

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE
A KONTROLY LÉČIV

STANOVENÍ LIPOFILITY POTENCIÁLNÍCH LÉČIV

Determination of Lipophilicity of Potential Drugs

Rigorózní práce

Rigorous thesis

Konzultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové 2016

Mgr. Iva Coufalová

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 12. 1. 2016

.....

Iva Coufalová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému konzultantovi panu Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. za odbornou pomoc, cenné rady a připomínky a za příjemnou spolupráci při tvorbě mé rigorózní práce. Poděkování patří také pracovní skupině prof. PharmDr. Martina Doležala, Ph.D. za poskytnutí vzorků pro analýzu. V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat mé rodině za trpělivost a projevenou podporu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Autor: Mgr. Iva Coufalová

Konzultant: Ing. Vladimír Kubiček, CSc.

Název rigorózní práce: Stanovení lipofility potenciálních léčiv

Tato rigorózní práce se zabývá stanovením lipofility u nově syntetizovaných potenciálních léčiv na bázi pyrazinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích.

V teoretické části je obsažen stručný přehled vývoje a klinického hodnocení nových léčivých látek, dále jsou zde shrnuty historické i v současnosti běžně používané postupy stanovování lipofility látek, včetně základních principů chromatografie.

Další část práce se věnuje měření konkrétních vzorků léčiv na koloně Zorbax ECLIPSE XDB-C8 600 Bar, 50,0x3,0 mm, 1,8 μm . Tato kolona byla zvolena za účelem zkrácení retenčních časů měřených látek oproti koloně s náplní C18. Za hodnoty lipofilit zkoumaných léčiv jsou považovány hodnoty logaritmu kapacitního faktoru, které byly zjištěny extrapolací na nulovou koncentraci methanolu v mobilní fázi.

Na závěr bylo provedeno porovnání získaných výsledků s hodnotami již dříve zjištěnými na koloně Zorbax ECLIPSE XDB-C18 600Bar, 50,0x4,6 mm, 1,8 μm a s hodnotami získanými matematickým výpočtem v programu ChemDraw Ultra 12.0.

Klíčová slova: léčiva, vývoj léčiv, lipofilita, kapalinová chromatografie na reverzních fázích, kapacitní faktor

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Author: Mgr. Iva Coufalová

Consultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Thesis Title: Determination of Lipophilicity of Potential Drugs

This rigorous thesis deals with the determination of lipophilicity of new synthesized potential drugs based on pyrazine structure by reversed phase high performance liquid chromatography.

The theoretical part contains a brief overview of the drugs development and clinical studies, there are also summarized historical and currently common used processes for lipophilicity estimating, including the basic principles of chromatography.

Another part of thesis is engaged in to the measurement of specific samples of drugs on a Zorbax ECLIPSE XDB-C8 600 Bar, 50.0x3.0 mm, 1.8 μm column. This column was chosen in order to shorten the retention times of the measured samples compared with C18 column packing. For the lipophilicity values of the examined drugs are considered the logarithm of capacity factor values which were determined by extrapolation to zero concentration of methanol in the mobile phase.

In conclusion there was made a comparison of the results with the values previously obtained on a Zorbax ECLIPSE XDB-C18 600Bar, 50.0x4.6 mm, 1.8 μm column and the values obtained by a mathematical calculation in program ChemDraw Ultra 12.0.

Keywords: drugs, drugs development, lipophilicity, reversed phase liquid chromatography, capacity factor

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Zdroje nových chemických léčiv	9
2.2 Vývoj léčiv	10
2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti léčiv	12
2.3.1 Rozpustnost ve vodě.....	13
2.3.2 Rozpustnost v tucích.....	14
2.3.3 Bazicitu a kyselost	15
2.4 Historie stanovení lipofility.....	15
2.5 Současné analytické metody k určení lipofility	16
2.5.1 Tradiční a přímé metody	17
2.5.2 Nepřímé metody	18
2.5.2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	18
2.5.2.2 Tenkovrstvá chromatografie	23
2.5.2.3 Micelární a mikroemulzní elektrokinetická chromatografie	24
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Použité chemikálie	27
3.2 Použité přístroje	30
3.3 Nástřik	30
3.4 Podmínky chromatografické detekce	30
4. VÝSLEDKOVÁ ČÁST	31
5. DISKUZE	58
6. ZÁVĚR	61
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Faf UK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy
KFCHKL	Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and Drug Administration)
QSAR	Kvantitativní vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou (z angl. Quantitative Structure – Activity Relationships)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. High Performance Liquid Chromatography)
RP-HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích (z angl. Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography)
TLC	Tenkovrstvá chromatografie (z angl. Thin Layer Chromatography)
RP-TLC	Tenkovrstvá chromatografie na reverzních fázích (z angl. Reversed-Phase Thin Layer Chromatography)
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie (z angl. Micellar electrokinetic chromatography)
MEEKC	Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (z angl. Microemulsion electrokinetic chromatography)

1. ÚVOD

Znalost lipofility léčiv je nesmírně důležitá pro hodnocení jejich biologické aktivity. Díky ní lze předvídat, jak se dané léčivo v organismu bude chovat. Jedná se totiž o jednu z fyzikálně-chemických vlastností, která ovlivňuje řadu dějů v organismu v souvislosti s podáním léčiva. Má vliv zejména na průnik látek přes biologické membrány, vazbu na plazmatické bílkoviny, distribuci léčiva v těle, délku účinku, ale i řadu dalších procesů. Není proto překvapením, že lipofilita je jedním z parametrů, který je třeba určit již během preklinického vývoje nových léčivých látek.

V odborné literatuře lze najít celou řadu informací týkajících se stanovení lipofility chemických látek. V současné době se nejčastěji využívají metody nepřímé, mezi které patří např. kapalinová chromatografie, elektrokinetická chromatografie, různé matematické výpočetní programy a další. Metody přímé (tradiční „vytřepávání“ a stanovení rozdělovacího koeficientu v systému oktanol-voda) jsou dnes využívány daleko méně, jelikož mají řadu nevýhod, zejména co se týče požadavků na rychlost stanovení, zručnost laboratorního pracovníka a množství použitého chemického materiálu.

V této rigorózní práci byla lipofilita stanovována pomocí kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC). Práce byla vytvořena ve spolupráci s katedrou Farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy (KFCHKL Faf UK).

2. TEORETICKÁ ČÁST

V posledních desetiletích dochází k velmi rychlému rozvoji výzkumu léčiv a k zavádění velkého množství nových léků na trh. Prodlužuje se však doba potřebná na vývoj nového léčiva, což je proces stále složitější a nákladnější, přičemž období, po které se toto léčivo udrží v praxi, se stále zkracuje. Proto jsou pro práci na vývoji nové účinné látky velmi důležité obecné poznatky o vlastnostech léčiv. Tyto znalosti pak mohou vzniklého léčiva výrazně zracionalizovat, urychlit a také zlevnit [1].

2.1 Zdroje nových chemických léčiv

Výzkum nových chemických léčiv lze rozdělit do pěti základních přístupů:

1.) Nahodilý screening

Jedná se o velmi častý zdroj pro získání nové účinné látky, ale také velmi nákladný. Sledují se účinky rozsáhlých souborů sloučenin připravených izolací nebo syntézou ve farmaceutickém výzkumu nebo v jiných oborech. Předpokládá se, že v průměru z 10 000 látek ve screeningu má šanci na praktické využití jako léčivo pouze jedna sloučenina.

2.) Objevování ztraceného

Mnoho pozornosti je třeba také věnovat studiu starších prací, ve kterých lze nalézt a následně využít takové poznatky, které v době publikování nebyly a nemohly být dostatečně doceněny. Lze sem také zahrnout mnoho léčiv přírodního původu, která jsou objevována na základě využití poznatků lidového léčitelství.

3.) Obměňování struktur stávajících léčiv

Po objevení nového léčiva dochází k intenzivnímu studiu různých chemických obměn dané molekuly za využití poznatků o vztazích mezi chemickou strukturou a účinkem. Tato metoda vede nejčastěji ke kladným výsledkům a k nalezení použitelné sloučeniny.

Z analýz mezinárodních patentů týkajících se léčiv vyplývá, že 87% všech patentů se týká modifikací známých molekul uvedených ve starších patentech. Tímto způsobem lze připravit například sloučeniny s vyšším účinkem, s odlišnou délkou aktivity, ve zvýšené míře

vylučované do určité tkáně, s méně výraznými vedlejšími nežádoucími účinky nebo s výhodnějšími organoleptickými vlastnostmi.

4.) Kombinatoriální chemie

Vyžaduje využití vysoce spolehlivých, citlivých a automatizovaných analytických postupů. Připraví se velký počet nových sloučenin, tisíce až desetitisíce – tzv. knihovna, která se pak podrobí testování a pokud se prokáže potřebná aktivita, je třeba danou substanci identifikovat a dále provést cílené resyntézy. Postupně vznikají tímto tříděním menší knihovny, až se docílí definovaných aktivních reakčních produktů.

5.) Využití poznatků příbuzných oborů

Výzkum léčiv probíhá na molekulární úrovni za využití znalostí z biochemie a biolékařství. Roli zde hrají hlavně poznatky o metabolismu, receptorech a mechanismu účinku, přičemž se získají přesné požadavky na strukturu, včetně rozložení funkčních skupin, prostorového uspořádání a elektrických nábojů. Výhodou tedy je, že se nemusí prověřovat tak velké množství sloučenin jako u jiných postupů [1].

2.2 Vývoj léčiv

Jak již bylo uvedeno, vývoj léčiv je časově i finančně velmi nákladný proces. Prvotní etapou zkoušení nové látky jsou preklinické studie. Jejich cílem je získat co nejvíce informací o nové molekule, zejména informace o mechanismu účinku a o toxicitě. Výsledky se získávají z laboratorních *in vitro* zkoušek a dále testováním na živých organismech (*in vivo*, na laboratorních zvířatech). Pokud léčivo prokáže v této fázi dostatečnou bezpečnost a účinnost, přistupuje se ke klinickému zkoušení. Klinické hodnocení léčiv se obvykle rozděluje do čtyř fází, které se vzájemně prolínají.

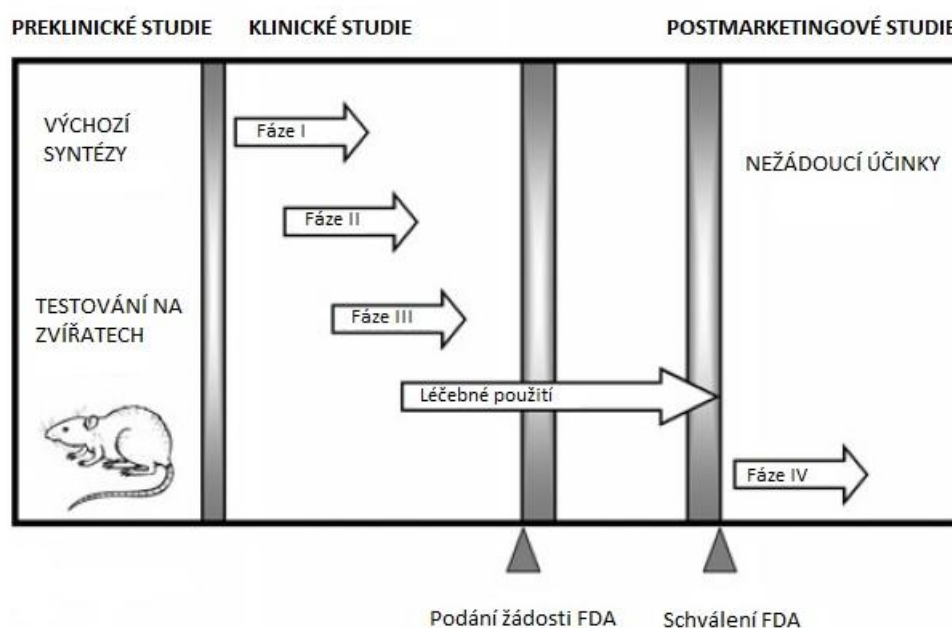
Během fáze I se léčivo poprvé podá člověku a stanovuje se jeho bezpečná dávka, detekují se možné nežádoucí účinky a také se zjišťuje dávka, při které se tyto nežádoucí účinky objevují. Testování probíhá na zdravých dobrovolnících, ve výjimečných případech přímo na pacientech.

Fáze II je charakteristická posouzením účinnosti léčiva, stanovením základních indikací a dávkováním. Dále se podrobněji zkoumá farmakokinetika, metabolismus,

biologická dostupnost a další parametry. Tato fáze již probíhá na homogenní skupině pacientů.

Ve fázi III se sleduje účinnost při všech indikacích, hledají se kontraindikace, interakce a nežádoucí účinky v závislosti na dávce. Sleduje se také vliv dalšího onemocnění nebo psychické změny. Léčivo se testuje na co nejrepresentativnější heterogenní skupině pacientů (děti, senioři, případně těhotné nebo kojící ženy).

Fáze IV se odehrává již po zavedení léčiva na trh a jedná se o tzv. postmarketingové studie. Pátrá se po málo častých nežádoucích účincích, interakcích s ostatními léky a potravinami, hodnotí se různé lékové formy a doba trvání léčby [2, 3]. Tyto poregistrační studie zahrnují zejména studie epidemiologické, farmakoekonomické a výzkumné. Dohled nad léčivými (farmakovigilanci) zajišťuje držitel rozhodnutí o registraci a spočívá zejména ve sběru a vyhodnocování dat týkajících se nežádoucích účinků [4]. Schéma vývoje léčiv je znázorněno na následujícím obrázku.



Obr. 1: Schéma procesu vývoje nových léčiv (převzato z [3], upraveno)

Nejběžnějším přístupem využívaným ve vývoji léčiv je vytváření různých molekulárních modelů. Cílem je získat vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou potenciálního léčiva v souvislosti se základními farmakokinetickými pochody (absorpce, distribuce, metabolismus a eliminace).

Jako určitou pomůcku pro vývoj nového léku lze využít empirické „pravidlo pěti“, známé také jako Lipinského pravidlo. Toto pravidlo doporučuje některé základní vlastnosti, které by měla chemická sloučenina splňovat, aby mohla být léčivem.

- 1.) molekula by neměla obsahovat ve své struktuře více než 5 donorů vodíkových vazeb
- 2.) molekula by neměla obsahovat ve své struktuře více než 10 akceptorů vodíkových vazeb
- 3.) molekulová hmotnost by měla být více než 500
- 4.) hodnota rozdělovacího koeficientu by měla být více než 5

Postupem času se však zjistilo, že toto pravidlo má řadu výjimek (např. biologická léčiva, léčiva přírodního původu a jejich semisyntetické deriváty) a také bohužel nepředvídá, zda je látka biologicky aktivní či nikoli. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (FDA) dokonce upozorňuje, že pouze polovina všech léčiv splňuje požadavky tohoto pravidla [3].

2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti léčiv

Pro biologickou aktivitu potenciálních léčiv jsou důležité fyzikálně-chemické vlastnosti léčiv. Nositelem těchto vlastností je chemická struktura (tj. pořadí a způsob, jakým jsou spolu jednotlivé atomy a atomové skupiny v molekule vázány).

Chemické vlastnosti jsou často základním předpokladem účinku léčiv na základě schopnosti interagovat s příslušným partnerem v organismu, kdežto fyzikální vlastnosti ovlivňují distribuci léčiva v organismu, jeho vstřebávání, transport na místo působení a vylučování. Kromě těchto tzv. vnitřních faktorů se uplatňují ještě vnější strukturální faktory a tam patří zejména metabolismus (tj. přeměna léčiva v živém organismu a mechanismus působení, který má za následek vyvolání účinku).

Nemalý význam z hlediska účinku má velikost molekuly. Důvodem je skutečnost, že se léčiva mnohdy podávají do míst (intravaskulárně, extravaskulárně), která jsou značně vzdálena od místa účinku. Při distribuci pak musí léčivo projít přes řadu biologických bariér, které oddělují jednotlivé části organismu (např. buněčné membrány, sliznice žaludku, sliznice tenkého střeva, červené krvinky a další). To mohou absolvovat pouze molekuly, které mají dostatečnou schopnost difúze. U příliš velkých molekul může být tato schopnost zpomalena, případně až znemožněna. V některých případech je však tato vlastnost naopak výhodou. Jako příklad lze uvést vysokomolekulární polysacharidy – dextransy, které se používají jako krevní náhrady, jejich schopnost pronikat tkáněmi je snížena, jsou proto schopny dočasně zastávat funkci krevních bílkovin a udržovat tak dostatečný onkotický tlak. Naopak malé molekuly

snadno difundují do centrálního nervového systému a toho se využívá např. u inhalačních anestetik.

Tvar a prostorové uspořádání molekuly zastávají důležitou roli při vlastním účinku léčiva. Vážou se na reaktivní místa stereo-specifických receptorů. S tím souvisí jev rozdílného prostorového uspořádání označovaný jako izomerie.

Jak již bylo výše uvedeno, léčivo při pohybu v organismu podléhá různým procesům, zejména rozdělování mezi vodnou a lipofilní fází, prostupuje přes biologické membrány a váže se na bílkoviny krevní plazmy. Z fyzikálně-chemických vlastností, které v uvedených procesech hrají velkou roli, jsou to především rozpustnost léčiva ve vodě a lipidech, dále bazicita a kyselost a schopnost adsorpce. K dalším významným fyzikálně-chemickým vlastnostem patří např. schopnost srážet koloidy, povrchové napětí a těkavost. Všechny tyto vlastnosti mají obecný význam a jejich vliv a efekt se projevuje komplexně [1].

2.3.1 Rozpustnost ve vodě

Aby léčivo mohlo účinkovat, je většinou nutné, aby bylo alespoň částečně rozpustné ve vodě. Všechna léčiva, kromě místně podávaných, jsou totiž na místo svého účinku transportována vodní cestou. Platí, že léčiva, která jsou velmi dobře rozpustná ve vodě, jsou také velmi rychle metabolizována a vyloučena z těla, mají krátkodobý účinek.

Rozpustnost ve vodě lze zvýšit jednak na fyzikálně-chemickém základě, a jednak zásahem do chemické struktury léčiva. Při prvním způsobu se využívá třetích látek – tzv. solubilizerů, což jsou látky zpravidla amfifilního charakteru (hydrofilní a hydrofobní zároveň). Principem je, že vznikají ve vodě snadno rozpustné molekulární komplexy léčivo-solubilizer. Jako tato solubilizující činidla se dají použít soli slabých, nejčastěji aromatických kyselin (např. benzoan sodný, salicylan sodný, ethylendiamin a další). K solubilizacím účelům je možno využít také povrchově aktivních látek, tenzidů (např. polysorbáty). Jejich účinek spočívá v tom, že ve vodném prostředí vytvářejí koloidní micely, které okludují nerozpustné částice léčiv. Druhým způsobem zvýšení rozpustnosti ve vodě je chemická obměna struktury, nejčastěji se jedná o převedení kyselin nebo zásad na vhodnou sůl neutralizací. U kyselin většinou na sodnou, draselnou nebo vápenatou sůl a u zásad převedením na chloridy, sulfáty, nitráty nebo fosfáty. Další výhodou je, že takto vytvořené soli jsou navíc většinou pevné látky, stabilnějšího charakteru, a tak i daleko vhodnější pro formulaci léčivých přípravků.

Pokud není možné vytvořit sůl, dosahuje se zvýšení rozpustnosti zavedením hydrofilních skupin (např. hydroxylové, hydroxyalkylové karboxylové, sulfonové, aminové seskupení) do molekuly. Tento způsob ale někdy může vést ke snížení biologické aktivity léčiva, zejména u látek s nižší molekulovou hmotností.

V některých případech je naopak žádoucí snížení rozpustnosti ve vodě. Důvodem může být zpomalení resorpce léčiva a následné dosažení zvýšeného hromadění v místě, kde má léčivo působit anebo také prolongace jeho účinku. Někdy je také cílem odstranit nepříjemnou chuť léčiva. Rozpustnost ve vodě se dá snížit přípravou špatně rozpustné soli nebo převedením na vhodný derivát. Další možností je chemická obměna, např. přeměna na lipofilní ester [1].

2.3.2 Rozpustnost v tucích

Rozpustnost v tucích (lipofilita) je pro léčiva stejně důležitá jako rozpustnost ve vodě. Ovlivňuje totiž především průnik látek přes biologické membrány a také vazbu na plazmatické bílkoviny.

Rozpustnost v tucích a ve vodě spolu vzájemně souvisejí. Jak již bylo dříve uvedeno, téměř všechna léčiva jsou v organismu transportována vodní cestou. Většina organických látek se však současně rozpouští více či méně v lipidech a jejich průchod vodní cestou tak vlastně představuje neustálé rozdělování mezi vodnou a lipofilní fází v tělesných tekutinách. Rozpustnost ve vodě a v lipidech jsou veličiny navzájem nepřímo úměrné – čím větší je rozpustnost v tucích, tím menší ve vodě a naopak.

Podíl hydrofobních a hydrofilních faktorů v molekule daného léčiva lze vyjádřit rozdělovacím koeficientem P (viz dále).

Rozpustnost v lipidech lze zvýšit substitucí vhodným lipofilním substituentem (např. alkylové, alkoxylové nebo halogenové skupiny) nebo dočasným blokováním hydrofilních skupin esterifikací nebo etherifikací. Vznikají tak např. prekurzory (proléčiva), které v těle uvolňují léčivo až v cílovém orgánu. Cílem přípravy lipofilnějších látek je také dosažení prolongovaného účinku nebo zlepšeného vstřebávání [1, 5].

2.3.3 Bazicita a kyselost

Velká část organických léčiv má charakter slabých kyselin nebo zásad, které jsou ve vodných roztocích přítomny v rovnovážném stavu svých ionizovaných a neionizovaných molekul. Stupeň ionizace je vyjádřen záporným dekadickým logaritmem kyselé/bazické disociační konstanty a označuje se symbolem pK_a . Hodnota disociační konstanty má vliv na rozpustnost, absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci léčiva. Kyseliny s nízkou hodnotou pK_a jsou silnými kyselinami a naopak kyseliny s vyššími hodnotami pK_a jsou slabší. U zásad je tomu naopak. Hodnoty pK_a se u většiny léčiv pohybují v rozmezí 2,0 – 10,8. Stupeň ionizace závisí nejen na pK_a , ale i na pH prostředí, ve kterém se látka nachází.

Acidobazické vlastnosti hrají významnou roli i při vazbě léčiv na plazmatické bílkoviny. Tato vazba se uskutečňuje podobně jako vazba léčiva na receptor, a sice pomocí vazebných sil typu iontových, vazeb vodíkovými můstky, hydrofobních, dipólových a kovalentních vazeb [1].

Během preklinického a klinického hodnocení léčiva je pozornost soustředěna právě na stanovení uvedených fyzikálně-chemických vlastností nové chemické látky. Jedná se zejména o určení disociační konstanty, lipofility, stability, rozpustnosti, farmakodynamických vlastností atd. [3].

2.4 Historie stanovení lipofility

Rozdělování látky mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze je již po mnoho let důležitým předmětem výzkumu. Metoda rozdělování látek byla v různých podobách používána už od nejstarších dob. Jednalo se zejména o izolaci přírodních produktů, např. esencí květin.

První systematická studie rozdělování látky mezi dvě rozpouštědla byla provedena s bromem a jodem. Jako rozpouštědla se používala voda a sirouhlík a podařilo se přesně určit koncentrace obou halogenů v jednotlivých fázích. Později se prováděly obdobné analýzy s různými dalšími látkami (H_2SO_4 , HCl , NH_3) rozdělováním mezi ethylether a vodu.

Z těchto prvních jednoduchých výzkumů byl získán základní poznatek, že poměr koncentrací látky rozdělené ve dvou vzájemně nemísitelných roztocích je konstantní a nezávisí na objemech použitých roztoků. Dále bylo zjištěno, že dochází k mírným změnám rozdělovacího koeficientu v závislosti na teplotě.

Později vyšlo najevo, že rozdělovací koeficient je konstantní pouze v případě, že se jedná o jeden typ molekuly (ve smyslu ionizace), což je i v současné době jeden z kritických problémů během studia rozdělovacích koeficientů.

Na začátku 20. století byla provedena řada experimentů s cílem určit ionizační konstantu ve vodné fázi u mírně ionizovaných kyselin a zásad.

Již v roce 1909 byly publikovány vzorce, které dávaly do souvislosti rozdělovací koeficient a počet extrakcí potřebných pro odstranění dané hmotnosti rozpuštěné látky v roztoku.

Ve 20. století přišel rozvoj kapalinové chromatografie a od 40. let se začaly využívat i další techniky - vícenásobné extrakce, protiproudá chromatografie apod., což vedlo ke zlepšení separace a charakterizace komplexních směsí.

V současné době dochází k dalšímu vývoji a zlepšování metod v oblasti chromatografických a elektrokinetických technik a také různých matematických výpočetních modelů, např. využitím kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (QSAR) [5, 6].

2.5 Současné analytické metody k určení lipofility

Lipofilita je charakterizována rozdělovacím koeficientem P , který popisuje rozdělení dané látky v systému dvou vzájemně nemísitelných kapalin. Je to vlastně poměr koncentrací neionizované sloučeniny mezi dvěma rozpouštědly. Vyjadřuje se ve formě dekadického logaritmu:

$$\log P = \log \left(\frac{c_o}{c_w} \right), \quad (1)$$

kde c_o je koncentrace látky v organické fázi a c_w je koncentrace látky ve vodné fázi v případě, kdy je celý systém v rovnováze.

U ionizovatelných látek je třeba vzít v potaz i pH vodné fáze. Lipofilita se pak vyjadřuje pomocí logaritmu tzv. distribučního koeficientu $\log D$:

$$\log D_{kys} = \log P + \log \left[\frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \right] \quad (2)$$

$$\log D_{zás} = \log P + \log \left[\frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \right], \quad (3)$$

přičemž $\log D_{\text{kys}}$ je distribuční koeficient kyselé látky a $\log D_{\text{zás}}$ je distribuční koeficient zásadité látky.

V případě, že sloučenina je ve velké míře ionizovaná, platí:

pro kyseliny s $(\text{pH} - \text{pK}_a) > 1$ je $\log D_{\text{kys}} \approx \log P + \text{pK}_a - \text{pH}$
a pro zásady s $(\text{pK}_a - \text{pH}) > 1$ je $\log D_{\text{zás}} \approx \log P - \text{pK}_a + \text{pH}$

Pokud je sloučenina z velké části neionizovaná, pak:

$$\log D \approx \log P \quad [5, 6]$$

Pro stanovení lipofility je jako referenční systém obecně přijímán systém n-oktanol-voda [1].

Znalost hodnot lipofility je velmi důležitá pro vývoj a tvorbu lékových forem. Pro injekční podání jsou vhodné velmi nízké hodnoty $\log P$ (okolo 0), léčiva pro perorální podání mívají hodnoty $\log P$ většinou kolem 0-3 a transdermální podání naopak vyžaduje vysoké hodnoty (obvykle kolem 3-4). U léčiv s vyššími hodnotami $\log P$ je také pravděpodobnější průnik do centrálního nervového systému. U vysoce lipofilních látek hrozí kumulace v organismu a z toho vyplývající toxicita, proto je během výzkumu cílem získat léčivo s dostatečným účinkem při co nejnižší hodnotě $\log P$.

Studiu rozdělovacích koeficientů je v poslední době věnována stále větší pozornost, protože se zjistilo, že biologická účinnost koreluje s jejich hodnotami. Proto je také $\log P$ jedním z hlavních parametrů QSAR, což je odvětví, které se zabývá právě vztahy mezi biologickou aktivitou léčiva a jeho strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi [1, 5].

2.5.1 Tradiční a přímé metody

Hodnotu rozdělovacího koeficientu lze získat využitím tradiční metody „vytřepávání“. Léčivo se vytřepáváním v dělicí nálevce spolu se směsí dvou vzájemně nemísitelných kapalin rozdělí mezi obě rozpouštědla na základě své afinity k jednotlivým kapalinám [5, 7]. Koncentraci látky v obou fázích lze pak poměrně přesně stanovit například spektrofotometricky nebo chromatograficky a poté použít k výpočtu lipofility [6].

Jedná se však o proces, který je pracný, časově zdlouhavý, náročný na čistotu použitého materiálu a vyžaduje velké množství rozpouštědla. Určitá zlepšení v několika aspektech přineslo využití technik stir-flask, generator column, potenciometrické titrace a vysokorychlostní protiproudé chromatografie.

Přímá metoda stanovení využívá také chromatografické měření (podrobněji viz dále). Nedávno byl popsán extrakční rozdělovací systém založený na sekvenčním vstřikování vzorku rozpuštěného ve vodné fázi a oktanolu na kolonu, přičemž detekcí se přímo určí koncentrace látky v obou fázích. Metoda se nazývá vysokorychlostní protiproudá chromatografie. Rovnovážný stav se monitoruje opačným směrem proudu a cyklicky tak, že části vodné fáze a oktanolu procházejí detektorem průběžně tam a zpět, dokud se neustálí koncentrace látky v obou fázích. Mezi výhody této metody patří rychlost a také nízká spotřeba rozpouštědel a stanovovaných látek. Omezením však může být relativní čistota používaných chemikálií a nutnost příznivé absorpce v UV u stanovovaného léčiva. Tímto způsobem lze zjistit hodnoty logP v rozmezí -2 až 4 [5, 7].

Další přímou metodou stanovení lipofility se zabývali například autoři práce [8], Schrader a Andersson. Určovali hodnoty rozdělovacích koeficientů u šesti různých lokálních anestetik a využívali k tomu dialyzační trubici, kde docházelo k oddělení vodné fáze od oktanolové, ve které byl rozpuštěný analyzovaný vzorek. Zjistilo se, že touto vylepšenou metodou za využití ultrazvukového míchání lze výrazně zkrátit čas analýzy. Tímto měřením byla prokázána dobrá shoda s hodnotami získanými klasickou metodou vytřepávání v dělicí nálevce, horší však byla korelace s výsledky získanými nepřímou metodou stanovení pomocí reverzní kapalinové chromatografie (viz dále) [8].

2.5.2 Nepřímé metody

2.5.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

V současné době se nejčastěji určují hodnoty rozdělovacího koeficientu nepřímo, za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [3]. Tato metoda byla pro analýzu logP navržena již v 70. letech 20. století a od té doby se stala mnohokrát předmětem řady výzkumů [5].

Základním principem HPLC je separace jednotlivých látek obsažených ve vzorku mezi stacionární fází, kterou je naplněna chromatografická kolona a mobilní fází, jež za vysokého tlaku touto kolonou protéká. Jelikož rozdělování látek probíhá na základě vratných dvoufázových separačních mechanismů (např. adsorpce, iontová výměna), lze tuto techniku použít k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo v organických rozpouštědlech. Pomocí této techniky lze, na rozdíl

od plynové chromatografie, analyzovat látky, které jsou tepelně nestálé a málo těkavé, proto je HPLC mnohem více využívána než například plynová chromatografie.

Nejdůležitější součástí chromatografického systému jsou separační kolony (obr. 2). Klasické kolony pro HPLC mají většinou délku 10 – 25 cm a vnitřní průměr 3 – 5 mm, vyrobené jsou obvykle z nerezové oceli nebo skla a uvnitř obsahují vhodný sorbent. Nejčastěji se využívají tzv. chemicky vázané stacionární fáze, kdy na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových částic jsou vhodnou chemickou reakcí navázány různé radikály. Těmito radikály bývají nejčastěji uhlovodíkové řetězce tvořené většinou 8 nebo 18 atomy uhlíku. V tomto případě se jedná o nepolární chemicky vázané fáze, tzv. reverzní fáze.

Někdy ovšem může být radikál tvořen řetězcem o třech atomech uhlíku, na jehož konci jsou navázány skupiny $-NH_2$, $-CN$ a jiné. Takto vázané fáze jsou pak středně polární.

Chemicky vázané stacionární fáze se komerčně vyrábějí ve velmi širokém sortimentu. Jako nosiče vlastních stacionárních fází se kromě silikagelu používají i jiné materiály, například vhodné pryskyřice.

Sorbenty v kolonách pro HPLC jsou někdy tvořeny přímo silikagelem nebo oxidem hlinitým (polární sorbenty), ale tato varianta není příliš častá.

U iontově výměnné chromatografie se jako sorbenty používají vhodné ionexy a pro chromatografickou analýzu enantiomerů léčiv jsou k dispozici také různé druhy chirálních stacionárních fází [9, 10].

Pro stanovení lipofility léčiv se využívá zejména chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC).

Jedná se o systém, kdy je stacionární fáze méně polární než fáze mobilní. Jak již bylo uvedeno, na povrch silikagelu v koloně jsou chemicky navázány hydrofobní skupiny, nejčastěji $-C_{18}H_{37}$ a $-C_8H_{17}$. Jako mobilní fáze se využívá voda nebo vhodný pufr ve směsi s methanolem nebo acetonitrilem [11]. Separace látek pak probíhá podle jejich různé lipofility – ve vodě rozpustné látky se vymývají nejdříve a naopak lipofilní sloučeniny se na koloně zdržují déle, mají delší retenční čas (viz dále).

Výhodou HPLC je, že pro analýzu stačí i velmi malé množství chemického materiálu a ve srovnání s tradičními metodami je rychlá a lze ji relativně snadno automatizovat. Moderní kapalinové chromatografy jsou vybaveny automatickými dávkovači (autosamplery, obr. 2) analyzovaného vzorku a jsou propojeny s kvalitním počítačovým softwarem, tudíž lze po vhodném nastavení jednotlivých parametrů měření provádět i několik desítek analýz bez přítomnosti obsluhy. Získané výsledky jsou reprodukovatelné a neovlivněné případnými

nečistotami. V neposlední řadě je výhodou této metody také možnost určení širší škály hodnot lipofilit (v rozmezí od 0 do 6) oproti stanovení přímými technikami [9, 10, 12].

Určitá omezení se vyskytují u sloučenin projevujících se strukturální odlišností a někdy mohou nastat nežádoucí interakce látky s povrchem sorbentu. Jedním z hlavních důvodů proč RP-HPLC nemůže nikdy poskytnout přesný model pro stanovení logP je fakt, že intermolekulární interakce, které se účastní rozdělovacího procesu během rozdělování na chromatografické koloně, jsou podobné, ale nikoliv stejné povahy jako interakce, které jsou zodpovědné za rozdělování mezi vodu a oktanol. Největší rozdíly jsou vidět v příspěvku vodíkových interakcí [5].

Obecně HPLC umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení analyzovaného materiálu.

Kvalitativně popisuje jednotlivé látky ve směsi jejich retenční (eluční) čas t_R , který je charakterizován jako časový úsek od nástřiku vzorku na kolonu až po dosažení maxima chromatografického píku. Totožnost stanovované látky se pak hodnotí na základě porovnání naměřeného retenčního času s retenčním časem píku standardu. UV detektory s diodovým polem jsou dokonce schopné v maximu chromatografického píku proměřit UV spektrum vzorku, což je další vhodná identifikační charakteristika pro ověření totožnosti látky [9, 10].

Hodnota retenčního času je důležitou charakteristikou nejen pro určení totožnosti léčiva, ale je také potřebná k dalším výpočtům. Pomocí následujícího vzorce se spočítá kapacitní faktor:

$$K = \frac{t_r - t_0}{t_0}, \quad (4)$$

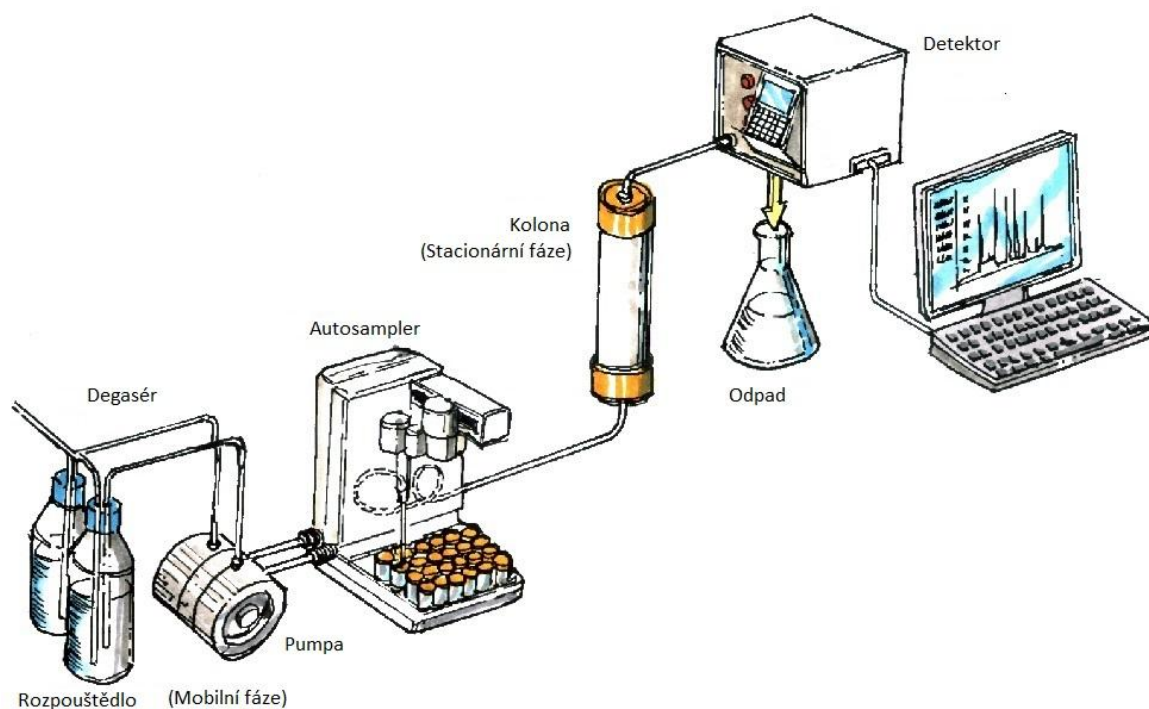
přičemž t_r je retenční čas a t_0 je mrtvý čas [3]. Mrtvý čas je retenční čas látky, která není v koloně zadržována.

Kvantitativní zastoupení jednotlivých složek směsi se hodnotí pomocí plochy (popř. výšky) chromatografického píku. Cílem chromatografické analýzy je získat dobré rozdělení jednotlivých látek v co nejkratším čase. Rozdělení může být úplné, částečné, nedokonalé [8, 9].

Citlivost a selektivita chromatografické analýzy závisí především na použitém detektoru (obr. 2). K dispozici je celá řada různých typů detektorů – např. spektrofotometrické, elektrochemické, refraktometrické nebo fluorescenční.

Nejběžnější jsou detektory spektrofotometrické, přičemž k detekci léčiv se mnohem častěji využívá UV oblast spektra, než viditelného nebo infračerveného záření. Spektrofotometrické detektory proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité

vlnové délky složkami eluátu, který protéká celou detektorem. Jednodušší UV detektory umožňují měřit pouze při fixních vlnových délkách (nejčastěji 254 nm nebo 280 nm), ale u dokonalejších UV-VIS detektorů lze libovolně nastavit vlnovou délku na potřebnou hodnotu (od 200 do 800 nm). Spektrofotometrické detektory jsou charakteristické vysokou citlivostí (10^{-9} až 10^{-10} g/ml), vykazují dobrou selektivitu a dají se použít i při gradientové eluci [9, 10].



Obr. 2: Schéma uspořádání kapalinového chromatografu (převzato z [35], upraveno)

Stanovením logP za využití chromatografie na reverzní fázi se zabývali např. Pallicer a spol., přičemž ve své práci se zaměřili na sloučeniny s rozmanitou chemickou strukturou a hodnotami pK_a vyššími než 9. Jako mobilní fázi používali pufr s vyšším pH, aby se zabránilo ionizaci sloučenin. Stanovení prováděli na třech různých kolonách s vhodnou povrchovou úpravou, odolnou vůči zásaditému pH [14].

Autoři práce [15] studovali naopak kyselé sloučeniny a zaměřili se na rozdíly v hodnotách retenčních časů naměřených s přidavkem n-oktanolu ke směsi mobilní fáze a naopak bez jeho přítomnosti. Ke stanovování rovněž využívali RP-HPLC.

Stanovení rozdělovacích koeficientů u 57 terpenoidů metodou chromatografie na reverzní fázi se věnovali autoři práce [16]. Detekce probíhala pomocí UV detektoru a

refraktometrického detektoru. Rozdělovací koeficienty byly následně porovnávány s vypočítanými hodnotami a hodnotami získanými přímou metodou vytřepávání v dělicí nálevce. Všechny získané výsledky spolu poměrně dobře korelovaly.

HPLC analýza může probíhat za konstantního složení mobilní fáze během celého měření – jedná se o tzv. isokratickou eluci. Tato metoda se používá nejčastěji. Druhá možnost spočívá v programově měněném složení mobilní fáze – tzv. gradientové eluci [9].

Určení logP pomocí gradientové chromatografie na reverzních fázích je popisováno např. v článku [17]. Autoři zde zjišťovali hodnoty rozdělovacích koeficientů u některých nosných dekonjestantů [17].

Jako další příklad gradientové metody a také příklad obtížnosti stanovení hodnot rozdělovacích koeficientů na koloně s chemicky vázanými fázemi lze uvést práci [18]. K analýze autoři používali kolonu se stacionární fází C18, jako mobilní fázi směs acetonitrilu/methanolu a vody, přičemž pH bylo upraveno octanem amonným u neutrálních sloučenin na hodnotu 7,4, u slabých bází na pH 10,5 a u slabě kyselých látek na hodnotu pH 2,0. Během analýzy se měnilo složení mobilní fáze a zjistilo se, že jako výhodnější součást mobilní fáze se osvědčil acetonitril a zároveň, že metoda je vhodnější spíše pro neutrální sloučeniny. Nelze ji použít pro různorodou skupinu sloučenin uplatňující interakce pomocí vodíkových vazeb [18].

Dalším možným způsobem pro určení logP je využití „obalených“ coated kolon. Na rozdíl od chemicky vázaných fází a porézních polymerních stacionárních fází nejsou tyto kolony využívané v takové míře, nicméně výzkumy poskytují rovněž zajímavé výsledky. Například práce [19, 20, 21] pojednávají o oktanolem plněných kolonách, kde jako mobilní fáze je používán fosfátový pufr ve směsi s oktanolem a methanolem, a dále publikace [22] o kolonách se silikagelem obaleným fosfatidylcholinem, kde mobilní fázi tvoří směs acetonitrilu a vody. Výsledky ukazují, že tyto metody jsou vhodné pro stanovení logP u neutrálních a slabě zásaditých látek, nikoliv u sloučenin kyselých. Problémem u těchto kolon je nedostatečná chemická a tepelná stabilita.

Metody přímé a nepřímé lze také propojit. Toho ve své práci využili například Hitzel a spol. Tradiční metodu vytřepávání převedli do technologie 96 jamkové destičky, kde probíhal proces rozdělování a příprava vzorků, přičemž autosampler pak dávkoval organické a vodné fáze přímo z destičky a vlastní analýza probíhala pomocí RP-HPLC. Tato metoda vedla k výraznému zkrácení doby analýzy a obchází jakoukoliv potřebu ručního zásahu [23].

2.5.2.2 Tenkovrstvá chromatografie

K jedné z dalších technik, jak určit rozdělovací koeficient, patří tenkovrstvá chromatografie (TLC). Jedná se o obdobnou separační metodu jako HPLC s tím rozdílem, že stacionární fáze je umístěna na pevném a plochém podkladu (nejčastěji na skleněné desce nebo hliníkové folii). Na tomto podkladu je nanesený vhodný sorbent, např. silikagel, oxid hlinitý, prášková celulóza apod.

Na TLC desku se nanese vzorek analyzovaného léčiva a nechá se vyvíjet v prostoru nasyceném parami mobilní fáze. Mobilní fáze vzlíná tenkou vrstvou pomocí kapilárních sil a unáší s sebou složky vzorku tím rychleji, čím méně interagují se stacionární fází. Obdobně jako u HPLC je výsledkem hodnota retenčního času, u TLC je to tzv. retenční faktor R_F , z něhož lze pak snadno, pomocí jednoduchého vzorce (5), spočítat hodnotu R_M :

$$R_M = \log\left[\frac{1}{R_F} - 1\right] \quad (5)$$

Hodnota R_M odráží strukturu chemických sloučenin, jelikož její hodnota je vlastně součtem hodnot R_M pro jednotlivé skupiny atomů v molekule [9, 10].

Výhodou TLC je, že vzorky jsou od sebe odděleny paralelně a jsou přístupné pro různé chemické reakce a pro pohodlnou detekci. Cena metody je příznivá a moderní vybavení umožňuje vysokou úroveň automatizace a zpracování dat. Je však třeba poznamenat, že TLC je ovlivněna mnoha parametry, které je nutné standardizovat pro získání reprodukovatelných výsledků [5].

O využití tenkovrstvé chromatografie na reverzní fázi již byla publikována řada studií, mnoho z nich je však omezeno na malé skupiny sloučenin s podobnými vlastnostmi. Výjimkou je studie Drosse a kol. [24], která byla úspěšně zhodnocena a potvrzena Abrahamem a kol. [25].

Dross a kol. navrhli rovnici k využití hodnoty R_M získané extrapolací ke stanovení $\log P$. Jako stacionární fáze byla použita deska, potažená -C18, z čehož vyplývá, že se jedná o obdobu RP-HPLC. Mobilní fáze obsahující směs vody a methanolu poskytla lepší výsledky oproti směsi vody a acetonitrilu a dále došli k závěru, že metoda je vhodnější pro neutrální sloučeniny [24].

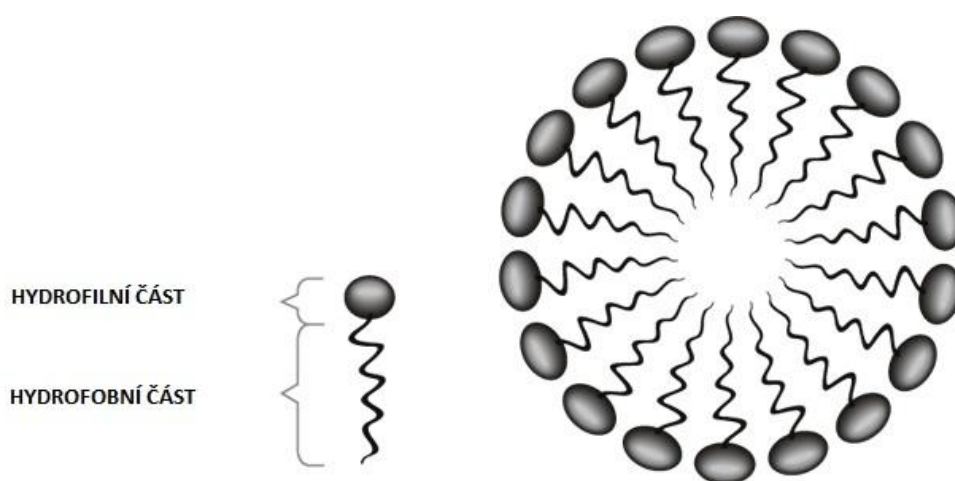
Abraham a kol. [25] dokázali, že retenční vlastnosti charakterizované hodnotami R_M korelují s rozdělovacími koeficienty a potvrdili tak domněnku, že extrapolované hodnoty R_M zjištěné při RP-TLC mohou být použity pro měření lipofility. Aromatické a dusíkaté

heterocyklické sloučeniny musely však být se studie vyloučeny a metoda je omezena pouze na neutrální látky a nelze ji proto zobecnit [25].

2.5.2.3 Micelární a mikroemulzní elektrokinetická chromatografie

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je v současné době předmětem mnoha výzkumů v souvislosti se stanovením logP [5]. Tato technika spadá pod metody kapilární elektroforézy.

Jedná se o elektromigrační techniku, která je vhodná pro rozdělení a kvantifikaci elektricky nabitých látek ale i neutrálních molekul. Separace se provádí při vysokém pH (zajišťuje dostatečný elektroosmotický tok uvnitř kapiláry) v základním roztoku elektrolytu, který obsahuje povrchově aktivní látku (tenzid) v koncentraci vyšší než je kritická micelární koncentrace. Molekuly tenzidu začnou agregovat a vytvářet micely (obr. 3), přičemž hydrofilní hlavičky jsou umístěny na vnější straně a hydrofobní řetězce tvoří nepolární jádro, v němž mohou být rozpuštěny složky vzorku. Dojde tak k vytvoření tzv. pseudostacionární fáze.



Obr. 3: Znárodnění struktury micely (převzato z [34], upraveno)

Jako nejčastější tenzid se používá dodecylsírán sodný, dále cetyltrimethylamoniumbromid, žlučové soli a další. Počet monomerů v micelách závisí na typu povrchově aktivní látky a také na přítomnosti organického rozpouštědla v separačním pufru (narušuje tvorbu micel).

Micely migrují kapilárou a složky vzorku se rozdělují mezi pseudostacionární fázi v micelách a vodný pufr (mobilní fázi) a obdobně jako u HPLC nastává jejich retence. Látky, které jsou micelami méně zadržované, mají kratší retenční časy a naopak. Výhodou této metody je, že zde dochází k rozdělení na základě náboje a hydrofobicity. Hydrofobní interakce a následné dělení probíhá na fázovém rozhraní elektrolytu a povrchu micel, kdežto separace na základě náboje probíhá v elektrolytu. MEKC lze proto považovat za kombinaci elektroforézy a chromatografie.

V případě, že stanovovaná látka je neutrální a tedy nemá elektroforetickou pohyblivost, rozdělí se mezi micely a vodný tlumivý roztok. Micely vlastně fungují jako náhrada organické fáze (methanolu nebo acetonitrilu). Migrační rychlost analyzované látky pak závisí na rozdělovacím koeficientu mezi micelou a tlumivým roztokem [26, 27, 28, 29].

Rozlišení analyzované látky je charakterizováno kapacitním faktorem, jenž je dán poměrem látkového množství rozpuštěné látky v micelách a látkového množství rozpuštěné látky v mobilní fázi a lze jej vyjádřit vzorcem (6):

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t_r}{t_m}\right)}, \quad (6)$$

kde t_r je retenční čas rozpuštěné látky, t_0 je retenční čas nezadržované složky a t_m je migrační čas micel.

Jak již bylo dříve uvedeno, nejvíce oblíbenou povrchově aktivní látkou pro MEKC je dodecylsírán sodný, který byl také jako první tenzid použit pro odhad $\log P$ [27, 30, 31, 32]. Žlučové soli v roli tenzidu byly využity například v práci [22].

Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC) je obdobná metoda jako MEKC. Analyzovaná látka se rozděljuje mezi olejovou a vodnou fázi. Jedná se o soustavu tvořenou kapičkami oleje dispergovanými ve vodné fázi (emulze).

Pro odhad hodnoty $\log P$ je široce používaný systém, kdy je mikroemulze připravená z dodecylsírany sodného, butan-1-olu a heptanu. Neutrální a bazické sloučeniny se analyzovaly za použití křemenné kapilární kolony s pufrem složeným z boritanu sodného a fosforečnanu sodného při pH 10. Slabě kyselé sloučeniny vyžadovaly sulfonovanou křemennou kolonu a fosforečnato-sodný pufr při pH 3 [33]. Zjistilo se a dalšími studiemi bylo potvrzeno, že retence v tomto mikroemulzním systému silně koreluje se systémem n-oktanol-voda.

Existují ještě mnohé další emulzní a mikroemulzní systémy, které se mohou využít pro stanovení $\log P$, a které poskytují ekvivalentní výsledky. Tyto systémy jsou nadále předmětem výzkumů [5].

Separční účinnost mikroemulzních systémů je podstatně vyšší než u kapalinové chromatografie a očekává se, že příprava mikroemulzí je více reprodukovatelná než příprava chemicky vázaných fází u kapalinové chromatografie.

MEKC a MEEKC jsou metody rovněž plně automatizovatelné a umožňují téměř bezobslužný provoz. Jejich nevýhodou je, že jsou vhodné pouze pro neutrální, slabě kyselé a slabě bazické sloučeniny. Látky, které jsou ionizované podléhají další elektroforetické migraci a elektrostatickými silami interagují s nabitými složkami separačního systému, a tudíž tak negativně ovlivňují výsledek retence [5].

Kromě experimentálních metod zde popsaných, lze lipofilitu nových léčiv odhadnout také za pomoci počítačových softwarů, které jsou založeny na různých matematických výpočetních metodách [6].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

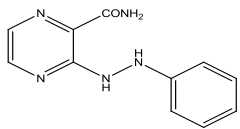
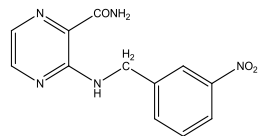
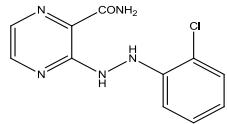
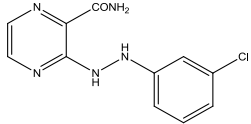
3.1 Použité chemikálie

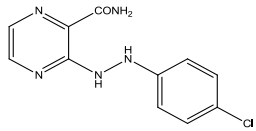
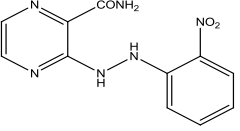
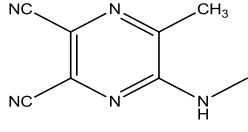
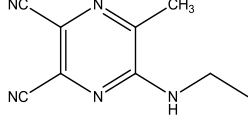
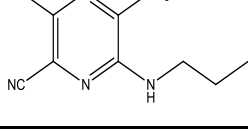
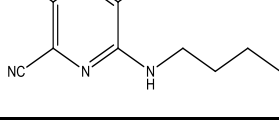
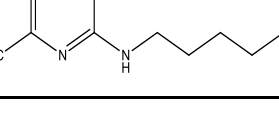
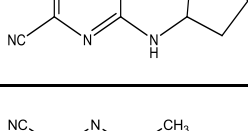
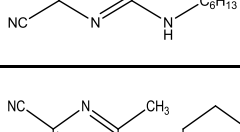
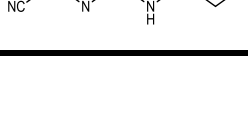
V této rigorózní práci byly použity následující chemikálie:

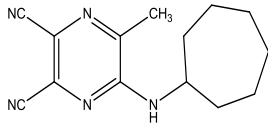
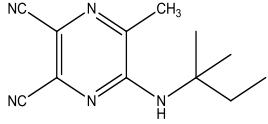
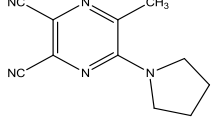
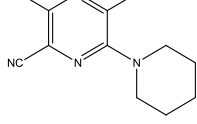
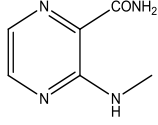
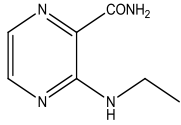
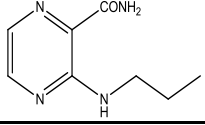
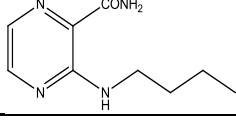
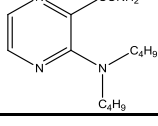
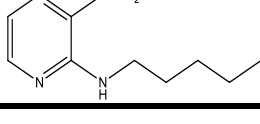
- Methanol for gradient elution – CHROMASOLV[®], Sigma - Aldrich
- Ultračistá voda připravená reverzní osmózou, FaF UK
- Jodid draselný (KI), poskytnut prof. Doležalem, KFCHKL

Vlastní měření probíhalo s methanolicými roztoky ($c = 10^{-4}$ mol/l) nově připravených potenciálních léčiv. Tyto roztoky byly rovněž poskytnuty pracovní skupinou prof. Doležala z KFCHKL. Přehled těchto vzorků je uveden v tab. 1.

Tab. 1: Označení a chemická struktura vzorků, včetně jejich molekulových hmotností

Kód	Vzorec	Molekulová hmotnost
OJ 16		229,24
OJ 54		273,25
OJ 75		263,68
OJ 76		263,68

OJ 77		263,68
OJ 78		274,24
OJ 80		173,17
OJ 81		187,20
OJ 82		201,23
OJ 83		215,25
OJ 85		229,28
OJ 86		227,27
OJ 87		243,31
OJ 88		241,29

OJ 90		255,32
OJ 92		229,28
OJ 93		213,24
OJ 94		227,27
OJ 95		152,15
OJ 96		166,18
OJ 97		180,21
OJ 98		194,23
OJ 99		250,34
OJ 100		208,26

3.2 Použité přístroje

Během měření byl používán kapalinový chromatograf Agilent® Series 1200 SL (Agilent Technologies) sestávající z následujících modulů:

- vakuový mikrodegaser
- binární čerpadlo 1200 SL
- autosampler 1200 SL plus
- termostat autosampleru
- kolonový termostat TCC Infinity 1290
- detektor s diodovým polem 1200 SL

Software: Agilent ChemStation, verze B.04.02.

Experimenty probíhaly na chromatografické koloně Zorbax ECLIPSE XDB-C8 600 Bar, 50,0x3,0 mm, 1,8 μm . Během všech měření byla kolona termostatována na 30 °C.

3.3 Nástřik

V této práci bylo při všech pokusech nastříkováno na chromatografickou kolonu 10 μl roztoku jednotlivých vzorků.

3.4 Podmínky chromatografické detekce

UV detekce probíhala při vlnových délkách 210 nm a 270 nm.

4. VÝSLEDKOVÁ ČÁST

Na chromatografickou kolonu Zorbax ECLIPSE XDB-C8 byly postupně nastříknuty jednotlivé vzorky a zjištěny jejich retenční časy.

Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a ultračisté vody v různých poměrech složek. Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min, u látek s dlouhými retenčními časy na 0,6 ml/min, případně 0,7 ml/min.

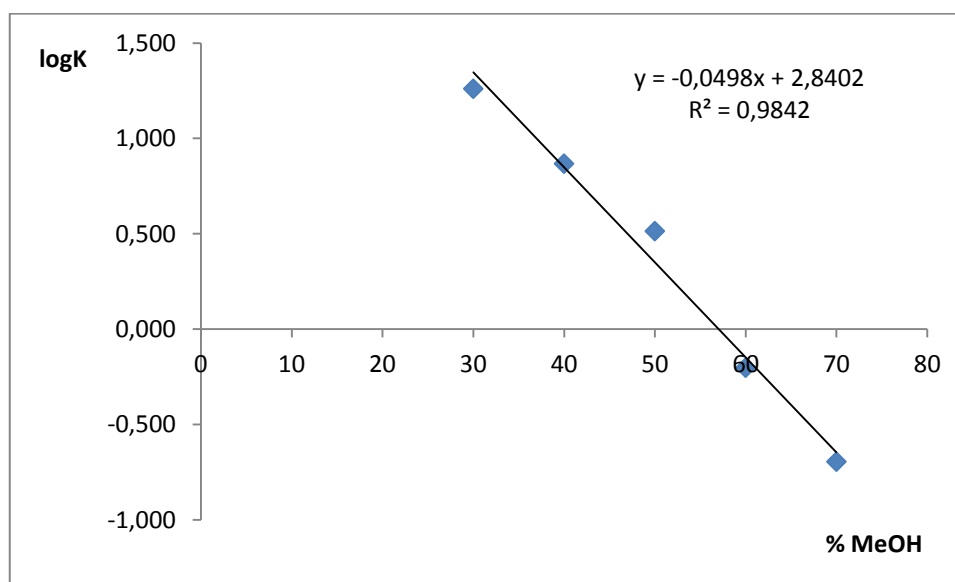
Ze získaných hodnot retenčních časů a mrtvého času kolony (za využití methanolickeho roztoku jodidu draselneho o koncentraci 10^{-4} mol/l) byl podle rovnice (4) u všech vzorků vypočítán kapacitní faktor a následně jeho dekadický logaritmus pro jednotlivá složení mobilní fáze.

Výsledné hodnoty retenčních časů vzorků, jodidu draselneho a vypočítaného kapacitního faktoru pro jednotlivé látky jsou uvedeny v následujících tabulkách. V grafech je pak znázorněna závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi, přičemž koncentrace methanolu je vyjádřena v objemových procentech. Příslušné závislosti jsou matematicky vyjádřeny pomocí rovnic regresních přímek. Absolutní člen v těchto rovnicích představuje hodnotu kapacitního faktoru látky extrapolovaného na nulovou koncentraci methanolu v mobilní fázi. Tato hodnota je považována za číselné vyjádření lipofility analyzovaných léčiv.

Vzorek OJ 16

Tab. 2: Retenční časy vzorku OJ 16 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	9,64	0,50	18,25	1,261
40	4,22	0,50	7,38	0,868
50	2,12	0,50	3,27	0,515
60	0,79	0,49	0,63	-0,202
70	0,58	0,49	0,20	-0,695

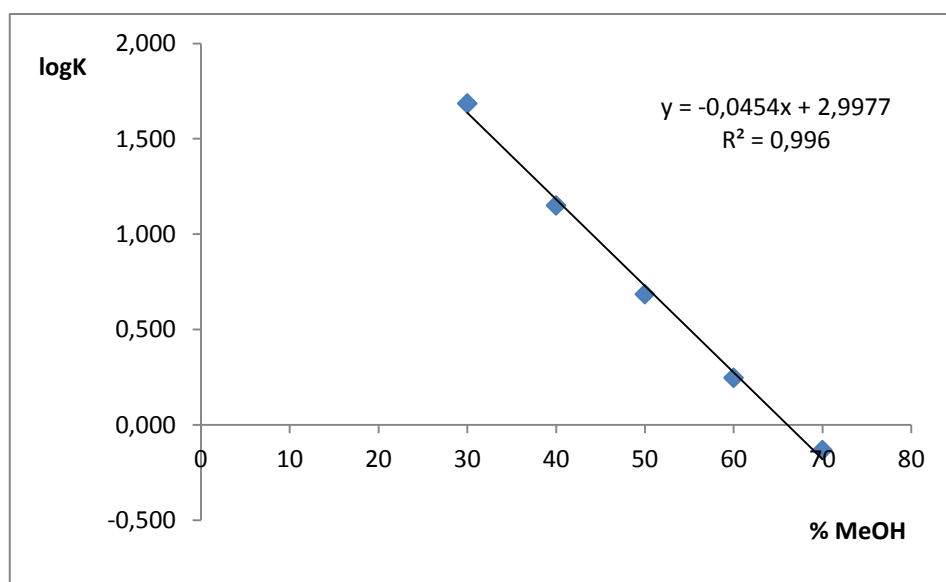


Graf 1: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 16

Vzorek OJ 54

Tab. 3: Retenční časy vzorku OJ 54 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	24,82	0,50	48,53	1,686
40	7,63	0,50	14,17	1,151
50	2,90	0,50	4,85	0,686
60	1,35	0,49	1,77	0,247
70	0,84	0,49	0,74	-0,132

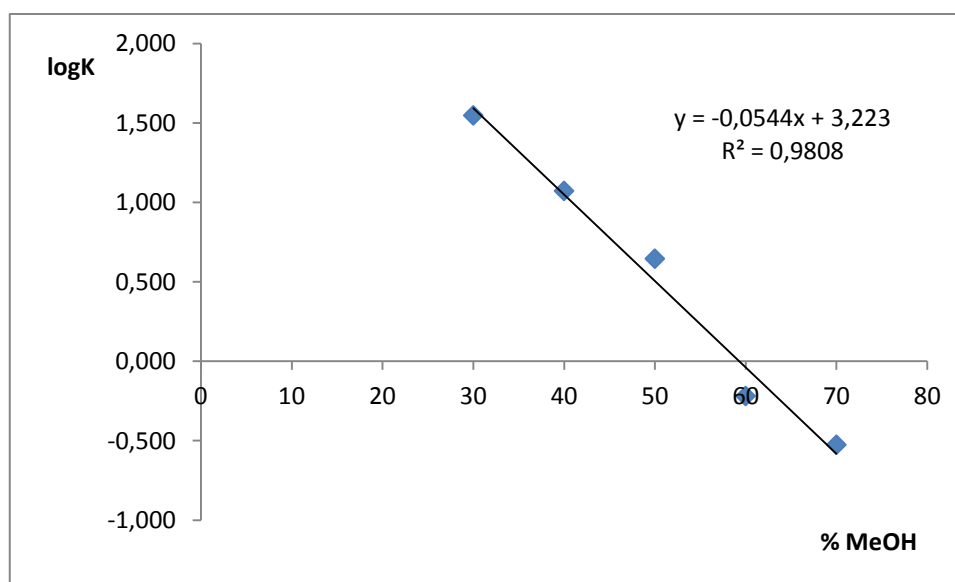


Graf 2: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 54

Vzorek OJ 75

Tab. 4: Retenční časy vzorku OJ 75 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	18,20	0,50	35,34	1,548
40	6,45	0,50	11,83	1,073
50	2,69	0,50	4,43	0,646
60	0,78	0,49	0,61	-0,218
70	0,63	0,49	0,30	-0,524

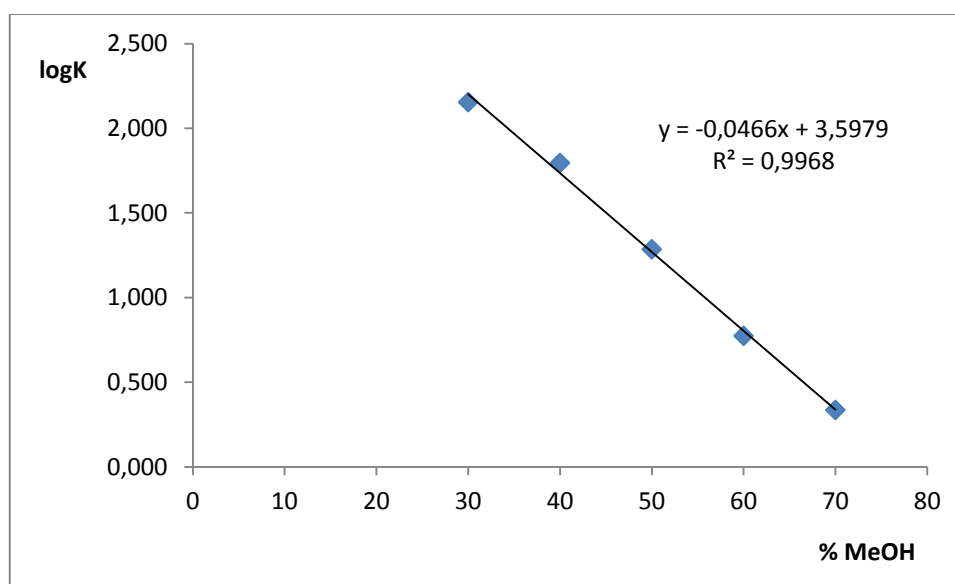


Graf 3: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 75

Vzorek OJ 76

Tab. 5: Retenční časy vzorku OJ 76 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	50,70	0,35	142,62	2,154
40	31,89	0,50	62,39	1,795
50	10,06	0,50	19,28	1,285
60	3,38	0,49	5,94	0,774
70	1,54	0,49	2,17	0,336

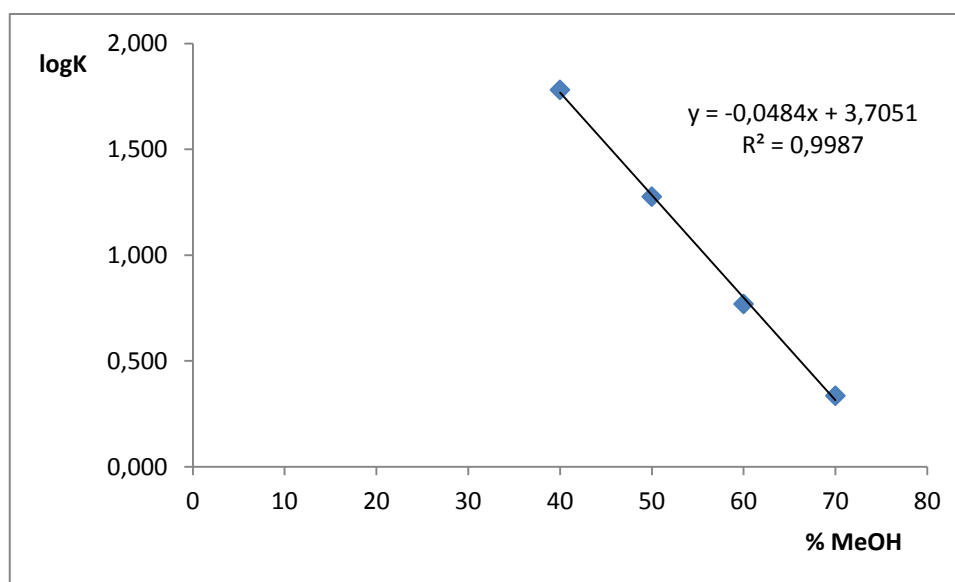


Graf 4: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 76

Vzorek OJ 77

Tab. 6: Retenční časy vzorku OJ 77 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	neměřeno	0,50	-	-
40	30,91	0,50	60,46	1,781
50	9,88	0,50	18,91	1,277
60	3,35	0,49	5,88	0,770
70	1,54	0,49	2,17	0,336

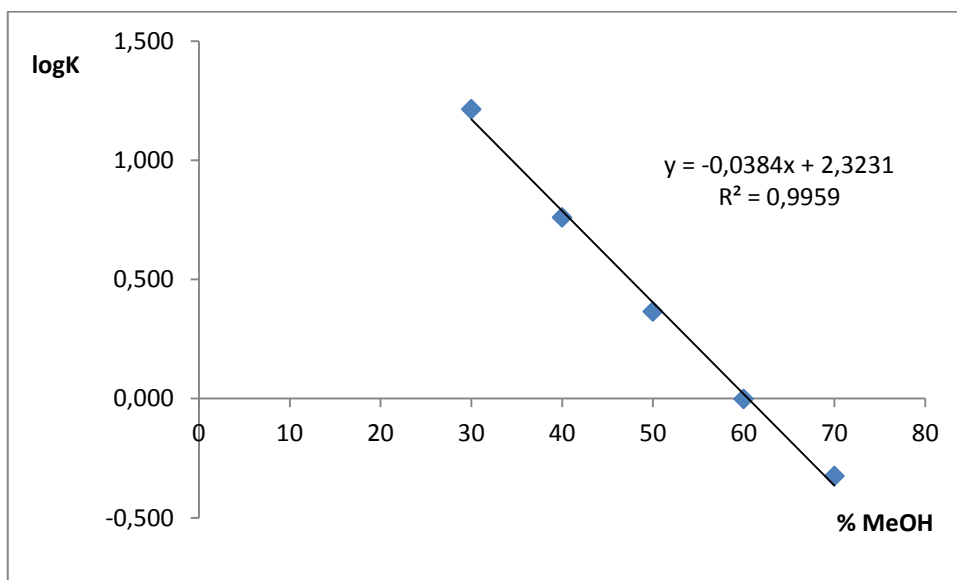


Graf 5: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 77

Vzorek OJ 78

Tab. 7: Retenční časy vzorku OJ 78 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	8,72	0,50	16,40	1,215
40	3,40	0,50	5,77	0,761
50	1,65	0,50	2,32	0,366
60	0,97	0,49	1,00	-0,001
70	0,72	0,49	0,47	-0,324

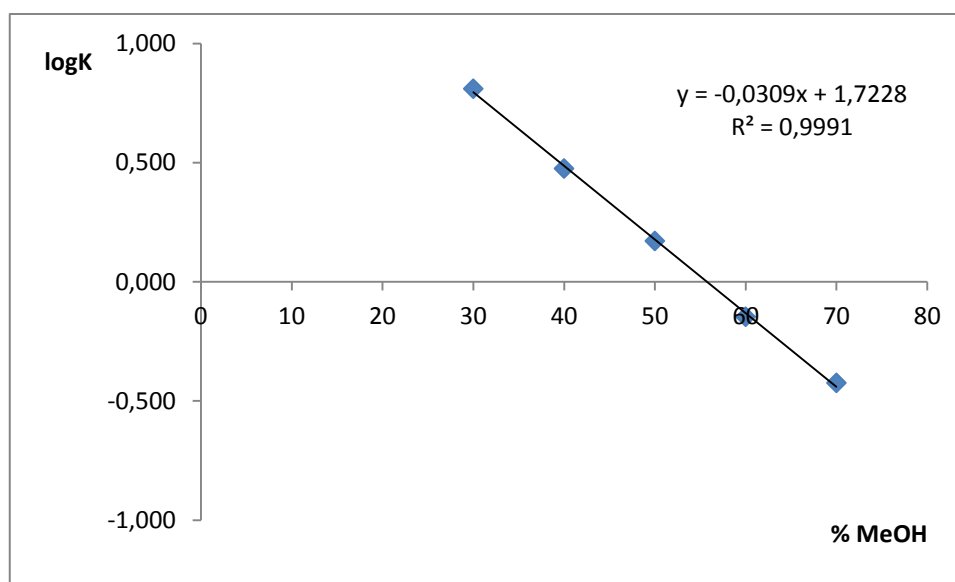


Graf 6: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 78

Vzorek OJ 80

Tab. 8: Retenční časy vzorku OJ 80 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	3,74	0,50	6,47	0,811
40	2,01	0,50	2,99	0,476
50	1,23	0,50	1,49	0,172
60	0,84	0,49	0,71	-0,146
70	0,67	0,49	0,38	-0,423

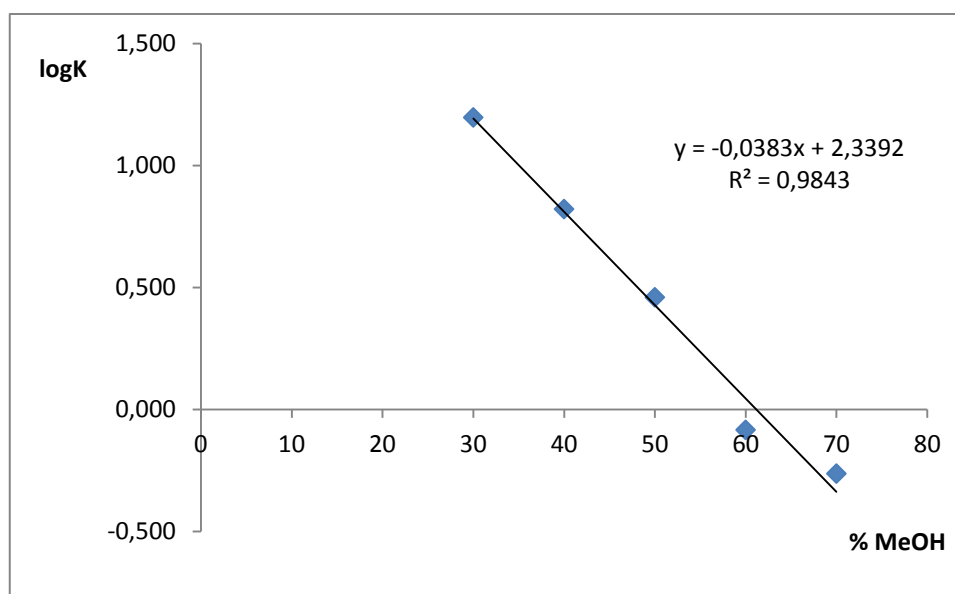


Graf 7: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 80

Vzorek OJ 81

Tab. 9: Retenční časy vzorku OJ 81 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	8,40	0,50	15,76	1,197
40	3,84	0,50	6,63	0,822
50	1,93	0,50	2,89	0,460
60	0,89	0,49	0,83	-0,083
70	0,75	0,49	0,55	-0,262

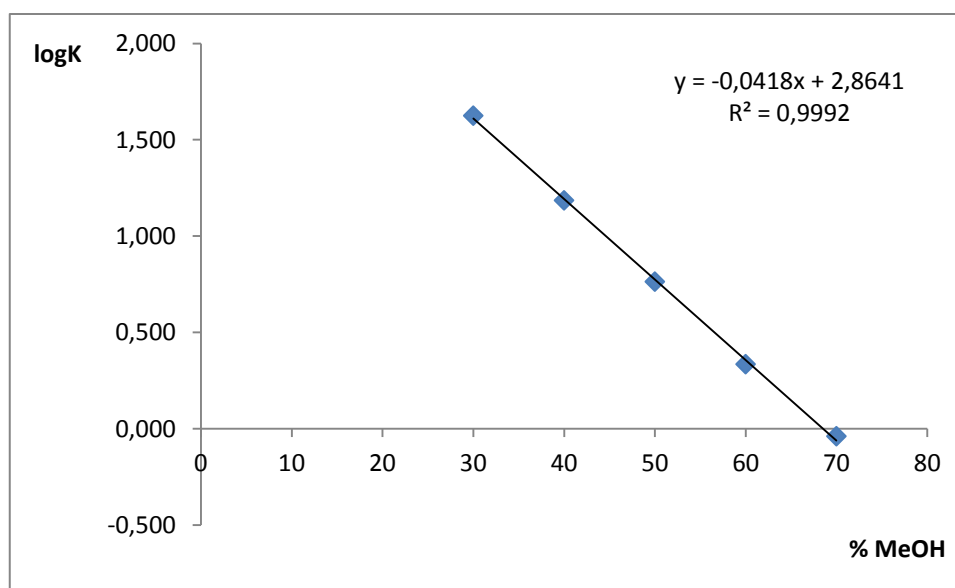


Graf 8: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 81

Vzorek OJ 82

Tab. 10: Retenční časy vzorku OJ 82 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	21,67	0,50	42,25	1,626
40	8,23	0,50	15,35	1,186
50	3,38	0,50	5,81	0,764
60	1,54	0,49	2,17	0,336
70	0,93	0,49	0,92	-0,038

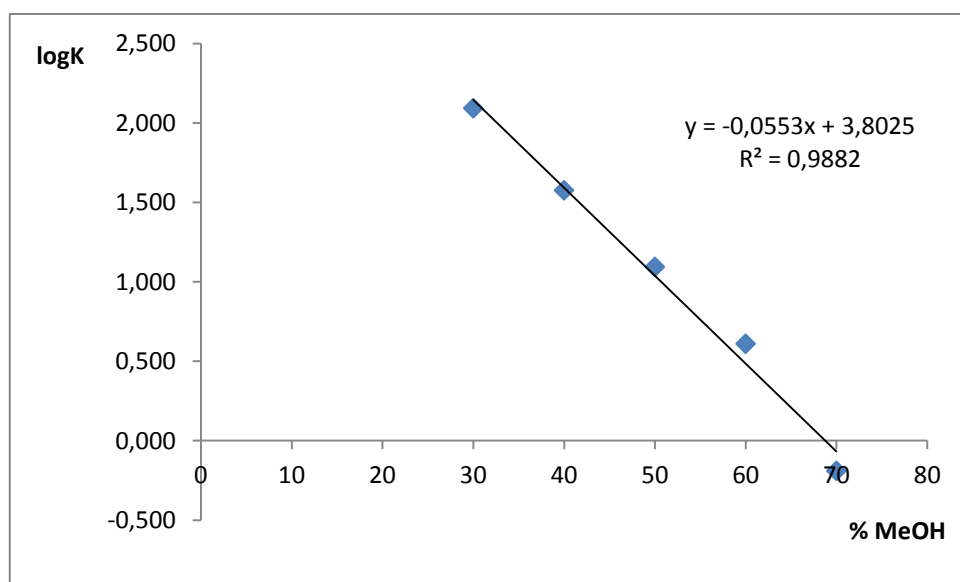


Graf 9: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 82

Vzorek OJ 83

Tab. 11: Retenční časy vzorku OJ 83 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	44,12	0,35	123,99	2,093
40	19,49	0,50	37,74	1,577
50	6,67	0,50	12,44	1,095
60	2,48	0,49	4,08	0,611
70	0,80	0,49	0,65	-0,189

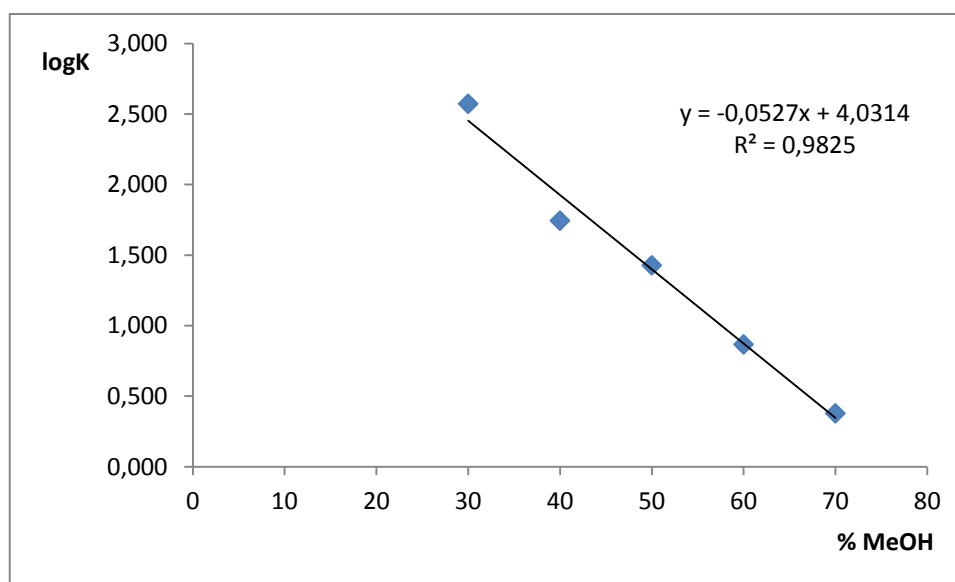


Graf 10: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 83

Vzorek OJ 85

Tab. 12: Retenční časy vzorku OJ 85 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	132,48	0,35	374,30	2,573
40	28,46	0,50	55,58	1,745
50	13,79	0,50	26,80	1,428
60	4,08	0,49	7,37	0,868
70	1,65	0,49	2,39	0,379

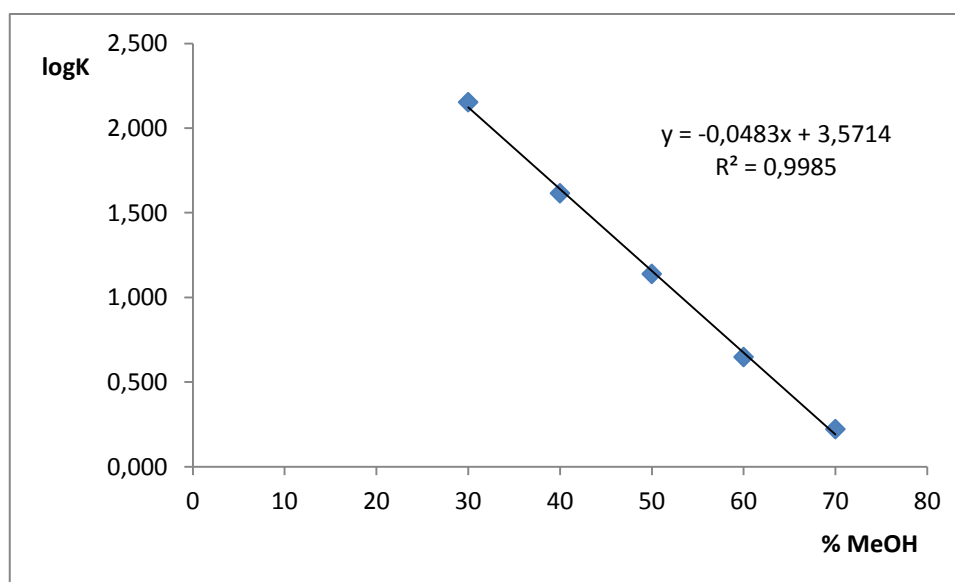


Graf 11: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 85

Vzorek OJ 86

Tab. 13: Retenční časy vzorku OJ 86 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	50,70	0,35	142,62	2,154
40	21,28	0,50	41,31	1,616
50	7,34	0,50	13,79	1,140
60	2,66	0,49	4,45	0,649
70	1,30	0,49	1,67	0,223

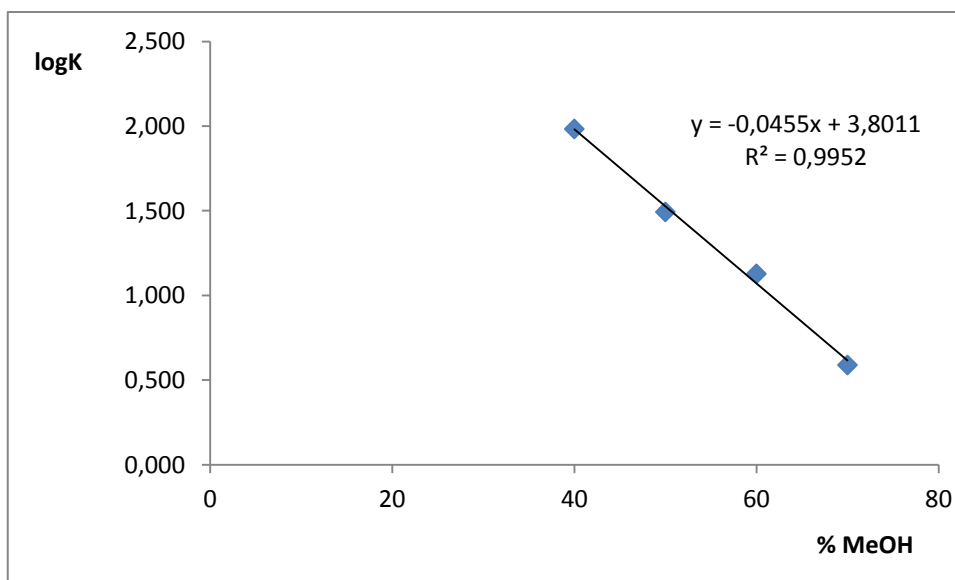


Graf 12: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 86

Vzorek OJ 87

Tab. 14: Retenční časy vzorku OJ 87 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	neměřeno	0,50	-	-
40	49,00	0,50	96,42	1,984
50	15,96	0,50	31,18	1,494
60	7,03	0,49	13,43	1,128
70	2,37	0,49	3,89	0,590

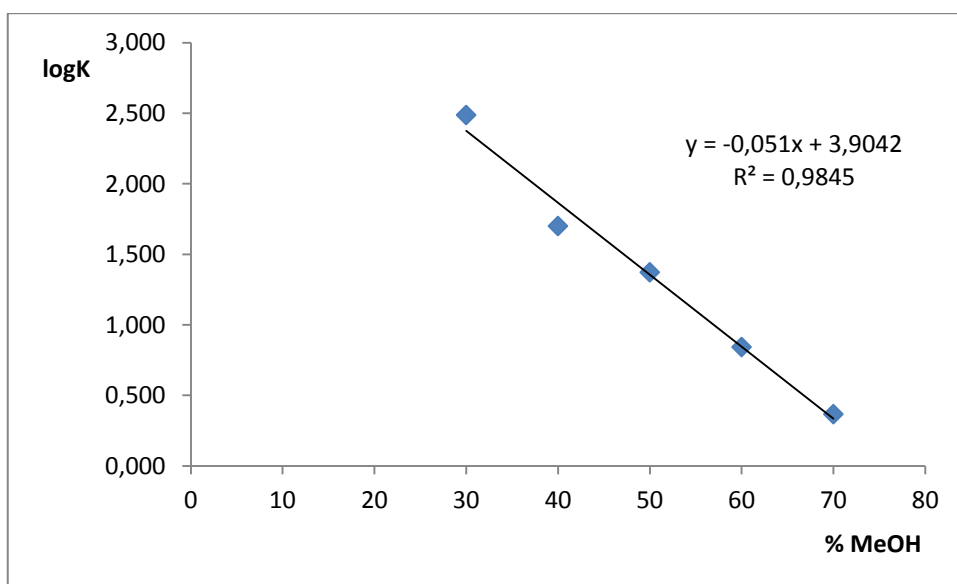


Graf 13: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 87

Vzorek OJ 88

Tab. 15: Retenční časy vzorku OJ 88 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	109,00	0,35	307,78	2,488
40	25,78	0,50	50,26	1,701
50	12,22	0,50	23,63	1,373
60	3,88	0,49	6,97	0,843
70	1,62	0,49	2,33	0,368

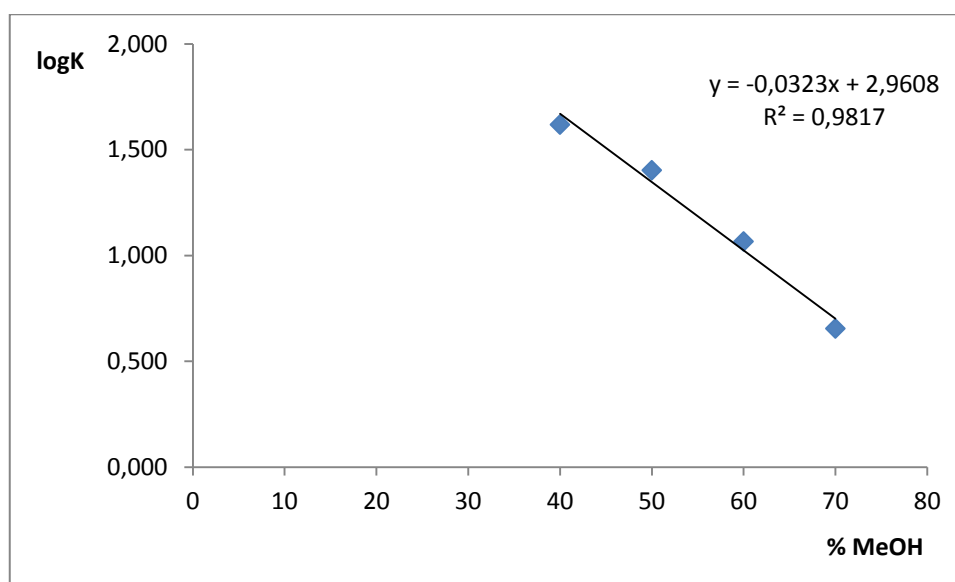


Graf 14: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 88

Vzorek OJ 90

Tab. 16: Retenční časy vzorku OJ 90 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	neměřeno	0,50	-	-
40	21,40	0,50	41,54	1,619
50	13,04	0,50	25,29	1,403
60	6,16	0,49	11,65	1,066
70	2,68	0,49	4,52	0,655

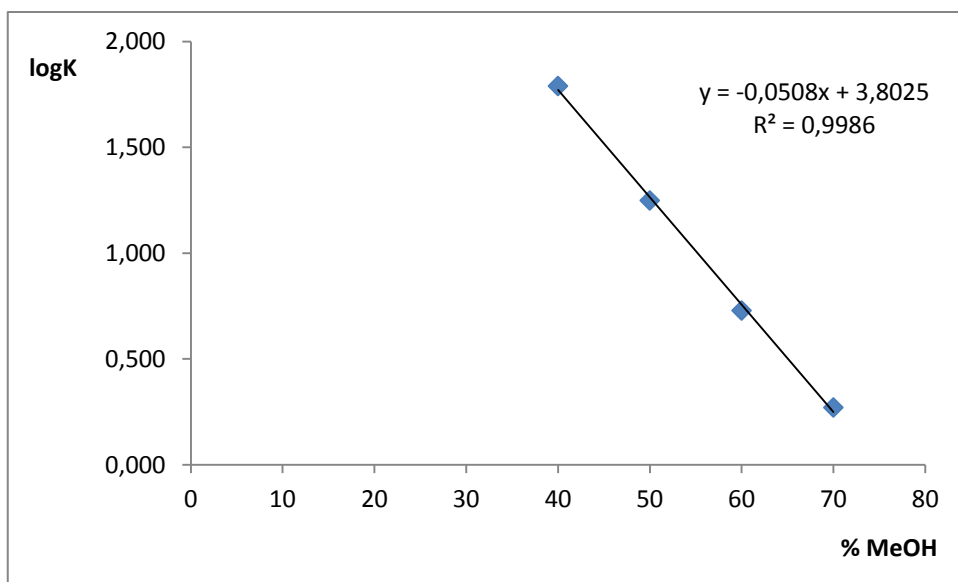


Graf 15: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 90

Vzorek OJ 92

Tab. 17: Retenční časy vzorku OJ 92 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	neměřeno	0,50	-	-
40	31,52	0,50	61,67	1,790
50	9,30	0,50	17,75	1,249
60	3,10	0,49	5,36	0,729
70	1,39	0,49	1,87	0,271

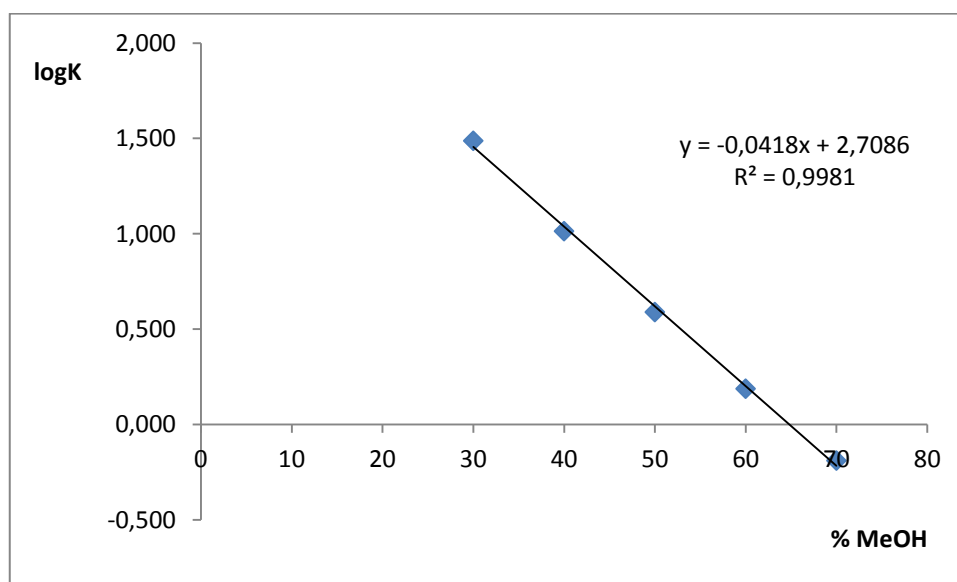


Graf 16: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 92

Vzorek OJ 93

Tab. 18: Retenční časy vzorku OJ 93 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	15,92	0,50	30,78	1,488
40	5,70	0,50	10,34	1,014
50	2,43	0,50	3,89	0,590
60	1,24	0,49	1,54	0,188
70	0,80	0,49	0,65	-0,189

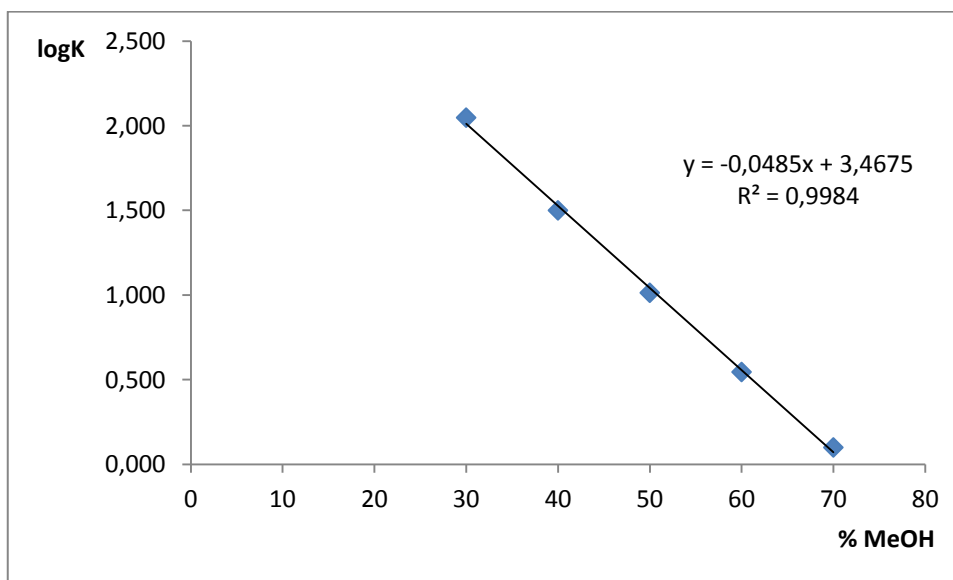


Graf 17: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 93

Vzorek OJ 94

Tab. 19: Retenční časy vzorku OJ 94 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	39,82	0,35	111,81	2,048
40	16,44	0,50	31,68	1,501
50	5,62	0,50	10,33	1,014
60	2,20	0,49	3,52	0,546
70	1,10	0,49	1,26	0,100

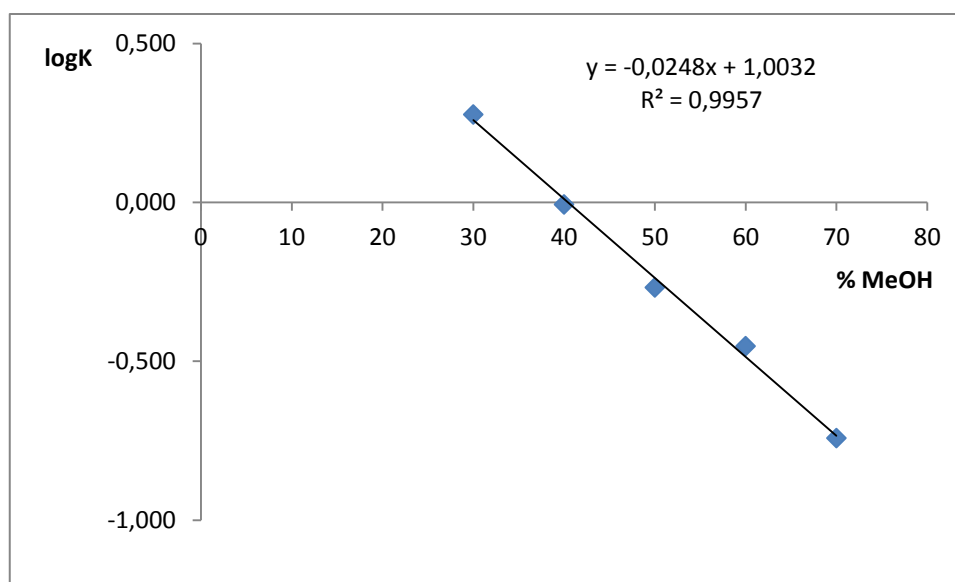


Graf 18: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 94

Vzorek OJ 95

Tab. 20: Retenční časy vzorku OJ 95 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	1,45	0,50	1,89	0,277
40	1,00	0,50	0,99	-0,006
50	0,76	0,50	0,54	-0,267
60	0,66	0,49	0,35	-0,452
70	0,57	0,49	0,18	-0,741

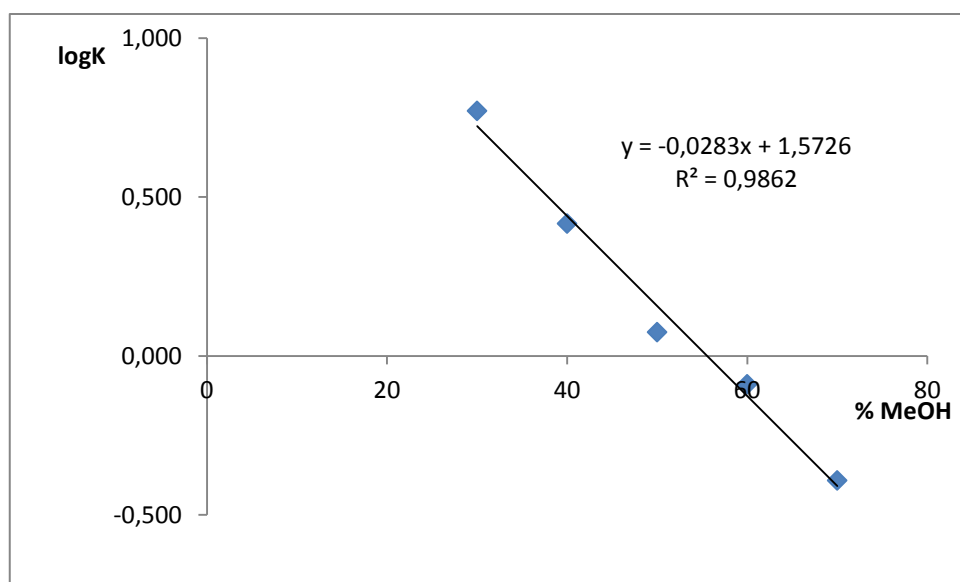


Graf 19: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 95

Vzorek OJ 96

Tab. 21: Retenční časy vzorku OJ 96 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	3,46	0,50	5,91	0,772
40	1,82	0,50	2,61	0,417
50	1,09	0,50	1,19	0,075
60	0,88	0,49	0,82	-0,089
70	0,68	0,49	0,41	-0,391

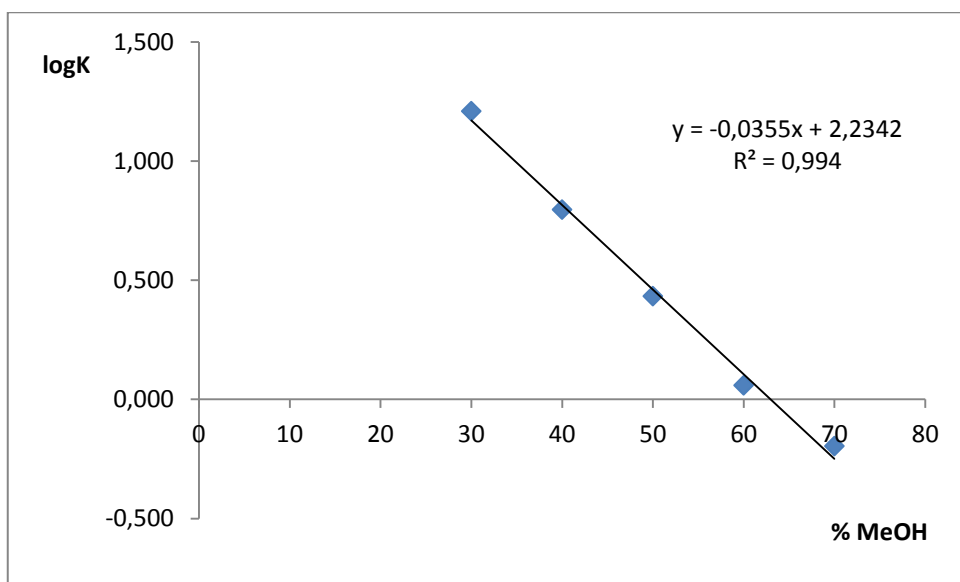


Graf 20: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 96

Vzorek OJ 97

Tab. 22: Retenční časy vzorku OJ 97 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	8,61	0,50	16,19	1,209
40	3,65	0,50	6,26	0,796
50	1,84	0,50	2,71	0,433
60	1,05	0,49	1,15	0,059
70	0,79	0,49	0,64	-0,196

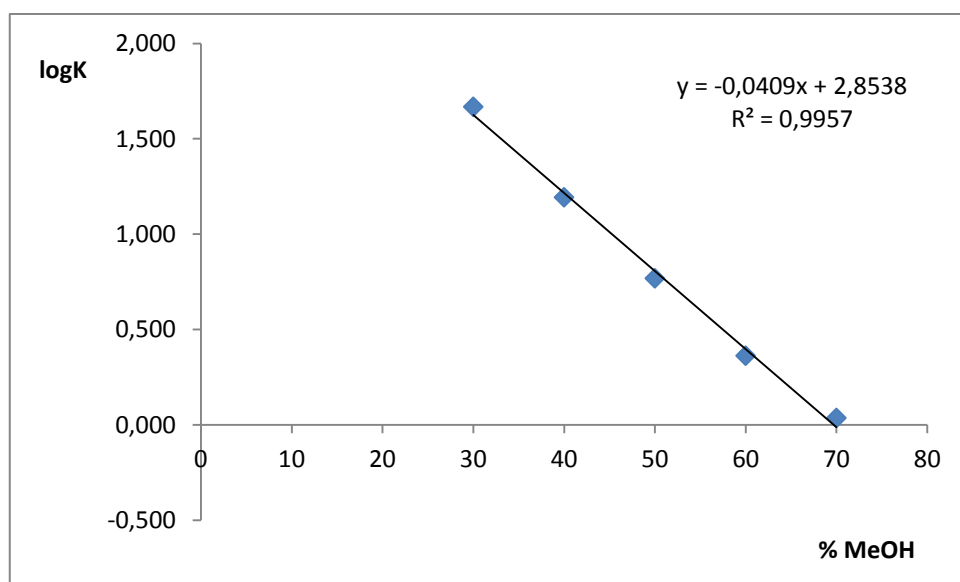


Graf 21: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 97

Vzorek OJ 98

Tab. 23: Retenční časy vzorku OJ 98 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	23,87	0,50	46,63	1,669
40	8,37	0,50	15,64	1,194
50	3,41	0,50	5,88	0,769
60	1,61	0,49	2,31	0,363
70	1,01	0,49	1,09	0,037

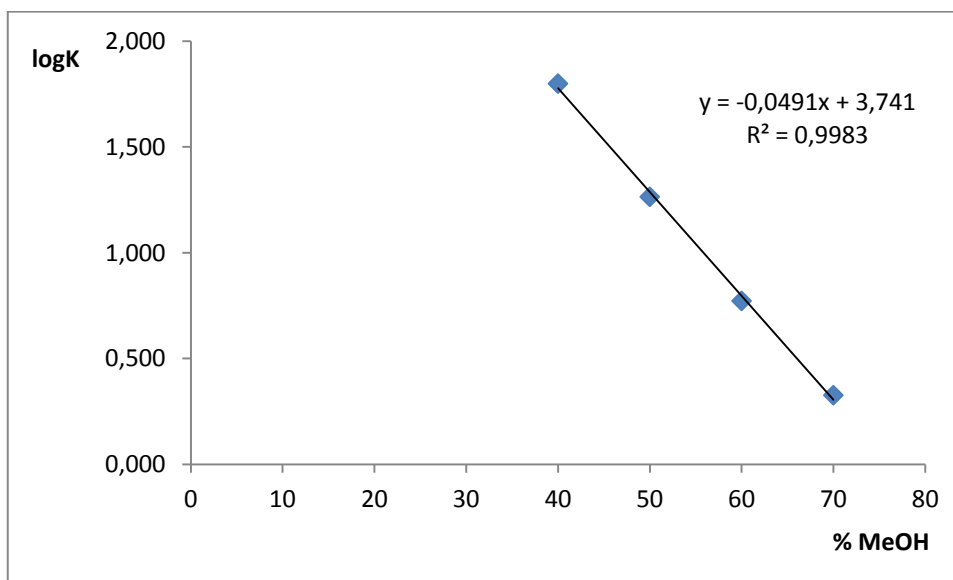


Graf 22: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 98

Vzorek OJ 99

Tab. 24: Retenční časy vzorku OJ 99 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	neměřeno	0,50	-	-
40	32,21	0,50	63,03	1,800
50	9,62	0,50	18,39	1,265
60	3,37	0,49	5,93	0,773
70	1,52	0,49	2,12	0,327

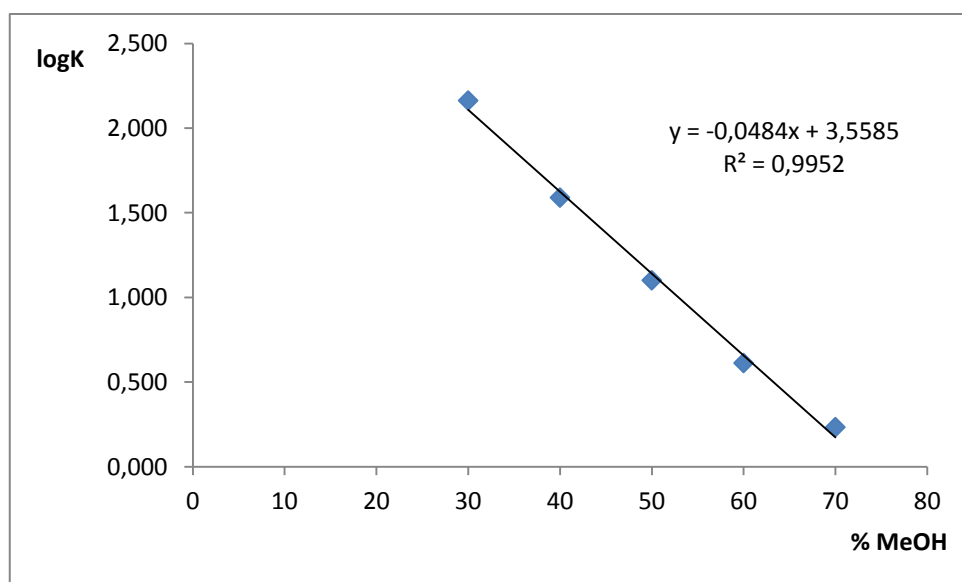


Graf 23: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 99

Vzorek OJ 100

Tab. 25: Retenční časy vzorku OJ 100 a jodidu draselného při různém obsahu methanolu v mobilní fázi, vypočítaný kapacitní faktor a jeho dekadický logaritmus

% MeOH	RT (min)	RT _{KI} (min)	K	logK
30	51,81	0,35	145,76	2,164
40	20,09	0,50	38,94	1,590
50	6,77	0,50	12,65	1,102
60	2,49	0,49	4,10	0,613
70	1,32	0,49	1,72	0,234



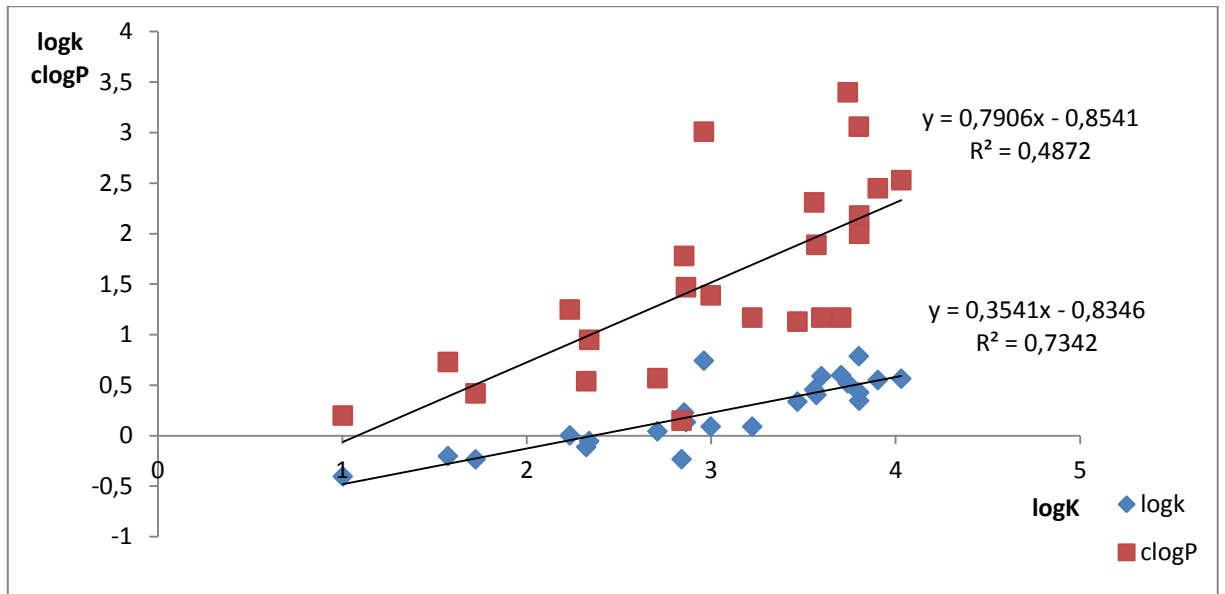
Graf 24: Závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi stanovená pro vzorek OJ 100

V tab. 26 jsou uvedeny lipofility vypočítané v programu ChemDraw Ultra 12.0 (sloupec clogP), dále hodnoty lipofilit chromatograficky zjištěné na koloně Zorbax ECLIPSE XDB-C18 600 Bar, 50,0x4,6 mm, 1,8 μ m (sloupec logK) a nakonec hodnoty lipofilit naměřené za využití kolony Zorbax ECLIPSE XDB-C8, 600 Bar, 50,0x3,0 mm, 1,8 μ m (sloupec logK).

Tab. 26: Lipofility vypočítané v programu ChemDraw, hodnoty zjištěné na koloně Zorbax ECLIPSE XDB-C18 600 Bar, 50,0x4,6 mm, 1,8 µm [36] a lipofility zjištěné na koloně Zorbax ECLIPSE XDB-C8, 600 Bar, 50,0x3,0 mm, 1,8 µm

Kód	clogP	logk	logK
OJ 16	0,150	-0,232	2,840
OJ 54	1,390	0,091	2,998
OJ 75	1,170	0,090	3,223
OJ 76	1,170	0,590	3,598
OJ 77	1,170	0,600	3,705
OJ 78	0,540	-0,112	2,323
OJ 80	0,420	-0,233	1,723
OJ 81	0,950	-0,053	2,339
OJ 82	1,470	0,135	2,864
OJ 83	2,000	0,347	3,803
OJ 85	2,530	0,565	4,031
OJ 86	1,890	0,404	3,571
OJ 87	3,060	0,787	3,801
OJ 88	2,450	0,552	3,904
OJ 90	3,010	0,743	2,961
OJ 92	2,180	0,428	3,803
OJ 93	0,570	0,044	2,709
OJ 94	1,130	0,338	3,468
OJ 95	0,200	-0,403	1,003
OJ 96	0,730	-0,201	1,573
OJ 97	1,250	0,004	2,234
OJ 98	1,780	0,229	2,854
OJ 99	3,400	0,520	3,741
OJ 100	2,310	0,456	3,559

V grafu 25 je znázorněna korelace mezi hodnotami logk a logK a mezi hodnotami clogP a logK.



Graf 25: Korelace mezi hodnotami logk a logK a mezi hodnotami clogP a logK.

5. DISKUZE

Tato rigorózní práce se zabývá stanovením lipofilit u 24 vzorků potenciálních léčiv pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích.

Jako nepolární stacionární fáze byla použita kolona Zorbax ECLIPSE XDB-C8 600 Bar, 50,0x3,0 mm, 1,8 μm a jako mobilní fáze byla zvolena směs methanolu a ultračisté vody s různým poměrem obou složek.

Měření lipofilit prováděná v rámci spolupráce skupiny fyzikální chemie s výzkumným týmem prof. Doležala z KFCHKL doposud využívala kolonu Zorbax ECLIPSE XDB-C18 600 Bar, 50,0x4,6 mm, 1,8 μm , tedy kolonu, jejíž stacionární fáze obsahovala oktadecylové řetězce (C18). Obecně platí, že zkrácení alkylového řetězce stacionární fáze vede ke zkrácení doby retence. Za účelem zkrácení retenčních časů měřených látek byla tedy při měření této práce použita kolona s oktylovým řetězcem (C8) navázaným na silikagel.

Během analýzy se postupně snižovala polarita mobilní fáze přidávkem organické složky (poměry methanol voda: 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 a 70:30), což vedlo k rychlejší eluci nepolárních látek z kolony. Tímto způsobem byly získány retenční časy měřených látek při pěti různých složeních mobilní fáze.

Na začátku měření byl nastaven průtok na 0,5 ml/min, v průběhu měření byl u látek s dlouhými retenčními časy zvýšen na 0,6 ml/min, později na 0,7 ml/min.

Ze získaných hodnot retenčních časů a mrtvého času kolony (za využití methanolickeho roztoku jodidu draselného o koncentraci 10^{-4} mol/l) byl u všech vzorků spočítán kapacitní faktor a následně jeho dekadický logaritmus pro jednotlivá složení mobilní fáze. Zvýšení průtoku mobilní fáze nemá vliv na kapacitní faktor, což ve své diplomové práci experimentálně ověřovala Pleváková na stejném přístroji a při velmi podobných chromatografických podmínkách [36].

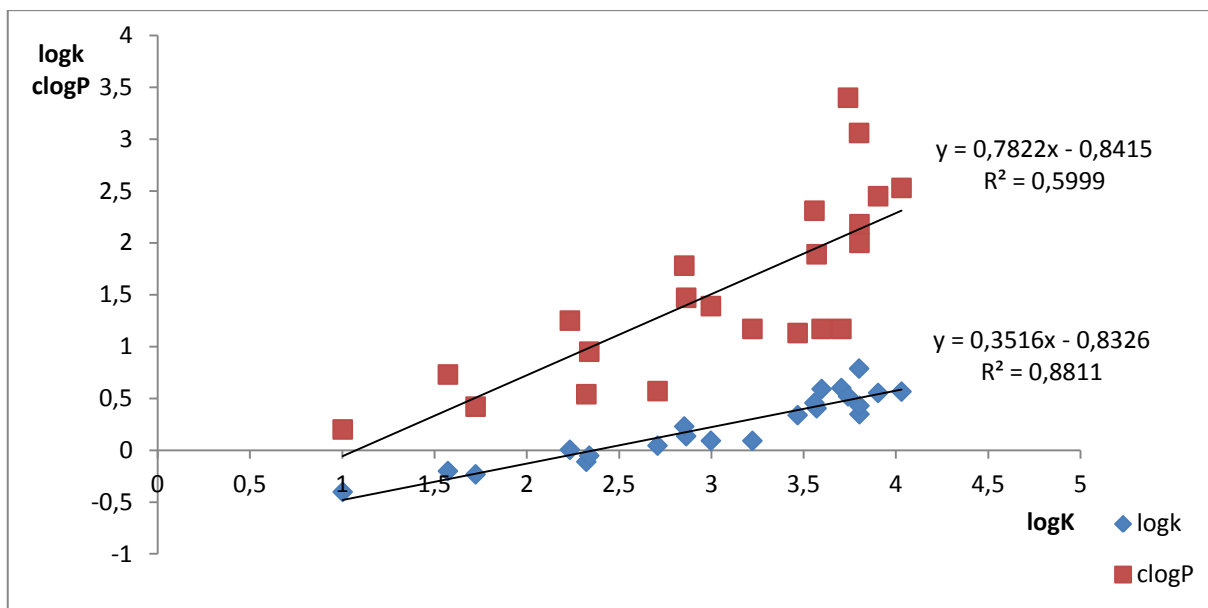
Během měření bylo zjištěno, že na použité koloně dosahovaly tlaky dosti vysokých hodnot, což poměrně omezovalo měření, jelikož nešlo zvýšit průtok na hodnoty, při kterých by se dosáhlo rozumných hodnot retenčních časů. To je zřejmě způsobeno malým průměrem kolony, který byl zvolen kvůli úspoře organické složky mobilní fáze. Výsledky tedy nenaplnily původní očekávání zkrátit retenční časy analyzovaných vzorků léčiv. Možným

řešením by mohlo být použití acetonitrilu namísto methanolu v mobilní fázi. Vzhledem k nižší viskozitě směs acetonitrilu a vody nevyvíjí tak vysoký tlak na kolonu jako směs methanolu a vody. V důsledku toho by šel zvýšit průtok mobilní fáze kolonou a zkrátit tak retenční časy měřených látek.

Do grafů (1-24) byla vynesena závislost logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi pro každou analyzovanou sloučeninu. Ze získaných grafů vyplývá, že korelace závislosti $\log K$ na obsahu organické složky v mobilní fázi je u většiny látek výborná, což potvrzují i hodnoty koeficientů determinace (R^2) v rovnicích regresních přímek, které jsou matematickým vyjádřením této závislosti. Absolutní člen v těchto rovnicích představuje hodnotu kapacitního faktoru látky extrapolovaného na nulovou koncentraci methanolu v mobilní fázi a tato hodnota je pokládána za číselné vyjádření lipofility dané látky.

Na závěr byly získané hodnoty lipofilit ($\log K$) porovnány s hodnotami vypočítanými v programu ChemDraw Ultra 12.0 (clogP) a s hodnotami lipofilit chromatograficky zjištěnými na koloně Zorbax ECLIPSE XDB-C18 600 Bar, 50,0x4,6 mm, 1,8 μm ($\log k$), což je zobrazeno v tabulce 26. Porovnání je názorně uvedeno v grafu 25, v němž jsou vyneseny obě závislosti, tj. $\text{clogP} = f(\log K)$ a $\log k = f(\log K)$, včetně příslušných koeficientů determinace (R^2).

Z grafu 25 je zcela zřejmé, že korelace mezi hodnotami $\log k$ a $\log K$ je výrazně lepší než mezi hodnotami clogP a $\log K$. Oba koeficienty determinace jsou ovšem dost nízké. Zlepšení korelace je možné dosáhnout vynecháním dvou odlehlých bodů pro látky OJ16 a OJ90, jak znázorňuje graf 26.



Graf 26: Upravená korelace mezi hodnotami logk a logK a mezi hodnotami clogP a logK.

Z grafu 26 je vidět, že došlo k výraznému zlepšení těsnosti korelovaných dat, což dokumentuje markantní nárůst hodnot koeficientů determinace. To je potěšitelné zejména u závislosti $\log k = f(\log K)$, neboť to znamená, že hodnoty lipofilit změřené na obou kolonách si vzájemně velmi dobře odpovídají. Horší korelace mezi hodnotami clogP a logK není tolik překvapující, neboť výpočet clogP nezohledňuje například všechny sterické aspekty molekuly.

Z uvedeného je tedy možné se domnívat, že u látek OJ16 a OJ90 byla hodnota lipofility stanovena přinejmenším jednou metodou se značnou chybou.

6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo určit hodnoty lipofilit u 24 potenciálních léčiv pomocí kapalinové chromatografie na reverzních fázích na koloně Zorbax ECLIPSE XDB-C8 600 Bar, 50,0x3,0 mm, 1,8 μm a tyto hodnoty pak porovnat s výsledky získanými výpočtem v programu ChemDraw Ultra 12.0 a s hodnotami lipofilit dříve chromatograficky zjištěnými na koloně Zorbax ECLIPSE XDB-C18 600 Bar, 50,0x4,6 mm, 1,8 μm . Kolona s kratším alkylovým řetězcem (C8) byla zvolena s předpokladem zkrátit retenční časy měřených látek. V průběhu měření byla každá látka stanovována při čtyřech, resp. pěti různých poměrech methanol/voda v mobilní fázi.

Během pokusů však hodnoty tlaku dosahovaly poměrně vysokých hodnot, což znemožňovalo zvýšit průtok tak, aby bylo dosaženo kratších retenčních časů. Možným navrhovaným řešením by bylo nahrazení methanolu v mobilní fázi acetonitrilem.

Po získání hodnot retenčních časů měřených látek byl pro každou tuto látku sestaven graf závislosti logaritmu kapacitního faktoru na koncentraci methanolu v mobilní fázi. Z grafů jasně vyplývá, že tato závislost je u většiny látek vynikající.

Poté byly extrapolací na nulovou koncentraci methanolu v mobilní fázi zjištěny hodnoty logaritmu kapacitního faktoru, které jsou považovány za hodnoty lipofilit zkoumaných potenciálních léčiv.

Grafickým a numerickým porovnáním těchto hodnot s hodnotami již dříve naměřenými na koloně s delším alkylovým řetězcem bylo dosaženo uspokojivých výsledků, za předpokladu vynechání dvou nejvíce odlehlých bodů z grafu u dvou zkoumaných látek, u kterých byla analýza pravděpodobně zatížena chybou.

Korelace mezi hodnotami naměřenými a hodnotami vypočítanými v počítačovém programu ChemDraw Ultra 12.0 už je o poznání horší. Možným vysvětlením by mohl být fakt, že výpočet nezohledňuje všechny sterické aspekty molekuly.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] **Hartl J., Palát K.:** Farmaceutická chemie I., Praha: Karolinum, 2007, 3, 15-17, 20, 90-99, ISBN: 978-80-7184-619-2.
- [2] Fáze klinických studií [online citace 7. 4. 2015]. Dostupné na: <<http://www.fnusa.cz/index.php/odbornici/klinické-studie/základní-pojmy/261-fáze-klinických-studií>>.
- [3] **Locatelli M., Governatori L., Carlucci G., Genovese S., Mollica A., Epifano F.:** Recent application of analytical methods to phase I and phase II drugs development: a review, Biomed. Chromatogr. 2012, 26, 283-300.
- [4] Zákon o léčivech 378/2007 Sb. [online citace 7. 4. 2015]. Dostupné na: <<http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378>>.
- [5] **Poole S.K., Poole C.F.:** Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients, J. Chromatogr. B 797, 2003, 3-19.
- [6] **Dabrowska M., Starek M., Skucińzki J.:** Lipophilicity study of some non-steroidal anti-inflammatory agents and cephalosporin antibiotics: A review, Talanta 86, 2011, 35-51.
- [7] **Sangster J.:** Octanol-water Partition Coefficients, Fundamentals and Physical Chemistry, Wiley, New York, NY, 1997.
- [8] **Schrader W., Andersson J.T.:** Fast and direct method for measuring 1-octanol-water partition coefficients exemplified for six local anesthetics, J. Pharm. Sci. 90, 2001, 1948.
- [9] **Klimeš a kol.:** Kontrola léčiv I., Praha: Karolinum, 2008, 33-35, ISBN: 978-80-246-1613-1.
- [10] **Karlíček a kol.:** Analytická chemie pro farmaceuty, Praha: Karolinum, 2007, 270 – 276, ISBN: 978-80-246-1453-3.
- [11] **Coufalová I.:** Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Chromatografické stanovení albendazolu a jeho metabolitů, 2011, 14.
- [12] **Rutkowska E., Pajak K., Józwiak K.:** Lipophilicity – methods of determination and its role in medicinal chemistry, Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, 70 No. 1, 2013, 3-18.

- [13] **Klimeš a kol.:** *Kontrola léčiv II.*, Praha: Karolinum, 2007, 73-74, ISBN: 978-80-246-1460-1.
- [14] **Pallicer J.M., Sales J., Rosés M., Rafols C., Bosch E.:** Lipophilicity assessment of basic drugs ($\log P_{o/w}$ determination) by a chromatographic method, *J. Chromatogr. A* 1218, 2011, 6356-6368.
- [15] **Giaginis C., Theocharis S., Tsantili-Kakoulidou A.:** Octanol/water partitioning simulation by RP-HPLC for structurally diverse acidic drugs: Comparison of three columns in the presence and absence of n-octanol as the mobile phase additive, *J. Sep. Sci.*, 2013, 36, 3830-3836.
- [16] **Griffin S., Wyllie G.S., Markham J.:** Determination of octanol-water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 864, 1999, 221-228.
- [17] **Wiczling P., Nasal A., Kubik L., Kaliszan R.:** A new pH/organic modifier gradient RP HPLC method for convenient determination of lipophilicity and acidity of drugs as applied to established imidazoline agents, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 47, 2012, 1-5.
- [18] **Du C.M., Valko K., Bevan C., Reynolds D., Abraham M.H.:** Rapid Method for the Estimation of Octanol/Water Partition Coefficient ($\log P_{oct}$) from Gradient RP-HPLC Retention and a Hydrogen Bond Acidity Term (Sigma α_2H), *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 24, 2001, 635.
- [19] **Cichna M., Markl P., Huber, J.F.:** Determination of true octanol-water partition coefficients by means of solvent generated liquid-liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, 1995, 339-51.
- [20] **Lombardo F., Shalaeva M.Y., Tupper K.A., Gao F., Abraham M.H.:** Elog P_{oct} : a tool for lipophilicity determination in drug discovery, *J. Med. Chem.* 43, 2000, 2922-8.
- [21] **Lombardo F., Shalaeva M.Y., Tupper K.A., Gao F., Abraham M.H.:** ElogD(oct): a tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and neutral compounds, *J. Med. Chem.* 44, 2001, 2490-7.
- [22] **Hanna M., Biasi V., Bond B., Salter C., Hutt A.J., Camilleri P.:** Estimation of the partitioning characteristics of drugs: a comparison of a large and diverse drug series utilizing chromatographic and electrophoretic methodology, *Anal. Chem.* 70, 1998, 2092-9.

- [23] **Hitzel L., Watt A.P., Locker K.L.:** An increased throughput method for the determination of partition coefficients, *Pharm. Res.* 17, 2000, 1389.
- [24] **Dross K., Sonntag C., Mannhold R.:** Determination of the hydrophobicity parameter R_{MW} by reversed-phase thin-layer chromatography, *J. Chromatogr. A*, 673, 1994, 113.
- [25] **Abraham M.H., Poole C.F., Poole S.K.:** Solute effects on reversed-phase thin-layer chromatography a linear free energy relationship analysis, *J. Chromatogr. A*, 749, 1996, 201.
- [26] **Štulík K. a kol.:** Vysokoúčinné analytické separace biologicky aktivních látek, Praha 2006, 65.
- [27] Český lékopis 1997, elektronická verze, [online citace 7. 4. 2015]. Dostupné na: <http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_47.htm>.
- [28] **Siles B.A.:** Capillary Electrophoresis, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Online 2006 John Wiley & Sons, 12-14.
- [29] **Klouda P.:** Moderní analytické metody, Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 37-38 ISBN: 80-86369-07-2.
- [30] **Chen N., Zhang Y., Terabe S., Nakagawa T.:** Effect of physico-chemical properties and molecular structure on the micelle-water partition coefficient in micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A*, 678, 1994, 327.
- [31] **Smith J.T., Vinjamoori D.V.:** Rapid determination of logarithmic partition coefficients between n-octanol and water using micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. B* 669, 1995, 59.
- [32] **Yang S., Bumgarner J.G., Kruk L.F.R., Khaledi M.G.:** Quantitative structure-activity relationships studies with micellar electrokinetic chromatography influence of surfactant type and mixed micelles on estimation of hydrophobicity and bioavailability, *J. Chromatogr. A* 721, 1996, 323.
- [33] **Poole S.K., Durham D., Kibbey C.:** Rapid method for estimating the octanol-water partition coefficient ($\log P_{ow}$) by microemulsion electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. B* 745, 2000, 117.
- [34] Micelle [online citace 7. 4. 2015]. Dostupné na: <<http://eng.thesaurus.rusnano.com/wiki/article1199>>.
- [35] Schéma kapalínového chromatografu [online citace 7. 4. 2015]. Dostupné na: <http://muniche.linde.com/international/web/lg/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/image_hplc>.

- [36] **Pleváková M.:** Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Stanovení lipofility léčiv pomocí HPLC, 2015, 1-60.