

STANOVENIE ACIDOBÁZICKÝCH DISOCIAČNÝCH KONŠTÁNT VYBRANÝCH β -BLOKÁTOROV POMOCOU KAPILÁRNEJ ZÓNOVEJ ELEKTROFORÉZY, RP-HPLC A ^1H NMR

IVA KAPUSTÍKOVÁ a JAN TENGLER

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinár-
ní a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42
Brno

kapustikovai@vfu.cz

Došlo 13.5.13, prepracované 23.7.13, prijaté 29.10.13.

Kľúčové slová: acidobázická disociačná konštanta, pK_a ,
CZE, RP-HPLC, ^1H NMR, β -blokátory, aryloxyamino-
propanoly

Úvod

V situácii, keď väčšina užívaných liečiv patrí medzi slabé kyseliny alebo zásady, je acidobázická disociačná konštanta pK_a veličinou, ktorej znalosť je nevyhnutná pre vývoj takmer každej farmaceuticky aktívnej látky. Jej hodnota má vplyv predovšetkým na farmakokinetické parametre liečiva závislé na prestupe cez biologické membrány (absorpcia, distribúcia a eliminácia), ale i na farmakodynamiku a toxicitu, uplatňuje sa pri disolúcii liečiva v tráviacom trakte a býva súčasťou QSAR štúdií^{1,2}.

Používa sa niekoľko spôsobov stanovenia pK_a , ktorých princíp vychádza z merania zmeny fyzikálnych, chemických či spektrálnych vlastností študovaných látok v závislosti na zmene pH prostredia. Medzi najbežnejšie metódy patrí potenciometrická titrácia a UV-VIS spektrofotometria³⁻⁵. Hoci sú presné, ich prevedenie je limitované potrebou čistého vzorku, časovou náročnosťou, problémami s citlivosťou detekcie a v prípadoch obtiažne rozpustných látok⁶. Novšími a doposiaľ menej často využívanými metódami sú kapilárna zónová elektroforéza (CZE), vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na reverznej fáze (RP-HPLC) a ^1H nukleárna magnetická rezonancia (^1H NMR)⁷⁻⁹.

Cieľom tejto práce bolo využiť tri posledne menované metódy a tri výpočtové programy k stanoveniu pK_a štyroch β -blokátorov a výsledky porovnať, s cieľom vybrať metódu najvhodnejšiu pre rutinné stanovenie pK_a novonasyntetizovaných liečiv.

Experimentálne stanovenie pK_a metódou CZE spočíva v meraní efektívnej elektroforetickej pohyblivosti ako funkcie pH základného elektrolytu v kapiláre. Táto závislosť má tvar sigmoidy, z ktorej následne určíme diso-

ciačné konštanty ako hodnoty pH v inflexnom bode^{7,9}.

Pri RP-HPLC experimente sú hodnoty pK_a stanovené zo sigmoidálnej závislosti retenčného faktoru analytu na pH mobilnej fázy. Elučná sila mobilnej fázy sa mení v závislosti na jej pH, v dôsledku vyššej afinity elektricky neutrálnych foriem analytov k nepolárnej stacionárnej fáze^{8,10}.

Pri stanovení pK_a pomocou ^1H NMR je pozorovaná závislosť chemického posunu ^1H jadier na meniacej sa hodnote pH prostredia. Pri tejto zmene dochádza k ovplyvneniu elektrónovej hustoty v susedstve disociova-
teľnej skupiny, ovplyvneniu magnetického tienenia a z toho vyplývajúcej zmene chemického posunu pozorovaných protónov^{9,11}.

Experimentálna časť

Chemikálie

Metanol pre HPLC (Carlo Erba reagents, Francúzsko), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ pre HPLC (Merck, Nemecko). Univerzálne kalibračné pufrы pre HPLC (Reagecon, Írsko). Metanol- d_4 , D_2O , tetrametylsilán (TMS) pre NMR a štandardy β -blokátorov (acebutolol, betaxolol, celiprolol, propranolol) (Sigma-Aldrich, USA), NaOH, HCl a $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (Lachema, Česká republika), trifluóroctová kyselina (CF_3COOH) a kalibračné pufrы pre CZE a ^1H NMR (WTW, Nemecko). Všetky uvedené chemikálie boli získané komerčne v analytickej čistote.

Študované látky

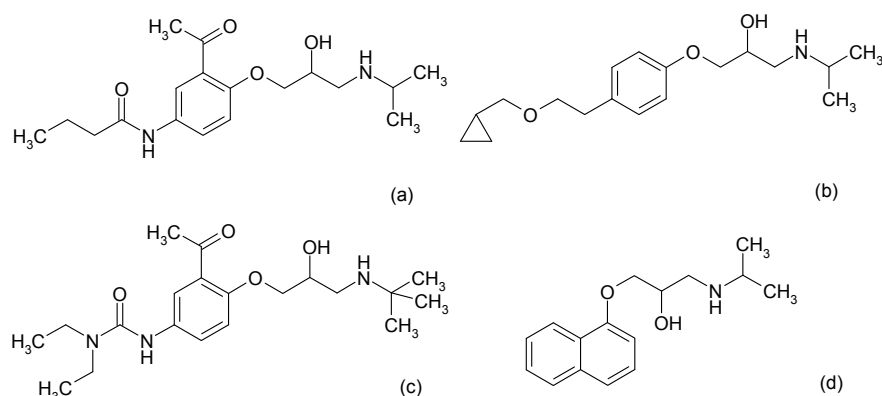
Študovanými látkami boli štyri β -blokátory vo forme monohydrochloridov, pričom protonizovaný je dusík aryloxyaminopropanolového skeletu (obr. 1).

Prístroje a pracovné postupy

Metóda kapilárnej zónovej elektroforézy

Elektroforetické merania boli uskutočnené na prístroji Agilent 3D CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemecko) s detektorom diodového poľa (DAD). Použitá bola nepokrytá kremenná kapilára Simplus Capillaries MicroSolv (USA) s vnútorným priemerom 75 μm . Celková dĺžka kapiláry bola $L_C = 48,5 \text{ cm}$ a dĺžka kapiláry od vstupného konca k detektoru (efektívna) $L_D = 40 \text{ cm}$. Kapilára bola kondicionovaná nasledujúcim spôsobom: po zapnutí prístroja premývaná 0,1 mol l^{-1} NaOH (4 min), vodou (10 min) a základným elektrolytom (10 min). Po každom meraní vzorky premývaná vodou (2 min) a základným elektrolytom (3 min). V prípade veľkého rozdielu pH použitých pufrův bola dĺžka premývania predĺžená až na 20 min.

Aplikované bolo separačné napätie +20 kV a elektrický prúd sa pohyboval v rozmedzí 20–30 μA . Teplota termostatu bola udržiavaná na $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorky



Obr. 1. Študované látky: acebutolol (a), betaxolol (b), celiprolol (c), propranolol (d)

boli dávkané hydrodynamicky tlakom 40 mbar po dobu 2 s a detegované pri vlnovej dĺžke 200 nm. Zásobné roztoky študovaných látok o koncentrácii $c = 7,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ boli pripravené ich rozpustením v metanole. Ako marker elektroosmotického toku bol použitý metanol pochádzajúci zo zásobného roztoku analytu. Elektroforetické merania boli uskutočnené v systéme jedenástich borátových elektrolytov s konštantnou iónovou silou 35 mmol l^{-1} v rozmedzí pH 6,30–12,50. Borátový elektrolyt bol použitý aj v oblastiach mimo jeho najväčšiu pufracnú kapacitu, aby v celej sérii meraní bola zachovaná matricia analytu a nemenili sa interakcie analyt-pufor. Hodnoty efektívnych elektroforetických mobilit získané v oblastiach pH vzdialených od pK_a kyseliny boritej (9,27) o viac než jednotku pH boli overené porovnaním s hodnotami nameranými v pufrí MOPS (35 mmol l^{-1}) pre pH nižšie ako 8,2 a fosfátovom pufrí (35 mmol l^{-1}) pre pH vyššie ako 10,2. Na výpočet ich zloženia bol použitý program Peak Master¹². U každej vzorky bolo meranie v každom základnom elektrolyte opakované štyrikrát.

Na spracovanie a vyhodnotenie výsledkov zaznamenaných systémom Agilent ChemStation bol použitý tabuľkový procesor SigmaPlot v. 10.0 (San Rafael, USA). pH tlmivých roztokov bolo kontrolované pH metrom WTW InoLab pH Level 2 (Česká republika) s kombinovanou sklenenou elektródou SenTix 41 (WTW, ČR).

Keďže študované látky mali charakter slabých zásad, bola ich ionizácia závislá na pH prostredia a experimentálne stanovenie pK_a spočívalo v sledovaní rýchlostí elektroforetickej migrácie v závislosti na pH základného elektrolytu. Na základe migračného času študovanej látky t_{mig} a markeru elektroosmotického toku t_{EOF} (s) sa vypočíta efektívna elektroforetická mobilita μ_{eff} ($\text{m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) podľa rovnice:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{L_C \cdot L_D}{U} \left(\frac{1}{t_{\text{mig}}} - \frac{1}{t_{\text{EOF}}} \right) \quad (1)$$

kde L_C je celková dĺžka kapiláry, L_D je efektívna dĺžka

kapiláry (m) a U je použité napätie (V) (cit.^{7,13}).

Vzťah medzi efektívnou elektroforetickou mobilitou slabých jednosýtnych zásad a ich disociačnou konštantou popisuje rovnica:

$$\mu_{\text{eff}} = \mu_{\text{BH}^+} \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}} \quad (2)$$

kde μ_{BH^+} je mobilita plne protonizovanej bázy. Závislosti efektívnych elektroforetických mobilit vzoriek na pH boli aproximované funkciou vyjadrenou rovnicou (2), ktorá definuje závislosť mobility na pH pre jednosýtné zásady. Tvar uvedenej závislosti efektívnej mobility na pH je identický s tvarom matematickej funkcie, tzv. Boltzmanovej sigmoidy. Hodnota pK_a zodpovedá hodnote pH v inflexnom bode tejto sigmoidálnej krivky^{13,14}.

Metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie

Pre RP-HPLC experiment bol použitý systém pozostávajúci z pumpy Merck-Hitachi L-7100 LaChrom (Francúzsko), UV-VIS detektoru Shimadzu SPD-10A VP ($\lambda = 254 \text{ nm}$) a integrátoru Shimadzu C-R8A Chromatopac. Použitá bola kolóna ZORBAX Eclipse XBD-C18, $2,1 \times 150 \text{ mm}$, s veľkosťou častíc $5 \mu\text{m}$ firmy Agilent (USA). pH bolo merané pH metrom Mettler Toledo MA 235pH/Ion Analyzer.

Usporiadanie RP-HPLC vyžaduje prítomnosť organického rozpúšťadla v mobilnej fáze, obzvlášť v prípade vo vode ťažko rozpustných foriem meraných látok⁸. Mobilnou fázou bola zmes metanolu a fosfátového tlmivého roztoku o koncentrácii $0,05 \text{ mol l}^{-1}$. Objemový pomer organickej a vodnej fázy bol 60:40. pH mobilnej fázy sa pohybovalo v rozmedzí 6,10–9,79. Fosfátový tlmivý roztok bol použitý aj v oblastiach mimo jeho najväčšiu pufracnú kapacitu preto, aby v celej sérii meraní bola zachovaná matricia analytu a nemenili sa interakcie analyt-pufor. pH mobilnej fázy bolo merané po zmiešaní vodného pufru a metanolu, pričom elektródový systém bol však kalibrovaný pomocou bežných vodných pufov¹⁵. Prietok mobilnej fázy kolónou bol $0,25 \text{ ml min}^{-1}$. Dávkaných

bolo 5 μl metanolického roztoku vzorky o koncentrácii $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Meranie každej látky bolo v každej zo šiestich mobilných fáz opakované štyrikrát. Teplota pri meraní bola $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Markerom mŕtveho času bol metanol. Detekcia prebiehala pri vlnovej dĺžke 254 nm.

Retenčné faktory analytu (k) boli vypočítané pomocou vzťahu (3), kde t_R je retenčný čas analytu a t_0 je retenčný čas markeru mŕtveho času (min)¹⁶.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3)$$

Závislosť retenčných faktorov slabých jednosýtnych zásad na pH mobilnej fázy má sigmoidálny priebeh, vyjadrený rovnicou (4)^{10,15}:

$$k = \frac{k_B + k_{\text{BH}^+} \cdot 10^{\text{p}K_a - \text{pH}}}{1 + 10^{\text{p}K_a - \text{pH}}} \quad (4)$$

kde k_B je retenčný faktor zásady v plne deprotonizovanom stave a k_{BH^+} je retenčný faktor plne protonizovanej zásady.

Hodnoty $\text{p}K_a$ odčítané ako pH v inflexnom bode sigmoidy boli vyjadrené vo vodnej škále pH (${}^s\text{p}K_a$), preto museli byť najprv pomocou vzťahu (5) prevedené na hodnoty zohľadňujúce podiel metanolu v hydroorganickej mobilnej fáze (${}^w\text{p}K_a$).

$${}^s\text{p}K_a = {}^w\text{p}K_a - \delta \quad (5)$$

Parameter $\delta = 0,1756$ je závislý na obsahu metanolu v zmesi a bol vypočítaný na základe empirického vzťahu (6), kde φ je objemový zlomok metanolu v mobilnej fáze^{8,17}.

$$\delta = (0,09\varphi - 0,11\varphi^2) / (1 - 3,15\varphi + 3,51\varphi^2 - 1,35\varphi^3) \quad (6)$$

Výsledné hodnoty $\text{p}K_a$ zodpovedajúce vodnému prostrediu (${}^w\text{p}K_a$) boli zo zmesi rozpúšťadiel (${}^s\text{p}K_a$) vypočítané podľa vzťahu (7), kde konštanty a_s a b_s sú závislé na zložení zmesi a faktoroch preferenčnej solvatacie funkčných skupín v študovanej molekule¹⁸.

$${}^w\text{p}K_a = \frac{{}^s\text{p}K_a - b_s}{a_s} \quad (7)$$

Hodnoty $a_s = 0,9668$ a $b_s = -0,4201$ boli vypočítané s použitím vzťahov (8) a (9), ktoré sú odvodené pre protonizované amíny, kde w je hmotnostný zlomok metanolu v zmesi¹⁸.

$$a_s = (1 - 0,077w + 0,245w^2) / (1 + 0,019w + 0,188w^2) \quad (8)$$

$$b_s = (-0,577w + 0,608w^2) / (1 - 1,588w + 0,615w^2) \quad (9)$$

Metóda nukleárnej magnetickej rezonancie

NMR spektrá pri stanovení $\text{p}K_a$ boli zaznamenávané pomocou spektrometru Gemini 2000 (Varian, USA) s operačnou frekvenciou 200 MHz (${}^1\text{H}$). K vyhodnoteniu

nameraných spektier bol použitý software MestReC Lite 4.7.4.0. (Mestrelab, Španielsko). Hodnoty pH boli merané pomocou elektródy IS FET pH-mikroelektróda PH46-SS napojenej na pH meter IQ 240 (IQ Scientific Instruments, USA).

Pri meraní boli použité nasledujúce parametre: 90° pulz, relaxačný čas 1 s, akvizíčný čas 1,9998 s, počet skenov 16–128. Meraných bolo 15 mg vzorky rozpustenej v 0,7 ml zmesi metanol- d_4 a D_2O v objemovom pomere 10:3. Vzorka bola titrovaná $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ roztokom CF_3COOH a $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ roztokom NaOH v zmesi metanol- $d_4/\text{D}_2\text{O}$ (10:3, v/v) a boli zaznamenávané zmeny ppm v rozmedzí pH 2,00–13,00 pri teplote $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Hodnoty chemického posunu boli referované na tetrametylsilán ako vnútorný štandard (0 ppm).

Na začiatku NMR experimentu bol roztok vzorky titrovaný pomocou CF_3COOH do kyslých hodnôt pH. V každom nasledujúcom kroku bolo priamo do NMR kvety pridaných 10–50 μl roztoku NaOH , hodnota pH bola meraná pomocou elektródy priamo v kvete a následne bolo získané ${}^1\text{H}$ NMR spektrum. Obvykle 25 opakovaní tohto kroku postačilo k získaniu krivky závislosti chemického posunu na pH. Vzťah medzi pH, $\text{p}K_a$, pozorovanými chemickými posunmi δ_{poz} , posunmi plne protonizovanej a plne deprotonizovanej formy analytu δ_{HL} a δ_{L} (ppm) popisuje rovnica:

$$\text{p}K_a = \text{pH} + \log \frac{\delta_{\text{L}} - \delta_{\text{poz}}}{\delta_{\text{poz}} - \delta_{\text{HL}}} \quad (10)$$

z ktorej možno dokázať, že závislosť chemického posunu na pH má tvar titračnej krivky ležiacej medzi asymptotami δ_{L} a δ_{HL} s inflexným bodom v $\text{pH} = \text{p}K_a$, kde $\delta_{\text{poz}} = (\delta_{\text{L}} + \delta_{\text{HL}})/2$. Titračná krivka je symetrická okolo inflexného bodu, čo znázorňuje obr. 4 a predstavuje jednoduchú metódu na určenie $\text{p}K_a$, δ_{L} a δ_{HL} (cit.¹⁹).

Z dôvodu použitia zmesi deuterovaných rozpúšťadiel bolo nutné hodnoty $\text{p}K_a$ odčítané z inflexného bodu sigmoidy (${}^w\text{p}K_a$) opäť pomocou rovníc (5) a (7) prepočítať na prostredie samotnej D_2O (${}^w\text{p}K_a^*$), pričom parameter $\delta = 0,1052$, $a_s = 0,9644$ a $b_s = -0,5906$. Následne bol uplatnený prevod na nedeuterované prostredie pomocou vzťahu²⁰:

$${}^w\text{p}K_a = 0,929 {}^w\text{p}K_a^* + 0,41 \quad (11)$$

Hodnoty boli zaznamenané a vyhodnotené v programe SigmaPlot v. 11.0 (San Rafael, USA).

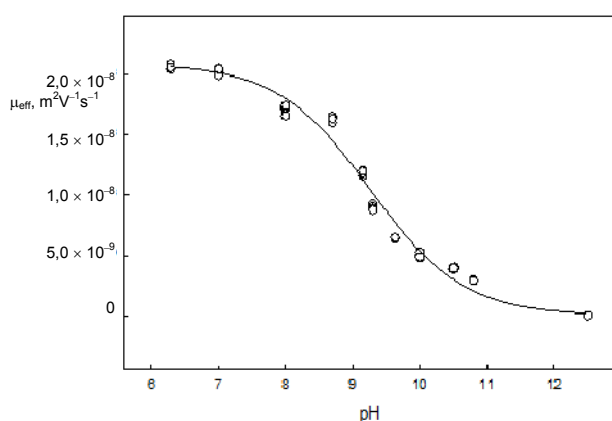
Metóda výpočtových programov

Hodnoty $\text{p}K_a$ boli tiež vypočítané pomocou troch predikčných programov ACD I-Lab (cit.²¹), SPARC (cit.²²) a Marvin 5.8.2 (cit.²³). Uvedené programy pracujú s rôznymi algoritmami výpočtu $\text{p}K_a$ zlučieniny na základe jej štruktúry.

Výsledky a diskusia

Metóda kapilárnej zónovej elektroforézy

V prípade študovaných β -blokátorov išlo o slabé zásady, u ktorých so stúpajúcim pH dochádzalo k postupnej deprotonizácii a ich mobilita preto klesala. Mobilitná krivka látky vyjadrujúca závislosť efektívnych elektroforetických mobilit acebutololu na pH základného elektrolytu je znázornená na obr. 2.

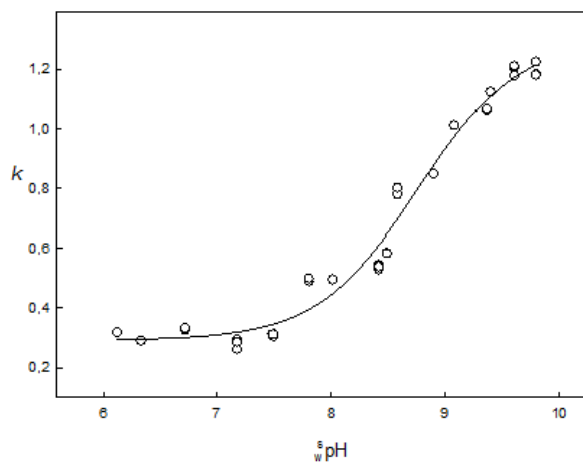


Obr. 2. Krivka závislosti efektívnej elektroforetickej pohyblivosti (μ_{eff}) acebutololu na pH základného vodného elektrolytu; metanolický zásobný roztok acebutololu o koncentrácii $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ dávkaný hydrodynamicky tlakom 40 mbar po dobu 2 s; separačné napätie +20 kV, prúd v rozmedzí 20–30 μA ; teplota $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; detekcia pri 200 nm

Hodnoty disociačných konštánt látok, smerodajné odchýlky výberové a koeficienty determinácie (R^2), ktoré charakterizujú kvalitu preloženia experimentálnych bodov sigmoidou, uvádza tab. I.

Metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie

Realizáciou RP-HPLC experimentu bola získaná sigmoidálna krivka závislosti retenčných faktorov analytu na pH mobilnej fázy (obr. 3). So stúpajúcim pH sa zvyšovali hodnoty retenčných faktorov, pretože dochádzalo k deprotonizácii študovaných látok, čo sa prejavilo zvýše-



Obr. 3. Krivka závislosti retenčných faktorov (k) acebutololu na ${}^s\text{pH}$, tj. zdánlivom pH, meranom v zmesnej hydroorganicznej mobilnej fáze (metanol/fosfátový tlmivý roztok o koncentrácii $0,05 \text{ mol l}^{-1}$; 60:40, v/v) s použitím sklenenej elektródy kalibrovanej na stupnicu vodných pufrů; prietok mobilnej fázy $0,25 \text{ ml min}^{-1}$; dávkaných 5 μl metanolickeho roztoku acebutololu o koncentrácii $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$; teplota $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; detekcia pri 254 nm

ním ich afinity k stacionárnej fáze. Táto závislosť bola vyhodnotená obdobne ako v prípade metódy CZE. Získané hodnoty (${}^s\text{p}K_a$) boli následne prepočítané na vodné prostredie (${}^w\text{p}K_a$) a sú uvedené v tab. I.

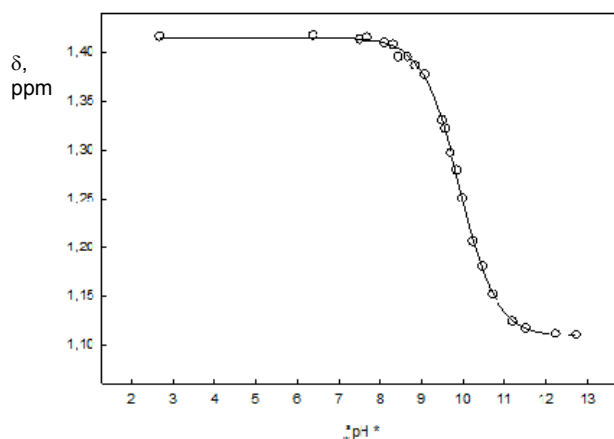
Metóda nukleárnej magnetickej rezonancie

Realizáciou ${}^1\text{H}$ NMR experimentu bola získaná sigmoidálna krivka závislosti chemických posunov vodíkov nachádzajúcich sa v blízkosti ionizovateľnej aminoskupiny na pH prostredia (obr. 4). U propranololu, acebutololu a betaxololu boli sledované zmeny chemického posunu signálov koncových metylových skupín isopropylaminového substituentu. Tieto signály boli vyhodnotené ako dublet dubletu. U celiprololu bol pozorovaný chemický posun singletu *terc*-butylaminového substituentu. S rastúcim pH dochádzalo k deprotonizácii sekundárneho aminu, rástlo magnetické tienenie a chemický posun vodíkov susedných skupín sa postupne posúval k nižším hod-

Tabuľka I

Stanovené hodnoty disociačných konštánt experimentálnymi metódami, smerodajné odchýlky výberové a koeficienty determinácie, ktoré charakterizujú kvalitu preloženia experimentálnych bodov sigmoidou (R^2)

Látka	$\text{p}K_a$ (CZE)	R^2	$\text{p}K_a$ (HPLC)	R^2	$\text{p}K_a$ (${}^1\text{H}$ NMR)	R^2
Acebutolol	$9,27 \pm 0,09$	0,98	$9,55 \pm 0,05$	0,98	$10,41 \pm 0,01$	0,99
Betaxolol	$9,19 \pm 0,11$	0,98	$9,54 \pm 0,03$	0,99	$10,06 \pm 0,01$	0,99
Celiprolol	$9,45 \pm 0,11$	0,98	$9,79 \pm 0,06$	0,99	$10,14 \pm 0,01$	0,99
Propranolol	$9,33 \pm 0,13$	0,98	$9,57 \pm 0,03$	0,99	$9,96 \pm 0,01$	0,99



Obr. 4. Závislosť chemického posunu (δ) protónov acebutolu na $^*pH^*$, tj. zdanlivom pH, meranom v zmesi metanol- d_4 /D $_2$ O (10:3, v/v) s pH elektródou kalibrovanou na stupnicu vodných pufrov; 90°pulz, relaxačný čas 1 s, akvizíčný čas 1,9998 s, počet skenov 16–128; meraných 15 mg vzorky v 0,7 ml zmesi metanol- d_4 /D $_2$ O (10:3, v/v); vzorka titovaná CF $_3$ COOH 0,2 mol l $^{-1}$ a NaOH 0,2 mol l $^{-1}$ v zmesi metanol- d_4 /D $_2$ O (10:3, v/v); vnútorný štandard TMS (0 ppm); teplota 21,5 °C

notám ppm. Na konci experimentu existovala pozorovaná látka len vo forme bázy. Získané hodnoty pK_a po prepočte na vodné prostredie uvádza tab. I.

Metóda výpočtového programu ACD I-Lab, SPARC a Marvin 5.8.2

Hodnoty pK_a vypočítané pomocou online programov spolu s hodnotami vyhladanými v literatúre sú uvedené v tab. II.

Experimentálne získané hodnoty pK_a boli porovnané s hodnotami vygenerovanými tromi výpočtovými programami a referenčnými údajmi z literatúry, ich súhrn znázorňuje obr. 5.

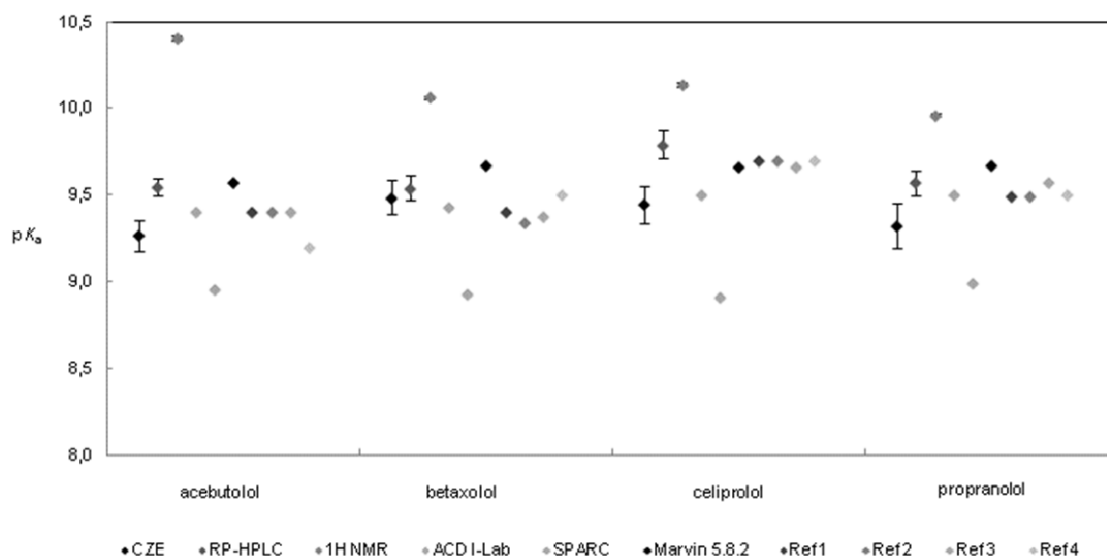
Tabuľka II

Disociačné konštanty študovaných látok vypočítané programom ACD I-Lab, SPARC, Marvin 5.8.2 a hodnoty získané z literatúry

Látka	ACD I-Lab	SPARC	Marvin 5.8.2	pK_a	Lit.	pK_a	Lit.	pK_a	Lit.	pK_a	Lit.
Acebutolol	9,40	8,96	9,57	9,40	24	9,40	25	9,40	26	9,20	27
Betaxolol	9,43	8,95	9,67	9,40	28	9,34	29	9,38	30	9,50	31
Celiprolol	9,50	8,91	9,66	9,70	25	9,70	32	9,66	33	9,70	34
Propranolol	9,50	8,99	9,67	9,49	35	9,49	27	9,57	36	9,50	37

V literatúre sa obvykle rozlišujú tzv. zdanlivé, zmiešané a termodynamické acidobázické disociačné konštanty s korekciami nameraných μ_{eff} a pK_a hodnôt na konštantnú resp. nulovú iónovú silu vodného prostredia a na referenčnú teplotu^{14,38–41}. V predloženej práci prebiehali merania vo vodnom (CZE), hydro-organickom (RP-HPLC), resp. deuterovanom hydro-organickom ($^1\text{H NMR}$) prostredí, pričom použité prevody z pH v roztokoch zmesných hydro-organických rozpúšťadiel na pH vodných pufrov sú založené na empiricky odvodených vzťahoch. Získané hodnoty neboli ďalej prepočítané na nulovú iónovú silu vodného prostredia^{8,9,15}. Ďalším dôležitým faktorom ovplyvňujúcim hodnotu pK_a je teplota. V prípade CZE v dôsledku Jouleovho tepla, ktoré pri prechode prúdu elektrickým odporom vzniká, dochádza k ohrevu roztoku vnútri kapiláry a tým i k zvýšeniu teploty, ktorá ovplyvňuje efektívnu elektroforetickú pohyblivosť⁴⁰. Pri zvolených experimentálnych podmienkach, kedy neprekročila hodnota prechádzajúceho elektrického prúdu 30 μA , možno predpokladať, že použitý systém chladenia kapiláry poskytuje dostatočnú kontrolu teploty a vplyv Jouleovho tepla môže byť zanedbaný^{14,41–43}. Určené hodnoty pK_a sa však vzťahujú k daným experimentálnym podmienkam a nie sú preto všeobecne platnými charakteristikami acidobázických vlastností študovaných látok.

Z porovnania získaných hodnôt pK_a štandardov β -blokátorov s hodnotami z literatúry vyplýva, že najsprávnejšie výsledky poskytli metódy CZE a HPLC a výpočtový program ACD I-Lab a Marvin 5.8.2. Výhodou metódy CZE bola možnosť pracovať vo vodnom prostredí bez potreby ďalšieho prepočtu nameraných hodnôt pK_a . Odchýlka disociačných konštánt získaných pomocou NMR mohla byť spôsobená komplikovaným prepočtom zo zmesi deuterovaných rozpúšťadiel na vodné prostredie. Napriek tomu sa $^1\text{H NMR}$ titrácia vyznačovala vysokými koeficientmi determinácie (R^2), nízkymi smerodajnými odchýlkami a najmä časovou nenáročnosťou experimentu a napriek odchýlkam pK_a od ďalších použitých metód predstavuje po optimalizácii prepočtov perspektívnu variantu pre rutinné stanovenie disociačných konštánt. Všetky použité metódy, s výnimkou výpočtového programu SPARC a $^1\text{H NMR}$, poskytli hodnoty pK_a , ktorých odchýlka od referenčných hodnôt neprevyšuje 5 % a osvedčili k analýze slabých jednosýtnych zásad.



Obr. 5. Hodnoty pK_a študovaných β -blokátorov získané tromi experimentálnymi, tromi výpočtovými metódami a referenčné hodnoty vyhládané v literatúre

Záver

Boli stanovené disociačné konštanty štyroch β -blokátorov. Využitie boli metódy CZE, RP-HPLC a $^1\text{H NMR}$, predikcia pK_a pomocou on-line programov a ich výsledky boli porovnané.

Výhodou použitých experimentálnych metód je predovšetkým potreba len malého množstva vzorku bez nutnosti jeho dokonalej čistoty. Výhodou CZE bola možnosť práce vo vodnom prostredí. NMR experiment sa vyznačoval vysokou reprodukovateľnosťou, jeho nevýhodou, rovnako ako v prípade RP-HPLC však bola nutnosť použitia zmesi rozpúšťadiel a z toho vyplývajúce následné prepočty pK_a pre vodné prostredie. Metóda $^1\text{H NMR}$ ďalej vyžadovala o niekoľko rádov viac študovanej látky než metóda RP-HPLC a najmä CZE. Na druhej strane, výhodou je možnosť študovať látky vo vode obtiažne rozpustné. Z porovnania vyplýva, že najsprávnejšie hodnoty poskytuje metóda CZE, HPLC a výpočtové programy ACD I-Lab a Marvin 5.8.2.

Popísané experimentálne metódy sa osvedčili ako alternatíva k potenciometrickým a UV-VIS spektrofotometrickým metódam pre stanovenie pK_a potenciálnych liečiv. V prípade, že sú látky vo vode rozpustné natoľko, aby mohli byť detegované aspoň jedným typom detektoru (UV-VIS fotometrickým, fluorescenčným alebo univerzálnym elektrickým vodivostným), je najpresnejšou metódou pre stanovenie pK_a CZE prevádzaná vo vodných pufoch. K hydro-organickým rozpúšťadlám je nutné obrátiť sa až v prípade látok vo vode obtiažne rozpustných, pretože prevod pK_a hodnôt z hydro-organických médií na vodné prostredie je založený na empirických vzťahoch, môže byť preto zatiaľčený radou nepresností a poskytuje len približné hodnoty pK_a .

Táto práca bola podporená grantom IGA VFU Brno 23/2010/FaF.

LITERATÚRA

- Testa B., van de Waterbeemd H., Folkers G., Guy R.: *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich 2001.
- Babić S., Horvat A. J. M., Pavlović D. M., Kaštelan-Macan M.: *Trends Anal. Chem.* 26, 1062 (2007).
- Foulon C., Duhal N., Lacroix-Callens B., Vaccher C., Ponte J. B., Goossens J. F.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 31, 165 (2007).
- Gómez-Zaleta B., Ramírez-Silva M. T., Gutiérrez A., González-Vergara E., Güizado-Rodríguez M., Rojas-Hernández A.: *Spectrochim. Acta, Part A* 64, 1002 (2006).
- Andrasi M., Buglyo P., Zekany L., Gaspar A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 1040 (2007).
- Wiczling P., Waszczuk-Jankowska M., Markuszewski M. J., Kaliszan R.: *J. Chromatogr. A* 1214, 109 (2008).
- Lišková A., Šlampová A.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 30, 375 (2007).
- Wiczling P., Markuszewski M. J., Kaliszan R.: *Anal. Chem.* 76, 3069 (2004).
- Rodríguez-Barrientos D., Rojas-Hernández A., Gutiérrez A., Moya-Hernández R., Gómez-Balderas R., Ramírez-Silva M. T.: *Talanta* 80, 754 (2009).
- Gumustas M., Sanli S., Sanli N., Ozkan S. A.: *Talanta* 82, 1528 (2010).
- Grycova L., Dommissie R., Pieters L., Marek R.: *Mag. Res. Chem.* 47, 977 (2009).
- <http://web.natur.cuni.cz/gas/>, staženo 17. 4. 2013.

13. Štulík K., Ševčík J., Pacáková V., Jelínek I., Coufal P.: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha 2004.
14. Šlampová A., Křivánková L.: *J. Chromatogr. A 1216*, 3637 (2009).
15. Kalisz R., Wiczling P., Markuszewski M. J.: *J. Chromatogr. A 1060*, 165 (2004).
16. Rouessac F., Rouessac A., Cruché D.: *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*. Wiley, Chichester 2007.
17. Canals I., Oumada F. Z., Rosés M., Bosch E.: *J. Chromatogr. A 911*, 191 (2001).
18. Rived F., Canals I., Bosch E., Rosés M.: *Anal. Chim. Acta 439*, 315 (2001).
19. Popov K., Rönkkömäki H., Lajunen L. H. J.: *Pure Appl. Chem.* 78, 663 (2006).
20. Krezel A., Bal W.: *J. Inorg. Biochem.* 98, 161 (2004).
21. <https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>, staženo 17. 4. 2013.
22. <http://archemcalc.com/sparc/?CFID=34146&CFTOKEN=82008647>, staženo 17. 4. 2013.
23. <http://www.chemaxon.com/download/marvin/>, staženo 17. 4. 2013.
24. Xu A. Q., Madden T. L.: *Analytical Methods for Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology*. J. Wiley, New Jersey 2011.
25. Florence A. T., Attwood D.: *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Pharmaceutical Press, London 2011.
26. Brittain H. G.: *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology: Critical Compilation of pK_a Values for Pharmaceutical Substances*. Academic Press, London 2007.
27. Hernando D., Gómez J., Aguera A., Fernández-Alba A. R.: *Trends Anal. Chem.* 26, 581 (2007).
28. Product information: *Kerlone (betaxolol hydrochloride), film coated tablet*. <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=8457>, staženo 17. 4. 2013.
29. Product information: *Betoptic, ophthalmic suspension*. http://www.alcon.ca/pdf/Product_pharma/Product_pharma_betopticS_eng.pdf, staženo 17. 4. 2013.
30. Perišić-Janjić N. U., Lučić B., Janjić N. J., Agbaba D.: *J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC 16*, 347 (2003).
31. Ghoreishi S. M., Behpour M., Khoob A.: *Anal. Methods 4*, 2475 (2012).
32. Doležal T.: *Remedia 3*, 158 (2002).
33. Avdeef A.: *Absorption and Drug Development. Solubility, Permeability, and Charge State*. J. Wiley, New Jersey 2012.
34. Itohda A., Tsutsumi K., Imai H., Iwao M., Kotegawa T., Ohashi K.: *J. Chromatogr. B 904*, 88 (2012).
35. Örnskov E., Linusson A., Folestad S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33, 379 (2003).
36. Wan H., Holmén A. G.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2639 (2003).
37. Moffat A. C.: *Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post-mortem Material*. The Pharmaceutical Society of Great Britain, The Pharmaceutical Press, London 1986.
38. Koval D., Kašička V., Jiráček J., Collinsová M., Garrow T. A.: *J. Chromatogr. B 770*, 145 (2002).
39. Koval D., Kašička V., Jiráček J., Collinsová M.: *Electrophoresis 24*, 774 (2003).
40. Včelárová K., Zusková I., Kenndler E., Gaš B.: *Electrophoresis 25*, 309 (2004).
41. Lipka E., Folly-Klan M., Charton J., Vaccher M.-P., Bonte J.-P., Vacher C.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53, 1267 (2010).
42. Foulon C., Danel C., Vacher C., Yous S., Bonte J.-P., Goossens J.-F.: *J. Chromatogr. A 1035*, 131 (2004).
43. Wu X., Gong S., Bo T., Liao Y., Liu H.: *J. Chromatogr. A 1061*, 217 (2004).

I. Kapustíková and J. Tengler (*Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Determination of Acid-base Dissociation Constants of Selected β -Blockers Using Capillary Zone Electrophoresis, RP-HPLC and ^1H NMR**

The acid-base dissociation constant (pK_a) is an important physicochemical parameter of weakly acid or weakly basic pharmaceuticals, which influences solubility, absorption, distribution, metabolism and elimination of drugs. pK_a of four standard β -blockers were firstly determined by capillary zone electrophoresis (CZE). Method is based on measurement of the effective electrophoretic mobility of an ionisable compound in a series of electrolyte solutions of various pHs. This dependence was fitted by a sigmoidal curve, where pK_a is the value of pH in the sigmoid inflection point. Then, pK_a was measured by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) using the sigmoidal dependence of the retention factor on pH of the mobile phase (methanol/phosphate buffer), where pK_a is the value of pH in the sigmoid inflection point. Thirdly, determination of pK_a using ^1H nuclear magnetic resonance (^1H NMR) was based on measurement of chemical shifts of selected protons of studied substances as a function of solution pH (methanol- d_4 /D $_2$ O). Values of pK_a obtained for water/methanol mixtures were recalculated for water medium. Experimentally obtained values of pK_a were compared with values calculated by SPARC, Marvin 5.8.2 and ACD I-Lab programs and literature values.