

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

**POTENCIOMETRICKÉ A SPEKTROMETRICKÉ STANOVENÍ
POSTUPNÝCH DISOCIAČNÍCH KONSTANT ANTIDEPRESIVA
VORTIOXETINU A LÉČIVA LESINURADU**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Aneta Čápová

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

KONZULTANT PRÁCE: Mgr. Lucie Pilařová

2018

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL-TECHNOLOGY

**POTENTIOMETRIC AND SPECTROMETRIC DETERMINATION OF
CONSECUTIVE DISSOCIATION CONSTANTS OF ANTIDEPRESSIVE
VORTIOXETINE AND MEDICINE LESINURADE**

THESIS

AUTHOR: Bc. Aneta Čápová

SUPERVISOR: Prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.

CONSULTANT: Mgr. Lucie Pilařová

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Aneta Čápková
Osobní číslo: C16474
Studijní program: N3912 Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Analýza biologických materiálů
Název tématu: Stanovení disociačních konstant antidepressiva Vortioxetine a léčiva Lesinuradu, k léčbě hyperurikémie spojené s dnou
Zadávající katedra: Katedra biologických a biochemických věd

Zásady pro vypracování:

Převést ošš léčiva ze ZENITIVA Praha, vyhodnotit a připravit k publikování v impaktovaném časopise.
Teoretická část:
Zvládnout nelineární regresi při výstavbě chemického modelu pruzomačnicích rovností obou léčiv včetně diagnostik ošřobednosti.
Experimentální část:
Regresní analýza potenciometrických titračních křivek. Regresní analýza vlněných spekter.

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Kriticky zhodnotit referenci o vlastnostech obou léčiv z farmaceutického, biochemického hlediska.

Velocí diplomové práce: prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: Mgr. Lucie Pilařová
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: 18. prosince 2017

Termín odevzdání diplomové práce: 11. května 2018

prof. Ing. Petr Kaluda, CSc.
děkan

L.S.

prof. Ing. Alexander Čížek, CSc.
vedoucí katedry

V Praze dne 28. února 2018

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

.....

Aneta Čápová

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 Mgr. Lucii Pilařové za konzultace ohledně diplomové práce a také mé rodině za velkou podporu během studií.

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. Pro tvorbu a správu citací byl využit software EndNote™.

HIGHLIGHTS

- Serotoninový modulátor Vortioxetin hydrobromid je určen k léčbě závažných depresivních poruch u dospělých.
- Byly stanoveny dvě disociační konstanty hydrobromidu Vortioxetinu při 25 °C a 37 °C ve vodném prostředí.
- Byla studována rovnováha kyselých bází pomocí spektrofotometrických a potenciometrických titrací.
- Počet různě protonovaných částic byl odhadnut z hodnoty UV-absorbanční matice.
- ϵ_{LH2} a ϵ_{LH3} ukazují, že protonace chromoforu LH_2^+ na LH_3^{2+} má větší vliv na chromofory v molekule Vortioxetinu než ϵ_{LH} .
- Lesinurad je inhibitor urátu v léčbě hyperurikémie, která je spojena s onemocněním dnou.
- Protonační rovnováhy byly studovány pomocí UV-spektrální analýzy a pH-titrace.
- Byly stanoveny tři thermodynamické disociační konstanty pK_{a1}^T , pK_{a2}^T , pK_{a3}^T u léčiva Lesinurad při 25 °C a 37 °C ve vodném prostředí.
- Počet různě protonovaných částic byl odhadnut z hodnoty UV-absorbanční matice.
- Tři pK a protonační místa byly předpovězeny programem MARVIN a ACD/Percepta.
- Vypočtená enthalpie a entropie dokazují, že disociace Lesinuradu je endothermní, a ne spontánní.

NOVELTY

(a) **Vědecká motivace:** Znalost ionizačních stavů farmaceutické látky, obsažených v pK_a , jsou nezbytné pro pochopení vlastností pro vývoj léků.

(b) **Význam:** Ke dnešnímu dni nebyla publikována žádná spektra, žádné disociační konstanty a žádné diagramy relativní koncentrace různě protonovaných částic léčiva Lesinuradu a Vortioxetinu. Pro nejnovější léky, zejména cytostatika od dodavatelů IVEX, TEVA a ZENTIVA, zveřejňujeme fyzikální konstanty z UV/VIS spekter. Tyto informace o lécích, zavedených v posledních třech letech, očekává řada čtenářů a firem. Naše publikace jsou proto inovativní a průkopnické.

(c) **Všeobecný význam získaných výsledků:** Medicína a farmakologie potřebují fyzikální konstanty (spektra, pK , rozpustnost apod.) nově zavedených léčiv.

(d) Novinky: Vortioxetin je atypické antidepresivum (modulátor a stimulator serotoninu), které bylo schváleno US FDA pro léčbu závažné depresivní poruchy u dospělých. Depresivní poruchy, včetně závažné depresivní poruchy, jsou běžnými duševními chorobami, u nichž se domnívá, že jsou způsobeny nerovnováhou v serotoninu (5-HT) a norepinefrinu, kromě mnoha situačních, kognitivních a lékařských faktorů. Dvě disociační konstanty byly odhadnuty pomocí počítačové analýzy absorbančního spektra, poté co byla prokázána spolehlivost použité regresní analýzy. Vzhledem k překrývající se protonační rovnováze a omezené rozpustnosti spektrofotometricky se pro vyhodnocení smíšené pK_a použila i analýza potenciometrických dat. Při použití závislosti na iontové síle byly odhadnuty termodynamické disociační konstanty při 25 °C a 37 °C.

Lesinurad je selektivní inhibitor reabsorpce kyseliny močové jako součást kombinace léků pro léčbu vysokých hladin kyseliny močové v krvi, nazývaných také hyperurikémie. Rovnováhy kyselých bází byly studovány pomocí UV spektrální analýzy a pH-titrace. Byly stanoveny tři termodynamické disociační konstanty pK_{a1}^T , pK_{a2}^T a pK_{a3}^T , léčiva Lesinuradu při 25 °C a 37 °C ve vodném prostředí.

HIGHLIGHTS

- Serotonin modulator Vortioxetine hydrobromide is for the treatment of major depressive disorders in adults.
- Two dissociation constants of Vortioxetine hydrobromide were determined at 25 °C and 37 °C in an aqueous medium.
- Acid-base equilibria were studied with spectrophotometric and potentiometric titrations.
- The number of variously protonated species was estimated from the rank of the UV-absorbance matrix.
- The ϵ_{LH2} and ϵ_{LH3} show that protonation of chromophore LH_2^+ to LH_3^{2+} has greater influence on chromophores in Vortioxetine molecule than ϵ_{LH} .
- Lesinurad is the urate transporter inhibitor for treating hyperuricemia, which is associated with gout.
- Protonation equilibria were studied with UV-metric spectra analysis and pH-metric titration analysis.
- Three close pK_{a1}^T , pK_{a2}^T , pK_{a3}^T , of Lesinurad were determined at 25°C and 37°C in an aqueous medium.
- The number of variously protonated species was estimated from the rank of the UV-absorbance matrix.
- Three multiple pK s and protonation locations were predicted by MARVIN and ACD/Percepta.
- Calculated enthalpy and entropy prove that the dissociation of Lesinurad is endothermic and not spontaneous.

NOVELTY

(a) Scientific motivation: Knowledge of the possible ionization states of a pharmaceutical substance, embodied in pK_a , is vital for understanding properties essential to drug development.

(b) Relevance: To date, no spectra, no dissociation constants or no pH-distribution diagrams of the relative concentration of variously protonated ions of the drug Lesinurad and Vortioxetine have been published. For the latest newly introduced medicines, especially anti-tumor drugs from IVEX, TEVA and ZENTIVA suppliers, we publish physical constants with UV/VIS spectra. Such information concerning drugs introduced within last 3 years is

expected by a number of readers and companies. Our publications are therefore innovative, pioneering and bring us success in the citation index.

(c) Significance: Medicine and pharmacology needs physical constants (spectra, pK' s, solubility, etc.) of newly introduced drugs.

(d) Novelty: Vortioxetine an atypical antidepressant (a serotonin modulator and stimulator) which was approved by the U.S. FDA for the treatment of major depressive disorder in adults. Depressive disorders, including major depressive disorder, are common mental health conditions thought to be caused by an imbalance in serotonin (5-HT) and norepinephrine in addition to multiple situational, cognitive, and medical factors. Three dissociation constants were estimated using a computer-assisted pH-absorbance spectra analysis when the reliability of the used regression analysis was proven. Due to the overlapping protonation equilibria and a limited solubility behind the spectrophotometric, potentiometric data analysis was also used to evaluate mixed pK_a . By using a dependence on the ionic strength, thermodynamic dissociation constants at 25 °C and 37 °C were estimated.

Lesinurad is a selective inhibitor of uric acid reabsorption as part of a combination of medicines to treat high levels of uric acid in blood, also called hyperuricemia. Acid-base equilibria were studied with UV-metric spectra analysis and pH-metric titration analysis. Three thermodynamic dissociation constants pK_{a1}^T , pK_{a2}^T , pK_{a3}^T , of Lesinurad were determined at 25 °C and 37 °C in an aqueous medium.

ANOTACE

Byly porovnány metody potenciometrické a spektrofotometrické pH-titrace u antidepresiva Vortioxetinu ke stanovení disociačních konstant. Vortioxetin je atypické antidepresivum, tj. modulátor a stimulátor serotoninu. Depresivními poruchami jsou chápány běžné psychické stavy, o nichž se domníváme, že jsou způsobeny nerovnováhou serotoninu a norepinefrinu, kromě mnoha dalších situačních, kognitivních a lékařských faktorů. Chemometrický přístup k nelineární regresi pH-spekter (REACTLAB, SQUAD84) a pH-titrace (ESAB) určil dvě překrývající se disociační konstanty. Mírně rozpustná neutrální báze LH hydrobromidu Vortioxetinu byla schopná protonace za vzniku dvou kationtů LH_2^+ a LH_3^{2+} rozpustných v čisté vodě. V rozmezí pH 5 až 10 lze spolehlivě odhadnout dvě disociační konstanty z malých změn ve spektrech při použité koncentraci 9.2×10^{-5} M Vortioxetinu. I když změna pH poněkud méně ovlivnila změny v chromoforu molekuly, byly odhadnuty dvě thermodynamické disociační konstanty $\text{p}K_{a1}^T = 7.22$ a $\text{p}K_{a2}^T = 8.67$ při 25 °C a $\text{p}K_{a1}^T = 7.27$ a $\text{p}K_{a2}^T = 8.79$ při 37 °C. Graf molárních absorpčních koeficientů různě protonovaných částic dle vlnové délky ukazuje, že spektrum částic LH_2^+ a LH se liší barvou, zatímco protonace chromoforu LH_2^+ na LH_3^{2+} má již menší vliv na chromofor molekuly Vortioxetinu hydrobromidu. Dvě thermodynamické disociační konstanty při použité koncentraci 3×10^{-4} M Vortioxetinu byly stanoveny regresní analýzou potenciometrických pH-titračních křivek $\text{p}K_{a1}^T = 7.08$ a $\text{p}K_{a2}^T = 8.50$ při 25 °C a $\text{p}K_{a1}^T = 7.33$ a $\text{p}K_{a2}^T = 8.76$ při 37 °C. Predikce disociačních konstant Vortioxetinu byla provedena programy MARVIN a ACD/Percepta a byly predikovány dvě disociační konstanty.

Dále byly porovnány potenciometrické a spektrofotometrické pH-titrace Lesinuradu při stanovení tří disociačních konstant. Lesinurad je selektivní inhibitor reabsorpce kyseliny močové v rámci kombinace léků pro léčbu vysokých hladin kyseliny močové v krvi, nazývané hyperurikémie. Nelineární regrese pH spektra programy REACTLAB a SQUAD84, a pH-titrační křivky programem ESAB, stanovila tři postupné disociační konstanty. Bylo navrženo protonační schéma léčiva Lesinurad. Rozpustný anion L^- byl protonován do rozpustných LH, LH_2^+ a LH_3^{2+} iontů v čisté vodě. Byly odhadnuty tři postupné thermodynamické disociační konstanty $\text{p}K_{a1}^T = 2.09$, $\text{p}K_{a2}^T = 4.25$, $\text{p}K_{a3}^T = 6.58$ při 25 °C a $\text{p}K_{a1}^T = 1.96$, $\text{p}K_{a2}^T = 4.16$, $\text{p}K_{a3}^T = 6.32$ při 37 °C, analýzou UV spekter. Graf molárních absorpčních koeficientů ukazuje, že spektrum LH_2^+ a LH se liší barvou, zatímco protonace chromoforu LH_2^+ na LH_3^{2+} má menší vliv na chromofory v molekule Lesinuradu. Tři thermodynamické disociační konstanty při koncentraci 1×10^{-4} mol. dm^{-3} Lesinuradu, byly

stanoveny pomocí pH-potenciometrické analýzy $pK_{a1}^T = 2.39$, $pK_{a2}^T = 3.47$, $pK_{a3}^T = 6.17$ při 25 °C a $pK_{a1}^T = 2.08$, $pK_{a2}^T = 3.29$, $pK_{a3}^T = 6.03$ při 37 °C. Hodnoty enthalpie ΔH^0 (pK_{a1}) = 19.19 kJ.mol⁻¹, ΔH^0 (pK_{a2}) = 13.29 kJ.mol⁻¹, ΔH^0 (pK_{a3}) = 38.39 kJ.mol⁻¹, ukazují, že disociační proces je endothermní. Pozitivní hodnoty ΔG^0 (pK_{a1}) = 11.93 kJ.mol⁻¹, ΔG^0 (pK_{a2}) = 24.26 kJ.mol⁻¹, ΔG^0 (pK_{a3}) = 36.56 kJ.mol⁻¹ při 25 °C naznačují, že disociační proces není spontánní, což bylo potvrzeno hodnotou entropie ΔS^0 (pK_{a1}) = 24.37 J.mol⁻¹, ΔS^0 (pK_{a2}) = -36.79 J.mol⁻¹, ΔS^0 (pK_{a3}) = 2.79 J.mol⁻¹. Tři disociační konstanty Lesinuradu a protonační lokality byly předpovězeny programem MARVIN a ACD/Percepta.

KLÍČOVÁ SLOVA

Disociační konstanty; Vortioxetin; Lesinurad; spektrofotometrická titrace; pH-titrace; REACTLAB; SQUAD84; ESAB

ANNOTATION

Potentiometric and spectrophotometric pH-titrations of the antidepressant Vortioxetine for dissociation constants determination were compared. Vortioxetine is an atypical antidepressant i.e. a serotonin modulator and stimulator. Depressive disorders are common mental health conditions thought to be caused by an imbalance in serotonin and norepinephrine in addition to multiple situational, cognitive, and medical factors. A chemometrics approach to nonlinear regression of the pH-spectra (REACTLAB, SQUAD84) and pH-titration (ESAB) determined two overlapping dissociation constants. A sparingly soluble neutral base LH of Vortioxetine hydrobromide was capable of protonation to form the still soluble two cations LH_2^+ and LH_3^{2+} in pure water. In the range of pH 5 to 10 two dissociation constants could be reliably estimated from small changes in spectra of 9.2×10^{-5} M Vortioxetine. Although the change of pH somewhat less affected changes in the chromophore, two thermodynamic dissociation constants were estimated $\text{p}K_{a1}^T = 7.22$ and $\text{p}K_{a2}^T = 8.67$ at 25 °C and $\text{p}K_{a1}^T = 7.27$ and $\text{p}K_{a2}^T = 8.79$ at 37 °C. The graph of molar absorption coefficients of variously protonated species according to wavelength shows that the spectrum of species LH_2^+ and LH vary in colour, while protonation of chromophore LH_2^+ to LH_3^{2+} has less influence on chromophores in Vortioxetine hydrobromide molecule. Two thermodynamic dissociation constants of 3×10^{-4} M Vortioxetine were determined by the regression analysis of potentiometric titration curves $\text{p}K_{a1}^T = 7.08$ and $\text{p}K_{a2}^T = 8.50$ at 25 °C and $\text{p}K_{a1}^T = 7.33$ and $\text{p}K_{a2}^T = 8.76$ at 37 °C. A prediction of the dissociation constants of Vortioxetine was carried out using the MARVIN and ACD/Percepta programs and only two dissociation constants were theoretically proposed.

Potentiometric and spectrophotometric pH-titrations of the Lesinurad for three consecutive dissociation constants determination were compared. Lesinurad is a selective inhibitor of uric acid reabsorption as part of a combination of medicines to treat high levels of uric acid in blood, also called hyperuricemia. Nonlinear regression of the pH-spectra with REACTLAB and SQUAD84 and of the pH-titration curve with ESAB determined three multiple close dissociation constants. The protonation scheme of Lesinurad was suggested. A sparingly soluble anion L^- of Lesinurad was protonated to the still soluble species LH, LH_2^+ and LH_3^{2+} in pure water. Three consecutive thermodynamic dissociation constants were estimated $\text{p}K_{a1}^T = 2.09$, $\text{p}K_{a2}^T = 4.25$, $\text{p}K_{a3}^T = 6.58$ at 25 °C and $\text{p}K_{a1}^T = 1.96$, $\text{p}K_{a2}^T = 4.16$, $\text{p}K_{a3}^T = 6.32$ at 37 °C by UV-metric spectra analysis. The graph of molar absorption coefficients shows that the spectrum of species LH_2^+ and LH vary in colour, while protonation

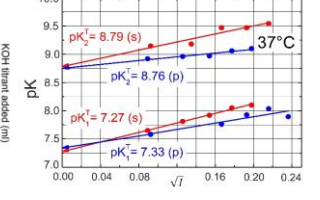
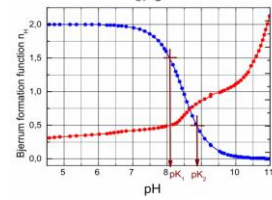
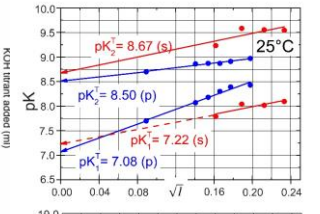
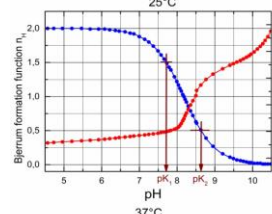
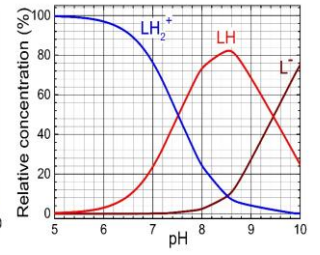
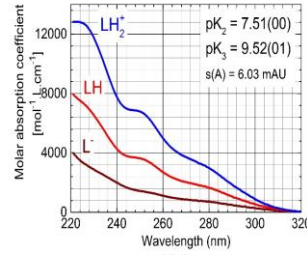
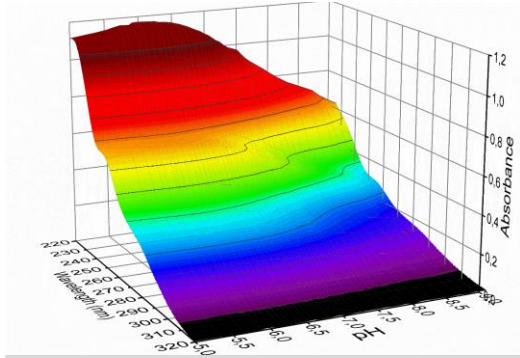
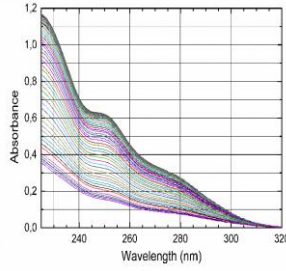
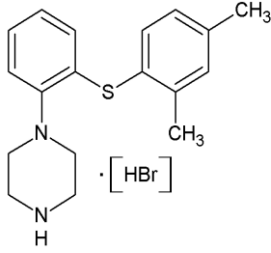
of chromophore LH_2^+ to LH_3^{2+} has less influence on chromophores in the Lesinurad molecule. Three multiple thermodynamic dissociation constants of 1×10^{-4} mol. dm^{-3} Lesinurad were determined by the pH-metric analysis $\text{p}K_{a1}^T = 2.39$, $\text{p}K_{a2}^T = 3.47$, $\text{p}K_{a3}^T = 6.17$ at 25°C and $\text{p}K_{a1}^T = 2.08$, $\text{p}K_{a2}^T = 3.29$, $\text{p}K_{a3}^T = 6.03$ at 37°C . The values of enthalpy $\Delta H^0(\text{p}K_{a1}) = 19.19 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta H^0(\text{p}K_{a2}) = 13.29 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta H^0(\text{p}K_{a3}) = 38.39 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, show the dissociation process is endothermic. The positive values of $\Delta G^0(\text{p}K_{a1}) = 11.93 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G^0(\text{p}K_{a2}) = 24.26 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G^0(\text{p}K_{a3}) = 37.56 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ at 25°C indicate that the dissociation process is not spontaneous, which was confirmed by the value of entropy $\Delta S^0(\text{p}K_{a1}) = 24.37 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0(\text{p}K_{a2}) = -36.79 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0(\text{p}K_{a3}) = 2.79 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$. Three macro-dissociation constants of Lesinurad and protonation locations were predicted by MARVIN and ACD/Percepta.

KEYWORDS

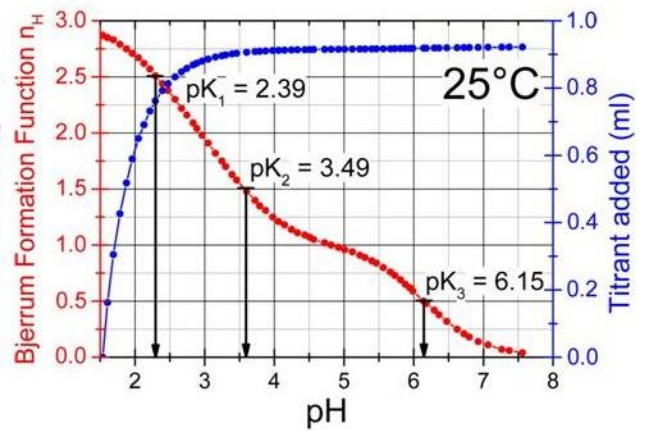
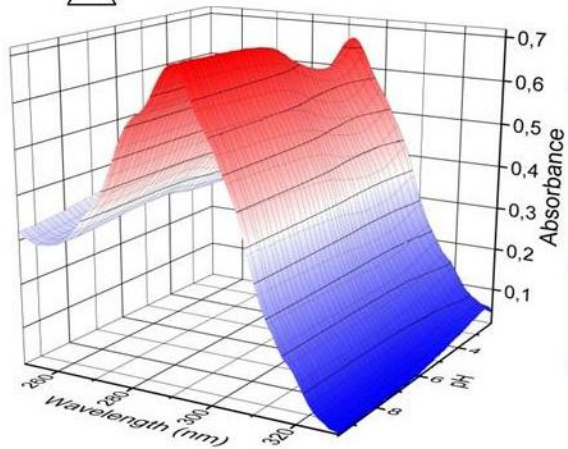
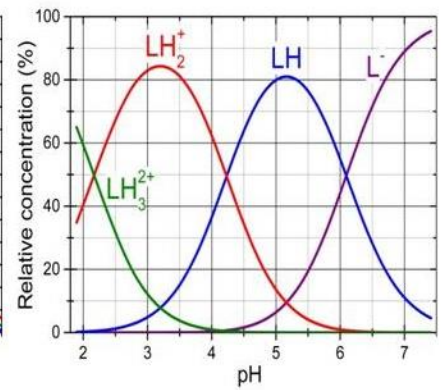
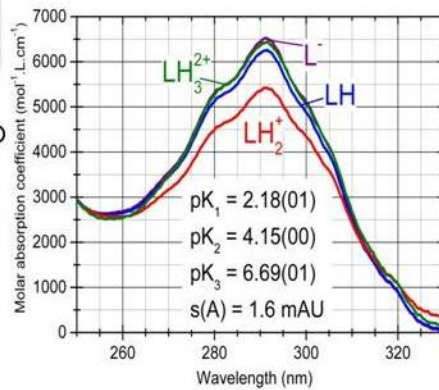
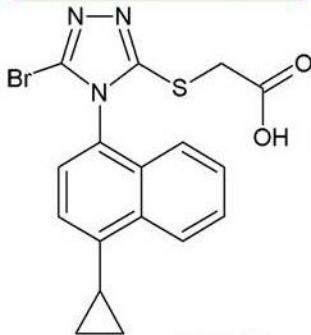
Dissociation constants; Vortioxetine; Lesinurad; spectrophotometric titration; pH-titration; REACTLAB; SQUAD84; ESAB

GRAFICKÁ ANOTACE

Vortioxetine hydrobromide



Lesinurad



OBSAH

Úvod.....	22
1 Literární část.....	23
1.1 Studované léčivo - Vortioxetin	23
1.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti.....	23
1.1.2 Mechanismus účinku	23
1.1.3 Farmakokinetické vlastnosti	24
1.1.4 Terapeutické indikace	25
1.1.5 Nežádoucí účinky	25
1.2 Studované léčivo - Lesinurad.....	26
1.2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti.....	26
1.2.2 Mechanismus účinku	26
1.2.3 Farmakokinetické vlastnosti	27
1.2.4 Terapeutické indikace	27
1.2.5 Nežádoucí účinky	28
2 Teoretická část.....	29
2.1 Disociační konstanty a jejich stanovení	29
2.1.1 Disociační konstanta	30
2.2 Potenciometrická titrace.....	33
2.2.1 Potenciometrie	33
2.2.2 Iontově selektivní elektrody.....	33
2.2.3 Chemický model pH-potenciometrickou titrací	34
2.3 Určení chemického modelu spektrofotometricky	35
2.3.1.1 Program SQUAD (84)	38
3 Experimentální část	39
3.1 Použité chemikálie a roztoky	39
3.2 Standardizace odměrných roztoků	40
3.2.1 Kyselina chlorovodíková, HCl	40
3.2.2 Hydroxid draselný, KOH.....	40
3.3 Pístová mikrobyreta a její kalibrace.....	41
3.4 Použité přístroje	41
3.5 Postup potenciometrické a spektrofotometrické titrace	42
3.6 Software	43

4	Výsledky a jejich diskuse	44
4.1	Vortioxetin	44
4.1.1	Analýza spekter.....	44
4.1.2	Analýza potenciometrických titračních dat	54
4.2	Lesinurad.....	59
4.2.1	Predikce disociačních konstant Lesinuradu	59
4.2.2	Analýza spekter.....	60
4.2.3	Analýza potenciometrických titračních dat	71
5	Závěr.....	76
6	Použitá literatura.....	78

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obr. 1 - Strukturální vzorec Vortioxetinu.....	23
Obr. 2 - Mechanismus účinku Vortioxetinu	25
Obr. 3 - Strukturální vzorec Lesinuradu	26
Obr. 4 - Mechanismus účinku Lesinuradu.....	27
Obr. 5 - Catellův graf úpatí vlastních čísel	36
Obr. 6 - Skleněná elektroda HC 103	41
Obr. 7 - Schéma aparatury používané k měření léčiv	42
Obr. 8 - a) 2D absorbanční matice, b) Soustava A-pH křivek, c) Grafické určení hodnoty absorbanční matice Vortioxetinu, d) Cattellův graf.....	45
Obr. 9 - Znázornění protonované molekulární struktury Vortioxetinu s předpovězenými disociačními konstantami a distribuční schéma relativní koncentrace různě protonovaných iontů	46
Obr. 10 - Hledání nejlepšího protonačního modelu Vortioxetinu	47
Obr. 11 - Dekonvoluce každého experimentálního spektra 9.2×10^{-5} M Vortioxetinu	52
Obr. 12 - a) 3D graf absorbanční responzní plochy b) Změna absorbance ve spektru pro <i>i</i> -té spektrum a <i>j</i> -tý absorbanční bod spektra Vortioxetinu, c) Graf poměru $e/s_{inst}(A)$ pro Vortioxetin.....	53
Obr. 13 - Potenciometrická titrační křivka okyseleného <i>hydrobromidu Vortioxetinu</i>	55
Obr. 14 - Závislost smíšené disociační konstanty pK_a Vortioxetinu na druhé mocnině iontové síly.....	58
Obr. 15 - Molekulární struktura Lesinuradu.....	60
Obr. 16 - Určení počtu světlo-absorbujících částic protonačních rovnováh Lesinuradu.....	61
Obr. 17 - Hledání a testování protonačního modelu pro Lesinurad.....	64
Obr. 18 - Reprodukovatelnost odhadovaných disociačních konstant při 25 °C a 37 °C	66
Obr. 19 - 3D graf absorbanční responzní plochy pro Lesinurad při 25 °C, 2D graf absorbanční matice	67
Obr. 20 - Poměr signálu a šumu při analýze malých změn ve spektrech.	68
Obr. 21 - Po sobě jdoucí deprotonační průběh, sledovaný ve spektrech	70
Obr. 22 - Hledání protonačního modelu. Regresní analýza titrační křivky Lesinuradu	71
Obr. 23 - Stanovené thermodynamické disociační konstanty léčiva Lesinuradu	74
Schéma 1 – Disociace Lesinuradu.	75

Tabulka 1 - Závislost pH komerčních pufrů na teplotě.	39
Tabulka 2 - Standardizace HCl.	40
Tabulka 3 - Kalibrace mikrobyret.	41
Tabulka 4 - Závislost odhadů dvou disociačních konstant na iontové síle <i>hydrobromidu Vortioxetinu</i> pomocí programů SQUAD84 a REACTLAB pro 25 °C.	48
Tabulka 5 - Závislost odhadů dvou disociačních konstant na iontové síle <i>hydrobromidu Vortioxetinu</i> pomocí programů SQUAD84 a REACTLAB pro 37 °C.	49
Tabulka 6 - Zpřesnění společných a skupinových parametrů programem ESAB pro pH-potenciometrickou titraci <i>hydrobromidu Vortioxetinu</i> s HCl a KOH při 25 °C.	56
Tabulka 7 - Zpřesnění společných a skupinových parametrů programem ESAB pro pH-potenciometrickou titraci <i>hydrobromidu Vortioxetinu</i> s HCl a KOH při 37 °C.	57
Tabulka 8 - Odhady disociačních konstant.	65
Tabulka 9 - Regresní zpřesnění společných a skupinových parametrů programem ESAB pro pH-titraci okyseleného Lesinuradu a titrovaného KOH.	72

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

RSS	The residual sum of squares - reziduálová suma čtverců
SERT	Serotoninový transportér
GABA	Kyselina gama-aminomáselná
5-HT	5-hydroxytryptamin
MDD	Závažná depresivní porucha
ADME	Absorpce, distribuce, metabolismus, vylučování
API	Aktivní farmaceutická složka
URAT1	Perorální inhibitor transportéru kyseliny močové 1
OAT4	Transportér kyseliny močové
XO	Xanthin oxidáza
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky
WApH	Spektrofotometrie a UV spektrální analýza
RMS	Reziduálová suma čtverců
RSD	Standardní odchylka reziduí
AE	Kritérium věrohodnosti
SER	Instrumentální chyba

Úvod

Tématem diplomové práce bylo stanovení blízkých thermodynamických disociačních konstant při malých změnách v UV/VIS spektru u obtížně rozpustného antidepressiva Vortioxetinu a léčiva Lesinuradu, které je určeno k léčbě hyperurikémie spojené s dnou. Léčiva o vysoké čistotě (>99 %), byla dodána od společnosti ZENTIVA, k. s. (Praha). Čistota byla stanovena společností pomocí metody HPLC. Úkolem bylo proměřit obě léčiva, vyhodnotit a připravit k publikování v impaktovaném časopise. V teoretické části je pozornost věnována nelineární regresi při výstavbě chemického modelu protonačních rovnováh včetně diagnostik věrohodnosti. V experimentální části je pozornost věnována regresní analýze potenciometrických titračních křivek a vějířů spekter. Díky acidobazickým vlastnostem léčiv se určí, zda a za jakých podmínek bude látka v disociované iontové nebo neiontové formě. Rozsah ionizace hraje klíčovou roli v jejich rozpustnosti, rychlosti rozpouštění v gastrointestinálním traktu, v propustnosti přes biologické membrány, absorpci, distribuci, metabolismu a vylučování. Stanovení disociačních konstant bylo provedeno spektrofotometricky v UV/VIS oblasti (metoda citlivá pro málo koncentrované roztoky) a pomocí potenciometrie (nejčastější metoda).

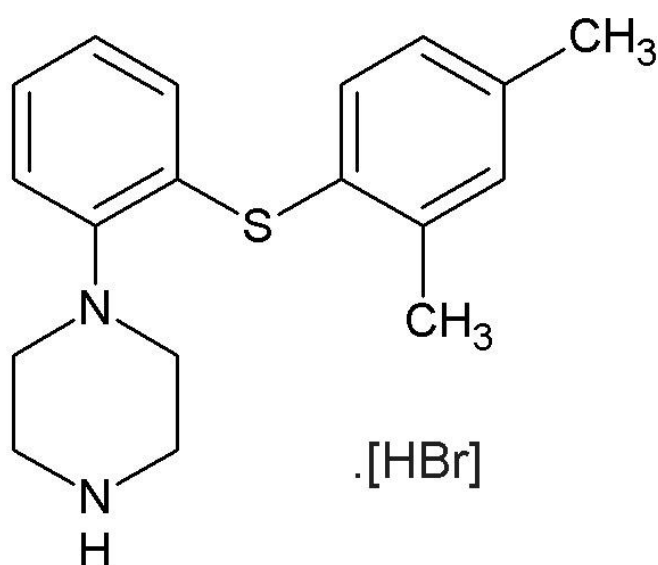
Regresní analýzou dat, která byla získána pomocí spektrofotometrie a potenciometrie, byly stanoveny smíšené disociační konstanty pK_a (na základě nejlepší těsnosti proložení). Byla provedena závislost stanovených disociačních konstant na odmocnině z iontové síly při teplotách 25 °C a 37 °C a pomocí extrapolace v nulovém bodě iontové síly byly stanoveny thermodynamické disociační konstanty.

1 Literární část

1.1 Studované léčivo – Vortioxetin

1.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Vortioxetin hydrobromid (obchodní název *Brintellix* a *Trintellix* v Kanadě), IUPAC název hydrobromid 1- (2 - ((2,4-dimethylfenyl) thio) fenyl) piperazin, má molekulární vzorec $C_{18}H_{22}N_2S \cdot HBr$ a molekulovou hmotnost 379.36 g/mol. Je to atypické antidepresivum (modulátor a stimulator serotoninu), které vyrábí Lundbeck [1] a Takeda [2].



Obr. 1 - Strukturní vzorec Vortioxetinu.

1.1.2 Mechanismus účinku

Zmírňuje symptomy depresí zvýšením koncentrace serotoninu v mozku tím, že inhibuje jeho zpětné vychytávání v synapsi a modulací (aktivace některých receptorů při blokování nebo antagonizaci ostatních receptorů) některých serotoninových receptorů. To ji řadí do třídy atypických antidepresiv, známých jako modulátory a stimulatory serotoninu [3, 4]. Dne 30. září 2013 byla schválena US FDA pro léčbu závažných depresivních poruch u dospělých. Vortioxetin byl také zkoumán pro léčbu generalizované úzkostné poruchy, ale nebylo prokázáno, že je lepší než placebo [5]. Vortioxetin je modulátor a stimulator serotoninu, protože i když má inhibiční účinky SERT (serotoninový transportér), je také agonistou a antagonistou serotoninového receptoru. Také působí na norepinefrin, dopamin, glutamát, GABA a cholinergní systém. Antidepresivní výzkum se zaměřuje na vývoj léků,






které se vážou na serotoninový transportér (SERT). SERT transportuje serotonin ze synaptické štěrbině do presynaptického neuronu a inhibice tohoto transportéru vede ke zvýšení serotoninu v synaptické štěrbině. Mnoho antidepresiv však působí také na serotoninové receptory, známé jako receptory 5 - hydroxytryptaminu (5-HT). 5-HT receptory jsou skupina receptorů nacházejících se v centrálním a periferním nervovém systému. Existuje 7 obecných tříd serotoninových receptorů a dalších 14 serotoninových podtypových receptorů, z nichž se většina účastní deprese a depresivního chování. Za normálních podmínek jsou serotoninové receptory aktivovány synaptickým serotoninem a podílejí se na excitační i inhibiční neurotransmisi. Po aktivaci tyto receptory modulují uvolňování dalších neurotransmiterů, jako je glutamát, dopamin, adrenalin a GABA. Vortioxetin má vysokou afinitu k SERT a blokáda SERT zvyšuje dostupnost serotoninu v synaptické štěrbině. Vortioxetin působí jako agonista na receptoru 5HT-1A, který je autoreceptorem pro serotoninergní neurotransmisi. Autoreceptor působí jako brzda na serotoninergním přenosu. Desenzitizace 5HT-1A zvyšuje uvolňování serotoninu a předpokládá se, že pomáhá zmírnit depresi. Antagonismus receptoru 5HT-7 potencuje účinek blokády SERT zvýšeným uvolňováním serotoninu. Receptory 5HT-1D jsou autoreceptory umístěné na terminálu presynaptického axonu. Detekují serotonin při synapsi, a když se serotonin při synapsi vytváří, váže se na autoreceptory, které uvolňují serotonin. Blokováním těchto receptorů zvyšuje Vortioxetin uvolňování serotoninu. Při blokování receptorů 5-HT3 může dojít ke zvýšení serotoninu, dopaminu, norepinefrinu, acetylcholinu a histaminu, což může vysvětlit prokognitivní účinky Vortioxetinu. V souhrnu blokuje Vortioxetin receptory 5-HT3, 5-HT1D a 5-HT7, stimuluje receptor 5-HT1A a částečně stimuluje receptor 5-HT1B [6].

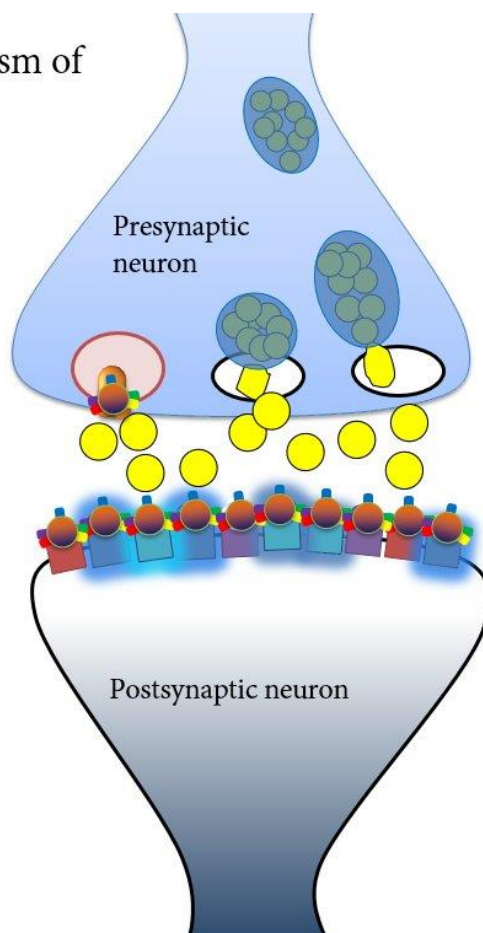
1.1.3 Farmakokinetické vlastnosti

Vortioxetin je schválen pro léčbu závažné depresivní poruchy (MDD) s počáteční dávkou 10 miligramů, která se zvyšuje na 20 miligramů denně. Má biologickou dostupnost 75 % a dosáhne maximální koncentrace v plazmě během sedmi až jedenácti hodin po podání. Dále se zdá, že jídlo neovlivňuje absorpci Vortioxetinu. Zvýšení dávky zvyšuje množství vazby léku na receptory o 15 % na každých 5 miligramů. Poločas rozpadu je přibližně 66 hodin a primárně se metabolizuje prostřednictvím jaterních enzymů cytochromu P450 na inaktivní metabolity [6].

Vortioxetine mechanism of action

SERT Inhibition

-  5HT -1A agonist
-  5HT-1B partial agonist
-  5HT-1D antagonist
-  5-HT₇ antagonist
-  5-HT₃ antagonist



Obr. 2 - Mechanismus účinku Vortioxetinu [6].

1.1.4 Terapeutické indikace

Depresivní poruchy, včetně závažných depresivních poruch, představují duševní zdravotní stavy, které jsou považovány za způsobené nerovnováhou mezi serotoninem (5-HT) a norepinefrinem, kromě mnoha situačních, kognitivních a lékařských faktorů [7].

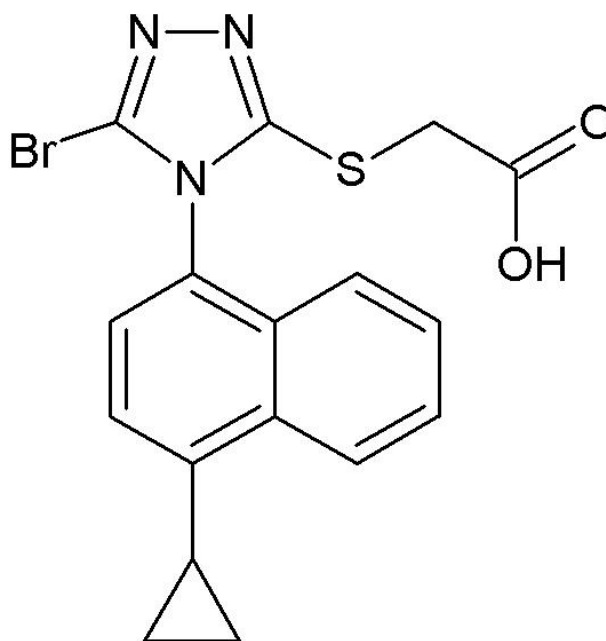
1.1.5 Nežádoucí účinky

Mezi nejčastější nežádoucí účinky hlášené u přípravku Vortioxetin patří nevolnost, průjem, sucho v ústech, zácpa, zvracení, plynatost, závratě a sexuální dysfunkce. Vortioxetin používaný samostatně ve vysoké dávce nebo v kombinaci s jinými léky, jako jsou jiná antidepresiva, může vyvolat potenciálně život ohrožující lékovou reakci známou jako serotoninový syndrom [8].

1.2 Studované léčivo - Lesinurad

1.2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

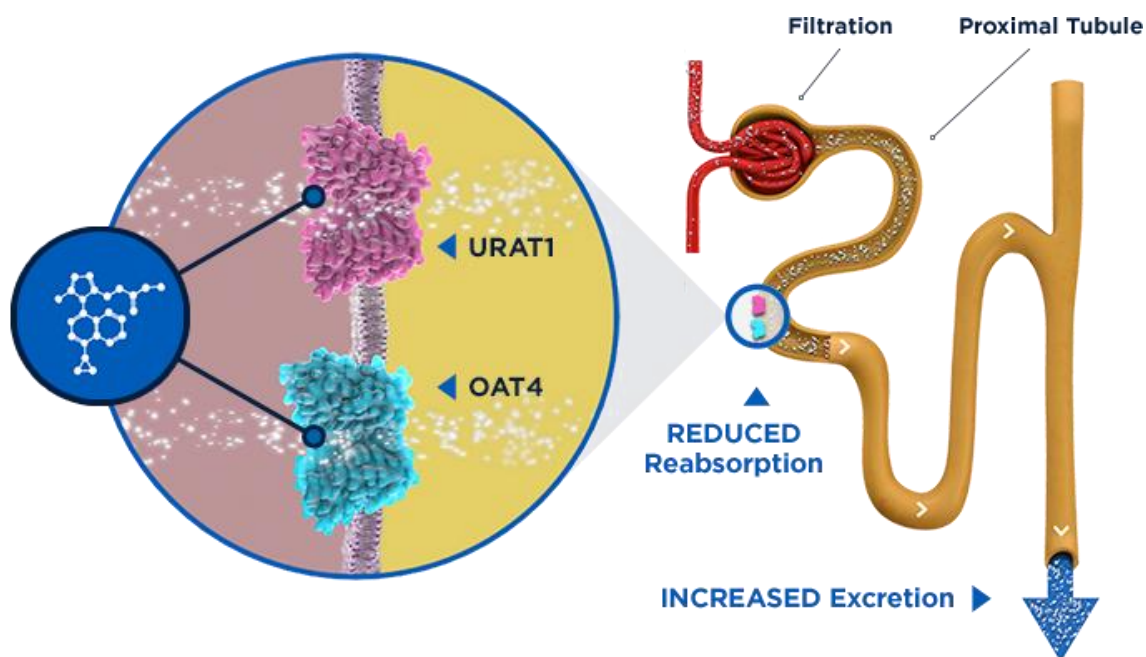
Lesinurad je inhibitor urátu pro léčbu hyperurikémie spojené s dnou. Chemické označení podle IUPAC společnosti je kyselina 2-((5-brom-4-(4-cyklopropyl-naftalen-1-yl)-1,2,4-triazol-3-yl)thio) octová s molekulovým vzorcem $C_{17}H_{14}BrN_3O_2S$ a existují různé chemické názvy pro Lesinurad, jako je 878672-00-5; RDEA594; Zurampic; RDEA 594 a UNII-09ERP08I3W. Molekulová hmotnost je 404.28 g/mol a rozpustnost ve vodě je 0.00779 mg/ml. Registrační číslo Lesinuradu je CAS 878672-00-5 a PubChem CID 53465279, UNII 09ERP08I3W (obr. 1) [9].



Obr. 3 - Strukturální vzorec Lesinuradu [9].

1.2.2 Mechanismus účinku

Lesinurad patří do třídy organických sloučenin známých jako fenyl-1,2,4-triazoly. Je to selektivní inhibitor reabsorpce kyseliny močové, která se používá v kombinaci s jinými přípravky při léčbě dny. Snižuje koncentraci kyseliny močové v séru inhibicí perorálního inhibitoru transportéru kyseliny močové 1 (URAT1), enzymu odpovědného za zpětné vychytávání kyseliny močové z renálních tubulů a OAT4, dalšího transportéru kyseliny močové, spojeného s diuretickou hyperurikémií [10].



Obr. 4 - Mechanismus účinku Lesinuradu [11].

1.2.3 Farmakokinetické vlastnosti

Lesinurad pomáhá ledvinám odstranit z těla kyselinu močovou. Léčba přípravkem Lesinurad 200 mg denně v kombinaci s xanthin oxidázou je schválena pro terapii snižující urát u pacientů s dnou. Lesinurad kombinovaný s inhibítorem xanthin oxidázy (XO) poskytuje účinnou léčbu hyperurikémie související s dnou. Byl schválen v prosinci 2015 Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropskou agenturou pro léčivé přípravky (EMA) v únoru 2016 [10]. Jednou z nejdůležitějších fyzikálně-chemických vlastností každé drogy se považuje její hodnota pK_a , což je klíčový fyzikálně-chemický parametr ovlivňující mnoho biofarmaceutických charakteristik ve studiích farmakokinetiky a biologické dostupnosti [12-15]. Disociační konstanty sloučeniny ovlivňují lipofilitu, rozpustnost a propustnost a hrají klíčovou úlohu při charakterizaci absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování (ADME) [16-20]. U pacientů s dnou Lesinurad snižuje hladinu kyseliny močové v séru, zvyšuje renální clearance a vylučování kyseliny močové. Lesinurad se po perorálním podání rychle vstřebává. Po podání jednorázové dávky na lačno i po jídle bylo dosaženo maximální plazmatické koncentrace během 1-4 hodin. Lesinurad se váže na proteiny v plasmě, hlavně na albumin. Poločas rozpadu je přibližně 5 hodin [21].

1.2.4 Terapeutické indikace

Dna je nejběžnější zánětlivou artritidou, která je rozšířená po celém světě [22]. Dna je způsobena zvýšenou hladinou sérové kyseliny močové. Je třikrát až čtyřikrát častější u mužů

než u žen a prevalence se zvyšuje s věkem [23]. Zvýšené koncentrace kyseliny močové v těle vedou k ukládání krystalů z monosodného urátu, a to zejména v kloubech. Tyto krystaly vyvolávají uvolňování prozánětlivých cytokinů, zejména interleukinu (IL)-1-beta, které stimulují zánět, a to má za následek velkou citlivost a bolest kloubů [24]. Akutní stadium je léčeno krátkodobými protizánětlivými léky, ale dlouhodobá prevence může být dosažena snížením hladiny kyseliny močové. Současné léky snižující hladinu urátu zahrnují jak inhibitory xanthin oxidázy, tak i urikosurická činidla. Nedávné pokroky v roli urátových transportérů v proximálních tubulech ledvin vedly k vývoji nových urikosurických léků, včetně přípravku Lesinurad [25].

1.2.5 Nežádoucí účinky

Nejčastějšími nežádoucími účinky přípravku byly bolesti hlavy, chřipka, zvýšený kreatinin v krvi a gastroezofageální refluxní choroba. Přípravek se nedoporučuje k léčbě asymptomatické hyperurikémie a neměl by být používán jako monoterapie. V klinických studiích byly u přípravku pozorovány infarkty myokardu a mrtvice [11].

2 Teoretická část

2.1 Disociační konstanty a jejich stanovení

Jednou z nejdůležitějších fyzikálně-chemických vlastností každé drogy se považuje její hodnota pK_a , což je klíčový fyzikálně-chemický parametr ovlivňující mnoho biofarmaceutických charakteristik ve studiích farmakokinetiky a biologické dostupnosti [12-15]. pK_a předpovídá stupeň ionizace molekuly v určitém pH za použití Hendersonova-Hasselbachovy rovnice [15] a je nezbytná pro pochopení mnoha vlastností, které jsou nezbytné pro vývoj léků. Disociační konstanty sloučeniny ovlivňují lipofilnost, rozpustnost a propustnost a hrají klíčovou úlohu při charakterizaci absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování (ADME) [16, 17, 26-28]. V případě špatně rozpustných léčiv ve vodě se zvyšuje význam pK_a v kontextu s ADME [16]. Je to základní parametr při objevování léků, zejména ve fyziologických systémech, kde ionizační stav ovlivní rychlost, při které je sloučenina schopna difundovat přes membrány včetně hematoencefalické bariéry [17]. Úroveň obecného zájmu o takovéto ionizační jevy je patrná z počtu posledních publikací na toto téma [26, 27, 29]. Hodnoty pK_a mohou být buď experimentálně měřeny, nebo teoreticky předpovězeny:

- a. Mnoho nových léčiv je špatně rozpustných ve vodných roztocích a potenciometrické stanovení konstant těchto sloučenin je proto často obtížné. Spektrofotometrie a UV spektrální analýza (nazývaná též WApH technika [30]) je vysoce citlivá vhodná metoda pro stanovení pK_a u velmi zředěných vodných roztoků, protože vyžaduje relativně jednoduché zařízení a může pracovat se submikromolárními koncentracemi sloučeniny (přibližně 10^{-5} až 10^{-6} M) [31-33]. Sloučenina by měla absorbovat světlo díky přítomnosti chromoforu v blízkosti ionizačního centra, srov. ref. [31-33]. Autoři [34-37] ukázali, že spektrofotometrická titrace v kombinaci s vhodnými chemometrickými nástroji může být použita k určení disociačních konstant pK_a i pro málo rozpustné léky [35-38]. Nejdůležitějšími počítačovými programy jsou SQUAD84 [32] a REACTLAB [39]. Stále se předpokládá, že spektrofotometrické údaje jsou ve své podstatě méně přesné než potenciometrické údaje [40]; v důsledku toho se většina rovnovážných konstant stanovuje pomocí potenciometrických titračních technik s použitím programu ESAB [41] nebo HYPERQUAD [42, 43]. Většina aktivních farmaceutických složek (API) selhává kvůli problémům s nízkou rozpustností. Zlepšení rozpustnosti API může být dosaženo přípravou jeho solí. Obecně mají soli vyšší rozpustnost než kokystalické látky, které jsou naopak

rozpuštěnější než čistý API. Vortioxetin hydrobromid obsahuje kyselý proton, který se přenesne na sekundární atom N na piperazinovém kruhu Vortioxetinu, čímž vzniká vodíková vazba s nábojem [44].

- b. Přesnost teoretických předpovědí pK_a z molekulární struktury s dvěma prognostickými programy ACD/Percepta [45-51], MARVIN [45, 47, 48, 50, 52-55] byla zjištěna jako nejlepší ze všech devíti podobných programů. Meloun a kol. [56] použili regresní diagnostický algoritmus REGDIA v S-PLUS [57], aby kriticky zhodnotili přesnost pK_a predikce dvěma programy (ACD/Percepta [1, 48], MARVIN [48]) a vyhodnotili je za nejlepší. Balogh a kol. [48] také našli nejpředvídatelnější a nejspolehlivější prediktory, které mají být MARVIN a ACD/Percepta. Cílem naší studie bylo prozkoumat regresní analýzu matice absorpce pH s velmi malými změnami v spektrech a provést potenciometrické stanovení protonačního modelu pH-metricky tak, aby byly nalezeny vhodné podmínky pro spolehlivé regresní stanovení disociačních konstant. Znalosti o disociačních konstantách kyselin jsou nezbytné pro vývoj nových léčiv s biologickou aktivitou, v tomto dokumentu jsme stanovili překrývající se hodnoty pK_a (tj. $|pK_{a2} - pK_{a1}| < 3$) antidepressivního Vortioxetinu ve vodě.

Spektrofotometrické údaje pH-titrace byly zpracovány programy SQUAD84 [32] a REACTLAB [58], které vypočítávají rovnovážné konstanty (protonační nebo disociační) a spektrální profily molárních absorpčních koeficientů a distribuční diagram relativních koncentrací nelineární regrese pH-spektra. Podrobná WApH technika [30] a alternativní pH-potenciometrická titrace, byly popsány dříve viz. [35-38].

2.1.1 Disociační konstanta

Disociační konstanty kyselin K_a nebo bází K_b slouží k určení rozsahu ionizace molekul v roztoku při různém pH, a to je důležité pro znalost farmakokinetických a farmakodynamických vlastností nových léčiv [59]. Disociace vede k ustavení protolytické rovnováhy, kdy část látky je v nedisociované formě a část ve formě iontů. Acidobazickou rovnováhu slabého elektrolytu (HA) lze vyjádřit:



Léčiva jsou slabé kyseliny či báze a jejich síla je charakterizována disociační konstantou K_a . Vyskytují se v závislosti na pH v různých disociovaných nebo

nedisociovaných formách. Disociační konstanta K_a udává poměr mezi aktivitami těchto forem [60]. Pokud je léčivo slabou kyselinou, vyjádří se K_a jako záporný dekadický logaritmus rovnovážné konstanty:

$$pK_a = -\log K_a \quad (2)$$

pK_a smíšená disociační konstanta

K_a lze definovat jako podíl ze součinu aktivit produktů umocněných na stechiometrické koeficienty a ze součinu aktivit výchozích látek umocněných na stechiometrické koeficienty nebo můžeme aktivitu vyjádřit pomocí aktivitních koeficientů γ a koncentrací nedisociovaných/disociovaných forem ($\frac{[A^-][H^+]}{[HA]}$):

$$K_a = \frac{a_{H^+} \cdot a_{A^-}}{a_{HA}} \quad (3)$$

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \frac{\gamma_{A^-} \gamma_{H^+}}{\gamma_{HA}} \quad (4)$$

Ve zředěných roztocích jsou hodnoty γ jednotkové.

Koncentrační disociační konstanta K_c kyseliny HA je definována vztahem mezi rovnovážnými koncentracemi:

$$K_c = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad (5)$$

Při konstantní iontové síle lze použít smíšené disociační konstanty dle vztahu [61]:

$$K_{a,j} = \frac{[H_{j-1}L] a_{H^+}}{[H_jL]} \quad (6)$$

Hodnoty disociačních konstant jsou v tabulkách a slouží ke klasifikaci síly kyselin a zásad. Disociační konstanty byly stanoveny pomocí UV/VIS spektrofotometrie a pomocí potenciometrické pH-titrace [62].

Aktivitní koeficienty jsou závislé na iontové síle roztoku. Závislost smíšené disociační konstanty na iontové síle I pro disociační rovnováhu $HL^z \leftrightarrow L^{z-1} + H^+$ (oba ionty vykazují

efektivní průměr iontu \bar{a} přibližně stejně velký). Thermodynamická disociační konstanta je dána vztahem:

$$K_a^T = a_{H^+} a_{L^-} / a_{HL} \quad (7)$$

Vysolovací koeficient C je dán vztahem:

$$C = C_L - C_{HL} \quad (8)$$

Iontová síla se vypočte dle:

$$I = 0.5 \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (9)$$

Rozšířený Debye-Hückelův zákon vyjadřuje závislost:

$$pK_a = pK_a^T - \frac{A(1-2z)\sqrt{I}}{(1+B\bar{a}\sqrt{I})} + (C_L - C_{HL})I, \quad (10)$$

Pro vodný roztok při 25 °C platí, že:

$$A = 0.5112 \text{ mol}^{-1/2} \text{ l}^{1/2} \text{ K}^{3/2}$$

$$B = 0.3291 \text{ mol}^{-1/2} \text{ m}^{-1} \text{ l}^{1/2} \text{ K}^{1/2} 10^{10}$$

Pro vodný roztok při 37 °C platí, že:

$$A = 0.52314 \text{ mol}^{-1/2} \text{ l}^{1/2} \text{ K}^{3/2}$$

$$B = 0.33164 \text{ mol}^{-1/2} \text{ m}^{-1} \text{ l}^{1/2} \text{ K}^{1/2} 10^{10} \text{ [63].}$$

V omezeném rozsahu iontových sil ($I \leq 0.1$) lze vztah uvést bez vysolovacího koeficientu a použít zkrácený Debye-Hückelův zákon [62]:

$$pK_a = pK_a^T - \frac{A(1-2z)\sqrt{I}}{(1+B\bar{a}\sqrt{I})} \quad (11)$$

2.2 Potenciometrická titrace

Při potenciometrické titraci se používá měrný článek z měrné a srovnávací elektrody. Průběh titrace se zaznamenává a vyhodnocuje se průběh titrační křivky (především bod ekvivalence), která je ovlivněna průběhem reakce. Disociační konstanty ve vodném roztoku se stanovují vyčíslením průběhu pH potenciometrické titrace. Titrace je narušena pufracím účinkem vody a mnoho léčiv je ve vodě špatně rozpustných, a proto je určení konstant závažným problémem, protože potenciometrie má obvykle detekční limit 10^{-4} M [64, 65].

Hodnota $[H_{j-1}L]/[H_jL]$ určuje koncentrační konstantu pK_c , a ta je závislá pouze na koncentraci. Při studii protonace při nízké iontové síle nebo při více iontových silách, lze získat extrapolací v bodě nulové iontové síly thermodynamickou disociační konstantu pK_a^T [66].

2.2.1 Potenciometrie

V potenciometrii se měří elektromotorické napětí galvanického článku, které je ovlivněno koncentrací (aktivitou) iontu. Galvanický článek se skládá z měrné elektrody (její potenciál je závislý na aktivitě iontu) a z referentní elektrody (ta má potenciál konstantní). Poločlánky jsou od sebe odděleny kapalinovým rozhraním a lze je spojit kapalinovým můstkem (snižuje kapalinový potenciál a nedochází k difúznímu míšení). Když dosáhnou všechny děje ve článku rovnováhy, je výsledné napětí rovnovážné. Chemická energie se mění na elektrickou.

Pomocí přímé potenciometrie zjišťujeme, jak je roztok kyselý či zásaditý. Spektrofotometrie využívá rovněž potenciometrického měření pH. Hodnoty standardních pufrů ke kalibraci pH-metru jsou určeny z měření s článkem bez převodu. Skleněná elektroda je nejpoužívanější pro měření pH ve vodných roztocích.

2.2.2 Iontově selektivní elektrody

Čidlem pro tyto elektrody je elektrochemická membrána a její potenciál je závislý na aktivitě iontu v roztoku. Tento typ elektrod je plněn roztokem soli iontu a chloridovým iontem (pro stálý potenciál argentchloridové elektrody).

Mezi iontově selektivní elektrody patří skleněná pH-měrná elektroda, která byla použita pro náš experiment. U skleněné elektrody tvoří elektrochemickou membránu skleněná

banička, která je ze speciálního skla a je naplněna vnitřním roztokem – octanový nebo fosforečnanový pufr s přísadkou chloridu (konstantní hodnota potenciálu na vnitřní stěně a konstantní potenciál argentchloridové elektrody). Tloušťka stěny je cca 0.1 mm a sklo obsahuje alkalický kov. Tyto elektrody se používají pro pH 1-14. Struktura skla je tvořena křemičitanovými řetězci a v nich jsou kyslíky vázány křemíkové atomy. Vytváří tak nepravidelný 3D skelet. Všechny křemíkové atomy jsou obklopeny čtyřmi kyslíky. Kyslíkové atomy nesou záporný náboj a na něj jsou poutány kationty. Elektrický proud je veden sklem díky poruchám ve struktuře skla. Sodný iont je přesunut a na jeho místě se uvolní záporný náboj, na povrchu sodný iont s vodou hydrolyzuje, přejde do roztoku a jeho místo je zaplněno vodíkovými kationty. Voda se dostává do povrchu skla a dochází k hydrataci, zbobtnání vrstvy na povrchu, tím vznikne kompaktní vrstva, a ta má zásadní vliv na rychlost ustavení rovnováhy na povrchu. Banička nesmí vyschnout, jinak by došlo k jejímu popraskání, a tím ke znehodnocení elektrody.

Pokud chceme vztah pro membránový potenciál těchto elektrod, tak vycházíme z podmínky elektroneutality, což znamená, že celkový počet skupin, které se účastní výměnné rovnováhy je konstantní a rovná se součtu koncentrace vodíkových a sodných iontů na povrchu elektrody. Výsledný potenciál je nulový, když se rovnají aktivity iontů ve vnitřním a měřeném roztoku a výměnný proces probíhá stejně na obou površích baničky. Reálně to neplatí kvůli odlišnému složení vrstev skla a měří se rozdíl potenciálů, tzv. asymetrický potenciál, který po nějakém čase máčení dosáhne konstantní hodnoty a při kalibraci pH-metru se tento potenciál vykompenzuje a není závislý na pH. Při potenciometrické pH-titraci byla použita skleněná elektroda HC103 (THETA '90).

Před samotnou analýzou je nutné provést kalibraci pomocí standardních pufrů [67].

2.2.3 Chemický model pH-potenciometrickou titrací

V rovnováhách se chemickým modelem rozumí počet částic rovnovážné směsi, jejich stechiometrie, konstanty stability, křivky molárních absorpčních koeficientů apod. Dříve byla potenciometrická pH-titrace standardní metodou pro stanovení disociačních konstant kvůli přesnosti a dostupným, rychlým a automatizovaným přístrojům. Při potenciometrické titraci byl vzorek titrován kyselinou (HCl) nebo hydroxidem (KOH) a měřeno pH pomocí skleněné pH-elektrody. Hodnota smíšené disociační konstanty pK_a byla vypočtena z polovičního bodu ekvivalence. K přesnému určení bodu ekvivalence slouží obvykle druhá derivace pH v závislosti na spotřebě titračního činidla [65].

2.2.3.1 Program ESAB

Program ESAB používá metodu nejmenších čtverců v regresní analýze acidobazické titrační křivky. Analyzují se experimentální data a hledá se nejtěsnější proložení titračních křivek experimentálními body. Mírou věrohodnosti testovaných parametrů a modelu je těsnost proložení. Minimalizací reziduální sumy čtverců jsou disociační konstanty zjemňovány, dokud se reziduální odchylky neblíží hodnotě blízké nule (rezidua se počítají z objemu titračního činidla). Hledáme minimum eliptického hyperparaboloidu ve vícerozměrném prostoru o $m+1$ rozměrech, kde m je počet neznámých odhadovaných parametrů. K vyčíslení odhadu slouží poslední vrstevnice v okolí nalezeného minima. Do programu ESAB jsou vložena data, a to přídavky KOH (titračního činidla), odečtené hodnoty pH, počáteční koncentrace léčiva a vodíkových iontů [68].

Účelová funkce $U(b)$ je definována:

$$U(b) = \sum_{i=1}^n w_i (V_{exp.} - V_{vypoč.})^2 = \sum_{i=1}^n w_i e_i^2, \quad (12)$$

w_i statistická váha, buď je rovna jedné, nebo je definována vztahem [63]:

$$\frac{1}{w_i} = s_i^2 = s_E^2 + \left[\frac{dE_i}{dV_i} \right]^2 \cdot s_v^2 \quad (13)$$

Při experimentu je často $s_E = 0.1$ mV nebo 0.01 jednotek pH a $s_v = 0.0005$ až 0.0020 cm^3 . Metoda nejmenších čtverců je optimalizována Gauss-Newtonovou metodou.

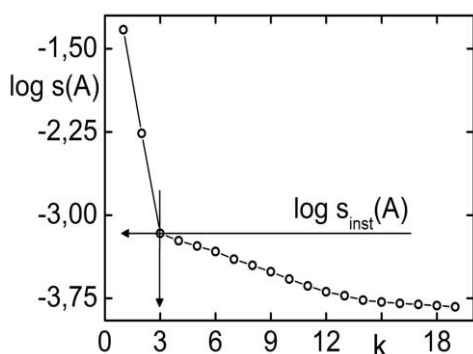
2.3 Určení chemického modelu spektrofotometricky

K určení disociačních konstant léčiv slouží také spektrofotometrie v UV/VIS oblasti pro koncentrace látky i 10^{-6} M. Podmínkou pro pH-titraci je přítomnost aktivního chromoforu v léčivu v blízkosti protonačního centra molekuly. Spektra se během titrace mění a největší změna je v okolí hodnoty disociační konstanty a jsou zaznamenávána pomocí spektrálního přístroje [69]. U UV/VIS spektrometrie dochází k absorpci UV a viditelného záření a k excitaci valenčních elektronů. Absorbance A je množství absorbovaného záření pro určitou vlnovou délku. Podle Lambert-Beerova zákona $A = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot l$ je absorbance přímo úměrná koncentraci látky c , tloušťce absorbující vrstvy l (kyvety) a molárnímu absorpčnímu koeficientu ϵ_λ [70].

Spektrofotometrická data při pH-titraci byla zpracována programem SQUAD84 [32] a REACTLAB [58], které vypočítávají rovnovážné (protonační nebo disociační) konstanty a distribuční diagram relativních koncentrací nelineární regresi pH-spektra. Podrobná WApH technika [30] a alternativní pH-potenciometrická titrace, byly popsány dříve [35-38].

Obecný postup spektrofotometrické studie protonační rovnováhy (analýza UV-spekter) byl popsán dříve [36, 61], a to následujícím schématem:

- 1) *Instrumentální chyba přístroje, $s_{inst}(A)$, a určení počtu světlo-absorbujících částic.*
 Program INDICES [71] odhaduje minimální počet světlo-absorbujících částic n_c metodou Wernimont-Kankareovy analýzy faktorů [33, 71] a instrumentální chyby přístroje $s_{inst}(A)$. Druhý moment absorbanční matice je vyčíslen z absorbanční matice \mathbf{A} a její transpozice \mathbf{A}^T , což dává symetrickou (čtvercovou) matici \mathbf{M} řádu n_s a hodnoty n_c , pozice $(\mathbf{M}) \leq n_c$. Použitím vlastních čísel g_j matice \mathbf{M} se odhaduje Kankareho reziduálová směrodatná odchylka absorbance $s_k(A)$, $s_k(A) = \{[tr(\mathbf{M}) - \sum_{i=1}^k \alpha_i]/(n_w - k)\}^{1/2}$, kde $tr(\mathbf{M})$ je stopa matice \mathbf{M} a r je odhadovaný počet složek ve směsi. Cattellův diagram vlastních čísel ukazuje hodnoty $s_k(A)$ pro různé počty aktivních komponent k , které jsou vykresleny proti pořadovému číslu k , $s_k(A) = f(k)$ a počet světlo-absorbujících částic je takové celé číslo, pro které platí $n_c = k$, pro které $s_k(A)$ se blíží instrumentální směrodatné odchylce absorbance $s_{inst}(A)$. Přesnost měření absorbance byla stanovena směrodatnou odchylkou absorbance pro použitý spektrofotometr $s_{inst}(A)$. Poté bylo zjištěno, že pokud $s_k(A) < s_{inst}(A)$ lze říci, že $n_c < k$.



Obr. 5 - Cattellův graf úpatí vlastních čísel.

- 2) *Teoretické predikce pK_a*: Dva programy MARVIN a ACD/Percepta, poskytují soubor výkonných nástrojů pro teoretické předpovědi pK_a na základě strukturních vzorců sloučeniny.
- 3) *Výpočetní strategie*: Byly použity dva programy pro numerickou analýzu spektra, technikou SQUAD84 [72] a REACTLAB [37, 58, 73].
- 4) *Diagnostika hledání a testování chemického modelu*: Podrobný postup grafické a numerické analýzy reziduí je popsán v [34, 36, 61] a zde stručně:
 - a) *Fyzikální smysl parametrických odhadů*: Zkoumá se fyzikální smysl disociačních konstant a molárního absorpčního koeficientu. Hodnota pK_{a,i} a ϵ_i by neměly být příliš vysoké ani příliš nízké a ϵ_i by nemělo být záporné. Empirickým pravidlem, které se často používá, je podmínka, že parametr je považován za významný, když je splněn vztah: $s(\beta_j) \times F_\sigma < \beta_j$, kde F_σ se rovná 3 pro 99.9 % pravděpodobnost.
 - b) *Fyzikální smysl koncentrace částic*: Fyzikální omezení se obecně aplikuje na koncentrace částic a jejich molární absorpční, jelikož to musí být kladná čísla. Volné koncentrace základních složek a různě protonovaných částic chemického modelu by měly vykazovat reálné molární hodnoty, tj. vyšší než 10⁻⁸ M.
 - c) *Test věrohodnosti pomocí statistické analýzy reziduí*: Pro identifikaci "nejlepšího" čili pravdivého chemického modelu by měl být reziduálový vektor e pečlivě analyzován. Jednou z nejdůležitějších veličin je *standardní směrodatná odchylka absorbance*, $s(A)$, která je odhadovaná na konci minimalizačního procesu $s(A) = \sqrt{U_{\min}/df}$, kde U_{\min} znamená minimální hodnotu reziduí - čtvercového součtu a df je stupeň volnosti, strana 101 v [74] a strana 290 v [75].
 - d) *Dekonvoluce spektra*: Rozklad každého experimentálního spektra do spekter jednotlivých různě protonovaných částic ukazuje, zda experimentální data pro navrhovaný experimentální rozsah pH, jsou přijatelná. V koncentracích nebo oblastech pH, kde více složek významně přispívá ke spektru, je třeba měřit více spekter. Minoritní částice mají relativní koncentraci v distribučním diagramu menší než 5 % celkové koncentrace základní složky c_L .
 - e) *Poměr signálu k instrumentální chybě při analýze malých změn ve spektrech* [61]: Změna absorbance Δ_{ij} je rozdíl absorbancí pro j -tou vlnovou délku v i -tém spektru, $\Delta_{ij} = A_{ij} - A_{i,\text{kyselina}}$, kde $A_{i,\text{kyselina}}$ a výsledný poměr $\Delta/s_{\text{inst}}(A)$ se nazývá poměr signálu k instrumentální chybě *SER* sledovaných spekter. Poměr *SER* se zkouší pro všechny absorbanční maticové prvky v celém rozsahu vlnové délky λ . Bylo prokázáno, že

když poměr $\Delta/s_{inst}(A)$ je roven nebo vyšší než 10, faktorová analýza je schopna předpovědět správný počet světlo-absorbujících částic v rovnovážné směsi.

- f) *Stanovení thermodynamické disociační konstanty*: Použila se zkrácená verze Debye-Hückelovy rovnice na údaje pro vodné roztoky a 25 °C, kde smíšená disociační konstanta pK_a je závislá proměnná, zatímco iontová síla I je nezávislou proměnnou.

2.3.1.1 Program SQUAD (84)

Program SQUAD hledá nejlepší odhady parametrů β_{pqr} a ε_{pqr} nelineární regresi metodou nejmenších čtverců:

$$RSC = U = \sum_{i=1}^{n_s} \sum_{k=1}^{n_w} (A_{exp,i,k} - A_{calc,i,k})^2 \approx \text{minimum}, \quad (16)$$

kde $A_{i,k,exp}$ je prvek absorbanční matice, neboli závisle proměnná a $A_{i,k,calc}$ je hodnota prvku matice vypočtená programem [68].

$$A_{calc,i,k} = \sum_{j=1}^{n_c} \varepsilon_{k,j} c_j \quad (17)$$

Na základě těsnosti proložení vypočtené absorbanční responzní plochy experimentálními body absorbance se provádí testování navržené hypotézy chemického modelu. Směrodatná odchylka absorbance, $s(A)$, představuje 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 protonační model je přijat [66, 68].

2.3.1.2 Program REACTLAB

Program REACTLAB slouží ke stanovení konstant stability z dat spektrofotometrické titrace. Jedná se o tzv. *soft modelingovou metodu*, která nevyžaduje pevně zadaný protonační model. Vedle programu INDICES v systému S-PLUS je také schopen stanovit počty chromoforů v roztoku faktorovou analýzou a nalézt hledané parametry, jako jsou protonační konstanty a molární absorpční koeficienty [58].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a roztoky

Léčivo Lesinurad: *Hydrochlorid intepirdinu* dodala společnost ZENTIVA k. s. (Praha) s deklarovanou čistotou (> 99%), která byla kontrolována metodou HPLC a alkalimetricky. Léčiva bylo váženo přímo do reakční nádoby, což mělo za následek koncentraci asi 9.9×10^{-5} mol. dm⁻³ [35].

Léčivo Vortioxetin: *Vortioxetin* dodala společnost ZENTIVA k. s. (Praha) s deklarovanou čistotou (> 99%), která byla kontrolována metodou HPLC a alkalimetricky. Léčiva bylo váženo přímo do reakční nádoby, což mělo za následek koncentraci asi 9.2×10^{-5} mol. dm⁻³ [35].

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 a standardizované HCl.

Kyselina chlorovodíková, HCl (1 M): Do odměrné baňky bylo dáno přesné množství 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): Do odměrné baňky bylo převedeno navážené a vypočtené množství tuhého KCl (p.a. Lachema Brno) a baňka byla doplněna redestilovanou vodou. KCl byl použit pro úpravu iontové síly.

Fosfátový pufr: Byl použit fosfátový pufr o 0.1 mol.l^{-1} .

Standardní komerční pufr byly využity pro kalibraci pH metru.

Tabulka 1 - Závislost pH komerčních pufrů na teplotě.

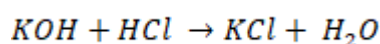
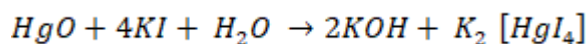
T [°C]	pH pufru A:	pH pufru B:	pH pufru C:	pH pufru D:
25	1.679	4.006	6.865	9.180
37	1.690	4.024	6.841	9.088

Redestilovaná voda: Pro přípravu všech roztoků byla použita redestilovaná voda, která byla odebrána z centrální ionexové úpravny a následně byla upravena na ultrazvukové lázni.

3.2 Standardizace odměrných roztoků

3.2.1 Kyselina chlorovodíková, HCl

Do měřicí nádoby bylo předloženo 25 ml demi-vody (která byla 30 minut v ultrazvuku), cca 1 g KI a vypočtená navážka HgO (na teoretickou spotřebu HCl = 250 µl). Takto připravený roztok byl titrován standardním roztokem HCl (za stálého míchání a probublávání argonem) a byly zaznamenány hodnoty pH po každém přidavku HCl dle rovnic:



Bod ekvivalence byl vyhodnocen metodou derivace. Celý postup byl opakován čtyřikrát. Aritmetický průměr koncentrace ze čtyř titrací je $c = 1.0618 \text{ mol.dm}^{-3}$.

Tabulka 2 - Standardizace HCl.

Titrace	1.	2.	3.	4.
Navážka HgO [g]	0.0271	0.0267	0.0284	0.0274
Navážka KI [g]	1.0312	1.4032	1.3030	1.2000
Spotřeba HCl [µl]	235.219	237.424	238.650	242.208
Koncentrace HCl [mol.l ⁻¹]	1.0638	1.0395	1.0988	1.0451

3.2.2 Hydroxid draselný, KOH

K 15 ml demineralizované vody v měřicí nádobce bylo mikrobyretou nadávkováno 250 µl standardního roztoku HCl. Roztok byl titrován mikrobyretou pomocí standardního roztoku KOH a po každém přidavku bylo odečteno určité pH, za stálého promíchávání a probublávání argonem.

Bod ekvivalence byl vyhodnocen derivační metodou. Aritmetický průměr koncentrace z opakovaných titrací je $c = 0.930366 \text{ mol.dm}^{-3}$.

3.3 Pístová mikrobyreta a její kalibrace

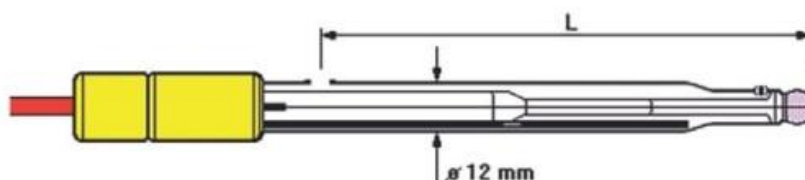
K potenciometrické a spektrofotometrické titraci bylo využito pístových mikrobyret s pístem typu PK1250 (META, Brno). Mikrobyreta byla naplněna demi-vodou, která byla 30 minut v ultrazvuku. Objem vody v mikrobyretě (2500 dílků) byl vytlačen do vysušené váženky a po uzavření váženky, byl tento objem zvážen na analytických vahách (KERN 870). Toto měření bylo opakováno 5x přičemž byla po celou dobu kalibrace sledována teplota použité vody.

Tabulka 3 - Kalibrace mikrobyret.

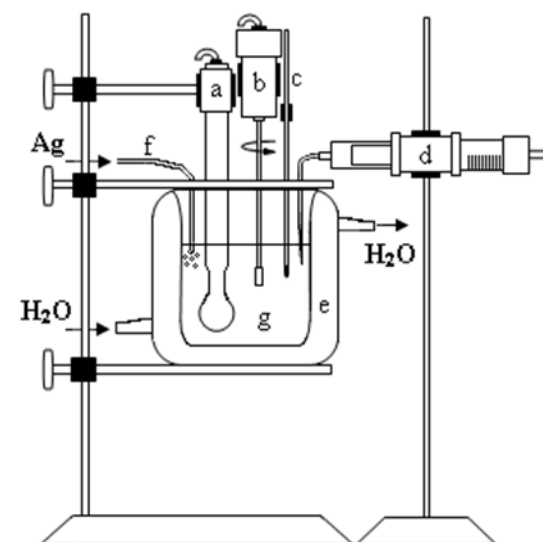
Mikrobyreta	č. 1 (KOH)	č. 2 (HCl)
Dílků mikrobyrety	2500	2500
Objem mikrobyrety [μ l]	508.117	1225.103
1 dílek mikrobyrety [μ l]	0.2032468	0.4900412

3.4 Použité přístroje

Při potenciometrické a spektrofotometrické titraci byla použita skleněná elektroda HC 103 (THETA '90), která je přesná s rychlou odezvou. Měří v rozsahu pH 0 – 14 a v teplotním rozsahu 0 - 70 °C. Jedná se o kombinovanou elektrodu – měrná skleněná elektroda a referenční argentschloridová. Byl použit digitální pH metr typu HANNA HI 3220 (pro měření pH v rozsahu -2.00 až 20.00 s přesností \pm 0.002 pH a v teplotním rozsahu -20 až 120 °C), ke kterému byla připojena skleněná elektroda a používá se k měření rovnovážného napětí. Průtočný termostat ED-5 (JULABO) byl držen na konstantních teplotních hodnotách díky rtuťovému teploměru, a tím i termostatovaný reaktůrek. K homogenizaci roztoku bylo použito elektrické míchadlo.



Obr. 6 - Skleněná elektroda HC 103 [76].



Obr. 7 - 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) termostatovaný reaktůrek, (f) hadička pro přívod argonu, (g) měřený roztok léčiva [77].

Spektrofotometrická měření byla provedena spektrofotometrem GBC Cintra 4040. Přístroj měřil v rozsahu vlnových délek 200 - 800 nm, s nastavenou velikostí štěrbině minimálně 0.5 nm a rychlostí měření 5 -7000 nm.min⁻¹. 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 byl deklarován menší než 0.0001 absorbančních jednotek A při A = 1 [38].

3.5 Postup potenciometrické a spektrofotometrické titrace

Postup byl dříve popsán v publikacích [35, 38, 63]. Metody spektrofotometrické a potenciometrické pH-titrace se ukázaly být nejlepšími instrumentálními metodami, jež spolehlivě určují také blízké disociační konstanty dokonce i obtížně rozpustných léčiv. Spektrofotometrická titrace byla použita jako alternativa k potenciometrické metodě pro stanovení hodnot pK_a látek kvůli vysoké citlivosti na nízké koncentrace látky až 10^{-5} M. Studovaná sloučenina však musí mít chromofor(y) v blízkosti ionizačního centra, takže protonizované a deprotonované částice vykazují dostatečnou spektrální rozlišnost. Nelineární regresní analýza spektrofotometrických dat je účinným a spolehlivým nástrojem, a to i v případě malých změn ve spektru při změně pH chromoforu.

3.6 Software

Odhad disociačních konstant byl proveden nelineární regresní analýzou UV- spekter s použitím programů SQUAD84 [32], REACTLAB [58] a potenciometrických údajů pH-titrací s použitím programu ESAB [41, 78]. Spektra byla interpretována pomocí programu INDICES [71]. Většina grafů byla vynesena pomocí grafického editoru ORIGIN 9.1, ref. [79]. Programy ACD/Percepta [45-51] a MARVIN [45, 47, 48, 50, 52-55] pro předpovědi pK_a jsou založeny na strukturních vzorcích léčiv.

4 Výsledky a jejich diskuse

4.1 Vortioxetin

Spektrofotometrické a potenciometrické stanovení protonačního modelu jsou vhodné pro spolehlivé regresní stanovení i blízkých disociačních konstant.

4.1.1 Analýza spekter

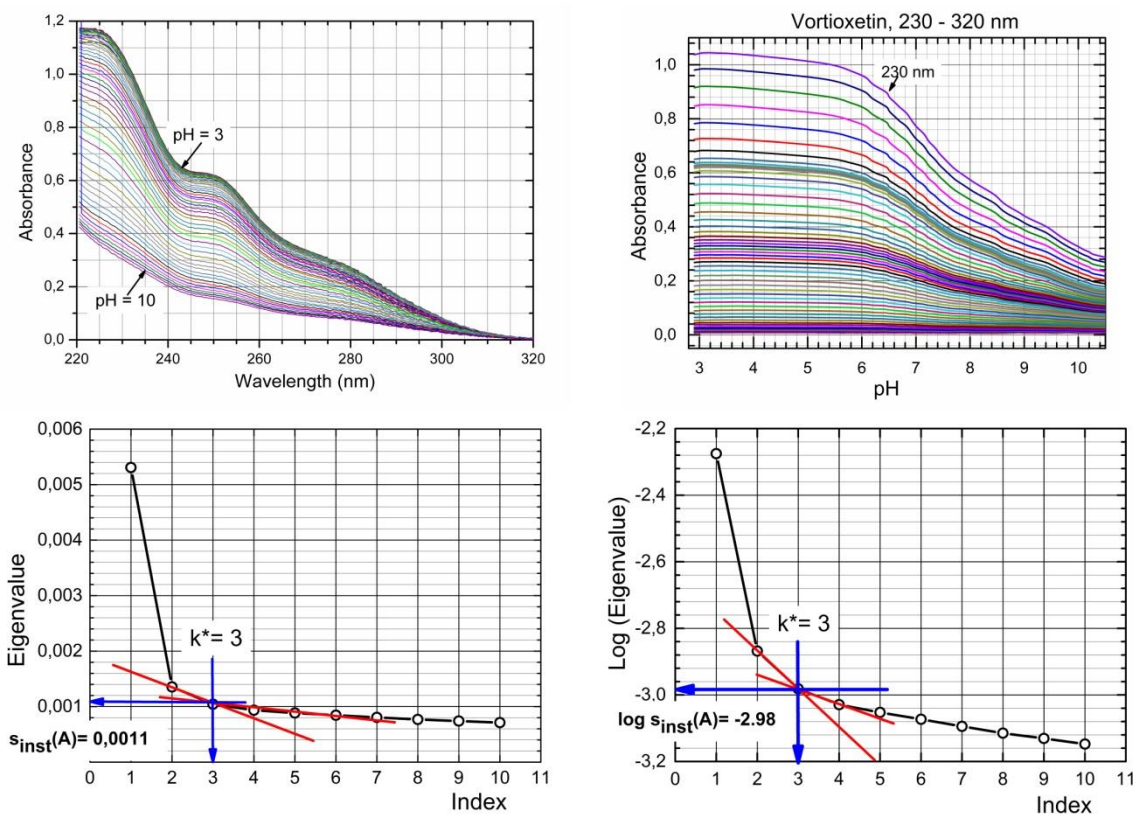
Strategie efektivního experimentování s určením disociačních konstant, pro niž byla použita spektrální analýza podle tutoriálu [36]. Cílem kvalitativní interpretace spektra je vyhodnocení dat, odstranění odlehlých bodů a odhad minimálního počtu faktorů, které jsou nezbytné k popisu experimentálních dat.

Instrumentální chyba přístroje, $s_{\text{inst}}(A)$, a určení počtu světlo-absorbujících částic n_c : Vortioxetin má komplikovanou molekulární strukturu (viz. obr. 1 a 9). Protonační rovnováhy byly sledovány spektrofotometricky (viz obr. 8a a 8b). Spektra ve formě absorbanční matice A , získaná pro různé hodnoty pH, byla podrobena faktorové analýze ke stanovení počtu světlo-absorbujících částic, n_c , algoritmem INDICES [71].

Program INDICES označuje bod zlomu na křivce $s_k(A) = f(k)$ v Cattellově grafu $s_k(A) = f(k)$ za použití přístupu Wernimont-Kankare, $s(A)$, viz. publikace [34, 71]) a dává $k = 3$ odpovídající souřadnici $s_3(A) = 0.9$ mAU (obr. 8c). Tato hodnota představuje také skutečnou chybu přístroje $s_{\text{inst}}(A) = 0.9$ mAU spektrofotometru CINTRA 5 (GBC, Austrálie). Počet světlo-absorbujících částic, n_c , pomáhá vytvořit protonační model. To znamená, že se budou uvažovat dvě disociační konstanty a bude se předpokládat přítomnost tří částic LH_3^{2+} , LH_2^+ a LH. Grafy jsou vykresleny také v logaritmickém měřítku a počet světlo-absorbujících částic, n_c , lze předpovědět z indexové funkce nalezením bodu $n_c = k = 3$, kde bod zlomu je $PC(k) = f(k)$ (obr. 8d).

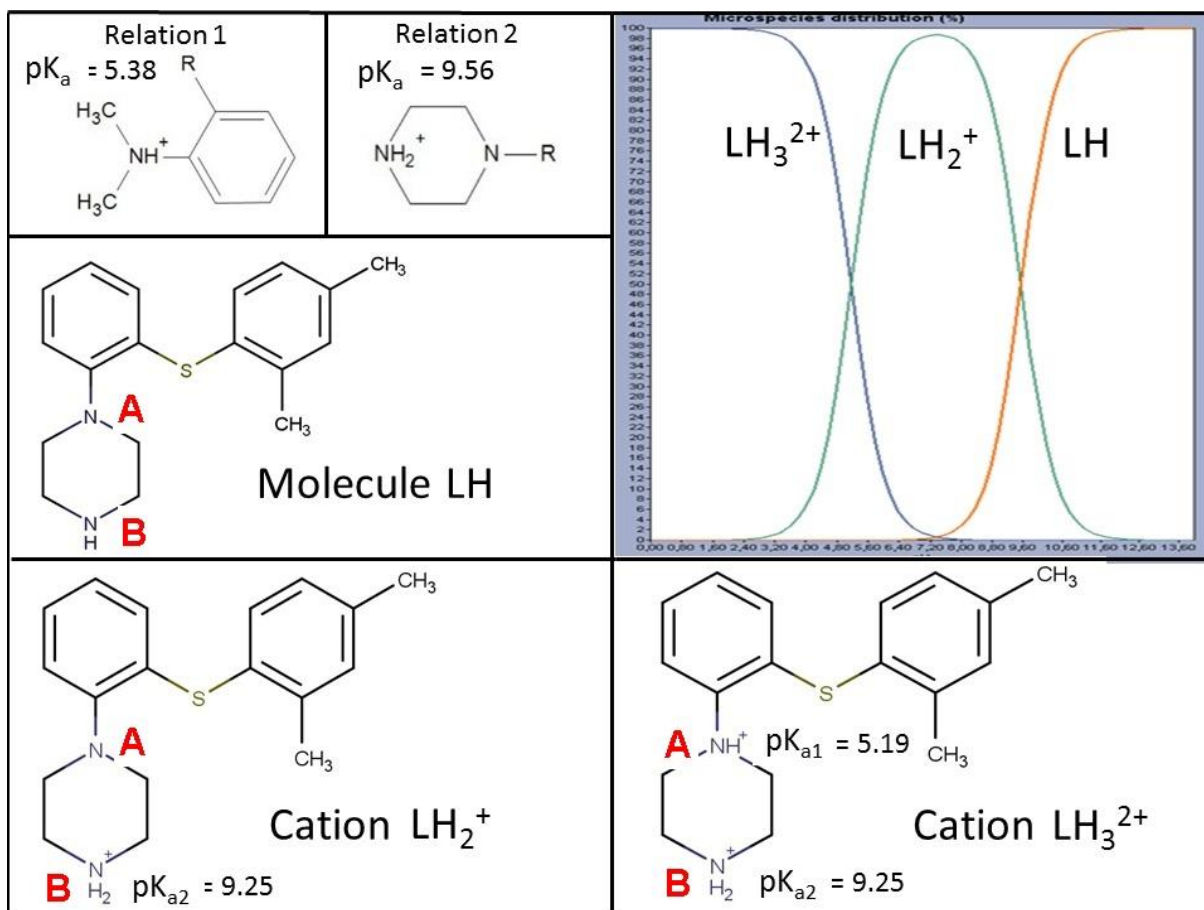
Predikce pK_a : MARVIN předpovídá dvě ionizační místa (označená jako A a B na obr. 9), která mohou být spojena s disociačními konstantami; obě ionizační místa jsou spojena s atomem dusíku. Makrodisociační konstanty Vortioxetinu byly předpovězeny podle chemické struktury analyzované dvěma spolehlivými pK_a predikčními nástroji. ACD/Percepta byla spuštěna pomocí modelu GALAS. Predikce pK_a programem MARVIN jsou založeny na vypočítaném částečném náboji atomů umístěných v analyzované struktuře za použití Hammett-Taftova postupu (obr. 9). Podle distribučního diagramu (MARVIN) na obr. 9 se má

Vortioxetin chovat převážně jako neutrální molekula LH při pH od 8 do 11. Když se roztok okyselí z pH 8 na 6, vytvoří se kationt LH_2^+ jako ionizační místo B. Při změně pH z 6 na 3 se objevil další kation LH_3^{2+} a ionizační místo A. Predikce disociačních konstant Vortioxetinu byla provedena programem MARVIN k určení protonačních míst.



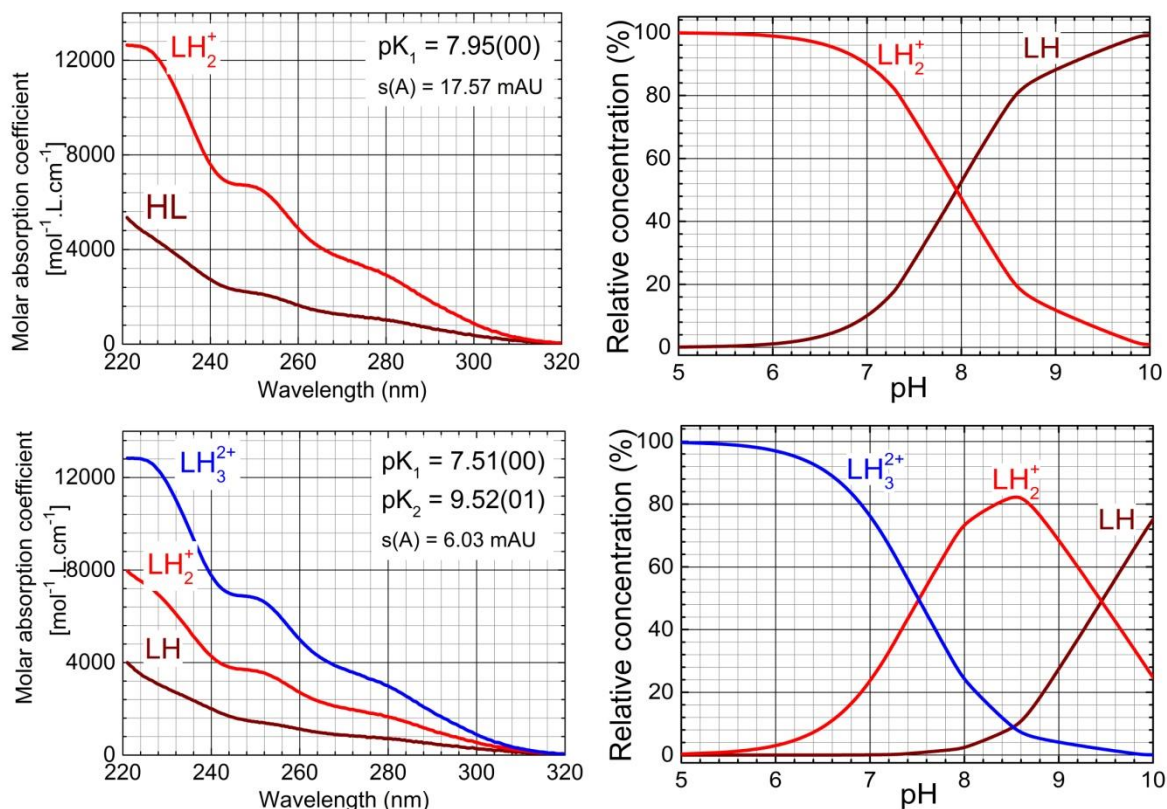
Obr. 8 - a) 2D absorbanční matice, b) Soustava A-pH křivek týkající se 70 naměřených UV/VIS absorbančních spekter protonační rovnováhy pro 9.2×10^{-5} M Vortioxetinu v čistě vodě při 25 °C, která tvoří vstupní data pro programy SQUAD84 a REACTLAB, c) Grafické určení hodnoty absorbanční matice Vortioxetinu umožňuje stanovení počtu světlo-absorbujících částic, n_c , ve směsi za použití Cattellova grafu $s_k(A) = f(k)$ na základě kritéria Wernimont-Kankare (SVD). Veličina $s_k(A)$ je vypočítaná standardní odchylka absorbance, která je odhadnuta faktorovou analýzou absorbanční matice a k je hodnota matice. Zde $k^* = 3$ ukazuje na tři částice absorbujících světlo ve směsi, $n_c = 3$ a skutečná instrumentální chyba použitého spektrofotometru je $s_{inst}(A) = 0.9$ mAU, d) Cattellova graf $s_k(A) = f(k)$ v logaritmicke měřítku (INDICES v S-PLUS).

Volba výpočetní strategie: Byla použita technika SQUAD84 a technika REACTLAB. V obou programech byla použita stejná výpočetní strategie, tj. *regresní triplet* (kritika dat, model a metoda), viz. publikace [34, 75].



Obr. 9 - Znáornění protonované molekulární struktury Vortioxetinu s předpovězenými disociačními konstantami a distribuční schéma relativní koncentrace různě protonovaných iontů pomocí predikce MARVIN. A: Vztah 1 predikuje pK_a protonovaného fragmentu, který je podobný s Vortioxetinem, B: Vztah 2 predikuje pK_a jiného protonovaného fragmentu.

Hledání a testování chemického modelu. Hledání nejlepší hypotézy chemického modelu, obsahujícího jednu nebo dvě disociační konstanty je ukázáno na obr. 10. Spektra byla zkoumána tak, aby označovala nejvhodnější rozsah vlnových délek, ve kterých je chromofor aktivní a obráží disociaci v molekule. Nejlepší regresní model byl vyhledán testováním dvou pracovních hypotéz protonačního modelu: první týkající se jedné a druhé s dvěma disociačními konstantami. Kritériem spolehlivosti mezi navrhovanými hypotézami bylo kritérium $s(A)$ v testu věrohodnosti. Současně byly porovnány odhady disociačních konstant pomocí dvou regresních programů, tj. SQUAD84 a REACTLAB (tabulka 4 a 5). Průměr absolutních hodnot reziduí $E|e|$ [mAU], směrodatná odchylka reziduí $s(e)$ [mAU] a Hamiltonův R-faktor [%] v programu SQUAD84 obecně ukázaly, že lepšího proložení spekter bylo vždy dosaženo pro protonační model se dvěma disociačními konstantami. Zdálo se, že REACTLAB nabízí spolehlivější odhady parametrů, jelikož vždy dosahoval lepšího proložení křivky než starší program SQUAD84.



Obr. 10 – Pomocí programu SQUAD84 hledání nejlepšího protonačního modelu Vortioxetinu v rozmezí pH od 5 do 10 pro jednu a dvě disociační konstanty pK_{a1} a pK_{a2} za použití 9.2×10^{-5} M Vortioxetinu při $I = 0.002$ při 25 °C. Vlevo: grafy molárních absorpčních koeficientů pro různé protonované částice. Vpravo: distribuční diagramy různě protonovaných částic v závislosti na pH (SQUAD84, ORIGIN).

V tabulkách 4 a 5 je závislost odhadů dvou disociačních konstant na iontové síle hydrobromidu Vortioxetinu vyčíslená programy SQUAD84 a REACTLAB při 25 °C. Roztok 9.2×10^{-5} M Vortioxetinu při $I = 0.002$ při 25 °C pro n_s spektrum naměřené při n_w vlnových délkách pro $n_z = 2$ základní složky L a H tvoří různě protonované částice. Standardní odchylky jsou v posledních platných číslicích v závorkách. Kritérium rozlišení a spolehlivost zjištěných odhadů parametrů jsou prokázána těsností proložení, reziduální směrodatnou odchylkou podle faktorové analýzy $s_k(A)$ [mAU], průměrem absolutních hodnot reziduí $E|\bar{e}|$ [mAU], směrodatnou odchylkou reziduí $s(\hat{e})$ [mAU], sigmou $s(A)$ [mAU] z programu REACTLAB a Hamiltonovým R-faktorem [%] z programu SQUAD84.

Tabulka 4 - Závislost odhadů dvou disociačních konstant na iontové síle *hydrobromidu Vortioxetinu* pomocí programů SQUAD84 a REACTLAB pro 25 °C.

25°C					
Ionic strength I_0 [mol/L]	0.0262	0.0357	0.0451	0.0544	
Cattel's scree plot indicating the rank of the absorbance matrix (INDICES)					
Number of spectra measured, n_s	33	35	41	31	
Number of wavelengths, n_w	96	95	95	97	
Number of light-absorbing species, k^*	3	3	3	3	
Residual standard deviation, $s_e^*(A)$ [mAU]	0.98	1.02	1.22	1.11	
Estimates of dissociation constants in the searched protonation model					
$pK_{a1}(s_1), LH_4^{3+} = H^+ + LH_3^{2+}$	SQUAD84	7.80(04)	8.05(04)	8.03(11)	8.09(06)
	REACTLAB	7.79(07)	8.04(01)	8.02(01)	8.09(01)
$pK_{a2}(s_2), LH_3^{2+} = H^+ + LH_2^+$	SQUAD84	9.27(03)	9.20(03)	9.60(09)	9.55(05)
	REACTLAB	9.23(02)	9.58(02)	9.55(04)	9.54(03)
Goodness-of-fit test with the statistical analysis of residuals					
Mean residual $E \bar{\epsilon} $ [mAU]	SQUAD84	11.50	15.35	14.5	13.32
	REACTLAB	11.47	15.21	14.43	13.16
Standard deviation of residuals $s(\epsilon)$ [mAU]	SQUAD84	17.79	29.05	30.50	26.90
	REACTLAB	16.96	27.79	29.33	25.21
Sigma from ReactLab [mAU]	REACTLAB	17.22	28.19	29.69	25.98
Hamilton R-factor from SQUAD84 [%]	SQUAD84	0.021	0.035	0.029	0.027

Tabulka 5 - Závislost odhadů dvou disociačních konstant na iontové síle *hydrobromidu Vortioxetinu* pomocí programů SQUAD84 a REACTLAB pro 37 °C.

37°C									
Ionic strength I_0 [mol/L]		0.0085	0.0181	0.0277	0.0372	0.0466	0.0558		
Cattel's scree plot indicating the rank of the absorbance matrix (INDICES)									
Number of spectra measured, n_s		46	53	49	50	49	47		
Number of wavelengths, n_w		234	117	117	117	117	117		
Number of light-absorbing species, K^*		3	3	3	3	3	3		
Residual standard deviation, $s_{\hat{\epsilon}}(4)$ [mAU]		1.21	0.82	0.88	0.84	0.83	0.86		
Estimates of dissociation constants in the searched protonation model									
$pK_{a1}(\phi_1), LH_4^{3+} = H^+ + LH_3^{2+}$	SQUAD84	7.58(02)	7.50(02)	7.77(02)	7.93(04)	8.08(06)	7.89(02)		
	REACTLAB	7.58(00)	7.50(01)	7.76(00)	7.93(01)	8.03(01)	7.89(01)		
$pK_{a2}(\phi_2), LH_3^{2+} = H^+ + LH_2^+$	SQUAD84	9.15(01)	9.19(01)	9.49(01)	9.48(03)	9.66(05)	9.38(02)		
	REACTLAB	9.14(01)	9.18(01)	9.47(01)	9.47(02)	9.54(03)	9.38(01)X		
Goodness-of-fit test with the statistical analysis of residuals									
Mean residual $E \hat{\epsilon}$ [mAU]	SQUAD84	68.50	4.56	6.11	10.9	15.61	8.01		
	REACTLAB	2.29	5.09	4.27	7.62	10.69	7.98		
Standard deviation of residuals $s(\hat{\epsilon})$ [mAU]	SQUAD84	16.30	9.65	11.80	24.70	35.25	19.70		
	REACTLAB	4.58	6.01	7.48	15.71	22.27	9.54		
Sigma from ReactLab [mAU]	REACTLAB	19.90	9.47	11.63	24.23	34.45	19.25		
Hamilton R-factor from SQUAD84 [%]	SQUAD84	0.028	0.019	0.021	0.043	0.058	0.029		

Dvě disociační konstanty pK_{a1} , pK_{a2} a tři molární absorpční koeficienty Vortioxetinu ϵ_{LH} , ϵ_{LH2} , ϵ_{LH3} byly odhadnuty programy SQUAD84 a REACTLAB. Spolehlivost odhadů parametrů lze ověřit následujícími obecnými diagnostikami (obr. 10), jak bylo podrobně popsáno v odkaze [36]:

1) *Fyzikální význam parametrických odhadů.* První diagnostika udává, zda všechny parametrické odhady $pK_{a,i}$ a ϵ_i mají fyzikální význam a dosáhnou reálných hodnot. Vzhledem k tomu, že standardní odchylky $s(pK_{a,i})$ parametrů $pK_{a,i}$ a $s(\epsilon_i)$ parametrů ϵ_i jsou významně menší než jejich odhady parametrů, všechny různě protonované částice jsou statisticky významné na hladině významnosti $\alpha = 0.05$. V levé části obrázku 10 jsou ukázány odhadované molární absorpční koeficienty všech různě protonovaných částic ϵ_{LH} , ϵ_{LH2} , ϵ_{LH3} Vortioxetinu vůči vlnové délce.

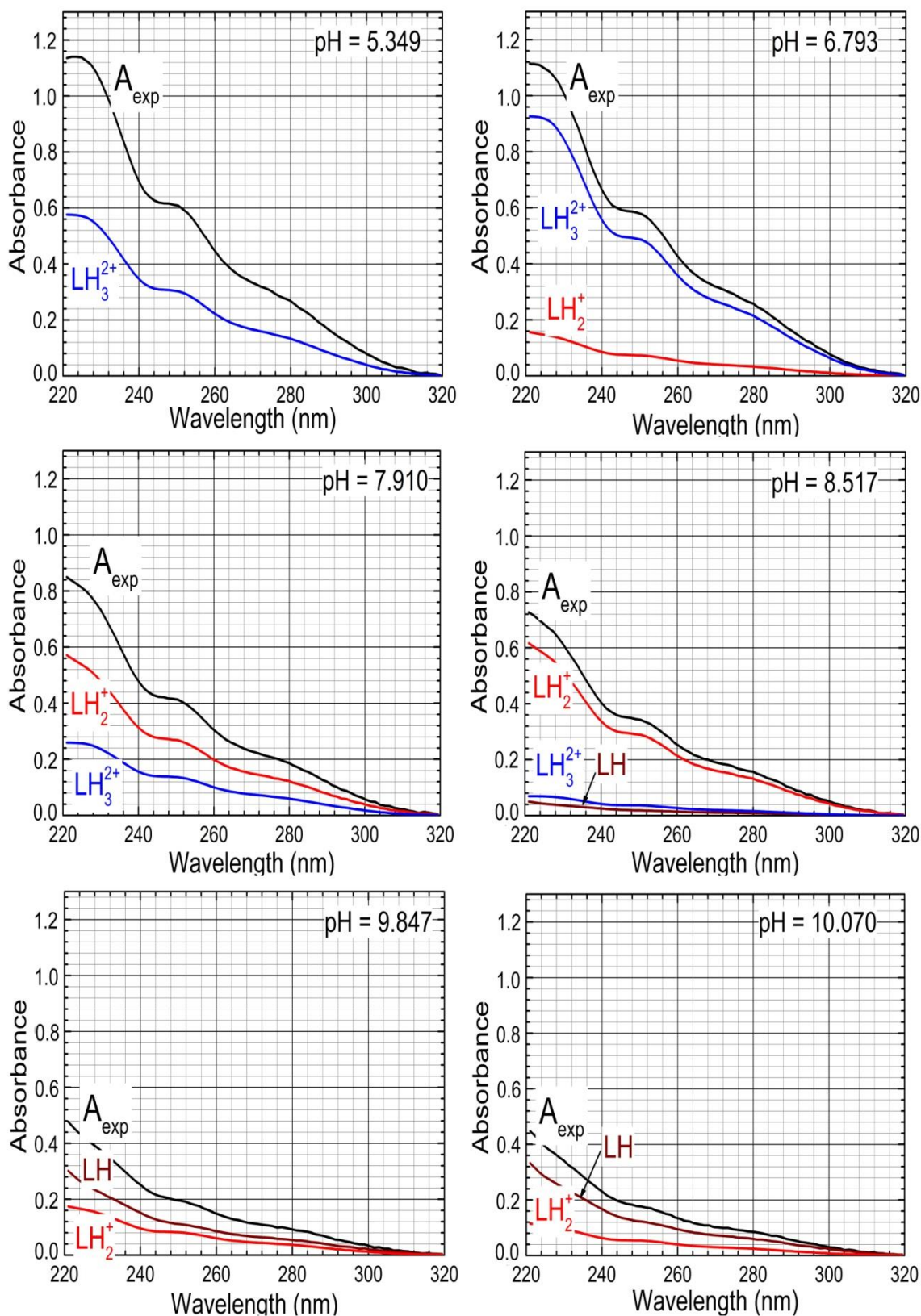
2) *Fyzikální význam koncentrací částic.* Druhá diagnostika zkoumá, zda všechny vypočtené volné koncentrace různě protonovaných částic v distribučním diagramu relativní koncentrace, vyjádřené v procentech mají fyzikální význam (obr. 10 vpravo). Distribuční diagram ukazuje protonační rovnováhu LH_3^{2+} , LH_2^+ a LH . Při neutrálním pH od 6 do 9 převládá Vortioxetin ve formě částic LH_3^{2+} a LH_2^+ , a od pH 8 do pH 9 pak ve formě LH_2^+ a neutrální molekuly LH . Acidifikace kationtu LH_2^+ vytváří kation LH_3^{2+} . Při koncentracích 10^{-4} až 10^{-6} M je Vortioxetin dostatečně rozpustný a všechny jeho disociační konstanty mohou být proto stanoveny spektrofotometricky.

3) *Vyšetření těsnosti proložení:* I když statistická analýza reziduí [36] poskytuje nejprísnejší posouzení věrohodnosti, musí zde být použity realistické empirické limity. Statistická měření všech reziduí e dokazuje, že bylo dosaženo globálního minima eliptického hyperparaboloidu RSS (tabulka 4 a 5): průměr absolutních hodnot reziduí $E|\bar{e}|$ [mAU] a směrodatná odchylka reziduí $s(\bar{e})$ [mAU] musí vždy nabývat dostatečně nízkých hodnot, prokazující tak velmi dobré proložení. To dokazuje i Hamiltonův *R-faktor*. Disociační konstanty odhadnuté pomocí SQUAD84 a REACTLAB ze všech reprodukováných měření jsou přitom v dobré shodě. SQUAD84 má velkou výhodu v testu těsnosti proložení, provedeného statistickou analýzou reziduí. Reprodukovatelnost tří experimentálních spektrálních dat s využitím dvou regresních programů ukazuje, že dvě disociační konstanty

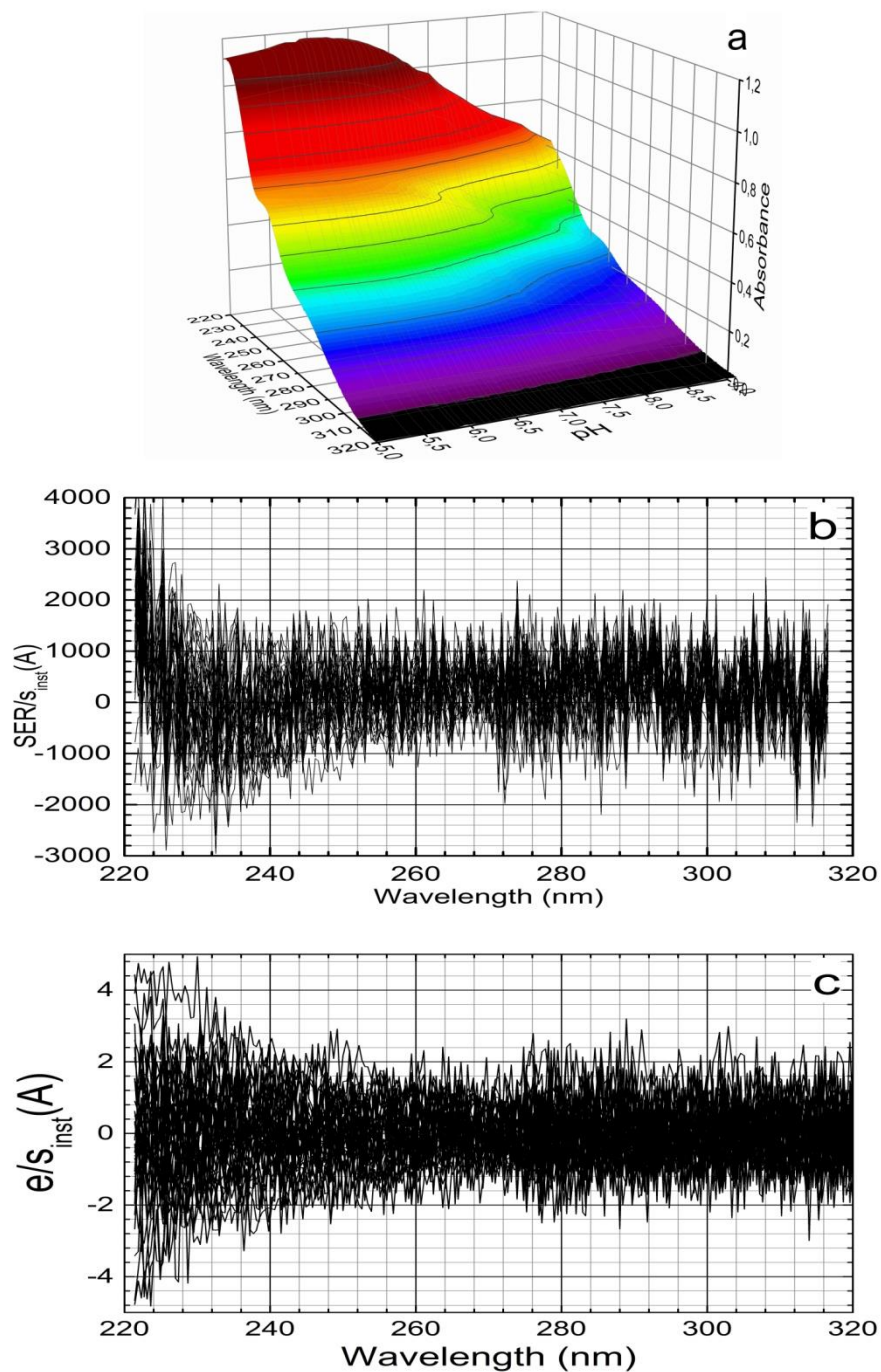
pK_{a1} 7.74 a pK_{a2} 9.15 jsou v regresním modelu dobře stanoveny a jejich numerické vyhodnocení je tedy spolehlivé (tabulka 4 a 5).

Dekonvoluce spektra. Obrázek 11 ukazuje šest po sobě následujících obrázků od $\text{pH} = 5.25$ až $\text{pH} = 10.07$, které ukázaly postupnou deprotonaci ve spektrech, kdy každé experimentální spektrum bylo rozloženo do spektra svých různě protonovaných částic ve směsi Vortioxetinu. Při $\text{pH} = 5.35$ převažuje kation LH_3^{2+} v roztoku. Při $\text{pH} = 6.79$ spolu s kationtem LH_2^+ vykazuje částice LH_3^{2+} absorpční pás při stejné vlnové délce absorpčního maxima λ_{max} . Při $\text{pH} = 7.91$ a 8.52 se experimentální spektrum rozkládá na dva absorpční pásy, týkající se kationtů LH_3^{2+} a LH_2^+ . Při $\text{pH} = 9.85$ se neutrální molekula LH vyskytuje u kationtu LH_2^+ a koncentrace LH v roztoku se zvyšuje až na hodnotu $\text{pH} = 10.07$.

Poměr signálu k instrumentálnímu šumu při analýze malých změn ve spektru. Byl analyzován 3D graf absorbanční responzní plochy (obr. 12a). Výsledný poměr normalizovaných změn spektra $SEI = \Delta/s_{\text{inst}}(A)$ se zobrazuje vůči vlnové délce λ pro všechny absorbanční maticové prvky (obr. 12b). Poměr SEI se pak porovnává s limitní hodnotou SEI a testuje se, zda jsou naměřené, i tak malé změny absorbancí stále ještě výrazně větší než instrumentální šum. Pokud je hodnota SEI větší než 10, faktorová analýza je schopna odhadnout správný počet světlo-absorbujících částic v rovnovážné směsi. K průkazu, že nelineární regrese může analyzovat taková spektrální data, byla zde rezidua porovnána s instrumentálním šumem, $s_{\text{inst}}(A)$. Obrázek 12c ukazuje porovnání poměru reziduí spektra proti instrumentálnímu šumu, poměrem $e/s_{\text{inst}}(A)$ vůči vlnové délce měřeného Vortioxetinu. Je zřejmé, že většina reziduí má stejnou velikost jako instrumentální šum a poměr $e/s_{\text{inst}}(A)$ je vesměs menší než 2.



Obr. 11– Dekonvoluce každého experimentálního spektra 9.2×10^{-5} M Vortioxetinu při $I = 0.002$ a 25°C na spektra pro jednotlivé různě protonované částice ve směsi při pH : 5.35, 6.79, 7.91, 8.52, 9.85, 10.07 programem SQUAD84.



Obr. 12 – a) 3D graf absorbanční responzní plochy b) Změna absorbance ve spektru pro i -té spektrum a j -tý absorbanční bod spektra byla vypočítána jako $\Delta_{ij} = A_{ij} - A_i$ a poté byla podělena instrumentální směrodatnou odchylkou $s_{inst}(A)$, což vedlo k normalizovaným změnám spektra $SER = \Delta/s_{inst}(A)$. A_i znamená absorbanci kyselého formy Vortioxetinu, c) Graf poměru $e/s_{inst}(A)$ znamená poměr reziduí dělených instrumentální směrodatnou odchylkou $s_{inst}(A)$ versus vlnová délka λ pro všechny prvky reziduální matice pro Vortioxetin, zde se testuje, zda mají rezidua stejnou velikost jako instrumentální šum (REACTLAB, ORIGIN 9).

4.1.2 Analýza potenciometrických titračních dat

Potenciometrická titrace okyseleného Vortioxetinu a titrovaného hydroxidem draselným byla prováděna při 25 °C a 37 °C pro nastavenou hodnotu iontové síly (obr. 13). Počáteční odhad disociační konstanty studovaného Vortioxetinu, odpovídající střední hodnotě každé potenciometrické titrační křivky byl zjemněn programem ESAB.

Vzhledem k tomu, že Vortioxetin vykazuje dvě disociační konstanty, je jejich numerický odhad vyčíslen počítačovou nelineární regresí. Regresní analýza byla použita především na střední část titrační křivky, která se týkala alkalizovaného Vortioxetinu titrovaného kyselinou chlorovodíkovou a následnou opětovnou reakcí s hydroxidem draselným. Byla také vyčíslena Bjerrumova tvorná funkce, která je znázorněna na grafu na obr. 13. Odhady dvou disociačních konstant pK_{a1} , pK_{a2} jsou znázorněny na křivkách Bjerrumumovy tvorné funkce. Vzhledem k tomu, že u hodnot pH nad 10 a pH pod 4 se vyskytuje v titrovaném roztoku velmi jemná sraženina Vortioxetinu, která zpočátku tvoří jenom mírnou opalescenci, tato část titrační křivky s hodnotou pH nad 10 a pH pod 4 nebyla vzata do regresní analýzy pro odhad pK_{a1} a pK_{a2} .

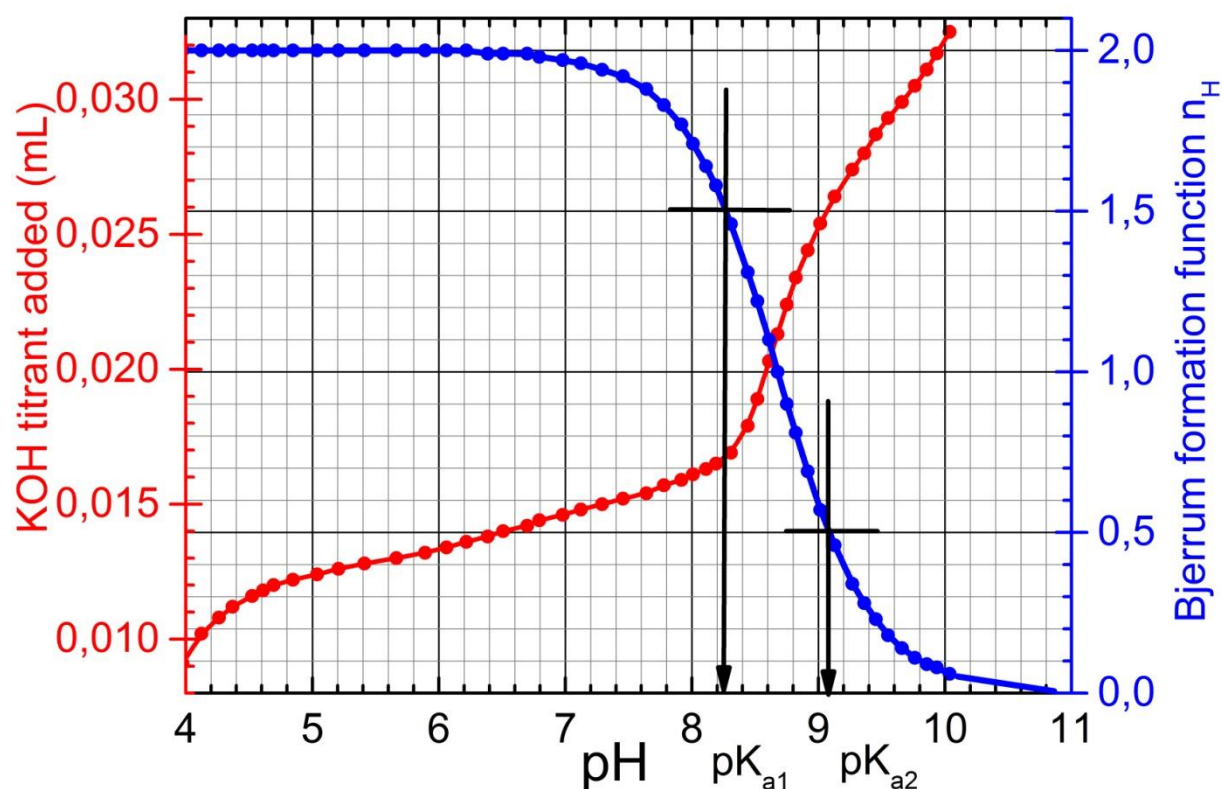
V následující tabulce č. 6 a 7 je ukázáno, jak ESAB zpřesní společné a skupinové parametry u pH-potenciometrické titrace *hydrobromidu Vortioxetinu* s HCl a KOH a odhadne disociační konstanty pK_{a1} , pK_{a2} s jejich standardními odchylkami v posledních platných číslicích v závorkách při 25 °C. Spolehlivost odhadu parametru je prokázána statistickým testem těsnosti proložení. Užije se střední hodnota aritmetického průměru reziduí $E(\hat{\epsilon})$ [mL], průměr absolutní hodnoty reziduí, $E|\hat{\epsilon}|$ [mL], směrodatná odchylka reziduí $s(\hat{\epsilon})$ [mL], šikmost $g_1(\hat{\epsilon})$ a špičatost $g_2(\hat{\epsilon})$ prokazující Gaussovo normální rozdělení a Jarque-Berra test normality.

Upřesněné společné parametry: pK_{a1} , pK_{a2} . Upřesněné skupinové parametry: H_0 , H_T , L_0 . Konstanty: $t = 25.0$ °C, $pK_w = 13.9799$, $V_0 = 20.22$ mL, $s(V) = s_{inst}(y) = 0.0001$ mL, I_0 upravená (v reaktúrku), $I_T = 0.9304$ (v byretě KOH).

Rezidua v programu ESAB jsou definována jako rozdíl mezi experimentálním a vypočteným objemem titrantu (tabulka 6 a 7). Test těsnosti proložení se provádí statistickou analýzou reziduí. Jsou zpřesněny také další skupinové parametry. Za citlivé kritérium spolehlivosti odhadnutých disociačních konstant je zde brán průměr absolutních hodnot reziduí $E|\hat{\epsilon}|$ [mL]. Srovnání reziduí s instrumentálním šumem, $s_{inst}(y)$, zde $s_{inst}(y) = s(V) = 0.0001$ [mL], potvrzuje vynikající těsnost proložení, protože průměr absolutních hodnot

reziduí $E | \bar{e} |$ [mL] a také směrodatná odchylka reziduí $s(\hat{e})$ [mL] jsou téměř stejné nebo nižší než experimentální šum $s_{inst}(y)$. Zde jsou hodnoty $E | \bar{e} | = 0.0001$ mL and $s(\hat{e}) = 0.0002$ mL podobné a stejné jako u směrodatné odchylky mikrobyrety $s(V) = 0.0001$ mL. Všechna rezidua oscilují mezi dolní -0.0002 ml a horní 0.0002 ml hranicí Hoaglinova intervalu spolehlivosti, a proto nebyly mimo tyto hranice nalezeny žádné odlehlé body (viz strana 80 v odkazu [80]). Odhady disociačních konstant programem ESAB jsou spolehlivé. Křivka těsnosti proložení je dále zlepšena pomocí zpřesnění skupinového parametru L_0 , t.j.skutečné koncentrace titrovaného léčiva Vortioxetinu.

Obrázek 14 ukazuje extrapolaci smíšených disociačních konstant na nulovou hodnotu iontové síly podle zkráceného Debye-Hückelova zákona pro protonační model dvou disociačních konstant při teplotách 25 °C a 37 °C.



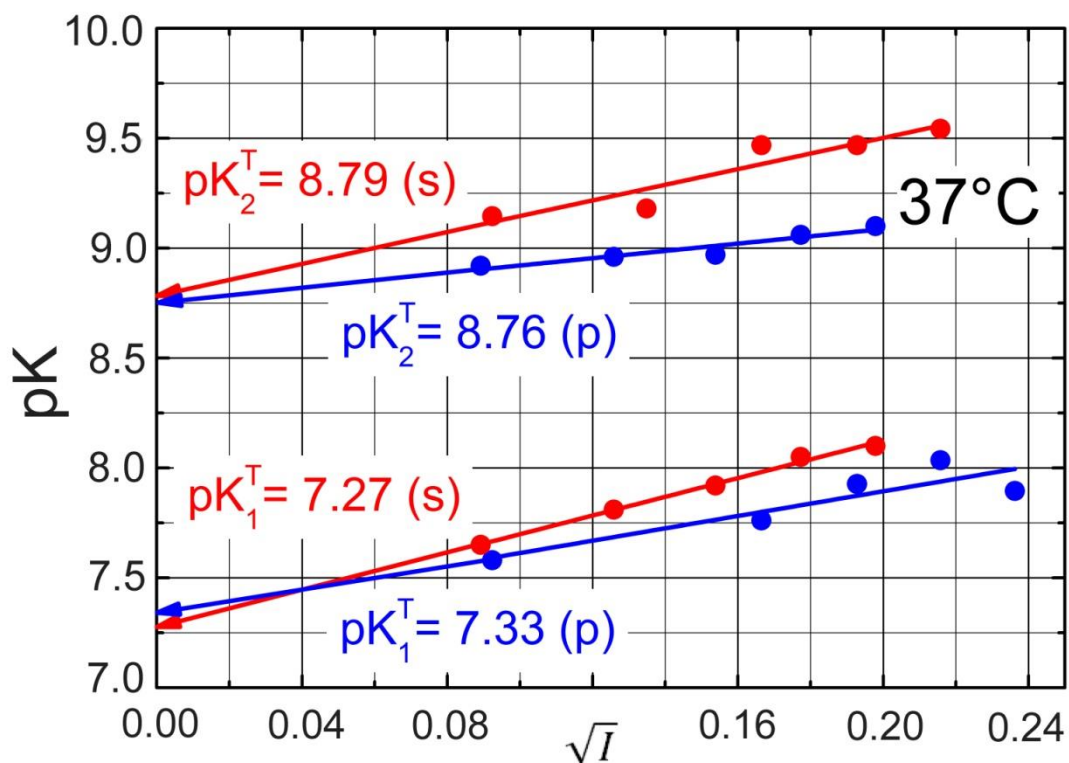
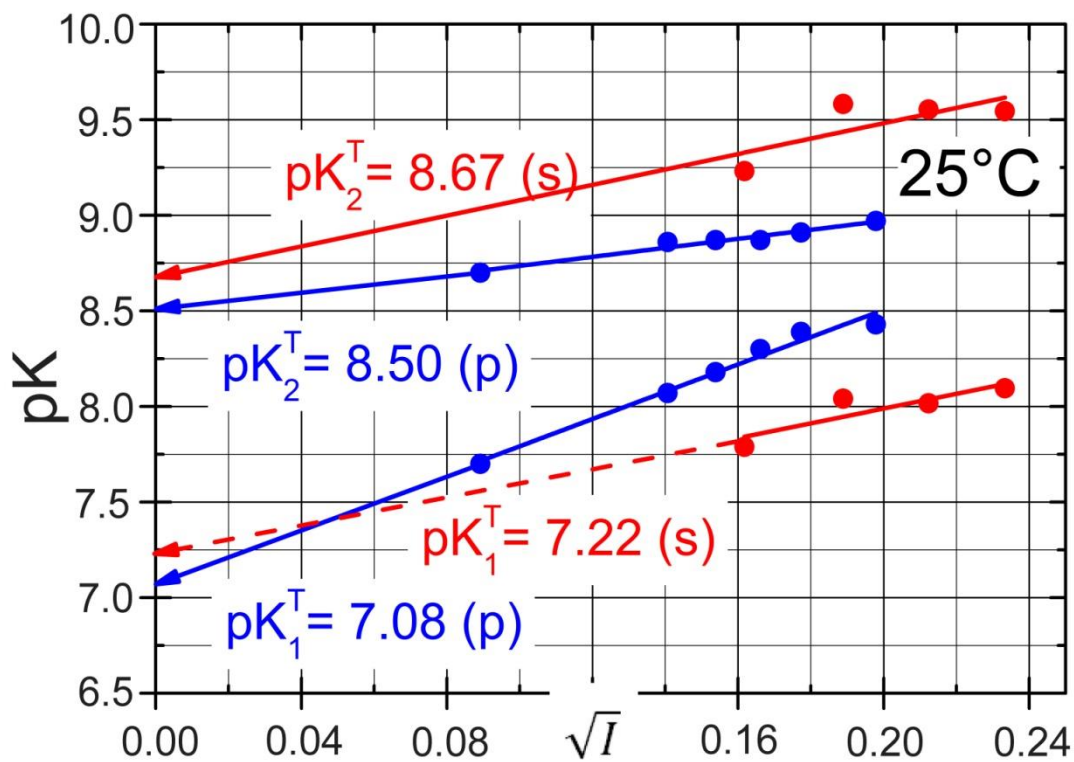
Obr. 13 - Potenciometrická titrační křivka okyseleného (HCl) hydrobromidu Vortioxetinu, titrovaného KOH je vynesena pomocí Bjerrumovy tvorné funkce a vykazuje hodnoty pK. Analýza byla provedena programem ESAB pro hypotézu protonačního modelu se dvěma disociačními konstantami při 25 °C (ESAB , ORIGIN).

Tabulka 6 - Zpřesnění společných a skupinových parametrů programem ESAB pro pH-potenciometrickou titraci hydrobromidu Vortioxetinu s HCl a KOH: odhadované disociační konstanty pK_{a1} , pK_{a2} Vortioxetinu, jejich standardní odchylky v posledních platných číslicích jsou v závorkách při 25 °C.

25°C						
Ionic strength I_0 [mol/L]	0.0080	0.0158	0.0237	0.0314	0.0391	
Estimates of the group parameters H_0, H_T and L_0 in the searched protonation model						
Number of points n	52	57	53	52	56	
$H_0 \times 1E+04$ [mol/L]	5.08(02)	5.08(01)	5.25(02)	4.36(05)	4.86(06)	
H_T [mol/L]	0.9729(0396)	0.9668(0208)	0.94081(0306)	0.9304	0.9375(0104)	
$L_0 \times 1E+04$ [mol/L]	3.16(02)	3.26(01)	2.60(01)	2.98(05)	2.99(06)	
Estimates of the common parameters i.e. dissociation constants in the searched protonation model						
pK_{a1}	8.39(06)	8.48(05)	8.82(09)	8.70(09)	8.82(09)	
pK_{a2}	8.99(09)	8.96(07)	8.79(09)	8.65(08)	8.54(08)	
Goodness-of-fit test with the statistical analysis of residuals						
Arithmetic mean of residuals $E(\hat{\epsilon})$, [mL]	-1.77E-20	-9.51E-21	-1.89E-06	3.34E-20	-3.04E-05	
Hoaglin limit LL	-0.0002	-0.0002	-0.0001	-0.0002	-0.0002	
Hoaglin limit LU	0.0002	0.0002	0.0001	0.0002	0.0002	
Mean of absolute value of residuals, $E \hat{\epsilon} $, [mL]	0.0005	0.0005	0.0004	0.0005	0.0006	
Residual standard deviation, pH (ESAB)	0.1271	0.1175	0.0907	0.1296	0.1456	
Residual standard deviation, $s(\hat{\epsilon})$, [mL]	0.0006	0.0006	0.0004	0.0006	0.0007	
Residual skewness $g_1(\hat{\epsilon})$	0.11	0.16	-0.18	-0.02	0.06	
Residual kurtosis $g_2(\hat{\epsilon})$	2.63	2.36	2.32	2.38	2.45	
Jarque-Berra test of normality: p, Normality is	0.894, Accepted	0.818, Accepted	0.780, Accepted	0.974, Accepted	0.952, Accepted	

Tabulka 7 - Zpřesnění společných a skupinových parametrů programem ESAB pro pH-potenciometrickou titraci hydrobromidu Vortioxetinu s HCl a KOH: odhadované disociační konstanty pK_{a1} , pK_{a2} Vortioxetinu, jejich standardní odchylky v posledních platných číslicích jsou v závorkách při 37 °C.

37°C						
Ionic strength I_0 [mol/L]	0.0080	0.0158	0.0237	0.0314	0.0391	
Estimates of group parameters H_0, H_T and L_0 in the searched protonation model						
Number of points n	57	57	58	54	48	
$H_0 \times 1E+04$ [mol/L]	5.00(05)	3.99(06)	4.15(06)	5.39(05)	4.37(05)	
H_T [mol/L]	0.9304	0.9304	0.9304	0.9304	0.9304	
$L_0 \times 1E+04$ [mol/L]	3.74(01)	4.26(12)	4.14(09)	3.55(12)	3.68(09)	
Estimates of common parameters i.e. dissociation constants in the searched protonation model						
pK_{a1}	8.16(04)	8.17(04)	8.18(04)	8.29(04)	8.32(04)	
pK_{a2}	9.26(08)	9.36(08)	9.13(07)	9.36(10)	9.25(08)	
Goodness-of-fit test with the statistical analysis of residuals						
Arithmetic mean of residuals $E(\hat{\epsilon})$, [mL]	3.51E-06	1.75E-06	3.45E-06	1.85E-06	-4.52E-21	
Hoaglin limit LL	-0.0002	-0.0002	-0.0002	-0.0002	-0.0002	
Hoaglin limit LU	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	
Mean of absolute value of residuals, $E \hat{\epsilon} $, [mL]	0.0005	0.0006	0.0006	0.0005	0.0005	
Residual standard deviation, pH (ESAB)	0.1214	0.146	0.1506	0.1254	0.1187	
Residual standard deviation, $s(\hat{\epsilon})$, [mL]	0.0006	0.0007	0.0007	0.0006	0.0006	
Residual skewness $g_1(\hat{\epsilon})$	0.00	-0.18	-0.15	-0.22	-0.10	
Residual kurtosis $g_2(\hat{\epsilon})$	1.83	1.66	1.71	1.76	1.74	
Jarque-Berra test of normality: p, Normality is	0.977, Accepted	0.771, Accepted	0.827, Accepted	0.712, Accepted	0.911, Accepted	



Obr. 14 – Závislost smíšené disociační konstanty pK_a Vortioxetinu na druhé mocnině iontové síly, vedoucí k thermodynamické disociační konstantě pK_a^T při 25 °C a 37 °C za použití UV-spektrálních analýz (s) a pH-potenciometrické analýzy (p).

Spektrofotometrická titrace byla využita jako alternativa k určení hodnot pK_a díky vysoké citlivosti na koncentrace látky (až na 10^{-5} M). Zkoumaná sloučenina však musí mít chromofor(y) v blízkosti ionizačního centra tak, že protonované a deprotonované částice vykazují dostatečné změny ve spektrech. Při UV-titraci tvoří spektrální údaje měřeného Vortioxetinu sérii spekter, získaných při různých hodnotách pH. Okyselení roztoku vede k protonaci částice LH_2^+ na kationt LH_3^{2+} , ale může to být narušeno srážením Vortioxetinu, které se projevuje zejména při vyšších koncentracích při potenciometrickém stanovení. Programy REACTLAB i SQUAD84 pro spektrální analýzu dávají pro spektrofotometrickou koncentraci 9.2×10^{-5} M Vortioxetinu stejné odhady obou disociačních konstant, které vzájemně vykazují shodu v testu těsnosti proložení. Vliv teploty 25 °C a 37 °C zde není významný. Program ESAB formuluje rezidua vztahem $e_i = (V_{exp, i} - V_{calc, i})$ a dosáhne 0.1 nebo 0.2 mL, a tím dokazuje vynikající těsnost proložení. Lze konstatovat, že spolehlivost disociačních konstant Vortioxetinu byla prokázána, i když *skupinové parametry* L_0 , H_T byly v modelu špatně podmíněny. Test těsnosti proložení prokázal dostatečnou spolehlivost odhadů parametrů pro obě disociační konstanty Vortioxetinu při 25 °C a 37 °C.

Určené disociační konstanty jsou v souladu s predikovanými hodnotami programem MARVIN. Nesrovnalosti mohou být způsobeny nejasnou strukturou rezonance jádra heterocyklické molekuly a v důsledku toho různými distribucemi elektronů, které mohou dále vést k různým predikovaným hodnotám navrhované struktury. V takových případech mohou prognostické programy MARVIN a ACD selhávat, a proto je zapotřebí experimentálního laboratorního stanovení. Vzhledem k tomu, že oba potenciometrické a spektrofotometrické odhady pK jsou podobné, především co se týká testů těsnosti proložení, lze konstatovat, že získané experimentální výsledky jsou spolehlivé a vykazují skutečnou disociaci látky.

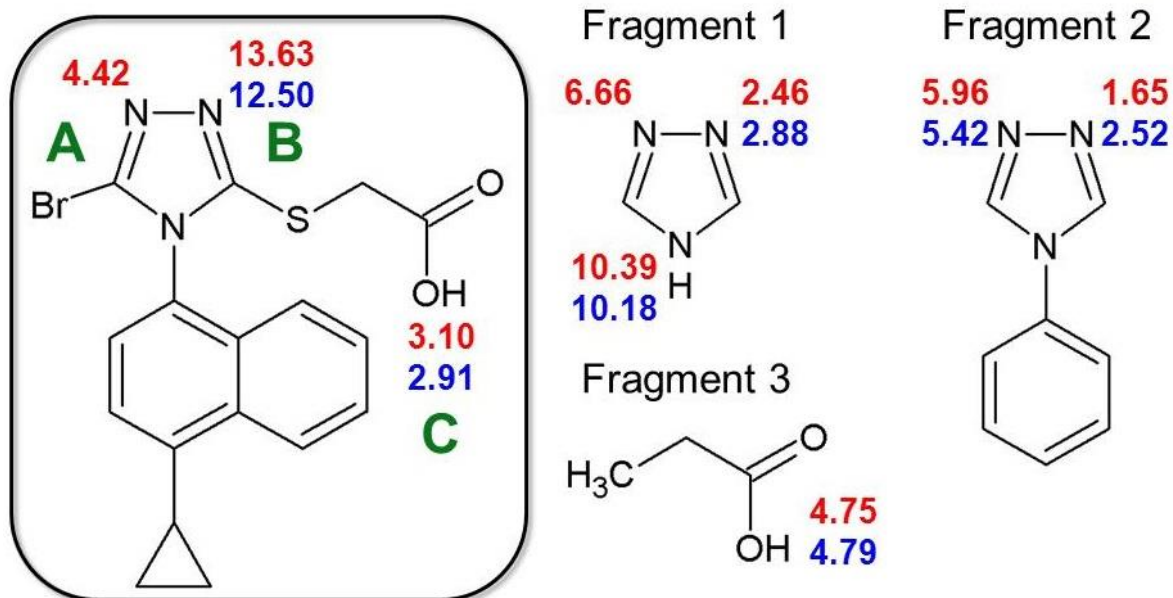
4.2 Lesinurad

4.2.1 Predikce disociačních konstant Lesinuradu

Odhady pK_a ze struktury Lesinuradu: Prvním krokem analýzy je předpověď disociačních konstant, založená na kvantově-chemickém výpočtu, který vychází ze strukturního vzorce studované molekuly. Prediktivní program MARVIN naznačil tři protonizovatelná místa Lesinuradu, značená v obrázku 15: A, B, C, která mohou být spojena se třemi disociačními konstantami. Dvě protonační centra A a B jsou umístěna na atomech dusíku a třetí protonační centrum C se týká karboxylové skupiny. Elektronická povaha atomů

dusíku v molekule se značně liší, protože je ovlivněna různými elektronickými a sterickými účinky. Pro usnadnění predikce disociačních konstant se molekula Lesinuradu rozdělila na tři vhodné fragmenty na obr. 15. Tyto fragmenty představují podobné molekuly, které mohou být považovány za zjednodušené části Lesinuradu s protonačními místy A, B a C. Například protonační centrum A ve fragmentech vykazuje pK blízko pK molekuly Lesinuradu. Podobný závěr byl také nalezen v protonačním centru C u karboxylové skupiny. V protonačním centru B však existuje rozdíl v odhadu pK fragmentů ve srovnání s Lesinuradem. Program ACD/Percepta zobrazuje podobné předpokládané hodnoty pK , jako je dosaženo u programu MARVIN.

Predicted pK_{pred} of Lesinurad with **MARVIN** and **ACD**



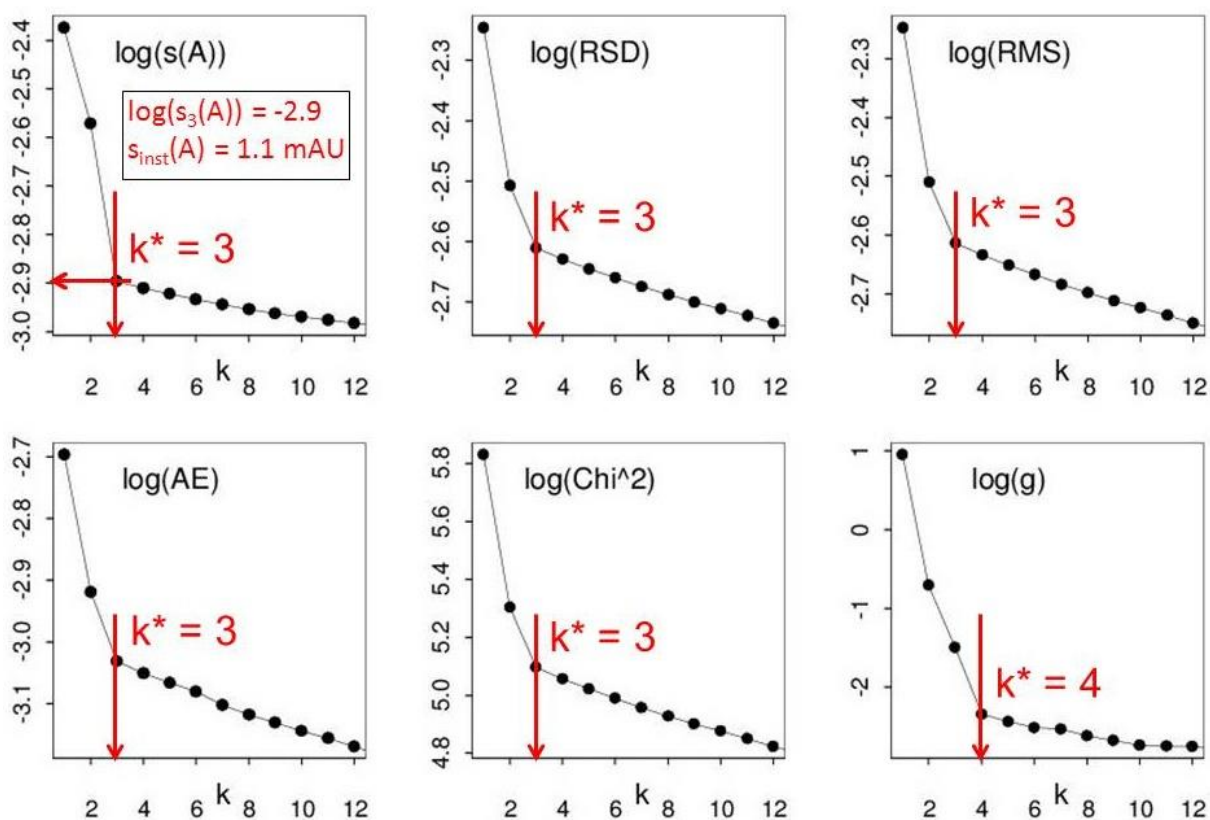
Obr. 15 - Molekulární struktura Lesinuradu se zvýrazněnými protonizovatelnými místy A, B, C a znázorněné predikované hodnoty pK_a pomocí prognostických programů MARVIN/ACD. Vpravo je znázorněná struktura pomocných fragmentů a jejich predikovaná hodnota pK_a .

4.2.2 Analýza spekter

Experimentální postup a výpočetní strategie pro stanovení disociačních konstant analýzou pH-absorbanční matice byly popsány v publikovaném manuálu [36]. Kromě stanovení protonační rovnováhy, počtu různě protonovaných částic, diagramu relativní koncentrace a grafu molárních absorpčních koeficientů v rozsahu vlnových délek zde uvedeme kritéria spolehlivosti nalezeného protonačního modelu.

4.2.2.1 Určení počtu světlo-absorbujících částic

Počet světlo-absorbujících částic n_c : Lesinurad obsahuje komplikovanou molekulární strukturu, uvedenou na obr. 3 (struktura) a 15 (predikce) a několik protonačních rovnováh lze sledovat také spektrofotometricky. Spektrální data ve formě absorbanční matice A získaná při různých hodnotách pH, byla podrobena faktorové analýze pro stanovení počtu světlo-absorbujících částic, n_c . Vše bylo provedeno s využitím hodnoty absorbanční matice vypočtené v algoritmu INDICES [71]. Absorbanční matice A obsahuje m sloupců naměřených hodnot pH a n vlnových délek. INDICES algoritmus [71] vykreslí graf $s_k(A)$ vůči indexu k (obr. 16). Nalezené řešení je k^* , což je souřadnice zlomu na křivce $s_k(A) = f(k)$. Pro tento postup však existuje mnoho modifikací, jako jsou standardní odchylka reziduí RSD, reziduálová suma čtverců RMS, kritérium věrohodnosti AE, χ^2 kritérium Chi2 a směrodatná odchylka vlastních čísel g_k , ref. [78].



Obr. 16 – Určení počtu světlo-absorbujících částic protonačních rovnováh Lesinuradu $k^* = 4$ z absorbanční matice pěti modifikacemi Cattelova indexového grafu vlastních čísel faktorové analýzy vede ke čtyřem světlo-absorbujícím částicím ve směsi.

Soubor spekter na obr. 17 a graf molárních absorpčních koeficientů na obr. 17 ukazují, že existuje velmi malý rozdíl mezi spektrem L^- a LH_3^{+2} , který je podobný spektrálnímu šumu

experimentu $s_{\text{inst}}(A)$. Proto většina modifikací faktorové analýzy na obr. 16 určuje počet světlo-absorbujících částic ve směsi rovno třem, $k^* = 3$. Nicméně nejcitlivější metodou pro stanovení počtu světlo-absorbujících částic ve směsi je graf vlastních čísel $\log(g_k)$, který byl vynesena proti indexu k , a vedl ke korekci $k^* = 4$. Počet světlo-absorbujících částic n_c je užitečný pro studium rovnováhy v roztoku, protože pomáhá při vytváření protonačního modelu. To znamená, že budou preferovány tři disociační konstanty a v rovnovážné směsi by měly být přítomny čtyři světlo-absorbující částice: LH_3^{2+} , LH_2^+ , LH a L^- . Souřadnice zlomu na křivce také umožňují odhadnout skutečné instrumentální chyby $s_{\text{inst}}(A) = 1.1$ mAU experimentálního zařízení spektrofotometru CINTRA 5 (GBC, Austrálie).

Diagnostika pro hledání a testování protonačního modelu: Pro hledání protonačního modelu byla využita technika SQUAD84 a technika REACTLAB. V obou programech byla použita stejná výpočetní strategie, tj. *regresní triplet* (kritika dat, model a metoda), srov. ref. [34, 75]. Metoda nejmenších čtverců *RSS* kvantifikuje součet odchylek absorbancí mezi experimentálním a naměřeným spektrem. Naměřené spektrum je kvantifikováno jako součet všech různě protonovaných částic, když se jejich koncentrace vypočítají pro odhadované disociační konstanty. V iteračním procesu se vypočítají molární absorpční koeficienty těchto částic. Navrhovaná hypotéza protonačního modelu je výchozím bodem iteračního postupu. Hledání nejlepších hypotéz protonačního modelu obsahujícího jednu, dvě nebo tři disociační konstanty je znázorněno na obr. 17, kde jsou uvedeny grafy molárních absorpčních koeficientů a distribuční diagramy všech částic ze tří použitých hypotéz pro protonační model. Spolehlivé kritérium věrohodnosti pro nejlepší hypotézu je založeno na výsledném testu spolehlivosti naměřených spekter prostřednictvím experimentální absorpční matice $s(A)$. Nejlepší těsnosti proložení bylo dosaženo u hypotézy čtyř různě protonovaných částic LH_3^{2+} , LH_2^+ , LH a L^- , ačkoli spektra obou částic L^- a LH_3^{2+} jsou téměř stejná.

V následující tabulce č.8 je znázorněno regresní zpřesnění tří disociačních konstant $\text{p}K_{a1}$, $\text{p}K_{a2}$, $\text{p}K_{a3}$ Lesinuradu programy SQUAD84 a REACTLAB při 25 °C a 37 °C v závislosti na iontové síle. Roztok 9.9×10^{-5} M Lesinuradu pro n_s spektra měřená při n_w vlnových délkách pro $n_z = 2$, základní složky L a H , tvoří různě protonované částice. Standardní odchylky odhadu parametrů jsou v posledních platných číslicích v závorkách. Kritérium rozlišení a spolehlivosti nalezených parametrů byly prokázány pomocí statistických údajů, jako je reziduální standardní směrodatná odchylka analýzou faktorů $s_k(A)$ [mAU], průměr absolutních hodnot reziduí $E|\bar{e}|$ [mAU], směrodatná odchylka absorbance po

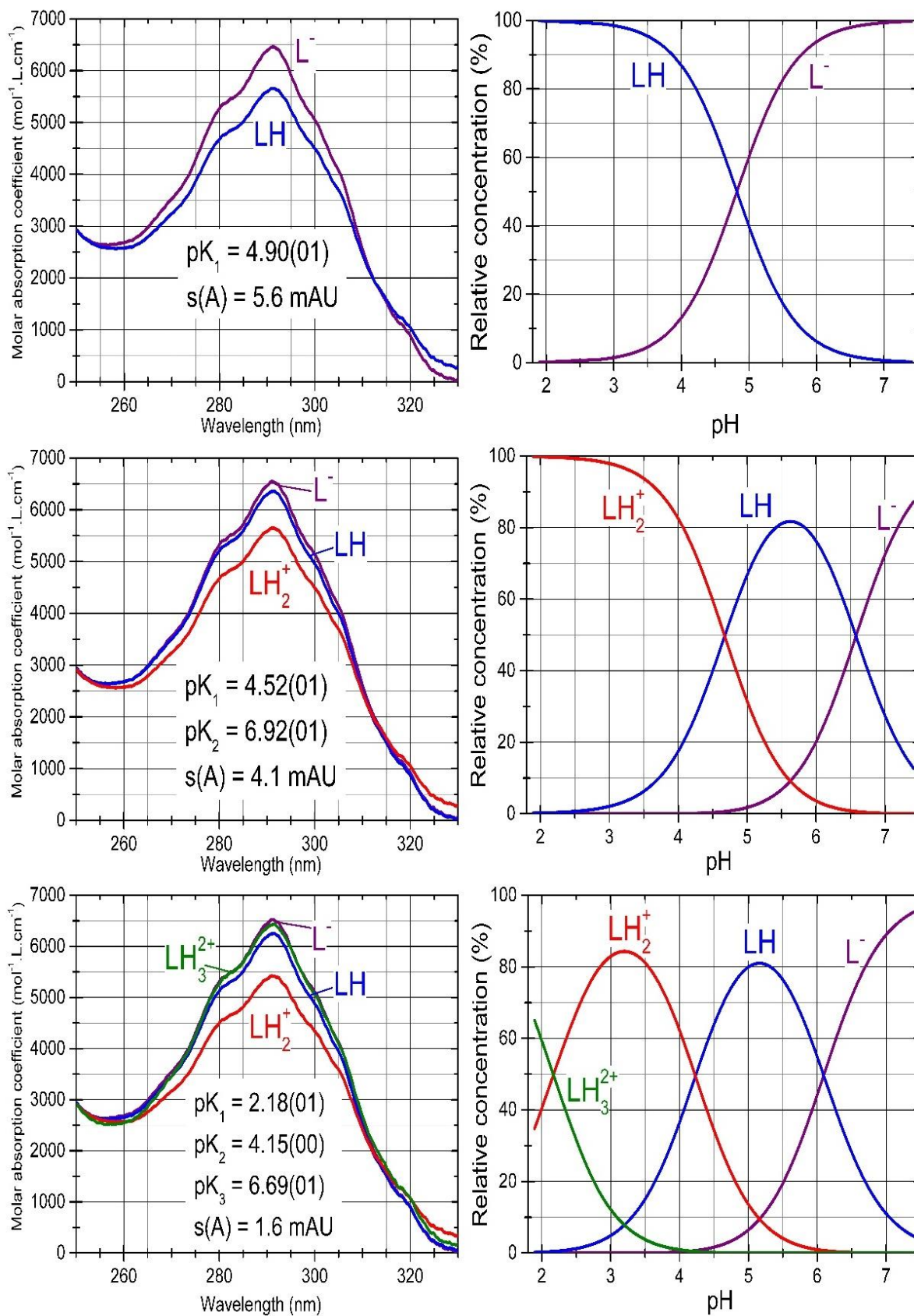
terminaci regresního procesu $s(\hat{e})$ [mAU], sigma $s(A)$ [mAU] z programu REACTLAB a Hamiltonův R-faktor [%] z programu SQUAD84.

Byly porovnány odhady disociačních konstant pomocí dvou regresních programů, tj. SQUAD84 a REACTLAB (tabulka 8). Průměr absolutních hodnot reziduí $E|e|$ [mAU], směrodatná odchylka reziduí $s(e)$ [mAU] a Hamiltonův R-faktor relativního proložení [%] v SQUAD84 obecně ukázaly, že vynikajícího proložení naměřených spekter bylo dosaženo pro protonační model se třemi disociačními konstantami. Zdá se, že REACTLAB nabízí spolehlivější odhady parametrů, jelikož vždy dosahuje lepšího tvaru křivky než starší program SQUAD84. Spolehlivost odhadů parametrů regrese může být testována pomocí následující obecné diagnostiky (tabulka 8 a obr. 17), jak bylo dříve objasněno v ref. [36]:

(a) *Fyzikální význam parametrických odhadů.* V levé části obrázku 17 je uvedena odhadovaná molární absorpce všech různě protonovaných částic ϵ_L , ϵ_{LH} , ϵ_{LH_2} a ϵ_{LH_3} Lesinuradu vzhledem k vlnové délce. Křivky ϵ_L a ϵ_{LH_3} se zdály být blízké až téměř stejné.

(b) *Fyzikální smysl volných koncentrací různě protonovaných částic.* Distribuční diagram (obr. 17) ukazuje protonační rovnováhu LH_3^{2+} , LH_2^+ , LH a L^- . Při pH 7 má Lesinurad částice L^- a LH . Okyselením LH se vytváří kation LH_2^+ a v roztoku při pH 3 až 2 se tvoří kationty LH_2^+ a LH_3^{2+} .

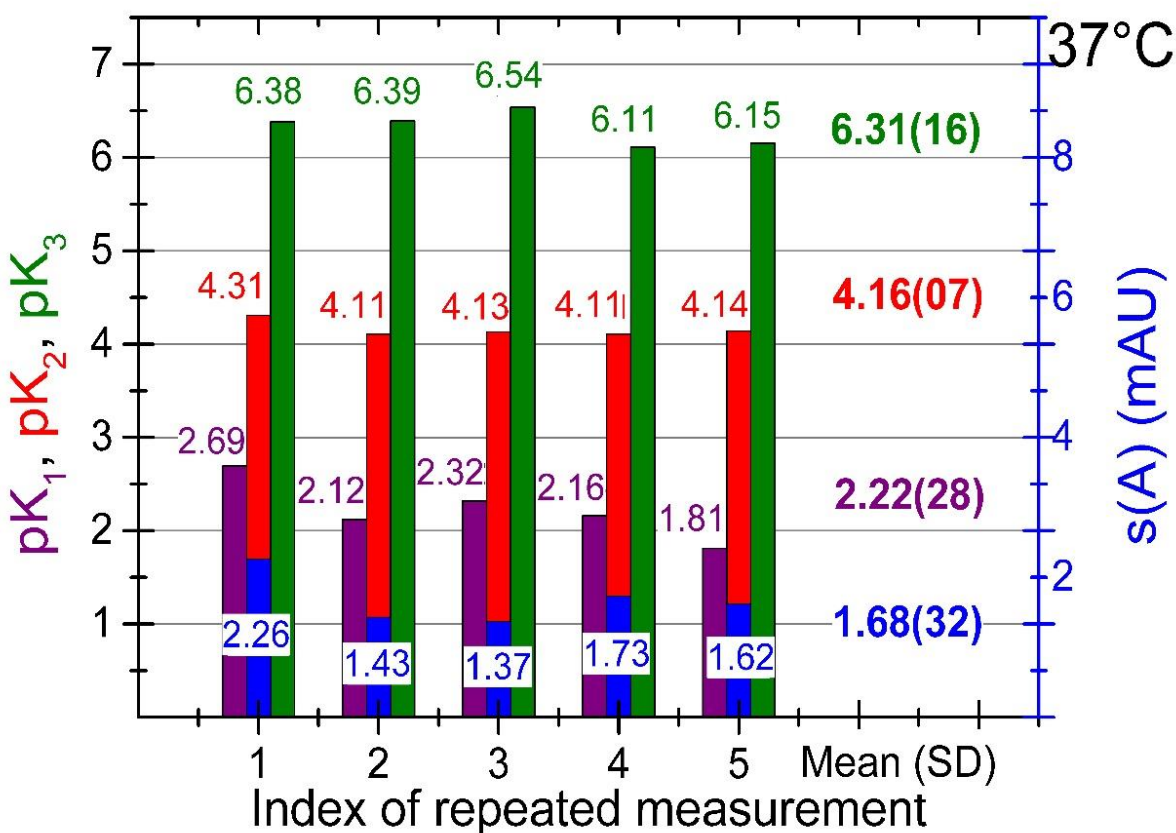
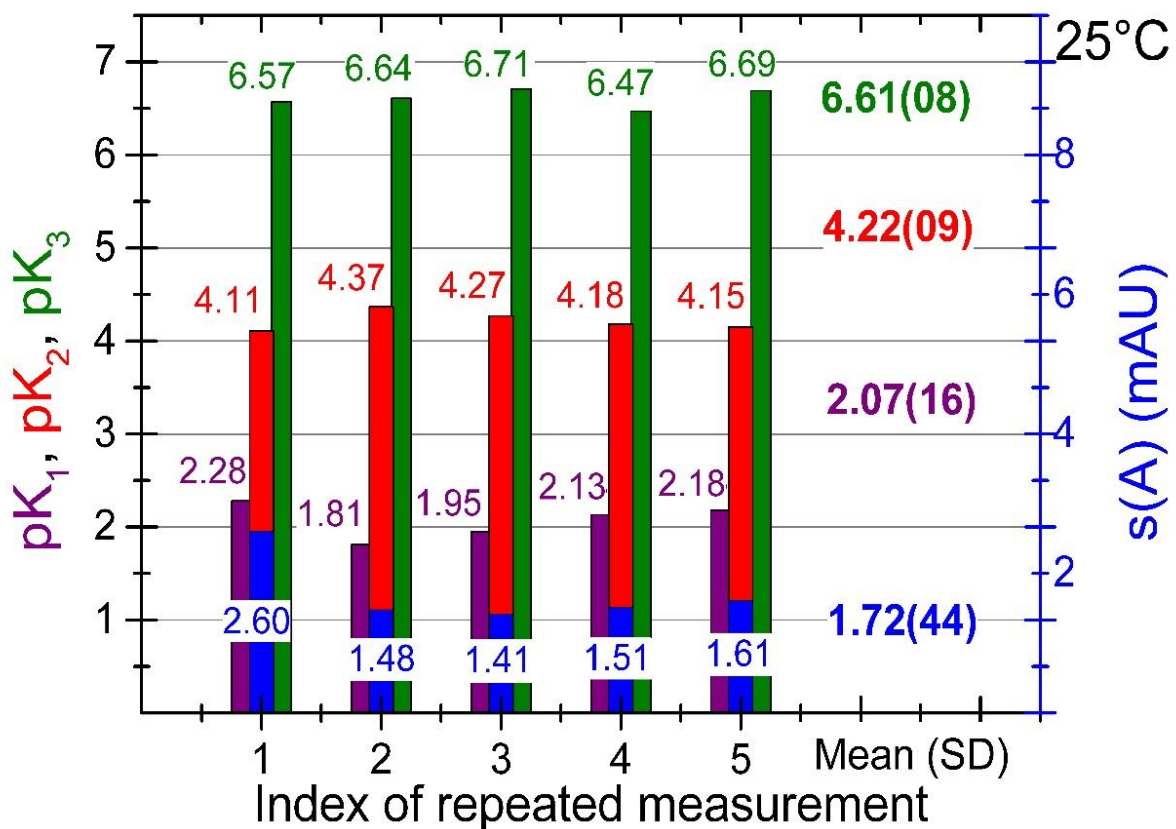
(c) *Těsnost proložení:* Přestože by měla být použita statistická analýza reziduí [36] jako nejpřísnější zkouška věrohodnosti, měly by být respektovány realistické empirické limity. Statistická měření všech reziduí dokazuje, že bylo dosaženo minima eliptického hyperparaboloidu RSS (tabulka 8): průměr absolutních hodnot reziduí $E|\bar{e}|$ [mAU] a směrodatná odchylka reziduí $s(\hat{e})$ [mAU] mají vždy dostatečně nízké hodnoty, nižší než 2 mA, což je méně než 0.2 % naměřené hodnoty absorbance, což dokazuje vynikající těsnost proložení. Těsnost proložení je také prokázána nízkou hodnotou Hamiltonova R-faktoru, která je většinou méně než 0.5 %.



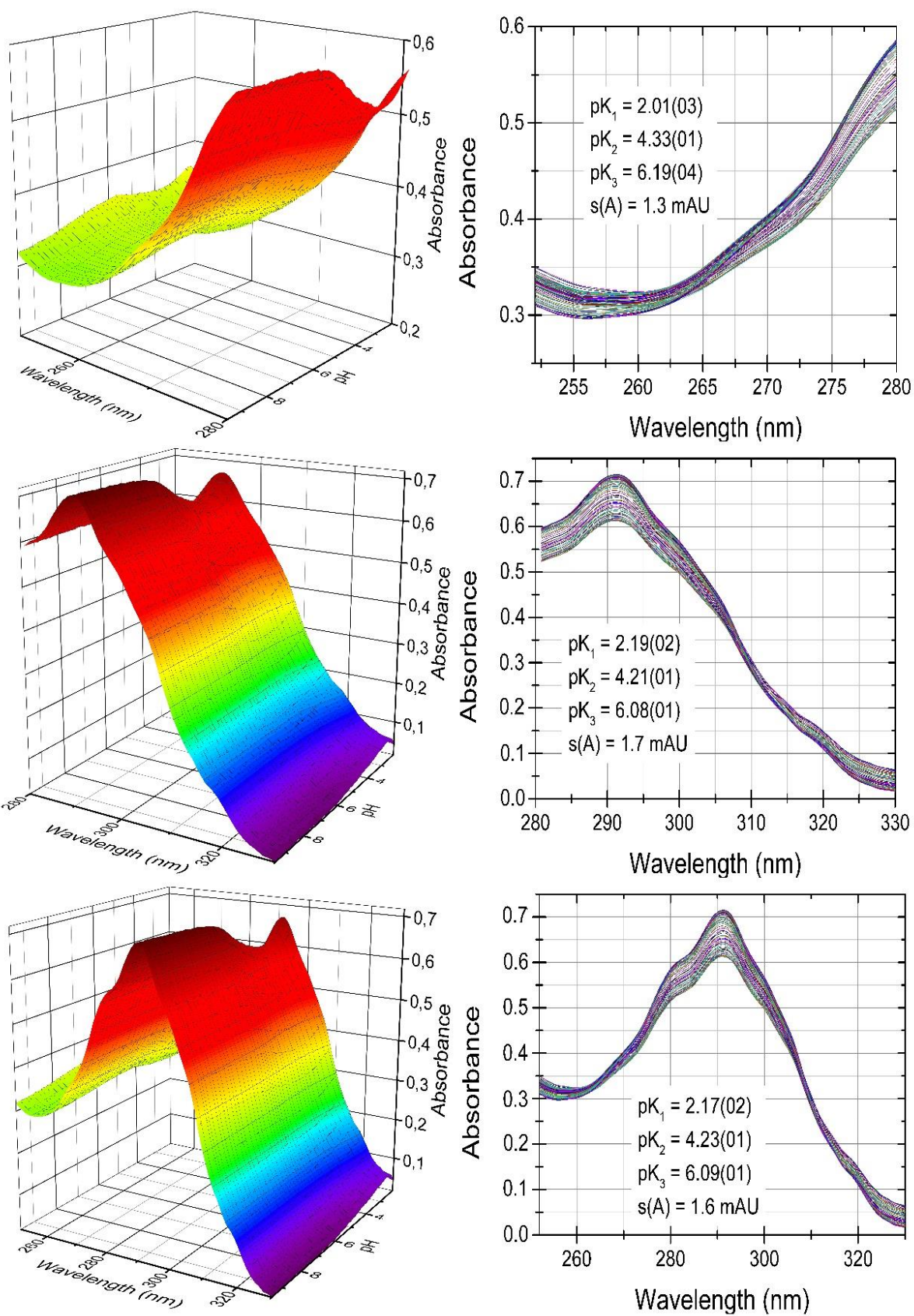
Obr. 17 - Hledání a testování protonačního modelu: grafy molárních absorpčních koeficientů vlevo a distribuční diagramy v závislosti na pH vpravo, pro všechny různě protonované částice v rozmezí pH = 2 až 8 pro jednu, dvě a tři disociační konstanty.

Tabulka 8 - Odhady disociačních konstant pomocí dvou regresních programů SQUAD84 a REACTLAB.

Temperature		25°C						37°C					
Ionic strength [mol/L]		0.0329	0.0399	0.0478	0.0624	0.0769	0.0178	0.0329	0.0478	0.0624	0.0769		
Cattel's scree plot indicating the rank of the absorbance matrix (INDICES)													
Number of spectra measured, n_s		45	46	47	48	53	49	43	45	46	44		
Number of wavelengths, n_w		187	187	187	188	187	188	187	187	187	187		
Number of light-absorbing species, k^*		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
Residual standard deviation, $s_k^*(A)$ [mAU]		1.50	1.62	1.51	1.53	1.46	1.14	1.60	1.55	1.62	1.89		
Estimates of dissociation constants in the searched protonation model													
$pK_{a1}(s_1), LH_4^{3+} = H^+ + LH_3^{2+}$	SQUAD84	2.12(02)	1.91(02)	1.79(01)	1.89(02)	2.01(02)	2.12(01)	1.95(02)	1.90(02)	2.04(01)	1.88(01)		
	REACTLAB	2.12(01)	1.91(01)	1.78(01)	1.89(01)	2.00(01)	2.12(01)	1.94(01)	1.90(01)	2.04(01)	1.89(01)		
$pK_{a2}(s_2), LH_3^{2+} = H^+ + LH_2^+$	SQUAD84	4.18(02)	4.29(02)	4.16(01)	4.22(02)	4.18(02)	4.13(01)	4.17(02)	4.16(02)	4.07(01)	4.16(01)		
	REACTLAB	4.18(01)	4.29(01)	4.16(00)	4.22(01)	4.19(01)	4.13(00)	4.17(00)	4.16(00)	4.07(00)	4.16(01)		
$pK_{a3}(s_3), LH_2^+ = H^+ + LH$	SQUAD84	6.30(01)	6.27(01)	6.36(01)	6.16(01)	6.14(01)	6.29(01)	6.28(01)	6.24(01)	6.34(01)	6.22(01)		
	REACTLAB	6.30(01)	6.27(01)	6.36(01)	6.16(01)	6.20(01)	6.29(01)	6.28(01)	6.24(01)	6.34(01)	6.22(01)		
Goodness-of-fit test with the statistical analysis of residuals													
Mean residual $E \hat{\epsilon} $ [mAU]	SQUAD84	1.13	1.22	1.13	1.15	1.11	1.08	1.18	1.15	1.19	1.38		
	REACTLAB	1.15	1.24	1.15	1.17	1.13	1.10	1.20	1.17	1.21	1.40		
Standard deviation of residuals $s(\hat{\epsilon})$ [mAU]	SQUAD84	1.50	1.62	1.51	1.53	1.46	1.45	1.60	1.55	1.62	1.89		
	REACTLAB	1.46	1.57	1.47	1.49	1.40	1.41	1.58	1.49	1.56	1.82		
Sigma from ReactLab [mAU]	REACTLAB	1.48	1.59	1.48	1.51	1.44	1.43	1.56	1.52	1.59	1.85		
Hamilton R-factor from SQUAD84 [%]	SQUAD84	0.49	0.44	0.39	0.47	0.53	0.38	0.38	0.40	0.44	0.46		

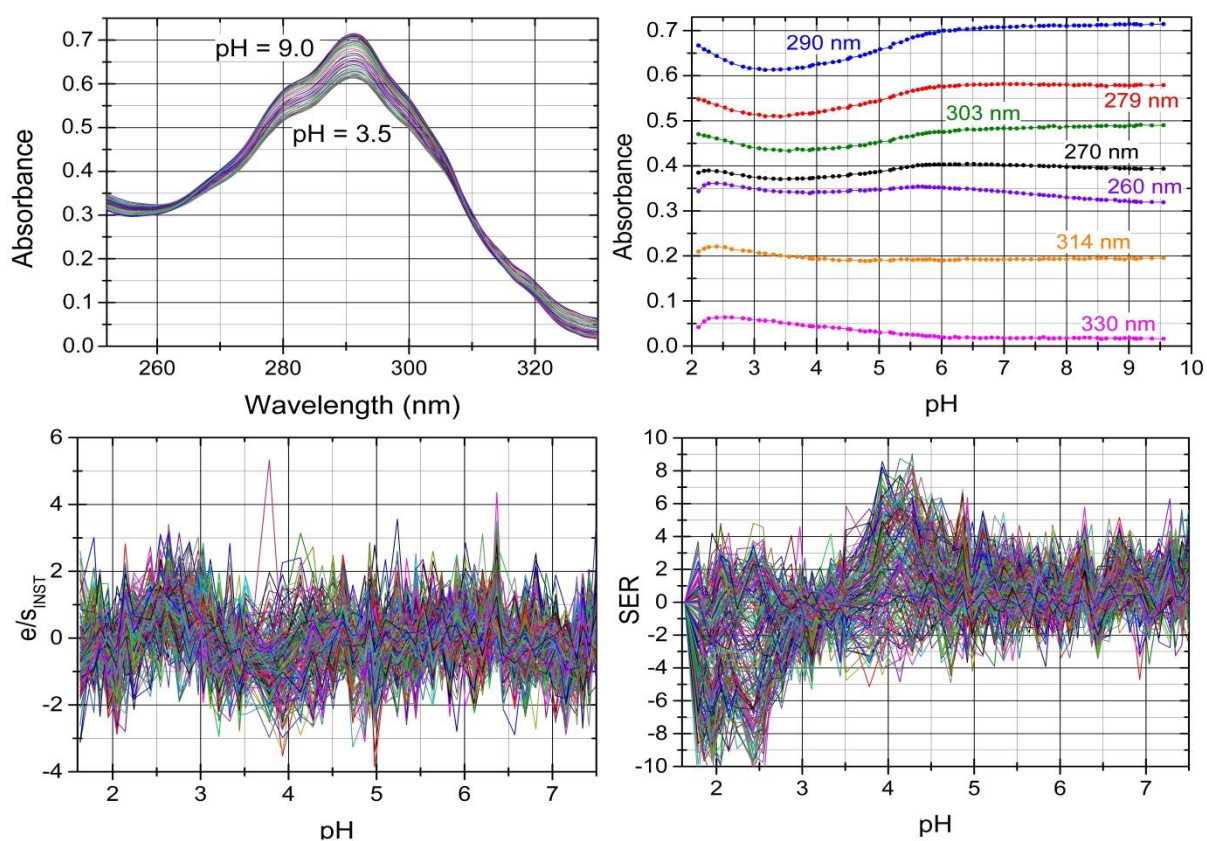


Obr. 18 – Reprodukovatelnost odhadovaných disociačních konstant při 25 °C a 37 °C (ORIGIN).



Obr. 19 – Vlevo 3D graf absorbanční responzní plochy při různém pH pro Lesinurad při 25 °C. Vpravo 2D graf absorbanční matice (REACTLAB, SQUAD84).

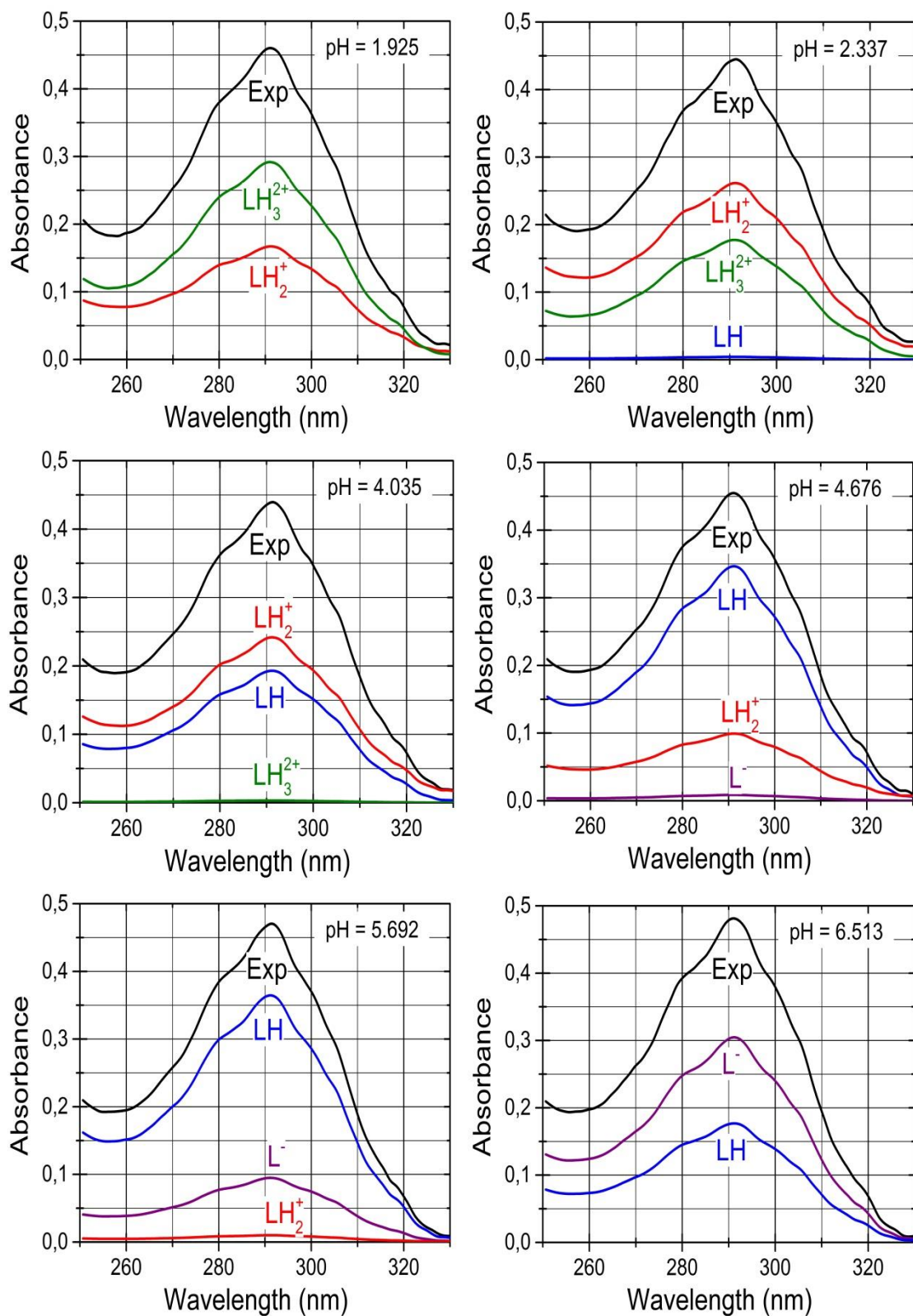
Reprodukovatelnost a volba rozsahu vlnových délek: Aby bylo možné zkoumat závislost blízkosti ionizovatelné skupiny vůči chromoforu, spektrální posun nemusí být vždy dostatečně silný, aby umožnil úspěšné stanovení pK . Je důležité zvolit takový rozsah vlnových délek, aby se vyhodnotil účinek ionizovatelného centra na chromofor při změně pH. Pro zjištění byly proto zvoleny tři rozsahy 250 - 330 nm, 280 - 330 nm a 250 - 280 nm a spektra byla vyhodnocena v těchto oblastech vlnových délek. Na obr. 18 a 19 jsou znázorněny odhady tří disociačních konstant včetně dosažené hodnoty $s(A)$, která zde slouží za kritérium věrohodnosti získaných odhadů. Nejlepšího proložení bylo dosaženo v rozmezí vlnových délek 250 - 280 nm, i když odhady disociačních konstant jsou prakticky stejné ve všech třech oblastech. Reprodukovatelnost disociačních konstant získaných programy SQUAD84 a REACTLAB, odhadovaná z pěti reprodukováných měření, byla shledána v dobré dohodě při 25 °C a 37 °C (tabulka 8, obr. 18 a 19).



Obr. 20 – Poměr signálu a šumu při analýze malých změn ve spektrech.

Poměr signálu k šumu při analýze malých změn ve spektrech: Při spektrofotometrickém stanovení pK_a Lesinuradu je nutné zkoumat, zda změna pH způsobí dostatečnou změnu absorbance na tvaru spektra. Na obr. 20a a 20b je zřejmé, že spektrální odezva chromoforu v molekule Lesinuradu není velká, takže bylo nutné ověřit, zda je vůbec možné odhadnout disociační konstanty i při tak malých spektrálních změnách. Změna pro i -té spektrum a j -tý absorbanční bod spektra byla vypočítána jako $\Delta_{ij} = A_{ij} - A_i$ a poté byla podělena instrumentální směrodatnou odchylkou $s_{\text{inst}}(A)$, což vedlo k normalizovaným změnám spektra $SEER = \Delta/s_{\text{inst}}(A)$. A_i zde znamená absorbanci kyselé formy Lesinuradu. Je třeba zjistit, zda tyto malé změny Δ v spektrech jsou dostatečně větší než velikost šumu $s_{\text{inst}}(A)$. Změny $SEER$ ve spektrech jsou vyneseny oproti vlnové délce λ pro všechny prvky absorbanční matice (obr. 20d) a ukazují, že i když jsou tyto hodnoty malé, jsou stále větší než instrumentální šum standardizovaných reziduí $e/s_{\text{inst}}(A)$ na obr. 20c. Zatímco $e/s_{\text{inst}}(A)$ je zde v rozsahu (-2, +2), změny v $SEER$ jsou v rozsahu (-10, +10). To znamená, že malé rozdíly ve spektrech vysvětlují vyšší míru nejistoty odhadu disociačních konstant. Je třeba mít na paměti empirické pravidlo, že pokud je $SEER$ menší než 10, počet světlo-absorbujících částic n_c nemusí být správně určen analýzou faktorů v algoritmu INDICES [71].

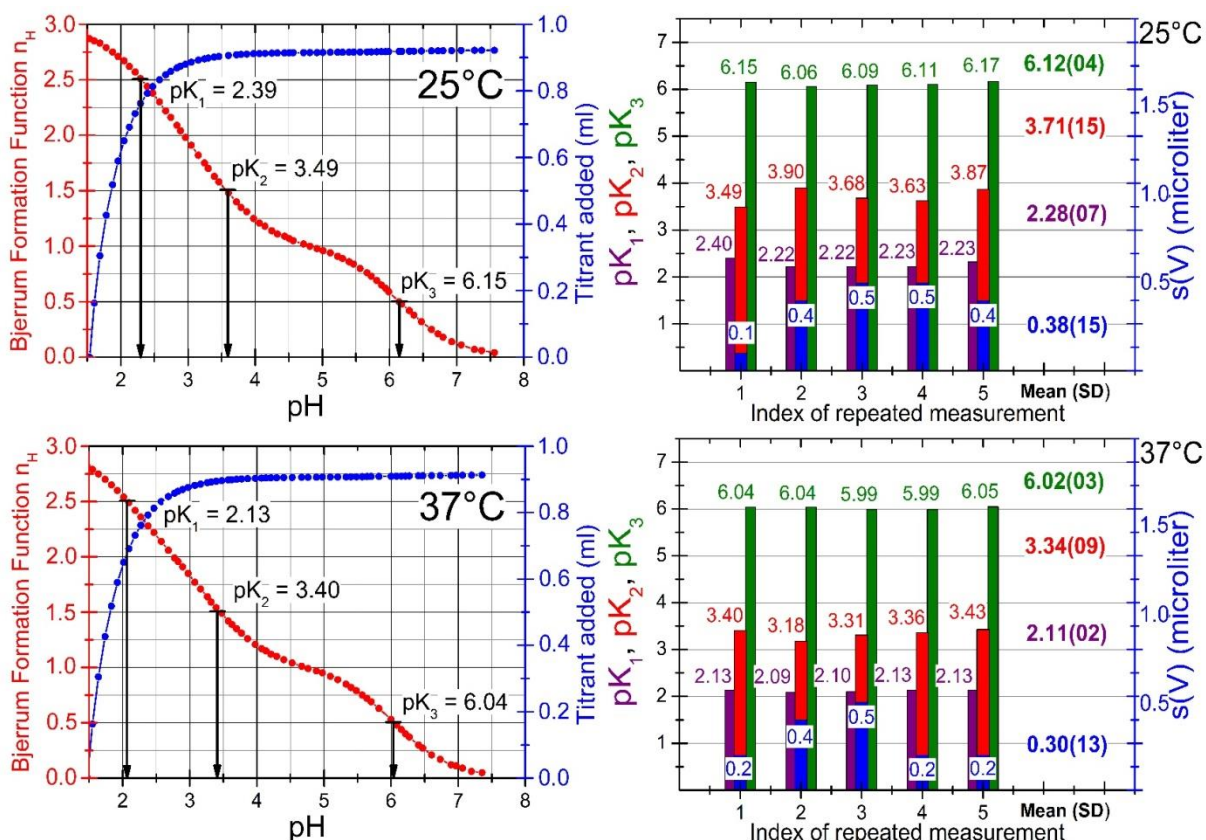
Dekonvoluce spektra: Rozklad každého experimentálního spektra na spektra jednotlivých částic dokládá, zda experimentální návrh byl navržen dostatečně efektivně. V oblastech pH, kde více komponent přispívá významně ke spektru, je třeba měřit více spekter. Takové spektrum pak poskytuje dostatečné informace pro regresní analýzu, která monitoruje alespoň dvě částice v rovnováze, kde žádná z nich nepředstavuje minoritní částici. Na obr. 21 je znázorněno šest obrázků dekonvoluce každého naměřeného spektra do absorpčních pásů různě protonovaných částic Lesinuradu. Je ukázána názorná deprotonace, sledovaná ve spektrech Lesinuradu. Od hodnoty pH 1.925 je absorpční pás kationtu LH_3^{2+} přítomen v rovnovážné směsi, která doprovází kationt LH_2^+ . Od pH 2.237 na pH 4.035 se absorpční pás kationtu LH_3^{2+} snižuje s poklesem koncentrace a zvyšují se absorpční pásy kationtu LH_2^+ a neutrální molekuly LH. Z pH 4.676 na pH 5.692 se koncentrace LH zvyšuje, koncentrace LH_2^+ se snižuje na pH 6.513 a kationt LH_2^+ zmizí, a tedy i jeho absorpční pásmo. Dva absorpční pásy LH a převládající anion L^- jsou přítomny při pH 6.513.



Obr. 21 - Šest obrázků pro pH = 1.925 až po pH = 6.513 znázorňuje po sobě jdoucí deprotonační průběh, sledovaný ve spektrech, kdy bylo každé spektrum podrobeno dekonvoluci na spektra různě protonovaných částic v roztoku Lesinuradu (SQUAD84).

4.2.3 Analýza potenciometrických titračních dat

Potenciometrická titrace okyseleného Lesinuradu hydroxidem draselným, byla provedena při 25 °C a 37 °C pro upravenou hodnotu iontové síly (obr. 22). Počáteční odhad disociačních konstant studovaného Lesinuradu byl dále zjemněn programem ESAB.



Obr. 22 – Hledání protonačního modelu. Regresní analýza titrační křivky Lesinuradu (okyselený HCl a titrovaný KOH) (ESAB, ORIGIN).

Analýza údajů o pH a Bjerrumova tvorná funkce: Protože Lesinurad vykazuje tři disociační konstanty, jejich numerický odhad se provádí počítačovou nelineární regresí programem ESAB. Regresní analýza byla použita pomocí střední části titrační křivky okyseleného Lesinuradu titrovaného hydroxidem draselným, což je znázorněno na grafu na obrázku 22. Odhady tří disociačních konstant pK_{a1} , pK_{a2} a pK_{a3} jsou vyznačené na křivkách Bjerrumovy tvorné funkce. Při vyšší koncentraci než $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ se však vyskytuje sraženina Lesinuradu, která zpočátku tvoří mírnou opalescenci.

Tabulka 9 - Regresní zpřesnění společných a skupinových parametrů programem ESAB pro pH-titraci okyseleného Lesinuradu a titrovaného KOH: odhadované disociační konstanty pK_{a1} , pK_{a2} , pK_{a3} Lesinuradu, když jejich standardní odchylky jsou v posledních platných číslicích v závorce.

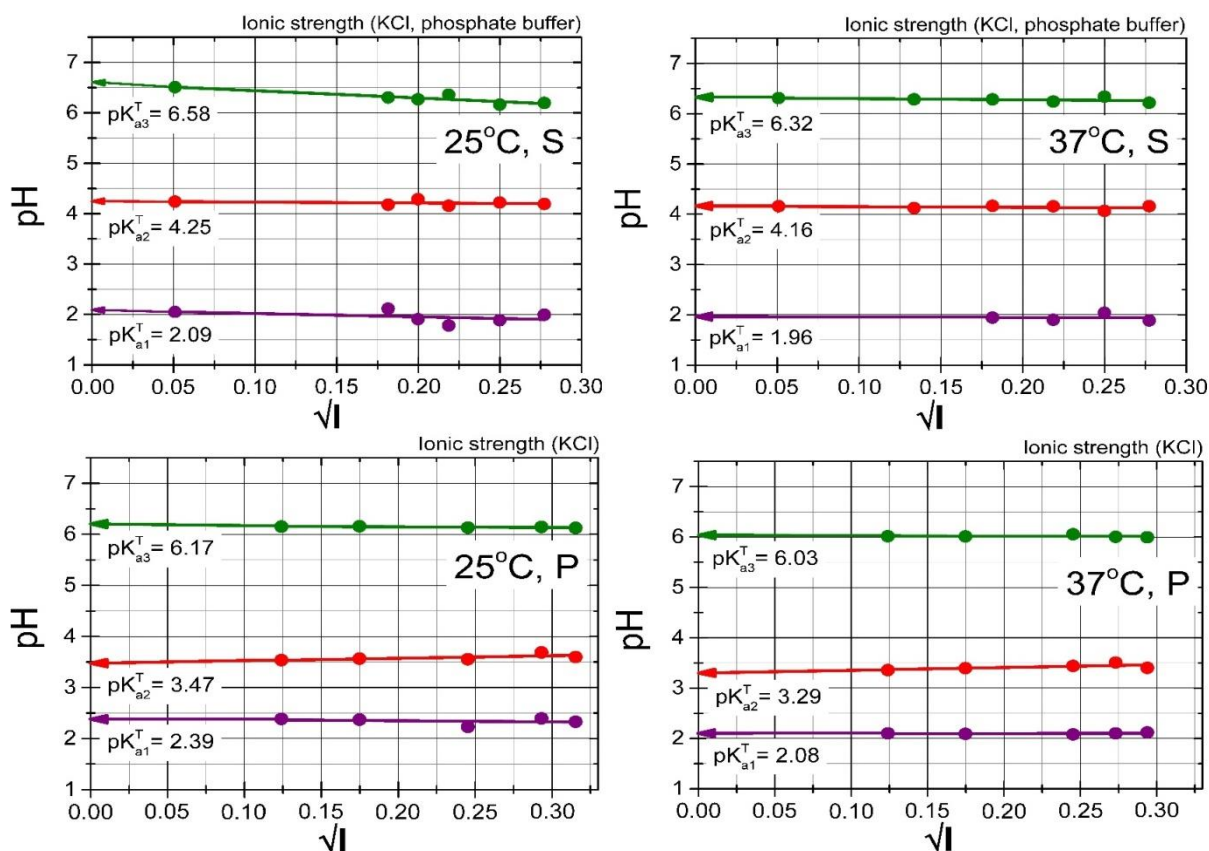
Temperature	25°C										37°C				
	Ionic strength I_0 [mol/L]	0.0154	0.0305	0.0601	0.0858	0.0992	0.0154	0.0305	0.0601	0.0746	0.0863				
Estimates of the group parameters H_0, H_T and L_0 in the searched protonation model															
Number of points used n	44	44	29	38	32	33	31	42	35	41					
$H_0 \times 1E+02$ [mol/L]	3.26(00)	3.23(00)	3.11(00)	3.12(00)	3.06(00)	3.21(00)	3.25(00)	3.15(00)	3.04(00)	2.98(00)					
H_T [mol/L]	0.9304	0.9304	0.9304	0.9304	0.9304	0.9304	0.9304	0.9304	0.9304	0.9304					
$L_0 \times 1E+04$ [mol/L]	1.62(02)	1.89(02)	3.58(01)	2.13(02)	3.13(04)	1.30(04)	1.27(02)	1.52(03)	1.55(04)	1.86(05)					
Estimates of the common parameters i.e. dissociation constants in the searched protonation model															
pK_{a1}	2.39(05)	2.37(07)	2.22(05)	2.39(07)	2.33(06)	2.10(04)	2.09(05)	2.08(06)	2.10(06)	2.12(07)					
pK_{a2}	3.54(02)	3.57(01)	3.55(04)	3.66(01)	3.57(02)	3.36(06)	3.40(07)	3.44(04)	3.51(05)	3.40(06)					
pK_{a3}	6.15(02)	6.16(01)	6.13(03)	6.15(01)	6.13(02)	6.02(05)	6.01(05)	6.06(03)	6.00(04)	5.99(05)					
Goodness-of-fit test with the statistical analysis of residuals															
Arithmetic mean of residuals $\bar{E}(\hat{\epsilon})$, [mL]	-2.27E-06	-4.32E-05	6.89E-05	4.73E-05	-7.69E-05	1.52E-05	5.71E-05	4.86E-05	-2.94E-06	1.71E-05					
Mean of absolute value of residuals, $\overline{ E }$, [mL]	0.00015	0.00012	0.00059	0.00015	0.00030	0.00019	0.00014	0.00026	0.00026	0.00037					
Residual standard deviation, pH (ESAB) $s(\hat{\epsilon})$, [mL]	0.0002	0.0001	0.0006	0.0001	0.0003	0.0002	0.0001	0.0002	0.0003	0.0004					
Residual standard deviation, Residual skewness $g_1(\hat{\epsilon})$	0.00021	0.00016	0.00067	0.00018	0.00035	0.00028	0.00019	0.00035	0.00033	0.00051					
Residual kurtosis $g_2(\hat{\epsilon})$	-0.14	0.00	-0.08	0.33	-0.06	-0.92	-0.23	-0.10	0.52	-0.72					
Jarque-Berra test of residuals normality: p.	2.90	3.43	1.61	2.35	1.95	3.42	3.14	3.52	2.91	4.72					
	0.862, Accepted	0.975, Accepted	0.943, Accepted	0.582, Accepted	0.955, Accepted	0.092, Accepted	0.783, Accepted	0.925, Accepted	0.343, Accepted	0.139, Accepted					

V předchozí tabulce č. 9 je regresní zpřesnění společných a skupinových parametrů pro pH-titraci okyseleného Lesinuradu a titrovaného KOH. Odhadované disociační konstanty pK_{a1} , pK_{a2} , pK_{a3} Lesinuradu jsou s jejich standardními odchylkami posledních platných číslic v závorce. Spolehlivost odhadu parametrů je prokázána těsností proložení: aritmetickým průměrem reziduí $E(\hat{e})$ [mL], průměrem absolutních hodnot reziduí $E|\hat{e}|$ [mL], směrodatnou odchylkou reziduí $s(\hat{e})$ [mL], šikmostí $g_1(\hat{e})$ a špičatostí $g_2(\hat{e})$, které prokazují Gaussovské rozdělení a Jarque-Berra test normality. Upřesněné společné parametry: pK_{a1} , pK_{a2} , pK_{a3} . Upřesněné skupinové parametry: H_0 , H_T , L_0 . Konstanty: $t = 25.0$ °C, $pK_w = 13.9799$, $s(V) = s_{inst}(y) = 0.0001$ mL, I_0 upravené (v reakční nádobě), $I_T = 0.9303$ (v byretě KOH) nebo 1.0618 (v byretě HCl).

Rezidua jsou v programu ESAB definována jako rozdíl mezi experimentálním a vypočteným objemem titrantu $e_i = V_{exp, i} - V_{calc, i}$. Test těsnosti proložení se provádí statistickou analýzou reziduí. Při dalším zpřesnění skupinových parametrů se odhady disociačních konstant stále zlepšují. Poměrně citlivé kritérium spolehlivosti odhadnutých disociačních konstant je průměr absolutních hodnot reziduí $E|\bar{e}|$ [mL]. Srovnání velikosti reziduí s instrumentálním šumem, $s_{inst}(V)$, zde $s_{inst}(V) = s(V) = 0.0001$ mL, potvrzuje vynikající proložení, protože průměr absolutních hodnot reziduí $E|\bar{e}|$ [mL] a také směrodatná odchylka reziduí $s(\hat{e})$ [mL] jsou téměř stejné nebo jsou nižší než experimentální šum $s_{inst}(y)$. Zde jsou hodnoty $E|\bar{e}| = 0.0001$ mL a $s(\hat{e}) = 0.0001$ mL stejné a obě hodnoty jsou také stejné jako směrodatná odchylka mikrobyrety $s(V) = 0.0001$ ml. Všechna rezidua oscilují mezi dolní -0.0001 mL a horní 0.0001 mL hranicí Hoaglinova intervalu spolehlivosti, a proto nebyly nalezeny žádné odlehlé body (viz strana 80 v poznámce [80]). Odhady disociačních konstant odhadnutých programem ESAB jsou spolehlivé (tabulka 9). Křivka těsnosti proložení je zlepšena pomocí zpřesnění skupinového parametru L_0 , skutečné koncentrace titrovaného léčiva Lesinuradu.

Thermodynamické disociační konstanty: Aplikací Debye-Hückelovy rovnice na data z tabulky 8 a 9 byl neznámý parametr pK_a^T odhadnut při dvou teplotách 25 °C a 37 °C. Vzhledem k úzkému rozmezí a malým hodnotám iontové síly nemohly být parametry efektivního průměru iontů \bar{a} a vysolovací koeficient C odhadnuty. Obrázek 23 ukazuje extrapolaci smíšených disociačních konstant na nulovou hodnotu iontové síly podle zkráceného Debye-Hückelova zákona pro protonační model tří disociačních konstant při teplotách 25 °C a 37 °C: $pK_{a1}^T = 2.09$, $pK_{a2}^T = 4.25$, $pK_{a3}^T = 6.58$ při 25 °C a $pK_{a1}^T = 1.96$,

$pK_{a2}^T = 4.16$, $pK_{a3}^T = 6.32$ při 37 °C (spektrofotometricky) a $pK_{a1}^T = 2.39$, $pK_{a2}^T = 3.47$, $pK_{a3}^T = 6.17$ při 25 °C a $pK_{a1}^T = 2.08$, $pK_{a2}^T = 3.29$, $pK_{a3}^T = 6.03$ při 37 °C (potenciometricky).



Obr. 23 - Stanovené thermodynamické disociační konstanty léčiva Lesinuradu. Závislost smíšených disociačních konstant na druhé odmocnině z iontové síly vlevo pro 25 °C, vpravo pro 37 °C, nahoře spektrofotometricky (s) a dole potenciometricky (p). (REACTLAB, ORIGIN).

Jako poslední krok bylo provedeno stanovení změny enthalpie a entropie: Změna enthalpie (ΔH^0) pro disociační proces byla vypočtena pomocí rovnice van't Hoffa $\ln K/dT = \Delta H^0/RT^2$. Z hodnoty volné energie ΔG^0 a ΔH^0 lze vypočítat entropii ΔS^0 : $\Delta G^0 = -RT \ln K$ a $\Delta S^0 = (\Delta H^0 - \Delta G^0)/T$, kde R (univerzální plynová konstanta) = 8.314 JK⁻¹.mol⁻¹, K je thermodynamická disociační konstanta a T je absolutní teplota. Thermodynamické parametry ΔH^0 a ΔG^0 byly stanoveny z teplotní změny disociačních konstant pomocí van't Hoffovy rovnice. Hodnoty enthalpie $\Delta H^0(pK_{a1}) = 19.19$ kJ.mol⁻¹, $\Delta H^0(pK_{a2}) = 13.29$ kJ.mol⁻¹, $\Delta H^0(pK_{a3}) = 38.39$ kJ.mol⁻¹, ukazují, že disociační proces je endothermní. Pozitivní hodnoty $\Delta G^0(pK_{a1}) = 11.93$ kJ.mol⁻¹, $\Delta G^0(pK_{a2}) = 24.26$ kJ.mol⁻¹, $\Delta G^0(pK_{a3}) = 37.56$ kJ.mol⁻¹ při 25 °C naznačují, že disociační proces není spontánní, což bylo potvrzeno také entropií $\Delta S^0(pK_{a1}) = 24.37$ J.mol⁻¹, $\Delta S^0(pK_{a2}) = -36.79$ J.mol⁻¹, $\Delta S^0(pK_{a3}) = 2.79$ J.mol⁻¹.

Programy REACTLAB i SQUAD84 vyhodnocovaly pro spektrální analýzu se spektrofotometrickou koncentrací 1×10^{-4} mol. dm^{-3} Lesinuradu stejné odhady všech tří disociačních konstant včetně testu těsnosti proložení. Program ESAB metodou nejmenších čtverců reziduí $e_i = V_{\text{exp}, i} - V_{\text{calc}, i}$, dosahuje velikost reziduí i 0.1 nebo 0.2 mL, což dokazuje vynikající proložení. Lze konstatovat, že spolehlivost disociačních konstant Lesinuradu byla prokázána, ačkoli skupinové parametry L_0 , H_T byly špatně podmíněny v modelu. Dobré proložení prokázalo dostatečnou spolehlivost odhadů parametrů pro tři disociační konstanty Lesinuradu při 25 °C a 37 °C. Nesrovnalost zjištěného experimentálního pK a jeho předpovězených hodnot může být způsobena nejasnou strukturou rezonance heterocyklického jádra a v důsledku toho různou distribucí elektronů, která může dále vést k různým predikcím pK podle navrhované struktury. V takových případech mohou prognostické programy MARVIN a ACD/Percepta selhat a je zapotřebí experimentální laboratorní stanovení. Vzhledem k tomu, že potenciometrické a spektrofotometrické výsledky jsou podobné, lze konstatovat, že získané experimentální výsledky jsou spolehlivé a že vykazují skutečnou disociaci látky.

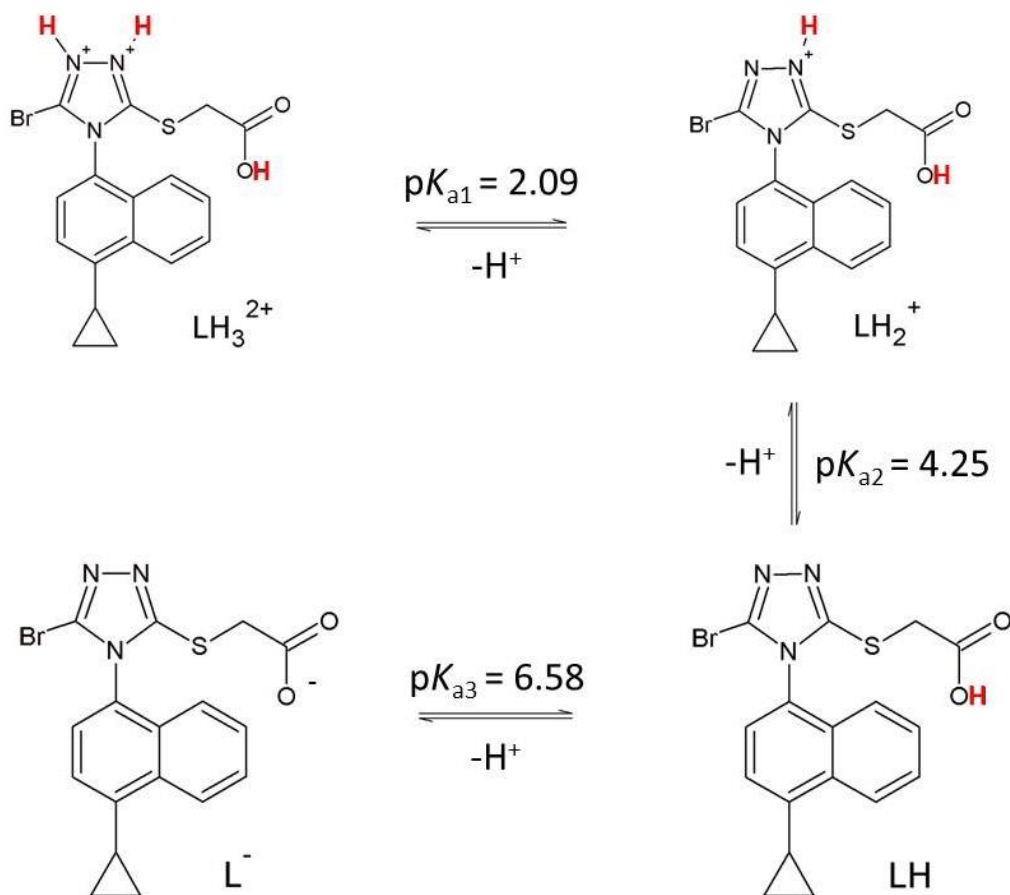


Schéma 1 – Disociace Lesinuradu.

5 Závěr

1) Omezeně rozpustná neutrální molekula LH Vortioxetinu je schopná protonace za vzniku dvou kationtů LH_2^+ a LH_3^{2+} , které jsou rovněž rozpustné v čisté vodě. Graf molárních absorpčních koeficientů různě protonovaných částic podle vlnové délky ukazuje, že spektrum částic LH_2^+ a LH se mírně liší v barvě, zatímco protonace chromoforu LH_2^+ na LH_3^{2+} má větší vliv na chromofory molekuly Vortioxetinu.

2) Bylo prokázáno, že v rozmezí pH 4 až 10 lze spolehlivě odhadnout dvě disociační konstanty ze spektra, pokud je koncentrace Vortioxetinu asi 9.2×10^{-5} M. Přestože změna pH poněkud méně ovlivňuje změny v chromoforu, lze spolehlivě stanovit dvě překrývající se thermodynamické disociační konstanty, kdy SQUAD84 a REACTLAB dosáhnou podobných hodnot $\text{p}K_{\text{a}1}^{\text{T}} = 7.22$, $\text{p}K_{\text{a}2}^{\text{T}} = 8.67$ při 25 °C a $\text{p}K_{\text{a}1}^{\text{T}} = 7.27$, $\text{p}K_{\text{a}2}^{\text{T}} = 8.79$ při 37 °C.

3) Dvě překrývající se thermodynamické disociační konstanty Vortioxetinu při potenciometrické koncentraci 3×10^{-4} mol.dm⁻³ byly stanoveny regresní analýzou potenciometrických titračních křivek za použití ESAB, $\text{p}K_{\text{a}1}^{\text{T}} = 7.08$, $\text{p}K_{\text{a}2}^{\text{T}} = 8.50$ při 25 °C a $\text{p}K_{\text{a}1}^{\text{T}} = 7.33$, $\text{p}K_{\text{a}2}^{\text{T}} = 8.76$ při 37 °C.

4) Predikce disociačních konstant Vortioxetinu byla provedena pomocí programu MARVIN pro určení protonačních míst a použití programu ACD/pK. Při porovnání dvou prediktivních a dvou experimentálních technik lze konstatovat, že prognostické programy se často liší odhadem $\text{p}K_{\text{a}}$.

5) Spektrofotometrická a potenciometrická pH-titrace umožnila měření tří disociačních konstant Lesinuradu (Schéma 1).

6) Omezeně rozpustný anion L^- Lesinuradu je schopný protonace za vzniku tří rozpustných částic LH, LH_2^+ , LH_3^{2+} v čisté vodě. Graf molárních absorpčních koeficientů různě protonovaných částic vůči vlnové délce ukazuje, že spektra částic L^- a LH_3^{2+} jsou téměř stejná.

7) Bylo prokázáno, že v rozmezí pH 2 až 8 lze ze spektra spolehlivě odhadnout tři disociační konstanty, když je koncentrace Lesinuradu 1.0×10^{-4} mol. dm⁻³. Ačkoli se u této látky poněkud méně změny pH ovlivňují chromofor, mohou být stanoveny tři thermodynamické disociační konstanty, přičemž SQUAD84 a REACTLAB dosáhnou podobných hodnot, $\text{p}K_{\text{a}1}^{\text{T}} = 2.09$, $\text{p}K_{\text{a}2}^{\text{T}} = 4.25$, $\text{p}K_{\text{a}3}^{\text{T}} = 6.58$ při 25 °C a $\text{p}K_{\text{a}1}^{\text{T}} = 1.96$, $\text{p}K_{\text{a}2}^{\text{T}} = 4.16$, $\text{p}K_{\text{a}3}^{\text{T}} = 6.32$ při 37 °C.

8) Tři thermodynamické disociační konstanty Lesinuradu při potenciometrické koncentraci $3 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ byly stanoveny regresní analýzou potenciometrických titračních křivek za použití ESAB, $pK_{a1}^T = 2.39$, $pK_{a2}^T = 3.47$, $pK_{a3}^T = 6.17$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $pK_{a1}^T = 2.08$, $pK_{a2}^T = 3.29$, $pK_{a3}^T = 6.03$ při $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

9) Predikce disociačních konstant Lesinuradu byla provedena programy MARVIN a programu ACD/Percepta k určení protonačních míst. Při porovnání dvou prediktivních a dvou experimentálních technik lze konstatovat, že prognostické programy se někdy liší odhadem pK_a .

10) Thermodynamické parametry ΔH^0 and ΔG^0 byly určeny z teplotní závislosti disociačních konstant odhadnutých z analýzy spektra za použití van't Hoffovy rovnice. Hodnoty enthalpie $\Delta H^0(pK_{a1}) = 19.19 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^0(pK_{a2}) = 13.29 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^0(pK_{a3}) = 38.39 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ukazují, že disociační proces je endothermní. Pozitivní hodnoty $\Delta G^0(pK_{a1}) = 11.93 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta G^0(pK_{a2}) = 24.26 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta G^0(pK_{a3}) = 37.56 \text{ kJ.mol}^{-1}$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ naznačují, že disociační proces není spontánní, což bylo potvrzeno hodnotou entropie $\Delta S^0(pK_{a1}) = 24.37 \text{ J.mol}^{-1}$, $\Delta S^0(pK_{a2}) = -36.79 \text{ J.mol}^{-1}$, $\Delta S^0(pK_{a3}) = 2.79 \text{ J.mol}^{-1}$.

6 Použitá literatura

1. Lundbeck, H., *FDA accepts Takeda and Lundbeck's filing for review of Brintellix (vortioxetine) for the treatment of major depression.* . 2015.
2. Lundbeck, H., *BRINTELLIX™ (vortioxetine) tablets for oral use. Full Prescribing Information.* Pharmacodynamics, 2013.
3. Kohler, S., et al., *The serotonergic system in the neurobiology of depression: Relevance for novel antidepressants.* J Psychopharmacol, 2016. **30**(1): p. 13-22.
4. Kelliny, M., et al., *Profile of vortioxetine in the treatment of major depressive disorder: an overview of the primary and secondary literature.* Therapeutics and Clinical Risk Management, 2015. **11**: p. 1193-1212.
5. Rothschild, A.J., et al., *Vortioxetine (Lu AA21004) 5 mg in generalized anxiety disorder: Results of an 8-week randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial in the United States.* European Neuropsychopharmacology. **22**(12): p. 858-866.
6. Psychscenehub, *dostupné z: <https://psychscenehub.com/psychinsights/vortioxetine-mechanism-of-action/>*
7. Meeker, A.S., et al., *The safety and efficacy of vortioxetine for acute treatment of major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis.* Systematic Reviews, 2015. **4**(1): p. 21.
8. Katona, C., T. Hansen, and C.K. Olsen, *A randomized, double-blind, placebo-controlled, duloxetine-referenced, fixed-dose study comparing the efficacy and safety of Lu AA21004 in elderly patients with major depressive disorder.* Int Clin Psychopharmacol, 2012. **27**(4): p. 215-23.
9. Drugbank, L.v.d., *dostupné z <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11560>*.
10. Gupta, A., et al., *Lesinurad: A significant advancement or just another addition to existing therapies of gout?* Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics, 2016. **7**(4): p. 155-158.
11. Zurampichcp, *dostupné z: <https://www.zurampichcp.com/mechanism-action>*.
12. Pathare, B., V. Tambe, and V. Patil, *A review on various analytical methods used in determination of dissociation constant.* International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014. **6**(8): p. 26-34.
13. Reijenga, J., et al., *Development of Methods for the Determination of pKa Values.* Anal. Chem. Insights, 2013. **8**: p. 53-71.
14. Hernández, J.A., et al., *New chemometric strategies in the spectrophotometric determination of pKa.* European Journal of Chemistry, 2014. **5**(1): p. 1-5.
15. Shayesteh, T.H., et al., *Application of chemometrics in determination of the acid dissociation constants (pKa) of several benzodiazepine derivatives as poorly soluble drugs in the presence of ionic surfactants.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **69**: p. 44-50.
16. Pandey, M.M., et al., *Determination of pKa of felodipine using UV-Visible spectroscopy.* Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2013. **115**: p. 887-890.
17. Manallack, D.T., *The pK(a) Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery.* Perspect Medicin Chem, 2008. **1**: p. 25-38.
18. Milletti, F.S., L.; Sforza, G.; Cruciani, G., *New and original pKa prediction method using grid molecular interaction fields.* J. Chem. Inf. Model., 2007. **47**: p. 2172-2181.
19. Settimo, L.B., K.; Knegt, R. A., *Comparison of the accuracy of experimental and predicted pKa values of basic and acidic compounds.* Pharm. Res., 2014. **31**: p. 1082-1095.

20. Tam, K.Y. and K. Takács-Novák, *Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study*. *Analytica Chimica Acta*, 2001. **434**(1): p. 157-167.
21. Irwdpi, *Dostupné z: http://irwdpi.com/zurampic/ZURAMPIC_PI_and_Medguide_2017.pdf#page=1*.
22. Rees, F., M. Hui, and M. Doherty, *Optimizing current treatment of gout*. *Nature Reviews Rheumatology*, 2014. **10**: p. 271.
23. Sanchez-Nino, M.D., et al., *Lesinurad: What the nephrologist should know*. *Clinical Kidney Journal*, 2017. **10**(5): p. 679-687.
24. Schlesinger, N., *Difficult-to-Treat Gouty Arthritis*. *Drugs*, 2011. **71**(11): p. 1413-1439.
25. Yashika Garg, V.G., Rajeshwari Gore, Radhe Shyam Garg, Arun Kumar, *Lesinurad, a Novel Uricosuric Drug for Allopurinol-Refractory Gout Patients*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research [serial online]*, 2018. **12**(2): p. FE01-FE05.
26. Milletti, F., et al., *New and Original pKa Prediction Method Using Grid Molecular Interaction Fields*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2007. **47**(6): p. 2172-2181.
27. Settimo, L., K. Bellman, and R.M.A. Knegtel, *Comparison of the Accuracy of Experimental and Predicted pKa Values of Basic and Acidic Compounds*. *Pharmaceutical Research*, 2014. **31**(4): p. 1082-1095.
28. Tam, K.Y.T.-N., K., *Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: A validation study*. *Anal. Chim. Acta*, 2001. **434**: p. 157-167.
29. Tam, K.Y., M. Hadley, and W. Patterson, *Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants, Part IV. Water-insoluble pyridine derivatives*. *Talanta*, 1999. **49**: p. 539-546.
30. Allen, R.I., et al., *Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants of ionizable drugs*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998. **17**(4): p. 699-712.
31. Hartley, F.R., C. Burgess, and R.M. Alcock, *Solution Equilibria*, 1980: p. 257.
32. Leggett, D.J. and W.A.E. McBryde, *General computer program for the computation of stability constants from absorbance data*. *Analytical Chemistry*, 1975. **47**(7): p. 1065-1070.
33. Kankare, J.J., *Computation of equilibrium constants for multicomponent systems from spectrophotometric data*. *Analytical Chemistry*, 1970. **42**(12): p. 1322-1326.
34. Meloun, M., Z. Ferenčíková, and M. Javůrek, *Reliability of dissociation constants and resolution capability of SQUAD(84) and SPECFIT/32 in the regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2012. **86**: p. 305-14.
35. Meloun, M., et al., *The dissociation constants of the cytostatic bosutinib by nonlinear least-squares regression of multiwavelength spectrophotometric and potentiometric pH-titration data*. *J Pharm Biomed Anal*, 2016. **120**: p. 158-67.
36. Meloun, M., et al., *Tutorial on a chemical model building by least-squares non-linear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data*. *Analytica chimica acta*, 2006. **580**(1): p. 107-121.
37. Meloun, M., S. Bordovská, and A. Vrána, *The thermodynamic dissociation constants of the anticancer drugs camptothecine, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecine, 10-hydroxycamptothecine and 7-ethylcamptothecine by the least-squares nonlinear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **584**(2): p. 419-432.

38. Meloun, M., et al., *Overlapping pK a of the Multiprotic Hemostyptic Eltrombopag using UV–Vis Multiwavelength Spectroscopy and Potentiometry*. Journal of Solution Chemistry, 2017. **46**(11): p. 2014-2037.
39. Maeder, M. and P. King, *Determination of the Reaction Mechanism and Fitting of Equilibrium and/or Rate Constants*. Analysis of Chemical Processes, 2012.
40. Leggett, D.J., et al., *A computational approach to the spectrophotometric determination of stability constants-II. Application to metalloporphyrin-axial ligand interactions in non-aqueous solvents*. Talanta, 1983. **30**(8): p. 579-586.
41. De Stefano, C., et al., *Computer analysis of equilibrium data in solution ESAB2M: an improved version of the ESAB program*. Annali Di Chimica, 1987. **77**(7-8): p. 643-675.
42. Gans, P., A. Sabatini, and A. Vacca, *Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs*. Talanta, 1996. **43**(10): p. 1739-1753.
43. Gans, P., Sabatini, A., and Vacca, A., *Hyperquad computer-program suite*. Abstr Pap Am Chem S, 2000(U763-U763): p. 219.
44. Zhou, X.B., et al., *Structures and physicochemical properties of vortioxetine salts*. Acta Crystallographica Section B-Structural Science Crystal Engineering and Materials, 2016. **72**: p. 723-732.
45. Ribeiro, A.R. and T.C. Schmidt, *Determination of acid dissociation constants (pKa) of cephalosporin antibiotics: Computational and experimental approaches*. Chemosphere, 2017. **169**: p. 524-533.
46. *ACD/Labs pKa Predictor 3.0*. . 2007.
47. Balogh, G.T., et al., *Comparative Evaluation of in Silico pK(a) Prediction Tools on the Gold Standard Dataset*. Qsar & Combinatorial Science, 2009. **28**(10): p. 1148-1155.
48. Balogh, G.T., A. Tarcsay, and G.M. Keseru, *Comparative evaluation of pK(a) prediction tools on a drug discovery dataset*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012. **67-68**: p. 63-70.
49. Evagelou, V., A. Tsantili-Kakoulidou, and M. Koupparis, *Determination of the dissociation constants of the cephalosporins cefepime and ceftirome using UV spectrometry and pH potentiometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003. **31**(6): p. 1119-1128.
50. Liao, C.Z. and M.C. Nicklaus, *Comparison of Nine Programs Predicting pK(a) Values of Pharmaceutical Substances*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2009. **49**(12): p. 2801-2812.
51. Roda, G., et al., *Determination of Acid Dissociation Constants of Compounds Active at Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors by Means of Electrophoretic and Potentiometric Techniques*. Analytical Sciences, 2010. **26**(1): p. 51-54.
52. Bezençon, J., et al., *pKa determination by 1H NMR spectroscopy – An old methodology revisited*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **93**: p. 147-155.
53. Hansen, N.T., et al., *Prediction of pH-Dependent Aqueous Solubility of Druglike Molecules*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2006. **46**(6): p. 2601-2609.
54. Manchester, J., et al., *Evaluation of pK(a) Estimation Methods on 211 Drug like Compounds*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2010. **50**(4): p. 565-571.
55. ten Brink, T. and T.E. Exner, *pK(a) based protonation states and microspecies for protein-ligand docking*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2010. **24**(11): p. 935-942.

56. Meloun, M. and S. Bordovská, *Benchmarking and validating algorithms that estimate pK a values of drugs based on their molecular structures*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **389**(4): p. 1267-1281.
57. StatSci, *S-PLUS 8.2 a new philosophy of data analysis*. Dostupné z: <http://www.insightful.com/products/splus>. 1994.
58. Maeder, M. and P. King, *ChemInform Abstract: Analysis of Chemical Processes, Determination of the Reaction Mechanism and Fitting of Equilibrium and Rate Constants*. ChemInform, 2013. **44**(43).
59. Fazary, A.E., *Thermodynamic Studies on the Protonation Equilibria of Some Hydroxamic Acids in NaNO₃ Solutions in Water and in Mixtures of Water and Dioxane*. Journal of Chemical & Engineering Data, 2005. **50**(3): p. 888-895.
60. Dostálek, M., *Farmakokinetika*. Praha; Grada, 2006. **1. ed.**(ISBN 80224714647).
61. Meloun, M., S. Bordovská, and T. Syrový, *A novel computational strategy for the pK(a) estimation of drugs by non-linear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data exhibiting small spectral changes*. Journal of Physical Organic Chemistry, 2007. **20**(9): p. 690-701.
62. P. Debye, E.H., *De la theorie des electrolytes. I. abaissement du point de congelation et phenomenes associes*. . Physikalische Zeitschrift, 1923. **roč. 24, č.9**: p. 185-206.
63. Meloun, M. and P. Černohorský, *Thermodynamic dissociation constants of isocaine, physostigmine and pilocarpine by regression analysis of potentiometric data*. Talanta, 2000. **52**(5): p. 931-945.
64. Hemmateenejad, B., et al., *Spectrophotometric determination of acidity constants by two-rank annihilation factor analysis*. Analytica Chimica Acta, 2008. **607**(2): p. 142-152.
65. Avdeef, A., et al., *PH-metric log P 11. pKa determination of water-insoluble drugs in organic solvent–water mixtures*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999. **20**(4): p. 631-641.
66. Meloun, M., T. Syrový, and A. Vrána, *The thermodynamic dissociation constants of losartan, paracetamol, phenylephrine and quinine by the regression analysis of spectrophotometric data*. Analytica Chimica Acta, 2005. **533**(1): p. 97-110.
67. S. Kotrlý, J.C., *Analytická chemie III - Elektroanalytické metody*. Vysoká škola chemicko-technologická Pardubice, 1984: p. 9-25.
68. Meloun, M., J. Militký, and H. Kočmířová, *Statistické zpracování experimentálních dat*. 1994: Plus.
69. Babić, S., et al., *Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2007. **26**(11): p. 1043-1061.
70. Klouda, P., *Moderní analytické metody*. Vol. 2. 2003: Pavel Klouda.
71. Meloun, M., et al., *Critical comparison of methods predicting the number of components in spectroscopic data*. Analytica Chimica Acta, 2000. **423**(1): p. 51-68.
72. Meloun, M., J. Havel, and E. Högfeltd, *Computation of solution equilibria : a guide to methods in potentiometry, extraction, and spectrophotometry*. Ellis Horwood series in analytical chemistry. 1988, Chichester, England: Ellis Horwood x, 297 p.
73. Meloun, M., et al., *Reliability and uncertainty in the estimation of pK (a) by least squares nonlinear regression analysis of multiwavelength spectrophotometric pH titration data*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **387**(3): p. 941-955.
74. Meloun, M., J. Havel, and E. Hogfeltd, *Computation of solution equilibria: A guide to methods in potentiometry, extraction, and spectrophotometry*. 1988: John Wiley and Sons, New York, NY (US); None. Medium: X; Size: Pages: 307.

75. Meloun, M., J. Militký, and M. Forina, *Chemometrics for analytical chemistry, Volume 2: PC- aided regression and related methods*. Chemometrics for analytical chemistry. 1994, Chichester: Ellis Horwood. 400.
76. ThermoFisher, Dostupné z: <http://www.thermofisher.cz/produkty/ph-elektroda-hc-103-presne-laboratorni-mereni>.
77. Veronika, N. 2015, VŠCHT Pardubice.
78. Rigano, C., M. Grasso, and S. Sammartano, *Computer-Analysis of Equilibrium Data in Solution - a Compact Least-Squares Computer-Program for Acid-Base Titrations*. *Annali Di Chimica*, 1984. **74**(7-8): p. 537-532.
79. ORIGIN. OriginLab Corporation, O.R.P., Suite 303, Northampton, MA 01060, USA.
80. Meloun, M., J. Militký, and M. Forina, *Chemometrics for analytical chemistry, Volume 1: PC-Aided Statistical Data Analysis*. Chemometrics for analytical chemistry. 1992, Chichester: Ellis Horwood. 330.