Faktorová analýza a nelineární regrese absorbanční responzní plochy v protonačních rovnováhách vybraných léčiv

Ing. Sylva Bordovská,
Katedra analytické chemie, Univerzita Pardubice, 532 10 Pardubice,
sylva.bordovska@seznam.cz
a
Prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.,
Katedra analytické chemie, Univerzita Pardubice, 532 10 Pardubice,
milan.meloun@upce.cz

Abstract

There are many techniques for spectrophotometric data analysis, both for qualitative and quantitative techniques namely factor analysis (FA) and principal component analysis (PCA). All these techniques are of computational nature. The high data quality and good knowledge of physiochemical properties of system solved should be available for accurate and precise estimates.

Souhrn

Existuje široká škála technik pro analýzu spektrofotometrických dat jak pro kvalitativní, tak i pro kvantitativní účely. Jedná se především o techniky faktorové analýzy (FA) a metody hlavních komponent (PCA). Všechny techniky jsou výpočtově náročné. Mají-li výše uvedené metody přinášet přesné a správné výsledky, je nutná vysoká kvalita dat vstupního experimentu a dobrá znalost fyzikálně-chemických vlastností systému.

1. Úvod

Disociační konstanty pK_a léčiva jsou pro farmaceuty a lékaře důležitou veličinou při aplikaci medikamentu. Léčiva jsou většinou slabé kyseliny, či baze, které ve vodném prostředí přechází do rovnovážného stavu svých ionizovaných a neionizovaných forem. Slabé kyseliny lépe přestupují do krve v kyselém prostředí žaludku oproti slabým zásadám v zásaditém prostředí střev. Pro firmu IVAX a.s. jsme stanovovali termodynamické disociační konstanty pro převážně nově zaváděná léčiva při teplotách 25° C a 37° C.

Camptothecin (CPT) (Chemické označení: 4-Ethyl-4-hydroxy-IH-Pyrano(3'4'6'7) indolizino (1,2,-b) quinoline 3,14 (4H, 12H)-dione, CAS 7689-03-4, sumární vzorec $C_{20}H_{16}N_2O_4$, molekulová hmotnost 348.36 g/mol) je světle žlutý prášek s bodem tání 257-260° C. Látka je rozpustná v DMSO, prakticky nerozpustá ve vodě.

7-ethyl-10-hydroxycamptothecine (Chemické označení: 4,11-diethyl-4,9-dihydroxy-1H-Pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-3,14(4H,12H)-dione, CAS 86639-52-3,

sumární vzorec $C_{22}H_{20}N_2O_5$, molekulová hmotnost 392.40 g/mol) je světle žlutý krystalický prášek s bodem tání 230-237° C.

10-hydroxycamptothecine (CAS 19685-09-7, sumární vzorec $C_{20}H_{16}N_2O_5$, molekulová hmotnost 364.4 g/mol) je žlutý prášek s bodem tání 268-270° C. 10-hydroxycamptothecin je téměř nerozpustný ve vodě.

7-ethylcamptothecine (CAS 78287-27-1, sumární vzorec $C_{22}H_{20}N_2O_4$, molekulová hmotnost 376.44 g/mol) je jeden z prvních polysyntetických alkyl-derivátů CPT.
Camptothecin a jeho tři deriváty patří do skupiny cytostatik a v dnešní době se používají k léčbě nádorových onemocnění.

Losartan (Chemické označení 2-Butyl-4-chloro-1-[[2'-(1*H*-tetrazol-5-yl)[1,1'-biphen-yl]-4yl]methyl]-1*H*imidazole-5-methanol, CAS 114798-26-4, sumární vzorec $C_{22}H_{23}N_6OCl$, molekulová hmotnost 422.911 g/mol) je bílá krystalická látka rozpustná ve vodě, methanolu a ethanolu. Losartan patří mezi antihypertensiva, používá se k léčbě chronického srdečního selhání.

Silybin (Chemické označení: 3,5,7-trihydroxy-2-[3-(4-hydroxy-3-methoxyphenil)-2-hydroxy-methyl-1,4-benzodioxan-6-il]-chronan-4-one, CAS 22888-70-6, sumární vzorec $C_{25}H_{22}O_{10}$, molekulová hmotnost 482.44 g/mol) je přírodní bioflavonid, obsažený v rostlině ostřepec mariánský – Carduus Marianu[1]. Silybin je bílý prášek s bodem tání 167°C. Je rozpustný v acetonu, methanolu, ethanolu, a poměrně málo rozpustný ve vodě[2]. Silybin patří mezi hepatoprotektiva[3]. Využívá se při léčbě akutní virové hepatitidy, u chronické aktivní hepatitidy a jaterní cirhózy.

2. Experimentální část:

2.1 Chemikálie a rozpouštědla

Čistota u většiny léčiv byla vyšetřena zadavatelem úlohy firmou IVAX Pharmaceuticals se sídlem v Opavě a byla garantována certifikátem. U ostatních léčiv byla čistota garantována výrobcem.

Tabulka 2.1 *Přehled léčiv*

Léčivo	Metoda stanovení	Čistota [%]	Výrobce
Camptothecin	HPLC	92.4	Ivax Pharmaceuticals
7-ethyl-10-hydroxycamptothecin	HPLC	98.5	Ivax Pharmaceuticals
10-hydroxycamptothecin	HPLC	98.2	Ivax Pharmaceuticals
7-ethylcamptothecine	HPLC	98.2	Ivax Pharmaceuticals
Losartan	HPLC	99.7	SMS Pharmaceuticals
Silybin	HPLC	97.5	Ivax Pharmaceuticals

Kyselina chlorovodíková (1 M) *(p.a. Lachema Brno)*, *hydroxid draselný* (1 M) (Aldrich Chemical Company, USA), *oxid rtuťnatý (p.a. Lachema Brno)* a *jodid draselný (p.a. Lachema Brno), chlorid draselný (p.a. Lachema Brno), redestilovaná voda.* Použité komerční pufry *(Lachema Brno)*: nasycený roztok *hydrogenvínanu draselného*, roztok *hydrogenftalátu draselného*, roztok $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$, roztok *boraxu* + *NaOH*, roztok $Ca(OH)_2$.

2.2 Přístroje a experimentální uspořádání

K pH-spektrofotometrickým titracím byla použita skleněná elektroda OP-0718-P *(Radelkis, Budapest)* a referenční kalomelová elektroda OP-8303 *(Radelkis Budapest)*, zapojená do digitálního pH-metru OP-271 (*Radelkis, Budapest)* s udávanými parametry: přesnost ± 0.1 mV, resp. ± 0.002 pH. Pomocí komerčních pufrů byla nastavena nernstovská směrnice. Z důvodu možné difúze studovaného léčiva do referentní elektrody, byl roztok KCl čas od času vyměněn komerčním roztokem. Spektrofotometrická měření byla prováděna na spektrofotometru GBC Cintra 40.

Popis přístroje:

Zdroje záření: 50W wolfram-halogenová lampa pro viditelnou oblast 30W deuteriová lampa pro ultrafialovou oblast

Rozsah: 200 – 800 nm

Šířka štěrbiny: min 0.5 nm

Rychlost měření: 5 – 7000 nm.min-1

Monochromátor: Czerny-Turner

Detektor: fotonásobič

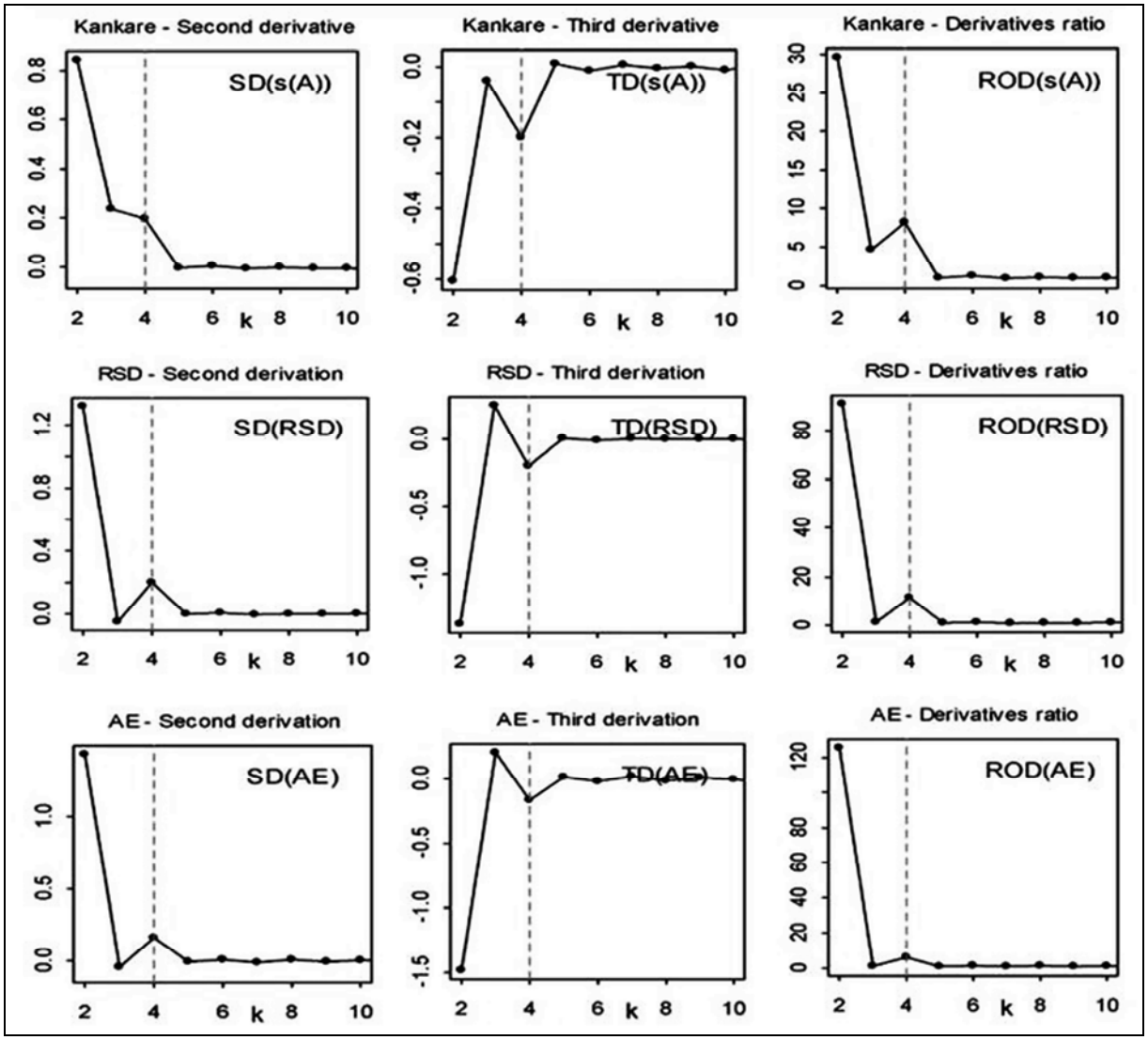
2.3 Použitý software

Regresní maticová analýza byla provedena programy SQUAD(84) [4] a SPECFIT/32 [5]. Pro tvorbu grafů byly použity programy ORIGIN 7.5 [6] a S-Plus [7]. Statistické výpočty byly

provedeny v programech ADSTAT a QC-Expert [8]. Algoritmus INDECES [9] byl naprogramován v software S-Plus [7].

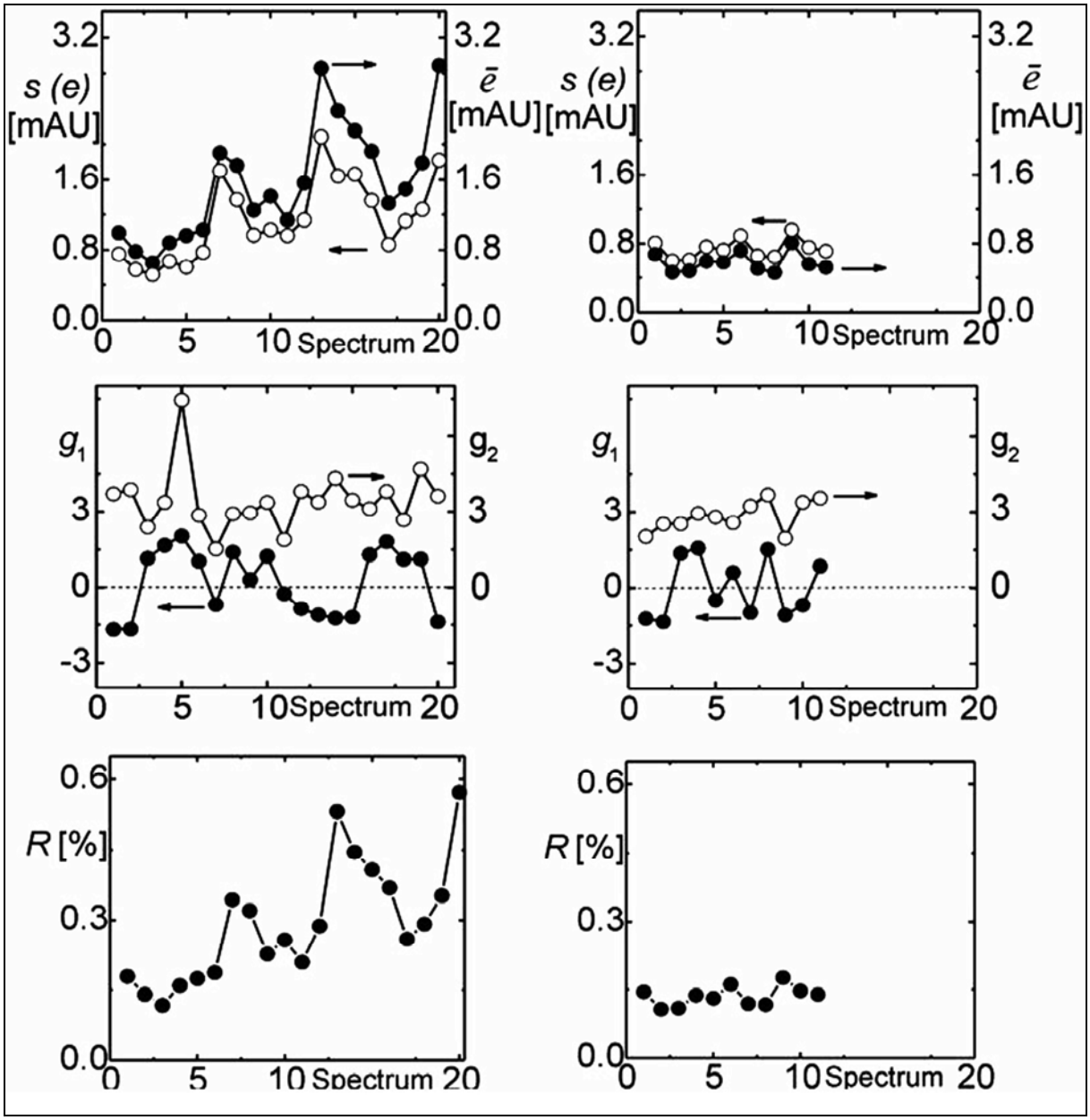
3. Výsledky a diskuze

Analýzou Cattelova indexového grafu vlastních čísel absorbanční zdrojové matice se stanoví počet světlo-absorbujících částic směsi. Nalezený počet 4 byl ověřen 9 diagnostikami (obr.1).



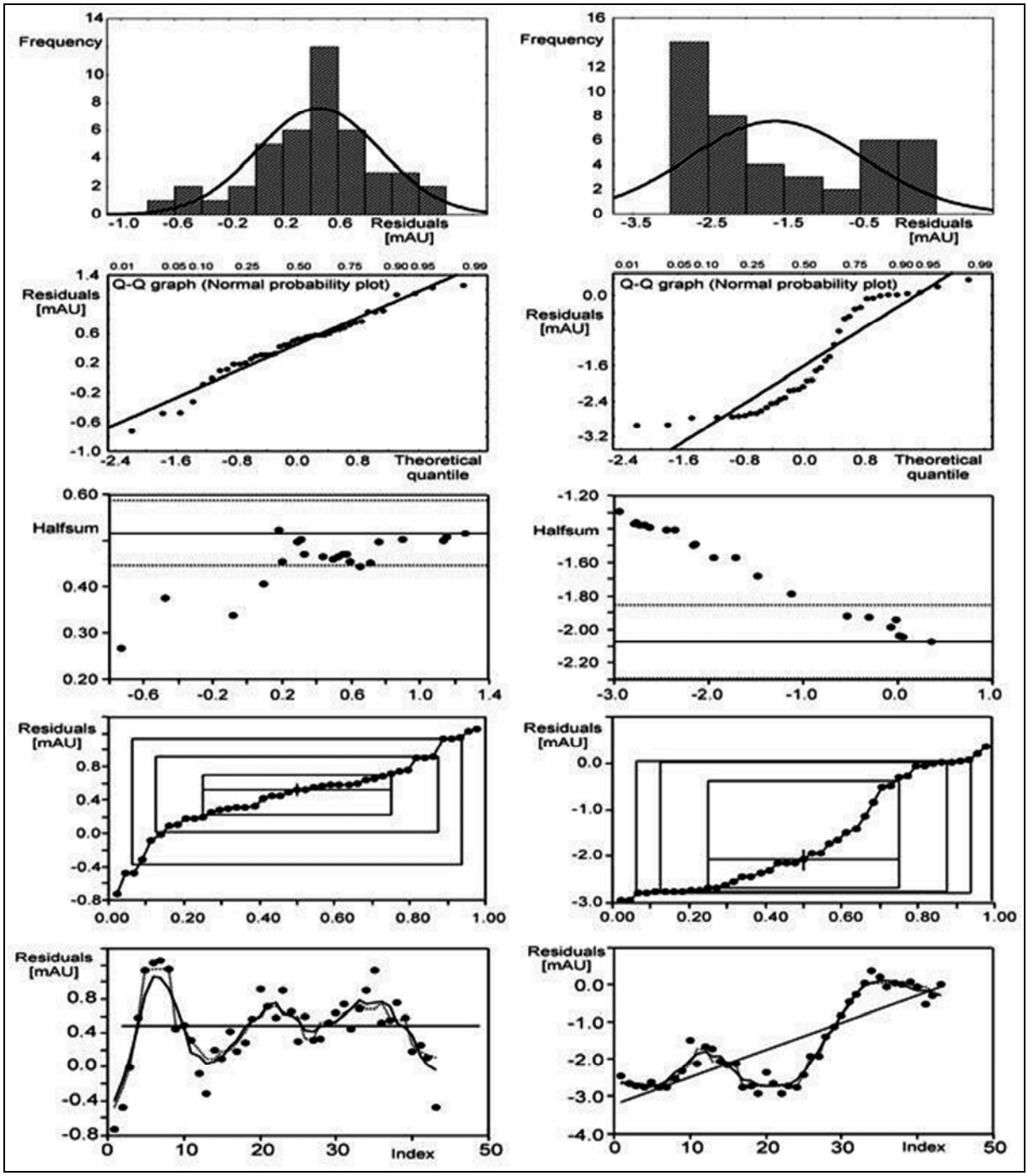
Obr. 1 Aplikace derivačních metod faktorové analýzy na spektrální data. První řádek: Druhá derivace $SD(s_k(A))$ Kankareho reziduální směrodatné odchylky $s_k(k)$; Třetí derivace $TD(s_k(A))$ Kankareho reziduální směrodatné odchylky $s_k(k)$; Poměr derivací $ROD(s_k(A))$ Kankareho reziduální směrodatné odchylky $s_k(k)$. Druhý řádek: Druhá derivace *SD(RSD)*; Třetí derivace *TD(RSD)*; Poměr derivací *ROD(RSD)*. Třetí řádek: Druhá derivace *SD(AE)*; Třetí derivace *TD(AE)*; Poměr derivací *ROD(AE)*.

Ve absorbanční matici 20 spekter je třeba odhalit fatální spektra, která nekorespondují s navrženým regresním chemickým modelem. S využitím statistické analýzy reziduí byla odhalena a odstraněna vybočující spektra a výsledná data přepočítána. Nalezené odhady navrženého modelu byly proto daleko věrohodnější než v datech s odlehlými hodnotami.



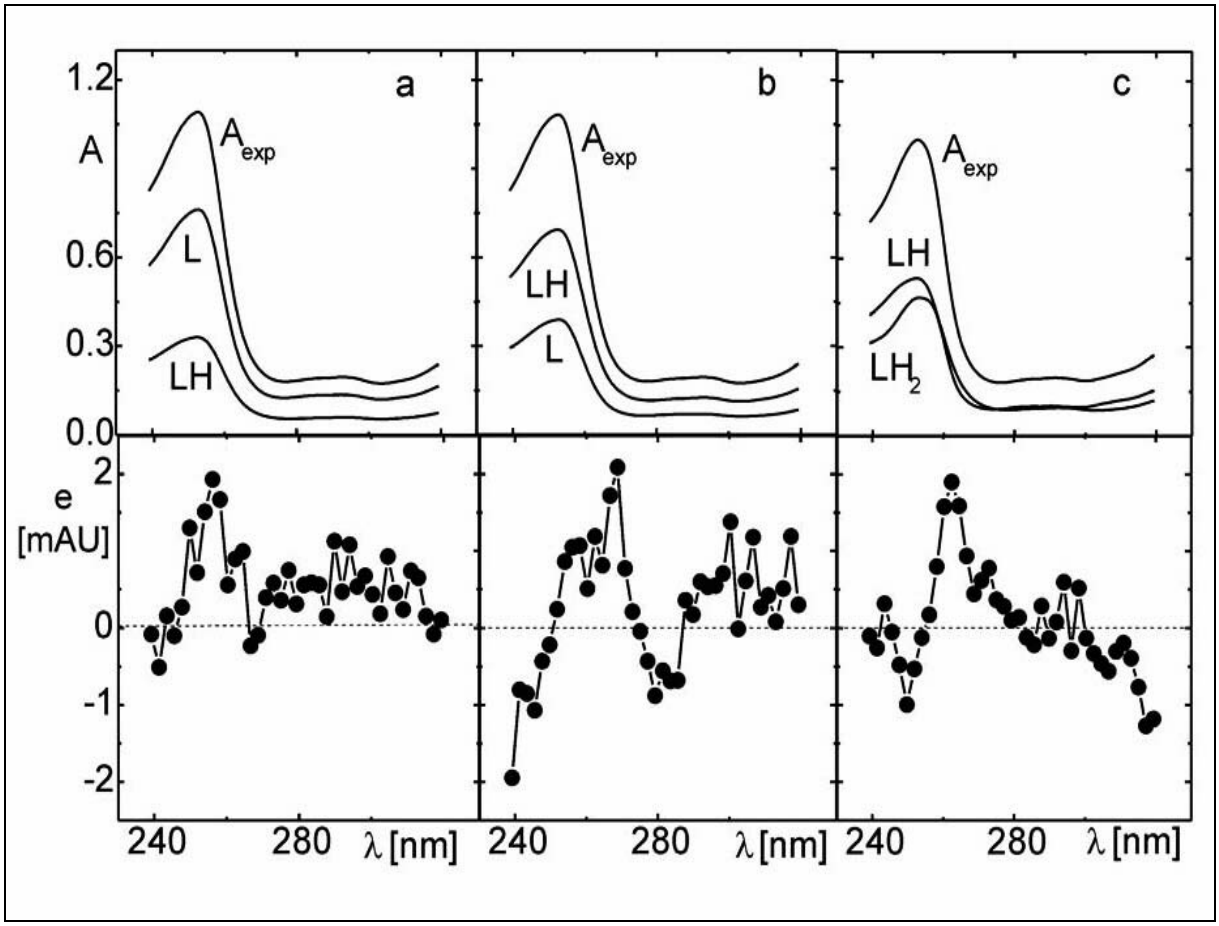
Obr.2 Odhalení a odstranění odlehlých spekter camptothecinu při 25º C. Levý sloupec před a pravý po odstranění outlierů. 1. řádek: Směrodatná odchylka reziduí s(e) vs.číslo spektra, 2. řádek: Šikmost proložení vs. číslo spektra, 3. řádek: Hamiltonův *R* faktor vs. číslo spektra, (SQUAD, ORIGIN).

Technika odhalení fatálních spekter v absorbanční matici je postavena na uvedených pěti statistických diagnostikách ve statistické analýze reziduí testu těsnosti proložení. Vedle míry rozptýlení reziduí jde také o analýzu rozdělení a odhalení trendu v reziduích.



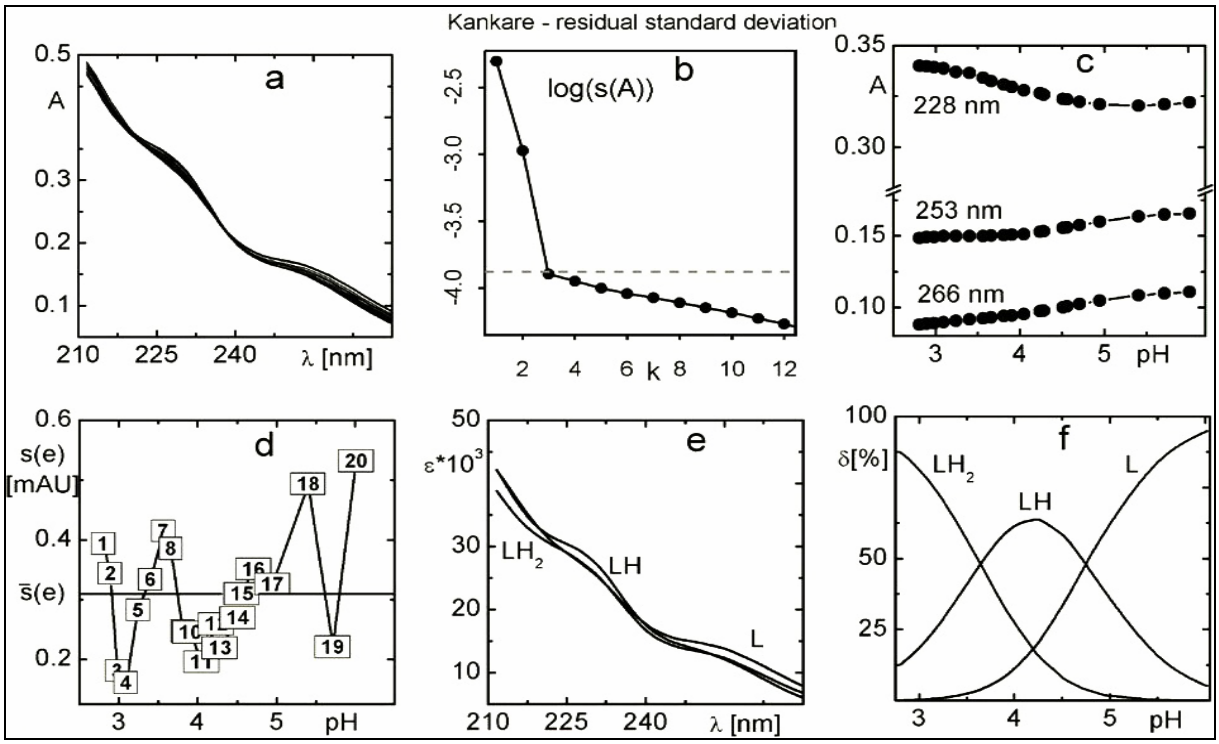
Obr. 3 Odhalení a odstranění odlehlých spekter pomocí exploratorní analýzy. Levý sloupec: Symetrické (Gaussovo) rozdělení, Pravý sloupec: Nesymetrické rozdělení. 1. řádek: Histogram a jádrový odhad hustoty pravděpodobnosti, 2. řádek: Kvantilově-kvantilový graf (Q-Q graf), 3. řádek Graf polosum, 4. řádek: Graf rozptýlení s kvantily, 5. řádek: Graf trendy vyhlazení, (QC-Expert).

Dekonvoluce spekter je významným pomocníkem v určení strategie experimentu, zde volbě hodnot pH, při kterých byla spektra snímána. Experimentální spektrum je rozloženo do aditivních spekter jednotlivých rozličně protonovaných částic. Mírou věrohodnosti celého výpočtu je analýza těsnosti proložení rozptylovým diagramem reziduí.



Obr. 4 1. řádek: Dekonvoluce spekter camptothecinu při 25º C, zleva pro pH: 9.89, 9.28 a 2.82. A_{exp} představuje experimentální hodnoty absorbance, ostatní křivky odpovídají spektrálním příspěvkům jednotlivých různě protonovaných částic. 2. řádek: Test těsnosti proložení spekter pro tytéž hodnoty pH, (SQUAD, ORIGIN).

Každé léčivo je prezentováno šesti grafy, vypovídajícími o věrohodnosti celého vyhodnocení. I látky vykazující malé změny je možné úspěšně vyhodnotit, když vykazují poměr S/N > 10. Užijeme za S změnu absorbance a za N pak přístrojovou chybu $s_{inst}(A)$.



Obr. 5 Vyhodnocení protonačních rovnovah losartanu regresní analýzou spekter při 25º C. 1. řádek: 2-D- graf A-pH spekter losartanu, Kankareho reziduální směrodatná odchylka $s_k(A)$, A-pH křivky tří vybraných vlnových délek. 2. řádek: Směrodatná odchylka reziduí s(e) vs.pH, graf molárních absorpčních koeficientů pro částice L, LH a LH_2, Distribuční diagram relativního zastoupení různě protonovaných částic, (SPECFIT, ORIGIN).

4. Závěr

Při řešení velmi komplikovaných rovnovah, jako jsou systémy vícesytných kyselin a bazí, je nezbytnou součástí celé strategie experimentu nejen zajištění přesných a spolehlivých vstupních dat, ale i velmi průkazný a spolehlivý vyhodnocovací aparát. Takové podmínky splňuje metodologie, která zahrnuje několik dílčích, navzájem propojených kroků, jako jsou faktorová analýza (k určení počtu světlo-absorbujících části), analýza reziduí (pomocí níž se hledá stechiometrické uspořádaní chemického modelu). Důležité jsou také chemické zkušenosti experimentátora, potřebné pro návrh správné strategie celého experimentu.

Poděkování

Práce vznikla za podpory grantu Ministerstva zdravotnictví NR9055-4/2004 a vědeckých záměrů Ministerstva školství, kultury a mládeže MSMT0021627502.

Doporučená literatura

1. Pharminex Kompendium, Praha (1995).
2. H. Gampp, M. Maeder, A. Zuberbühler, Talanta 27 (1980) 1037.
3. K. Flora, M. Hahn, H. Rosen, K. Banner, J. of Gastroenterology 93 (1998).
4. SQUAD(84): M. Meloun, M. Javůrek, J. Havel, Multiparametric curve fitting. X. A structural classification of program for analysing multicomponent spectra and their use in equilibrium-model determination, Talanta 33 (1986) 513 - 524.
5. 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).
6. ORIGIN: OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Suite 303, Northampton, MA 01060, USA.
7. S-PLUS: http://www.insightful.com/products/splus.
8. ADSTAT: ADSTAT 1.25, 2.0, 3.0 (Windows 95), TriloByte Statistical Software Ltd., Pardubice, Czech Republic.
9. INDICES: M. Meloun, T. Syrový, A. Vrána, Determination of the number of light- absorbing species in the protonation equilibria of selected drugs, Anal. Chim. Acta 489 (2003) 137 - 151.
10. 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, Academia 2004.
11. Krzanowski W. J.: *Principles of Multivariate Analysis, A User's Perspective*, Oxford Science Publications 1988,
12. Meloun M. , Militký J., *Statistické zpracování experimentálních dat*, Plus Praha 1994, Academia Praha 2004..

13. Meloun M. , Militký J., Hill M., *Počítačová analýza vícerozměrných dat v příkladech,* Academia Praha 2005.

14. Meloun M., Militký J., *Kompendium statistického zpracování experimentálních dat*, Academia Praha 2002, 2006.