NŽ38·2Cl** (298,1 mg/ml) s jedním atomem fluoru dochází ke snížení rozpustnosti v porovnání s látkou **JM24.1·2Cl**, od které byl odvozen. Avšak u látky **NŽ40·2Cl** (879,6 mg/ml) s třemi atomy fluoru dochází k výraznému zvýšení rozpustnosti v porovnání s **JM24.1·2Cl**. Zvýšení rozpustnosti navázáním jednoho nebo dvou atomů fluoru ukazuje studie sledující vliv halogenace v sérii selektivních A<sub>2B</sub> antagonistů adenosinových receptorů. [98] Ovlivnění rozpustnosti pravděpodobně způsobuje změna polaritativity a polarizovatelnosti, ale vliv může mít také ionizace, velikost a tvar molekuly a energie krystalové mřížky. [97] Nicméně je nutné brát v potaz i limitace metody měření rozpustnosti. Dle modelu BOILED-Egg existuje u látky **NŽ40** možnost přestupu do mozku, nicméně se jedná o substrát P-glykoproteinu, a proto je pravděpodobnost prostupu skrz HEB nízká.

Ke zhodnocení vlivu halogenace na rozpustnost je vhodné porovnat chlorované a fluorované látky. Při vzájemném porovnání látky **NŽ46/47** a **NŽ38** zjistíme, že pro zvýšení rozpustnosti ve vodě je výhodná substituce chlorem v *m*-poloze aromatické části molekuly **NŽ46/47·2Cl** nikoliv substituce fluorem v *p*-poloze aromatické části molekuly **NŽ38·2Cl**. Trisubstituované sloučeniny **NŽ37** a **NŽ40** mají velmi podobnou rozpustnost. Na základě experimentálních hodnot rozpustnosti je látka **NŽ37** se třemi navázanými atomy chloru více rozpustná nepřevedená na hydrochlorid než látka **NŽ40** nepřevedená na hydrochlorid. Naopak ve formě soli je více rozpustná látka **NŽ40·2Cl** v porovnání s **NŽ37·2Cl**. Neshodný rozdíl v rozpustnosti mezi látkou **NŽ37** a **NŽ40** před a po převedení na hydrochlorid může být způsoben limitací metody a také rozdílným zvýšením rozpustnosti po převedení na hydrochlorid. Pokud bychom vycházeli z rozpustnosti *in silico*, tak budou rozpustnější fluorované látky **NŽ38** a **NŽ40**, jelikož chlor je objemnější atom s vyšší atomovou hmotností a zároveň fluor může vystupovat jako AHV.

Podobně jako u výše zmíněných látek dochází ke zvýšení experimentální hodnoty rozpustnosti i u látky **NŽ39·2Cl** v porovnání se základní látkou **JM24.1·2Cl** o 596,5 mg/ml. Látka **NŽ39** je tvořena aromatickou částí vycházející z fenolu s chlorem navázaným v *o*-poloze (R<sub>2</sub>) a fluorem v *p*-poloze (R<sub>4</sub>). Na základě struktury je očekáváno snížení rozpustnosti ve vodě v porovnání se základní látkou, což u látky **NŽ39** potvrzuje

rozpustnost *in silico*. Zároveň zvýšení hodnoty  $clogP$  u **NŽ39** potvrzuje zvýšení lipofility zavedením halogenů do molekuly. Nicméně experimentální hodnota rozpustnosti nekoreluje s predikcí a rozpustností *in silico*. Látka **NŽ39·2Cl<sup>-</sup>** má ze všech měřených látek nejvyšší experimentálně stanovenou rozpustnost, konkrétně 1056,1 mg/ml. Na rozpuštění 1 g látky je potřeba méně než 1 ml rozpouštědla a dle ČL2023 se jedná o „velmi snadno rozpustnou“ sloučeninu. Zvýšení rozpustnosti je způsobeno zavedením chloru a fluoru do molekuly, což pravděpodobně způsobuje změnu polarizovatelnosti, ale vliv může mít také ionizace, velikost a tvar molekuly a energie krystalové mřížky. [97]

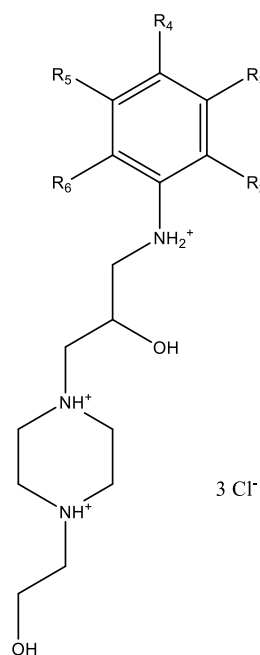
Látka **JM23.1** má navázaný methyl v *m*-poloze ( $R_3$ ) a chlor v *p*-poloze ( $R_4$ ) aromatické části molekuly vycházející z fenolu. Na základě struktury bychom očekávali snížení rozpustnosti v porovnání se základní látkou **JM24.1** z důvodu zavedení lipofilních substituentů v molekule **JM23.1**. Rozpustnost *in silico* a hodnota  $clogP$  potvrzují hypotézu. Experimentálně stanovená rozpustnost je u látky **JM23.1·2Cl<sup>-</sup>** 988,3 mg/ml, tedy o 528,7 mg/ml vyšší oproti základní látce **JM24.1·2Cl<sup>-</sup>**. Opět je vyvráceno odhadované snížení rozpustnosti zavedením lipofilních substituentů. Důvody neočekávaného zvýšení rozpustnosti jsou pravděpodobně obdobné jako u předchozích látek.

Další měřenou látkou je **NŽ58/69**, která má navázanou 4-fluorofenoxy skupinu v *p*-poloze ( $R_4$ ) aromatické části molekuly vycházející z fenolu. Je očekáváno snížení rozpustnosti oproti základní látce **JM24.1**, jelikož 4-fluorofenoxy skupina zvyšuje lipofilitu molekuly, čímž zvyšuje hodnotu  $clogP$  a snižuje rozpustnost ve vodě. V analogii předchozích látek odhadované snížení rozpustnosti potvrzuje hodnota rozpustnosti *in silico*, avšak experimentální hodnota rozpustnosti látky **NŽ58/69·2Cl<sup>-</sup>** je 654,0 mg/ml, tedy o 194,4 mg/ml vyšší v porovnání se základní látkou **JM24.1·2Cl<sup>-</sup>**. Podobně jako u methoxy skupiny by mohl kyslík v 4-fluorofenoxy skupině vystupovat jako AHV a podílet se na tvorbě vodíkových vazeb a zvyšovat tak hydrataci molekuly nebo narušovat krystalickou strukturu molekuly a důsledkem může být zvýšení rozpustnosti ve vodě. Dle modelu BOILED-Egg existuje pravděpodobnost přestupu látky **NŽ58/69** do mozku, nicméně se jedná o substrát P-glykoproteinu, a proto je šance na přestup přes HEB nízká.

Látky **NŽ48/49** a **NŽ68** mají nitro skupinou a chlorem nebo fluorem substituovanou aromatickou část molekuly vycházející z fenolu. Látka **NŽ48/49** je substituována fluorem v *o*-poloze ( $R_2$ ) a nitro skupinou v *p*-poloze ( $R_4$ ) a látka **NŽ68** je substituována nitroskupinou v *m*-poloze ( $R_3$ ) a chlorem v *p*-poloze ( $R_4$ ). Podle struktury bychom očekávali snížení rozpustnosti u obou látek oproti základní látce **JM24.1**. Nicméně experimentální rozpustnost je vyšší u **NŽ48/49·2Cl<sup>-</sup>** (821,3 mg/ml) i u **NŽ68·2Cl<sup>-</sup>** (607,6 mg/ml) v porovnání s **JM24.1·2Cl<sup>-</sup>** (459,6 mg/ml). Vliv substituentů na rozpustnost je popsán výše a i zde je pravděpodobně stejný jako u předchozích substancí a zvýšení rozpustnosti je nejspíše způsobeno vlivem na energii krystalové mřížky. Experimentální hodnoty rozpustnosti nekorelují s rozpustností *in silico*, která je nižší u látek **NŽ48/49** a **NŽ68** než u základní látky. Halogeny obvykle zvyšují lipofilitu a snižují rozpustnost ve vodě. Nitroskupina není hydrofilní, ale polární skupina, jelikož má velký dipólový moment. Ne všechny polární skupiny jsou hydrofilní. Nitroskupina netvoří nebo tvoří velmi slabé vodíkové vazby. [96] Proto je rozpustnost *in silico* nižší v porovnání se základní látkou **JM24.1**. Rozpustnost *in silico* je vyšší a zároveň *clogP* nižší u látky **NŽ48/49** oproti **NŽ68**, jelikož obsahuje atom fluoru, který může vystupovat jako AHV.

Poslední měřenou sloučeninou odvozenou od základní látky **JM24.1** je sloučenina **JM4.1** s aromatickou částí vycházející z fenolu náhradou benzenového jádra za naftalen. Kvůli přítomnosti polycyklického uhlovodíku – naftalenu bychom očekávali u látky **JM4.1** nižší rozpustnost než u základní látky. Experimentální hodnota rozpustnosti látky **JM4.1·2Cl<sup>-</sup>** je 36,2 mg/ml, tedy o 423,4 mg/ml nižší než u látky **JM24.1·2Cl<sup>-</sup>**, což potvrzuje očekávání. S experimentálními výsledky koreluje rozpustnost *in silico*, která je také nižší u látky **JM4.1** a zároveň je u látky **JM4.1** vyšší *clogP* než u **JM24.1**. Sloučeninu **JM4.1** považujeme za vysoce rozpustnou ve vodě, i když se jedná o nejméně rozpustnou sloučeninu z měřených látek.

Následující sloučeniny jsou odvozeny od základní látky **JM56.1** s nesubstituovanou aromatickou částí molekuly vycházející z anilinu (Obrázek 11). Nejprve byla porovnána rozpustnost a vliv struktury na rozpustnost dvou anilinových derivátů (viz Tabulka 8) se základní látkou **JM56.1** s *in vitro* rozpustností 82,5 mg/ml ve formě soli a *in silico* rozpustností 6,77 mg/ml a zároveň vzájemně mezi vybranými anilinovými a fenolovými deriváty.



Obrázek 11: Obecný vzorec látek s aromatickou částí molekuly vycházející z anilinu

První látkou je **NŽ76**, jejíž aromatická část molekuly vychází z anilinu a v *o*-poloze ( $R_2$ ) má navázanou methoxy skupinu a v *p*-poloze ( $R_4$ ) nitro skupinu. Experimentální rozpustnost sloučeniny **NŽ76·3Cl<sup>-</sup>** je 770,2 mg/ml, tedy vyšší o 687,7 mg/ml než rozpustnost základní látky **JM56.1·3Cl<sup>-</sup>**. Znovu byl pozorován stejný jev zvýšení rozpustnosti navázáním substituentu na aromatickou část molekuly pravděpodobně snížením energie krystalové mřížky. Zároveň můžeme vidět limitaci výpočtu rozpustnosti metodou ESOL jako je nezohlednění prostorového uspořádání molekuly, jelikož využívá pouze parametry vycházející z 2D struktury látek. [89] Proto je rozpustnost *in silico* vyšší u základní látky **JM56.1**.

Z hlediska rozpustnosti je vhodné porovnat látky **NŽ76** a **NŽ25**, neboť se liší pouze základem aromatické části molekuly. U substance **NŽ76** je základem aromatické části molekuly anilin a u **NŽ25** fenol. Rozpustnější je látka **NŽ76·3Cl<sup>-</sup>** o 249,8 mg/ml než **NŽ25·2Cl<sup>-</sup>**. Vyšší rozpustnost sloučeniny **NŽ76** pravděpodobně lze vysvětlit vlivem substituentů na acidobazické vlastnosti molekuly. Dusík v **NŽ76** je součástí aromatického aminu, který vykazuje nižší bazicitu ve srovnání s alifatickými aminy. Pokud je methoxy skupina navázána na aromatické jádro, tak funguje jako elektron poskytující skupina, což umožňuje přenos elektronů na dusík v její blízkosti. Vlivem přenosu elektronů se může mírně zvýšit bazicita aromatického aminu, což následně při ionizaci ve vodě může vést

ke zvýšení rozpustnosti sloučeniny **NŽ76**. Podle vypočtené rozpustnosti jsou látky **NŽ76** a **NŽ25** prakticky stejně rozpustné. Tuto shodu lze vysvětlit dalším nedostatkem metod výpočtu rozpustnosti. Metody výpočtu rozpustnosti obvykle nezohledňují  $pK_A$  látek a pH prostředí, které mohou v případě kyselých nebo bazických látek ovlivnit výslednou rozpustnost ve vodě.

Druhou látkou je **NŽ489** s dichlorsubstituovanou aromatickou částí molekuly vycházející z anilinu. Chlor je navázán v *m*-poloze a *p*-poloze ( $R_3$  a  $R_4$ ). S ohledem na strukturu bychom očekávali snížení rozpustnosti ve vodě a zvýšení lipofility molekuly v porovnání se základní látkou **JM56.1**. Experimentální rozpustnost je nižší o 24,1 mg/ml u substance **NŽ489·3Cl** (58,4 mg/ml) oproti **JM56.1·3Cl** (82,5 mg/ml). Zároveň i vypočtená rozpustnost je nižší a *clogP* vyšší u látky **NŽ489**. Odhadované snížení rozpustnosti navázáním dvou atomů chloru se u molekuly **NŽ489** potvrdilo pomocí *in silico* i experimentální rozpustnosti ve vodě. Současně dochází i ke shodě mezi naměřenými výsledky a studií zmíněnou výše, kdy halogenace molekul u řady látek způsobila snížení rozpustnosti, ale u některých naopak došlo ke zvýšení.

Vhodné je porovnat rozpustnost látek **NŽ489** a **NŽ36**, jelikož obě látky mají dichlorsubstituovanou aromatickou část molekuly v *m*-poloze a *p*-poloze ( $R_3$  a  $R_4$ ) a liší se pouze tím, že u **NŽ489** vychází aromatická část z anilinu a u **NŽ36** z fenolu. Rozdíl v rozpustnosti *in silico* je minimální, ale rozdíl je v hodnotě *clogP*, která je vyšší skoro o jedna u **NŽ36**. I přesto je experimentální rozpustnost vyšší o 457,1 mg/ml u **NŽ36·2Cl**, což je pravděpodobně způsobeno snížením energie krystalové mřížky.

Rozpustnost představuje komplexní fenomén, a proto je obtížné odhadnout vliv substituentů a funkčních skupin na rozpustnost. Komplexností rozpustnosti je ovlivněna i schopnost *in silico* modelů predikovat rozpustnost ve vodě. Predikce rozpustnosti ve vodě je složitá i díky problémům spojených s reprodukovatelností experimentálních dat, na jejichž základě jsou vytvářeny *in silico* modely. [99] Nevýhodou *in silico* modelů je nezohlednění řady faktorů ovlivňujících rozpustnost jako je energie krystalové mřížky, teplota, závislost elektrolytů na pH a vliv polymorfních forem látek. [92] Dalším nepredikovatelným faktorem je povaha sloučenin jako jsou solvatomorfní formy, hydráty, soli a polymorfní formy látek. [100] Řada substituentů a funkčních skupin jako jsou např. halogeny může mít neočekávaný vliv na rozpustnost resp. mohou zvyšovat

rozpustnost ve vodě. Vliv na rozpustnost je pravděpodobně dán vlivem na ionizaci, velikost a tvar molekuly, energii krystalové mřížky, polaritu a polarizovatelnost. [97]

## 7 Závěr

Celkem byla stanovena rozpustnost ve vodě u 23 látek ve formě hydrochloridové soli, z toho u čtyř látek i ve formě baze. Rozpustnost byla porovnávána se základní látkou a v rámci strukturně příbuzných skupin. Všechny měřené látky můžeme z pohledu zařazení označit za vysoce rozpustné. Stanovené hodnoty rozpustnosti zpravidla neodpovídají předpokladům, jelikož na základě struktury bylo očekáváno snížení rozpustnosti při navázání skupin zvyšujících lipofilitu v porovnání se základní látkou. Paradoxně u většiny měřených látek došlo ke zvýšení *in vitro* rozpustnosti ve vodě oproti predikcím. V případě *in silico* rozpustnosti odpovídá vliv substituentů na rozpustnost očekávaným trendům, a proto u měřených látek nedochází ke korelaci mezi *in vitro* a *in silico* rozpustností. Potvrdilo se zvýšení rozpustnosti ve vodě převedením na hydrochloridovou sůl.

Ze získaných výsledků vyplývá, že navázání methoxy skupiny na aromatickou část molekuly vede ke zvýšení rozpustnosti měřených látek ve vodě ve srovnání se základní látkou. Nejméně výhodné je navázání methoxy skupiny do *p*-polohy aromatické části molekuly v porovnání s *o*-polohou a *m*-polohou. Obdobně i při vazbě chloru nebo fluoru na aromatickou část molekuly dochází ke zvýšení rozpustnosti, kdy se nejvýhodněji jeví kombinace navázání fluoru a chloru, případně trisubstituce chlorem nebo fluorem. Samotné navázání fluoru v *p*-poloze vedlo dokonce ke snížení rozpustnosti oproti základní látce, což naznačuje, že substituce *p*-polohy měřených látek není z hlediska rozpustnosti příznivá. K vyšší rozpustnosti ve vodě rovněž přispělo zavedení dalších funkčních skupin jako je allyl, isopropyl, methyl a nitro skupina. Kondenzace dalšího aromatického jádra výrazně snížila rozpustnost sloučeniny.

Neočekávané poznatky o vlivu substituentů na rozpustnost mohou pomoci při navrhování nových nebo při modifikaci struktur stávajících malých molekul s potenciální radioprotektivní aktivitou s cílem získat molekuly s optimalizovanou farmakokinetikou, požadovaným účinkem a nižší rizikem vedlejších účinků. Údaje o rozpustnosti jsou limitujícím faktorem obecně pro další testování látek *in vitro* a případně dále i *in vivo*.

## 8 Seznam tabulek

|  |    |
|--|----|
| Tabulka 1: Třídy rozpustnosti dle ČL 2023 .....  | 15 |
| Tabulka 2: Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS).....   | 16 |
| Tabulka 3: Biofarmaceutický klasifikační systém distribuce léčiv (BDDCS) +<br>převládající způsoby eliminace a efekt transportérů..... | 18 |
| Tabulka 4: Příklady závislosti mezi vnitřní rozpustností, pH a $pK_A$ .....  | 21 |
| Tabulka 5: Vybrané kyselé a zásadité funkční skupiny a jejich rozmezí $pK_A$ .....   | 39 |
| Tabulka 6: Metodologie pro stanovení vodné rozpustnosti ve výzkumu a vývoji léčiv  | 49 |
| Tabulka 7: Měřené látky 1 .....  | 57 |
| Tabulka 8: Měřené látky 2 .....  | 59 |
| Tabulka 9: Parametry získané během stanovení rozpustnosti měřených látek.....  | 60 |
| Tabulka 10: Vlastnosti měřených látek ovlivňující rozpustnost a jejich rozpustnost <i>in<br/>silico</i> v neutrální formě .....        | 61 |
| Tabulka 11: Klasifikační rozmezí rozpustnosti .....  | 63 |

## 9 Seznam grafů

|   |    |
|---|----|
| Graf 1: Porovnání kinetické a termodynamické rozpustnosti souboru 465 strukturálně různorodých sloučenin..... | 14 |
| Graf 2: Vypočtená závislost rozpustnosti benzylaminu ve vodě na pH .....                                      | 22 |
| Graf 3: Vypočtená závislost rozpustnosti benzoové kyseliny ve vodě na pH .....                                | 22 |
| Graf 4: Vypočtená závislost rozpustnosti 4-(aminomethyl)benzoové kyseliny ve vodě na pH.....                  | 23 |
| Graf 5: Hypotetický příklad, jak dokáže logP ovlivnit p.o. BAV u série sloučenin.....                         | 26 |
| Graf 6: Lineární korelace mezi hodnotami logP a počtem methylenových skupin v alkyl 4-hydroxybenzoátu .....   | 26 |
| Graf 7: Profil permeability a rozpustnosti kyselé látky s hodnotou pKA 5.....                                 | 35 |
| Graf 8: Absorpční spektrum látky NŽ37 .....   | 52 |
| Graf 9: Kalibrační křivka látky NŽ37.....   | 52 |
| Graf 10: Absorpční spektrum látky NŽ428 .....   | 64 |

## 10 Seznam obrázků

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 1: Vliv pH na distribuci slabé kyseliny ( $pK_A = 4,4$ ) mezi plazmou a žaludeční tekutinou oddělenými lipidovou bariérou..... | 36 |
| Obrázek 2: $H_1$ -antihistaminika první generace: Promethazin a difenhydramin .....  | 37 |
| Obrázek 3: $H_1$ -antihistaminika druhé generace: Cetirizin a fexofenadin .....  | 37 |
| Obrázek 4: Karbidopa, gabapentin a alprostadil.....  | 38 |
| Obrázek 5: Inhibitory HMG-CoA reductázy – atorvastatin a rosuvastatin .....  | 41 |
| Obrázek 6: Základní uspořádání spektrofotometrů .....  | 45 |
| Obrázek 7: Webový nástroj SwissADME – výchozí rozhraní .....   | 54 |
| Obrázek 8: Webový nástroj SwissADME – vygenerované informace o měřené látce JM24.1 .....   | 55 |
| Obrázek 9: Webový nástroj SwissADME – prediktivní model BOILED-Egg látky JM24.1. ....  | 56 |
| Obrázek 10: Obecný vzorec látek s aromatickou částí molekuly vycházející z fenolu..  | 66 |
| Obrázek 11: Obecný vzorec látek s aromatickou částí molekuly vycházející z anilinu..   | 74 |

## 11 Seznam rovnic

|   |    |
|---|----|
| Rovnice 1: Reakce kyseliny a vody za vzniku anionu kyseliny a oxoniového kationu .    | 19 |
| Rovnice 2: Reakce zásady a vody za vzniku kationu zásady a hydroxidového anionu .     | 20 |
| Rovnice 3: Rozpustnost jednomocných kyselin v rovnovážném stavu .....                 | 20 |
| Rovnice 4: Rozpustnost jednomocných zásad v rovnovážném stavu.....                    | 20 |
| Rovnice 5: Henderson-Hasselbalchova rovnice .....                                     | 20 |
| Rovnice 6: Výpočet rozpustnosti kyselin na základě znalosti $S_0$ , pH a $pK_A$ ..... | 20 |
| Rovnice 7: Výpočet rozpustnosti zásad na základě znalosti $S_0$ , pH a $pK_A$ .....   | 20 |
| Rovnice 8: Výpočet rozdělovacího koeficientu pro logP .....                           | 25 |
| Rovnice 9: Výpočet rozdělovacího koeficientu pro logD .....                           | 25 |
| Rovnice 10: Výpočet logP .....  | 25 |
| Rovnice 11: Výpočet logD .....  | 25 |
| Rovnice 12: Výpočet logD bazických léčiv při pH 7,4. ....                             | 27 |
| Rovnice 13: Obecná rovnice rozpustnosti. ....   | 31 |
| Rovnice 14: Lambert-Beerův zákon. ....  | 44 |
| Rovnice 15: Upravená rovnice kalibrační přímky .....                                  | 53 |
| Rovnice 16: Rovnice pro výpočet koncentrace měřené látky.....                         | 53 |

## 12 Použitá literatura

- [1] LOSADA-BARREIRO, Sonia, Sumeyye CELIK, Zerrin SEZGIN-BAYINDIR, Sofia BRAVO-FERNÁNDEZ a Carlos BRAVO-DÍAZ. Carrier Systems for Advanced Drug Delivery: Improving Drug Solubility/Bioavailability and Administration Routes. *Pharmaceutics* [online]. 2024, **16**(7), 852 [vid. 2024-08-21]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics16070852
- [2] COLTESCU, Anamaria-Roxana, Monica BUTNARIU a Ioan SARAC. The Importance of Solubility for New Drug Molecules. *Biomedical and Pharmacology Journal* [online]. 2020, **13**(2), 577–583 [vid. 2024-08-21]. Dostupné z: <https://biomedpharmajournal.org/vol13no2/the-importance-of-solubility-for-new-drug-molecules/>
- [3] KERNS, Edward Harvel a Li DI. *Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization*. Amsterdam Boston: Academic Press, 2008. ISBN 978-0-12-369520-8.
- [4] 2.1.5: Spectrophotometry. *Chemistry LibreTexts* [online]. 2013 [vid. 2025-03-09]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Kinetics/02%3A\\_Reaction\\_Rates/2.01%3A\\_Experimental\\_Determination\\_of\\_Kinetics/2.1.05%3A\\_Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry)
- [5] SINGH, Namrata, Ondřej SOUKUP, Zdeněk FIŠAR a Kamil KUČA. METHOD OPTIMIZATION FOR DETERMINATION OF DRUG SOLUBILITY LIMIT. *Military Medical Science Letters* [online]. 2017, **86**(1), 11–16 [vid. 2025-02-14]. ISSN 03727025, 03727025. Dostupné z: doi:10.31482/mmsl.2017.003
- [6] MARTIN, Alfred N., Patrick J. SINKO a Yashveer SINGH. *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences: physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences*. 6th ed., 50th anniversary ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. ISBN 978-0-7817-9766-5.
- [7] SMITH, Blaine Templar. *Remington Education: Physical Pharmacy*. B.m.: Pharmaceutical Press, 2015. ISBN 978-0-85711-106-7.
- [8] SUGANO, Kiyohiko, Arimichi OKAZAKI, Shohei SUGIMOTO, Sumitra TAVORNVIPAS, Atsushi OMURA a Takashi MANO. Solubility and dissolution profile assessment in drug discovery. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* [online]. 2007, **22**(4), 225–254. ISSN 1347-4367. Dostupné z: doi:10.2133/dmpk.22.225
- [9] SAAL, Christoph a Anna Christine PETEREIT. Optimizing solubility: Kinetic versus thermodynamic solubility temptations and risks. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2012, **47**(3), 589–595 [vid. 2024-11-12]. ISSN 0928-0987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2012.07.019

- [10] KERNS, Edward H., Li DI a Guy T. CARTER. In vitro solubility assays in drug discovery. *Current Drug Metabolism* [online]. 2008, **9**(9), 879–885. ISSN 1389-2002. Dostupné z: doi:10.2174/138920008786485100
- [11] *Český lékopis 2023 : Pharmacopoea bohemica MMXXIII : (Ph. B. MMXXIII)*. První vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2023. ISBN 978-80-271-5059-5.
- [12] OKÁČOVÁ, Ladislava, David VETCHÝ, Aleš FRANC, Miloslava RABIŠKOVÁ a Bohumil KRATOCHVÍL. Zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek jejich modifikací. *Chem. Listy* [online]. 2010, **104**(1), 21–26. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010\\_01\\_21-26.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_01_21-26.pdf)
- [13] AMIDON, Gordon L., Hans LENNERNÄS, Vinod P. SHAH a John R. CRISON. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research* [online]. 1995, **12**(3), 413–420. ISSN 1573-904X. Dostupné z: doi:10.1023/A:1016212804288
- [14] FDA/CDER/"PURDIE, Florine P". Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry. 2017.
- [15] LINDENBERG, Marc, Sabine KOPP a Jennifer B DRESSMAN. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2004, **58**(2), The International Association of Pharmaceutical Technology (APV), 265–278 [vid. 2024-08-21]. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2004.03.001
- [16] YU, Lawrence X., Gordon L. AMIDON, James E. POLLI, Hong ZHAO, Mehul U. MEHTA, Dale P. CONNER, Vinod P. SHAH, Lawrence J. LESKO, Mei-Ling CHEN, Vincent H. L. LEE a Ajaz S. HUSSAIN. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical Research* [online]. 2002, **19**(7), 921–925. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1023/a:1016473601633
- [17] ALSENZ, Jochem a Manfred KANSY. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2007, **59**(7), Drug Solubility: How to Measure it, How to Improve it, 546–567 [vid. 2024-08-22]. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2007.05.007
- [18] VARMA, Manthena, Sateesh KHANDAVILLI, Yasvanth ASHOKRAJ, Amit JAIN, Anandbabu DHANIKULA, Anurag SOOD, Narisetty THOMAS, Omathanu PILLAI, Pradeep SHARMA, Rajesh GANDHI, Shrutidevi AGRAWAL, Vinod NAIR a Ramesh PANCHAGNULA. Biopharmaceutic Classification System: A Scientific Framework for Pharmacokinetic Optimization in Drug Research. *Current Drug Metabolism* [online]. 2004, **5**(5), 375–388 [vid. 2024-08-22]. ISSN 13892002. Dostupné z: doi:10.2174/1389200043335423
- [19] KAWABATA, Yohei, Koichi WADA, Manabu NAKATANI, Shizuo YAMADA a Satomi ONOUE. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on

- biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2011, **420**(1), 1–10 [vid. 2024-08-22]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2011.08.032
- [20] KASIM, Nehal A., Marc WHITEHOUSE, Chandrasekharan RAMACHANDRAN, Marival BERMEJO, Hans LENNERNÄS, Ajaz S. HUSSAIN, Hans E. JUNGINGER, Salomon A. STAVCHANSKY, Kamal K. MIDHA, Vinod P. SHAH a Gordon L. AMIDON. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2004, **1**(1), 85–96 [vid. 2024-08-22]. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/mp034006h
- [21] WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* [online]. 2008, **50**(3) [vid. 2024-08-22]. ISSN 0036-4665. Dostupné z: doi:10.1590/S0036-46652008000300013
- [22] VRANÍKOVÁ, Barbora a Jan GAJDZIOK. Methods used in pharmaceutical technology to increase bioavailability of poorly soluble drugs after oral administration. *Česká a slovenská farmacie* [online]. 2015, **64**(5), 159–172 [vid. 2025-05-01]. ISSN 1210-7816, 1805-4439. Dostupné z: doi:10.36290/csf.2015.035
- [23] WU, Chi-Yuan a Leslie Z. BENET. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharmaceutical Research* [online]. 2005, **22**(1), 11–23. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-004-9004-4
- [24] BEHERA, AL, Su SAHOO a Sachinkumar PATIL. Enhancement of solubility: A pharmaceutical overview. *Der Pharmacia Lettre*. 2010, **2**, 310–318.
- [25] GONG, Yuchuan, David GRANT a Harry BRITAIN. Principles of Solubility. In: *Biotechnol: Pharm Aspects* [online]. 2007, s. 1–27. ISBN 978-0-387-69149-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-69154-1\_1
- [26] MOTA, Fátima L., Aristides P. CARNEIRO, António J. QUEIMADA, Simão P. PINHO a Eugénia A. MACEDO. Temperature and solvent effects in the solubility of some pharmaceutical compounds: Measurements and modeling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2009, **37**(3), 499–507 [vid. 2024-08-26]. ISSN 0928-0987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2009.04.009
- [27] ATKINS, Peter, Julio De PAULA a James KEELER. *Atkins' Physical Chemistry* [online]. 12. vyd. B.m.: Oxford University Press, 2022 [vid. 2024-08-26]. ISBN 978-0-19-884781-6. Dostupné z: doi:10.1093/hesc/9780198847816.001.0001
- [28] POBUDKOWSKA, A. a U. DOMAŃSKA. Study of pH-dependent drugs solubility in water. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* [online]. 2014, **20**(1), 115–126 [vid. 2024-08-27]. ISSN 1451-9372, 2217-7434. Dostupné z: doi:10.2298/CICEQ120531116P

- [29] KAUR, Navpreet, Ajit NARANG a Arvind Kumar BANSAL. Use of biorelevant dissolution and PBPK modeling to predict oral drug absorption. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2018, **129**, 222–246 [vid. 2024-08-27]. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2018.05.024
- [30] LEE, Yung-Chi, Philip D ZOCHARSKI a Brian SAMAS. An intravenous formulation decision tree for discovery compound formulation development. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2003, **253**(1), 111–119 [vid. 2024-08-28]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(02)00704-4
- [31] HENDRIKSEN, Barry A., Manuel V. Sanchez FELIX a Michael B. BOLGER. The composite solubility versus pH profile and its role in intestinal absorption prediction. *AAPS pharmSci* [online]. 2003, **5**(1), E4. ISSN 1522-1059. Dostupné z: doi:10.1208/050104
- [32] FLORENCE, Alexander T. a David ATTWOOD. *Physicochemical principles of pharmacy*. 4. ed., reprinted. London: Pharmaceutical Press, 2007. ISBN 978-0-85369-608-7.
- [33] RAHMAN, Asim, Md. Faheem HAIDER, Nazish NASEEM a Nafisur RAHMAN. Solubility of Drugs, Their Enhancement, Factors Affecting and Their Limitations: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* [online]. 2023, **79**, 78–94. Dostupné z: doi:10.47583/ijpsrr.2023.v79i02.014
- [34] VARMA, Manthena, Sateesh KHANDAVILLI, Yasvanth ASHOKRAJ, Amit JAIN, Anandbabu DHANIKULA, Anurag SOOD, Narisetty THOMAS, Omathanu PILLAI, Pradeep SHARMA, Rajesh GANDHI, Shrutidevi AGRAWAL, Vinod NAIR a Ramesh PANCHAGNULA. Biopharmaceutic Classification System: A Scientific Framework for Pharmacokinetic Optimization in Drug Research. *Current Drug Metabolism* [online]. 2004, **5**(5), 375–388 [vid. 2024-08-30]. ISSN 13892002. Dostupné z: doi:10.2174/1389200043335423
- [35] LOBO, Sonia. Is there enough focus on lipophilicity in drug discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery* [online]. 2020, **15**(3), 261–263 [vid. 2024-08-30]. ISSN 1746-0441. Dostupné z: doi:10.1080/17460441.2020.1691995
- [36] SWAIN, Chris. LogD. *Cambridge MedChem Consulting* [online]. [vid. 2024-08-30]. Dostupné z: [https://www.cambridgemedchemconsulting.com//resources//resources/lead\\_optimisation//resources/physiochem//resources/physiochem/logD.html](https://www.cambridgemedchemconsulting.com//resources//resources/lead_optimisation//resources/physiochem//resources/physiochem/logD.html)
- [37] KASIM, Nehal A., Marc WHITEHOUSE, Chandrasekharan RAMACHANDRAN, Marival BERMEJO, Hans LENNERNÄS, Ajaz S. HUSSAIN, Hans E. JUNGINGER, Salomon A. STAVCHANSKY, Kamal K. MIDHA, Vinod P. SHAH a Gordon L. AMIDON. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2004, **1**(1), 85–96 [vid. 2024-08-31]. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/mp034006h
- [38] SOARES, José X., Álvaro SANTOS, Carla FERNANDES a Madalena M. M. PINTO. Liquid Chromatography on the Different Methods for the Determination of

- Lipophilicity: An Essential Analytical Tool in Medicinal Chemistry. *Chemosensors* [online]. 2022, **10**(8), 340 [vid. 2024-08-31]. ISSN 2227-9040. Dostupné z: doi:10.3390/chemosensors10080340
- [39] LU, Dajuan, Peter CHAMBERS, Peter WIPF, Xiang-Qun XIE, Danielle ENGLERT a Stephen WEBER. Lipophilicity screening of novel drug-like compounds and comparison to clog *P*. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1258**, 161–167 [vid. 2024-08-31]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.07.078
- [40] TALBOT, Rich. What are the limitations of CLogP? *Revvity Signals* [online]. 2021 [vid. 2024-08-31]. Dostupné z: <https://support.revvitysignals.com/hc/en-us/articles/4408233561620-What-are-the-limitations-of-CLogP>
- [41] BERGSTRÖM, Christel A. S. a Mehran YAZDANIAN. Lipophilicity in Drug Development: Too Much or Not Enough? *The AAPS journal* [online]. 2016, **18**(5), 1095–1100. ISSN 1550-7416. Dostupné z: doi:10.1208/s12248-016-9947-5
- [42] CHEN, Zhi a Stephen G. WEBER. High-Throughput Method for Lipophilicity Measurement. *Analytical Chemistry* [online]. 2007, **79**(3), 1043–1049 [vid. 2024-08-31]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac061649a
- [43] TIMMERMAN, H. Why are non-sedating antihistamines non-sedating? *Clinical & Experimental Allergy* [online]. 1999, **29**(S3), 13–18 [vid. 2024-08-30]. ISSN 1365-2222. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2222.1999.00003.x-i1
- [44] LIPINSKI, Christopher A., Franco LOMBARDO, Beryl W. DOMINY a Paul J. FEENEY. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1997, **23**(1), In Vitro Models for Selection of Development Candidates, 3–25 [vid. 2024-09-04]. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(96)00423-1
- [45] ABRAHAM, Michael H, Adam IBRAHIM, Andreas M ZISSIMOS, Yuan H ZHAO, John COMER a Derek P REYNOLDS. Application of hydrogen bonding calculations in property based drug design. *Drug Discovery Today* [online]. 2002, **7**(20), 1056–1063 [vid. 2024-09-06]. ISSN 1359-6446. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-6446(02)02478-9
- [46] HARROLD, Marc W. a Robin M. ZAVOD. *Basic Concepts in Medicinal Chemistry* [online]. B.m.: ASHP, 2022 [vid. 2024-10-10]. ISBN 978-1-58528-695-9. Dostupné z: doi:10.37573/9781585286959
- [47] LIPINSKI, Christopher A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [online]. 2000, **44**(1), Current Directions in Drug Discovery: A Review of Modern Techniques, 235–249 [vid. 2024-09-04]. ISSN 1056-8719. Dostupné z: doi:10.1016/S1056-8719(00)00107-6
- [48] LIPINSKI, Christopher A. Rule of five in 2015 and beyond: Target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project

- decisions. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2016, **101**, Understanding the challenges of beyond-rule-of-5 compounds, 34–41 [vid. 2024-09-09]. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2016.04.029
- [49] *Study Details | Study of Oral Navitoclax Tablet In Combination With Oral Ruxolitinib Tablet When Compared With Oral Ruxolitinib Tablet To Assess Change In Spleen Volume In Adult Participants With Myelofibrosis | ClinicalTrials.gov* [online]. [vid. 2024-09-05]. Dostupné z: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04472598>
- [50] VEBER, Daniel F., Stephen R. JOHNSON, Hung-Yuan CHENG, Brian R. SMITH, Keith W. WARD a Kenneth D. KOPPLE. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2002, **45**(12), 2615–2623. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm020017n
- [51] BAKHT, Mohammed Afroz, M. SHAHAR YAR, Anees A. SIDDIQUI, M. M. ABDULLAH, Hamadeh TARAZI, Moawiah M. NAFFAA a Ahmed M-ALAFEEFY. Molecular properties prediction, synthesis, and diuretic activity of phenoxy acetic acid bearing pyrazolines. *Medicinal Chemistry Research* [online]. 2013, **22**(2), 916–926 [vid. 2024-09-15]. ISSN 1554-8120. Dostupné z: doi:10.1007/s00044-012-0086-y
- [52] DITZINGER, Felix, Daniel J. PRICE, Alexandra-Roxana ILIE, Niklas J. KÖHL, Sandra JANKOVIC, Georgia TSAKIRIDOU, Simone ALEANDRI, Lida KALANTZI, René HOLM, Anita NAIR, Christoph SAAL, Brendan GRIFFIN a Martin KUENTZ. Lipophilicity and hydrophobicity considerations in bio-enabling oral formulations approaches - a PEARRL review. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2019, **71**(4), 464–482. ISSN 2042-7158. Dostupné z: doi:10.1111/jphp.12984
- [53] ALANTARY, Doaa a Samuel YALKOWSKY. Comments on prediction of the aqueous solubility using the general solubility equation (GSE) versus a genetic algorithm and a support vector machine model. *Pharmaceutical Development and Technology* [online]. 2018, **23**(7), 739–740 [vid. 2024-09-12]. ISSN 1083-7450, 1097-9867. Dostupné z: doi:10.1080/10837450.2017.1321663
- [54] RAN, Yingqing, Yan HE, Gang YANG, Jennifer L. H. JOHNSON a Samuel H. YALKOWSKY. Estimation of aqueous solubility of organic compounds by using the general solubility equation. *Chemosphere* [online]. 2002, **48**(5), 487–509 [vid. 2024-09-12]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/S0045-6535(02)00118-2
- [55] BOX, K. J. a J. E. A. COMER. Using measured pKa, LogP and solubility to investigate supersaturation and predict BCS class. *Current Drug Metabolism* [online]. 2008, **9**(9), 869–878. ISSN 1389-2002. Dostupné z: doi:10.2174/138920008786485155
- [56] SCHULTES, Sabine, Chris de GRAAF, Helmut BERGER, Moriz MAYER, Andreas STEFFEN, Eric E. J. HAAKSMA, Iwan J. P. de ESCH, Rob LEURS a Oliver KRÄMER. A medicinal chemistry perspective on melting point: matched molecular pair analysis of the effects of simple descriptors on the melting point of

- drug-like compounds. *MedChemComm* [online]. 2012, **3**(5), 584–591 [vid. 2024-09-17]. ISSN 2040-2511. Dostupné z: doi:10.1039/C2MD00313A
- [57] MCDONAGH, J. L., T. VAN MOURIK a J. B. O. MITCHELL. Predicting Melting Points of Organic Molecules: Applications to Aqueous Solubility Prediction Using the General Solubility Equation. *Molecular Informatics* [online]. 2015, **34**(11–12), 715–724. ISSN 1868-1751. Dostupné z: doi:10.1002/minf.201500052
- [58] ZHU, Wenjing, Wenling FAN, Xiaotong ZHANG a Meiqi GAO. Sustained-Release Solid Dispersion of High-Melting-Point and Insoluble Resveratrol Prepared through Hot Melt Extrusion to Improve Its Solubility and Bioavailability. *Molecules* [online]. 2021, **26**(16), 4982 [vid. 2024-09-17]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26164982
- [59] FOX, Shelley Chambers. *Pharmaceutics*. London: Pharmaceutical Press, 2014. Remington education. ISBN 978-0-85711-070-1.
- [60] WILLIAMS, Hywel D., Natalie L. TREVASKIS, Susan A. CHARMAN, Ravi M. SHANKER, William N. CHARMAN, Colin W. POUTON a Christopher J. H. PORTER. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacological Reviews* [online]. 2013, **65**(1), 315–499 [vid. 2024-09-18]. ISSN 0031-6997, 1521-0081. Dostupné z: doi:10.1124/pr.112.005660
- [61] PUDIPEDDI, Madhu a Abu T. M. SERAJUDDIN. Trends in solubility of polymorphs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2005, **94**(5), 929–939. ISSN 0022-3549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.20302
- [62] MURDANDE, Sharad B., Michael J. PIKAL, Ravi M. SHANKER a Robin H. BOGNER. Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals: II. Application of quantitative thermodynamic relationships for prediction of solubility enhancement in structurally diverse insoluble pharmaceuticals. *Pharmaceutical Research* [online]. 2010, **27**(12), 2704–2714. ISSN 1573-904X. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-010-0269-5
- [63] RUSSO, Marcos G., Elena V. BRUSAU, Javier ELLENA a Griselda E. NARDA. Crystalline and amorphous famotidine malate as pathways to prevent polymorphic transformation with improved dissolution. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2023, **642**, 123053 [vid. 2024-09-19]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2023.123053
- [64] WEI, Yuanfeng, Yunni LING, Meiling SU, Lei QIN, Jianjun ZHANG, Yuan GAO a Shuai QIAN. Characterization and Stability of Amorphous Tadalafil and Four Crystalline Polymorphs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2018, **66**(12), 1114–1121. Dostupné z: doi:10.1248/cpb.c18-00450
- [65] HANCOCK, B. C. a M. PARKS. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharmaceutical Research* [online]. 2000, **17**(4), 397–404. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1023/a:1007516718048

- [66] PINAL, Rodolfo. Effect of molecular symmetry on melting temperature and solubility. *Organic & Biomolecular Chemistry* [online]. 2004, **2**(18), 2692–2699. ISSN 1477-0520. Dostupné z: doi:10.1039/B407105K
- [67] FAGERBERG, Jonas H. a Christel A. S. BERGSTRÖM. Intestinal solubility and absorption of poorly water soluble compounds: predictions, challenges and solutions. *Therapeutic Delivery* [online]. 2015, **6**(8), 935–959. ISSN 2041-6008. Dostupné z: doi:10.4155/tde.15.45
- [68] BRUNTON, Laurence L., Randa HILAL-DANDAN, Björn C. KNOLLMANN, Louis Sanford GOODMAN, Alfred GILMAN a Alfred Goodman GILMAN, ed. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. Thirteenth edition. New York Chicago San Francisco: McGraw Hill Education, 2018. ISBN 978-1-259-58473-2.
- [69] HU, Yawen, Deidra E. SIECK a Walter H. HSU. Why are second-generation H1-antihistamines minimally sedating? *European Journal of Pharmacology* [online]. 2015, **765**, 100–106. ISSN 1879-0712. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2015.08.016
- [70] YANAI, Kazuhiko, Takeo YOSHIKAWA, Ai YANAI, Tadaho NAKAMURA, Tomomitsu IIDA, Rob LEURS a Manabu TASHIRO. The clinical pharmacology of non-sedating antihistamines. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2017, **178**, 148–156. ISSN 1879-016X. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2017.04.004
- [71] PUBCHEM. *Promethazine* [online]. [vid. 2025-02-23]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4927>
- [72] PUBCHEM. *Diphenhydramine* [online]. [vid. 2025-02-23]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3100>
- [73] KONDURU, Naresh a G. V. MADHURI. Stability indicating method of carbidopa and levodopa assay in carbidopa, levodopa and entaca-pone film coated tablets by RP-HPLC. *International journal of pharmaceutical sciences and research* [online]. 2014, **5**(12), 5530–5538. ISSN 0975-8232. Dostupné z: doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.5(12).5530-38
- [74] PUBCHEM. *Gabapentin* [online]. [vid. 2024-10-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3446>
- [75] PUBCHEM. *Alprostadil* [online]. [vid. 2024-10-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280723>
- [76] WERMUTH, C. G. *The practice of medicinal chemistry*. 3rd ed. Amsterdam Boston: Elsevier/Academic Press, 2008. ISBN 978-0-12-374194-3.
- [77] CLIMENT, Elisenda, David BENAIGES a Juan PEDRO-BOTET. Hydrophilic or Lipophilic Statins? *Frontiers in Cardiovascular Medicine* [online]. 2021, **8**, 687585. ISSN 2297-055X. Dostupné z: doi:10.3389/fcvm.2021.687585

- [78] SCHACHTER, Michael. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & Clinical Pharmacology* [online]. 2005, **19**(1), 117–125. ISSN 0767-3981. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-8206.2004.00299.x
- [79] KÖNCZÖL, Árpád a Gergő DARGÓ. Brief overview of solubility methods: Recent trends in equilibrium solubility measurement and predictive models. *Drug Discovery Today: Technologies* [online]. 2018, **27**, Physicochemical characterisation in drug discovery, 3–10 [vid. 2025-03-03]. ISSN 1740-6749. Dostupné z: doi:10.1016/j.ddtec.2018.06.001
- [80] 4.4: UV-Visible Spectroscopy. *Chemistry LibreTexts* [online]. 2016 [vid. 2025-03-09]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Physical\\_Methods\\_in\\_Chemistry\\_and\\_Nano\\_Science\\_\(Barron\)/04%3A\\_Chemical\\_Speciation/4.04%3A\\_UV-Visible\\_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/04%3A_Chemical_Speciation/4.04%3A_UV-Visible_Spectroscopy)
- [81] HOELKE, Bettina, Sabine GIERINGER, Michael ARLT a Christoph SAAL. Comparison of Nephelometric, UV-Spectroscopic, and HPLC Methods for High-Throughput Determination of Aqueous Drug Solubility in Microtiter Plates. *Analytical Chemistry* [online]. 2009, **81**(8), 3165–3172 [vid. 2025-03-11]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac9000089
- [82] BEVAN, Christopher D. a Richard S. LLOYD. A High-Throughput Screening Method for the Determination of Aqueous Drug Solubility Using Laser Nephelometry in Microtiter Plates. *Analytical Chemistry* [online]. 2000, **72**(8), 1781–1787 [vid. 2025-03-11]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac9912247
- [83] SOU, Tomáš a Christel A. S. BERGSTRÖM. Automated assays for thermodynamic (equilibrium) solubility determination. *Drug Discovery Today: Technologies* [online]. 2018, **27**, Physicochemical characterisation in drug discovery, 11–19 [vid. 2025-03-13]. ISSN 1740-6749. Dostupné z: doi:10.1016/j.ddtec.2018.04.004
- [84] MAREK, Jan, Ales TICHY, Radim HAVELEK, Martina SEIFRTOVA, Alzbeta FILIPOVA, Lenka ANDREJSOVA, Tomas KUCERA, Lukas PRCHAL, Lubica MUCKOVA, Martina REZACOVA, Zuzana SINKOROVA a Jaroslav PEJCHAL. A novel class of small molecule inhibitors with radioprotective properties. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2020, **187**, 111606 [vid. 2024-12-10]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2019.111606
- [85] CHMIL, Vojtěch, Natálie ŽIVNÁ, Marcela MILANOVÁ, Alžběta FILIPOVÁ, Jaroslav PEJCHAL, Lukáš PRCHAL, Darina MUTHNÁ, Vít ŘEHÁČEK, Martina ŘEZÁČOVÁ, Jan MAREK, Aleš TICHÝ a Radim HAVELEK. Second-generation piperazine derivatives as promising radiation countermeasures. *RSC medicinal chemistry* [online]. 2024, **15**(8), 2855–2866. ISSN 2632-8682. Dostupné z: doi:10.1039/d4md00311j
- [86] FILIPOVA, Alzbeta, Jan MAREK, Radim HAVELEK, Jaroslav PEJCHAL, Marcela JELICOVA, Jana CIZKOVA, Martina MAJOROSOVA, Lubica MUCKOVA, Tomas KUCERA, Lukas PRCHAL, Miroslav PSOTKA, Natalie

- ZIVNA, Darja KOUTOVA, Zuzana SINKOROVA, Martina REZACOVA a Ales TICHY. Substituted Piperazines as Novel Potential Radioprotective Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. 2020, **25**(3), 532. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25030532
- [87] *SwissADME* [online]. [vid. 2024-12-19]. Dostupné z: <http://www.swissadme.ch/>
- [88] DAINA, Antoine, Olivier MICHELIN a Vincent ZOETE. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**, 42717 [vid. 2024-12-19]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep42717
- [89] DELANEY, John S. ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* [online]. 2004, **44**(3), 1000–1005 [vid. 2024-12-22]. ISSN 0095-2338. Dostupné z: doi:10.1021/ci034243x
- [90] DAINA, Antoine a Vincent ZOETE. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* [online]. 2016, **11**(11), 1117–1121. ISSN 1860-7187. Dostupné z: doi:10.1002/cmdc.201600182
- [91] OZAKI, Shunsuke, Yoshiaki NAKAGAWA, Osamu SHIRAI a Kenji KANO. Substituent effect on the thermodynamic solubility of structural analogs: relative contribution of crystal packing and hydration. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, **103**(11), 3524–3531. ISSN 1520-6017. Dostupné z: doi:10.1002/jps.24139
- [92] WANG, Junmei a Tingjun HOU. Recent advances on aqueous solubility prediction. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* [online]. 2011, **14**(5), 328–338. ISSN 1875-5402. Dostupné z: doi:10.2174/138620711795508331
- [93] MILBANK, J. B., M. TERCEL, G. J. ATWELL, W. R. WILSON, A. HOGG a W. A. DENNY. Synthesis of 1-substituted 3-(chloromethyl)-6-aminoindoline (6-amino-seco-CI) DNA minor groove alkylating agents and structure-activity relationships for their cytotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 1999, **42**(4), 649–658. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm980545s
- [94] LALWANI, Nikhil, David W. ALLEN, Peter N. HORTON, Simon J. COLES, Neil A. CROSS a Neil BRICKLEBANK. Methoxy-phenyl groups reduce the cytotoxicity and increase the aqueous solubility of phosphonium zwitterions and salts. *Polyhedron* [online]. 2019, **158**, 515–523 [vid. 2024-12-29]. ISSN 0277-5387. Dostupné z: doi:10.1016/j.poly.2018.10.069
- [95] PALUSIAK, Marcin a Sławomir J GRABOWSKI. Methoxy group as an acceptor of proton in hydrogen bonds. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2002, **642**(1), 97–104 [vid. 2024-12-29]. ISSN 0022-2860. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-2860(02)00406-4
- [96] SAGAWA, Naoya a Toshiyuki SHIKATA. Are all polar molecules hydrophilic? Hydration numbers of nitro compounds and nitriles in aqueous solution. *Physical*

- Chemistry Chemical Physics* [online]. 2014, **16**(26), 13262–13270 [vid. 2025-02-20]. ISSN 1463-9084. Dostupné z: doi:10.1039/C4CP01280A
- [97] ZHANG, Jianfang, Kinga Virág GULYÁS, Jintian LI, Minfei MA, Liping ZHOU, Leyun WU, Ruisheng XIONG, Mate ERDELYI, Weiliang ZHU a Zhijian XU. Unexpected effect of halogenation on the water solubility of small organic compounds. *Computers in Biology and Medicine* [online]. 2024, **172**, 108209 [vid. 2024-12-30]. ISSN 0010-4825. Dostupné z: doi:10.1016/j.compbiomed.2024.108209
- [98] PRIETO-DÍAZ, Rubén, Manuel GONZÁLEZ-GÓMEZ, Hugo FOJO-CARBALLO, Jhonny AZUAJE, Abdelaziz EL MAATOUGUI, Maria MAJELLARO, María I. LOZA, José BREA, Víctor FERNÁNDEZ-DUEÑAS, M. Rita PALEO, Alejandro DÍAZ-HOLGUÍN, Beatriz GARCIA-PINEL, Ana MALLO-ABREU, Juan C. ESTÉVEZ, Antonio ANDÚJAR-ARIAS, Xerardo GARCÍA-MERA, Iria GOMEZ-TOURINO, Francisco CIRUELA, Cristian O. SALAS, Hugo GUTIÉRREZ-DE-TERÁN a Eddy SOTELO. Exploring the Effect of Halogenation in a Series of Potent and Selective A2B Adenosine Receptor Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2022, **66**(1), 890–912 [vid. 2024-12-31]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01768
- [99] HEWITT, M., M. T. D. CRONIN, S. J. ENOCH, J. C. MADDEN, D. W. ROBERTS a J. C. DEARDEN. In Silico Prediction of Aqueous Solubility: The Solubility Challenge. *Journal of Chemical Information and Modeling* [online]. 2009, **49**(11), 2572–2587 [vid. 2025-03-18]. ISSN 1549-9596. Dostupné z: doi:10.1021/ci900286s
- [100] DAS, Torsa, Chetan H. MEHTA a Usha Y. NAYAK. Multiple approaches for achieving drug solubility: an in silico perspective. *Drug Discovery Today* [online]. 2020, **25**(7), 1206–1212. ISSN 1878-5832. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2020.04.016