

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**CHEMOMETRICKÉ STANOVENÍ PŘEKRÝVAJÍCÍCH SE  
DISOCIAČNÍCH KONSTANT LÉČIVA ELTROMBOPAG  
SPEKTROSKOPICKY A POTENCIOMETRICKY**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

AUTOR PRÁCE: Bc. Lucie Pilařová

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

2017

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL-TECHNOLOGY**

**CHEMOMETRIC DETERMINATION OF THE OVERLAPPING  $pK_a$  OF  
MULTIPROTIC DRUG ELTROMBOPAG USING UV/VIS  
SPECTROSCOPY AND POTENTIOMETRY**

**THESIS**

**AUTHOR: Bc. Lucie Pilařová**

**SUPERVISOR: Prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.**

**2017**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

- Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Pilařová**  
Osobní číslo: **C15624**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Chemometrické stanovení překrývajících se disociačních konstant cytostatika Eltrombopag spektroskopicky a potenciometricky**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Proveďte rešerši dosavadních publikací a poznatků o protonačních rovnováhách cytostatika Eltrombopag.
2. Stanovte všechny disociační konstanty Eltrombopagu regresní analýzou spekter.
3. Stanovte všechny i překrývající se disociační konstanty Eltrombopagu regresní analýzou potenciometrických titračních dat.
4. Zhodnoňte oba fyzikálně-chemické postupy a výsledky komentujte.
5. Pokuste se připravit své výsledky k publikování v impaktovaném časopise.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

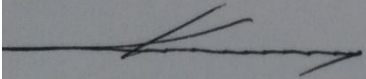
**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

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

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

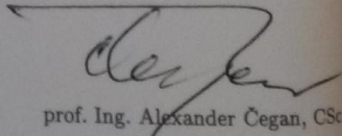
Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.

děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne .....

.....

Lucie Pilařová

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu diplomové práce prof. RNDr. Milanu Melounovi, DrSc. za jeho odborné vedení, řadu cenných námětů, rad a připomínek, které mi byly důležitou pomocí při tvorbě diplomové práce. Mé poděkování patří rovněž prof. Ing. Miloši Sedlákovvi, DrSc. a doc. Ing. Filipovi Burešovi, PhD., kteří nám poskytli cenné konzultace týkající se struktury molekuly léčiva a predikce  $pK_a$  programem MARVIN.

Diplomová práce byla napsána v textovém editoru WORD 2007, tabulky byly vytvořeny v programu EXCEL 2007. Grafy byly vytvořeny v programu OriginPro 9 a S-Plus 4.5. Vzorec léčiva byl vytvořen programem ChemSketch 10.0. Regresní analýza maticových absorbančních dat byla provedena programy SQUAD(84) a REACTLAB. Regresní analýza potenciometrických dat byla provedena programy ESAB a HYPERQUAD. Pro tvorbu a správu citací byl využit software EndNote<sup>TM</sup>.

## HIGHLIGHTS

- První experimentálně stanovená UV/VIS spektra a hodnoty  $pK_a$  léčiva Eltrombopag.
- Eltrombopag léčí nízký počet krevních destiček u dospělých pacientů s chronickou imunitní idiopatickou trombocytopenií.
- Bylo stanoveno pět disociačních konstant léčiva Eltrombopag při 25°C a 37°C.
- Spektrofotometrickou a potenciometrickou titrací byly studovány protonační rovnováhy.
- Z hodnoty absorbanční matice byl odhadnut počet světlo-absorbujících částic všech částic protonační rovnováhy.

## NOVELTY

(a) **Vědecká motivace:** Eltrombopag je léčivo k léčbě nízkého počtu krevních destiček u dospělých pacientů s chronickou imunitní idiopatickou trombocytopenií (ITP). Způsobuje vyšší produkci krevních destiček buňkami kostní dřeně. Oblast lékařství a farmakologie nezbytně potřebuje znalost fyzikálních konstant (spektra,  $pK$ , rozpustnost, atd.) nových léčiv.

(b) **Význam:** Spektra, disociační konstanty a distribuční diagramy relativní koncentrace různě protonovaných částic nového málo rozpustného léčiva Eltrombopag nebyly doposud publikovány.

(c) **Všeobecný význam získaných výsledků:** Počítačem asistovanou analýzou absorbančních pH spekter bylo odhadnuto pět disociačních konstant, u kterých byla prokázána věrohodnost odhadů parametrů regresní analýzy. Vzhledem k silně překrývajícím se protonačním rovnováhám a nízké rozpustnosti léčiva byla k vyhodnocení smíšených  $pK_a$  vedle spektrofotometrie použita také potenciometrie. Ze závislosti  $pK_a$  na iontové síle byly odhadnuty termodynamické disociační konstanty při 25°C a 37°C.



## HIGHLIGHTS

- First experimentally determined UV/VIS spectra and  $pK_a$  value of Eltrombopag.
- Eltrombopag treats low blood platelet counts in adults with chronic immune idiopathic thrombocytopenia.
- Five thermodynamic dissociation constants of Eltrombopag were determined at 25°C and 37°C.
- Protonation equilibria were studied with spectrophotometric and potentiometric titrations.
- The number of light-absorbing species of all protonation equilibria was estimated from the rank of the absorbance matrix.

## NOVELTY

**(a) Scientific motivation:** Drug Eltrombopag treats low blood platelet counts in adults with chronic immune idiopathic thrombocytopenia ITP. It works by causing the cells in the bone marrow to produce more platelets. Medicine and pharmacology needs physical constants (spectra,  $pK$ 's, solubility, etc.) of new drugs.

**(b) Relevance:** No spectra and no dissociation constants and no distribution diagrams of relative concentration of variously protonated species of the new sparingly soluble drug Eltrombopag have been published in literature by now.

**(c) General significance of the obtained results:** Five dissociation constants were estimated using a computer-assisted pH-absorbance spectra analysis when the reliability of the used regression analysis was proven. Because of the strongly overlapping protonation equilibria and a limited solubility behind the spectrophotometric also potentiometric data analysis was used to evaluate mixed  $pK_a$ . Using a dependence on the ionic strength thermodynamic dissociation constants at 25°C and 37°C were estimated.

## ANOTACE

Pro stanovení disociačních konstant multiprotického léčiva Eltrombopag byly porovnány potenciometrické a spektrofotometrické pH-titrace. Eltrombopag slouží k léčbě nízkého počtu krevních destiček u dospělých pacientů s chronickou imunitní idiopatickou trombocytopenií (ITP). Eltrombopag vykazuje pět protonovatelných míst v rozmezí pH od 2 do 10, kde dvě  $pK$  jsou vzdálené ( $\Delta pK > 3$ ), zatímco další tři jsou blízké disociační konstanty. Podle predikčního programu MARVIN se v neutrálním prostředí Eltrombopag vyskytuje ve vodě rozpustné formě  $LH_3$ , která může být protonována na rozpustné molekuly  $LH_4$  a  $LH_5$ . Molekula  $LH_3$  může být také disociována na tři obtížně rozpustné molekuly  $LH_2$ ,  $LH$  a  $L$ . Matice spekter při hodnotách pH od 2 do 10, od 300 do 625 nm vykazuje citlivost chromoforů na změnu pH. Vzhledem k omezené rozpustnosti Eltrombopagu nad pH 9,5 byla protonace studována jen do pH 10. Pět disociačních konstant bylo spolehlivě určeno programy REACTLAB a SQUAD(84), které vedly ke shodným odhadům disociačních konstant. Ze závislosti disociační konstanty na iontové síle byly při teplotách 25°C a 37°C vyčísleny termodynamické disociační konstanty:  $pK_{a1}^T = 2.69$  a  $3.38$ ,  $pK_{a2}^T = 6.97$  a  $5.79$ ,  $pK_{a3}^T = 7.13$  a  $7.12$ ,  $pK_{a4}^T = 7.65$  a  $7.54$ ,  $pK_{a5}^T = 8.30$  a  $9.43$ . Protože se nad pH 10 a pod pH 5 objevuje v titrovaném roztoku opalescence velmi jemné sraženiny Eltrombopagu, nebyla část potenciometrické pH-titrační křivky nad pH 9 a pod pH 5 brána do regresní analýzy a odhad pouze disociačních konstant  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$ ,  $pK_{a4}$ ,  $pK_{a5}$  byl proveden při 25°C programy ESAB a HYPERQUAD.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Disociační konstanty, Eltrombopag, spektrofotometrická titrace, potenciometrická titrace, SQUAD(84), REACTLAB, ESAB, HYPERQUAD

## ANNOTATION

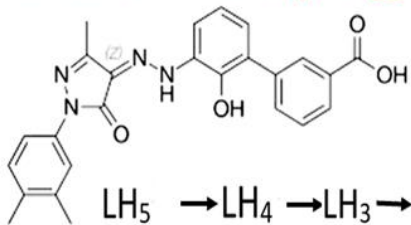
Potentiometric and spectrophotometric pH-titrations of the multiprotic drug Eltrombopag for dissociation constants determination were compared. Eltrombopag treats low blood platelet counts in adults with chronic immune idiopathic thrombocytopenia ITP. Eltrombopag exhibits five protonatable sites in a pH range of 2 to 10, where two  $pK$  are well separated ( $\Delta pK > 3$ ), while the other three are near dissociation constants. According to MARVIN prediction, in the neutral medium Eltrombopag occurs in the slightly water soluble form  $LH_3$  that can be protonated to the soluble molecules  $LH_4$  and  $LH_5$ . The molecule  $LH_3$  can be dissociated to still difficultly soluble molecules  $LH$ ,  $LH$  and  $L$ . The set of spectra upon pH from 2 to 10 in the 300 to 625 nm exhibits sensitivity of chromophores to a pH change. Due to limited solubility of Eltrombopag above pH 9,5 the protonation was studied up to pH 10. Five dissociation constants can be reliably determined with REACTLAB and SQUAD(84) leading to the same value. From a dependence on ionic strength the thermodynamic dissociation constants were estimated at 25°C and 37°C:  $pK_{a1}^T = 2.69$  and 3.38,  $pK_{a2}^T = 6.97$  and 5.79,  $pK_{a3}^T = 7.13$  and 7.12,  $pK_{a4}^T = 7.65$  and 7.54,  $pK_{a5}^T = 8.30$  and 9.43. Since pH above 10 and pH down 5 occurs in a titrated solution the very fine precipitate of Eltrombopag which is initially forming a slight opalescence, this part of the potentiometric titration curve pH over 9 and pH down 5 was not taken into regression analysis to estimate  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$ ,  $pK_{a4}$ ,  $pK_{a5}$  only at 25°C with ESAB and HYPERQUAD.

## KEYWORDS

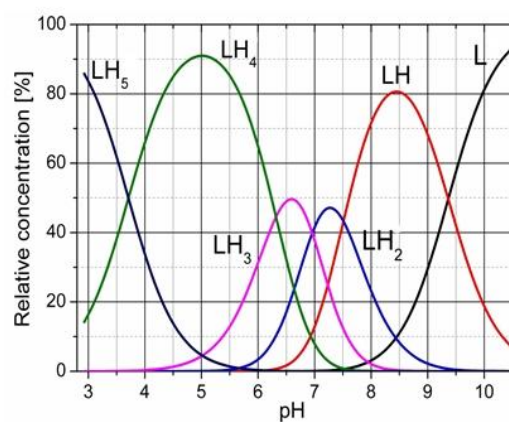
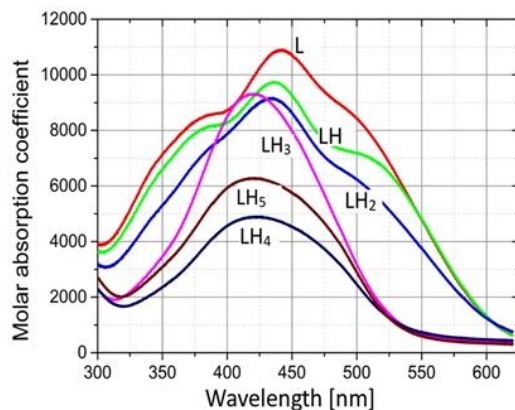
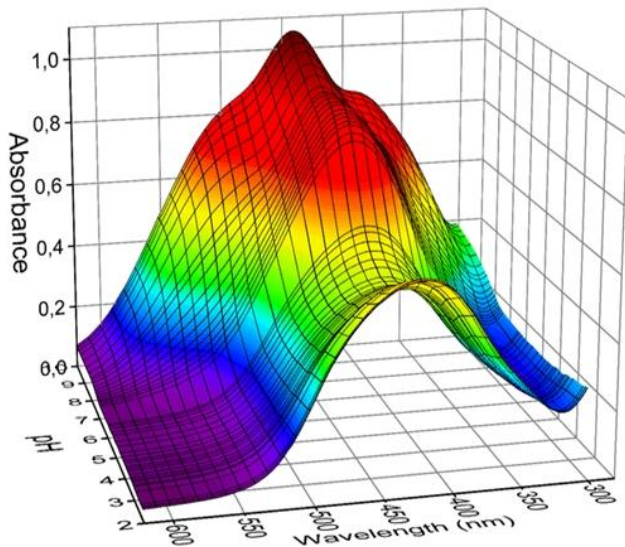
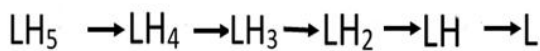
Dissociation constants, Eltrombopag, spectrophotometric titration, potentiometric titration, SQUAD(84), REACTLAB, ESAB, HYPERQUAD

# GRAFICKÁ ANOTACE

## Eltrombopag



	25C	37C
pK1 =	2,69	3,38
pK2 =	6,97	5,79
pK3 =	7,13	7,12
pK4 =	7,65	7,54
pK5 =	8,30	9,43



# OBSAH

Úvod.....	17
1 Literární část.....	18
1.1 Studované léčivo - Eltrombopag.....	18
1.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti.....	18
1.1.2 Mechanismus účinku.....	18
1.1.3 Farmakokinetické vlastnosti.....	19
1.1.4 Terapeutické indikace.....	19
2 Teoretická část.....	20
2.1 Disociační/protonační konstanty a jejich stanovení.....	20
2.1.1 Disociační konstanta.....	20
2.1.2 Protonační konstanta.....	21
2.1.3 Debye-Hückelův zákon.....	22
2.2 Potenciometrická titrace.....	22
2.2.1 Chemický model pH-potenciometrickou titrací.....	23
2.2.1.1 Program ESAB.....	23
2.2.1.2 Program HYPERQUAD.....	24
2.3 Spektrofotometrická titrace.....	24
2.3.1 Určení chemického modelu spektrofotometricky.....	25
2.3.1.1 Program SQUAD (84).....	26
2.3.1.2 Program REACTLAB™ EQUILIBRIA.....	26
2.3.2 Určení počtu světla absorbujících částic ze spekter.....	27
3 Experimentální část.....	30
3.1 Použité chemikálie a roztoky.....	30
3.2 Standardizace odměrných roztoků.....	31
3.2.1 Kyselina chlorovodíková, HCl.....	31
3.2.2 Hydroxid draselný, KOH.....	32
3.3 Pístová mikrobyreta a její kalibrace.....	32
3.4 Čištění přívodních hadiček u spektrofotometrické titrace.....	33
3.5 Uspořádání experimentu a parametry použitých přístrojů.....	33
3.6 Postup potenciometrické a spektrofotometrické titrace.....	34
4 Výsledky a jejich diskuse.....	36
4.1 Predikce disociačních konstant.....	36

4.2	Analýza spekter .....	38
4.3	Analýza potenciometrických titračních dat.....	47
5	Závěr.....	51
6	Použitá literatura.....	53
7	Přílohová část .....	57

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obr. 1 - Strukturní vzorec Eltrombopagu .....	18
Obr. 2 - Mechanismus účinku Eltrombopagu .....	19
Obr. 3 - Rozklad zdrojové absorbanční matice.....	27
Obr. 4 - Catellův graf úpatí vlastních čísel. ....	28
Obr. 5 - Skleněná elektroda HC 103 (THETA '90).....	33
Obr. 6 - Schéma aparatury používané k měření léčiv .....	34
Obr. 7 - Strukturní vzorec a jednotlivé fragmenty s predikovanými makrodisociačními konstantami Eltrombopagu. ....	36
Obr. 8 - 3D absorbanční responzní plocha Eltrombopagu.....	38
Obr. 9 - Určení počtu světlo-absorbujících částic protonačních rovnováh.....	39
Obr. 10 - V souboru spekter bylo vybráno pět analytických vlnových délek a až e, při kterých byly vyneseny absorbanční-pH křivky. ....	40
Obr. 11 - Absorbanční-pH křivky .....	41
Obr. 12 - Dekonvoluce.....	41
Obr. 13 - Inputy dat absorbanční matice znázorňují čtyři oblasti vybraných vlnových délek 2D-absorbanční responzní plochy souboru spekter. ....	42
Obr. 14 - Graf molárních absorpčních koeficientů pro šest různě protonovaných částic Eltrombopagu proti vlnové délce (horní část). Odpovídající distribuční diagram relativní koncentrace šesti různě protonovaných částic Eltrombopagu (dolní část). ....	45
Obr. 15 - Analýza protonačních rovnováh Eltrombopagu programem ESAB. ....	47
Obr. 16 - Distribuční diagram relativní koncentrace různě protonovaných částic L, LH, LH <sub>2</sub> , LH <sub>3</sub> a LH <sub>4</sub> Eltrombopagu v závislosti na pH při 25°C .....	47
Obr. 17 - Stanovené thermodynamické disociační konstanty léčiva Eltrombopag. ....	52
Tabulka 1 - Příprava roztoku léčiva.....	30
Tabulka 2 - Závislost pH komerčních pufrů na teplotě. ....	31
Tabulka 3 - Standardizace HCl. ....	31
Tabulka 4 - Standardizace KOH. ....	32
Tabulka 5 - Kalibrace mikrobyret.....	32
Tabulka 6 - Přehled predikovaných hodnot pK <sub>a</sub> u protonovaných center A až F.....	43
Tabulka 7 - Výsledná tabulka spektrofotometrického stanovení pK <sub>a</sub> .....	43
Tabulka 8 - Výsledná tabulka potenciometrického stanovení pK <sub>a</sub> .....	50

## **SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK**

ITP	Idiopatická trombocytopenická purpura
JAK-STAT	Janusova kináza a signální transkriptor a aktivátor transkripce
XE	Extrahovaná chyba
RE	Reálná chyba
RSS	The residual sum of squares - reziduálová suma čtverců



## Úvod

Cílem diplomové práce bylo stanovení thermodynamických disociačních konstant léčiva Eltrombopag. Léčivo s garancí vysoké čistoty bylo dodáno společností ZENTIVA GROUP, Ltd. (Praha). Acidobazické vlastnosti léčiv určují, zda a za jakých podmínek bude látka v disociované iontové nebo neiontové formě, což má zásadní vliv na jeho rozpustnost a hlavně na rychlost rozpouštění v gastrointestinálním traktu a v propustnosti přes biologické membrány. Přesné stanovení disociačních konstant je tak často nutné v různých chemických a biochemických oblastech. Samotné stanovení disociačních konstant lze provádět spektrofotometrickými metodami v UV/VIS oblasti a potenciometricky.

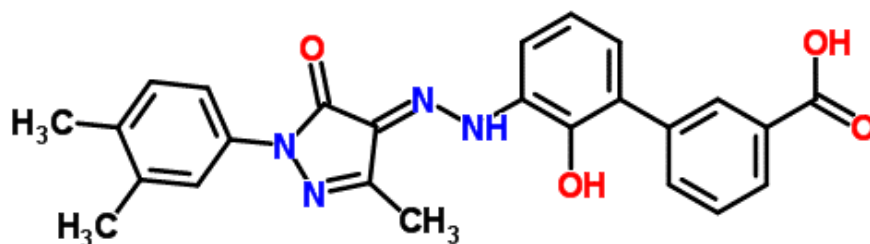
V diplomové práci byly regresní analýzou dat získaných metodami spektrofotometrické a potenciometrické titrace na základě nejlepší těsnosti proložení stanoveny smíšené disociační konstanty  $pK_a$ . Ze závislosti stanovených smíšených disociačních konstant na odmocnině z iontové síly byly při teplotách 25°C a 37°C pomocí regresní analýzy Debye-Hückelova vztahu stanoveny thermodynamické disociační konstanty.

# 1 Literární část

## 1.1 Studované léčivo - Eltrombopag

### 1.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

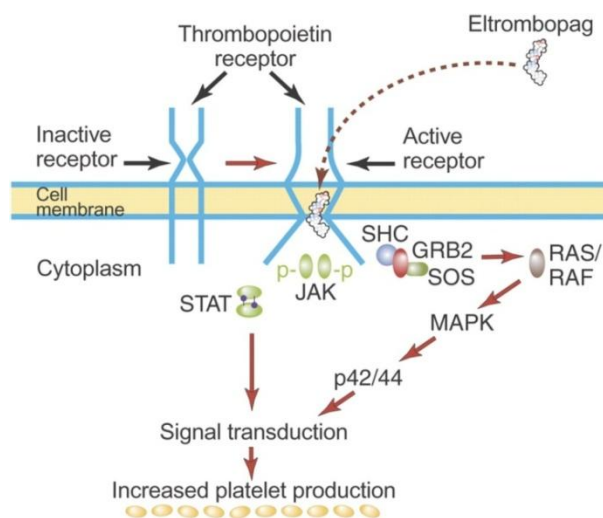
Chemický název látky podle IUPAC zní 3'-[2-[(2Z)-1-(3,4-dimethylphenyl)-1,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-4H-pyrazol-4-ylidene]hydrazinyl]-2'-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-karboxylová kyselina (obr. 1). Cytostatikum má i své synonymní označení Eltrombopagum. Sumární vzorec látky je  $C_{25}H_{22}N_4O_4$ , molekulová hmotnost  $442.466 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Eltrombopag lze nalézt pod registračním číslem CAS 496775-61-2. Na trhu se vyskytuje pod obchodními značkami Promacta nebo Revolade. Jedná se o oranžovou pevnou látku s rozpustností ve vodě  $0.0103 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ [1].



Obr. 1 - Strukturní vzorec Eltrombopagu [2].

### 1.1.2 Mechanismus účinku

Eltrombopag patří do farmakoterapeutické skupiny hemostyptika, hemostatika. Perorálně podávané léčivo Eltrombopag je nízkomolekulární perorální agonista receptoru pro trombopoetin. Selektivně se váže na transmembránovou doménu trombopoetinového receptoru (cMpl) na povrchu krevních destiček, megakaryocytů a prekurzorů megakaryocytových buněk, a tím zvyšuje produkci trombocytů. Tento účinek je důsledkem aktivace signální dráhy JAK-STAT (Janusova kináza a signální transduktor a aktivátor transkripce), která dále vede ke zvýšené proliferaci a diferenciaci megakaryocytů a následnému zvýšení počtu trombocytů (Obr. 2) [3].



Obr. 2 - Mechanismus účinku Eltrombopagu [4].

### 1.1.3 Farmakokinetické vlastnosti

Po perorálním podání dochází ke vstřebání Eltrombopagu v trávicím ústrojí a za přibližně 4 - 6 hodin je dosaženo maximální sérové koncentrace. Po vstřebání se váže na transportní plazmatické bílkoviny, kdy se jedná především o albumin. Pomocí štěpení, oxidace a konjugace s kyselinou glukuronovou, glutathionem nebo cysteinem dochází k primární metabolizaci Eltrombopagu [5]. Primárně jsou metabolity léčiva eliminovány stolicí (59 %) a zbytek je vyloučen do moči. S polyvalentními kationty (Fe, Ca, Mg, Al, Se a Zn) vytváří léčivo cheláty, což je příčinou snížené absorpce léčiva a výrazného snížení jeho sérové koncentrace. Antacida, různé minerální a polyvitamínové doplňky stravy nebo mléčné výrobky se z tohoto důvodu nedoporučují užívat současně s tímto léčivem [6].

### 1.1.4 Terapeutické indikace

Léčivo se stalo účinným přípravkem v léčbě idiopatické trombocytopenické purpury (ITP). ITP je autoimunitní onemocnění, při kterém protilátky proti krevním destičkám urychlují destrukci krevních destiček a nebo může být narušena produkce krevních destiček vlivem těchto protilátek, které mohou poškodit megakaryocyty. I přes to, že ITP mohou být závažné, známky krvácení jsou obvykle nepatrné. Trvale nízký počet krevních destiček ( $<20,000/\text{mm}^3$ ) je spojen se zvýšeným rizikem závažného krvácení, jako je například intrakraniální hemoragie (intrakraniální krvácení) [7]. Eltrombopag zvyšuje počet trombocytů, snižuje riziko krvácivých komplikací a v porovnání s jinými metodami léčby pacientů trpících ITP je považován za jeden z nejúčinnějších [8].

## 2 Teoretická část

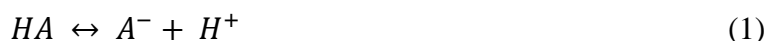
### 2.1 Disociační/protonační konstanty a jejich stanovení

Disociační/protonační konstanty jsou velmi důležité jak při analýze léčiv, tak i při interpretaci jejich mechanismu účinku, protože jsou klíčovými parametry pro označení rozsahu ionizace molekul v roztoku při různých hodnotách pH. Disociační/protonační konstanty organických sloučenin hrají velmi zásadní roli v mnoha analytických postupech, kterými jsou acidobazické titrace, extrakce rozpouštědlem a tvorba komplexů. V souvislosti s objevy a vývojem nových farmaceutických léčiv je význam stanovení  $pK_a$  zdůrazněn skutečností, že přes 60 % všech známých farmaceutických látek jsou slabé kyseliny nebo báze. Fyzikálně-chemické vlastnosti těchto farmaceutických látek jako lipofilita, rozpustnost a propustnost přes biologické membrány, jsou často závislé na pH. Disociační/protonační konstanty hrají klíčovou úlohu při vývoji nových léčiv, kde je důležitá znalost ionizovaného stavu určité funkční skupiny a porozumění farmakokinetickým a farmakodynamickým vlastnostem léčiv. Tomuto tématu je věnován značný zájem v posledních publikacích [9 - 18].

Pro stanovení disociačních konstant byla popsána řada metod, kterými jsou potenciometrie, UV/VIS spektrofotometrie, nukleární magnetická rezonance a také konduktometrie. Nejdůležitější a široce používanými metodami jsou potenciometrická a spektrofotometrická titrace díky snadnému použití a nízkým nákladům [9].

#### 2.1.1 Disociační konstanta

Disociace slabého elektrolytu vede na rovnovážný stav, kdy část látky zůstává ve své nedisociované formě a zbytek ve tvaru příslušných iontů. Acidobazickou rovnováhu disociační reakce slabého elektrolytu HA je možné vyjádřit rovnicí:



Míra, do jaké je elektrolyt schopen disociace, tj. síla slabého elektrolytu, je vyjádřena údajem o velikosti disociační konstanty  $K_a$ . Aktivitní výraz  $K_a$  lze slovně definovat a to jako podíl ze součinu aktivit konečných látek umocněných na stechiometrické koeficienty a ze součinu aktivit výchozích látek rovněž umocněných na stechiometrické koeficienty:

$$K_a(p, T) = \frac{a_{H^+} \cdot a_{A^-}}{a_{HA}} = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \frac{\gamma_{A^-} \gamma_{H^+}}{\gamma_{HA}}, \quad (2)$$

kde  $\gamma$  představuje aktivitní koeficient a symboly iontů v hranatých závorkách představují koncentrace nedisociovaných/disociovaných forem. Ve zředěných roztocích se hodnoty aktivitních koeficientů blíží jedné.

Koncentrační disociační konstanta  $K_c$  kyseliny HA, jejichž velikost závisí na iontové síle roztoku, je pro případ stechiometrické rovnice  $HA \leftrightarrow A^- + H^+$  definována vztahem:

$$K_c = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad (3)$$

Pro disociační reakce uskutečněné při konstantní iontové síle jsou definovány tzv. smíšené disociační konstanty vztahem:

$$K_{a,j} = \frac{[H_{j-1}L]a_{H^+}}{[H_jL]} \quad (4)$$

Při výpočtu smíšené disociační konstanty je použita jak koncentrace, tak i aktivita. Potenciometricky měřené pH totiž odpovídá zápornému dekadickému logaritmu aktivity vodíkových kationtů. Tyto konstanty se nacházejí v experimentech, kde jsou hodnoty pH stanoveny pomocí skleněné a referenční elektrody, standardizované na mezinárodně uznávanou praktickou aktivitní stupnici  $pH = pa_{H^+}$  [19].

### 2.1.2 Protonační konstanta

Protonaci anionu  $L^{z-1}$  lze dle Brönstedovy teorie podle rovnice  $L^{z-1} + H^+ \leftrightarrow HL^z$  charakterizovat protonační thermodynamickou konstantou dle vztahu:

$$K_H = \frac{a_{HL^z}}{a_{L^{z-1}}a_{H^+}} = \frac{[HL^z]}{[L^{z-1}][H^+]} \frac{\gamma_{HL^z}}{\gamma_{L^{z-1}}\gamma_{H^+}} \quad (5)$$

Pokud se jedná o vícesytnou molekulu, je báze léčiva protonována na vícesytnou kyselinu v několika krocích, které však mohou být vyjádřeny jednou *celkovou protonační konstantou*  $\beta_{qr}$ . Protonační rovnováhou mezi aniontem L léčiva a protonem H vznikají

soubory různě protonovaných částic L, LH, LH<sub>2</sub>, LH<sub>3</sub>, apod., zastoupených  $p$  počtem forem,  $(q, r)_i$ ,  $i = 1, \dots, p$ , kde index  $i$  popisuje jejich konkrétní stechiometrii. Obecný vzorec pro tyto protonované částice je L<sub>q</sub>H<sub>r</sub>. Celková protonační konstanta  $\beta_{qr}$  (konstanta stability) je poté vyjádřena rovnicí (6) [19].

$$\beta_{qr} = \frac{[L_q H_r]}{[L]^q [H]^r} = \frac{c}{l^q h^r} \quad (6)$$

### 2.1.3 Debye-Hückelův zákon

Závislost smíšené disociační konstanty  $K_a$  na iontové síle  $I$  v disociační rovnováze  $HL^z \leftrightarrow L^{z-1} + H^+$ , kdy mají oba ionty efektivní průměr iontu  $\bar{a}$  přibližně stejně velký. Thermodynamická disociační konstanta je vyjádřena vztahem  $K_a^T = a_{H^+} a_{L^{z-1}} / a_{HL^z}$ , vysolovací koeficient  $C = C_L - C_{HL}$  a iontová síla  $I = 0.5 \sum_{i=1}^n c_i z_i$ . Rozšířený Debye-Hückelův zákon poté vyjadřuje tuto závislost:

$$pK_a = pK_a^T - \frac{A(1-2z)\sqrt{I}}{(1+B\bar{a}\sqrt{I})} + (C_L - C_{HL})I, \quad (7)$$

kde  $A = 0.5112 \text{ mol}^{-1/2} \text{ l}^{1/2} \text{ K}^{3/2}$  a  $B = 0.3291 \text{ mol}^{-1/2} \text{ m}^{-1} \text{ l}^{1/2} \text{ K}^{1/2} 10^{10}$  (pro vodný roztok při 25°C) [20].

Pokud se jedná o omezený rozsah iontových sil ( $I \leq 0.1$ ), lze vztah uvádět bez vysolovacího koeficientu a výsledkem je zkrácený Debye-Hückelův zákon:

$$pK_a = pK_a^T - \frac{A(1-2z)\sqrt{I}}{(1+B\bar{a}\sqrt{I})} \quad (8)$$

## 2.2 Potenciometrická titrace

Pro stanovení rovnovážných konstant ve vodném roztoku lehce rozpustných sloučenin se velmi často používá potenciometrická pH titrace. Pro kyseliny a zásady s hodnotou  $\log K$  mezi 2.5 a 10.5 lze přesným měřením získat dobře reprodukovatelné výsledky ( $\log K \pm 0.03$ ). Potenciometrická pH titrace je omezena rušivým vlivem interferencí souvisejících s titrací ve

vodném prostředí, dále při titraci analyt překonává pufrační účinek vody. Většina sloučenin jsou ve vodě špatně rozpustné a přesné určení jejich disociačních/protonačních konstant je pro potenciometrickou titraci poměrně složitý problém, jelikož přesnost potenciometrické indikace je omezena detekčním limitem  $10^{-4}$  M [9, 21].

Hodnota poměru  $[H_{j-1}L]/[H_jL]$  stanovená potenciometrickou titrací vede k určení podmíněných koncentračních konstant  $pK_C$ , které jsou závislé jenom na koncentraci. Při studii protonace při nízké iontové síle nebo při více iontových silách, je možné získat extrapolací v bodě nulové iontové síly thermodynamickou disociační konstantu  $pK_a^T$  [19].

## 2.2.1 Chemický model pH-potenciometrickou titrací

Chemickým modelem se v rovnováhách rozumí počet částic rovnovážné směsi, jejich stechiometrie, jejich konstanty stability a další fyzikální konstanty, kterými mohou být křivky například molárních absorpčních koeficientů. Dříve představovala potenciometrická titrace standardní metodu pro stanovení disociačních konstant díky své přesnosti a také díky dostupným, rychlým a automatizovaným přístrojům. Při potenciometrické titraci se vzorek titruje kyselinou nebo hydroxidem s použitím článku skleněné pH-elektrody. Hodnota smíšené disociační konstanty  $pK_a$  je vypočtena z polovičního bodu ekvivalence dané titrační křivky. K zjištění bodu ekvivalence slouží metoda druhé derivace pH proti spotřebě titračního činidla. U potenciometrické titrace je nutno ke stanovení disociačních konstant použít koncentrace léčiva vyšší než  $10^{-3}$  M [22].

### 2.2.1.1 Program ESAB

Regresní analýzou potenciometrické acidobazické titrační křivky programem ESAB lze určit současně *společné* i *specifické parametry*. ESAB aplikuje metodu nejmenších čtverců při analýze experimentálních titračních dat a hledá nejlepší odhad zpřesňovaných parametrů na základě nejtěsnějšího proložení vypočtených titračních křivek experimentálními body. Mírou věrohodnosti určených parametrů a testovaného modelu je vždy těsnost proložení.

Minimalizace reziduální sumy čtverců čili účelové funkce je možná, pokud jsou naměřené hodnoty pH dostatečně spolehlivé. Hledání minima účelové funkce představuje totiž hledání dolíčku eliptického hyperparaboloidu ve vícerozměrném prostoru o  $m+1$

rozměrech, kde  $m$  představuje počet neznámých odhadovaných parametrů. K vyčíslení odhadu směrodatných odchylek stanovovaných parametrů slouží pak poslední vrstevnice v okolí nalezeného minima [23].

Účelová funkce čili reziduální součet čtverců  $U(b)$  je definován:

$$U(b) = \sum_{i=1}^n w_i (V_{exp.} - V_{vypoč.})^2 = \sum_{i=1}^n w_i e_i^2, \quad (9)$$

kde  $w_i$  je statistická váha, která je definována rovnicí [20]:

$$\frac{1}{w_i} = s_i^2 = s_E^2 + \left[ \frac{dE_i}{dV_i} \right]^2 \cdot s_V^2 \quad (10)$$

S dobrým instrumentálním vybavením bývá obvykle  $s_E = 0.1$  mV nebo 0.01 jednotek pH a  $s_V = 0.0005$  až  $0.0020$  cm<sup>3</sup>.

### 2.2.1.2 Program HYPERQUAD

Program HYPERQUAD používá účelovou funkci formulovanou v maticovém zápisu  $U = r^T W r$ , kde  $r$  je vektor reziduí reprezentující měření v mV nebo v jednotkách pH a  $W$  matice vah. K minimalizaci objektivní funkce je u tohoto programu použit Gauss-Newton-Marquardtův algoritmus. Kritérium nejlepšího proložení je tzv. SIGMA kritérium, definované vztahem

$$SIGMA = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n w_i r_i^2}{n-m}}, \quad (11)$$

kde  $n$  je počet bodů,  $m$  je počet parametrů a statistická váha  $w_i$  je počítána z odhadů chyb závisle proměnné zde v pH. Tento program analyzuje experimentálně naměřená data (pH, V) potenciometrických titrací [24].

## 2.3 Spektrofotometrická titrace

Alternativou potenciometrické titrace jsou spektrofotometrické metody, které jsou obecně velmi citlivé, a proto vhodné pro studium chemické rovnováhy v roztocích. UV-VIS



spektrofotometrie je používána i za předpokladu, že je nízká rozpustnost sloučeniny ve vodě a tedy i nízká koncentrace vzorků pro stanovení  $pK_a$  pomocí potenciometrické titrace. Hlavní výhodou této metody je vysoká citlivost i při koncentraci látky  $10^{-6}$  M, proto je metoda vhodná i pro látky s velkými molárními absorpčními koeficienty. Spektrofotometrická titrace vyžaduje přítomnost aktivního chromoforu ve studované sloučenině, a to v blízkosti ionizačního (čili protonačního) centra molekuly, kdy totiž disociací protonu u chromoforu dochází ke změně absorpce světla daného chromoforu. Spektra jsou kontinuálně zaznamenávána v průběhu titrace pomocí spektrálního přístroje. Absorbanční spektra vzorku se během titrace mění a indikují koncentraci neutrálních a ionizovaných částic. K největší změně absorpce dochází v hodnotě pH, která odpovídá hodnotě disociační konstanty  $pK_a$  [25].

Podstatou ultrafialové a viditelné spektrometrie je absorpce ultrafialového a viditelného záření, a to zředěnými roztoky molekul. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Molekulová absorpční spektra můžeme proto nazývat spektry elektronovými.

Absorbance je definována jako záporný dekadický logaritmus transmitance, neboli propustnosti, což je relativní část záření prošlého kyvetou se vzorkem. Absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky  $c$  a tloušťce absorbující vrstvy  $l$  dle lineárního vztahu podle Lambert-Beerova zákona  $A = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l$ , kde  $\varepsilon_\lambda$  je molární absorpční koeficient,  $c$  je koncentrace látky v kyvetě délky  $l$  [26].

### 2.3.1 Určení chemického modelu spektrofotometricky

K určování chemického modelu se jeví spolehlivější analýza UV-VIS spekter, a to při využití celého spektra čili naměřené absorbanční matice při více vlnových délkách. S využitím maticového počtu jsou pak regresní maticovou analýzou určovány vedle disociačních konstant i molární absorpční koeficienty všech barevných či světlo-absorbujících částic dané rovnovážné směsi v závislosti na vlnové délce. Platnost Bouguer-Lambert-Beerova zákona je předpokladem vyhodnocení chemického modelu. Absorbance daného  $i$ -tého roztoku pro  $j$ -tou vlnovou délku  $A_{ij}$  je pro jednotkovou délku kyvety vyjádřena vztahem

$$A_{ij} = \sum_p \varepsilon_{p,j} [H_p L] = \sum_p \varepsilon_{j,p} \beta_p [H]^p [L] \quad (12)$$

Grafickou interpretací absorpční matice  $A$  o  $n_s$  řádcích a  $n_w$  sloupcích je absorbanční responzní plocha. Z této absorbanční responzní plochy lze získat řezem při konstantní vlnové délce fotometrickou titrační křivku zde A-pH křivku a řezem při konstantní koncentraci absorbanční spektrum [27].

### 2.3.1.1 Program SQUAD (84)

Program SQUAD je programem, který hledá nejlepší odhady parametrů  $\beta_{pqr}$  a  $\varepsilon_{pqr}$  nelineární regrese metodou nejmenších čtverců založené na minimalizaci účelové funkce

$$RSC = U = \sum_{i=1}^{n_s} \sum_{k=1}^{n_w} (A_{exp,i,k} - A_{calc,i,k})^2 \approx minimum, \quad (13)$$

kde  $A_{i,k,exp}$  je prvkem absorbanční matice, neboli závisle proměnnou a  $A_{i,k,calc}$  je hodnota prvku matice vypočtená programem [23]:

$$A_{calc,i,k} = \sum_{j=1}^{n_c} \varepsilon_{k,j} C_j \quad (14)$$

Na základě těsnosti proložení vypočtené absorbanční responzní plochy experimentálními body se provádí testování navržené hypotézy chemického modelu. Směrodatná odchylka absorbance  $s(A)$  představuje nejdůležitější kritérium těsnosti proložení. Pokud je splněna podmínka, že  $s(A) \approx s_{inst}(A)$  a Hamiltonův R-faktor je menší než 1 %, je hypotéza chemického modelu přijata jako nejpravděpodobnější a model je přijat [19,23].

### 2.3.1.2 Program REACTLAB<sup>TM</sup> EQUILIBRIA

Program REACTLAB byl vyvinut pro stanovení konstant stability z dat získaných spektrofotometrickou titrací. Tento program pracuje na obecných předpokladech. Jde o tzv. *soft modelingovou metodu*, která nevyžaduje pevně zadaný protonační model. Vedle programu S-PLUS je také schopen stanovit počty chromoforů v roztoku faktorovou analýzou a nalézt hledané parametry jako jsou protonační konstanty a molární absorpční koeficienty [28].

### 2.3.2 Určení počtu světla absorbujících částic ze spekter

Počet světlo absorbujících částic se stanovuje metodou faktorové analýzy. Faktorová analýza je statistickou metodou, která slouží k interpretaci rozptylu experimentálních proměnných menším počtem latentních proměnných. Počet světlo-absorbujících částic se stanoví z hodnoty druhého momentu absorbanční matice  $A$ , která se získá z pH-spektrofotometrické titrace.

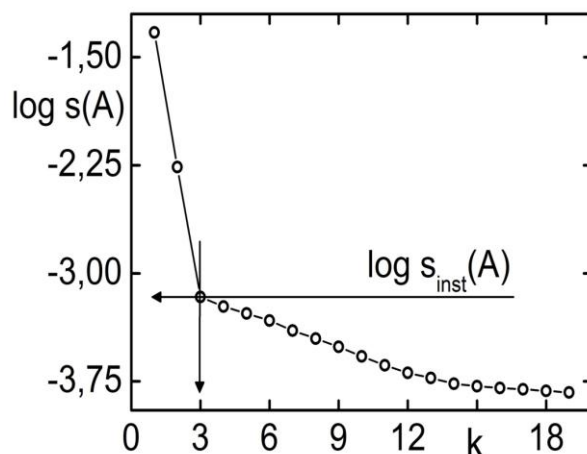
Datovou maticí je absorbanční matice  $A$ , která obsahuje proměnné v  $m$  sloupcích (hodnoty pH) a objekty v  $n$  řádcích (vlnové délky). Zdrojovou maticí  $A$ , která má rozměry  $n \times m$  lze vyjádřit rovnicí  $A = LF + A$  (obr. 3),

$$\begin{array}{|c|} \hline \text{Zdrojová matice} \\ \hline \mathbf{A} \\ \hline \end{array} = \begin{array}{|c|} \hline \text{Matice skóre} \\ \hline \mathbf{L} \\ \hline \end{array} \times \begin{array}{|c|} \hline \text{Matice zátěží} \\ \hline \mathbf{F} \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline \text{Matice chyb} \\ \hline \mathbf{E} \\ \hline \end{array}$$

Obr. 3 - Rozklad zdrojové absorbanční matice.

kde  $L$  o rozměrech  $n \times k$  představuje matici faktorového skóre,  $F$  matice s rozměry  $k \times m$  představuje matici faktorových zátěží,  $E$  matice o rozměrech  $n \times m$  představuje matici chybových faktorů. Zde  $n$  značí počet spekter,  $m$  je počet vlnových délek,  $k$  je index testované komponenty a  $r$  je skutečný počet světlo-absorbujících částic ve směsi.

Prvním grafickým výstupem faktorové analýzy je *Cattelův graf úpatí vlastních čísel*. V tomto Cattelově grafu je vynesena vypočtená funkce  $f(k)$  reziduální směrodatné odchylky absorbance vůči indexu  $k$ , tedy proti počtu komponent. Zlom na křivce je poté hlavním kritériem pro určení počtu komponent  $k$ . Křivka uvedené závislosti bývá v některých případech hyperbolického tvaru, ze které je mnohdy obtížnější extrapolovat zlom extrapolovaných tečen [29].



Obr. 4 - Catellův graf úpatí vlastních čísel.

Kriticky se porovnává vhodnost tří vybraných postupů z metod pro stanovení počtu světlo-absorbujících částic ze spekter:

- 1) **Kankareho metoda:** metoda vychází z druhého momentu  $\mathbf{M}$  absorbanční matice  $\mathbf{A}$  vypočteného podle vztahu:

$$\mathbf{M} = \frac{1}{M} \mathbf{A}^T \mathbf{A} \quad (15)$$

Využitím vlastních čísel  $r_a$  matice  $\mathbf{M}$  se určí reziduální směrodatná odchylka absorbance  $s_k(A)$  podle následujícího vztahu:

$$s_k(A) = \sqrt{\frac{\text{tr}(\mathbf{M}) - \sum_{a=1}^k r_a}{N-k}}, \quad (16)$$

kde  $\text{tr}(\mathbf{M})$  je stopa matice  $\mathbf{M}$  a  $k$  je počet latentních proměnných. Hodnoty  $s_k(A)$ , které se pro různý počet aktivních komponent  $k$  vynášejí do grafu jako funkce  $s_k(A) = f(k)$ . Hledaný počet světlo-absorbujících částic pak odpovídá hodnotě  $k$ , při které  $s_k(A)$  nejlépe aproximuje reziduálovou směrodatnou odchylkou absorbance  $s_{inst}(A)$  pro příslušný spektrofotometr.

- 2) **Metoda reálné chyby:** Měřítkem rozdílu mezi skutečnými hrubými daty a ideálními čistými daty je *reálná chyba*  $RE$ , definována vztahem:

$$RE = \sqrt{\frac{\sum_{a=k+1}^M g_a}{N(M-k)}}, \quad (17)$$

kde  $g_a$  jsou vlastní čísla kovarianční matice  $\mathbf{Z}$  a  $k$  je hledaný počet signifikantních latentních proměnných. Hodnoty  $RE$  se vynášejí graficky jako funkce počtu latentních proměnných  $RE = f(k)$  a dále se srovnává s velikostí odhadu experimentální chyby

daného spektrofotometru. Jako počet světlo-absorbujících částic se udává taková hodnota  $k$ , pro kterou  $RE$  nejlépe aproximuje odhad experimentální chyby.

- 3) **Metoda extrahované chyby:** *Extrahovaná chyba*  $XE$  (nebo také RMS) funguje jako měřítko rozdílu mezi hrubými daty a daty získanými rekonstrukcí v krátkém cyklu pomocí prvních  $k$  hlavních komponent.  $XE$  je definována vztahem:

$$XE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M (A_{ij} - \hat{A}_{ij})^2}{NM}}, \quad (18)$$

kde  $A_{ij}$  je definován jako příslušný prvek absorbanční matice  $A$  a  $\hat{A}_{ij}$  je tento prvek rekonstruovaný pomocí prvních  $k$  latentních proměnných podle vzorce:

$$\hat{A}_{ij} = \sum_{a=1}^k t_{ia} p_{aj}, \quad (19)$$

kde  $t_{ia}$  je prvkem matice latentních proměnných  $T$  a  $p_{aj}$  je prvkem matice zátěží  $P$  [30].

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Použité chemikálie a roztoky

**Léčivo Eltrombopag:** Toto studované léčivo bylo dodáno společností ZENTIVA GROUP, Ltd. (Praha) s deklarovanou čistotou nad 99 %. Léčivo bylo rozpuštěno v alkalických vodných roztocích a po krátké homogenizaci v digitální ultrazvukové lázni použito k měření.

Tabulka 1 - Příprava roztoku léčiva.

Příprava roztoku léčiva o $c$ [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]	
Eltrombopag	
<i>Spektrofotometrie</i>	<i>Potenciometrie</i>
$1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	$1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

**Hydroxid draselný, KOH (1 M):** Hydroxid byl připraven rozpuštěním přesné navážky tuhého KOH (Aldrich chemical Company, USA) v 1 l redestilované vody. Standardizace byla provedena potenciometrickou titrací standardizovanou kyselinou chlorovodíkovou.

**Kyselina chlorovodíková, HCl (1 M):** Příprava kyseliny byla provedena ředěním koncentrované kyseliny chlorovodíkové (p.a. Lachema Brno). Standardizace byla provedena potenciometrickou titrací na navážku pevného HgO za přítomnosti nadbytečného množství KI.

**Oxid rtuťnatý, HgO** (p.a. Lachema Brno) a **jodid draselný, KI** (p.a. Lachema Brno) byly použity pro standardizaci HCl.

**Chlorid draselný, KCl (2 M):** Roztok byl připraven rozpuštěním tuhé látky (p.a. Lachema Brno) v redestilované vodě. Chlorid draselný byl používán pro úpravu iontové síly.

**Fosfátový pufr:** Byl připraven fosfátový pufr o  $c = 0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

**Standardní komerční pufr** využité pro kalibraci pH metru.

Tabulka 2 - Závislost pH komerčních pufrů na teplotě.

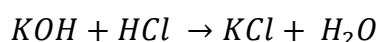
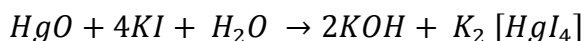
T [°C]	pH pufru A: roztok ftalanu draselného	pH pufru B: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	pH pufru C: roztok boraxu + NaOH
25	4.006	6.865	9.180
37	4.024	6.841	9.088

**Redestilovaná voda:** Pro přípravu všech roztoků byla použita redestilovaná voda odebraná z centrální ionexové úpravny.

## 3.2 Standardizace odměrných roztoků

### 3.2.1 Kyselina chlorovodíková, HCl

Do měřicí nádoby bylo předloženo 25 ml demineralizované vody (redestilovaná voda, která byla 30 minut v ultrazvukové lázni), dále byl přidán a rozpuštěn 1 g KI a navážka HgO, která byla vypočtená na teoretickou spotřebu HCl = 250 µl. Za stálého míchání a probublávání argonem byl roztok titrován pomocí mikrobyrety standardním roztokem HCl a po každém přidavku byla odečtena hodnota pH. Probíhaly následující titrace:



Bod ekvivalence byl následně vyhodnocen metodou derivace. Celý postup potenciometrické titrace byl opakován čtyřikrát. Aritmetický průměr koncentrace ze čtyř reprodukovatelných titrací vede k hodnotě  $c = 1.04417 \text{ mol.dm}^{-3}$ .

Tabulka 3 - Standardizace HCl.

Opakování titrace	1.	2.	3.	4.
Navážka HgO [g]	0.0272	0.0274	0.0276	0.0277
Spotřeba HCl [µl]	242.219	243.712	243.712	242.219
Koncentrace HCl [mol.l <sup>-1</sup> ]	1.0369	1.0382	1.0457	1.0559

### 3.2.2 Hydroxid draselný, KOH

K 15 ml demineralizované vody (redestilovaná voda, která byla 30 minut v ultrazvukové lázni zbavena rozpuštěného vzduchu) v měřicí nádobce bylo pomocí mikrobyrety nadávkováno 250  $\mu\text{l}$  standardního roztoku HCl. Za stálého promíchávání a probublávání argonem byl roztok titrován mikrobyretou standardním roztokem KOH a po každém přidavku byla odečtena hodnota pH.

Bod ekvivalence byl vyhodnocen derivační metodou. Postup potenciometrické titrace byl opakován třikrát. Aritmetický průměr koncentrace ze tří reprodukovatelných titrací vede k hodnotě  $c = 0.81387 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

Tabulka 4 - Standardizace KOH.

Opakování titrace	1.	2.	3.
Spotřeba HCl [ $\mu\text{l}$ ]	250	250	250
Spotřeba KOH [ $\mu\text{l}$ ]	318.713	316.722	321.209
Koncentrace KOH [ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	0.8125	0.8203	0.8088

### 3.3 Pístová mikrobyreta a její kalibrace

K potenciometrické a spektrofotometrické titraci bylo pro přesné dávkování HCl a KOH využito pístových mikrobyret s pístem typu PK1250 (META, Brno). Před samotným měřením byla provedena kalibrace mikrobyret pomocí redestilované vody, která byla odvzdušněna na ultrazvukové lázni a teplotně temperovaná. Z mikrobyrety byl poté vytlačen do suché váženky přesný objem redestilované vody a zvážen na analytických vahách (KERN 870).

Tabulka 5 - Kalibrace mikrobyret.

Kalibrovaná mikrobyreta	A (pro KOH)	B (pro HCl)
Teoretický objem mikrobyrety [ $\mu\text{l}$ ]	1250	1250
Skutečný objem mikrobyrety [ $\mu\text{l}$ ]	1244.08	1244.72
1 dílek stupnice mikrobyrety [ $\mu\text{l}$ ]	0.4976	0.49788



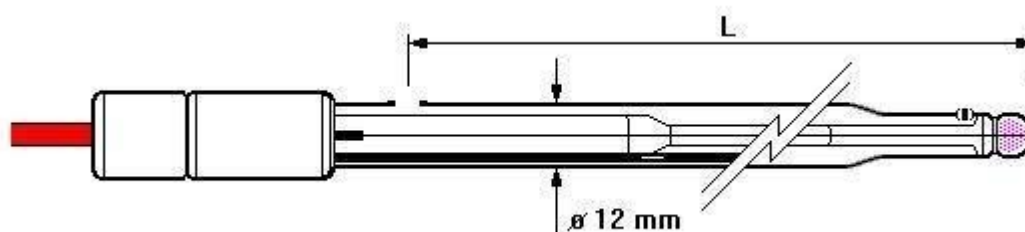
### 3.4 Čištění přívodních hadiček u spektrofotometrické titrace

Léčivo se během titrace adsorbuje na povrch přívodních polyethylenových hadiček spojujících reaktůrek s průtočnou kyvetou. Na základě tohoto zjištění byl navržen postup čištění těchto hadiček před každou spektrofotometrickou titrací:

- 1) Roztokem zředěného KOH byly promývány polyethylenové hadičky a průtoková kyveta po dobu 5 minut.
- 2) Dále následovalo promývání hadiček redestilovanou vodou po dobu 5 minut a naměření kontrolního spektra.
- 3) Před zahájením další titrace byl roztok z reaktůrku odstraněn a vše opakovaně spolu s elektrodou opláchnuto roztokem zředěného KOH, poté redestilovanou vodou a nakonec filtračním papírkem vysušeno do sucha.

### 3.5 Uspořádání experimentu a parametry použitých přístrojů

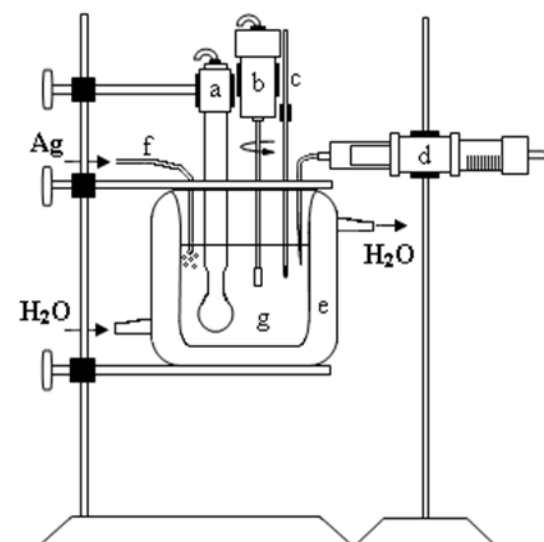
Při potenciometrické a spektrofotometrické titraci byla využita skleněná elektroda HC 103 (THETA '90). Jedná se o kombinovanou skleněnou elektrodu s vysokou přesností a rychlostí odezvy (rozsah pH 0 - 14, rozsah teplot 0 - 70 °C).



Obr. 5 - Skleněná elektroda HC 103 (THETA '90) [31].

Elektroda byla napojena na digitální pH metr typu HANNA HI 3220 (měření pH v rozsahu -2.00 - 20.00 s přesností  $\pm 0.002$  pH, rozsah teplot -20 - 120°C).

Průtočným termostatem ED-5 (JULABO) byla udržována konstantní teplota roztoku umístěného v thermostatovaném reaktůrku. Další součástí experimentálního uspořádání bylo elektrické míchadlo zajišťující homogenizaci roztoku, přívod argonu polyethylenovou hadičkou a ústí pístové mikrobyrety, kterou byl dávkován odměrný roztok.



Obr. 6 - Schéma aparatury používané k měření léčiv: (a) skleněná elektroda, (b) elektrické míchadlo, (c) rtuťový teploměr, (d) mikrobyreta, která je naplněná roztokem KOH či HCl, (e) duplikátorový reaktůrek, (f) hadička pro přívod Ar, (g) měřený roztok léčiva [32].

Spektrofotometrická měření byla provedena na spektrofotometru GBC Cintra 4040. Přístroj měřil v rozsahu vlnových délek 200 - 800 nm, s nastavenou velikostí štěrbin minimálně 0.5 nm a rychlostí měření 5 -7000 nm.min<sup>-1</sup>. Zdrojem záření byla ve viditelné oblasti 50 W wolfram-halogenová lampa a v ultrafialové oblasti 30 W deuteriová lampa. V přístroji byl systém Czerny-Turner využit jako monochromátor a jako detektor fotonásobič. Šum spektrofotometru < 0.0001 A při A = 1.

### 3.6 Postup potenciometrické a spektrofotometrické titrace

Před každou spektrofotometrickou či potenciometrickou titrací byla provedena tříbodová kalibrace stupnice pH, kdy bylo využito tří komerčních pufrů vytemperovaných dle požadovaných podmínek měření na 25°C nebo 37°C.

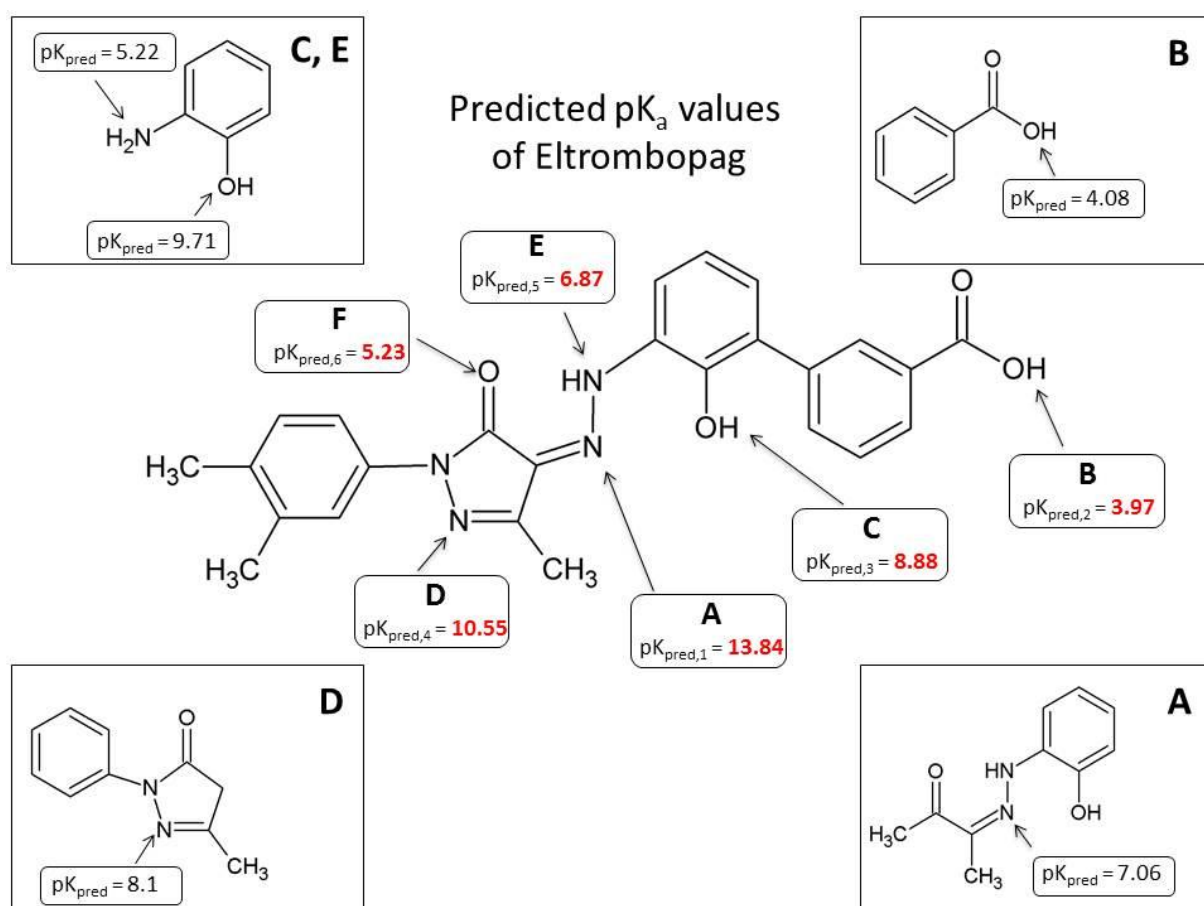
Při stanovení disociačních konstant léčiva potenciometrickou pH-titrací bylo do suchého thermostatovaného reaktůru odměřeno 20 ml roztoku léčiva, dále byl přidán z mikrobyrety standardní roztok HCl pro úpravu požadované počáteční hodnoty pH. Takto připravený roztok byl následně titrován standardním roztokem KOH. Po celý průběh titrace byl roztok probubláván argonem, promícháván elektrickým míchadlem a jeho teplota byla udržována v rozmezí 25.0 ± 0.5°C resp. 37.0 ± 0.5°C.

Při stanovení disociačních konstant léčiva spektrofotometrickou titrací bylo do suchého thermostatovaného reaktůrku odměřeno 20 ml roztoku léčiva, dále byl přidán fosfátový pufr a z mikrobyrety standardní roztok HCl pro úpravu požadované počáteční hodnoty pH. Pro nastavení iontové síly roztoku v reaktůrku byl přidán příslušný objem roztoku KCl. Spektrofotometr GBC Cintra 4040 byl během temperování roztoku v reaktůrku nastaven na základní linii pomocí redestilované vody, vestavěným peristaltickým čerpadlem promíchal obsah měřicí nádoby a po ustálení rovnováhy byla odečtena hodnota pH na pH-metru a bylo změřeno spektrum pro příslušné pH. Následně byl roztok titrován standardním roztokem KOH a pro každou změnu pH bylo změřeno příslušné spektrum. Po celý průběh titrace byl roztok probubláván argonem, promícháván elektrickým míchadlem a jeho teplota byla udržována v rozmezí  $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  resp.  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

## 4 Výsledky a jejich diskuse

### 4.1 Predikce disociačních konstant

Léčivo Eltrombopag má šest funkčních skupin, označených písmeny A, B, C, D, E, F na obr. 7, které mohou být asociované s disociačními konstantami; dvě ionizace jsou asociované s hydroxylovou skupinou a jiné s ionizací atomu dusíku. V následujícím textu jsou náboje iontů vynechány pro jednoduchost a ionty jsou označovány jako různě protonované částice.



Obr. 7 - Strukturální vzorec a jednotlivé fragmenty s predikovanými makrodisociačními konstantami Eltrombopagu.

Makrodisociační konstanty Eltrombopagu byly predikovány zadáním analýzy chemické struktury tohoto léčiva pomocí dvou predikčních programů [33]. ACD/Percepta [34, 35, 36] byla provedena v modelu GALAS, který využívá interní školící sadu více než 31000 individuálních hodnot  $pK_a$  pro přibližně 16000 sloučenin rozpustných ve vodě [37]. Predikce  $pK_a$  programem MARVIN je založena na výpočtu parciálních nábojů atomů, které

jsou součástí analyzované struktury, a to za použití Hammettova-Taftova modelu přiblížení. Predikce programy ACD/Percepta a MARVIN [34, 35] poukazují na podobnou interpretaci výsledků a poskytují predikované hodnoty  $pK_a$  pro všechny zjištěné ionizované místa v molekule. Predikované hodnoty  $pK_a$  (na Obr. 7 zobrazeny červeně) jsou přiřazeny k odpovídajícím ionizačním místům pomocí těchto predikčních programů, které jsou nezbytné u sloučenin s více ionizačními místy. Celá molekula byla dále rozdělena do čtyř pomocných fragmentů (obr. 7), které obsahují funkční skupiny, na nichž dochází k protonaci a tyto predikované hodnoty  $pK_a$  posloužily k porovnání s predikovanými hodnotami u celé struktury molekuly. V protonačním centru B se predikovaná hodnota  $pK_a$  studované molekuly Eltrombopagu blíží predikované hodnotě  $pK_a$  pomocného fragmentu. Centra A, C, D, E, F se vyskytují v místě molekuly, která tvoří poměrně složitou konformaci. Fragmenty, které obsahují těchto pět center, nejsou ovlivněny silným elektronovým polem zbytku molekuly, a proto se jejich predikované hodnoty  $pK_a$  značně liší od hodnot  $pK_a$  predikovaných pro celou molekulu (Tabulka 6).

Pro léčivo Eltrombopag byly predikovány rozličně protonované částice, které se v roztoku vyskytují s obsahem větším než 10 %. Dle distribučního diagramu se Eltrombopag vyskytuje v biologicky fyziologickém pH (5 - 8) jako částice LH<sub>2</sub>.

Tabulka 6 - Přehled predikovaných hodnot  $pK_a$  u protonovaných center A až F a programem MARVIN vypočítaných tautomerů struktury molekuly Eltrombopag.

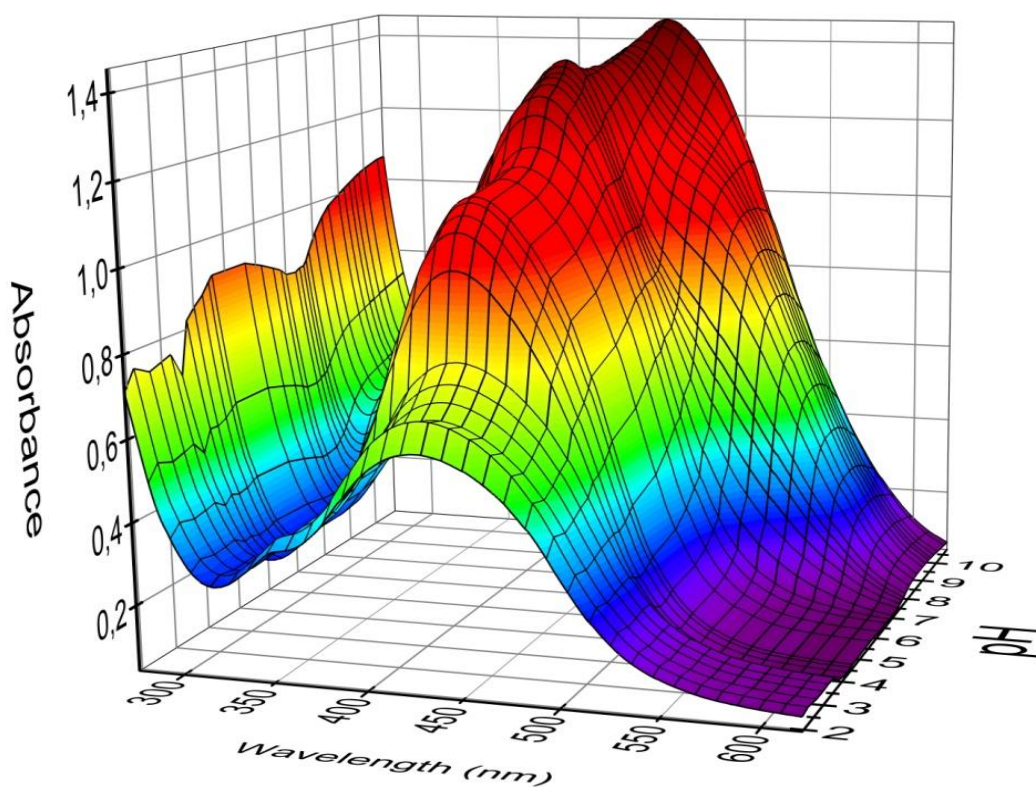
<b>Tautomer, Protonated ionization sites</b>	<b><math>pK_{a1}</math></b>	<b><math>pK_{a2}</math></b>	<b><math>pK_{a3}</math></b>	<b><math>pK_{a4}</math></b>	<b><math>pK_{a5}</math></b>	<b><math>pK_{a6}</math></b>
<b>1 A, B, C</b>	0.13	3.97	9.36	-----	13.13	-----
<b>2 A, B, C, D</b>	4.70	3.61	9.40	-----	14.56	-----
<b>3 B, C, D</b>	0.51	3.97	7.20	6.22	-----	-----
<b>4 B, C, F</b>	-----	3.94	12.17	1.53	-----	5.23
<b>5 B, C</b>	-0.80	3.97	7.68	-----	-----	-----
<b>6 B, C, D, F</b>	1.05	3.96	7.78	10.15	-----	5.54
<b>7 B, C, D</b>	-----	4.00	7.68	2.89	-----	-----
<b>Auxiliary fragments</b>	For <b>B</b> is 4.08	For <b>E</b> is 5.22	For <b>A</b> is 7.06	For <b>D</b> is 8.1	For <b>C</b> is 9.71	Not found
<b>Site in molecule of Eltrombopag</b>	For <b>B</b> is 3.97	For <b>E</b> is 6.87	For <b>A</b> is 13.84	For <b>D</b> is 10.55	For <b>C</b> is 8.88	For <b>F</b> is 5.23

Byla provedena predikce ionizačních fragmentů programem MARVIN a výsledky se podobaly hodnotám, které byly námi vyhodnoceny z naměřených dat. Z nabídky komerčních programů se proto program MARVIN jeví jako nejvhodnější k predikci disociačních konstant Eltrombopagu. Predikční program MARVIN nabízí následující předpovědi sedmi možných

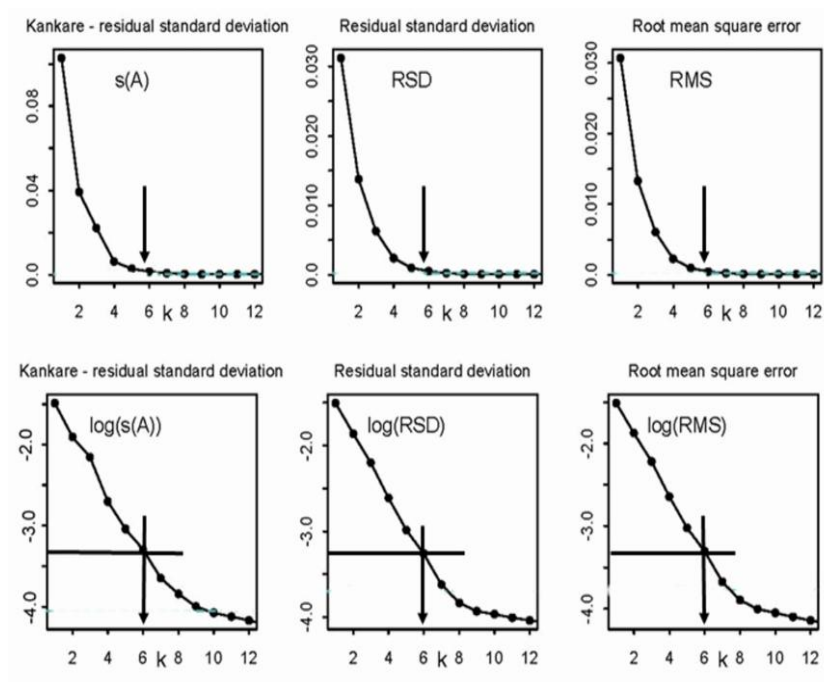
tautomerů Eltrombopagu, generovaných tímto programem včetně jejich postupných disociačních konstant (Tabulka 6). Přidělení těchto pěti odhadů jednotlivým protonačním centřům je zatím věcí odborné spekulace. Ukázalo se, že vhodnou nápovědou mohou být programem MARVIN provedené predikční odhady  $pK_a$  čtyř pomocných fragmentů, odvozených z molekuly Eltrombopagu.

## 4.2 Analýza spekter

Většina léčiv jsou sloučeniny mírně rozpustné ve vodě a přesné určení hodnot jejich disociačních konstant je náročný proces, a to zejména u potenciometrické titrace, protože použitelnost této metody je omezena jejím detekčním limitem koncentrace, který se pohybuje na hranici  $10^{-4}$  M. Ke stanovení hodnot  $pK_a$  látek s velkou molární absorptivitou byla jako alternativa použita spektroskopická titrace, a to díky své vysoké citlivosti ke koncentraci látky, která je velmi nízká, a to až  $10^{-6}$  M.



Obr. 8 - 3D absorbanční responzní plocha Eltrombopagu představující input dat pro program SQUAD(84) a REACTLAB.

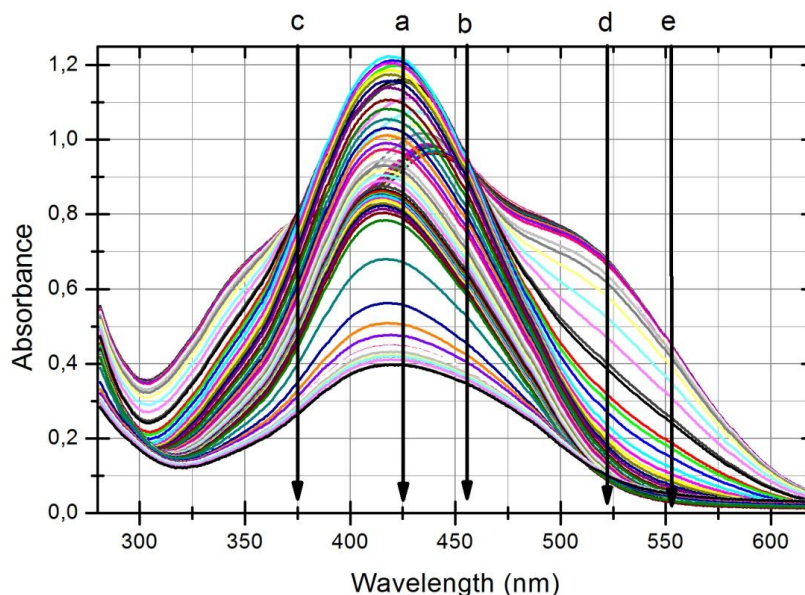


Obr. 9 - Určení počtu světlo-absorbujících částic protonačních rovnováh Eltrombopagu  $k^* = 6$  z absorbanční matice modifikacemi Cattelova indexového grafu vlastních čísel faktorové analýzy vede k šesti světlo-absorbujícím částicím ve směsi.

Studované sloučeniny musí mít vlastní chromofor/chromofory v blízkosti centra ionizace/ionizací, aby protonované/deprotonované částice vykazovaly dostatečné spektrální odlišnosti. Při spektrofotometrické titraci se získává vějíř spekter, kdy každé spektrum odpovídá jiné hodnotě pH. Pro efektivní experimentování pro stanovení disociačních konstant zpracováním spektrálních dat byla použita strategie na základě publikovaného Tutoriálu [38].

Eltrombopag vykazuje složitou molekulární strukturu, uvedenou na Obr. 1 a 7. Ve dvou krocích byly spektrofotometricky sledovány vybrané protonační rovnováhy k analýze dat spekter: v prvním kroku byly spektrální data v podobě absorbanční matice podrobeny analýze hlavních komponent ke stanovení počtu nezávislých světlo-absorbujících částic algoritmem INCIDES [29], (Obr. 10). INCIDES značí pozici zlomového bodu na  $s_k(A) = f(k)$  křivce v grafu pomocí tří nejspolehlivějších metod, a to Kankareho  $s(A)$ , RSD a RSM metoda [29], které udávají  $k^* = 6$  s odpovídající proložením  $s_4^*(A) = 0.4$  mAU. Tato hodnota značí také skutečnou instrumentální chybu  $s_{inst}^*(A) = 0.4$  mAU a  $\log(s_{inst}^*(A)) = -3.4$  spektrofotometru CINTRA 5, GBC, Australie. Počet světlo-absorbujících částic je pomůcka k stanovení protonačního modelu. To znamená, že v roztoku Eltrombopagu se nachází 6 částic: LH<sub>5</sub>, LH<sub>4</sub>, LH<sub>3</sub>, LH<sub>2</sub>, LH, a L a Eltrombopag by měl proto mít pět disociačních konstant. Z důvodu velkého kolísání indexů v grafu závislosti směrodatné odchylky  $s_{inst}(A)$  na počtu vlastních

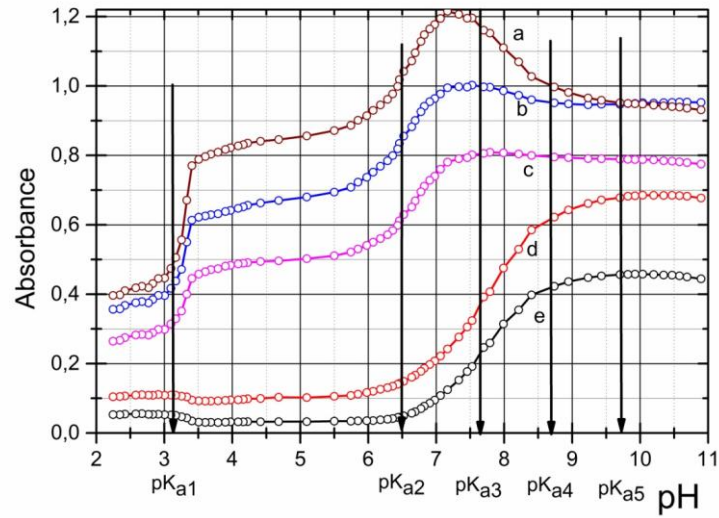
čísel  $k$  je směrodatná odchylka vynesena jako  $\log(s_{inst}(A))$  a počet světlo-absorbujících částic  $p$  lze usuzovat dle zlomu na křivce, kde  $PC(k) = f(k)$ , a tedy  $\log k = -3,4$  (Obr. 7). Tento postup je běžným kritériem pro určení  $p$ . Nízké hodnoty  $s_{inst}^*(A)$  značí, že byl použit velmi spolehlivý spektrofotometr s vyhovující experimentální technikou.



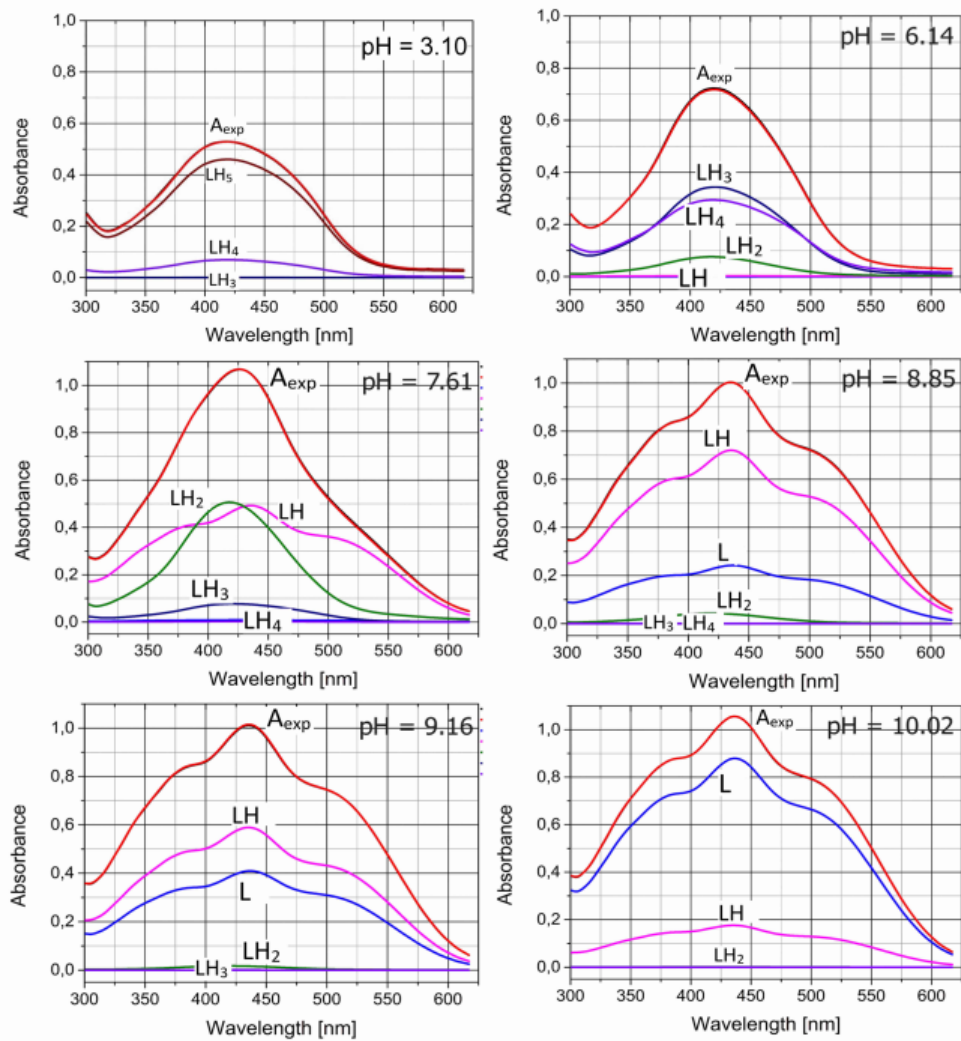
Obr. 10 - V souboru spekter bylo vybráno pět analytických vlnových délek a až e, při kterých byly vyneseny absorbanční-pH křivky.

V matici spekter na Obr. 10, 11 bylo zvoleno pět analytických vlnových délek *a* až *e*, při kterých byly analyzovány absorbanční-pH křivky. Šest následujících grafů na Obr. 12 znázorňuje po sobě jdoucí deprotonační průběh, sledovaný ve spektrálních pásech, kdy bylo každé spektrum podrobena dekonvoluci na spektra různě protonovaných částic v roztoku Eltrombopagu. Při  $\text{pH} = 3.10$  převládá v roztoku částice  $\text{LH}_5$  doprovázená částicí  $\text{LH}_4$ . Při  $\text{pH} = 6.14$  se v roztoku vyskytuje společně s neutrální molekulou  $\text{LH}_3$  částice  $\text{LH}_5$  a  $\text{LH}_4$ , které vykazují absorbanční pásy se stejnou vlnovou délkou absorpčního maxima  $\lambda_{\text{max}}$ . Při  $\text{pH} = 7.61$  je experimentální spektrum rozloženo do tří absorbančních pásů neutrální molekuly  $\text{LH}_3$ , která disociuje na částici  $\text{LH}_2$  a  $\text{LH}$ . Při  $\text{pH} = 8.85$  se společně s částicí  $\text{LH}_2$  a  $\text{LH}$  vyskytuje v roztoku částice  $\text{L}$  a koncentrace této částice v roztoku vzrůstá až do  $\text{pH} = 10.02$ .



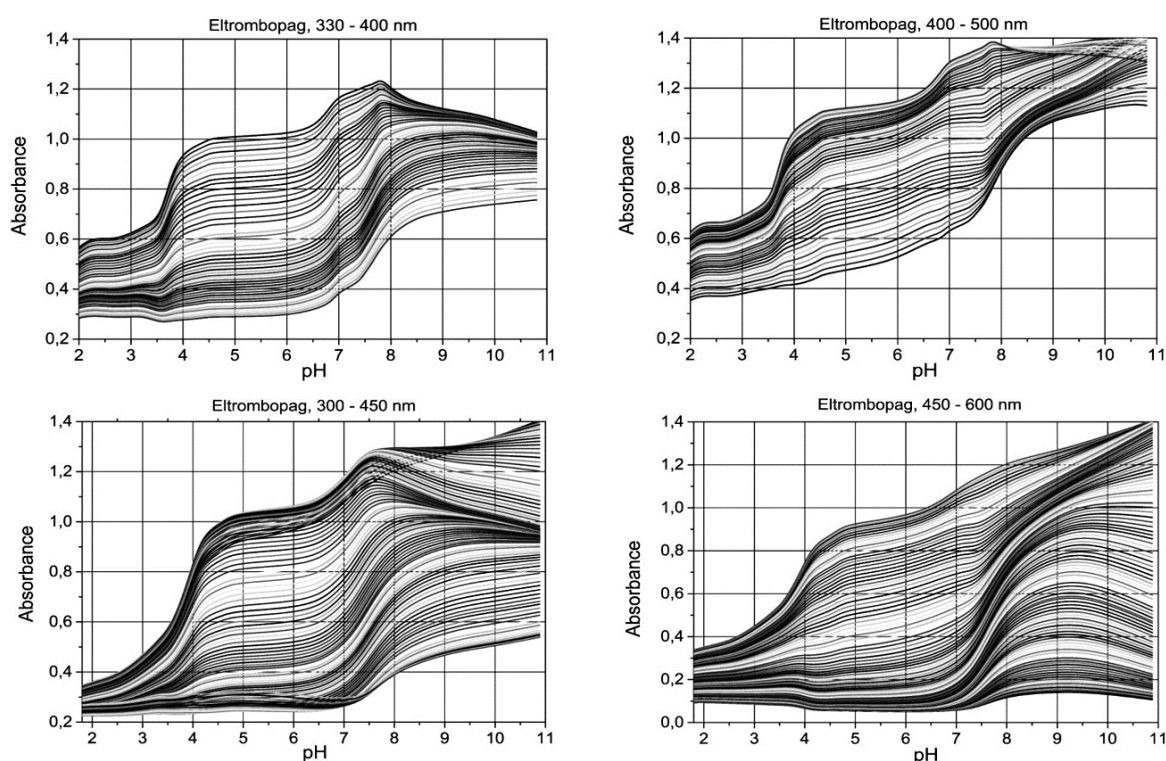


Obr. 11 - Vybrané analytické vlnové délky **a** až **e**, při kterých byly vyneseny absorbanční-pH křivky.



Obr. 12 - Šest následujících obrázků od pH = 3.10 až po pH = 10.02 znázorňuje po sobě jdoucí deprotonační průběh, sledovaný ve spektrech, kdy bylo každé spektrum podrobeno dekonvoluci na spektra různě protonovaných částic v roztoku Eltrombopagu.

Pozornost byla věnována výběru vhodné analytické vlnové délky spektra pro stanovení hodnot  $pK_a$  a to zejména u překrývajících se  $pK_a$  pozorovaných ve sloučeninách, ve kterých jsou ionizované skupiny v symetrických polohách a neovlivňují se. Obr. 13 znázorňuje čtyři pH-spektrofotometrické titrační vějíře spekter monitorovaných při různých vlnových délkách, u kterých jsou chromofory citlivé na změnu pH. Hledání nejlepšího chemického modelu, který obsahuje buď čtyři nebo pět disociačních konstant znázorňuje Tabulka 7: Byla zkoumána čtyři různá spektra o rozsahu vhodných analytických vlnových délek, a tato spektra také ukazují na nejlepší rozsah spekter, ve kterém je aktivní aktuální chromofor a monitoruje protonaci či disociaci protonu v molekule. Byl hledán nejlepší regresní model, a to testováním dvou pracovních hypotéz o protonačním modelu: první se týká čtyř a druhý pěti disociačních konstant. Kritériem věrohodnosti mezi oběma hypotézami byl test těsnosti proložení. Byly také porovnány odhady disociačních konstant pomocí dvou regresních programů SQUAD(84) a REACTLAB. Standardní směrodatná odchylka reziduí a Hamiltonův R-faktor poukazují, že lépe vyhovuje model s pěti disociačními konstantami.



Obr. 13 - Inputy dat absorbanční matice znázorňují čtyři oblasti vybraných vlnových délek 2D-absorbanční responzní plochy souboru spekter při koncentraci Eltrombopagu  $9.5 \cdot 10^{-5}$  M v závislosti na pH a při 25°C.

Tabulka 7 - Výsledná tabulka spektrofotometrického stanovení  $pK_a$ .

Wavelength of spectra range used	330 – 400 nm	400 – 500 nm	300 – 450 nm	450 – 600 nm	300 – 600 nm
Number of spectra measured, $n_s$	43	43	43	43	43
Number of wavelengths, $n_w$	165	235	352	343	750
Number of light-absorbing species, $k^*$	4 or 5	4 or 5	5 or 6	4 or	5 or
Residual standard deviation, $s_k^*(A)$ [mAU]	0.91 or 0.57	1.32 or 0.67	0.96 or 0.51	0.98 or 0.54	0.90 or 0.57

Cattel's scree plot indicating the rank of the absorbance matrix (INDICES)										
Number of spectra measured, $n_s$	43	43	43	43	43					
Number of wavelengths, $n_w$	165	235	352	343	750					
Number of light-absorbing species, $k^*$	4 or 5	4 or 5	5 or 6	4 or	5 or					
Residual standard deviation, $s_k^*(A)$ [mAU]	0.91 or 0.57	1.32 or 0.67	0.96 or 0.51	0.98 or 0.54	0.90 or 0.57					

Estimates of dissociation constants in the searched protonation model											
Dissociation constant	Program	Four pK	Five pK	Four pK	Five pK	Four pK	Five pK	Four pK	Five pK	Four pK	Five pK
$pK_{a1}(s_1), H_5L = H + H_4L$	SQUAD84	3.09(01)	3.09(06)	3.14(00)	3.13(06)	3.13(00)	3.12(04)	3.09(00)	3.09(2)	3.13(00)	3.12(02)
	ReactLab	3.10(00)	3.09(00)	3.14(00)	3.13(00)	3.13(00)	3.12(00)	3.09(00)	3.10(00)	3.12(00)	3.11(00)
$pK_{a2}(s_2), H_4L = H + H_3L$	SQUAD84	6.50(01)	6.52(06)	6.47(00)	6.49(06)	6.49(00)	6.51(04)	6.51(00)	6.49(02)	6.49(00)	6.50(02)
	ReactLab	6.51(00)	6.53(00)	6.48(00)	6.49(00)	6.50(00)	6.51(00)	6.52(00)	6.49(00)	6.49(00)	6.50(00)
$pK_{a3}(s_3), H_3L = H + H_2L$	SQUAD84	7.75(01)	7.62(06)	7.62(00)	7.59(06)	7.78(00)	7.64(04)	7.71(00)	7.60(02)	7.70(00)	7.60(02)
	ReactLab	7.74(00)	7.61(01)	7.62(00)	7.59(01)	7.79(00)	7.66(01)	7.71(00)	7.60(00)	7.71(00)	7.58(00)
$pK_{a4}(s_4), H_2L = H + HL$	SQUAD84	9.00(00)	8.55(06)	9.46(00)	8.97(06)	9.17(00)	8.64(03)	9.50(00)	8.78(02)	9.33(00)	8.69(02)
	ReactLab	9.00(01)	8.51(01)	9.46(01)	8.91(03)	9.20(01)	8.62(02)	9.50(00)	8.75(01)	9.35(00)	8.57(01)
$pK_{a5}(s_5), HL = H + L$	SQUAD84	XXX	10.06(04)	XXX	10.08(04)	XXX	9.99(02)	XXX	9.77(01)	XXX	9.90(01)
	ReactLab	XXX	9.89(02)	XXX	9.98(04)	XXX	9.95(03)	XXX	9.75(01)	XXX	9.75(01)

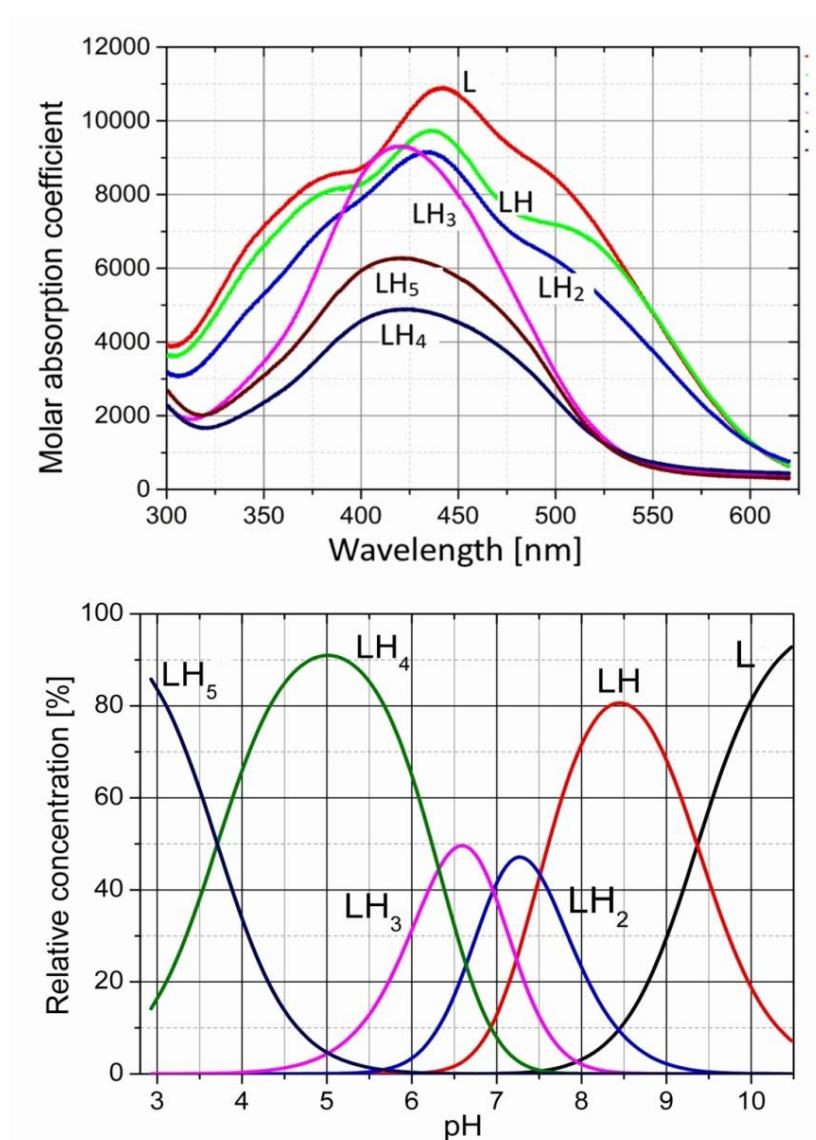
Goodness-of-fit test with the statistical analysis of residuals										
Mean residual $E \varepsilon $ [mAU]	1.84	1.62	2.49	2.29	2.11	1.84	1.70	1.35	1.93	1.65
Standard deviation of residuals $s(\varepsilon)$ [mAU]	0.99	0.94	1.22	1.07	1.37	1.18	1.24	0.99	1.75	1.29
Sigma from ReactLab [mAU]	2.59	2.29	3.28	3.12	2.96	2.65	2.38	1.90	2.73	2.39
Residual-Square-Sum function $RSS$	1.21	1.14	1.423	1.25	1.63	1.38	1.46	1.18	2.07	1.53
Hamilton R-factor from SQUAD84 [%]	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Residual-Square-Sum function $RSS$	2.56	2.24	3.24	3.07	2.93	2.61	2.35	1.84	2.859	2.28
Hamilton R-factor from SQUAD84 [%]	0.4213	0.03208	0.09593	0.08435	0.11700	0.09120	0.07408	0.04500	0.21250	0.15830
Residual-Square-Sum function $RSS$	0.4216	0.03224	0.09590	0.08413	0.11803	0.09081	0.07395	0.04550	0.23914	0.14765
Hamilton R-factor from SQUAD84 [%]	0.48	0.42	0.47	0.44	0.50	0.44	0.58	0.45	0.55	0.47
Residual-Square-Sum function $RSS$	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Hamilton R-factor from SQUAD84 [%]	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Pomocí regresních programů SQUAD(84) a REACTLAB bylo stanoveno pět disociačních konstant  $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$ ,  $pK_{a4}$ ,  $pK_{a5}$  a šest molárních absorpčních koeficientů Eltrombopagu  $\varepsilon_L$ ,  $\varepsilon_{LH}$ ,  $\varepsilon_{LH2}$ ,  $\varepsilon_{LH3}$ ,  $\varepsilon_{LH4}$ ,  $\varepsilon_{LH5}$ . Spolehlivost odhadů parametrů byla dále testována použitím následujících diagnostik:

První diagnostika indikuje, zda všechny odhady parametrů  $\beta_r$  a  $\varepsilon_r$  mají fyzikální smysl a dosahují reálných hodnot. Vzhledem k tomu, že standardní směrodatné odchylky  $s(\log \beta_r)$  parametrů  $\log \beta_r$  a  $s(\varepsilon_r)$  parametrů  $\varepsilon_r$  jsou výrazně nižší, než jejich odpovídající odhady parametrů, jsou všechny různě protonované částice statisticky významné na hladině významnosti  $\alpha = 0.05$ . Absolutní hodnoty  $s(\beta_r)$ ,  $s(\varepsilon_r)$  poskytují informace o minimu  $RSS$ -tvaru hyperparaboloidu v okolí minima  $RSS_{\min}$ . Pro dobře podmíněné parametry je konečný  $RSS$ -tvar pravidelný elipsoid a směrodatné odchylky jsou nízké. Vysoké hodnoty se vyskytují u nežádoucích parametrů a u talířovitě tvarovaného hyperparaboloidu. Vztahu  $s(\beta_j) \times F_\sigma < \beta_j$  by mělo být dosaženo, pokud je  $F_\sigma$  rovno 3. Soubor standardních odchylek  $\varepsilon_r$  různých vlnových délek,  $s(\varepsilon_r) = f(\lambda)$ , by měly mít Gaussovo rozdělení; v opačném případě se získají chybné odhady  $\varepsilon_r$ . Obr. 14 znázorňuje odhadované molární absorpční koeficienty všech různě protonovaných částic  $\varepsilon_L$ ,  $\varepsilon_{LH}$ ,  $\varepsilon_{LH2}$ ,  $\varepsilon_{LH3}$ ,  $\varepsilon_{LH4}$ ,  $\varepsilon_{LH5}$  Eltrombopagu v závislosti na vlnové délce. Tři částice  $LH_2$ ,  $LH$  a  $L$  vykazují podobná spektra o  $\lambda_{\max} = 440$  nm, s postupně klesající protonací. Částice  $L$  vykazuje nejvyšší hodnotu  $\varepsilon_{\max}$  při  $\lambda_{\max} = 440$  nm, zatímco nejnižší hodnotu  $\varepsilon_{\max}$  má částice  $LH_2$ . Neutrální molekula  $LH_3$  vykazuje ve srovnání s předchozí částicí  $LH_2$  vzhledem k hypsochromnímu efektu nižší hodnotu vlnové délky  $\lambda_{\max} = 420$  nm, která je výsledkem po sobě jdoucích protonací molekuly. V rámci další protonace molekuly  $LH_3$  na částici  $LH_4$  spektra se  $\varepsilon_{\max}$  výrazně snižuje při zachování stejné  $\lambda_{\max}$ , kterou má  $LH_3$ . Další acidifikací částice  $LH_4$  na pH 2 nebo 1 vede ke vzniku částice  $LH_5$ , jehož spektrum se zvyšuje. Spektra  $LH_2$ ,  $LH$  a  $L$  jsou si podobné společnou vlnovou délkou  $\lambda_{\max} = 440$  nm a spektra  $LH_3$  a částice  $LH_4$  a  $LH_5$  jsou si podobné ve tvaru se společným  $\lambda_{\max} = 420$  nm.

Druhá diagnostika zkoumá, zda-li mají všechny vypočtené koncentrace různě protonovaných částic v distribučním diagramu relativního zastoupení rozličně protonovaných částic vyjádřené v procentech fyzikální smysl (spodní část Obr. 14). Vypočtená koncentrace základních komponent a různě protonovaných částic chemického modelu by měla dosahovat molarity  $10^{-8}$  M. Má-li částice zastoupení ve směsi okolo 1% nebo nižší, je v rovnovážné směsi považována za experimentální šum. Distribuční diagram znázorněný na Obr. 14 usnadňuje rychle posoudit podíly jednotlivých částic v celkové koncentraci. Vzhledem k tomu, že se molární absorptivita pohybuje v rozmezí  $10^3 - 10^5$  l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, budou mít

přítomné částice v množství menším než 0.1 % relativní koncentrace významný vliv na absorbanci pouze tehdy, pokud je hodnota jejich  $\epsilon$  vysoká. Distribuční diagram znázorňuje protonační rovnováhy částic LH<sub>5</sub>, LH<sub>4</sub>, LH<sub>3</sub>, LH<sub>2</sub>, LH a L. Při neutrálním pH 5 - 8 převládá neutrální molekula LH<sub>3</sub>, od pH 6 do pH 9 zase částice LH<sub>2</sub>. V rozmezí pH 6 – 10 se neutrální molekula LH<sub>3</sub> deprotonuje na částici LH<sub>2</sub> a LH a poté až na L. Okyselením neutrální molekuly LH<sub>3</sub> vzniká jako první v roztoku částice LH<sub>4</sub>, jehož zastoupení v roztoku v rozmezí pH 3 – 7 převyšuje 90 %. Dalším okyselením částice LH<sub>4</sub> vzniká od pH 4 do pH 1 částice LH<sub>5</sub>. Při koncentracích 10<sup>-4</sup> až 10<sup>-6</sup> M je Eltrombopag dostatečně rozpustný, a proto všechny jeho disociační konstanty mohou být spolehlivě spektrofotometricky stanoveny.



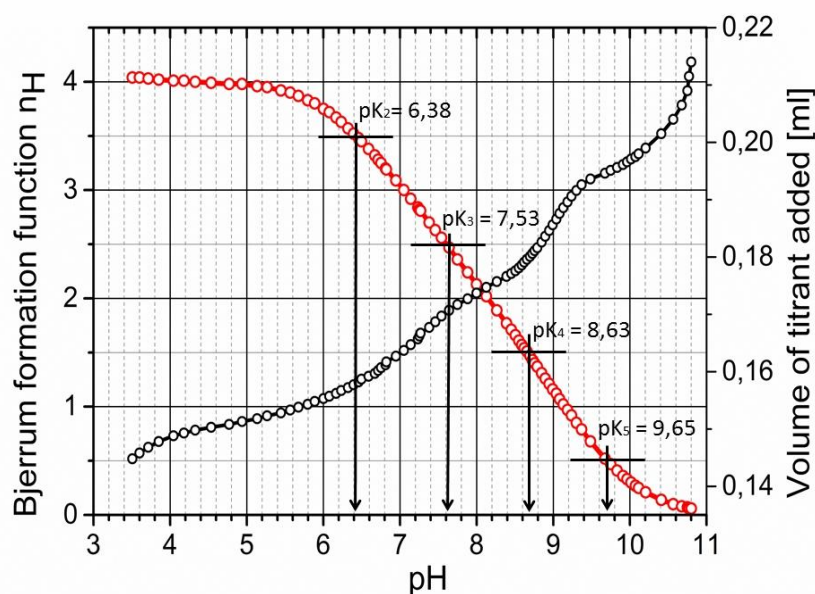
Obr. 14 - Graf molárních absorpčních koeficientů pro šest různě protonovaných částic Eltrombopagu proti vlnové délce (horní část). Odpovídající distribuční diagram relativní koncentrace šesti různě protonovaných částic Eltrombopagu (dolní část) (REACTLAB, ORIGIN).

Následující diagnostika se týká těsnosti proložení, které je sledováno v reziduích. Nejlepšího proložení je snadno dosaženo vyšetřením reziduí mezi experimentálními a vypočtenými hodnotami absorbance,  $e_i = A_{exp,i,j} - A_{calc,i,j}$ . Prozkoumání spekter a grafu predikované absorbanční responzní plochy pomocí všech experimentálních bodů by mělo odhalit, zda jsou stanovené výsledky konzistentní a zda byly provedeny při měření spekter experimentální chyby. Jedním z nejdůležitějších statistických výpočtů je směrodatná odchylka absorbance  $s(A)$ , vypočtená ze sady vybraných parametrů při ukončení procesu minimalizace. Ačkoli tato statistická analýza reziduí [38] udává nejpřísnější test nejvyššího stupně spolehlivosti, musí být použity realistické empirické limity. Statistická analýza všech reziduí  $e$  dokazuje, že bylo dosaženo minima eliptického hyperparaboloidu  $RSS_{min}$  (Tab. 6): standardní odchylka reziduí  $s(\hat{e})$  má vždy dostatečně nízké hodnoty, nižší než 3 mAU, což je méně než 0.2 % naměřených hodnot absorbancí. Rozlišovací kritéria využívané k hypotézám byly: (1) selhání minimalizačního procesu v divergenci nebo cyklizaci; (2) posouzení fyzikálního významu odhadovaných parametrů, pokud byly oba realistické a pozitivní; a (3) rezidua by měla vykazovat Gaussovo rozdělení. Systematické odchylky od náhodného rozdělení svědčí o chybném regresním modelu nebo o nedostatečných odhadech stanovovaných parametrů.

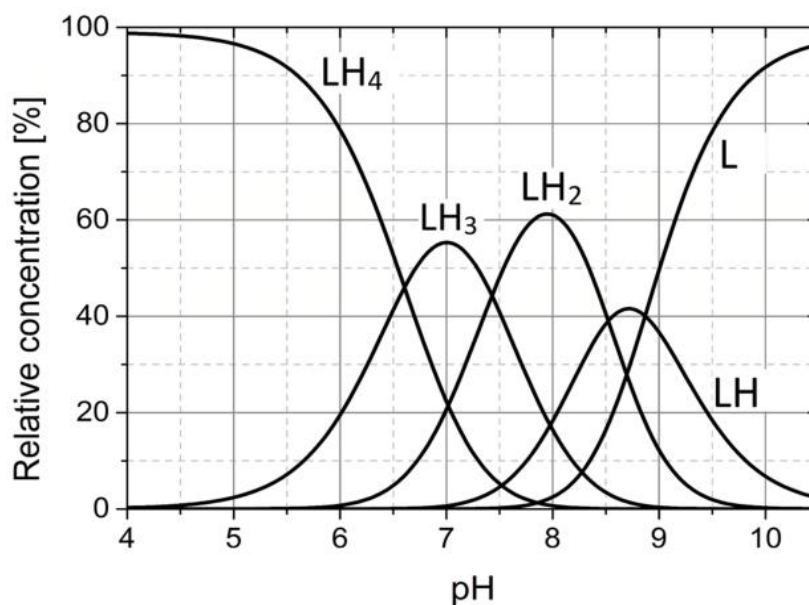
Disociační konstanty odhadované pomocí programů SQUAD(84) a REACTLAB jsou v dobré shodě. Program SQUAD(84) má velkou výhodu v rigorózním testu těsnosti proložení provedeného pomocí statistické analýzy reziduí. Reprodukovatelnost čtyř experimentálních sad spekter s využitím dvou regresních programů poukazuje na to, že jsou  $pK_{a3}$  7  $pK_{a4}$  7.5 a  $pK_{a5}$  9.3 v regresním modelu dobře podmíněné, a proto je jejich stanovení velice spolehlivé. První dvě disociační konstanty  $pK_{a1}$  3.1 a  $pK_{a2}$  6.0 jsou v regresním modelu špatně podmíněné, tvar hyperparaboloidu těchto dvou parametrů je talířovitého tvaru bez výrazného minima. Výpočet souřadnic tohoto minima je mnohem obtížnější a odhady parametrů jsou proto méně spolehlivé. Okyselením roztoku neutrální molekuly  $LH_3$  vedoucí k částicím  $LH_4$  a  $LH_5$  může docházet k vysrážení Eltrombopagu, což se projevuje zvláště při vyšších koncentracích u potenciometrického stanovení. Z toho důvodu nemůže být při koncentraci 0.0005 M vyčísleno  $pK_{a1}$ , protože se Eltrombopag v kyselém prostředí vysráží. Oba programy dospěly ke stejným odhadům všech pěti disociačních konstant a identické těsnosti proložení. Vliv teploty 25°C a 37°C se zdá být nevýznamný.

### 4.3 Analýza potenciometrických titračních dat

Byla provedena potenciometrická titrace směsi kyseliny chlorovodíkové a Eltrombopagu hydroxidem draselným při teplotě 25 °C a 37 °C (Obr. 15). Byla studována počáteční orientační hodnota disociační konstanty léčiva, která odpovídá střední hodnotě potenciometrické titrační křivky, stanovené pomocí programu ESAB a HYPERQUAD.



Obr. 15 - Analýza protonačních rovnováh Eltrombopagu programem ESAB. Potenciometrická titrační křivka Eltrombopagu okyseleného pomocí HCl a titrovaného KOH je vynesena společně s Bjerrumovou tvornou funkcí protonační křivky uvádějící hodnoty pK (ESAB, HYPERQUAD, ORIGIN).



Obr. 16 - Distribuční diagram relativní koncentrace různě protonovaných částic L, LH,  $LH_2$ ,  $LH_3$  a  $LH_4$  Eltrombopagu v závislosti na pH při 25°C (ESAB, HYPERQUAD, ORIGIN).

Vzhledem k tomu, že Eltrombopag vykazuje čtyři blízké disociační konstanty, je jejich numerický odhad poměrně obtížný a stanovení se neobejde bez použití nelineární regrese. Regresní analýza byla použita pro střední část titrační křivky, kdy se alkalický Eltrombopag titroval kyselinou chlorovodíkovou a následně retitroval hydroxidem draselným. Část titrační křivky byla vyčíslena jako Bjerrumova tvorná funkce, která je zobrazena v grafu na Obr. 15. Na Bjerrumově tvorné křivce jsou vyneseny odhady tří nebo čtyř disociačních konstant  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$ ,  $pK_{a4}$ ,  $pK_{a5}$ . Vzhledem k tomu, že se nad pH 9 a pod pH 5 vyskytuje v titrovaném roztoku velmi jemná sraženina Eltrombopagu, který zpočátku tvoří mírnou opalescenci, nebyla tato část titrační křivky nad pH 9 a pod pH 5 vzata regresní analýzou k odhadu  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$ ,  $pK_{a4}$ ,  $pK_{a5}$ .

Stanovení blízkých disociačních konstant bývá v regresní analýze obtížný úkol, a proto byly ke stanovení využity dva nezávislé počítačové programy, ESAB a HYPERQUAD a dosažené odhady disociačních konstant porovnány. Oba programy se přitom liší v definici součtu čtverců reziduí. Zatímco v programu ESAB jsou rezidua definována jako rozdíly mezi experimentálním a vypočteným objemem titračního činidla, v programu HYPERQUAD jde o rozdíly mezi experimentálními a vypočtenými hodnotami pH. Předpoklad metody nejmenších čtverců však požaduje, aby nezávisle proměnná nebyla zatížena náhodnými chybami a proměnnou v regresní analýze je závisle proměnná, která je zatížena náhodnými experimentálními chybami. Tento předpoklad je splněn pouze programem HYPERQUAD.

Tab. 8 znázorňuje výsledky regresní analýzy programem ESAB a HYPERQUAD vybrané části titrační křivky v závěrečné části procesu minimalizace. Jsou stanoveny skupinové parametry a těsnost proložení křivky dokládají výsledky statistické analýzy reziduí. Spolehlivost stanovené disociační konstanty je posuzována těsností proložení, čili statistickou analýzou reziduí. Jsou-li vybrány další skupinové parametry, dojde ke zlepšení proložení. Dostatečně citlivým kritériem spolehlivosti disociační konstanty je průměr absolutních hodnot reziduí  $E|\hat{e}|$ . Porovnáním reziduí s experimentálním šumem,  $s_{inst}(y)$ , vyjádřeného buď jako  $s_{inst}(y) = y(V) = 0.0001 \text{ ml}$  nebo  $s_{inst}(y) = y(\text{pH}) = 0.01$ , potvrzuje vynikající proložení, protože průměr  $E|\hat{e}|$  a směrodatné odchylky reziduí  $s(\hat{e})$  jsou téměř stejné nebo nižší než experimentální šum  $s_{inst}(y)$ .  $E|\hat{e}| = 0.0001 \text{ ml}$  a  $s(\hat{e}) = 0.0002 \text{ ml}$  jsou si podobné a oba jsou nižší než chyba mikrobyrety  $s(V) = 0.0001 \text{ ml}$ . Vzhledem k tomu, že je tendence  $E(\hat{e})$  v programu ESAB rovna  $-2.6 \times 10^{-6}$ , což může být přijato jako přiblížení nule, neočekává se



žádná systematická chyba křivky. Všechny rezidua oscilují mezi dolní -0.0002 ml a horní 0.0001 ml mezi Hoaglinova intervalu spolehlivosti, a proto se zde nevyskytuje žádný odlehlý bod. Rezidua vykazují normální rozdělení, potvrzené Jarque-Berra testem normality pro kombinovaný vzorek šikmosti a špičatosti (viz. strana 80 v ref.) [39], šikmost  $g_1(\hat{e})$  je blízká 0 (což poukazuje na symetrické rozdělení) a špičatost  $g_2(\hat{e})$  je blízká 3 (což dokazuje normální symetrické rozdělení). Je indikováno výborné proložení a odhady regresních parametrů jsou považovány za dostatečně spolehlivé. Program ESAB dosáhl trvale lepšího proložení oproti programu HYPERQUAD, a proto je možné učinit závěr, že odhady disociačních konstant odhadnutých programem ESAB jsou spolehlivější. Individuální dvojice jedné disociační konstanty odhadnuté programy ESAB a HYPERQUAD, ve kterých byly použity stejné body titrační křivky, se liší pouze ve druhém desetinném místě. Příléhající křivka se výrazně vylepšila pomocí upřesnění skupinového parametru  $L_0$ , koncentrace titrovaného léčiva Eltrombopag.

Program ESAB minimalizací reziduí  $e_i = (V_{exp, i} - V_{calc, i})$  dosahuje 0.1 nebo 0.2 mikrolitrů a HYPERQUAD minimalizací  $e_i = (pH_{exp, i} - pH_{calc, i})$  dosahuje SIGMA hodnoty kolem 1 nebo nižší, čímž prokazuje vynikající proložení. Závěrem může být řečeno, že byly dokázány disociační konstanty Eltrombopagu i přes to, že skupina parametrů  $L_0, H_T$  byla špatně podmíněná modelu. Stanovení těchto disociačních konstant je nejisté a může vést k nesprávnému odhadu společných parametrů  $pK_a$ , a proto je výpočetní strategie důležitá. Tyto skupiny parametrů mohou mít velký vliv na systematickou chybu při odhadu  $pK_a$  a měly by být očištěné spolu s běžnými parametry  $pK_a$ . Provedená externí kalibrace pH článku skleněné elektrody během titrace je dostatečně přesná. Porovnáním dvou výpočetních programů, programu ESAB a HYPERQUAD, vedlo k závěru, že ESAB poskytoval lepší proložení potenciometrické titrační křivky. Těsnost proložení prokázala dostatečnou spolehlivost odhadů parametrů čtyř disociačních konstant léčiva Eltrombopag při 25°C a 37°C.

Tabulka 8 - Výsledná tabulka potenciometrického stanovení p*K<sub>a</sub>*.

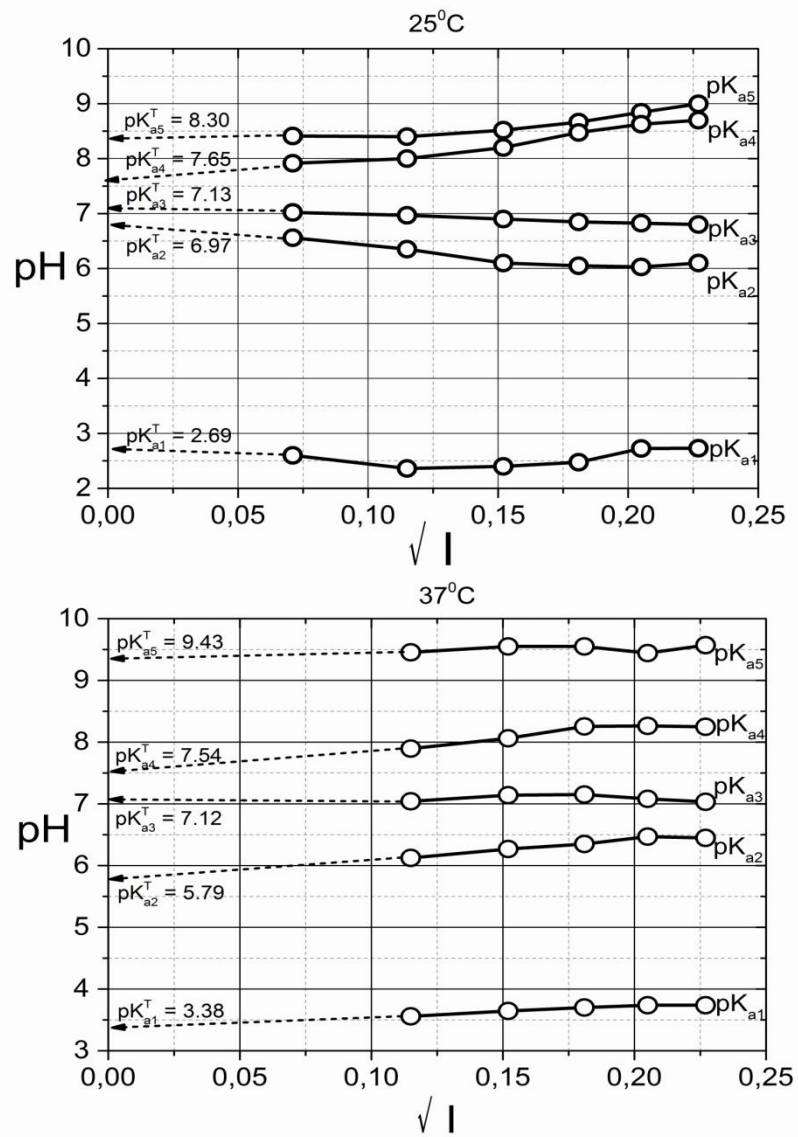
	25°C		37°C	
	HYPERQUAD	ESAB	HYPERQUAD	ESAB
Number of points <i>n</i>	39	39	78	56
p <i>K<sub>a2</sub></i> ( <i>s</i> <sub>1</sub> ), H <sub>4</sub> L = H + H <sub>3</sub> L	6.60(13)	6.59(07)	6.41(15)	6.47(02)
p <i>K<sub>a3</sub></i> ( <i>s</i> <sub>2</sub> ), H <sub>3</sub> L = H + H <sub>2</sub> L	7.38(12)	7.56(07)	7.72(20)	7.54(03)
p <i>K<sub>a4</sub></i> ( <i>s</i> <sub>3</sub> ), H <sub>2</sub> L = H + HL	8.46(09)	8.48(07)	9.26(35)	8.63(03)
p <i>K<sub>a5</sub></i> ( <i>s</i> <sub>4</sub> ), HL = H + L	8.77(07)	9.29(07)	9.18(16)	9.41(03)
<i>L</i> <sub>0</sub> concentration of drug [mol.dm <sup>-3</sup> ]	4.6E-04	1.7E-04	2.3E-04	3.9E-04
<b>Goodness of fit test by the statistical analysis of residuals in pH (HYPERQUAD) or in <i>V</i> [mL] (ESAB)</b>				
Sigma in pH units (HYPERQUAD)	0.615 pH units	*	0.885 pH units	*
Bias, arithmetic mean of residuals <i>E</i> ( $\hat{\epsilon}$ )	-9.05E-03 pH units	6.9E-05 mL	8.107E-02 pH units	-3.6E-06 mL
Residual mean, <i>E</i>   $\hat{\epsilon}$	0.0228 pH units	0.0001 mL	0.1503 pH units	0.0002 mL
Standard deviation of residuals, <i>s</i> ( $\hat{\epsilon}$ )	0.0335 pH units	0.0004 mL	0.2161 pH units	0.0003 mL
Residual skewness, <i>g</i> <sub>1</sub> ( $\hat{\epsilon}$ )	1.08	0.14	1.68	-0.12
Residual kurtosis, <i>g</i> <sub>2</sub> ( $\hat{\epsilon}$ )	8.42	3.39	4.49	2.37
Jarque-Bera normality test	Rejected	Accepted	Rejected	Accepted

## 5 Závěr

Spektrofotometrickou a potenciometrickou titrací bylo stanoveno pět disociačních konstant léčiva Eltrombopag. Vznikající jemné sraženiny nad pH 9 a pod pH 5 při potenciometrické titraci, vedou k závěru, že odhady  $pK_a$  pro pH vyšší než 9 a nižší než 5 nejsou dostatečně spolehlivé.

- 1) Při neutrálním pH se Eltrombopag vyskytuje ve vodě v obtížně rozpustné formě  $LH_3$ , která je schopná protonace za vzniku již rozpustné částice  $LH_4$ . Neutrální molekula  $LH_3$  může být ve vodě disociována na rozpustnou částici  $L$ . Acidobazická titrace triprotické molekuly  $LH_3$  pomocí  $KOH$  zahrnuje směs šesti částic  $H_3O^+$ ,  $OH^-$ ,  $LH_3$ ,  $LH_2$ ,  $LH$ ,  $L$  a kation draslíku  $K^+$ . Graf molárních absorpčních koeficientů rozličeně protonovaných částic v závislosti na vlnové délce ukazuje, že spektrum částic  $LH_3$  a  $LH_2$  se barevně minimálně odlišuje. Totéž platí pro protonaci chromoforu  $LH$  na  $LH_2$ , zatímco protonace chromoforu  $LH_2$  na  $LH_3$  daleko více ovlivňuje chromofor molekuly Eltrombopagu a projev ve spektru je proto značný.
- 2) Prokázali jsme, že v rozmezí pH 2 až 10 lze ze spekter spolehlivě odhadnout pět disociačních konstant, kdy je koncentrace Eltrombopagu menší než  $10^{-4}$  M. I přes to, že změna pH velmi málo ovlivňuje změny v chromoforu, bylo spolehlivě určeno pět disociačních konstant při iontové síle  $I = 0.005$  pomocí programu REACTLAB a SQUAD(84), kdy bylo u obou programů dosaženo srovnatelných hodnot,  $pK_{a1} = 3.12(02)$ ,  $pK_{a2} = 6.50(02)$ ,  $pK_{a3} = 7.60(02)$ ,  $pK_{a4} = 8.69(02)$  a  $pK_{a5} = 9.90(01)$  při  $25^\circ C$  a  $pK_{a1} = 3.34(01)$ ,  $pK_{a2} = 6.77(01)$ ,  $pK_{a3} = 7.59(01)$ ,  $pK_{a4} = 8.69(02)$  a  $pK_{a5} = 9.90(01)$  při  $37^\circ C$ .
- 3) Byly stanoveny čtyři disociační konstanty Eltrombopagu v koncentraci 5 mikromolů regresní analýzou potenciometrické titrační křivky bez úpravy iontové síly  $I = 0.005$  s využitím programů ESAB a HYPERQUAD, kdy bylo u obou programů dosaženo srovnatelných hodnot,  $pK_{a2} = 6.53(01)$ ,  $pK_{a3} = 7.60(04)$ ,  $pK_{a4} = 9.62(59)$  a  $pK_{a5} = 10.55(340)$  při  $25^\circ C$  a za použití programu ESAB  $pK_{a2} = 6.82(02)$ ,  $pK_{a3} = 7.99(02)$ ,  $pK_{a4} = 9.33(04)$  a  $pK_{a5} = 8.74(07)$  při  $37^\circ C$ . Standardní směrodatné odchylky poslední platné jednotky jsou uvedené v závorce.
- 4) Predikce disociačních konstant Eltrombopagu byla provedena s použitím predikčního programu MARVIN a výsledky se podobaly hodnotám, které byly námi vyhodnoceny z naměřených dat. Z nabídky komerčních programů se proto program MARVIN jeví jako nejvhodnější k predikci disociačních konstant Eltrombopagu.

- 5) Uplatněním Debye-Hückelovy rovnice závislosti směsné disociační konstanty na iontové síle, byly stanoveny neznámé thermodynamické disociační konstanty  $pK_a^T$  při dvou experimentálních teplotách (Obr. 17).



Obr. 17 - Stanovené thermodynamické disociační konstanty léčiva Eltrombopag (REACTLAB, ORIGIN).

## 6 Použitá literatura

1. Eltrombopag v databázi Drugbank, dostupné z <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06210>
2. Eltrombopag v databázi Chemspider, dostupné z <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21106301.html>
3. Garnock-Jones K. P., Susan K. J.: Eltrombopag. *Drugs*. 2009, vol. 69, n. 5, p. 567-576.
4. Kuter D. J.: New thrombopoietic growth factors. *Blood*. 2007, vol. 109, n. 11, p. 4607.
5. Jenkins J. M., Williams D., Deng Y., Uhl J., Kitchen V., Collins D., Erickson-Miller C. L.: Phase 1 clinical study of eltrombopag, an oral, nonpeptide thrombopoietin receptor agonist. *Blood*. 2007, vol. 109, n. 11, p. 4739-4741.
6. Park R.: Eltrombopag: a new treatment option for chronic refractory adult immune thrombocytopenia. *Blood Research*. 2015, vol. 50, n. 1, p. 1-2.
7. Bussel J. B., Cheng G., Saleh M. N., Psaila B., Kovaleva L., Meddeb B., Kloczko J., Hassani H., Mayer B., Stone N. L., et al.: Eltrombopag for the Treatment of Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *New England Journal of Medicine*. 2007, vol. 357, n. 22, p. 2237-2247.
8. Kim Y. K., Lee S. S., Jeong S. H., Ahn J. S., Yang D. H., Lee J. J., Kim H. J.: Efficacy and safety of eltrombopag in adult refractory immune thrombocytopenia. *Blood Research*. 2015, vol. 50, n. 1, p. 19-25.
9. Hemmateenejad B., Abbaspour A., Maghami H., Foroumadi A.: Spectrophotometric determination of acidity constants by two-rank annihilation factor analysis. *Analytica Chimica Acta*. 2008, vol. 607, n. 2, p. 142-152.
10. Barzanti C., Evans R., Fouquet J., Gouzin L., Howarth N. M., Kean G., Levet E., Wang D., Wayemberg E., Yeboah A. A., Kraft A.: Potentiometric determination of octanol–water and liposome–water partition coefficients (log P) of ionizable organic compounds. *Tetrahedron Letters*. 2007, vol. 48, n. 19, p. 3337-3341.
11. Liao C. Z., Nicklaus M. C.: Comparison of Nine Programs Predicting pK(a) Values of Pharmaceutical Substances. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2009, vol. 49, n. 12, p. 2801-2812.
12. Milleti F. S. L., Sforza G., Cruciani G.: New and original pK<sub>a</sub> prediction method using grid molecular interaction fields. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2007, vol. 47, n. 6, p. 2172-2181.

13. Settimo L. B. K., Knegtel R. A.: Comparison of the accuracy of experimental and predicted  $pK_a$  values of basic and acidic compounds. *Pharmaceutical Research*. 2014, vol. 31, p. 1082-1095.
14. Szakacs Z. N. B.: Protonation microequilibrium treatment of polybasic compounds with any possible symmetry. *Journal of Mathematical Chemistry*. 1999, vol. 33, p. 145-161.
15. Tam K. Y.: Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants. Part VI. Deconvolution of binary mixtures of ionizable compounds. *Analytical Letters*. 2000, vol. 33, n. 1, p. 145-161.
16. Tam K. Y.: Multiwavelength spectrophotometric resolution of the micro-equilibria of a triprotic amphoteric drug: Methacycline. *Mikrochimica Acta*. 2001, vol. 136, n. 91, p. 91-97.
17. Tam K. Y., Quéré. L.: Multiwavelength spectrophotometric resolution of the micro-equilibria of cetirizine. *Analytical Sciences*. 2001, vol. 17, n. 10, p. 1203-1208.
18. Tam K. Y., Takács-Novák K.: Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: A validation study. *Analytica Chimica Acta*. 2001, vol. 434, n. 1, p. 157-167.
19. Meloun M., Syrový T., Vrána A.: The thermodynamic dissociation constants of losartan, paracetamol, phenylephrine and quinine by the regression analysis of spectrophotometric data. *Analytica Chimica Acta*. 2005, vol. 533, n. 1, p. 97-110.
20. Meloun M., Černohorský P.: Thermodynamic dissociation constants of isocaine, physostigmine and pilocarpine by regression analysis of potentiometric data. *Talanta*. 2000, vol. 52, n. 5, p. 931-945.
21. Box K. J., Donor R. E., Jupp P. E., Leader I. P., Trew D. F., Turner Ch. H.: The chemistry of multi-protic drugs: Part 1: A potentiometric, multi-wavelength UV and NMR pH titrimetric study of the micro-speciation of SKI-606. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, vol. 47, n. 2, p. 303-311.
22. Avdeef A., Box K. J., Comer J. E. A., Gilges M., Hadley M., Hibbert C., Patterson W., Tam K. Y.: PH-metric log P 11.  $pK_a$  determination of water-insoluble drugs in organic solvent–water mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999, vol. 20, n. 4, p. 631-641.
23. Meloun M., Militký J.: Zpracování experimentálních dat na IBM PC. Pardubice: FINISH, 1992. ISBN 80-85340-18-6.

24. Gans P., Sabatini A., Vacca A.: Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta*. 1996, vol. 43, n. 10, p. 1739-1753.
25. Babić S., Horvat A. J. M., Pavlović D. M., Kaštelan-Macan M.: Determination of pK<sub>a</sub> values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2007, vol. 26, n. 11, p. 1043-1061.
26. Klouda P.: Moderní analytické metody. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
27. Meloun M., Militký J.: CHEMOMETRIE V. Interaktivní tvorba chemického modelu na IBM PC, 1988.
28. Meader M., King P.: Analysis of Chemical Processes. Determination of the Reaction Mechanism and Fitting of Equilibrium and/or Rate Constants. Chemometrics in Practical Applications. Rijeca: InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0438-4.
29. Meloun M., Čapek J., Mikšík P., Brereton R. G.: Critical comparison of methods predicting the number of components in spectroscopic data. *Analytica Chimica Acta*. 2000, vol. 423, n. 1, p. 51-68.
30. Meloun M.: Univerzita Pardubice [online]. 2017 [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <https://meloun.upce.cz/docs/publication/060.pdf>.
31. Vekron, dostupné z <http://www.verkon.cz/elektrody-ph-theta/>
32. Nečasová V.: Spektrofotometrické a potenciometrické stanovení disociačních konstant cytostatika bosutinibu regresní analýzou. *Diplomová práce*, Pardubice 2011, VŠCHT Pardubice.
33. Balogh G. T., Tarcsay A., Keseru G. M.: Comparative evaluation of pK(a) prediction tools on a drug discovery dataset. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012, vol. 67-68, p. 63-70.
34. Japertas P., Lanevskij K., Sazonovas A.: ACD/Percepta structure design engine: Virtual enumeration and screening of physchem properties for 10(16) compounds in real time. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. 2014, vol. 248.
35. Japertas P., Sazonovas A., Lanevskij K.: ACD/Percepta portal: Crowdsourcing in medicinal chemistry projects. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. 2014, vol. 248.
36. da Cunha M. G., Franco G. C. N., Franchin M., Beutler J. A., de Alencar S. M., Ikegaki M., Rosalen P. L.: Prediction of pharmacokinetic and toxicological parameters

- of a 4-phenylcoumarin isolated from geopropolis: In silico and in vitro approaches. *Toxicology Letters*. 2016, vol. 263, p. 6-10.
37. Manchester J., Walkup G., Rivin O., You Z.: Evaluation of pK<sub>a</sub> estimation methods on 211 druglike compounds. *Journal of chemical information and modeling*. 2010, vol. 50, n. 4, p. 565-571.
38. Meloun M., Bordovská S., Syrový T., Vrána A.: Tutorial on a chemical model building by least-squares non-linear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data. *Analytica Chimica Acta*. 2006, vol. 580, n. 10, p. 107-121.
39. Meloun M., Militký J., Forina M.: Chemometrics for analytical chemistry, Volume 2: PC – aided regression and related methods. Chemometrics for analytical chemistry. Chichester: Ellis Horwood, 1994. ISBN 0-13-123788-7.

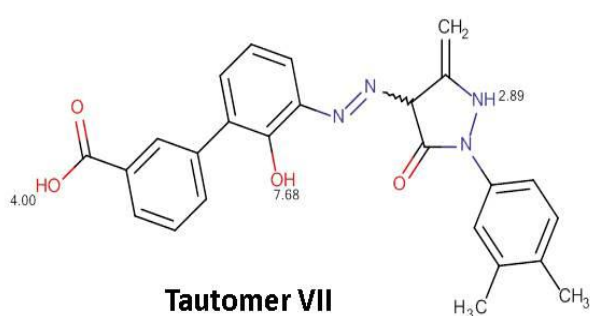
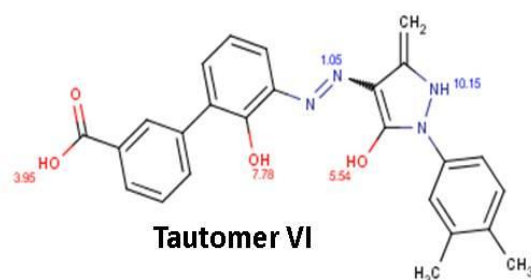
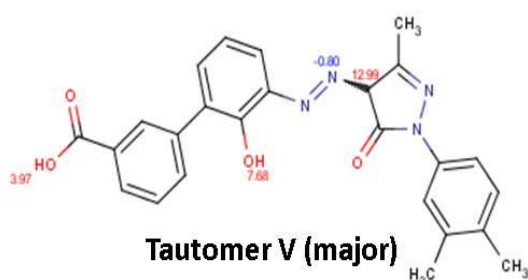
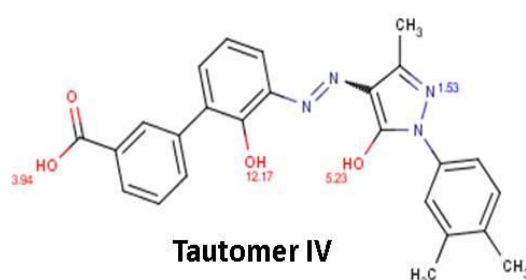
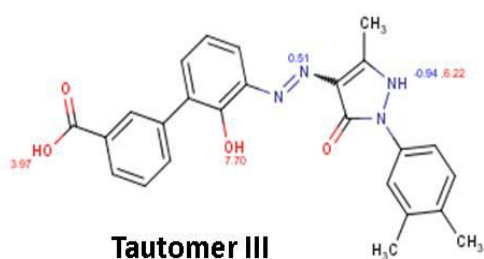
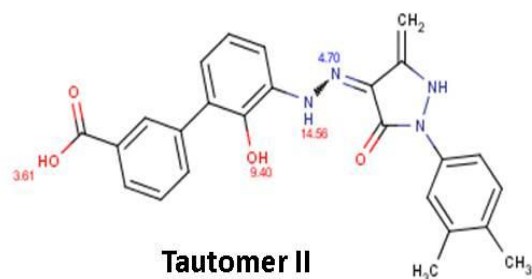
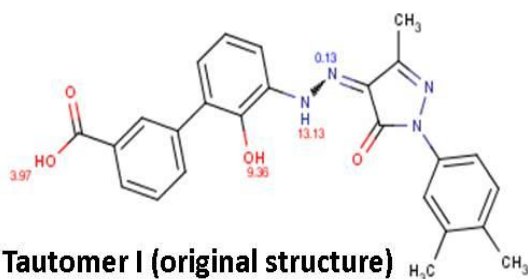


## **7 Přílohová část**

## **PREDIKCE DISOCIAČNÍCH KONSTANT**

# MARVIN

## Predicted Tautomeric form and $pK_a$ values of Eltrombopag



### MarvinSketch

Product Version: MarvinSketch 6.0.2

Build Date: 2013-06-25

Internal build id: 6.0.2\_b97

Operating System: x86 Windows 7 6.1

Java: Sun Microsystems Inc. Java 1.6.0\_41

Memory: 247.5M maximum, 37.8M total, 13.2M free

Environment: Application

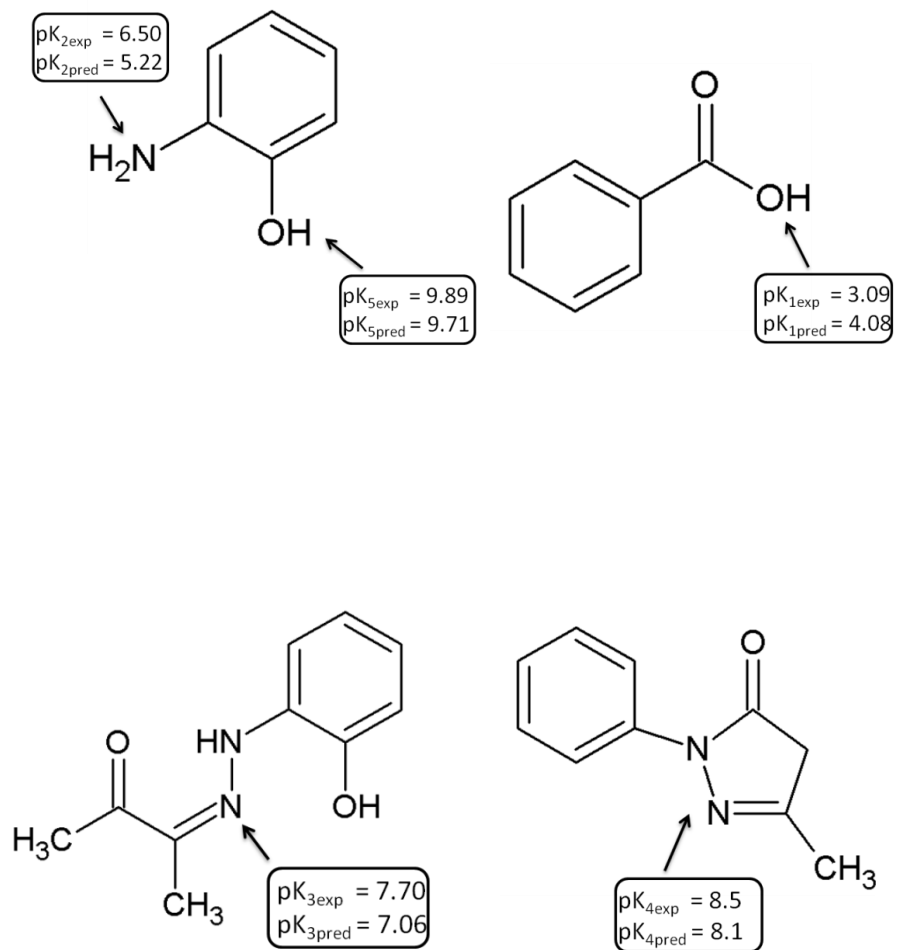
Browser: -

Copyright © 1998-2013 ChemAxon Ltd.

<http://www.chemaxon.com>

# MARVIN

## Predikované a experimentálně stanovené hodnoty pK<sub>a</sub>



ACD



**ACD/Labs**

**ACD/Labs**

*ACD/pKa Classic Module Report*

Date: April 25, 2016 11:14 AM

Software name and version: ACD/Percepta 14.0.0 (Build 2726)

Compound name:

Structure:

Strongest pKa(Acid): -1,3 +/- 0,4

No base pKa

-1,3 +/- 0,4 (Atom number: 17)

4,0 +/- 0,1 (Atom number: 32)

9,6 +/- 0,5 (Atom number: 24)

11,9 +/- 0,5 (Atom number: 24)

