

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra organické chemie



**Stanovenie distribučnej konštanty  $\log D_{7,4}$  pomocou vysokoúčinnnej  
kvapalinovej chromatografie na reverzných fázach s gradientovou  
elúciou**

*Bakalárska práca*

Autor:	Veronika Pavlová
Študijný program:	Chemie
Študijný odbor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ štúdia:	Prezenčné
Vedúci práce:	RNDr. Adam Příbylka, Ph.D.

**Prehlásenie:**

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne pod vedením RNDr. Adama Příbylky, Ph.D. a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

Súhlasím s tým, aby bola moja práca sprístupnená v knižnici Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 15. 5. 2018

.....  
Podpis

**Pod'akovanie:**

V prvom rade chcem poďakovať vedúcemu mojej práce RNDr. Adamu Příbylkovi, PhD. za ochotu, vrúcny prístup a čas, ktorý mi venoval, ako aj za cenné rady a pripomienky, ktoré mi poskytol pri riešení tejto bakalárskej práce. Taktiež ďakujem Ing. Kamilu Motykovi, Ph.D. za prvotné vedenie mojej práce. V neposlednej rade patrí poďakovanie mojej rodine a priateľovi za veľkú trpezlivosť a podporu počas celého môjho štúdia.

## Bibliografická identifikácia:

Autor:	Veronika Pavlová
Názov práce:	Stanovenie distribučnej konštanty $\log D_{7,4}$ pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie na reverzných fázach s gradientovou elúciou
Typ práce:	Bakalárska práca
Pracovisko:	Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Školiteľ:	RNDr. Adam Příbylka, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2018
Abstrakt:	<p>Táto bakalárska práca sa zaoberá stanovením distribučného koeficientu <math>\log D</math> respektíve rozdeľovacieho koeficientu <math>\log P</math> pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie na obrátených fázach s gradientovou elúciou. Teoretická časť popisuje dôležitosť distribučného koeficientu ako významného parametru lipofility látok. Ďalej poskytuje prehľadnú literárnu rešerš zameranú na možnosti stanovenia distribučného koeficientu priamymi metódami trepania, pomalého miešania a mikro trepania a stanovenie metódami nepriamymi pomocou kvapalinovej chromatografie, s dôrazom kladeným na HPLC na obrátených fázach. Praktická časť je venovaná experimentálnemu overeniu korelácie medzi chromatografickým správaním analyzovanej látky a jej lipofilitou, vyjadrenou distribučným, respektíve rozdeľovacím koeficientom. Analýzou štandardov s rozličnými fyzikálno-chemickými vlastnosťami pri rôznych experimentálnych podmienkach (vrátane odlišného zloženie mobilnej fázy) na dvoch kolónach, bolo vytvorených niekoľko regresných modelov, pričom svojím rozsahom splňujú podmienku kladenú na tzv. „high-throughput“ metódu. Správnosť týchto regresných modelov bola následne otestovaná na troch vybraných látkach.</p>
Kľúčové slová:	distribučný koeficient, rozdeľovací koeficient, trepacia metóda, vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
Počet strán:	56
Počet príloh:	1
Jazyk:	Slovenčina

## **Bibliographical identification:**

Author: Veronika Pavlová

Title: Determination of distribution constant  $\log D_{7,4}$  using reversed phase high-performance liquid chromatography with gradient elution

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Advisor: RNDr. Adam Příbylka, Ph.D.

The year of presentation: 2018

Abstract: This bachelor thesis deals with the determination of the distribution coefficient  $\log D$ , respectively the partition coefficient  $\log P$ , by reverse phase high performance liquid chromatography with gradient elution. The theoretical part describes the importance of the distribution coefficient as a significant parameter of lipophilicity of substances. It also provides a literary overview focusing on the possibility of determining the distribution coefficient by direct methods including shaking, slow mixing and microshaking and determination by indirect methods using liquid chromatography, with emphasis on reversed phase HPLC. The practical part is dealing with the experimental verification of correlation between the chromatographic behavior of analyzed substance and its lipophilicity, which is expressed by the distribution coefficient. By analyzing standards with different physicochemical properties under different experimental conditions (including different mobile phase composition) on two columns, several regression models were created. These models fulfill by their range of application a condition placed on the so-called „high-throughput“ method and their accuracy was subsequently evaluated on three selected substances.

Keywords: distribution coefficient, partition coefficient, shake-flask method, high-performance liquid chromatography

Number of pages: 56

Number of appendixes: 1

Language: Slovak

**Zoznam skratiek:**

ACN	acetonitril
HEPES	kyselina 2[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]etánsulfónová
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
MF	mobilná fáza
MOPS	kyselina 3-( <i>N</i> -morfolino)propánsulfónová
Mr	relatívna molekulová hmotnosť
NP	system normálnych fáz
PDA detektor	detektor diodového poľa
RP	system obrátených fáz
SF	stacionárna fáza
TLC	tenkovrstevná chromatografia

# OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	CIELE PRÁCE .....	9
3	TEORETICKÁ ČASŤ .....	10
3.1	DISTRIBUČNÝ KOEFICIENT .....	10
3.2	STANOVENIE DISTRIBUČNÉHO KOEFICIENTU.....	13
3.2.1	PRIAME METÓDY .....	13
3.2.1.1	Metóda trepania .....	13
3.2.1.2	Metóda pomalého miešania.....	14
3.2.1.3	Metóda mikro trepania .....	14
3.2.1.4	Automatizovaná 96-jamková doska .....	15
3.2.2	NEPRIAME METÓDY .....	15
3.2.2.1	RP-HPLC.....	16
3.2.2.2	RP-TLC .....	27
3.2.2.3	Micelárna kvapalinová chromatografia.....	28
3.2.2.4	Výpočtové metódy.....	28
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	29
4.1	Skúmané látky.....	29
4.2	Prístrojové vybavenie.....	31
4.3	Chromatografické kolóny.....	31
4.4	Chemikálie .....	31
4.5	Príprava vzoriek a mobilných fáz .....	32
4.6	Separáčné podmienky .....	32
5	VÝSLEDKY a DISKUSIA .....	34
5.1	Vývoj metodiky.....	34
5.2	Stanovenie log <i>P</i> pomocou RP-HPLC s gradientovou elúciou.....	35
5.3	Retenčné charakteristiky a štatistické ukazovatele .....	36
5.4	Regresné modely – Kolóna XSelect HSS T3 XP – W.....	38
5.5	Regresné modely – Kolóna Kinetex® C18 – K.....	41
5.6	Aplikácia experimentálnych podmienok na vybrané látky .....	44
6	ZÁVER .....	48
7	ZOZNAM LITERATÚRY .....	49
8	PRÍLOHY .....	53

# 1 ÚVOD

Hodnotenie lipofility predstavuje jeden z kľúčových parametrov v posúdení látky ako potencionálneho kandidáta na nové liečivo. Znalosť rozdeľovacieho respektíve distribučného koeficientu, ako parametru slúžiaceho k vyjadreniu lipofility, umožňuje priblížiť správanie skúmanej látky v živých organizmoch. Pre stanovenie distribučného koeficientu existuje niekoľko metód, pričom spoločným menovateľom je ich snaha o čo najpresnejšie určenie rozdelenia látky medzi vodnú a organickú fázu.

Stále často využívaná trepacia metóda síce poskytuje pomerne presný odhad distribučného koeficientu, ale nejde opomenúť jej nevýhody ako sú prácnosť, zdĺhavosť, tvorba emulzií počas pretrepávania a nároky na čistotu stanovovanej látky. Z týchto dôvodov sa stále viac využívajú chromatografické metódy, ktoré tieto nedostatky odstraňujú. Použitie chromatografických metód je výhodné z hľadiska automatizácie, nižších nárokov na čistotu a relatívne malé množstvo látky potrebnej k analýze, čo predstavuje veľkú výhodu. V súčasnej dobe je neustála snaha o zlepšenie metodiky tak, aby splňovala podmienku tzv. high-throughput metódy, ktorá musí spĺňať požiadavky na rýchlosť, univerzálnosť a jednoduchosť.

Táto práca je zameraná na otestovanie experimentálnych podmienok vedúcich k rýchlemu stanoveniu distribučného koeficientu pomocou RP-HPLC s gradientovou elúciou, a to pre látky s rozdielnymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami, čím by splňovala predpoklad pre univerzálnosť tejto metódy.



## 2 CIELE PRÁCE

Cieľ práce možno zhrnúť do troch základných bodov:

- teoretické oboznámenie sa s metódami stanovenia distribučného koeficientu, s dôrazom kladeným na nepriame stanovenie vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou
- praktické zoznámenie sa s technikou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie a osvojenie si jej základných princípov
- pokúsiť sa nájsť a následne otestovať experimentálne podmienky pre stanovenie distribučných koeficientov vybraných látok, ktoré sa svojimi fyzikálno-chemickými vlastnosťami natoľko líšia, že zmienené experimentálne podmienky by bolo možné označiť za tzv. high-throughput.

## 3 TEORETICKÁ ČASŤ

### 3.1 DISTRIBUČNÝ KOEFICIENT

Lipofilita je jedna z najdôležitejších fyzikálno-chemických charakteristík látky. Charakterizuje distribúciu látky v dvojfázovom systéme, pričom vyjadruje, do akej miery látka uprednostňuje lipofilné prostredie pred vodným. Má rozhodujúcu úlohu vo farmakologickom správaní a aktivite liečiv, nakoľko práve ona rozhoduje o transporte látok z miesta podania na miesto ich účinku, transporte cez biologické membrány, ako aj o interakcii týchto látok s receptormi v mieste účinku.<sup>1-5</sup> K vyjadreniu lipofility slúži rozdeľovací koeficient.

**Rozdeľovací koeficient  $P$**  je definovaný ako pomer aktivít látky v dvojfázovom systéme v rovnovážnom stave. Pri nízkych koncentráciách možno aktivitu nahradiť rovnovážnou koncentráciou a rozdeľovací koeficient sa potom vypočíta podľa nasledujúceho vzťahu:

$$P = \frac{[HA]_o}{[HA]_v} \quad (1)$$

kde  $[HA]_o$  predstavuje rovnovážnu koncentráciu látky v organickom rozpúšťadle a  $[HA]_v$  je rovnovážna koncentrácia látky vo vodnom rozpúšťadle.<sup>6</sup>

Z uvedeného vzťahu vyplýva, že  $P$  je bezrozmerná veličina. Vzhľadom k veľkému rozsahu hodnôt, ktoré sú získavané pre rôzne zlúčeniny, je rozdeľovací koeficient prevádzaný na logaritmickú hodnotu  $\log P$ .<sup>7</sup> Rozdeľovací koeficient je tiež nazývaný rozdeľovacím koeficientom n-oktanol – voda. Toto pomenovanie vychádza z faktu, že najčastejšie používané organické rozpúšťadlo pre meranie  $\log P$  je práve n-oktanol a predstavuje zjednodušený model biologickej membrány. Z tohto dôvodu možno v literatúre pre rozdeľovací koeficient nájsť aj označenie  $P_{ok/w}$ .<sup>8</sup>

Rozdeľovací koeficient teda popisuje rozdielnú rozpustnosť látky vo vodnej a organickej fáze pri konkrétnom tlaku a teplote. Určovanie hodnoty  $\log P$  je smerodajné prevažne u látok, ktoré v roztoku nedisociujú/neprotonujú, čo znamená, že látka v roztoku nevytvára iónovú formu. V tomto prípade hodnota  $\log P$  nezávisí na pH. Väčšina biologicky aktívnych látok sú však slabé kyseliny alebo bázy, teda vo vodnom roztoku budú prítomné v oboch formách, v disociovej/protonovanej aj nedisociovej/neprotonovanej forme. Disociovaná/protonová forma sa však prevažne nerozdeľuje do organickej fázy, takže sa dá uvažovať, že k rozdeleniu medzi

vodné a organické rozpúšťadlo dochádza len pri nedisociovej/neprotonovanej forme.

Keďže celková koncentrácia látky zahŕňa koncentráciu každej formy v každom z rozpúšťadiel, bol zavedený **distribučný koeficient  $D$** , niekedy označovaný ako distribučný pomer alebo pravý rozdeľovací koeficient, ktorý je daný vzťahom:

$$D = \frac{[HA]_o}{[HA]_v + [A^-]_v} \quad (2)$$

pre slabú kyselinu a

$$D = \frac{[B]_o}{[B]_v + [BH^+]_v} \quad (3)$$

pre slabú bázu.

Člen  $[HA]_o$ ,  $[B]_o$  je rovnovážna koncentrácia nedisociovej/neprotonovanej formy látky v organickom rozpúšťadle,  $[HA]_v$ ,  $[B]_v$  je rovnovážna koncentrácia nedisociovej/neprotonovanej formy vo vodnom rozpúšťadle a  $[A^-]_v$ ,  $[BH^+]_v$  predstavuje rovnovážnu koncentráciu disociovej/protonovanej formy látky vo vodnom roztoku.<sup>7</sup>

Distribučný koeficient sa uvádza, tak ako rozdeľovací koeficient, v logaritmickej forme ako  $\log D$ . Ako už bolo uvedené vyššie, hodnota rozdeľovacieho koeficientu nezávisí na hodnote pH. Naproti tomu je hodnota  $\log D$  pH závislá, pretože stupeň disociácie/protonácie vo vodnej fáze je ovplyvnený pH tejto fázy a  $pK_a$  danej látky. Počas merania je pH vodnej fázy kontrolované pomocou pufro. Najvhodnejšie sa ukázalo pufrovať vodný roztok na pH 7,4, čo je fyziologické pH krvi. Za optimálnu hodnotu  $\log D_{7,4}$  pre absorpciu liečiva pri perorálnom podaní sa považuje hodnota medzi -0,5 až 2. Zlúčeniny s hodnotou  $\log D_{7,4}$  menšou ako -0,5 respektíve s hodnotou väčšou ako 2 majú nízku absorpciu, nakoľko v prvom prípade majú obmedzenú membránovú penetráciu, a teda nízku lipofilitu a v prípade druhom slabú vodnú rozpustnosť, a teda nízku hydrofilitu.<sup>9</sup>

Vzťah medzi  $\log P$  a  $\log D$  pre slabé kyseliny a bázy, u ktorých je známa hodnota  $pK_a$  je daný rovnicami:

$$\log P = \log D - \log \left( \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \right) \quad (4)$$

pre slabé kyseliny a

$$\log P = \log D - \log \left( \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \right) \quad (5)$$

pre slabé bázy.

U slabých kyselín platí, že v prípade, že je pH vodnej fázy o 3 jednotky nižšie ako  $pK_a$  kyseliny, zlúčenina bude skoro výlučne v nedisociovannej forme. U báz platí, že ak je pH o tri jednotky vyššie ako  $pK_a$  jej konjugovanej kyseliny, bude zlúčenina v neprotonovanej forme, a teda člen v rovnici, ktorý zohľadňuje  $pK_a$  a pH môžeme zanedbať. Namerané hodnoty  $\log D$  sú teda v tomto prípade ekvivalentné  $\log P$ .<sup>7</sup>

Znalosť rozdeľovacieho a distribučného koeficientu je potrebná v mnohých odvetviach. Považuje sa za jeden z najvýznamnejších parametrov pri štúdiu kvantitatívnych vzťahov medzi chemickou štruktúrou látky a jej biologickou aktivitou, tzv. QSAR. Ako dôležitý farmakokinetický parameter má významný vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus a elimináciu zlúčeniny, teda na jej ADME vlastnosti. Stanovenie rozdeľovacieho koeficientu je dôležité tiež pre posúdenie bezpečnosti liečiv. U lipofilných látok s vysokou hodnotou  $\log P$  môže dochádzať k ich zvýšenej akumulácii v tukových tkanivách, sú tak pomalšie metabolizované a pomalšie vylúčené z organizmu, čo prispieva k zvyšovaniu ich toxicity. Ideálne liečivo by teda malo mať čo najnižšiu možnú lipofilitu pri súčasnom zachovaní dôležitých vlastností, ako je absorpcia a väzba liečiva na cieľový receptor. Určenie rozdeľovacieho koeficientu je tiež kľúčové v ekologickej sfére. Tu slúži k posúdeniu ekologického rizika organických zlúčenín, ako sú absorpcia látky do pôdy, do vody, bio akumulácia látky v organizme rýb a mnoho iných aplikácií.<sup>5,8,10,11</sup>

## 3.2 STANOVENIE DISTRIBUČNÉHO KOEFICIENTU

Rozdeľovací  $P$  alebo distribučný  $D$  koeficient sa experimentálne stanovuje niekoľkými metódami. Na jednej strane stoja metódy priame, kde dochádza priamo k rozdeleniu látky medzi organickú a vodnú fázu a na strane druhej metódy nepriame, založené na vytváraní korelačného vzťahu medzi retenčnými vlastnosťami látky a separačným systémom.

### 3.2.1 PRIAME METÓDY

Priame metódy stanovenia  $\log P$  respektíve  $\log D$  sú založené na vytrepávaní stanovovanej látky medzi  $n$ -oktanol a vodnú fázu.

#### 3.2.1.1 Metóda trepania

Najpoužívanejšou priamou metódou je metóda trepania (z anglického „Shake flask method“). Princíp spočíva v zavedení stanovovanej látky do deliacej banky, ktorá obsahuje dve nemiešateľné fázy –  $n$ -oktanol a vodu, pričom vodná fáza môže byť nahradená pufrom.<sup>6</sup>

Pred samotným stanovením sa na mechanickej trepačke nechávajú zásobné fľaše obsahujúce obe fázy 24 hodín trepať, čím sa zaistí, že vodná aj organická fáza budú vzájomne nasýtené.<sup>12</sup> Po pridaní stanovovanej látky sa necháva deliaca banka trepať na mechanickej trepačke za laboratórnej teploty niekoľko hodín, počas ktorých sa ustanoví rovnováha danej látky medzi vodnou a organickou fázou. Po dosiahnutí rovnováhy sa obsah odstreduje, aby sa z vodnej fázy odstránili malé kvapôčky  $n$ -oktanolu vznikajúce v dôsledku tvorby emulzie počas pretrepávania.<sup>6</sup> Nakoniec sa pomocou UV-VIS spektrometrie zmeria hodnota absorpcie vodnej fázy pred vytrepáním a po vytrepaní a distribučný koeficient sa následne vypočíta pomocou rovnice:

$$D = \frac{A_0 - A_1}{A_1} \cdot \frac{V_w}{V_{oct}} \quad (6)$$

kde  $A_0$  je hodnota absorpcie pred vytrepávaním,  $A_1$  hodnota absorpcie po vytrepaní,  $V_{aq}$  je objem vodnej fázy a  $V_{oct}$  objem oktanolovej fázy.<sup>13</sup>

Táto metóda má však viacero nevýhod. Experimentálne možno metódu trepania použiť pre stanovenie hodnôt distribučného koeficientu v rozsahu 2 – 4.<sup>12</sup> Je časovo náročná, prácna, horšie opakovateľná a vyžaduje vyššie množstvo stanovovanej látky.

Taktiež je kladený dôraz ako na čistotu stanovovanej látky, tak na čistotu oboch fáz. Pri stanovení log  $P$  u bázičných látok je vhodné použitie skla so silanizovaným povrchom, aby sa zabránilo interakcii silanových skupín. Ďalším problémovým faktorom sa ukázala tvorba emulzií, ktoré skresľujú výsledky merania. Preto sa u látok, ktoré podliehajú micelárnej agregácii, pracuje so zriedenými roztokmi, kedy maximálna koncentrácia stanovovanej látky v oboch fázach je 0,01 mol/l.<sup>1</sup>

### **3.2.1.2 Metóda pomalého miešania**

V snahe odstrániť niektoré nedostatky trepacej metódy sa vyvinula metóda pomalého miešania (z anglického „Stir flask method“). Kým pri trepacej metóde dochádza k trepaniu oboch fáz so stanovovanou látkou, táto metóda spočíva v pomalom miešaní celého systému. Do nádoby sa spoločne vnesie voda s magnetickou miešacou tyčou potiahnutou teflónom a začne sa zahrievať. Keď dosiahne požadovanú teplotu, opatrne sa prevrství oktanolovou fázou obsahujúcou stanovovanú látku tak, aby nedošlo k vytvoreniu emulzie. Celý systém je miešaný najmenej 36 hodín do ustanovenia rovnováhy. Následne je vodná fáza opäť analyzovaná podobne ako u trepacej metódy.<sup>6</sup>

Vyššie popísaným postupom sa odstraňuje nielen možnosť hrubej kontaminácie jednej vrstvy druhou, ale sa aj minimalizuje vznik emulzie. Výsledky meraní získané použitím metódy stir flask sa ukázali ako dobre reprodukovateľné a v relatívne dobrej zhode s hodnotami distribučného koeficientu stanoveného pomocou iných metód.<sup>14</sup> Napriek určitým výhodám sa však čas potrebný na stanovenie jednej látky neskrátil.

### **3.2.1.3 Metóda mikro trepania**

Metódou mikro trepania (z anglického „Micro shake flask method“) možno analyzovať až 24 vzoriek za deň, čo je oproti vyššie popísaným metódam veľká výhoda. Metóda využíva 4 vialky – prvá (štandard) obsahuje stanovovanú látku len vo vodnom roztoku pufru a ostatné tri obsahujú rôzne pomery oktanolu a pufru so vzorkou. Vialky sú pretrepávané do dosiahnutia rovnováhy. Následne sa vodná fáza vzoriek stanovuje pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s UV detekciou alebo detekciou pomocou hmotnostnej spektrometrie.<sup>15</sup>

Distribučný koeficient sa následne určuje podľa rovnice:

$$\log D = \log \left[ \left( \frac{A_{st}}{A_w} - 1 \right) \frac{V_w}{V_{oct}} \right] \quad (7)$$

Člen  $A_{st}$  je plocha píku štandardu,  $A_w$  je plocha píku stanovovanej látky rozpustenej vo vodnej fáze,  $V_w$  a  $V_{oct}$  predstavujú objem vodnej a oktanolovej fázy.

Hlavným obmedzením metódy je požiadavka na dobrú rozpustnosť vzorky vo vodnom roztoku pufru, čo vysoko lipofilné látky nespĺňujú. Okrem toho je metóda použiteľná len pre stanovenie  $\log D$  v rozmedzí od -1,5 do 3,5.<sup>13</sup>

#### **3.2.1.4 Automatizovaná 96-jamková doska**

Vzhľadom na požiadavku rýchlej analýzy veľkého množstva látok bola tradičná trepacia metóda automatizovaná a prenesená na 96-jamkovú dosku. Táto technológia využíva robotickú obsluhu pre prípravu vzoriek. Po dosiahnutí rovnováhy je analyzované presne rovnaké množstvo oboch fáz pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s UV detekciou. Vzhľadom na to, že analýza jednej látky trvá radovo niekoľko minút, je táto metóda vhodná pre rýchlu analýzu látok. Výsledky meraní získané touto metódou sa ukázali ako dobre reprodukovateľné a v dobrej korelácii s výsledkami meraní inými metódami.<sup>3,16</sup>

#### **3.2.2 NEPRIAME METÓDY**

Nepriame metódy sú metódy využívajúce korelačný vzťah medzi retenčnými vlastnosťami látky a separačným systémom. Využívajú stanovenie rozdeľovacieho koeficientu analyzovanej látky koreláciou jej retenčného času s podobnými zlúčeninami o známej hodnote  $\log P$ . Patria sem metódy chromatografické, pričom prakticky sa používa chromatografia na obrátených (reverzných) fázach (z anglického „Reversed phase“, RP), a to ako tenkovrstevná chromatografia (z anglického „Thin layer chromatography“, TLC), tak vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (z anglického „High performance liquid chromatography“, HPLC). Medzi nepriame metódy stanovenia rozdeľovacieho koeficientu patrí tiež micelárna kvapalinová chromatografia.<sup>3</sup>

Stanovenie rozdeľovacieho koeficientu pomocou chromatografických metód prináša mnoho výhod. Oproti klasickej trepacej metóde je ich veľkou výhodou rýchla analýza pomerne veľkého množstva látok a tiež sa znižuje manipulácia so vzorkami. Na meranie je dostačujúce menšie množstvo látky, ktorá za predpokladu, že bude počas chromatografickej separácie rozdelená od prípadných nečistôt, nemusí byť úplne v čistej forme. Taktiež je odstránený problém tvorby emulzií, ktoré u trepacej metódy vytvárali povrchovo aktívne látky. Použitím chromatografických metód je umožnené stanovovať hodnoty  $\log P$  respektíve  $\log D$  v širšom rozsahu, a to pre hodnoty od 0 do 6.<sup>1,2,17</sup>

### **3.2.2.1 RP-HPLC**

Princípom RP-HPLC je rozdelenie látky medzi dve fázy, nepolárnu (hydrofóbnu) stacionárnu fázu (SF) a polárnu (hydrofilnú) mobilnú fázu (MF).

#### **Systém normálnych a obrátených fáz**

Jedna z možností, ako rozdeliť chromatografické metódy je rozdelenie podľa toho, či je potreba separovať látky polárne alebo nepolárne. Od toho sa odvíja aj povaha SF, MF a princíp rozdelenia medzi tieto dve fázy. Na základe tohto princípu možno chromatografiu rozdeliť na chromatografiu na normálnych fázach a chromatografiu na obrátených fázach.

**Systém normálnych fáz** (z anglického „Normal phase“, NP) je oproti systéme s obrátenými fázami historicky staršou technikou. Podstata separácie v NP je založená na tom, že SF, ktorá je polárna, obsahuje na povrchu aktívne adsorbčné centra a analyzovaná látka o ne súťaží s MF, ktorá je nepolárna. Retencia látky tak závisí od toho, ako bude interagovať analyt a MF so SF.<sup>18</sup>

Ako SF sa pre separácie v NP najčastejšie používa silikagél, polárne chemicky viazané fázy (napríklad kyanová skupina, nitro skupina, dioly atď.) na silikagélovom nosiči alebo menej často oxid hlinitý. U silikagélu sú adsorbčné centrá voľné silanové skupiny, pomocou ktorých interaguje s analyzovanou látkou. Tieto interakcie majú elektrostatickú povahu (interakcia dipól – dipól) alebo analyzovaná látka vytvára so SF vodíkové väzby.<sup>18-20</sup>

Ako MF sa v NP používajú organické rozpúšťadlá, ktoré sú menej polárne ako je SF, napríklad hexán, diethylether alebo propanol. Najčastejšie sa volí binárna



(dvojzložková) zmes rozpúšťadiel, ktoré majú odlišnú polaritu (nepolárna zložka MF – alifatický uhl'ovodík a polárnejšia zložka MF – napr. propanol), čím sa zaistí dostatočná selektivita delenia látok. U MF je dôležitým faktorom obsah vody v danom rozpúšťadle. Naviazaním vody na adsorbčné centrá na povrchu silikagélu dôjde k zmene jeho aktivity, čím sa znižujú retenčné objemy analyzovanej látky. Výsledkom je tak zlá reprodukovateľnosť v opakovaných meraniach. Preto je vhodné používať uzavretý systém s kontrolovanou vlhkosťou, kde MF preteká cez predkolónu naplnenú silikagélom o známom obsahu vody.<sup>18-20</sup> Systém NP sa používa najmä v analýze polárnych látok. V dnešnej dobe sa vo väčšej miere využíva separácia na obrátených fázach.

**Systém reverzných fáz** má uplatnenie v 80 až 90 % všetkých analýz. Jeho veľkou výhodou je možnosť separácie jednak látok nepolárnych, ale aj látok so strednou a vysokou polaritou, u ktorých je nutné vhodne nastaviť pH MF.

SF je nepolárna, najčastejšie tvorená chemicky modifikovaným silikagélom, poprípade sa používajú polymérne SF (Kapitola 3.2.2.1. – Stacionárna fáza v RP-HPLC). MF má polárny charakter, pričom ide o zmes vodnej zložky (voda, pufo) a polárneho organického rozpúšťadla (methanol, acetonitril, tetrahydrofurán), ktorý zvyšuje elučnú silu MF. MF pre systém RP podrobnejšie popisuje kapitola 3.2.2.1. – Mobilná fáza v RP-HPLC.

Princíp retencie v RP je odlišný od NP, a to hlavne z toho dôvodu, že na SF v systéme RP sa skoro nevyskytujú aktívne adsorbčné centrá. Podstata retencie sa tak pripisuje viacerým faktorom. Jednak je rozdelenie výsledkom rovnováhy rozpustnosti medzi dve kvapalné fázy – kvapalinu, ktorá je chemicky viazaná na pevný nosič (C8, C18) a kvapalinu, ktorá slúži ako MF. Retencia látky tak závisí na jej rozpustnosti v týchto dvoch kvapalinách. Ďalším faktorom vplývajúcim na retenciu látky je tzv. solvofóbny efekt. Na jeho základe sa predpokladá, že hnacou silou retencie sú polárne interakcie medzi jednotlivými molekulami MF (hlavne vody), ktoré sú silnejšie ako interakcie medzi molekulami MF a analyzovanou látkou, čím dochádza k vytesňovaniu látky z MF do SF. Čím je látka menej polárna a MF viac polárna, tým bude analyt viac zadržovaný.<sup>19-21</sup>

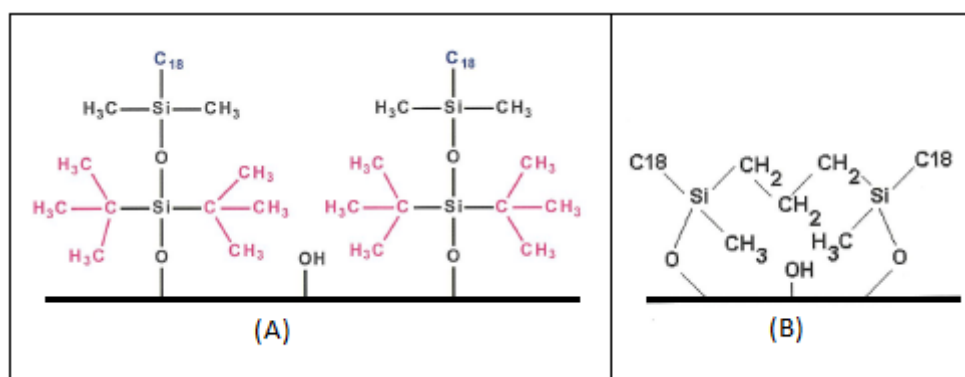
## Stacionárna fáza v RP-HPLC

SF tvorí náplň chromatografickej kolóny, na ktorej prebiehajú separačné procesy. Najpoužívanejším sorbentom je **silikagél** (gél kyseliny kremičitej,  $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ), ktorý sa používa jednak ako SF pre systém NP, ale slúži tiež pre prípravu chemicky viazaných fáz využívaných v RP systéme. Ako je možné vyčítať z chemického vzorca silikagélu, voda je v štruktúre viazaná v nestechiometrickom množstve za vzniku rôznych typov **silanových skupín**. Tie sú v systéme NP zodpovedné za interakciu SF s analyzovanou látkou tvorbou vodíkových väzieb alebo väzbou dipól – dipól. Práve vďaka nim je povrch silikagélu slabo kyslý a bude tak vo väčšej miere interagovať s bázičnými látkami, čo sa prejaví chvostovaním ich pík. V snahe predchádzať tomuto chvostovaniu, sa do MF pridávajú *organické amíny* (najčastejšie trietylamín alebo trioktylamín), ktoré sa dynamicky naviažu na voľné silanové skupiny a dôjde k ich pokrytiu bez toho, aby došlo k stálej chemickej modifikácii silikagélu. Ukázalo sa však, že tento spôsob má vplyv na retenčné časy analyzovaných látok. Navyše, prídavok báze musí byť taký, aby sa neprekročilo pH 8, kedy dochádza k rozpusteniu silikagélu.<sup>2,3,17,22</sup>

V systéme RP je však situácia iná a SF by mala byť nepolárna. Keďže silikagél má polárny charakter, musí byť pre systém RP **povrchovo modifikovaný**. Najčastejšou modifikáciou je naviazanie alkylových reťazcov, najčastejšie oktadecylových C18 alebo oktylových C8. Fázy, kde je silikagél modifikovaný fenylovými, difenylovými alebo alkylfenylovými skupinami, vykazujú vyššiu polaritu a selektívnu afinitu hlavne k aromatickým látkam a nitrozlučeninám.<sup>19,20</sup>

Táto modifikácia však nie je vždy stopercentná, a teda SF obsahuje určité percento nezreagovaných voľných silanových skupín, ktoré sú polárne. Z tohto dôvodu je snaha pokryť tieto voľné silanové skupiny a docieľiť tak úplne nepolárnu SF, čo možno docieľiť použitím sféricky objemných substituentov ako sú diisobutyl, diisopropyl alebo fenyl, ktoré ich sféricky zatienia, čím sú neprístupné pre reakciu s analytom (Obr. 1B). Takéto SF vykazujú vyššiu stabilitu voči MF o nízkom pH (~1). Proces, ktorý redukuje počet voľných silanových skupín sa nazýva **endcapping**. Táto technika využíva menšiu molekulu *organosilanu* napríklad trimetylchlorsilánu alebo hexametyldisilazánu, ktorá má dobrý sférický prístup k voľným silanovým skupinám a preto dôjde k jej efektívnemu naviazaniu (Obr. 1A).

Nevýhoda je, že použitie týchto fáz je limitované pre pH 2 až 9. Preto sa vyvinula *technika dvojitého chránenia* (z angl. „double endcapping“), kde naviazaním dvoch C18 skupín a ich vzájomným spojením propylénovým mostíkom dochádza k ešte lepšiemu zatieneniu silanových skupín (Obr. 1B). S takto upravenou SF je možné pracovať pri pH od 1,7 do 11,5.<sup>2,18-20</sup>



**Obr. 1** Eliminácia vplyvu voľných silanových skupín. Prevzaté z<sup>18</sup>

V snahe zväčšiť teplotnú stabilitu a hlavne chemickú stabilitu náplní kolón, vznikli **polymérne SF**, ktoré umožňujú separáciu pri celom rozsahu pH. Pre systém RP je najčastejšie využívaný kopolymér styrénu a divinylbenzenu (PS-DVB), poprípade polyvinyl alkohol (PVA).<sup>18</sup>

### **Mobilná fáza v RP-HPLC**

Ako už bolo uvedené, MF v RP-HPLC je polárna, pričom sa používa voda poprípade pufr o vhodnom pH v kombinácii s organickým rozpúšťadlom.<sup>1</sup>

Použitie pufru ako MF zohráva veľkú úlohu pri látkach, ktoré obsahujú ionizovateľné funkčné skupiny, či už kyslé (sulfónové, karboxylové) alebo bázické (aminoskupiny). Retencia takýchto látok veľmi závisí na disociácii/protonácii ich funkčných skupín a tú je možné práve úpravou pH MF ovplyvniť. Všeobecne sú pufrы definované ako zmesi slabých kyselín a ich solí alebo zmesi slabých zásad a ich solí.

Každý pufr je charakterizovaný pufracnou kapacitou ( $\beta$ ), ktorá je definovaná ako počet mólov silnej kyseliny alebo zásady, potrebných na vyvolanie jednotkovej zmeny pH jedného litru pufru.<sup>23</sup> Pufracná kapacita závisí na dvoch faktoroch: (1) na koncentrácii pufru a (2) na rozdieli medzi pH pufru a  $pK_a$  látky, z ktorej je pufr

pripravený. Oblasť pH, v ktorej je pufr účinný je  $pK_a$  pufru  $\pm 1,5$ . Aby bola zaistená dobrá reprodukovateľnosť výsledkov, je potrebné, aby mal pufr dostatočnú pufracnú kapacitu. Pre meranie je vhodná koncentrácia pufru 50 mM, avšak ak sa používa MF s vysokým podielom organického rozpúšťadla a hrozilo by, že sa pufr vyzráža, pracuje sa s nižšou koncentráciou, napríklad 10 mM.<sup>24,25</sup> Pre stanovenie rozdeľovacieho koeficientu, a teda pre posúdenie lipofility látok pomocou RP-HPLC sa za najlepšiu voľbu považuje pufr MOPS. Vykazuje schopnosť pufrvať v pH rozmedzí 6,7 – 7,9 a vďaka svojej povahe obojakého iónu neinteraguje ani s analytom, ani so SF.<sup>2</sup> Navyše ide o organickú soľ, ktorá sa ukázala ako menej náchylnou na zrážanie pri vyšších koncentráciách organického rozpúšťadla.<sup>26</sup> Na druhej strane sa k napodobeniu fyziologických podmienok v ľudskom organizme často používa fosfátový pufr alebo fosfátom pufraný fyziologický roztok obsahujúci NaCl a KCl.<sup>2</sup>

V RP-HPLC sa však zriedkakedy používa len čistá voda alebo teda vodný roztok pufru, pretože má slabú elučnú silu, a teda pri použití čistej vody ako MF, by mali stanovované látky neprimerane dlhé retenčné časy. Z tohto dôvodu sa musí pridať organický modifikátor, najčastejšie acetonitril (ACN) alebo metanol (MeOH).<sup>22</sup> MeOH je najpoužívanejší organický modifikátor pre stanovenie  $\log P$ .<sup>2,17</sup> Je to protické rozpúšťadlo (podobne ako voda), a preto je schopný vytvárať vodíkové väzby. Zohráva aktívnu úlohu v priebehu separácie, kedy dochádza k interakcii s voľnými silanovými skupinami na povrchu sorbentu SF. Vďaka tejto vlastnosti je uprednostňovaný aj v analýze bázičných látok. Na druhej strane ACN je aprotické rozpúšťadlo a s voľnými silanovými skupinami bude preto reagovať veľmi obmedzene, nakoľko s nimi nevytvára vodíkové väzby. Touto skutočnosťou sa vysvetľuje aj fakt, že ACN produkuje veľké množstvo asymetrických pík pri analýze organických báz.<sup>2,24</sup>

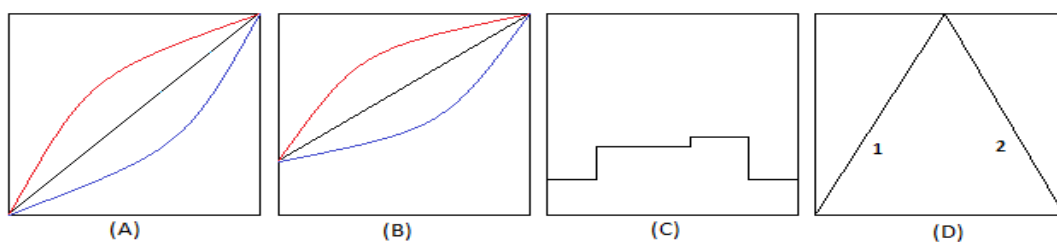
Tiež bolo pozorované, že prídavkom n-oktanolu do MF bolo dosiahnuté zvýšenie štatistickej významnosti vzťahov medzi  $\log P$  a retenčnými vlastnosťami látky. n-Oktanol v MF pôsobí ako maskovacie činidlo, ktorý redukuje sekundárne interakcie medzi analyzovanou látkou a už niekoľkokrát zmieňovanými voľnými silanovými skupinami. Potlačením týchto interakcií bolo preukázané zlepšenie korelácie medzi  $\log P$  a  $\log k$ . Použitie n-oktanolu ako maskovacieho činidla v MF navyše poskytuje reálnejší model rozdelenia látky v systéme oktanol – voda, čo vedie k presnejšiemu odhadu lipofility.<sup>1,26–28</sup>

## Izokratická a gradientová elúcia

Ďalšia z možností, ako rozdeliť chromatografické metódy, je rozdelenie podľa toho, či je zloženie MF konštantné, alebo sa v priebehu separácie jej zloženie mení. Na tomto princípe sa rozlišujú dva typy elúcie – izokratická a gradientová.

Pri **izokratickej elúcii** sa zloženie MF v priebehu analýzy nemení. Je vhodná predovšetkým pre látky, ktoré majú podobné fyzikálno-chemické vlastnosti. V analytickej chémii je však potreba analyzovať hlavne zložitejšie zmesi látok, ktoré sa výrazne líšia v polarite, a teda aj v retencii. Ich analýza izokratickou elúciou by vyžadovala veľmi dlhý čas.

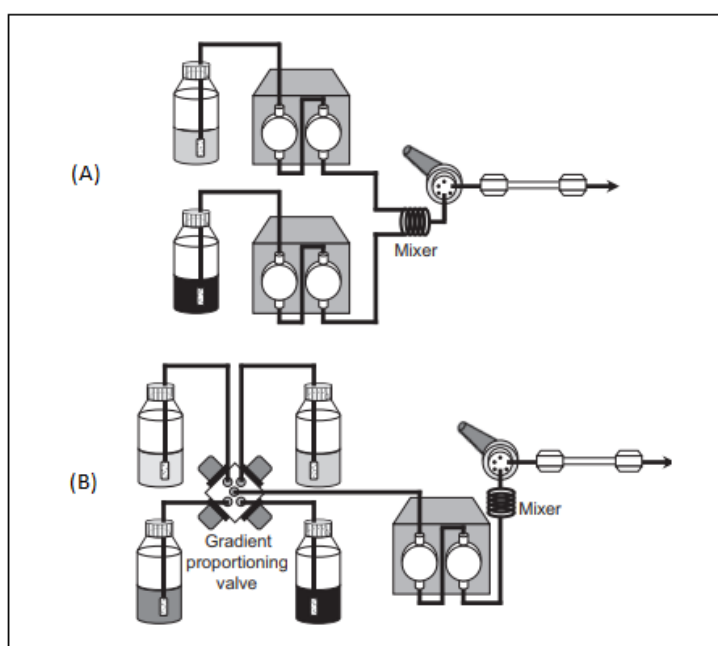
Preto sa v praxi častejšie používa **gradientová elúcia**, pri ktorej sa v priebehu merania mení pomer zložiek MF tak, že vzrastá jej elučná sila. U analýz na RP to znamená, že s časom dochádza k nárastu obsahu organického rozpúšťadla na úkor vodnej zložky MF. Najčastejšie sa využíva gradient binárny, kde sa miešajú dve zložky, pričom sa vzájomne výrazne líšia svojou elučnou silou. Podľa elučnej sily, a teda polarite, sú rozpúšťadlá usporiadané do tzv. *eluotropického radu*. Napríklad pre systém RP elučná sila rozpúšťadiel vzrastá s klesajúcou polaritou v poradí voda < metanol < acetonitril < tetrahydrofurán.<sup>18,29</sup> Časová zmena obsahu zložky s vyššou elučnou silou sa označuje ako *profil gradientu*. Môže mať charakter kontinuálny, kedy dochádza k zmene zloženia MF plynulo, alebo k zmene dochádza skokom a profil gradientu má tak stupňovitý charakter (Obr.2).



**Obr. 2** Rôzne typy profilov gradientu mobilnej fázy.

(A), (B) – kontinuálny gradient s nulovou (A) a nenulovou (B) počiatkovou koncentráciou, čierna priamka – lineárny gradient, červená krivka – konvexný, modrá – konkávny. (C) – stupňovitý gradient. (D) – lineárny gradient (1) nasledovaný obráteným lineárnym gradientom (2). Upravené podľa<sup>20</sup>

Gradient môže byť tvorený dvojakým spôsobom: v nízkotlakovej alebo vysokotlakovej časti chromatografického systému, podľa čoho sa rozlišuje vysokotlakový a nízkotlakový gradient. Pri *nízkotlakovom gradiente* dochádza k zmiešavaniu zložiek MF v zmiešavacej komôrke, ktorá je predradená pumpe (Obr. 3A). Pomer jednotlivých zložiek je programovo riadený pomocou otvárania a zatvárania proporcionálneho ventilu. Pri *vysokotlakovom gradiente* má každá zo zložiek MF svoju vlastnú pumpu, ktorá ju dávkuje do zmiešavacej komôrky. K zmiešavaniu teda dochádza až za pumpou, vo vysokotlakovej oblasti systému (Obr. 3B).<sup>19,30,31</sup>

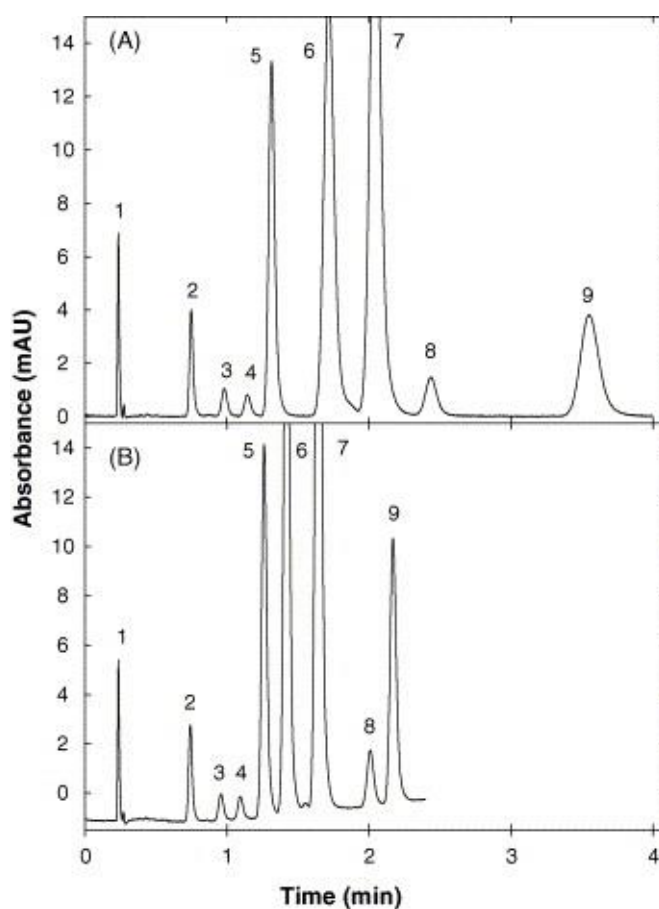


**Obr. 3** Tvorba gradientu. (A) – tvorba vysokotlakového gradientu. (B) – tvorba nízkotlakového gradientu. Prevzaté z <sup>31</sup>

Gradient tvorený v nízkotlakovej časti systému je presnejší a ekonomicky výhodnejší, keďže je potrebná len jedna pumpa (vo vysokotlakovom usporiadaní je potreba dve, poprípade viac, ak je zmiešavaných viac zložiek). Nevýhodou však je, že oproti vysokotlakovému systému je zmena zloženia MF na kolóne vďaka mŕtvemu objemu vo ventile registrovaná pomalšie. Okrem toho vyžaduje dokonale odplynenú MF, nakoľko v prípade, že je v MF rozpustený plyn dochádza k viacerým problémom ako sú nestabilita základnej línie, zlá opakovateľnosť analýzy a taktiež problémy s pumpou, kde dochádza k uvoľneniu bublín vo ventiloch a zavzdušňovaniu hlavy pumpy. Výhodou vysokotlakového systému je, že jednotlivé rozpúšťadla

sa miešajú pod tlakom, a tak bubliny, ktoré by vznikali za atmosférického tlaku, zostávajú v roztoku práve kvôli zvýšenému tlaku.<sup>30,31</sup>

Pri porovnaní izokratickej a gradientovej elúcie, izokratická elúcia ponúka určité výhody, ako sú možnosť zmiešavania MF pred analýzou, nižšiu náročnosť na prevedenie, ako aj na inštrumentáciu. Kým u izokratickej elúcie s rastúcou retenciou dochádza k postupnému rozširovaniu pík, pri gradientovej elúcii by šírka pík mala byť rovnaká a píky sú ostrejšie (Obr.4).<sup>18,32</sup> Ako bolo uvedené vyššie, v praxi je preferovaná gradientová elúcia, a to hlavne vďaka možnosti rýchlejšej separácie látok s rôznou chemickou povahou.



**Obr. 4** Porovnanie izokratickej (A) a gradientovej (B) elúcie pri separácií. Prevzaté z <sup>32</sup>

## Popis retenčných dát

Pre stanovenie log  $P$  respektíve log  $D$  pomocou RP-HPLC sa sledujú dve retenčné charakteristiky: retenčný čas  $t_R$  a mŕtvy retenčný čas  $t_M$ .

Distribúcia analytu medzi SF a MF je charakterizovaná jej **retenčným časom**. Je to čas od nástreku vzorky po maximum jej píku, nezávisí na koncentrácií stanovovanej látky a na jej množstve nastrieknutej na kolónu. Retenčný čas látky, ktorá nie je na kolóne zadržovaná, a teda sa pohybuje rovnakou rýchlosťou ako MF, je označovaný ako **mŕtvy retenčný čas**. Pomocou týchto dvoch parametrov je definovaný kapacitný faktor, uvádzaný aj ako **retenčný faktor  $k$** , ktorý je vyjadrený pomocou nasledujúcej rovnice<sup>33,34</sup>:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (8)$$

Kapacitný faktor predstavuje mieru interakcie medzi molekulou a daným chromatografickým systémom. Vyjadruje, ako veľmi je látka zadržovaná na SF oproti látke, ktorá sa vymýva v mŕtvom čase, a teda so SF neinteraguje. Kapacitný faktor je závislý na parametroch, ktoré charakterizujú interakciu analyzovanej látky so SF ako sú typ a vlastnosti SF (veľkosť a druh častíc, použitý endcapping atď.), zloženie MF a teplota na kolóne. Na druhej strane je nezávislý na podmienkach ako sú prietok MF alebo rozmery kolóny, preto je tento parameter vhodný k porovnávaní výsledkov, ktoré boli obdržané na rôznych kolónach.<sup>24</sup>

## Stanovenie log $P$ /log $D$ pomocou RP-HPLC

Princíp stanovenia log  $P$  respektíve log  $D$  pomocou RP-HPLC je založený na analýze látok (štandardov) o známom log  $P$  pomocou série izokratických meraní a následnom vytvorení korelačného modelu, ktorý môže byť použitý k výpočtu log  $P$  analyzovanej látky o podobnej štruktúre. Každé zo série týchto meraní obsahuje vždy rôzne percentuálne zastúpenie organického rozpúšťadla (30 – 70 %) voči vodnej zložke v MF. Zo zaznamenaných retenčných časov sa následne vypočíta kapacitný faktor pre každý štandard podľa rovnice (8).

Izokratické kapacitné faktory predstavujú relatívny rozsah lipofily. Avšak, ako bolo uvedené vyššie, log  $P$  predstavuje rozdelenie látky medzi organickú a vodnú fázu. SF v podstate zastupuje oktanolovú fázu v pôvodnej trepacej metóde a MF predstavuje fázu vodnú. Vzhľadom na to, že do vody sa pridáva organický modifikátor,



je vhodné vykonať extrapoláciu na 0 % organického podielu , respektíve na 100% vodnú fázu a eliminovať tak účinok organického rozpúšťadla. Touto úpravou sa dostane kapacitný faktor pre čistú vodnú fázu  $\log k_w$ , pričom existuje vzťah medzi izokratickým  $k$  a extrapolovaným  $k_w$  podľa nasledujúcej rovnice:

$$\log k = \log k_w + S\Phi \quad (9)$$

kde člen  $\Phi$  označuje objem pridaného organického rozpúšťadla a  $S$  určuje sklon priamky získanej z rovnice regresnej závislosti. Po izokratických meraniach, výpočte kapacitného faktora pre každý zo štandardov a jeho extrapolácií, sa vytvorí korelačný graf medzi nameranými hodnotami  $\log k_w$  a známymi hodnotami  $\log P$ .

Hodnoty rozdeľovacieho koeficientu neznámych látok sa následne vypočítajú z danej rovnice regresie:

$$\log P = p + q \cdot \log k_w \quad (10)$$

kde  $\log k_w$  je kapacitný faktor po extrapolácií a členy  $p, q$  sú koeficienty známe z grafu vytvoreného pre štandardy.<sup>2,33,35</sup>

V súčasnosti je neustála snaha o vývoj a zlepšenie metodiky, pretože aj cez určité výhody oproti priamym metódam (Kapitola 3.2.2.), použitie RP-HPLC prináša mnoho nevýhod. Chromatografické metódy neposkytujú presný model rozdelenia látky v systéme oktanol – voda, keďže sa tu objavujú špecifické interakcie medzi analytom a SF (Kapitola 3.2.2.1. – Stacionárna fáza v RP-HPLC.), ktoré u priamych metód chýbajú. Taktiež reprodukovateľnosť výsledkov v rámci rôznych šarží rovnakých náplňových materiálov kolón môže byť nedostačujúca, nakoľko jednotlivé šarže sa môžu nepatrne odlišovať v zložení a usporiadaní SF, čo môže prinášať odchýlku merania. Nevýhoda viacnásobnej izokratickej elúcie je tiež čas potrebný na analýzu jednej látky. Navrhované riešenia týchto problémov zahŕňajú skúmanie SF so zlepšenou stabilitou pH, použitie chemicky viazaných fáz navrhnutých tak, aby čo najviac imitovali systém oktanol – voda, použitie micelárnych MF, či vývoj gradientových elučných metód.<sup>3,36</sup>

### Stanovenie log $P/\log D$ pomocou gradientovej elúcie

Použitie gradientovej elúcie k stanovení lipofility látok sa zdá byť výhodnou metódou hlavne vo vzťahu k látkam, ktorých stanovenie pomocou série izokratických meraní by bolo v príliš zdĺhavé, nakoľko majú príliš dlhé retenčné časy. Princíp gradientovej elúcie a jej porovnanie s izokratickou elúciou je uvedený vyššie (Kapitola 3.2.2.1 – Izokratická a gradientová elúcia). Valko et al.<sup>37</sup> popisuje použitie krátkych kolón v kombinácii s rýchlym gradientom (5min.) k stanoveniu chromatografického indexu hydrofobicity  $CHI$  (z anglického „chromatographic hydrophobicity index“), ktorý môže byť korelovaný s hodnotami log  $P$  alebo priamo slúžiť ako miera lipofility. Bolo použité väčšie množstvo štandardov s rozsiahlym spektrom štruktúry a lipofility, pokrývajúce rozmedzie -0,35 – 5,52. MF bola tvorená organickou zložkou a vodnou zložkou. Ako organická zložka MF bol použitý MeOH a následne pre porovnanie ACN. Vodná zložka MF bola tvorená rozdielnymi puframi, v závislosti na vlastnostiach analyzovaných látok: (1) octanový pufor s pH 7,4 pre neutrálne látky, (2) octanový pufor s pH 10,5 pre stanovenie bázičných látok a (3) fosfátový pufor s pH 2,0 pre stanovenie látok kyslých. Použitím rôzneho pH MF pre látky rôznych acidobázičných vlastností sa potlačí ich disociácia/protonácia a látka tak bude pri analýze v nenabitom stave. Látky boli najskôr merané za izokratických podmienok podľa všeobecnej metodiky popísanej v Kapitole 3.2.2.1. – Stanovenie log  $P/\log D$  pomocou RP-HPLC. Z chromatografických dát boli podľa rovnice (9) vypočítané hodnoty  $S$  a  $\log k_w$ , ktoré sa následne dosadili do rovnice (11), slúžiacej pre výpočet izokratického stupňa hydrofóbnosti  $\varphi_0$ .

$$\varphi_0 = -\log k_w / S \quad (11)$$

Člen  $\varphi_0$  určuje percentuálne zastúpenie organického rozpúšťadla vo vodnej MF požadované na dosiahnutie rovnomerného rozdelenia analyzovanej látky medzi MF a SF. Následne sa tieto látky merali za pomoci lineárnej gradientovej elúcie a ukázalo sa, že bola dosiahnutá dobrá korelácia medzi hodnotami gradientového retenčného času  $t_{Rg}$  a izokraticky determinovaným  $\varphi_0$ . Konštanty tejto lineárnej korelácie a gradientový retenčný čas sa použili k výpočtu  $CHI$  podľa rovnice:

$$CHI = A \cdot t_{Rg} + B \quad (12)$$

Po zavedení regresného modelu pre štandardy, môže byť  $CHI$  vypočítaný z jej gradientového retenčného času pre akúkoľvek látku použitím rovnakého gradientového

systemu. Ukázalo sa, že na koreláciu medzi vypočítaným  $CHI$  a  $\log P$  má vplyv disociácia/protonácia látky, nakoľko najlepšia korelácia bola dosiahnutá pre látky v nenabitom stave.<sup>37–40</sup> Chromatografický index lipofility je závislý na type použitej SF, na type organického modifikátora pridaného do MF a tiež od pH MF. Bohužiaľ, tak ako aj iné metódy, je táto metóda poskytuje vhodný odhad lipofility len pre neutrálne látky, respektíve pre slabo bázické látky.<sup>3,37,38,41</sup>

### 3.2.2.2 RP-TLC

Separáčny systém pre RP-TLC je zhodný ako pre RP-HPLC, preto by sa mohlo zdať, že obmedzenia, ktoré platili v HPLC platia rovnako pre TLC. Toto tvrdenie je pravdivé však iba z časti, nakoľko štruktúra a hustota SF v TLC je iná, ako u kolón používaných v HPLC. Taktiež v TLC je iný prietok MF ako v HPLC a to vďaka kapilárnym silám. Výhodou je tiež detekcia látok, ktoré neobsahujú chromofor a taktiež RP-TLC poskytuje vyšší rozsah stanovenia rozdeľovacieho koeficientu, a to v rozsahu 0 až 12.<sup>6</sup> Pre stanovenie lipofility slúži lipofilný parameter  $R_M$ , ktorý sa vypočíta podľa nasledujúcej rovnice:

$$R_M = \log \left( \frac{1}{R_F} - 1 \right) \quad (13)$$

Člen  $R_F$  je retardačný faktor, ktorý je daný ako podiel vzdialenosti stredu škvry od štartu a vzdialenosti čela MF od štartu. Keďže hodnota  $R_M$  je závislá na organickom rozpúšťadle, pridaného do MF, je podobne, ako u RP-HPLC, preferovaná extrapolovaná hodnota na 100% vodnú fázu  $R_{MW}$ .<sup>42</sup>

Aj keď sa ukázalo, že retenčné vlastnosti obdržané pomocou RP-TLC sa približujú výsledkom získaných priamymi metódami, teda imitujú rozdelenie v systéme oktanol – voda, nie sú tieto výsledky uspokojivé. Opäť, podobne ako u všetkých nepriamych metód, sú tieto odchýlky vysvetľované polarizáciou látky a tiež prítomnosťou kyslého vodíku v štruktúre analyzovaných látok. Preto stanovenie  $\log P$  metódou RP-TLC je vhodnejšie pre analýzu neutrálnych a slabo bázických látok oproti kyslým látkam.<sup>3</sup>

### 3.2.2.3 Micelárna kvapalinová chromatografia

Micelárna kvapalinová chromatografia je istou variantou RP-HPLC, ktorá používa povrchovo aktívnu látku (surfaktant) vo vodnom alebo vodne – organickom roztoku ako MF. Vo väčšine prípadov bol ako surfaktant použitý dodecylsulfát sodný alebo tetradecyltrimetylamónium bromid.<sup>25,43,44</sup> So stúpajúcou koncentráciou surfaktantu v MF dochádza taktiež k jeho adsorpcii na povrch SF. V prípade, že obsah surfaktantu v MF dosiahne tzv. *kritickú micelárnu koncentráciu* (CMC), nebude sa už naďalej adsorbovať na povrch SF, ale dôjde k tvorbe micel v MF.

Retencia látky závisí od súčasnej distribúcie vzorky medzi micely a vodný roztok, ktorý ich obklopuje a MF a SF pokrytú povrchovo aktívnou látkou. Kapacitný faktor je potom daný rovnicou:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_M} + \left( \frac{k_{AM}}{k_M} \right) [M] \quad (14)$$

kde  $k_M$  je kapacitný faktor pri nulovej koncentrácii micel,  $k_{AM}$  je konštanta určujúca väzbu medzi micelou a rozpustenou látkou a  $[M]$  predstavuje celkovú koncentráciu povrchovo aktívnej látky v MF, od ktorej je odčítaná CMC. Do MF sa tiež pridáva malý obsah organického rozpúšťadla, napríklad 2-propanolu, čím sa nielen dosiahne zvýšenie chromatografickej účinnosti, ale sa aj zvýši elučná sila micelárneho roztoku, ktorá môže byť v niektorých prípadoch malá. Aj keď bolo zistené, že niektoré systémy môžu svojou presnosťou konkurovať priamym metódam, v praxi sa táto metóda veľmi nepoužíva hlavne kvôli dĺžke analýzy, ale aj kvôli kompatibilitate surfaktantu so SF.<sup>25,43,44</sup>

### 3.2.2.4 Výpočtové metódy

Mimo experimentálne stanovenie  $\log P$  respektíve  $\log D$ , existujú aj viaceré výpočtové programy schopné na základe štruktúry a vlastností danej látky predpovedať jej lipofilitu. Napríklad výpočet **podľa Reekera**, ktorý poskytuje výpočet  $\log P$  na základe jednotlivých hydrofóbných fragmentov molekuly.

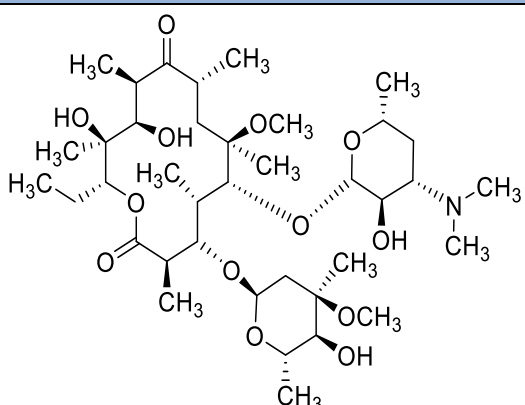
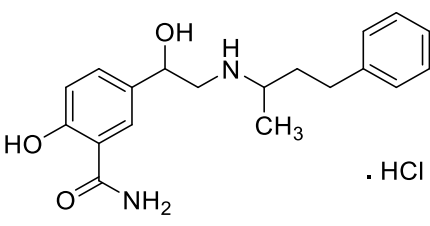
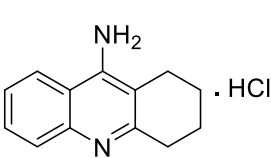
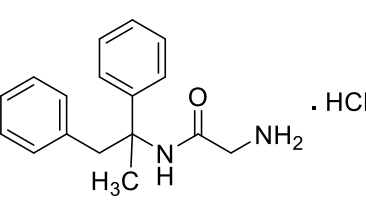
Za zmienku stojí aj tzv. **Solvatačný model** (z anglického „Solvation parameter model“), ktorý popisuje, ako veľmi vplyvajú jednotlivé intermolekulárne interakcie (napríklad vodíkové väzby) na rozdelenie neutrálnych látok v systéme oktanol – voda. Výpočtové metódy sú často používané hlavne pre ich rýchlosť, ale pre presné stanovenie  $\log P$  sa stále používajú skôr experimentálne postupy.<sup>1,36</sup>

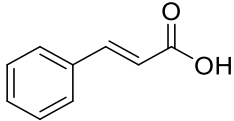
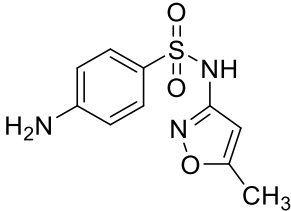
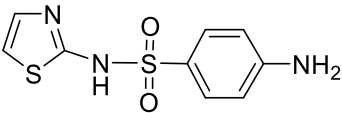
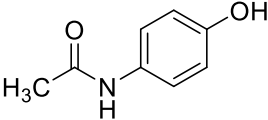
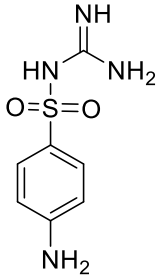
## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Skúmané látky

Pre experiment bolo vybraných 9 štandardov s hodnotami  $\log P$  pokrývajúce rozmedzie od -1,22 do +3,16. Prehľad skúmaných látok, ich chemická štruktúra a vybrané vlastnosti sú uvedené v Tab. 1.

**Tab. 1** Štruktúra a vlastnosti použitých štandardov. Hodnoty prevzaté z <sup>45</sup>

NÁZOV LÁTKY	Mr [g/mol]	pKa	Log P	CHEMICKÁ ŠTRUKTÚRA
<b>Klaritromycín</b>	747,96	8,38	3,16	
<b>Labetalol</b>	364,87	8,05	3,09	
<b>Takrín</b>	234,73	8,95	2,71	
<b>Remacemid</b>	304,82	8,14	2,23	

NÁZOV LÁTKY	Mr [g/mol]	pKa	Log P	CHEMICKÁ ŠTRUKTÚRA
Kyselina škoricová	148,16	4,44	2,13	
Sulfametoxazol	253,28	6,16	0,89	
Sulfatiazol	255,31	7,20	0,54	
Acetamidofenol	151,17	9,46	0,46	
Sulfaguanidín	214,24	11,28	-1,22	

\* látky sú v tabuľke usporiadané zostupne podľa hodnoty log *P*

## 4.2 Prístrojové vybavenie

Merania boli vykonávané na ultravysokoúčinnom kvapalinovom chromatografe UPLC Acquity H-Class (Waters, MA, USA) s kvartérnou pumpou, autosamplerom a PDA detektorom. Chromatogramy boli spracované a vyhodnotené pomocou programu MassLynx.

Pri meraní a úprave pH mobilných fáz bol použitý pH meter Bench pHenomenal® IS 2100L (VWR International, PA, USA) so sklenenou kombinovanou elektródou Blue Line (Schott Instrumentals GmbH, Mainz, Nemecko).

## 4.3 Chromatografické kolóny

Pre úvodné experimenty bola použitá kolóna XSelect HSS T3 XP, v práci ďalej označená ako W (Waters, MA, USA) s nasledujúcimi parametrami: dĺžka 50 mm, vnútorný priemer 3 mm, veľkosť častíc 2,5  $\mu\text{m}$ , veľkosť pórov 100 Å. Silikagél bol modifikovaný oktadecylovými skupinami C18. Stabilita kolóny je v rozmedzí pH 2 až 8.

Pre overenie robustnosti experimentálnych podmienok bola následne použitá druhá kolóna značky Kinetex® C18, v práci ďalej označená ako K (Phenomenex, CA, USA), ktorá mala nasledujúce parametre: dĺžka 50 mm, vnútorný priemer 2,1 mm, veľkosť častíc 2,6  $\mu\text{m}$ , veľkosť pórov 100 Å. Silikagél je taktiež modifikovaný oktadecylovými skupinami C18 a endcappingom pomocou trimetylsilánu (TMS). Stabilita kolóny je výrobcom uvádzaná v rozmedzí pH 1,7 až 8,5 za použitia gradientovej elúcie a 1,5 až 10 za izokratických podmienok.

## 4.4 Chemikálie

Ultra čistá voda čistená reverznou osmózou (Milli-Q RG, Milipore, Intertech, Bedford, MA, USA), acetonitril (pre HPLC – Super Gradient, VWR International, PA, USA), MOPS (99,5%), HEPES (99,5%), n-oktanol (pre HPLC) všetky (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko), kyselina fosforečná (p.a.), kyselina chlorovodíková (p.a.) obe (Lach-ner, Neratovice, Česká republika), hydroxid draselný (p.a.), štandardné roztoky pufrův pre kalibráciu pH-metra (pH  $4,01 \pm 0,01$  a  $7,00 \pm 0,01$ , XS Instruments, Capri, Italy), sulfametoxazol (99,5%), tryptofán (pre biochémiu) obe (VWR International, PA, USA), labetalol (p.a.), sulfatiazol (99%), ibuprofén (p.a.), takrín (99%), nikotín (99%), remacemid (p.a.), klaritromycín (p.a.) všetky (SigmaAldrich, Steinheim, Nemecko),

acetaminofenol (p.a.), sulfaguanidín (98%), kyselina škoricová (98%) všetky (Thermo Fisher Scientific, Acros Organics, USA). Štandardy labetalol, takrín a remacemid boli dostupné vo forme hydrochloridu.

#### **4.5 Príprava vzoriek a mobilných fáz**

Boli pripravené zásobné roztoky skúmaných látok v metanole o koncentrácií 1 mg/ml. Ich desaťnásobným riedením ultra čistou vodou boli do vialiek pripravené roztoky k HPLC analýze, o koncentrácií 0,1 mg/ml.

MF bola tvorená ACN a vodným roztokom pufru. Boli pripravené tri pufry: MOPS, HEPES a fosfátový pufor (ďalej v práci označený ako FOS), všetky o celkovej koncentrácií 0,01 mol/l. Pufor MOPS a HEPES boli pripravené navážením presne vypočítaného množstva látky, jeho následným rozpustením vo vode a doplnením vodou na požadovaný objem. Fosfátový pufor bol pripravený z vypočítaného objemu 85% kyseliny fosforečnej a doplnený vodou na požadovaný objem. pH bolo určené pomocou pH metru, ktorý bol pred meraním kalibrovaný pomocou štandardných kalibračných pufov o pH 4,00 a 7,00. Následne bolo pH pufov upravené pomocou 50% roztoku hydroxidu draselného a 35% kyseliny chlorovodíkovej na hodnotu 7,4 a pufry boli odplynené na ultrazvuku po dobu 15 minút.

Po sérií meraní, kde sa ako MF použil ACN a daný pufor, bola metodika prevedená na MF s prídavkom n-oktanolu, kedy bolo do ACN aj do pufov pridané 0,25 % (v/v) n-oktanolu a takto pripravená MF sa nechala sýtiť približne 24 hodín.

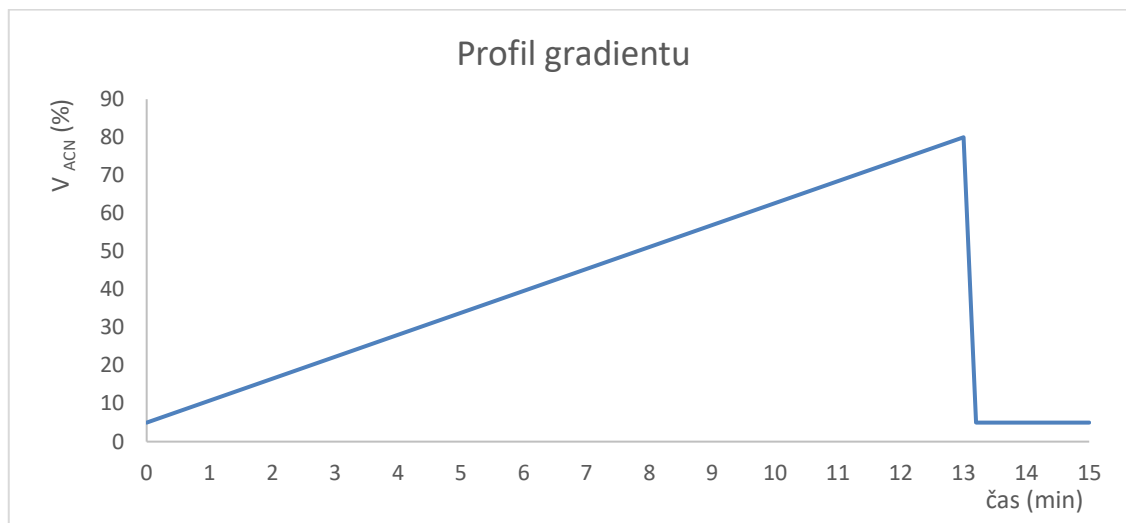
#### **4.6 Separačné podmienky**

Pri všetkých meraniach bol použitý rovnaký lineárny gradient o objemovom zložení a prietoku MF, ktoré sú uvedené v Tab. 2. UV detekcia bola v rozmedzí 210 – 500 nm. Dávkovanie vzorky bolo vykonávané pomocou autosampleru s nástrekom 5  $\mu$ l.



**Tab. 2** Separáčné podmienky

Čas [min]	Pufor [%]	ACN [%]	Prietok [ml/min]
0	95	5	0,6
13:00	20	80	0,6
13:20	95	5	0,6
15:00	95	5	0,6



**Obr. 5** Profil použitého gradientu

## 5 VÝSLEDKY a DISKUSIA

### 5.1 Vývoj metodiky

Ako už bolo uvedené (Kapitola 3.2.2.1. – Stanovenie  $\log D/\log P$  pomocou RP-HPLC),  $\log D$  respektíve  $\log P$  sa stanovuje pomocou série izokratických meraní s rôznym percentuálnym zastúpením organického rozpúšťadla voči vodnej zložke MF, následným výpočtom kapacitného faktora  $k$  z retenčných dát a jeho extrapoláciou na  $k_w$ . Nevýhodou tohto postupu je, že vyžaduje pomerne dlhý čas na stanovenie jednej látky. Hlavným cieľom bolo preto pokúsiť sa navrhnúť a otestovať metódu stanovenia distribučného koeficientu, ktorá by skrátila čas potrebný k stanoveniu jednej látky a zároveň by umožňovala stanovovať látky rôznej chemickej štruktúry a vlastností.

Preto bola navrhnutá metóda, kde sa použila takmer vodná MF, ktorá by odstraňovala nutnosť viacnásobného merania látky s následnou extrapoláciou  $k$  na 100% vodnú fázu a priamo z nameraných retenčných časov by poskytovala informáciu o  $\log k_w$  z jediného merania. MF pozostávala z vodnej zložky a malého percenta organického rozpúšťadla (0 – 10 %). Ako vodná zložka bol použitý fosfátový pufor (FOS) o celkovej koncentrácii 0,01 mol/l. Ako organický modifikátor bol použitý MeOH, keďže v literatúre bol popísaný ako najvhodnejšie organické rozpúšťadlo pre stanovenie  $\log D$ . K otestovaniu bolo vybraných 6 látok s rôznou chemickou štruktúrou a s širokým rozsahom hodnôt  $\log P$  (histidín -3,32; tyrozín -2,26; acetaminofenol 0,46; nikotín 1,17; kyselina škoricová 2,13; takrín 2,71). Týchto 6 látok bolo postupne analyzovaných izokratickou elúciou s použitím MF tvorenou FOS s prídavkom 10, 5, 3 a 0 % MeOH. Bola použitá kolóna XSelect HSS T3 XP, s parametrami charakterizovanými v kapitole 4.3. a prietok MF 2 ml/min.

Na základe chromatografického správania látok a nameraných retenčných dát, sa tento postup ukázal byť nevyhovujúci, nakoľko látky polárnejšieho charakteru (histidín, tyrozín a acetaminofenol) neboli na kolóne zadržované a boli tak vymývané z kolóny v mŕtvom čase. Naopak, látky menej polárne (takrín a kyselina škoricová), boli vzhľadom na nízku elučnú silu MF na kolóne zadržované vo veľkej miere a k ich analýze by bol potrebný neprimerane dlhý čas. Uspokojivý retenčný čas bol dosiahnutý len pre nikotín, ktorého retenčný čas aj pri 100% vodnej fáze bol kvôli horšej opakovateľnosti analýz medzi 2 – 3 min. Na tomto príklade možno vidieť ďalší problém, a to meniace sa retenčné časy látky pri jej opakovanom nástreku,

a teda zhoršenie opakovateľnosti analýzy, čo bolo spôsobené vysokým a nestálym pracovným tlakom v chromatografickom systéme.

Z týchto dôvodov bolo navrhnuté použitie gradientovej elúcie, ktorá využíva meniace sa zloženie MF v priebehu analýzy tak, že sa postupne zvyšuje elučná sila MF, a tým sa docieli elúcia aj menej polárnych látok v primeranom čase. Bol zvolený a otestovaný lineárny gradient s časom analýzy 15 minút, pričom zvolený gradient bol natoľko robustný, že sa očakávalo, že bude vhodný pre stanovenie ako lipofilných látok, tak látok menej lipofilných. Všetky testované látky, či už nepolárnejšie alebo viac polárne boli z kolóny vymývané v čase 0,5 – 10 minút, čím sa preukázala vhodná elučná sila zvoleného gradientu. Na základe tohto testovania bol tento gradient zvolený pre ďalšie analýzy.

## 5.2 Stanovenie log *P* pomocou RP-HPLC s gradientovou elúciou

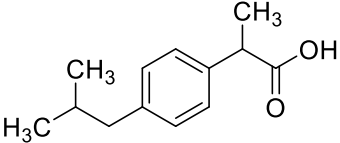
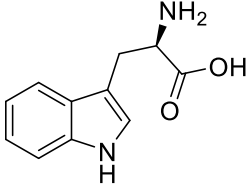
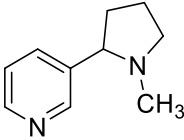
Pre experiment bolo vybraných 9 látok, ktoré predstavovali štandardy. Štandardné látky boli vyberané tak, aby pokrývali rôznu chemickú štruktúru a zároveň splňovali požiadavku pokrytia širokého rozsahu hodnôt log *P*. Názov, chemickú štruktúru a vlastnosti týchto látok prehľadne zobrazuje Tab. 1.

MF bola tvorená vodnou a organickou zložkou. Ako vodná zložka boli použité tri pufrý: MOPS, HEPES a FOS. pH pufróv bolo upravené na hodnotu 7,4, ktoré sa pre stanovenie lipofility používa veľmi často, vzhľadom na to, že táto hodnota odpovedá fyziologickému pH krvi. Ako organická zložka MF boli použité MeOH a ACN, ktoré boli v literatúre popísané ako najčastejšie používané organické rozpúšťadla pre stanovenie lipofility. Po úvodných analýzach s použitím MeOH ako zložkou MF sa však ukázalo, že dochádza ku veľkému kolísaniu tlaku v chromatografickom systéme v priebehu analýzy, čo malo vplyv na retenčné časy analyzovaných látok a opakovateľnosť analýzy. Z tohto dôvodu sa v ďalších analýzach ako organická zložka MF používal len ACN.

Každá z látok bola analyzovaná na danej kolóne a pri danom zložení MF celkom 5 krát. Látky boli analyzované najskôr pri troch rôznych MF: ACN/MOPS, ACN/HEPES, ACN/FOS. Následne bol do MF pridaný n-oktanol a látky boli znovu analyzované pri nasledujúcich troch rôznych MF: ACN/MOPS + oktanol, ACN/HEPES + oktanol a ACN/FOS + oktanol. Pre úvodné experimenty bola zvolená kolóna XSelect HSS T3 XP. Následne sa robustnosť experimentálnych podmienok overila na kolóne

Kinetex® C18. Špecifikácie týchto kolón sú uvedené v kapitole 4.3. Experimentálne podmienky vrátane zvoleného gradientu sú bližšie popísané v kapitole 4.6. Analýza látok, vybraných ako štandardy, poslúžila k výpočtu kapacitného faktora. Jeho následnou koreláciou s tabuľkovými hodnotami ich  $\log P$  bola vytvorená regresná závislosť, na základe ktorej bolo možné vypočítať experimentálne určenú hodnotu  $\log P_{exp}$  pre tri vybrané látky – ibuprofén, tryptofán a nikotín (štruktúra a ich vlastnosti popisuje Tab. 3) a porovnať ho s tabuľkovými hodnotami  $\log P_{tab}$ .

**Tab. 3** Štruktúra a vlastnosti analyzovaných látok

NÁZOV LÁTKY	Mr [g/mol]	pKa	Log P	CHEMICKÁ ŠTRUKTÚRA
Ibuprofén	206,29	4,91	3,97	
Tryptofán	204,23	7,38	-1,06	
Nikotín	162,24	8,50	1,17	

### 5.3 Retenčné charakteristiky a štatistické ukazovatele

Pre experiment boli sledované vybrané chromatografické parametre:

- Retenčný čas
- Mŕtvy retenčný čas
- Kapacitný faktor vypočítaný podľa rovnice (8)

Pomocou nameraných dát boli následne vypočítané nasledujúce štatistické ukazovatele:

- **Aritmetický priemer**

$$\bar{t}_R = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n t_{Ri} \quad (15)$$

- **Smerodajná odchýlka**

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{n=1}^n (t_{Ri} - \bar{t}_R)^2} \quad (16)$$

kde  $n$  je počet meraní,  $\bar{t}_R$  je aritmetický priemer retenčných časov a  $t_{Ri}$  predstavuje retenčný čas pre každú látku.

- **Absolútna chyba**

$$\Delta = |\mu - \bar{X}| \quad (17)$$

- **Relatívna chyba**

$$R = \frac{\Delta \cdot 100}{\mu} \quad (18)$$

kde člen  $\mu$  predstavuje skutočnú hodnotu ( $\log P_{tab.}$ ) a člen  $\bar{X}$  je priemerná experimentálna hodnota ( $\log P_{exp.}$ ).

- **Odl'ahlé body**

Pre vylúčenie odl'ahlých bodov zo súboru hodnôt existujú dva testy: (1) Grubsov test pre rozsiahle súbory a (2) Dean-Dixonov test pre súbory obsahujúce 1 – 30 hodnôt. Keďže každá z analyzovaných látok bola meraná 5 krát, pre výpočet odl'ahlých bodov bol použitý Dean-Dixonov test s nasledujúcim testovacím kritériom:

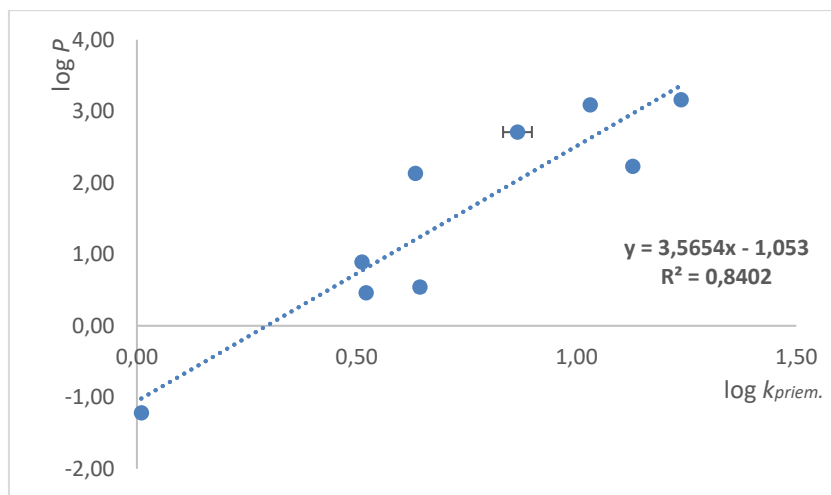
$$Q_n = \frac{x_n - (x_{n-1})}{R} \quad (19)$$

Člen  $x_n$  je hodnota, ktorá je považovaná za potenciálne odl'ahlú. V tabuľkách pre kritické hodnoty testu bola na hladine významnosti  $\alpha = 0,05$  nájdená kritická hodnota  $Q_k$  pre  $n$  stupňov voľnosti ( $n=5$ ) a v prípade, že  $Q_k > Q_n$ , možno bod považovať za odl'ahlý a bol tak vylúčený zo súboru.<sup>46</sup>

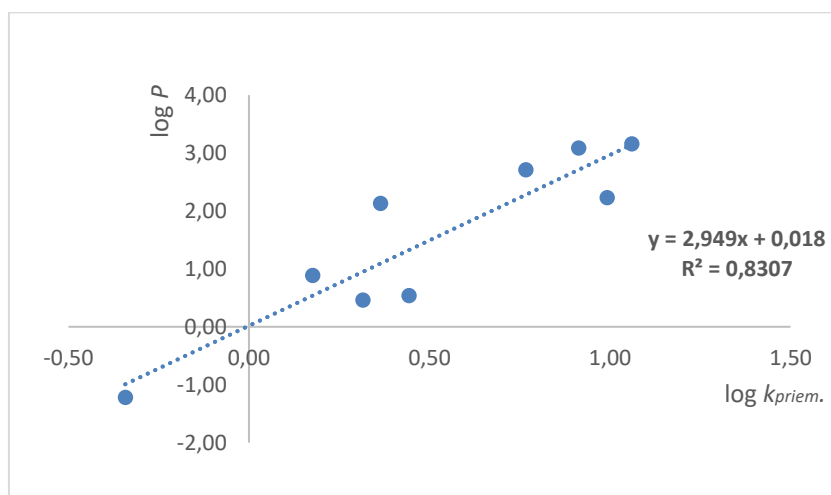
## 5.4 Regresné modely – Kolóna XSelect HSS T3 XP – W

Na kolóne W boli štandardné látky analyzované postupne pri 6 rôznych MF. Každá z látok bola analyzovaná 5 krát, pričom priemerný retenčný čas  $t_{R_{priem.}}$  bol určený podľa rovnice (15). Z neho bol následne vypočítaný logaritmus kapacitného faktora  $\log k_{priem.}$  podľa rovnice (8). Na základe týchto dát bol vytvorený graf závislosti medzi tabuľkovým  $\log P$  a  $\log k_{priem.}$ , čím sa získala rovnica regresie pre dané zloženie MF. Namerané a vypočítané dáta pre látky pri danom zložení MF sú pre prehľadnosť uvedené v prílohe Tab.10 – 15.

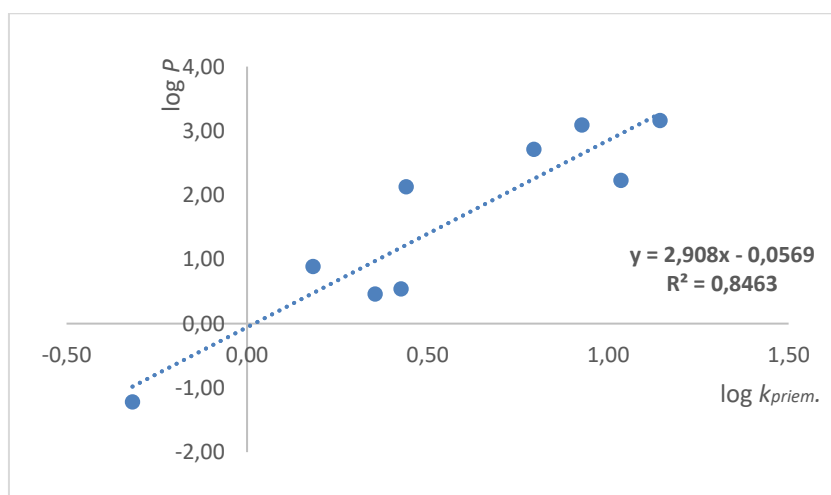
Ako možno vyčítať z grafov (Obr. 6 – 11) koeficient determinácie  $R^2$  sa pohyboval v rozmedzí 0,7332 – 0,8497. Najvyšší  $R^2$  bol dosiahnutý pri zložení MF ACN/HEPES + okt. (0,8497) a ACN/FOS + okt. (0,8497). V literatúre<sup>26-28</sup> bolo popísané, že prídavkom n-oktanolu do MF došlo k zlepšeniu korelácie medzi  $\log P$  a  $\log k$ . Na kolóne W bolo toto tvrdenie potvrdené len čiastočne, kedy pri zložení MF ACN/HEPES + okt. a ACN/FOS + okt. bolo naozaj pozorované malé zlepšenie tejto korelácie. Taktiež je zaujímavé, že prídavkom n-oktanolu do MF došlo k zlepšeniu korelačného vzťahu pre určitú skupinu látok: (1) pre látky viac lipofilné pri zložení MF ACN/MOPS + okt. (2) pre skupinu látok menej lipofilných pri MF ACN/FOS + okt. Ďalej možno pozorovať (Obr. 6 – 11), že korelácia medzi  $\log P$  a  $\log k$  je napriek určitým odchýlkam, lineárna. V analýze bola najväčšia odchýlka od linearítu tohto regresného modelu korelácie pozorovaná u kyseliny škoricovej ( $\log P$  2,13;  $pK_a$  4,4), a to pri každom testovanom zložení MF (Obr. 6 – 11). Možno predpokladať, že dôvodom by mohlo byť zvolené pH pufrův tvoriacich vodnú zložku MF, pretože všetky analyzované látky mali vlastnosti slabej bázy, kým kyselina škoricová je slabá kyselina.



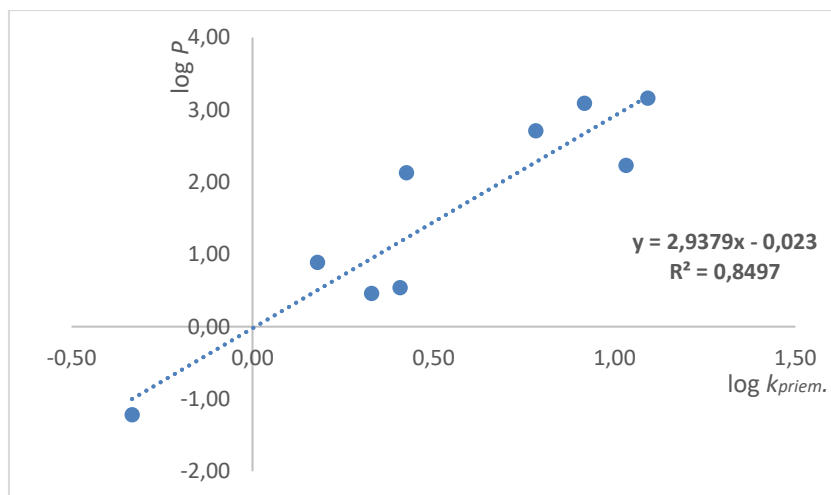
**Obr. 6** Závislost'  $\log k_{priem.}$  –  $\log P$  pri zložení MF ACN/MOPS na kolóne W



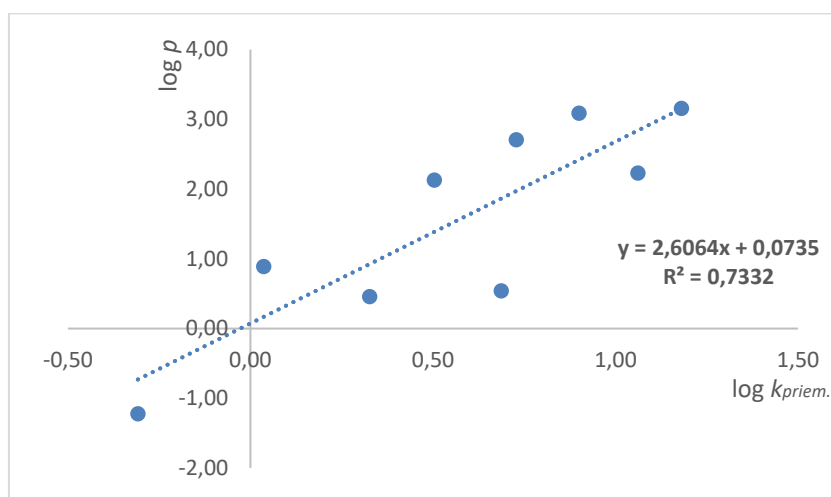
**Obr. 7** Závislost'  $\log k_{priem.}$  –  $\log P$  pri zložení MF ACN/MOPS + okt. na kolóne W



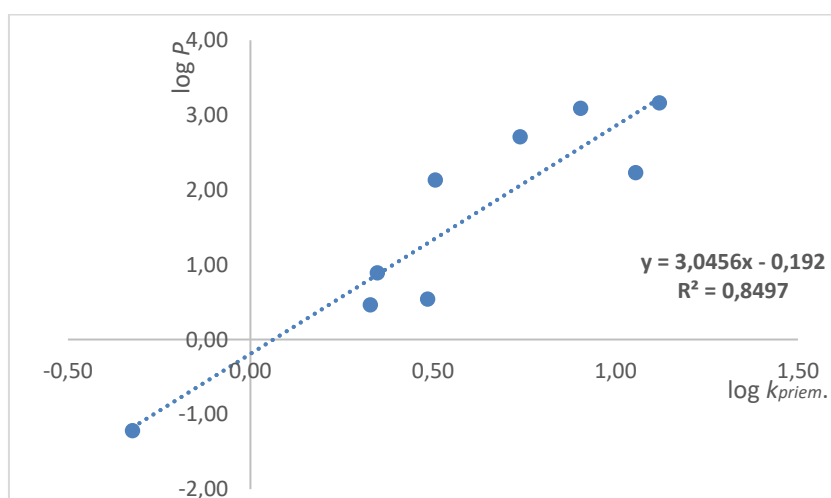
**Obr. 8** Závislost'  $\log k_{priem.}$  –  $\log P$  pri zložení MF ACN/HEPES na kolóne W



**Obr. 9** Závislosť  $\log k_{priem.}$  –  $\log P$  pri zložení MF ACN/HEPES + okt. na kolóne W



**Obr. 10** Závislosť  $\log k_{priem.}$  –  $\log P$  pri zložení MF ACN/FOS na kolóne W



**Obr. 11** Závislosť  $\log k_{priem.}$  –  $\log P$  pri zložení MF ACN/FOS + okt. na kolóne W

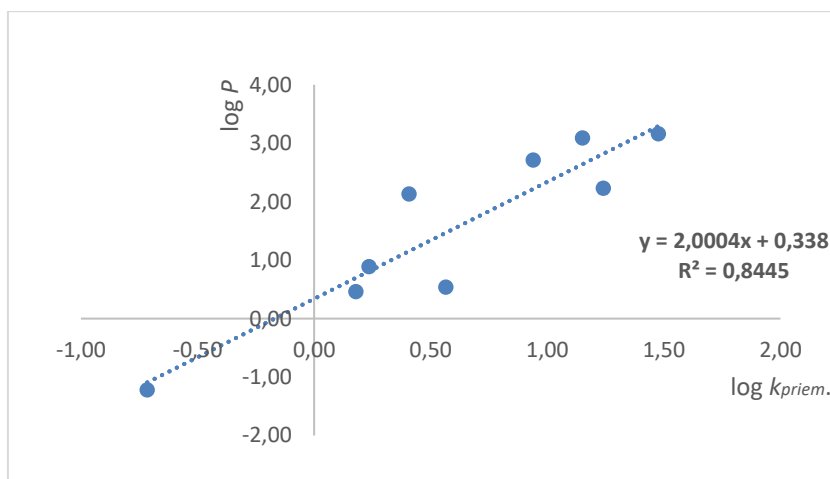


## 5.5 Regresné modely – Kolóna Kinetex® C18 – K

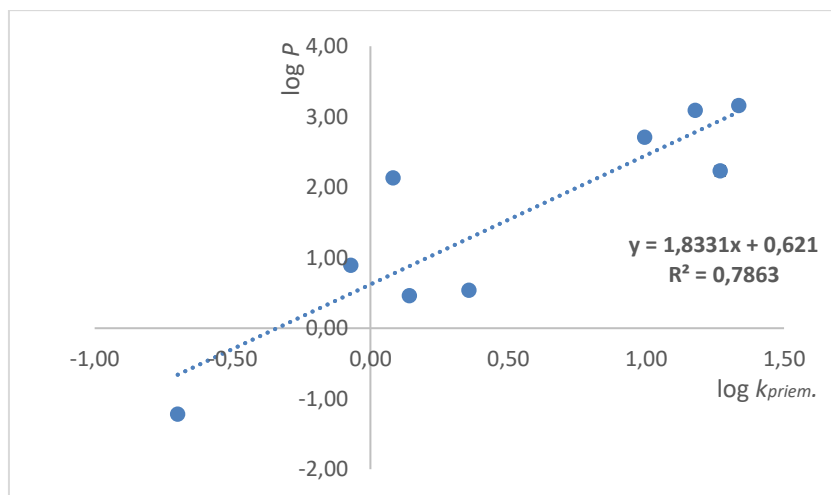
Po experimentoch na kolóne W bola metodika prevedená na kolónu K. Analýza a vyhodnocovanie dát prebiehalo rovnako ako na kolóne W. Namerané a vypočítané dáta sú opäť pre prehľadnosť uvedené v prílohe Tab. 16 – 21.

Z grafov (Obr. 12 – 17) možno vyčítať, že koeficient determinácie  $R^2$  sa pohyboval v rozmedzí 0,7863 – 0,8445, pričom najvyšší bol dosiahnutý pri zložení MF ACN/MOPS (0,8445). Na kolóne K zlepšenie korelácie medzi  $\log P$  a  $\log k$  prídavkom n-oktanolu do MF nebolo pozorované. Podobne ako u kolóny W, bola opäť pozorovaná výrazná odchýlka od linearity u kyseliny škoricovej.

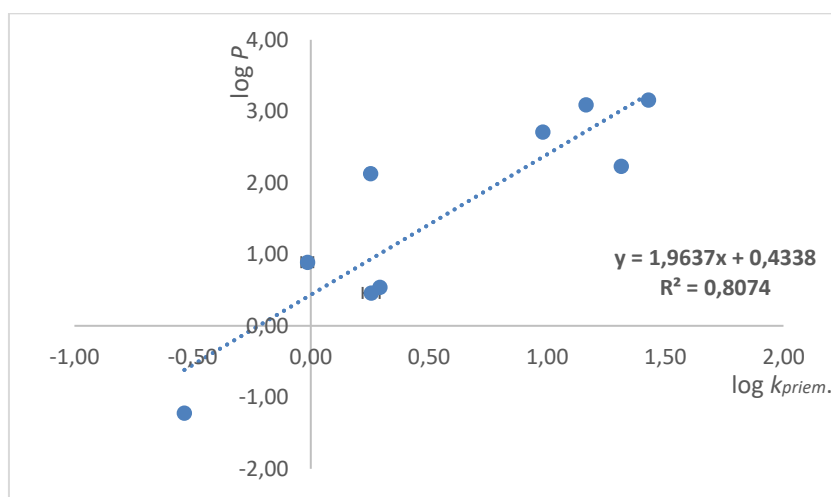
U oboch kolón bolo dosiahnutej dobrej opakovateľnosti, nakoľko retenčné časy jednej látky pri opakovanom nástreku sa líšili len minimálne, čo je vidieť na smerodajných odchýlkach v tabuľkách 10 – 21 uvedených v prílohe.



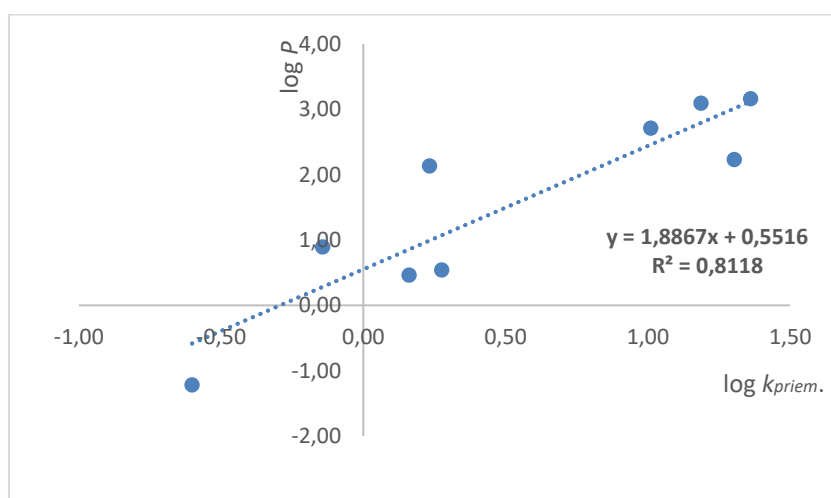
**Obr. 12** Závislosť  $\log k_{priem.}$  –  $\log P$  pri zložení MF ACN/MOPS na kolóne K



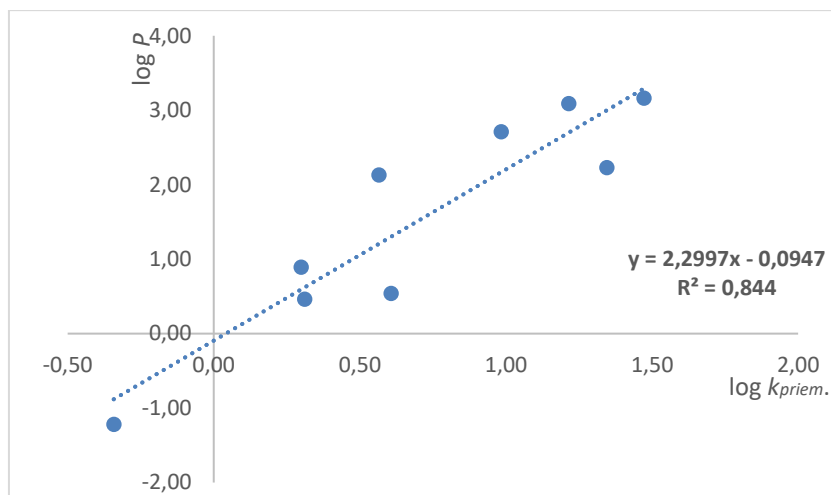
**Obr. 13** Závislost'  $\log k_{priem.}$  –  $\log P$  pri zložení MF ACN/MOPS + okt. na kolóne K



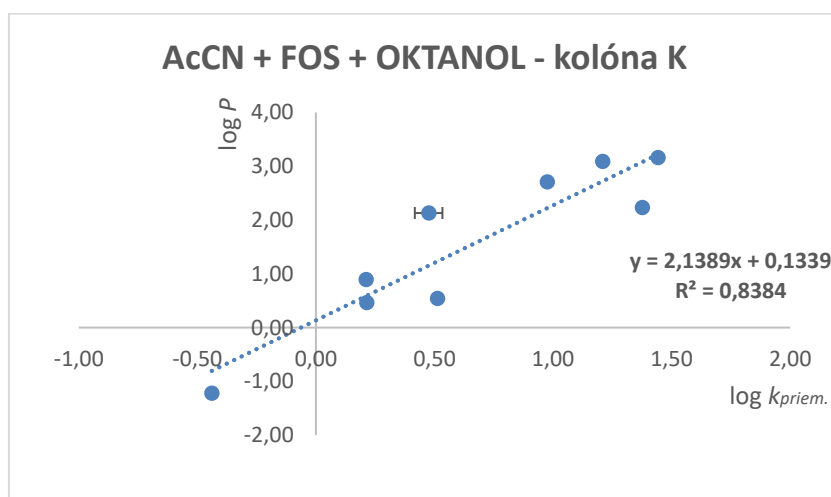
**Obr. 14** Závislost'  $\log k_{priem.}$  –  $\log P$  pri zložení MF ACN/HEPES na kolóne K



**Obr. 15** Závislost'  $\log k_{priem.}$  –  $\log P$  pri zložení MF ACN/HEPES + okt. na kolóne K



**Obr. 16** Závislosť  $\log k_{priem.}$  –  $\log P$  pri zložení MF ACN/FOS na kolóne K



**Obr. 17** Závislosť  $\log k_{priem.}$  –  $\log P$  pri zložení MF ACN/FOS + okt. na kolóne K

## 5.6 Aplikácia experimentálnych podmienok na vybrané látky

Experimentálne podmienky použité pre štandardné látky boli následne použité k analýze troch vybraných látok – ibuprofenu, tryptofánu a nikotínu. Namerané a vypočítané hodnoty pre tieto látky pri rôznom zložení MF a na kolónach W a K sú prehľadne zobrazené v tabuľkách 4 – 6.

**Tab. 4** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pre ibuprofén

IBUPROFÉN						
Mobilná fáza	Kolóna	$t_M$	$t_{R_{priem.}}$	$k_{priem.}$	$\log k_{priem.}$	$S \cdot 10^{-3}$
MOPS	W	0,44	5,51	11,532	1,062	0,47
	K	0,26	4,21	15,192	1,182	2,20
MOPS + oktanol	W	0,59	5,27	7,932	0,899	0,01
	K	0,25	3,66	13,632	1,135	0,57
HEPES	W	0,60	5,28	7,803	0,892	1,21
	K	0,25	3,80	14,184	1,152	2,69
HEPES + oktanol	W	0,59	5,21	7,831	0,894	0,66
	K	0,24	3,63	14,125	1,150	1,60
FOS	W	0,59	5,41	8,173	0,912	0,40
	K	0,22	3,99	17,127	1,234	1,26
FOS + oktanol	W	0,59	5,45	8,241	0,916	0,40
	K	0,22	3,89	16,682	1,222	0,01

**Tab. 5** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pre tryptofán

TRYPTOFÁN						
Mobilná fáza	Kolóna	$t_M$	$t_{R_{priem.}}$	$k_{priem.}$	$\log k_{priem.}$	$S \cdot 10^{-3}$
MOPS	W	0,44	1,87	3,255	0,512	2,54
	K	0,26	0,63	1,438	0,153	33,87
MOPS + oktanol	W	0,59	1,75	1,963	0,294	4,12
	K	0,25	0,56	1,256	0,093	7,55
HEPES	W	0,60	1,84	2,122	0,315	2,93
	K	0,25	0,58	1,328	0,121	10,99
HEPES + oktanol	W	0,59	1,76	1,990	0,297	6,20
	K	0,24	0,56	1,344	0,125	13,58
FOS	W	0,59	1,75	1,969	0,294	1,67
	K	0,22	0,61	1,773	0,249	0,01
FOS + oktanol	W	0,59	1,77	2,003	0,301	1,64
	K	0,22	0,54	1,455	0,163	0,01

**Tab. 6** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pre nikotín

NIKOTÍN						
Mobilná fáza	Kolóna	$t_M$	$t_{R_{priem.}}$	$k_{priem.}$	$\log k_{priem.}$	$S \cdot 10^{-4}$
MOPS	W	0,44	2,96	5,578	0,758	0,01
	K	0,26	1,61	5,192	0,715	2,27
MOPS + oktanol	W	0,59	3,24	4,492	0,652	0,01
	K	0,25	1,91	6,640	0,822	0,01
HEPES	W	0,60	3,93	5,654	0,744	0,58
	K	0,25	2,30	8,575	0,914	2,76
HEPES + oktanol	W	0,59	3,74	5,346	0,727	2,09
	K	0,24	2,24	8,333	0,921	2,82
FOS	W	0,59	3,34	4,661	0,668	0,01
	K	0,22	1,87	7,500	0,875	1,86
FOS + oktanol	W	0,59	3,42	4,800	0,681	0,69
	K	0,22	1,87	7,500	0,875	0,01

Dosadením experimentálne získaného kapacitného faktora  $\log k_{priem.}$  do regresných rovníc grafov pre príslušnú MF (Obr. 6 – 17) bol vypočítaný experimentálny  $\log P_{exp.}$ , ktorý bol následne porovnaný s tabuľkovou hodnotou  $\log P_{tab.}$  a bola určená relatívna chyba stanovenia podľa rovnice (18). Výsledky zobrazujú tabuľky 7 – 9.

**Tab.7** Porovnanie experimentálne získaného ( $\log P_{exp.}$ ) a tabuľkového ( $\log P_{tab.}$ ) rozdeľovacieho koeficientu pre ibuprofén

IBUPROFÉN				
Mobilná fáza	Kolóna	$\log P_{exp.}$	$\log P_{tab.}$	Rel. chyba [%]
MOPS	W	2,73	3,97	31,2
	K	2,70		31,9
MOPS + oktanol	W	2,67		32,7
	K	2,70		32,0
HEPES	W	2,54		36,1
	K	2,70		32,1
HEPES + oktanol	W	2,60		34,4
	K	2,72		31,5
FOS	W	2,45		38,3
	K	2,74		30,9
FOS + oktanol	W	2,60		34,6
	K	2,75		30,8

**Tab.8** Porovnanie experimentálne získaného ( $\log P_{exp.}$ ) a tabuľkového ( $\log P_{tab.}$ ) rozdeľovacieho koeficientu pre tryptofán

TRYPTOFÁN				
Mobilná fáza	Kolóna	Log $P_{exp.}$	Log $P_{tab.}$	Rel. chyba [%]
MOPS	W	0,77	-1,06	172,8
	K	0,64		160,8
MOPS + oktanol	W	0,88		183,4
	K	0,79		174,7
HEPES	W	0,86		181,1
	K	0,67		163,3
HEPES + oktanol	W	0,85		180,2
	K	0,79		174,3
FOS	W	0,84		179,1
	K	0,48		145,0
FOS + oktanol	W	0,72		168,4
	K	0,48		145,5

**Tab.9** Porovnanie experimentálne získaného ( $\log P_{exp.}$ ) a tabuľkového ( $\log P_{tab.}$ ) rozdeľovacieho koeficientu pre nikotín

NIKOTÍN				
Mobilná fáza	Kolóna	Log $P_{exp.}$	Log $P_{tab.}$	Rel. chyba [%]
MOPS	W	1,65	1,17	41,0
	K	1,77		51,2
MOPS + oktanol	W	1,94		66,0
	K	2,13		81,9
HEPES	W	2,11		80,1
	K	2,23		90,4
HEPES + oktanol	W	2,11		80,7
	K	2,29		95,6
FOS	W	1,82		55,2
	K	1,92		63,9
FOS + oktanol	W	1,88		60,8
	K	2,01		71,4

Z výsledkov je viditeľné, že v prípade ibuprofenu bola dosiahnutá priemerná relatívna chyba 33,0 %, v prípade nikotínu 69,9 % a v prípade tryptofánu bola priemerná relatívna chyba 169,0 %. Možno teda usudzovať, že len v prípade ibuprofenu zvolené experimentálne podmienky poskytovali relatívny odhad lipofility. Dalo by sa uvažovať, že výsledky sú ovplyvnené lipofilitou látok, nakoľko na rozdiel od nikotínu ( $\log P$  1,17) a tryptofánu ( $\log P$  -1,06) je ibuprofén látka viac lipofilná ( $\log P$  3,97). U korelačných závislostí štandardov (Obr. 6 – 17) taktiež možno sledovať

podobný trend, kedy pri odlišnom zložení MF sa vo väčšine prípadov od lineárnej regresnej priamky v menšej miere odchyľujú viac lipofilné látky ako látky menej lipofilnej povahy. Je nutné dodať, že zloženie MF a výber kolóny pre tieto tri látky malo len malý vplyv na relatívnu chybu stanovenia.

## 6 ZÁVER

Táto bakalárska práca poskytuje prehľadnú literárnu rešerš zameranú na možnosti stanovenia distribučného koeficientu  $D$  respektíve rozdeľovacieho koeficientu  $P$ , pričom sú diskutované výhody i nevýhody jednotlivých metód. Rešerš poskytuje prehľad jednak priamych metód trepania, pomalého miešania, mikro trepania a automatizovanej dosky, ale aj nepriame metódy stanovenia pomocou chromatografických metód s dôrazom kladeným na vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu na obrátených fázach.

Keďže je čas, potrebný k experimentálnemu stanoveniu  $\log P/\log D$  jednej látky pomocou RP-HPLC vďaka viacnásobnej izokratickej elúcií, relatívne dlhý, bola táto práca zameraná na snahu navrhnúť také experimentálne podmienky, ktoré by čas analýzy jednej látky výrazne znížili a zároveň by umožňovali analýzu látok, ktoré majú aj výrazne odlišné vlastnosti. Bol navrhnutý experiment, kde sa ako MF použila takmer vodná zložka, bohužiaľ táto metóda neposkytovala jednak rýchlu analýzu viac lipofilných látok, a taktiež dobrú opakovateľnosť retenčných časov v opakovaných meraniach. Preto bol zvolený postup využívajúci gradientovú elúciu, čím sa predpokladala elúcia aj viac lipofilných látok v prijateľnom čase. Po zvolení vhodného gradientu boli pri rôznych experimentálnych podmienkach na dvoch kolónach otestované vybrané štandardné látky s tak rozdielnymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami, aby sa dalo uvažovať o univerzálnosti tohto postupu. Na základe ich chromatografických dát bolo vytvorených niekoľko regresných modelov, ktoré boli použité k výpočtu experimentálne získaného  $\log P$  pre vybrané látky. Na základe porovnania s tabuľkovou hodnotou  $\log P$  bola určená relatívna chyba stanovenia.

Nastavené experimentálne podmienky poskytovali rýchlu analýzu (15min) a nízke smerodajné odchýlky retenčných časov látok pri ich opakovanom nástreku ukazovali dobrú opakovateľnosť. Najlepší regresný model na oboch kolónach bol dosiahnutý pri zložení MF ACN/MOPS a ACN/FOS + okt., oba s  $R^2 > 0,842$ . Napriek tomu výpočet experimentálne stanoveného  $\log P$  nepriniesol úplne uspokojivé výsledky, kedy relatívna chyba u nikotínu bola 69,9 % a u tryptofánu 169,0 %. Jedine u ibuprofenu poskytovali aplikované podmienky relatívny odhad lipofility, s priemernou relatívnou chybou 33 %. Na základe týchto informácií možno povedať, že sa nepodarilo úplne naplniť podmienku univerzálnosti testovanej metódy.



## 7 ZOZNAM LITERATÚRY

- (1) Kuchař, M. *Výskum a Vývoj Léčiv*, 1st ed. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Praha, **2008**.
- (2) Giaginis, C.; Tsantili-Kakoulidou, A. Current state of the art in HPLC methodology for lipophilicity assessment of basic drugs: A Review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, *31* (1), 79–96.
- (3) Poole, S. K.; Poole, C. F. Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *797* (1–2), 3–19.
- (4) Jevrić, L. R.; Karadžić, M.; et al. Lipophilicity estimation and characterization of selected steroid derivatives of biomedical importance applying RP HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *134*, 27–35.
- (5) Di, L.; Kerns, E. H. Profiling drug-like properties in discovery research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (3), 402–408.
- (6) Danielsson, L.; Zhang, Y. Methods for determination octanol-water partition constants. *TrAC Trends Anal. Chem.* **1996**, *15* (4), 188–196.
- (7) Denton, P.; Rostron, Ch. *Pharmaceutics: The Science of medicine design*, OUP: Oxford, **2013**.
- (8) Mark, B.; Hons, E.; Mrsc, C. *A guide to log P and pKa measurements and their use*. **2012**, 1–20.
- (9) Kwon, Y. *Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism for industrial scientists*. 1st ed. Springer US, **2014**.
- (10) Sangster, J. Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1989**, *18* (3), 1111–1229.
- (11) Hermens, J. L. M.; de Bruijn, J. H. M.; Brooke, D. N. The octanol-water partition coefficient: Strengths and limitations. *Environ. Toxicol. Chem.* **2013**, *32* (4), 732–733.
- (12) OECD/OCDE. *Test No. 107: Partition Coefficient (n-Octanol/Water): Shake Flask Method*; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1; OECD Publishing, **1995**; Vol. 107.

- (13) Andrés, A.; Rosés, M.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; Huerta, J. M. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (Log D) from low drug amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181–191.
- (14) Brooke, D.; Nielsen, I.; de Bruijn, J.; Hermens, J. An interlaboratory evaluation of the stir-flask method for the determination of octanol-water partition coefficients (Log Pow). *Chemosphere* **1990**, *21* (1–2), 119–133.
- (15) Zhao, Y.; Jona, J.; Chow, D. T.; Rong, H.; Semin, D.; Xia, O.; Zanon, R.; Spancake, C.; Maliski, E. high-throughput LogP measurement using parallel liquid chromatography/ultraviolet/mass spectrometry and sample-pooling. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16* (16), 1548–1555.
- (16) Hitzel, L.; Watt, A. P.; Locker, K. L. An increased throughput method for the determination of partition coefficients. *Pharm. Res.* **2000**, *17* (11), 1389–1395.
- (17) Lambert, W. J. Modeling oil-water partitioning and membrane permeation using reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr. A* **1993**, *656* (1–2), 469–484.
- (18) Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi I*. 1st ed. Praha, **2013**.
- (19) Corradini, D. *Handbook of HPLC*. 2nd ed. CRC Press, **2011**.
- (20) Churáček, J.; Jandera, P.; Krupčík, J. *Analytická Separace Látek*. SNTL - Nakladatelství technické literatury: Praha, **1990**.
- (21) Poole, F. C. *The essence of chromatography*. 1st ed. Elsevier B.V.: The Netherlands, **2003**.
- (22) Griffin, S.; Wyllie, S. G.; Markham, J. Determination of octanol-water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1999**, *864* (2), 221–228.
- (23) Bartoš, M. *Analytická Chemie I*. Univerzita Pardubice: Fakulta chemicko-technologická, katedra analytické chemie, **2004**.
- (24) Kromidas, S. *HPLC made to measure : A practical handbook for optimization*. Wiley: Weinheim, **2006**.
- (25) García-Álvarez-Coque, M. C.; Torres-Lapasió, J. R.. Secondary chemical equilibria in reversed-phase liquid chromatography. In: *Liquid chromatography*; Fanali, S.; Haddad, P.; Schoenmakers, P.; Loyd, D. 2nd ed. Elsevier Inc.: US, **2013**, 87–104.

- (26) Minick, D. J.; Frenz, J. H.; Patrick, M. A.; Brent, D. A. A comprehensive method for determining hydrophobicity constants by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Med. Chem.* **1988**, *31* (10), 1923–1933.
- (27) Benhaim, D.; Grushka, E. Effect of n-octanol in the mobile phase on lipophilicity determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a modified silica column. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1209* (1–2), 111–119.
- (28) Han, S.; Liang, C.; Yu, H.; Qiao, J.; Ge, X.; Lian, H. Influence of n-octanol in mobile phase on QSRRs of lipophilicity and retention mechanism of acidic and basic compounds in RP-HPLC. *RSC Adv.* **2015**, *5* (36), 28840–28847.
- (29) Dolan, J. W.; Snyder, L. R. Theory and practice of gradient elution liquid chromatography. In: *Liquid chromatography*; Fanali, S.; Haddad, P.; Schoenmakers, P.; Loyd, D. 2nd ed. Elsevier Inc.: US, **2013**, 269–282.
- (30) Snyder, L. R.; Dolan, J. W. *High-Performance Gradient Elution*; **2006**; Vol. 53.
- (31) Shackman, J. G. General Instrumentation. In: *Liquid chromatography*; Fanali, S.; Haddad, P.; Schoenmakers, P.; Loyd, D. 2nd ed. Elsevier Inc.: US, **2013**, 283–306.
- (32) Schellinger, A. P.; Carr, P. W. Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1109* (2), 253–266.
- (33) Liu, X.; Tanaka, H.; Yamauchi, A.; Testa, B.; Chuman, H. Determination of lipophilicity by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Influence of 1-octanol in the mobile phase. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1091* (1–2), 51–59.
- (34) Klouda, P. *Moderní Analytické Metody*, 2nd ed. Pavel Klouda: Ostrava, **2003**.
- (35) Chu, Y.; Poole, C. F. System maps for retention of neutral organic compounds under isocratic conditions on a reversed-phase monolithic column. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1003* (1–2), 113–121.
- (36) Dias, N. C.; Nawas, M. I.; Poole, C. F. Evaluation of a reversed-phase column (Supelcosil LC-ABZ) under isocratic and gradient elution conditions for estimating octanol–water partition coefficients. *Analyst* **2003**, *128* (5), 427–433.
- (37) Valkó, K.; Bevan, C.; Reynolds, D. Chromatographic hydrophobicity index by fast-gradient RP-HPLC: A high-throughput alternative to log P/log D. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (11), 2022–2029.

- (38) Valko, K.; Du, C.; Bevan, C.; Reynolds, D.; Abraham, M. Rapid method for the estimation of octanol / water partition coefficient (log Poct) from gradient RP-HPLC retention and a hydrogen bond acidity term (Sigma Alpha2H). *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8 (9), 1137–1146.
- (39) Kaliszan, R.; Haber, P.; Baczek, T.; Siluk, D. Gradient HPLC in the Determination of drug lipophilicity and acidity. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73 (9), 1465–1475.
- (40) Liang, C.; Qiao, J. qin; Lian, H. zhen. Determination of reversed-phase high performance liquid chromatography based octanol-water partition coefficients for neutral and ionizable compounds: Methodology evaluation. *J. Chromatogr. A* **2017**, 1528, 25–34.
- (41) Du, C. M.; Valko, K.; Bevan, C.; Reynolds, D.; Abraham, M. H. Rapid gradient RP-HPLC method for lipophilicity determination: A solvation equation based comparison with isocratic methods. *Anal. Chem.* **1998**, 70 (20), 4228–4234.
- (42) Dross, K.; Sonntag, C.; Mannhold, R. Determination of the hydrophobicity parameter RMw by reversed-phase thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A* **1994**, 673 (1), 113–124.
- (43) Berthod, A.; Garcia-Alvarez-Coque, C. *Micellar Liquid Chromatography*. Marcel Dekker: New York, **2000**.
- (44) Heibr, B. J.; Dorsey, J. N-octanol-water partition coefficient estimation by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chem.* **1995**, 67 (4), 744–749.
- (45) (<https://www.drugbank.ca/> [cit. 19. apríla 2018] ).
- (46) Meloun, M.; Militký, J. *Statistická analýza experimentálních dat*. Academia Praha: Praha, **2004**.

## 8 PRÍLOHY

**Tab. 10** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pri MF ACN/MOPS na kolóne W

Názov látky	t <sub>M</sub>	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	t <sub>R5</sub>	t <sub>Rpriem.</sub>	k <sub>priem.</sub>	log k <sub>priem.</sub>	S [ $\cdot 10^{-3}$ ]
REMACEMID	0,44	6,43	6,32	6,32	6,32	6,32	6,34	13,414	1,128	3,60
KLARITROMYCÍN	0,42	7,73	7,68	7,72	7,66	7,61	7,68	17,286	1,238	2,90
SULFAMETOXAZOL	0,46	1,96	1,95	1,95	1,96	1,95	1,95	3,248	0,512	1,59
ACETAMIDOFENOL	0,44	1,89	1,92	1,91	1,90	1,89	1,90	3,323	0,521	3,87
TAKRÍN	0,44	3,67	3,68	4,26	3,66	3,66	3,67	7,341	0,866	1,29
LABETALOL	0,44	5,17	5,17	5,18	5,16	5,16	5,17	10,745	1,031	0,77
SULFATIAZOL	0,44	2,42	2,43	2,34	2,35	2,35	2,38	4,405	0,644	9,65
KYS. ŠKORICOVÁ	0,44	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	4,295	0,633	0,01
SULFAGUANIDÍN	0,44	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	1,023	0,010	0,01

\* hodnota označená červenou farbou je odľahlý bod určený podľa rovnice (19)

**Tab. 11** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pri MF ACN/MOPS + okt. na kolóne W

Názov látky	t <sub>M</sub>	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	t <sub>R5</sub>	t <sub>Rpriem.</sub>	k <sub>priem.</sub>	log k <sub>priem.</sub>	S [ $\cdot 10^{-3}$ ]
REMACEMID	0,61	6,56	6,61	6,61	6,61	6,62	6,60	9,823	0,992	1,73
KLARITROMYCÍN	0,62	7,74	7,78	7,73	7,72	7,73	7,74	11,484	1,060	1,43
SULFAMETOXAZOL	0,59	1,47	1,48	1,47	1,48	1,48	1,48	1,502	0,177	2,69
ACETAMIDOFENOL	0,59	1,81	1,81	1,81	1,81	1,81	1,81	2,068	0,316	0,01
TAKRÍN	0,59	4,04	4,04	4,03	4,04	4,04	4,04	5,844	0,767	0,56
LABETALOL	0,59	5,42	5,42	5,42	5,42	5,43	5,42	8,190	0,913	0,40
SULFATIAZOL	0,59	2,24	2,22	2,23	2,22	2,23	2,23	2,776	0,443	2,22
KYS. ŠKORICOVÁ	0,59	1,95	1,94	1,96	1,96	1,96	1,95	2,312	0,364	2,85
SULFAGUANIDÍN	0,59	0,86	0,86	0,85	0,86	0,86	0,86	0,454	-0,343	7,33

**Tab. 12** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pri MF ACN/HEPES na kolóne W

Názov látky	t <sub>M</sub>	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	t <sub>R5</sub>	t <sub>Rpriem.</sub>	k <sub>priem.</sub>	log k <sub>priem.</sub>	S [ $\cdot 10^{-3}$ ]
REMACEMID	0,61	7,32	7,22	7,23	7,20	7,19	7,23	10,856	1,036	3,38
KLARITROMYCÍN	0,62	9,26	9,25	9,26	9,25	9,25	9,25	13,926	1,144	0,28
SULFAMETOXAZOL	0,59	1,48	1,48	1,50	1,49	1,49	1,49	1,522	0,182	4,04
ACETAMIDOFENOL	0,59	1,94	1,93	1,91	1,92	1,92	1,92	2,261	0,354	3,71
TAKRÍN	0,59	4,26	4,27	4,26	4,28	4,26	4,27	6,231	0,795	1,06
LABETALOL	0,59	5,58	5,58	5,59	5,57	5,58	5,58	8,458	0,927	0,62
SULFATIAZOL	0,59	2,17	2,17	2,16	2,16	2,16	2,16	2,668	0,426	1,51
KYS. ŠKORICOVÁ	0,59	2,22	2,22	2,21	2,23	2,20	2,22	2,756	0,440	3,05
SULFAGUANIDÍN	0,59	0,88	0,87	0,87	0,88	0,87	0,87	0,481	-0,318	8,35

**Tab. 13** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pri MF ACN/HEPES + okt. na kolóne W

Názov látky	t <sub>M</sub>	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	t <sub>R5</sub>	t <sub>Rpriem.</sub>	k <sub>priem.</sub>	log k <sub>priem.</sub>	S [ $\cdot 10^{-3}$ ]
REMACEMID	0,59	6,89	6,95	6,96	6,96	6,96	6,94	10,769	1,032	2,09
KLARITROMYCÍN	0,60	8,01	8,01	8,03	8,01	8,01	8,01	12,357	1,092	0,52
SULFAMETOXAZOL	0,59	1,49	1,49	1,48	1,46	1,49	1,48	1,512	0,180	6,40
ACETAMIDOFENOL	0,59	1,85	1,84	1,85	1,85	1,85	1,85	2,132	0,329	1,55
TAKRÍN	0,59	4,16	4,17	4,17	4,17	4,16	4,17	6,061	0,783	0,67
LABETALOL	0,59	5,47	5,47	5,46	5,46	5,47	5,47	8,264	0,917	0,49
SULFATIAZOL	0,59	2,10	2,10	2,10	2,09	2,10	2,10	2,556	0,408	1,29
KYS. ŠKORICOVÁ	0,59	2,16	2,16	2,16	2,17	2,16	2,16	2,664	0,426	1,23
SULFAGUANIDÍN	0,59	0,86	0,87	0,86	0,86	0,87	0,86	0,464	-0,333	8,65

**Tab. 14** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pri MF ACN/FOS na kolóne W

Názov látky	t <sub>M</sub>	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	t <sub>R5</sub>	t <sub>Rpriem.</sub>	k <sub>priem.</sub>	log k <sub>priem.</sub>	S [ $\cdot 10^{-3}$ ]
REMACEMID	0,55	6,89	6,87	6,88	6,89	6,87	6,88	11,509	1,061	0,69
KLARITROMYCÍN	0,57	9,19	9,21	9,21	9,20	9,20	9,20	15,144	1,180	0,42
SULFAMETOXAZOL	0,57	1,19	1,19	1,87	1,19	1,19	1,19	1,088	0,037	0,01
ACETAMIDOFENOL	0,59	1,84	1,84	1,84	1,84	1,85	1,84	2,122	0,327	1,55
TAKRÍN	0,59	3,75	3,75	3,74	3,74	3,74	3,74	5,346	0,728	0,75
LABETALOL	0,59	5,28	5,27	5,27	5,28	5,27	5,27	7,939	0,900	0,51
SULFATIAZOL	0,41	2,40	2,40	2,40	2,41	2,40	2,40	4,859	0,687	0,97
KYS. ŠKORICOVÁ	0,59	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	3,186	0,503	0,01
SULFAGUANIDÍN	0,59	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,492	-0,308	0,01

\* hodnota označená červenou farbou je odľahlý bod určený podľa rovnice (19)

**Tab. 15** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pri MF ACN/FOS+ okt. na kolóne W

Názov látky	t <sub>M</sub>	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	t <sub>R5</sub>	t <sub>Rpriem.</sub>	k <sub>priem.</sub>	log k <sub>priem.</sub>	S [ $\cdot 10^{-3}$ ]
REMACEMID	0,56	6,89	6,92	6,92	6,92	6,92	6,91	11,346	1,055	0,92
KLARITROMYCÍN	0,58	8,23	8,23	8,24	8,23	8,23	8,23	13,193	1,120	0,25
SULFAMETOXAZOL	0,58	1,87	1,87	1,87	1,87	1,87	1,87	2,224	0,347	0,01
ACETAMIDOFENOL	0,59	1,85	1,86	1,84	1,83	1,85	1,85	2,129	0,328	3,95
TAKRÍN	0,59	3,82	3,82	3,82	3,81	3,82	3,82	5,471	0,738	0,60
LABETALOL	0,59	5,33	5,32	5,33	5,33	5,32	5,33	8,027	0,905	0,50
SULFATIAZOL	0,59	2,4	2,39	2,39	2,39	2,39	2,39	3,054	0,485	1,08
KYS. ŠKORICOVÁ	0,59	2,49	2,49	2,48	2,48	2,48	2,48	3,210	0,507	1,26
SULFAGUANIDÍN	0,59	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,475	-0,324	0,01

**Tab. 16** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pri MF ACN/MOPS na kolóne K

Názov látky	t <sub>M</sub>	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	t <sub>R5</sub>	t <sub>Rpriem.</sub>	k <sub>priem.</sub>	log k <sub>priem.</sub>	S [ $\cdot 10^{-3}$ ]
REMACEMID	0,26	4,59	4,6	4,91	4,90	4,90	4,78	17,385	1,240	16,35
KLARITROMYCÍN	0,26	8,05	8,05	8,05	8,05	8,04	8,05	29,954	1,476	0,25
SULFAMETOXAZOL	0,26	0,72	0,71	0,71	0,70	0,69	0,71	1,715	0,234	11,14
ACETAMIDOFENOL	0,26	0,65	0,66	0,65	0,65	0,65	0,65	1,508	0,178	4,92
TAKRÍN	0,26	2,49	1,88	2,56	2,51	2,52	2,52	8,692	0,939	5,64
LABETALOL	0,26	3,93	3,95	3,95	3,92	3,92	3,93	14,131	1,150	1,79
SULFATIAZOL	0,26	1,21	1,21	1,21	1,21	1,23	1,21	3,669	0,565	4,05
KYS. ŠKORICOVÁ	0,26	0,92	0,93	0,93	0,91	0,92	0,92	2,546	0,406	5,50
SULFAGUANIDÍN	0,26	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,192	-0,716	0,01

\* hodnota označená červenou farbou je odľahlý bod určený podľa rovnice (19)

**Tab. 17** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pri MF ACN/MOPS + okt. na kolóne K

Názov látky	t <sub>M</sub>	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	t <sub>R5</sub>	t <sub>Rpriem.</sub>	k <sub>priem.</sub>	log k <sub>priem.</sub>	S [ $\cdot 10^{-3}$ ]
REMACEMID	0,25	4,50	4,89	4,89	4,89	4,88	4,89	18,550	1,268	16,95
KLARITROMYCÍN	0,25	5,63	5,67	5,67	5,65	6,04	5,66	21,620	1,335	13,43
SULFAMETOXAZOL	0,25	0,46	0,46	0,47	0,46	0,46	0,46	0,848	-0,072	9,04
ACETAMIDOFENOL	0,25	0,60	0,59	0,60	0,60	0,59	0,60	1,384	0,141	6,90
TAKRÍN	0,25	2,72	2,71	2,72	2,71	2,71	2,71	9,856	0,994	0,97
LABETALOL	0,25	4,01	4,01	4,01	4,01	4,01	4,01	15,040	1,177	0,01
SULFATIAZOL	0,25	0,82	0,82	0,82	0,81	0,82	0,82	2,272	0,356	3,44
KYS. ŠKORICOVÁ	0,25	0,56	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	1,208	0,082	6,37
SULFAGUANIDÍN	0,25	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,200	-0,699	0,01

**Tab. 18** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pri MF ACN/HEPES na kolóne K

Názov látky	t <sub>M</sub>	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	t <sub>R5</sub>	t <sub>Rpriem.</sub>	k <sub>priem.</sub>	log k <sub>priem.</sub>	S [ $\cdot 10^{-3}$ ]
REMACEMID	0,25	5,39	5,39	5,36	5,39	5,39	5,38	20,536	1,313	1,14
KLARITROMYCÍN	0,25	6,94	6,99	6,95	6,95	6,90	6,95	26,784	1,428	2,08
SULFAMETOXAZOL	0,24	0,47	0,48	0,48	0,48	0,45	0,47	0,967	-0,015	25,17
ACETAMIDOFENOL	0,25	0,66	0,66	0,73	0,72	0,73	0,70	1,800	0,255	36,02
TAKRÍN	0,25	2,71	2,66	2,62	2,61	2,61	2,64	9,568	0,981	7,80
LABETALOL	0,25	3,88	3,91	3,90	3,90	3,89	3,90	14,584	1,164	1,36
SULFATIAZOL	0,25	0,74	0,75	0,72	0,75	0,74	0,74	1,960	0,292	10,97
KYS. ŠKORICOVÁ	0,25	0,72	0,69	0,69	0,69	0,70	0,70	1,792	0,253	12,46
SULFAGUANIDÍN	0,24	0,31	0,31	0,31	0,26	0,31	0,31	0,292	-0,535	0,01

\* hodnota označená červenou farbou je odľahlý bod určený podľa rovnice (19)

**Tab. 19** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pri MF ACN/HEPES + okt. na kolóne K

Názov látky	t <sub>M</sub>	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	t <sub>R5</sub>	t <sub>Rpriem.</sub>	k <sub>priem.</sub>	log k <sub>priem.</sub>	S [ $\cdot 10^{-3}$ ]
REMACEMID	0,24	4,90	5,08	5,07	5,07	5,07	5,07	20,135	1,304	7,07
KLARITROMYCÍN	0,24	5,73	5,74	5,74	5,75	5,74	5,74	22,927	1,360	0,56
SULFAMETOXAZOL	0,24	0,41	0,41	0,41	0,41	0,42	0,41	0,719	-0,143	11,10
ACETAMIDOFENOL	0,24	0,59	0,58	0,58	0,60	0,59	0,59	1,448	0,161	10,41
TAKRÍN	0,24	2,70	2,70	2,68	2,70	2,71	2,70	10,240	1,010	1,94
LABETALOL	0,24	3,91	3,93	3,92	3,92	3,92	3,92	15,344	1,186	0,83
SULFATIAZOL	0,24	0,69	0,69	0,69	0,70	0,69	0,69	1,885	0,275	4,27
KYS. ŠKORICOVÁ	0,24	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	1,708	0,233	0,01
SULFAGUANIDÍN	0,24	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,250	-0,602	0,01

**Tab. 20** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pri MF ACN/FOS na kolóne K

Názov látky	t <sub>M</sub>	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	t <sub>R5</sub>	t <sub>Rpriem.</sub>	k <sub>priem.</sub>	log k <sub>priem.</sub>	S [ $\cdot 10^{-3}$ ]
REMACEMID	0,22	5,10	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08	22,109	1,345	0,80
KLARITROMYCÍN	0,22	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	29,682	1,472	0,01
SULFAMETOXAZOL	0,23	0,68	0,69	0,69	0,69	0,47	0,69	1,989	0,299	4,77
ACETAMIDOFENOL	0,22	0,67	0,67	0,67	0,68	0,66	0,67	2,045	0,311	6,83
TAKRÍN	0,22	2,33	2,35	2,35	2,33	2,33	2,34	9,627	0,984	2,24
LABETALOL	0,22	3,83	3,83	3,82	3,82	3,82	3,82	16,382	1,214	0,66
SULFATIAZOL	0,22	1,10	1,11	1,12	1,11	1,11	1,11	4,045	0,607	3,45
KYS. ŠKORICOVÁ	0,22	1,02	1,03	1,03	1,03	1,03	1,03	3,673	0,565	2,41
SULFAGUANIDÍN	0,22	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,455	-0,342	0,01

\* hodnota označená červenou farbou je odľahlý bod určený podľa rovnice (19)

**Tab. 21** Namerané dáta a vypočítané hodnoty pri MF ACN/FOS + okt. na kolóne K

Názov látky	t <sub>M</sub>	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	t <sub>R5</sub>	t <sub>Rpriem.</sub>	k <sub>priem.</sub>	log k <sub>priem.</sub>	S [ $\cdot 10^{-3}$ ]
REMACEMID	0,20	4,78	4,97	4,97	4,96	4,96	4,97	23,825	1,377	7,70
KLARITROMYCÍN	0,20	5,74	5,75	5,74	5,75	5,74	5,75	27,725	1,443	0,43
SULFAMETOXAZOL	0,22	0,58	0,58	0,58	0,58	0,57	0,58	1,625	0,211	5,47
ACETAMIDOFENOL	0,22	0,59	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	1,636	0,214	5,32
TAKRÍN	0,22	2,31	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	9,455	0,976	0,93
LABETALOL	0,22	3,76	3,77	3,79	3,76	3,80	3,78	16,182	1,209	2,22
SULFATIAZOL	0,22	0,93	0,96	0,93	0,93	0,92	0,94	3,250	0,512	9,13
KYS. ŠKORICOVÁ	0,22	0,91	0,91	0,74	0,92	0,94	0,88	2,989	0,475	8,71
SULFAGUANIDÍN	0,22	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,364	-0,439	0,01

\* hodnota označená červenou farbou je odľahlý bod určený podľa rovnice (19)