

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

VÝZNAM A METODY STANOVENÍ DISOCIAČNÍCH KONSTANT LÉČIV

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Libor Kovář

VEDOUCÍ PRÁCE: Prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.

2013

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

THE IMPORTANCE AND METHODS OF DETERMINATION OF
DISSOCIATION CONSTANTS OF SOME DRUGS

Bachelor thesis

AUTHOR: Libor Kovář

SUPERVISOR: Prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.

2013

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Libor Kovář**
Osobní číslo: **C09239**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Název tématu: **Význam a metody stanovení disociačních konstant léčiv**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma. Kriticky zhodnoťte význam stanovení disociačních konstant léčiv.
2. Kriticky zhodnoťte metody stanovení pK_a léčiv ve vodném, nevodném i smíšeném prostředí.
3. Jaký je hlavní rozdíl mezi metodami, které jsou nejvhodnější a proč?
4. Výsledky zpracujte formou bakalářské práce.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Zuzana Ferenčíková**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **25. února 2013**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. července 2013**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 25. února 2013

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že ne na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Libor Kovář

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce prof. RNDr. Milanu Melounovi, DrSc. za jeho odborné vedení, řadu cenných námětů, rad a připomínek, které mi byly důležitou pomocí při tvorbě bakalářské práce. Děkuji i všem pedagogům Univerzity Pardubice, kteří se při mém studiu podíleli na obohacení mých znalostí a zkušeností.

Velice děkuji slečně Ing. Zuzaně Ferenčíkové za její rady a ochotu při konzultacích.

Děkuji svým rodičům a přítelkyni za jejich pomoc, obětavost, porozumění a toleranci, které vedly k vytvoření příznivých podmínek pro mé studium.

Anotace

Bakalářská práce je věnována popisu stanovení disociačních konstant léčiv instrumentálními analytickými metodami. Většina léčiv jsou slabé kyseliny nebo zásady a jejich acidobazické vlastnosti mají vliv na jejich farmakokinetiku a farmakodynamiku. V experimentální části práce byla použita kyselina acetylsalicylová k validaci metody potenciometrické titrace ve vodně-metanolickém prostředí.

Klíčová slova

Kyselina acetylsalicylová, disociační konstanta, potenciometrická titrace, směsné prostředí.

Annotation

Bachelor thesis deals with an instrumental analytical methods using to determination of dissociation constants of drugs. Drugs are chemically acids or basis and their acid-base properties affect their pharmacokinetics and pharmacodynamics. The acetylsalicylic acid was used in the experimental part of the work to validate the method of potentiometric titration in aqueous-methanolic environment.

Keywords

Acetylsalicylic acid, dissociation constant, potentiometric titration, organic-aqueous environment.

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Teoretická část.....	12
2.1	Léčivo.....	12
2.2	Disociační konstanta	12
2.2.1	Makroskopická konstanta	12
2.2.2	Mikroskopická konstanta.....	13
2.3	Léčivo v organismu.....	15
2.3.1	Transport léčiv	15
2.3.2	Osud léčiva v organismu.....	16
2.4	Způsoby podání.....	18
2.4.1	Enterální.....	18
2.4.2	Parenterální	19
3	Instrumentální metody ke stanovení disociační konstanty	21
3.1	Predikce disociačních konstant	21
3.2	Potenciometrie.....	21
3.3	Molekulová absorpční spektroskopie.....	23
3.4	Kapilární elektroforéza.....	26
3.5	Kapalinová chromatografie	27
3.6	Nukleární magnetická rezonance	29
3.7	Další metody	31
3.7.1	Molekulová emisní-absorpční fluorescenční spektroskopie	31
3.7.2	Kolorimetrie.....	31
3.7.3	Voltametrie	31

3.7.4	Konduktometrie	32
3.8	Stanovení disociační konstanty pK_a ve vodném či smíšeném prostředí.	32
4	Experimentální část.....	33
4.1	Chemikálie a roztoky	33
4.2	Použité přístroje a jejich parametry.....	35
4.3	Postup potenciometrické titrace	37
5	Výsledky a diskuze	39
6	Závěr	41
7	Literatura:.....	42

1 Úvod

Cílem bakalářské práce je popsat význam a stanovení disociačních konstant léčiv. Většina léčiv jsou slabé kyseliny nebo zásady a jejich acidobazické vlastnosti mají vliv na jejich farmakokinetiku, farmakodynamiku a zároveň popisují, jestli se dané léčivo za konkrétních podmínek bude vyskytovat v ionizované či neionizované formě. Disociační konstanta určuje kde a za jakých podmínek bude docházet k absorpci, distribuci a vylučování z těla, a proto jejich stanovené hodnoty jsou žádány farmaceutickými firmami či lékařem. Např. slabé kyseliny se lépe adsorbují v kyselém prostředí žaludku, než v zásaditém prostředí střev.

Nejstarší, ale stále nejčastěji používanou metodou je potenciometrická titrace [1-7]. Mezi další hojně užívané metody patří UV/VIS spektrofotometrie [4,7-17], kapalinová chromatografie [4,18-22], kapilární elektroforéza [23-28] a NMR [29-32].

V experimentální části tato bakalářská práce ukazuje jako příklad potenciometrickou titraci kyseliny acetylsalicylové v organicko-vodném prostředí.

2 Teoretická část

2.1 Léčivo

Léčivo je látka či směs léčivých látek nebo léčivý přípravek. Je určeno k příznivému ovlivňování zdraví lidí nebo zvířat. Léčivou látkou se rozumí látka přírodního nebo syntetického charakteru s farmakologickým účinkem na organismus. V odborné literatuře nebo ve firemní dokumentaci se léčivá látka označuje jako API (Active Pharmaceutical Ingredient). Léčivými látkami jsou nejčastěji čisté chemické substance s přesně definovanou strukturou. Pouze API podléhá zkoumání disociačních konstant [33]. Kromě API konečná forma léku obsahuje ještě další pomocné látky bez vlastního účinku, které napomáhají její výrobě, aplikaci, uchovávání apod. Pro každou lékovou formu jsou specifické pomocné látky.

2.2 Disociační konstanta

Pro správné vysvětlení farmakologických jevů jako je absorpce, distribuce a eliminace je často pro lékaře třeba znát disociační konstantu. Je jednou z důležitých veličin sloužící k popisu vlastností léčiva a poznatky o jeho pK_a jsou významné i pro samotnou výrobu lékových forem. Většina léčiv jsou slabé kyseliny nebo zásady. V závislosti na pH se mohou v těle vyskytovat v ionizované či neionizované formě. Ionizované molekuly jsou hydrofilnější, neionizované molekuly jsou naopak lipofilnější. Neionizované formy snáze přecházejí fosfolipidovými membránami [34]. Výsledkem je, že za rovnovážného stavu se bude lišit celková (ionizovaná + neionizovaná) koncentrace látky v různých kompartmentech (prostorech). Bazické léčivo bude koncentrováno v kompartmentu o nižším pH a naopak.

Disociační konstanta je rovnovážná konstanta disociační reakce $HA \leftrightarrow H^+ + A^-$, která charakterizuje složení reakční směsi po dosažení chemické rovnováhy [35].

2.2.1 Makroskopická konstanta

O makroskopické konstantě mluvíme především u látek, které mají jedno centrum schopné disociace (acidobazická rovnováha) a je popsána rovnicí:



Disociační konstanta K_a je definována vztahem

$$K_a = \frac{a_{H^+} \cdot a_{A^-}}{a_{HA}} \quad (2)$$

$$a_i = x_i \cdot \gamma_i, \quad (3)$$

kde a_i značí aktivitu iontů, γ_i aktivní koeficient a x_i molární zlomek. Aktivita je veličina, která popisuje míru interakce iontů v roztoku s okolím. Závisí na okolí a je dána kovalentními a elektrostatickými interakcemi. T.zn., že reaktivita iontu obklopeného molekulami vyrovnaného rozpouštědla (voda, alkoholy...) bude jiná než u iontu obklopeného protofilním rozpouštědlem jako je třeba kapalným amoniak. Aktivita iontů je závislá na iontové síle roztoku dle limitního Debye-Hückelova vztahu pro střední aktivní koeficient:

$$-\log \gamma_i = A |z_+ z_-| \sqrt{I}, \quad (4)$$

kde A je tabelovaná hodnota závislá na teplotě, z_+ a z_- značí náboje kationtů a aniontů a I pak iontovou sílu roztoku definovanou vztahem:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i \cdot z_i^2, \quad (5)$$

kde c_i značí molární koncentraci, z_i mocnoství iontu. Tento vztah lze užít pouze, je-li hodnota iontové síly nepřevyšuje 0.01. V opačném případě užijeme rozšířený Debye-Hückelův vztah:

$$-\log \gamma_i = \frac{A |z_+ z_-| \sqrt{I}}{1 + B a \sqrt{I}} + C I, \quad (6)$$

kde B značí tabelovanou hodnotu závislou na teplotě, a efektivní průměr iontu a C vysolovací konstantu. Pokud je roztok dostatečně zředěný ($c < 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) je možné aktivitu považovat za jednotkovou a disociační konstantu pak lze vyjádřit pouze s využitím rovnovážných koncentrací:

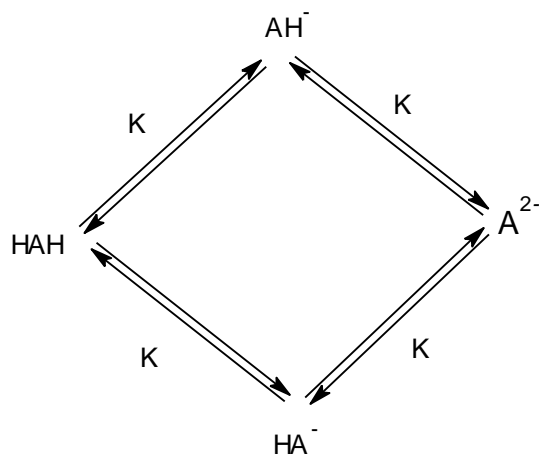
$$K_c = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}. \quad (7)$$

Zlogaritmováním rovnice (2) získáme Henderson-Hasselbachovu rovnici:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}. \quad (8)$$

2.2.2 Mikroskopická konstanta

V asymetrických molekulách s minimálně dvěma centry schopnými disociace, které zároveň splňují podmínku, že rozdíl mezi $\text{p}K_{a,n}$ a $\text{p}K_{a,n+1}$ není větší než tři, lze sledovat výskyt konstant mikroskopických. Typickými zástupci s dvěma centry schopnými disociace a zároveň tělu vlastními jsou α -aminokyseliny.



Obr. 1 Postupná disociace látky s dvěma centry schopné acidobazické rovnováhy.

Z obrázku 1 je zřejmé, že mezi HAH a A^{2-} se nachází čtyři mikroskopické konstanty. Např. konstantě $K_{a,A}$ odpovídá vztah:

$$K_{a,A} = \frac{[H^+][HA^-]}{[HAH]}, \quad (9)$$

a dle stejného principu lze vypočítat mikroskopické konstanty $K_{a,B}$, $K_{a,C}$, $K_{a,D}$. Mikroskopické konstanty se dále přepočítají na makroskopické K_{a1} a K_{a2} .

$$K_{a1} = K_{aA} + K_{aB}, \quad (10)$$

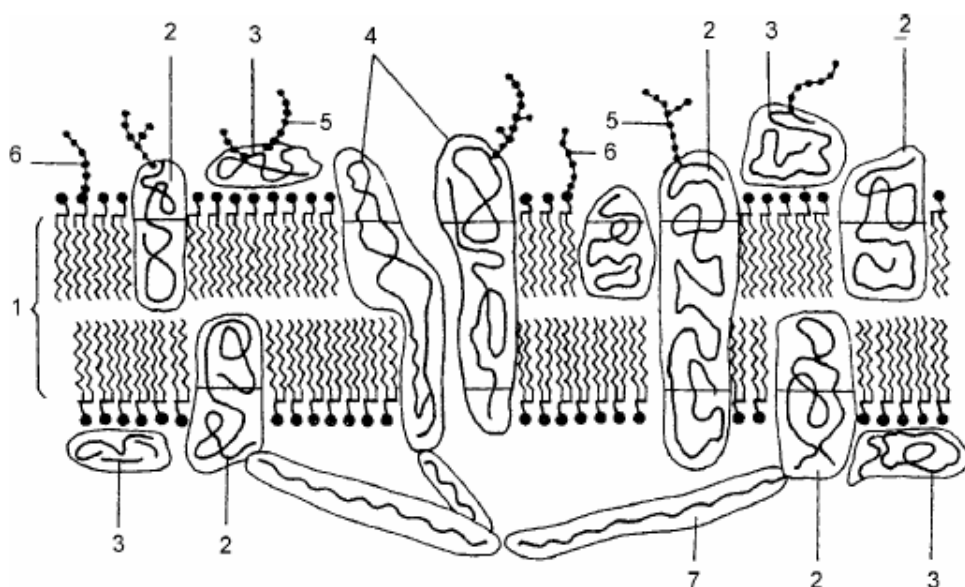
$$K_{a2} = K_{aC} + K_{aD}, \quad (11)$$

2.3 Léčivo v organismu

2.3.1 Transport léčiv

Organismus se považuje za soustavu vzájemně propojených kompartmentů, ve kterých se dané látky chovají zcela specificky. Mezi hlavní kompartmenty řadíme krevní plazmu (event. i krev), intracelulární a extracelulární tekutiny, tukovou tkáň. Jednotlivé kompartmenty jsou od sebe odděleny bariérami, které mají pro různé typy látek rozdílnou propustnost. Těmito bariérami jsou nejčastěji membrány.

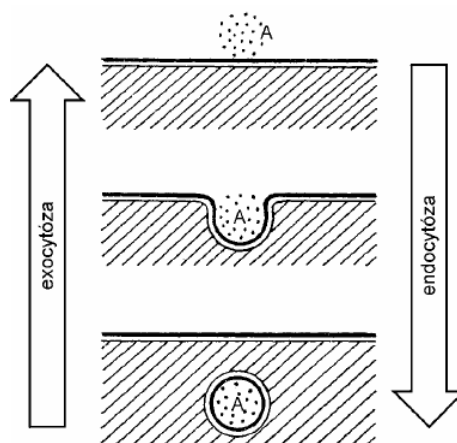
Stavba membrány je patrně nejlépe popsána v rámci tzv. mozaikového modelu [33], který říká, že je tvořena dvojitou vrstvou fosfolipidů, jenž jsou k sobě poutány hydrofobními interakcemi a proteiny (fungující jako enzymy, iontové kanály, pumpy, receptory apod.), které se mohou v rámci jedné vrstvy relativně volně a nahodile pohybovat. Polární, hydrofilní skupiny (tzv. „hlavy“) molekul fosfolipidů směřují vně membrány, hydrofobní alkylové řetězce jsou orientovány do nitra dvojvrstvy [36].



Obr. 2 Struktura membrány. Lipidová dvojvrstva (1) s integrálními (2) a periferními (3) bílkovinami. Příklad transmembránové integrální bílkoviny (4) vytvářející kanál v membráně. Na vnější straně membrány jsou vázány sacharidy na bílkoviny (5) a nepolární části některých lipidů (6). Vnitřní strana membrány bývá zpevněna vláknitými bílkovinami (7). Převzato z [33].

Látky (včetně léčiv) se snaží dostávat dovnitř/vně membrány různými mechanismy. Existují čtyři hlavní způsoby přestupu látky přes membránu, ale pro většinu léčivých látek je podstatná především difuze přes lipidy (pasivní transport) a transport pomocí přenašečů. Pasivní transport je řízen koncentračním spádem a není třeba dodávat energii, čehož ve velké míře využívají především lipofilní látky. Oproti tomu aktivní transport může probíhat i proti koncentračnímu spádu, ale je nutné dodávat energii (ATP). Přechod iontovými kanálky má praktický význam převážně při eliminaci látek ledvinami.

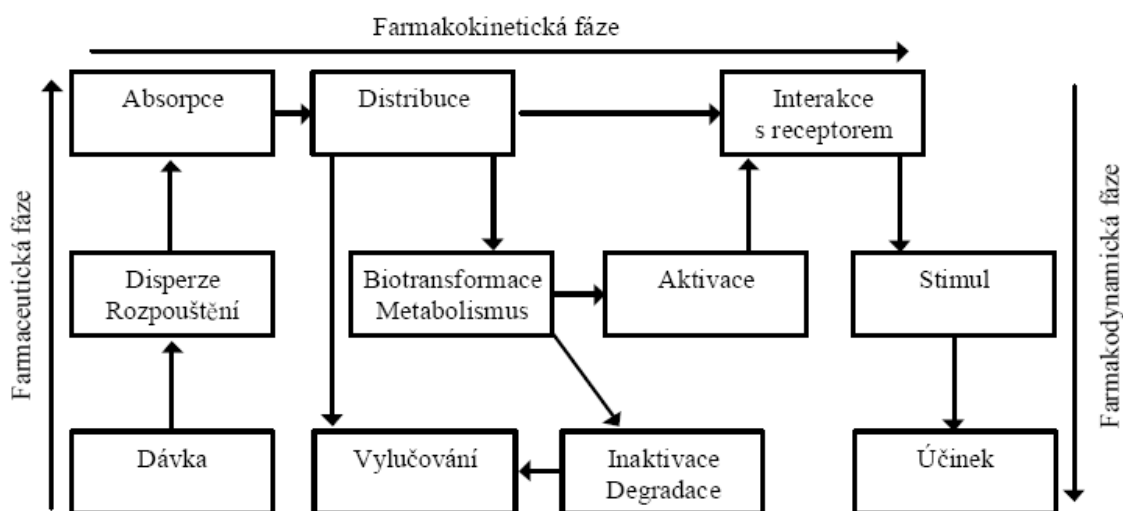
Mezi významné transporty řadíme též pinocytózu. Substance, která se musí dostat vně (exocytóza) nebo dovnitř (endocytóza) bariéry se obalí látkou, která svým složením připomíná membránu.



Obr. 3 Endocytóza a exocytóza - schéma transportu látky (A) přes membránu. Převzato z [33].

2.3.2 Osud léčiva v organismu

Osud celkově působícího léčiva po jeho podání do organismu je schematicky znázorněn na obrázku 4.



Obr. 4. Schéma farmaceutické, farmakokinetické a farmakodynamické fáze léčiva v organismu. Převzato z [33].

Osud léčiva v organismu je řízen řadou komplikovaných procesů. Absorpce látky je charakterizována rychlostí, po jakou dobu jí trvá opustit místo, do kterého bylo aplikováno. S absorpcí je blízce spjatá tzv. biologická využitelnost [37]. Udává rozsah, ve kterém léčivo dosáhne systémové cirkulace. Distribuce (rozptýlení) léčiva v organismu je ovlivněna vznikem komplexu protein krevní plazmy + léčivo. Pevnost této vazby vyjadřuje hodnota rovnovážné konstanty K .

$$K = \frac{c_{LP}}{c_L \cdot c_P}, \quad (13)$$

kde c_L ukazuje na rovnovážnou koncentraci volného léčiva, c_P na rovnovážnou koncentraci volného proteinu a c_{LP} na rovnovážnou koncentraci komplexu léčivo/protein

Pouze volné léčivo může podléhat biotransformaci a eliminaci a pouze nevázané léčivo je účinné. Čím vyšší rovnovážná konstanta K , tím vzniká více komplexu léčivo-protein, a tím je třeba do těla dodávat více účinné látky, aby bylo dosaženo požadovaného účinku. Léčivo ve volné formě je vystaveno mnoha nescifickým enzymovým reakcím, při kterých dochází k jeho biotransformaci (přeměně) na hydrofilní látky, které jsou poté schopny exkrece (vylučování). Metabolická přeměna může vést i k inaktivaci/deaktivaci účinku nebo naopak k aktivaci. Jsou známy i případy, kdy z neškodné látky pro organismus vznikne díky biotransformaci látka toxická (metanol/formaldehyd) [38].

2.4 Způsoby podání

Medicína do současnosti vyvinula mnoho způsobu, jak vpravit lék do organismu (krevního řečiště). Volba metody závisí především na aktuálním stavu léčené osoby a vlastnostech účinné látky [39].

2.4.1 Enterální

2.4.1.1 Perorální podání

Jedná se o nejčastěji užívanou metodu podání léku především proto, že je nejekonomičtější a nejpohodlnější. Některá léčiva nelze tímto způsobem podávat především pro jejich fyzikální vlastnosti. Lék musí projít přes trávicí trakt, kde může dojít k destrukci žaludečními šťávami nebo trávicími enzymy. Jestliže se absorpce uskutečňuje pasivní cestou, poté je možné absorpci podpořit podáním léku v neionizované podobě, kdy je látka více lipofilní.

2.4.1.2 Sublingvální podání

Při sublingválním podání lék neputuje do trávicího traktu, jelikož se aplikuje pod jazyk, kde je vysoce prokrvená sliznice. Výhodou je rychlý nástup účinku a po dosažení potřebné koncentrace lze neprodleně ukončit vstřebávání další účinné látky. Látka, která se podává sublingválně je např. nitroglycerin, který vykazuje velkou účinnost, jelikož v přítomném pH není ionizován.

2.4.1.3 Rektální podání

Léčivo je aplikováno do konečníku, odkud dochází k absorpci do krve. Podávají se většinou takové látky, které by se mohli působením žaludečních šťáv znehodnotit nebo pacient není schopen lék požit (vyvolává zvracení apod.) či je v bezvědomí. Často se této aplikaci využívá taktéž u dětí. Některé látky se aplikovat rektálně nemohou, jelikož dráždí rektální sliznici.

2.4.2 Parenterální

2.4.2.1 Inhalace

Inhalace se nejběžněji používá pro uklidnění dýchacího systému (při záchvatech kašle) nebo k dosažení systémového účinku (anestézie). Plyny vyvolávající celkovou anestezii se přes plíce dostávají do krve a působí na organismus.

2.4.2.2 Injekční podání

Podle místa podání se dělí na intravenózní (nitrožilní), intramuskulární (do svalu) a subkutánní (pod kůží). U intravenózního podání prakticky nedochází k absorpci a léčivo ihned účinkuje. Tohoto se využívá především u akutních problémů. Léčiva olejovitého charakteru, suspenze, nebo ta léčiva, která sráží krevní složky, se nesmí podávat intravenózně. Naopak při aplikaci do svalu nebo pod kůží hraje absorpce roli a kromě bariér, které látka musí projít, hraje důležitou roli i disperzní systém.

2.4.2.3 Lokální podání

Léčivo se aplikuje na povrch organismu (kůže, sliznice). Předpokládá se, že účinná látka bude působit jen v místě nebo blízkosti podání. Jedná se o různé oční/ nosní kapky, mastě, zásypy, náplasti.

2.4.2.4 Přípravky s pomalým uvolňováním

Jedná se o implantáty operativně vpravené pod kůži nebo speciální náplasti, které kontinuálně uvolňují určitou koncentraci léku do krve.

Mezi specifické aplikace léku patří vaginální podání a podání močovou trubicí. Tyto aplikace jsou užívány především při léčení lokálních infekcí.

Z farmakodynamického hlediska mají léčiva specifický a nespecifický účinek. U specifického účinku se API naváže na receptor a vyvolá příslušný efekt. Látky, které po navázání na receptor vyvolávají podobné/stejně účinky endogenní látky, nazýváme

agonisty. Látky, které brání účinku endogenního působení, nazýváme jejich antagonisty. Některé typy léčiv působí nespecificky a jejich účinek vyplývá pouze z obecných fyzikálně-chemických vlastností. Typickými zástupci jsou inhalační anestetika, antacida a absorbenty.

3 Instrumentální metody ke stanovení disociační konstanty

V dnešní době existuje mnoho instrumentálních metod, kterými lze disociační konstantu stanovit. Léčiva bývají však převážně molekuly bazického či kyselého charakteru, které se obtížněji rozpouštějí. Z tohoto důvodu se nejčastěji metody rozdělují na vysokokontrační cca. $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (např. potenciometrie) a nízkokontrační cca. $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (např. kapalinová chromatografie HPLC).

3.1 Predikce disociačních konstant

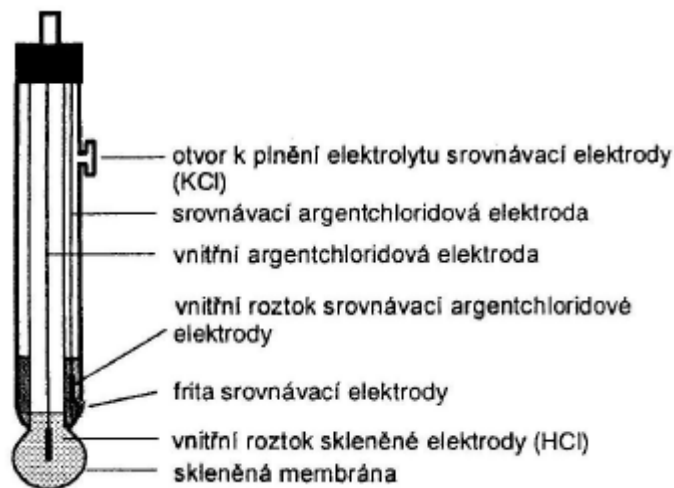
V současné době se před samotným stanovením disociačních konstant léčiv provádí tzv. predikce neboli hrubý odhad pK_a na základě struktury a fyzikálně-chemických vlastností sloučeniny. Programy jsou založeny na složitých chemických výpočtech, které berou v úvahu tautomerii, hydrataci molekuly, rezonanční struktury a další. Dosažený výsledek se porovnává s databází tabulkových hodnot experimentálně stanovených látek a vyčíslí se disociační konstanta. Za tím účelem se užívají volně dostupné programy jako PALLAS [40], MARVIN [41], SPARC [42] a ADC/LAB [43].

3.2 Potenciometrie

Potenciometrie je instrumentální analytická metoda, která je založena na měření rovnovážného napětí článku, který je zpravidla sestaven z měrné a srovnávací elektrody. Elektrický potenciál indikační elektrody závisí na koncentraci sledované látky a potenciál srovnávací elektrody je stále stejný. Rovnovážné napětí, které je rozdílem těchto dvou potenciálů, je mírou koncentrace sledované látky [44].

Dnes se v praxi nevyužívá dvou elektrod, ale převážně kombinované skleněné elektrody. Skleněná elektroda patří mezi iontově-selektivní elektrody, které jsou vyrobeny z membrán citlivých na specifický ion. Schopnost skleněné elektrody indikovat H^+ se zjednodušeně vysvětluje tím, že skleněná membrána (vyfouknutá banička z velmi tenkého skla) je propustná pouze pro H^+ ionty. Ve vnitřním elektrolytu je ponořený stříbrný drátek potažený vrstvičkou $AgCl$. Čím je větší kyselost zkoumaného roztoku, tím se dostane více H^+

iontů dovnitř baničky. Ionty Cl^- membránou neprocházejí a pro zachování elektroneutality roztoku dochází k reakci na elektrodě: $\text{AgCl(s)} + e^- \leftrightarrow \text{Ag(s)} + \text{Cl}^-$. Jestliže je elektroda ponořena do kyselého roztoku tak reakce bude probíhat zprava doleva a spotřebuje se více elektronů ze stříbrného drátku a elektroda získá kladnější napětí. Naopak v zásaditém prostředí nadbytek Cl^- bude své elektrony odevzdávat a na elektrodě bude zápornější napětí.



Obr. 5 Schéma kombinované skleněné elektrody. Převzato z [44]

Při ponoření elektrody do měřeného roztoku vzniká mezi vnější a vnitřní stranou skleněné membrány potenciálový rozdíl, jehož velikost je úměrná rozdílu pH měřeného a vnitřního roztoku. Poněvadž roztok uvnitř elektrody je vždy stejný, závisí výsledný potenciál pouze na hodnotě pH měřeného roztoku. Rovnice pro výpočet pH vychází z Nernstovy-Petersonovy rovnice:

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{red}}{a_{ox}}, \quad (14)$$

kde E značí elektrodový potenciál elektrody, E^0 standardní elektrodový potenciál, R molární plynovou konstantu ($8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), T teplotu v Kelvinech, n počet vyměněných elektronů, F Faradayovu konstantu ($96485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$), a aktivitu oxidované či redukované formy.

Po mírné úpravě a dosazení vznikne vztah, ze kterého z elektrodového potenciálu dopočítám pH:

$$E = 0 + \frac{8,314 \cdot 298}{1 \cdot 96485} \log a_{\text{H}^+}, \quad (15)$$

$$E = -0,05916 \text{ pH}, \quad (16)$$

Konečná rovnice je platná za standardního tlaku a teploty. Společně s molekulovou absorpční spektroskopií je potenciometrie nejspolehlivější (přesnou a správnou), a proto nejužívanější metodou pro stanovení disociační konstanty. Principem je potenciometrická titrace. Ze

spotřeby titračního činidla a změřených hodnot pH se vyjádří potenciometrická křivka (sinoida), ze které se vypočte disociační konstanta. Potenciometricky nemohou být stanoveny extrémně kyselé či bazické látky, protože látky v takových oblastech již pro potenciometrickou titraci bývají nestabilní. Největší nevýhodou potenciometrické titrace je nutnost relativně vysoké koncentrace stanovované látky cca $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jelikož léčiva, API jsou většinou látky hůře rozpustné ve vodě, tak se tento problém řeší tzv. Yasuda-Sheldovskyho metodou [15,45]. Pro vyhodnocení disociační konstanty se užívá především mezinárodně validovaných programů ESAB2M [46] a HYPERQUAD [47-48].

3.3 Molekulová absorpční spektroskopie

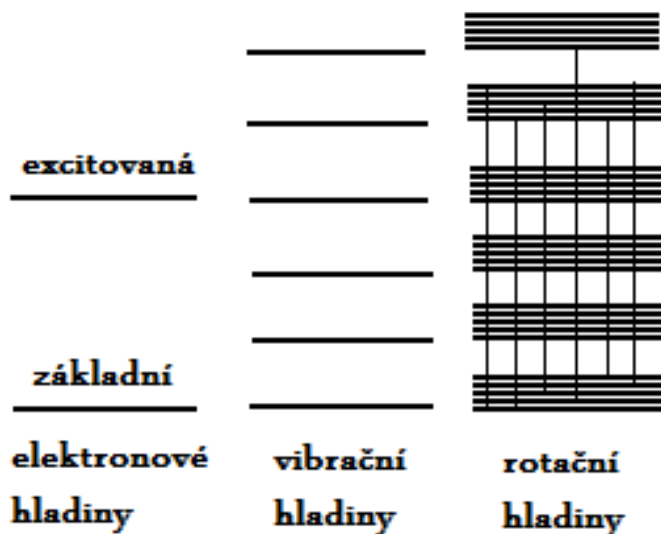
Metoda molekulové absorpční spektroskopie je založena na absorpci elektromagnetického záření. Při interakci fotonů specifické vlnové délky s valenční vrstvou zkoumané látky dojde k absorpci energie, která způsobí přechod elektronu ze základního stavu na hladinu excitační. Ve spektru poté pozorujeme absorpční pás s energií odpovídající rozdílu energií obou stavů elektronů.

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu , \quad (17)$$

kde E_2 ukazuje na energii v excitovaném stavu, E_1 energii v základním stavu, h Planckovu konstantu a ν frekvenci záření. Vnitřní energie molekuly je dána součtem tří druhů energií: elektronové, vibrační a rotační. Každý elektronový přechod je doprovázen přechody vibračními a rotačními, jejichž energie se vzájemně liší o poměrně malé hodnoty. Rozlišujeme zde šest základních přechodů:

- 1) $\sigma \rightarrow \sigma^*$ - vyžadují vysokou energii, pokud molekula obsahuje jednoduché vazby, v praxi nemá význam,
- 2) $n \rightarrow \sigma^*$ - pokud molekula obsahuje heteroatomy (O, S, N, X) s volnými elektronovými páry,
- 3) $\pi \rightarrow \pi^*$ - přechod z vazebného do protivazebného orbitalu u všech nenasycených sloučenin (alkeny, alkiny, areny, ketony, karboxylové kyseliny apod.),
- 4) $n \rightarrow \pi^*$ - u sloučenin, které obsahují dvojně nebo trojně vazby, na nichž se podílí alespoň jeden atom s volným elektronovým párem (-C=O, -C=S),
- 5) $\sigma \rightarrow \pi^*$ - symetricky zakázaný,
- 6) $\pi \rightarrow \sigma^*$ - symetricky zakázaný.

UV-VIS záření má dostatečnou energii fotonů, aby excitaci mezi hladinami zrealizovala. Nelze totiž zabránit tomu, aby se zamezilo energetickým přechodům molekuly do vyšších vibračních a rotačních hladin díky energii fotonů.



Obr. 6 Schéma přechodu elektronů při absorpci záření molekulou.

Při kvalitativní analýze hraje významnou roli absorpční spektrum, které je charakteristické pro každou chemickou látku. Pro kvantitativní analýzu je rozhodující míra absorbance, která je definována Lambert-Beerovým zákonem:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c_x, \quad (18)$$

kde A značí absorbanci, ε molární absorpční koeficient, l délku kyvety a c_x koncentraci látky rotační hladiny. Absorbance se též počítá z transmittance:

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0}, \quad (19)$$

kde T značí transmittanci, Φ intenzitu záření po výstupu z kyvety, Φ_0 intenzitu záření před vstupem do kyvety. Po následném zlogaritmování transmittance se vyčíslí absorbance

$$A = \log T, \quad (20)$$

UV/VIS spektrofotometrie má nespornou výhodu především v tom, že látka se může měřit i při velmi malých koncentracích. Nejnižší možné koncentrace se uvádí až okolo $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nezbytnou podmínkou, která musí být v této metodě splněna, je přítomnost UV-aktivního chromoforu v blízkosti místa, kde dochází k protonační/disociační rovnováze. Jako chromofory se označuje skupina atomů, která je schopna absorbovat elektromagnetické záření a obsahuje π -elektronový systém konjugovaných násobných vazeb. U léčiv není výjimkou, že

se v molekule vyskytují substituenty s volným elektronovým párem (-Cl, -OH, -NH₂ atd.), kterým říkáme auxochromy. Tyto skupiny atomů nám komplikují měření, protože při interakci s chromoforem vyvolávají posun maximálních vlnových délek k vyšším. Jelikož se nejedná o separační metodu, tak je nesmírně důležitá čistota látky.

V praxi se při stanovení disociační konstanty užívá několik postupů. K nejjednodušším patří stanovení při maximální vlnové délce, kdy API vykazuje největší absorbanci. Bohužel tuto metodu lze použít pouze v případě, jestliže se jedná o jednosytnou kyselinu/bázi nebo o vícesytnou kyselinu se vzdálenými disociačními konstantami.

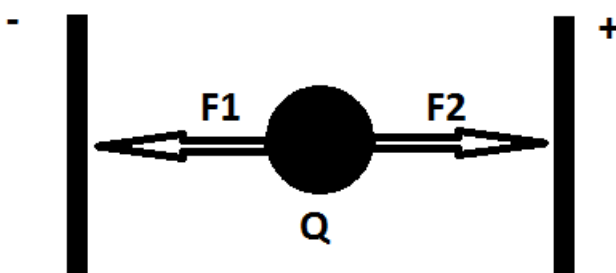
Pokud se jedná o vícesytnou kyselinu/bázi s blízkými konstantami je výhodnější použít metodu měření při více vlnových délkách. Vyhodnocení takového měření je samozřejmě složitější a je potřeba použití speciálních regresních programů jako jsou SQUAD [49] a SPECIFIT/32 [50].

Experimentálně se užívají dvě metody titrace tzv. v kyvetě či vně kyvety. Při provádění první varianty (uvnitř) je titrace prováděna přímo v kyvetě, kdy je do kyvety vsunut elektroda minimální velikosti a roztokem je mícháno též miniaturním mechanickým míchadlem.

Při titraci vně kyvety se titrační činidlo přidává do API díky automatizovanému titrátoru do tzv. reaktoru, ze kterého je směs přiváděna čerpadlem do průtočné kyvety umístěné ve spektrofotometru [13].

3.4 Kapilární elektroforéza

Řadíme ji mezi elektroforézní metody. Jde separační metodu, která rozděluje látky na základě jejich pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektroforetická pohyblivost nabitých částic je rychlost pohybu v elektrickém poli. Na začátku separace jsou všechny částice v jednom místě, ale po spuštění stejnosměrného elektrického proudu se zahájí separace. Dopředu se dostávají ty nabitě částice, které mají větší pohyblivost (čím menší a více nabitá částice, tak tím má větší pohyblivost). Tím dochází k jejich oddělení:



Obr. 7 Síly působící na nabitou částici

Na nabitou částici o náboji působí v elektrickém poli o dané intenzitě dvě síly:

$$F_1 = Q \cdot E, \quad (21)$$

kde F_1 ukazuje na elektrickou sílu, Q náboj a E intenzitu.

$$F_2 = k \cdot v, \quad (22)$$

kde F_2 značí odporovou sílu vnitřního prostředí, k koeficient závislý na tvaru a velikosti částice, v rychlost částice. Na počátku měření je rychlost v nulová. Částice je uvedena silou F_1 do pohybu, ale s rostoucí rychlostí se zvětšuje i síla F_2 , tak dlouho až se obě síly působící na částici vyrovnají a nastane stacionární stav. Pro pohyblivost částice μ poté vychází vztah:

$$\mu = \frac{v}{E}, \quad (23)$$

Pokud se měření započne zkoumáním nenabitě molekuly, tak je mobilita nulová, ale díky rostoucí ionizaci se mobilita zvětšuje. V roztocích slabých elektrolytů jsou vedle sebe disociované (nabitě) a nedisociované (nenabitě) molekuly. Pro jednosytnou slabou kyselinu platí:

$$\mu_{eff} = \sum_i x_i \cdot \mu_{A-i}, \quad (24)$$

kde značí μ_{eff} efektivní mobilitu, x_i podíl jednosytné kyseliny ve formě aniontu, $\mu_{A-, i}$ elektroforetickou mobilitu aniontu. Podíl jednosytné kyseliny ve formě aniontu se dopočítá pomocí vztahu:

$$x_i = \frac{K_a}{[H^+] + K_a}, \quad (25)$$

Následným sloučením rovnic dostaneme vztah, ze kterého již získáme disociační konstanty:

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_{A-, i} \cdot 10^{-pK_a}}{10^{-pK_a} + 10^{-pH}}, \quad (26)$$

Efektivní mobilita se stanovuje experimentálně ze znalosti celkové délky kapiláry, efektivní délky kapiláry (k detektoru), vloženého napětí, migračního času zkoumané látky a markeru. Jako marker se nejčastěji používá metanol.

Kapilární elektroforéza je dnes označována za nejvýhodnější metodu stanovení disociačních konstant málo rozpustných látek, a proto je často užívanou metodou. Nespornou výhodou této metody je, že není potřeba rozpuštění celého množství zkoumané látky. Elektroforetická mobilita se mění s hodnotou pH. Změřené pohyblivosti zaneseme do grafu vůči pH elektrolytu. Uvedená závislost se proloží sigmoidální křivkou a z inflexního bodu se získá hodnota pH, která odpovídá disociační konstantě. Kapilární elektroforézy se využívá hojně i proto, že k analýze stačí malé množství vzorku (ng). Koncentrace zkoumané látky je omezena pouze schopností detektoru látku postřehnout. Stejně jako u chromatografie nemusí být látka dokonale čistá, jelikož se jedná o separační metodu.

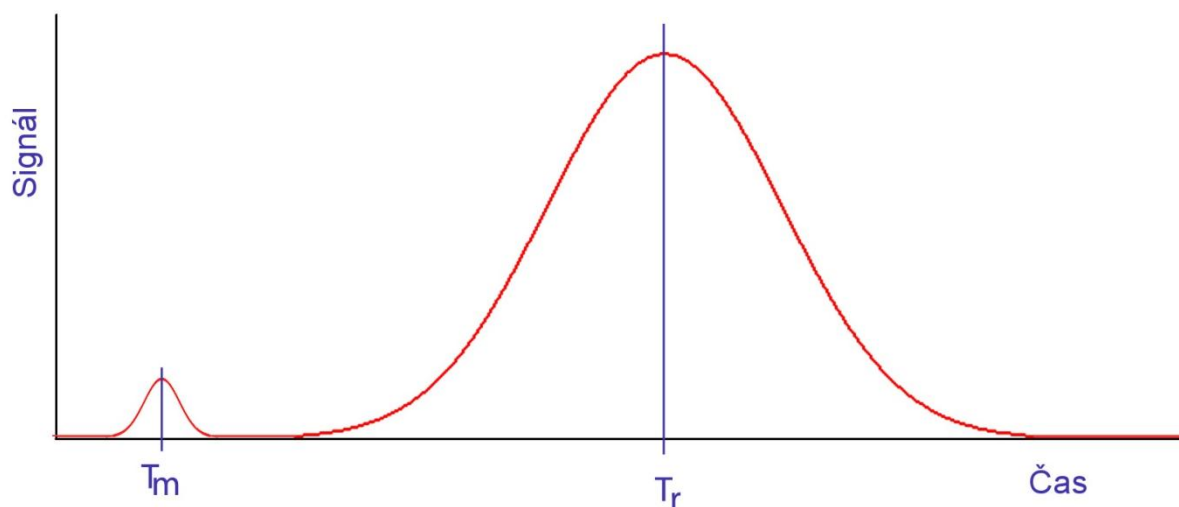
3.5 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je nejužívanější separační metoda. Ve většině případů se používá kolonová chromatografie, kde kolona je úzká trubice naplněná sorbentem. Mezi malými částicemi sorbentu ve stacionární fázi v koloně protéká kapalina zvaná mobilní fáze. Při nejběžnější eluční metodě se vzorek vstříkne na začátek kolony a je unášen příslušnou mobilní fází do kolony. Tady se látka zdržuje v závislosti na velikosti retence. Velikost retence či zadržení je závislá na distribuční konstantě K :

$$K = \frac{n_s}{n_m}, \quad (27)$$

kde K značí distribuční konstantu, n_s látkové množství ve stacionární fázi, n_m látkové množství v mobilní fázi. Pro zadržení látky v koloně je tedy rozhodující distribuční konstanta K . Čím vyšší K , tím se látka více zdržuje ve stacionární fázi a má vyšší retenční faktor.

Mobilní fáze vystupující z chromatografu jde do detektoru, který na základě fyzikálně chemických změn indikuje přítomnost příslušných složek. Tyto změny se zapisují do chromatogramu.



Obr. 8 T_m - mrtvý retenční čas. Složka, která není na koloně zadržována má stejný retenční čas jako mobilní fáze a tento čas se nazývá mrtvý, T_r - retenční čas. Je to doba, za kterou projede látka (zadržovaná na sorbentu) kolonou.

Z redukovaného retenčního faktoru lze vypočítat retenční faktor k pro danou látku.

$$k = \frac{T_r}{T_m}, \quad (28)$$

kde k značí retenční faktor, T_r redukovaný retenční čas (rozdíl T_r a T_m) a T_m mrtvý retenční čas

Retenční faktory jsou často použity pro identifikaci látek, jelikož daná látka má za určitých podmínek charakteristický retenční faktor. Pro jednosytnou kyselinu můžeme retenční faktor popsat pomocí rovnice:

$$k = x_{HA}k_{HA} + x_{A^-}k_{A^-}, \quad (29)$$

kde x_{HA} značí molární zlomek kyseliny, x_{A^-} molární zlomek aniontu, k_{HA} retenční čas kyseliny, k_{A^-} retenční čas aniontu. Pro dopočítání molárních zlomků jsou nezbytné vztahy:

$$x_{HA} = \frac{10^{(pK_a - pH)}}{1 + 10^{(pK_a - pH)}}, \quad (30)$$

$$x_{A^-} = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a + pH)}}, \quad (31)$$

Sloučením uvedených vztahů získáme:

$$k = \frac{k_{HA} \cdot 10^{-pH} + k_{A^-} \cdot 10^{-pK_a}}{10^{-pH} + 10^{-pK_a}}, \quad (32)$$

Podstatou stanovení disociační konstanty pK_a látky pomocí kapalinové chromatografie je sledování změny retenčních faktorů v závislosti na pH mobilní fáze [19,51].

Oproti kapilární elektroforéze je stanovení pK_a náročnější z důvodu požadované retence vůči fázím. Kapalinové chromatografie pro stanovení disociačních konstant se využívá jen pro malé množství sloučenin. Výhodou je, že látky nemusí být dokonale čisté, jelikož se přítomné nečistoty rozdělí na základě retence ve stacionární fázi a není velkým problémem ani horší rozpustnost ve vodě. Směrodatné odchylky jsou větší než u běžně používaných metod jako jsou potenciometrie a spektrofotometrie. Musíme proto volit pečlivě pH mobilní fáze, abychom našli co nejpřesnější pK_a a nedestabilizovali zkoumanou látku či nepoškodili kolonu. Metoda není vhodná pro látky dobře rozpustné ve vodě a ve vodně-organických roztocích s nízkým podílem organického rozpouštědla, protože dochází k prodloužení retenčních časů.

3.6 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance je moderní analytická metoda. Jestliže jsou atomová jádra prvků obsažená v molekule vystavena magnetickému poli s vysokofrekvenčním zářením, mohou absorbovat záření určitých vlnových délek λ . Jsou-li atomy součástí molekuly, pak absorbované vlnové délky λ závisí na charakteru vazby v molekule. Jádra stejných atomů vázaných jiným způsobem či na jiné pozici v molekule vykazují absorpci záření o různých frekvencích (kvalitativní stanovení typu vazeb). Každé jádro daného prvku/atomu vázané stejným způsobem přispívá k absorpci. Dle intenzity absorbovaného záření lze stanovit počet atomů stejného charakteru tzn. kvantitativní stanovení.

Radiofrekvenční záření absorbují pouze atomy s nenulovým magnetickým momentem, které mají nenulový jaderný spin I . Řadíme sem jádra s lichým nukleonovým číslem (součet protonů a neutronů v jádře je lichý). Nejlépe měřitelná jádra jsou taková, která splňují podmínku $I=1/2$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N ...). Poté se hovoří o ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{15}N -NMR spektroskopii.

V praxi je kapalný vzorek umístěn mezi póly silného elektromagnetu. Působením magnetu dochází k energetickému oddělení mezi oběma spinovými stavy. Vzorek je ozařován vysokofrekvenčními pulsy – předávání energie vzorku = excitace a s tím spojená následná relaxace. Tato energie je registrována v závislosti na čase a je převedena na spektrum (intenzita signálu na frekvenci).

Vzorek se nachází v rotující kyvetě. Po změření hodnot se na osu x NMR spektra nanese chemický posun:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_0}{f}, \quad (33)$$

kde δ značí chemický posun, ν naměřenou frekvenci, ν_0 frekvenci odpovídající standartu, f frekvenci přístroje. Přepočet zajišťuje stejný chemický posun na různých přístrojích. Na osu y je vynášena relativní intenzita signálu. Při NMR měření jsou nejdůležitějšími signály právě chemický posun (kvalita) a intenzita signálu (kvantita). Chemický posun je vysvětlován rozdílným stíněním jader.

$^1\text{H-NMR}$ se užívá pro stanovení léčiv, které se prezentují jako silné kyseliny a jejich disociace probíhá v rozmezí pH 0-2. Při tak nízkém pH je stanovení pK_a ostatními metodami již obtížné. Principem je sledování chemického posunu δ v závislosti na pH. Disociací molekuly se mění chemický posun [29,52]:

$$\delta_{\text{měř}} = x_{\text{HA}} \cdot \delta_{\text{HA}} + x_{\text{A}^-} \cdot \delta_{\text{A}^-} = \frac{\delta_{\text{A}^-} + 10^{pK_a - \text{pH}} \cdot \delta_{\text{HA}}}{1 + 10^{pK_a - \text{pH}}}, \quad (34)$$

kde x_{HA} ukazuje na molární zlomek kyseliny, x_{A^-} molární zlomek aniontu, δ_{HA} chemický posun kyseliny, δ_{A^-} chemický posun aniontu. Pokud se proměří řada vzorků s měnícím se pH je získán vztah odpovídající modifikované Henderson-Hasselbachově rovnici:

$$pK_a = \text{pH} + \log \frac{\delta_{\text{A}^-} - \delta_{\text{měř}}}{\delta_{\text{měř}} - \delta_{\text{HA}}}, \quad (35)$$

Analýzu jednosytných kyselin je možno zjednodušit konstrukcí grafu v závislosti chemického posunu na pH a z inflexního bodu pak určíte pK_a . Stanovení disociačních konstant vícesytných kyselin je poněkud obtížnější a je k němu zapotřebí program zvaný DISCO [53-54].

3.7 Další metody

Zmíněné a podrobněji popsané metody jsou nejvyužívanějšími metodami pro stanovení pK_a . V nedávné minulosti se užívalo i metod jako molekulová emisní-absorpční fluorescenční spektroskopie, kolorimetrie, volumetrie, či konduktometrie. Od těchto metod se v dnešní době upouští především díky tomu, že tyto metody vykazovaly vyšší směrodatnou odchylku a nedisponovaly žádnou zřetelnou výhodou oproti metodám dnes užívaným.

3.7.1 Molekulová emisní-absorpční fluorescenční spektroskopie

Užívá se zřídka ke stanovení disociačních konstant. Základní a nezbytnou podmínkou je, aby zkoumaná API vyzařovala sekundární emisní záření (fluorescenci). Podstatou stanovení je, že se při různých hodnotách pH zaznamenávají jak emisní, tak absorpční spektra stanovované látky.

3.7.2 Kolorimetrie

Je v dané problematice dnes již spíše metodou historickou. Jedná se o nejstarší optickou metodu. Kolorimetrické stanovení pH je založeno na tom, že některé organické acidobazické indikátory v určitých oblastech pH mění svou intenzitu zabarvení. Na kyvetu se poté svítí jednoduchým fotometrem a z grafu se vyhodnocuje závislost absorbance na objemu přidaného titrantu.

3.7.3 Voltametrie

Elektrochemická metoda založená na měření křivek závislosti proudu na potenciálu pracovní elektrody při elektrolýze analyzovaného roztoku. Při měření se potenciál pracovní elektrody mění s časem podle určité funkce (při stejnosměrné voltametii nebo polarografii jde o lineární změnu potenciálu s časem). Indikace ekvivalenčního bodu je založena na měření změn intenzity proudu v závislosti na objemu přidaného odměrného roztoku při konstantní hodnotě.

3.7.4 Konduktometrie

Metoda založená na měření vodivosti elektrolytů. Při konduktometrické titraci se měří vodivost elektrolytu v závislosti na objemu přidaného titračního činidla. Inflexní bod se projeví výrazným zlomem na titrační křivce.

3.8 Stanovení disociační konstanty pK_a ve vodném či smíšeném prostředí.

Ideálním případem by bylo, kdyby se všechny látky rozpouštěly ve vodném prostředí, které je tělu vlastní. Bohužel tomu tak vždy není a některé látky jsou lépe a jiné naopak hůře rozpustné ve vodě. Tento fakt nejvíce omezuje stanovení pomocí ověřených metod, proto se osvědčil postup, kdy se pK_a stanoví v systému voda-organické rozpouštědlo a poté se přepočítá na pK_a ve vodě. Jako organické rozpouštědlo se převážně užívá metanol.

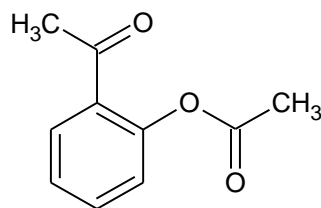
Na základě zkušeností v příslušné problematice se často doporučuje následující postup měření. Nejdříve se provede kalibrace elektrody pro každou směs voda/organické rozpouštědlo, která bude použita pro stanovení pK_a . Důležité je, aby se kalibrace prováděla za stejných podmínek jako samotné měření, t.zn. při konstantní teplotě a iontové síle. Poté se vybere nejnižší možné R (hm. % metanolu), při kterém se rozpustí zkoumané léčivo. Stanovení p_sK_a se provede nejméně pro 3 rozdílné hodnoty R (ideálně 5-6), přičemž za maximální hodnotu R se doporučuje 70%. Vhodné koncentrace léčiva pro správné stanovení se udávají okolo 1-5 mmol·l⁻¹ a nezbytné je taky použití inertního plynu (dusíku, argonu), aby se zabránilo absorpci CO₂ jako tomu je při stanovení ve vodném prostředí. Následně se ze změřených p_sK_a dopočítá pK_a ověřenými metodami.

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie a roztoky

Pro přípravu všech použitých roztoků byla použita redestilovaná voda odebrána z centrální iontové úpravy. Redestilovaná voda vznikla redestilací neionizované vody.

Kyselina acetylsalicylová (Aspirin, Acylpyrin, Anopyrin) byla dodána společností ZENTIVA, k.s. (Praha). Deklarovaná čistota se blíží 98% a byla stanovena pomocí HPLC. Aspirin je aromatická karboxylová kyselina, která se používá samostatně nebo v kombinacích jako analgetikum, antipyretikum a antiflogistikum. Vykazuje též protisrážlivý účinek, který se využívá ke snížení rizika vzniku infarktu.



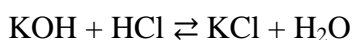
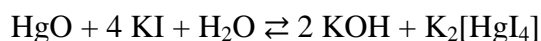
Obr. 9 Strukturální vzorec kyseliny acetylsalicylové

Mezi nežádoucí účinky patří možný vznik žaludečních vředů, silnější menstruační krvácení a při dlouhodobém užívání v kombinaci s jinými léky může vést k chronické nefritidě a následnému selhání ledvin. Vzhledem k riziku Reyova syndromu se nedoporučuje podávání dětem do 15 let a těhotným ženám. Mechanismus spočívá v inhibici enzymu cyklooxygenázy (COX), který je v organismu zodpovědný za syntézu prostaglandinů a tromboxanů.

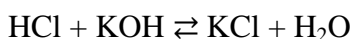
Aspirin, chemicky kyselina 2-acetoxybenzoová je bílá krystalická látka mírně rozpustná ve vodě s molekulovou hmotností 180, 160 g·l⁻¹ a termodynamickou disociační konstantou $pK_a^T = 3.49$ při 25°C.

Kyselina chlorovodíková, HCl, 1 mol·dm⁻³, byla připravena ředěním koncentrované kyseliny chlorovodíkové (*p.a.*, Lachema Brno). Standardizace byla vykonána potenciometrickou titrací na

navážku pevného HgO za přítomnosti nadbytečného množství KI a za současného probublávání argonem. Standardní roztok HCl byl čerpán ze zásobní láhve. Standardizace probíhala dle reakcí:



Hydroxid draselný, KOH, 1 mol. dm⁻³, byl připraven rozpuštěním přesné navážky tuhého KOH (Aldrich chemical Company, USA) v 1l redestilované vody, která byla před přípravou probublávána argonem. Roztok KOH byl uchovávan v polyethylenové láhvi v exikátoru v argonové atmosféře. Standardizace tohoto roztoku byla provedena potenciometrickou titrací na standardizovanou kyselinu chlorovodíkovou. Připravený roztok byl za stálého míchání a probublávání argonem titrován standardním roztokem KOH. Standardní roztok KOH byl čerpán ze zásobní láhve. Bod ekvivalence byl stanoven metodou první a druhé derivace. Standardizace probíhala podle stejné rovnice, jako při standardizaci KOH.



Chlorid draselný, KCl (3M) roztok byl připraven rozpuštěním tuhé látky (*p.a., Lachema Brno*) v redestilované vodě. Roztoky byly používány pro nastavení iontové síly při potenciometrických titracích látek.

Standardní komerční pufry byly použity 3 různé komerční pufr y pro kalibraci pH metru:

- 1) roztok ftalanu draselného
- 2) NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄
- 3) roztok boraxu + NaOH

Tabulka 1: Závislost pH komerčních pufrů na teplotě

T(°C)	Pufr č. 1	Pufr č. 2	Pufr č. 3
25	4.006	6.865	9.180
37	4.025	6.841	9.088

4.2 Použité přístroje a jejich parametry

Digitální analytické váhy Kern 870

Všechna potřebná vážení proběhla na analytických vahách typu Kern 870. Maximální váživost: 83g, dílek skutečný: 0,1 mg, dílek ověřitelný: 1mg.



Obr. 10 Digitální váha Kern 870

Digitální pH-metr Hanna 3220

Má rozsah: -2.00 až 20.00 pH, ± 2000.00 mV, rozsah teplot: -20 až 120 °C, přesnost pH-metru: ± 0.002 pH, ± 0.2 mV.



Obr. 11 Digitální pH-metr Hanna 3220

Digitální ultrazvuková lázeň DT52 (BANDELIN)

Pro úpravu redestilované vody k měření byl používán digitální ultrazvuková lázeň DT52 (BANDELIN).



Obr. 12 Digitální pH-metr Hanna 3220

Termostat Julabo ED-5

Pro udržení stálé teploty roztoku v duplikátorovém reaktůrku byl použit oběhový termostat ED-5 (JULABO) a pro kontrolu teploty roztoku byly použity rtuťové teploměry.



Obr. 13 Termostat Julabo ED-5

Skleněná solvotroda (Solvotrode easyclean Metrohm)

Solvotroda je elektroda vhodná pro měření v nevodných roztocích, kde dává rychlou odezvu a stabilní výsledky. Kalibrace byla provedena pomocí standardních pufrů o hodnotách 4.006 (4.024), 6.865 (6.841) a 9.180 (9.088) při 25 C a při 37 C, respektive, v závorkách.



Obr. 14 Skleněná solvotroda

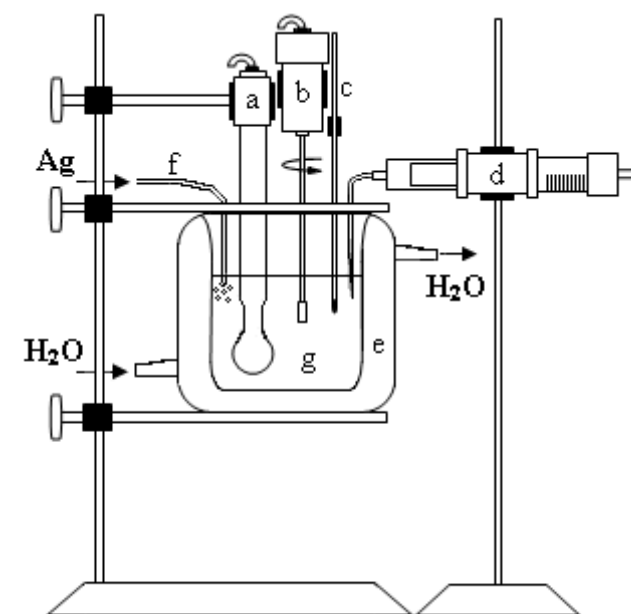
Pístové mikrobyrety

Pro vlastní měření byly použity mikrobyrety s pístem typu PK1250 (META, Brno), které umožnily velmi přesné dávkování roztoků KOH, HCl. Polyethylenové kapilární ústí mikrobyrety bylo ponořeno do roztoku při přidávání titračního činidla, poté bylo urychleně vytaženo, aby se zabránilo úniku titračního činidla při odečítání pH.

4.3 Postup potenciometrické titrace

Před začátkem potenciometrické titrace byla provedena tříbodová kalibrace pH. Ke kalibraci byly použity komerčně dodávané pufrů, které byly vytemperovány podle požadovaných podmínek na 25 °C. Pro výpočet disociačních konstant je důležitá vlastní kalibrace elektrody, která byla prováděna potenciometrickou titrací roztoku silné kyseliny odměrným roztokem silné báze. Změna pH během potenciometrického stanovení byla sledovaná solvotrodou určenou pro měření

ve smíšeném prostředí. Titrační činidlo bylo do titrovaného roztoku zaváděno tenkou kapilárou, jež byla ponořena pod hladinu měřeného roztoku v termostatované nádobce (Obr. 15). Titrovaný roztok obsahoval kyselinu chlorovodíkovou, organické rozpouštědlo (metanol) a roztok KCl k nastavení iontové síly. Měření bylo prováděno v inertní atmosféře argonu z důvodu eliminace CO₂. Titrace probíhala z kyselé do alkalické oblasti v různých poměrech voda-organické rozpouštědlo. Při zpracování dat byl využit program MS Excel a HYPERQUAD. Stanovení pK_a aspirinu probíhalo obdobně jako kalibrace elektrody, ale v titrovaném roztoku bylo rozpuštěno přesně definované množství léčiva.



Obr. 15 Schéma aparatury používané k potenciometrickému měření léčiv: (a) kombinovaná skleněná elektroda, (b) elektrické míchadlo, (c) rtuťový teploměr, (d) mikrobyreta, která je naplněná roztokem KOH, (e) duplikátorový reaktor, (f) hadička pro přívod argonu, (g) měřený roztok léčiva.

5 Výsledky a diskuze

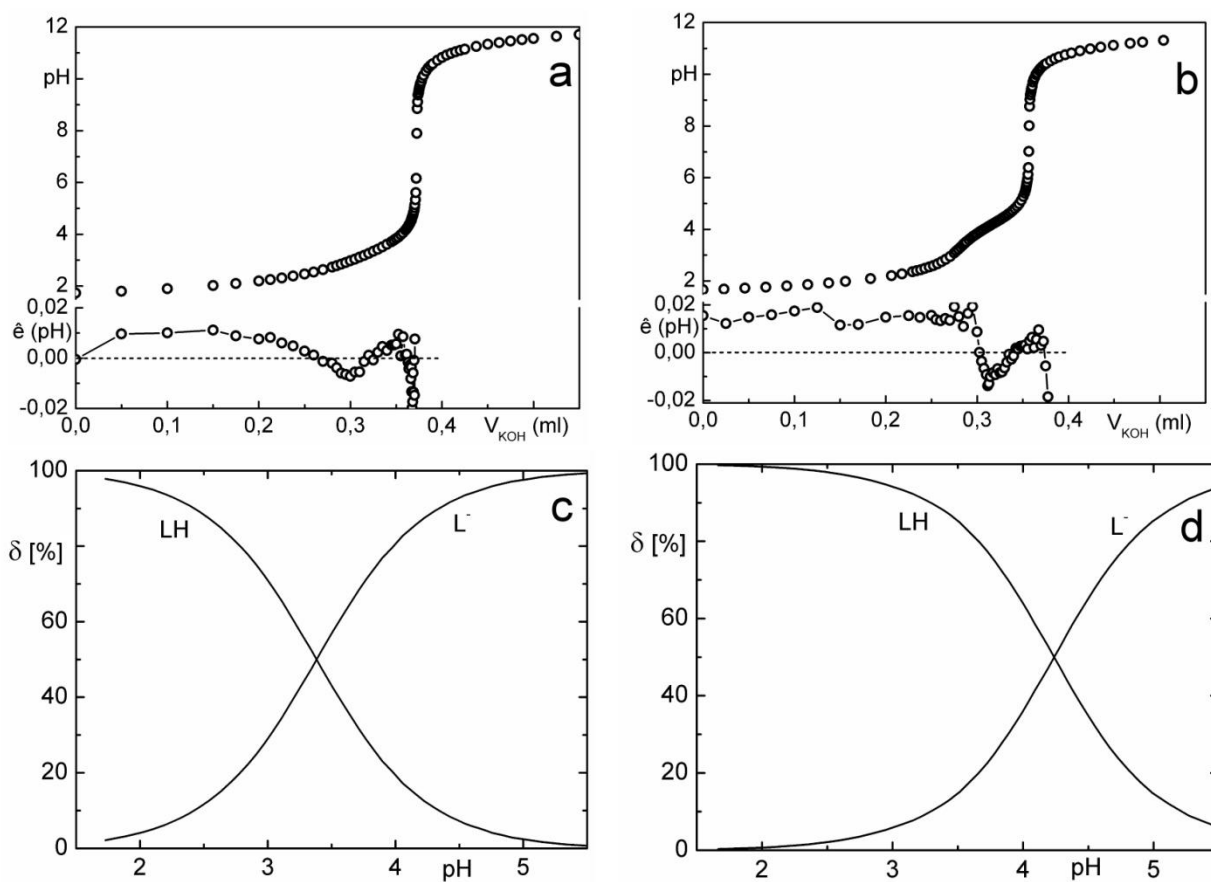
Kyselina acetylsalicylová patří mezi léčiva vykazující jednoduchou disociační rovnováhu. Její disociační konstanta je dobře známá a lze ji proto užít pro validaci metody potenciometrické titrace ve vodně-metanolickém prostředí.

Ke kalibraci solvotrody byly užity komerční pufrы pro vodné prostředí o hodnotách 4.006, 6.865 a 9.180 při 25 °C. Před vlastním měření aspirinu při různém obsahu metanolu byla provedena kalibrační titrace kyseliny chlorovodíkové hydroxidem draselným. Získané hodnoty pH byly pomocí multiparametrické rovnice $pH = \alpha + S p_c H + j_H [H^+] + j_{OH} K_w / [H^+]$ přepočítány na hodnoty koncentrační $p_c H$. Získané kalibrační parametry byly užity k výpočtu parametrů při titracích léčiva ve směsném prostředí. Po kalibrační titraci následovala titrace aspirinu za naprosto shodných podmínek. Všechny roztoky obsahovaly 0.1 M KCl.

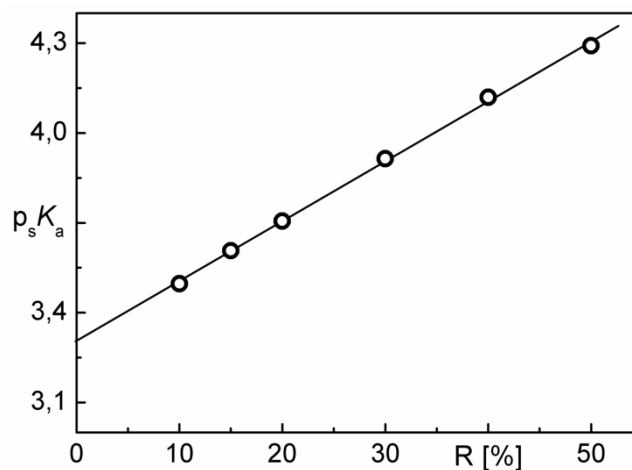
Obr. 16 ukazuje na rozdílnost titračních křivek aspirinu ve vodném (Obr. 16a) a 50% MetOH (Obr. 16b) prostředí. Grafy reziduí vypovídají o věrohodnosti nalezených parametrů programem HYPERQUAD. Distribuční diagramy rozličně protonovaných částic ukazují na rozdílnost stanovených konstant. Zatímco ve vodném prostředí byla stanovena hodnota 3.38, v 50% MetOH byla stanovena hodnota 4.29 (Tabulka 2). Nelineární regresí hodnot získaných při různém obsahu metanolu ve směsi byla získána rovnice $y = 0.0199(0.0003) x + 3.3058 (0.0104)$ s korelačním koeficientem $r = 0.9994$ (Obr. 17). Vychýlení v hodnotách $p_s K_a$ při 0 % (wt) MetOH je pravděpodobně způsobeno sníženou přesností hodnot získaných měřením vodného roztoku aspirinu solvotrodou, jež pro toto prostředí není primárně určena.

Tabulka 2: Stanovené směšné disociační konstanty při různých obsazích metanolu ve směsi. V závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky v číslicích posledního platného čísla.

R [wt%] (MetOH)	0	10	15	20	30	40	50
$p_s K_a$	3.383(1)	3.497(2)	3.607(1)	3.706(1)	3.914(1)	4.119(1)	4.291(1)
Sigma kritérium	0.971	1.71	1.162	0.787	0.423	0.883	1.177



Obr. 16 (a) Potenciometrická titrační křivka $5.0 \cdot 10^{-3}$ aspirinu ve vodném prostředí, (b) Potenciometrická titrační křivka $5.2 \cdot 10^{-3}$ aspirinu 50% MetOH, (c) Distribuční diagram rozličně protonovaných částic aspirinu ve vodném prostředí, (d) Distribuční diagram rozličně protonovaných částic aspirinu v 50% MetOH.



Obr. 17 Hodnoty $p_s K_a$ aspirinu ve směsi metanol-voda jako funkce hmotnostního obsahu metanolu.

6 Závěr

V bakalářské práci je popsán význam a stanovení disociačních konstant léčiv. Stanovené hodnoty disociačních konstant jsou žádány nejen farmaceutickými firmami, ale i lékaři, jelikož disociační konstanta ovlivňuje chování léčiva v organismu a to především absorpci, distribuci a eliminaci. Acidobazické vlastnosti určují, zda a za jakých podmínek se bude léčivo vyskytovat v ionizované (hydrofilní) či neionizované (lipofilní) formě.

Do dnešního dne bylo užito pro stanovení disociačních konstant již mnoho analytických instrumentálních metod. Od určitých metod se již upustilo a jiné byly naopak modifikovány, aby lépe odpovídaly potřebám v dané problematice. Léčiva jsou převážně slabé kyseliny nebo zásady většinou špatně rozpustné ve vodě. Právě rozpustnost společně s čistotou látky jsou jedny z nejdůležitějších parametrů pro správnou volbu instrumentální metody pro určení disociační konstanty. Jestliže léčivo ve vodě nelze rozpustit, není možno stanovit disociační konstantu ve vodném prostředí, ale je nutné nejdříve stanovit disociační konstantu ve smíšeném prostředí a následně ji přepočítat na prostředí vodné (viz kapitola 5)

Mezi nejvyžívanější patří stále potenciometrická titrace. Pro metodu je nutná relativně vysoká koncentrace stanovované látky cca $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a též se nedá použít pro stanovení silně kyselých nebo bazických sloučenin, kde výsledky již nadměrně ovlivňuje kyselá/alkalická chyba skleněné membrány. UV/VIS spektrofotometrie již patří mezi nízko-koncentrační metody, jelikož schopnost detekce disociační konstanty léčiva je možno provádět při koncentraci cca $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nezbytnou podmínkou, která musí být v této metodě splněna, je přítomnost UV-aktivního chromoforu v blízkosti místa, kde dochází k disociační rovnováze. Separační metody (kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza) jsou vhodné pro stanovení látek nedokonale čistých, nebo špatně rozpustných ve vodě.

Experimentální část byla zaměřena na stanovení $p_s K_a$ kyseliny acetylsalicylové pomocí potenciometrické titrace ve vodně-metanolickém prostředí. Vychýlení v hodnotách $p_s K_a$ při 0 % (wt) MetOH je pravděpodobně způsobeno sníženou přesností hodnot získaných měřením vodného roztoku aspirinu solvotrodou, jež pro toto prostředí není primárně určena.

7 Literatura:

- [1] Uguagliati P.,Canovese L.: Macroscopic and microscopic acid dissociation constants of diprotic acids—A potentiometric and spectrophotometric study, *Talanta*, 1991, 38, s. 697-704.
- [2] Roman L.,Mirel S.,Floean E.,Oprean R.: The potentiometric and spectrophotometric determination of dissociation constants for some 2-mercapto-5-R-amino-1,3,4-thiadiazole derivatives, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998, 18, s. 137-144.
- [3] Meloun M.,Černohorský P.: Thermodynamic dissociation constants of isocaine, physostigmine and pilocarpine by regression analysis of potentiometric data, *Talanta*, 2000, 52, s. 931-945.
- [4] Barbosa J.,Barron D.,Jimenez-Lozano E.,Sanz-Nebot V.: Comparison between capillary electrophoresis, liquid chromatography, potentiometric and spectrophotometric techniques for evaluation of pK(a) values of zwitterionic drugs in acetonitrile-water mixtures, *Analytica Chimica Acta*, 2001, 437, s. 309-321.
- [5] Herrero-Martinez J. M.,Repolles C.,Bosch E.,Roses M.,Rafols C.: Potentiometric determination of aqueous dissociation constants of flavonols sparingly soluble in water, *Talanta*, 2008, 74, s. 1008-1013.
- [6] Meloun M.,Ferencikova Z.,Netolicka L.,Vrana A.: The thermodynamic dissociation constant of naphazoline by the regression analysis of potentiometric data, *Central European Journal of Chemistry*, 2011, 9, s. 66-74.
- [7] Meloun M.,Ferencikova Z.,Vrana A.: Determination of the thermodynamic dissociation constant of capecitabine using spectrophotometric and potentiometric titration data, *J Chem Thermodyn*, 2011, 43, s. 930-937.
- [8] Takacs-Novak K.,Tam K. Y.: Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants - Part V: microconstants and tautomeric ratios of diprotic amphoteric drugs, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2000, 21, s. 1171-1182.
- [9] Tam K. Y.,Takács-Novák K.: Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study, *Analytica Chimica Acta*, 2001, 434, s. 157-167.
- [10] Meloun M.,Burkonova D.,Syrovy T.,Vrana A.: Thermodynamic dissociation constants of silychristin, silybin, silydianin and mycophenolate by the regression analysis of spectrophotometric data, *Analytica Chimica Acta*, 2003, 486, s. 125-141.
- [11] Meloun M.,Syrovy T.,Vrana A.: The thermodynamic dissociation constants of ambroxol, antazoline, naphazoline, oxymetazoline and ranitidine by the regression analysis of spectrophotometric data, *Talanta*, 2004, 62, s. 511-522.
- [12] Alter K. P.,Molloy J. L.,Niemeyer E. D.: Spectrophotometric determination of the dissociation constant of an acid-base indicator using a mathematical deconvolution technique, *J Chem Educ*, 2005, 82, s. 1682-1685.
- [13] Meloun M.,Bordovska S.,Syrovy T.,Vrana A.: Tutorial on a chemical model building by least-squares non-linear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data, *Analytica Chimica Acta*, 2006, 580, s. 107-121.
- [14] Meloun M.,Bordovska S.,Syrovy T.: A novel computational strategy for the pK(a) estimation of drugs by non-linear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data exhibiting small spectral changes, *J Phys Org Chem*, 2007, 20, s. 690-701.

- [15] Volgyi G., Ruiz R., Box K., Comer J., Bosch E., Takacs-Novak K.: Potentiometric and spectrophotometric pK(a) determination of water-insoluble compounds: Validation study in a new cosolvent system, *Analytica Chimica Acta*, 2007, 583, s. 418-428.
- [16] Meloun M., Ferencikova Z., Vrana A.: The thermodynamic dissociation constants of methotrexate by the nonlinear regression and factor analysis of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data, *Central European Journal of Chemistry*, 2010, 8, s. 494-507.
- [17] Meloun M., Ferencikova Z., Javurek M.: Reliability of dissociation constants and resolution capability of SQUAD(84) and SPECFIT/32 in the regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data, *Spectrochim Acta A*, 2012, 86, s. 305-314.
- [18] Berzas J. J., Guiberteau C., Contento A. M., Rodriguez V.: Sensitive and rapid high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of antidepressants in pharmaceutical formulations, *Chromatographia*, 2002, 56, s. 545-551.
- [19] Janos P.: Determination of equilibrium constants from chromatographic and electrophoretic measurements, *J Chromatogr A*, 2004, 1037, s. 15-28.
- [20] Canbay H. S., Demiralay E. C., Alsancak G., Ozkan S. A.: Chromatographic Determination of pK(a) Values of Some Water-Insoluble Arylpropionic Acids and Arylacetic Acids in Acetonitrile plus Water Media, *J Chem Eng Data*, 2011, 56, s. 2071-2076.
- [21] Gumustas M., Sanli S., Sanli N., Ozkan S. A.: Determination of pK(a) values of some antihypertensive drugs by liquid chromatography and simultaneous assay of lercanidipine and enalapril in their binary mixtures, *Talanta*, 2010, 82, s. 1528-1537.
- [22] Sato E., Miya S., Saitoh K., Saito S., Shibukawa M.: Reversed-phase ion-pair liquid chromatographic method for determination of reaction equilibria involving ionic species: Exemplification of the method using ligand substitution reactions of ethylenediaminetetraacetatochromium(III) ion with acetate and phosphate ions, *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218, s. 922-928.
- [23] Koval D., Kasicka V., Jiracek J., Collinsova M., Garrow T. A.: Determination of dissociation constant of phosphinate group in phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis, *J Chromatogr B*, 2002, 770, s. 145-154.
- [24] Hu Q., Hu G., Zhou T., Fang Y.: Determination of dissociation constants of anthrocycline by capillary zone electrophoresis with amperometric detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 31, s. 679-684.
- [25] Matoga M., Laborde-Kummer E., Langlois M. H., Dallet P., Bosc J. J., Jarry C., Dubost J. P.: Determination of pKa values of 2-amino-2-oxazolines by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 2003, 984, s. 253-260.
- [26] Poole S. K., Patel S., Dehring K., Workman H., Poole C. F.: Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 2004, 1037, s. 445-454.
- [27] Andrasi M., Buglyo P., Zekany L., Gaspar A.: A comparative study of capillary zone electrophoresis and pH-potentiometry for determination of dissociation constants, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 44, s. 1040-1047.
- [28] Ehala S., Grishina A. A., Sheshenev A. E., Lyapkalo I. M., Kašička V.: Determination of acid-base dissociation constants of very weak zwitterionic heterocyclic bases by capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, s. 8048-8053.

- [29] Szakacs Z., Hagele G.: Accurate determination of low pK values by $(1)H$ NMR titration, *Talanta*, 2004, 62, s. 819-825.
- [30] Szakacs Z., Kraszni M., Noszal B.: Determination of microscopic acid-base parameters from NMR-pH titrations, *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378, s. 1428-1448.
- [31] Popov K., Ronkkomaki H., Lajunen L. H. J.: Guidelines for NMR measurements for determination of high and low pK(a) values, *Pure Appl Chem*, 2006, 78, s. 663-675.
- [32] Grycova L., Dommissie R., Pieters L., Marek R.: NMR determination of pK(a) values of indoloquinoline alkaloids, *Magn Reson Chem*, 2009, 47, s. 977-981.
- [33] Hampl F., Rádl S., Paleček J. *Farmakochemie*; Vydavatelství VŠCHT: Praha, 2007.
- [34] Hynie S. *Farmakologie v kostce*; Triton, 2001.
- [35] McMurry J., Brně V. u. t. v. *Organická chemie*; VUTIUM, 2007.
- [36] Lincová D., Farghali H. *Základní a aplikovaná farmakologie*; Galén, 2007.
- [37] Janků I. *Farmakokinetické základy dávkování léků*; Avicenum, 1986.
- [38] Lüllmann H., Mohr K., Wenke M., Mühlbachová E. *Farmakologie a toxikologie*; Grada Publishing, 2002.
- [39] Květina J., Herink J., Vopršalová M. *Základy farmakologie: Obecná farmakologie; Veterinární a farmaceutická univerzita, Farmaceutická fakulta*, 1999.
- [40] Kitamura K., Takegami S., Kobayashi T., Makihara K., Kotani C., Kitade T., Moriguchi M., Inoue Y., Hashimoto T., Takeuchi M.: Dissociation constants of phenothiazine drugs incorporated in phosphatidylcholine bilayer of small unilamellar vesicles as determined by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometric titration, *Bba-Biomembranes*, 2004, 1661, s. 61-67.
- [41] Szegezdi J., Csizmadia F. In *American Chemical Society National Meeting*, 2004.
- [42] Hilal S. H., Karickhoff S. W., Carreira L. A.: A rigorous test for SPARC's chemical reactivity models: Estimation of more than 4300 ionization pK(a)s, *Quant Struct-Act Rel*, 1995, 14, s. 348-355.
- [43] Inc., A.C.D., Ed. Toronto, Canada, 2007.
- [44] Klouda P. *Moderní analytické metody*; Pavel Klouda, 2003.
- [45] Erdemgil F. Z., Sanli S., Sanli N., Ozkan G., Barbosa J., Guiteras J., Beltran J. L.: Determination of pK(a) values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology and potentiometry, *Talanta*, 2007, 72, s. 489-496.
- [46] Destefano C., Princi P., Rigano C., Sammartano S.: Computer-Analysis of Equilibrium Data in Solution Esab2m - an Improved Version of the Esab Program, *Ann Chim-Rome*, 1987, 77, s. 643-675.
- [47] Gans P., Sabatini A., Vacca A.: Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs, *Talanta*, 1996, 43, s. 1739-1753.
- [48] Gans P., Sabatini A., Vacca A.: Hyperquad computer-program suite., *Abstr Pap Am Chem S*, 2000, 219, s. U763-U763.
- [49] D. J. Leggett (Ed.) *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*; Plenum Press: New York, 1985.
- [50] Gampp H., Maeder M., Meyer C. J., Zuberbühler A. D.: Calculation of Equilibrium Constants from Multiwavelength Spectroscopic Data .2. Specfit - 2 User-Friendly Programs in Basic and Standard Fortran-77, *Talanta*, 1985, 32, s. 257-264.
- [51] Babic S., Horvat A. J. M., Pavlovic D. M., Kastelan-Macan M.: Determination of pK(a) values of active pharmaceutical ingredients, *Trac-Trend Anal Chem*, 2007, 26, s. 1043-1061.

- [52] Rabenstein D. L., Sayer T. L.: Determination of microscopic acid dissociation constants by nuclear magnetic resonance spectrometry, *Analytical Chemistry*, 1976, 48, s. 1141-1146.
- [53] Reniero F., Guillou C., Frassinetti C., Ghelli S.: DISCO - a general computer program for the computation of acid dissociation constants of polyprotic molecules in water and biological fluids, from nuclear magnetic resonance data: application to polyamines, *Anal Biochem*, 2003, 319, s. 179-194.
- [54] Martin Y. C.: Disco - a Computer-Program for Pharmacophore Mapping That Combines Insights from Small-Molecule and Macromolecular Crystallography, Quantum-Chemistry, Computational Chemistry, and Graph-Theory, *Abstr Pap Am Chem S*, 1994, 208, s. 140-COMP.