

Spektrofotometrické stanovení termodynamických disociačních konstant vybraných cytostatik

Sylva Bordovská a Milan Meloun

Katedra analytické chemie, Chemicko-technologická fakulta,
Univerzita Pardubice, náměstí Čs. legií 565, 532 10 Pardubice

Souhrn

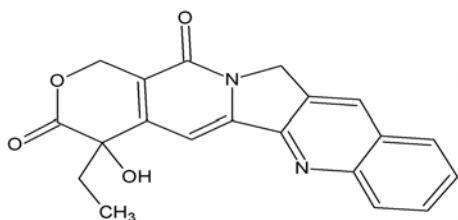
Nelineární regresní analýzou byly ze závislosti smíšených disociačních konstant na iontové síle vyčísleny termodynamické disociační konstanty při teplotě 25°C a 37°C pro camptothecin $pK_{a,1}^T = 2.90(7)$ a $3.02(8)$, $pK_{a,2}^T = 10.18(30)$ a $10.23(8)$, pro 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin, $pK_{a,1}^T = 3.11(2)$ a $2.46(6)$, $pK_{a,2}^T = 8.91(4)$ a $8.74(3)$, $pK_{a,3}^T = 9.70(3)$ a $9.47(8)$, pro 10-hydroxycamptothecin $pK_{a,1}^T = 2.93(4)$ a $2.84(5)$, $pK_{a,2}^T = 8.93(2)$ a $8.92(2)$, $pK_{a,3}^T = 9.45(10)$ a $9.98(4)$ a pro 7-ethylcamptothecin $pK_{a,1}^T = 3.10(4)$ a $3.30(16)$, $pK_{a,2}^T = 9.94(9)$ a $10.98(18)$. Smíšené disociační konstanty byly vyhodnoceny regresní analýzou spekter programy SQUAD(84) a SPECFIT/32.

Summary

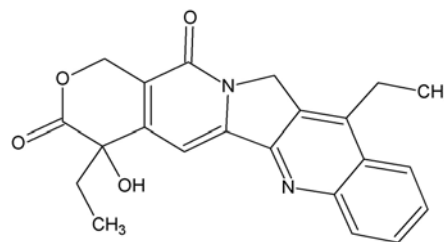
The thermodynamic dissociation constants pK_a^T were estimated by nonlinear regression of $\{pK_a, I\}$ data at 25°C and 37°C: for camptothecin $pK_{a,1}^T = 2.90(7)$ and $3.02(8)$, $pK_{a,2}^T = 10.18(30)$ and $10.23(8)$, for 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin, $pK_{a,1}^T = 3.11(2)$ and $2.46(6)$, $pK_{a,2}^T = 8.91(4)$ and $8.74(3)$, $pK_{a,3}^T = 9.70(3)$ and $9.47(8)$, for 10-hydroxycamptothecin $pK_{a,1}^T = 2.93(4)$ and $2.84(5)$, $pK_{a,2}^T = 8.93(2)$ and $8.92(2)$, $pK_{a,3}^T = 9.45(10)$ and $9.98(4)$ and for 7-ethylcamptothecin $pK_{a,1}^T = 3.10(4)$ and $3.30(16)$, $pK_{a,2}^T = 9.94(9)$ and $10.98(18)$. The mixed dissociation constants were determined with the use of two programs, SPECFIT32 and SQUAD(84).

Přehled léčiv:

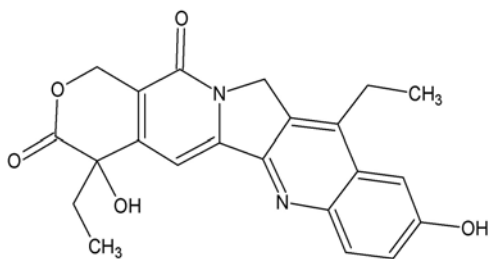
1) Camptothecin



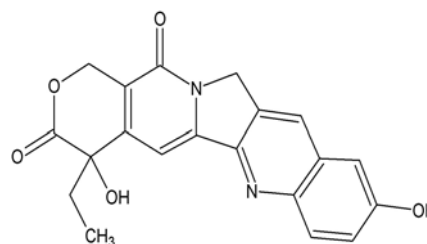
2) 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin



3) 10-hydroxycamptothecin



4) 7-ethylcamptothecin



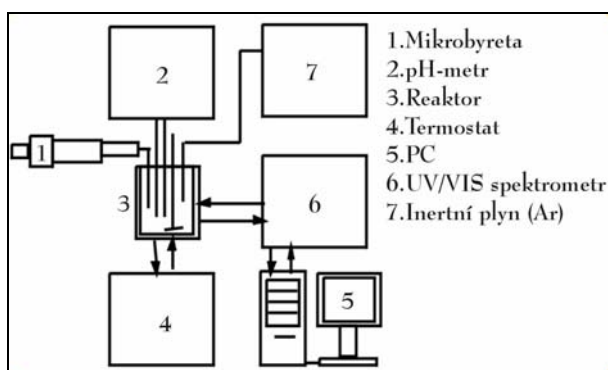
Experimentální část

Přístroje: UV/VIS spektrofotometr GBC Cintra 40, pH metr Radelkis OP-271, termostat, mikrobyrety.

Chemikálie: 1M HCl, 1M KOH, Standartní pH pufrý, pufrý.

Programy: SQUAD(84), SPECFIT/32, INDICES, ADSTAT 1.25, S-Plus, MS EXCEL 2002, Microcal Origin.

Schéma experimentu:



Analýza spektrofotometrických dat:

Existuje široká škála technik analýzy spektrofotometrických dat pro kvalitativní i kvantitativní účely. Jedná se hlavně o techniky faktorové analýzy (FA), metody hlavních komponent (PCA) a nelineární regrese absorbančních responzních ploch, tj. celých vějířů spekter. Všechny tyto techniky jsou numericky náročné a k jejich aplikaci je nutné využití výpočetní techniky. Mají-li výše uvedené metody přinášet přesné a správné výsledky, je nutná vysoká kvalita vstupních dat a také dobrá znalost fyzikálně-chemických vlastností systému.

1) Určení počtu světlo-absorbujících částic

Metoda hlavních komponent (PCA): K určení počtu světlo-absorbujících částic lze použít metodu hlavních komponent^{1,2,3}. Tato metoda je určena pro zjišťování počtu tzv. latentních proměnných, tj. proměn-

ných, které popisují všechnu variabilitu datové matice A o m řádcích (v našem případě jednotlivá spektra) a n sloupcích (v našem případě vlnové délky) nezpůsobenou experimentální chybou. Počet světlo-absorbujících částic je pak roven počtu statisticky významných latentních proměnných absorbanční matice.

2) Postup určení počtu latentních proměnných v PCA

2.1 Rozklad zdrojové matice:

Prvním krokem metody hlavních komponent je rozklad zdrojové (v našem případě absorbanční) matice A rozměru m řádků (spekter) a n sloupců (vlnových délek) na součin matic T a P^T a matici nepopsané variability E

$$A = TP^T + E \quad (1)$$

kde T je matice latentních proměnných (score matice) o rozměrech $m \times k$, k jsou sloupcové vektory označované jako hlavní komponenty, matice P je matice zátěží (loadings matice) o rozměrech $n \times k$, kde k jsou sloupcové vektory vyjadřující míru příspěvku dané latentní proměnné k variabilitě zdrojové matice. Výpočet matic T a P je založen na diagonalizaci kovarianční matice Z

$$Z = A^T A, \quad (2)$$

čímž dostáváme vlastní čísla g_a matice Z a matici vlastních vektorů Q , která je totožná s maticí P . Matice T se pak dopočítá podle vztahu

$$T^T = (P^T P)^{-1} P^T A^T. \quad (3)$$

2.2 Krátký cyklus:

Krátkým cyklem se v metodě hlavních komponent nazývá proces rekonstrukce zdrojové matice použitím prvních k nejvýznamnějších proměnných, popisujících experimentální chybou nezatíženou variabilitu dat. Rekonstrukce se provádí podle vztahu

$$A^{\text{pred}} = TP^T. \quad (4)$$

Takto vypočtená rekonstruovaná matice se pak porovnává s původní datovou maticí.

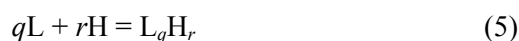
3) Metody pro zjištění počtu světlo-absorbujících částic

Tučně – spolehlivé metody⁴, kurzívou – spíše selhávající metody⁴

Kankareho metoda	Metoda χ^2 -kriteria	Reziduální variace	Malinowského F-test
Metoda reálné chyby	Metoda smod. vlastních čísel	Metoda log. vlastních čísel	<i>Bartlettův test</i> <i>izotropie</i>
Metoda extrahované chyby	<i>Metoda průměru vlastních čísel</i>	Metoda zabudované chyby	
Metoda průměrné chyby	<i>Metoda Exnerovy funkce</i>	Faktorová indikátorová funkce	

4) Chemický model analýzou spektrofotometrických dat

Chemický model je definován počtem komplexních částic, vznikajících v průběhu reakce základních komponent L a H



a jejich stechiometrickými koeficienty q , r a dále celkovou konstantou stability

$$\beta_{qr} = \frac{[L_qH_r]}{[L]^q [H]^r} \quad (6)$$

Počet komplexů a jejich stechiometrické koeficienty q , r tvoří hypotézu chemického modelu, kterou je potřeba zadat ve vstupních datech. Určení chemického modelu, tzn. počtu komplexních částic L_qH_r , jejich stechiometrických koeficientů q , r , protonačních konstant β_{qr} a dalších fyzikálně chemických parametrů, je založeno na nelineární regresi experimentálně naměřených dat. Hypotéza chemického modelu je nelineární regresi verifikována nebo v případě chybného proložení zamítnuta. Experimentální body sledují určitý funkční vztah $y = f(x, \beta_1, \dots, \beta_m)$. Pro zvolené hodnoty nezávisle proměnné x (vlnové délky λ , pH nebo přidavek titračního činidla) byly naměřeny hodnoty závisle proměnné y (absorbance), které v sobě skrývají jednak funkční vztah $f(x, \vec{\beta})$ a dále náhodnou chybu ε měřené veličiny y , $y = f(x, \vec{\beta}) + \varepsilon$. Pro získání konkrétní regrese funkce navrženého modelu je třeba konkretizovat odhady parametrů $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_m$. Metodou nejmenších čtverců je minimalizována účelová funkce

$$U = \sum_{i=1}^n w_i (y_{exp, i} - f(x, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_m))^2, \quad (7)$$

což znamená, že experimentálními body je prokládána vypočtená regrese křivka.

5) Regresní analýza A-pH spekter

Analýza spektrofotometrických dat za účelem určení počtu světlo-absorbujících částic v roztoku, protonačních konstant pK a jejich molárních absorpčních koeficientů $\epsilon_{qr,\lambda}$ je předmětem nelineární regresní analýzy spekter pomocí programu SQUAD(84). Absorbanční matice popisující k světlo-absorbujících částic v rovnovážné směsi je tvořena m roztoky pro n vlnových délek.

5.1 Hledané parametry:

Nejdůležitějšími parametry, jež jsou předmětem odhadu programem SQUAD(84)⁵ a SPECFIT/32⁶, je protonační konstanta pK a molární absorpční koeficient $\epsilon_{qr,\lambda}$ měřené vlnové délky. Oba tyto parametry jsou určovány pro všechny zúčastněné světlo-absorbující částice. Parametry pK a $\epsilon_{qr,\lambda}$ jsou odhadovány na základě nelineární regresní analýzy absorbanční matice řádu $m \times n$ obdržené z experimentu.

5.2 Věrohodnost parametrů:

Věrohodnost určených parametrů lze posoudit na základě dosažené těsnosti proložení vypočtené regresní spektrální křivky experimentálními body statistickou analýzou reziduí⁷. U nejtěsnějších proložení vykazují rezidua Gaussovské normální rozložení a jejich velikost není větší než $s_{inst}(A)$. Analýzu reziduí popisují následující statistiky:

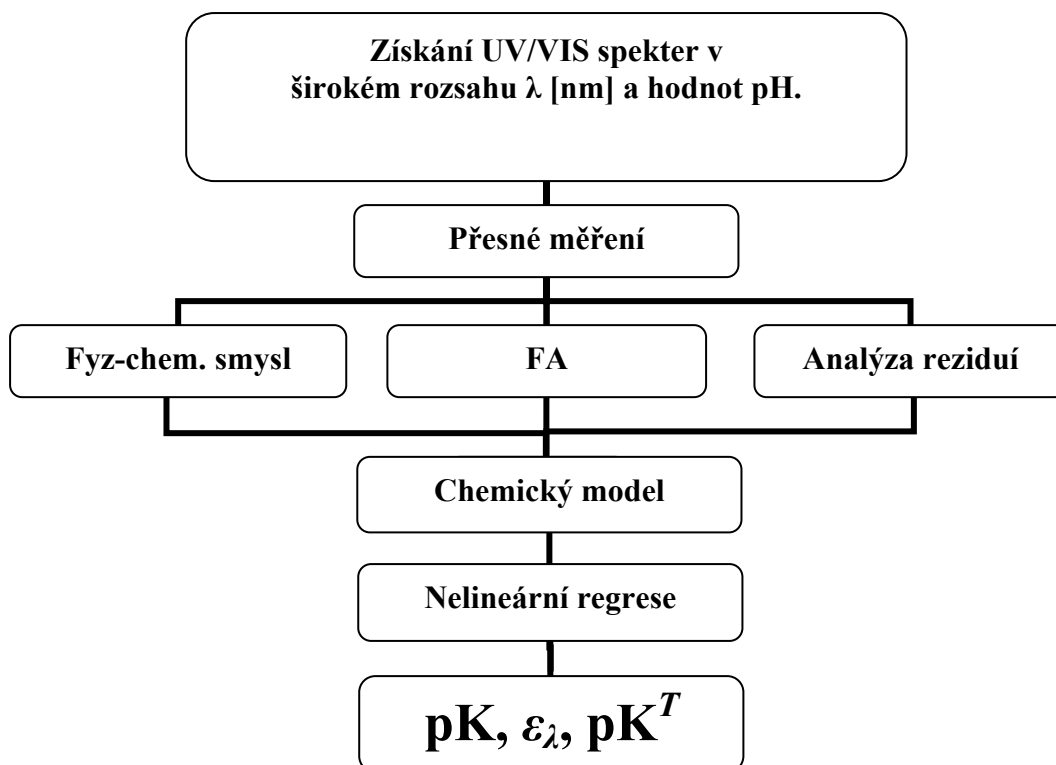
- a) Aritmetický průměr reziduí musí být roven nule, $\bar{e} \approx 0$.
- b) Průměrná reziduum musí být menší nebo rovno než $s_{inst}(A)$.
- c) Koeficient šikmosti rozdělení reziduí musí být roven 0.
- d) Koeficient špičatosti rozdělení reziduí musí být roven 3.
- e) Hamiltonův R -faktor⁷ menší než 1%.

I když rezidua nevykazují vždy Gaussovo rozložení, je jejich analýza užitečnou pomůckou k objektivnímu posouzení těsnosti proložení a výběru nejlepší testované hypotézy rovnovážného modelu.

Tabulka 1. Hledání nejlepšího modelu protonačních rovnováh L_qH_r pro camptothecin při $t = 25^\circ\text{C}$ (v závorce směrodatná odchylka posledních platných číslic).

q, r	$\log \beta_{qr}$	$\log \beta_{qr}$	$\log \beta_{qr}$	$\log \beta_{qr}$	$\log \beta_{qr}$
1, 1	10.767(41)	6.771(146)	5.886(14)	-	-
1, 2	13.609(44)	-	-	9.953(34)	-
2, 1	-	-	15.115(69)	15.096(65)	8.500(3804)
2, 2	-	14.500(2745)	-	-	11.500(3642)
$s_k(A)$ [mAU], k	0.52, 3	0.52, 3	0.52, 3	0.52, 3	0.52, 3
$s(A)$ [mAU]	0.83	2.50	0.83	0.79	1.60
R -faktor [%]	0.17	0.52	0.17	0.16	0.33
\bar{e}	0.60	1.43	0.59	0.56	1.11
$g_1(e)$	0.29	1.28	0.14	0.26	-0.17
$g_2(e)$	2.80	9.70	2.80	3.13	2.58
Model je	přijat	zamítnut	přijat	přijat	zamítnut

Funkční postup hledání pK , ε_λ a pK^T lze shrnout do následujícího schématu:



6) Debye-Hückelův vztah

Protonační rovnováhu lze popsat koncentrační, smíšenou nebo termodynamickou rovnovážnou konstantou. Smíšená rovnovážná konstanta je pro $q = 1$ charakterizována následujícím vztahem

$$\beta_{1r} = \frac{[\text{LH}_r]}{[\text{L}]a_{\text{H}^+}^r} = K_{11} \cdot K_{12} \dots K_{1r}. \quad (8)$$

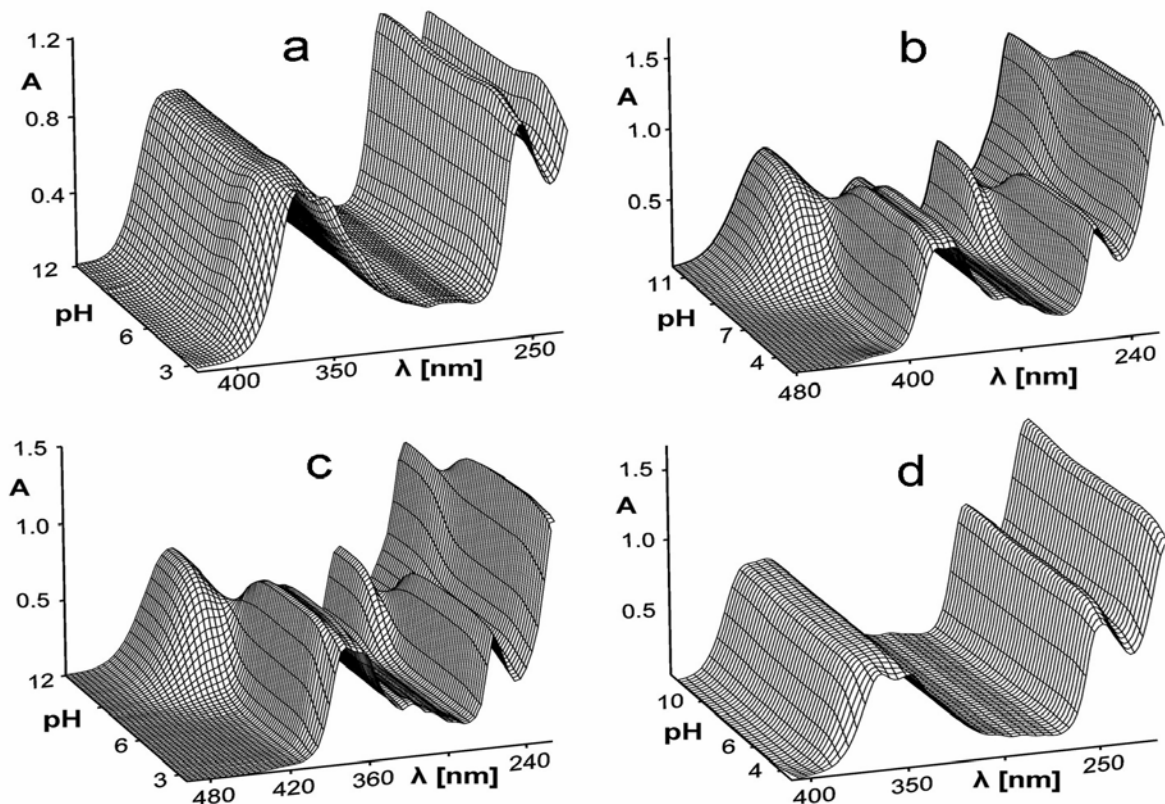
Vztah mezi protonační smíšenou a koncentrační konstantou pomocí následující rovnice

$$\log K_{1r,\text{smiš}} = \log K_{1r,c} + \log \gamma_{\text{H}^+}. \quad (9)$$

Pro Debye-Hückelovu rozšířenou rovnici je možné z definice rovnovážné konstanty a na základě definice aktivního koeficientu vyjádřit vztah závislosti smíšené protonační konstanty na iontové síle, kde pro nízké iontové síly $I \leq 0.1$ lze vztah zjednodušit na tzv. zkrácený Debye-Hückelův zákon

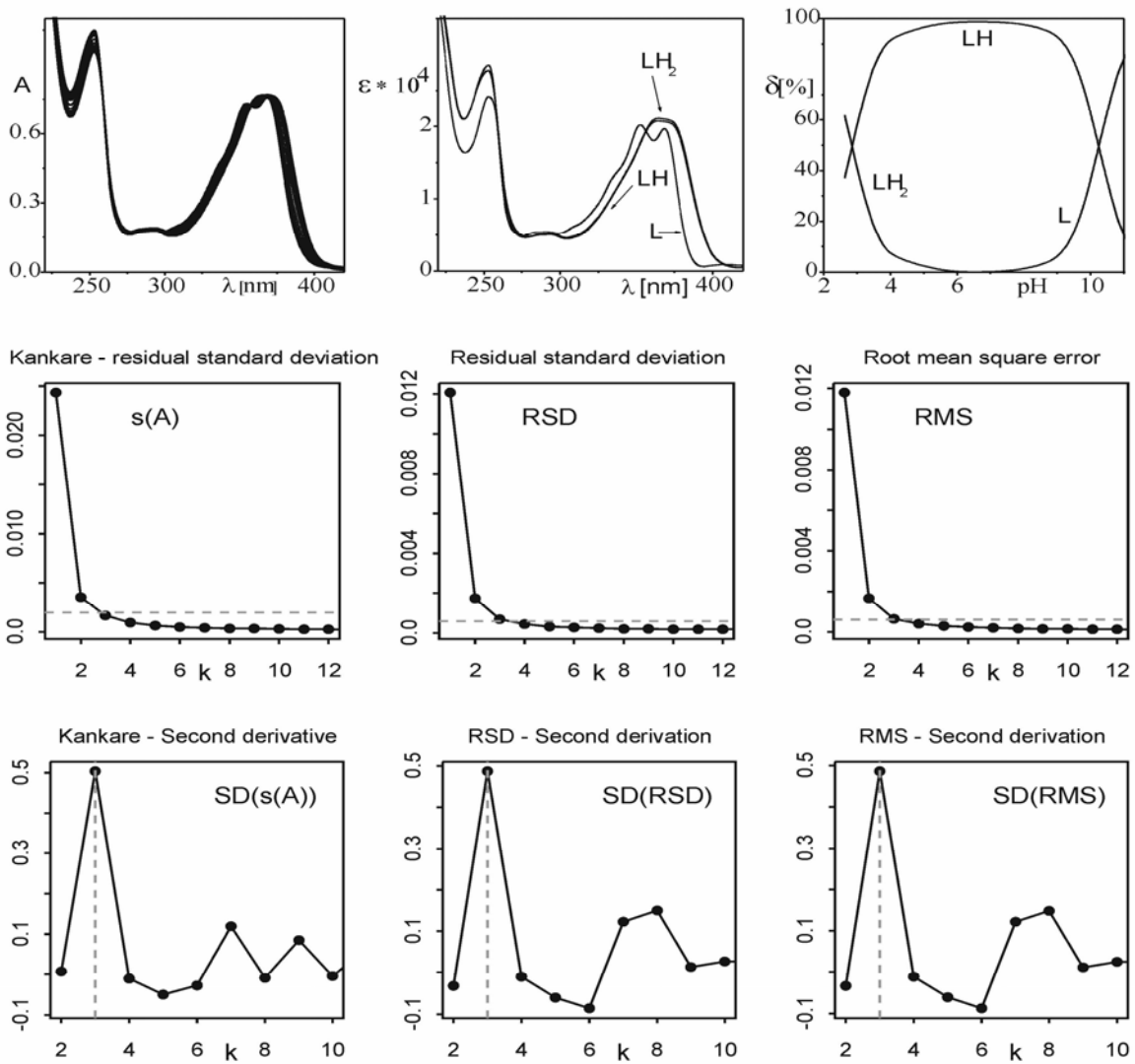
$$\log K_{1r,\text{smiš}} = \log K_{1r}^T - \frac{A|z_+z_-|\sqrt{I}}{1 + B\tilde{a}\sqrt{I}}. \quad (10)$$

Diskuse



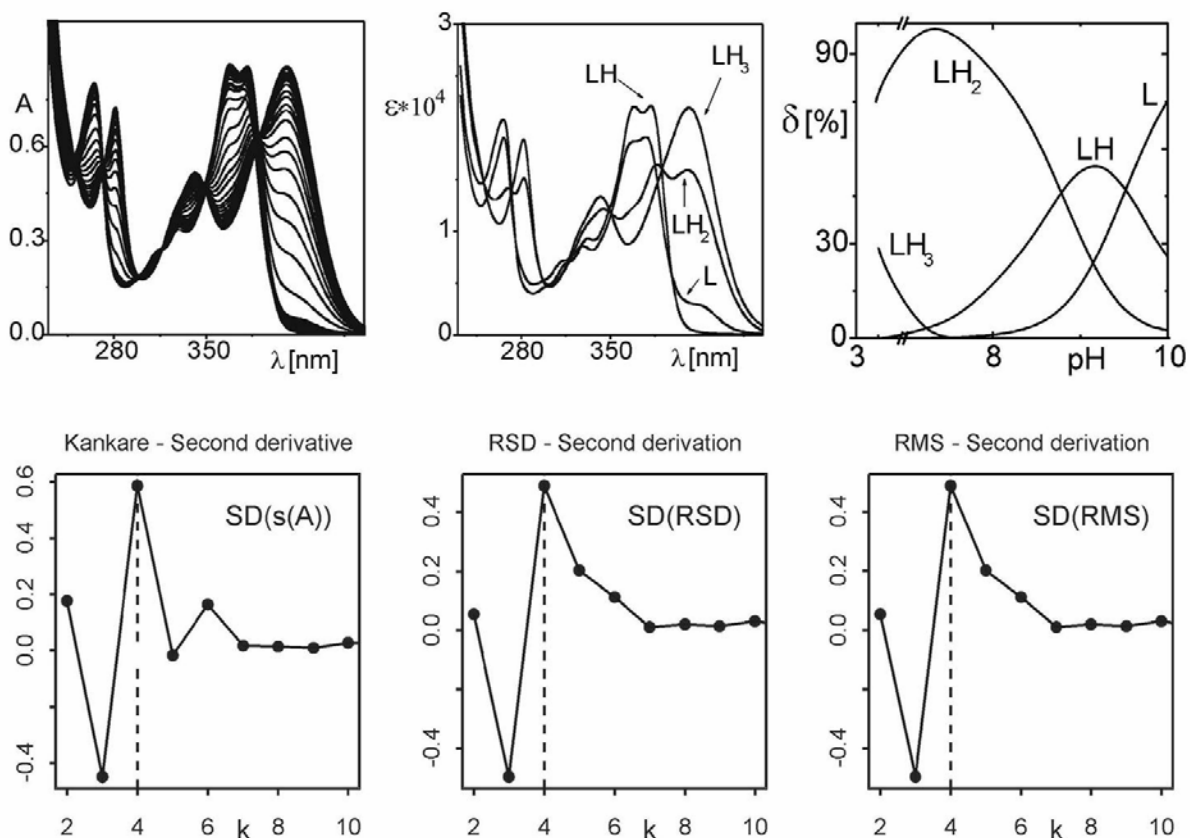
Obr. 1 3D- graf spekter a) camptothecin, b) 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin, c) 10-hydroxycamptothecin a d) 7-ethylcamptothecin

Camptothecin



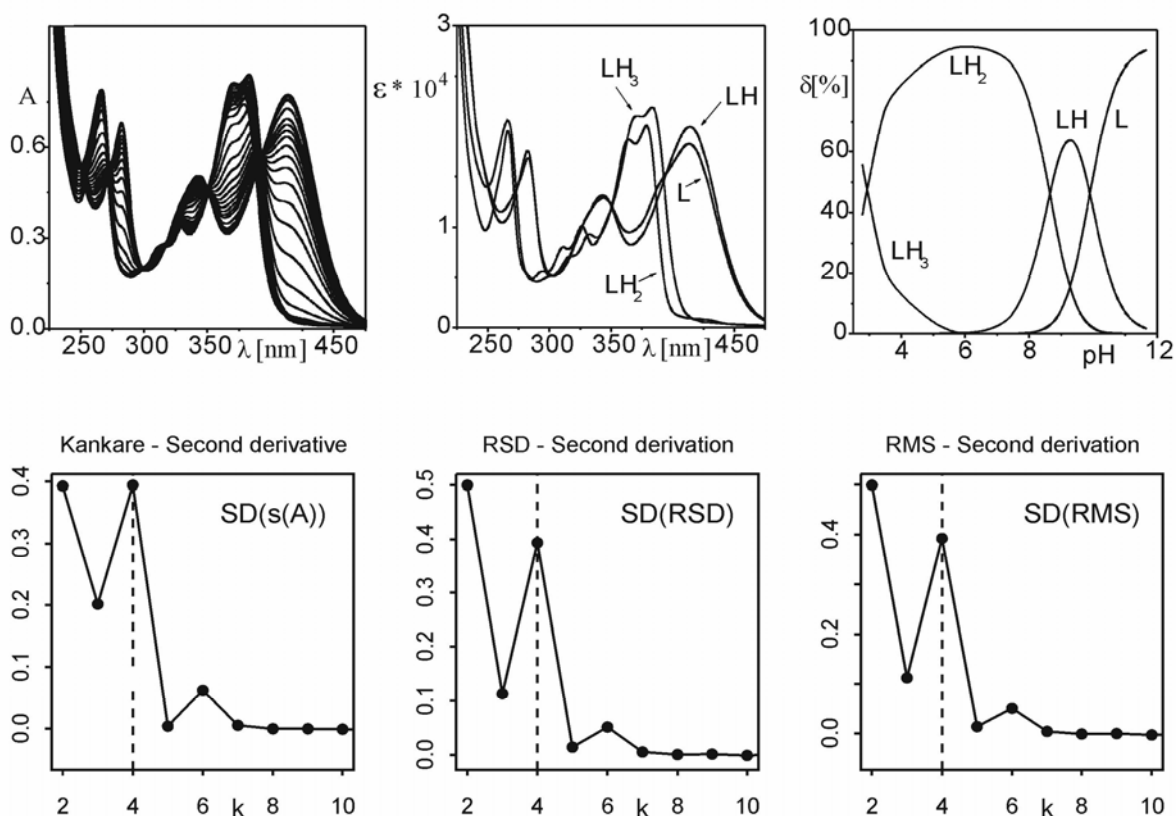
Obr. 2 Vyhodnocení protonačních rovnováh camptothecinu regresní analýzou spekter při 25°C. První řádek: 2D-graf A-pH spekter (vlevo), graf molárních absorpčních koeficientů pro částice L, LH a LH₂ (uprostřed), distribuční diagram relativního zastoupení různě proponovaných částic (vpravo). Druhý řádek: Kankareho reziduální směrodatná odchylka $s_k(A)$, Reálná chyba RSD , Extrahovaná chyba RMS/XE . Třetí řádek: Aplikace derivačních metod faktorové analýzy: druhá derivace $SD(s_k(A))$ Kankareho reziduální směrodatné odchylky $s_k(k)$, $SD(RSD)$, $RSD(RMS)$. Náboje částic byly pro jednoduchost vynechány.

7-ethyl-10-hydroxycamptothecin



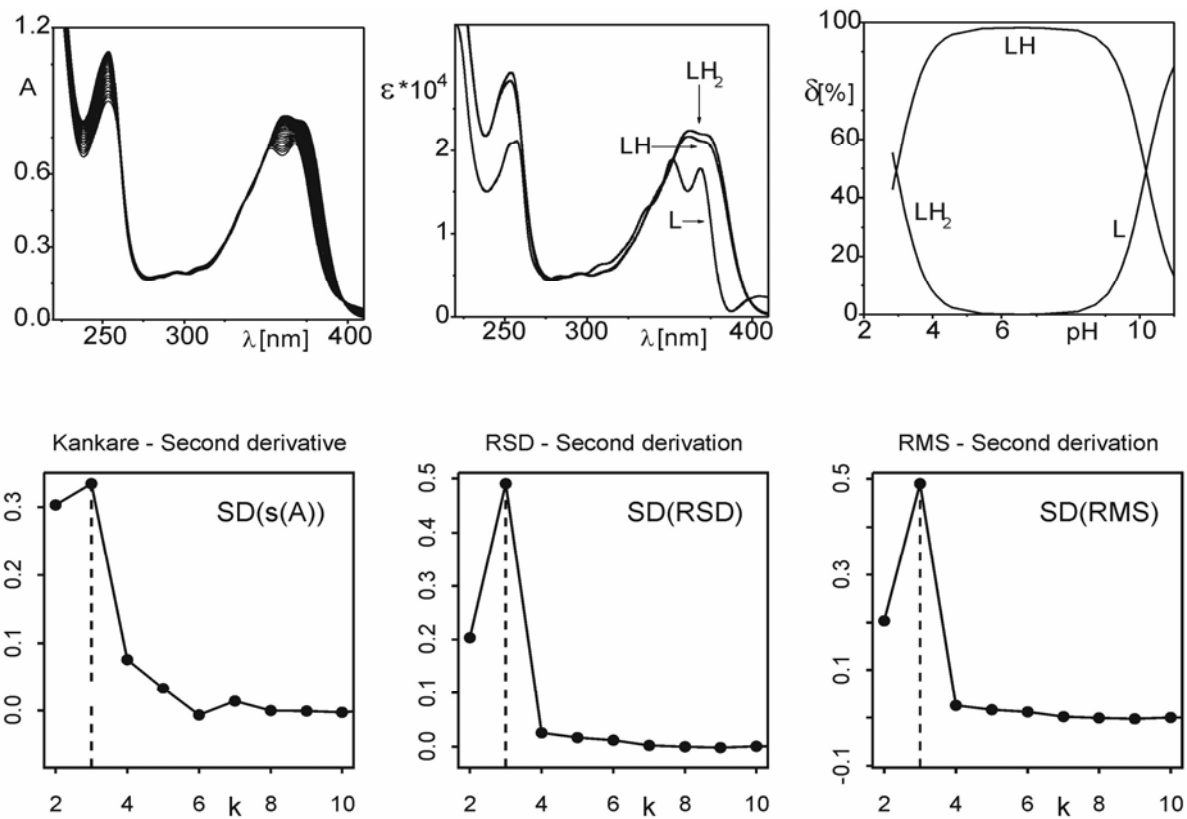
Obr. 3 Vyhodnocení protonačních rovnováh 7-ethyl-10-hydroxycamptothecinu regresní analýzou spekter při 25°C. První řádek: 2D-graf A-pH spekter (vlevo), graf molárních absorpčních koeficientů pro částice L, LH, LH₂ a LH₃ (uprostřed), distribuční diagram relativního zastoupení různě proponovaných částic (vpravo). Druhý řádek: Aplikace derivačních metod faktorové analýzy: druhá derivace $SD(s_k(A))$ Kankareho reziduální směrodatné odchylky $s_k(k)$, $SD(RSD)$, $SD(RMS)$.

10-hydroxycamptothecin



Obr. 4 Vyhodnocení protonačních rovnováh 10-hydroxycamptothecinu regresní analýzou spekter při 25°C. První řádek: 2D-graf A-pH spekter (vlevo), graf molárních absorpčních koeficientů pro částice L, LH, LH₂ a LH₃ (uprostřed), distribuční diagram relativního zastoupení různě proponovaných částic (vpravo). Druhý řádek: Aplikace derivačních metod faktorové analýzy: druhá derivace $SD(s_k(A))$ Kankareho reziduální směrodatné odchylky $s_k(k)$, $SD(RSD)$, $SD(RMS)$.

7-ethylcamptothecin



Obr. 5 Vyhodnocení protonačních rovnováh 7-ethylcamptothecinu regresní analýzou spekter při 25°C. První řádek: 2D-graf A-pH spekter (vlevo), graf molárních absorpčních koeficientů pro částice L, LH a LH₂ (uprostřed), distribuční diagram relativního zastoupení různě proponovaných částic (vpravo). Druhý řádek: Aplikace derivačních metod faktorové analýzy: druhá derivace $SD(s_k(A))$ Kankareho reziduální směrodatné odchylky $s_k(k)$, $SD(RSD)$, $SD(RMS)$.

Závěr

Pro 4 vybraná léčiva byla změřena spektra, která byla podrobena nelineární regresní analýze. Byly stanoveny disociační konstanty pK pro vybrané iontové síly. Disociační konstanty byly analyzovány nelineární regresí Debye-Hückelova vztahu a byly získány termodynamické disociační konstanty pK^T .

Tabulka 2. Termodynamické disociační konstanty pro camptothecin, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin, 10-hydroxycamptothecin a 7-ethylcamptothecin při teplotě 25 °C a 37 °C (v závorce směrodatná odchylka posledních platných číslic).

		SPECFIT		SQUAD	
		25°C	37°C	25°C	37°C
Camptothecin	$pK_{a,1}^T$	2.90(7)	3.02(8)	2.83(9)	2.92(8)
	$pK_{a,2}^T$	10.18(30)	10.23(8)	10.11(36)	10.43(3)
7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin	$pK_{a,1}^T$	3.11(2)	2.46(6)	3.04(5)	2.30(6)
	$pK_{a,2}^T$	8.91(4)	8.74(3)	8.90(3)	8.84(3)
	$pK_{a,3}^T$	9.70(3)	9.47(8)	9.71(5)	9.53(10)
10-Hydroxycamptothecin	$pK_{a,1}^T$	2.93(4)	2.84(5)	2.92(4)	2.77(5)
	$pK_{a,2}^T$	8.93(2)	8.92(2)	8.93(3)	8.90(2)
	$pK_{a,3}^T$	9.45(10)	9.98(4)	9.46(9)	10.02(7)
7-Ethylcamptothecin	$pK_{a,1}^T$	3.10(4)	3.30(16)	2.94(3)	3.26(22)
	$pK_{a,2}^T$	9.94(9)	10.98(18)	9.73(9)	10.96(18)

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury IGA číslo NR9055-4/2006 a grantu Ministerstva školství číslo MSM253100002.

Literatura

1. Čepan M., Pelikán P., Liška M.: *Chem. Listy* 1991, 85, 1057.
2. Pytela O.: *Chemometrie pro organické chemiky*, VŠCHT Pardubice 1993.
3. Malinowski E. R.: *Anal. Chem.* 1977, 49, 606.
4. Čapek J.: *Diplomová práce*, Univerzita Pardubice 1999.
5. Meloun M., Havel J.: *Computation of Solution Equilibria Spectrophotometry*, UJEP Brno 1985.

6. SPECFIT/32: Spectrum Software Associates, 197M Boston Post Road West, Marlborough, MA, 01752 U.S.A. (2004), (<http://www.bio-logic.info/rapid-kinetics/specfit.html>).
7. Meloun M., Militký J., *Statistické zpracování experimentálních dat v chemometrii, biometrii, ekonometrii a v dalších oborech přírodních, technických a společenských věd*, East Publishing, a.s., Praha, 1998, s. 589-611 s. 680.