Užití faktorové analýzy a nelineární regrese při stanovení disociačních konstant léčiv

Factor analysis and nonlinear regression in determination of dissociation constants of some drugs

Zuzana Ferenčíková, Milan Meloun

Katedra analytické chemie, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice,
zuzana.ferencikova@student.upce.cz, milan.meloun@upce.cz

Abstract

The mixed dissociation constants of methotrexate at various ionic strengths *I* and at temperatures of 25°C and 37°C were determined with the use of two different multiwavelength and multivariate treatments of spectral data, SPECFIT32 and SQUAD(84) nonlinear regression analyses and INDICES factor analysis according to a general rule of first, determining the number of components, and then calculating the spectral responses and concentrations of the components. The factor analysis in the INDICES programme predicts the number of light-absorbing components when the data quality is high and the instrumental error is known. Three thermodynamic dissociation constants were estimated by nonlinear regression: pK_{a1}^T= 2.895(13), pK_{a2}^T= 4.410(14), pK_{a3}^T= 5.726(15) at 25°C and pK_{a1}^T= 3.089(15), pK_{a2}^T= 4.392(12), pK_{a3}^T= 5.585(11) at 37°C, where the figure in brackets is the standard deviation in last significant digits. The reliability of the dissociation constants of the drug were proven by conducting goodness-of-fit tests of the multiwavelength spectrophotometric pH-titration data.

Keywords: spectrophotometric titration, dissociation constant, factor analysis, methotrexate

Úvod:

Disociační konstanty pK_a léčiv jsou pro farmaceuty a lékaře důležitou veličinou při aplikaci medikamentu. Léčiva jsou většinou slabé kyseliny či slabé zásady, které ve vodném prostředí přecházejí do rovnovážného stavu svých ionizovaných a neionizovaných forem. Slabé kyseliny lépe přestupují do krve v kyselém prostředí žaludku, slabé zásady pak v zásaditém prostředí střev.

1 Teoretická část

1.1 Statistická analýza spektrofotometrických dat

Spektrofotometrická data jsou pro svou přesnost velice vhodná k analýze chemického modelu iontových roztoků. Charakter dat vychází z platnosti Bougeuer-Lambert-Beerova zákona v širokém rozsahu koncentrací a přesnost a kvalita dat je docílena především vyspělostí současné elektroniky v instrumentální technice.

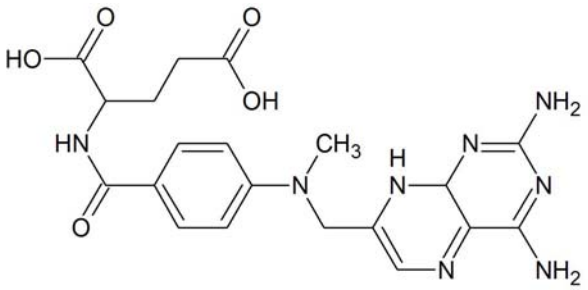
Máme-li objektivně zjistit jakého druhu a s jakými rovnovážnými konstantami se vyskytují ionty sloučenin vybraného léčiva v analyzovaných roztocích, musíme nejprve určit, kolik druhů rozličně protonovaných iontů léčiva se v daném roztoku vyskytuje. Intuitivní postup spočívá v určení hodnosti absorbancí matice, která je totiž úměrná počtu světlo-absorbujících

částic v rovnovážném systému. Využívá se k tomu metody faktorové analýzy (FA) s různými technikami k vyčíslení experimentální chyby v datech, a tím i ke spolehlivému určení počtu světlo-absorbujících částic.

1.2 Methotrexát

Chemické označení je kyselina (2S)-2-[[4-[(2,4-diaminopteridin-6-yl)methyl-ethylamino] benzoyl]amino]-pentandikarboxylová (obr. 1) se sumárním vzorcem $C_{20}H_{22}N_8O_5$, molekulovou hmotností 454.44 g/mol a registračním číslem CAS 59-05-2. Najdeme jej pod ochrannými známkami Methotrexat, Folex, Trexall, Mexate, Emtexate, Amethopterin, Rheumatrex.

Methotrexát je bílá krystalická látka, rozpustná ve vodě, polyethylenglykolu a kyselinách. Bod tání je 195°C. Disociační konstanty nalezené v literatuře jsou pK_{a1} = 3.36, pK_{a2} = 4.7 a pK_{a3} = 5.71 (Poe M., 1977) a pK_{a1} = 3.22, pK_{a2} = 4.53 a pK_{a3} = 5.62 (Szakács Z., Noszál B., 2006)



Obr. 1 Strukturní vzorec methotrexátu

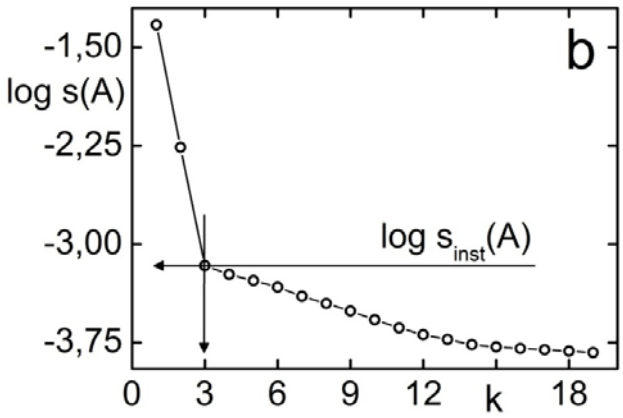
Methotrexát se používá k léčbě některých typů rakoviny, např. těhotenského zhoubného nádoru placenty, zhoubného žlázového nádoru vnějšího obalu plodu, nádorového bujení bílých krvinek, rakoviny prsu, nádorů kůže hlavy a krku, rakoviny plic, nádorů mízních uzlin, nádorů kostí. Methotrexát zabraňuje syntéze DNA, a tím selektivně blokuje reprodukci aktivně se množících tkání např. nádorových buněk a buněk pokožky postižené lupénkou, jakož i buněk kostní dřeně, tkání plodu, sliznice dutiny ústní a střev. Methotrexát má i silný nespecifický imunosupresivní účinek, pro který je využíván u autoimunitní Crohnovy choroby.

1.3 Stanovení počtu světlo-absorbujících částic v reakční směsi

K určení počtu světlo-absorbujících částic lze použít metodu faktorové analýzy. Faktorová analýza patří mezi metody pro snížení dimenzionality čili k redukci počtu původních znaků. Hlavními cíly faktorové analýzy jsou sumarizace dat a jejich redukce. V sumarizaci dat využívá tato metoda faktorů tak, aby data vysvětlila a usnadnila jejich pochopení daleko menším počtem latentních proměnných, než je počet původních znaků. Redukce dat je dosaženo vyčíslením skóre pro každý faktor a následnou náhradou původních znaků novými latentními proměnnými čili faktory.

Ve spektrofotometrii je datovou maticí absorbanční matice **A**, jejíž sloupce představují měřené vlastnosti (pH) a řádky pak vlnové délky. Zdrojovou matici **A** o rozměrech n x m lze pak vyjádřit ve tvaru **A=LF+E** , kde **L** s rozměry n x k představuje matici faktorového skóre, **F** o rozměrech k x m představuje matici faktorových zátěží a **E** o rozměrech n x m představuje matici chybových faktorů. V našem případě je n počet spekter, m počet vlnových délek, k index testované komponenty a r skutečný počet světlo-absorbujících částic ve směsi.

O prvním grafickém výstupu faktorové analýzy lze obecně hovořit jako o tzv. *„Cattelově grafu úpatí vlastních čísel"*, ve kterém se vynáší vypočtená funkce *f(k)* proti počtu komponent *k*. Hlavním kritériem určení počtu komponent *k* je u většiny metod zlom na křivce *f(k)* vs. *k* (Obr. 2). Cattelův graf úpatí je výhodnější vynášet jako logaritmus hodnot funkce *log(f(k))* pro dosažení lepšího rozlišení zlomu křivky, což mnohdy napomůže k odhalení i minoritních složek ve směsi.



Obr. 2 Cattelův graf úpatí vlastních čísel

Metody faktorové analýzy dělíme z uživatelského hlediska na metody precizní, aproximativní a z matematického hlediska na derivační a nederivační. Počet komponent ve směsi se u precizních metod určuje na základě porovnání zbytkové reziduálové chyby $s_k(\mathbf{A})$ pro *k*-tou komponentu s instrumentální chybou přístroje $s_{inst}(\mathbf{A})$. Do grafu je pak vynášena směrodatná odchylka absorbance $s_k(\mathbf{A})$ vůči hodnosti absorbanční matice čili zde vůči počtu komponent *k*. Řešením je pak takové číslo *k*, u kterého dochází na křivce k prudkému zlomu. Do metod precizních řadíme Kankareho reziduálovou směrodatnou odchylku absorbance $s_k(\mathbf{A})$, reziduálovou směrodatnou odchylku *RSD*, odmocninu z průměrné chyby *RMS*, kritérium průměrné absorbance *AE*, Barlettův χ^2 *test* a směrodatnou odchylku vlastních čísel $s(g_k)$. Kankareho metoda a Barlettův χ^2 test patří mezi metody nejspolehlivější.

Pokud není známa směrodatná odchylka absorbance užitého přístroje $s_{inst}(\mathbf{A})$, využijeme metod aproximativních. Mezi tyto metody řadíme logaritmus vlastních čísel $\log g_a$, Exnerovu funkci ψ, graf úpatí *RPV(k)*, vloženou chybu *IE*, faktorovou indikátorou funkci *IND(k)* a metodu *RESO*. Ve většině případů se jedná o funkce empirické.

Pokud je počet komponent ve směsi větší než tři, může se stát, že výše uvedená specifická kritéria nemusí vypovídat zcela jasně. Proto je výhodnější použít metod derivací pro zřetelnější odhalení zlomu na křivce. Do derivačních metod řadíme metodu druhé derivace *SD*, metodu třetí derivace *TD* a konečně metodu poměru derivací *ROD*. U metody druhé derivace a metody poměru derivací je počet světlo-absorbujících částic roven takovému *k*, pro nějž křivka funkce *SD*(*k*), resp. křivka funkce *ROD*(*k*) vykazuje první maximum, u metody třetí derivace je pak tento počet určen takovým *k*, pro něž křivka funkce *TD*(*k*) vykazuje první minimum. Za první minimum či maximum ovšem nebereme $k = 2$.

Všechny výše jmenované metody byly naprogramovány v programu S-PLUS a výsledný algoritmus byl nazván INDICES.

1.4 Určení protonačního modelu programem SPECFIT nebo SQUAD(84)

Disociace protonu sloučeniny při konstantní iontové síle je vyjádřena *smíšenou disociační konstantou* vztahem (1)

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

kde se užívá spíše její záporný dekadický logaritmus $-\log K_{a,j} = pK_{a,j}$. Je-li uvažována protonační rovnováha mezi aniontem L (náboje byly pro jednoduchost vynechány) léčiva a protonem H, mohou vzniknout rozličně proponované částice L, HL, H_2L, H_3L … atd. obecného vztahu H_pL. Vstupními daty pro program SPECFIT a SQUAD(84) (Meloun M., Havel J., 1985; Meloun M., Militký J., 1988; Leggett D.J., 1985), umožňující výpočet *protonačních konstant* β_p, definovanou vztahem (2)

$$\beta_p = \frac{[H_pL]}{[H]^p[L]}, \quad (2)$$

a molárního absorpčního koeficientu iontu H_pL při *i*-té vlnové délce $\varepsilon_{p,j}$, je absorbanční matice, navrhovaný počet světlo-absorbujících částic, jejich stechiometrie a analytické koncentrace základních komponent H a L. Oba programy vychází z Bougeuer-Lambert-Beerova zákona, kdy pro absorbanci A_{ij} *j*-tého roztoku při *i*-té vlnové délce při jednotkové délce kyvety platí vztah $A_{i,j} = \sum_p \varepsilon_{p,i}[H_pL] = \sum_p \varepsilon_{p,i}\beta_p[H]^p[L]$. Nelineární regresí se hledají nejlepší odhady β_p a $\varepsilon_{p,i}$ minimalizací účelové funkce $U = \sum\sum(A_{ij,exp} - A_{ij,cac})^2$, kde $A_{ij,exp}$ je hodnota prvku absorbanční matice a $A_{ij,calc}$ je hodnota prvku matice vypočtené programem.

Kromě β_p a $\varepsilon_{p,i}$ počítají programy SPECFIT a SQUAD i rovnovážné koncentrace jednotlivých složek. Aby byl navrhovaný model dostatečně věrohodný, je nutno vyhodnotit řadu model dokazujících diagnostik:

1. *Fyzikální smysl* β_p *a* $\varepsilon_{p,i}$ *a koncentrací složek:* β_p a $\varepsilon_{p,i}$ musí být nezáporné, přičemž rovnovážné koncentrace volných složek menších než 10^{-8} mol.l^{-1} nemají fyzikální smysl.
2. *Směrodatné odchylky parametrů* $s(\beta_p)$ *a* $s(\varepsilon_{p,i})$ musí být v dobře podmíněném modelu dostatečně malé, a tím β_p a $\varepsilon_{p,i}$ musí být statisticky významné; $b_p > 3\ s(\beta_p)$, $\varepsilon_{p,i} > s(\varepsilon_{p,i})$.
3. *Těsnost proložení naměřených spekter* vypočtenými regresními spektry určuje vhodnost daného protonačního modelu. K určení těsnosti proložení se používá v programu SPECFIT jenom směrodatná odchylka predikované absorbance *s(A)* zatímco program SQUAD vyčísluje následující statistiky ze statistické analýzy reziduí: *Aritmetický průměr reziduí E (ê)* by měl být číslo blízké nule, *průměrné reziduum (aritmetický průměr absolutních hodnot reziduí)E (|ê |)* by mělo být číslo blízké šumu čili průměrné náhodné chybě *E (ε)*, *směrodatná odchylka predikované absorbance s(A)* by měla být rovněž blízká svou velikostí šumu čili *E (ε)* a *Hamiltonův R-faktor [%]* nabývá pro výtečné proložení hodnot do 0.5%, přijatelné pro natypovaný protonační model jsou ještě hodnoty do 1%.

Dekonvoluce experimentálních spekter znamená rozklad spekter do absorpčních příspěvků jednotlivých složek. Snahou je mít spektrum složené z významných příspěvků více složek. Mezi obecné požadavky kladené na všechny výše uvedené metody faktorové analýzy patří: (a) žádné ze spekter čistých složek není lineární kombinací spekter ostatních látek, (b) koncentraci žádné ze složek nelze vyjádřit konstantním poměrem koncentrací jiných složek, (c) relativní koncentrace nesmí být konstantní. Nesplnění všech těchto podmínek vede k snížení hodnosti absorbanční matice čistých dat , a tím k nesprávnému určení fyzikálně-chemickému modelu určením menšího počtu latentních proměnných než odpovídá skutečnosti.

1.5 Termodynamická disociační konstanta

Pro Debye-Hückelovu rozšířenou rovnici je možné z definice rovnovážné konstanty a na základě definice aktivitního koeficientu vyjádřit vztah závislosti smíšené protonační konstanty na iontové síle. Tato rovnice (3) se nazývá rozšířený Debye-Hückelův zákon,

$$log\, K_{1r,smíš} = log\ K_{1r}^{T} - \frac{A\,|z_{+}z_{-}|\sqrt{I}}{1+B\text{å}\sqrt{I}} + CI, (3)$$

kde pro nízké iontové síly I ≤ 0.1 lze vztah zjednodušit na Debye-Hückelův zákon (4) bez členu vysolovací konstanty *CI,*

$$log\, K_{1r,smíš} = log\ K_{1r}^{T} - \frac{A\,|z_{+}z_{-}|\sqrt{I}}{1+B\text{å}\sqrt{I}}. (4)$$

2 Experimetální část

2.1 Chemikálie a rozpouštědla

Kyselina chlorovodíková, HCl, (1 M) byla připravena ředěním koncentrované kyseliny chlorovodíkové *(*p.a., Lachema Brno*)*. Standardizace tohoto roztoku byla provedena potenciometrickou titraci na navážku pevného HgO za přítomnosti nadbytečného množství KI a za intenzivního probublávání argonem.

Hydroxid draselný, KOH, (1 M) byl připraven rozpuštěním přesné navážky tuhého KOH (Aldrich Chemical Company, USA) v 1 l redestilované vody, která byla před přípravou roztoku probublána argonem. Roztok KOH byl uchováván v polyethylenové láhvi v exikátoru v argonové atmosféře. Standardizace tohoto roztoku byla provedena potenciometrickou titrací na standardizovanou kyselinu chlorovodíkovou.

Methotrexát. Toto léčivo bylo dodáno firmou IVAX Pharmaceuticals s.r.o., Opava. Dodavatel garantoval vysokou čistotu (101%). Totožnost látky byla kontrolována pomocí IČ a UV spekter a také pomocí HPLC.

Chlorid draselný, KCl, jeho roztoky byly připraveny rozpuštěním tuhé látky *(*p.a., Lachema Brno*)* v redestilované vodě. Roztoky byly používány pro nastavení iontové síly při potenciometrických titracích látek.

Komerční pufry (Lachema Brno), roztok ftalanu draselného, roztok NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4, roztok boraxu + NaOH byly užity pro kalibraci elektrody.

2.2 Přístroje a experimentální uspořádání

K pH-spektrofotometrickým titracím byla použita kombinovaná skleněná elektroda HC 103 (Theta ´90), zapojená do digitálního pH-metru Hanna pH 213 (Hanna instruments) s udávanými parametry: přesnost ± 0.5 mV, resp. ± 0.002 pH. Pomocí komerčních pufrů byla nastavena Nernstnovská směrnice. Z důvodu možné difúze studovaného léčiva do referentní elektrody byl roztok KCl čas od času vyměněn komerčním roztokem.

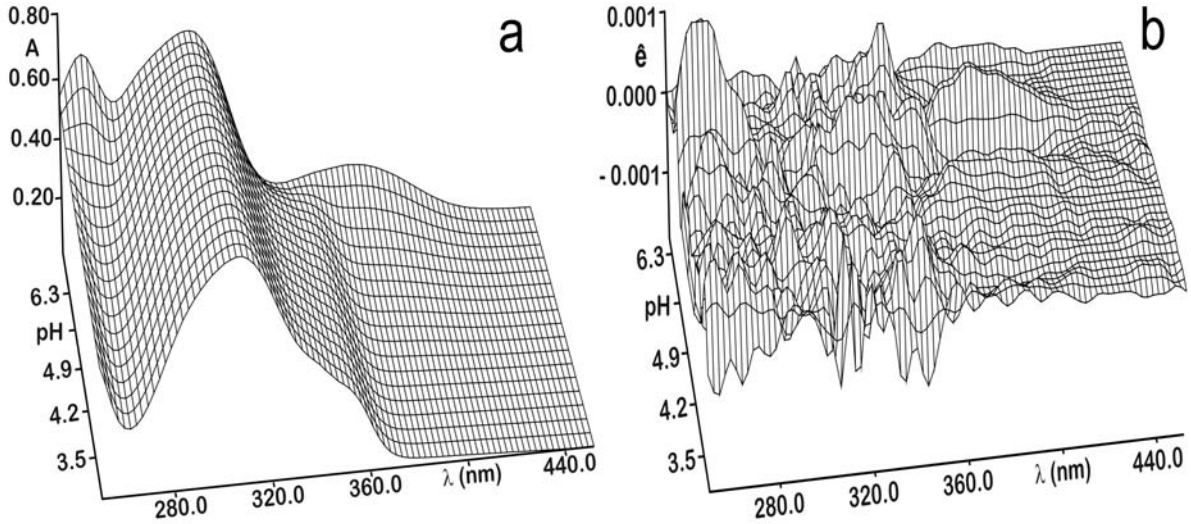
Spektrofotometrická měření byla prováděna na spektrofotometru GBC Cintra40, kde zdrojem záření je 50W wolfram-halogenová lampa pro viditelnou oblast a 30W deuteriová lampa pro ultrafialovou oblast. Přístroj o rozsahu 200 – 800 nm, se šířkou štěrbiny minimálně 0.5 nm, a rychlostí měření 5 – 7000 $nm.min^{-1}$, je postaven na monochromátoru Czerny-Turner s fotonásobičem jako detektorem.

2.3 Použitý software

Regresní maticová analýza byla provedena v programu SPECFIT/32 a SQUAD(84). Pro tvorbu grafů byly využity programy Origin 7.5 a S-PLUS 4.5. Statistické výpočty byly provedeny v programu ADSTAT. Algoritmus INDICES byl naprogramován v programu S-PLUS.

3 Výsledky a diskuze

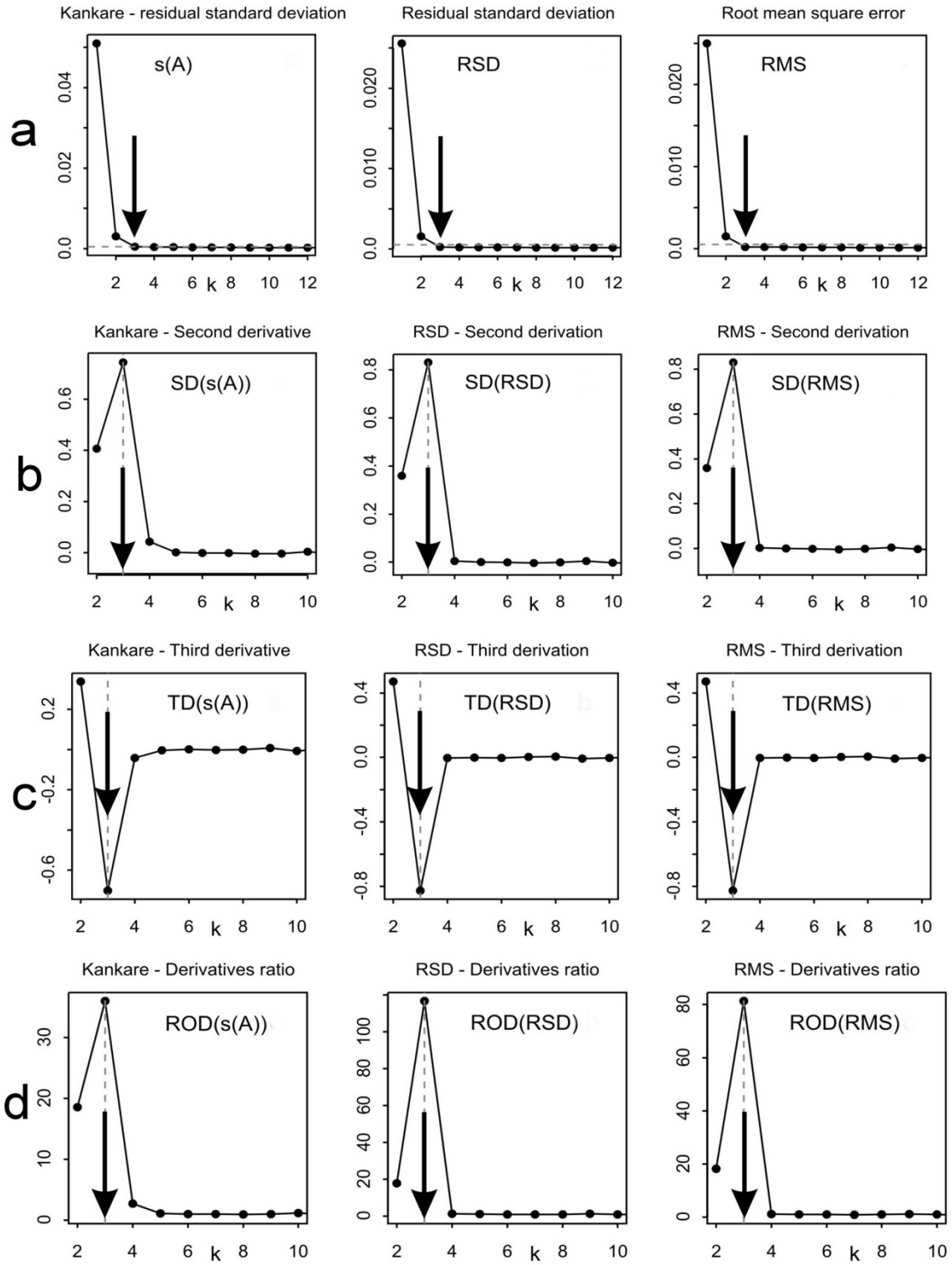
Regresní analýzou absorbanční responzní plochy z obr. 3a a vějíře 2D-spekter z obr. 4a o 20 spektrech methotrexátu naměřených při 29 vlnových délkách byly programem SPECFIT stanoveny nejlepší odhady disociačních konstant pK_{a1} = 2.887(0.126), pK_{a2} = 4.372(0.019) a pK_{a3} = 5.673(0.008) (Obr. 7) se směrodatnou odchylkou predikované absorbance v okamžiku terminace minimalizačního procesu $s(A)$ = 0.35 mAU. Zatímco pK_{a2} a pK_{a3} byly vyčísleny s dostatečně malou směrodatnou odchylkou, svědčící o dobré podmíněnosti obou parametrů v nelineárním regresním modelu, je směrodatná odchylka parametru pK_{a1} poněkud vyšší. To značí, že pK_{a1} je hůře podmíněn v nelineárním regresním modelu a jeho stanovení je proto zatíženo větší nejistotou než je tomu u pK_{a2} a pK_{a3}.



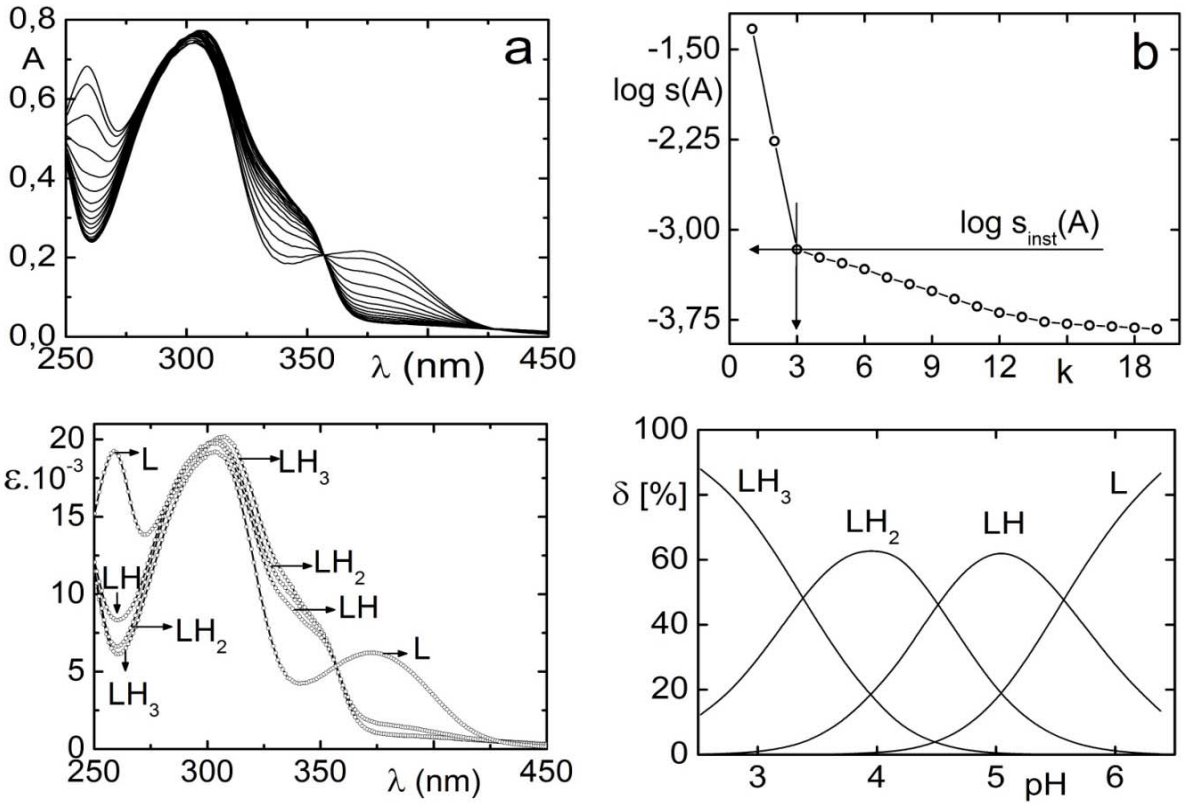
Obr. 3 (a) 3D-Absorbanční responzní plocha spekter methotrexátu při 29 vlnových délkách a 20 hodnotách pH a (b) Těsnost proložení u 3D-responzní plochy reziduí po nalezení nejlepších odhadů disociačních konstant pK_{a1}, pK_{a2} a pK_{a3} a křivek molárních absorpčních koeficientů ε_L, ε_{LH}, ε_{LH2} a ε_{LH3} v závislosti na vlnové délce (SPECFIT, SQUAD(84), S-PLUS).

Odhady tří disociačních konstant programem SQUAD(84) byly ve shodě s programem SPECFIT, i když tento program užívá v minimalizačním procesu zcela odlišnou matematickou metodu: pK_{a1} = 3.085(0.167), pK_{a2} = 4.403(0.062) a pK_{a3} = 5.675(0.005) se směrodatnou odchylkou predikované absorbance v okamžiku terminace minimalizačního procesu s (A) = 0.65 mAU, ve statistické analýze reziduí při kontrole těsnosti proložení vykazuje stejnou směrodatnou odchylku reziduí s (e) = 0.65 mAU a průměrným reziduálem $|\bar{e}|$ = 0.41 mAU. Hamiltonův *R-faktor* relativní těsnosti proložení dosahoval velmi nízké hodnoty *R-faktor* = 0.12 %, svědčící o výtečném proložení.

Cattelův indexový graf vlastních čísel v metodě hlavních komponent ukázal při analýze absorbanční matice na zbytkovou reziduální chybu absorbance $s_k(A)$ = 0.43 mAU (čili log $s_k(A)$ = -0.366 na obr. 4b) pro počet částic $n_c = k$, kde hodnost absorbancí matice byla rovna k = 3 anebo $s_k(A)$ = 0.36 mAU (čili log $s_k(A)$ = -0.444) pro počet částic n_c = 4. Protože v rovnovážné směsi existují dvě částice LH_2 a LH_3, které se dle obr. 4c liší ve tvaru spektra velmi nepatrně, je určení počtu světlo-absorbujících částic Cattelovým grafem poněkud nezřetelné. Byl proto aplikován algoritmus INDICES, který užívá modifikace Cattelova grafu dle 12 rozličných autorů (obr. 5) včetně využití druhých (obr. 5b) a třetích derivací (obr. 5c) a poměru derivací Cattelova grafu (obr. 5d). Rozborem a vzájemným porovnáním těchto grafů byl určen počet světlo- absorbujících částic roven 3.



Obr. 5 Přehled hrubšího určení počtu světlo-absorbujících částic protonační rovnováhy methotrexátu absorbanční maticí z obr. 4a třemi modifikacemi Cattelova indexového grafu vlastních čísel metody faktorové analýzy FA: (a) Kankareho metoda *s(A)*, metoda reálné chyby RSD, metoda extrahované chyby RMS, (b) druhá derivace s(A), druhá derivace RSD, druhá derivace RMS, (c) třetí derivace *s(A)*, třetí derivace RSD, třetí derivace RMS, (d) poměr derivací *s(A)*, poměr derivací RSD, poměr derivací RMS (S-Plus). Šipkami je vyznačen zde stanovený počet částic ve směsi, což činí u všech metod $k = 3$.



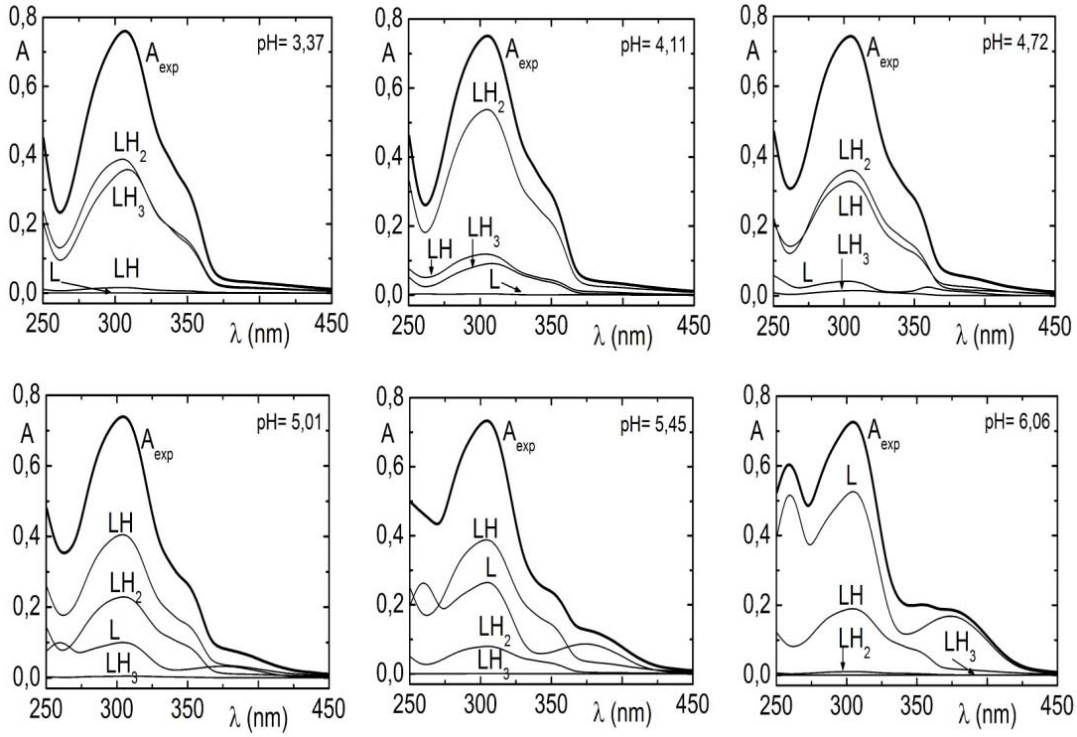
Obr. 4 Vyhodnocení protonačních rovnovah methotrexátu regresní analýzou spekter při 25°C. Náboje částic byly pro jednoduchost vynechány. (a) 2D-graf spekter, (b) stanovení počtu světlo-absorbujících částic k faktorovou analýzou spekter dle prahu křivky log $s_k(A)$ = f(k), což ukazuje na $s_{inst}(A)$= 0.68 mAU při $k = n_c = 3$, (c) graf molárních absorpčních koeficientů pro částice L, LH, LH_2 a LH_3, (d) distribuční diagram relativního zastoupení rozličně protonovaných částic v závislosti na pH.

Další užitečnou diagnostikou k určení počtu indikovatelných rozličně proponovaných částic lze použít hledání protonačního modelu programem SQUAD(84). V tabulce 1 je zřejmé, že regresní analýza vějíře spekter je schopna rozlišit mezi navrženými třemi modely jedno-, dvoj- a trojsytné kyseliny. Statistická analýza reziduí ukazuje, že na základě nejlepšího dosaženého proložení byl zřetelně prokázán model trojsytné kyseliny s částicemi L, LH, LH_2 a LH_3.

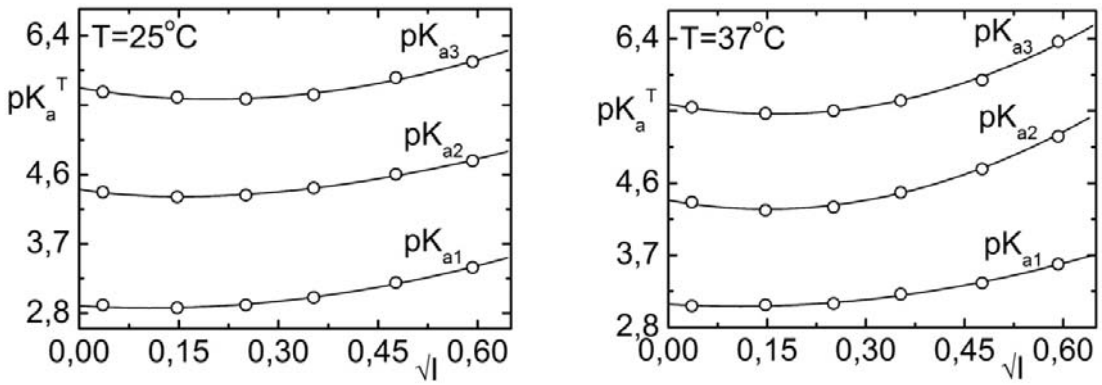
Tabulka 1. Hledání směsi částic v nejlepším chemickém modelu protonačních rovnovah L_qH_r s disociačními konstantami $pK_{a,r}$ pro methotrexát při iontové síle I = 0.0012. Náboje částic byly pro jednoduchost vynechány. V závorce jsou uvedeny směrodatné odchylky v jednotkách posledních platných číslic.

Hypotéza modelu protonačních rovnovah LH_r s jeho disociačními konstantami $pK_{a,r}$			
r	$pK_{a,r}$	$pK_{a,r}$	$pK_{a,r}$
1	5.532(7)	3.813(18)	3.086(167)
2	-	5.639(2)	4.403(62)
3	-	-	5.675(5)
$s(A)$ [mAU]	4.68	0.87	0.65
$s_k(A)$ [mAU],k	4.00,2	0.55,3	0.49,4
$\lvert\bar{e}\rvert$ [mAU]	3.24	0.58	0.42
$s(e)$ [mAU]	4.68	0.87	0.65
$g_1(e)$	-0.53	-0.07	-0.28
$g_2(e)$	4.29	3.2	3.22
R-faktor [%]	0.976	0.175	0.125
Hypotéza modelu je	zamítnuta	zamítnuta	přijata

Dekonvoluce experimentálně naměřeného spektra rovnovážné směsi rozličně protonovaných částic methotrexátu (obr. 6) do absorpčních pásů jednotlivých částic pro 6 vybraných pH ilustruje, jak jednotlivé částice přispívají do výsledné hodnoty naměřeného spektra. Vektorovým skládáním pásů jednotlivých částic vznikne výsledné spektrum pro dané pH, které je naměřeno. Z obrázku je proto názorně zřejmé, jakým způsobem lze vybrat dominantní analytickou vlnovou délku, při které lze sledovat postupnou disociaci trojsytné kyseliny methotrexátu.



Obr. 6 Dekonvoluce experimentálního spektra methotrexátu v rozsahu 250 – 450 nm na absorpční pásy jednotlivých rozličně protonovaných částic pro šest hodnot nastaveného pH 3.37, 4.11, 4.72, 5.01, 5.45, 6.06. Tučná křivka představuje experimentální spektrum, slabé křivky odpovídají spektrálním příspěvkům L, LH, LH_2 a LH_3 částic. Náboje částic byly pro jednoduchost vynechány.



Obr. 7 Závislost smíšené disociační konstanty methotrexátu na odmocnině z iontové síly, která vede na termodynamické disociační konstatnty pK_{a1}^T= 2.895(4), pK_{a2}^T= 4.410(6), pK_{a3}^T= 5.726(8) při 25°C a pK_{a1}^T= 3.089(8), pK_{a2}^T= 4.392(10), pK_{a3}^T= 5.585(14) při 37°C.

4 Závěr

Pro vybrané léčivo methotrexát bylo naměřeno spektrum, které bylo dále podrobeno faktorové analýze pro určení počtu částic, analyzováno nelineární regresní analýzou pro stanovení protonačního modelu a byly stanoveny disociační konstanty pK pro vybrané iontové síly. Takto získané konstanty byly analyzovány nelineární regresí Debye- Hückelova vztahu a byly získány termodynamické disociační konstanty pK_a^T.

Poděkování

Práce vznikla za podpory vědeckých záměrů Ministerstva školství, kultury a mládeže č. MSM0021627502.

Literatura

1. Leggett D. J., *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, Plenum Press, New York – London, 1985
2. Meloun M., Havel J., *Computation of Solution Equilibria 1. Spectrophotometry*, UJEP Brno, 1985.
3. Meloun M., Militký J., *Chemometrie V. Interaktivní tvorba chemického modelu na IBM PC*, VŠCHT Pardubice, 1988
4. Poe M., *Acidic Dissociation Constants of Folic Acid, Dihydrofolic Acis and Methotrexate*, J. Biol. Chem. 1977, vol. 252, p. 3724-3728
5. Szakács Z., Noszal B., *Determination Of Dissociation Constants of Folic Acid, Methotrexate, and Other Photolabile Pteridines by Pressure-assisted Capillary Electrophoresis,* ELCTDN 2006, vol. 27, p. 3399-3409

Recenzent: Doc. Ing. Jiří Kulhánek, Ph.D, Ústav organické chemie a technologie, FChT, Univerzita Pardubice, Studenská 573, 53210 Pardubice, jiri.kulhanek@upce.cz