

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Hradec Králové, 2018

Pavla Tomanová

**Prohlášení:**

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. 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 11. 5. 2018*

.....

*Pavla Tomanová*

**Poděkování:**

*Ráda bych poděkovala především svému školiteli, panu Ing. Vladimíru Kubíčkovi, CSc., za pomoc a rady poskytnuté v laboratoři a během sepisování této diplomové práce. Děkuji za trpělivost a vstřícnost.*

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Autor: *Pavla Tomanová*

Školitel: *Ing. Vladimír Kubíček, CSc.*

Název diplomové práce: *Fyzikálně chemické vlastnosti léčiv*

Ve své práci jsem měřila disociační konstanty, resp. hodnoty  $pK$ , a lipofilitu derivátů dusíkatých heterocyklů, které byly připraveny na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové.

Pro zjištění hodnoty  $pK$  jsem využila dvou metod – potenciometrické titrace a spektrofotometrie. Potenciometrická titrace téměř ve všech případech přinesla relativně přesné výsledky, bohužel spektrofotometrické stanovení  $pK$  vždy reprodukovatelné nebylo. Disociační konstanty jsem porovnávala jak na základě použité metody, tak i s teoreticky vypočítanou disociační konstantou, kterou jsem získala pomocí počítačového programu ChemDraw Ultra 12.0. Výsledky obou experimentálních stanovení si byly velice podobné a odpovídaly teoretické hodnotě  $pK$ .

Lipofilita je další základní vlastností léčiv, která se v preklinických zkouškách stanovuje. Charakterizuje afinitu léčiva k vodné nebo lipofilní fázi a tím zásadně ovlivňuje ADMET léčiva v organismu. Ke stanovení lipofility jsem využila hodnoty kapacitního faktoru naměřené pomocí RP-HPLC na koloně Zorbax Eclipse XDB C18 RRHT 4,6 x 50,0 mm; 1,8  $\mu$ m. Zjištěné kapacitní faktory látek jsem následně porovnávala s hodnotou  $ClogP$ , kterou vygeneroval počítačový program ChemDraw Ultra 12.0. Korelace mezi experimentálně zjištěnými kapacitními faktory a vypočítanými hodnotami  $ClogP$  byla velice uspokojivá.

# Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of biophysics and physical chemistry

Author: *Pavla Tomanová*

Supervisor: *Ing. Vladimír Kubíček, CSc.*

Thesis title: *Physico-Chemical properties of drugs*

This thesis deals with measuring dissociation constants (the  $pK_a$  value) and the lipophilicity of nitrogenous heterocycle derivatives produced at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové.

Two methods were used to determine the  $pK$  value: potentiometric titration and spectrophotometry. Potentiometric titration almost invariably produced relatively exact results, however the results of  $pK$  value obtained by spectrophotometry were sometimes difficult to replicate. Dissociation constants were compared on the basis of the method applied, and also with the theoretically determined dissociation constant calculated by means of the ChemDraw Ultra 12.0 software. The results obtained by the two experimental methods turned out to be very similar, corresponding to the theoretical  $pK$  value.

Lipophilicity is another essential property of drugs tested in the preclinical stage. It specifies the aqueous or lipophilic phase affinity of a drug, substantially affecting the drug's ADMET in organism. Lipophilicity was determined on the basis of capacity factor value identified by RP-HPLC measurement using the ZorbaxEclipse XDB C18 RRHT column 4,6 x 50,0 mm; 1,8  $\mu$ m. The capacity factors identified were subsequently compared to the  $ClogP$  value generated by ChemDraw Ultra 12.0. The correspondence between the experimentally identified capacity factors and the  $ClogP$  values proved very satisfactory.

# Obsah

1. Úvod .....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti léčiv .....	9
2.2 Acidita a bazicita.....	10
2.2.1 Disociační konstanta .....	10
2.2.2 Acidita a bazicita léčiv .....	12
2.2.3 Potenciometrie.....	14
2.2.4 Spektrofotometrie .....	16
2.3 Lipofilita .....	19
2.3.1 Způsoby měření lipofility léčiv .....	20
3. Experimentální část.....	26
3.1 Stanovení disociační konstanty léčiv.....	28
3.1.1 Materiální vybavení .....	28
3.1.2 Titrační činidla .....	28
3.1.3 Pufry .....	28
3.1.4 Příprava vzorku .....	29
3.1.5 Postup práce – potenciometrie.....	31
3.1.6 Postup práce – spektrofotometrie .....	33
3.2 Stanovení lipofility léčiv .....	34
3.2.1 Materiální vybavení .....	34
3.2.2 Příprava vzorků .....	34
3.2.3 Postup práce .....	34
4. Výsledky a diskuze.....	35
4.1 Stanovení disociační konstanty léčiv.....	35
4.1.1 Potenciometrie.....	35
4.1.2 Spektrofotometrie .....	35
4.1.3 Pyrazin-2-karboxylová kyselina .....	35
4.1.4 LSPJ14 .....	37
4.1.5 LSPJ15 .....	40
4.1.6 LSPJ16 .....	42

4.1.7	LSPJ17 .....	44
4.1.8	LSPJ18 .....	46
4.1.9	2-hydroxychinoxalin .....	48
4.1.10	4-hydroxychinazolin .....	51
4.1.11	VN014 .....	54
4.1.12	VN034 .....	57
4.1.13	LSPJ11 .....	59
4.1.14	LSPJ12 .....	63
4.1.15	LSPJ13 .....	67
4.2	Stanovení lipofility léčiv .....	71
5.	Shrnutí výsledků .....	73
5.1	Stanovení disociační konstanty léčiv .....	73
5.2	Stanovení lipofility léčiv .....	75
6.	Závěr .....	76
7.	Seznam použité literatury .....	77

# 1. Úvod

Jedním z hlavních posláních farmacie a vědy obecně je objevování a vývoj nových látek. Snaha vyvíjet nové látky je umocněna nárůstem civilizačních chorob, rozvojem nových technologií, šířením infekčních nemocí rezistentních na stávající léčbu. V laboratořích se syntetizuje nesčítelně nových potenciálních léčiv, ale pouze zlomek z nich postupuje do preklinického a zejména klinického hodnocení. Tato skutečnost je dána vysokou finanční i časovou náročností. Látky, které „opustí zkumavku“, je proto potřeba pečlivě vybírat.

První informace o tom, jak se nasyntetizované léčivo bude chovat v organismu poskytnou jeho fyzikálně chemické vlastnosti. Mezi základní charakteristiky potenciálních léčiv patří rozpustnost, hodnota  $pK$ , lipofilita, schopnost adsorpce atp. Fyzikálně chemické vlastnosti informují o základních údajích potenciálního léčiva, jsou schopny předpovědět jeho farmakokinetiku i farmakodynamiku, popřípadě mohou dát podnět k vývoji a optimalizaci lékové formy.

Cílem mé diplomové práce je stanovení hodnot  $pK$  a lipofility ( $\log K$ ) celkem dvanácti látek, přičemž devět z nich je zkoumáno jako potenciální léčiva. Látky byly připraveny na Katedře farmaceutické chemie a analýzy FaF a na Katedře anorganické a organické chemie FaF. Součástí mého výzkumu je zároveň porovnání dvou metod použitých při měření disociační konstanty (resp.  $pK$ ) – potenciometrické titrace a spektrofotometrické metody.



## 2. Teoretická část

### 2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti léčiv

Molekula léčiva, které má vykazovat biologickou aktivitu, musí mít určitou chemickou strukturu a od ní se odvíjející fyzikálně chemické vlastnosti. Je potřeba, aby vlastnosti léčiv byly v souladu s fyzikálně chemickým prostředím organismu.

Ze strukturního hlediska lze rozdělit léčiva do dvou skupin. První zahrnuje léčiva, u kterých je stěžejní chemická struktura (pro vazbu na receptor). Jedná se o tzv. *strukturně specifické látky* se specifickým účinkem na organismus. Tvoří největší část používaných léčiv. V tomto případě fyzikálně chemické vlastnosti podstatně ovlivňují farmakokinetiku léčiva. Druhou skupinu představují látky *strukturně nespecifické*. Jejich účinek není příliš závislý na chemické struktuře, ale základem nespecifického účinku na organismus jsou jejich fyzikálně chemické vlastnosti. Převážně se jedná o diuretika, adsorbencia, laxativa, náhrady krevní plazmy atd.

Mezi hlavní fyzikálně chemické vlastnosti, které ovlivňují biologickou aktivitu léčiv patří: rozpustnost, lipofilita, acidita/bazicitita a schopnost adsorpce. U některých léčiv je dobré pozorovat také těkavost, povrchové napětí atd.

Při posuzování fyzikálně chemických vlastností léčiv je potřeba uvažovat komplexně, nestačí je hodnotit samostatně. [1] Z takového tvrzení vychází i *Lipinského pravidlo pěti*, podle kterého je farmakokineticky výhodné léčivo (pro perorální podání) splňující následující parametry: relativní molekulová hmotnost menší než 500; rozdělovací koeficient ( $\log P$ ) menší než 5 (dnes je spíše preferován  $\log D$ , který bere v úvahu i ionizovanou formu léčiva); méně než 5 donorů vodíkové vazby a méně než 10 akceptorů vodíkových vazeb. [2]

Ve své práci se budu věnovat převážně aciditě/bazicitě léčiv a stanovení jejich lipofility.

## 2.2 Acidita a bazicita

### 2.2.1 Disociační konstanta

Disociační konstanta  $K_D$  je druhem rovnovážné konstanty. [3] Slabé elektrolyty nejsou ve svém roztoku zcela disociovány. Disociační konstanta charakterizuje rovnovážný stav mezi ionizovanou a neionizovanou frakcí látky v roztoku. [4] Lze ji vyjádřit na základě *Guldbergova-Waageova zákona* vycházejícího z rovnice  $KA \rightleftharpoons K^+ + A^-$ , kde KA značí nedisociovanou látku,  $K^+$  kation a  $A^-$  anion. Hranaté závorky ve vzorci znázorňují molární koncentrace jednotlivých složek. [5]

$$K_D = \frac{[K^+][A^-]}{[KA]} \quad (1)$$

Z výše uvedeného vzorce vyplývá, že čím je větší hodnota  $K_D$ , tím je v roztoku vyšší koncentrace iontů a příslušná kyselina či báze je silnější. [4]

Jelikož hodnoty disociačních konstant slabých kyselina  $K_a$  a slabých bází  $K_b$  jsou řádově velice nízké, používá se pro přehlednější vyjádření míry disociace hodnota  $pK_a$ . Jedná se o záporný dekadický logaritmus disociační konstanty. [3]

Jelikož většina léčiv má charakter slabé kyseliny nebo zásady, je znalost  $pK_a$  při vývoji nových léčiv velice důležitá. Hodnoty  $pK_a$  se nejčastěji pohybují v rozmezí 2,0-10,8. Míra ionizace látek nezávisí samozřejmě jen na  $pK_a$ , ale i na pH prostředí. Tento vztah ilustruje *Hendersonova-Hasselbalchova rovnice*, kterou lze použít pro kyseliny i pro zásady:

$$\text{Kyseliny} \quad pK_a = pH + \log \frac{c_n}{c_d} \quad (2)$$

$$\text{Zásady} \quad pK_a = pH + \log \frac{c_d}{c_n} \quad (3)$$

Proměnná  $c_n$  vyjadřuje molární koncentraci nedisociované frakce léčiva a  $c_d$  molární koncentraci disociované frakce léčiva. Za předpokladu, že hodnoty  $pK_a$  a pH jsou totožné, je léčivo ionizováno právě z poloviny. [1]

Ze vzorce lze též odvodit obecnou tabulku míry ionizace látek (v procentech) v prostředí o různém pH:

vztah $pK_a$ a pH	kyseliny HA	zásady BH
$pK_a$ o 2 jednotky nižší než pH	0,99	99
$pK_a$ o 1 jednotku nižší než pH	9,1	90,9
$pK_a = \text{pH}$	50	50
$pK_a$ o 1 jednotku vyšší než pH	90,9	9,1
$pK_a$ o 2 jednotky vyšší než pH	99	0,99

Tabulka č. 1: Vliv pH prostředí na disociaci látek

Při snižování okolního pH roste podíl neionizované formy kyseliny (HA) a snižuje se koncentrace její ionizované formy ( $A^-$ ). Zásady se chovají opačně. Podíl nedisociované formy (BH) se při klesajícím pH snižuje, podíl ionizované formy ( $BH^+$ ) narůstá.

$pK_a < 2$	silné kyseliny; konjugované báze nemají ve vodném prostředí významný vliv
$4 < pK_a < 6$	slabé kyseliny a slabé konjugované báze
$8 < pK_a < 10$	velice slabé kyseliny; silnější konjugované báze
$pK_a > 12$	žádné významné kyselé vlastnosti ve vodném prostředí, silné konjugované báze

Tabulka č. 2: Distribuce kyselin a zásad v závislosti na  $pK_a$

Obecně se kyseliny mohou rozdělit na dva základní typy: HA (neionizované kyseliny přecházející na ionizované konjugované báze) a  $BH^+$  (protonované konjugované báze). Nejvýznamnější HA používané v praxi zahrnují: anorganické kyseliny (kyselina chlorovodíková, kyselina sírová), barbituráty, hydantoiny, amidy (sulfonamidy), imidy a karboxylové kyseliny (kyselina salicylová, aryloctové kyseliny, N-arylantranilové kyseliny...). Nejdůležitější konjugované báze jsou mezi léčivy protonované aminy. Látky, které obsahují více funkčních skupin (např. amoxicilin), vykazují více hodnot  $pK_a$ . Jejich ionizovaná forma pak odpovídá stavu při fyziologickém pH organismu  $\text{pH} = 7,4$ . [6]

Sloučeniny v ionizované formě mají vyšší polaritu a s tím související vyšší rozpustnost ve vodě. Konečná rozpustnost je určena jak neutrální neionizovanou molekulou, tak i její ionizovanou, podstatně rozpustnější, formou. Sloučeniny v ionizovaném stavu neprostupují tak snadno membránami jako neutrální molekuly, které jsou mnohem lipofilnější a snadněji přecházejí pasivní difuzí. Všechny tyto faktory pak zásadně ovlivňují absorpci léčiv, která se odehrává převážně v tenkém střevě. [6]

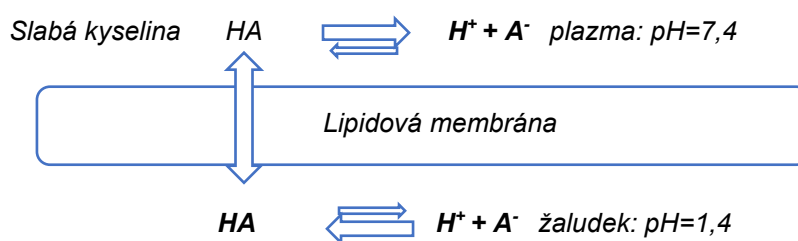
## 2.2.2 Acidita a bazicita léčiv

Jak již bylo řečeno, většina užívaných léčiv má charakter slabých zásad, nebo slabých kyselin. Právě z toho důvodu je měření disociační konstanty léčiv velice důležité. Znalost tohoto parametru z jisté části předpoví chování léčiv při různých hodnotách fyziologického pH.

$pK_a$  léčiva má vliv i na další vlastnosti léčiv, jejichž znalost je nepostradatelná pro správné určení chování léčiva v organismu. Mezi tyto biofyzikální vlastnosti patří v první řadě lipofilita, rozpustnost, vazba na proteiny a již zmíněná schopnost penetrace přes membrány. Všechny tyto parametry mají přímý vliv na farmakokinetické vlastnosti léčiva, tzv. ADMET (absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece, toxicita). Jelikož jsou všechny tyto vlastnosti léčiv více či méně závislé na hodnotě disociační konstanty, její stanovení u nově nasyntetizovaných léčiv je zcela esenciální. Znalost disociační konstanty může navíc pomoci optimalizovat lékovou formu a upravit tak chování léčiva v organismu. [7]

Ve vodném prostředí krve se šíří rychleji látky ionizované. Naopak pro přestup kapilární stěnou, hematoencefalickou bariérou (v případě látek působících na CNS) nebo jinou buněčnou membránou je potřeba, aby bylo léčivo ve formě neionizované, tzn. ve formě  $HA$  nebo  $BH$ . [6] Přechodu ionizovaného léčiva přes membránu navíc brání výskyt mnoha kladných a záporných nábojů přítomných v membráně. [1]

Z výše popsaného jevu lze zároveň odvodit tzv. *ion trapping*, tedy vychytávání iontů. Léčivo se kumuluje na té straně membrány, na které je více ionizované (v závislosti na rozdílném pH prostředí – viz tabulka č. 3) a kde je tedy znesnadněn přechod přes membránu. Z tohoto relativně jednoduchého vztahu lze určit, kde se bude léčivo nacházet ve vyšší koncentraci, popřípadě můžeme předpovědět tendenci přecházet do plodu matky, či do mateřského mléka. Disociační konstanta tedy pomáhá mimo jiné určit, zda bude léčivo relativně bezpečné i při podání těhotným, či kojícím ženám.



Obrázek č. 1: *Ion trapping* [8]

*Pokud podáme perorálně léčivo charakteru slabé kyseliny, bude se v prostředí žaludku vyskytovat převážně ve formě neionizované, přejde žaludeční sliznicí do krevní plazmy. V plazmě koncentrace léčiva narůstá z důvodu vyššího pH. Léčivo se vykytuje hlavně ve formě ionizované a jeho přestup přes membrány je značně omezen.*

Plazma	7,4
Žaludek	1-3
Duodenum	5-6
Ileum, tlusté střevo	8
Mléko	7,0-7,3
Mozkomíšní mok	7,3
Moč	4-8
Plod	7,3

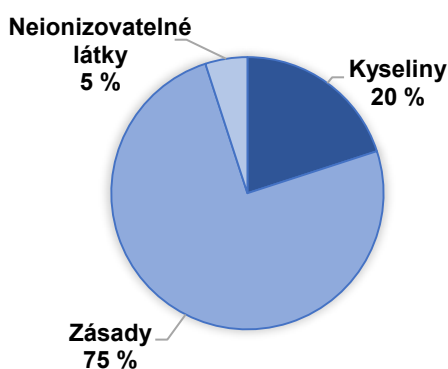
Tabulka č. 3: Hodnoty pH v organismu [8]

Jak již bylo řečeno, samotná hodnota  $pK_a$  jednoznačně neurčí chování látky. Je potřeba znát i další fyzikálně chemické vlastnosti. [1]

Pokud bychom chtěli zkoumat rozložení disociačních konstant používaných léčiv, museli bychom pracovat s databázemi  $pK_a$ . K dispozici jich je několik, jako je PhysProp (Syracuse Research Corporation, North Syracuse, USA), Merck Index, Avdeef... Některé databáze zohledňují, zda je hodnota  $pK_a$  odvozená od kyseliny nebo zásady. Problémem při zpracovávání již naměřených hodnot je kvalita získaných dat, jelikož měření byla prováděna v mnoha laboratořích a nelze tedy zajistit zcela identické podmínky stanovení. V tomto ohledu by bylo vhodné mít možnost zpětně dohledat průběh měření, např. podmínky, za kterých byla data stanovována, použití pomocných rozpouštědel, jakým způsobem byly řešeny problémy s rozpouštěním, rozkladem léčiv, nedostatečnou absorpcí UV záření apod. Jelikož nejsou naměřené hodnoty plně reprodukovatelné, nelze zcela jednoznačně popsat celkovou distribuci  $pK_a$  léčiv.

Tento fakt podporuje i několik provedených studií, které se zabývaly právě distribucí disociačních konstant léčiv. V některých odborných zdrojích lze nalézt, že až 95 % léčiv obsahuje ionizovatelnou funkční skupinu, zatímco analýza World Drug Index z roku 1999 ukázala, že při pH 2 až 12 je ionizovatelných pouze 62,9 % léčiv. Studie, ze které jsou tyto poznatky, prováděla analýzu distribuce  $pK_a$  u 582 léčiv a pouze 65,5 % z nich bylo ionizovatelných (což se od studie z roku 1999 příliš neliší). Za zmínku stojí i výsledky měření  $pK_a$  léčiv přecházejících do CNS. Ve studii se ukázalo, že sloučeniny s minimálně jedním nábojem o  $pK_a < 4$  nebo  $pK_a > 10$  nejsou schopné projít hematoencefalickou bariérou pasivní difúzí. Většina látek schopných přestoupit do CNS vykazovala  $pK_a$  6,1-10,2. [7]

I přesto, že se některé zdroje v údajích týkajících se distribuce  $pK_a$  léčiv liší, většina odborných zdrojů se shoduje na následujícím rozdělení:



Graf č. 1: Distribuce léčiv dle  $pK_a$  [6]

### 2.2.3 Potenciometrie

Potenciometrie patří mezi elektroanalytické metody. Je založena na měření rovnovážného napětí elektrochemického článku, který se skládá z měrné a referenční elektrody. Referenční elektroda bývá spojena s analyzovaným roztokem pomocí solného můstku. [9] Jelikož se jedná o rovnovážnou metodu, měření se provádí za podmínek, kdy článkem neprotéká elektrický proud.

Prakticky lze využít dvě varianty potenciometrie. Prvním druhem je *potenciometrie přímá*. V tomto případě se stanovuje analyt přímo z naměřeného napětí. [10] Koncentrace analytu se zjišťuje na základě stanovení koncentrace iontů, nejčastěji vodíkových (měření pH), nicméně lze stanovit i jiné ionty. K tomuto účelu slouží speciální iontově selektivní elektrody (tzv. selektrody). [9] Druhou variantu tvoří nepřímá potenciometrie, *potenciometrická titrace*. Zde se pozoruje změna napětí článku v závislosti na množství přidaného odměrného roztoku (analyt se stanovuje podle jeho spotřeby). [10] Graficky lze výsledek znázornit pomocí titrační křivky, která udává závislost elektromotorického napětí článku na objemu přidaného odměrného činidla. [11] Z grafu (popřípadě z naměřených dat) je možné následně vypočítat tzv. bod ekvivalence acidobazických, srážecích, komplexotvorných či redoxních reakcí.

Jak již bylo řečeno, v potenciometrii se využívá elektrochemického článku, který se skládá ze dvou poločlánků – dvou elektrod – měrné (indikační) a srovnávací (referenční). Potenciál měrné elektrody je závislý na změně koncentrace analytu a druh se volí podle typu prováděné titrace. Elektroda referenční pak má stálé, neměnné napětí. Její potenciál je nezávislý na složení analytu i na jeho koncentraci.

*Skleněná elektroda* je jednou z nejčastěji využívaných indikačních elektrod u neutralizačních titrací při měření pH. Je selektivní pro vodíkové ionty. Měří v rozsahu pH 2-11 a její hlavní část tvoří tenká membrána ze speciálního sodno-vápenatého skla ve tvaru malé baňky. Uchovává se v destilované vodě, aby nedošlo k vyschnutí membrány. Časté je také využití *kombinované elektrody*. V takovém

případě je do baňky, která je naplněna kyselinou chlorovodíkovou, ponořena referenční elektroda (nejčastěji *argentchloridová*). [11] [9] Právě této elektrody jsem při svém měření využila.

Při vlastní potenciometrii dochází ke vzájemné výměně sodných iontů skleněné membrány za protony obsažené v roztoku. Dochází tedy k hydrolyze skleněné membrány. Jako většina experimentálních měření může být i potenciometrická titrace pomocí kombinované elektrody zatížena chybou. Při  $\text{pH} > 12$  se jedná o chybu alkalickou (sodnou), naopak ve velice kyselém prostředí ( $\text{pH} < 1$ ) o chybu kyselou. Naměřená alkalická chybná hodnota  $\text{pH}$  bývá nižší než reálná, naopak u kyselých chyb lze předpokládat naměření vyšších hodnot  $\text{pH}$ . Těmto chybám lze předejít využitím speciálního lithného skla. U skleněné elektrody může být také pozorován tzv. asymetrický potenciál, který do určité míry zkresluje výsledky měření. Pro každou elektrodu je asymetrický potenciál odlišný a časem se snižuje. Uvedené chyby lze zkorigovat kalibrací přístroje pomocí standardních tlumivých roztoků. [11]

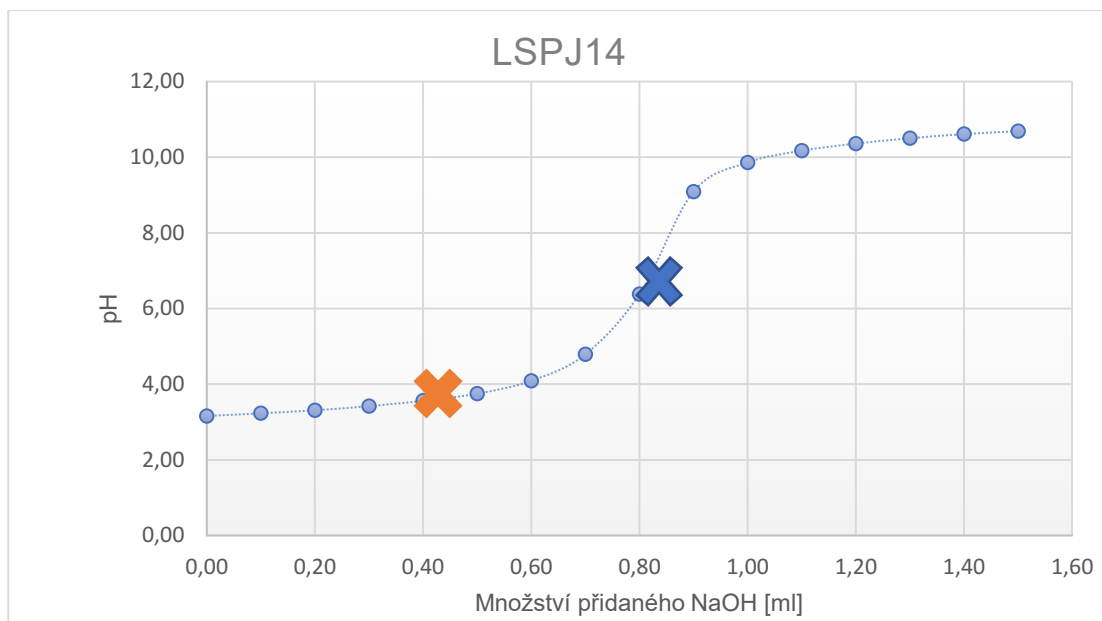
*Kalomelovou referenční elektrodu* tvoří rtuť pokrytá vrstvou suspenze  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  (kalomel). Je ponořena do nasyceného roztoku  $\text{KCl}$  s krystalky  $\text{KCl}$  v nadbytku.

*Argentchloridová elektroda* se skládá ze stříbrného drátku potaženého vrstvičkou  $\text{AgCl}$  ponořeného do roztoku alkalického chloridu či kyseliny chlorovodíkové nasyceného chloridem stříbrným. Jedná se o referenční elektrodu. [9]

### 2.2.3.1 Potenciometrické stanovení disociační konstanty léčiv

Ve své práci využívám měření  $\text{pH}$  roztoku vzorku pro zjištění  $\text{p}K_a$  léčiva. Vzorce, ze kterých jsem při svém měření vycházela, jsou uvedeny v experimentální části mé práce. Je vhodné zmínit i možnost grafického určení  $\text{p}K_a$  z titrační křivky. Velice často se setkáváme s grafickým stanovením bodu ekvivalence. Je však třeba podotknout, že v acidimetrických (alkalimetrických) titracích bod ekvivalence a hodnota  $\text{p}K_a$  nejsou totožné. Bod ekvivalence se nachází v místě ukončení reakce, která během titrace probíhá, kyselina nebo zásada je tedy zcela zneutralizována (100 %). [4]

Bod ekvivalence se pohybuje kolem  $\text{pH}$  7. Při titraci silné kyseliny nebo zásady je přesně 7, v případě, že se titruje slabá kyselina, odpovídá bod ekvivalence hodnotě  $\text{pH}$  větší než 7. Pokud se jedná o titraci slabé zásady je bod ekvivalence menší než 7. Čím je daná kyselina nebo báze slabší, tím je bod ekvivalence více vzdálen od  $\text{pH}$  7. [12] V grafu se vyznačuje velice strmým stoupáním (alkalimetrie) nebo klesáním (acidimetrie). Hodnota  $\text{p}K_a$  je bod, kdy je právě 50 % látky disociované, tudíž se na titrační křivce vyskytuje přibližně v polovině vzdálenosti mezi počátkem titrace a bodem ekvivalence. [4] Pro zjednodušenou ilustraci jsem využila titrační křivku jednoho ze vzorků (LSPJ14), u kterého jsem  $\text{p}K$  experimentálně stanovovala:



Graf č.2: Titrační křivka látky LSPJ14

Modrý křížek značí bod ekvivalence ( $pH = 7$ ), výsledná hodnota  $pK$  je znázorněna oranžovým křížkem.

#### 2.2.4 Spektrofotometrie

Spektrometrie je druhem optické analytické metody, která je založena na interakci elektromagnetického záření s analytem. [13] Konkrétně se pozoruje intenzita záření, která je analytem absorbována. Absorpce světla je závislá na vlnové délce záření, na síle vrstvy (šířka kyvety) a na koncentraci a struktuře analytu.

Při absorpčním měření se určuje tzv. *transmitance*  $T$ . Ta udává podíl toků záření (intenzity záření) prošlých měrnou kyvetou  $I$  a srovnávací kyvetou  $I_0$ . [14] Pokud proměřujeme homogenní vzorek, můžeme zanedbat rozptyl a odraz světla, tudíž pokles intenzity záření je způsoben pouze absorpcí samotného vzorku. [15]

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

Absorbance  $A$  je pak veličina, která se rovná zápornému dekadickému logaritmu transmitance. Obě dvě veličiny jsou bezrozměrné. [14]

$$A = -\log T \quad (5)$$

Obecně lze spektrometrické metody rozdělit na základě vlnové délky, ve které se pohybují:

UV spektrofotometrie: 200–400 nm

VIS spektrofotometrie: 400–760 nm

IR spektrometrie: 0,8–500  $\mu\text{m}$



Tyto metody mají využití v kvantitativní i v kvalitativní analýze. Kvantitu vyjadřuje změna intenzity světla po průchodu analytem a kvalitu počet a hodnoty frekvencí ve spektru.

Jelikož v praktické části práce využívám metody *UV/VIS spektrofotometrie*, bude se následující text vztahovat hlavně k tomuto tématu.

Při absorpci světla v UV a VIS oblasti dochází k přeskokům valenčních elektronů a změně vibračních a rotačních stavů molekul. Výsledkem spektrofotometrického měření je absorpční spektrum. Jedná se o závislost absorbance (popřípadě transmitance) na vlnové délce záření  $\lambda$ . [14] Z absorpčního spektra lze odečíst maximum absorpčního pásu  $\lambda_{max}$ . Jedna absorpční křivka může být složena i z více absorpčních pásů a mít tedy větší počet  $\lambda_{max}$ . Toto maximum je výsledkem rozdílu energií mezi excitovaným a základním stavem. Čím více energie je potřeba dodat, tím bude hodnota  $\lambda_{max}$  menší. [13]

Absorpční spektra v UV a VIS oblasti se nazývají elektronová spektra. Excitace jsou schopny převážně  $\pi$  elektrony. Chromofory jsou skupiny s dvojnými a trojnými vazbami nebo funkční skupiny obsahující kyslík, dusík či halogeny. Takové skupiny jsou schopné absorbovat záření v UV oblasti. Ve viditelné oblasti je důležité, aby molekula zahrnovala systém konjugovaných násobných vazeb, což se projeví zbarvením. Pokud tomu tak není, je možné bezbarvé sloučeniny převést přesnou chemickou reakcí na barevné, chemicky stálé látky. [13] [14]

Pomocí spektrofotometrie lze provádět kvalitativní i kvantitativní analýzu. Pro stanovení koncentrace analytu se využívá *Lambertův-Beerův zákon*,

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b \quad (6)$$

kde A značí absorbanci roztoku,  $\epsilon$  molární absorpční koeficient, c koncentraci látky [mol/l] a b je síla absorbující vrstvy v cm. [14] Jak lze z výše uvedeného vzorce vyčíst, absorbance je lineární funkcí koncentrace měřeného roztoku. Pokud proměříme řadu vzorků o různé koncentraci při stálé vlnové délce a stálé hodnotě b, získáme kalibrační křivku. V případě, že je kalibrace lineární a reprodukovatelná, provede se lineární regrese a z parametrů přímky se vypočítá koncentrace stanovovaného vzorku. [12] Absorbance se měří při vlnové délce maxima absorpčního pásu proti slepému vzorku. Aby výsledky byly reprodukovatelné, lze měřit pouze roztoky o nízké koncentraci. [13] K nepřesným výsledkům může dojít vlivem změny molárního absorpčního koeficientu (např. z důvodu disociace, tvorby dimerů, hydrolyzy, reakce s rozpouštědlem). [12] Pokud měřený vzorek obsahuje více složek, které absorbují světlo, má výsledná absorbance aditivní charakter. [15]

V kvalitativní analýze je stěžejní počet a polohy absorpčních pásů. Pozorují se jejich minima a maxima. Při porovnávání spekter látek však velice záleží na dodržení stejných experimentálních podmínek. Výslednou absorpční křivku může zkreslit jiné pH nebo použití odlišného rozpouštědla (methanol, ethanol, voda...). [13] Pro správnou identifikaci měřené látky, je důležité, aby se shodovaly hodnoty maxim a minim, specifická absorbance i absorpční poměry měřené při dvou různých vlnových délkách. S těmito požadavky pro identifikaci některých látek se setkáváme velmi často i v Českém lékopise. [14]

#### 2.2.4.1 Spektrofotometrické stanovení disociační konstanty léčiv

UV/VIS spektrofotometrie je velice přesnou metodou stanovení  $pK_a$  a využívá se jako alternativa k potenciometrické titraci. Její velkou výhodou je možnost stanovení méně rozpustných látek, jelikož je zapotřebí pouze nízká koncentrace vzorku. Předpokladem ovšem je, že měřený vzorek reaguje na odlišné hodnoty pH změnou absorbance. Toho lze dosáhnout pouze tehdy, pokud se chromofor nachází v dostatečné blízkosti ionizované části molekuly. Absorpční spektrum látky se v závislosti na pH mění. Tato změna reflektuje aktuální koncentraci ionizované a neionizované formy v roztoku. [16] [17] Pokud se v roztoku vzorku ustanovuje rovnováha mezi ionizovanou a neionizovanou formou léčiva, protnou se všechny absorpční křivky v tzv. *izosbestickém bodě* nacházejícím se v určité vlnové délce. V tomto bodě platí, že hodnoty molárních absorpčních koeficientů disociované a nedisociované formy léčiva jsou totožné. [18]

K získání řady roztoků o známém pH se využívají pufrů. Hodnotu  $pK_a$  lze vypočítat z absorbancí naměřených při libovolné vlnové délce kromě izosbestického bodu. V praxi je však nejvýhodnější využít vlnovou délku, ve které se od sebe absorbance nejvíce liší. Prakticky vždy se proto používají hodnoty absorbancí při vlnové délce absorpčního maxima. Tato vlnová délka se nazývá analytická. [17]

Pro měření v UV oblasti se používají převážně kyvety z křemenného skla. Kyvety z optického skla vhodné nejsou, jelikož absorbují v UV oblasti, jejich použití se tedy omezuje na VIS spektrofotometrii. Dále je možné v UV oblasti využít jednorázových kyvet ze speciálního plastového materiálu. [19] Při měření roztoku zkoušeného vzorku a příslušného pufru (slepého vzorku) je nutné požívat vždy dvě stejné kyvety. Pufr se jako slepý vzorek používá proto, aby výsledné absorpční křivky patřily pouze vzorku a nebyly narušeny přítomností tlumivého roztoku. [15]

## 2.3 Lipofilita

Pojem lipofilita značí schopnost látky překonávat organickou a vodnou biofázi, uplatňují se při tom v různém poměru polární a hydrofobní interakce sloučeniny s prostředím. [20] Stejně jako disociační konstanta léčiv je důležitou charakteristikou a přímo ovlivňuje ADMET léčiva. Má tedy velký vliv i na další vlastnosti léčiv, jako je rozpustnost, permeabilita, vazba na proteiny a distribuce. [21]

Při objevování a vývoji nových léčiv je stanovení lipofility nepostradatelné. Ovlivňuje farmaceutický, farmakokinetický i farmakodynamický profil léčiva. Nejčastěji se lipofilita určuje pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC), popřípadě pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). [22]

Ze strukturního hlediska má na lipofilitu vliv objem molekuly, polarita, kyselost a bazicita vodíkových vazeb. Lipofilita vyjadřuje schopnost sloučeniny rozdělit se mezi dvě nemísitelné (nepolární a polární) fáze. Jako nepolární fáze se v experimentálních metodách obvykle používá oktanol, jako polární voda. Lipofilita léčiva je nejčastěji charakterizována logaritmem rozdělovacího koeficientu  $\log P$  (oktanol/voda), popřípadě se můžeme setkat s přesnějším vyjádřením lipofility –  $\log D$  (viz níže). [21]

Rozdělovací koeficient  $P$  označuje poměr koncentrace látky v organické ( $c_{org}$ ) a vodné fázi ( $c_{aq}$ ), přičemž pH prostředí odpovídá stavu, kdy se látka nachází v neutrální formě. V praxi se využívá logaritmu rozdělovacího koeficientu  $\log P$ .

$$P = \frac{c_{org}}{c_{aq}} \quad (7)$$

$\log D$  zohledňuje okolní pH. Část sloučeniny se tedy může nacházet v ionizované formě. Výsledná hodnota závisí na lipofilitě neutrální i ionizované formy léčiva. Samozřejmě sloučenina v ionizovaném stavu chová vyšší afinitu k vodnému, polárnímu prostředí. Z toho vyplývá, že u kyselin bude se vzrůstajícím pH hodnota  $\log D$  klesat. Analogicky pro báze platí, že se vzrůstajícím pH, kdy se snižuje podíl ionizované formy,  $\log D$  vzrůstá také. [21] [22]

Pro léčiva podávaná per os se jeví jako ideální rozmezí  $\log P$  0–3. Potvrzují to studie, které sledovaly vliv rozdělovacího koeficientu na distribuční objem léčiv. Látky s nižšími hodnotami  $\log P$  jsou polárnější, tudíž hůře procházejí lipidovou dvouvrstvou. Opakem jsou pak sloučeniny lipofilnější, což determinuje jejich omezenou rozpustnost ve vodném prostředí. Obě dvě varianty výrazně snižují biodostupnost léčiv po perorálním podání. [21]

Aby léčivo vyvolalo účinek, je většinou potřeba, aby alespoň z části bylo rozpustné ve vodě. Všechna léčiva, kromě lokálně působících, jsou do místa účinku transportována vodní cestou (obsah vody v těle je asi 50–60 %). Nicméně při zjišťování rozpustnosti léčiv je třeba vycházet z biologického prostředí organismu. Není výjimkou, že léčivo ve vodě nerozpustné se za fyziologických vlastností těla rozpustným stane. Například lze zmínit ve vodě nerozpustné bazické látky, které v kyselém prostředí žaludku rozpustné jsou. Vysoká rozpustnost způsobuje rychlou absorpci, zároveň však i eliminaci, tudíž mají taková léčiva pouze krátkodobý účinek. Naopak velké snížení rozpustnosti ve vodě může vést k potlačení až úplnému vymizení účinku. Nerozpustnost může být v určitých

případech velice žádanou vlastností. Např. síran barnatý je možné díky jeho enormní nerozpustnosti využívat jako rentgenokontrastní látku i přes vysokou toxicitu barnatých iontů, které se do organismu ale nevolňují. [1]

Pro každý parametr ADMET je výhodnější jiné rozmezí  $\log P$ . Tuto závislost shrnuje následující tabulka:

Parametr	$\log P$ léčiva
Rozpustnost	< 3
Penetrace	-1–5,9
Biodostupnost	0–3
Průnik do CNS	> 2
Toxicita	> 3

Tabulka č.4: Vztah mezi  $\log P$  léčiv a parametry ADMET [23]

Vlastnosti léčiv vycházející z hodnoty  $\log D$  (měřeno za fyziologických podmínek pH 7,4) popisuje následující text:

**$\log D_{7,4} < 1$ :** dobrá rozpustnost, špatná absorpce a průnik hematoencefalickou bariérou, vysoká clearance ledvinami způsobená polaritou sloučenin

**$1 < \log D_{7,4} < 3$ :** dobrá absorpce z intestinálního traktu, díky dostatečné rozpustnosti a zároveň schopnosti pasivní difuze, metabolizace léčiv snížena z důvodu nižší afinity k metabolickým enzymům

**$3 < \log D_{7,4} < 5$ :** dobrá permeabilita, špatná rozpustnost, míra absorpce snížena, metabolismus vyšší v závislosti na zvýšené vazbě na metabolické enzymy

**$\log D_{7,4} > 5$ :** biologická dostupnost velice nízká, distribuční objem velký z důvodu ukládání látek do tkání, toxicita zvýšena [21]

### 2.3.1 Způsoby měření lipofility léčiv

Experimentální metody, které se využívají pro měření lipofility léčiv, lze rozdělit na přímé (měříme hodnotu  $\log P$ ) a nepřímé. [22] Výstupem nepřímých měření je jiný parametr lipofility, který lze dát do závislosti (většinou lineární) s  $\log P$ . [23] Ve své experimentální práci jsem využila nepřímé metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie, tudíž se na ni i více zaměřím. Ostatní metody jsou v textu níže pouze stručně popsány.

#### 2.3.1.1 Přímé metody

##### **Extrakční metoda**

Extrakční metoda je jednou z nejjednodušších experimentálních metod používaných ke stanovení rozdělovacího koeficientu. Dochází zde k extrakci v systému oktanol-voda. [22] Ač jsou tato dvě rozpouštědla vzájemně nemísitelná, z určité malé části vzájemně rozpustná jsou, a to má vliv na přesnost dalšího stanovení. V 1 l *n*-oktanolu se rozpustí 2,3 molu vody, což má za následek změnu

polarity oktanolu a jeho následné interakce (na úrovni H-můstek). [20] I když organická rozpouštědla nemohou zcela nahradit fyziologické prostředí organismu, bylo zjištěno, že oktanol vykazuje jistou podobnost s molekulami buněčné membrány. Hydroxylové skupiny oktanolu a vody se mohou podílet na polárních interakcích léčiva s prostředím. Z důvodu různých vlastností vodíkových vazeb v membránách i receptorech byla kromě oktanolu pro extrakci v dělicí nálevce ustanovena ještě další tři rozpouštědla. Jedná se o chloroform, cyklohexan a propylenglykoldipelargonát. Oktanol lze za tato rozpouštědla pro výpočet  $\log P$  zaměnit, přičemž rozdíly  $\log P$  v těchto jednotlivých systémech se liší převážně z důvodu odlišných interakcí na úrovni vodíkových vazeb. [22]

Důležitým požadavkem je vysoká čistota zkoušené látky. Případné nečistoty by mohly narušit měření a vést k nepřesným výsledkům. V případě spektrofotometrického hodnocení jsou vysoké požadavky na čistotu kladeny i na rozpouštědla. [20] Dále je nutné, aby vrstvy byly dokonale odděleny. I malé množství oktanolu ve vodné fázi může obsahovat velké množství vzorku a vést k nepřesným výsledkům. [24]

Nevýhodou měření  $\log P$  pomocí extrakční metody je časová (potřeba dostatečně dlouhého třepání) a pracovní náročnost a spotřeba organických rozpouštědel. [22] Extrakční metoda je využitelná pro látky s  $\log P$  -2–4. [20] Problémem měření vysoce lipofilních či naopak hydrofilních látek je jejich špatná rozpustnost, tvorba emulze atd.

Vývoj v této oblasti směřuje k miniaturizaci objemu (ze 100 ml až na 1 ml), tedy i ke snížení objemů potřebných rozpouštědel, a k automatizaci. Tyto metody se vyznačují vyšší reprodukovatelností, přesností, rychlostí, nicméně i finanční zátěží. [22]

### **Potenciometrická titrace**

Další přímou metodou měření  $\log P$  je potenciometrická titrace. Pozoruje se rozdělení neutrálních a ionizovaných látek mezi vodnou a organickou fází. Je nezbytné měřit lipofilitu léčiva při různém pH prostředí, z důvodu predikce chování léčiva při průchodu odlišnými fyziologickými kompartmenty lidského těla. [22]

#### **2.3.1.2 Nepřímé metody**

Jak již bylo řečeno, nejvíce uplatňovaným principem měření lipofility je rozdělení látky mezi dvě nemísitelné fáze. Toho lze prakticky nejlépe docílit pomocí chromatografie. Nejfrekventovanějšího užití se dočkala HPLC s reverzní fází. Stacionární fází tvoří uhlovodík chemicky vázaný na oxid křemičitý. Takováto stacionární fáze je podobná struktuře fosfolipidů, přičemž oxid křemičitý i hydrofobní řetězce reprezentují funkční skupiny. Rozsah měřitelného  $\log P$  není tak omezený jako u extrakční metody. Preferovanou metodou se stala i z důvodu dostupnosti, přesnosti, reprodukovatelnosti a možnosti automatizace. Oproti přímým metodám případné nečistoty ve vzorku měření neovlivní (jednotlivé složky se oddělí). Je zapotřebí pouze malého množství vzorku, ve kterém jsme schopni změřit větší počet chemických sloučenin. Omezením chromatografie je možnost měřit pouze sloučeniny s podobnými retenčními časy (HPLC) nebo retenčními faktory (TLC), tedy homology

a blízké příbuzné sloučeniny. Tento problém lze u HPLC obejít využitím gradientové eluce. [22] Chromatografické veličiny, které se používají pro určení lipofility, korelují s všeobecně uznávanou hodnotou lipofility  $\log P$ . [20]

### **TLC**

Nejvýraznější postavení v měření lipofility sice zastává HPLC, nicméně metoda chromatografie na tenké vrstvě s reverzní fází má také své uplatnění. [22] Svým uspořádáním je TLC plošná kapalinová chromatografie. Sorbent (u reverzní fáze nejčastěji modifikovaný silikagel) je nanesen na hliníkovou fólii či skleněnou desku v rovnoměrné vrstvě. Samotné vyvíjení se odehrává v tzv. chromatografické vaně, která se před vlastním vyvíjením nechá nasytit parami použité mobilní fáze. [25]

K určení lipofility se využívají naměřené retenční faktory  $R_f$ , ze kterých se následně vypočítají hodnoty  $R_M$ . Retenční faktor  $R_f$  je charakterizován jako poměr mezi vzdáleností start – střed skvrny a start – čelo mobilní fáze. Hodnota  $R_M$  vypočítaná podle vzorce č. 8 odpovídá lineární závislosti s všeobecně uznávanou hodnotou lipofility  $\log P$ .  $R_M$  je lineárně závislý na koncentraci organického rozpouštědla, tudíž je extrapolován na jeho nulový obsah.

$$R_M = \log \frac{1}{R_f} - 1 \quad (8) \quad [22]$$

$$\log P = R_M + \text{konst.} \quad (9) \quad [20]$$

TLC při měření lipofility využívá reverzního systému, přičemž stacionární fáze je zastoupena nejčastěji silikagelem s navázanými  $C_{18}$  nebo  $C_8$  řetězci. Jelikož vodu jako mobilní fázi použít nelze (retenční čas je dlouhý), využívá se často směs metanolu, acetonitrilu, dioxanu nebo acetonu.

Výhodou této metody je rychlost stanovení, možnost měření několika vzorků s širokým rozsahem lipofility najednou. Spotřeba vzorků je v porovnání s přímými metodami minimální (několik  $\mu\text{l}$ ). Zároveň na ně nejsou kladeny vysoké nároky na čistotu. Dalším pozitivem je, že se jedná o pracovní relativně snadný proces. [22]

Tuto metodu lze miniaturizovat. Potom se jedná o tzv. HPTLC (vysokoúčinná chromatografie na tenké vrstvě). Jejím použitím se docílí ještě menší spotřeby vzorků a rychlejšího a efektivnějšího vyvíjení, jelikož se využívá jemnější sorbent. [25]

### **HPLC**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se svým uspořádáním řadí mezi kolonové chromatografie využívající eluční způsob vyvíjení. Nejčastěji se setkáváme s reverzní fází, ale normální uspořádání lze také použít. [26]

HPLC je jednou z nejvíce uplatňovaných metod v oblasti analýzy léčiv, což potvrzuje i její široké využití Českým lékopisem. Tato separační metoda umožňuje hodnotit léčivo z kvalitativního i z kvantitativního hlediska. Zároveň se jedná o metodu relativně časově nenáročnou, kterou lze navíc zcela automatizovat. Uplatňuje se při identifikaci léčiv, stanovení obsahu a případných nečistot. V měření lipofility léčiv je taktéž velice frekventovanou metodou, čehož jsem využila ve své práci. Dále

Lze získat pomocí HPLC informace o stabilitě léčiv (rozkladné produkty), je možné analyzovat přírodní léčiva z biologického materiálu a monitorovat látky v tělních tekutinách a tím i částečně sledovat osud léčiva v organismu. Svými parametry je HPLC srovnatelná s plynovou chromatografií. Ve farmacii se však uplatňuje ve větší míře, jelikož v plynové chromatografii lze měřit pouze těkavá léčiva (nebo je nutné je na těkavá převést).

Pro správné provedení HPLC je důležité optimalizovat podmínky měření. Jednotlivé separované složky musí představovat ostré, symetrické, oddělené píky. Kvalitativní analýzu zastává retenční (eluční) čas  $t_r$  (čas od nástřiku vzorku do kolony k maximální hodnotě píku), kvantitu pak určuje plocha píku. [14]

HPLC systém je složen z několika základních částí. Patří mezi ně: rezervoár mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo a směšovač (umožňuje smísení složek mobilní fáze před kolonou). Dále je v systému přítomný dávkovač analytu (většinou se využívá autosampler). Analyt se dávkuje z tzv. vialek. Vzorek je ve formě roztoku rozpuštěn buď v organické složce mobilní fáze, nebo přímo v mobilní fázi. Nastříknutý vzorek putuje do předkolony, která slouží k odstranění zbytků matrice vzorku, a do kolony, kde dochází k vlastnímu vyvíjení analytu. K detekci se používají různé druhy detektorů s průtokovou celou. Vše je řízeno počítačem, který zároveň zaznamenává naměřená data. [26]

Délka chromatografických kolon je většinou 5–25 cm a jejich vnitřní průměr se pohybuje v rozmezí 2–5 mm. Nejčastějším materiálem používaným na jejich výrobu je nerezová ocel či sklo. Stacionární fáze bývá většinou tvořena silikagelem s chemicky navázanými radikály. V případě reverzní fáze, která se uplatňuje i u měření lipofility, se jedná o 18 (nebo 8) členné uhlovodíkové zbytky. Pokud naopak chceme dosáhnout střední polaroty stacionární fáze, volí se radikály typu  $-NH_2$ ,  $-CN$  atd. Chemicky nepozměněný silikagel a oxid hlinitý lze využít též jako polární stacionární fázi, nicméně nejsou tak častými sorbenty. [14]

Separace analytu může probíhat 2 způsoby eluce. Buď se využije *eluce isokratická*, tzn. že se složení mobilní fáze po celou dobu vyvíjení nemění, nebo *eluce gradientová*. K té se přistupuje, pokud se stanovuje vzorek s širokým rozpětím retenčních časů jednotlivých analytů. Je pro ni typická průběžná změna poměrů složek v mobilní fázi. Zvyšuje se zastoupení té složky, která má vyšší eluční účinnost a tím se zrychluje proces vyvíjení. [26]

Citlivost a selektivitu měření z velké části ovlivňuje zvolený detektor soustavy. Nejčastějším typem jsou spektrofotometrické detektory založené na měření absorpce elektromagnetického záření. Nejvíce je využíván UV detektor, nicméně lze použít i UV-VIS detektory. Mezi další patří: fluorimetrické, elektrochemické (voltametrické, polarografické a amperometrické) a refraktometrické detektory. [14]

#### *Uplatnění RP-HPLC v měření lipofility léčiv*

Pro stanovení lipofility je RP-HPLC v současnosti jednou z nejužívanějších metod. Její uplatnění se začalo rozvíjet již v 70. letech minulého století. Vyskytuje se zde však několik zásadních problémů, které se během vývoje optimalizují. Chromatografický systém s reverzní fází neposkytne zcela totožný

model jako soustava oktanol/voda, může dojít k interakcím na povrchu stacionární fáze (např. se silanolovými skupinami), problémem může být také velikost pórů sorbentu a přenositelnost dat mezi kolonami. Rozsah  $\log P$  za použití izokratické eluce je omezen, stejně tak rozpětí pH není široké kvůli vlastnostem stacionární fáze na bázi oxidu křemičitého. [24] Nejčastěji se využívají stacionární fáze s chemicky modifikovaným silikagelem s oktanylovými či oktadecylovými zbytky.

Hodnotu lipofility sloučenin udává tzv. *kapacitní faktor*, vyjádřený jako  $\log K$ . Ten charakterizuje schopnost retence látky v koloně a její míru separace v porovnání s mrtvým retenčním časem. Lze jej vypočítat z naměřených retenčních časů:

$$K = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (10)$$

Ve vzorci č. 10 značí  $t_R$  retenční čas látky a  $t_0$  tzv. mrtvý retenční čas. Jedná se o retenční čas látky, která se pohybuje stejnou rychlostí jako mobilní fáze, tudíž není kolonou nijak zadržována. Jelikož mobilní fáze představuje polární složku soustavy, budou se hydrofilnější látky vyvíjet rychleji (kratší  $t_R$ ) a lipofilnější látky – zadržované stacionární fází – pomaleji (delší  $t_R$ ). [27] Ze vzorce vyplývá, že čím je hodnota kapacitního faktoru vyšší, tím je látka kolonou více zadržována. [26]

$\log K$  vykazuje ve vztahu k  $\log P$  lineární závislost:

$$\log P = \log K + \text{konst.} \quad (11) [20]$$

Pro provedení extrapolace hodnoty kapacitního faktoru na nulový obsah methanolu v mobilní fázi  $\log k_w$  lze využít následující vztah,

$$\log k = -S\phi + \log k_w \quad (12)$$

kde  $k_w$  značí hodnotu kapacitního faktoru extrapolovanou na čistou vodu,  $\phi$  představuje objemovou frakci organického rozpouštědla v mobilní fázi a  $S$  udává sklon přímky lineární regrese. Z důvodu jednoduchosti se nejčastěji používá vztah lineární, ačkoli se lze setkat i s rovnicí kvadratickou. Často se však mohou v lineárních grafech vyskytnout určité odchylky ve vysokých koncentracích organického rozpouštědla mobilní fáze. Hodnoty  $k_w$  jsou pro různá organická rozpouštědla odlišné (i za dodržení stejných podmínek a proměňování totožného analytu). [28]

Jak již bylo řečeno, závislost  $\log P$  na  $\log K$  je lineární. Nejvyšší korelace mezi těmito veličinami byla prokázána u  $\log K$  naměřeného při obsahu 40 % methanolu v mobilní fázi, popřípadě u  $\log k_w$ . [29] Obecně lze konstatovat, že se jako nejvýhodnější organické rozpouštědlo v mobilní fázi jeví methanol. Na základě lipofility analytů se využívají koncentrace 30-70 %, pokud toto rozmezí není dodrženo, nelze využít lineární ani kvadratické vztahy. [30] Z hodnoty  $\log k_w$  je možné pomocí lineární regrese získat přímo hodnotu  $\log P$ . Touto problematikou se zabývaly mnohé studie a data poskytovala velice dobrou korelaci. Nicméně je zapotřebí přesné dodržení podmínek, za kterých je  $\log k_w$  naměřeno. Aby se potvrdila lineární závislost mezi  $\log k_w$  a  $\log P$ , přidává se do mobilní fáze  $n$ -oktanol a poté se porovnává s výsledky, které se získaly měřením, kde  $n$ -oktanol použit nebyl. [28]

Nejčastěji se setkáváme s kolonami tvořenými stacionární fází na bázi modifikovaného silikagelu s uhlovodíkovými řetězci ( $C_8$ ,  $C_{18}$ ). Jednou z nevýhod těchto materiálů je jejich nestabilita v alkalickém



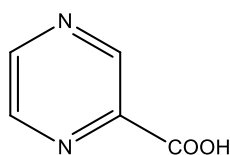
prostředí. Dalším nedostatkem je možnost vzniku polárních interakcí (elektrostatické, vodíkové) mezi analytem a silanolovými skupinami oxidu křemičitého. Takové interakce pak mají za následek asymetrické píky v chromatogramu. Aby k těmto jevům nedocházelo, může se stacionární fáze chránit polárními funkčními skupinami, které zamezují kontaktu se silanolovými skupinami. Komerčně dostupné jsou např. fáze alkylamidové a karbamátové. [22]

### 3. Experimentální část

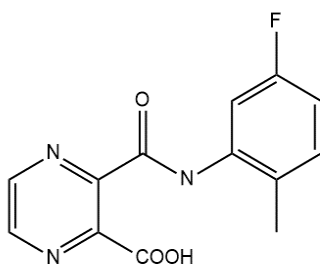
V experimentální části se budu zabývat měřením fyzikálně chemických vlastností nově nasyntetizovaných léčiv z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy FaF a z Katedry anorganické a organické chemie FaF. K určení hodnot  $pK_a$  jsem využila metod potenciometrie a spektrofotometrie a k naměření lipofility léčiv metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází. U potenciometrie jsem musela několikrát použít extrapolační křivky z důvodu nedostatečné rozpustnosti látek ve vodě a nutnosti využít pomocného rozpouštědla methanolu. Jako léčiva mi posloužily látky odvozené od pyrazin-2-karboxylové kyseliny (zkoumaná jako potenciální antituberkulotika) a od chinazolinu a chinoxalinu (potenciální bronchodilatancia). Z důvodu větší přehlednosti rozdělují svou experimentální práci na dvě části: stanovení disociační konstanty léčiv a stanovení lipofility léčiv.

*Seznam vzorců látek využitých v mé experimentální práci:*

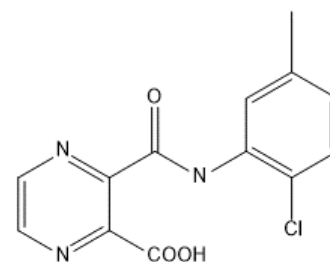
Pyrazin-2-karboxylová kyselina



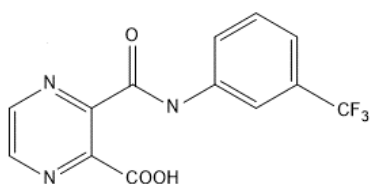
LSPJ11



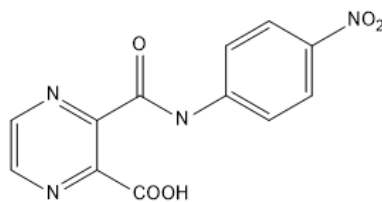
LSPJ12



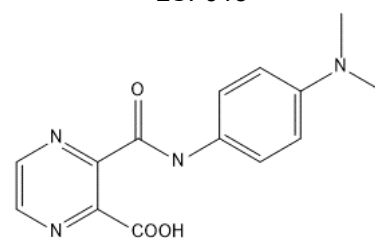
LSPJ13



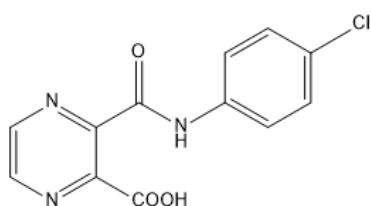
LSPJ14



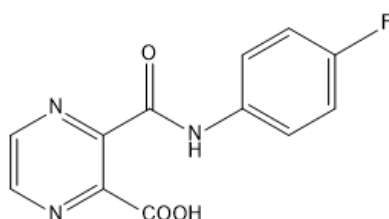
LSPJ15



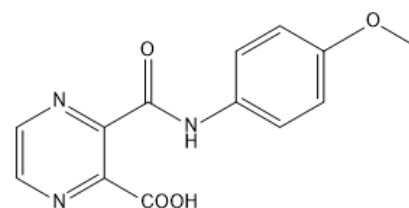
LSPJ16



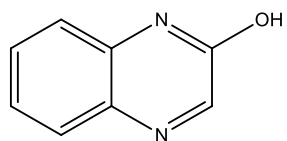
LSPJ17



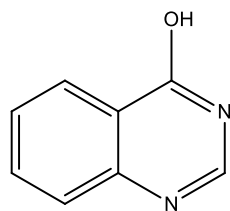
LSPJ18



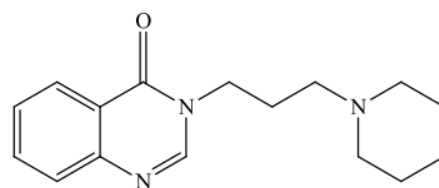
2-hydroxychinoxalin



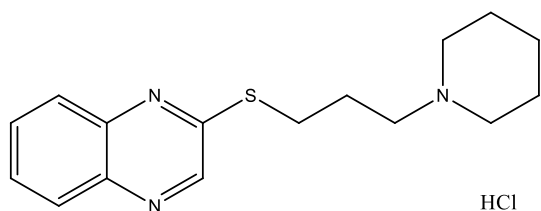
4-hydroxychinazolin



VN014



VN034



## 3.1 Stanovení disociační konstanty léčiv

### 3.1.1 Materiální vybavení

#### *Přístroje:*

- pH metr inoLab 720 (WTW) + kalibrační TEC pufrý (WTW)
- Kombinovaná elektroda typ Sentix 61 (WTW)
- Magnetická míchačka (Heidolph) + míchadla
- Spektrofotometr Agilent HP8453 (Agilent Technologies) + kyvety (Agilent Technologies)
- Analytické váhy (Sartorius)

#### *PC software:*

- UV-Visible ChemStation Software (Agilent Technologies)
- MS Excel 2016

#### *Chemikálie:*

- Základní roztok Brittonova-Robinsonova pufru
- Kyselina chlorovodíková p.a. (Penta)
- Hydroxid sodný p.a. (Penta)
- Fenolftalein p.a. (Lachema Brno)
- Methylalkohol p. a. (Penta)

### 3.1.2 Titrační činidla

Přesná koncentrace roztoku NaOH o přibližné koncentraci 0,2 mol/l byla stanovena titrací roztokem HCl o přesně známé koncentraci na fenolftalein. Při vlastním potenciometrickém měření jsem hydroxid zředila na 0,01 mol/l. Koncentrace byla vždy vypočítána s přesností na 4 desetinná místa. Stanovení přesné koncentrace roztoku NaOH bylo prováděno každý den před zahájením potenciometrických měření.

### 3.1.3 Pufrý

Při spektrofotometrickém měření byly pro fixaci hodnot pH používány pufrý dle Brittona a Robinsona. Tyto pufrý byly připravovány smícháním základního roztoku dle Brittona a Robinsona (směs 0,04 mol/l kyseliny borité, 0,04 mol/l kyseliny fosforečné a 0,04 mol/l kyseliny octové) a roztoku NaOH o koncentraci přibližně 0,2 mol/l v určitém poměru podle literatury. [31] Přesné hodnoty pH takto připravených pufrů jsem změřila pH-metrem.

### 3.1.4 Příprava vzorku

Vzorek jsem převedla do roztoku o koncentraci 0,001 mol/l. K přípravě jsem využila dvou baněk (objem 10 ml a 25 ml). Na potenciometrii jsem spotřebovala 30 ml roztoku (10 ml na každé měření), zbytek jsem využila na spektrofotometrii. Roztok vzorku byl připraven vždy v čas potřeby.

Pro výpočet navážky ( $m$ ) jsem využila vzorec,

$$m=c.M.V \quad (13)$$

kde  $c$  je výsledná koncentrace roztoku ( $c = 0,001 \text{ mol/l}$ ),  $m$  značí navážku,  $M_r$  molární hmotnost měřené látky a  $V$  výsledný objem roztoku (10 nebo 25 ml). [18]

V případě snížené rozpustnosti ve vodě jsem vzorek ve vodě zahřívala. Pokud ani tato iniciace nepomohla, přistoupilo se k přidavku přesně zaznamenaného objemu methanolu a doplnění destilovanou vodou po rysku, přičemž se pro potenciometrické měření využilo nejméně tří odlišných poměrů methanol/voda.

Tabulka navážek jednotlivých látek a objemů v souvislosti s molekulovou hmotností látek a výslednou přesnou koncentrací připravených roztoků je uvedena níže.

Vzorek	Molární hmotnost	Objem [ml]	Navážka [g]	Koncentrace [mol/l]
Pyrazin-2-karboxylová kyselina	124,10	25	0,0045	0,0015
LSPJ11	275,24	10	0,0028	0,0010
		10	0,0029	0,0010
		10	0,0033	0,0010
LSPJ12	291,69	10	0,0030	0,0010
		10	0,0027	0,0009
		10	0,0032	0,0011
		10	0,0031	0,0011
LSPJ13	311,22	10	0,0033	0,0011
		10	0,0034	0,0011
		10	0,0032	0,0010
LSPJ14	288,22	10	0,0036	0,0013
		25	0,0079	0,0011
LSPJ15	286,29	10	0,0037	0,0013
		25	0,0078	0,0011
LSPJ16	277,66	10	0,0029	0,0010
		25	0,0066	0,0010
LSPJ17	261,21	10	0,0030	0,0011
		25	0,0061	0,0009
LSPJ18	273,25	10	0,0032	0,0012
		25	0,0064	0,0009
2-hydroxychinoxalin	147,15	10	0,0023	0,0016
		25	0,0036	0,0010
4-hydroxychinazolin	146,15	10	0,0014	0,0010
		25	0,0034	0,0009
VN014	271,39	10	0,0027	0,0010
		25	0,0065	0,0010
VN034	323,88	10	0,0032	0,0010
		25	0,0087	0,0010

Tabulka č. 5: Seznam vzorků, jejich molekulových hmotností a navážek pro jednotlivá měření

### 3.1.5 Postup práce – potenciometrie

Před vlastním měřením na pH metru inoLab 720 byla provedena jeho kalibrace pomocí kalibračních pufrů. Po zkalibrování přístroje jsem k roztoku vzorku o objemu 10 ml v 25 ml kádince přidávala roztok hydroxidu sodného (popř. kyseliny chlorovodíkové) o koncentraci 0,01 mol/l pipetou po 0,1 ml a po ustálení hodnoty pH jsem ji zaznamenala. Kádinka o objemu 25 ml zaručovala, že i při použití pouze 10 ml títrovaného roztoku bude elektroda ponořená minimálně nad diafragmu, což je pro správné měření nutné. Takto jsem pokračovala až do přechodu do zásaditého (kyselého) prostředí. Z důvodu eliminace chyb jsem měření provedla celkem třikrát. Výsledky měření jsem přenesla do excelových tabulek a získala  $pK_a$  zkoumané látky, které jsem následně zprůměrovala. Závislost pH na objemu přidaného hydroxidu (kyseliny) jsem vynesla do grafu. Výsledky měření i grafy jsou uvedeny u jednotlivých látek v kapitole *Výsledky a diskuze*.

Ve své práci jsem využila k výpočtu  $pK_a$  dvou vzorců. První, jednodušší, vypadá takto:

$$pK_a = pH + \log \frac{[HA]}{[A^-]} \quad (14)$$

Druhý vzorec bere v úvahu i vodíkové ionty přítomné v roztoku, tudíž je přesnější:

$$pK_a = pH + \log \frac{[HA] - [H^+]}{[A^-] + [H^+]} \quad (15)$$

Pro dosažení do jednotlivých vzorců je však třeba provést několik mezivýpočtů. Význam proměnných použitých ve vzorcích 14–20 je uveden v tabulce č. 6. [4] [32]

$$C_{HA} = \frac{A \cdot C'_{HA}}{X} \quad (16)$$

$$C_{OH} = \frac{B \cdot C_{OH}}{X} = [A^-] \quad (17)$$

$$X = A + B \quad (18)$$

$$[HA] = C_{HA} - C_{OH} \quad (19)$$

$$[H^+] = 10^{-pH} \quad (20)$$

Symbol	Význam
$C_{OH}$	Aktuální koncentrace titračního činidla
$C'_{OH}$	Původní koncentrace titračního činidla
$C_{HA}$	Aktuální koncentrace látky v roztoku
$C'_{HA}$	Původní koncentrace látky v roztoku
$X$	Celkový objem látky v roztoku
$A$	Počáteční objem roztoku
$B$	Přídavek titračního činidla
$[HA]$	Rozdíl koncentrací látky a titračního činidla/ koncentrace neionizované frakce
$[H^+]$	Koncentrace kationtů vodíku v roztoku
$[A^-]$	Koncentrace ionizované frakce

Tabulka č. 6: Význam symbolů ze vzorců 14–20 [4] [32]

V případě vzorků, které nebylo možné rozpustit ve vodě, jsem provedla nejméně tři měření, přičemž roztok vzorku vždy obsahoval různý poměr methanol/voda. Výsledky by byly přesnější, pokud by se jednotlivé koncentrace methanolu v roztoku proměřily vícekrát, nicméně to nebylo možné kvůli omezenému množství látky. Z jednotlivých měření byla sestrojena kalibrační křivka, která mi umožnila extrapolovat hodnotu  $pK$  na 0% koncentraci methanolu v roztoku.

K extrapolaci jsem využila Yasudy-Shedlovského rovnici,

$$pK_a + \log x_1 = \frac{a_D}{D} + b_D \quad (21)$$

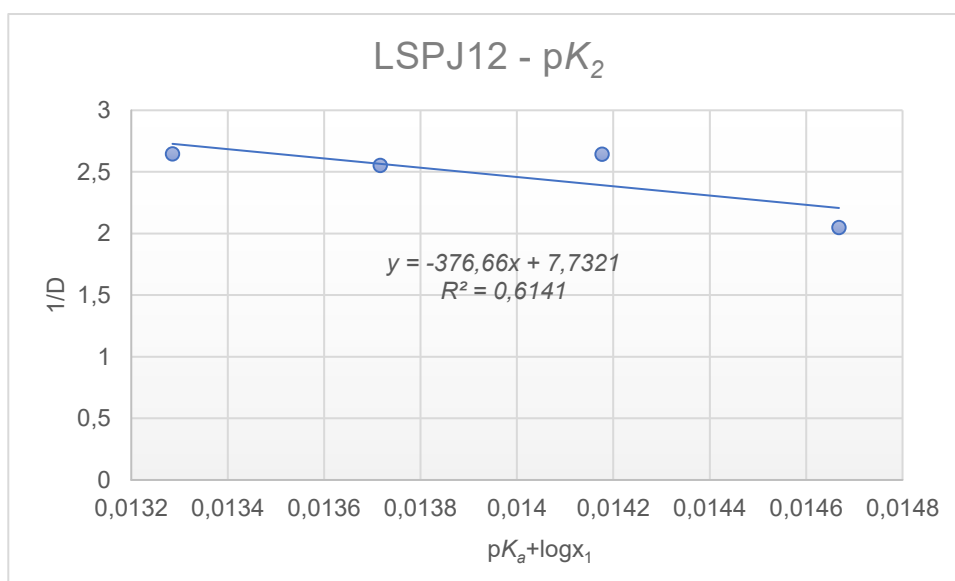
kde  $pK_a$  jsou experimentálně naměřené hodnoty,  $x_1$  objemový zlomek vody v rozpouštědle,  $D$  je dielektrická konstanta rozpouštědla a hodnoty  $a_D$  a  $b_D$  empiricky zjištěné konstanty. [33] [34] Při použití této rovnice by koncentrace methanolu v rozpouštědle neměla přesahovat 40 %. [35]

Hodnota  $D$  se pro směsné rozpouštědlo methanol/voda počítá podle následujícího vzorce:

$$D = x_1 D_1 + x_2 D_2 \quad (22)$$

$D_1$  a  $D_2$  jsou dielektrické konstanty vody ( $D_1 = 80,0$ ) a methanolu ( $D_2 = 32,7$ ) a  $x_2$  značí objemový zlomek methanolu v rozpouštědle.

Na základě Yasudy-Shedlovského rovnice lze sestavit graf. Na osu  $x$  se vynese  $pK_a + \log x_1$  a na osu  $y$  druhá část rovnice,  $\frac{1}{D}$ . [33] Na ukázkou přikládám graf vzorku LSPJ12, který je také uveden v kapitole *Výsledky a diskuze*.



Graf č. 3: Extrapolace  $pK_2$  látky LSPJ12 metodou lineární regrese



### 3.1.6 Postup práce – spektrofotometrie

Pro první, pouze orientační, měření jsem použila čtyři kyvety. První kyveta sloužila pro slepý vzorek, do dalších tří kyvet jsem nanasla mikropipetou 0,2 ml roztoku vzorku o koncentraci 0,001 mol/l, který se následně 10x naředil – v prvním případě roztokem kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,1 mol/l, ve druhém čistou destilovanou vodou a nakonec roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol/l. Poté jsem všechny tři vzorky měřila proti slepému roztoku na spektrofotometru Agilent HP8453. Další měření jsem provedla v menších intervalech v okolí pH, kde jsem předpokládala, že se bude vyskytovat  $pK_a$  látky. Pro vytvoření daného pH jsem využila pufr dle *Brittona a Robinsona*. Roztok vzorku o určitém pH (0,2 ml vzorku + 1,8 ml pufru) byl vždy proměřován proti slepému roztoku téhož pufru. Z důvodu eliminace chyb byly pro jedno měření použity vždy dvě totožné kyvety.

K výpočtu  $pK_a$  vzorku jsem využila hodnoty absorbancí získané z programu UV-Visible ChemStation Software. Absorbance byly naměřeny při vlnové délce, ve které se od sebe nejvíce lišily.

Disociační konstantu jsem vypočítala pomocí následujícího vzorce (proměnné jsou vysvětleny v doprovodné tabulce):

$$pK_a = pH + \log \frac{A_{I^-} - A}{A - A_{HI}} \quad (23)$$

Symbol	Význam
pH	pH pufru
$A_{I^-}$	Absorbance v zásaditém prostředí
$A_{HI}$	Absorbance v kyselém prostředí
A	Absorbance vzorku

Tabulka č. 7: Význam proměnných ze vzorce č. 23 [15]

## 3.2 Stanovení lipofility léčiv

### 3.2.1 Materiální vybavení

HPLC systém – Kapalinový chromatograf Agilent® Series 1200 SL (Agilent Technologies):

- vakuový mikrodegaser
- binární čerpadlo 1200 SL
- autosampler 1200 SL plus
- termostat autosampleru
- TCC cluster tvořený dvěma kolonovými termostaty TCC Infinity 1290 a dvěma osmipozicovými devíticestnými ventily
- detektor s diodovým polem 1200 SL
- fluorescenční detektor 1200

*Chromatografická kolona:*

- Zorbax Eclipse XDB C18 RRHT 4,6 x 50,0 mm; 1,8 µm; 600 bar (Agilent Technologies)

*Chromatografické podmínky:*

- složení mobilní fáze (MF): methanol/voda = 70/30
- průtok MF: 1 ml/min
- teplota kolony: 30 °C
- detekce: UV 210 nm a 270 nm
- stanovení mrtvého retenčního času: retenční čas roztoku jodidu draselného

*Software:*

- Agilent ChemStation, verze B. 04.02.

*Složky mobilních fází:*

- ultračistá voda čištěná reverzní osmózou
- Methanol for gradient elution – CHROMASOLV®, Sigma-Aldrich

### 3.2.2 Příprava vzorků

Pro měření lipofility jsem využila stejných látek jako v předchozí podkapitole *Stanovení disociační konstanty léčiv*. Jejich seznam je uveden na počátku kapitoly *Experimentální část*. U vzorku pyrazin-2-karboxylové kyseliny lipofilita stanovována nebyla. Zkoušenou látku jsem rozpustila v MF methanol:voda = 70:30 na koncentraci 0,001 mol/l.

### 3.2.3 Postup práce

Roztoky vzorků jsem převedla do vialek a provedla nástřik za výše popsanych podmínek. Hodnotu lipofility logK jsem vypočítala pomocí vzorce č. 10 uvedeného v teoretické části v kapitole *Lipofilita*.

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Stanovení disociační konstanty léčiv

#### 4.1.1 Potenciometrie

Výsledky pro každý vzorek uvádí tabulka zaznamenávající průběh titrace jednoho ze tří měření. K tabulce je přiložen odpovídající graf titrační křivky (závislost pH roztoku na objemu přidaného hydroxidu sodného/kyseliny chlorovodíkové). Všechny výsledné hodnoty  $pK_a$  jsem zaznamenala do další tabulky, z které jsem vybrala hodnoty pro výpočet průměrného výsledku. Průměrnou hodnotu  $pK_a$  doplňuje směrodatná odchylka označena řeckým písmenem sigma ( $\sigma$ ).

Proměnné uváděné v tabulkách charakterizujících průběh titrace jsou vysvětleny výše (tabulka č. 6). Hodnoty, které byly během celého měření konstantní (počáteční koncentrace a objem roztoku vzorku, koncentrace titračního činidla), jsou uvedeny nad příslušnou tabulkou. Hodnota  $pK_1$  označuje výsledek vypočtený pomocí vzorce č. 14, hodnota  $pK_2$  značí výsledek pomocí vzorce č. 15. Jelikož tento vzorec bere v úvahu ionty vodíku, má vyšší vypovídající hodnotu. Rozhodla jsem se tedy závěrečnou průměrnou hodnotu disociační konstanty počítat z výsledků  $pK_2$ . Pokud koncentrace titračního činidla přesáhla koncentraci stanovované látky, výpočet nebylo možné provést. V tabulce jsou tyto případy označeny textem #ČÍSLO!

Látky jsou seřazeny na základě struktury. Na konec jsem oddělila látky nerozpustné ve vodě (LSPJ11 – LSPJ13), u kterých byl použit odlišný způsob výpočtu.

#### 4.1.2 Spektrofotometrie

Spektrofotometrické měření disociační konstanty doprovází graf s absorpčními křivkami. Pro výpočet  $pK_a$  jsem využila vzorec č. 23. Hodnoty, které jsem do vzorce dosadila, jsou vypsány v tabulce pod grafem. Spektrofotometrii jsem prováděla u každého vzorku, nicméně ne vždy měření poskytlo použitelné hodnoty. Takový stav nastává tehdy, když se neliší absorpční spektra disociované a nedisociované formy studované látky.

#### 4.1.3 Pyrazin-2-karboxylová kyselina

Tento vzorek jsem využila pouze jako zkušební látku pro měření hodnoty  $pK_a$  potenciometrickou metodou. Látku jsem si vybrala, jelikož její  $pK_a$  bylo již dříve naměřeno ve stejné laboratoři. Zároveň jsem předpokládala, že při měření nenastanou žádné zvláštní problémy (např. s rozpustností). Spektrofotometrické měření u tohoto vzorku provedeno nebylo.

#### *Potenciometrie*

Výsledky potenciometrické titrace pyrazin-2-karboxylové kyseliny standardizovým odměrným roztokem hydroxidu sodného jsou uvedeny v tabulce č. 8. Grafické znázornění závislosti pH na objemu přidaného hydroxidu vyjadřuje titrační křivka v grafu č. 4. Na rozdíl od dalších

potenciometrických stanovení, zde bylo provedeno jedno měření, jelikož se jednalo pouze o zkušební vzorek.

$$C'_{OH} = 0,0097 \text{ mol/l}$$

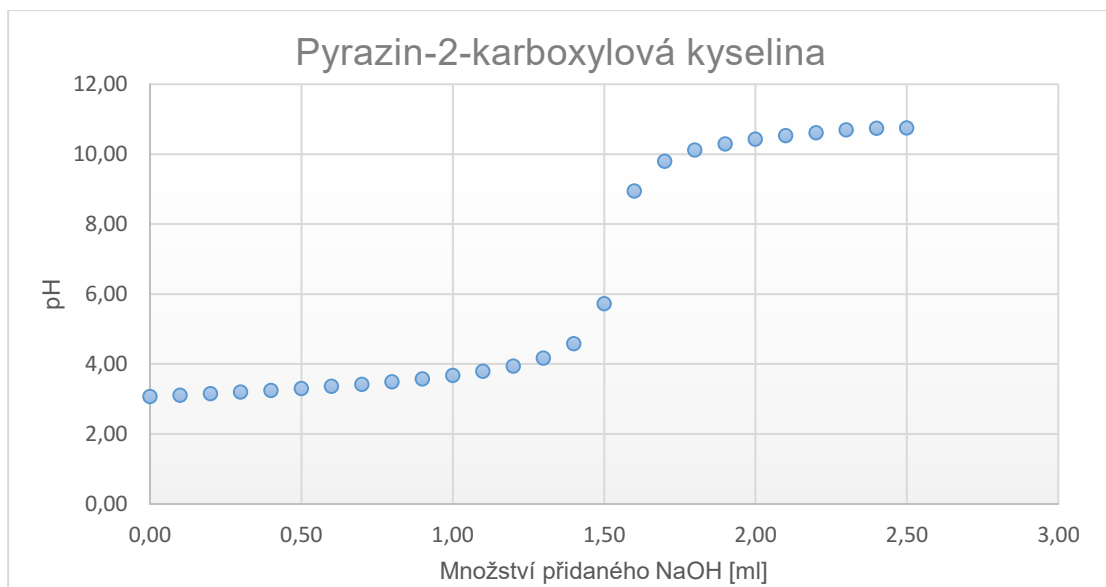
$$A = 10 \text{ ml}$$

$$C'_{HA} = 0,0015 \text{ mol/l}$$

$$X = 10 + B \text{ [ml]}$$

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	3,07	0,0015	0,0000	0,0015	#DĚLENÍ_NULOU!	0,0009	2,9173
0,10	3,11	0,0014	0,0001	0,0013	4,2560	0,0008	2,9205
0,20	3,15	0,0014	0,0002	0,0012	3,9627	0,0007	2,9163
0,30	3,20	0,0014	0,0003	0,0011	3,8019	0,0006	2,9345
0,40	3,24	0,0014	0,0004	0,0010	3,6791	0,0006	2,9137
0,50	3,30	0,0014	0,0005	0,0009	3,6008	0,0005	2,9395
0,60	3,36	0,0014	0,0005	0,0008	3,5358	0,0004	2,9514
0,70	3,42	0,0014	0,0006	0,0007	3,4777	0,0004	2,9489
0,80	3,49	0,0013	0,0007	0,0006	3,4317	0,0003	2,9540
0,90	3,57	0,0013	0,0008	0,0005	3,3935	0,0003	2,9610
1,00	3,67	0,0013	0,0009	0,0004	3,3685	0,0002	2,9842
1,10	3,79	0,0013	0,0010	0,0003	3,3501	0,0002	3,0097
1,20	3,94	0,0013	0,0010	0,0003	3,3372	0,0001	3,0366
1,30	4,17	0,0013	0,0011	0,0002	3,3560	6,76E-05	3,1113
1,40	4,58	0,0013	0,0012	0,0001	3,4316	2,63E-05	3,2599
1,50	5,72	0,0013	0,0013	0,0000	#ČÍSLO!	1,91E-06	#ČÍSLO!
1,60	8,95	0,0013	0,0013	-0,0001	#ČÍSLO!	1,12E-09	#ČÍSLO!
1,70	9,80	0,0012	0,0014	-0,0002	#ČÍSLO!	1,58E-10	#ČÍSLO!
1,80	10,12	0,0012	0,0015	-0,0002	#ČÍSLO!	7,59E-11	#ČÍSLO!
1,90	10,29	0,0012	0,0015	-0,0003	#ČÍSLO!	5,13E-11	#ČÍSLO!
2,00	10,43	0,0012	0,0016	-0,0004	#ČÍSLO!	3,72E-11	#ČÍSLO!
2,10	10,53	0,0012	0,0017	-0,0005	#ČÍSLO!	2,95E-11	#ČÍSLO!
2,20	10,61	0,0012	0,0017	-0,0006	#ČÍSLO!	2,45E-11	#ČÍSLO!
2,30	10,69	0,0012	0,0018	-0,0006	#ČÍSLO!	2,04E-11	#ČÍSLO!
2,40	10,74	0,0012	0,0019	-0,0007	#ČÍSLO!	1,82E-11	#ČÍSLO!
2,50	10,75	0,0012	0,0019	-0,0008	#ČÍSLO!	1,78E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č. 8: Výsledky potenciometrické titrace pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Graf č. 4: Titrační křivka pyrazin-2-karboxylové kyseliny

Pro výpočet aritmetického průměru  $pK_2$  jsem použila 13 hodnot, které jsem vyznačila v tabulce č. 8 šedě. Vyšlo mi, že:

$$pK = 2,95 (\sigma = 0,04)$$

#### Zhodnocení výsledků

Stanovení pyrazin-2-karboxylové kyseliny jako modelového příkladu jsem zvolila, jelikož hodnota  $pK$  již na katedře biofyziky a fyzikální chemie stanovena byla, měla jsem tudíž možnost hodnoty porovnat. Zároveň jsem neočekávala během přípravy vzorku a následné potenciometrické titrace žádné větší problémy, což lze také vypožorovat z tabulky i grafu. Výsledná hodnota  $pK = 2,95$  se velmi dobře shoduje s již dříve naměřenou hodnotou 2,96. [36]

#### 4.1.4 LSPJ14

##### Potenciometrie

Výsledky potenciometrické titrace látky LSPJ14 standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného jsou uvedeny v tabulce č. 9. Grafické znázornění závislosti pH na objemu přidaného hydroxidu vyjadřuje graf titrační křivky č. 5. Tabulka č. 10 shrnuje výsledky  $pK$  ze všech tří měření.

$$C'_{\text{OH}} = 0,0098 \text{ mol/l}$$

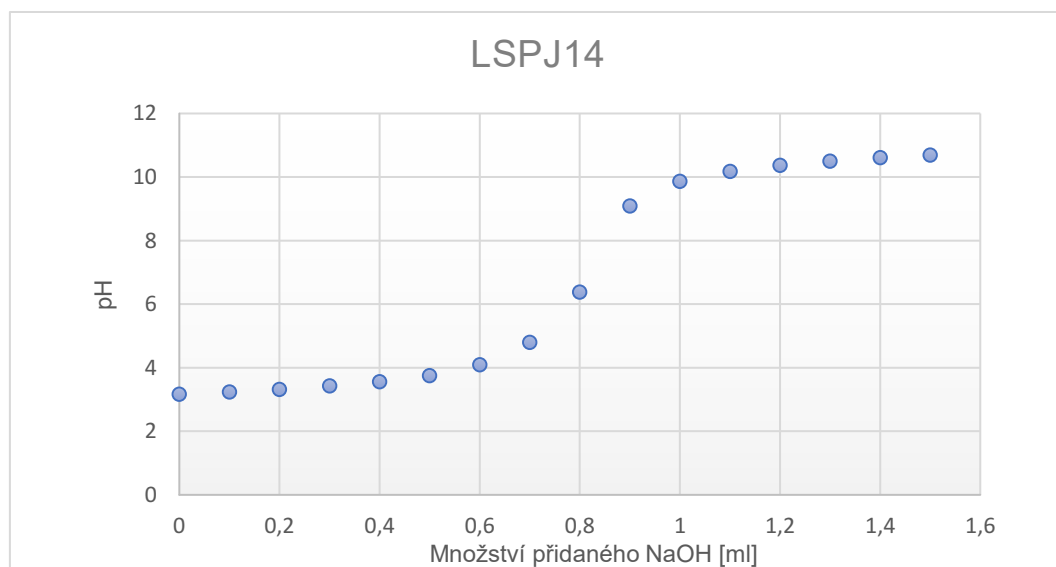
$$A = 10 \text{ ml}$$

$$C'_{\text{HA}} = 0,0012 \text{ mol/l}$$

$$X = 10 + B \text{ [ml]}$$

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	3,16	0,00125	0,00000	0,00125	#DĚLENÍ_NULOU!	0,000692	3,0660
0,10	3,23	0,00124	0,00010	0,00114	4,2999	0,000589	3,1348
0,20	3,31	0,00122	0,00019	0,00103	4,0402	0,00049	3,2108
0,30	3,42	0,00121	0,00029	0,00093	3,9317	0,00038	3,3348
0,40	3,56	0,00120	0,00038	0,00082	3,8997	0,000275	3,4848
0,50	3,75	0,00119	0,00047	0,00072	3,9401	0,000178	3,6772
0,60	4,09	0,00118	0,00055	0,00062	4,1409	8,13E-05	4,0208
0,70	4,79	0,00117	0,00064	0,00053	4,7042	1,62E-05	4,6798
0,80	6,38	0,00116	0,00073	0,00043	6,1532	4,17E-07	6,1525
0,90	9,09	0,00115	0,00081	0,00034	8,7093	8,13E-10	8,7093
1,00	9,86	0,00114	0,00089	0,00024	9,2986	1,38E-10	9,2986
1,10	10,17	0,00113	0,00097	0,00015	9,3705	6,76E-11	9,3705
1,20	10,36	0,00112	0,00105	0,00007	9,1532	4,37E-11	9,1532
1,30	10,50	0,00111	0,00113	0,00002	#ČÍSLO!	3,16E-11	#ČÍSLO!
1,40	10,61	0,00110	0,00120	0,00011	#ČÍSLO!	2,45E-11	#ČÍSLO!
1,50	10,69	0,00109	0,00128	0,00019	#ČÍSLO!	2,04E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č. 9: Výsledky potenciometrické titrace látky LSPJ14



Graf č. 5: Titrační křivka látky LSPJ14

Měření č. 1	Měření č. 2	Měření č. 3	Průměr
2,9769	2,9416	3,066	<b>2,99</b>
3,0555	3,0099	3,1348	<b>3,07</b>
3,1865	3,0555	3,2108	<b>3,15</b>
3,3635	3,2117	3,3348	<b>3,30</b>
3,5733	3,3635	3,4848	<b>3,47</b>
3,9006	3,6067	3,6772	<b>3,73</b>
4,2791	3,9269	4,0208	<b>4,08</b>
5,6972	5,0923	4,6798	<b>5,16</b>
8,7125	7,2689	6,1525	<b>7,38</b>
9,1727	9,0925	8,7093	<b>8,99</b>
8,7825	9,2227	9,2986	<b>9,10</b>

Tabulka č. 10: Hodnoty  $pK_2$  látky LSPJ14 a jejich průměr

Z naměřených hodnot  $pK_2$  jsem se rozhodla vypočítat aritmetický průměr z 6 výsledků (v tabulce č.10 zvýrazněny šedě) a vyšlo mi, že:

$$pK = 3,29 (\sigma = 0,25)$$

#### Spektrofotometrie

Absorbance jsem naměřila při vlnové délce 320 nm. Po zhlédnutí tabulky č. 11 je však patrné, že jsem se nedobrala žádných racionálních výsledků. Grafické znázornění zde nepřikládám.

Číslo měření	pH	$A_{HI}$	$A_{I-}$	A	pK
1	8,72	2,1875	1,4023	2,0564	8,02
2	8,98	2,1875	1,4023	2,0959	8,10
3	10,35	2,1875	1,4023	2,0116	9,81
4	11,00	2,1875	1,4023	1,9663	10,59
5	11,21	2,1875	1,4023	1,8628	11,06
6	11,47	2,1875	1,4023	1,8350	11,38
7	11,70	2,1875	1,4023	1,6005	12,17

Tabulka č. 11: Výpočet pK látky LSPJ14 spektrofotometrickou metodou

#### Zhodnocení výsledků

Tento vzorek je, podobně jako ostatní látky z řady LSPJ, derivátem pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Potenciometricky zjištěná hodnota pK (3,29) struktury látky odpovídá. Když se podíváme na vzorce látek LSPJ, zjistíme, že se liší pouze typem a polohou substituentu na sousedním fenylu pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Jelikož se nemění substituce v okolí karboxylové funkční skupiny, lze předpokládat, že hodnoty  $pK_a$  budou obdobné (což dokazují následující výsledky). Výslednou hodnotu jsem porovнала s hodnotou pK vypočítanou programem ChemDraw Ultra 12.0, podle kterého se rovná  $pK_a$  této látky 2,23.

Spektrofotometrickým měřením jsem se nedobrala k použitelným výsledkům.

#### 4.1.5 LSPJ15

##### Potenciometrie

Výsledky potenciometrické titrace látky LSPJ15 standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného jsou uvedeny v tabulce č. 12. Grafické znázornění závislosti pH na objemu přidaného hydroxidu vyjadřuje graf titrační křivky č. 6. Tabulka č. 13 shrnuje výsledky pK ze všech tří měření.

$$C'_{\text{OH}} = 0,0129$$

$$A = 10 \text{ ml}$$

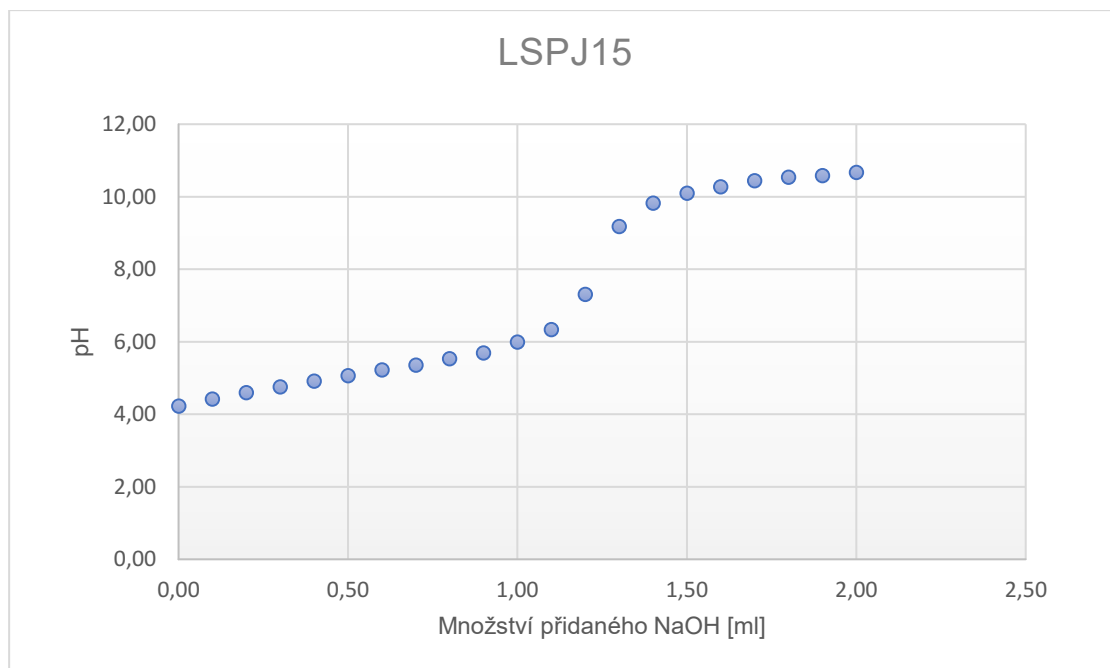
$$C'_{\text{HA}} = 0,0013$$

$$X = 10 + B \text{ [ml]}$$

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	4,22	0,00129	0,00000	0,00129	#DĚLENÍ_NULOU!	6,03E-05	<b>5,5307</b>
0,10	4,42	0,00128	0,00010	0,00118	<b>5,5075</b>	3,8E-05	<b>5,3493</b>
0,20	4,59	0,00127	0,00019	0,00108	<b>5,3394</b>	2,57E-05	<b>5,2742</b>
0,30	4,75	0,00125	0,00028	0,00097	<b>5,2829</b>	1,78E-05	<b>5,2485</b>
0,40	4,91	0,00124	0,00038	0,00087	<b>5,2733</b>	1,23E-05	<b>5,2530</b>
0,50	5,06	0,00123	0,00047	0,00077	<b>5,2766</b>	8,71E-06	<b>5,2635</b>
0,60	5,22	0,00122	0,00055	0,00067	<b>5,3011</b>	6,03E-06	<b>5,2925</b>
0,70	5,35	0,00121	0,00064	0,00057	<b>5,2996</b>	4,47E-06	<b>5,2931</b>
0,80	5,53	0,00120	0,00072	0,00047	<b>5,3456</b>	2,95E-06	<b>5,3411</b>
0,90	5,69	0,00119	0,00081	0,00038	<b>5,3623</b>	2,04E-06	<b>5,3589</b>
1,00	5,99	0,00117	0,00089	0,00029	<b>5,4995</b>	1,02E-06	<b>5,4975</b>
1,10	6,33	0,00116	0,00097	0,00020	<b>5,6374</b>	4,68E-07	<b>5,6361</b>
1,20	7,30	0,00115	0,00105	0,00011	<b>6,3115</b>	5,01E-08	<b>6,3113</b>
1,30	9,18	0,00114	0,00112	0,00002	<b>7,4321</b>	6,61E-10	<b>7,4321</b>
1,40	9,82	0,00113	0,00120	-0,00007	#ČÍSLO!	1,51E-10	#ČÍSLO!
1,50	10,09	0,00112	0,00127	-0,00015	#ČÍSLO!	8,13E-11	#ČÍSLO!
1,60	10,27	0,00111	0,00135	-0,00023	#ČÍSLO!	5,37E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č. 12: Výsledky potenciometrické titrace látky LSPJ15





Graf č. 6: Titrační křivka látky LSPJ15

Měření č. 1	Měření č. 2	Měření č. 3	Průměr
5,5307	5,7192	5,7396	<b>5,66</b>
5,3493	5,4456	5,4705	<b>5,42</b>
5,2742	5,3412	5,3412	<b>5,32</b>
5,2485	5,3508	5,3718	<b>5,32</b>
5,253	5,3591	5,3591	<b>5,32</b>
5,2635	5,3718	5,3718	<b>5,34</b>
5,2925	5,3884	5,3783	<b>5,35</b>
5,2931	5,5004	5,4701	<b>5,42</b>
5,3411	5,5942	5,5942	<b>5,51</b>
5,3589	5,8489	5,7787	<b>5,66</b>
5,4975	6,2834	6,0132	<b>5,93</b>
5,6361	7,3372	6,7471	<b>6,57</b>
6,3113	5,7192	5,7396	<b>5,92</b>
7,4321	5,4456	5,4705	<b>6,12</b>

Tabulka č. 13: Hodnoty  $pK_2$  látky LSPJ15 a jejich průměr

Hodnoty  $pK_2$  jsou si v tomto měření velice blízké, jak lze také vyčíst z tabulky č. 13. Do aritmetického průměru jsem zařadila 10 výsledných hodnot, které jsou v tabulce č. 13 označeny šedě.

$$pK = 5,43 \quad (\sigma = 0,13)$$

### Spektrofotometrie

Spektrofotometrické měření tohoto vzorku nevedlo k výsledku. Absorpční křivky látky LSPJ15 se neprotínaly v žádném izosbestickém bodě. Výpočet ani grafické znázornění zde z toho důvodu neuvádím.

### Zhodnocení výsledků

Potenciometrická titrace látky LSPJ15 mi poskytla relativně přesný výsledek  $pK = 5,43$ , který se ovšem velice liší od hodnoty 2,23 udávané počítačovým programem ChemDraw Ultra 12.0. Vyšší experimentální hodnotu  $pK$  lze zdůvodnit např. sterickým stíněním kyselých karboxylových funkčních skupin navázaných na pyrazinu. Na vedlejším benzenovém jádře je zároveň připojena terciální aminoskupina, což také může přispět k vyšším hodnotám  $pK$ .

Spektrofotometrické stanovení disociační konstanty nevedlo k výsledku.

## 4.1.6 LSPJ16

### Potenciometrie

Výsledky potenciometrické titrace látky LSPJ16 standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného jsou uvedeny v tabulce č. 14. Grafické znázornění závislosti pH na objemu přidaného hydroxidu vyjadřuje graf titrační křivky č. 7. Tabulka č. 15 shrnuje výsledky  $pK$  ze všech tří měření.

$$C'_{OH} = 0,0098 \text{ mol/l}$$

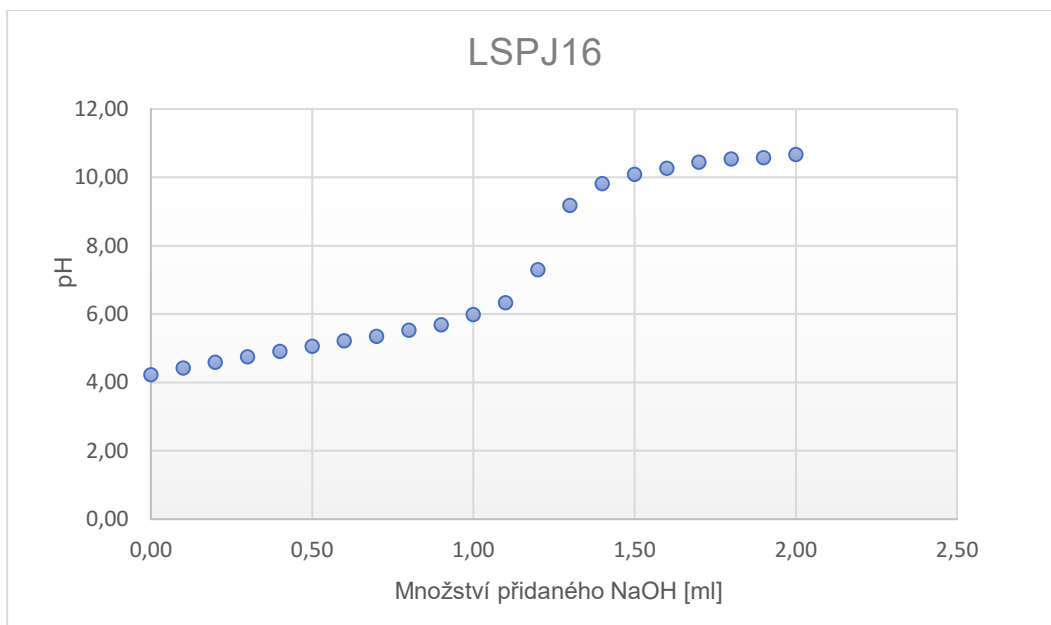
$$A = 10 \text{ ml}$$

$$C'_{HA} = 0,0010 \text{ mol/l}$$

$$X = 10 + B \text{ [ml]}$$

B (NaOH [ml])	pH	$C_{HA}$	$C_{OH}$	HA	$pK_1$	$H^+$	$pK_2$
0,00	3,12	0,00095	0,00000	0,00095	#DĚLENÍ_NULOU!	0,000759	<b>2,5238</b>
0,10	3,18	0,00094	0,00010	0,00084	<b>4,1196</b>	0,000661	<b>2,5645</b>
0,20	3,27	0,00093	0,00019	0,00074	<b>3,8556</b>	0,000537	<b>2,7146</b>
0,30	3,36	0,00092	0,00029	0,00064	<b>3,7091</b>	0,000437	<b>2,8050</b>
0,40	3,51	0,00091	0,00038	0,00054	<b>3,6640</b>	0,000309	<b>3,0322</b>
0,50	3,72	0,00091	0,00047	0,00044	<b>3,6933</b>	0,000191	<b>3,2973</b>
0,60	4,08	0,00090	0,00055	0,00034	<b>3,8703</b>	8,32E-05	<b>3,6887</b>
0,70	5,17	0,00089	0,00064	0,00025	<b>4,7566</b>	6,76E-06	<b>4,7400</b>
0,80	6,20	0,00088	0,00073	0,00015	<b>5,5279</b>	6,31E-07	<b>5,5257</b>
0,90	8,02	0,00087	0,00081	0,00006	<b>6,9121</b>	9,55E-09	<b>6,9121</b>
1,00	9,67	0,00086	0,00089	-0,00003	#ČÍSLO!	2,14E-10	#ČÍSLO!
1,10	10,01	0,00086	0,00097	-0,00011	#ČÍSLO!	9,77E-11	#ČÍSLO!
1,20	10,21	0,00085	0,00105	-0,00020	#ČÍSLO!	6,17E-11	#ČÍSLO!
1,30	10,42	0,00084	0,00113	-0,00029	#ČÍSLO!	3,8E-11	#ČÍSLO!
1,40	10,40	0,00083	0,00120	-0,00037	#ČÍSLO!	3,98E-11	#ČÍSLO!
1,50	10,50	0,00083	0,00128	-0,00045	#ČÍSLO!	3,16E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č. 14: Výsledky potenciometrické titrace látky LSPJ16



*Graf č. 7: Titrační křivka látky LSPJ16*

Měření č. 1	Měření č. 2	Měření č. 3	Průměr
2,202	2,5238	2,5812	<b>2,44</b>
2,3045	2,5645	2,6671	<b>2,51</b>
2,4237	2,7146	2,7981	<b>2,65</b>
2,6372	2,8050	2,9117	<b>2,79</b>
2,8035	3,0322	3,0868	<b>2,97</b>
3,0671	3,2973	3,3377	<b>3,23</b>
3,2879	3,6887	3,7175	<b>3,57</b>
3,7601	4,7400	4,8434	<b>4,45</b>
5,0341	5,5257	5,6061	<b>5,39</b>
6,2048	6,9121	7,0621	<b>6,73</b>

*Tabulka č. 15: Hodnoty  $pK_2$  látky LSPJ16 a jejich průměr*

Při hodnocení výsledného  $pK$  látky LSPJ16 jsem se rozhodla brát v úvahu 5 šedě zvýrazněných hodnot. Průměrná hodnota  $pK$  je:

$$pK = 3,04 (\sigma = 0,33)$$

### Spektrofotometrie

Látku LSPJ16 jsem měřila dvakrát, jelikož první měření bylo zcela neprůkazné (absence izosbestického bodu), druhý pokus již vyšel lépe. Jak je však znázorněno v tabulce č. 16, hodnoty absorbancí naměřené při vlnové délce 389 nm neposkytují racionální výsledek. Během měření mohlo dojít k nepřesnému ředění roztoků, což by pak mělo za následek tyto nejasné hodnoty.

Číslo měření	pH	A <sub>H+</sub>	A <sub>I-</sub>	A	pK
1	8,30	0,035593	0,35799	0,10602	8,85
2	8,83	0,035593	0,35799	0,17532	8,95
3	9,67	0,035593	0,35799	0,31200	8,89
4	10,04	0,035593	0,35799	0,29931	9,39
5	11,31	0,035593	0,35799	0,29705	10,68

Tabulka č. 16: Výpočet pK látky LSPJ16 spektrofotometrickou metodou

### Zhodnocení výsledků

Již ze struktury vzorce látky LSPJ16 lze usoudit, že bude mít o něco kyselější charakter než látka předchozí. Dimethylaminovou skupinu na fenylu předchozí látky nahradil chlor, který na rozdíl od dimethylaminové skupiny elektrony odtahuje. Výsledky potenciometrické titrace tyto úvahy potvrdily. Hodnota pK látky LSJ16 je 3,04. Hodnota vypočítaná programem ChemDraw Ultra 12.0 je o něco nižší, tedy 2,23.

Spektrofotometrická metoda neposkytla použitelné výsledky.

### 4.1.7 LSPJ17

#### Potenciometrie

Výsledky potenciometrické titrace látky LSPJ17 standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného jsou uvedeny v tabulce č. 17. Grafické znázornění závislosti pH na objemu přidaného hydroxidu vyjadřuje graf titrační křivky č. 8. Tabulka č. 18 shrnuje výsledky pK všech tří měření.

$$C'_{\text{OH}} = 0,0098 \text{ mol/l}$$

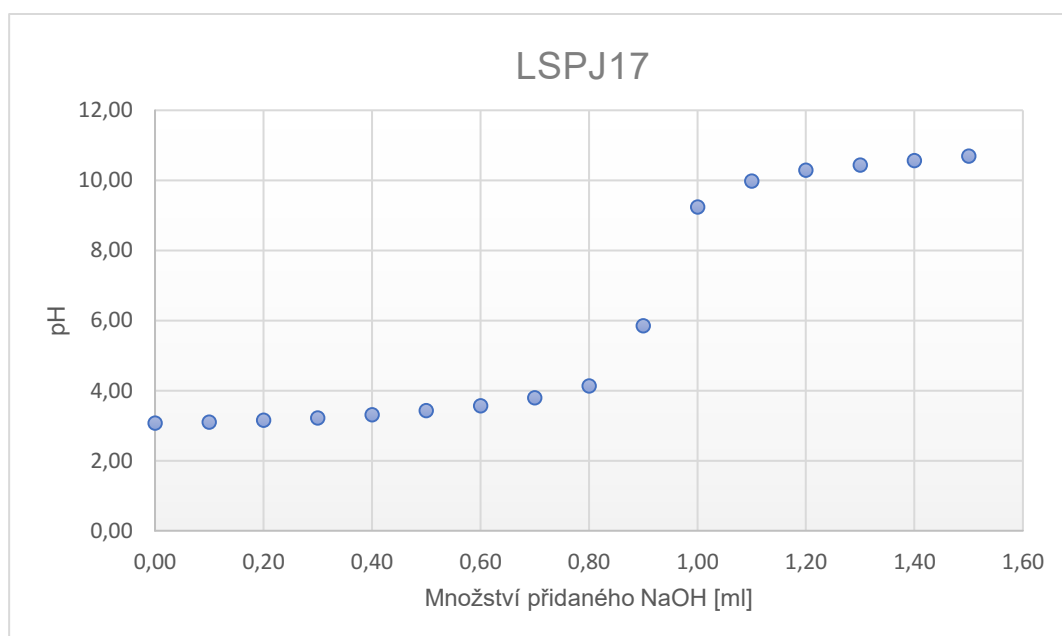
$$A = 10 \text{ ml}$$

$$C'_{\text{HA}} = 0,0012 \text{ mol/l}$$

$$X = 10 + B \text{ [ml]}$$

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	3,07	0,00115	0,00000	0,00115	#DĚLENÍ_NULOU!	0,000851	2,6133
0,10	3,10	0,00114	0,00010	0,00104	4,1302	0,000794	2,5405
0,20	3,16	0,00113	0,00019	0,00093	3,8466	0,000692	2,5974
0,30	3,22	0,00112	0,00029	0,00083	3,6834	0,000603	2,6277
0,40	3,31	0,00110	0,00038	0,00073	3,5955	0,00049	2,7480
0,50	3,43	0,00109	0,00047	0,00063	3,5584	0,000372	2,9142
0,60	3,57	0,00108	0,00055	0,00053	3,5492	0,000269	3,0685
0,70	3,80	0,00107	0,00064	0,00043	3,6288	0,000158	3,3345
0,80	4,13	0,00106	0,00073	0,00034	3,7974	7,41E-05	3,6474
0,90	5,85	0,00105	0,00081	0,00024	5,3302	1,41E-06	5,3270
1,00	9,24	0,00104	0,00089	0,00015	8,4754	5,75E-10	8,4754
1,10	9,98	0,00103	0,00097	0,00006	8,7956	1,05E-10	8,7956
1,20	10,29	0,00103	0,00105	-0,00002	#ČÍSLO!	5,13E-11	#ČÍSLO!
1,30	10,44	0,00102	0,00113	-0,00011	#ČÍSLO!	3,63E-11	#ČÍSLO!
1,40	10,57	0,00101	0,00120	-0,00020	#ČÍSLO!	2,69E-11	#ČÍSLO!
1,50	10,69	0,00100	0,00128	-0,00028	#ČÍSLO!	2,04E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č. 17: Výsledky potenciometrické titrace látky LSPJ17



Graf č. 8: Titrační křivka látky LSPJ17

Měření č. 1	Měření č. 2	Měření č. 3	Průměr
2,3455	2,4844	2,6133	2,48
2,323	2,3230	2,5405	2,40
2,3318	2,3318	2,5974	2,42
2,4844	2,1952	2,6277	2,44
2,552	2,6903	2,7480	2,66
2,7169	2,7909	2,9142	2,81
2,9263	2,8974	3,0685	2,96
3,2117	3,1717	3,3345	3,24
3,8304	4,0201	3,6474	3,83
5,58	5,0768	5,3270	5,33

Tabulka č. 18: Hodnoty  $pK_2$  látky LSPJ17 a jejich průměr

Hodnoty  $pK_2$ , které jsem se rozhodla brát v úvahu a započítat je do konečného průměru se pohybují v rozmezí od 2,5 do 3,0 (zvýrazněno šedě). Výsledná hodnota pak je:

$$pK = 2,60 (\sigma = 0,21)$$

#### Spektrofotometrie

Spektrofotometrické měření tohoto vzorku nebylo možné vyhodnotit. Absorpční křivky látky LSPJ17 se neprotínaly v izosbestickém bodě. Výpočet ani grafické znázornění zde nepříkládám.

#### Zhodnocení výsledků

Po zhlédnutí vzorce látky LSPJ17 jsem usoudila, že se bude pravděpodobně jednat o mírně kyselější látku, než byla předchozí (LSPJ16), což mi potvrdila i experimentálně zjištěná hodnota  $pK = 2,60$ . Toto malé zvýšení kyselosti lze zdůvodnit záměnou chloru za elektronegativnější fluor umístěný v para poloze na fenylu. Jelikož je substituce provedena v relativně vzdálené poloze od hlavní funkční skupiny, je její vliv obecně malý. Hodnota látky LSPJ17 vypočítaná programem ChemDraw Ultra 12.0 je 2,23.

Spektrofotometrické stanovení disociační konstanty úspěšné nebylo.

### 4.1.8 LSPJ18

#### Potenciometrie

Výsledky potenciometrické titrace látky LSPJ18 standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného jsou uvedeny v tabulce č. 19. Grafické znázornění závislosti pH na objemu přidaného hydroxidu vyjadřuje graf titrační křivky č. 9. Tabulka č. 20 shrnuje výsledky  $pK$  všech tří měření.

$$C'_{\text{OH}} = 0,0098 \text{ mol/l}$$

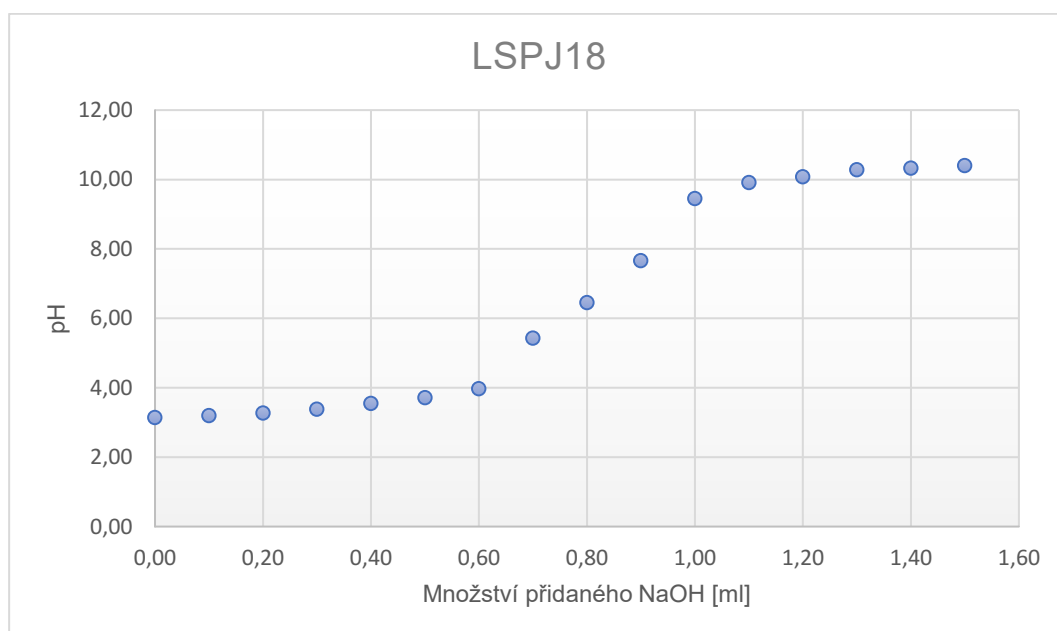
$$A = 10 \text{ ml}$$

$$C'_{\text{HA}} = 0,0010 \text{ mol/l}$$

$$X = 10 + B \text{ [ml]}$$

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	3,14	0,00094	0,00000	0,00094	#DĚLENÍ_NULO!	0,000724	2,6072
0,10	3,20	0,00093	0,00010	0,00083	4,1325	0,000631	2,6381
0,20	3,27	0,00092	0,00019	0,00073	3,8475	0,000537	2,6843
0,30	3,38	0,00091	0,00029	0,00062	3,7198	0,000417	2,8500
0,40	3,55	0,00090	0,00038	0,00052	3,6930	0,000282	3,1152
0,50	3,71	0,00089	0,00047	0,00043	3,6700	0,000195	3,2522
0,60	3,97	0,00088	0,00055	0,00033	3,7433	0,000107	3,4955
0,70	5,43	0,00088	0,00064	0,00023	4,9931	3,72E-06	4,9837
0,80	6,45	0,00087	0,00073	0,00014	5,7400	3,55E-07	5,7387
0,90	7,66	0,00086	0,00081	0,00005	6,4539	2,19E-08	6,4537
1,00	9,45	0,00085	0,00089	-0,00004	#ČÍSLO!	3,55E-10	#ČÍSLO!
1,10	9,91	0,00084	0,00097	-0,00013	#ČÍSLO!	1,23E-10	#ČÍSLO!
1,20	10,08	0,00084	0,00105	-0,00021	#ČÍSLO!	8,32E-11	#ČÍSLO!
1,30	10,28	0,00083	0,00113	-0,00030	#ČÍSLO!	5,25E-11	#ČÍSLO!
1,40	10,33	0,00082	0,00120	-0,00038	#ČÍSLO!	4,68E-11	#ČÍSLO!
1,50	10,40	0,00081	0,00128	-0,00046	#ČÍSLO!	3,98E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č. 19: Výsledky potenciometrické titrace látky LSPJ18



Graf č. 9: Titrační křivka látky LSPJ18

Měření č. 1	Měření č. 2	Měření č. 3	Průměr
2,7342	2,6072	2,6597	<b>2,67</b>
2,7544	2,6381	2,6381	<b>2,68</b>
2,9022	2,6843	2,7289	<b>2,77</b>
3,0085	2,8500	2,8854	<b>2,91</b>
2,9736	3,1152	3,0620	<b>3,05</b>
3,2403	3,2522	3,2943	<b>3,26</b>
3,5067	3,4955	3,6513	<b>3,55</b>
3,8674	4,9837	4,7055	<b>4,52</b>
5,0863	5,7387	5,7588	<b>5,53</b>
5,6540	6,4537	6,2435	<b>6,12</b>

Tabulka č. 20: Hodnoty  $pK_2$  látky LSPJ18 a jejich průměr

Hodnoty  $pK_2$  se během přidávání hydroxidu sodného postupně zvyšovaly, nicméně velký rozdíl hodnot byl zaznamenán až při vyšších koncentracích hydroxidu. Z toho důvodu jsem zahrнула do průměru pouze hodnoty  $pK_2$ , které jsou označeny šedě.

$$pK = 2,89 (\sigma = 0,21)$$

#### Spektrofotometrie

Spektrofotometrické měření tohoto vzorku neposkytlo žádné uspokojivé výsledky. Absorpční křivky látky LSPJ18 nevykazovaly izosbestický bod proto zde výpočet ani grafické znázornění nepřikládám.

#### Zhodnocení výsledků

Výpočtem disociační konstanty látky LSPJ18 jsem pomocí potenciometrické titrace získala hodnotu  $pK = 2,89$ . Hodnota  $pK$ , kterou mi poskytl program ChemDraw Ultra 12.0 je 2,23. Po porovnání jsou tyto hodnoty velice podobné.

Spektrofotometrickou metodou se mi bohužel nepodařilo dobrat k žádným výsledkům.

### 4.1.9 2-hydroxychinolin

#### Potenciometrie

Výsledky potenciometrické titrace látky 2-hydroxychinolinu standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného jsou uvedeny v tabulce č. 21. Grafické znázornění závislosti pH na objemu přidaného hydroxidu vyjadřuje graf titrační křivky č. 10. Tabulka č. 22 shrnuje výsledky  $pK$  všech tří měření.



$$C'_{HA} = 0,0010 \text{ mol/l}$$

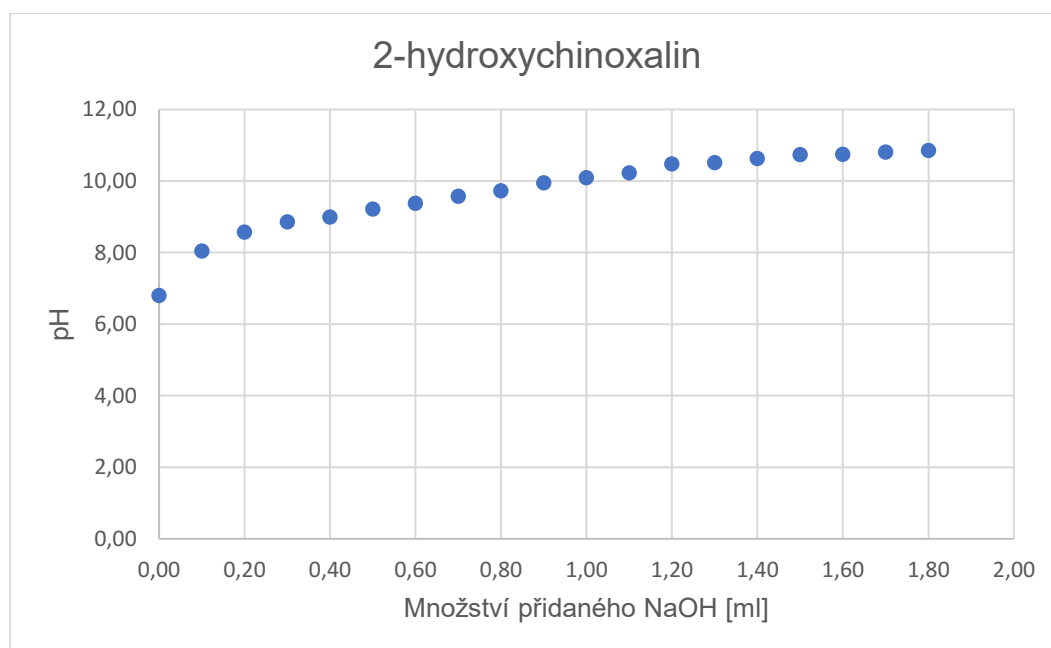
$$A = 10 \text{ ml}$$

$$C'_{OH} = 0,0112 \text{ mol/l}$$

$$X = 10 + B \text{ [ml]}$$

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>A</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	6,80	0,0010	0,0000	0,0010	#DĚLENÍ_NULO!	1,58E-07	10,5935
0,10	8,05	0,0010	0,0001	0,0009	8,9429	8,91E-09	8,9428
0,20	8,58	0,0014	0,0002	0,0012	9,3192	2,63E-09	9,3192
0,30	8,86	0,0010	0,0003	0,0006	9,1474	1,38E-09	9,1474
0,40	9,00	0,0009	0,0004	0,0005	9,0805	1E-09	9,0805
0,50	9,22	0,0009	0,0005	0,0004	9,1024	6,03E-10	9,1024
0,60	9,38	0,0009	0,0006	0,0003	9,0512	4,17E-10	9,0512
0,70	9,58	0,0009	0,0007	0,0002	8,9936	2,63E-10	8,9936
0,80	9,73	0,0009	0,0008	8,43E-05	8,7376	1,86E-10	8,7376
0,90	9,95	0,0009	0,0009	-1,9E-05	#ČÍSLO!	1,12E-10	#ČÍSLO!
1,00	10,10	0,0009	0,0010	-0,0001	#ČÍSLO!	7,94E-11	#ČÍSLO!
1,10	10,23	0,0009	0,0011	-0,0002	#ČÍSLO!	5,89E-11	#ČÍSLO!
1,20	10,48	0,0009	0,0012	-0,0003	#ČÍSLO!	3,31E-11	#ČÍSLO!
1,30	10,52	0,0009	0,0013	-0,0004	#ČÍSLO!	3,02E-11	#ČÍSLO!
1,40	10,63	0,0009	0,0014	-0,0005	#ČÍSLO!	2,34E-11	#ČÍSLO!
1,50	10,74	0,0009	0,0015	-0,0006	#ČÍSLO!	1,82E-11	#ČÍSLO!
1,60	10,75	0,0008	0,0015	-0,0007	#ČÍSLO!	1,78E-11	#ČÍSLO!
1,70	10,81	0,0008	0,0016	-0,0008	#ČÍSLO!	1,55E-11	#ČÍSLO!
1,80	10,86	0,0008	0,0017	-0,0009	#ČÍSLO!	1,38E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č. 21: Výsledky potenciometrické titrace 2-hydroxychinoxalinu



Graf č. 10: Titrční křivka 2-hydroxychinoxalinu

Měření č. 1	Měření č. 2	Měření č. 3	Průměr
10,1101	10,5935	10,3935	<b>10,37</b>
9,0335	8,9428	8,9828	<b>8,99</b>
8,9792	9,3192	9,2792	<b>9,19</b>
9,1039	9,1474	9,1774	<b>9,14</b>
9,1240	9,0805	9,1005	<b>9,10</b>
9,0990	9,1024	9,0724	<b>9,09</b>
9,1181	9,0512	9,1412	<b>9,10</b>
9,0850	8,9936	8,8536	<b>8,98</b>
9,1053	8,7376	8,7876	<b>8,88</b>

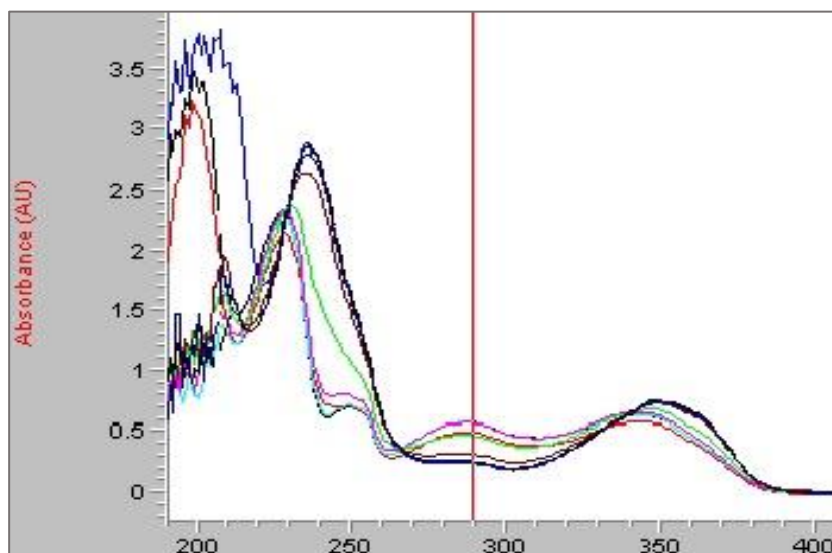
Tabulka č. 22: Hodnoty  $pK_2$  2-hydroxychinoxalinu a jejich průměr

Po vypočítání aritmetického průměru z osmi šedě označených hodnot z tabulky č. 22 jsem získala výsledek:

$$pK = 9,06 (\sigma = 0,10)$$

#### Spektrofotometrie

Graf č. 11 znázorňuje absorpční křivky 2-hydroxychinoxalinu při různých hodnotách pH. Absorbance využitá pro výpočet jsem naměřila při vlnové délce 289 nm. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 23.



Graf č. 11: Absorpční křivky 2-hydroxychinoxalinu

Číslo měření	pH	A <sub>Hl</sub>	A <sub>I-</sub>	A	pK
1	7,96	0,57245	0,2411	0,56936	9,99
2	8,86	0,57245	0,2411	0,46759	9,19
3	9,82	0,57245	0,2411	0,31290	9,26
4	10,80	0,57245	0,2411	0,25636	9,48
5	11,65	0,57245	0,2411	0,25555	10,31

Tabulka č. 23: Výpočet pK 2-hydroxychinoxalinu spektrofotometrickou metodou

Po zprůměrování tří šedě označených hodnot pK mi vyšlo, že:

$$pK = 9,31 (\sigma = 0,12)$$

#### Zhodnocení výsledků

Výsledky měření disociační konstanty 2-hydroxychinoxalinu byly velmi uspokojivé. Na základě struktury můžeme usoudit, že se jedná o velmi slabou kyselinu (kyselost dodává dusíkatému heterocyklu hydroxylová skupina). Potenciometrickou titrací jsem získala relativně přesnou hodnotu pK = 9,06, spektrofotometrickou metodou jsem se dobrala výsledku 9,31. Program ChemDraw Ultra 12.0 v tomto případě neposkytl referenční hodnotu pK. Pro porovnání zde uvádím pK fenolu, která je 9,89. [37]

#### 4.1.10 4-hydroxychinazolin

##### Potenciometrie

Výsledky potenciometrické titrace 4-hydroxychinazolinu standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného jsou uvedeny v tabulce č. 24. Grafické znázornění závislosti pH na objemu přidaného hydroxidu vyjadřuje graf titrační křivky č. 12. Tabulka č. 25 shrnuje výsledky pK všech tří měření.

$$C'_{HA} = 0,0014 \text{ mol/l}$$

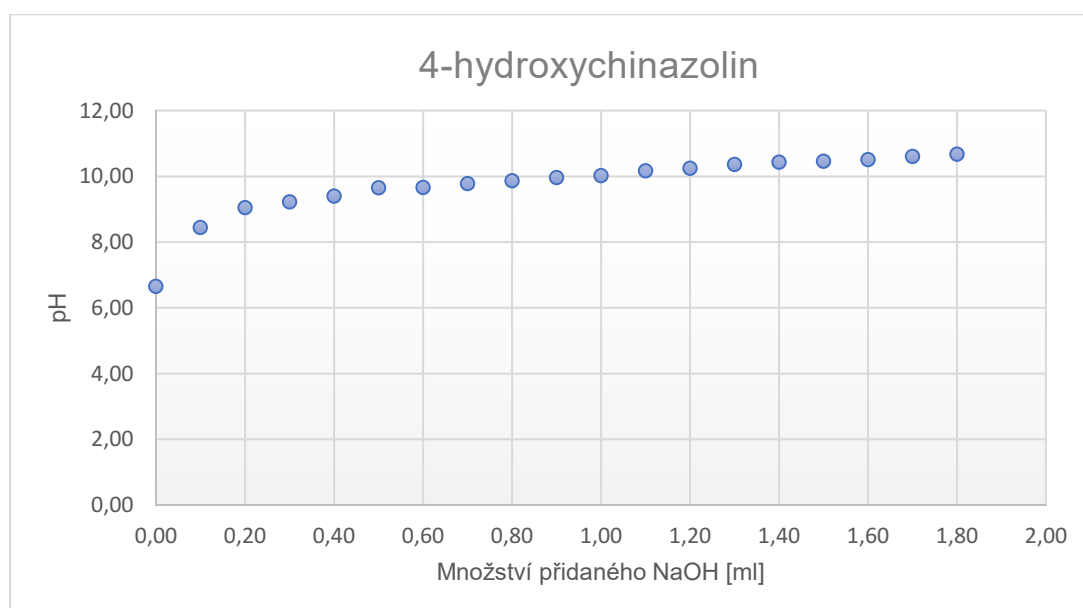
$$A = 10 \text{ ml}$$

$$C'_{OH} = 0,0097 \text{ mol/l}$$

$$X = 10 + B \text{ [ml]}$$

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>A</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	6,65	0,0014	0	0,0014	#####	2,24E-07	10,4574
0,10	8,45	0,0014	9,6069E-05	0,0013	9,5902	3,55E-09	9,5901
0,20	9,05	0,0014	0,0002	0,0012	9,8610	8,91E-10	9,8610
0,30	9,23	0,0014	0,0003	0,0011	9,8251	5,89E-10	9,8251
0,40	9,40	0,0014	0,0004	0,0010	9,8317	3,98E-10	9,8317
0,50	9,65	0,0014	0,0005	0,0009	9,9426	2,24E-10	9,9426
0,60	9,66	0,0014	0,0005	0,0008	9,8268	2,19E-10	9,8268
0,70	9,78	0,0013	0,0006	0,0007	9,8275	1,66E-10	9,8275
0,80	9,87	0,0013	0,0007	0,0006	9,8000	1,35E-10	9,8000
0,90	9,97	0,0013	0,0008	0,0005	9,7798	1,07E-10	9,7798
1,00	10,02	0,0013	0,0009	0,0004	9,7020	9,55E-11	9,7020
1,10	10,17	0,0013	0,0010	0,0003	9,7094	6,76E-11	9,7094
1,20	10,25	0,0013	0,0010	0,0002	9,6193	5,62E-11	9,6193
1,30	10,37	0,0013	0,0011	0,0002	9,5134	4,27E-11	9,5134
1,40	10,43	0,0013	0,0012	6,88E-05	9,1916	3,72E-11	9,1916
1,50	10,46	0,0012	0,0013	-1,6E-05	#ČÍSLO!	3,47E-11	#ČÍSLO!
1,60	10,51	0,0012	0,0013	-1E-04	#ČÍSLO!	3,09E-11	#ČÍSLO!
1,70	10,61	0,0012	0,0014	-0,00018	#ČÍSLO!	2,45E-11	#ČÍSLO!
1,80	10,68	0,0012	0,0015	-0,00026	#ČÍSLO!	2,09E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č. 24: Výsledky potenciometrické titrace 4-hydroxychinazolinu



Graf č. 12: Titrační křivka 4-hydroxychinazolinu

Měření č. 1	Měření č. 2	Měření č. 3	Průměr
10,4574	11,1565	10,1994	<b>10,60</b>
9,5901	9,3186	9,4387	<b>9,45</b>
9,8610	9,7410	9,7010	<b>9,77</b>
9,8251	9,6193	9,5134	<b>9,65</b>
9,8317	9,5664	9,5364	<b>9,64</b>
9,9426	9,5776	9,5276	<b>9,68</b>
9,8268	9,5256	9,5256	<b>9,63</b>
9,8275	9,5457	9,4657	<b>9,61</b>
9,8000	9,4139	9,3839	<b>9,53</b>
9,7798	9,3094	9,2794	<b>9,46</b>
9,7020	9,1010	9,0710	<b>9,29</b>
9,7094	8,5129	8,5329	<b>8,92</b>

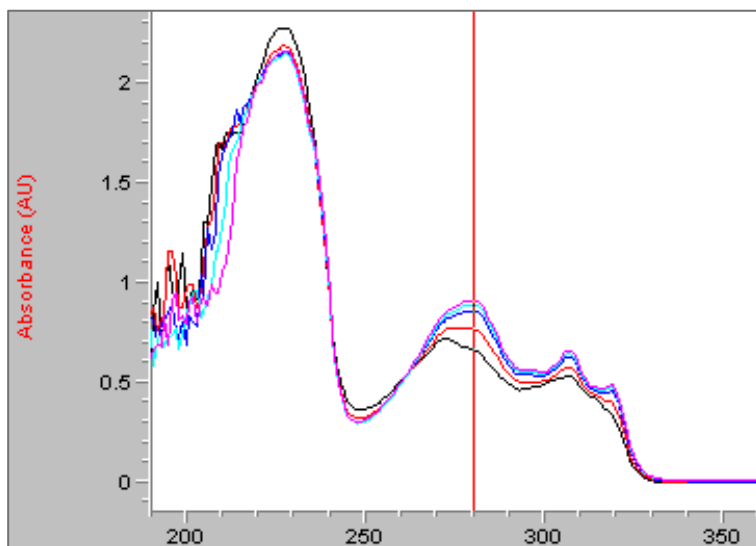
Tabulka č. 25: Hodnoty  $pK_2$  4-hydroxychinazolinu a jejich průměr

Průměrnou hodnotu  $pK$  jsem získala ze sedmi vyznačených hodnot v tabulce. Vyšlo mi, že:

$$pK = 9,65 (\sigma = 0,07)$$

#### Spektrofotometrie

Graf č. 13 zobrazuje absorpční křivky 4-hydroxychinazolinu při různých hodnotách pH. Absorbance jsem naměřila při vlnové délce 289 nm. Tyto hodnoty jsem využila při výpočtu disociační konstanty v tabulce č. 26.



Graf č. 13: Absorpční křivky 4-hydroxychinazolinu

Číslo měření	pH	A <sub>Hl</sub>	A <sub>I-</sub>	A	pK
1	10,41	0,66091	0,90967	0,76612	10,54
2	10,91	0,66091	0,90967	0,85574	10,35
3	11,36	0,66091	0,90967	0,88833	10,33

*Tabulka č. 26: Výpočet pK 4-hydroxychinazolinu spektrofotometrickou metodou*

Po zprůměrování hodnot pK mi vyšlo, že:

$$\mathbf{pK = 10,41} \ (\sigma = 0,10)$$

#### *Zhodnocení výsledků*

Látka se strukturně podobá 2-hydroxychinoxalinu. Rozdíl je pouze v poloze OH skupiny a dusíků na heterocyklickém jádře. Disociační konstanta obou látek by měla být tedy podobná. Potenciometrickým stanovením disociační konstanty jsem získala velice přesnou hodnotu pK 9,65. Spektrofotometrickou metodou jsem se dostala k hodnotě pK = 10,41 (též s relativně dobrou přesností). Pro srovnání bohužel nebylo možné získat hodnotu vygenerovanou programem ChemDraw Ultra 12.0. Uvádím zde jako referenční hodnotu pK fenolu – pK = 9,89. [37]

#### 4.1.11 VN014

##### *Potenciometrie*

Výsledky potenciometrické titrace látky VN014 roztokem kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,0098 mol/l jsou uvedeny v tabulce č. 27. Grafické znázornění závislosti pH na objemu přidané kyseliny chlorovodíkové vyjadřuje graf titrační křivky č. 14. Tabulka č. 28 shrnuje výsledky pK všech tří měření.

$$C'_{HA} = 0,0010 \text{ mol/l}$$

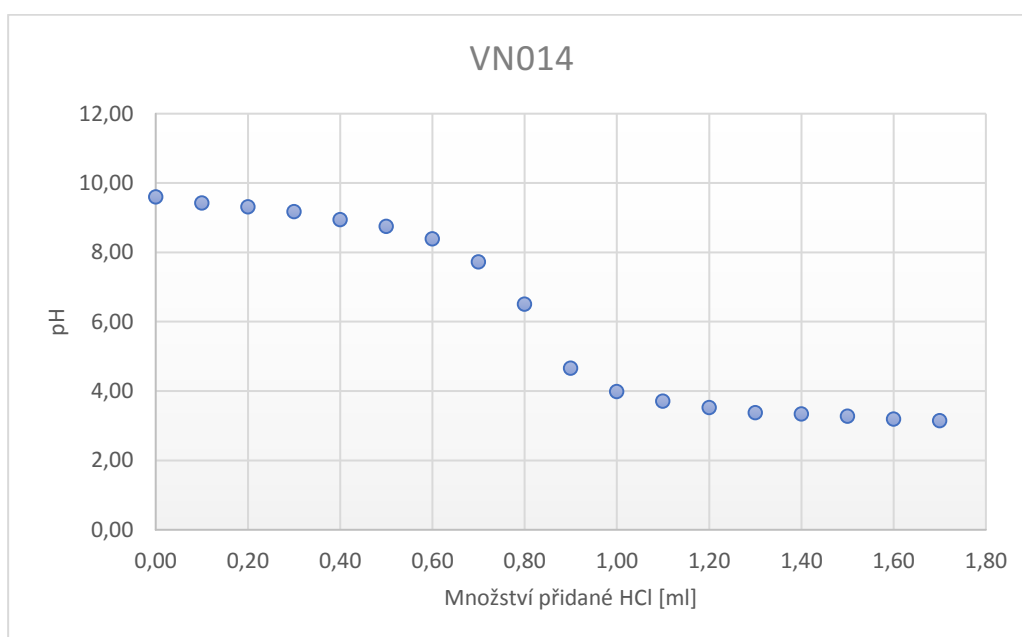
$$A = 10 \text{ ml}$$

$$C'_{OH} = 0,0112 \text{ mol/l}$$

$$X = 10 + B \text{ [ml]}$$

B (HCl [ml])	pH	C <sub>OH</sub>	C <sub>HA</sub>	[OH]	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	9,60	0,0010	0,0000	0,0010	#DĚLENÍ_NULOU!	2,51189E-10	16,1978
0,10	9,42	0,0010	9,7E-05	0,0009	10,3815	3,80189E-10	10,3815
0,20	9,31	0,0014	0,0002	0,0012	10,1160	4,89779E-10	10,1160
0,30	9,17	0,0010	0,0003	0,0007	9,5473	6,76083E-10	9,5473
0,40	8,94	0,0010	0,0004	0,0006	9,1269	1,14815E-09	9,1269
0,50	8,75	0,0009	0,0005	0,0005	8,7630	1,77828E-09	8,7630
0,60	8,39	0,0009	0,0006	0,0004	8,2301	4,0738E-09	8,2301
0,70	7,72	0,0009	0,0006	0,0003	7,3735	1,90546E-08	7,3734
0,80	6,50	0,0009	0,0007	0,0002	5,9297	3,16228E-07	5,9288
0,90	4,66	0,0009	0,0008	0,0001	3,7671	2,18776E-05	3,6525
1,00	3,98	0,0009	0,0009	1,35E-05	2,1613	0,0001	#ČÍSLO!
1,10	3,71	0,0009	0,0010	-7,5E-05	#ČÍSLO!	0,0002	#ČÍSLO!
1,20	3,52	0,0009	0,0011	-0,0002	#ČÍSLO!	0,0003	#ČÍSLO!
1,30	3,37	0,0009	0,0011	-0,0002	#ČÍSLO!	0,0004	#ČÍSLO!
1,40	3,34	0,0009	0,0012	-0,0003	#ČÍSLO!	0,0005	#ČÍSLO!
1,50	3,27	0,0009	0,0013	-0,0004	#ČÍSLO!	0,0005	#ČÍSLO!
1,60	3,19	0,0009	0,0014	-0,0005	#ČÍSLO!	0,0006	#ČÍSLO!

Tabulka č. 27: Výsledky potenciometrické titrace látky VN014



Graf č. 14: Titrační křivka látky VN014

Měření č. 1	Měření č. 2	Měření č. 3	Průměr
16,6014	16,3014	16,1978	<b>16,37</b>
10,5133	10,3733	10,3815	<b>10,42</b>
10,1760	10,1660	10,1160	<b>10,15</b>
9,5738	9,5738	9,5473	<b>9,57</b>
9,1196	9,0996	9,1269	<b>9,12</b>
8,7001	8,6901	8,7630	<b>8,72</b>
7,7688	8,0789	8,2301	<b>8,03</b>
6,0575	6,6081	7,3734	<b>6,68</b>
4,5566	4,5775	5,9288	<b>5,02</b>

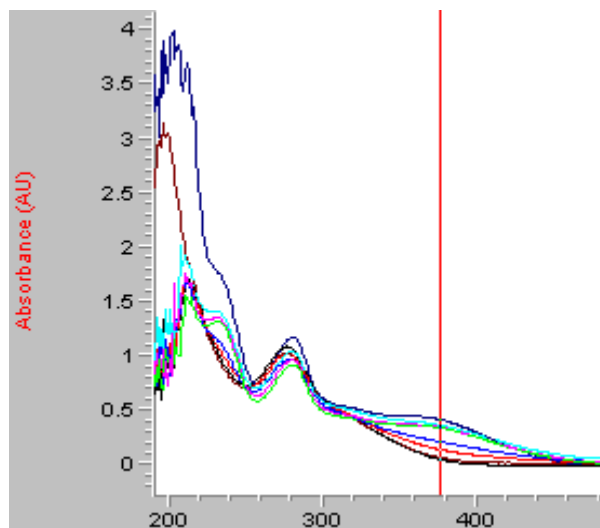
Tabulka č. 28: Hodnoty  $pK_2$  látky VN014 a jejich průměr

Jak je z tabulky č. 28 vidět, hodnoty  $pK_2$  jsou velice různorodé. Rozhodla jsem se vycházet ze čtyř šedě označených hodnot, nicméně pokud se podíváme na směrodatnou odchylku níže, jedná se bohužel o méně přesné stanovení.

$$pK = 9,81 (\sigma = 0,51)$$

#### Spektrofotometrie

Graf č. 15 znázorňuje absorpční křivky látky VN014 při různých hodnotách pH. Pro výpočet jsem použila absorbance naměřené při vlnové délce 376 nm. Hodnoty absorbancí a výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 29.



Graf č. 15: Absorpční křivky látky VN014



Číslo měření	pH	A <sub>Hl</sub>	A <sub>I-</sub>	A	pK
1	8,30	0,047935	0,41385	0,13883	8,78
2	8,83	0,047935	0,41385	0,21035	8,93
3	9,67	0,047935	0,41385	0,36188	8,89
4	10,04	0,047935	0,41385	0,34048	9,44
5	11,31	0,047935	0,41385	0,33772	10,73

Tabulka č. 29: Výpočet pK látky VN014 spektrofotometrickou metodou

Hodnota disociační konstanty látky VN014 je po zprůměrování šedě označených hodnot:

$$pK = 8,87 (\sigma = 0,06)$$

#### Zhodnocení výsledků

Struktura látky VN014 má od pohledu charakter báze (zacyklený terciární dusík na alifatickém řetězci). Odpovídá tomu i chování látky během potenciometrické titrace a spektrofotometrického měření. Látku jsem titrovala kyselinou chlorovodíkovou a její výsledek (9,81) se blížil vygenerované hodnotě programem ChemDraw Ultra 12.0 (9,14).

Pomocí spektrofotometrické metody jsem získala absorpční křivky, z kterých jsem vypočítala hodnotu pK = 8,87. Jedná se o nižší hodnotu, nicméně rozdíl není tak výrazný.

#### 4.1.12 VN034

##### Potenciometrie

Výsledky potenciometrické titrace látky VN034 standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného jsou uvedeny v tabulce č. 30. Grafické znázornění závislosti pH na objemu přidaného hydroxidu vyjadřuje graf titrační křivky č. 16. Tabulka č. 31 shrnuje výsledky pK všech tří měření.

$$C'_{\text{OH}} = 0,01122 \text{ mol/l}$$

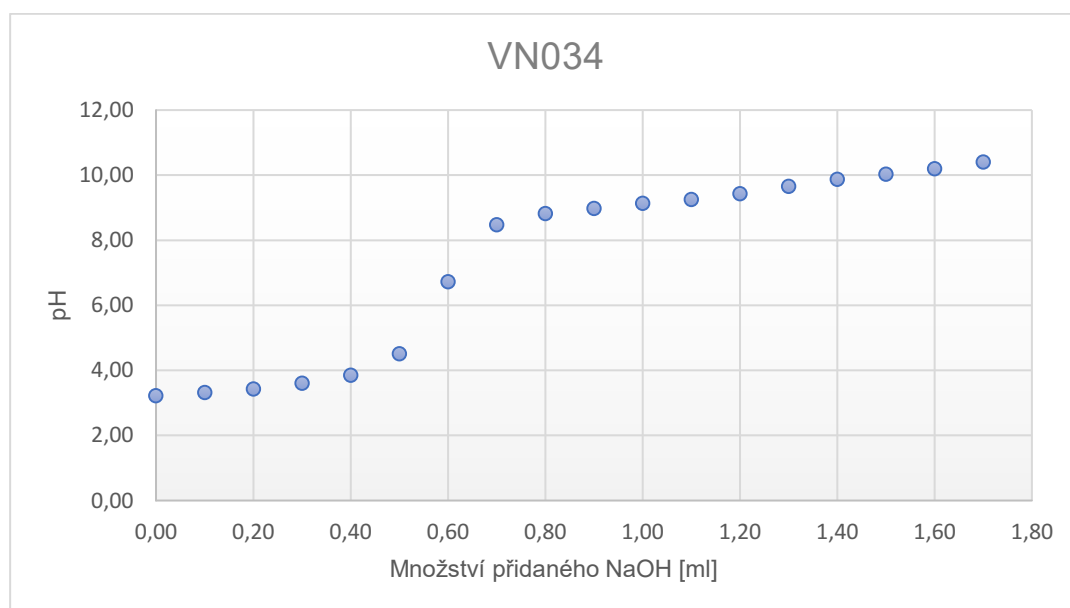
$$A = 10 \text{ ml}$$

$$C'_{\text{HA}} = 0,00098 \text{ mol/l}$$

$$X = 10 + B \text{ [ml]}$$

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	3,22	0,0010	0,0000	0,0010	#DĚLENÍ_NULOU!	0,0006	3,0260
0,10	3,32	0,0010	0,0001	0,0009	4,2124	0,0005	3,1388
0,20	3,43	0,0014	0,0002	0,0012	4,1673	0,0004	3,5771
0,30	3,61	0,0010	0,0003	0,0006	3,8967	0,0002	3,4401
0,40	3,85	0,0010	0,0004	0,0005	3,9297	0,0001	3,6686
0,50	4,51	0,0009	0,0005	0,0004	4,3915	0,0000	4,3327
0,60	6,73	0,0009	0,0006	0,0003	6,3999	1,86E-07	6,3995
0,70	8,48	0,0009	0,0007	0,0002	7,8916	3,31E-09	7,8916
0,80	8,82	0,0009	0,0008	0,0001	7,8232	1,51E-09	7,8232
0,90	8,98	0,0009	0,0009	0,0000	#ČÍSLO!	1,05E-09	#ČÍSLO!
1,00	9,14	0,0009	0,0010	-0,0001	#ČÍSLO!	7,24E-10	#ČÍSLO!
1,10	9,26	0,0009	0,0011	-0,0002	#ČÍSLO!	5,5E-10	#ČÍSLO!
1,20	9,43	0,0009	0,0012	-0,0003	#ČÍSLO!	3,72E-10	#ČÍSLO!
1,30	9,66	0,0009	0,0013	-0,0004	#ČÍSLO!	2,19E-10	#ČÍSLO!
1,40	9,88	0,0009	0,0014	-0,0005	#ČÍSLO!	1,32E-10	#ČÍSLO!
1,50	10,03	0,0009	0,0015	-0,0006	#ČÍSLO!	9,33E-11	#ČÍSLO!
1,60	10,20	0,0009	0,0015	-0,0007	#ČÍSLO!	6,31E-11	#ČÍSLO!
1,70	10,41	0,0008	0,0016	-0,0008	#ČÍSLO!	3,89E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č. 30: Výsledky potenciometrické titrace látky VN034



Graf č. 16: Titrační křivka látky VN034

Měření č. 1	Měření č. 2	Měření č. 3	Průměr
3,0260	3,3001	3,3001	<b>3,21</b>
3,1388	3,3077	3,3077	<b>3,25</b>
3,5771	3,6982	3,6982	<b>3,66</b>
3,4401	3,6015	3,6015	<b>3,55</b>
3,6686	3,9328	3,9328	<b>3,84</b>
4,3327	5,3446	5,3446	<b>5,01</b>
6,3995	7,0252	7,0252	<b>6,82</b>
7,8916	8,2359	8,2359	<b>8,12</b>
7,8232	8,2446	8,2446	<b>8,10</b>

Tabulka č. 31: Hodnoty  $pK_2$  látky VN034 a jejich průměr

Pro výpočet průměrné hodnoty  $pK_2$  jsem se rozhodla brát v úvahu pět hodnot zvýrazněných v tabulce č. 31 šedě. Průměrná hodnota je:

$$pK = 3,50 (\sigma = 0,24)$$

#### Spektrofotometrie

Absorpční křivky vzorku VN034 v neutrálním, kyselém a zásaditém prostředí byly zcela totožné. Změna pH se v hodnotě absorpční nijak neprojevila.

#### Zhodnocení výsledků

Po zhlédnutí vzorce VN034 je evidentní, že samotná látka kyselý charakter nemá. V roztoku se však nacházela ve formě hydrochloridu, který zároveň výhodně zvýšil její rozpustnost. V roztoku tedy došlo k protonizaci bazického dusíku piperidinu a látka se vůči NaOH, kterým byla následně titrována, chovala jako kyselina. Hodnota  $pK = 3,50$  tedy odpovídá deprotonizaci látky VN034. Hodnota  $pK_a$  vygenerovaná programem ChemDraw Ultra 12.0 udává číslo 9,66, to se však vztahuje k látce bez navázaného protonu.

Spektrofotometrické měření nebylo možné použít.

#### 4.1.13 LSPJ11

##### Potenciometrie

Při převádění vzorku LSPJ11 do roztoku jsem zjistila, že tuto látku (ani po zahřátí) nelze rozpustit ve vodě. Přistoupila jsem tedy k přidání malého množství methanolu. Jak již bylo řečeno, je třeba přepočítat zjištěné hodnoty  $pK$  na nulovou koncentraci methanolu v roztoku. Připravila jsem tedy tři roztoky o koncentraci 0,001 mol/l vždy s jiným poměrem methanol/voda, který ale nepřesáhl koncentraci 40 % methanolu v roztoku. S tímto postupem se setkáme i u následujících dvou látek (LSPJ12 a LSPJ13).

Níže jsou uvedeny tabulky (č. 32, 33, 34) všech tří měření popisující průběh potenciometrické titrace látky LSPJ11 standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného. U každé tabulky je

zaznamenán objem methanolu, který byl použit pro přípravu roztoku. Grafy č. 17 a 18 znázorňují extrapolaci naměřených hodnot  $pK$  na 0% koncentraci methanolu.

$C'_{HA} = 0,0010 \text{ mol/l}$  (platné pro všechny tabulky)

$A = 10 \text{ ml}$  (platné pro všechny tabulky)

$C'_{OH} = 0,0097 \text{ mol/l}$  (platné pro všechny tabulky)

$X = 10 + B \text{ [ml]}$  (platné pro všechny tabulky)

B (NaOH [ml])	pH	$C_{HA}$	$C_{OH}$	HA	$pK_1$	$H^+$	$pK_2$
0,00	3,18	0,0010	0,0000	0,0010	#DĚLENÍ_NULOU!	0,0007	2,8656
0,10	3,20	0,0010	0,0001	0,0009	4,1563	0,0006	2,7248
0,20	3,23	0,0010	0,0002	0,0008	3,8344	0,0006	2,5963
0,30	3,28	0,0010	0,0003	0,0007	3,6507	0,0005	2,5276
0,40	3,37	0,0009	0,0004	0,0006	3,5492	0,0004	2,6150
0,50	3,46	0,0009	0,0005	0,0005	3,4638	0,0003	2,6384
0,60	3,54	0,0009	0,0006	0,0004	3,3686	0,0003	2,5404
0,70	3,85	0,0009	0,0006	0,0003	3,4883	0,0001	3,0932
0,80	3,85	0,0009	0,0007	0,0002	3,2573	0,0001	2,5523
0,90	4,18	0,0009	0,0008	9,35E-05	3,2443	6,61E-05	2,6777
1,00	5,10	0,0009	0,0009	3,87E-06	2,7396	7,94E-06	#ČÍSLO!
1,10	6,46	0,0009	0,0010	-8,4E-05	#ČÍSLO!	3,47E-07	#ČÍSLO!
1,20	7,47	0,0009	0,0010	-0,0002	#ČÍSLO!	3,39E-08	#ČÍSLO!
1,30	8,40	0,0009	0,0011	-0,0003	#ČÍSLO!	3,98E-09	#ČÍSLO!
1,40	9,42	0,0009	0,0012	-0,0003	#ČÍSLO!	3,8E-10	#ČÍSLO!
1,50	10,07	0,0009	0,0013	-0,0004	#ČÍSLO!	8,51E-11	#ČÍSLO!

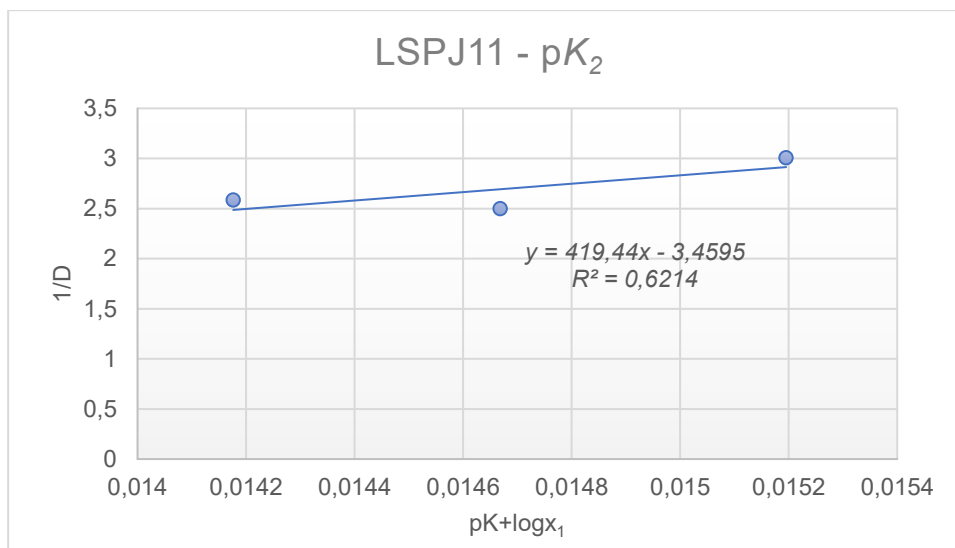
Tabulka č. 32: Potenciometrická titrace látky LSPJ11 (2,0 ml methanolu na 10 ml = 20 %)

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	3,08	0,0010	0,0000	0,0010	#DĚLENÍ_NULOU!	0,0008	2,3251
0,10	3,10	0,0012	0,0001	0,0011	4,1537	0,0008	2,6222
0,20	3,09	0,0012	0,0002	0,0010	3,8025	0,0008	2,3234
0,30	3,20	0,0012	0,0003	0,0009	3,6921	0,0006	2,6360
0,40	3,26	0,0012	0,0004	0,0008	3,5779	0,0005	2,6540
0,50	3,32	0,0011	0,0005	0,0007	3,4853	0,0005	2,6462
0,60	3,40	0,0011	0,0006	0,0006	3,4223	0,0004	2,6827
0,70	3,51	0,0011	0,0006	0,0005	3,3905	0,0003	2,7764
0,80	3,61	0,0011	0,0007	0,0004	3,3420	0,0002	2,7819
0,90	3,74	0,0011	0,0008	0,0003	3,3064	0,0002	2,8040
1,00	4,18	0,0011	0,0009	0,0002	3,5448	6,61E-05	3,3446
1,10	5,61	0,0011	0,0010	0,0001	4,6880	2,45E-06	4,6776
1,20	6,06	0,0011	0,0010	0,0000	4,4810	8,71E-07	4,4667
1,30	7,17	0,0011	0,0011	-0,0001	#ČÍSLO!	6,76E-08	#ČÍSLO!
1,40	9,46	0,0011	0,0012	-0,0001	#ČÍSLO!	3,47E-10	#ČÍSLO!
1,50	9,99	0,0010	0,0013	-0,0002	#ČÍSLO!	1,02E-10	#ČÍSLO!

Tabulka č. 33: Potenciometrická titrace látky LSPJ11 (2,5 ml methanolu na 10 ml = 25 %)

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	3,24	0,0010	0,0000	0,0010	#DĚLENÍ_NULOU!	0,0006	3,1210
0,10	3,25	0,0010	0,0001	0,0009	4,2406	0,0006	3,0155
0,20	3,32	0,0010	0,0002	0,0008	3,9628	0,0005	3,0535
0,30	3,39	0,0010	0,0003	0,0007	3,8042	0,0004	3,0699
0,40	3,47	0,0010	0,0004	0,0006	3,6996	0,0003	3,0910
0,50	3,52	0,0010	0,0005	0,0005	3,5835	0,0003	3,0086
0,60	3,65	0,0010	0,0006	0,0004	3,5519	0,0002	3,0966
0,70	3,84	0,0010	0,0006	0,0003	3,5732	0,0001	3,2494
0,80	3,92	0,0010	0,0007	0,0003	3,4620	0,0001	3,1138
0,90	4,59	0,0010	0,0008	0,0002	3,8879	2,57E-05	3,7982
1,00	5,89	0,0010	0,0009	6,99E-05	4,7859	1,29E-06	4,7772
1,10	7,90	0,0009	0,0010	-1,9E-05	#ČÍSLO!	1,26E-08	#ČÍSLO!
1,20	9,72	0,0009	0,0010	-0,0001	#ČÍSLO!	1,91E-10	#ČÍSLO!
1,30	10,20	0,0009	0,0011	-0,0002	#ČÍSLO!	6,31E-11	#ČÍSLO!
1,40	10,36	0,0009	0,0012	-0,0003	#ČÍSLO!	4,37E-11	#ČÍSLO!
1,50	10,57	0,0009	0,0013	-0,0004	#ČÍSLO!	2,69E-11	#ČÍSLO!
1,60	10,62	0,0009	0,0013	-0,0004	#ČÍSLO!	2,4E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č.34: Potenciometrická titrace látky LSPJ11 (3,0 ml methanolu na 10 ml = 30 %)



Graf č. 17 pro  $pK_1$  a graf č. 18 pro  $pK_2$ : Extrapolace  $pK$  látky LSPJ11 metodou lineární regrese

Po dosažení do rovnice přímky z grafů č. 17 a 18 jsem vypočítala, že:

$$pK_1 = 3,02$$

$$pK_2 = 1,78$$

Stále platí, že hodnota  $pK_2$  je díky započítání aktivity  $H^+$  iontů přesnější. Výslednou hodnotu  $pK_1$  jsem se rozhodla uvést z důvodu vyššího koeficientu determinace ( $R^2 = 1$ ) rovnice regresní přímky.

#### Spektrofotometrie

Spektrofotometrické měření tohoto vzorku neposkytlo jasné výsledky z důvodu absence izosbestického bodu. Výpočet ani grafické znázornění zde nepřikládám.

#### Zhodnocení výsledků

Již od pohledu lze ze vzorce látky LSPJ11 vysledovat, že se jedná o kyselou látku. Oproti ostatním zde zmiňovaným derivátům pyrazin-2-karboxylové kyseliny obsahuje sousední fenyl v meta poloze fluor s výraznými elektronegativními vlastnostmi. Na fenylu je přidán také methyl, který způsobuje snížení rozpustnosti látky ve vodě, proto jsem musela využít odlišný způsob zpracování dat. Uvedla jsem zde výsledky hodnot  $pK$  vycházejících z obou vzorců (č. 14 a 15). Oba výsledky  $pK_a = 3,02$  a  $1,78$  byly blízko hodnotě vygenerované programem ChemDraw Ultra 12.0 ( $pK_a = 2,18$ ). Jelikož všechna měření byla prováděna pouze jednou, lze určitou odchylku očekávat.

Spektrofotometrické měření disociační konstanty nebylo možné vyhodnotit.

#### 4.1.14 LSPJ12

##### Potenciometrie

Látku LSPJ12 (stejně jako předchozí látku LSPJ11) se mi nepodařilo rozpustit ve vodě ani za zvýšené teploty. Při měření látky jsem tedy postupovala obdobně jako u předchozího vzorku. Pro přesnější výsledky jsem zde využila čtyř různých koncentrací methanolu v roztoku. Průběh potenciometrických titrací látky LSPJ12 standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného je uveden v tabulkách č. 35, 36, 37, 38. Graf č. 19 doprovázený rovnicí přímky a koeficientem determinace  $R^2$  znázorňuje extrapolaci hodnoty  $pK$  na nulovou koncentraci methanolu v roztoku.

$C'_{HA} = 0,0009; 0,0010; 0,0011; 0,0010 \text{ mol/l}$  (dle tabulky)  $A = 10 \text{ ml}$  (platné pro všechny tabulky)

$C'_{OH} = 0,0097 \text{ mol/l}$  (platné pro všechny tabulky)  $X = 10 + B \text{ [ml]}$  (platné pro všechny tabulky)

B (NaOH [ml])	pH	$C_{HA}$	$C_{OH}$	HA	$pK_1$	$H^+$	$pK_2$
0,00	3,14	0,0009	0,0000	0,0009	#DĚLENÍ_NULOU!	0,0007	<b>2,5836</b>
0,10	3,19	0,0009	0,0001	0,0008	<b>4,1200</b>	0,0006	<b>2,5621</b>
0,20	3,27	0,0009	0,0002	0,0007	<b>3,8447</b>	0,0005	<b>2,6630</b>
0,30	3,32	0,0009	0,0003	0,0006	<b>3,6566</b>	0,0005	<b>2,5742</b>
0,40	3,41	0,0009	0,0004	0,0005	<b>3,5493</b>	0,0004	<b>2,6307</b>
0,50	3,51	0,0009	0,0005	0,0004	<b>3,4654</b>	0,0003	<b>2,6607</b>
0,60	3,66	0,0009	0,0006	0,0003	<b>3,4274</b>	0,0002	<b>2,7897</b>
0,70	3,92	0,0009	0,0006	0,0002	<b>3,4749</b>	0,0001	<b>3,0756</b>
0,80	4,25	0,0009	0,0007	0,0001	<b>3,5265</b>	5,62E-05	<b>3,2628</b>
0,90	5,35	0,0008	0,0008	4,57E-05	<b>4,1051</b>	4,47E-06	<b>4,0580</b>
1,00	6,26	0,0008	0,0009	-4,3E-05	#ČÍSLO!	5,5E-07	#ČÍSLO!
1,10	6,90	0,0008	0,0010	-0,0001	#ČÍSLO!	1,26E-07	#ČÍSLO!
1,20	7,38	0,0008	0,0010	-0,0002	#ČÍSLO!	4,17E-08	#ČÍSLO!
1,30	9,47	0,0008	0,0011	-0,0003	#ČÍSLO!	3,39E-10	#ČÍSLO!
1,40	9,78	0,0008	0,0012	-0,0004	#ČÍSLO!	1,66E-10	#ČÍSLO!

Tabulka č. 35: Potenciometrická titrace látky LSPJ12 (1,0 ml methanolu na 10 ml = 10 %)

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	3,07	0,0011	0,0000	0,0011	#DĚLENÍ_NULOU!	0,0009	2,5308
0,10	3,09	0,0011	0,0001	0,0010	4,1016	0,0008	2,3794
0,20	3,17	0,0011	0,0002	0,0009	3,8360	0,0007	2,5514
0,30	3,24	0,0011	0,0003	0,0008	3,6804	0,0006	2,6202
0,40	3,30	0,0011	0,0004	0,0007	3,5595	0,0005	2,6113
0,50	3,40	0,0010	0,0005	0,0006	3,4983	0,0004	2,7275
0,60	3,50	0,0010	0,0006	0,0005	3,4436	0,0003	2,7865
0,70	3,60	0,0010	0,0006	0,0004	3,3853	0,0003	2,7891
0,80	3,79	0,0010	0,0007	0,0003	3,4014	0,0002	2,9662
0,90	4,17	0,0010	0,0008	0,0002	3,5717	6,76E-05	3,3604
1,00	5,33	0,0010	0,0009	0,0001	4,4337	4,68E-06	4,4129
1,10	5,92	0,0010	0,0010	0,0000	4,3094	1,2E-06	4,2862
1,20	6,94	0,0010	0,0010	-0,0001	#ČÍSLO!	1,15E-07	#ČÍSLO!
1,30	7,25	0,0010	0,0011	-0,0001	#ČÍSLO!	5,62E-08	#ČÍSLO!

Tabulka č. 36: Potenciometrická titrace látky LSPJ12 (1,5 ml methanolu na 10 ml = 15 %)

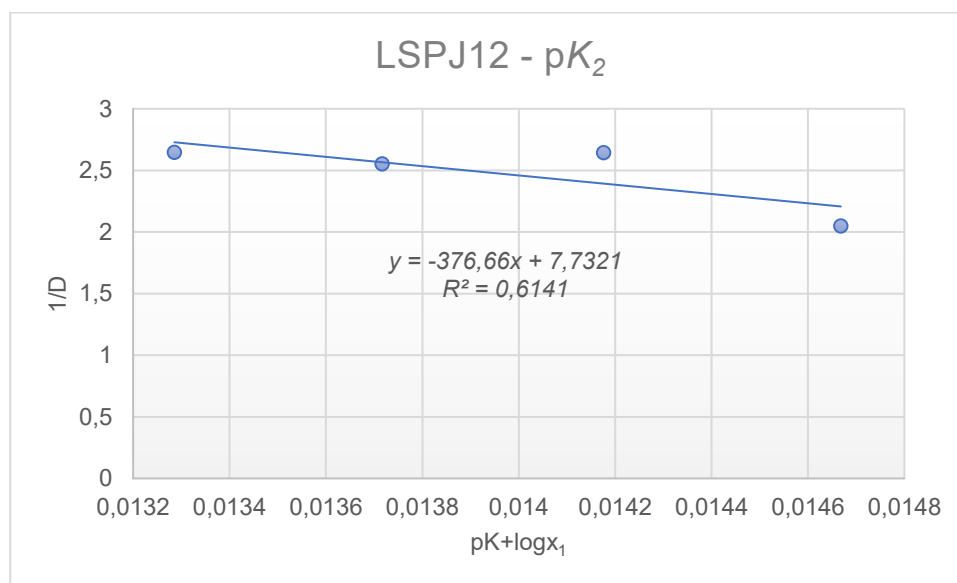
B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	3,15	0,0010	0,0000	0,0010	#DĚLENÍ_NULOU!	0,0007	2,8059
0,10	3,18	0,0010	0,0001	0,0009	4,1607	0,0007	2,7179
0,20	3,23	0,0010	0,0002	0,0008	3,8617	0,0006	2,6971
0,30	3,36	0,0010	0,0003	0,0007	3,7617	0,0004	2,9474
0,40	3,41	0,0010	0,0004	0,0006	3,6252	0,0004	2,8803
0,50	3,63	0,0010	0,0005	0,0005	3,6765	0,0002	3,2357
0,60	3,88	0,0010	0,0006	0,0004	3,7613	0,0001	3,5042
0,70	4,21	0,0010	0,0006	0,0003	3,9170	6,17E-05	3,7853
0,80	4,79	0,0010	0,0007	0,0002	4,2960	1,62E-05	4,2547
0,90	6,65	0,0009	0,0008	0,0001	5,8903	2,24E-07	5,8894
1,00	7,76	0,0009	0,0009	0,0001	6,5120	1,74E-08	6,5119
1,10	9,15	0,0009	0,0010	0,0000	#ČÍSLO!	7,08E-10	#ČÍSLO!
1,20	9,34	0,0009	0,0010	-0,0001	#ČÍSLO!	4,57E-10	#ČÍSLO!
1,30	10,02	0,0009	0,0011	-0,0002	#ČÍSLO!	9,55E-11	#ČÍSLO!
1,40	10,05	0,0009	0,0012	-0,0003	#ČÍSLO!	8,91E-11	#ČÍSLO!
1,50	10,24	0,0009	0,0013	-0,0004	#ČÍSLO!	5,75E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č. 37: Potenciometrická titrace látky LSPJ12 (2,0 ml methanolu na 10 ml = 20 %)



B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	3,08	0,0011	0,0000	0,0011	#DĚLENÍ_NULOU!	0,0008	2,5236
0,10	3,10	0,0011	0,0001	0,0010	4,0964	0,0008	2,3586
0,20	3,09	0,0010	0,0002	0,0009	3,7392	0,0008	1,6710
0,30	3,20	0,0010	0,0003	0,0007	3,6215	0,0006	2,3083
0,40	3,26	0,0010	0,0004	0,0006	3,4979	0,0005	2,2854
0,50	3,32	0,0010	0,0005	0,0005	3,3932	0,0005	2,1909
0,60	3,40	0,0010	0,0006	0,0005	3,3136	0,0004	2,1510
0,70	3,51	0,0010	0,0006	0,0004	3,2579	0,0003	2,2097
0,80	3,61	0,0010	0,0007	0,0003	3,1719	0,0002	1,8676
0,90	3,74	0,0010	0,0008	0,0002	3,0684	0,0002	#ČÍSLO!
1,00	4,18	0,0010	0,0009	0,0001	3,1425	6,61E-05	2,3811
1,10	5,61	0,0010	0,0010	0,0000	#ČÍSLO!	2,45E-06	#ČÍSLO!
1,20	6,06	0,0009	0,0010	-0,0001	#ČÍSLO!	8,71E-07	#ČÍSLO!
1,30	7,17	0,0009	0,0011	-0,0002	#ČÍSLO!	6,76E-08	#ČÍSLO!
1,40	9,46	0,0009	0,0012	-0,0003	#ČÍSLO!	3,47E-10	#ČÍSLO!
1,50	9,99	0,0009	0,0013	-0,0003	#ČÍSLO!	1,02E-10	#ČÍSLO!

Tabulka č. 38: Potenciometrická titrace látky LSPJ12 (2,5 ml methanolu na 10 ml = 25 %)



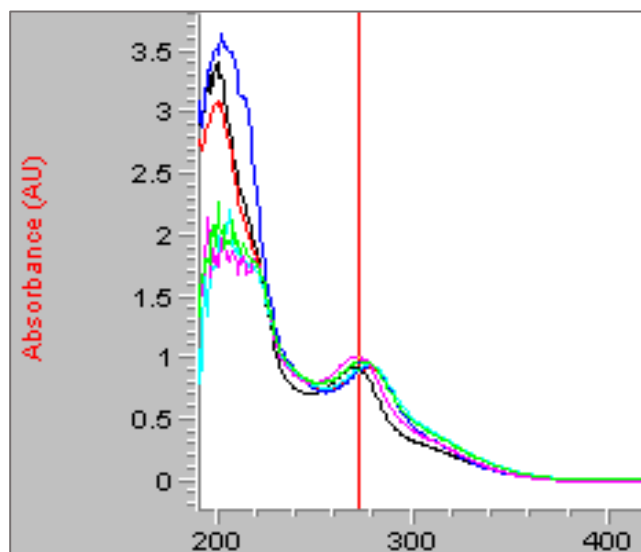
Graf č. 19: Extrapolace pK<sub>2</sub> látky LSPJ12 metodou lineární regrese

Po dosazení do rovnice přímky, která je uvedena v grafu č. 19, jsem získala hodnotu pK<sub>2</sub> látky LSPJ12:

$$pK = 3,02$$

### Spektrofotometrie

Graf č. 20 znázorňuje absorpční křivky látky LSPJ12 při různých hodnotách pH. Absorbance, které jsem využila při výpočtech v tabulce č. 39 jsou naměřeny při vlnové délce 272 nm.



Graf č. 20: Absorpční křivky látky LSPJ12

Číslo měření	pH	$A_{HI}$	$A_{I^-}$	A	pK
1	1,00	0,88444	1,00810	0,90990	0,41
2	2,46	0,88444	1,00810	0,96576	2,74
3	3,32	0,88444	1,00810	0,91106	2,76

Tabulka č. 39: Výpočet pK látky LSPJ12 spektrofotometrickou metodou

Po zprůměrování šedě označených výsledků jsem získala hodnotu:

$$pK = 2,75 (\sigma = 0,01)$$

### Zhodnocení výsledků

Jak již bylo řečeno, rozpustnost látky LSPJ12 ve vodě byla nedostatečná. Napovídá tomu i vzorec látky (methylová skupina na fenylu). Následné měření disociační konstanty bylo tedy znesnadněno nutností extrapolovat disociační konstantu na 0% koncentraci methanolu v rozpouštědle. Tento krok mohl vnést do výpočtu mírnou chybu, což by vysvětlovalo výsledek  $pK = 3,02$ . Porovnávací hodnotou je  $pK = 2,06$ , kterou vypočítal program ChemDraw Ultra 12.0.

Bližšího výsledku jsem se dobrala spektrofotometrickou metodou. Hodnota pK se v tomto případě rovná 2,75, je však třeba brát v potaz, že byla získána pouze průměrem dvou hodnot.

#### 4.1.15 LSPJ13

##### Potenciometrie

Látku LSPJ13 (stejně jako dvě předchozí látky) se mi nepodařilo rozpustit ve vodě ani po iniciaci teplem. Při měření látky jsem tedy postupovala obdobně jako u předchozích vzorků. Výsledky potenciometrických titrací látky LSPJ13 standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného jsou uvedeny v tabulkách č. 40, 41, 42. Graf č. 21 doprovázený rovnicí přímky a koeficientem determinace  $R^2$  znázorňuje extrapolaci hodnoty  $pK$  na nulovou koncentraci methanolu v roztoku.

$C'_{HA} = 0,0010; 0,0011; 0,0011 \text{ mol/l}$  (dle tabulky)       $A = 10 \text{ ml}$  (platné pro všechny tabulky)

$C'_{OH} = 0,0097 \text{ mol/l}$  (platné pro všechny tabulky)       $X = 10 + B$  (platné pro všechny tabulky)

B (NaOH [ml])	pH	$C_{HA}$	$C_{OH}$	HA	$pK_1$	$H^+$	$pK_2$
0,00	3,15	0,0010	0,0000	0,0010	#DĚLENÍ_NULOU!	0,0007	2,8055
0,10	3,18	0,0010	0,0001	0,0009	4,1605	0,0007	2,7174
0,20	3,24	0,0010	0,0002	0,0008	3,8715	0,0006	2,7389
0,30	3,33	0,0010	0,0003	0,0007	3,7315	0,0005	2,8468
0,40	3,43	0,0010	0,0004	0,0006	3,6450	0,0004	2,9423
0,50	3,52	0,0010	0,0005	0,0005	3,5663	0,0003	2,9658
0,60	3,66	0,0010	0,0006	0,0004	3,5410	0,0002	3,0750
0,70	3,83	0,0010	0,0006	0,0003	3,5366	0,0001	3,1811
0,80	4,23	0,0010	0,0007	0,0002	3,7355	5,89E-05	3,5735
0,90	5,44	0,0009	0,0008	0,0001	4,6794	3,63E-06	4,6660
1,00	6,08	0,0009	0,0009	4,97E-05	4,8297	8,32E-07	4,8219
1,10	6,48	0,0009	0,0010	-3,8E-05	#ČÍSLO!	3,31E-07	#ČÍSLO!
1,20	7,43	0,0009	0,0010	-0,0001	#ČÍSLO!	3,72E-08	#ČÍSLO!
1,30	9,25	0,0009	0,0011	-0,0002	#ČÍSLO!	5,62E-10	#ČÍSLO!
1,40	9,71	0,0009	0,0012	-0,0003	#ČÍSLO!	1,95E-10	#ČÍSLO!
1,50	9,92	0,0009	0,0013	-0,0004	#ČÍSLO!	1,2E-10	#ČÍSLO!

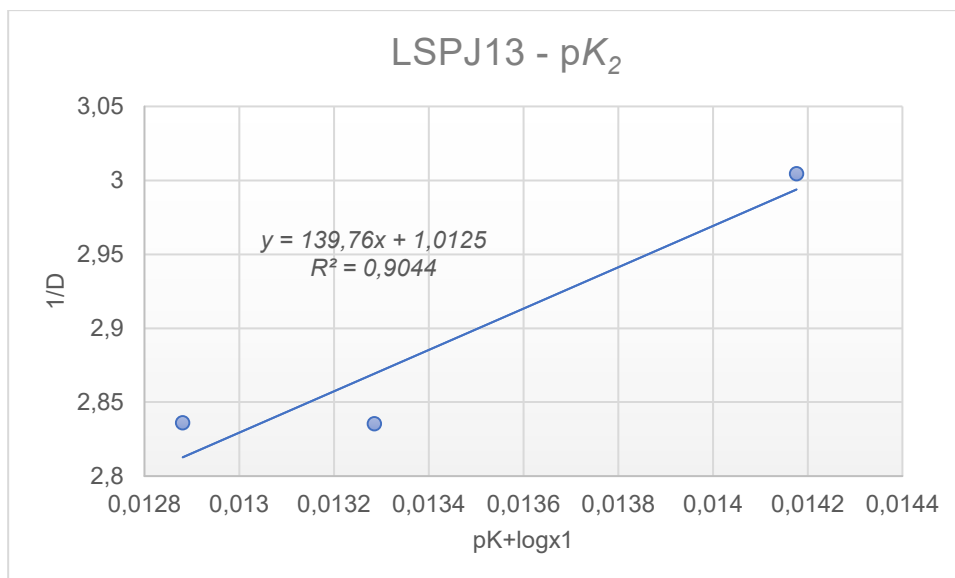
Tabulka č. 40: Potenciometrická titrace látky LSPJ13 (0,5 ml methanolu na 10 ml = 5 %)

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	3,13	0,0011	0,0000	0,0011	#DĚLENÍ_NULOU!	0,0007	2,7638
0,10	3,17	0,0010	0,0001	0,0010	4,1653	0,0007	2,7251
0,20	3,22	0,0010	0,0002	0,0008	3,8680	0,0006	2,7115
0,30	3,28	0,0010	0,0003	0,0007	3,7000	0,0005	2,7169
0,40	3,37	0,0010	0,0004	0,0006	3,6063	0,0004	2,8059
0,50	3,48	0,0010	0,0005	0,0005	3,5513	0,0003	2,9124
0,60	3,70	0,0010	0,0006	0,0004	3,6113	0,0002	3,2221
0,70	3,80	0,0010	0,0006	0,0004	3,5450	0,0002	3,1908
0,80	4,22	0,0010	0,0007	0,0003	3,7781	6,03E-05	3,6290
0,90	5,32	0,0010	0,0008	0,0002	4,6426	4,79E-06	4,6275
1,00	6,08	0,0010	0,0009	7,89E-05	5,0302	8,32E-07	5,0252
1,10	7,09	0,0010	0,0010	-9,5E-06	#ČÍSLO!	8,13E-08	#ČÍSLO!
1,20	9,28	0,0009	0,0010	-9,6E-05	#ČÍSLO!	5,25E-10	#ČÍSLO!
1,30	9,97	0,0009	0,0011	-0,0002	#ČÍSLO!	1,07E-10	#ČÍSLO!
1,40	10,11	0,0009	0,0012	-0,0003	#ČÍSLO!	7,76E-11	#ČÍSLO!
1,50	10,24	0,0009	0,0013	-0,0003	#ČÍSLO!	5,75E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č. 41: Potenciometrická titrace látky LSPJ13 (1,0 ml methanolu na 10 ml = 10 %)

B (NaOH [ml])	pH	C <sub>HA</sub>	C <sub>OH</sub>	HA	pK <sub>1</sub>	H <sup>+</sup>	pK <sub>2</sub>
0,00	3,14	0,0011	0,0000	0,0011	#DĚLENÍ_NULOU!	0,0007	2,8459
0,10	3,17	0,0011	0,0001	0,0010	4,1796	0,0007	2,7724
0,20	3,26	0,0011	0,0002	0,0009	3,9238	0,0005	2,9099
0,30	3,28	0,0011	0,0003	0,0008	3,7179	0,0005	2,7744
0,40	3,39	0,0011	0,0004	0,0007	3,6466	0,0004	2,9261
0,50	3,54	0,0010	0,0005	0,0006	3,6350	0,0003	3,1239
0,60	3,74	0,0010	0,0006	0,0005	3,6797	0,0002	3,3486
0,70	3,87	0,0010	0,0006	0,0004	3,6505	0,0001	3,3792
0,80	4,33	0,0010	0,0007	0,0003	3,9351	4,68E-05	3,8315
0,90	5,84	0,0010	0,0008	0,0002	5,2326	1,45E-06	5,2286
1,00	6,59	0,0010	0,0009	0,0001	5,6772	2,57E-07	5,6761
1,10	7,45	0,0010	0,0010	1,95E-05	5,7557	3,55E-08	5,7549
1,20	9,12	0,0010	0,0010	-6,8E-05	#ČÍSLO!	7,59E-10	#ČÍSLO!
1,30	9,88	0,0010	0,0011	-0,0002	#ČÍSLO!	1,32E-10	#ČÍSLO!
1,40	10,17	0,0010	0,0012	-0,0002	#ČÍSLO!	6,76E-11	#ČÍSLO!
1,50	10,44	0,0010	0,0013	-0,0003	#ČÍSLO!	3,63E-11	#ČÍSLO!

Tabulka č. 42: Potenciometrická titrace látky LSPJ13 (2,0 ml methanolu na 10 ml = 20 %)



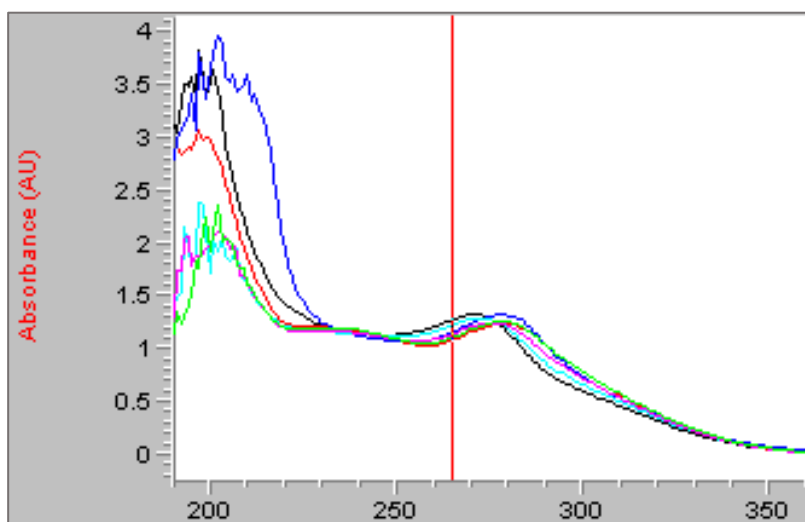
*Graf č. 21: Extrapolace pK<sub>2</sub> látky LSPJ13 metodou lineární regrese*

Po dosažení do rovnice přímky s koeficientem determinace  $R^2 = 0,9044$  mi vyšlo, že:

$$\mathbf{pK = 2,76}$$

### *Spektrofotometrie*

Graf č. 22 znázorňuje absorpční křivky látky LSPJ13 při různých hodnotách pH. Výpočet jsem provedla ve 2 vlnových délkách (265 nm, 287 nm). Získané hodnoty jsem následně využila pro výpočet disociační konstanty v tabulkách č. 43 a 44.



*Graf č. 22: Absorpční křivky látky LSPJ13*

Číslo měření	pH	A <sub>HI</sub>	A <sub>I-</sub>	A	pK
1	1,83	1,2731	1,0749	1,2194	2,26
2	2,43	1,2731	1,0749	1,1375	2,09
3	3,23	1,2731	1,0749	1,1022	2,43

Tabulka č. 43: Výpočet pK látky LSPJ13 spektrofotometrickou metodou ( $\lambda = 265 \text{ nm}$ )

Po zprůměrování hodnot pK naměřených při vlnové délce 265 nm mi vyšlo, že

$$pK = 2,29 (\sigma = 0,07)$$

Číslo měření	pH	A <sub>HI</sub>	A <sub>I-</sub>	A	pK
1	1,83	0,87018	1,1514	0,95323	2,21
2	2,43	0,87018	1,1514	1,03580	2,27
3	3,23	0,87018	1,1514	1,11610	2,39

Tabulka č. 44: Výpočet pK látky LSPJ13 spektrofotometrickou metodou ( $\lambda = 287 \text{ nm}$ )

Po zprůměrování hodnot pK naměřených při vlnové délce 287 nm mi vyšlo, že:

$$pK = 2,26 (\sigma = 0,14)$$

#### Zhodnocení výsledků

Látka LSP13, stejně jako 2 předchozí látky, nebyla dostatečně rozpustná ve vodě. Toto chování bylo způsobeno trifluormethylovou skupinou umístěné na fenylu. Pro vyhodnocení potenciometrické titrace bylo potřeba využít lineární regrese. Rovnice regresní přímky byla velice přesná, jak také napovídá koeficient determinace 0,9044. Po dosazení do rovnice jsem získala hodnotu  $pK = 2,76$ .

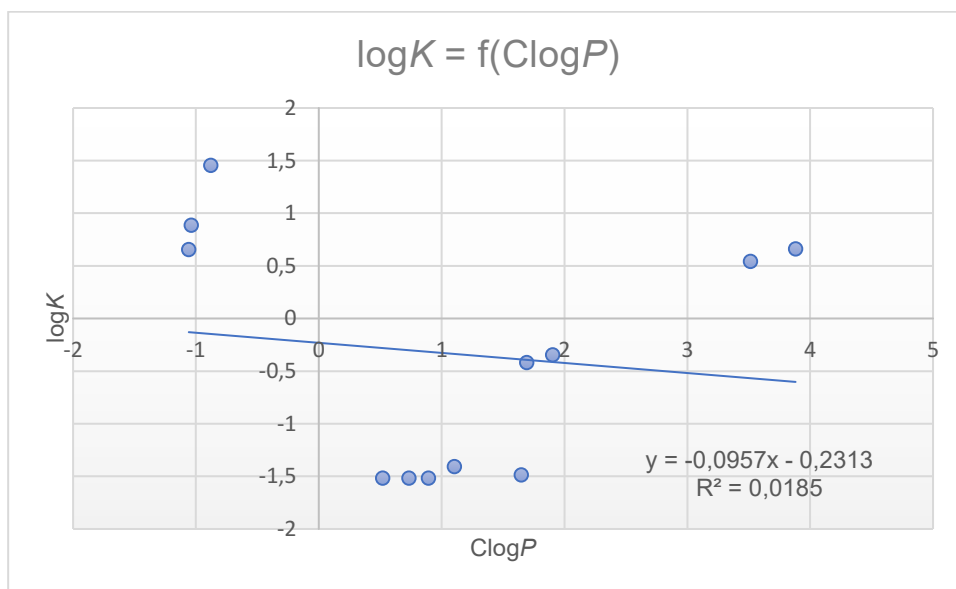
U spektrofotometrického měření jsem se po zhlédnutí absorpčních křivek rozhodla využít pro výpočet hodnoty 2 vlnových délek. Oba výpočty dosáhly velice podobného výsledku:  $pK_{265} = 2,29$  a  $pK_{287} = 2,26$ . Při porovnání experimentálně zjištěných hodnot s programem ChemDraw Ultra 12.0 ( $pK = 2,23$ ) jsem zjistila, že si jsou všechny hodnoty velice blízké.

## 4.2 Stanovení lipofility léčiv

Výsledky lipofility měřených léčiv jsou uvedeny v tabulce č. 45. Lipofilita je zde vyjádřena jako logaritmus kapacitního faktoru  $\log K$ , který byl vypočítán podle vzorce č.10. Hodnota  $\log K$  byla naměřena za použití mobilní fáze methanol:voda = 70:30. Pro srovnání zde přikládám i hodnoty  $C\log P$ , které vyjadřují logaritmus rozdělovacího koeficientu v systému oktanol/voda vypočítaný počítačovým programem ChemDraw Ultra 12.0. Z hodnot  $\log K$  a  $C\log P$  jsem sestrojila regresní přímku, která je uvedena v grafu č. 23.

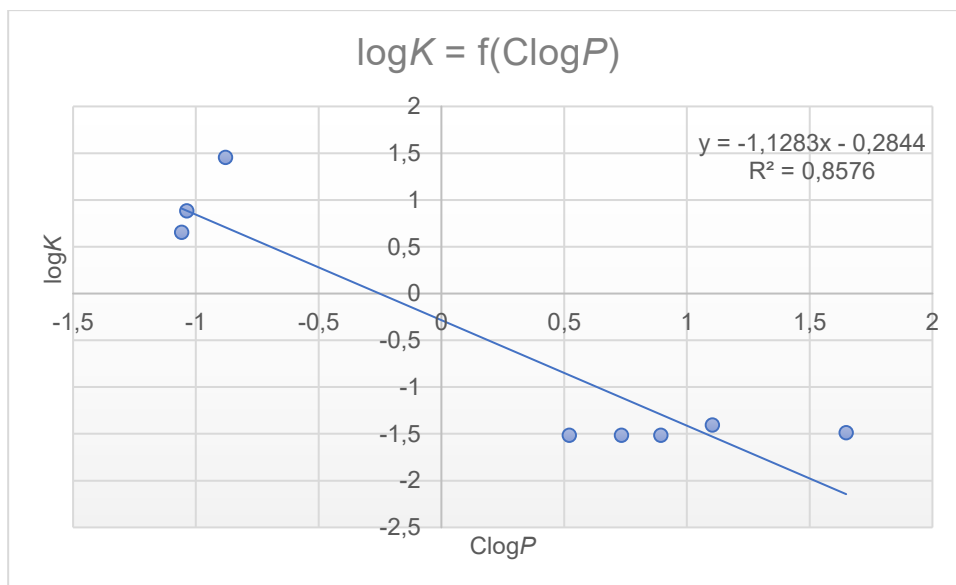
Vzorek	$\log K$	$C\log P$
LSPJ11	-1,5166	0,73
LSPJ12	-1,4075	1,10
LSPJ13	-1,4867	1,65
LSPJ14	-1,5166	0,52
LSPJ15	-1,5166	0,89
LSPJ16	1,4549	-0,88
LSPJ17	0,8849	-1,04
LSPJ18	0,6544	-0,06
2-hydroxychinoxalin	-0,3457	1,90
4-hydroxychinazolin	-0,4202	1,69
VN014	0,5421	3,52
VN034	0,6613	3,88

Tabulka č. 45: Porovnání hodnoty  $\log K$  a  $C\log P$

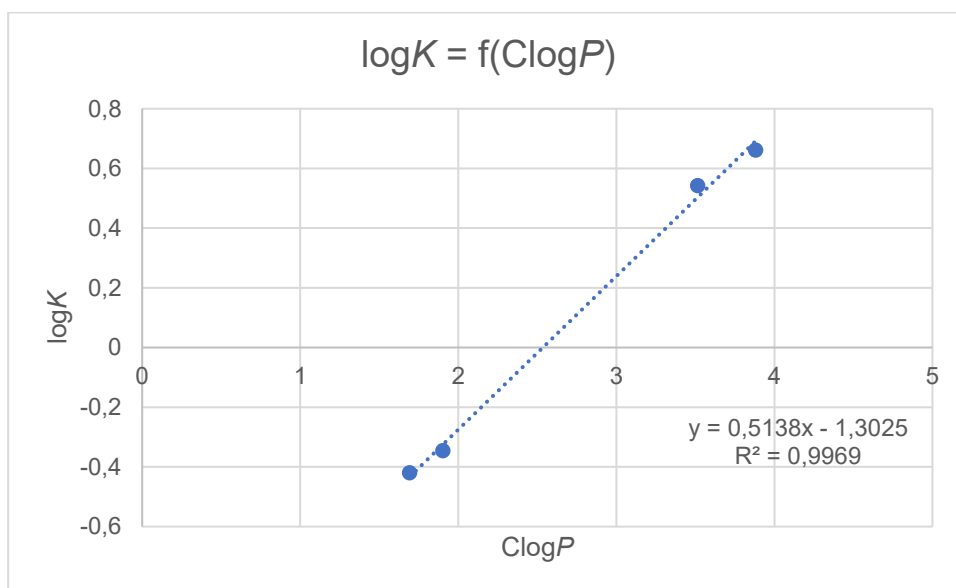


Graf č. 23: Porovnání hodnoty  $\log K$  a  $C\log P$

Jak je na první pohled zřetelné z grafu č. 23, hodnoty jsou velice rozmanité, tomu nasvědčuje i koeficient determinace blízký se 0. Z toho důvodu jsem se rozhodla sestrojít 2 dílčí grafy, první vychází z naměřených dat řady látek LSPJ 11–18 a druhý zaznamenává hodnoty derivátu chinazolinu a chinoxalinu (2-hydroxychinoxalin, 4-hydroxychinazolin VN014, VN034).



Graf č. 24: Porovnání hodnoty logK a ClogP řady látek LSPJ11-18



Graf č. 25: Porovnání hodnoty logK a ClogP látek 2-hydroxychinoxalinu, 4-hydroxychinazolinu, VN014 a VN034

Grafy č. 24 a 25 mají téměř lineární charakter, koeficienty determinace to také potvrzují ( $R^2=0,8576$  a  $0,9969$ ). Hodnota ClogP slouží pouze k předběžnému určení reálné hodnoty lipofility logP, tudíž nemusí vždy zcela odpovídat hodnotě skutečné. Z porovnání grafu č. 23 s grafy č. 24 a 25 je zřejmé, že korelace mezi naměřenými hodnotami logK a vypočítanými hodnotami ClogP je smysluplná pouze u řad strukturálně podobných látek.



## 5. Shrnutí výsledků

V tabulce č. 46 jsou vypsány všechny experimentálně zjištěné hodnoty pK studovaných látek a jejich lipofility. K těmto parametrům jsou uvedeny pro porovnání hodnoty, které vygeneroval počítačový program ChemDraw Ultra 12.0, popř. jsou zjištěny z jiných zdrojů (*viz tabulka*).

Vzorek	pK			Lipofilita	
	Potenciometrie	Spektrofotometrie	Referenční	logK	ClogP
Pyrazin-2-karboxylová kyselina	2,95	N	2,96 [36]	N	N
LSPJ11	3,02/1,78	-	2,18	-1,5166	0,73
LSPJ12	3,02	2,75	2,06	-1,4075	1,10
LSPJ13	2,76	2,29/2,26	2,23	-1,4867	1,65
LSPJ14	3,29	-	2,23	-1,5166	0,52
LSPJ15	5,43	-	2,23	-1,5166	0,89
LSPJ16	3,04	-	2,23	1,4549	-0,88
LSPJ17	2,60	-	2,23	0,8849	-1,04
LSPJ18	2,89	-	2,23	0,6544	-0,06
2-hydroxychinoxalin	9,06	9,31	9,89* [37]	-0,3457	1,90
4-hydroxychinazolin	9,65	10,41	9,89* [37]	-0,4202	1,69
VN014	9,81	8,87	9,14	0,5421	3,52
VN034	3,50	-	9,66	0,6613	3,88

Tabulka č.46: Výsledky disociačních konstant a hodnot lipofility zkoumaných látek:

Písmeno „N“ značí, že metoda provedena nebyla, symbol „-“ označuje metodu, která neposkytla reprezentativní výsledky. „\*“ je symbolem pro pK fenolu jako referenční hodnoty

### 5.1 Stanovení disociační konstanty léčiv

Prvním vzorkem, u kterého jsem měřila pK, byla již dříve zkoumaná pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Kromě toho, že jsem měla možnost porovnat svůj výsledek s naměřenou hodnotou, jednalo se také o výchozí sloučeninu pro řadu látek LSPJ 11–18. Tyto vzorky mají společnou karbamoylovou skupinu, přes kterou je na pyrazinové jádro připojen fenyl. Tento objemný substituent může stericky stínit hlavní karboxylovou skupinu na pyrazinu a tím ji i mírně oslabovat. Řada LSPJ se mezi sebou odlišuje pouze substitucí na fenylu. Nelze tedy předpokládat příliš velký vliv těchto funkčních skupin. Hydrofobní substituenty však mají zásadní vliv na sníženou rozpustnost látky, což se následně odrazilo v odlišnosti postupu práce a výpočtu.

U disociační konstanty látek 2-hydroxychinoxalinu, 4-hydroxychinazolinu, VN014 a VN034 jsem taktéž nepředpokládala razantní výkyvy. Na první pohled se ostatním látkám vymykala vzorek VN034. Potenciometricky naměřená hodnota pK připomínala o hodně silnější kyselinu, než byla samotná struktura. V tomto případě však naměřená hodnota pK odpovídala deprotonizaci molekuly, jelikož se látka v roztoku vyskytovala ve formě hydrochloridu. Pokud se podíváme na struktury látek VN014

a VN034 zjistíme, že látka VN014 je derivátem 4-hydroxychinazolinu a VN034 derivátem 2-hydroxychinoxalinu. Jelikož oba dva deriváty mají na základní struktuře navázaný řetězec zakončený zásaditým terciárním aminem, můžeme předpokládat, že budou vykazovat bazičtější charakter než výchozí sloučeniny, což také potvrzuje v případě látky VN014 experimentální stanovení.

## 5.2 Stanovení lipofility léčiv

Grafické znázornění porovnání  $\log K$  a  $ClogP$  řady látek LSPJ není zcela jednoznačné. S určitostí lze tvrdit, že mezi látky s poněkud hydrofilnějším charakterem patří vzorky LSPJ16, 17 a 18. Tyto látky mají na fenylu substituované funkční skupiny -Cl, -F a methoxyskupinu. Na opačné straně se umístily lipofilní látky obsahující substituenty typu methyl a trifluormethyl (LSPJ11, 12, 13). Vysoká hodnota lipofility je důvodem jejich nízké rozpustnosti ve vodě, což jsem si potvrdila během své experimentální práce, kdy jsem musela využít jako pomocné rozpouštědlo methanol. Mezi lipofilnější látky na základě teoreticky zjištěného  $ClogP$  patří i LSPJ15, nicméně v praxi se po zahřátí rozpouštěla relativně snadno. U vzorku LSPJ14 byla potřeba k rozpuštění iniciace teplem, na fenylu je substituován relativně hydrofilní nitroskupinou. Při porovnání hodnot  $\log K$  vyneseny do grafu je zřetelné, že hodnoty lipofilnějších látek jsou velice podobné a odlišuje je až srovnání s  $ClogP$ .

Výbornou korelaci  $\log K$  a  $ClogP$  přineslo měření derivátů chinazolinu a chinoxalinu, což potvrzuje i lineární charakter grafu č. 25. Mezi nejméně lipofilní látky patří základní struktury 2-hydroxychinoxalin a 4-hydroxychinazolin. Jejich jediným substituentem je hydroxylová skupina na heterocyklu, ta podporuje hydrofilní charakter molekuly. Deriváty těchto dvou molekul obsahují hydrofobnější tříčlenný řetězec zakončený cyklickým terciárním aminem. U látky VN034 navíc chybí hydroxylová skupina, proto je také její lipofilita nejvyšší (nenacházela se ve formě hydrochloridu), nicméně rozdíl s látkou VN014 není příliš velký.

## 6. Závěr

Cílem této práce bylo stanovit hodnoty  $pK$  a  $\log K$  dvanácti látek. Devět z nich představuje nově připravená potenciální léčiva.

Základní metodou použitou pro stanovení  $pK$  byla metoda potenciometrická, která byla doplněna měřením metodou spektrofotometrickou u těch látek, kde to bylo možné. Spektrofotometrické měření poskytovalo použitelné výsledky pouze u pěti z dvanácti zkoušených vzorků. V případech úspěšného změření  $pK$  potenciometrickou titrací i spektrofotometrií se výsledky obou metod odlišovaly pouze minimálně, zároveň i jejich přesnost byla velice příznivá. Mé poznatky tedy potvrzují, že při experimentálním stanovení disociační konstanty (resp.  $pK$ ) je potenciometrická titrace metodou základní, protože je univerzálnější. Spektrofotometrii lze použít jako metodu doplňkovou, jelikož je aplikovatelná pouze u některých látek.

Dále jsem zkoumala vliv vedlejších funkčních skupin nebo připojených řetězců na výslednou hodnotu  $pK$ . Potvrdila se mi teorie, že disociační konstanta se v rámci řady LSPJ změní pouze minimálně. Deriváty chinazolinu a chinoxalinu se chovaly obdobně.

Vypočítané hodnoty  $pK$  i  $ClogP$  je nutné brát s mírným nadhledem – jedná se o výsledky získané příspěvkovými metodami, které zanedbávají některé vlivy. Reálné měření naopak další vnější vlivy, které při měření působí, zahrnuje.

Při stanovení lipofility jsem využila logaritmu kapacitního faktoru  $\log K$  měřeného v prostředí mobilní fáze (methanol:voda = 70:30). Po přenesení všech výsledků do grafu pro porovnání s  $ClogP$  jsem však musela konstatovat, že korelace mezi  $\log K$  a  $ClogP$  prakticky neexistuje. Důvodem byla pravděpodobně příliš rozdílná struktura látek. Proto jsem výsledky rozdělila do 2 grafů v závislosti na struktuře měřených látek a získala jsem téměř lineární charakter závislosti. Výborná korelace  $\log K$  s  $ClogP$  se nejvíce projevila u derivátů chinazolinu a chinoxalinu.

## 7. Seznam použité literatury

- [1] HARTL, J., PALÁT, K. Farmaceutická chemie I. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-2033-6.
- [2] BHAL, S. K., KASSAM, K., PEIRSON, I. G., PEARL, G. M. The Rule of Five Revisited: Applying Log D in Place of Log P in Drug-Likeness Filters. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2007, 4(4), 556, DOI: 10.1021/mp0700209. ISSN 1543-8384. [cit. 11. 2. 2018].  
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp0700209>
- [3] Disociační konstanta – Wikipedie. [online]. [cit. 20. 10. 2017].  
Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Disocia%C4%8Dn%C3%AD\\_konstanta](https://cs.wikipedia.org/wiki/Disocia%C4%8Dn%C3%AD_konstanta)
- [4] LÁZNÍČKOVÁ, A., KUBÍČEK, V. Základy fyzikální chemie: vybrané kapitoly pro posluchače Farmaceutické fakulty. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1511-0.
- [5] VI. Disociace a iontové rovnováhy - PDF. [online]. Copyright © DocPlayer.cz. [cit. 28. 12. 2017].  
Dostupné z: <http://docplayer.cz/1626691-Vi-disociace-a-iontove-rovnovahy.html>
- [6] WILSON, Ch. O., BEALE, J. M., BLOCK, J. H.. Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 12th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, c2011. ISBN 978-0-7817-7929-6.
- [7] MANALLACK, D. T. The p K a Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. *Perspectives in Medicinal Chemistry* [online]. 2007, 1, 25-37, DOI: 10.1177/1177391X0700100003. ISSN 1177-391X. [cit. 15. 10. 2017].  
Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1177391X0700100003>
- [8] ŠTAUD, F.: Transport léčiv přes biologické membrány. Přednáška. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2016.
- [9] SKLENÁŘOVÁ, H.: Potenciometrie. Přednáška. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2017.
- [10] Potenciometrie - PDF. [online]. [cit. 20. 1. 2018].  
Dostupné z: [http://vyuka-data.lf3.cuni.cz/CVSE1M0001/potenciometrie\(4f9a89599efa9\).pdf](http://vyuka-data.lf3.cuni.cz/CVSE1M0001/potenciometrie(4f9a89599efa9).pdf)
- [11] VINŠOVÁ, H. ZACHAŘ P., ZÁRUBA K.: Potenciometrické měření pH. [cit. 13. 2. 2018].  
Dostupné z: [https://uanlch.vscht.cz/files/uzel/0012437/3\\_Pot-pH.pdf?redirected](https://uanlch.vscht.cz/files/uzel/0012437/3_Pot-pH.pdf?redirected)

- [12] KARLÍČEK, R. Analytická chemie pro farmaceuty. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1453-3.
- [13] SKLENÁŘOVÁ, H.: Spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti. Přednáška. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2017.
- [14] KLIMEŠ, J. Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. 1. vydání. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2011. ISBN 978-80-87009-29-1.
- [15] KUBÍČEK, V. Praktická cvičení z fyzikální chemie. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1379-6.
- [16] BABIĆ, S., HORVAT, A. J. M., MUTAVDŽIĆ PAVLOVIĆ, D., KAŠTELAN-MACAN, M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2007, 26(11), 1043-1061. DOI: 10.1016/j.trac.2007.09.004. ISSN 01659936. [cit. 16. 1. 2018].
- Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993607001884>
- [17] REIJENGA, J., VAN HOOFF, A., VAN LOON, A., a TEUNISSEN, B. Development of Methods for the Determination of pK a Values. *Analytical Chemistry Insights* [online]. 2013, 8. 53-71. DOI: 10.4137/ACI.S12304. ISSN 1177-3901. [cit. 20. 12. 2017].
- Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/ACI.S12304>
- [18] KUBÍČEK, V. Výpočty z fyzikální chemie I. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2001. ISBN 80-7184-898-0.
- [19] Cuvette - Wikipedia. [online]. [cit. 1. 2. 2018].
- Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cuvette>
- [20] KUCHAR, M. Výzkum a vývoj léčiv: studijní program: syntéza a výroba léčiv. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-677-7.
- [21] KERNS, E. H. a Li. DI. Drug-like properties: concepts, structure design and methods : from ADME to toxicity optimization. Boston: Academic Press, c2008. ISBN 978-0-12-369520-8.
- [22] RUTKOWSKA, E., PAJAK K. a JÓŹWIAK K.. Lipophilicity-methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Poloniae Pharmaceutica* [online]. 2013, 70(1), 3-18. ISSN 0001-6837. [cit. 1. 2. 2018].
- Dostupné z: <http://www.ptfarm.pl/download/7,4,14,17,2,2>

- [23] ARNOTT, J. A., KUMAR, R., PLANEY, S. L. Lipophilicity Indices for Drug Development. *Journal of Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics* [online]. 2013. 31-36. DOI: 10.14205/2309-4435.2013.01.01.6. ISSN 23094435. [cit. 20. 10. 2017].
- Dostupné z: <http://www.pharmapublisher.com/downloads/jabpv1n1a6/>
- [24] POOLE, S. K., POOLE, C. F. Separation methods for estimating octanol–water partition coefficients. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, 797(1-2), 3-19. DOI: 10.1016/j.jchromb.2003.08.032. ISSN 15700232. [cit. 16. 1. 2018].
- Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023203006937>
- [25] SKLENÁŘOVÁ, H.: *Separační analytické metody-vysokoučinná kapalinová chromatografie*. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2017.
- [26] SKLENÁŘOVÁ, H.: *Separační analytické metody-tenkovrstvá a papírová chromatografie*. Přednáška. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2017.
- [27] Technical Report 009 – assessment of reverse-phase chromatographic methods for determining partition coefficients. Brussels, 1983. [cit. 15. 2. 2018].
- Dostupné z: <http://www.ecetoc.org/publication/tr-009-assessment-of-reverse-phase-chromatographic-methods-for-determining-partition-coefficients/>
- [28] GRUSHKA, E. a N. GRINBERG, ed. *Advances in Chromatography*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2012. ISBN 978-1-4398-5844-8.
- [29] AGLIARA, A., KHAMIS, E., TRINH, A., CARRUPT, P., TSAI, R., TESTA, B. Structural Properties Governing Retention Mechanisms on RP-HPLC Stationary Phases Used for Lipophilicity Measurements. *Journal of Liquid Chromatography* [online]. 1995, 18(9), 1721-1745. DOI: 10.1080/10826079508010002. ISSN 0148-3919. [cit. 15. 10. 2017].
- Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826079508010002>.
- [30] AYOUNI, L., CAZORLA, G., CHAILLOU, D., ERBRETEAU, B., RUDAZ HS., LANTÉRI P., CARRUPT, P.-A. Fast Determination of Lipophilicity by HPLC. *Chromatographia* [online]. 2005, 62(5-6), 251-255. DOI: 10.1365/s10337-005-0608-6. ISSN 0009-5893. [cit. 1. 1. 2018].
- Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-005-0608-6>
- [31] DVOŘÁK J., SUK V.: *Příručka měření pH*, Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1975.
- [32] ALBERT, A., SERJEANT, E. P. *The determination of ionization constants: a laboratory manual*. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 1971. ISBN 9780412103001.
- [33] SHELDONOVSKY, T.: *Electrolytes* (ed. B Pesce), Pergamon, New York 1962.

[34] HERRERO-MARTÍNEZ, J. M., REPOLLÉS, C., BOSCH, E., ROSÉS M., RÀFOLS, C. Potentiometric determination of aqueous dissociation constants of flavonols sparingly soluble in water. *Talanta* [online]. 2008, 74(4), 1008-1013. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.08.007. ISSN 00399140. [cit. 20. 12. 2017].

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914007005632>

[35] BENET, L. Z., GOYAN, J. E. Potentiometric determination of dissociation constants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1967, 56(6), 665-680. DOI: 10.1002/jps.2600560602. ISSN 00223549. [cit. 12. 11. 2017].

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915358329>

[36] KRČILOVÁ Š.: Fyzikálně chemické vlastnosti nově připravených léčiv. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2012.

[37] LANGE N. A. (ed.): *Handbook of Chemistry and Physics*, Handbook Publishers, Inc., Sandusky, Ohio, 1946.