Razvoj UPLC-MS metode za određivanje kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7 i 10.5

Radović, Roberta

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:693769

Rights / Prava: Attribution-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Roberta Radović

Razvoj UPLC-MS metode za određivanje kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7 i 10.5

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Roberta Radović

Razvoj UPLC-MS metode za određivanje kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7 i 10.5

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
University Graduate Programme
Biotechnology in medicine

Roberta Radović

Development of a UPLC-MS method for measurement of the chromatographic hydrophobicity index (CHI) at pH 2.7 and 10.5

Master's Thesis

Rijeka, 2020.

Mentorica: doc. dr. sc. Jasna Padovan

Diplomski rad obranjen je dana 09.12.2020.

pred povjerenstvom:

1. dr. sc. Jasminka Giacometti, red. prof.
2. dr. sc. Sanja Koštrun, izv. prof.
3. doc. dr. sc. Jasna Padovan

Rad ima 62. stranice, 25 slika, 12 tablica i 30 literaturnih navoda.

Ovaj diplomski rad je izrađen u grupi za in vitro ADME pod nadzorom mag. chem. Petre Mišetić unutar odjela „Metabolizam lijekova i farmakokinetika“ znanstveno-istraživačkog centra Fidelta d.o.o., Zagreb, pod vodstvom dr. sc. Jasne Padovan.

Sažetak

Lipofilnost se uz konstantu ionizacije i topljivost smatra najvažnijim fizikalno-kemijskim svojstvom jer ima izravan utjecaj na svojstva apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja (ADME) potencijalnog lijeka u organizmu, kao i na toksičnost. Predstavlja afinitet molekule ili dijela molekule za lipofilnu okolinu te se izražava preko logaritama particijskog ili distribucijskog koeficijenata (log P ili log D). Zbog značajnog utjecaja na svojstva potencijalnog lijeka određuje se već u vrlo ranim fazama istraživanja lijeka. Tradicionalne metode određivanja lipofilnosti, poput metode izmućkivanja, ograničene su na topljive spojeve te zahtijevaju veću količinu spoja i dulje vrijeme. Stoga se u ranim fazama istraživanja zamijenjuju s indirektnim visokoprotočnim analizama, kao što je obrnuto-fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Jedna od takvih indirektnih metoda je metoda za određivanje kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) koja se zasniva na preračunavanju gradijentnih vremena zadržavanja analita na koloni u CHI uz pomoć jednadžbe dobivene linearnom regresijskom analizom.

Cilj ovog rada bio je razvijanje metode za određivanje CHI pri kiselim (pH 2.7) i bazičnim (pH 10.5) uvjetima pokretne faze koristeći obrnuto-faznu tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (RP-UPLC) spregnutom sa spekrometrijom masa (MS). Kromatografski indeks hidrofobnosti ispitan je pri pH 2.7, 7.4 i 10.5 za set od 30 spojeva, podijeljenih u slijedeće skupine: kiseli, bazični, neutralni, amfoterni i makrolidi. Pomoću komercijalnog software-a ACD/Percepta određene su *in silico* vrijednosti za log D pri pH 2.7, 7.4 i 10.5.

Metoda određivanja CHI vrijednosti pri pH 2.7 i pH 10.5 uspješno je uvedena na RP-UPLC/MS sustavu te je pokazala visoku preciznost. Istovremeno je prikazan i utjecaj starenja kromatografske kolone na CHI vrijednosti. Određivanjem CHI vrijednosti pri tri različita pH određena su kiselo-bazna svojstva za sve ispitane spojeve te su dobivene visoke korelacije sa *in silico* izračunatim vrijednostima za većinu spojeva.

Ključne riječi: lipofilnost, CHI, Log D, UPLC-MS, kiselo-bazna svojstva

Abstract

Lipophilicity is considered to be the most important physicochemical property, in addition to the ionization constant and solubility, as it has a direct impact on the absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) properties of a potential drug in the body, as well as on toxicity. It represents the affinity of a molecule or part of a molecule for a lipophilic environment and expresses the logarithm of the partition or distribution coefficient (log P or log D). Due to the significant impact on the properties of the potential drug, it is usually determined already in the very early stages of drug discovery. Traditional methods of determining lipophilicity, such as the shake-flask method, are limited to soluble compounds and require a larger amount of compound and a longer time. Therefore, they are being replaced by indirect high-throughput analyses, such as reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) in the early stages of discovery. Such an indirect measurment is the method for determining the chromatographic hydrophobicity index (CHI), which is based on calculating CHI values from gradient retention times of the analyte using the equation obtained by linear regression analysis.

The aim of this work was to develop a method for determining CHI under acidic (pH 2.7) and basic (pH 10.5) conditions of the mobile phase using reversed phase ultra high performance liquid chromatography (RP-UPLC) coupled to mass spectrometry (MS). CHI was determined at pH 2.7, 7.4 and 10.5 for a set of 30 compounds, divided into the following groups: acidic, basic, neutral, amphoteric and macrolides. *In silico* values for log D at pH 2.7, 7.4 and 10.5 were calculated using a commercial software ACD/Percepta.

A method with high precision for determining CHI at pH 2.7 and pH 10.5 was successfully implemented using RP-UPLC/MS. The influence of an aging chromatographic column in the method was also shown. By determining of CHI values at three different pH values it was possible to characterize the acid-base character for all tested compounds. A good correlation between

measured CHI values and with *in silico* predictions was obtained for most compounds.

Key words: lipophilicity, CHI, Log D, UPLC-MS, acid-base character

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1. Lipofilnost 2
1.2. Važnost lipofilnosti u farmakokinetičkom profilu lijeka 3
1.3. Skala lipofilnosti 5
1.4. Metode određivanja lipofilnosti 6
1.4.1. Metoda izmućkivanja 7
1.4.2. Računalne metode određivanja lipofilnosti 7
1.4.3. Kromatografske metode za određivanje lipofilnosti 8
1.4.4. Određivanje lipofilnosti upotrebom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza 12
1.5. Određivanje kiselo-baznih svojstava uz pomoć obrnuto-fazne tekućinske kromatografije 15
2. Cilj rada 17
3. Materijali i metode 18
3.1. Materijali 18
3.1.1. Kemikalije 18
3.1.2. Oprema 27
3.2. Analitička metoda 27
3.2.1. UPLC-MS uvjeti 27
3.2.2. Priprema otopina korištenih kao pokretne faze 28
3.2.3. Priprema uzoraka za UPLC analizu 28
3.2.4. Priprema smjese standarda za umjeravanje UPLC sustava . 28
3.3. Obrada podataka 29
3.3.1. Određivanje in silico parametara 30
4. Rezultati 31
4.1. UPLC-MS metoda 31
4.2. Umjeravanje UPLC sustava pri pH 2.7 i 10.5 31
4.3. Eksperimentalne vrijednosti Chrom log $D_{pH\ 7.4}$, $CHI_{2.7}$ i $CHI_{10.5,}$ te profili kiselo-baznih svojstava 35

4.4. Usporedba eksperimentalno određenih $CHI_{2.7}$, Chrom log $D_{7.4}$ i $CHI_{10.5}$ vrijednosti s in silico analizama 41
4.5. Preciznost između dva mjerenja CHI vrijednosti pri pH 2.7, 7.4 i 10.5 46
5. Rasprava 49
6. Zaključak 57
7. Literatura 58
8. Životopis 61

Popis Tablica

Tablica 1. Niz spojeva za baždarenje kromatografskog sustava za određivanje kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.0, 7.4 i 10.5. 13

Tablica 2. Niz spojeva za umjeravanje UPLC sustava, te spojevi korišteni za određivanja CHI pri pH 2.7, 7.4 i 10.5, njihove strukture, molekulske mase, molekulske formule, dobavljači, indikacija ili upotreba lijeka i in silico pK_a vrijednosti. 19

Tablica 3. Standardi korišteni za umjeravanje UPLC sustava, njihovi CAS brojevi, molekulske mase i CHI_{lit}^{20}. 29

Tablica 4. Standardi korišteni u umjeravanju UPLC sustava sa pripadajućim eksperimentalno određenim vremenima zadržavanja i literaturnim vrijednostima CHI. 33

Tablica 5. Srednje vrijednosti kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7, 7.4 i 10.5, te Chrom log $D_{pH\ 7.4}$ za skupinu kiselih spojeva. ... 36

Tablica 6. Srednje vrijednosti kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7, 7.4 i 10.5, te Chrom log $D_{pH\ 7.4}$ za skupinu bazičnih spojeva. 37

Tablica 7. Srednje vrijednosti kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7, 7.4 i 10.5, te Chrom log $D_{pH\ 7.4}$ za skupinu neutralnih spojeva. 38

Tablica 8. Srednje vrijednosti kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7, 7.4 i 10.5, te Chrom log $D_{pH\ 7.4}$ za skupinu amfoternih spojeva. 39

Tablica 9. Srednje vrijednosti kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7, 7.4 i 10.5, te Chrom log $D_{pH\ 7.4}$ za skupinu makrolidnih spojeva. 40

Tablica 10. Eksperimentalno određene CHI vrijednosti pri pH 2.7 i 10.5 i in silico izračuni log D pri pH 2.7 i 10.5 za ispitivane spojeve. 41

Tablica 11. Eksperimentalno određene CHI i Chrom logD vrijednosti pri pH 7.4 i u slučaju korištenja stare i nove kromatografske kolone i in silico izračuni log D pri pH 7.4. 43

Tablica 12. Popis spojeva kojima CHI vrijednosti odstupaju više od 5 jedinica. 47

Popis Slika

Slika 1. Utjecaj lipofilnosti molekule na oralnu bioraspoloživost. 5

Slika 2. Kemijska struktura oktanola. 7

Slika 3. Korelacija literaturnih i predviđenih vrijednosti log D (koristeći Prolog D) za 70 komercijalnih lijekova. 8

Slika 4. Prikaz t_R i t_0 na kromatogramu. 9

Slika 5. Kemijska struktura fosfolipida. 10

Slika 6. C18 nepokretna faza u obrnuto-faznoj tekućinskoj kromatografiji 11

Slika 7. Primjer baždarnog pravca dobivenog umjeravanjem HPLC sustava standardima za određivanje $CHI_{7.4}$. 13

Slika 8. Korelacija log D i Chrom log $D_{pH\ 7.4}$. 14

Slika 9. Utjecaj pH vrijednosti pokretne faze na CHI vrijednost molekula različitih kiselo-baznih svojstava. 16

Slika 10. Kromatogram za umjeravanje UPLC sustava pri kiselim uvjetima pokretne faze (pH 2.7). 32

Slika 11. Kromatogram za umjeravanje UPLC sustava pri bazičnim uvjetima pokretne faze (pH 10.5). 32

Slika 12. Baždarni pravac za umjeravanje UPLC pri pH 2.7 s pripadajućom jednadžbom i koeficijentima determinacije R^2. 34

Slika 13. Baždarni pravac za umjeravanje UPLC pri pH 7.4 s pripadajućom jednadžbom i koeficijentima determinacije R^2. 34

Slika 14. Baždarni pravac za umjeravanje UPLC pri pH 10.5 s pripadajućom jednadžbom i koeficijentima determinacije R^2. 34

Slika 15. Usporedba $CHI_{2.7}$, $CHI_{7.4}$ i $CHI_{10.5}$ za kiseline. 36

Slika 16. Usporedba $CHI_{2.7}$, $CHI_{7.4}$ i $CHI_{10.5}$ za baze (*CHI>100). 37

Slika 17. Usporedba $CHI_{2.7}$, $CHI_{7.4}$ i $CHI_{10.5}$ za neutralne spojeve (*CHI>100). 38

Slika 18. Usporedba $CHI_{2.7}$, $CHI_{7.4}$ i $CHI_{10.5}$ za amfoterne spojeve (*CHI<17.9). 39

Slika 19. Usporedba $CHI_{2.7}$, $CHI_{7.4}$ i $CHI_{10.5}$ za makrolide (*CHI>100). ... 40

Slika 20. Korelacija *in silico* log $D_{2.7}$ i log $D_{10.5}$ vrijednosti, te eksperimentalno određenih $CHI_{2.7}$ i $CHI_{10.5}$. 42

Slika 21. Korelacija *in silico* log $D_{7.4}$ vrijednosti i eksperimentalno određenih Chrom log $D_{7.4}$ upotrebom starije (gornja slika) i nove (donja slika) kromatografske kolone. 44

Slika 22. Korelacija *in silico* log $D_{7.4}$ vrijednosti i eksperimentalno određenih Chrom log $D_{7.4}$ upotrebom starije (gornja slika) i nove (donja slika) kromatografske kolone, za set spojeva bez makrolida. 45

Slika 23. Korelacija između dva mjerenja CHI (a) – pri pH 2.7, b) – pri pH 7.4, korelacija između korištenja stare i nove kolone s pretkolonom, c) – pri pH 7.4, korelacija između korištenja nove kolone s pretkolonom i nove kolone bez pretkolone, d) – pri pH 10.5)..... 46

Slika 24. Korelacija između dva mjerenja $CHI_{pH\ 7.4}$, za slučaj isključivanja makrolida iz analize i korištenja stare i nove kolone sa pretkolonom..... 48

Slika 25. Korelacija između dva mjerenja $CHI_{pH\ 7.4}$, za slučaj isključivanja makrolida iz analize i korištenja nove kolone s pretkolonom i nove kolone bez pretkolone. 48

Popis korištenih kratica

ADME	Apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje (*engl. Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion*)
CAD	Kationski amfifilni lijekovi (*engl. Cationic Amphiphilic Drugs*)
CHI	Kromatografski indeks hidrofobnosti (*engl. Chromatographic Hydrophobicity Index*)
DAD	Detektor s nizom fotodioda (*engl. Diode Array Detector*)
DMSO	Dimetil sulfoksid
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
log D	Logaritamski koeficijent distribucije
log $D_{7.4}$	Logaritamski koeficijent distribucije pri pH 7.4
log P	Logaritamski koeficijent raspodjele
MS	Spektrometrija masa
pK_a	Konstanta ionizacije
PSA	Polarna površina (*engl. Polar Surface Area*)
R^2	Koeficijent determinacije
RP	Reverzna faza (*engl. Reversed Phase*)
RP-HPLC	Obrnuto-fazna tekućinska kromatografija (*engl. Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*)
STD	Standard
t_0	Mrtvo vrijeme
t_r	Vrijeme zadržavanja (*engl. Retention time*)
UPLC	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
UPLC-MS	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrijom masa
UV-VIS	Ultraljubičasto-vidljivo područje spektra

1. Uvod

Istraživanje i razvoj lijekova je vrlo dugotrajan, zahtjevan i skup proces, čiji se trošak danas procijenuje na 1.336 milijarde USD (1). Svrha istraživanja novih lijekova je razvijanje učinkovitih, sigurnih i visokokvalitetnih supstancija za liječenje bolesti za koje nema terapije te kao zamjena za nedovoljno učinkovite lijekove ili lijekove s nuspojavama. Najučinkovitiji lijek je onaj koji ima optimalnu ravnotežu između sigurnosti, učinkovitosti, farmakokinetike, formulacije, lijek-lijek interakcija i troškova proizvodnje (2).

Djelovanje lijeka posljedica je nekoliko kemijskih i bioloških procesa. Uz farmakodinamički proces interakcije lijeka i mete, farmakokinetički procesi također imaju temeljnu ulogu u postizanju biološke aktivnosti lijeka. Djelatna tvar lijeka mora se odvojiti od primjenjenog farmaceutskog oblika, otopiti u tjelesnim tekućinama i proći kroz stanične membrane kako bi stigla do ciljane mete. Nakon interakcije s metom, aktivni spoj se odvaja od mjesta vezanja, te metabolizira i izlučuje iz tijela. Svojstva apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja (engl. absorption, distribution, metabolism and excretion ili ADME) uglavnom su određena fizikalno-kemijskim svojstvima (3).

U prošlosti je glavni fokus u istraživanju lijeka bio farmakodinamički aspekt biološke aktivnosti te su farmakokinetička svojstva ispitivana tek u kasnijoj razvojnoj fazi. Tako su tijekom 90-tih godina prošlog stoljeća, loša farmakokinetička svojstva navedena kao glavni uzrok odustajanja od daljnjeg razvoja lijeka u kliničkim fazama ispitivanja. Farmaceutske industrije su zato pokrenule profiliranje farmakokinetičkih svojstava lijeka u ranim fazama istraživanja kako bi samo oni spojevi s velikim potencijalom i odgovarajućim farmakokinetičkim svojstvima bili odabrani za daljnji razvoj. Značajan napredak napravljen je uvođenjem velikog broja *in vitro* metoda za određivanje svojstava apsorpcije, distribucije i metabolizma te povećanjem kapaciteta testiranja broja spojeva, što je rezulitiralo smanjenjem postotka spojeva koji se zaustavljaju u kliničkom razvoju sa

visokih 39% u 1991. godini na samo 8% u 2000. godini. U istraživanju novih lijekova sve se više pažnje pridodaje pretkliničkom profiliranju lijekova kandidata, među kojima se ističu računske metode i metode ekstrapolacije *in vitro* i *in vivo* podataka za predviđanje farmakokinetike u čovjeka. Pretkliničko profiliranje lijekova, između ostalog, podrazumijeva fizikalno-kemijsku karakterizaciju potencijalnih spojeva koji se razvijaju kao lijekovi (4). Među fizikalno-kemijskim svojstvima koja je potrebno odrediti su integritet, topljivost, lipofilnost, pK_a, i druge. Optimizacija fizikalno-kemijskih svojstava jedan je od važnih koraka u ranoj fazi istraživanja lijekova, a najveća važnost pridodaje se mjerenju i predviđanju svojstva lipofilnosti (5).

1.1. Lipofilnost

Prema IUPAC-ovoj definiciji lipofilnost se definira kao afinitet molekule ili dijela molekule prema lipofilnom okruženju. Hidrofobnost je etimološki sinonim za lipofilnost, a njegova definicija proizlazi iz sklonosti molekule prema lipofilnom okruženju, tj. sklonosti da odbija vodu. Hidrofobnošću se mjeri udruživanje nepolarnih skupina ili molekula u vodenom okruženju. Vrijednosti lipofilnosti najčešće se izražavaju preko logaritamskog koeficijenta raspodjele (log P) u sustavu ravnotežne raspodjele između organskog otapala i vodene faze. Kao organsko otapalo najčešće se koristi n-oktanol, zbog sličnosti s biološkim fosfolipidnim membranama, a kao vodena faza pufer. Log P se određuje pri pH-u gdje su spojevi u neutralnom obliku (neionizirani). Logaritamska vrijednost koeficijenta raspodjele definira se kao omjer koncentracije neutralnog spoja u organskoj fazi ($C_{oktanol}$) i koncentracije neutralnog spoja u vodenoj fazi (C_{voda}) (jednadžba 1).

$$\log P = \log\left(\frac{C_{oktanol}}{C_{voda}}\right) \quad (1)$$

Viša log P vrijednost ukazuje na veći afinitet molekule za lipidnu fazu, dok niža vrijednost ukazuje na afinitet za vodenu fazu. Log P se najčešće

određuje eksperimentalnom metodom izmućkivanja (engl. shake-flask) ili računski.

Uz koeficijent raspodjele kojim se izražava lipofilnost molekule u neioniziranom obliku, određuje se i distribucijski koeficijent (log D). Log D predstavlja raspodjelu neionizirane, kao i svih ioniziranih vrsta pri određenoj pH vrijednosti, te se također određuje raspodjelom između organske i vodene faze pri određenom pH. Logaritamska vrijednost koeficijenta raspodjele definira se kao omjer koncentracije ionizirajućeg spoja u organskoj fazi ($C_{oktanol}$) i koncentracije ionizirajućeg spoja u vodenoj fazi (C_{voda}), pri određenoj pH vrijednosti (jednadžba 2).

$$\log D_{pH,\,okt/voda} = \log \left(\frac{C\ \text{ionizirajući}_{oktanol} + C\ \text{neionizirajući}_{oktanol}}{C\ \text{ionizirajući}_{voda} + C\ \text{neionizirajući}_{voda}} \right) \quad (2)$$

Udio neionizirane i ionizirane vrste pri određenoj pH vrijednosti ovisit će o konstanti ionizacije pK_a koju određuju bazične i/ili kisele ionizacijske skupine u molekuli. Ako molekula ne posjeduje ionizirajuće skupine tada su log P i log D vrijednosti jednake i neovisne o pH (5-7). Za kiseline se omjer neutralnih molekula i aniona u otopini smanjuje s povećanjem pH, te se log D vrijednost smanjuje s povećanjem pH. Obrnuto, za baze se omjer neutralnih molekula i kationa u otopini povećava s povećanjem pH, te se log D vrijednost povećava s povećanjem pH (6).

1.2. Važnost lipofilnosti u farmakokinetičkom profilu lijeka

Lipofilnost spoja od velike je važnosti za biološku aktivnost lijeka, upravo zbog afiniteta lipofilnih molekula da se otapaju u lipidima, te utječe na topljivost i svojstva apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije (ADME), kao i na toksičnost lijeka. Dobra oralna bioraspoloživost važno je obilježje lijekova za oralnu primjenu budući da osigurava nisku dozu te manju varijabilnost u apsorbiranoj frakciji lijeka u sistemskoj cirkulaciji. Lipinski i suradnici su proučavali svojstva oralno bioraspoloživih lijekova te predložili tzv. „Lipinski pravilo 5“, prema kojem su slaba apsorpcija i permeabilnost vjerojatnije ukoliko molekula posjeduje dva ili više od

sljedećih kriterija: 1) relativna molekulska masa veća od 500, 2) više od 5 donora vodikovih veza, 3) više od 10 akceptora vodikovih veza, te 4) log P> 5 (6).

Kako bi se spojevi za oralnu primjenu mogli apsorbirati, prvenstveno se moraju moći otopiti u tankom crijevu, a upravo na topljivost utječe i lipofilnost (log P) pa će tako pri visokim vrijednostima lipofilnosti topljivost biti smanjena. Osim topljivosti na apsorpciju iz epitela tankog crijeva utječe i permeabilnost spoja. Svojstvo više lipofilnosti te manje molekulske mase i polarne površine (engl. polar surface area, PSA) omogućuje lijekovima lagan prolazak preko lipidnih barijera (stanične fosfolipidne membrane) pri čemu su neutralne molekule permeabilnije od ioniziranih kod pasivne difuzije. U nekim slučajevima manje lipofilni lijekovi prolaze staničnu membranu mehanizmom aktivnog transporta.

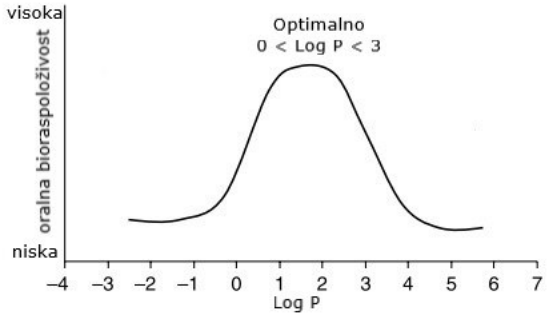
Lipofilnost je važan faktor distribucije spoja u tijelu. Visoki postotak vezanja lipofilnih spojeva na proteine plazme čest je problem u efikasnosti lijeka zbog niske slobodne frakcije koja se može vezati na biološku metu, kao i u farmakokinetici zbog utjecaja na farmakokinetičke parametre kao što su volumen raspodjele. Volumen raspodjele (engl. volume of distribution, V_d) je hipotetski volumen koji opisuje raspodjelu spoja između tkiva i plazme (3,8), te se definira kao omjer doze lijeka u tijelu i koncentracije lijeka koja se mjeri u plazmi. Premda kiselo-bazna svojstva molekula najviše utječu na volumen distribucije, količina vezanja za membrane ili tkiva ovisi i o lipofilnosti molekula. Tako molekule s bazičnim ionizacijskim centrima pokazuju veći afinitet vezanja za fosfolipidne membrane tkiva, te imaju veće volumene distribucije u odnosu na kiseline, čiji je afinitet vezanja za proteine plazme veći pri nižim vrijednostima lipofilnosti.

Istraživanjem utjecaja lipofilnosti na metabolizam spojeva, utvrđeno je da su spojevi s visokim vrijednostima lipofilnosti (log P>5) skloniji povećanoj metaboličkoj nestabilnosti kao i interakcijama s metaboličkim enzimima citokroma P450 (8).

Nadalje, jako lipofilni lijekovi mogu stvarati nespecifične interakcije s neželjenim metama, čime se povećava njihova distribucija u tkivima, a time i toksičnost (9). Pozitivno nabijeni lipofilni spojevi mogu inhibirati hERG kalijev kanal u srcu, prilikom čega dolazi do povećanja QT srčanog intervala. Posljedica produženog QT intervala je aritmija koja može rezultirati smrću (5). Uz blokiranje hERG kanala, fosfolipidoza je još jedan toksični efekt za kojeg su zaslužni lipofilni bazični spojevi, točnije kationski amfifilni lijekovi (engl. cationic amphiphilic drugs, CAD). Fosfolipidoza je reverzibilni poremećaj pohrane lizosoma, koji karakterizira akumulacija fosfolipida i lijekova u lizosomima bubrega, jetre, pluća, mozga. CAD-ovi uzrokuju povećanje lizosomalnog pH čime smanjuju lizosomalnu enzimatsku aktivnost (10).

1.3. Skala lipofilnosti

Odnos između između log P vrijednosti i bioraspoloživosti nekog spoja prikazan je na slici 1. Vidljivo je kako je za optimalnu gastrointestinalnu apsorpciju poželjno da je raspon log P vrijednosti između 0 i 3. U tom rasponu, spojevi imaju dobar omjer između topljivosti i propusnosti kroz stanične membrane. Spojevi sa nižim vrijednostima log P su polarniji i time bolje topljivi, ali ipak slabije permeabilni, dok su spojevi sa višim log P vrijednostima (>3) lipofilniji te imaju slabiju topljivost u vodenom okruženju i podložniji su metabolizmu.



Slika 1. Utjecaj lipofilnosti molekule na oralnu bioraspoloživost.

Preuzeto i adaptirano iz Borchardt RT, Kerns EH, Lipinski CA, Thakker DR, Wang B. *Drug-like Properties: Concepts, Structure, Design and Methods*. Elsevier: London, UK, 2008.

Kod spojeva koji mogu ionizirati, odnosno onih koji pri fiziološkom pH imaju naboj, govorimo o log $D_{7.4}$ vrijednosti. Ovisno o rasponu log $D_{7.4}$ vrijednosti, molekule se mogu podijeliti u četiri skupine prema fizikalno-kemijskim i ADME/T svojstvima koje pokazuju (6):

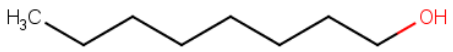
- log $D_{7.4}$ < 1: Ove molekule su dobro topljive, ali imaju nisku propusnost što za posljedicu ima lošu apsorpciju i slabi prelazak preko krvno-moždane barijere. Zbog velike polarnosti pokazuju brže izlučivanje iz tijela putem bubrega.
- 1 < log $D_{7.4}$ < 3: Ovaj raspon lipofilnosti je idealan za molekule koje se razvijaju kao lijekovi. Molekule koje se nalaze u ovom rasponu općenito imaju dobru gastrointestinalnu apsorpciju zahvaljujući dobrom odnosu između topljivosti i propusnosti. Metabolički su stabilne zbog slabijeg vezanja na metaboličke enzime.
- 3 < log $D_{7.4}$ < 5: Molekule u ovom rasponu pokazuju dobru propusnost, ali je zbog smanjene topljivosti apsorpcija niska. Zbog povećanog metabolizma, njihovo je izlučivanje iz organizma ubrzano.
- log $D_{7.4}$ > 5: Molekule s povećanim vrijednostima lipofilnosti pokazuju nisku apsorpciju i bioraspoloživost, upravo zbog niske topljivosti. Također, imaju visoku stopu metabolizma, a zbog nakupljanja u tkivima velik je potencijal za toksične efekte.

1.4. Metode određivanja lipofilnosti

Lipofilnost se uobičajeno mjeri kao raspodjela spoja u dvofaznom sustavu. Razlikujemo tekući-tekući sustav koji se sastoji od oktanola i vode, i čvrsti-tekući koji se bazira na obrnuto-faznoj tekućinskoj kromatografiji (engl. reversed phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) (11). Metode kojima se mjeri lipofilnost dijelimo na direktne i indirektne. U direktnim metodama kao što su metoda izmućkivanja, metoda miješanja ili potenciometrijska titracija, lipofilnost se određuje direktno iz izmjerenih podataka. Kod indirektnih metoda izmjereni parametar ima linearnu povezanost s log P i log D vrijednostima (3).

1.4.1. Metoda izmućkivanja

Metoda izmućkivanja je metoda koja se smatra zlatnim standardom za određivanje log P i log D (6). Zasniva se na mjerenju raspodjele spoja između nepolarne i polarne faze. Kao nepolarna faza koristi se n-oktanol (prikazan na slici 2) koji oponaša lipidni dio biološkog sustava. Kao polarna faza koristi se vodeni pufer koja oponaša hidrofilni dio u biološkom sustavu.



Slika 2. Kemijska struktura oktanola.

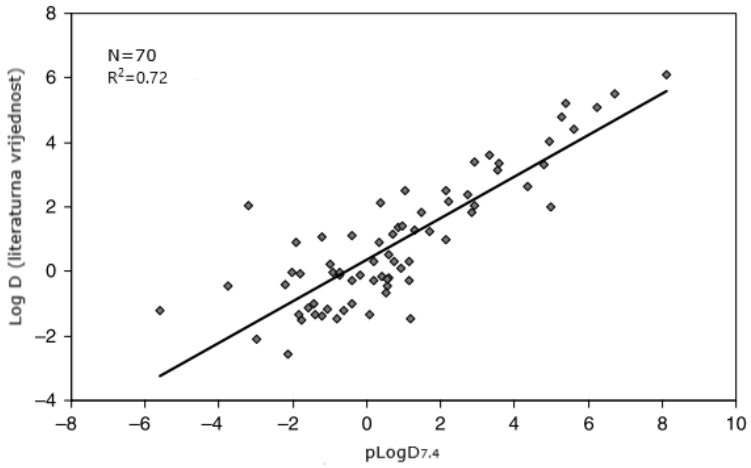
Ispitivana molekula se otopi u vodenoj fazi i unosi u staklenu posudicu nakon čega se dodaje oktanol. Ovakav sustav se izmućkuje pri konstantnoj temperaturi do trenutka ostvarivanja ravnoteže, što, ovisno o ispitivanom spoju, može potrajati od 1, pa sve do 72 sata. Nakon odvajanja faza centrifugiranjem slijedi određivanje koncentracije spoja u svakoj od njih, koristeći UV/VIS spektrometriju ili tekućinsku kromatografiju – mjereći površinu ispod kromatografskog pika. Logaritamska vrijednost omjera koncentracija u dvije faze je log P ili log D vrijednost (3,6).

Unatoč jednostavnosti i visokoj preciznosti, metoda izmućkivanja ima nekoliko nedostataka. Ova metoda ograničena je na topljive spojeve, a otapalo i spojevi moraju biti visoke čistoće. Potrebne su također relativno velike količine spojeva (do 10 mg). Nadalje, potrebno je održavati konstantnu temperaturu tijekom cijelog procesa. Metoda oduzima mnogo vremena dok su mogućnosti automatizacije ograničene (3,12).

1.4.2. Računalne metode određivanja lipofilnosti

Danas postoje mnogi *in silico* modeli koji pružaju mogućnost predviđanja log P i log D vrijednosti novosintetiziranih spojeva, a široko se koriste u modelima medicinske kemije za pronalaženje veze između strukture i svojstava molekule (5). *In silico* modeli razvijaju se koristeći koeficijente razdjeljenja i distribucije određene metodom izmućkavanja za određeni set

molekula. Računalni modeli mogu na temelju strukturnih parametara predvidjeti lipofilnost novog kemijskog entiteta. Iako je pouzdanost *in silico* modela sve veća zahvaljujući velikom broju eksperimentalno dostupnih vrijednosti na kojima su modeli razvijeni, ipak treba imati na umu da neće svi modeli dati isto predviđanje i da vrijednosti neće uvijek biti visoko korelirane s laboratorijskim mjerenjima. Tipična korelacija predviđene i izmjerene vrijednosti log $D_{pH7.4}$ prikazana je na slici 3. Prosječna razlika između predviđene i izmjerene vrijednosti je oko 1,05 log jedinica (6). Do većih nepodudarnosti može doći ako se za razvoj modela koristi nedovoljan broj eksperimentalnih podataka, ukoliko se molekule čije se vrijednosti predviđaju znatno strukturno razlikuju od molekula korištenih pri razvoju modela, te za molekule složene trodimenzionalne strukture (8).



Slika 3. Korelacija literaturnih i predviđenih vrijednosti log D (koristeći Prolog D) za 70 komercijalnih lijekova.

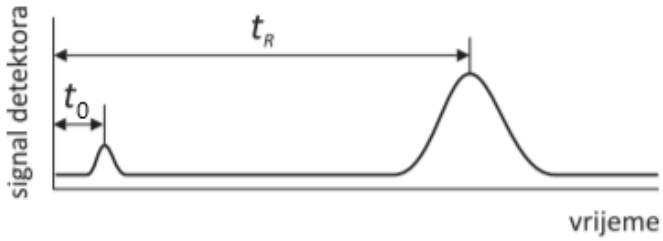
Preuzeto i adaptirano iz Kerns EH, Di L. Drug-like Properties: Concepts, Structure, Design and Methods. Elsevier: London, UK, 2008.

1.4.3. Kromatografske metode za određivanje lipofilnosti

Kromatografija je fizikalna metoda koja se koristi za razdvajanje smjesa i karakterizaciju spojeva. Komponente smjese koje se razdvajaju raspodjeljuju se između dviju faza: nepokretne (engl. stationary phase) i pokretne (engl. mobile phase) koja se kreće u određenom smjeru. Pokretna faza može biti tekućina, plin ili superkritični fluid, dok nepokretna može biti

kruta tvar, gel ili tekućina (13). Faze se odabiru tako da komponente smjese imaju različitu topljivost u svakoj od faza. Razdvajanje u kromatografiji zasniva se na tome da različite komponente imaju različito vrijeme zadržavanja na nepokretnoj fazi, zbog razlika u adsorpciji, ionskoj izmjeni, raspodjeli između faza i veličini tvari koje se razdvajaju. Vrijeme zadržavanja, t_R, mjeri se od trenutka injektiranja uzorka do izlaska komponente iz kromatografskog sustava što na kromatogramu vidimo kao najvišu točku pika. Pošto vrijeme zadržavanja varira s dužinom kolone i protokom pokretne faze, korisnije je služiti se faktorom kapaciteta. Faktor kapaciteta *k* pokazuje koliko se komponenta zadržava u nepokretnoj u odnosu u pokretnoj fazi. Definira se kao omjer vremena zadržavanja analita (t_R) i vremena prolaska komponente koja se ne zadržava na nepokretnoj fazi već samo prolazi kroz sustav (t_0) (jednadžba 3). Kako bi se postigla odgovarajuća razlučivost u prihvatljivom vremenu analize, poželjno je da je vrijednost k između 1 i 5 (14).

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



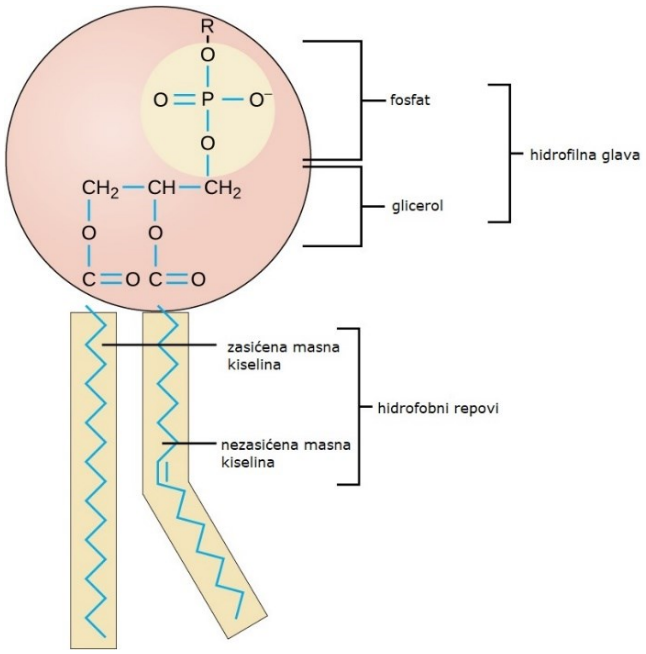
Slika 4. Prikaz t_R i t_0 na kromatogramu.

Preuzeto i adaptirano sa
https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/chrom1.htm

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) se uobičajeno koristi kao separacijska i analitička metoda u određivanju čistoće i identifikaciji spojeva. Osim toga, može se koristiti i u metodama određivanja različitih fizikalno-kemijskih svojstava kao što su topljivost, propusnost, kiselo/bazna svojstva i lipofilnost.

Jedna od indirektnih metoda za mjerenje lipofilnosti/hidrofobnosti je obrnuto-fazna tekućinska kromatografija. Zadržavanje u kromatografiji u sustavu obrnutih faza povezano je s dinamičkom raspodjelom spoja između nepokretne nepolarne i pokretne polarne faze. Vrijeme zadržavanja spoja na nepokretnoj fazi je mjera lipofilnosti molekule. Tako se manje lipofilne molekule zadržavaju kraće, dok povećanjem lipofilnosti dolazi do jačeg vezanja na kromatografsku kolonu (15).

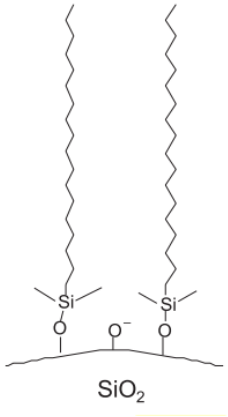
Nekoliko je razloga zašto je tekućinska kromatografija u sustavu obrnutih faza bolji model od metode izmućkivanja za određivanje lipofilnosti. Prvi leži u sličnosti u strukturama fosfolipidnog dvosloja i nepoketne faze. Naime, fosfolipidni dvosloj (prikazan na slici 5) je anizotropan zbog karakteristične strukture u kojoj su proteini ugrađeni u lipide.



Slika 5. Kemijska struktura fosfolipida.

Preuzeto i adaptirano sa https://www.bioexplorer.net/phospholipid-bilayer.html/

Nepokretna faza u obrnuto-faznoj kromatografiji je silika s kemijski vezanim C18 ugljikovodičnim lancima (prikazana na slici 6). Ona je također anizotropna i time slična strukturi fosfolipidnog dvosloja.



Slika 6. C18 nepokretna faza u obrnuto-faznoj tekućinskoj kromatografiji

Preuzeto iz Rutkowska E, Pająk K, Jóźwiak K. Lipophilicity - Methods of determination and its role in medicinal chemistry. Acta Pol Pharm - Drug Res 2013; 70: 3–18.

Oktanol, koji se koristi u metodi izmućkivanja, je izotropan, pa samim time manje sličan strukturi fosfolipidnog dvosloja od C18 nepokretne faze.

Nadalje, zbog amfifilnog karaktera oktanola, hidroksilna skupina može služiti kao donor i akceptor vodikove veze (11). Spojevi sa amfifilnim svojstvima mogu se nakupljati na međupovršini i onemogućiti potpuno odvajanje dviju faza, te narušiti ravnotežu raspodjele. Ravnoteža nije narušena u slučaju kromatografske raspodjele jer se ono odvija na velikoj površini koja je sličnija raspodjeli spojeva na biološkim membranama.

Kromatografske metode imaju brojne prednosti nad tradicionalnim metodama. Radi se o visoko učinkovitim, brzim i reproducibilnim metodama, koje se vrlo lako mogu automatizirati. U jednom se danu može odrediti lipofilnost za više od 100 spojeva po jednom instrumentu. Mjerenje vremena zadržavanja je preciznije i ponovljivije nego određivanje koncentracija u metodi izmućkivanja. Također, kromatografske metode ne zahtijevaju veliku količinu spoja, neosjetljive su na onečišćenja, osobito ako se u sprezi s tekućinskom kromatografom koristi spektometar masa. Također, primjenjive su za slabije topljive spojeve i mogu se analizirati spojevi sa širim rasponom lipofilnosti (11,16).

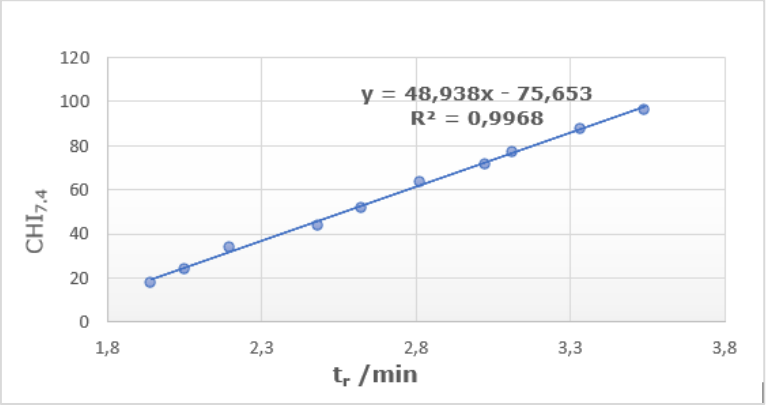
1.4.4. Određivanje lipofilnosti upotrebom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza

Za kromatografsko određivanje lipofilnosti koristi se RP-HPLC u gradijentnom načinu ispiranja. U ovoj se metodi mjeri raspodjela otopljene tvari između nepolarne nepokretne faze i polarne puferske pokretne faze. Kao pokretna faza koristi se gradijent acetonitrila i amonijevog acetata, a kao nepokretna C18 nepolarni ugljikovodični lanci kemijski vezani na siliku. Sastav pokretne faze se tijekom analize mijenja, što znači da se radi o gradijentnom načinu ispiranja. Pritom se koncentracija acetonitrila postepeno povećava. Spojevi se eluiraju s kolone u onom trenutku kada se postigne odgovarajuća koncentracija acetonitrila. Povećanjem koncentracije acetonitrila osigurava se da se jače vezani lipofilni spojevi eluiraju u jednom ispiranju i u kratkom vremenu trajanja od dvije do pet minuta. Jednim gradijentnim eluiranjem pokriva se širi raspon lipofilnosti. Mutton je istaknuo kako je povećanjem brzine protoka i korištenjem kraćih kolona moguće smanjiti gradijentno vrijeme bez gubitka efikasnosti separacije i rezolucije (3). Vrijeme zadržavanja je direktno povezano s raspodjelom spoja između pokretne i nepokretne faze. Također, vrijeme zadržavanja je i mjera lipofilnosti molekule. Manje lipofilne molekule zadržavaju se kraće, dok povećanjem lipofilnosti dolazi do jačeg vezanja na kolonu.

Vrijednosti kromatografskog indeksa hidrofobnosti (engl. chromatographic hydrophobicity index, CHI) direktno se preračunavaju iz vremena zadržavanja koristeći jednadžbu baždarnog pravca. Za umjeravanje se koristi bilo koji set spojeva koji pokriva lipofilnost u rasponu od -0.4 do 6.3 Chrom log D. Primjer seta spojeva koji se koristi pri umjeravanju, zajedno sa pripadajućim vremenima zadržavanja i CHI prikazan je u tablici 1. Baždarni pravac i pripadajuća jednadžba prikazana je na slici 7 (3,16).

Tablica 1. Niz spojeva za baždarenje kromatografskog sustava za određivanje kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.0, 7.4 i 10.5.

Spoj	tr/min. (pH 2.0)	CHI_2	tr/min. (pH 7.4)	$CHI_{7.4}$	tr/min. (pH 10.5)	$CHI_{10.5}$
Teofilin	1.12	6.3	1.94	18.4	1	4.97
5-Feniltetrazol	1.38	17.9	2.05	23.6	1.29	15.98
Benzimidazol	1.78	42.2	2.19	34.3	1.58	30.61
Kolkicin	1.83	43.9	2.48	43.9	1.70	43.86
8-Fenilteofilin	1.97	51.7	2.62	51.7	1.39	21.48
Acetofenon	2.12	64.1	2.81	64.1	2.05	64.12
Indol	2.29	72.1	3.02	72.1	2.19	72.07
Propiofenon	2.37	77.4	3.11	77.4	2.29	77.42
Butirofenon	2.55	87.3	3.33	87.3	2.46	87.33
Valerofenon	2.72	96.4	3.54	96.4	2.61	96.36



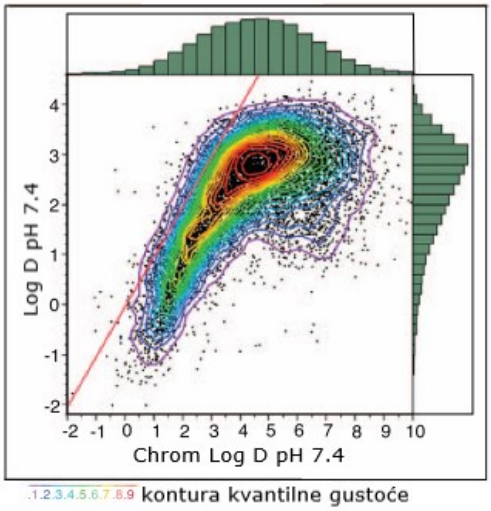
Slika 7. Primjer baždarnog pravca dobivenog umjeravanjem HPLC sustava standardima za određivanje $CHI_{7.4}$.

Slika 7 prikazuje tipičan baždarni pravac, međutim, umjeravanje bi se trebalo ponavljati svaki put kada dođe do značajnog pomaka u gradijentnim vremenima zadržavanja niza spojeva za baždarenje. Nadalje, učestalo mjerenje vremena zadržavanja smjese standarda služi i kao provjera ispravnosti rada sustava. Jednadžba baždarnog pravca služi za preračunavanje eksperimentalno određenog gradijentnog vremena

zadržavanja u CHI vrijednost za bilo koji ispitivani spoj. CHI vrijednosti opisuju lipofilnost u rasponu od 0 do 100. Za jako hidrofilne ili lipofilne spojeve, vrijednost može biti manja od 0, odnosno veća od 100. Što je CHI vrijednost veća, to je spoj lipofilniji i potrebna je veća koncentracija acetonitrila u pokretnoj fazi kako bi se spoj isprao s nepokretne nepolarne faze (17). Kako CHI vrijednost još uvijek nije široko rasprostranjena među svim znanstvenicima, radi lakšeg snalaženja se prevodi u tradicionalno korištenu log D skalu. CHI vrijednost se prevodi u novi parametar Chrom log $D_{7.4}$ pomoću jednadžbe 4.

$$\text{Chrom log } D_{7.4} = (0.0857) * \text{CHI} - 2.00 \quad (4)$$

Kada vrijednosti Chrom log $D_{7.4}$ uspoređujemo sa izmjerenim koeficijentom raspodjele log $D_{pH\ 7.4}$ uočavamo kako su vrijednosti dobro korelirane za niže vrijednosti lipofilnosti. Slaba korelacija i iskrivljena distribucija povezuju se s višim vrijednostima lipofilnosti (slika 8). Kromatografske metode omogućuju određivanje šireg raspona lipofilnosti jer su u manjoj mjeri ograničene topljivošću spoja.



Slika 8. Korelacija log D i Chrom log $D_{pH\ 7.4}$.

Preuzeto i adaptirano iz Young RJ, Green DVS, Luscombe CN, Hill AP. Getting physical in drug discovery II: The impact of chromatographic hydrophobicity measurements and aromaticity. Drug Discov Today 2011; 16: 822–830.

Vrijednosti Chrom log $D_{7.4}$ su za približno dvije log jedinice veće od tradicionalno korištenog koeficijenta raspodjele log D. Kako bi se naglasilo različito podrijetlo podataka, ovo odstupanje se u praksi zadržalo (5).

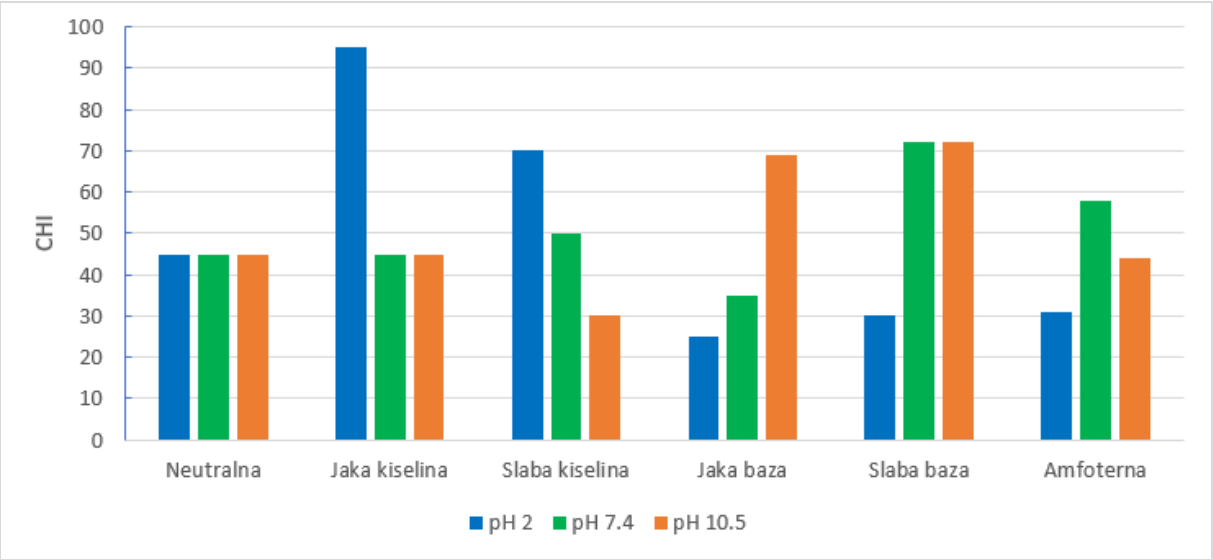
1.5. Određivanje kiselo-baznih svojstava uz pomoć obrnuto-fazne tekućinske kromatografije

Određivanje kiselo-baznih svojstava spoja omogućuje njegovu karakterizaciju i predviđanje *in vivo* ponašanja u ranoj fazi istraživanja lijeka. Koeficijenti raspodjele dobiveni iz sustava raspodjele oktanol-voda nisu prikladni za procjenu *in vivo* distribucije spojeva, posebno kada su spojevi nabijeni pri fiziološkom pH. Naime, spojevi koji se razvijaju kao lijekovi mogu imati jedan ili više centara ionizacije. Njihovo ionizacijsko stanje ovisi o pH otapala. Henderson-Hasselbalch-ova jednadžba opisuje vezu između pH, konstante ionizacije (pK_a) i postotka ionizacije spoja, za kiseline i baze:

$$\log D_{pH} = \log P - \log\left[1+10^{(pH-pK_a)}\right] \qquad (5)$$

$$\log D_{pH} = \log P - \log\left[1+10^{(pK_a-pH)}\right] \qquad (6)$$

Obrnuto-fazna tekućinska kromatografija ističe se kao prikladna metoda za predviđanje *in vivo* distribucije spoja u tijelu. Posljednja saznanja pokazala su da se RP-HPLC može koristiti i za karakterizaciju peptida i malih proteina, a za koje su tradicionalne metode pokazale neuspjeh (18). S ciljem određivanja kiselo-baznih svojstava spojeva, provodi se određivanje CHI vrijednosti pri kiselim (pH 2-3), fiziološkim (pH 7.4) i bazičnim (pH 9-11) uvjetima pokretne faze, za svaki spoj (3,17). Mjerenja se provode pri tri različite vrijednosti pH kako bi se moglo procijeniti ponašanje molekula u različitim dijelovima ljudskog organizma. Temeljem ova tri mjerenja, molekule se mogu klasificirati u šest različitih razreda prikazanih na slici 9.



Slika 9. Utjecaj pH vrijednosti pokretne faze na CHI vrijednost molekula različitih kiselo-baznih svojstava.

Preuzeto i adaptirano iz Borchardt RT. Pharmaceutical profiling in drug discovery for lead selection. AAPS Press, 2004.

Pozitivno nabijene bazične molekule su lipofilnije pri visokim pH vrijednostima jer tada gube naboj. Kiseline su lipofilnije pri niskim pH vrijednostima jer tada ne dolazi do protona sa kisele grupe (17). Neutralne molekule imaju istu CHI vrijednost neovisno o pH vrijednosti pokretne faze. Za jake kiseline CHI vrijednost je pri pH 2 značajno viša jer se nalaze u neioniziranom obliku te time imaju najjaču interakciju sa nepokretnom fazom. Tako će jaka kiselina pri niskom pH pokazati svojstva visoke lipofilnosti. Pri pH 7.4 su potpuno ionizirane te pokazuju istu CHI vrijednost pri pH 7.4 i 10.5. Slabe kiseline pokazuju pad CHI vrijednosti porastom pH pokretne faze. Što je kiselina slabija, to je manja razlika CHI vrijednosti između pH 2 i 7.4. S druge strane, CHI vrijednost jake baze raste s porastom pH vrijednosti. Slabe baze imaju najnižu CHI vrijednost pri kiselom pH, dok im je CHI vrijednost pri pH 7.4 i 10.5 jednaka, jer se pri tim uvjetima nalaze u neioniziranom obliku. Amfoterne molekule imaju najveću CHI vrijednost pri pH 7.4, dok pri visokim i niskim pH vrijednostima dolazi do njezinog pada (19).

2. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada je bio razviti i optimirati metodu tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti u sustavu obrnutih faza (RP-UPLC) u sprezi sa spektrometrijom masa za određivanje CHI pri pH 2.7 i pH 10.5, na bazi već postojeće metode pri pH 7.4 te usporediti dobivene vrijednosti sa *in silico* računskim vrijednostima. Drugi cilj je bio odrediti kiselo/bazna svojstva spojeva mjerenjem vremena zadržavanja analita na obrnutoj fazi pri gradijentnom eluiranju i pri različitim vrijednostima pH.

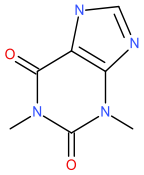
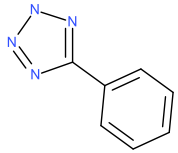
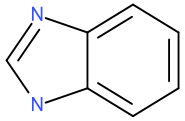
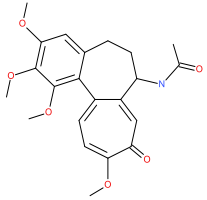
3. Materijali i metode

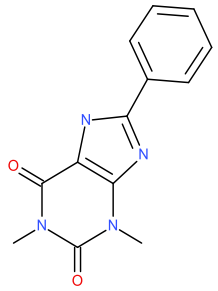
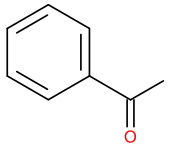
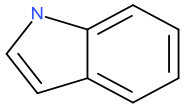
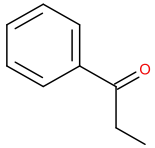
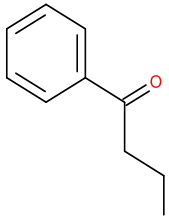
3.1. Materijali

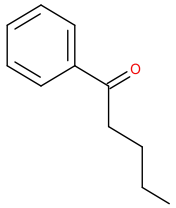
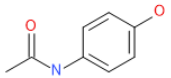
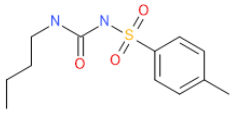
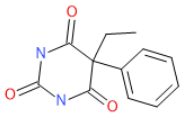
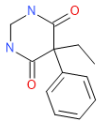
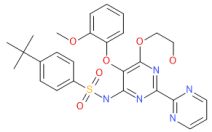
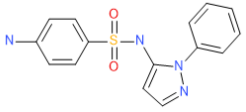
3.1.1. Kemikalije

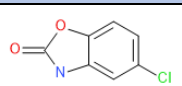
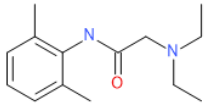
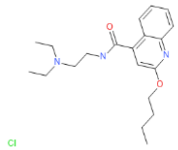
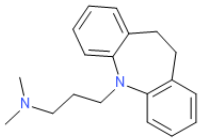
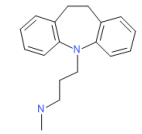
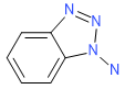
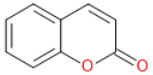
U radu je korišten acetonitril, kupljen od Merck-a (Darmstadt, Njemačka), mravlja kiselina, kupljena od Fluke (Everett, SAD), te amonijev acetat i dimetil sulfoksid, kupljeni od Sigme Aldrich (Darmstadt, Njemačka). Korištena je i octena kiselina, kupljena od Fluke, i otopina amonijaka (min. 25% p.a.) kupljena od Kemike (Zagreb, Hrvatska). Za pripremu pokretne faze korištena je demineralizirana voda pročišćena *Mili-Q Advantage Milipore* sistemom. Standardi koji su korišteni za umjeravanje UPLC sustava, kao i spojevi kojima su određene CHI vrijednosti pri pH 2.7, 7.4 i 10.5 navedeni su u Tablici 2, zajedno s njihovim dobavljačima.

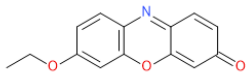
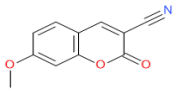
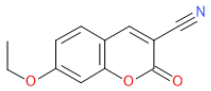
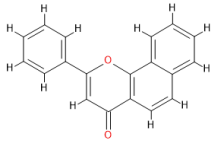
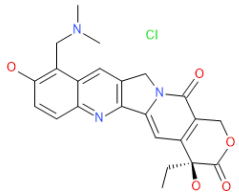
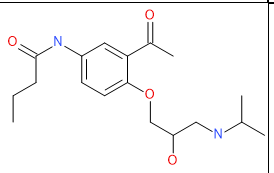
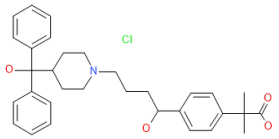
Tablica 2. Niz spojeva za umjeravanje UPLC sustava, te spojevi korišteni za određivanja CHI pri pH 2.7, 7.4 i 10.5, njihove strukture, molekulske mase, molekulske formule, dobavljači, indikacija ili upotreba lijeka i in silico pK_a vrijednosti.

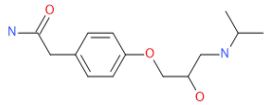
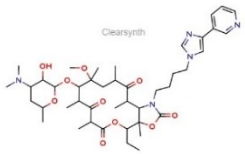
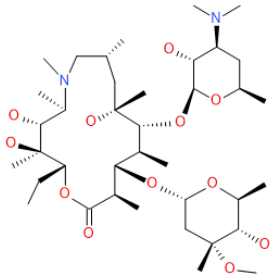
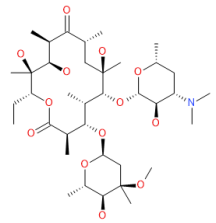
Spoj	Struktura	Molekulska masa (g/mol)	Molekulska formula	Dobavljač	Indikacija lijeka ili upotreba spoja	*In silico* pK_a
Standardi za umjeravanje						
Teofilin		180.16	$C_7H_8N_4O_2$	FLUKA	/	/
5-Fenil-1H-tetrazol		146.15	$C_7H_6N_4$	TCI	/	/
Benzimidazol		118.14	$C_7H_6N_2$	FLUKA	/	/
Kolhicin		399.44	$C_{22}H_{25}NO_6$	SIGMA	/	/

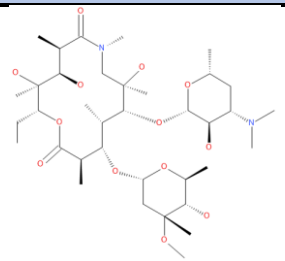
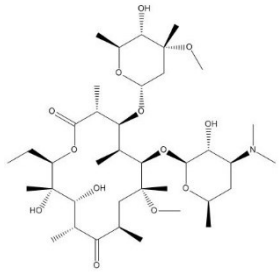
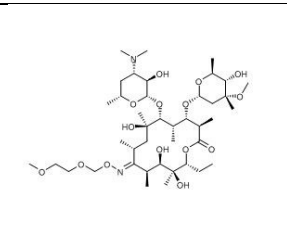
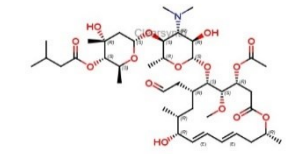
Spoj	Struktura	Molekulska masa (g/mol)	Molekulska formula	Dobavljač	Indikacija lijeka ili upotreba spoja	*In silico* pK_a
8-Fenilteofilin		256.26	$C_{13}H_{12}N_4O_2$	SIGMA	/	/
Acetofenon		120.15	C_8H_8O	ALDRICH	/	/
Indol		117.15	C_8H_7N	SAFC	/	/
Propiofenon		134.18	$C_9H_{10}O$	TCI	/	/
Butirofenon		148.20	$C_{10}H_{12}O$	TCI	/	/

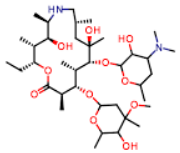
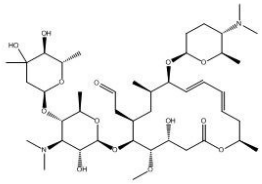
Spoj	Struktura	Molekulska masa (g/mol)	Molekulska formula	Dobavljač	Indikacija lijeka ili upotreba spoja	*In silico* pK_a
Valerofenon		162.23	$C_{11}H_{14}O$	TCI	/	/
Kiseli spojevi						
Acetaminofen		151.16	$C_8H_9NO_2$	SIGMA	Analgetik i antipiretik	9.86
Tolbutamid		270.35	$C_{12}H_{18}N_2O_3S$	SIGMA	Hipoglikemija	5.37
Fenobarbital		232.23	$C_{12}H_{12}N_2O_3$	PLIVA	Sedativ	7.58
Primidon		218.25	$C_{12}H_{14}N_2O_2$	SIGMA	Antiepileptik	12.26
Bosentan		551.60	$C_{27}H_{29}N_5O_6S$	APL	Hipertenzija plućne arterije	4.01
Sulfafenazol		314.40	$C_{15}H_{14}N_4O_2S$	SIGMA	Antibiotik	6.47

Spoj	Struktura	Molekulska masa (g/mol)	Molekulska formula	Dobavljač	Indikacija lijeka ili upotreba spoja	*In silico* pK_a
Klorozoksazon		169.56	$C_7H_4ClNO_2$	SIGMA	Mišićni relaksant	8.46
Bazični spojevi						
Lidokain		234.34	$C_{14}H_{22}N_2O$	SIGMA	Anestetik i antiaritmik	7.96
Dibukain HCl		379.90	$C_{20}H_{30}ClN_3O_2$	SIGMA	Lokalni anestetik	9.07
Imipramin		280.40	$C_{19}H_{24}N_2$	SIGMA	Antidepresiv	9.49
Desipramin		266.40	$C_{18}H_{22}N_2$	SIGMA	Antidepresiv	10.40
1-Aminobenzotriazol		134.14	$C_6H_6N_4$	SIGMA	Inhibitor CYP450 koji se koristi isključivo u istraživanju	2.09
Neutralni spojevi						
Kumarin		146.14	$C_9H_6O_2$	SIGMA	Aromatski organski kemijski spoj	/

Spoj	Struktura	Molekulska masa (g/mol)	Molekulska formula	Dobavljač	Indikacija lijeka ili upotreba spoja	*In silico* pK_a
Resorufin etileter		241.24	$C_{14}H_{11}NO_3$	SIGMA	Marker za CYP450	/
3-Cijano-7-metoksikumarin		201.18	$C_{11}H_7NO_3$	ULTRAFINE	Flurescentna proba za CYP450	/
3-Cijano-7-etoksikumarin		215.20	$C_{12}H_9NO_3$	ULTRAFINE	Flurescentna proba za CYP450	/
α-Naftoflavon		272.30	$C_{19}H_{12}O_2$	SIGMA	Sintetski derivat flavona	/
Amfoterni spojevi						
Topotekan HCl		457.90	$C_{23}H_{24}ClN_3O_5$	SIGMA	Citostatik	8.82 (kiselina); 7.65/4.64 (baza)
Acebutolol		372.90	$C_{18}H_{29}ClN_2O_4$	SIGMA	Antihipertenziv	13.78 (kiselina); 9.40(baza)
Feksofenadin HCl		538.10	$C_{32}H_{40}ClNO_4$	TCI EUROPE NV	Antihistaminik	4.43 (kiselina); 9.42(baza)

Spoj	Struktura	Molekulska masa (g/mol)	Molekulska formula	Dobavljač	Indikacija lijeka ili upotreba spoja	*In silico* pK_a
Atenolol		266.34	$C_{14}H_{22}N_2O_3$	SIGMA	Antihipertenziv	13.88 (kiselina); 9.43(baza)
Makrolidni spojevi						
Telitromicin		812.0	$C_{43}H_{65}N_5O_{10}$	TORONTO RESEARCH CHEMICALS	Antibiotik	8.13/4.00
Azitromicin dihidrat		749.0	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	PLIVA	Antibiotik	8.59/8.16
Eritromicin		733.9	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	PLIVA	Antibiotik	8.16

Spoj	Struktura	Molekulska masa (g/mol)	Molekulska formula	Dobavljač	Indikacija lijeka ili upotreba spoja	*In silico* pK_a
Azahomoeritromicin		735.0	$C_{36}H_{66}N_2O_{13}$	PLIVA	Makrolidni kemijski spoj	8.15
Klaritromicin		748.0	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	PLIVA	Antibiotik	8.16
Roksitromicin		837.1	$C_{41}H_{76}N_2O_{15}$	SIGMA	Antibiotik	8.16
Josamicin		828. 0	$C_{42}H_{69}NO_{15}$	FLUKA	Antibiotik	7.40

Spoj	Struktura	Molekulska masa (g/mol)	Molekulska formula	Dobavljač	Indikacija lijeka ili upotreba spoja	*In silico* pK_a
N'-Desmetil Azitromicin		735.0	$C_{37}H_{70}N_2O_{12}$	PLIVA	/	9.81/8.16
Spiramicin		843.1	$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	Antibiotik	8.61/7.40

3.1.2. Oprema

Za potrebe podešavanja pH korišten je Orion 370 LogR Benchtop pH/ISE metar (Thermo Scientific) opremljen sa Orion 91-72 Sure-Flow pH elektrodom (Thermo Scientific). Sustav LC-MS se sastojao od tekućinskog kromatografa ultravisoke djelotvornosti (UPLC) tipa Waters Acquity spregnutim sa DAD detektorom s elektrosprej načinom ionizacije (engl. electrospray ionization) (Waters). Za upravljanje UPLC-MS sustavom, te za obradu podataka korišten je MasLynx v4.1 softver (Waters).

3.2. Analitička metoda

Za određivanje vremena zadržavanja spojeva korištena je tehnika tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti u sustavu obrnutih faza u sprezi sa spektrometrijom masa (RP-UPLC-MS). Metoda Chrom log D koja se odvijala na obrnuto-faznoj tekućinskoj kromatografiji služila je za mjerenje CHI pri pH 7.4 te je ispitana mogućnost primjene metode pri kiselim (pH 2.7) i bazičnim uvjetima pokretne faze (pH 10.5).

3.2.1. UPLC-MS uvjeti

Kromatografsko razdvajanje postignuto je korištenjem kolone reverzne faze tipa Luna C18(2), duljine 30 mm, unutarnjeg promjera 2 mm, veličine čestica 3 μm, te veličine pora 100 Å (Phenomenex), a filter je bio od proizvođača Fortis Technologies (Cat. No. 2-SAV5). Prva mjerenja Chrom log $D_{7.4}$ i $CHI_{2.7}$ provedena su na koloni koja se već neko vrijeme koristila (zajedno sa filterom), a ponavljana su na novoj Luna C18(2) koloni s pretkolonom SecurityGuard ULTRA guard cartridge, C18 (Phenomenex). Također, ponovljena analiza pri fiziološkom pH provedena je na novoj koloni bez upotrebe pretkolone. Za oba mjerenja $CHI_{10.5}$ korištena je nova kolona zajedno s pretkolonom.

Temperatura kolone održavana je na 40°C, a temperatura uzorka na 15°C. Pokretna faza sastojala se od 10 mM otopine amonijevog acetata (otopina A1) za uvjete pri pH 7.4 i 10.5. Pri uvjetima pokretne faze pH 2.7 korištena je 0.1% vodena otopina mravlje kiseline (otopina A1). Kao organski

modifikator korišten je acetonitril (otopina B2). Gradijentni program za određivanje CHI uključivao je sljedeće: koncentracija pokretne faze B2 povećana je s 0% do 90% tijekom prvih 1.30 minuta, a zatim je 90% B2 držano do 1.53 minute, nakon čega je koncentracija B2 pokretne faze spuštena do 0% do 1.60 minute te držana na 0% do 2 minute. Ukupno vrijeme analize bilo je 2 minute, a protok pokretne faze 0.5 mL min^{-1}. Volumen injektiranja uzorka bio je 1 µL, a svaki uzorak injektiran je 2 puta uzastopno. Uvjeti za DAD detektor bili su sljedeći: raspon valne duljine bio je od 190 do 500 nm, a raspon intervala 1.2 nm. U MS metodi koristio se elektrosprej način ionizacije. Raspon masa bio je od 100 do 1200, a vrijeme skeniranja 0.2 sekunde.

3.2.2. Priprema otopina korištenih kao pokretne faze

Za pripremu 200 mM štok otopine amonijevog acetata otopljeno je 6.17 g amonijevog acetata u 400 mL vode, te je skladištena na 4°C. Radna otopina (10mM) pripremljena je razrijeđivanjem 20 mL štok otopine (200 mM) u 380 mL demineralizirane vode. pH je podešen na 7.4, odnosno na 10.5 otopinom amonijaka. Za pripremu 0,1%-tne vodene otopine mravlje kiseline 500 µL mravlje kiseline razrijeđeno je u 500 mL vode.

3.2.3. Priprema uzoraka za UPLC analizu

Za svaki uzorak pripremljena je 10 mM DMSO štok otopina. Zatim je pripremljena 0.5 mM radna otopina razrijeđivanjem štok otopine u acetonitrilu (7 µL 10 mM štok otopine razrijeđeno je sa 133 µL acetonitrila, sa konačnim volumenom od 140 µL). Radna otopina od 140 µL nanesena je u jažice plate.

3.2.4. Priprema smjese standarda za umjeravanje UPLC sustava

Za umjeravanje UPLC sustava korištena je skupina od 10 standardnih spojeva sa različitim CHI_{lit} vrijednostima (prikazano u Tablici 3). Štok otopina svakog standarda pripremljena je pri koncentraciji od 1 mg/mL u acetonitrilu, osim STD_5 koji je pripremljen u DMSO zbog slabe topljivosti u acetonitrilu. Za umjeravanje sustava pri pH 2.7 i 10.5 svakom standardu

je u zasebnoj analizi određeno vrijeme zadržavanja, a pri svakoj sljedećoj analizi koristila se mješavina spojeva za baždarenje. Ista je pripremljena miješanjem 0.1 mL štok otopine svakog standarda. Umjeravanje se provodilo na samom početku i kraju svake analize.

Tablica 3. Standardi korišteni za umjeravanje UPLC sustava, njihovi CAS brojevi, molekulske mase i CHI_{lit}[20].

Ime	Spoj	CHI pH 2.7 lit.	CHI pH 7.4 lit.	CHI pH 10.5 lit.
STD_1	Teofilin	17.9	18.4	5.0
STD_2	5-Fenil-1H-tetrazol	42.2	23.6	16.0
STD_3	Benzimidazol	*NO	34.3	30.6
STD_4	Kolhicin	43.9	42.0	43.9
STD_5	8-Fenilteofilin	51.7	51.2	21.5
STD_6	Acetofenon	64.1	65.1	64.1
STD_7	Indol	72.1	71.5	72.1
STD_8	Propiofenon	77.4	77.4	77.4
STD_9	Butirofenon	87.3	87.5	87.3
STD_10	Valerofenon	96.4	96.2	96.4

*NO = nije određeno

3.3. Obrada podataka

Sustav UPLC umjeravan je uz pomoć niza spojeva za baždarenje s poznatim CHI_{lit} vrijednostima. Koristeći dobivena gradijentna vremena zadržavanja i CHI_{lit} vrijednosti, metodom regresijske analize dobiven je baždarni pravac:

$$CHI = a \times t_r\,(min) + b \quad (7)$$

Za spojeve koji su UV aktivni određeno je vrijeme zadržavanja glavnog kromatografskog pika iz DAD kromatograma pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije (λ_{max}). Za spojeve koji nisu UV/VIS aktivni, vrijeme zadržavanja očitano je iz masenog kromatograma s korekcijom od 0.03 minute. Vrijednosti vremena zadržavanja unesene su u jednadžbu baždarnog pravca čime je dobivena CHI vrijednost. Dobivene $CHI_{7.4}$ vrijednosti preračunate su Chrom log D vrijednosti koristeći jednadžbu 4.

3.3.1. Određivanje in silico parametara

In silico analize, odnosno izračuni *in silico* log D pri pH 7.4, te pK_a vrijednosti provedene su korištenjem softvera ACD/Percepta 14.2.0 (ACD/Labs Release 2019.1.0 (build3200. 17 Jul 2019).

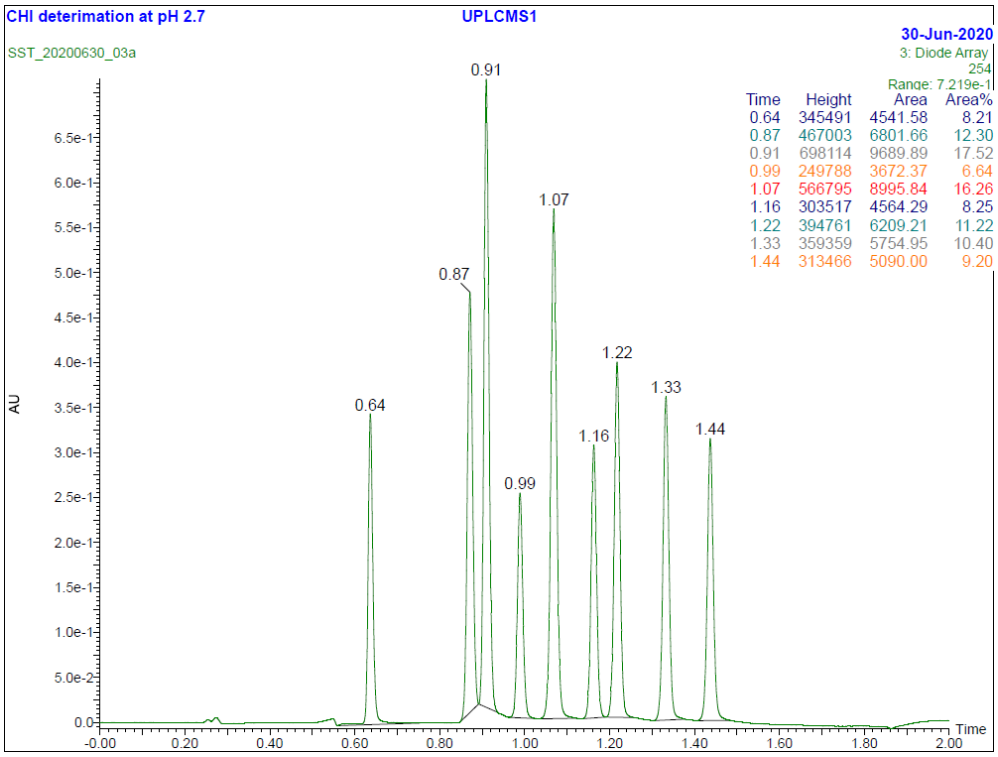
4. Rezultati

4.1. UPLC-MS metoda

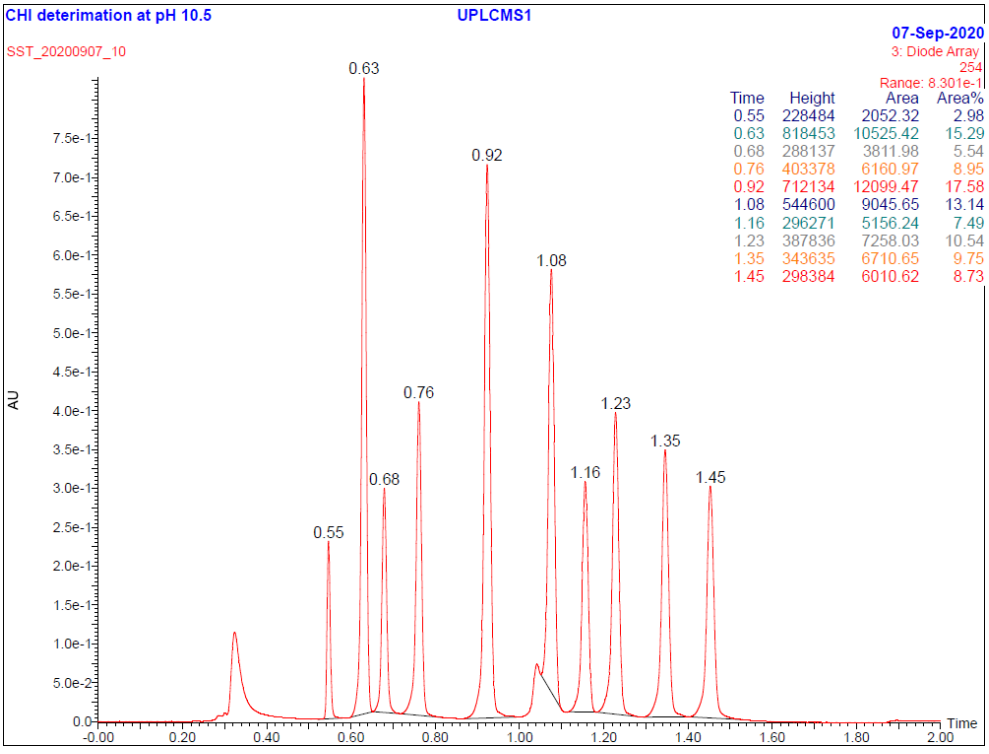
Kao tehnika koja je služila za određivanje vremena zadržavanja odabrana je obrnuto fazna kromatografija zbog mogućnosti kontroliranja eksperimentalnih uvjeta (protok mobilne faze, vrsta organskog modifikatora, sastav otapala i temperatura), u sprezi sa masenom spektrometrijom. U radu su određene CHI i Chrom log D vijednosti ispitivanih spojeva upotrebom metode opisane u poglavlju 3.2.1. pri fiziološkoj pH vrijednosti od 7.4. Nadalje, razvijene su UPLC metode za određivanje CHI vrijednosti ispitivanih spojeva na koloni Phenomenex Luna C18(2) (30 x 2 mm, 3 mm, 100 Å) pri kiselim (pH 2.7) i bazičnim (pH 10.5) uvjetima pokretne faze. Vrijeme trajanja razvijenih metoda je dvije minute s protokom pokretne faze od 0.5 mL min^{-1}. Pri kiselim uvjetima pokretne faze korištena je 0.1% vodena otopina mravlje kiseline, a pri fiziološkim, odnosno bazičnim uvjetima 10mM otopina amonijevog acetata pri odgovarajućoj pH vrijednosti. Kao organski modifikator korišten je acetonitril. UPLC sustav umjeravan je pomoću 10 standardnih spojeva s literaturnim CHI vrijednostima (Tablica 3). Detalji o gradijentnom programu, pripremi standarda za umjeravanje i MS metodi navedeni su u poglavlju 3.2.

4.2. Umjeravanje UPLC sustava pri pH 2.7 i 10.5

Umjeravanje UPLC sustava uspješno je provedeno pomoću 10 standardnih spojeva. Slike 10 i 11 prikazuju kromatograme za umjeravanje UPLC sustava pri kiselim i bazičnim uvjetima pokretne faze.



Slika 10. Kromatogram za umjeravanje UPLC sustava pri kiselim uvjetima pokretne faze (pH 2.7).



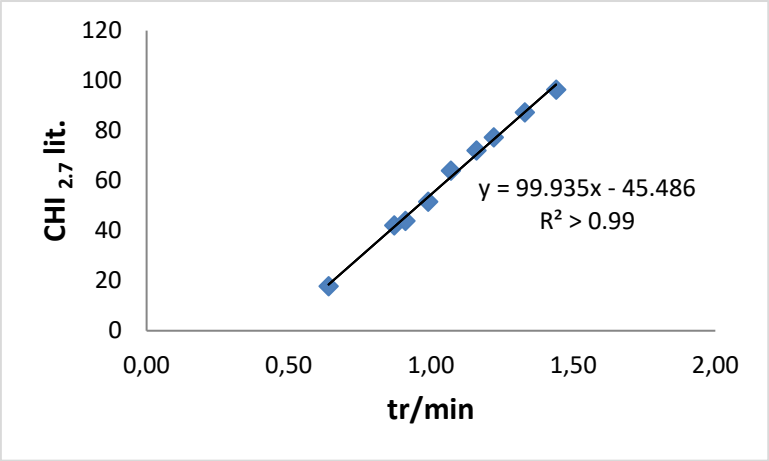
Slika 11. Kromatogram za umjeravanje UPLC sustava pri bazičnim uvjetima pokretne faze (pH 10.5).

Eksperimentalno dobivena vremena zadržavanja za standarde i literaturne vrijednosti kromatografskog indeksa hidrofobnosti (20) prikazani su u tablici 4, a na slikama 12-14 prikazani su baždarni pravci s pripadajućim jednadžbama. Koeficijenti determinacije (R^2) ukazuju visoku korelaciju između literaturnih CHI vrijednosti i eksperimentalno određenih vremena zadržavanja za sva tri slučaja umjeravanja UPLC sustava ($R^2_{2.7} > 0.99$, $R^2_{7.4} > 0.99$, $R^2_{10.5} > 0.99$). Za umjeravanje pri pH 2.7, standard benzimidazol (STD_3) isključen je iz analize zbog njegove eluacije s frontom, zbog čega je njegova upotreba suvišna.

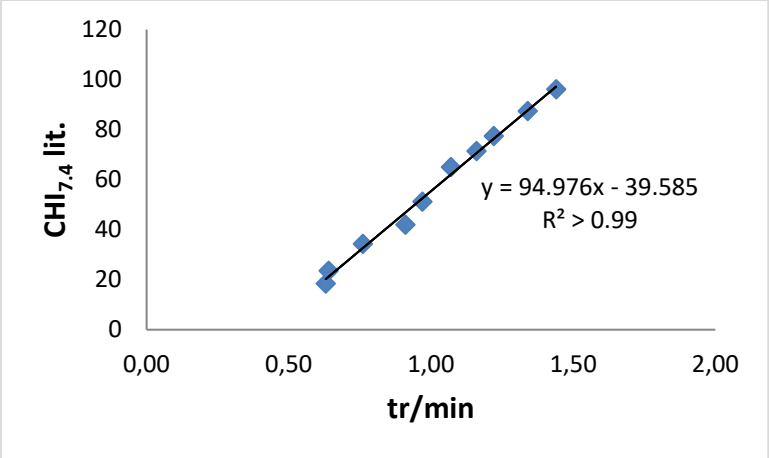
Tablica 4. Standardi korišteni u umjeravanju UPLC sustava sa pripadajućim eksperimentalno određenim vremenima zadržavanja i literaturnim vrijednostima CHI.

Broj	Spoj	t_r/min	$CHI_{2.7}$ lit.	t_r/min	$CHI_{7.4}$ lit.	t_r/min	$CHI_{10.5}$ lit.
STD_1	Teofilin	0.64	17.9	0.63	18.4	0.55	5.0
STD_2	5-Fenil-1H-tetrazol	0.87	42.2	0.64	23.6	0.63	16.0
STD_3	Benzimidazol	*NO	*NO	0.76	34.3	0.76	30.6
STD_4	Kolhicin	0.91	43.9	0.91	42.0	0.92	43.9
STD_5	8-Fenilteofilin	0.99	51.7	0.97	51.2	0.68	21.5
STD_6	Acetofenon	1.07	64.1	1.07	65.1	1.08	64.1
STD_7	Indol	1.16	72.1	1.16	71.5	1.16	72.1
STD_8	Propiofenon	1.22	77.4	1.22	77.4	1.23	77.4
STD_9	Butirofenon	1.33	87.3	1.34	87.5	1.35	87.3
STD_10	Valerofenon	1.44	96.4	1.44	96.2	1.45	96.4

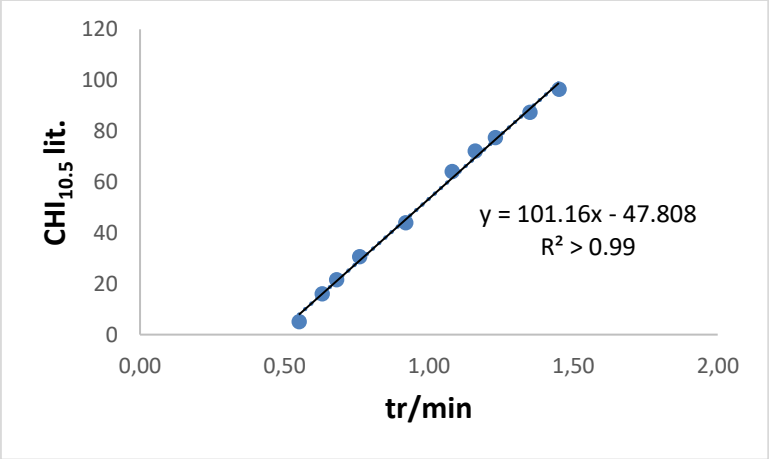
*NO = nije određeno



Slika 12. Baždarni pravac za umjeravanje UPLC pri pH 2.7 s pripadajućom jednadžbom i koeficijentima determinacije R^2.



Slika 13. Baždarni pravac za umjeravanje UPLC pri pH 7.4 s pripadajućom jednadžbom i koeficijentima determinacije R^2.



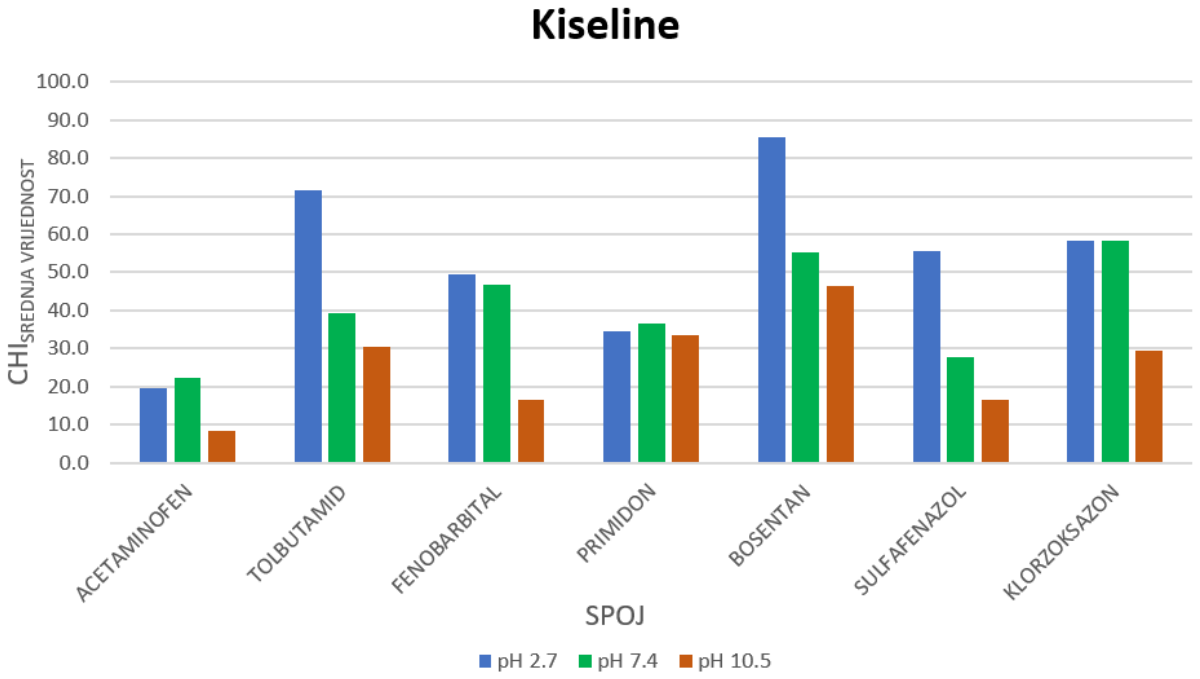
Slika 14. Baždarni pravac za umjeravanje UPLC pri pH 10.5 s pripadajućom jednadžbom i koeficijentima determinacije R^2.

4.3. Eksperimentalne vrijednosti Chrom log $D_{pH\ 7.4}$, $CHI_{2.7}$ i $CHI_{10.5,}$ te profili kiselo-baznih svojstava

Upotrebom tehnike tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute sa spektrometrijom masa određena su vremena zadržavanja za 30 spojeva, koji su na temelju njihovih značajki podijeljeni u pet skupina: kiseli, bazični, neutralni, amfoterni i makrolidni spojevi. Njihova vremena zadržavanja su preračunata u CHI vrijednosti koristeći jednadžbu baždarnog pravca pri pH 2.7, 7.4 i 10.5. Također, pri pH 7.4 izračunate su i Chrom log D vrijednosti uz pomoć jednadžbe (4) (prikazano u tablicama 5 – 9). Nadalje, pomoću CHI vrijednosti pri pH 2.7, 7.4 i 10.5 izrađeni su profili kiselo-baznih svojstava po skupinama spojeva (prikazano na slikama 15-19).

Tablica 5. Srednje vrijednosti kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7, 7.4 i 10.5, te Chrom log $D_{pH\ 7.4}$ za skupinu kiselih spojeva.

Naziv spoja	CHI (srednja vrijednost) pH 2.7	CHI (srednja vrijednost) pH 7.4	Chrom log D pH 7.4	CHI (srednja vrijednost) pH 10.5
Acetaminofen	19.5	22.1	-0.10	8.4
Tolbutamid	71.4	39.2	1.36	30.4
Fenobarbital	49.5	46.8	2.01	16.4
Primidon	34.5	36.4	1.12	33.4
Bosentan	85.4	55.4	2.75	46.4
Sulfafenazol	55.4	27.8	0.39	16.4
Klorozoksazon	58.4	58.2	2.99	29.4

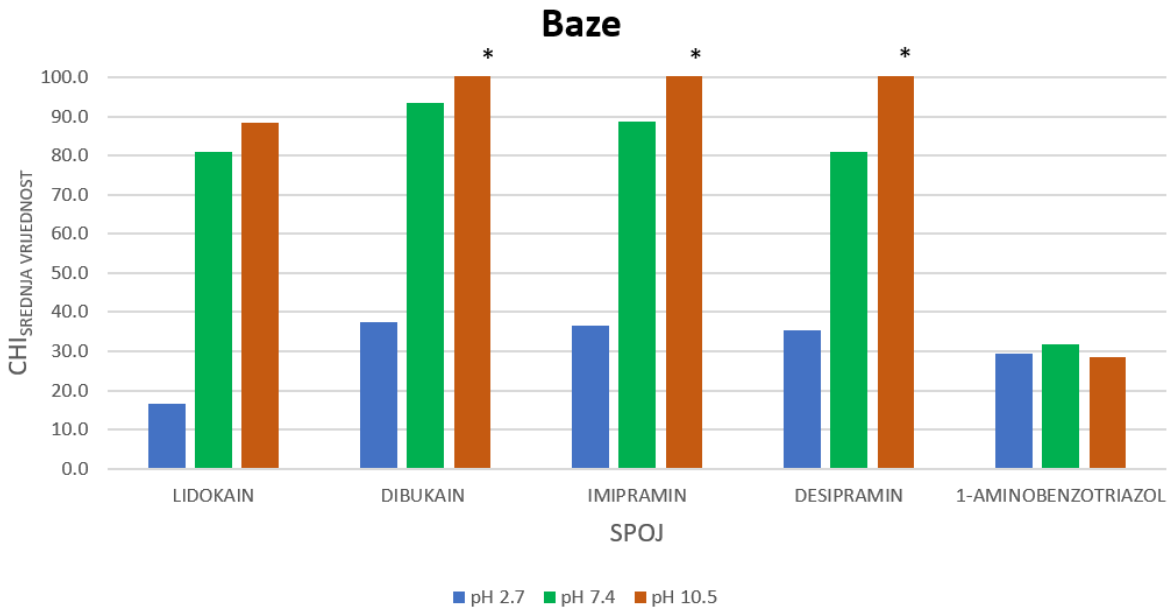


Slika 15. Usporedba $CHI_{2.7}$, $CHI_{7.4}$ i $CHI_{10.5}$ za kiseline.

Spojevi kiselog karaktera imaju najveću vrijednost CHI pri kiselom pH, dok se s povećanjem pH CHI vrijednost smanjuje. Očekivani CHI profil pokazali su svi testirani kiseli spojevi, uz iznimku primidona.

Tablica 6. Srednje vrijednosti kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7, 7.4 i 10.5, te Chrom log $D_{pH\ 7.4}$ za skupinu bazičnih spojeva.

Naziv spoja	CHI (srednja vrijednost) pH 2.7	CHI (srednja vrijednost) pH 7.4	Chrom log D pH 7.4	CHI (srednja vrijednost) pH 10.5
Lidokain	<17.9	81.0	4.94	88.3
Dibukain	37.5	93.4	6.00	>100
Imipramin	36.5	88.6	5.60	>100
Desipramin	35.5	81.0	4.94	>100
1-Aminobenzotriazol	29.5	31.6	0.71	28.4

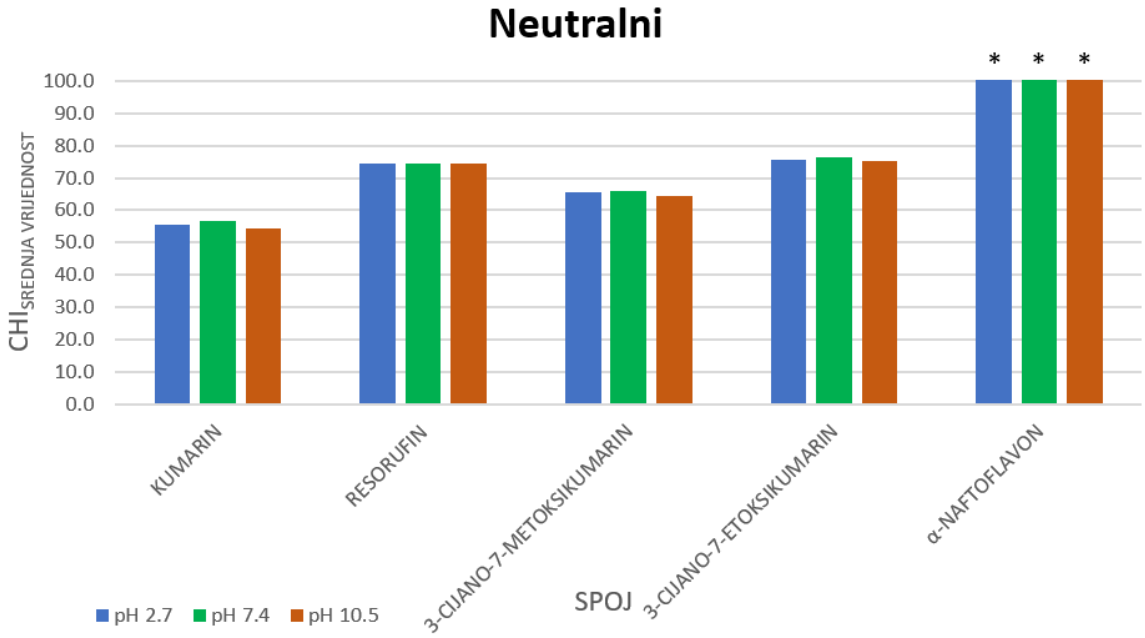


Slika 16. Usporedba $CHI_{2.7}$, $CHI_{7.4}$ i $CHI_{10.5}$ za baze (*CHI>100).

Suprotno, kod bazičnih spojeva je potvrđeno da imaju najveću CHI vrijednost pri bazičnom pH, dok se smanjenjem pH smanjuje i njihova CHI vrijednost. Jedini spoj koji nije pokazao očekivan CHI profil je 1-aminobenzotriazol.

Tablica 7. Srednje vrijednosti kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7, 7.4 i 10.5, te Chrom log $D_{pH\ 7.4}$ za skupinu neutralnih spojeva.

Naziv spoja	CHI (srednja vrijednost) pH 2.7	CHI (srednja vrijednost) pH 7.4	Chrom log D pH 7.4	CHI (srednja vrijednost) pH 10.5
Kumarin	55.4	56.8	2.87	54.4
Resorufin	74.4	74.4	4.37	74.3
3-Cijano-7-metoksikumarin	65.4	65.8	3.64	64.4
3-Cijano-7-etoksikumarin	75.4	76.3	4.54	75.3
α-Naftoflavon	>100	>100	>6.57	>100

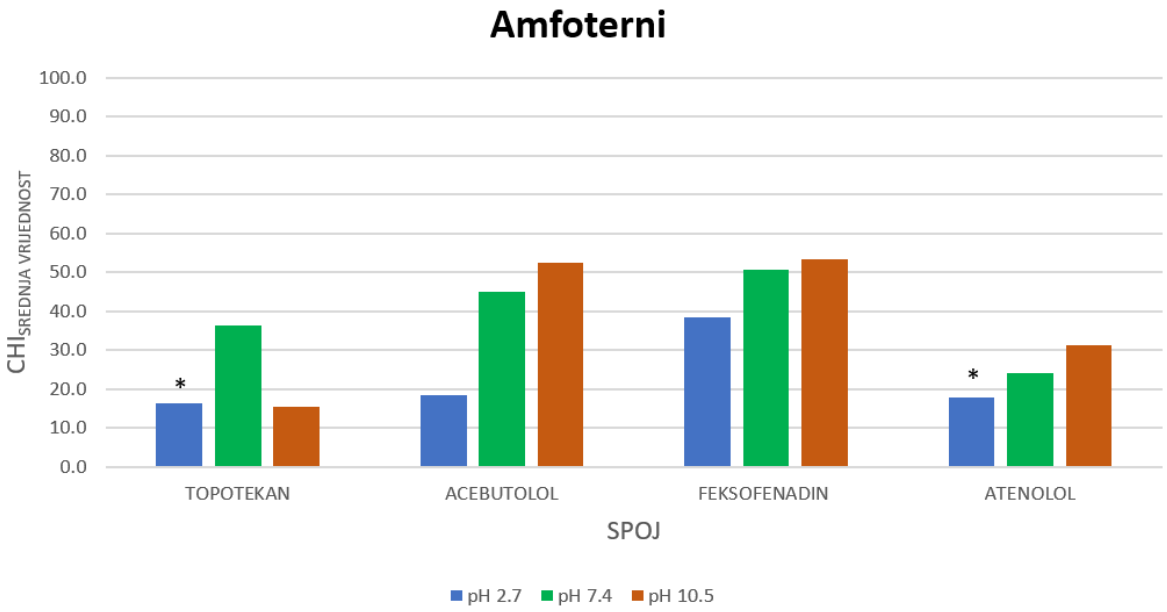


Slika 17. Usporedba $CHI_{2.7}$, $CHI_{7.4}$ i $CHI_{10.5}$ za neutralne spojeve (*CHI>100).

Za neutralne spojeve vrijedi da imaju istu CHI vrijednost pri svim pH vrijednostima pokretne faze, što je i dokazano za ispitivani set neutralnih spojeva.

Tablica 8. Srednje vrijednosti kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7, 7.4 i 10.5, te Chrom log $D_{pH\ 7.4}$ za skupinu amfoternih spojeva.

Naziv spoja	CHI (srednja vrijednost) pH 2.7	CHI (srednja vrijednost) pH 7.4	Chrom log D pH 7.4	CHI (srednja vrijednost) pH 10.5
Topotekan	<17.9	36.4	1.12	15.4
Acebutolol	18.5	44.9	1.85	52.4
Feksofenadin	38.5	50.6	2.34	53.4
Atenolol	<17.9	24.0	0.06	31.4

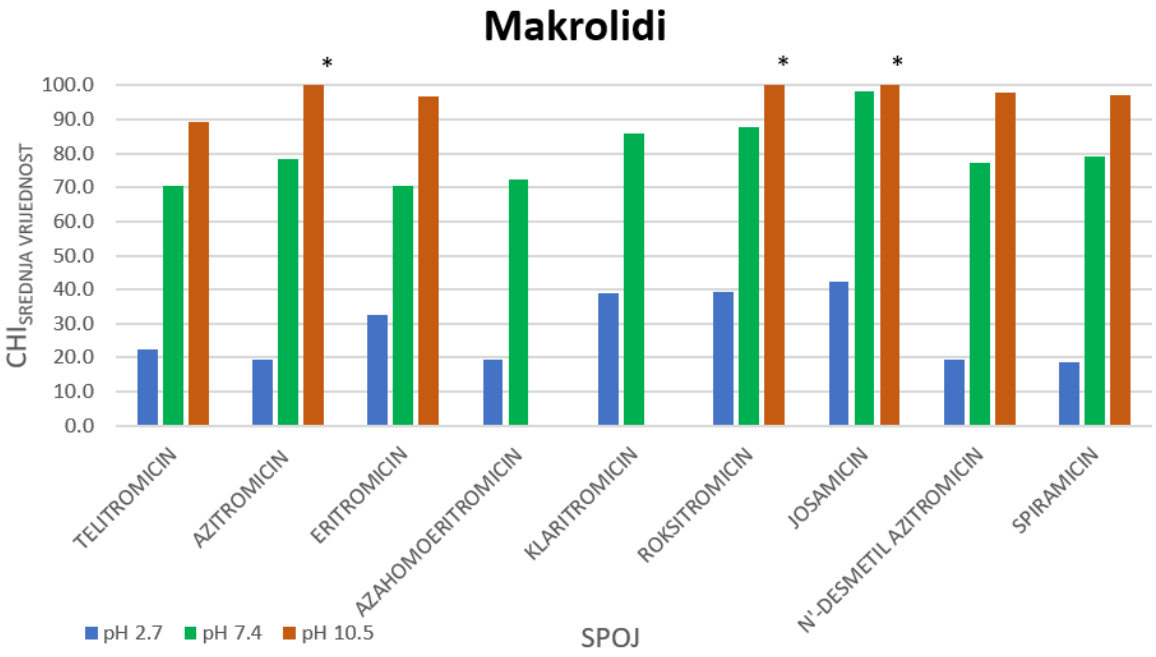


Slika 18. Usporedba $CHI_{2.7}$, $CHI_{7.4}$ i $CHI_{10.5}$ za amfoterne spojeve (*CHI<17.9).

Za amfoterne spojeve vrijedi da imaju najveći CHI pri pH 7.4. U ispitanom setu spojeva samo je topotekan hidroklorid pokazao očekivani CHI profil.

Tablica 9. Srednje vrijednosti kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) pri pH 2.7, 7.4 i 10.5, te Chrom log $D_{pH\ 7.4}$ za skupinu makrolidnih spojeva.

Naziv spoja	CHI (srednja vrijednost) pH 2.7	CHI (srednja vrijednost) pH 7.4	Chrom log D pH 7.4	CHI (srednja vrijednost) pH 10.5
Telitromicin	22.5	70.6	4.05	89.3
Azitromicin	19.5	78.2	4.70	<100
Eritromicin	32.5	70.6	4.05	96.8
Azahomoeritromicin	19.5	72.5	4.21	*NO
Klaritromicin	39.0	85.8	5.35	*NO
Roksitromicin	39.5	87.7	5.51	<100
Josamicin	42.5	98.1	6.41	<100
N'-Desmetil Azitromicin	19.5	77.2	4.62	97.8
Spiramicin	18.5	79.1	4.78	97.3



Slika 19. Usporedba $CHI_{2.7}$, $CHI_{7.4}$ i $CHI_{10.5}$ za makrolide (*CHI>100).

Makrolidni spojevi, koji su slabe baze, pokazali su karakterističan profil svojstven bazama. Za azahomoeritromicin i klaritromicin nije bilo moguće odrediti potpuni profil, zbog nemogućnosti određivanja $CHI_{10.5}$.

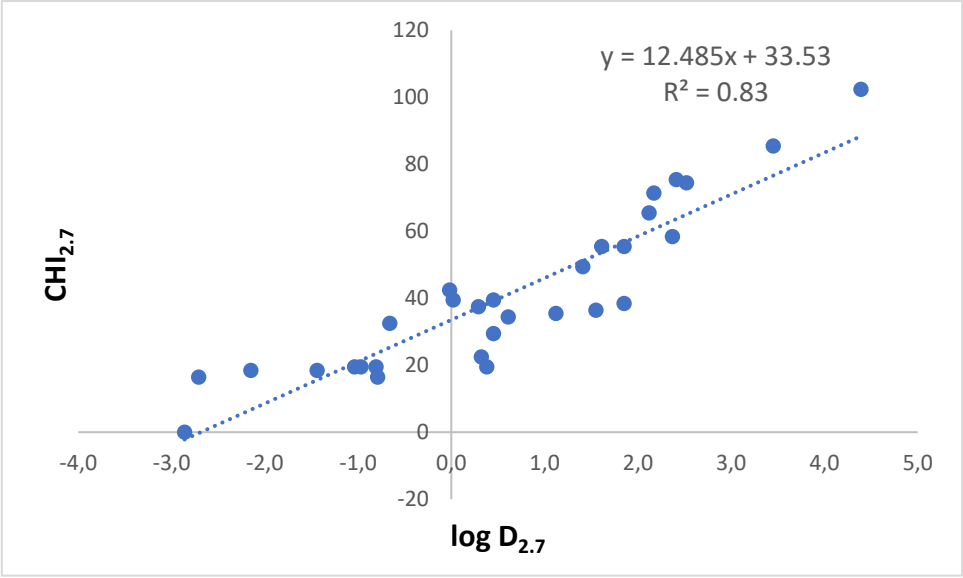
4.4. Usporedba eksperimentalno određenih $CHI_{2.7}$, Chrom log $D_{7.4}$ i $CHI_{10.5}$ vrijednosti s in silico analizama

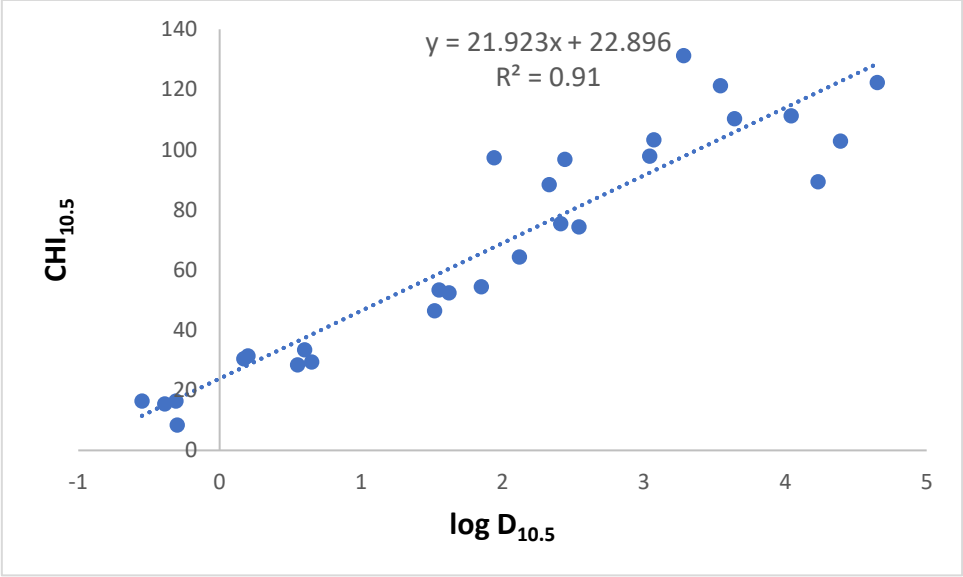
U tablici 10 navedene su *in silico* log $D_{2.7}$ i log $D_{10.5}$ vrijednosti i eksperimentalno određene $CHI_{2.7}$ i $CHI_{10.5}$, te je na slici 20 prikazana korelacija. S obzirom na to da su CHI i log D vrijednosti linearno ovisne, mogu se međusobno uspoređivati. Koeficijent determinacije pokazao se izrazito visokim za korelaciju $CHI_{10.5}$ i *in silico* log $D_{10.5}$ te iznosi 0.91, dok je za $CHI_{2.7}$ i *in silico* log $D_{2.7}$ dobivena nešto niža korelacija (R^2=0.83).

Tablica 10. Eksperimentalno određene CHI vrijednosti pri pH 2.7 i 10.5 i in silico izračuni log D pri pH 2.7 i 10.5 za ispitivane spojeve.

Naziv spoja	$CHI_{2.7}$	log $D_{2.7}$ *in silico*	$CHI_{10.5}$	log $D_{10.5}$ *in silico*
Acetaminofen	19.5	0.38	8.4	-0.30
Tolbutamid	71.4	2.17	30.4	0.17
Fenobarbital	49.5	1.41	16.4	-0.55
Primidon	34.5	0.61	33.4	0.60
Bosentan	85.4	3.45	46.4	1.52
Sulfafenazol	55.4	1.61	16.4	-0.31
Klorozoksazon	58.4	2.37	29.4	0.65
Lidokain	16.5	-0.79	88.3	2.33
Dibukain	37.5	0.29	<100	3.64
Imipramin	36.5	1.55	<100	4.65
Desipramin	35.5	1.12	<100	4.04
1-Aminobenzotriazol	29.5	0.45	28.4	0.55
Kumarin	55.4	1.85	54.4	1.85
Resorufin	74.4	2.52	74.3	2.54
3-Cijano-7-metoksikumarin	65.4	2.12	64.4	2.12
3-Cijano-7-etoksikumarin	75.4	2.41	75.3	2.41
α-Naftoflavon	<100	4.39	<100	4.39
Topotekan	16.5	-2.71	15.4	-0.39
Acebutolol	18.5	-1.44	52.4	1.62
Feksofenadin	38.5	1.85	53.4	1.55
Atenolol	NA	-2.86	31.4	0.20
Telitromicin	22.5	0.32	89.3	4.23
Azitromicin	19.5	-0.81	<100	3.28
Eritromicin	32.5	-0.66	96.8	2.44
Azahomoeritromicin	19.5	-0.97	*NO	2.13
Klaritromicin	39.5	0.02	*NO	3.12
Roksitromicin	39.5	0.45	<100	3.54
Josamicin	42.5	-0.02	<100	3.07
N'-Desmetil Azitromicin	19.5	-1.04	97.8	3.04
Spiramicin	18.5	-2.15	97.3	1.94

*NO = nije određeno





Slika 20. Korelacija in silico log $D_{2.7}$ i log $D_{10.5}$ vrijednosti, te eksperimentalno određenih $CHI_{2.7}$ i $CHI_{10.5}$.

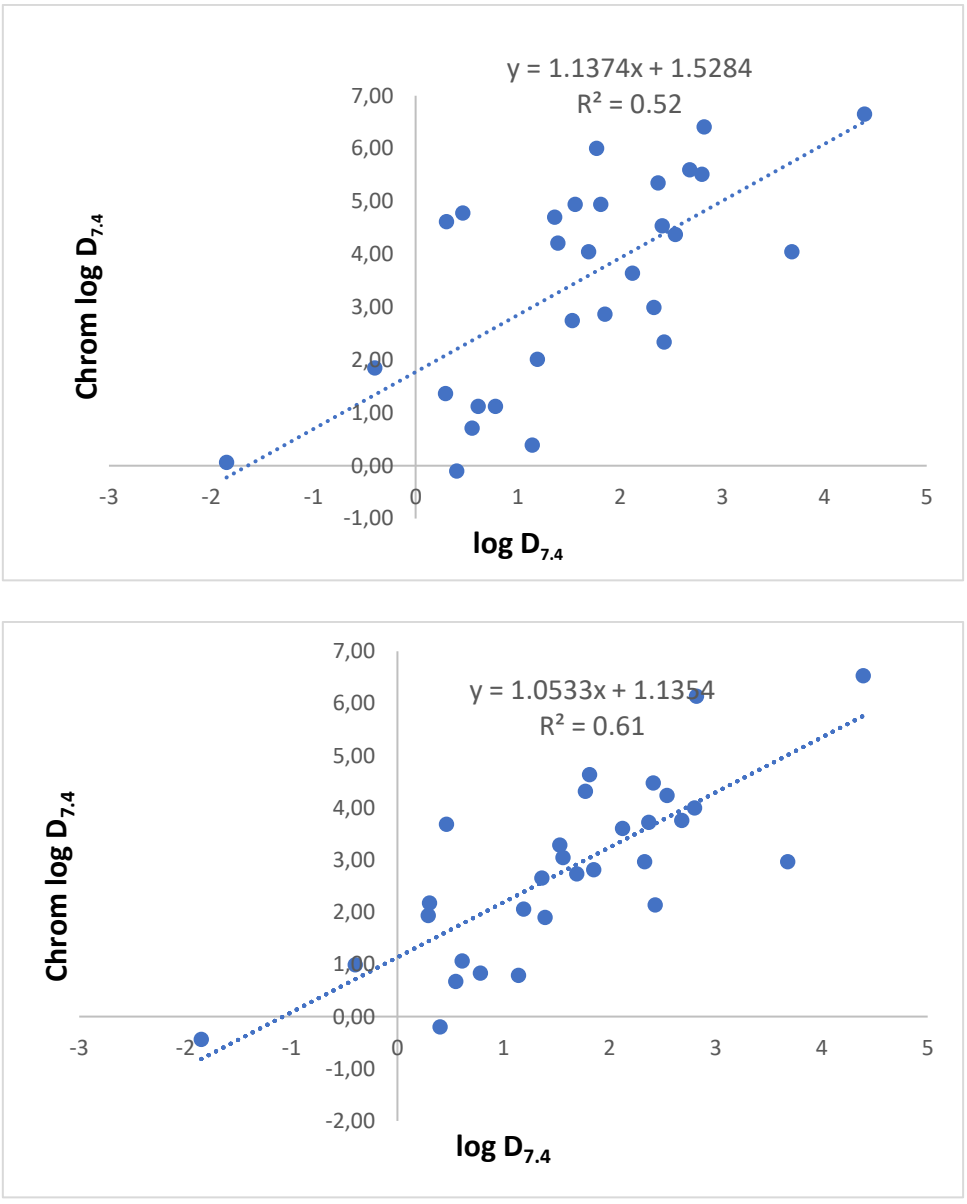
U tablici 11 prikazane su *in silico* log $D_{7.4}$ vrijednosti i eksperimentalno određene $CHI_{7.4}$ vrijednosti prilikom korištenja starije, te nove kromatografske kolone a korelacija je prikazana na slici 21. Koeficijent determinacije za Chrom log $D_{7.4}$ i *in silico* log $D_{7.4}$ je nešto niži u usporedbi s podatcima dobivenim pri pH 2.7 i 10.5, te iznosi 0.52 kad se koristila starija kromatografska kolona. U slučaju korištenja nove kolone, koeficijent determinacije za Chrom log $D_{7.4}$ i *in silico* log $D_{7.4}$ je nešto viši te iznosi 0.61. Ukoliko se isključe podatci za makrolidne spojeve iz analize, tada koeficijenti determinacije iznose 0.61 u slučaju korištenja stare kolone, odnosno 0.74 za korištenje nove kolone (slika 22).

Tablica 11. Eksperimentalno određene CHI i Chrom logD vrijednosti pri pH 7.4 i u slučaju korištenja stare i nove kromatografske kolone i in silico izračuni log D pri pH 7.4.

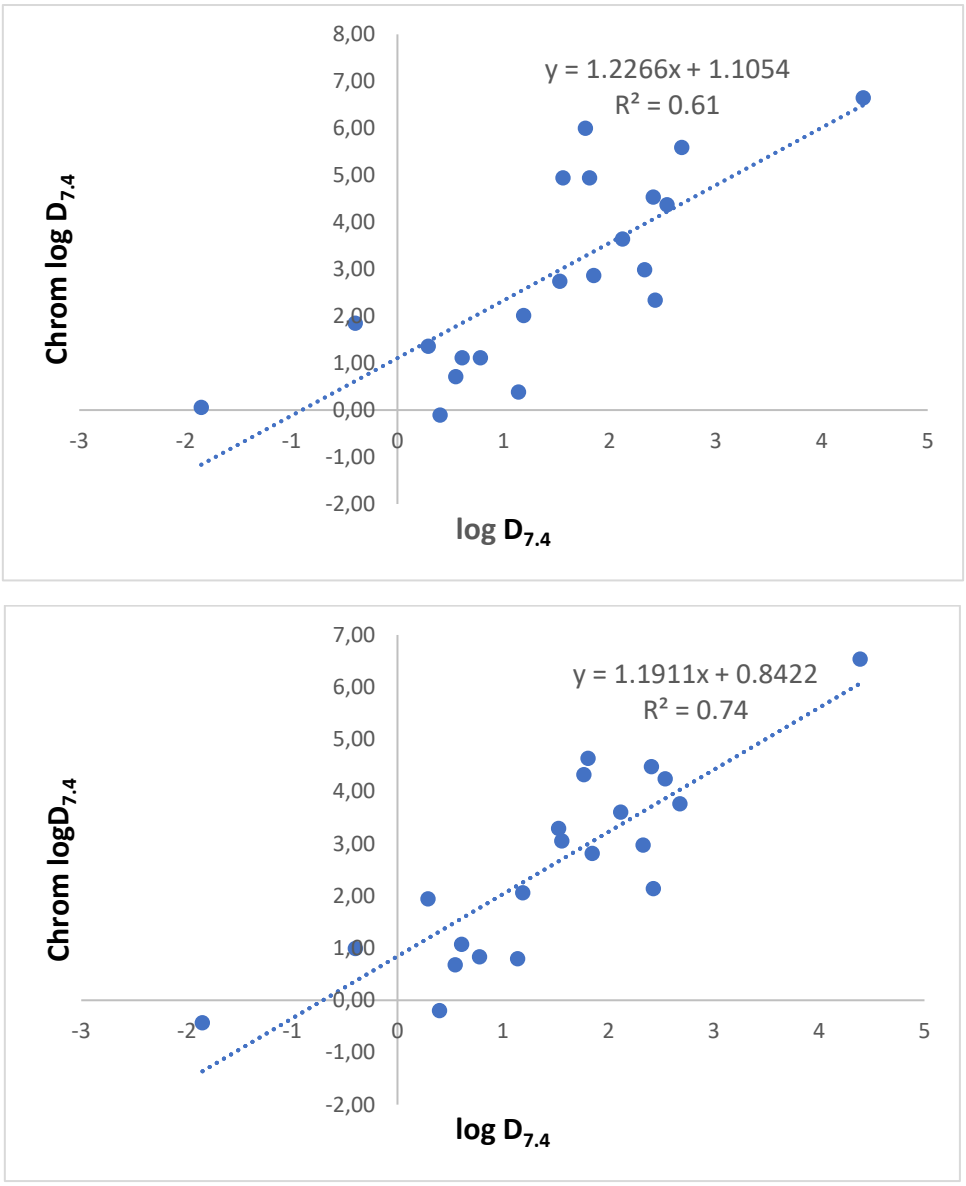
Naziv spoja	Chrom log $D_{7.4}$ stara kolona	Chrom log $D_{7.4}$ nova kolona	log $D_{7.4}$ *in silico*
Acetaminofen	-0.10	-0.20	0.40
Tolbutamid	1.36	1.94	0.29
Fenobarbital	2.01	2.06	1.19
Primidon	1.12	1.07	0.61
Bosentan	2.75	3.29	1.53
Sulfafenazol	0.39	0.79	1.14
Klorozoksazon	2.99	2.97	2.33
Lidokain	4.94	4.64	1.81
Dibukain	6.00	4.32	1.77
Imipramin	5.60	3.76	2.68
Desipramin	4.94	3.05	1.56
1-Aminobenzotriazol	0.71	0.67	0.55
Kumarin	2.87	2.81	1.85
Resorufin	4.37	4.24	2.54
3-Cijano-7-metoksikumarin	3.64	3.61	2.12
3-Cijano-7-etoksikumarin	4.54	4.48	2.41
α-naftoflavon	6.65	6.54	4.39
Topotekan	1.12	0.83	0.78
Acebutolol	1.85	0.99	-0.40
Feksofenadin	2.34	2.14	2.43
Atenolol	0.06	-0.43	-1.85
Telitromicin	4.05	2.97	3.68
Azitromicin	4.70	2.65	1.36

Eritromicin	4.05	2.73	1.69
Azahomoeritromicin	4.21	1.90	1.39
Klaritromicin	5.35	3.72	2.37
Roksitromicin	5.51	4.00	2.80
Josamicin	6.41	6.14	2.82
N'-Desmetil Azitromicin	4.62	2.18	0.30
Spiramicin	4.78	3.68	0.46

*NO = nije određeno



Slika 21. Korelacija in silico log $D_{7.4}$ vrijednosti i eksperimentalno određenih Chrom log $D_{7.4}$ upotrebom starije (gornja slika) i nove (donja slika) kromatografske kolone.

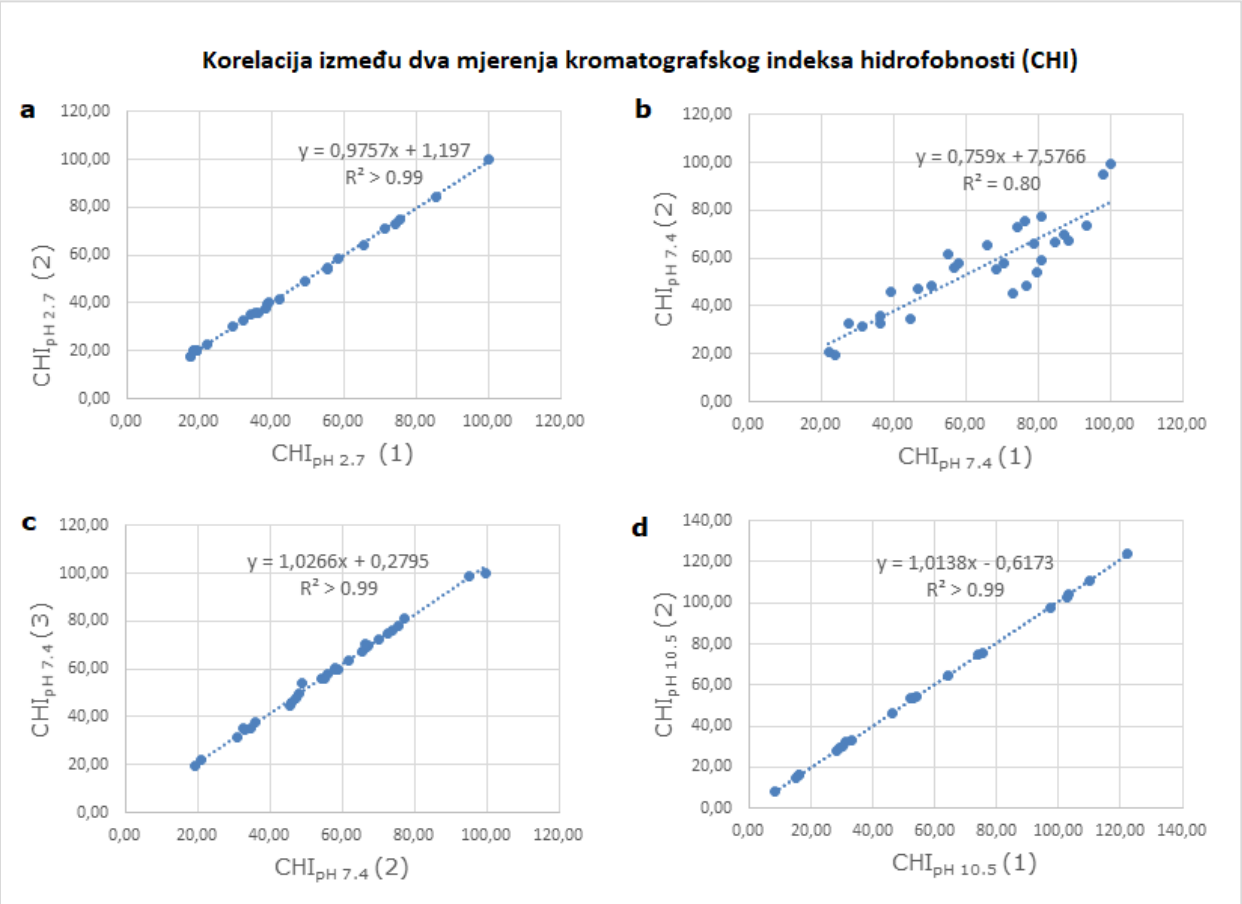


Slika 22. Korelacija in silico log $D_{7.4}$ vrijednosti i eksperimentalno određenih Chrom log $D_{7.4}$ upotrebom starije (gornja slika) i nove (donja slika) kromatografske kolone, za set spojeva bez makrolida.

4.5. Preciznost između dva mjerenja CHI vrijednosti pri pH 2.7, 7.4 i 10.5

Preciznost između dva mjerenja CHI vrijednosti pokazala se vrlo uspješnom pri kiselim i bazičnim uvjetima, na što ukazuju visoke vrijednosti koeficijenata determinacije: $R^2_{CHI\ pH\ 2.7} > 0.99$ (slika 23.a); $R^2_{CHI\ pH\ 10.5} > 0.99$ (slika 23.d).

Koeficijent determinacije za fiziološke uvjete iznosi $R^2_{CHI\ pH\ 7.4}=0.80$ za korelaciju između korištenja stare kolone i nove kolone s pretkolonom (slika 23.b); >0.99 za korelaciju između korištenja nove kolone sa pretkolonom i nove kolone bez pretkolone (slika 23.c).



Slika 23. Korelacija između dva mjerenja CHI (a) – pri pH 2.7, b) – pri pH 7.4, korelacija između korištenja stare i nove kolone s pretkolonom, c) – pri pH 7.4, korelacija između korištenja nove kolone s pretkolonom i nove kolone bez pretkolone, d) – pri pH 10.5).

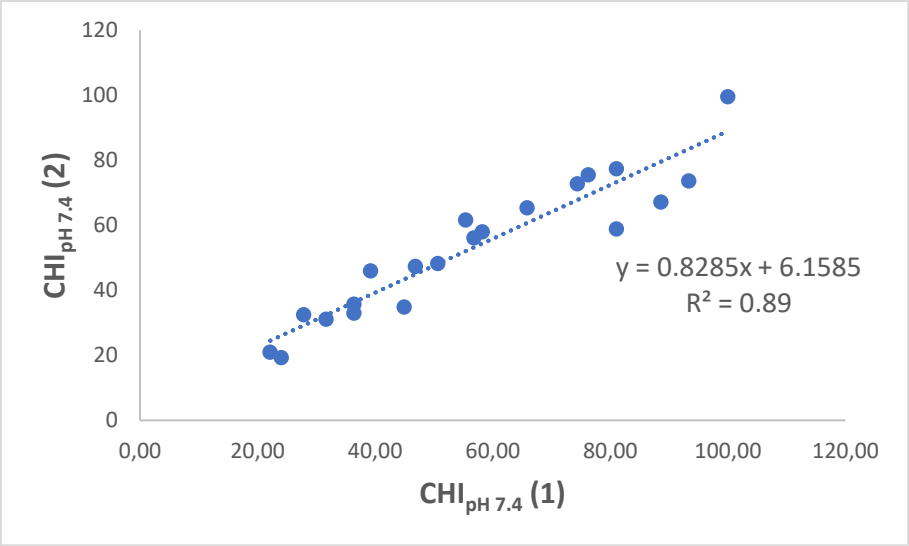
Popis spojeva kojima CHI vrijednosti pokretne faze pH 7.4 odstupaju za više od 5 jedinica prikazani su u tablici 12.

Tablica 12. Popis spojeva kojima CHI vrijednosti odstupaju više od 5 jedinica.

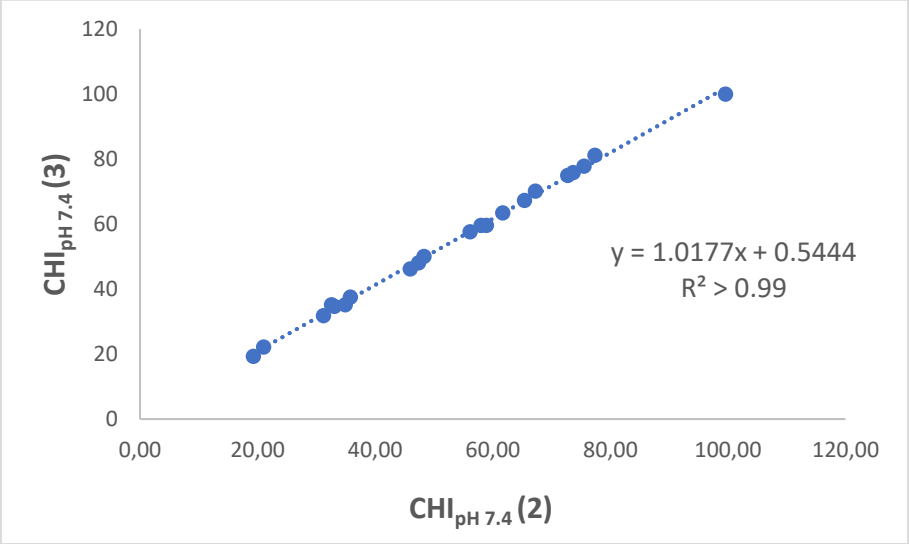
Spoj	$CHI_{pH\ 7.4}$ (1)*	$CHI_{pH\ 7.4}$ (2)*	$CHI_{pH\ 7.4}$ (3)*	$CHI_{pH\ 7.4}$ (1) – $CHI_{pH\ 7.4}$ (2)
Tolbutamid	39.3	46.0	46.2	7
Bosentan	55.4	61.7	62.5	6
Dibukain	93.4	73.7	75.9	20
Imipramin	88.6	67.3	70.1	21
Desipramin	81.0	58.9	59.6	22
Acebutolol	44.9	34.9	35.1	10
Telitromicin	70.6	58.0	60.5	13
Azitromicin	79.6	54.3	55.8	25
Eritromicin	68.7	55.2	55.8	13
Azahomoeritromicin	73.0	45.5	44.7	27
Klaritromicin	84.8	66.8	69.2	18
Roksitromicin	87.2	70.0	72.1	17
N'-Desmetil Azitromicin	76.8	48.8	54.3	28
Spiramicin	79.1	66.3	70.6	13

*(1) – stara kolona, *(2) – nova kolona s pretkolonom, *(3) – nova kolona bez pretkolone

Budući da su makrolidni spojevi pokazali najveća odstupanja između dva mjerenja pri uvjetima pokretne faze pH 7.4, napravljena je korelacija bez uključivanja njihovih rezultata (slike 24 i 25). U tom slučaju, koeficijent determinacije R^2 za korelaciju između korištenja stare i nove kolone s pretkolonom iznosi 0.89, a za korelaciju između korištenja nove kolone pretkolonom i nove kolone bez pretkolone >0.99.



Slika 24. Korelacija između dva mjerenja $CHI_{pH\ 7.4}$, za slučaj isključivanja makrolida iz analize i korištenja stare i nove kolone sa pretkolonom.



Slika 25. Korelacija između dva mjerenja $CHI_{pH\ 7.4}$, za slučaj isključivanja makrolida iz analize i korištenja nove kolone s pretkolonom i nove kolone bez pretkolone.

5. Rasprava

Razvoj UPLC-MS metode za određivanje lipofilnosti pri pH 2.7 i 10.5

U ovom radu uspješno su razvijene dvije UPLC-MS metode za određivanje CHI vrijednosti spojeva pri kiselim (pH 2.7) i bazičnim (pH 10.5) uvjetima pokretne faze. UPLC-MS sustav umjeravan je pomoću niza spojeva za baždarenje pri pH 7.4, kao za novouvedene metode pri pH 2.7 (slika 10) i 10.5 (slika 11), na što ukazuju visoki koeficijenti determinacije (R^2>0.99) pri sve tri ispitivane pH vrijednosti pokretne faze (slike 12-14). Za umjeravanje pri pH 2.7 i 10.5 svaki standard (tablica 4) je najprije zasebno analiziran kako bi prilikom svake sljedeće analize mješavine standardnih spojeva mogli točno odrediti koje se vrijeme zadržavanja odnosi na koji standardni spoj, te se u daljnjim analizama za umjeravanje UPLC-MS sustava koristila isključivo smjesa standarda.

Kako bi se dobili podatci o lipofilnosti koji su inter- i intra-laboratorijski usporedivi, poželjno je koristiti isti niz spojeva za baždarenje, što omogućuje standardizaciju kromatografskog postupka. U kromatografskim metodama određivanja lipofilnosti većina spojeva za umjeravanje su neutralni pa se pri svim pH vrijednostima nalaze u neutralnom obliku i pokazuju konstantnu CHI vrijednost. Preostali spojevi su osjetljivi na pH pokretne faze pa je važno obratiti pozornost na koeficijent determinacije, R^2. Niski R^2 (<0.99) ukazuje na razlike u kromatografskom sustavu ili metodi (npr. pH vrijednosti pokretne faze ili gradijentu). Općenito, CHI vrijednosti za skupinu spojeva za umjeravanje pokazuju jako dobro inter-laboratorijsko slaganje pri istom pH, čak i ako su primijenjeni malo drukčiji uvjeti: različita dimenzija kolone, veličina čestica, protok pokretne faze, temperatura i slično. Korištenje istog seta spojeva za umjeravanje može poboljšati inter-laboratorijsku usporedbu i omogućuje generiranje velikih baza podataka. U Glaxo Smith Kline-u već su izmjerene CHI vrijednosti za više od 500 000 spojeva te je stvoren model za Chrom log $D_{pH\ 7.4}$ koji daje sigurno predviđanje lipofilnosti novosintetiziranih spojeva (20). Kako bi se osiguralo pouzdano određivanje lipofilnosti, spojevi koji se ispituju trebaju

biti analizirani pod istim kromatografskim uvjetima kao i set spojeva za umjeravanje.

Nepokretna faza korištena u ovom radu je kolona reverznog tipa koja sadrži silika gel sa vezanim ugljikovodičnim lancima zbog stabilnosti u organskim i vodenim otapalima u pH rasponu od 2.5 do 8. Vrlo visoke (>10) i vrlo niske (<2) vrijednosti pH pokretne faze često se povezuju sa problemima u stabilnosti kromatografske kolone. U preliminarnoj analizi pri pH vrijednosti od 10.5 došlo je do začepljenja kolone zbog čega je pri daljnjim analizama u bazičnim uvjetima pokretne faze korištena pretkolona. Pretkolona je značajno kraća od kromatografske kolone, ali ima ista svojstva i štiti kolonu od oštećenja uslijed analiziranja jakih adsorpcijskih spojeva ili proteina u biološkim uzorcima koji mogu začepiti kolonu. Na taj način se može produžiti vijek trajanja skupe analitičke kolone (21).

Kiselo-bazna svojstva ispitivanih spojeva

Određivanjem kiselo baznih svojstava možemo predvidjeti ponašanje lijeka u različitim vodenim odjeljcima u organizmu, te odrediti utjecaj na ADME profil. Mnogi lijekovi su slabe kiseline ili baze pa je samo mala promjena u pH vrijednosti dovoljna da lijek iz neionizirane forme prijeđe u ioniziranu i obrnuto. Neionizirana forma lijeka je topljiva u lipidima pa brže prolazi kroz fosfolipidni dvosloj membrane, no ima slabiju topljivost. S druge strane, ionizirana forma ima vrlo nisku topljivost u lipidima i gotovo da ne prolazi membranu osim u slučaju postojanja aktivnog transporta. Kiselo-bazna svojstva spojeva najviše dolaze do izražaja u gastrointestinalnom traktu gdje postoji gradijent pH. Lijekovi koji su slabe kiseline, u kiselim uvjetima u želudcu (pH~2) bit će pretežito u neioniziranom obliku, što pomaže njihovoj bržoj apsorpciji iz želudca. No topljivost neioniziranog oblika je znatno manja. U tankom crijevu, gdje se pH kreće oko 6.5-8, prisutan je veći udio ioniziranog oblika pa kiseli lijek sporije prolazi kroz membrane. No zbog velike apsorpcijske površine tankog crijeva gotovo sva količina lijeka se može apsorbirati u krvotok. Suprotno, slabe baze su najčešće u ioniziranom obliku u želudcu i gornjem dijelu crijeva, gdje je pH kiseo što

pogoduje dobroj topljivosti. Slaba baza se brže apsorbira iz tankog crijeva u odnosu na slabu kiselinu, jer se nalazi pretežito u neioniziranom obliku. Neutralni spojevi postoje samo u neutralnom obliku pa njihova kiselo-bazna svojstva ne dolaze do izražaja. Iz toga možemo zaključiti da lipofilnost ovisi o kiselo-baznim svojstvima, odnosno da je neionizirani oblik lijeka lipofilan i najviše određuje prolazak kroz membranu. Spoj je lipofilniji što mu je veći udio neioniziranog oblika. Osim na brzinu apsorpcije i prolazak kroz membranu, kiselo-bazna svojstva imaju veliki utjecaj i na volumen distribucije, vezanje na proteine plazme, metabolizam, prodiranje lijeka u mozak i veličinu bubrežnog odstranjivanja.

Svim skupinama ispitivanih spojeva određene su CHI vrijednosti pri pH 2.7, 7.4 i 10.5 (tablice 5-9) na temelju čega je moguće odrediti njihova kiselo-bazna svojstva (slike 15-19). Zadržavanje ionizirajućih spojeva na kromatografskoj koloni ovisi o stupnju ionizacije, koji ovisi o pK_a spoja i pH pokretne faze. Kako su za ispitivanja korišteni komercijano dostupni spojevi, čija su kiselo-bazna svojstva poznata, moguće je provjeriti kako kromatografsko određivanje reflektira stvarni profil. Očekivana kiselo-bazna svojstva dobivena su za većinu ispitivanih spojeva, uz nekoliko iznimki.

U skupini kiselih spojeva (slika 15), primidon nije pokazao očekivani profil, ali njegova pKa vrijednost (12.3) ukazuje da do ionizacije dolazi tek pri izrazito visokoj pH vrijednosti, te da se ovaj spoj nalazi u neioniziranoj formi pri sve tri ispitivane pH vrijednosti. To znači da pri fiziološki relevantnim pH vrijednostima primidon ne ionizira, te se nalazi u neutralnoj formi, što je i pokazano njegovim eksperimentalno određenim kiselo-baznim profilom. Nadalje, spojevi acetaminofen (pK_a=9.38), fenobarbital (pK_a=7.3) i klorzoksazon (pK_a=9.39) pokazali su manju razliku CHI vrijednosti između pH 2.7 i 7.4, što se može objasniti time da se njihove pK_a vrijednosti nalaze blizu pH 7.4. Zbog premale razlike između pK_a spoja i pH pokretne faze od 7.4 (~1), ovi spojevi se nalaze u ravnoteži između ioniziranog i neutralnog oblika, odnosno obje forme su prisutne. Tek većim pomakom prema kiselom

i baznom dolazi do potpune ionizacije (pH 10.5), odnosno prelaska u neionizirani oblik (pH 2.7).

Bazični spojevi pokazali su očekivani CHI profil (slika 16), pa tako imaju najveću CHI vrijednost pri bazičnom pH gdje se nalaze u neutralnoj formi, dok se sa smanjenjem pH smanjuje i njihova CHI vrijednost. Jedino 1-aminobenzotriazol nije pokazao očekivan CHI profil, a razlog leži u tome što je njegova pK_a vrijednost (2.10) izvan ispitivanog pH raspona, te se spoj pri svim ispitivanjima nalazio u neutralnoj formi.

Neutralni spojevi imaju konstantan profil, te su njihove CHI jedinice pri svim ispitivanim pH vrijednostima unutar granica eksperimentalne pogreške (slika 17).

Najviša očekivana CHI vrijednost za amfoterne spojeve je pri pH 7.4, gdje se oni nalaze u neutralnoj formi. Acebutolol, atenolol i feksofenadin nisu pokazali očekivani profil (slika 18). U slučaju acebutolola i atenolola je najviša CHI vrijednost dobivena pri pH 10.5. Razlog tome je što je njihova kisela pK_a vrijednost 13.78, odnosno 13.88, što je izvan ispitivanog pH raspona. Feksofenadin je pokazao neočekivano visoku CHI vrijednost pri pH 10.5, gdje bi se prema njegovoj bazičnoj pK_a vrijednosti od 9.49 očekivalo da CHI vrijednost pri pH 10.5 bude niža od one na pH 7.4. Općenito, kada se određuje gradijentno vrijeme zadržavanja, tada zadržavanje ovisi i o koncentraciji i vrsti organske faze. Prilikom povećanja postotka organske faze, dolazi do promjena u pH pokretne faze i u pK_a vrijednosti spoja. Te promjene dodatno utječu na udio zadržavanja neutralnih i ionizirajućih vrsta. Stoga je pH pokretne faze vrlo važan optimizacijski parametar, koji se zajedno sa sastavom pokretne faze mora adekvatno mjeriti i kontrolirati odgovarajućim puferima (22). Canals i suradnici (23) te Espinosa i suradnici (24) mjerili su promjene u pH vrijednosti pokretne faze nakon miješanja vodenog pufera i organskog modifikatora. Početna vrijednost otopine amonijevog acetata se sa pH 2.6 povećala na 5 kada je koncentracija acetonitrila dosegla 90%. Kada se otopina amonijevog acetata početne pH vrijednosti 10.5 pomiješa s acetonitrilom, pH padne na 8.5. Kod fizioloških

uvjeta (pH 7.4) vodene otopine amonijevog acetata, pH je ostao relativno konstantan kako se koncentracija acetonitrila povećavala. Međutim, čak i pri pH 7.4 ne možemo zanemariti učinak koncentracije acetonitrila na pK_a spoja, jer će promjena u pK_a utjecati na udio molekula u ioniziranom obliku bez obzira na konstantni pH. Te promjene pH vrijednosti utječu na našu interpretaciju pokazatelja lipofilnosti CHI u smislu njegove povezanosti s neioniziranim oblikom spoja. Na primjer, za bazični spoj s pK_a=9, može se pretpostaviti da će vrijednosti CHI dobivene s početnom pH vrijednosti pokretne faze od 10.5 proizvesti CHI vrijednosti neioniziranog oblika. No kako povećavamo koncentraciju acetonitrila, pH će se smanjivati čime se potiče ionizacija spoja. Kao kompenzacija, vrijednosti pK_a bazičnih spojeva smanjuju se s porastom koncentracije acetonitrila. Ovo može biti razlog neočekivano visoke CHI vrijednosti pri pH 10.5 za feksofenadin, gdje je došlo do pomaka njegove pK_a vrijednosti. Sličan efekt događa se kod upotrebe kisele pokretne faze, gdje pH raste s porastom koncentracije acetonitrila kao i pKa vrijednost spoja. Promjena pH uzrokovana povećanjem koncentracije acetonitrila prilično se razlikuje za razne vrste pufera. Tako se pH fosfatnog pufera pri pH 6.8 povećava na 8 kada se koncentracija acetonitrila poveća na 50%. Zato je nužna primjena prikladnog pufera da bi se izbjegla značajna promjena pH vrijednosti neutralne pokretne faze prilikom povećanja koncentracije acetonitrila (18). U ovom radu je korišten amonijev acetat kao pufer, jer fosfatni pufer nije adekvatan za spregu sa spektrometrom masa, koji je nužan za određivanje vremena zadržavanja za spojeve koji nisu UV/VIS aktivni. Međutim, unatoč ovakvom utjecaju povećanja koncentracije acetonitrila na dobivene CHI vrijednosti ispitivanih spojeva, upotrebom ekstremnih pH vrijednosti pokretne faze od 2.7 i 10.5 minimizira se ovaj efekt, te je moguće dobiti ispravan kiselo-bazni profil za većinu ispitivanih spojeva.

Makrolidni spojevi su slabe baze s jednim ili više centara moguće ionizacije. Njihove pK_a vrijednost/i su bliske fiziološkom pH, te je određivanje njihovih CHI vrijednosti izazovan zadatak. Unatoč tome, pri analizama makrolidnih

spojeva bez iznimke je dobiven očekivan kiselo-bazni profil (slika 19) svojstven slabim bazama.

Usporedbe eksperimentalno određenih CHI i Chrom log D vrijednosti s in silico izračunima

In silico podatci mogu se uspoređivati s eksperimentalnim log D vrijednostima jer je njihov odnos linearan. Modeli za predviđanje lipofilnosti smatraju se visoko pouzdanim za spojeve molekulske mase manje od 500, a na to ukazuju i visoki koeficijenti determinacije za kisele (R^2=0.83) i bazične uvjete (R^2=0.91), dobiveni u ovom radu (tablica 10 i slika 20). Za fiziološke uvjete (pH 7.4), koeficijent determinacije dobiven korelacijom *in silico* log $D_{7.4}$ vrijednosti i eksperimentalno određene $CHI_{7.4}$ vrijednosti pokazao se manjim (R^2=0.52, slika 21) nego za kisele i bazične uvjete pokretne faze. Isključivanjem makrolidnih spojeva iz analize povećan je i koeficijent determinacije (R^2=0.61) između *in silico* log $D_{7.4}$ i eksperimentalno određenih vrijednosti $CHI_{7.4}$ (slika 22). Zbog njihove molekulske mase, te posjedovanja više ionizacijskih centara, makrolidi često nisu uključeni u setove za stvaranje jednostavnih pravila ili za stvaranje raznih modela za ADME profiliranje, koji su dobiveni izračunatim strukturnim i fizikalno-kemijskim svojstvima (25). Računalni programi razvijeni su koristeći mjerene podatke i trening setova, a temelje razlaganju spoja na fragmente te zbrajanju atomskih doprinosa za određeno svojstvo. Kod manjih i planarnih molekula se stoga mogu dobiti dobre korelacije, dok su kod složenijih trodimenzionalnih strukura poput makrolida uglavnom slabije. Tako je bilo i za očekivati da se *in silico* podatci za makrolide neće visoko poklapati sa eksperimentalno određenim vrijednostima. Nadalje, sve više truda ulaže se u razvijanje 3D modela za predviđanje lipofilnosti kompleksnih 3D struktura, kao što su makrolidi (26).

Preciznost između dva mjerenja CHI vrijednosti

Kako bi se ispitala preciznost određivanja CHI vrijednosti, ispitivani spojevi su analizirani u nekoliko navrata pri sva tri ispitivana pH. Najbolja preciznost između dva CHI mjerenja pokazala se za kisele i bazične uvjete pokretne faze (slika 23.a i 23.d). Pri bazičnim uvjetima, oba mjerenja provedena su uporabom nove kolone i pretkolone. Za mjerenja pri kiselom i fiziološkom pH prva mjerenja provedena su uporabom starije kolone zajedno sa filterom. Ponavljanja su provedena na novoj koloni, zajedno sa pretkolonom. Kod fiziološkog pH dobivena je nešto niža preciznost, pa se mjerenje ponovilo bez pretkolone kako bi ustanovili je li to razlog odstupanja. Rezultati su ponovno bili isti, odnosno 14 spojeva je odstupalo od prvog mjerenja (imali su razliku u CHI vrijednosti koja je veća od 5 jedinica, prikazano u tablici 12). Usporedba rezultata između mjerenja s novom kolonom i pretkolonom te s novom kolonom bez pretkolone, pokazala je da su rezultati visoko ponovljivi (nije prikazano). Iz toga se može zaključiti da je starost kolone glavni faktor koji je imao utjecaj na vrijeme zadržavanja, ali ne i za sve spojeve, već za samo one koji su osjetljivi na takve promjene.

Kao i kod korelacije *in silico* i izmjerenih vrijednosti $CHI_{7.4}$, kada su makrolidi bili isključeni iz analize korelacije između dva mjerenja $CHI_{7.4}$, dobivena je veća preciznost (slike 24 i 25), iz čega se može zaključiti da su makrolidni spojevi osjetljiviji na starenja kolone od malih molekula.

Razlozi promjena u vremenima zadržavanja spojeva pri upotrebi starije i nove kromatografske kolone se može objasniti promjenama na nepokretnoj fazi do kojih dolazi starenjem kolone. U obrnuto-faznoj tekućinskoj kromatografiji slobodne silanolne skupine na koje nisu vezani ugljikovodični C18 lanci mogu predstavljati problem pri pH vrijednostima višim od 5. Naime, na površini silika gela prisutne su i slobodne silanolne skupine zato jer se zbog steričkih smetnji ne mogu na svaku vezati ugljikovodični lanci. Pošto su silanolne skupine kiselog karaktera te se pretežito nalaze u nabijenom negativnom stanju pri višem pH (27), mogu nastati sekundarne

ionske interakcije sa pozitivno nabijenim bazičnim spojevima. Time se povećava njihovo vrijeme zadržavanja te se otežano eluiraju s kolone, a na kromatogramu uočavamo široke i asimetrične pikove, što je i bio slučaj u ovom eksperimentu za neke spojeve pri pH 7.4 i pH 10.5. Na tržištu danas postoje mnoge varijante nepokretnih faza kod kojih su slobodne silanolne skupine deaktivirane na razne načine. Neki od njih su enkapsuliranje površine polimernom fazom, gušće vezivanje alkilnih lanaca ili homogena distribucija silanolnih skupina (28,29). Kao dodatak pokretnoj fazi mogu se koristiti trietilamin ili trifluoroctena kiselina, koji imaju veći afinitet za vezanje na ionizirane silanolne skupine čime se onemogućuje vezanje bazičnih spojeva. No potrebno je naglasiti kako slobodne silanolne grupe mogu imati i pozitivan učinak kada ugljikovodični lanci ne pružaju dovoljnu selektivnost razdvajanja. Pritom silanolne grupe doprinose polarnom efektu te mogu stvarati interakcije sa polarnim funkcionalnim grupama analita (30). Također, dodatak modifikatora u pokretnu fazu, slično kao gore opisana mogućnost korištenja druge kromatografske kolone, bi mogla utjecati na selektivnost standarda za umjeravanje UPLC sustava, ali i vremena zadržavanja ispitivanih spojeva, što treba ispitati prije uvođenja ovakve promjene.

6. Zaključak

- U ovom radu uspješno su razvijene dvije RP-UPLC/MS metode za određivanje CHI vrijednosti spojeva pri kiselim (pH 2.7) i bazičnim (pH 10.5) uvjetima pokretne faze, pri čemu je korišten odabrani niz spojeva za umjeravanje te je dobiven visoki koeficijent determinacije (R^2>0.99).
- Svim skupinama ispitivanih spojeva određene su CHI vrijednosti pri pH 2.7, 7.4 i 10.5 te su za većinu spojeva potvrđena njihova kiselo-bazna svojstva uz nekoliko odstupanja. Za većinu kiselina potvrđena je najveća CHI vrijednost pri kiselom pH, za baze pri bazičnom pH te za neutralne spojeve je dobiven konstantan profil. Kod amfoternih spojeva potvrđen je najveći CHI pri neutralnom pH za jedan od četiri spoja, dok su makrolidni spojevi, kao slabe baze, pokazali karakterističan profil svojstven bazama.
- Usporedbom eksperimentalno određene CHI vrijednosti sa *in silico* log D vrijednostima, pri istim uvjetima, dobiveni su visoki koeficijenti determinacije za kisele i bazične uvjete dok je koeficijent determinacije pri fiziološkim uvjetima (pH 7.4) bio značajno niži. Isključivanjem seta makrolidnih spojeva, dobivena je nešto bolja korelacija. Budući da su prediktivni modeli često rađeni na bazi podataka malih molekula, za očekivati su i veća odstupanja za takve molekule.
- Preciznost između dva mjerenja CHI vrijednosti pokazala se vrlo uspješnom pri kiselim ($R^2_{CHIpH2.7}$>0.99), bazičnim ($R^2_{CHIpH\ 10.5}$>0.99) i fiziološkim uvjetima (s novom kolonom, $R^2_{\ CHI\ pH\ 7.4}$>0.99).

7. Literatura

1 Wouters OJ, McKee M, Luyten J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA - J Am Med Assoc* 2020; **323**: 844–853.

2 Testa B, van de Waterbeemd H. *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical ... - Google Knjige*. John Wiley & Sons, 2001https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=vwetAF8HfMgC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Pharmacokinetic+Optimization+in+Drug+Research.+Biological,+Physicochemical,+and+Computational+Strategies,&ots=QP-tIDHr60&sig=gLnCfUkoAQAWe7a26_zCZVGeoRA&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (accessed 31 Mar2020).

3 Mandić Z (ed.). *Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development*. IAPC Publishing: Zagreb, 2012 doi:10.5599/obp.7.0.

4 Meanwell NA. Improving Drug Candidates by Design : A Focus on Physicochemical Properties As a Means of Improving Compound Disposition and Safety. 2011; : 1420–1456.

5 Young RJ, Green DVS, Luscombe CN, Hill AP. Getting physical in drug discovery II: The impact of chromatographic hydrophobicity measurements and aromaticity. *Drug Discov Today* 2011; **16**: 822–830.

6 Kerns EH, Di L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure, Design and Methods*. Elsevier: London, UK, 2008.

7 Hill AP, Young RJ. Getting physical in drug discovery : a contemporary perspective on solubility and hydrophobicity. *Drug Discov Today* 2010; **15**: 648–655.

8 Waring MJ. Expert Opinion on Drug Discovery Lipophilicity in drug discovery Lipophilicity in drug discovery. 2010; **0441**. doi:10.1517/17460441003605098.

9 Tsopelas F, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2017; **12**: 885–896.

10 Breiden B, Sandhoff K. Emerging mechanisms of drug-induced phospholipidosis. 2011. doi:10.1515/hsz-2019-0270.

11 Rutkowska E, Pająk K, Jóźwiak K. Lipophilicity - Methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Pol Pharm* -

Drug Res 2013; **70**: 3–18.

12 Andrés A, Rosés M, Ràfols C, Bosch E, Espinosa S, Segarra V *et al.* European Journal of Pharmaceutical Sciences Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (log D) from low drug amounts. 2015; **76**: 181–191.

13 Crawford Scientific. Mass Spectrometry Fundamental LC-MS Introduction. 2004; : 1–24.

14 Fornstedt T, Forssén P, Westerlund D. Basic HPLC Theory and De fi nitions : Retention , Thermodynamics , Selectivity , Zone Spreading , Kinetics , and Resolution. 2015; : 1–24.

15 Bunally S, Young RJ. The role and impact of high throughput biomimetic measurements in drug discovery. *ADMET DMPK* 2018; **6**: 74–84.

16 Valkó KL. Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery. *J Pharm Biomed Anal* 2016; **130**: 35–54.

17 Valko KL. Application of biomimetic HPLC to estimate in vivo behavior of early drug discovery compounds . *Futur Drug Discov* 2019; **1**: FDD11.

18 Valko K, Ivanova-Berndt G, Beswick P, Kindey M, Ko D. Application of biomimetic HPLC to estimate lipophilicity, protein and phospholipid binding of potential peptide therapeutics. *ADMET DMPK* 2018; **6**: 162–175.

19 Borchardt RT. *Pharmaceutical profiling in drug discovery for lead selection*. AAPS Press, 2004.

20 Valkó KL. Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery. *J Pharm Biomed Anal* 2016; **130**: 35–54.

21 Niessen WMA, Group F. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry Third Edition*. 2006.

22 Soriano-meseguer S, Fuguet E, Port A, Ros M. Analytica Chimica Acta In fl uence of the acid-base ionization of drugs in their retention in reversed-phase liquid chromatography. 2019; **1078**: 1–11.

23 Canals I, Bosch E, Hill AP. Retention of Ionizable Compounds on HPLC . 8 . Influence of Mobile-Phase pH Change on the Chromatographic Retention of Acids and Bases during Gradient Elution. 2001; **73**: 4937–4945.

24 Espinosa S, Bosch E. R etention of ionizable compounds in high-performance liquid chromatography 14 . Acid – base p K values in acetonitrile – water mobile phases. 2002; **964**: 55–66.

25 Stepanić V, Žiher D, Gabelica-Marković V, Jelić D, Nunhuck S, Valko K *et al.* Physicochemical profile of macrolides and their comparison with small molecules. *Eur J Med Chem* 2012; **47**: 462–472.

26 Koštrun S, Munic Kos V, Matanović Škugor M, Palej Jakopović I, Malnar I, Dragojević S *et al.* Around the macrolide – Impact of 3D structure of macrocycles on lipophilicity and cellular accumulation. *Eur J Med Chem* 2017; **133**: 351–364.

27 Bocian S, Buszewski B. Residual silanols at reversed-phase silica in HPLC - A contribution for a better understanding. *J Sep Sci* 2012; **35**: 1191–1200.

28 Majors RE, Przybyciel M. Columns for reversed-phase LC separations in highly aqueous mobile phases. *LCGC North Am* 2002; **20**.

29 García-Alvarez-Coque MC, Ruiz-Angel MJ, Berthod A, Carda-Broch S. On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography. A review. Anal. Chim. Acta. 2015; **883**: 1–21.

30 Boysen RI, Hearn MTW. High performance liquid chromatographic separation methods. *Compr Nat Prod II Chem Biol* 2010; **9**: 5–49.

8. Životopis



ROBERTA RADOVIĆ

UNIV. BACC. BIOTECH. ET PHARM. INV.

PROFIL

Motivirana da konstantno razvijam svoje vještine i rastem profesionalno. Obavezama pristupam odgovorno i sve što radim, radim sa 100% predanosti.

KONTAKT

Čepić Polje 28, 52232 Kršan
091 786 73 84
roberta.radovic@hotmail.com

EDUKACIJA

Sveučilište u Rijeci
Odjel za biotehnologiju
diplomski studij Biotehnologija u medicini (2019.-danas)
univ. bacc. biotech. et pharm. inv.

VJEŠTINE

- Komunikacijske vještine stečene raznim volonterskim aktivnostima i poslom promotora.
- Uspješno snalaženje u timskom radu, kao i individualno.
- Sposobna sam pratiti upute i dati kvalitetne rezultate.

RADNO ISKUSTVO

JADRAN GALENSKI LABORATORIJ, JGL D.O.O.
LISTOPAD - STUDENI 2020.

- Stručna praksa u odjelu Farmakovigilancije i medicinskih poslova.

DEKRA, PROMOTORICA KOZMETIČKIH PROIZVODA
OŽUJAK 2019. - SVIBANJ 2019.

- Promoviranje i informiranje kupaca o novoj liniji ulnih seruma i kozmetičkih proizvoda u ljekarnama.

JADRAN GALENSKI LABORATORIJ, STRUČNA PRAKSA
SRPANJ 2018.

- Iskustvo prakse u odjelu za osiguranje kvalitete
- Analiziranje dokumentacije i praćenje parametara koji su od važnosti za postizanje dobre proizvodne prakse

HOTEL & RESTORAN FLANONA
SRPANJ - RUJAN 2016.-2019.

- Ljetni posao tijekom četiri sezone.
- Iskustvo rada i komunikacije s ljudima.

DODATNE INFORMACIJE

PRIZNANJA I NAGRADE

- Diplomu sveučilišne prvostupnice biotehnologije i istraživanja lijekova primila sam sa pohvalom CUM LAUDE.
- Primala sam stipendiju Općine Kršan tijekom srednjoškolskog obrazovanja, kao i za vrijeme studiranja.

OSTALO

- Sudjelovala sam u Ljetnoj školi ''Patofiziologija aktualnih javnozdravstvenih problema i bolesti'' u lipnju 2018. gdje sam stekla praksu timskog rada i kritičkog razmišljanja.
- Volonter Festivala sporta i rekreacije Homo si teć, 2017.-2018., i projekta Europska Prijestolnica Kulture Rijeka 2020.
- Pohađam UDEMY online tečaj pod nazivom ''MS Excel - Excel from Beginner to Advanced''
- Vozačka dozvola B kategorije

ČLANSTVA

- Članica Udruge studenata Biotehnologije Sveučilišta u Rijeci (USBRI) u sklopu koje sam volontirala i sudjelovala u izvedbi projekata: Kuglice dobrih želja, NatuRis, Karnevalska grupa Kampus, Dan otvorenih vrata, Studenti mentori.
- Vršiteljica dužnosti tajnice USBRI u periodu od 10.2019.-07.2020.

ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Jasni Padovan na pruženoj prilici i komentorici mag. chem. Petri Mišetić na pomoći, strpljenju, savjetima i prenesenom znanju. Zahvaljujem Vam što ste unatoč ovim teškim vremenima pronašle vrijeme i za mene.

Najveće hvala mojoj obitelji, prijateljima i Toniju na velikoj podršci tijekom svih godina studiranja. Hvala vam što ste uvijek tu i vjerujete u mene!