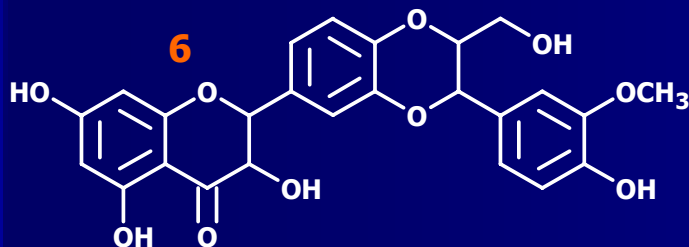
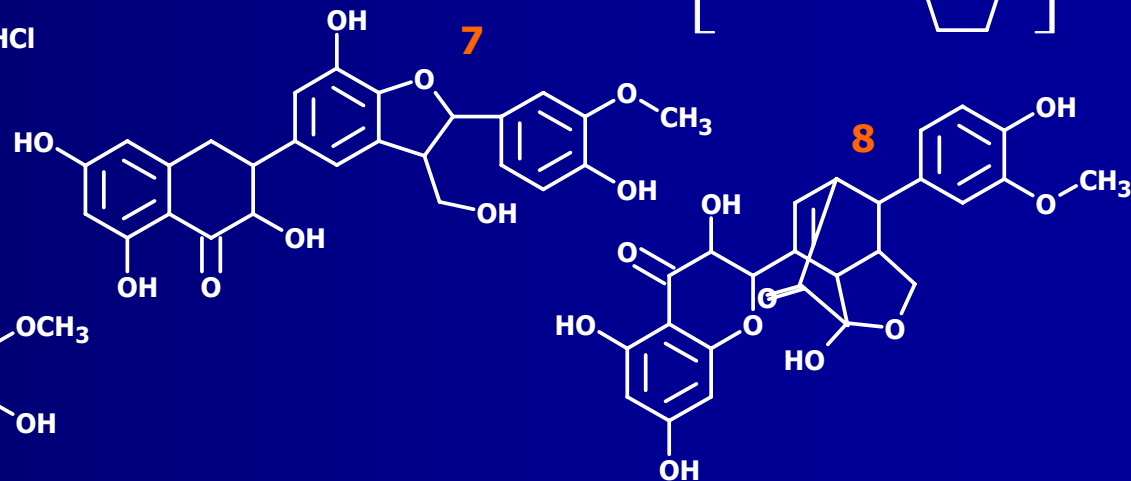
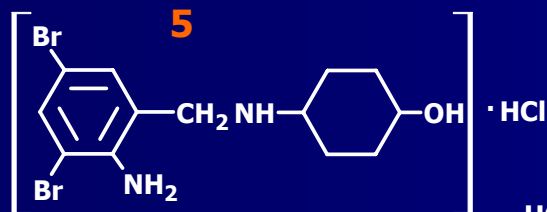
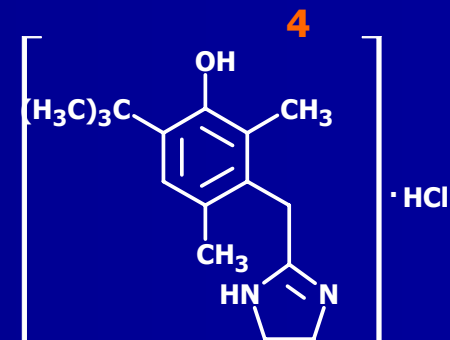
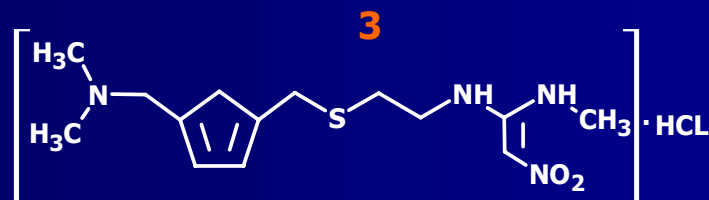
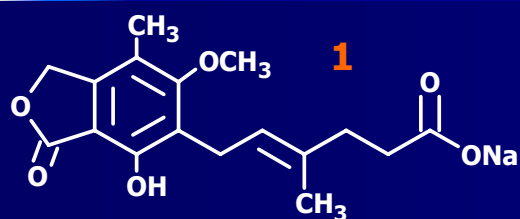


Univerzita Pardubice, KAlch

Spektrofotometrické stanovení pK léčiv

Autoři: Ing. Tomáš Syrový, Ing. Dominika Burkoňová,
Prof. RnDr Milan Meloun DrSc

č.	Látka	Zařazení léčiva	č.	Látka	Zařazení léčiva
1	Ambroxol HCl	Expektorancium	5	Ranitidin HCl	Antagonistum
2	Mykofenolát mofetilu	Imunosupresivum	6	Silybinin	Hepatoprotektivum
3	Mykofenolát sodný	Imunosupresivum	7	Silychristin	Hepatoprotektivum
4	Oxymetazolin HCl	Antagonistum	8	Silydianin	Hepatoprotektivum



Technické zabezpečení experimentu

Přístroje

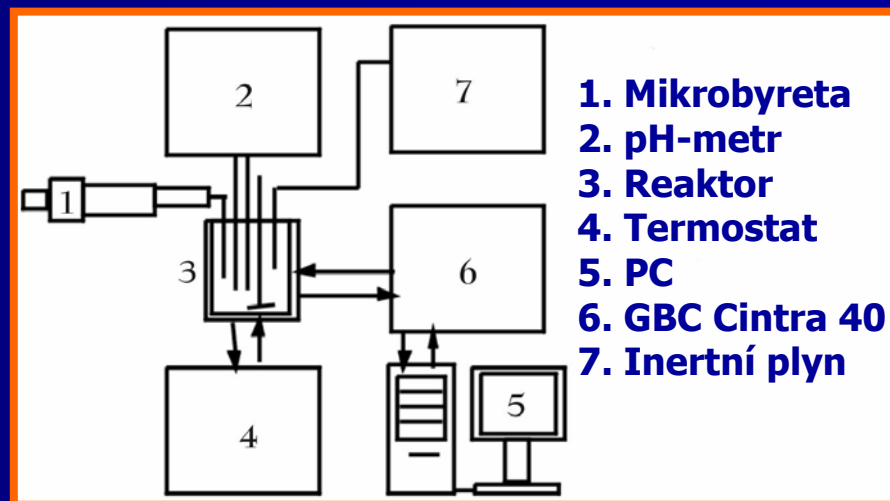
- UV/VIS spektrofotometr GBC Cintra 40
- pH metr Radelkis OP-271
- Termostat
- Mikrobyrety

Chemikálie

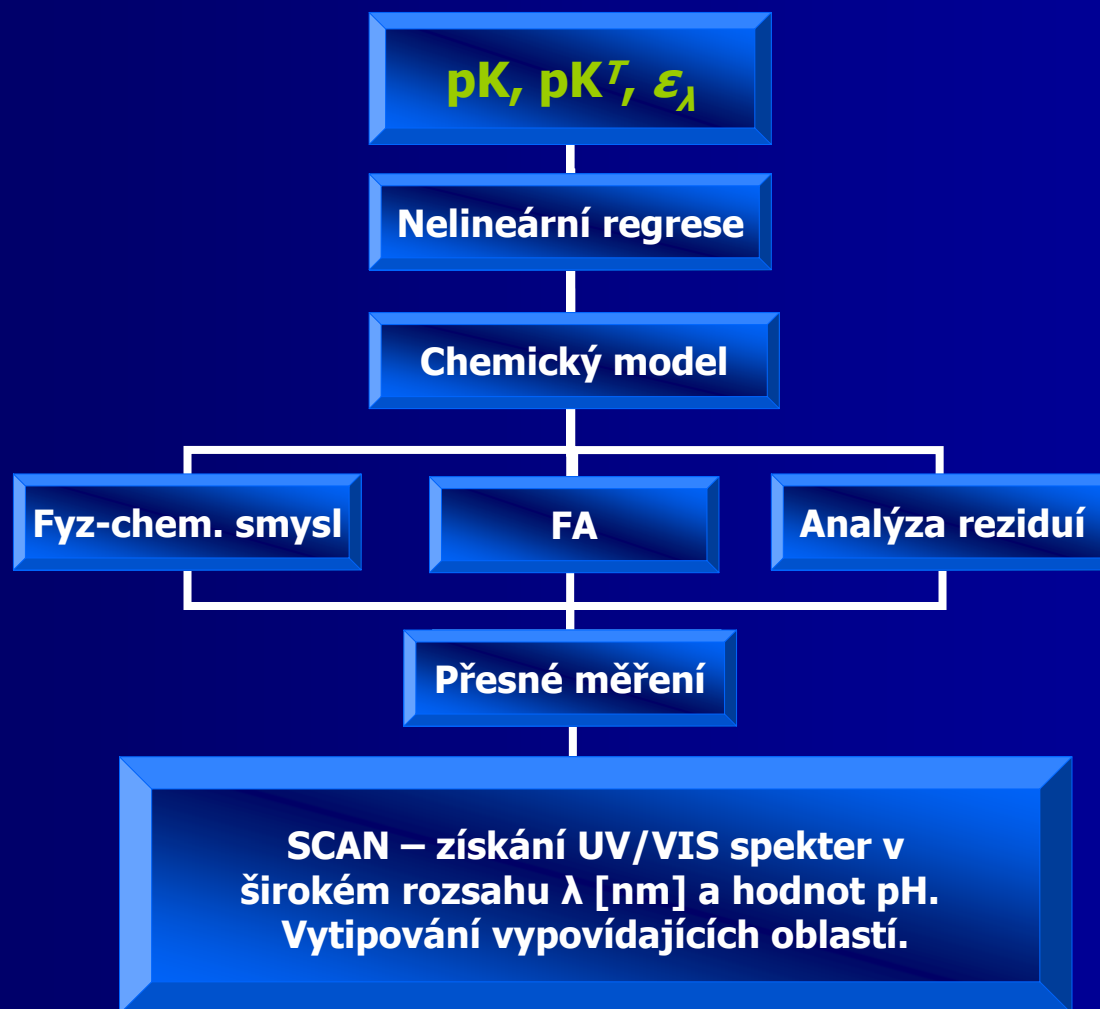
- 1M HCl
- 1M KOH
- Standardní pH pufry
- Pufry

Programy

- SQUAD(84)
- STAR, STARFA
- ADSTAT 1.25
- S-Plus
- MS EXCEL 2002
- Microcal Origin



Strategie experimentu



FA a PCA

Rozklad zdrojové matice

Matice A o rozměrech $m \times n$, kde $A = TP^T + E$.

Způsob výpočtu T a P matic z kovarianční matice Z , kde $Z = A^T A$.

Matice latentních proměnných lze vypočítat ze vztahu: $T^T = (P^T P)^{-1} P^T A^T$

Krátký cyklus

Rekonstrukce datové matice použitím prvních k nejvýznamějších latentních proměnných.

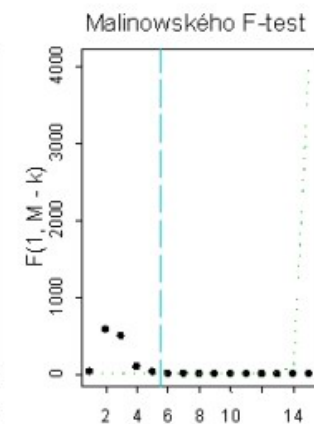
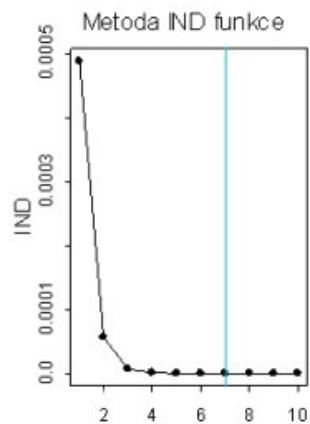
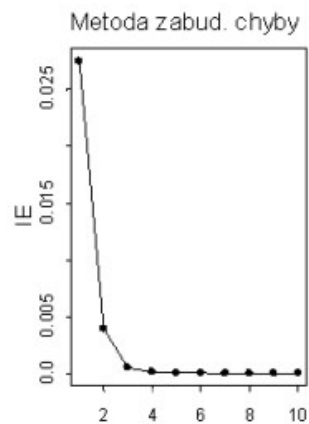
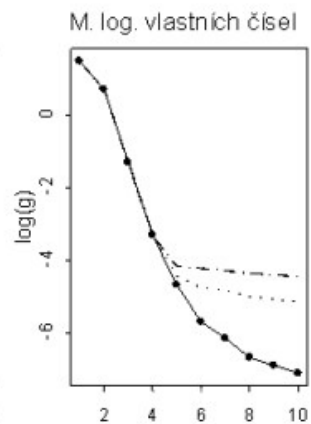
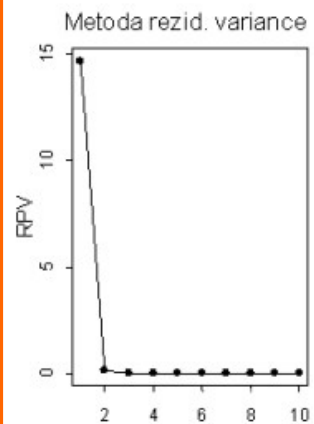
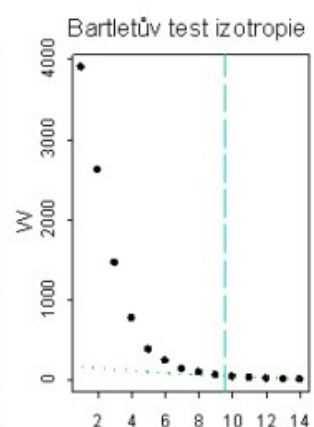
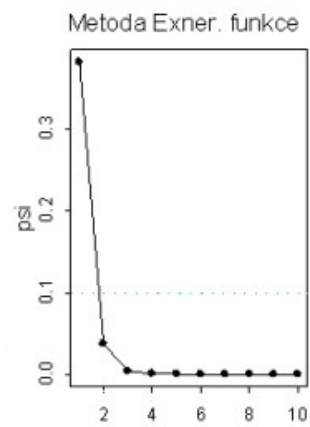
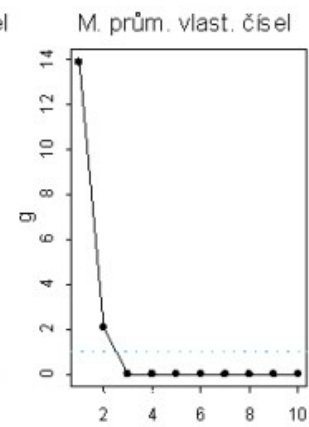
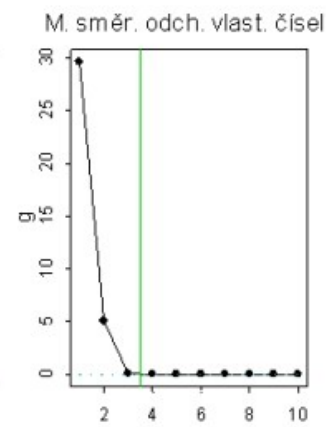
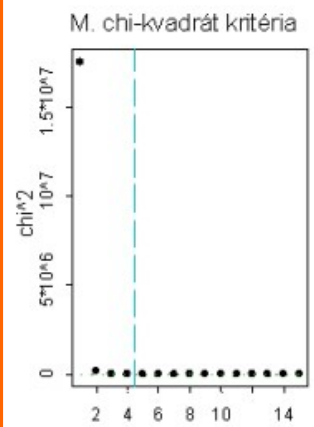
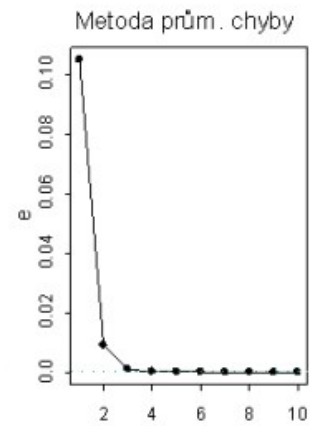
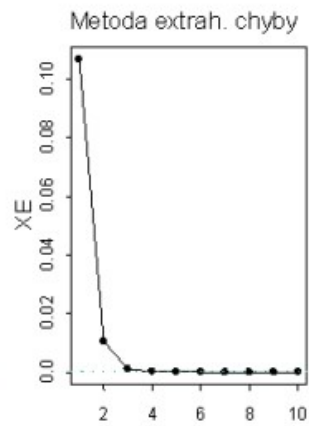
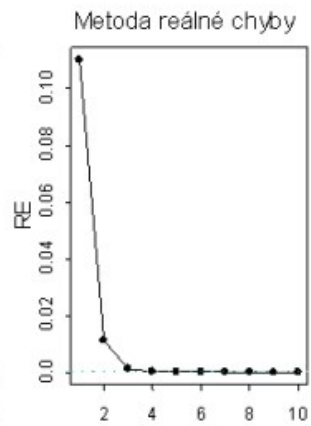
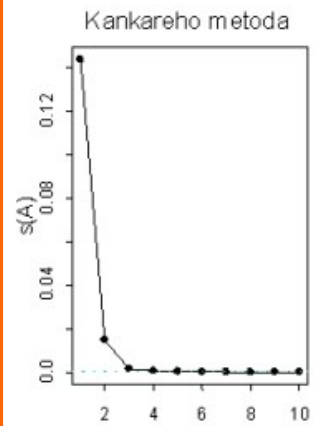
$$A_{\text{pred}} = TP^T$$

Metody k určení počtu latentních proměnných

Spolehlivé metody: zeleně označené

Selhávající metody: červeně označené

Kankareho metoda	Metoda X^2 - kritéria	Reziduální variace	Malinowského F-test
Metoda reálné chyby	Metoda smod. vlastních čísel	Metoda log. vlastních čísel	Bartlettův test izotropie
Metoda extrahované chyby	Metoda průměru vlastních čísel	Metoda zabudované chyby	
Metoda průměrné chyby	Metoda Exnerovy funkce	Faktorová indikátorová funkce	



Kankareho metoda

Vychází z druhého momentu M analyzované absorpční matice A .

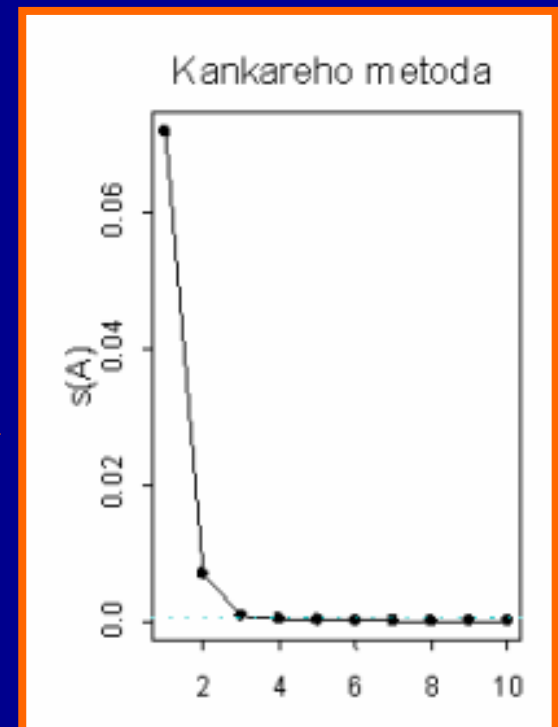
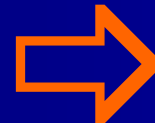
$$M = \frac{1}{n_W} A^T A$$

Předpoklad: Prvky matice jsou zatíženy experimentálním šumem jehož úroveň je dána $s_{inst}(A)$.

Zbytková reziduálová chyba $s_k(A)$

$$s_k(A) = \sqrt{\frac{tr(M) - \sum_{a=1}^k r_a}{n_W - k}}$$

Za hodnotu matice je pokládána ta hodnota, kdy platí $s_k(A) = s_{inst}(A)$, přičemž hodnota matice je roven počet latentních proměnných.



Metoda χ^2 kritéria

Pro data s měnící se směrodatnou odchylkou bod od bodu. Jedná se o určení matice A^{pred} , která reprodukuje matici A v rámci experimentální chyby.

Nevýhodou je nutnost znát směrodatnou odchylku u každého bodu.

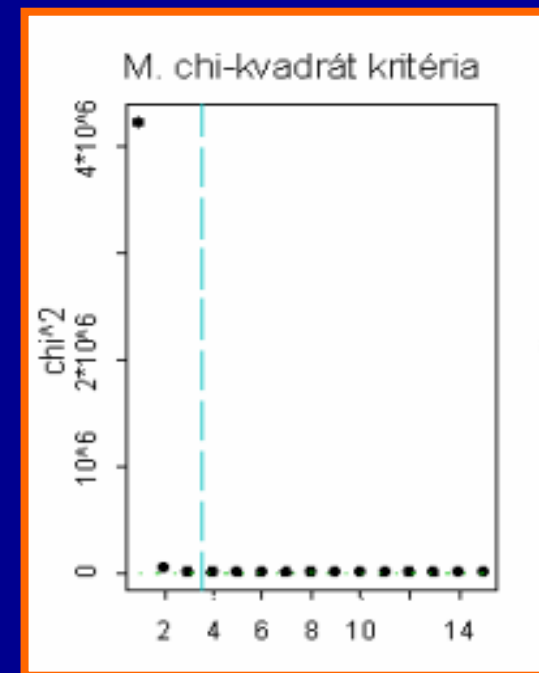
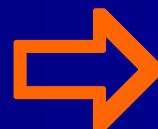
K posouzení, zda A^{pred} aproximuje datovou matici v rámci experimentální chyby jejich prvků

slouží **Bartletův χ^2 – test**, kde

$$\chi^2(k) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \left(\frac{A_{ij} - \hat{A}_{ij}}{\sigma_{ij}} \right)^2$$

Testovací kritérium: $\chi_{krit}^2 = (n - k)(m - k)$

kdy počet aktivních složek ve směsi odpovídá první hodnotě k , pro kterou platí $\chi^2(k) < \chi_{krit}^2$.



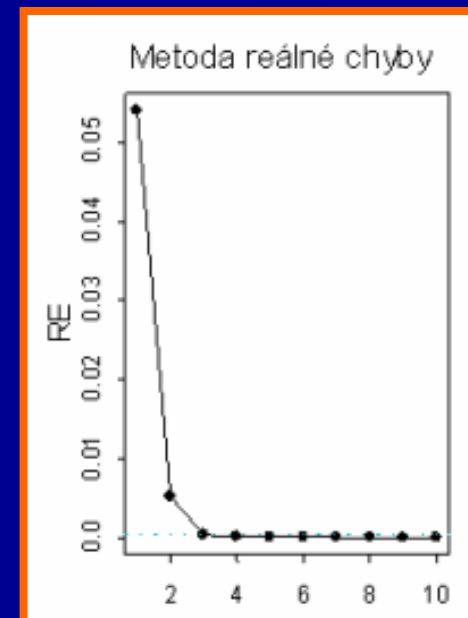
Metoda reálné chyby

Reálná chyba RE je mírou difference mezi naměřenými daty a ideálně čistými daty, jejíž variabilita by byla dána pouze latentními proměnnými.

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

Kde g_a jsou vlastní čísla kovarianční matice Z , M počet proměnných a N počet spekter.

Počet světlo-absorbujících částic je k , pro nějž RE nejlépe aproximuje odhad experimentální chyby.



Metoda extrahované chyby

Extrahovaná chyba XE je mírou rozdílu mezi naměřenými daty a daty získanými rekonstrukcí datové matice v krátkém cyklu použitím pouze prvních k latentních proměnných.

$$XE(k) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (A_{ij} - \hat{A}_{ij})^2}{nm}}$$

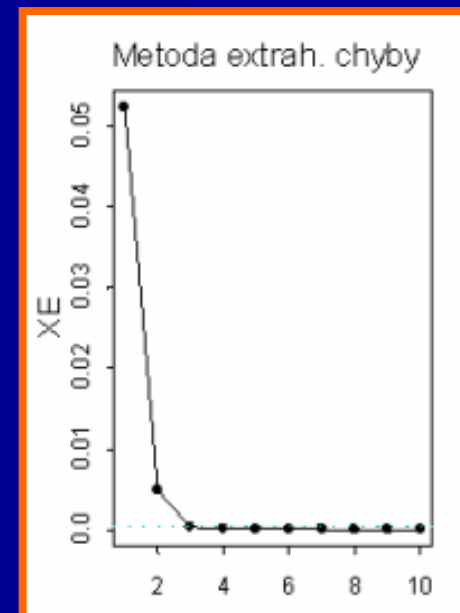
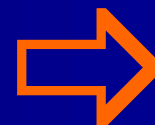
Alternativně lze také spočítat z vlastních čísel g_j a kovarianční matice Z

$$XE(k) = \sqrt{\frac{\sum_{j=k+1}^m g_j}{nm}}$$

Vzájemný přepočít pro $RE(k)$ a $XE(k)$ je poté:

$$XE(k) = RE(k) \sqrt{\frac{m-k}{m}}$$

Počet světlo-absorbujících částic je k , pro něž XE nejlépe aproximuje odhad experimentální chyby.



Malinowského F-test

Malinowski navrhl pro rozlišení primárních a sekundárních vlastních čísel **F-test**, testující

nulovou hypotézu H_0 : $q_j^{red} = \bar{q}_j^{red}$

oproti alternativní H_0 : $q_j^{red} > \bar{q}_j^{red}$,

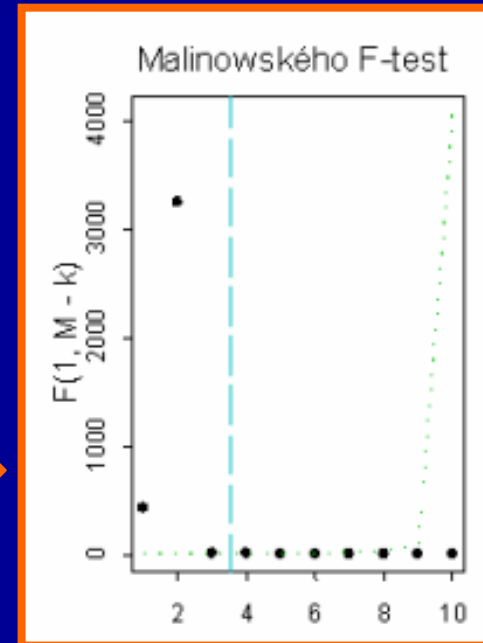
kde q_j^{red} jsou redukovaná vlastní čísla $q_j^{red} = \frac{g_a}{(N-a+1)(M-a+1)}$

a \bar{q}_j^{red} je vážený průměr sekundárních q_j^{red} .

V případě platnosti nulové hypotézy má testovací kritérium tvar:

$$F(1, m-k) = \frac{\sum_{j=k+1}^m (n-j+1)(m-j+1)}{(n-k+1)(m-k+1)} \times \frac{g_j}{\sum_{j=k+1}^m g_j}$$

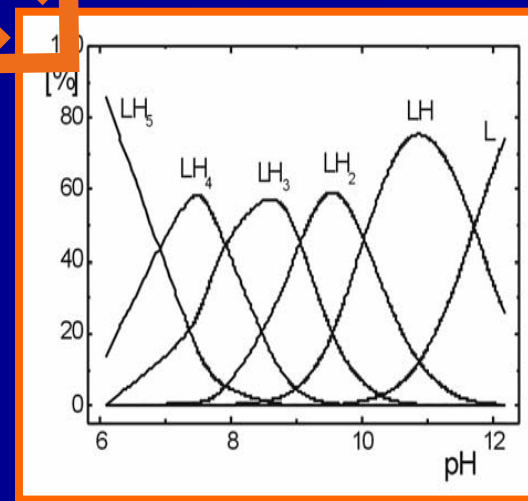
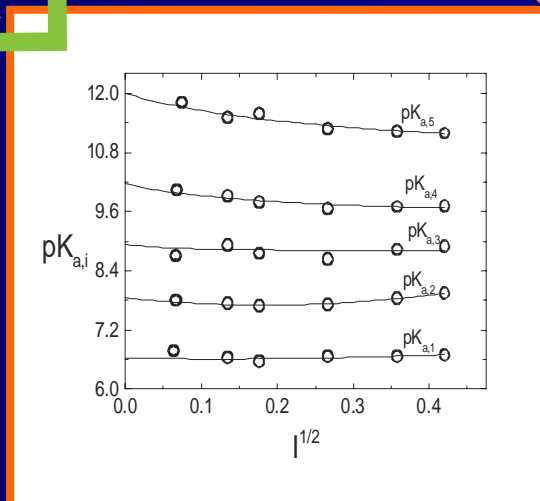
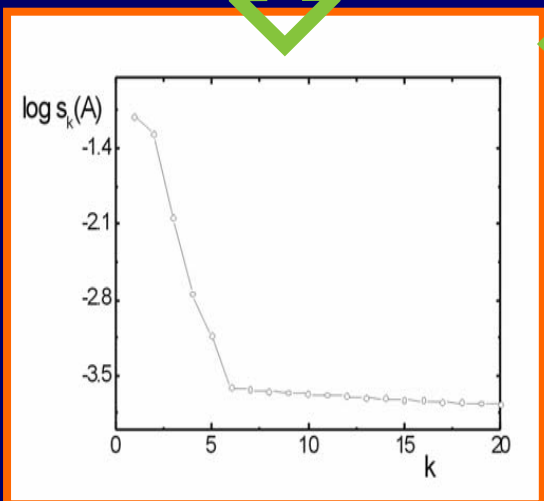
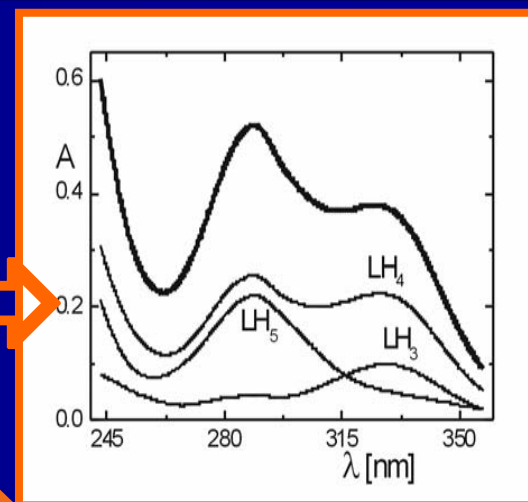
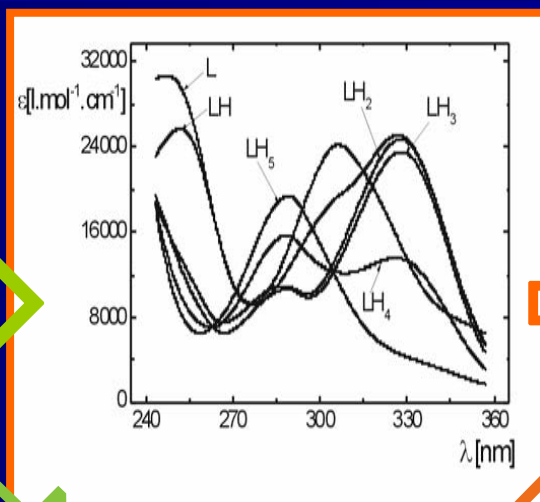
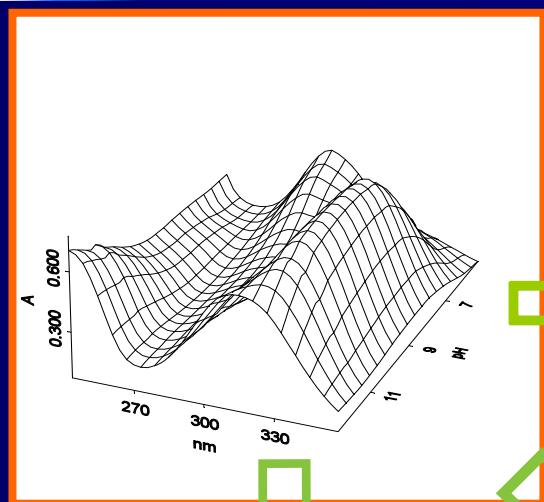
Testovací kritérium: První k -té redukované vlastní číslo, pro něž je hodnota testovacího kritéria větší než hodnota tabulovaná na dané hladině významnosti, je považováno za nejmenší primární a hodnota $r = k$ za počet světlo-absorbujících částic.



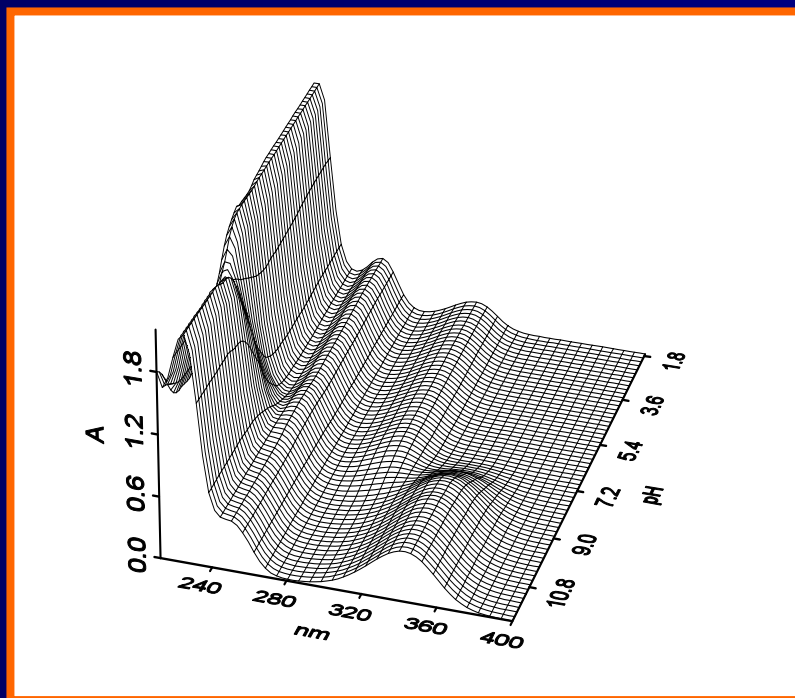
Hledání chemického modelu

Hledání modelu rovnováh léčiva Silychristin				
$q = 1, r =$	$\log \beta_{qr}$	$\log \beta_{qr}$	$\log \beta_{qr}$	$\log \beta_{qr}$
0	-	-	-	-
1	11.746(11)	11.768(7)	11.802(8)	11.819(9)
2	9.682(14)	9.697(9)	9.743(15)	9.886(64)
3	6.814(14)	7.208(36)	8.549(74)	8.856(213)
4	-	6.429(68)	7.143(75)	3.736(***)
5	-	-	6.388(89)	11.608(197)
6	-	-	-	6.677(202)
$s_k(A)$ [mAU], k	0.29, 6	0.26, 6	0.25, 6	0.27, 6
$s(A)$ [mAU]	2.91	1.89	1.63	1.49
R -faktor [%]	0.54	0.34	0.28	0.25
$ \bar{e} $	0.0017	0.0012	0.0009	0.0008
$s(e)$	0.0029	0.0019	0.00163	0.0015
$g_1(e)$	0.131	-0.329	-0.028	0.184
Model je	zamítnut	zamítnut	přijat	zamítnut

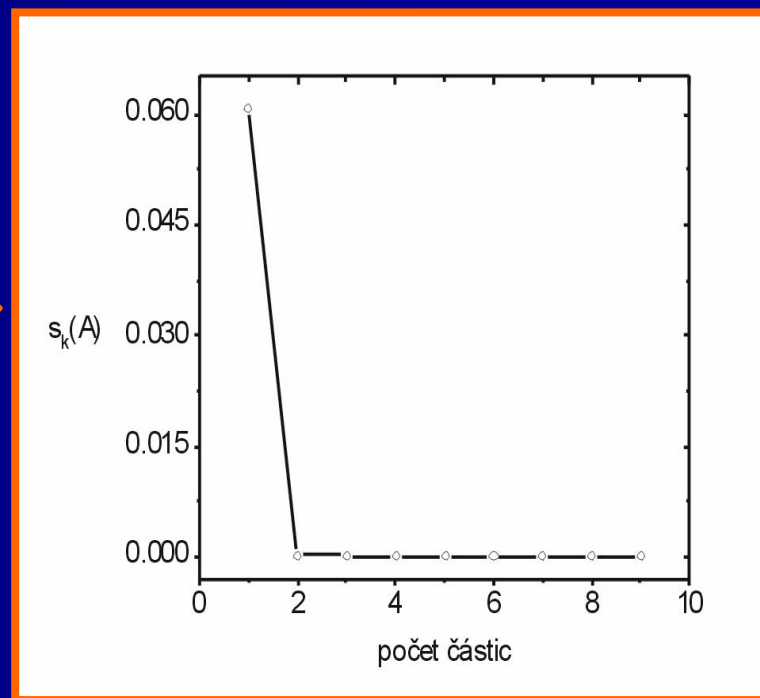
Vyhodnocení experimentálních dat



Mykofenolát mofetilu

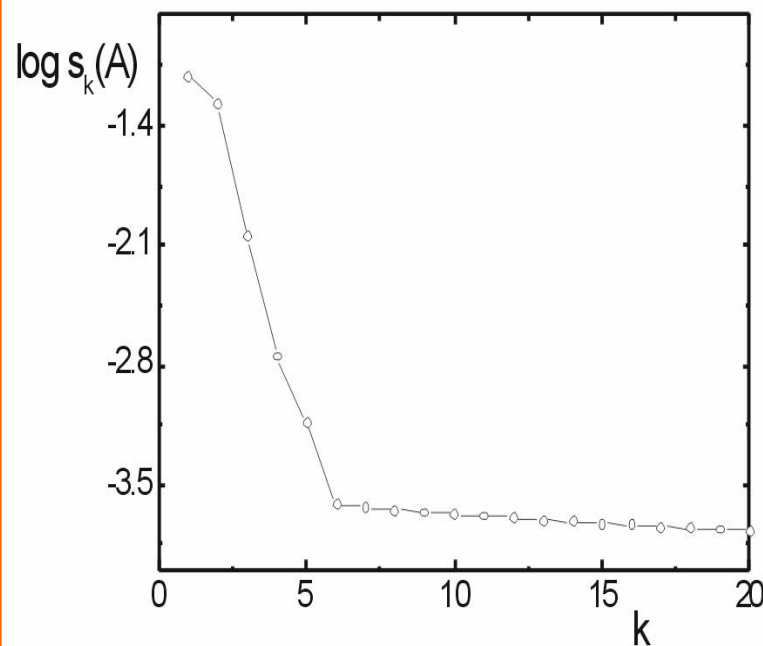
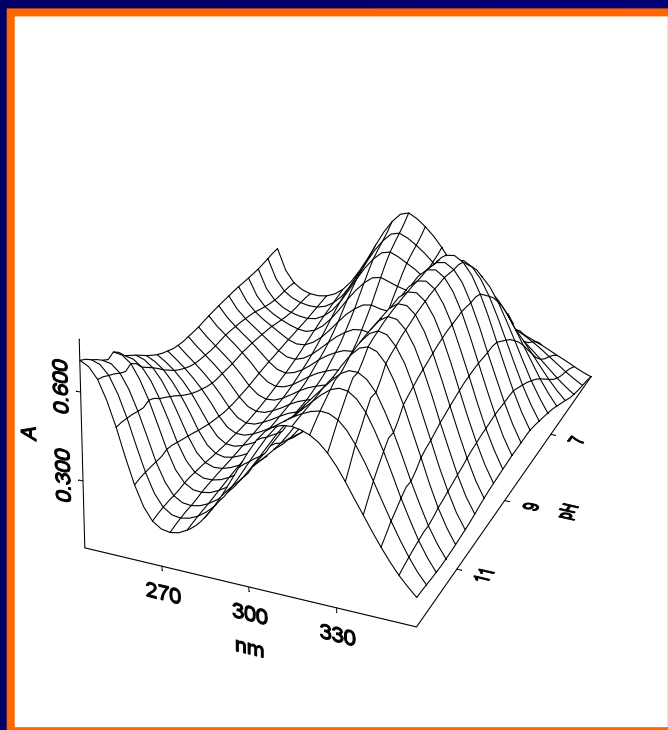


při 25 °C
 $pK_a^T = 8.29 (1)$



při 37 °C
 $pK_a^T = 8.16 (1)$

Silychristin



při 25°C

$$pK_{a,1}^T = 6.64 (18)$$

$$pK_{a,2}^T = 7.85 (31)$$

$$pK_{a,3}^T = 8.95 (34)$$

$$pK_{a,4}^T = 10.17 (92)$$

$$pK_{a,5}^T = 12.00 (9)$$

při 37°C

$$pK_{a,1}^T = 6.23 (29)$$

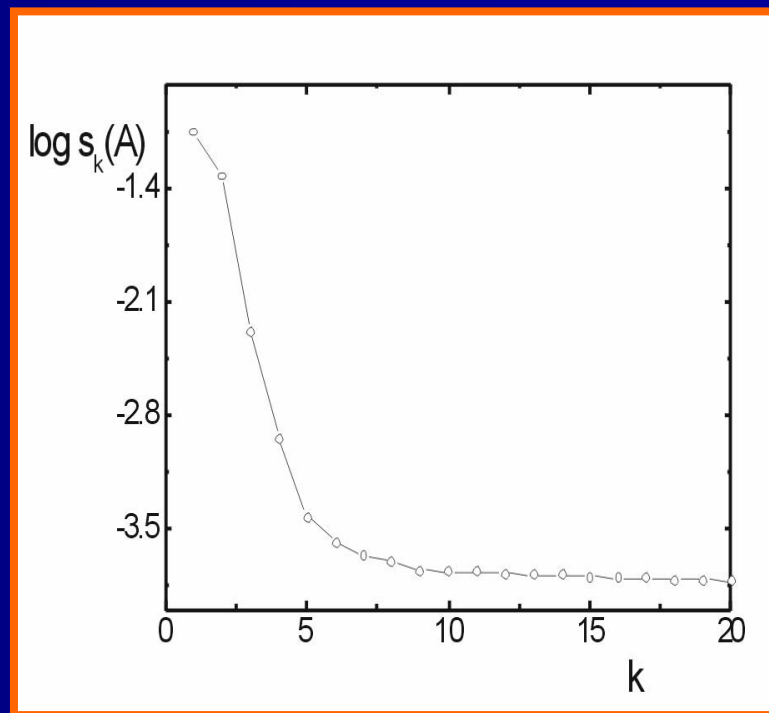
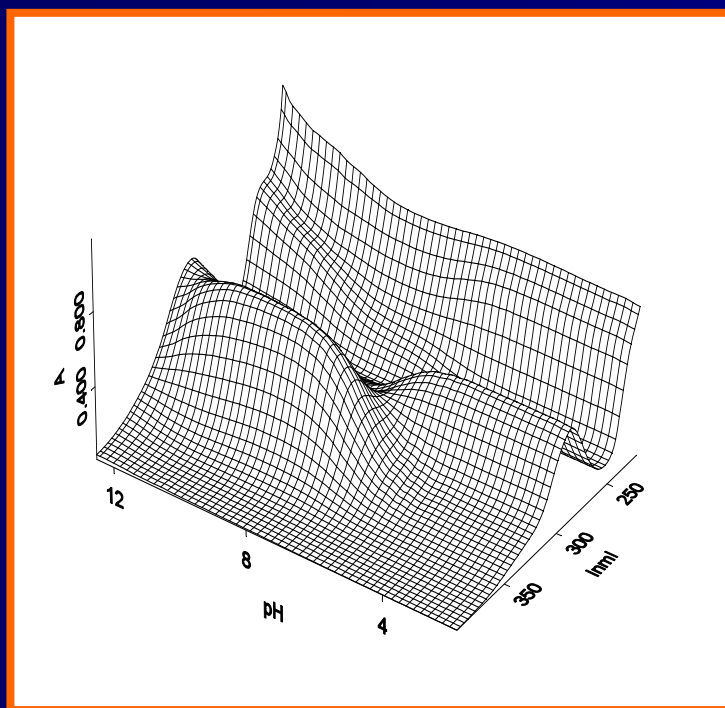
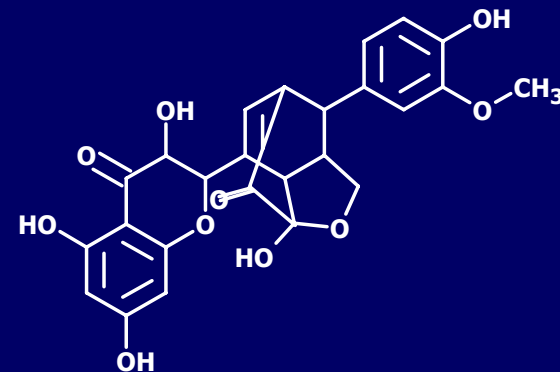
$$pK_{a,2}^T = 7.24 (26)$$

$$pK_{a,3}^T = 9.08 (18)$$

$$pK_{a,4}^T = 9.78 (8)$$

$$pK_{a,5}^T = 12.15 (34)$$

Silydianin



při 25°C

$$\text{pK}_{a,1}^T = 6.46 (17)$$

$$\text{pK}_{a,2}^T = 8.64 (25)$$

$$\text{pK}_{a,3}^T = 9.66 (91)$$

$$\text{pK}_{a,4}^T = 10.74 (20)$$

$$\text{pK}_{a,5}^T = 12.54 (36)$$

při 37°C

$$\text{pK}_{a,1}^T = 7.09 (17)$$

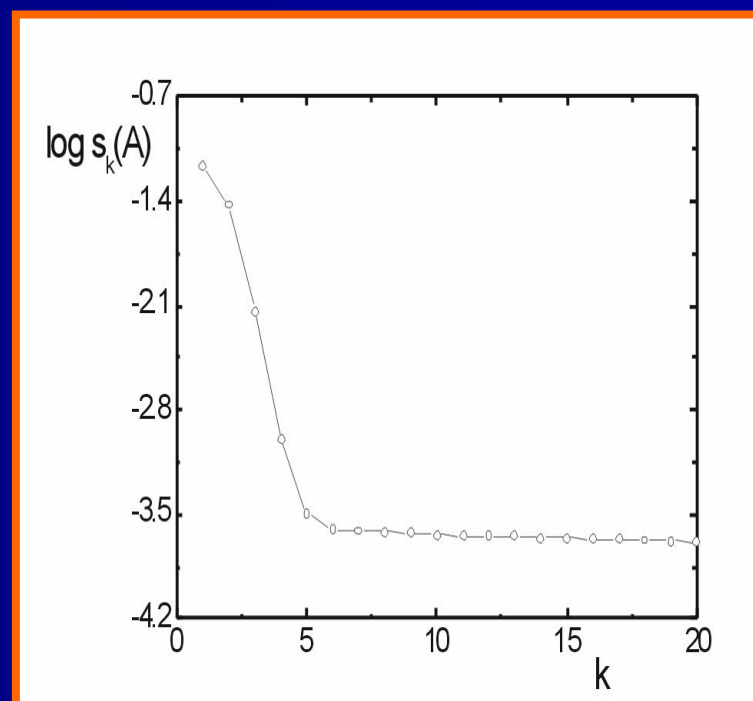
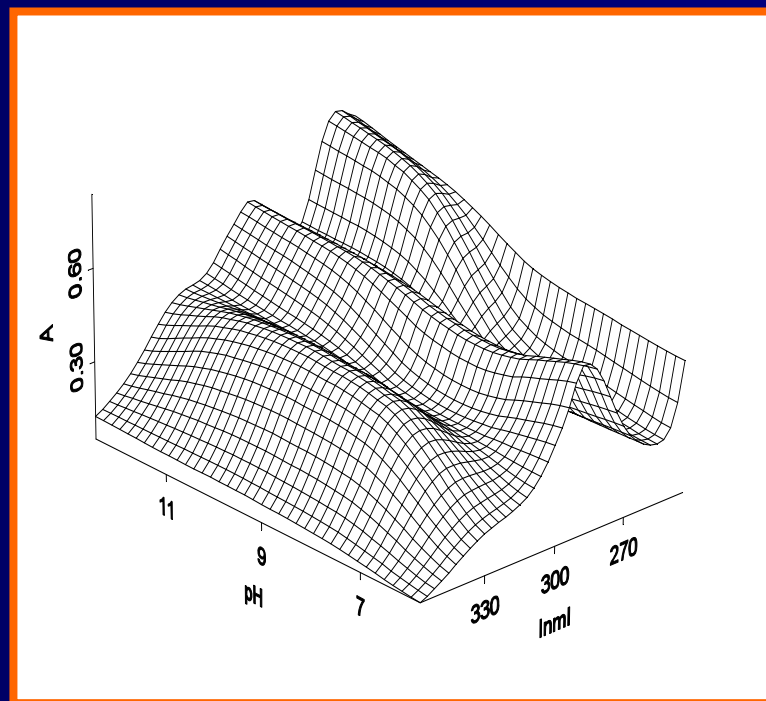
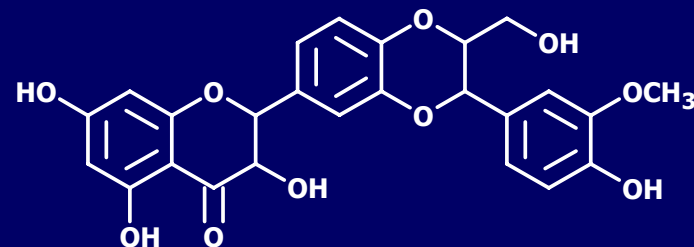
$$\text{pK}_{a,2}^T = 8.83 (14)$$

$$\text{pK}_{a,3}^T = 10.22 (11)$$

$$\text{pK}_{a,4}^T = 10.97 (73)$$

$$\text{pK}_{a,5}^T = 12.4 (59)$$

Silybinin



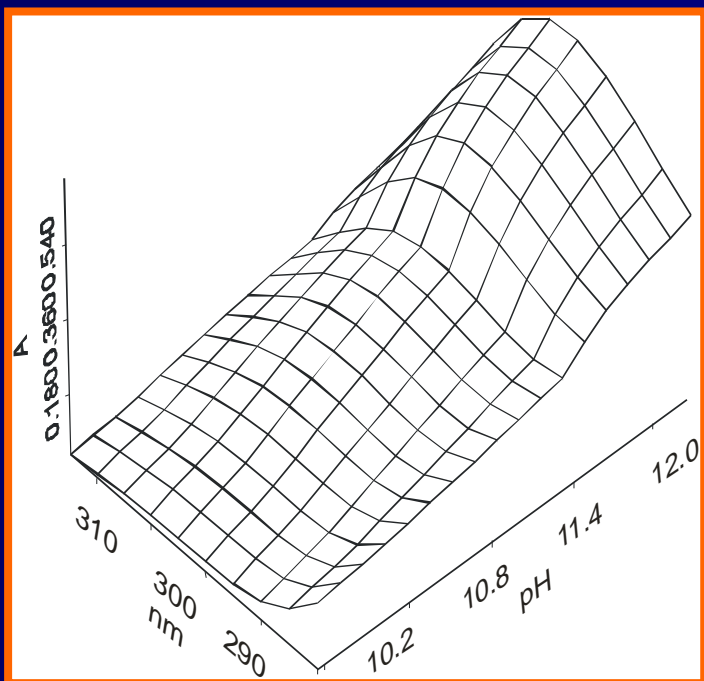
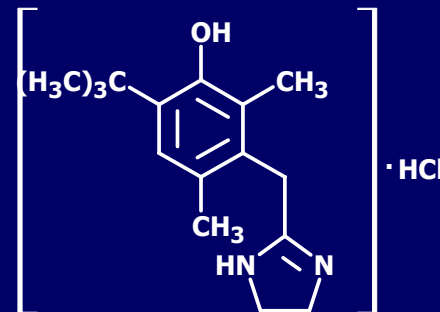
při 25°C

$pK_{a,1}^T = 6.98$ (5)
 $pK_{a,2}^T = 8.92$ (14)
 $pK_{a,3}^T = 9.66$ (11)
 $pK_{a,4}^T = 11.66$ (3)

při 37°C

$pK_{a,1}^T = 6.86$ (4)
 $pK_{a,2}^T = 8.66$ (4)
 $pK_{a,3}^T = 9.68$ (1)
 $pK_{a,4}^T = 11.44$ (7)

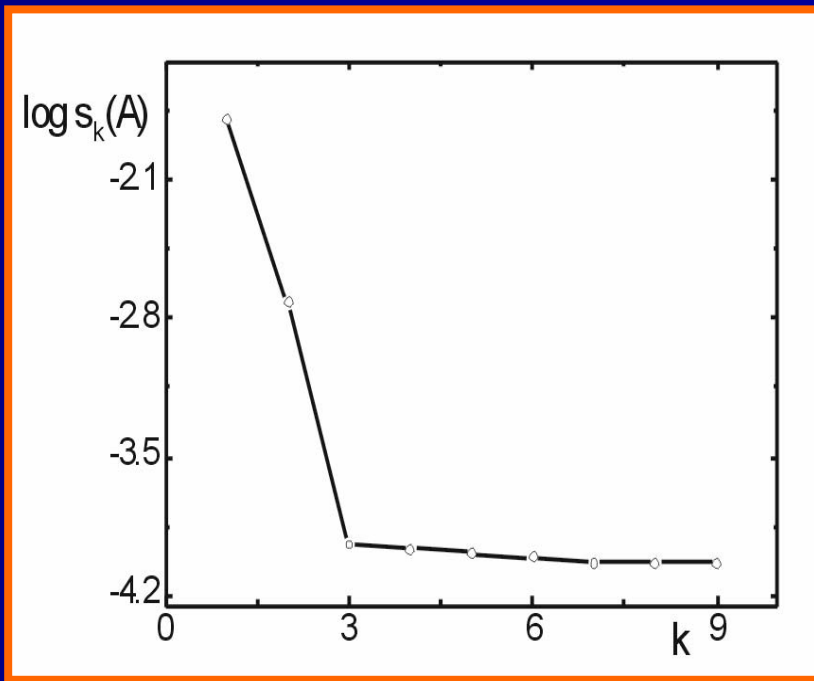
Oxymetazolin HCl



při 25°C

$pK_{a,1}^T = 10.59$ (9)

$pK_{a,2}^T = 12.03$ (3)

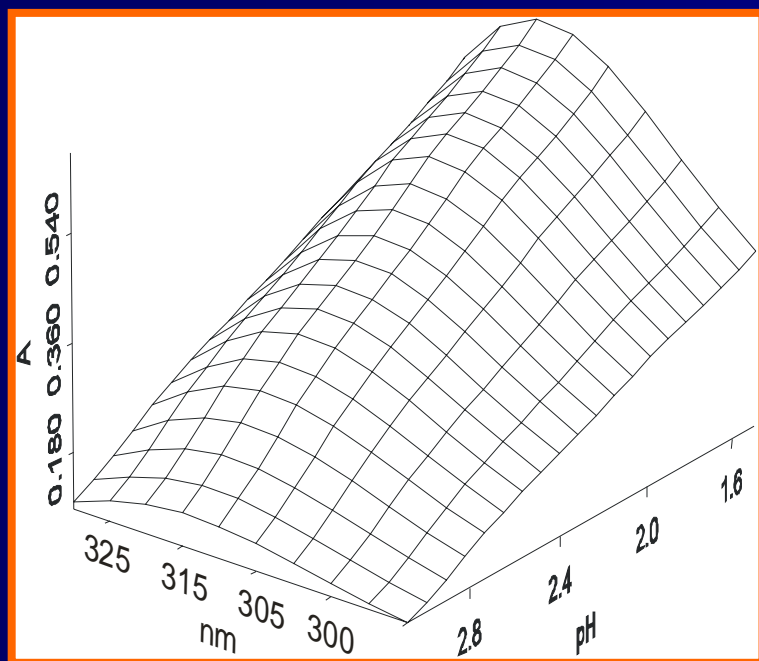
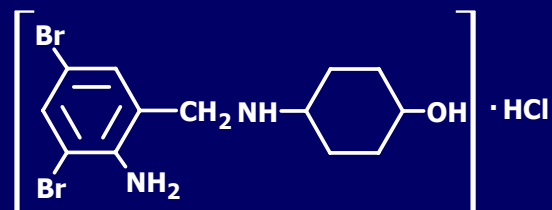


při 37°C

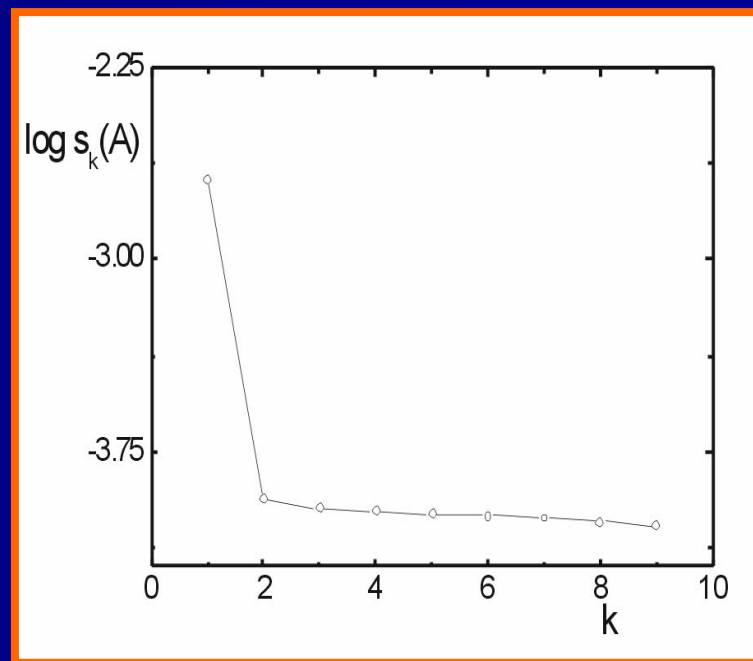
$pK_{a,1}^T = 10.77$ (5)

$pK_{a,2}^T = 11.76$ (9)

Ranitidin HCl



při 25°C
 $pK_a^T = 1.97 \pm 0.09$



při 37°C
 $pK_a^T = 1.88 \pm 0.04$

Léčivo		25°C					37°C				
		pK _{a,1} ^T	pK _{a,2} ^T	pK _{a,3} ^T	pK _{a,4} ^T	pK _{a,5} ^T	pK _{a,1} ^T	pK _{a,2} ^T	pK _{a,3} ^T	pK _{a,4} ^T	pK _{a,5} ^T
Ambroxol HCl		8.12 (6)	11.63 (7)	-----	-----	-----	8.23 (5)	11.90 (9)	-----	-----	-----
Mykofenolát sodný		8.32 (1)	-----	-----	-----	-----	8.14 (1)	-----	-----	-----	-----
Mykofenolát mofetilu		8.29 (1)	-----	-----	-----	-----	8.16 (1)	-----	-----	-----	-----
Silychristin		6.64 (18)	7.85 (31)	8.95 (34)	10.17 (92)	12.00 (90)	6.23 (29)	7.24 (26)	9.08 (18)	9.78 (8)	12.15 (34)
Silydianin		6.46 (17)	8.64 (25)	9.66 (91)	10.74 (20)	12.54 (36)	7.09 (17)	8.83 (14)	10.22 (11)	10.97 (73)	12.40 (59)
Silybinin		6.98 (5)	8.92 (14)	9.66 (9)	11.66 (3)	-----	6.86 (4)	8.66 (4)	9.68 (1)	11.44 (7)	-----
Oxymetazolin HCl		10.5 9 (9)	12.03 (3)	-----	-----	-----	10.77 (5)	11.76 (9)	-----	-----	-----
Ranitidin HCl		1.97 (9)	-----	-----	-----	-----	1.88 (4)	-----	-----	-----	-----