UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Metodika stanovení vybraných fyzikálně-chemických farmakologických parametrů

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor práce:	Mgr. Tereza Volná
Studijní obor:	Analytická chemie
Konzultant:	Ing. Kamil Motyka, Ph.D.

2017

Prohlašuji, že jsem předloženou rigorózní práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady uvedené v přiloženém seznamu.

Souhlasím s tím, aby práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne ……..

.....

Vlastnoruční podpis

Chtěla bych poděkovat Ing. Kamilovi Motykovi, Ph.D. za konzultace a rady spojené s vypracováním této práce. Také bych chtěla poděkovat Katedře organické chemie za možnost, aby tato práce vznikla a všem kolegům z katedry a z Ústavu molekulární a translační medicíny.

Souhrn

Tato práce se zabývá stanovením disociační konstanty a distribučního koeficientu při pH 7,4, což jsou fyzikálně-chemické farmakologické parametry, které jsou důležité pro odhadnutí chování látky v biologickém systému. 3-hydroxychinolin-4(1H)-ony (3HQs) jsou sloučeniny s významnou biologickou aktivitou a byly vybrány pro stanovení distribučního koeficientu. Distribuční koeficient lze stanovit pomocí klasické třepací metody, ale nevýhodou je práce s oktanolem, časová náročnost a tato metoda není úplně vhodná pro látky nerozpustné ve vodě. Druhá metoda, kterou se zabývá tato práce, využívá vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Výhodou této metody je, že je časově méně náročná, postačuje malé množství vzorku, který může obsahovat nečistoty a lze ji použít pro látky omezeně rozpustné ve vodě. Standardy, které byly použity, vykazovaly dobrou korelaci mezi tabelovanými hodnotami log P a naměřenými hodnotami log k_w (R^2 0,9895). Nejvyšší hodnota regresního koeficientu pro chinolony byla 0,9499. Pro stanovení disociační konstanty (pKa) byly vybrány běžně dostupné farmaceutické standardy. pKa lze stanovit různými metodami jako je potenciometrie, spektrofotometrie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. V prvních dvou případech je potřeba čisté látky bez obsahu nečistot, které by mohly zkreslit výsledek. Tyto metody jsou časově náročné a v případě potenciometrie je potřeba velké množství vzorku (jednotky až desítky miligramů). Disociační konstantu lze stanovit pomocí HPLC dvěma způsoby, buď s obsahem organického modifikátoru v mobilní fázi, což vyžaduje několik měření s různým obsahem modifikátoru a následnou extrapolaci na pouze vodnou fázi. Druhá možnost je použití pouze vodné fáze, díky které se samotné stanovení urychlí, minimálně třikrát, oproti první možnosti. V této práci byla použita pouze vodné mobilní fáze, která ještě v literatuře nebyla popsaná. Studované HPLC metody lze využít pro jednoduchý a rychlý odhad farmakologických parametrů látek, které jsou získávány například pomocí kombinatorální chemie.

Klíčová slova: distribuční koeficient, disociační konstanta, high throughput screening, vodná mobilní fáze

Summary

This thesis deals with determination of dissociation constant and distribution coefficient in pH 7.4. These are physico–chemical pharmaceutic parameters, very important for biological system. 3-hydroxyquinolin-4(1H)-ons (3HQs) are compounds with significant biological activity and they were choosen for determination of distribution coeficient. We can determinate distribution coeficient by shake flask method. This method is disadvantageous because we have to work with octanol. The whole process is time consuming and it is not suitable for compounds insoluble in water. The second method is HPLC. This method is less time consuming. We need a small amount of sample which can contain impurities. This method is suitable for compounds insoluble in water. The standards, which were used, had a good corelation between values log *P* obtained from literature and values log k_w determinated by HPLC (R^2 0,9895). The highest value for quinolones was 0,9499. The common used standards were choosen for determination p*Ka*. The dissociation constant we can determinate by several methods such as potentiometrie, spektrofotometrie and HPLC. In the first two cases we need a pure compound without impurities. These methods are time consuming and in case of potentiometrie we need a large amount of sample. We can determinate the dissociation constant by HPLC by two diffrent ways. Firstly the mobile phase can contain an organic modifier. Secondly the mobile phase can contain only aquatic phase. In this thesis was used only aquatic mobile phase which has not been published yet. HPLC methods can be used for easy and fast prediction of pharmacological parameters of compounds which we can obtain by combinatorial chemistry.

Key words: distribution coefficient, dissociation constant, high throughput screening, aquatic mobile phase

OBSAH

1. ÚVOD 7

2. TEORETICKÁ ČÁST 8

2.1. DISTRIBUČNÍ KOEFICIENT 8

2.1.1. Metody stanovení distribučního koeficientu 9

2.1.2. Deriváty 3-Hydroxychinolin-4(1H)-onu 11

2.2. DISOCIAČNÍ KONSTANTA 13

2.2.1. Metody stanovení disociační konstanty 14

2.2.2. Standardy pro stanovení disociační konstanty 16

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 17

3.1. CHEMIKÁLIE 17

3.2. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ 17

3.3. PRACOVNÍ POSTUPY 18

3.3.1. Příprava pracovních roztoků a vzorků 18

3.3.2. Chromatografická separace 18

3.3.3. Stanovení distribučního koeficientu pomocí třepací metody 21

4. VÝSLEDKY A DISKUZE 22

4.1. SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ DISTRIBUČNÍHO KOEFICIENTU 22

4.2. CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ DISTRIBUČNÍHO KOEFICIENTU 23

4.2.1. Korelace mezi log kw a log P pro standardy 23

4.2.2. Závislost log k - % MeOH pro chinolony 25

4.2.3. Korelace mezi standardní třepací metodou a HPLC metodou. 29

4.3. STANOVENÍ DISOCIAČNÍ KONSTANTY POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE 32

4.3.1. Vodná mobilní fáze 32

4.3.2. Výpočet disociační konstanty 34

4.3.3. Pufr s 5 % methanolu 36

5. ZÁVĚR 37

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 38

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURA 39

1. Úvod

Fyzikálně - chemické farmakologické parametry jako jsou distribuční koeficient log *D* a disociační konstanta p*Ka* jsou užitečnými parametry pro přiblížení chování zkoumané látky v živých organismech.

V současnosti se pro stanovení log *D* používá klasická třepací metoda a pro stanovení disociační konstanty potenciometrie nebo spektrofotometrie. Nicméně v některých případech zmiňované metody nelze použít. Buď je to kvůli špatné rozpustnosti vzorku ve vodě a n-oktanolu nebo je potřeba většího množství vzorku (jednotky až desítky miligramů). V dnešní době, ve které jsou kladené vysoké nároky na co nejrychlejší vývoj nových potenciálních léčiv je potřeba několik miligramů na veškeré analýzy. Proto je potřeba zvolit vhodnou případně vytvořit novou metodiku, aby splňovala podmínky univerzálnosti, rychlosti, jednoduchosti - high throughput screening.

Tato práce se zabývá ověřením použitelnosti kapalinové chromatografie pro stanovení uvedených parametrů, jako vhodné alternativy k jiným klasickým metodám. Byly také navrženy modifikace zavedených postupů, díky kterým došlo k zjednodušení a zrychlení metod. Metodiky jsou vhodné pro série kandidátů potenciálních léčiv připravených například pomocí kombinatoriální chemie, protože nevyžaduje čisté sloučeniny a mohou být v malých množstvích ve složitějších směsích.

2. Teoretická část

2.1. Distribuční koeficient

Rozdělovací *P* a distribuční *D* koeficient jsou důležité farmakokinetické parametry, které popisují absorpční, distribuční, metabolické a eliminační (ADME) vlastnosti, stejně jako farmakodynamický a toxikologický profil léčiv. Lipofilní charakter léčiv byl uznán jako jeden z důležitých faktorů ovlivňující rozsah vazby na bílkoviny, metabolismus a absorpci [1, 2].

Rozdělovací koeficient (*P* nebo log *P)* je definován jako poměr koncentrací neionizované sloučeniny v organické a vodné fázi v rovnováze. Jako organická fáze pro měření log *P* se používá n-oktanol. Distribuční koeficient (*D* nebo log *D*) je definován jako celkový poměr disociované a nedisociované formy v organické a vodné fázi.

Rozdělovací (*P*) a distribuční (*D*) koeficient látky *HA* může být vyjádřen pomocí dvou rovnic:

$$P = \frac{[HA]_{org.\ fáze}}{[HA]_{vodná\ fáze}}$$

$$D = \frac{[HA]_{org.\ fáze}}{[HA]_{vodná\ fáze} + [A^-]_{vodná\ fáze}}$$

Rozdělovací koeficient je nezávislý na pH a poukazuje na rovnováhu pouze neionizované sloučeniny mezi fázemi. Distribuční koeficient je pH závislý, protože stupeň disociace ve vodné fázi je ovlivněn jak hodnotou pH tak hodnotou p*Ka* dané sloučeniny.

Hodnota pH krve je 7,4, proto se pro testování používá tato hodnota. Optimální hodnota log $D_{7,4}$ pro orální absorpci je mezi -0,5 až 2, sloučeniny s nižší hodnotou než -0,5 nebo sloučeniny s vyšší hodnotou než 2 mají špatnou orální absorpci vzhledem k limitované membránové penetraci (nízká lipofilita) nebo špatné rozpustnosti ve vodné fázi (nízká hydrofilita). [3].

2.1.1. Metody stanovení distribučního koeficientu

1. *Třepací metoda*

Pro stanovení distribučního koeficientu lze použít dvě metody, jedna z nich je klasická třepací metoda (angl. shake flask method). V dělící nálevce, případně v jiné vhodné nádobě, která obsahuje dvě nemísitelné fáze oktanol a vodu (nebo pufr) se přidá analyzovaná sloučenina. Dělící nálevka se nechává třepat několik hodin na třepačce za laboratorní teploty. Během třepání dochází k ustavení rovnováhy sloučeniny mezi vodnou a organickou fází. Pomocí UV/VIS spektrofotometrie se změří hodnota absorbance sloučeniny ve vodné fázi před a po třepání a vypočítá se hodnota distribučního koeficientu pomocí dané rovnice [4]:

$$D = \frac{A_0 - A_1}{A_1} \cdot \frac{V_{aq}}{V_{oct}}$$

A_0 = hodnota absorbance před třepáním

A_1 = hodnota absorbance po třepání

V_{aq} = objem vodné fáze

V_{oct} = objem oktanolové fáze

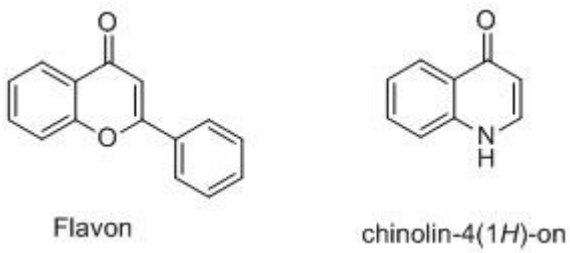
Tuto metodu lze použít pro stanovení distribučního koeficientu pro hodnoty od 2 do 4. Nevýhodou této metody je práce s oktanolem, který má silný aromatický zápach, časová náročnost, potřeba vyššího množství vzorku a zároveň vzorek by neměl obsahovat nečistoty. Metoda není příliš vhodná pro sloučeniny, které jsou špatně rozpustné ve vodě, protože může dojít k vysrážení ve vodné fázi a tím ke zkreslení hodnoty [5].

2. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*

Princip stanovení distribučního koeficientu pomocí RP-HPLC je, že stacionární fáze kolony je nepolární (zastupuje nám to oktanolovou fázi v třepací metodě) a polární mobilní fázi, kterou je voda a methanol. Ve většině případů nelze použít pouze vodnou složku jako mobilní fázi, protože voda má nízkou eluční sílu, proto se k vodné fázi přidává organický modifikátor, většinou methanol. Protože se distribuční koeficient stanovuje mezi vodnou a organickou fází v klasické metodě [5], je potřeba změřit několik isokratických měření s různým procentuálním zastoupením methanolu v mobilní fázi. Následně je nutné provést extrapolaci na pouze vodnou mobilní fázi a z retenčních časů pro jednotlivé složení mobilní fáze vypočítat kapacitní faktor pro vybrané standardy se známou hodnotou log *P*. Vytvoří se korelační graf mezi naměřenýma hodnotami log k_w a tabelovanými hodnotami log *P* a daná rovnice regrese se použije pro výpočet neznámých hodnot. Výhodou této metody je nižší spotřeba vzorku, rychlejší analýza, sloučeniny mohou být nerozpustné ve vodě a vzorky pro analýzu mohou obsahovat nečistoty. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je vhodná pro stanovení látek s hodnotou distribučního koeficientu od 0 do 6 [6].

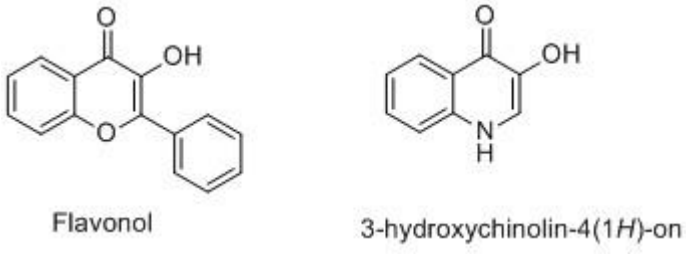
2.1.2. Deriváty 3-Hydroxychinolin-4(1H)-onu

Již od 60. let minulého století jsou chinolony studovány. Tyto látky jsou analoga od přírodních látek flavonů (Obrázek 1). Chinolin-4(1*H*)-ony můžeme rozdělit do čtyř základních skupin podle vývoje. Do první generace patří kyselina nalidixová a kyselina oxolinová, obě byly antibiotika vyvinuté v 60. a 70. letech. Kyselina pipemidová patří do druhé generace a sloužila k léčbě infekcí močového ústrojí. Třetí generace léčiv chinolonů byla vyvinuta na konci 80. let a do této skupiny patří fluorované deriváty. Zavedením molekuly fluoru do skeletu chinolonu měla za následek zvýšení aktivity a tyto látky se projevily jako širokospektrální antibiotika, která se využívala k léčbě dýchacích cest, prostatitidy a kapavky. Do čtvrté generace patří Trovafloxacin a Sparfloxacin, který se využívá výhradně jako rezervní antibiotikum. Mezi nežádoucí účinky zmiňovaných léčiv patří nevolnost, zvracení, bolesti v kloubech a může dojít k poškození kloubní chrupavky u rostoucích jedinců [7, 8].



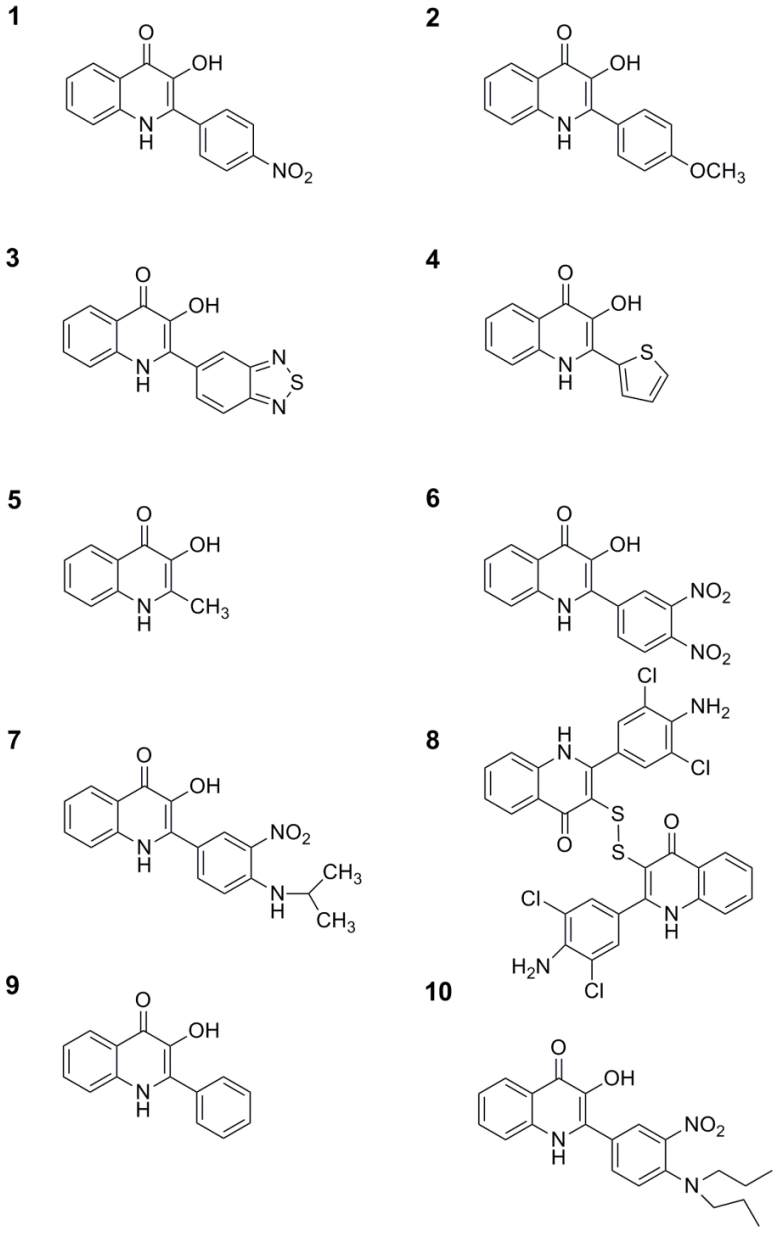
Obrázek 1 struktura flavonu a chinolin-4(1*H*)-onu

Další vývoj v syntéze chinolonů nastal zavedením hydroxyskupiny do polohy tři a vznikly 3-hydroxychonolin-4(1*H*)-ony (3HQ), které jsou odvozeny od přírodních látek flavonolů u nichž je prokázána vysoká biologická aktivita (Obrázek 2)[7, 8].



Obrázek 2 Struktura flavonolu a 3HQ

V roce 1986 byla poprvé zmíněna biologická aktivita derivátů chinolonů, 3-hydroxy-graveolin, který byl izolován z nadzemní části routy chalebské (lat. Ruta Chalapensis). 3-hydroxychinolony (3HQ) jsou několik let syntetizovány na katedře organické chemie. Tyto sloučeniny se vyznačují svojí širokou biologickou aktivitou jakou je protirakovinný, protizánětlivý, diuretický, antivirový účinek, a jsou tedy vhodnými potenciálními kandidáty pro nová léčiva [9]. V této práci bylo testováno deset strukturně odlišných derivátů 3HQ, které byly připraveny na katedře organické chemie skupinou pana prof. Hradila (Obrázek 3).



Obrázek 3 Struktury derivátů 3HQ

2.2. Disociační konstanta

Hodnota disociační konstanty (pKa) je důležitým parametrem, který indikuje stupeň disociace molekul v roztoku při různých hodnotách pH. Mnoho fyzikálně-chemických a biologických vlastností, přírodních i syntetických sloučenin, se řídí vzájemným působením kyselých a bazických skupin. V takových sloučeninách popisuje pKa mnoho metabolických aspektů například dopravu přes membrány. Léčiva jsou obecně slabé kyseliny a zásady, které se v závislosti na pH prostředí, mohou vyskytovat disociované nebo nedisociované formě. Je-li látka disociovaná tzn., že je polárnější (hydrofilní) lze ji rozpustit ve vodě. Zatímco látky nedisociované, jsou více nepolárnější (lipofilní) a mají nižší rozpustnost ve vodě, ale snadněji prostupují lipidickými membránami v biologickém prostředí. Při orálním podání léčivo může postupovat z úst do žaludku, do tenkého střeva a následně do tlustého střeva. V žaludku je nejnižší hodnota pH (1 – 3) tzn., že slabá kyselina nebude téměř disociovaná a bude mít lipofilnější charakter a bude se absorbovat v žaludku. Zatímco hodnota pH v tlustém střevě je 8 tzn., že zásadité látky nebudou disociovány a budou absorbovány v tlustém střevě. Podle hodnoty pKa lze určit, v jaké části zažívacího traktu bude léčivo absorbováno. Léčivo je z 50% disociováno, jestli je hodnota pKa rovno pH. Čím více jsou léčiva disociovaná tím lépe se rozpouštějí ve vodě a v krevním řečišti. Proto studium disociační konstanty je významné především pro biologii, farmacii, lékařství a další vědecké obory [10 - 12].

Kyseliny a zásady můžeme definovat pomocí Brönstedtovy teorie, která říká, že kyselina je látka, které je schopna odštěpit vodíkový kationt a zásada je látka, která je schopná přijmout vodíkový kationt. Jestli se látka bude disociovat, určuje disociační konstanta pKa. Henderson-Hasselbalchova rovnice popisuje vztah mezi pH a disociační konstantou a také poměr mezi disociovanou a nedisociovanou části [11].

$$AH \leftrightarrow A^- + H^+ \qquad B + H^+ \leftrightarrow BH^+$$

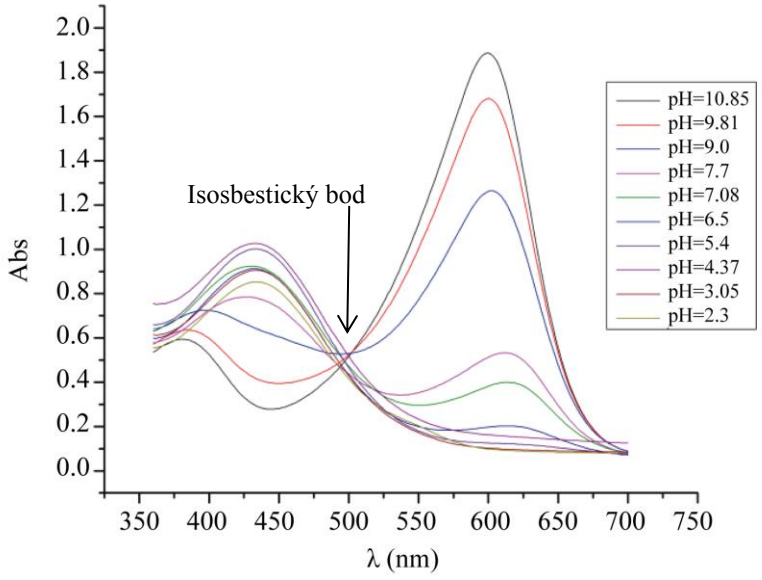
$$pKa = pH + log\left(\frac{[AH]}{[A^-]}\right) \qquad pKa = pH + log\left(\frac{[BH^+]}{[B]}\right)$$

2.2.1. Metody stanovení disociační konstanty

Disociační konstantu můžeme stanovit několika metodami. Mezi nejčastější metody, které se v dnešní době používají je spektrofotometrie, potenciometrie nebo kapalinová chromatografie. Potenciometrie je metoda, která vyžaduje větší množství vzorku, které se může pohybovat v jednotkách nebo i dokonce v desítkách miligramů. Zatímco pro stanovení disociační konstanty pomocí kapalinové chromatografie nám stačí desetiny nebo setiny miligramu [13-16].

1. *Spektrofotometrie*

Spektrofotometrické stanovení disociační konstanty lze použít tehdy, jestli sloučenina absorbuje záření v UV/VIS oblasti. Podstatou spektrofotometrického stanovení je, že protonovaná a neprotonovaná forma absorbují při různých vlnových délkách. Je potřeba změřit absorpční spektra obou forem a poté je změřit v jednotlivých hodnotách pH pufru. Isosbestický bod je hodnota vlnové délky, při které je hodnota absorbance nezávislá na vlnové délce (Obrázek 4). Závislost absorbance, při vlnové délce, kdy dochází k největší změně absorbance na pH (v tomto případně λ = 425 a 600 nm), protonované nebo neprotonovné formy je sigmoidní křivka a v bodu inflexe můžeme odečíst hodnotu pKa (pH = pKa) [13, 14]. Nevýhodou této metody je, že studovaná sloučenina nesmí obsahovat nečistoty, které by mohly zkreslit měření. Výhodou je, že tato metoda je poměrně jednoduchá a relativně rychlá.



Obrázek 4 Absorpční spektra pro různé hodnoty pH převzato [10]

2. *Potenciometrie*

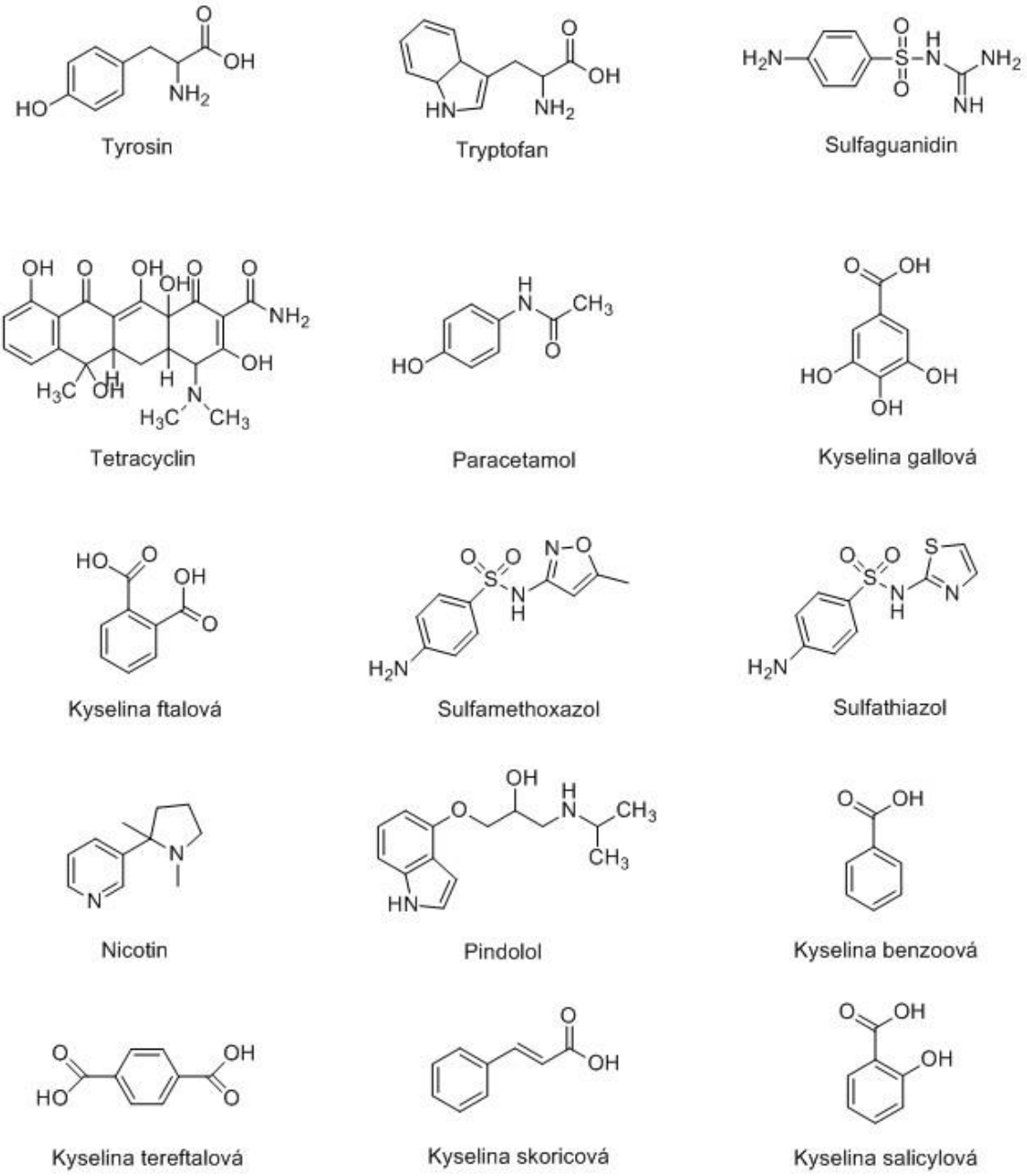
Potenciometrické stanovení je další metoda pro stanovení disociační konstanty. Měří se závislost přidaného titračního činidla na změně pH a hodnota pH v inflexním bodě odpovídá hodnotě disociační konstanty. Lze postupovat dvěma způsoby. Jestli je látka dostatečné rozpustná ve vodě, je tato metoda celkem jednoduchá a rychlá, ale nevýhodou je, že velmi málo látek je rozpustných ve vodě a při tomto stanovení je potřeba větší množství látky (jednotky až desítky miligramů) [15]. Jestli je látka špatně rozpustná ve vodě, můžeme použít organické směsi pro zvýšení rozpustnosti, ale tato metoda vyžaduje minimálně tři měření s různým procentuálním zastoupení organické části a vody ve směsi a následnou extrapolaci pouze na čistou vodu. Což samozřejmě velmi časově prodlužuje samotné stanovení. V literatuře je popsáno několik postupů. Lze použít směs methanol – voda v procentuálním zastoupením methanolu od 30 do 60 % v/v [15] nebo je také popsaná metoda s využitím směsi MDM – voda (MDM – methanol, dioxan, acetonitril) [16]. Tato směs rozpouštědel pomáhá zvýšit rozpustnost látek než samotný methanol s vodou. V obou případech je potřeba provést několik měření v různém procentuálním zastoupení organické rozpouštědlo – voda a následně provést extrapolaci na čistou vodu pomocí Yasuda-Sheldovského vztahu, který vyjadřuje vztah p*Ka* a složení rozpouštědla [15, 16].

3. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*

Stejně jako u potenciometrie můžeme také u HPLC použít dvě metody, lze buď použít pouze vodnou mobilní fázi. Zde jsme limitování typem kolony a lipofilitou látek. Můžeme použít pouze kolony, které jsou vhodné pouze pro vodnou fázi a jejich pH stabilita je co nejširší (2 – 12). Tato metoda je vhodná pouze pro látky s nižší lipofilitou, protože během analýzy musí dojít k jejich eluci pomocí vodné mobilní fáze, která má malou eluční sílu. V tomto případě nemusíme použít extrapolaci a celková analýza je minimálně třikrát rychlejší [17]. Druhá možnost, které je v literatuře popsaná je využít organický modifikátor (většinou methanol) pro zvýšení eluční síly. V tomto případě můžeme analyzovat látky, které jsou lipofilnější, ale opět je potřeba provést několik měření a extrapolovat na vodnou fázi, což nám prodlužuje celkovou dobu stanovení p*Ka* minimálně třikrát oproti první metody, kde je použita pouze vodná fáze [18]. Výhodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie je, že můžeme analyzovat látky hůře rozpustné ve vodě, analyty mohou být ve složitějších směsích a mohou obsahovat nečistoty.

2.2.2. Standardy pro stanovení disociační konstanty

Pro stanovení disociační konstanty byly vybrány běžně dostupné standardy s tabelovanými hodnotami p*Ka* a log *P*, které jsou běžně používané ve farmaceutickém průmyslu. Byly vybrány sloučeniny, aby pokryly co nejširší rozsah. Hodnoty log *P* se pohybují v rozmezí od -2,26 až do +2,26, hodnoty p*Ka* jsou od kyselé oblasti (2,24) až po bazickou oblast (11,24). Studované sloučeniny můžete vidět na Obrázku 5.



Obrázek 5 Struktury použitých standardů

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie

Deriváty chinolonu 1-10 (>98%, připraveno na Katedře organické chemie), voda (Milli-Q RG, Millipore, Intertech, Bedford, MA, USA), methanol (HPLC – gradient grade, Sigma – Aldrich, Steinheim, Německo), pufr MOPS (>99,5%, Sigma – Aldrich, Steinheim, Německo), kyselina mravenčí (p. a., Lach-ner, Neratovice, Česká Republika). Oktanol (HPLC), anisol, acetofenon, benzylalkohol, brombenzen, ethylbenzoát a trichloethylen (p. a., Sigma – Aldrich, Steinheim, Německo). Standardní roztoky pufrů pro kalibraci pH-metru (Hamilton Duracal buffers, pH 4.01 ± 0.01 and 7.00 ± 0.01). Pro přípravu Britton-Robinsonova pufru byla použita kyselina fosforečná (p. a.), kyselina octová (p. a.) a kyselina boritá (p. a.) všechny (Lach-ner, Neratovice, Česká Republika). Diethylamin (p. a.), tyrosin (99%), tryptofan (pro biochemii), sulfaguanidin (98%), tetracyclin (88%), paracetamol (98%), kyselina gallová (p. a.), kyselina ftalová (p. a.), sulfamethoxazol (99,5%), sulfathiazole (99%), nikotin (99%), pindolol (98%), kyselina benzoová (p. a.), kyselina skořicová (98%), kyselina salicylová (p. a.), kyselina tereftalová (98%) byly zakoupeny od (Sigma – Aldrich, Steinheim, Německo).

3.2. Přístrojové vybavení

Všechna chromatografická měření byla prováděna na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Alliance (Waters, MA, USA) s kvartérní pumpou, autosamplerem a PDA detektorem. Data byla vyhodnocena pomocí softwaru Empower (verze 3).

Pro měření pH byl použit pH metr (XS Instrument, Capri, Italy) se skleněnou kombinovanou elektrodou SENTEK P11 (SENTEK, Braintree, Britanie).

3.3. Pracovní postupy

3.3.1. Příprava pracovních roztoků a vzorků

Byly připraveny zásobní roztoky derivátů 3HQs v methanolu o koncentraci 1 mg/ml, z těchto zásobních roztoků byly připraveny vzorky v 50/50 methanol/voda o koncentraci 0,2 mg/ml a přefiltrovány přes stříkačkový filtr. Stejným postupem byly připraveny vzorky standardů pro stanovení disociační konstanty, ale konečná koncentrace používaných roztoků byla 0,1 mg/ml ve vodě.

Pro přípravu mobilní fáze, pro stanovení distribučního koeficientu, byl použit methanol s 0,25 % v/v oktanolem a voda sycená oktanolem. Byl použit pufr, 20 mM MOPS (pH = 7,4) a voda s 0,1 % v/v kyseliny mravenčí (pH = 3,0).

Byly použity dva pufry pro stanovení disociační konstanty. Kyselý pufr byl Britton-Robinsonův o koncentraci 0,01 mol/l (pH = 2,2) a zásaditý pufr 0,1 % v/v diethylaminu ve vodě (pH = 11,3).

3.3.2. Chromatografická separace

1. *Stanovení log P pomocí HPLC*

Mobilní fáze pro stanovení distribučního koeficientu obsahovala vodnou část 20 mM pufr MOPS (pH = 7,4) nebo vodu s 0,1 % v/v kyseliny mravenčí ve vodě a organickou část methanol s 0,25 % v/v oktanolu. Bylo použito šest analytických kolon, jejichž parametry jsou sumarizované v Tabulce 1. Separační podmínky jsou shrnuty v Tabulce 2. Distribuční koeficienty byly stanoveny následujícím způsobem: ze sady isokratických měřeních při různém obsahu methanolu v mobilní fázi (každé měření bylo 3x opakováno a RSD byla menší jak 5%), byly stanoveny hodnoty úseku na ose y závislosti log k – procentuální zastoupení methanolu (log k_w) pro jednotlivé standardy (anisol, acetofenon, benzylalkohol, brombenzen, ethylbenzoát, trichlorethylen). log k_w je odhadem kapacitního faktoru pro zcela vodnou mobilní fázi. Stejným způsobem byly určeny hodnoty log k_w pro jednotlivé chinolony. Hodnoty distribučního koeficientu pro 3HQ byly zjištěny pomocí korelace mezi naměřenými hodnotami log k_w a tabelovanými hodnotami log P pro standardy.

Tabulka 1 Použité kolony a jejich parametry

Kolona	Výrobce	Délka (mm)	ID (mm)	Velikost částic (µm)	Průtok (mil/min)	Obsah uhlíku (%)
xBridge C18	Waters	50	3,0	3,5	1,0	18
Triart C18	YMC	50	3,0	5,0	1,0	20
Kinetex C18	Phenomenex	50	3,0	2,6	0,2	12
Cortecs C18+	Waters	50	3,0	2,7	0,5	5,7
xSelect HSS T3	Waters	50	3,0	2,5	0,4	11
xSelect phenyl-hexyl	Waters	50	2,1	2,5	0,2	14

Tabulka 2 Obsah methanolu v mobilní fázi pro jednotlivé sloučeniny a kolony (obsah methanolu byl měněn po 5%)

Kolona	xBridge C18	Triart C18	Kinetex C18	Cortecs+ C18	xSelect HSS T3	xSelect phenyl-hexyl
Sloučenina	% MeOH	% MeOH	% MeOH	% MeOH	% MeOH	% MeOH
Anisol	35 – 60	35 – 60	40 – 65	45 – 70	55 – 75	40 – 60
Acetofenon	40 – 65	35 – 60	40 – 65	45 – 70	55 – 75	40 – 60
Benzylalkohol	35 – 60	35 – 60	40 – 65	45 – 70	55 – 75	40 – 60
Brombenzen	40 – 65	40 – 65	40 – 65	45 – 70	55 – 75	40 – 60
Ethylbenzoát	40 – 65	35 – 60	40 – 65	45 – 70	55 – 75	40 – 60
Trichlorethylen	40 – 65	40 – 60	40 – 65	45 – 70	55 – 75	40 – 60
1	35 – 60	35 – 60	40 – 65	45 – 70	50 – 75	40 – 60
2	35 – 60	35 – 60	40 – 65	45 – 70	50 – 75	40 – 60
3	35 – 60	35 – 60	40 – 65	45 – 70	50 – 75	40 – 60
4	35 – 60	35 – 60	40 – 65	45 – 70	50 – 75	40 – 60
5	15 – 35	15 – 35	25 – 50	45 – 70	50 – 75	40 – 60
6	35 – 60	35 – 60	40 – 65	45 – 70	50 – 75	40 – 60
7	35 – 60	45 – 65	50 – 80	45 – 70	50 – 75	40 – 60
8	35 – 60	35 – 60	40 – 65	45 – 70	50 – 75	40 – 60
9	35 – 60	35 – 60	40 – 65	45 – 70	50 – 75	40 – 60
10	60 – 80	60 – 80	60 – 85	55 – 80	55 – 80	40 – 60

2. *Stanovení pKa pomocí HPLC*

Disociační konstanta byla stanovena pomocí kolony YMC Triart C18 (YMC Co., Kyoto, Japonsko) o dvou různých délkách pro polární 50 mm a více lipofilnější látky 20 mm, I.D. 2.0 mm, velikost částic 5 µm. Separace byla provedena pomocí isokratické eluce o průtoku 1 mil/min pro 20 mm kolonu a 0,5 mil/min pro 50 mm kolonu. Teplota kolony byla 25 °C a objem nástřiku 5 µl. Mobilní fáze A byl Britton-Robinsonův pufr a mobilní fáze B byl diethylamin 0,1 % v/v ve vodě. Pomocí nastavení směšovacího ventilu v HPLC čerpadle byly nastaveny jednotlivé poměry mezi kyselým a zásaditým pufrem a výsledné pH bylo změřeno pomocí pH-metru. Mísení pufrů bylo nastaveno, aby se pokryla celá škála pH od 2,2 do 11,3 (Tabulka 3). Každá analýza byla třikrát opakována.

Tabulka 3 Obsah Britton-Robinsonova pufru v mobilní fázi bez a s 5 % MeOH v mobilní fázi a výsledné pH

Eluent A (%)	pH mobilní fáze	pH mobilní faze s 5 % MeOH	Relativní změna (%)
100	2.50	2.52	0.79
60	3.54	3.57	0.83
50	4.10	4.15	1.20
45	4.47	4.51	0.89
40	4.92	5.07	2.96
35	5.94	6.01	1.16
30	6.61	6.66	0.75
27.5	7.10	7.14	0.56
25	7.82	7.75	-0.90
22.5	8.70	8.58	-1.40
20	9.31	9.2	-1.20
15	9.84	9.72	-1.23
10	10.47	10.4	-0.67
0	10.77	10.7	-0.65

3.3.3. Stanovení distribučního koeficientu pomocí třepací metody

Protože nebyly publikovány hodnoty distribučních koeficientů výše zmiňovaných derivátů chinolonu, byly stanoveny pomocí standardní třepací metody, aby se tyto hodnoty mohly porovnat s daty naměřenými pomocí HPLC. Do plastových zkumavek o objemu 15 ml byl přidán 9,8 ml 0,01 M fosfátového pufru pH = 7,4, 200 µl zásobního roztoku chinolonu v dimethylsulfoxidu o koncentraci 1 mg/ml a 1 ml oktanolu. Směs se míchala na míchačce po dobu čtyř hodin. Poté se zkumavka vložila do centrifugy a při 2500 rpm se nechala centrifugovat 15 minut, aby se dostatečně od sebe oddělila organická a vodná vrstva. Vodná fáze před a po ekvilibraci byla analyzována pomocí UV/VIS spektrometru a pomocí Rovnice 1 byl vypočítán distribuční koeficient. Každé měření bylo třikrát opakováno a RSD byla menší než 5 %.

$$D = \frac{A_0 - A_1}{A_1} \cdot \frac{V_{vodná}}{V_{okt.}} \qquad \text{(Rovnice 1)}$$

A_0 = absorbance před ekvilibrací

A_1 = absorbance po ekvilibraci

$V_{vodná}$ = objem vodné váze

$V_{okt.}$ = objem oktanolové fáze

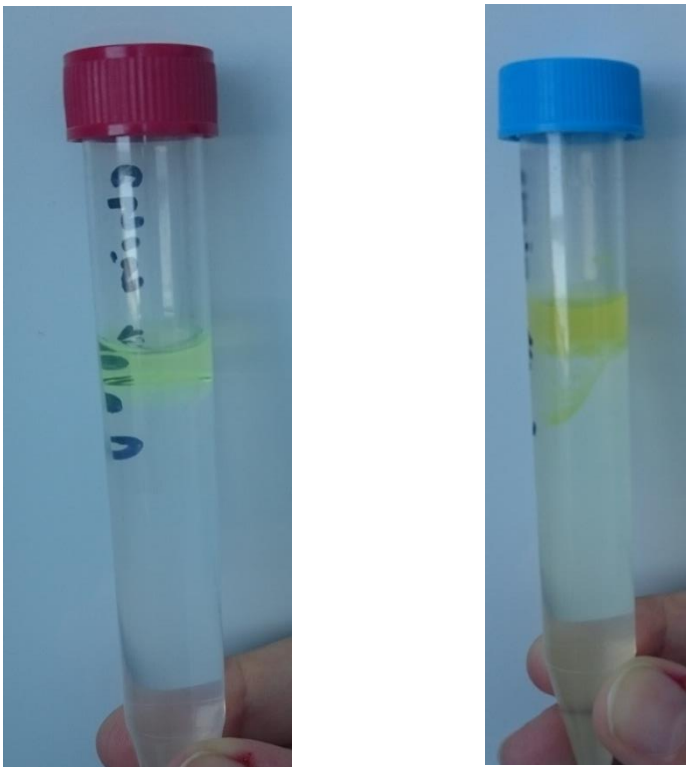
4. Výsledky a diskuze

4.1. Spektrofotometrické stanovení distribučního koeficientu

Jak již bylo zmíněno výše, v literatuře nebyly publikovány hodnoty distribučních koeficientů studovaných chinolonů. Proto byla použita klasická třepací metoda jako standardní. Bohužel během dalších analýz chinolonů, které jsou nerozpustné ve vodě, bylo zjištěno, že dochází k částečnému vysrážení vzorku během třepání (Obrázek 6 b). Což může mít za následek zkreslení naměřených hodnot distribučních koeficientů. Vysrážení vzorků během třepání bylo pozorováno u dalších skupin chinolonů. Lze tedy usoudit, že extrémní polární povahy použitých rozpouštědel (voda a oktanol) nejsou zcela vhodné pro stanovení distribučních koeficientů chinolonů, ve kterých dochází k špatné rozpustnosti a následnému vysrážení, což může mít za následek zkreslení měření.

Třepací metoda je zdlouhavá, nevhodná pro látky, které nejsou rozpustné ve vodě. Pro stanovení je potřeba čisté látky bez obsahu nečistot, které také mohou zkreslit výsledek měření.

(A) (B)



Obrázek 6 Zkumavka s vodnou a oktanolovou fázi. A) chinolon, který je omezeně rozpustný ve vodě – nevysrážený B) chinolon, který je nerozpustný ve vodě - vysrážený

4.2. Chromatografické stanovení distribučního koeficientu

4.2.1. Korelace mezi log kw a log P pro standardy

Běžně dostupné a levné látky jako jsou anisol, acetofenon, brombenzen, benzylalkohol, ethylbenzoát a trichlorethylen byly vybrány jako standardy. Hodnoty log *P* standardů pro korelaci mezi log k_w a log *P* byly převzaty z literatury [19] (hodnoty log *P* pro anisol 2.1, acetofenon 1.7, benzylalkohol 1.1, brombenzen 3.0, ethylbenzoát 2.6 a trichlorethylen 2.4). Standardy byly vybrány, aby pokryly rozsah hodnot log *P* od 1 do 3, protože sloučeniny v tomto rozsahu jsou vhodnými kandidáty potenciálních léčiv. Bylo použito šest standardů pro jednoduchost a rychlost analýz. Obecně je známo, že se chinolony špatně separují na reverzních fázích a dochází ke značnému rozmývání a chvostování píku. Jak bylo popsáno v literatuře [20, 21] nižší pH napomáhá lepší separaci na koloně a píky jsou užší a vykazují lepší symetrii. Proto v této práci byly použity dva pufry o různém pH. Jeden z nich byla voda okyselená kyselinou mravenčí 0,1% v/v o pH = 3 a druhý byl 20 mM pufr MOPS pH = 7,4, který svou hodnotou pH simuloval fyziologické pH. V Tabulce 4 jsou uvedeny hodnoty směrnice *S*, úseku k_w a lineární regrese závislosti *k* - % MeOH, která byla lineární a hodnota regresního koeficientu $R^2 > 0,99$ byla pro téměř všechny použité standardy a kolony.

Tabulka 4 Hodnoty směrnice *S*, úseku k_w a regresního koeficientu R^2 pro standardy

	Anisol	Acetofenon	Benzylalkohol	Brombenzen	Ethylbenzoát	Trichlorethylen
xBridge C18 pH = 3.0						
S	-0.0233	0.0209	-0.0141	-0.0342	-0.0300	-0.0299
log kw	1.6804	1.1243	0.5127	2.7423	2.2409	2.3495
R^2	0.9950	0.9922	0.9537	0.9989	0.9975	0.9981
xBridge C18 pH = 7.4						
S	-0.0238	-0.0209	-0.0167	-0.0302	-0.0301	-0.0299
log kw	1.6965	1.1074	0.6545	2.8185	2.2368	2.3400
R^2	0.9972	0.9916	0.9844	0.9944	0.9972	0.9981
Triart C18 pH = 3.0						
S	-0.0262	-0.0227	-0.0162	-0.0360	-0.0326	-0.0321
log kw	2.0505	1.4338	0.7733	3.0339	2.5927	2.6551
R^2	0.9983	0.9985	0.9863	0.9992	0.9990	0.9993

Triart C18 pH = 7,4						
S	-0.0261	-0.0210	-0.0162	-0.0339	-0.0315	-0.0324
log kw	2.0525	1.3440	0.7803	3.4680	2.5434	2.6701
R^2	0.9982	0.9962	0.9885	0.9999	0.9984	0.9991
Kinetex C18 pH = 3.0						
S	-0.0270	-0.0220	-0.0196	-0.0355	-0.0316	-0.0310
log kw	1.8198	1.1595	0.7466	2.7429	2.885	2.3296
R^2	0.9998	0.9994	0.9982	0.9999	0.9996	0.9998
Kinetex C18 pH = 7.4						
S	-0.0270	-0.0226	-0.0216	-0.0364	-0.0331	-0.0316
log kw	1.8100	1.1821	0.8401	2.7867	2.3576	2.3629
R^2	0.9981	0.9978	0.9881	0.9997	0.9970	0.9989
Cortecs C18+ pH = 3.0						
S	-0.0281	-0.0253	-0.0246	-0.0364	-0.0333	-0.0326
log kw	1.8522	1.2932	0.8428	2.7921	2.3778	2.3977
R^2	0.9977	0.9925	0.9736	0.9974	0.9983	0.9985
Cortecs C18+ pH = 7,4						
S	-0.0263	-0.0255	-0.0183	-0.0348	-0.0319	-0.0314
log kw	1.7873	1.1740	0.5574	2.7277	2.3339	2.3571
R^2	0.9951	0.9918	0.9646	0.9983	0.9977	0.9982
HSS T3 pH= 3.0						
S	-0.0267	-0.0221	-0.0320	-0.0179	-0.0317	-0.0351
log kw	1.8933	1.2536	2.4267	0.7407	2.4707	2.8167
R^2	0.9958	0.9880	0.9978	0.9996	0.9982	0.9985
HSS T3 pH = 7.4						
S	-0.0270	-0.0234	-0.0325	-0.0213	-0.0319	-0.0353
log kw	1.8957	1.3083	2.4370	0.9504	2.4565	2.7953
R^2	0.9924	0.9761	0.9838	0.9767	0.9970	0.9973
xSelect phenly-hexyl pH = 3.0						
S	-0.0304	-0.0242	-0.0178	-0.0374	-0.0337	-0.0289
log kw	1.7921	1.1506	0.4972	2.5806	2.1921	1.9737
R^2	0.9965	0.9920	0.9782	0.9920	0.9963	0.9881
xSelect phenyl-hexyl pH = 7,4						
S	-0.0277	-0.0227	-0.0184	-0.0380	-0.0337	-0.0351
log kw	1.6228	1.0596	0.5057	2.5931	2.1783	2.2625
R^2	0.9994	0.9956	0.9877	0.9999	0.9993	0.9978

Jak můžete vidět v Tabulce 5 korelace mezi log k_w a log P pro standardy byla téměř lineární. Nejvyšší hodnota regresního koeficientu byla dosažena na koloně xSelect phenyl-hexyl (0,9895) a xBridge (0,9776) při pH = 3. Z Tabulky 5 je také zřejmé, že změna pH měla zanedbatelný vliv na korelaci mezi log k_w log P.

Tabulka 5 Korelace mezi log kw a log *P* pro standardy při pH 3,0 a 7,4

Column	pH 3.0	R^2	pH 7.4	R^2
XBridge C18	log *P* = 0.8546 log k_w + 0.6745	0.9776	log *P* = 0.8756 log k_w + 0.5993	0.9690
Triart C18	log *P* = 0.9259 log k_w + 0.3521	0.9490	log *P* = 0.9232 log k_w + 0.3772	0.9506
Kinetex C18	log *P* = 0.9360 log k_w + 0.4628	0.9701	log *P* = 0.9563 log k_w + 0.3935	0.9622
Cortecs C18+	log *P* = 0.9010 log k_w + 0.4148	0.9749	log *P* = 0.8139 log k_w + 0.6670	0.9756
HSS T3	log *P* = 0.9339 log k_w + 0.5375	0.9692	log *P* = 0.9185 log k_w + 0.3370	0.9627
XSelect Phenyl-Hexyl	log *P* = 0.8910 log k_w + 0.6381	0.9895	log *P* = 0.8355 log k_w + 0.7266	0.9687

4.2.2. Závislost log k - % MeOH pro chinolony

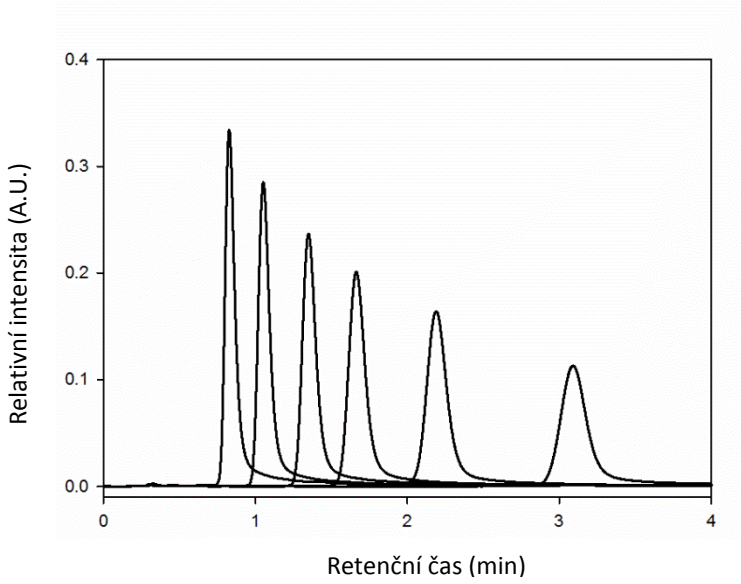
Rovnice lineární regrese závislosti log *k* – % MeOH, stejně jako hodnota regresního koeficientu R^2 pro studované sloučeniny **1 - 10** a použité kolony jsou shrnuty v Tabulce 6. Na Obrázku 7 můžete vidět ilustrativní chromatogramy derivátu **1** při různém obsahu methanolu v mobilní fázi. Ve většině případu byl regresní koeficient $R^2 > 0,99$. Nižší hodnoty R^2 byly pozorovány pro sloučeniny **1** (Kinetex pH = 7,4), **3** (xBridge pH = 3,0 a 7,4), **5** (xBridge pH = 3,0, Kinetex pH = 3,0 a 7,4) a **8** (Kinetex pH = 7,4). Z hodnot uvedených v Tabulce 6 vyplývá, že nejvhodnější kolona byla YMC Triart C18 $R^2 > 0,99$. Na druhou stranu, kolona xSelect phenyl-hexyl nebyla vhodná pro separaci chinolonů, Deriváty **7** a **10** vykazovaly špatné chromatografické chování, chinolony se nerovnoměrně eluovaly z kolony a nebylo možné je vyhodnotit. V Obrázku 8 je znázorněna závislost log *k* na procentuálním zastoupení methanolu v mobilní fázi. Pro pH = 3,0 (nahoře) a pH = 7,4 (dole) pro kolonu Triart C18. Jak můžete vidět na závislostech, změna pH měla zdánlivě větší vliv než u standardů. Zvláště hodnoty log k_w, což představuje 100 % vodní fáze, se u některých derivátů lišily při různém pH. Derivát **5** měřen na koloně Kinetex C18 měl při pH = 3 hodnotu log k_w rovnu 0,6228 a při pH = 7,4 byla hodnota log k_w rovna 1,1424. Rozdíl mezi hodnotami naměřených při pH 3,0 a 7,4, alespoň pro kolonu Triart C18 je patrný z Obrázku 8. Ale obecně lze říci, že změna pH neměla zásadní vliv na hodnoty distribučních koeficientů. Možné vysvětlení může spočívat v acidobazických vlastnostech studovaných derivátů. Lze tedy očekávat, že deriváty chinolonů se nevyskytují v disociované formě při pH = 3,0 ani při pH = 7,4 a proto se jejich retenční časy výrazně nemění. Jak již bylo zmíněno výše, v literatuře [20 21] při nižším pH dochází k lepší separaci chinolonů, tvar píku je více symetrický a píky jsou užší. Bohužel v tomto případě neměla změna pH vliv na separaci a celkovou analýzu. Pro potvrzení

předpokladu, že nedochází k disociaci derivátů chinolonů v kyselém a neutrálním prostředí, byla stanovena disociační konstanta pro derivát **1** pomocí UV/VIS spektrometrie [22].

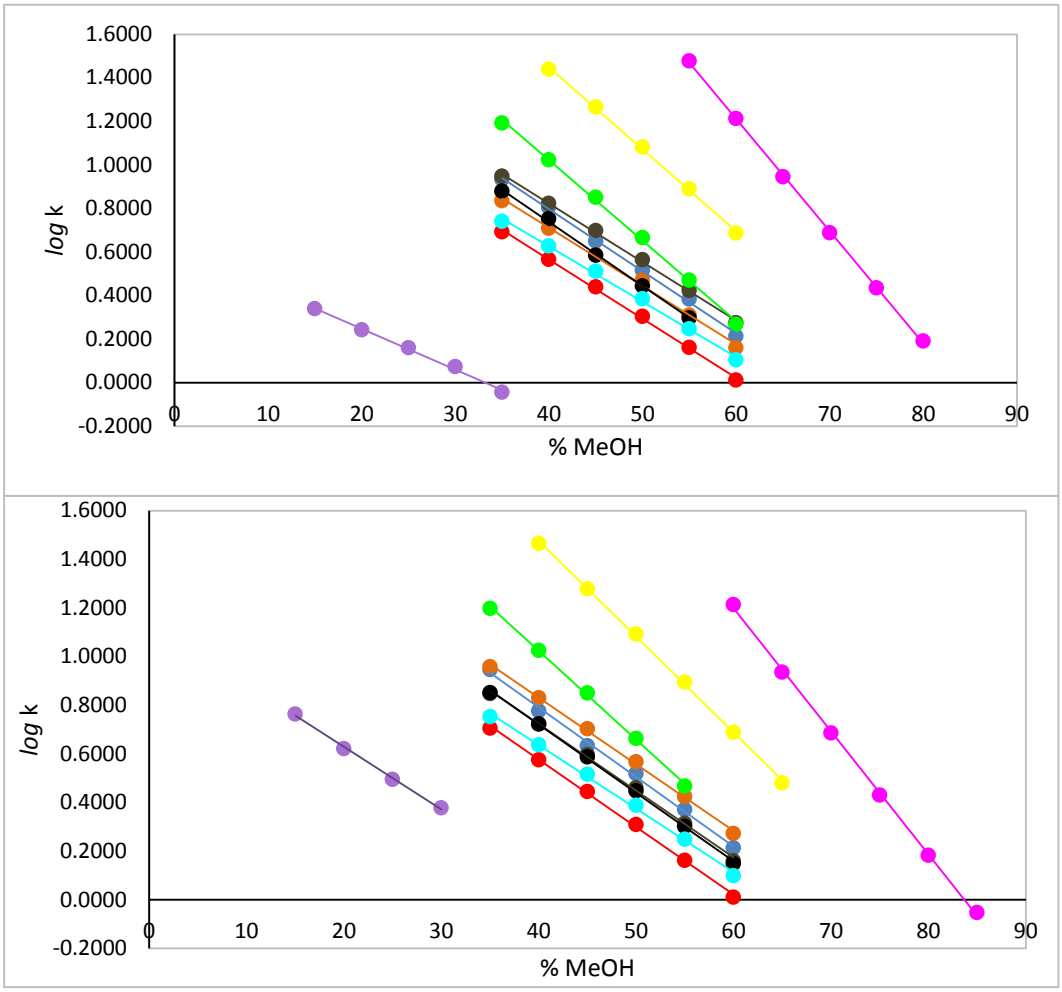
Tabulka 6 Hodnoty směrnice *S*, úseku *kw* a regresního koeficientu R^2 pro chinolony 1 – 10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
xBridge C18 pH = 3.0										
S	-0.0208	-0.0259	-0.0290	-0.0296	-0.0190	-0.0275	-0.0352	-0.0352	-0,0243	-0.0490
log kw	1.6582	1.4687	1.7523	1.7851	0.4930	1.3883	2.5357	2.1647	1.3338	3.9205
R^2	0.9989	0.9996	0.9798	0.9982	0.9702	0.9999	0.9992	0.9993	0.9994	0.9999
xBridge C18 pH = 7.4										
S	-0.0243	-0.0254	-0.0279	-0.0255	-0.0229	-0.0272	-0.0352	-0.0352	-0.0242	-0.0471
log kw	1.4682	1.4541	1.7158	1.4518	0.5886	1.3788	2.5327	2.1123	1.3309	3.7929
R^2	0.9904	0.9956	0.9795	0.9998	0.9931	0.9956	0.9993	0.9989	0.9975	0.9997
Triart C18 pH = 3.0										
S	-0.0285	-0.0275	-0.0269	-0.0294	-0.0188	-0.0271	-0.0382	-0.0370	-0.0254	-0.0516
log kw	1.9383	1.8195	1.8969	1.9157	0.6228	1.6509	2.9821	2.5000	1.6431	4.3062
R^2	0.9985	0.9950	0.9987	0.9993	0.9961	0.9987	0.9992	0.9986	0.9977	0.9997
Triart C18 pH = 7,4										
S	-0.0286	-0.0274	-0.0273	-0.0281	-0.0257	-0,0277	-0,0394	-0,0365	-0,0261	-0,0506
log kw	1.9333	1.8193	1.9242	1.8446	1.1424	1.6849	3.0501	2.4822	1.6786	4.2312
R^2	0.9976	0.9981	0.9987	0.9910	0.9981	0.9989	0.9994	0.9992	0.9976	0.9994
Kinetex C18 pH = 3.0										
S	-0.0299	-0.0288	-0.0292	-0.0296	-0.0278	-0.0290	-0.0396	-0.0415	-0.0284	-0.0495
log kw	1.8260	1.7151	1.8631	1.7581	0.9320	1.5938	2.8926	2.5695	1.6344	3.9760
R^2	0.9920	0.9982	0.9999	0.9982	0.9621	0.9983	0.9995	0.9997	0.9995	0.9993
Kinetex C18 pH = 7.4										
S	-0.0358	-0.0290	-0.0281	-0.0290	-0.0208	-0.0292	-0.0394	-0.0467	-0.0272	-0.0497
log kw	2.1701	1.7222	1.7912	1.7278	0.5839	1.6077	2.6595	2.8596	1.5684	3.9871
R^2	0.9741	0.9981	0.9916	0.9999	0.9678	0.9998	0.9997	0.9872	0.9997	0.9994
Cortecs C18+ pH = 3.0										
S	-0.0317	-0.0315	-0.0293	-0.0305	-0.0267	-0.0320	-0.0388	-0.0450	-0.0301	-0.0529
log kw	1.8158	1.7141	1.7760	1.6578	0.5436	1.5515	2.7580	2.5674	1.5657	4.1554
R^2	0.9765	0.9902	0.9955	0.9942	0.9191	0.9888	0.9956	0.9923	0.9921	0.9994
Cortecs C18+ pH = 7,4										
S	-0.0282	-0.0273	-0.0256	-0.0261	-0.0144	-0.0257	-0.0380	-0.0397	-0.0259	-0.0531
log kw	1.6563	1.5410	1.6377	1.4520	0.1024	1.1566	2.7467	2.2583	1.4033	4.2149
R^2	0.9959	0.9940	0.9893	0.9971	0.9029	0.9960	0.9988	0.9964	0.9931	0.9978
HSS T3 pH= 3.0										
S	-0.0320	-0.0314	-0.0301	-0.0270	-0.0202	-0.0271	-0.0363	-0.0379	-0.0282	-0.0491

log kw	2.0668	1.9641	2.0457	1.6661	0.6240	1.5444	2.7904	2.4264	1.7223	4.1110
R^2	0.9761	0.9935	0.9959	0.9937	0.9168	0.9824	0.9980	0.9972	0.9945	0.9994
HSS T3 pH = 7.4										
S	-0.0291	-0.0282	-0.0273	-0.0273	-0.0166	-0.0277	-0.0372	-0.0390	-0.0270	-0.0526
log kw	1.8472	1.7289	1.8353	1.6655	0.4731	1.5457	2.8009	2.4307	1.6111	4.2818
R^2	0.9938	0.9946	0.9951	0.9918	0.9779	0.9964	0.9958	0.9937	0.9960	0.9963
xSelect phenyl-hexyl pH = 3.0										
S	-0.0330	-0.0341	-0.0337	-0.0365	-0.0242	-0.0346	-	-0.0494	-0.0314	-0.0520
log kw	2.1002	2.0104	2.1624	2.1295	0.7496	2.0090	-	3.4228	1.7748	2.5307
R^2	0.9927	0.9944	0.9773	0.9968	0.9647	0.9990	-	0.9998	0.9982	0.9999
xSelect phenyl-hexyl pH = 7,4										
S	-0.0302	-	-0.0281	-0.0302	-0.0160	-0.0281	-	-0.0399	-0.0275	-
log kw	1.9391	-	1.8472	1.7765	0.2870	1.6292	-	2.6218	1.5546	-
R^2	0.9959	-	0.9939	0.9973	0.9955	0.9856	-	0.9947	0.9923	-

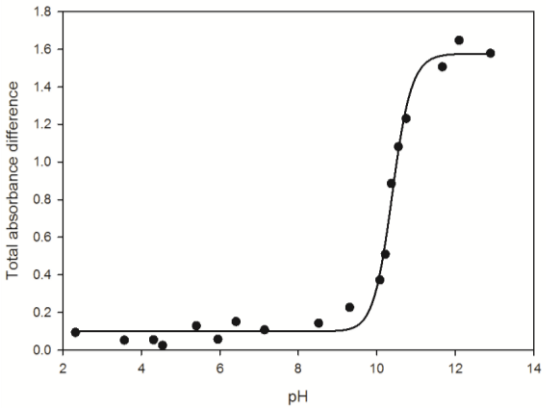


Obrázek 7 Ilustrativní chromatogramy pro derivát 1 s různým obsahem methanolu v mobilní fázi (YMC Triart C18 se zvyšující se retencí 60, 55, 50, 45, 40 a 35 % MeOH)



Obrázek 8 Srovnání chromatogramů v závislosti log k na obsahu methanolu v mobilní fázi při dvou pH 3,0 a 7,4. pH = 3 (nahoře), pH = 7,4 (dole) pro kolonu Triart C18. (1 modrá, 2 okrová, 3 tm. hnědá, 4 černá, 5 fialová, 6 červená, 7 žlutá, 8 sv. zelená, 9 tyrkysová, 10 růžová)

V obrázku 9 lze vidět disociační křivku, ze které lze stanovit hodnotu p*Ka* 10,25 pro derivát **1**. K disociaci základních chinolonů dochází až v silně alkalickém prostředí. Tímto experimentem byl potvrzen předpoklad ohledně acidobazického chování derivátů chinolonů v kyselém a neutrálním prostředí.



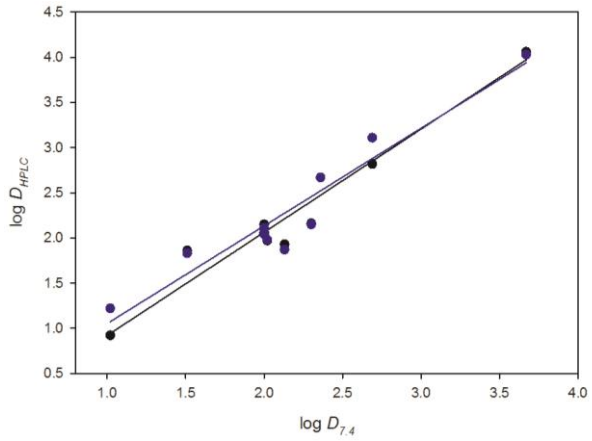
Obrázek 9 Závislost absorbance na změně pH pro derivát 1

4.2.3. Korelace mezi standardní třepací metodou a HPLC metodou.

Distribuční koeficienty byly stanoveny pomocí korelace mezi log k_w a log P pro standardy pro určité hodnoty pH a kolony. V Tabulce 8 můžete vidět hodnoty distribučních koeficientů naměřený pomocí klasické třepací metody a HPLC metody. Distribuční koeficienty stanovené pomocí HPLC byly relativně v dobré shodě s hodnotami distribučních koeficientů stanovených pomocí třepací metody. Nejvyšší hodnoty R^2 korelace mezi log P a log k_w pro deriváty chinolonu byly nalezeny pro pH = 7,4 u kolon Triart C18 (R^2 0,9436) a Cortecs C18+ (R^2 0,9756). Na Obrázku 10 lze vidět téměř shodné závislosti mezi hodnotami distribučních koeficientů získaných pomocí HPLC metody a klasické třepací metody pro dvě různé pH. Z naměřených dat je zřejmé, že hodnota pH měla malý vliv na korelaci mezi třepací a HPLC metodou. V Tabulce 7 můžeme také vidět, že nejlepší hodnoty regresního koeficientu jsou pro kolonu Triart C18 a Cortecs C18+. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s hodnotami již publikovány dříve pro různé sady sloučeniny (R^2 0,9490; R^2 0,9370 nebo R^2 0,9430) [23]. Na koloně xSelect phenyl-hexyl probíhala špatná separace derivátů chinolonu. Během analýzy docházelo k špatné separaci chinolonů, špatný a široký tvar píků, které nebylo možné vyhodnotit. I když korelace pro standardy byla velmi dobrá, bohužel tato kolona byla nepoužitelná pro chinolony.

Tabulka 7 Korelace mezi log P a log k_w pro chinolony v pH = 3,0 a pH = 7,4

Kolona	pH = 3.0	R^2	pH = 7.4	R^2
XBridge C18	log D = 0.9514k_w + 0.2474	0.8536	log D = 1.0528k_w – 0.0646	0.8639
Triart C18	log D = 1.0787k_w – 0.0399	0.9193	log D = 1.1262k_w – 0.1839	0.9436
Kinetex C18	log D = 1.0863k_w + 0.0488	0.9044	log D = 1.1720k_w – 0.1463	0.9077
Cortecs C18+	log D = 1.1939k_w – 0.3647	0.9271	log D = 1.2243k_w – 0.5017	0.9499
HSS T3	log D = 1.1434k_w – 0.4133	0.5810	log D = 1.2301k_w – 0.4492	0.9033
XSelect CSH Phenyl-Hexyl	log D = 0.5443k_w + 1.3592	0.3960	log D = 1.0810k_w + 0.0585	0.7813



Obrázek 10 Korelace mezi log $D_{7,4}$ (pomocí třepací metody) a log D stanovený pomocí HPLC pro kolonu Cortecs C18+ (černá pH = 3,0, modrá pH = 7,4)

Tabulka 7 Srovnání distribučních koeficientů naměřených pomocí třepací metody a HPLC metody

Cmpd.	Třepací metoda	xBridge pH 3.0	xBridge pH 7.4	Triart pH 3.0	Triart pH 7.4	Kinetex pH 3.0	Kinetex pH 7.4	Cortecs pH 3.0	Cortecs pH 7.4	HSS T3 pH 3.0	HSS T3 pH 7.4	XSelect pH 3.0	XSelect pH 7.4
1	2.30	2.06	1.86	2.03	2.01	2.13	2.40	2.05	2.02	2.26	2.03	2.51	2.35
2	2.00	1.91	1.85	1.94	1.93	2.03	2.00	1.96	1.92	2,18	1.92	2.43	-
3	2.00	2.13	2.06	2.00	2.00	2.16	2.06	2.01	2.00	2.24	2.02	2.56	2.27
4	2.02	2.14	1.84	2.01	1.94	2.07	2.01	1.91	1.85	1.93	1.87	2.54	2.21
5	1.02	2.13	1.15	1.00	1.46	1.35	1.00	0.90	0.75	1.06	0.77	1.31	0.97
6	1.51	1.84	1.79	1.81	1.83	1.93	1.90	1.81	1.69	1.83	2.02	2.43	2.09
7	2.69	2.76	2.72	2.85	2.77	3.06	2.83	2.90	2.90	2.86	2.91	-	-
8	2.36	2.46	2.38	2.47	2.37	2.78	3.00	2.73	2.51	2.56	2.57	3.69	2.92
9	2.13	1.80	1.75	1.80	1.83	1.96	1.87	1.83	1.81	1.97	1.82	2.22	2.02
10	3.67	3.86	3.73	3.89	3.59	4.01	4.00	4.16	4.10	3.97	4.27	2.89	-

4.3. Stanovení disociační konstanty pomocí kapalinové chromatografie

4.3.1. Vodná mobilní fáze

Bylo testováno 15 dobře známých farmaceutických standardů o různé chemické struktuře a různých acidobazických vlastnostech. Získané hodnoty p*Ka* byly porovnány s literaturou [24, 25]. Důvodem pro měření retenčních dat výhradně ve vodné mobilní fázi, bylo zjednodušení a urychlení měření. Klasický postup stanovení p*Ka* pomocí HPLC spočívá v měření závislostí kapacitního faktoru na pH pro různé obsahy methanolu v mobilní fázi a následnou extrapolací pro plně vodnou fázi se získá hodnota p*Ka* ve vodě [26, 27]. Metoda s vodnou mobilní fází, umožňuje stanovit disociační konstantu pouze při použití změny pH mobilní fáze. Z toho vyplývá, že není potřeba použít extrapolaci na plně vodnou fázi a stanovení disociační konstanty je minimálně třikrát rychlejší. Jako eluent A byl použit Britton-Robinsonův pufr (0,01 M kyselina boritá, 0,01 M kyselina fosforečná a 0,01 M kyselina octová). Diethylamin (0,1 % v/v ve vodě) byl použit jako eleunt B. pH v rozsahu 2,2 až 11,3 bylo upraveno pomocí eluentů A a B ve směšovači HPLC a výsledné pH bylo měřeno pomocí pH-metru na výstupu z detektoru. Původní složení Britton-Robinsonova pufru o koncentraci 0,04 mol/l bylo sníženo na 0,01 mol/l, aby se zabránilo případnému zanášení HPLC systému. Jako zásaditá část mobilní fáze byl původně používán 0,01 M NaOH, ale protože při použití roztoku hydroxidu bylo pozorováno ucpávání systému, byl roztok hydroxidu nahrazen těkavější sloučeninu diethylaminem. Po této úpravě mobilní fáze nedocházelo k problémům s ucpáváním systému. Ale při snížení koncentrace Britton-Robinsonova pufru došlo ke zvýšení jeho pH z 1,8 na 2,2. Pomocí takto modifikovaných pufrů bylo možné stanovit hodnoty disociačních konstant vybraných látek v rozmezí od 2,2 do 11,3. Při přípravě pufrů nebylo vždy možné přesně namíchat stejnou koncentraci, aby výsledná škála pH byla stejná. Vždy při přípravě nových pufrů bylo potřeba znovu přeměřit celý rozsah pH v HPLC, aby se zajistilo co nejpřesnější měření. V Tabulce 9 a 10 můžete vidět rozdíl pH mezi vodou fází a fází s obsahem 5 % methanolu a také časovou stálost pH. pH bylo měřeno na začátku přípravy po 2 a 4 hodinách v celém rozsahu pH a bylo dokázáno, že pufry jsou stabilní během měření a hodnota RSD je ve většině případů pod 1 % (Tabulka 10). Byla použita kolona YMC Triart C18 o dvou délkách 20 mm a 50 mm. Tato kolona umožňuje provádět analýzy v širokém rozsahu pH (1 – 12) a lze ji použít ve 100 % vodném

prostředí. Rychlost průtoku 1 mil/min umožnila eluovat látky v přijatelných časech. Nejvyšší retenční čas měla kyselina skořicová 21 min při nejnižší hodnotě pH.

Tabulka 8 Obsah Britton-Robinsonova pufru bez a s přídavkem methanolu v mobilní fázi

Eluent A (%)	Mobilní fáze pH	pH mobilní fáze s 5 % MeOH	Relativní změna (%)
100	2.50	2.52	0.79
60	3.54	3.57	0.83
50	4.10	4.15	1.20
45	4.47	4.51	0.89
40	4.92	5.07	2.96
35	5.94	6.01	1.16
30	6.61	6.66	0.75
27.5	7.10	7.14	0.56
25	7.82	7.75	-0.90
22.5	8.70	8.58	-1.40
20	9.31	9.2	-1.20
15	9.84	9.72	-1.23
10	10.47	10.4	-0.67
0	10.77	10.7	-0.65

Tabulka 9 Časová stabilita pufrů v různém pH

	Výhradně vodnná mobilní fáze				**Mobilní faze obsahující 5% v/v MeOH**			
	čas (h)				čas (h)			
Eluent A (%)	0	2	4	RSD (%)	0	2	4	RSD (%)
100	2.14	2.16	2.44	6.10	2.36	2.30	2.32	1.07
60	2.95	2.97	2.87	1.47	3.00	3.00	2.96	0.63
50	3.98	3.97	3.69	3.46	3.94	3.93	3.99	0.66
45	4.37	4.36	4.18	2.03	4.39	4.43	4.44	0.49
40	4.83	4.81	4.63	1.89	4.87	4.87	4.93	0.58
35	5.78	5.82	5.64	1.34	5.76	5.81	5.88	0.85
32.5	6.53	6.58	6.48	0.63	6.45	6.47	6.49	0.25
30	6.98	6.98	6.91	0.47	6.89	6.91	6.94	0.30
27.5	7.57	7.53	7.50	0.38	7.27	7.27	7.30	0.19
25	8.49	8.44	8.40	0.44	7.68	7.71	7.71	0.18
22.5	9.11	9.05	9.01	0.45	8.33	8.36	8.33	0.17
20	9.65	9.58	9.50	0.64	8.97	8.92	8.88	0.41
15	10.39	10.27	10.14	0.99	9.76	9.67	9.58	0.76
10	10.71	10.54	10.43	1.09	10.12	10.05	9.94	0.74
0	11.26	11.22	11.16	0.37	10.95	10.90	10.82	0.49

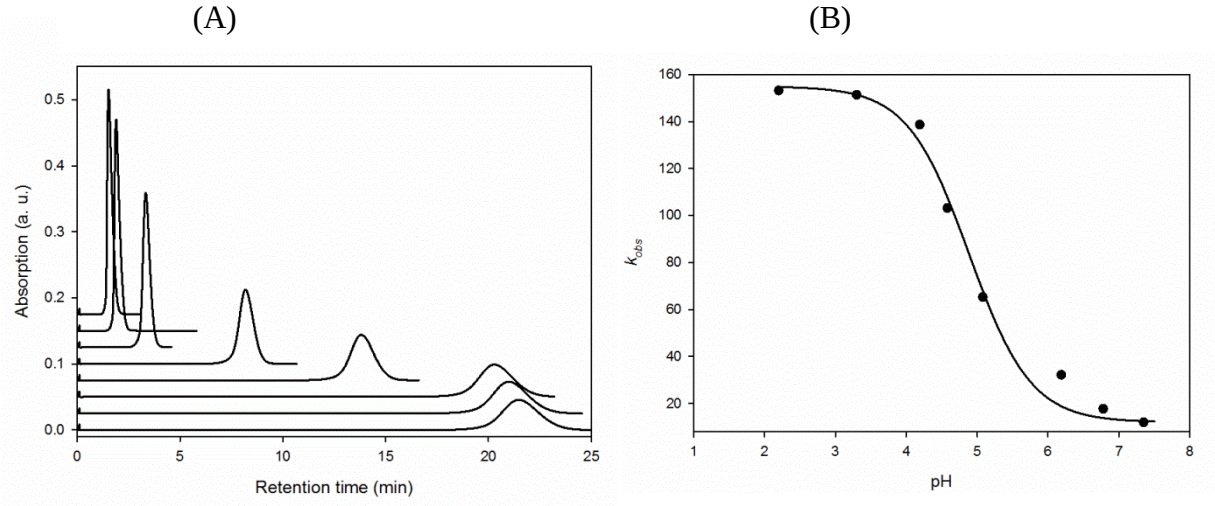
4.3.2. Výpočet disociační konstanty

Hodnoty kapacitních faktorů k_{obs} byly vyneseny do grafu v závislosti na pH a hodnoty byly proloženy křivkami podle Rovnice 1 pro kyseliny a Rovnice 2 pro zásady k získání hodnot p*Ka* (MS Excel Řešitel, verze 14). $k_{HA,}$ k_B a k_A^-, k_{BH}^+ jsou retenční faktory nenabitých a nabitých forem kyselin a zásad.

$$k_{obs} = \frac{k_{HA} + k_{A^-} \cdot 10^{pH-pK_a}}{1+10^{pH-pK_a}} \quad (1)$$

$$k_{obs} = \frac{k_B + k_{BH^+} \cdot 10^{pK_a-pH}}{1+10^{pK_a-pH}} \quad (2)$$

Na Obrázku 9a jsou znázorněné ilustrativní chromatogramy pro různé pH a také proložení křivky závislosti k_{obs} na pH mobilní fáze pro kyselinu skořicovou (Obrázek 9b).



Obrázek 8 (A) Ilustrativní chromatogramy pro různé pH a (B) závislost kapacitního faktoru na pH mobilní fáze pro kyselinu skořicovou

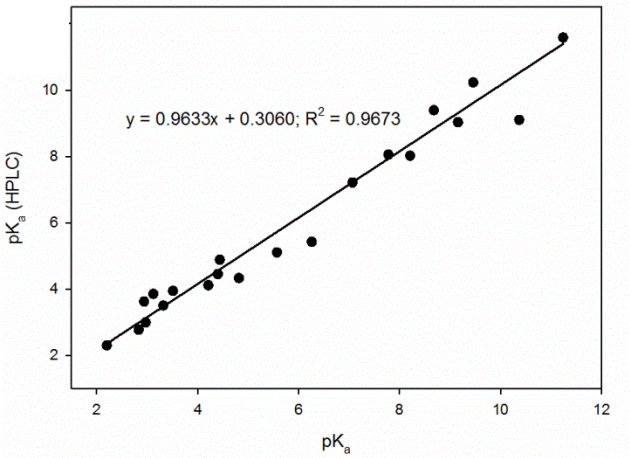
Chromatograficky stanovené hodnoty disociačních konstant v porovnání s referenčními hodnotami převzatými z literatury jsou uvedeny v Tabulce 11. V Tabulce 11 jsou uvedeny také hodnoty log *P* z důvodu demonstrace použitelnosti této metody v relativně širokém rozmezí lipofility Obecně lze říci, že byla získána dobrá shoda mezi naměřenými a referenčními hodnotami p*Ka* pro kyselé sloučeniny nebo sloučeniny, které nesou kyselou skupinu. Na Obrázku 10 je ukázána korelace mezi hodnotami p*Ka* převzatými z literatury a naměřenými hodnotami pKa pomocí HPLC. Velmi dobré shody měly sloučeniny tyrosin,

tryptofan, kyselina gallová, pindolol, kyselina skořicová a kyselina salicylová. Hodnota regresního koeficientu R^2 byla 0,9673. Nicméně, některé naměřené hodnoty p*Ka* pomocí HPLC nebyly totožné s referenčními hodnotami pro paracetamol, kyselinu ftalovou a tereftalovou. Tento fakt naznačuje, že chromatografické chování ionogenních analytů nemůže být vysvětleno pouze solvofobní teorií [28-30], která předpokládá, že vyšší retenci má neutrální forma analytu na nepolární stacionární fázi ve srovnání s iontovou formou stejné sloučeniny. Musíme brát také v úvahu interakce specifických míst s analytem na povrchu stacionární fáze [31].

Tabulka 10 Chromatograficky stanoveny hodnoty p*Ka* (HPLC) a hodnoty p*Ka* převzaté z literatury (lit.)

Sloučenina	log *P*	pK_{a1}(lit.)	pK_{a2}(lit.)	pK_{a1}(HPLC)[b]	pK_{a2}(HPLC)[b]
Tyrosin[b]	-2.26	2.24[9]	9.04[9]	2.30 (±0.02)	10.37 (±0.02)
Tryptofan[b]	-1.10	2.38[9]	9.34[9]	2.77 (±0.01)	8.68 (±0.01)
Sulfaguanidin	-0.38	-	11.24[10]	-	11.58 (±0.03)
Tetracyclin[a]	-0.56	3.32[10]	7.78[10]	3.63 (±0.01)	8.05 (±0.01)
Paracetamol	0.46	9.58[11]	-	10.23 (±0.03)	-
Kyselina gallová	0.70	4.40[11]	-	4.45 (±0.02)	-
Kyselina ftalová	0.70	2.94[9]	5.43[9]	3.62 (±0.01)	6.26 (±0.02)
Sulfamethoxazol	0.79	1.83[10]	5.57[10]	-	5.18 (±0.01)
Sulfathiazol	0.88	-	7.20[9]	-	7.21 (±0.01)
Nikotin	1.17	3.12[9]	8.02[9]	3.85 (±0.02)	8.21 (±0.02)
Pindolol[a]	1.75	9.16[10]	-	9.03 (±0.01)	-
Kyselina banzoová	1.87	4.20[9]	-	4.11 (±0.03)	-
kyselina tereftalová	2.00	3.54[9]	4.34[9]	3.94 (±0.02)	4.33 (±0.01)
Kyselina skořicová	2.13	4.44[9]	-	4.88 (±0.01)	-
Kyselina salicylová	2.26	2.97[12]	-	2.99 (±0.01)	-

[a] mobilní phase s 5% MeOH v/v
[b] kolona o délce 50 mm



Obrázek 9 Korelace mezi hodnotami p*Ka* z literatury a získány stanovením pomocí HPLC

4.3.3. Pufr s 5 % methanolu

Vzhledem k vysokým retenčním časům, některých testovaných analytů (pindolol, tetracyclin) pouze ve vodné mobilní fázi, byl zkoumán účinek methanolu (5 % v/v) v mobilní fázi na stanovení p*Ka*. Z Tabulky 9, kde jsou porovnány hodnoty pH pufru bez a s 5 % přídavkem methanolu, můžete vidět, že relativní změna je zanedbatelná. Největší relativní změna byla pozorována v mírně kyselých oblastech pH (pro pH 5 byla relativní změna 2,96 %). Na základě studií extrapolace Yasuda-Shedlovsky pro směs methanol – voda [28, 29], lze očekávat, že přídavek 5 % methanolu do mobilní fáze významně neovlivní hodnoty p*Ka* analytů. I když hodnota log *P* tetracyclinu je -0,55 a byla očekávána nízká retence, nicméně retenční čas tetracyclinu byl 30 minut pouze v kyselé oblasti pH. Pindolol nebyl eluován z kolony během jedné hodiny v alkalickém prostředí. A protože tyto hodnoty nejsou použitelné pro high-throughput analýzu, byl přidán 5 % methanol do mobilní fáze. Přidáním methanolu do mobilní fáze se snížila retence studovaných látek. Jak lze vidět v Tabulce 11 hodnoty disociačních konstant jsou v dobré shodě s referenčními hodnotami.

5. Závěr

V této práci bylo studováno stanovení distribučního koeficientů derivátů chinolonu pomocí HPLC. Bylo použito několik chromatografických kolon z reverzní fázi C18. Vzhledem k tomu, že chinolony mají špatné separační vlastnosti, byla použita kyselá a neutrální mobilní fáze. Bylo popsáno v literatuře, že chinolony se obecně lépe separují v kyselé oblasti pH, avšak kyselé pH nemělo zásadní vliv na separaci ani na samotné stanovení distribučního koeficientu. Jako standardy byly použity látky snadno cenově dostupné. Nejlepší linearita (R^2 0,9895) korelace mezi log k_w a log P pro standardy bylo dosaženo na koloně xSelect phenyl-hexyl. Bohužel stacionární fáze phenyl-hexyl se projevila jako nevhodná pro separaci chinolonů. Nejvyšší linearitu (R^2 0,9499) mezi log $D_{7,4}$ a log D_{HPLC} bylo dosaženo pro kolonu Cortecs C18+ při pH = 7,4. Popsaná metoda nabízí rychlý odhad hodnot distribučních koeficientů pro sloučeniny, které jsou špatně rozpustné ve vodě, u kterých může dojít k jejich vysrážení během klasické třepací metody a zkreslit výsledky.

Navržena HPLC metoda za použití výhradně nebo téměř vodné mobilní fáze, nabízí rychlé stanovení disociační konstanty, pro sloučeniny v celkem širokém rozsahu hodnot lipofility (log P od -2,26 do +2,26). Hodnota disociačních konstant pro jednodušší látky může být stanovena pomocí pouhých osmi měřeních. Navržena metoda nevyžaduje extrapolaci, což značně urychluje celý postup. Metodika je vhodná pro velké série kandidátů léčiv produkovanými např. pomocí kombinatorální chemie, protože nevyžaduje potřebu jejich čištění, sloučeniny mohou být ve formě složitějších směsích a je potřeba pouze malé množství.

Výsledky v této práci byly publikovány v odborných časopisech:

Volná, T., Motyka, K., Hlaváč, J.: *Potential of High-Performance Liquid Chromatography for Distribution Coefficient Determination of 3-Hydroxyquinolin-4(1H)-one Derivatives.* Chromatographia, *79*, 1153 – 1163, (2016).

Volná, T., Motyka, K., Hlaváč, J.: *RP-HPLC determination of dissociation constant using solely aqueous mobile phase.* J. Pharm. Biomed. Anal.**,** *134*, 143 - 148, (2017).

6. Seznam použitých zkratek

3HQs	3-hydroxychinolin-4(1H)-ony
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
p*Ka*	Disociační konstanta
RP – HPLC	Reverzní fáze – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MDM	Methanol, dioxan, acetonitril – směs
RSD	Relativní směrodatná odchylka

7. Seznam použité literatura

[1] Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J.: *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.* Adv. Drug. Deliv. Rev. *23*, 3–25, (1997).

[2] Testa, B., Crivori, P., Reist, M., Carrupt, P.A.: *The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: concepts and examples*. Perspect Drug Discov, *17*, 179–211, (2000).

[3] Kwon, Y.: *Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists.* Springer Science+Business Media, 2001.

[4] Volná, T., Motyka, K., Hlaváč, J.: *Potential of High-Performance Liquid Chromatography for Distribution Coefficient Determination of 3-Hydroxyquinolin-4(1H)-one Derivatives.* Chromatographia, *79*, 1153 – 1163, (2016).

[5]<http://www.oecdilibrary.org/docserver/download/9710701e.pdf?expires=1481286516&id=id&accname=guest&checksum=C1DFF8BA935BDAA85DFE09A55B2D5DF9> staženo 9.12.2016

[6] Giaginis, C., Theocharis, S., Tsantili-Kakoulidou, A.: *Contribution to the standardization of the chromatographic conditions for the lipophilicity assessment of neutral and basic drugs*. Anal Chim Acta. *573*, 311–318, (2006).

[7] Yahyazadeh, A.; Yousefi, H.; *Synthesis, spectral features and biological activity of some novel hetarylazo dyes derived from 8-chloro-4-hydroxyl-2-quinolone*. Molecular and Biolomecular Spectroscopy. *117,* 696 – 701, (2014).

[8] Loya, S.; Rudy, A.; Tal, R; Kashman,Y.; Loya, Y.; Hizi, A.: *3,5,8-trihydroxy-4-Quinolone, a novel natural inhibitor of the reverse transcriptas of human immunodeficiency viruses type-1 and type-2.* Arch. Biochem Biophys, *309,* 315-322, (1994).

[9] Hradil, P. Hlaváč, J., Soural, M., Hajdúch, M., Kolář, M., Večeřová, R.: *3-Hydroxy-2-phenyl-4(1H)-quinolinones as Promising Biologically Active Compounds*. Mini-Rev. Med. Chem. *9*, (2009).

[10] Vidal-Salgado, L.E., Vergas-Hernández, C.: *Spectrofotometric Determination of the pKa, Isosbestic Point and Equation of Absorbance vs. pH for a Universal pH Indicator.* Am. J. Anal. Chem. 5, 1290 – 1301, (2014).

[11] Hynie, S.: *Farmakologie v kostce.* Tritona, Praha, 2001.

[12] Dostálek, M.: *Farmakokinetika,* Grada, 2006.

[13] <https://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/navody/spf_kata.pdf>, staženo 24.11.2016

[14] <http://www.upce.cz/fcht/uocht/spektrum/labkat-spektraldisoc.pdf>, staženo 24.11.2016

[15] Fallavena, P., R., B., Schapoval, E., E., S.: *pKa Determination of Nimesulide in Methanol-Water Mixture by Potentiometric Titration.* Int. J. Pharm. *158*, 109 – 112, (1997).

[16] Völgyi, G., Ruiz, R., Box, K., Comer, J., Bosch, E., Takács-Novák, K.: *Potentiometric and Spectrophotometric pKa Determination of Water-Insoluble Compounds: Validation Study in a New Cosolvent System.* Anal. Chim. Acta, *583*, 418 – 428, (2007).

[17] Volná, T., Motyka, K., Hlaváč, J.: *RP-HPLC determination of dissociation constant using solely aqueous mobile phase.* J. Pharm. Biomed. Anal.**,** *134*, 143 - 148, (2017).

[18] Wiczling, P., Markuszewski, J.M., Kaliszan, R.: *Determination of pKa by pH gradient Reversed-Phase HPLC*. Anal. Chem, *76*, 3069 – 3077, (2004).

[19] Mackay, D., Shiu, W.-Y., Ma K.-C., Lee S.C.: *Handbook of physical–chemical properties and environmental fate for organic chemicals,* 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, (2006).

[20] Ortori, C.A., Dubern, J.F., Chhabra, S.F., Cámara, M., Hardie, K., Williams, P., Barrett, D.A.: *Simultaneous Quantitative Profiling of N-acyl-ι-homoserine Lactone and 2-alkyl-4(1H)-Quinolone Families of Quorum-Sensing Signaling Molecules Using LC–MS/MS*. Anal. Bioanal. Chem. *399*, 839 – 850, (2011).

[21] Lépine, F., Milot, S., Déziel, E., He, J., Rahme, L.G.: *Electrospray/Mass Spectrometric Identification and Analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) Produced by Pseudomonas Aeruginosa*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. *15*, 862 – 869, (2004).

[22] Martinez, C.H.R., Dardonville, C.: *Rapid Determination of Ionization Constants (pK(a)) by UV Spectroscopy Using 96-well Microtiter Plates*. ACS Med. Chem. Lett. *4*, 142–145, (2013).

[23] Lombardo, F., Shalaeva, M.Y., Tupper, K.A., Gao, F.: *ElogD(oct): a tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and neutral compounds*. J. Med. Chem. *44*, 2490–2497, (2001).

[24] Lide R.D., CRC Handbook of Chemistry and Physics, 85th Ed., CRC Press, Boca Raton, 2007.

[25] Babić, S., Horvat A.J.M, Pavlović D.M., Kaštelan-Macan M.: *Determination of pK(a) values of active pharmaceutical ingredients*. Trends Anal. Chem., *26*, 1043 - 1061, (2007).

[26] Balani S.K., Devishree, V.S., Miwa, G.T., Gan, L.S., Wu, J.T., Lee, F.W.: *Strategy of utilizing in vitro and in vivo ADME tools for lead optimization and drug candidate selection*. Curr. Top. Med. Chem., *5*, 1033–1038, (2005).

[27] Tam, K.Y., Takács-Novák, K.: *Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study.* Anal. Chim. Acta, *434*, 157-167, (2001).

[28] Takács-Novák, K., Box, K.J., Avdeef, A.: *Potentiometric pK(a) determination of water-insoluble compounds: Validation study in methanol/water mixtures*. Int. J. Pharm., *151*, 235-248, (1997).

[29] Slater, B., McCormack, A., Avdeef, A., Comer, J.E.:,*pH-metric log P. 4. Comparison of partition coefficients determined by HPLC and potentiometric methods to literature values. J. Pharm.* Sci., *83*, 1280-1283, (1994).

[30] Horváth, C., Melander, W., Molnár, I.: *Liquid-chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases.* Anal. Chem., *49*, 142-154, (1977).

[31] Sýkora, D., Tesařová, E., Popl, M., *Interactions of basic compounds in reversed-phase high-performance liquid chromatography - Influence of sorbent character, mobile phase composition, and pH on retention of basic compounds*. J. Chromatogr. A, *758*, 37-51, (1997).