

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Entalpie, entropie a termodynamické disociační konstanty Baricitinibu
a Valsartanu UV/VIS-metrickou spektrální a pH-metrickou analýzou dat

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Aneta Pfeiferová**
Osobní číslo: **C18493**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Analýza blízkých protonačních rovnovah léčiv Valsartanu a Baricitinibu**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. V literární části kriticky zhodnotte význam disociačních konstant pro léčiva a doplňte rešerši o biochemických a farmaceutických vlastnostech léčiv Valsartanu a Baricitinibu firmy Zentiva k. s.
2. Stanovte smíšené disociační konstanty vybraných léčiv při rozličných iontových silách a teplotách 25°C a 37°C analýzou spektrálních dat regresním programem REACTLAB a faktorovou analýzou INDICES.
3. Nelineární regresí smíšené disociační konstanty v závislosti na iontové síle vyčíslete termodynamickou disociační konstantu při teplotě 25°C a 37°C, a z naměřených disociačních konstant při 4 teplotách vyčíslete entalpii a entropii disociace.
4. Při dostatečné rozpustnosti léčiva se pokuste o srovnání disociačních konstant, stanovených potenciometrickou titrací vůči analýze spekter. Diskutujte spolehlivost regresních odhadů termodynamické disociační konstanty a proveďte jejich srovnání s kvantově-chemicky predikovanými hodnotami.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

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

Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1.6.2020

Aneta Pfeiferová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce prof. RNDr. Milanu Melounovi, DrSc. za užitečné rady a připomínky, ale především za odborné vedení a trpělivost při tvorbě této práce.

ANOTACE

Baricitinib se používá pro léčbu revmatoidní artritidy. Jde o selektivní a reverzibilní inhibitor Janusovy kinázy 1 a 2, které hrají důležitou roli v signalizaci prozánětlivé dráhy, aktivované u autoimunitních poruch, jako je revmatoidní artritida. pH-spektrofotometrická a pH-potenciometrická titrace umožnily měření tří nebo čtyř postupných disociačních konstant Baricitinibu. Chromofory Baricitinibu vykazovaly malé změny absorbance v UV/VIS-spektrech při změně pH, a proto odhady disociačních konstant byly vystaveny větší nejistotě než u potenciometrického stanovení. Baricitinib LH_2 byl schopen protonace na dva rozpustné kationty LH_4^{2+} , LH_3^+ , neutrální molekulu LH_2 , a disociace na dva rozpustné anionty LH^- a L^{2-} v čisté vodě. Graf molárních absorpčních koeficientů různé protonovaných částic proti vlnové délce indikoval, že spektra ϵ_L , ϵ_{LH} , ϵ_{LH_2} byla pro částice téměř stejná a spektra ϵ_{LH_4} a ϵ_{LH_3} si byla rovněž podobná. V rozmezí pH 2 až 13 lze spolehlivě odhadnout čtyři pK_a ze spekter programem REACTLAB ($I = 0,0020 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$): $pK_{a1}^T = 3,07$, $pK_{a2}^T = 3,87$, $pK_{a3}^T = 6,27$, $pK_{a4}^T = 12,78$ při 25 °C a $pK_{a1}^T = 3,00$, $pK_{a2}^T = 3,79$, $pK_{a3}^T = 6,12$, $pK_{a4}^T = 12,75$ při 37 °C a analýzou potenciometrické pH-titrace pro vyšší koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ programem ESAB ($I = 0,0001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$): $pK_{a1}^T = 3,69$, $pK_{a2}^T = 3,81$, $pK_{a3}^T = 4,73$ při 25 °C a $pK_{a1}^T = 3,62$, $pK_{a2}^T = 3,73$, $pK_{a3}^T = 4,43$ při 37 °C. Termodynamické parametry ΔH^0 a ΔG^0 byly vypočteny z teplotní změny disociačních konstant. Ze spekter byly ze závislosti $\ln K$ na $1/T$ vyčísleny hodnoty molární entalpie ΔH^0 , molární entropie ΔS^0 a Gibbsovy volné energie ΔG^0 : pro pK_1 s hodnotami $\Delta H^0 = 5,24 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -40,31 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 12,02 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K, pro pK_2 s hodnotami $\Delta H^0 = 19,78 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -6,56 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 1,98 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K, pro pK_3 s hodnotami $\Delta H^0 = 55,53 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 62,91 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 18,70 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K a pro pK_4 s hodnotami $\Delta H^0 = 23,78 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -167,40 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 49,94 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K. Potenciometrickou titrací byly ze závislosti $\ln K$ na $1/T$ vyčísleny pro pK_1 s hodnotami $\Delta H^0 = 41,91 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 69,58 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 21,09 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K, pro pK_2 s hodnotami $\Delta H^0 = 40,30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 51,23 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 25,12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K, pro pK_3 s hodnotami $\Delta H^0 = 18,54 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -29,89 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 27,40 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K.

Valsartan se používá kléčbě vysokého krevního tlaku, městnavého srdečního selhání a k prodloužení života po infarktu myokardu a ke snížení úmrtnosti lidí s dysfunkcí levé komory po infarktu myokardu. Regresní analýzou pH spekter programy REACTLAB a titrační pH křivky ESAB byly stanoveny dvě blízké disociační konstanty. MARVIN a ACD/Percepta předpověděly dvě protonační místa. Ve vodě tvoří rozpustný anion L^{2-} dvě mírně rozpustné částice LH^- a LH_2 . Přestože změna pH méně ovlivnila spektrální změny v chromoforu, byly stanoveny $pK_{a1}^T = 3,70 \pm 0,12$, $pK_{a2}^T = 4,82 \pm 0,08$ při 25 °C a $pK_{a1}^T = 3,44 \pm 0,08$, $pK_{a2}^T = 4,67 \pm 0,02$ při 37 °C ve vodném prostředí fosfátového pufru. Regresní analýzou pH-potenciometrických titračních křivek byly stanoveny $pK_{a1}^T = 3,51 \pm 0,01$, $pK_{a2}^T = 4,63 \pm 0,01$ při 25 °C a $pK_{a1}^T = 3,44 \pm 0,03$, $pK_{a2}^T = 4,51 \pm 0,03$ při 37 °C ve vodném prostředí. Pozitivní hodnoty entalpie $\Delta H^0(pK_{a1}) = 10,33 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta H^0(pK_{a2}) = 17,70 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ukázaly, že disociační proces byl endotermický. Změny Gibbsovy energie byly vyčísleny $\Delta G^0(pK_{a1}) = 20,03 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G^0(pK_{a2}) = 26,43 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 25 °C a změna entropie ΔS^0 byla $\Delta S^0(pK_{a1}) = -32,56 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0(pK_{a2}) = -29,26 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 25 °C a $\Delta S^0(pK_{a1}) = -30,01 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0(pK_{a2}) = -25,92 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 37 °C.

KLÍČOVÁ SLOVA

Disociační konstanty; Baricitinib; Valsartan; spektrofotometrická titrace; pH-titrace; REACTLAB; SQUAD84; ESAB; Entalpie; Entropie; Gibbsova volná energie;

TITLE

Enthalpy-Entropy and Thermodynamic Dissociation Constants of Baricitinib and Valsartan with UV-Spectra Metric and pH-Metric Method

ANNOTATION

Baricitinib is used for the treatment of rheumatoid arthritis. It is a selective and reversible inhibitor of Janus kinases 1 and 2, which play an important role in signaling the pro-inflammatory pathway activated in autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis. The pH-spectrophotometric and pH-potentiometric titrations allowed the measurement of three or four successive dissociation constants of Baricitinib. Its chromophores showed small changes in absorbance in UV/VIS spectra within pH change, and therefore estimates of dissociation constants were exposed to greater uncertainty than those from potentiometric method. Baricitinib LH_2 was able to protonate into two soluble cations LH_4^{2+} , LH_3^+ , the neutral LH_2 molecule which dissociated into two soluble anions LH^- and L^{2-} in pure water. The graph of molar absorption coefficients of differently protonated particles versus wavelength indicated that the spectra ϵ_{L} , ϵ_{LH} , ϵ_{LH_2} were almost the same for the particles and the spectra ϵ_{LH_4} and ϵ_{LH_3} were also similar. In the range of pH 2 to 13, four pK_a 's of spectra analysis can be reliably estimated by REACTLAB ($I = 0,0020 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$): $\text{pK}_{\text{a}1}^{\text{T}} = 3,07$, $\text{pK}_{\text{a}2}^{\text{T}} = 3,87$, $\text{pK}_{\text{a}3}^{\text{T}} = 6,27$, $\text{pK}_{\text{a}4}^{\text{T}} = 12,78$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and $\text{pK}_{\text{a}1}^{\text{T}} = 3,00$, $\text{pK}_{\text{a}2}^{\text{T}} = 3,79$, $\text{pK}_{\text{a}3}^{\text{T}} = 6,12$, $\text{pK}_{\text{a}4}^{\text{T}} = 12,75$ at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ and potentiometric pH-titration analysis for a higher concentration of $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ with ESAB ($I = 0,0001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$): $\text{pK}_{\text{a}1}^{\text{T}} = 3,69$, $\text{pK}_{\text{a}2}^{\text{T}} = 3,81$, $\text{pK}_{\text{a}3}^{\text{T}} = 4,73$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $\text{pK}_{\text{a}1}^{\text{T}} = 3,62$, $\text{pK}_{\text{a}2}^{\text{T}} = 3,73$, $\text{pK}_{\text{a}3}^{\text{T}} = 4,43$ při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Molar enthalpy values ΔH^0 , molar entropy ΔS^0 and Gibbs free energy ΔG^0 were calculated from the spectra from $\ln K$ to $1/T$: for pK_1 with values $\Delta H^0 = 5,24 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -40,31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta G^0 = 12,02 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ at $298,16 \text{ K}$, for pK_2 with values $\Delta H^0 = 19,78 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -6,56 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta G^0 = 1,98 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ at $298,16 \text{ K}$, for pK_3 with values $\Delta H^0 = 55,53 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 62,91 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta G^0 = 18,70 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ at $298,16 \text{ K}$ and for pK_4 with values $\Delta H^0 = 23,78 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -167,40 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta G^0 = 49,94 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ at $298,16 \text{ K}$. With the use of potentiometric titrations were from dependence $\ln K$ on $1/T$ it was calculated for pK_1 with values $\Delta H^0 = 41,91 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 69,58 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta G^0 = 21,09 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ at $298,16 \text{ K}$, for pK_2 with values $\Delta H^0 = 40,30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 51,23 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta G^0 = 25,12 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ at $298,16 \text{ K}$, for pK_3 with values $\Delta H^0 = 18,54 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -29,89 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta G^0 = 27,40 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ at $298,16 \text{ K}$.

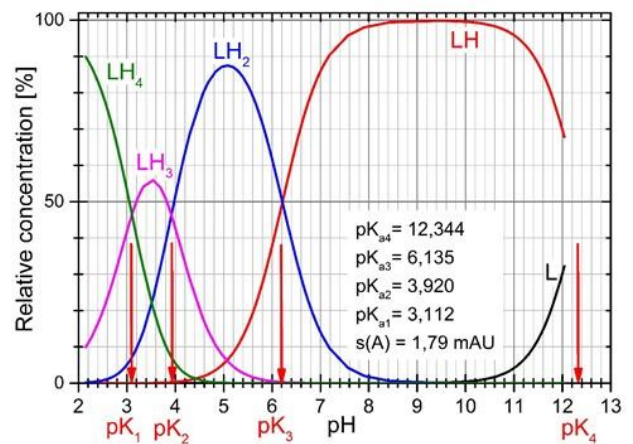
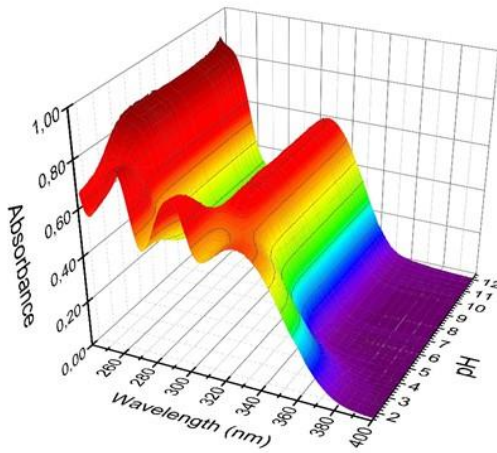
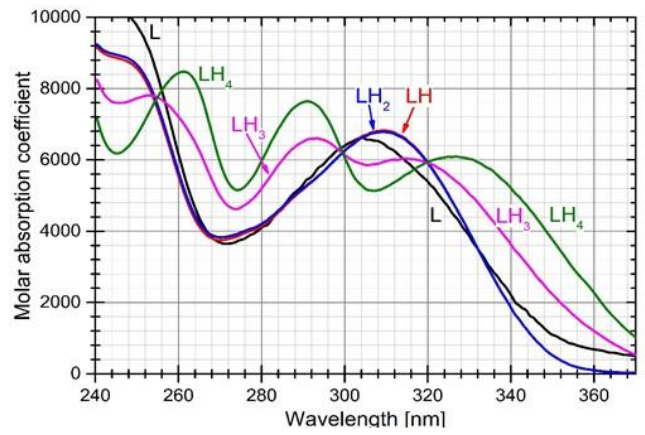
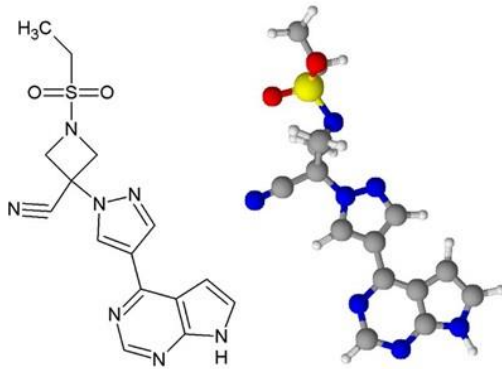
Valsartan is used to treat high blood pressure, congestive heart failure and prolong life after myocardial infarction and to reduce mortality in people with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Two close dissociation constants were determined by regression analysis of pH spectra by REACTLAB and titration pH curve of ESAB. MARVIN and ACD/Percepta predicted two protonation sites. The water soluble anion L^{2-} forms two slightly soluble particles LH^- and LH_2 . Although the pH change less affected spectral changes in the chromophore, $\text{pK}_{\text{a}1}^{\text{T}} = 3,70 \pm 0,12$, $\text{pK}_{\text{a}2}^{\text{T}} = 4,82 \pm 0,08$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and $\text{pK}_{\text{a}1}^{\text{T}} = 3,44 \pm 0,08$, $\text{pK}_{\text{a}2}^{\text{T}} = 4,67 \pm 0,02$ at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in aqueous phosphate buffer. $\text{pK}_{\text{a}1}^{\text{T}} = 3,51 \pm 0,01$, $\text{pK}_{\text{a}2}^{\text{T}} = 4,63 \pm 0,01$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and $\text{pK}_{\text{a}1}^{\text{T}} = 3,44 \pm 0,03$, $\text{pK}_{\text{a}2}^{\text{T}} = 4,51 \pm 0,03$ at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in aqueous solution were determined by regression analysis of pH-potentiometric titration curves. Positive enthalpy values $\Delta H^0(\text{pK}_{\text{a}1}) = 10,33 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta H^0(\text{pK}_{\text{a}2}) = 17,70 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ showed that the dissociation process was endothermic. Gibbs energy changes were calculated by $\Delta G^0(\text{pK}_{\text{a}1}) = 20,03 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta G^0(\text{pK}_{\text{a}2}) = 26,43 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and the entropy change ΔS^0 was $\Delta S^0(\text{pK}_{\text{a}1}) = -32,56 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0(\text{pK}_{\text{a}2}) = -29,26 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and $\Delta S^0(\text{pK}_{\text{a}1}) = -30,01 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0(\text{pK}_{\text{a}2}) = -25,92 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ at $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

KEYWORDS

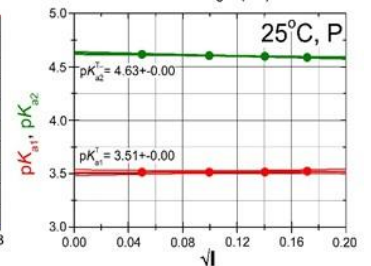
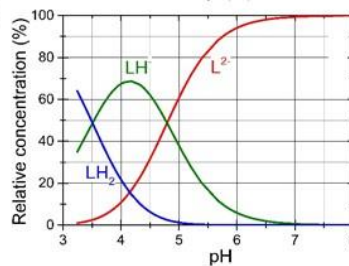
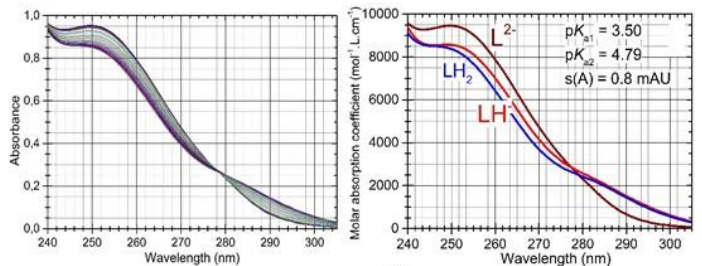
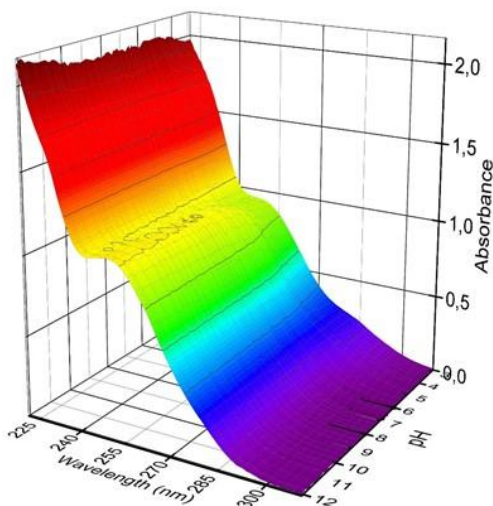
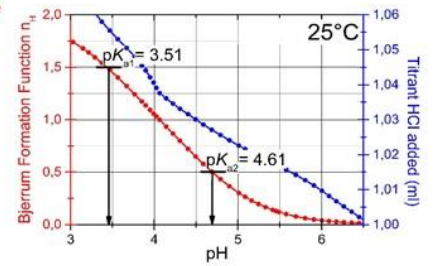
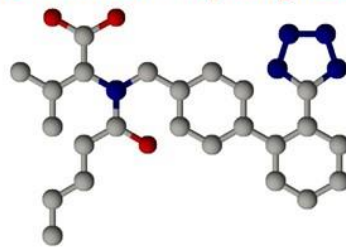
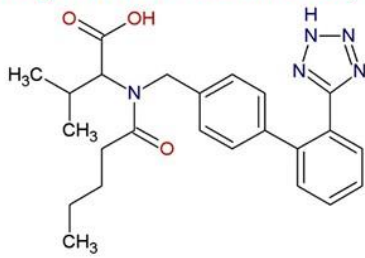
Dissociation constants; Baricitinib; Valsartan; spectrophotometric titration; pH titration; REACTLAB; SQUAD84; ESAB; Enthalpy; Entropy; Gibbs free energy;

GRAFICKÁ ANOTACE

BARICITINIB, C₁₆H₁₇N₇O₂S



Valsartan is for treatment of hypertension, cardiac insufficiency, myocardial infarction, and diabetic nephropathy.



OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM TABULEK	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD	14
Baricitinib.....	14
Valsartan	17
1 EXPERIMENTALNÍ ČÁST	19
1.1 Chemikálie a roztoky	19
1.2 Přístroje	19
1.3 Software	21
2 VÝSLEDKY.....	22
2.1 Baricitinib.....	22
2.1.1 UV-metrická spektrální analýza	22
2.1.1.1 Krok 1: Teoretická predikce disociačních konstant Baricitinibu:.....	22
2.1.1.2 Krok 2: Určení počtu světlo-absorbujících částic n_c :.....	23
2.1.1.3 Krok 3: Výstavba a testování chemického (protonačního) modelu:.....	25
2.1.1.4 Krok 4: Efektivní rozsah vlnových délek:	28
2.1.1.5 Krok 5: Změna absorbance ve spektrech při titraci pH:	30
2.1.1.6 Krok 6: Poměr signálu k šumu při spektrálních změnách:	30
2.1.1.7 Krok 7: Dekonvoluce spektra:	32
2.1.2 pH-metrická dat analýza	34
2.1.2.1 Krok 8: pH-metrická data analyzovaná Bjerrumovou tvornou funkcí:	34
2.1.2.2 Krok 9: Nejistota pK_{ai} v reprodukováných měřeních (obr. B12):.....	36
2.1.2.3 Krok 10: Termodynamické disociační konstanty:	38
2.1.2.4 Krok 11: Stanovení entalpie, entropie a Gibbsovy volné energie pro "extra- termodynamiku" disociace:	39
2.2 Valsartan	44
2.2.1 UV-metrická spektrální analýza	44
2.2.1.1 Krok 1: Teoretická predikce pK_a Valsartanu:	44
2.2.1.2 Krok 3: Výstavba protonačního modelu:	46
2.2.1.3 Krok 4: efektivní rozsah vlnových délek:	49
2.2.1.4 Krok 5: Změna absorbance ve spektru při pH titraci:	50
2.2.1.5 Krok 6: Poměr signál-chyba ve spektrálních změnách:	51
2.2.1.6 Krok 7. Dekonvoluce spektra.....	52

2.2.2	pH-metrická analýza dat	54
2.2.2.1	Krok 8: pH-metrická data analyzovaná Bjerrumovou tvornou funkcí.....	54
2.2.2.2	Krok 9: Nejistota pK_a v reprodukováných měřeních:	54
2.2.2.3	Krok 10: Termodynamické disociační konstanty:	57
2.2.2.4	Krok 11: Stanovení entalpie, entropie a Gibbsovy energie:	58
3	DISKUSE	60
3.1	Baricitinib.....	60
3.2	Valsartan	62
4	ZÁVĚR.....	63
4.1	Baricitinib.....	63
5	POUŽITÁ LITERATURA	66

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. B1 Strukturní vzorec Baricitinibu.....	14
Obr. B2 Cytokinová signalizace prostřednictvím izoforem Janusových kináz	15
Obr. V1 Mechanismus účinku Valsartanu	17
Obr. V2 Strukturní vzorec Valsartanu	18
Obr. B3 Uspořádání experimentu	20
Obr. B4 Teoretická predikce disociačních konstant Baricitinibu.	23
Obr. B5 Cattelův indexový graf vlastních čísel	24
Obr. B6 Testování nejlepší hypotézy hledaného protonačního modelu Baricitinibu	26
Obr. B7 Hledání efektivního rozsahu vlnových délek.....	29
Obr. B8 Změna hodnoty pH.....	30
Obr. B9 Vyšetření velikosti změny absorbance Δ_{ij} v pH-absorpčních spektrech	31
Obr. B10 Dekonvoluce vybraného experimentálního spektra	33
Obr. B11 (a) pH-metrická data analyzovaná Bjerrumovou tvornou funkcí (b) Distribuční diagram relativních koncentrací rozličně protonovaných částic Baricitinibu v %.	34
Obr. B12 Reprodukovatelnost odhadů čtyř disociačních konstant.....	37
Obr. B13 Reprodukovatelnost odhadů tří disociačních konstant.....	38
Obr. B14 Diagram závislosti čtyř disociačních konstant pK na pěti teplotách.....	39
Obr. B15 Diagram závislosti třech disociačních konstant pK na pěti teplotách.....	40
Obr. B16 Výpočet molární entalpie ΔH^0 , entropie ΔS^0 a Gibbsovy volné energie ΔG^0	41
Obr. B17 Závislost disociačních konstant na teplotě t^0C $pK_a = f(t^0C)$	43
Obr. V3 Molekulární struktura Valsartanu se zvýrazněnými protonačními místy A a B.....	44
Obr. V4 Cattelův indexový graf.....	45
Obr. V5 Výstavba a testování nejlepšího protonačního modelu Valsartanu	47
Obr. V6 Hledání efektivního rozsahu vlnových délek.....	49
Obr. V7 Upravené pH nezpůsobilo stejnou změnu absorbance ve spektru Valsartanu.....	50
Obr. V8 Analýza změny Δ_{ij} v absorbančních spektrech při nastaveném pH.....	52
Obr. V9 Znázornění dekonvoluce šesti vybraných experimentálních spekter	53
Obr. V10 Reprodukovatelnost hledání protonačního modelu	56
Obr. V11 Reprodukovatelnost disociačních konstant Valsartanu	57
Obr. V12 Závislost smíšených disociačních konstant Valsartanu na druhé odmocnině iontové síly.....	58
Obr. B18 Protonační schéma s distribučním diagramem.....	61
Obr. B19 Protonační schéma Baricitinibu	64
Obr. V13 Protonační schéma Valsartanu.....	65

SEZNAM TABULEK

Tabulka B1.....	27
Tabulka B2.....	35
Tabulka V1.....	48
Tabulka V2.....	55

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

FDA – Food and Drug Administration – Ústav pro kontrolu potravin a léčiv

TNF – Tumor necrosis factor

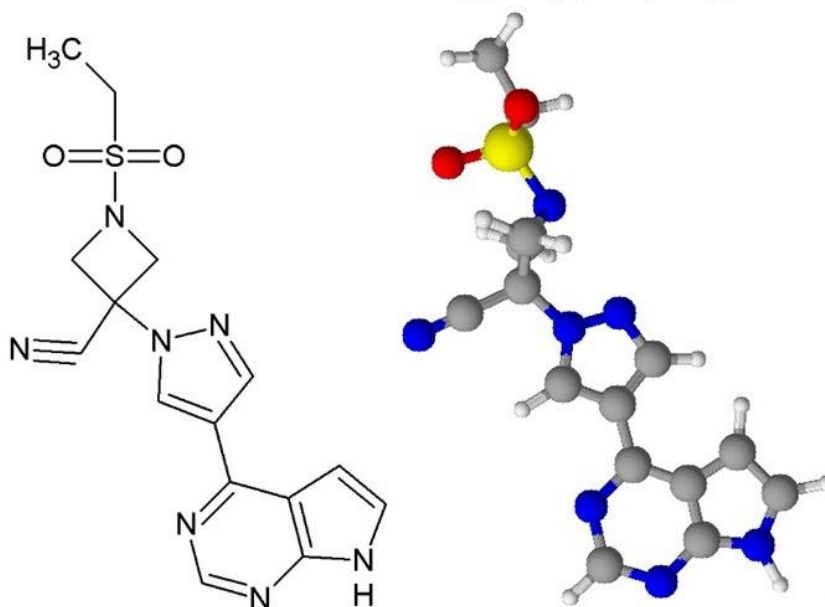
RSS – The residual sum of squares – reziduálová suma čtverců

ÚVOD

Baricitinib

Baricitinib obchodních názvů Olumiant nebo Baricinix patří do třídy organických sloučenin známých jako pyrrolo (2,3-d) pyrimidiny a vyvinul je Incyte a Eli Lilly v roce 2016[1,2]. Jedná se o aromatické heteropolycyklické sloučeniny obsahující pyrrolo (2,3-d) pyrimidinový kruhový systém, což jsou pyrrolopyrimidinové isomery, mající 3 atomy dusíku kruhu v polohách 1-, 5- a 7 (obr. B1). Dne 23. dubna 2018 poradní výbor FDA doporučil schválení 2 mg Baricitinibu pro léčbu revmatoidní artritidy, ale přitom nedoporučil dávku 4 mg pro závažné nežádoucí účinky [3]. Dne 31. května 2018 schválila FDA Baricitinib pro léčbu dospělých pacientů se středně těžkou až těžkou aktivní revmatoidní artritidou, a to u pacientů, kteří neodpovídali na jednu nebo více terapií antagonisty TNF.

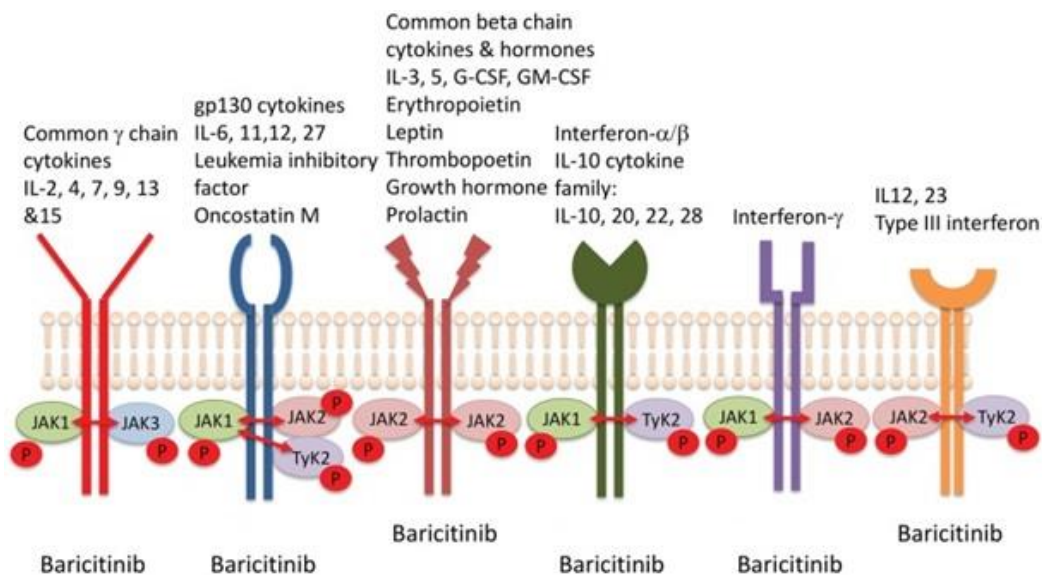
BARICITINIB, C₁₆H₁₇N₇O₂S



Obr. B1 Strukturní vzorec Baricitinibu

Baricitinib má IUPAC název 2- [1- (etansulfonyl) -3- (4- (7H-pyrrolo [2,3-d] pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl) azetidín-3-yl] acetonitril chemického vzorce C₁₆H₁₇N₇O₂S s molekulovou hmotností 371,419 g/mol a vlastní InChI klíč XUZMWHLSEFXCVMG-UHFFFAOYSA-N a UNII ISP4442I3Y. Je registrován pod externími kódy ID INCB-028050, INCB028050, LY-3009104, pod číslem CAS 1187594-09-7. Je ve třídách léčiv antirevmatik a ve farmakoterapeutických třídách imunosupresiv. Mezi předpovězené vlastnosti dostupné v literatuře patří zatím pouze rozpustnost ve vodě 0,357 mg/ml a dvě disociační konstanty pK_a 13,89, pK_a 3,91.

Baricitinib je selektivní a reverzibilní inhibitor Janusovy kinázy 1 (JAK1) a 2 (JAK2) (obr. B2) [4]. Janusovy kinázy patří do skupiny tyrosin proteinových kináz a hrají důležitou roli v signalizaci prozánětlivé dráhy, která je často nadměrně aktivována u autoimunitních poruch, jako je revmatoidní artritida.



Obr. B2 Cytokinová signalizace prostřednictvím izoforem Janusových kináz a jejich inhibitoru [8]

Blokováním účinků JAK1/2 Baricitinib narušuje aktivaci signálních molekul a prozánětlivých mediátorů [5-9]. Enzymy JAK jsou součástí rodiny tyrosin kináz, které se konstitutivně vážou na intracelulární domény cytokinových receptorů [2] a podporují signální kaskády cytokinů a růstové faktory zapojené do krvetvorby, zánětu a imunitních funkcí, které se také podílejí na patogenezi revmatoidní artritidy [10]. Cirkulující prozánětlivé cytokiny se vážou na tyto receptory na buněčném povrchu. Po navázání extracelulárních cytokinů a růstových faktorů jsou JAK fosforylovány a aktivují signální převodníky a aktivátory transkripce STATy. Prostřednictvím signálních kaskád je indukována zánětlivá cytokinová a chemokinová transkripce za vzniku zánětlivých mediátorů, včetně IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-23, IFN- γ a GM-CSF [8]. Baricitinib selektivně a reverzibilně inhibuje JAK1 a JAK2 modulací jejich signální dráhy, čímž snižuje fosforylaci a aktivaci STATů. V izolovaných enzymových testech Baricitinib také vykazoval inhibiční účinek na jiné typy enzymů JAK, tyrosinkinázu 2 a JAK3, při vyšších koncentracích potřebných pro inhibici JAK1/2.

Revmatoidní artritida je progresivní autoimunitní onemocnění obvykle spojené s nepohodlím, diasabilitou a poškozením kloubů. V průběhu progresu může onemocnění dále vést k erozi a deformacím kloubů, což způsobuje předčasnou úmrtnost, funkční poškození a sníženou kvalitu života [9]. Přestože je v léčbě k dispozici několik antirevmatických léků,

modifikujících onemocnění (DMARD), u pacientů často dochází k nedostatečným podpůrným účinkům těchto léků. Na zvířecích modelech zánětlivé artritidy bylo prokázáno, že Baricitinib má významné protizánětlivé účinky, ale také vedl k uchování chrupavky a kosti, aniž bylo možné zjistit potlačení humorální imunity nebo nepříznivé hematologické účinky [1]. V EU byl Baricitinib schválen v únoru 2017 jako orální léčba druhé linie pro středně těžkou až těžkou aktivní revmatoidní artritidu u dospělých, buď jako monoterapie, nebo v kombinaci s methotrexátem.

Jednou z důležitých fyzikálně-chemických vlastností každého léčiva jsou jeho disociační konstanty pK_a , protože biologické a biochemické procesy jsou řízeny přenosem protonů a pH je důležitým faktorem ve formulaci léčiv a jejich zpracování, protože pH usnadňuje skládání a rozklad proteinů, chemickou degradaci a rozpustnost léčiv. Odhaduje se, že dvě třetiny potenciálních léků na trhu jsou ionizovatelné sloučeniny. Protonační rovnováhy a ionizace léčiva jsou zvláště důležité pro předpovídání jejich chování ve fyziologických podmínkách, protože ionizační stav léčiva silně ovlivňuje jeho rozpustnost v místě aplikace [11-13].

1. Disociační konstanta pK_{ai} kyseliny LH_j může být stanovena regresní analýzou potenciometrických titračních dat, metodou nazvanou *pH-metrická analýza* [14-20], u které jsou *společné parametry* (pK_{ai} , $i = 1, \dots, j$) a *skupinové parametry* (E^0 , L_0 , H_T) současně numericky odhadnuty a regresním procesem iteračně zjemněny [11]. K analýze pH potenciometrických titračních dat byl použit regresní program ESAB [14].

2. *UV-metrická spektrální analýza* [23] je alternativní obzvláště vysoce citlivou a často používanou metodou ke stanovení smíšených disociačních konstant pK_a ve velmi zředěných vodných roztocích. Předností metody je relativně jednoduché zařízení, u kterého se může pracovat i s velmi nízkými koncentracemi submikro-molárních sloučenin (*tj.* 10^{-5} až 10^{-6} mol·dm⁻³), [24-27].

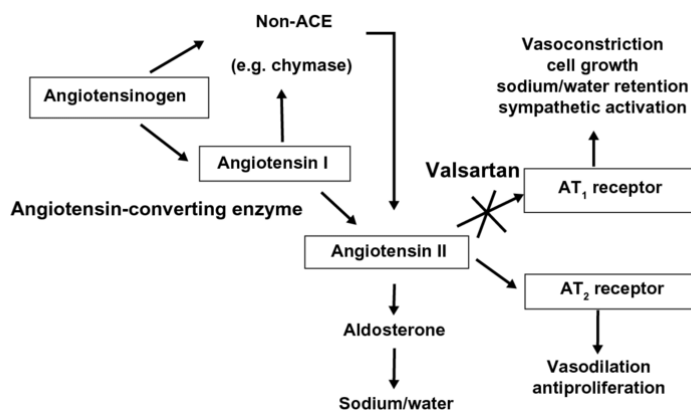
3. Kvantově-chemicky předpovězenou disociační konstantu pK_a v protonačním modelu lze vyčíslit dosazením strukturního vzorce molekuly léčiva do některého z prediktivních programů ACD/pK nebo ACD/Percepta [28,29], PALLAS [30] a MARVIN [31-36], které byly potvrzeny jako nejlepší z devíti dostupných predikčních programů [37-39].

Cílem této studie byla *UV-metrická spektrální analýza* u léčiva Baricitinibu a alternativně *pH-metrická analýza* titrační křivky protonačního modelu pro optimalizaci experimentálních podmínek ke spolehlivému stanovení všech blízkých postupných disociačních konstant a dále následný výpočet tří termodynamických parametrů disociace, jako jsou entalpie, entropie a Gibbsova volná energie.

Podrobný návod k titraci pH-absorpčních spekter UV/VIS, zvaný *UV-metrická spektrální analýza* a alternativně *pH-metrická analýza*, byl dříve popsán ve svých 10 krocích postupu [37].

Valsartan

Blokátory receptorů pro angiotenzin II (ARB), známé také pod názvem sartany, představují významnou skupinu léčiv používaných při léčbě hypertenze, srdečního selhání, infarktu myokardu a diabetické nefropatie [40]. *Valsartan* obchodního názvu Diovan nebo Novartis se používá hlavně k léčbě vysokého krevního tlaku, městnavého srdečního selhání a k prodloužení života po infarktu [40,41]. Je to antagonistu receptoru pro angiotenzin II (obr. V1), běžně nazývaný ARB nebo blokátor receptoru angiotenzinu, který je selektivní pro angiotenzinový receptor typu I [42].



Obr. V1 Mechanismus účinku Valsartanu [64]

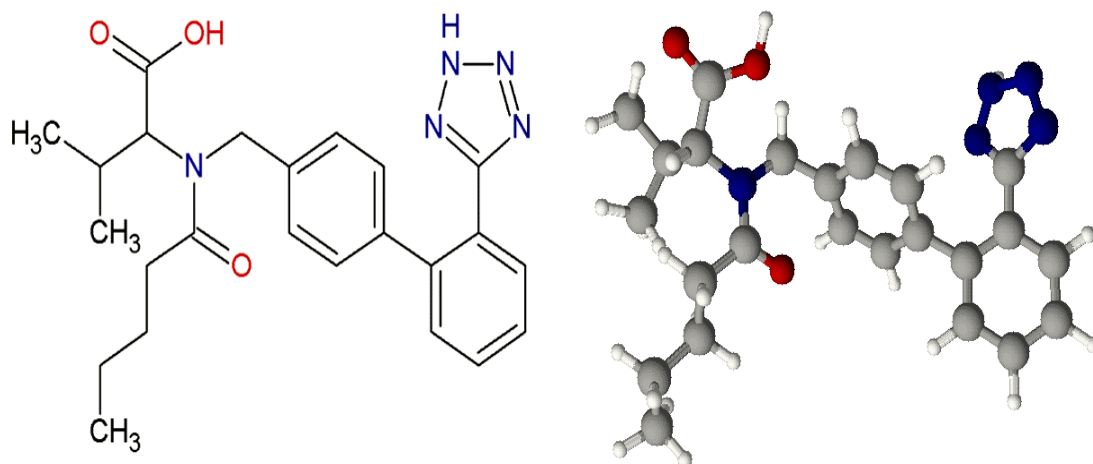
Valsartan se také používá ke snížení úmrtnosti lidí s dysfunkcí levé komory po srdečním infarktu [43]. U lidí s diabetem typu II a vysokým krevním tlakem nebo albuminem v moči se Valsartan používá ke zpomalení vývoje a zhoršení onemocnění ledvin v konečném stádiu [44]. Valsartan blokuje působení angiotenzinu II, které zahrnuje zúžení cév a aktivaci aldosteronu a dochází ke snížení krevního tlaku [45].

Název a vzorec Valsartanu dle IUPAC je (*S*)-3-methyl-2-(*N*-[[2'-(2*H*-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl] methyl] pentan amido) butanoic acid a $C_{24}H_{29}N_5O_3$. Molární hmotnost Valsartanu je 435,528 g/mol, bod tání 116–117 °C a rozpustnost ve vodě 4,406 mg/l při 25 °C. Je rozpustný v ethanolu a methanolu (23,4 mg/l). Valsartan je diprotická kyselina se skupinou karboxylové kyseliny a tetrazolovým kruhem (obr. V2).

Grujič a ostatní [40] stanovili potenciometricky pK_a následujících sartanů: pK_{a1} 3,88 a pK_{a2} 4,55 pro Irbesartan, pK_{a1} 3,27 a pK_{a2} 4,60 pro Losartan a pK_{a1} 3,79 (imidazol) a pK_{a2} 4,55 (tetrazol) pro Valsartan. Blízké hodnoty dvou po sobě jdoucích disociačních konstant poukazují na překrývající se protolytickou rovnováhu, která výrazně komplikuje vyčíslení hodnot pK_a k odpovídajícím ionizovatelným centřům. Znalost hodnot pK_a léčiv je nutná pro provádění testů biofarmaceutické charakterizace a při vývoji nových farmaceutických přípravků nebo zlepšování nových přípravků [40]. Definování ionizačního profilu léčiv je zvláště

významné pro predikci jejich chování ve fyziologických podmínkách, kde ionizační stav silně ovlivňuje rozpustnost léčiv v místě aplikace a jejich schopnost difúze biologickými membránami [46].

Valsartan, $C_{24}H_{29}N_5O_3$



Obr. V2 Strukturní vzorec Valsartanu

Cílem naší studie byla *UV-metrická spektrální analýza* u léčiva Valsartanu a alternativně *pH-metrická analýza* titrační křivky protonačního modelu pro optimalizaci experimentálních podmínek ke spolehlivému stanovení všech blízkých postupných disociačních konstant a výpočet termodynamických parametrů jako je entalpie, entropie a Gibbsova energie.

1 EXPERIMENTALNÍ ČÁST

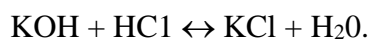
1.1 Chemikálie a roztoky

Baricitinib, dodaný firmou ZENTIVA k. s., (Praha) s deklarovanou čistotou HPLC-metodou a alkalimetry, byl > 99 %. Toto léčivo bylo naváženo přímo do reakční nádoby a vedlo k výsledné analytické koncentraci, vyjádřené termínem „asi přesně“ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. **Valsartan** od firmy ZENTIVA k.s., (Praha) měl deklarovanou čistotu > 99 %, zkontrolovanou HPLC a alkalimetry. Lék byl zvážen přímo do reakční nádoby, výsledkem byla koncentrace asi $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Kyselina chlorovodíková, $1,0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, byla připravena zředěním koncentrované HCl (p.a., Lachema Brno) redestilovanou vodou a standardizací proti HgO s KI s reprodukovatelností lepší než 0,002 podle rovnice:



a



Hydroxid draselný, $1,0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl připraven z přesné hmotnosti pelet (p. a., Aldrich Chemical Company) s redestilovanou vodou bez oxidu uhličitého, která byla předem udržována po dobu 50 minut v ultrazvukové lázni. Roztok byl skladován několik dní v polyethylenové láhvi v atmosféře argonu a byl standardizován potenciometricky proti roztoku *hydrogen-ftalátu draselného* a vyhodnocením bodu ekvivalence derivační metodou s reprodukovatelností 0,001.

Oxid rtuťnatý, jodid draselný a chlorid draselný, (p. a., Lachema Brno) nebyly extra čištěny. Dvakrát **redestilovaná voda** byla udržována po dobu 50 minut před použitím v ultrazvukové sonografické lázni pro přípravu roztoků.

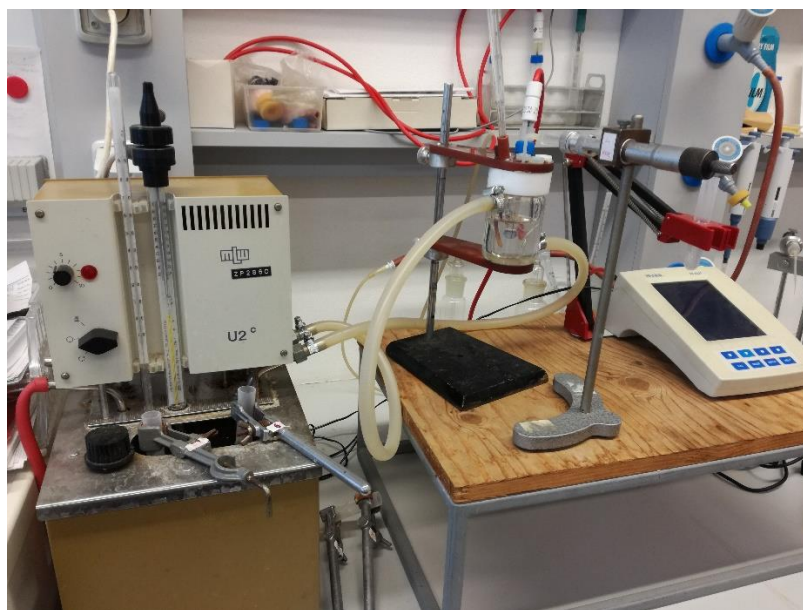
1.2 Přístroje

Použitý přístroj a oba titrační postupy byly již dříve podrobně popsány v našich publikacích [37,47,48]. Koncentrace volných vodíkových iontů $[\text{H}^+]$ byla měřena na digitálním voltmetru Hanna HI 3220 s přesností $\pm 0,002 \text{ pH}$ s použitím kombinované skleněné elektrody Theta HC 103-VFR.

Potenciometrické titrace léčiva s hydroxidem draselným byly prováděny s použitím aktivní stupnice. Standardizace pH metru byla prováděna s použitím standardních hodnot pufrů WTW, 4,006 (4,024), 6,865 (6,841) a 9,180 (9,088) při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (v závorkách).

Spektrofotometrická titrace s registrací absorbančního spektra při 300 vlnových délkách byla prováděna následujícím způsobem: vodný roztok $20,00 \text{ cm}^3$ obsahující $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ léčiva, $0,100 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kyseliny chlorovodíkové, $2,44 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ fosforečnanového pufru

a 10 cm³ indifferentního roztoku KCl pro úpravu iontové síly byl titrován standardním 1,0 mol·dm⁻³ KOH při 25 °C a 37 °C a zaznamenáno 80 absorpčních spekter. Titrace byly prováděny ve skleněné nádobě s pláštěm o dvojitě stěně, naplněným termostatovanou vodou objemu 100 ml, a nádoba byla uzavřena teflonovou zátkou, obsahující měrné a referenční elektrody, přívod argonu, teploměr, vrtulové míchadlo a vlasové kapilární ústí pístové mikrobyrety [49] (obr. B3).



Obr. B3 Uspořádání experimentu

Všechna měření pH byla prováděna při 25,0 °C ± 0,1 °C a 37,0 °C ± 0,1 °C. V průběhu titrace léčiva byl roztok probubláván proudem argonu za účelem dokonalého promíchání a udržení inertní atmosféry. Argon přitom procházel vodným iontovým médiem dvěma promývacími nádobami, které také obsahovaly užívané titrační médium před vstupem do titrovaného roztoku v reaktúrku. Použité mikrobyrety byly o objemu 1250 µL (META, Brno), opatřené mikrometrickým šroubem 25,00 cm [49]. Vlasové polyethylenové kapilární ústí pístové mikrobyrety bylo ponořeno do roztoku titrantu během přidávání titrantu, ale po každém přidavku titrantu bylo ústí z titrantu vytaženo, aby se zabránilo samovolného úniku titrantu během odečtu pH. Mikrobyreta byla kalibrována desetinásobným opakováním procesu přidávání celkového objemu dodané vody a zvážením její hmotnosti na vahách Sartorius 1712 MP8. Následovalo statistické vyhodnocení střední hodnoty a směrodatné odchylky, což vedlo k přesnosti přidavku ± 0,015 % objemu titrantu v celém rozsahu prováděné titrace. Po přidavku byl roztok léčiva vždy transportován do kyvety peristaltickou pumpou, která byla součástí spektrofotometru Cintra 40 (GBC, Austrálie) a následně elektronicky zaznamenáno spektrum při 300 vlnových délkách na pevný disk počítače.

1.3 Software

Odhad disociačních konstant byl proveden nelineární regresní analýzou souboru 80 pH-absorbančních spekter, naměřených UV-metrickou spektrální analýzou s využitím dvou osvědčených programů SQUAD84 [34,37,50,51] a REACTLAB [52] a nalezený chemický model se svými parametry byl porovnán s pH-metrickou analýzou titrační křivky protonačního modelu programem ESAB [14]. Spektrální interpretace faktorové analýzy při vyčíslení *hodnosti* pH-absorbanční matice léčiva programem INDICES [53] spolehlivě určila počet světlo-absorbujících částic rovnovážné směsi n_c . Grafy spekter léčiva byly kresleny programem ORIGIN 9.1 [54]. Programy ACD/Percepta [28,29], PALLAS [30] a MARVIN [32,33] sloužily k predikci disociačních konstant pK_a a vycházely vždy ze strukturního vzorce léčiva Baricitinibu nebo Valsartanu.

2 VÝSLEDKY

2.1 Baricitinib

Metody numerické analýzy pH-spekter a pH-potenciometrických titračních křivek se ukázaly být nejlepšími instrumentálními metodami, protože spolehlivě určují i blízké postupné disociační konstanty, a to i v případě špatně rozpustných léčiv. pH-spektrofotometrická titrace *UV-metrickou spektrální metodou* byla použita jako alternativní metoda k pH-potenciometrické titraci *pH-metrickou metodou* k určení disociačních konstant při velkých hodnotách molárních absorpčních koeficientů a prokázala vysokou citlivost na koncentraci studovaného léčiva Baricitinibu, a tím umožňovala použít nízkou koncentraci $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ jinak obtížně rozpustného léčiva.

2.1.1 UV-metrická spektrální analýza

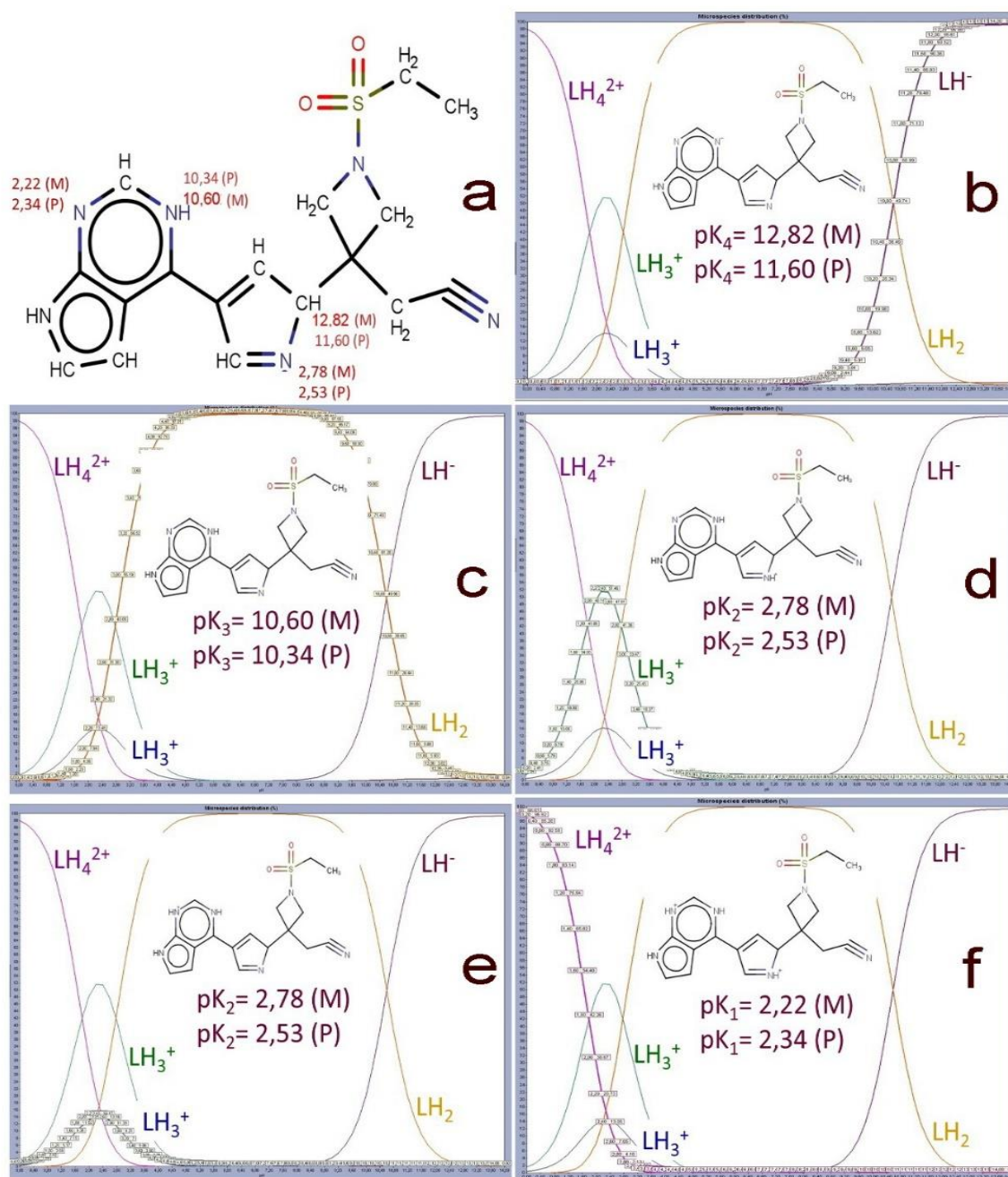
Experimentální postup a výpočetní strategie regresní analýzy pro stanovení disociačních konstant *UV-metrickou spektrální analýzou* byly popsány v 10 krocích v publikovaném sdělení Tutorial [37] a lze ho nalézt také na str. 226 v učebnici [55]: *Výstavba chemického modelu v iontových rovnováhách* se obecně týká následujících výpočtů: stanovení počtu protonačních rovnováh, dále stanovení počtu rozličně protonovaných částic, výpočet jejich zastoupení v relativním koncentračním diagramu a také sestavení grafu molárních absorpčních koeficientů v rozsahu měřených vlnových délek, a konečně obsahuje výpočet řady statistických kritérií za účelem testování spolehlivosti postaveného chemického (zde protonačního) modelu.

2.1.1.1 Krok 1: Teoretická predikce disociačních konstant Baricitinibu:

Prvním krokem UV-metrické spektrální metody byla predikce hodnot disociačních konstant, založená na kvantově-chemickém výpočtu, vycházejícího ze strukturního vzorce studované molekuly léčiva.

Baricitinib je aromatická heteropolycyklická sloučenina, obsahující pyrrolo(2,3-d)pyrimidinový kruh, který je pyrrolopyrimidinovým isomerem se 3 dusíkovými atomy v 1-, 5-, a 7-polohách (obr. B1). Predikční program MARVIN identifikoval v Baricitinibu čtyři protonizovatelná centra, která by mohla být teoreticky spojena se čtyřmi predikovanými disociačními konstantami (obr. B4). Predikční programy MARVIN (M) a PALLAS (P) předpověděly disociační konstanty mírně se vzájemně lišící, takže bylo zřejmé, že experimentální stanovení je zde nutné, protože by mohlo nabídnout spolehlivější výsledky. V části obr. B4a je přehled všech predikovaných disociačních konstant dvěma programy M a P. Obr. B4b až B4f ilustrují distribuční diagram rozličně protonovaných částic a ukazují

na protonační centra ve spojitosti s dotyčnou disociační konstantou. Obr. B4d a B4e ukazuje dvě alternace protonačních center u disociační konstanty pK_{a2} a jejich interpretaci v distribučním diagramu.

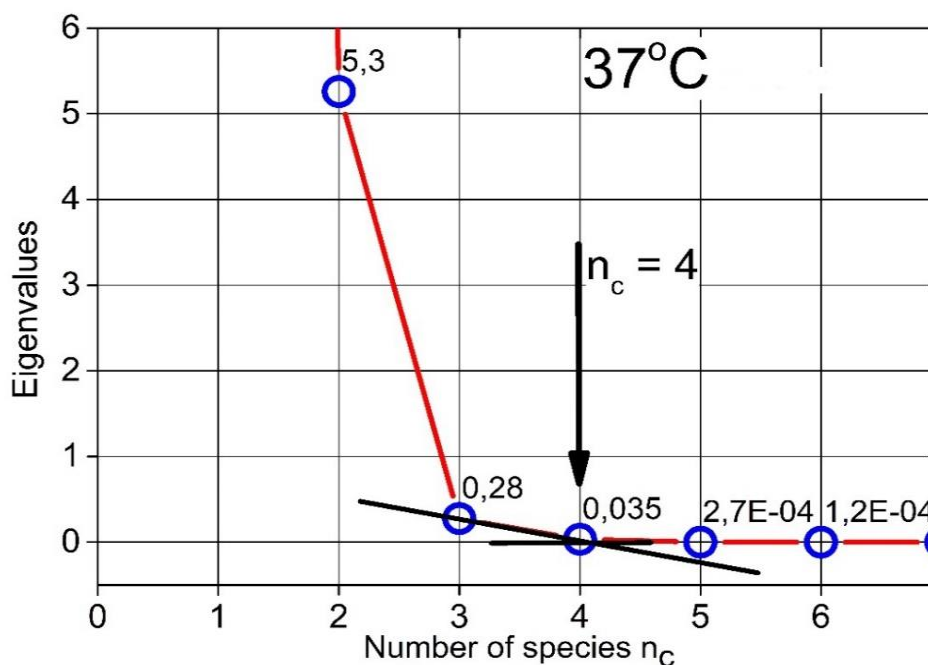
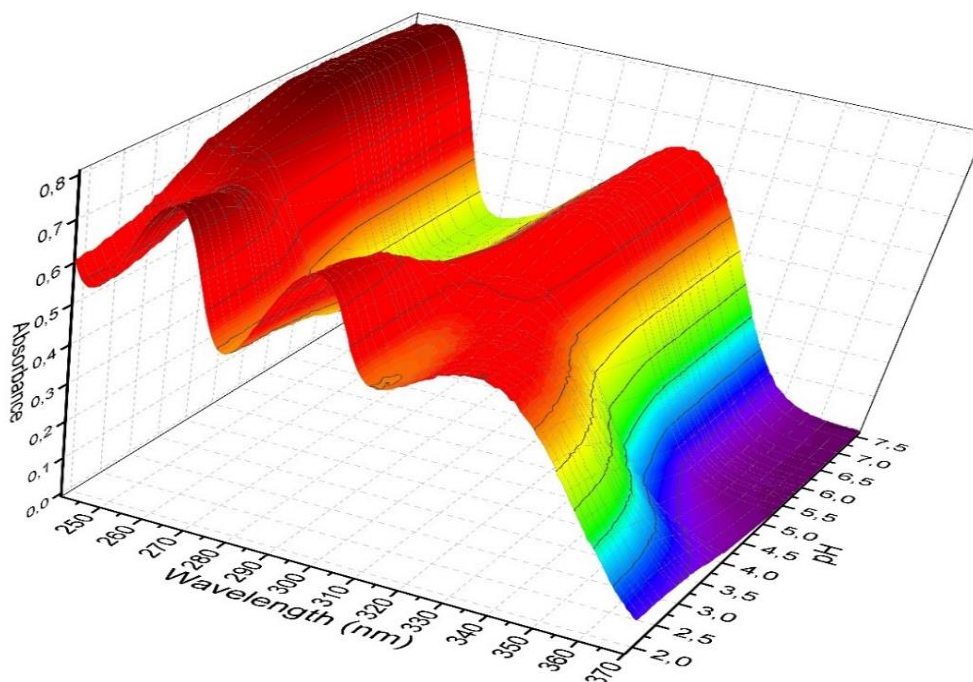


Obr. B4 Teoretická predikce disociačních konstant Baricitinibu vychází ze strukturálního vzorce a vyznačuje protonační centra, ve kterých ukazuje predikované hodnoty disociačních konstant pK_a včetně distribučního diagramu relativních koncentrací rozličně protonovaných částic LH^- , LH_2 , LH_3^+ , LH_4^{2+} s využitím programů MARVIN (M) and PALLAS (P).

2.1.1.2 Krok 2: Určení počtu světlo-absorbujících částic n_c :

Před vlastní regresní analýzou pH-absorpčních spekter UV-metrické spektrální metody byla použita faktorová analýza k filtraci vlastních čísel (SVD) druhého momentu absorbanční

matice pro určení *hodnosti absorbanční matice* [53,56]. Technika faktorové analýzy je založena na faktu, že pokud se spektrální datová matice skládá z r příspěvků světlo-absorbujících chemických částic, pak první r faktory absorbanční matice obsahují převážnou většinu důležitých chemických informací, získaných experimentem. Hodnota r pak značí *hodnost absorbanční matice* a obecně by měla být menší nebo rovna počtu světlo-absorbujících rozličně protonovaných částic m .



Obr. B5 Cattelův indexový graf vlastních čísel ukazuje na zlom křivky závislosti vlastních čísel pH-absorbanční matice Baricitinibu na faktorech, který odpovídá hodnotě matice $k^* = 3$ nebo 4 a počtu světlo-absorbujících částic $n_c = 3$ (a $s_k(A) = 0,28$ mAU) nebo 4 (a $s_k(A) = 0,035$ mAU), kde v závorce je uvedena směrodatná odchylka reziduí absorbance $s_k(A)$ (INDICES v S-PLUS) [53].

Vyšetření vlastních hodnot absorbanční matice pak ukazuje, že první faktory jsou statisticky významné až do zlomu na Cattelově indexovém grafu vlastních čísel, od kterého jsou již ostatní vyčíslené faktory statisticky nevýznamné a mohou být proto zahrnuty do experimentálního šumu monitorované absorbance. Protože změna nastavovaného pH nevyvolává dostatečnou změnu ve spektrech a spektra některých částic jsou si značně podobná, nebývá někdy zlom na Cattelově křivce jednoznačný.

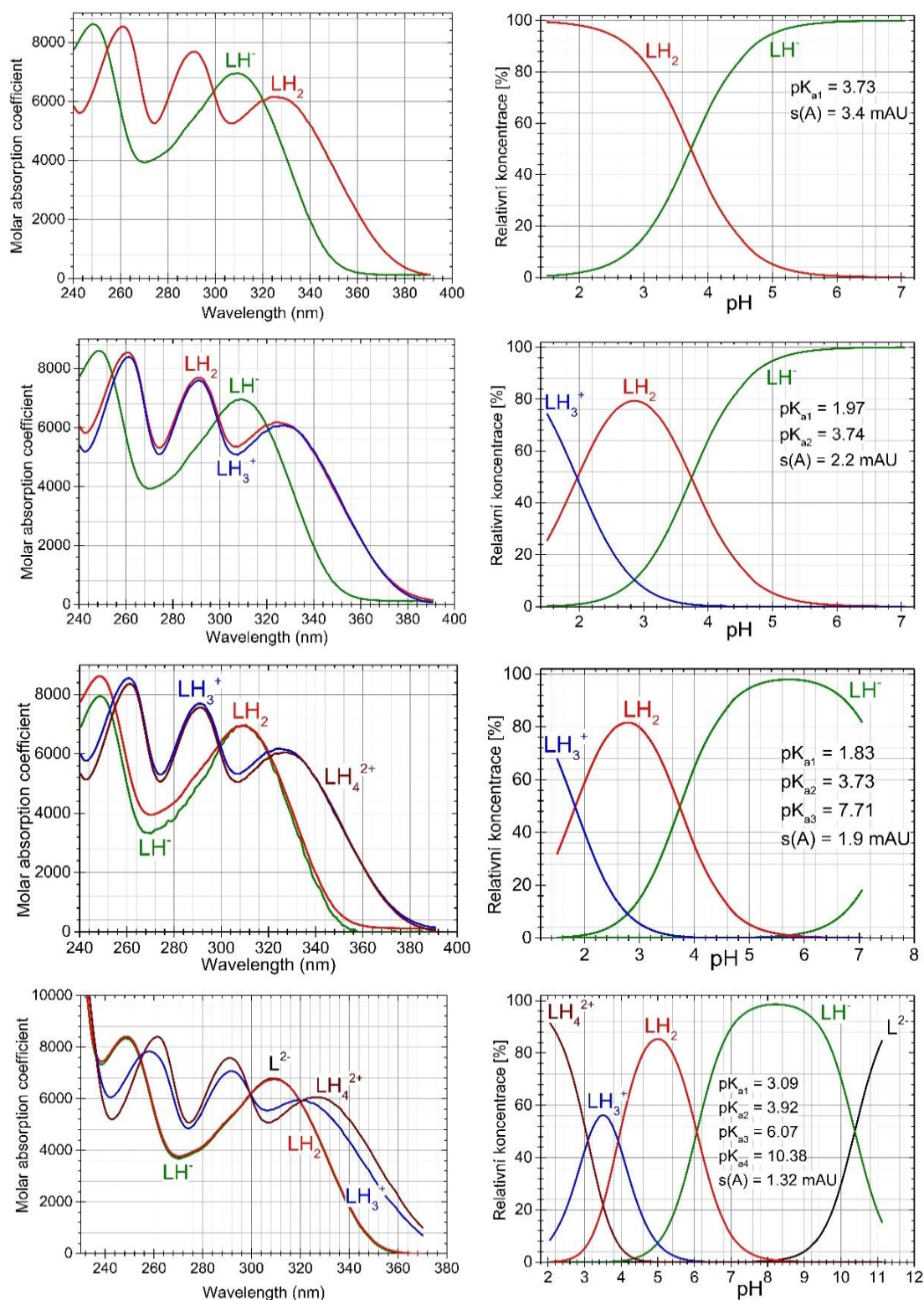
Cattelův indexový graf vlastních čísel [56] (obr. B5) ukázal, že celá matice pH-absorpčních spekter Baricitinibu při vlnových délkách 240–370 nm indikovala tři nebo čtyři světlo-absorbující částice v rovnovážné směsi $n_c = k^* = 3$ či 4 s experimentální hladinou šumu $s_k(A) = s_{\text{inst}}(A) = 0,28$ nebo $0,035$ mAU. Dále se ukázalo, že spektra molárních absorpčních koeficientů prvního páru částic L^{2-} a LH^- si byla velmi podobná. Skutečný počet světlo-absorbujících částic, oddělených od spektrálního šumu, lze věrohodně vyhodnotit spolehlivěji nelineární regresní analýzou spektrálních dat ve výstavbě chemického modelu.

2.1.1.3 Krok 3: Výstavba a testování chemického (protonačního) modelu:

V programu REACTLAB byla použita nelineární regresní analýza při zpracování pH-absorbančních spekter UV-metrickou spektrální metodou technikou regresního tripletu (kritika dat, kritika modelu a kritika numerické metody), dle postupu uvedeného v ref. [55,57-59].

Hledání nejlepší hypotézy protonačního modelu s jednou, dvěma, třemi a čtyřmi disociačními konstantami je znázorněno ve výsledných grafech molárních absorpčních koeficientů a distribučních diagramů odlišně protonovaných částic (obr. B6) pro navrhanou hypotézu protonačního modelu. Kritériem v hledání nejlepší hypotézy regresního modelu se používá test spolehlivosti těsnosti proložení vypočtených spekter experimentálními body pH-absorbančních spekter, který byl zde zjednodušen na vyčíslení směrodatné odchylky absorbance po terminaci regresního procesu dle vzorce, $s(A) = \sqrt{RSS/(n - m)}$, kde n je počet experimentálních bodů a m je počet odhadovaných parametrů [57,60].

Výstavba chemického (protonačního) modelu [55] tvoří rozhodovací kritérium pro přijetí vypočtených parametrů včetně svých statistických diagnostik pro testovanou hypotézu. Na obrázku B6 to je formou směrodatné odchylky regresované absorbance $s(A)$, která vystihuje dosaženou těsnost proložení. Jako nejlepší protonační model se ukázal model se čtyřmi disociačními konstantami, protože dosahoval nejnižší hodnoty $s(A) = 1,32$ mAU potvrzující nejtěsnější proložení. Křivky molárních absorpčních koeficientů částic LH_2 a LH_3^+ v modelu dvou pK při $s(A) = 2,2$ mAU jsou téměř totožné, pro částice LH_2 , LH_3^+ a LH_4^{2+} v modelu tří pK a při $s(A) = 1,9$ mAU jsou velmi blízké a konečně pro částice L^{2-} , LH^- a LH_2 jsou téměř totožné v modelu čtyř pK a při $s(A) = 1,32$ mAU.



Obr. B6 Testování nejlepší hypotézy hledaného protonačního modelu Baricitinibu v rozmezí pH 2 až 13 ukazuje na čtyři disociační konstanty pK_{a1} , pK_{a2} , pK_{a3} a pK_{a4} , spektrální analýzou $1,0 \times 10^{-4}$ mol·dm⁻³ Baricitinibu při 25 °C. *Vlevo*: Profily molárních absorpčních koeficientů rozličně protonovaných částic Baricitinibu ϵ_{LH} , ϵ_{LH2} , ϵ_{LH3} , ϵ_{LH4} proti vlnové délce (nm), *Vpravo*: Distribuční diagram relativních koncentrací různě protonovaných částic v protonačním modelu v závislosti na pH (REACTLAB, ORIGIN 9).

Tabulka B1 Reprodukovatelnost nejlepšího protonačního modelu Baricitinibu v rozmezí pH od 2 do 13 pro čtyři disociační konstanty pK_{a1} , pK_{a2} , pK_{a3} , pK_{a4} programem REACTLAB při 25 °C a 37 °C. Roztok o koncentraci 1.0×10^{-4} M Baricitinibu při $I = 0,002$ pro n_s spektra, měřená při n_w vlnových délkách pro $n_z = 2$ základní složky L a H tvoří různě protonované částice. Kritérium rozlišení a spolehlivosti zjištěných odhadů parametrů jsou prokázány statistickými analýzami reziduí, jako jsou průměr reziduí $E|\bar{e}|$ [mAU], směrodatná odchylka absorbance po ukončení regresního procesu $s(\hat{e})$ [mAU] a sigma $s(A)$ [mAU] z REACTLABu.

Reprodukovatelnost	25 °C				37 °C				
	1.měření	2.měření	3.měření	4.měření	Průměr	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr
Cattelův indexový graf vlastních čísel k odhadu hodnoty absorbanční matice									
Počet naměřených spekter, n_s	67	82	122	128		51	54	49	
Počet vlnových délek, n_w	141	153	153	153		141	141	141	
Počet světlo-absorbujících částic, k^*	4	4	4	4		4	4	4	
Odhady disociačních konstant v hledaném protonačním modelu									
$pK_{a1}(s_1)$, $LH_4^{2+} \rightleftharpoons H^+ + LH_3^+$	REACTLAB	2,99	2,93	3,09	3,20	3,05	3,09	3,09	3,09
$pK_{a2}(s_2)$, $LH_3^+ \rightleftharpoons H^+ + LH_2$	REACTLAB	3,83	3,80	3,91	3,93	3,87	3,50	3,48	3,56
$pK_{a3}(s_3)$, $LH_2 \rightleftharpoons H^+ + LH$	REACTLAB	6,43	6,68	6,49	6,43	6,51	4,58	4,61	4,60
$pK_{a4}(s_4)$, $LH \rightleftharpoons H^+ + L^{2-}$	REACTLAB	12,19	12,30	12,34	12,63	12,37	12,88	12,89	12,90
Test těsnosti proložení statistickou analýzou reziduí									
Průměr abs.reziduí $E \bar{e} $, [mAU]	REACTLAB	0,94	1,52	1,54	2,06		1,72	1,92	1,98
Směrodatná odchylka $s(\hat{e})$, [mAU]	REACTLAB	1,03	1,16	1,18	1,28		1,92	1,99	2,01
Sigma z REACTLABu, $s(\hat{e})$, [mAU]	REACTLAB	1,22	1,99	1,97	2,66		2,35	2,55	2,70

Ukázalo se, že výstavba protonačního modelu Baricitinibu nebyla snadným úkolem, protože tato sloučenina vykazovala jednak tři blízké postupné disociační konstanty ($|pK_{a,i+1} - pK_{a,i}| < 3$), a dále změna pH při titraci jenom mírně ovlivnila absorbanci chromoforů ve spektrech. Obě disociační konstanty byly proto špatně podmíněny v regresním modelu a jejich stanovení bylo proto zatíženo určitou mírou nejistoty.

V tabulce B1 lze sledovat numerické odhady disociačních konstant vypočtené regresním programem REACTLAB: průměr reziduí $E|e|$ [mAU], reziduálová směrodatná odchylka $s(e)$ [mAU] ukázala, že bylo dosaženo dostatečně těsného proložení vypočtených spekter experimentálními body všech spekter pro navržený protonační model se čtyřmi disociačními konstantami. Spolehlivost vypočtených odhadů regresních parametrů může být také testována následujícími regresními diagnostikami (Tabulka B1 a obr. B6), jak bylo vysvětleno na straně 226 v ref. [55].

(a) Fyzikální význam odhadů neznámých regresních parametrů: V levé části obr. B6 byla znázorněna spektra molárních absorpčních koeficientů rozdílně protonovaných $\epsilon_L, \epsilon_{LH}, \epsilon_{LH2}, \epsilon_{LH3}, \epsilon_{LH4}$ částic Baricitinibu versus vlnová délka. V případě, že dvojice křivek molárních absorpčních koeficientů ϵ je blízká nebo téměř stejná, hypotéza protonačního modelu může být nejistá nebo dokonce nepravdivá.

(b) Fyzikální význam koncentrací částic: Distribuční diagram relativních koncentrací všech částic v pravé části obr. B6 ukázal na protonační rovnováhu odlišně protonovaných částic $L^{2-}, LH^-, LH_2, LH_3^+, LH_4^{2+}$ a z grafu vyplynulo, že žádná z těchto částic nebyla statisticky nevýznamná, a proto všechny částice mají fyzikální význam.

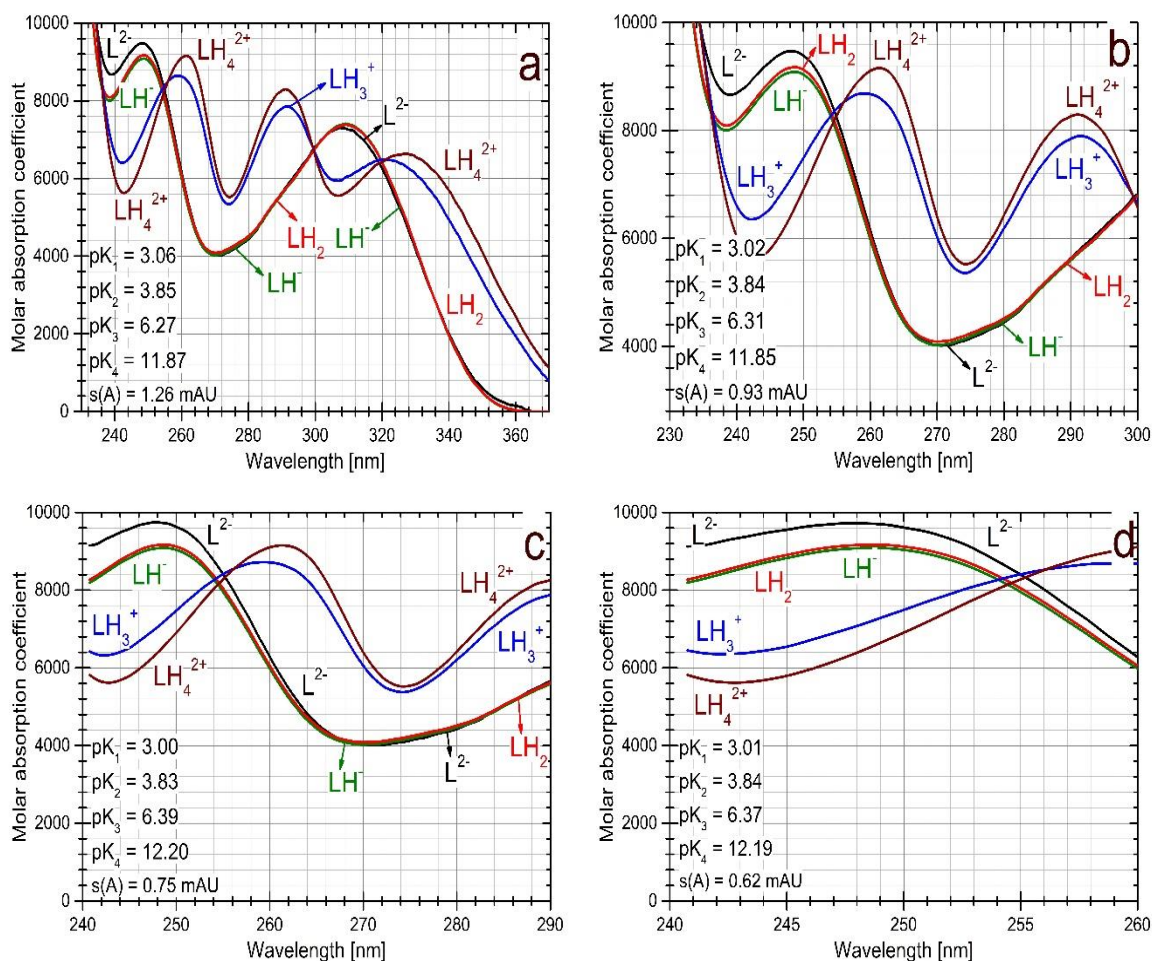
(c) Zkouška těsnosti proložení vypočtených spekter: Statistická analýza všech reziduí ukázala, že bylo dosaženo minima eliptického hyperparaboloidu sumy čtverců reziduí RSS -funkce (Tabulka B1), protože průměr reziduí $E|\bar{e}|$ [mAU] a směrodatná odchylka reziduí $s(\bar{e})$ [mAU] dosáhly velmi nízkých hodnot menších než 2 mAU, což představuje méně než 0,2 % naměřené hodnoty absorbance.

2.1.1.4 Krok 4: Efektivní rozsah vlnových délek:

Byly vybrány čtyři rozsahy vlnových délek (a) 230–370 nm, (b) 230–300 nm, (c) 240–290 nm a (d) 240–260 nm a byla vyhodnocena spektra v těchto rozmezích. Obr. B7 ilustruje věrohodnost vyčíslených odhadů čtyř disociačních konstant včetně těsnosti proložení spekter, vyjádřené směrodatnou odchylkou absorbance $s(A)$, která zde sloužila za kritérium spolehlivosti vyčíslených odhadů parametrů. Nejtěsnějšího proložení vypočtených spekter experimentálními body s kritériem těsnosti proložení $s(A) = 0,62$ mAU bylo dosaženo pro interval vlnových délek (d) 240–260 nm, i když odhady disociačních konstant ve všech

čtyřech testovaných rozmezech vlnových délek byly blízké a téměř shodné. Protože křivky molárních absorpčních koeficientů částic ϵ_{L2-} , ϵ_{LH-} , ϵ_{LH2} byly ve značném počtu vlnových délek téměř totožné, vedlo to k závěru, že změna pH roztoku neovlivňovala významně dotyčný chromofor.

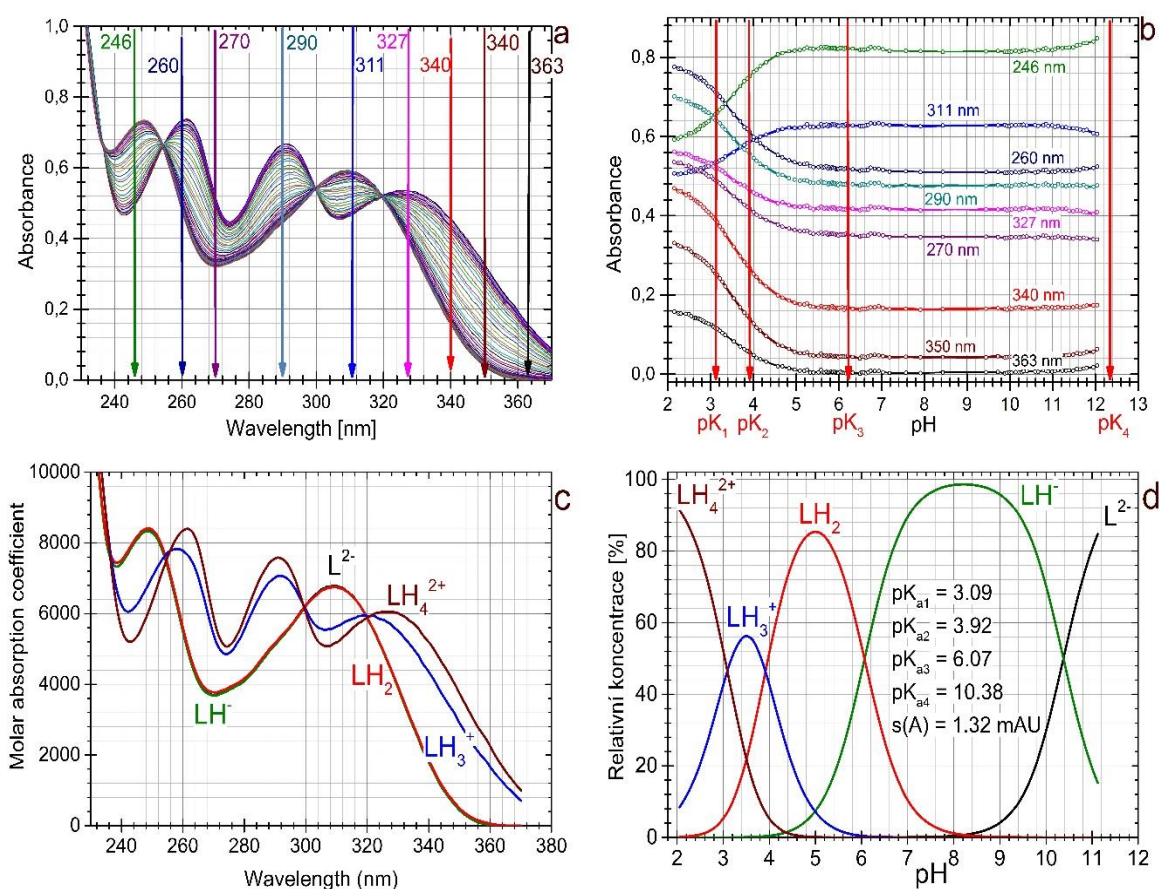
Stanovení disociačních konstant pK_{a2} a pK_{a3} a konečně i pK_{a4} bylo zatíženo značnou nejistotou, která se projevila ve vyšší hodnotě směrodatné odchylky odhadu disociační konstanty pK_a , a tím pádem i v jejím širším intervalovém odhadu. Blízké hodnoty dvou disociačních konstant pK_{a1} a pK_{a2} vedou rovněž k malému rozdílu ve spektrech molárních absorpčních koeficientů ϵ_{LH3} a ϵ_{LH4} . Porovnání čtyř grafů B7a, B7b, B7c, B7d ukazuje, že nejuvhodnější oblastí vlnových délek spektra pro nelineární regresní analýzu se jeví oblast (d) 240–260 nm, protože vykazuje nejlepší odezvu chromoforů na změnu pH čili největší rozdíly mezi křivkami molárních absorpčních koeficientů.



Ob. B7 Hledání efektivního rozsahu vlnových délek k vyšetření polohy ionizovatelných skupin chromoforů Baricitinibu pro dostatečnou změnu absorbance spekter při proměňovaném pH vede ke spolehlivému stanovení všech disociačních konstant hledaného protonačního modelu. Protonační model čtyř disociačních konstant byl analyzován pomocí čtyř rozsahů absorpčních pásů. Nejuvhodnější oblast vlnových délek byla v rozsahu 240–280 nm s $s(A) = 0,62$ mAU, i když odhady pK_a byly většinou podobné pro všechny testované rozsahy vlnových délek.

2.1.1.5 Krok 5: Změna absorbance ve spektrech při titraci pH:

Obr. B8 ukázal citlivost chromoforů v molekule Baricitinibu na změnu pH, která byla sledována ve formě A-pH křivek. Změna pH nezpůsobila vždy významnou změnu spektra Baricitinibu u všech vlnových délek stejně, protože některé chromofory byly méně ovlivněny změnou pH. Obr. B8c znázorňuje spektrum molárních absorpčních koeficientů v závislosti na vlnové délce pro uvedených devět vybraných vlnových délek na obr. B8a, pro které byly zobrazeny křivky A-pH na obr. B8b. Maximální změna absorbance zde nastává při změnách pH v okolí vlnové délky 340 nm a 260 nm. Grafy přinášejí odhady disociačních konstant a přítomnost rozdílně protonovaných částic. Z těchto grafů bylo zřejmé, že dvě disociační konstanty $pK_{a1} = 3,09$ a $pK_{a2} = 3,92$ byly blízké a jejich odhad byl proto zatížen větší nejistotou.



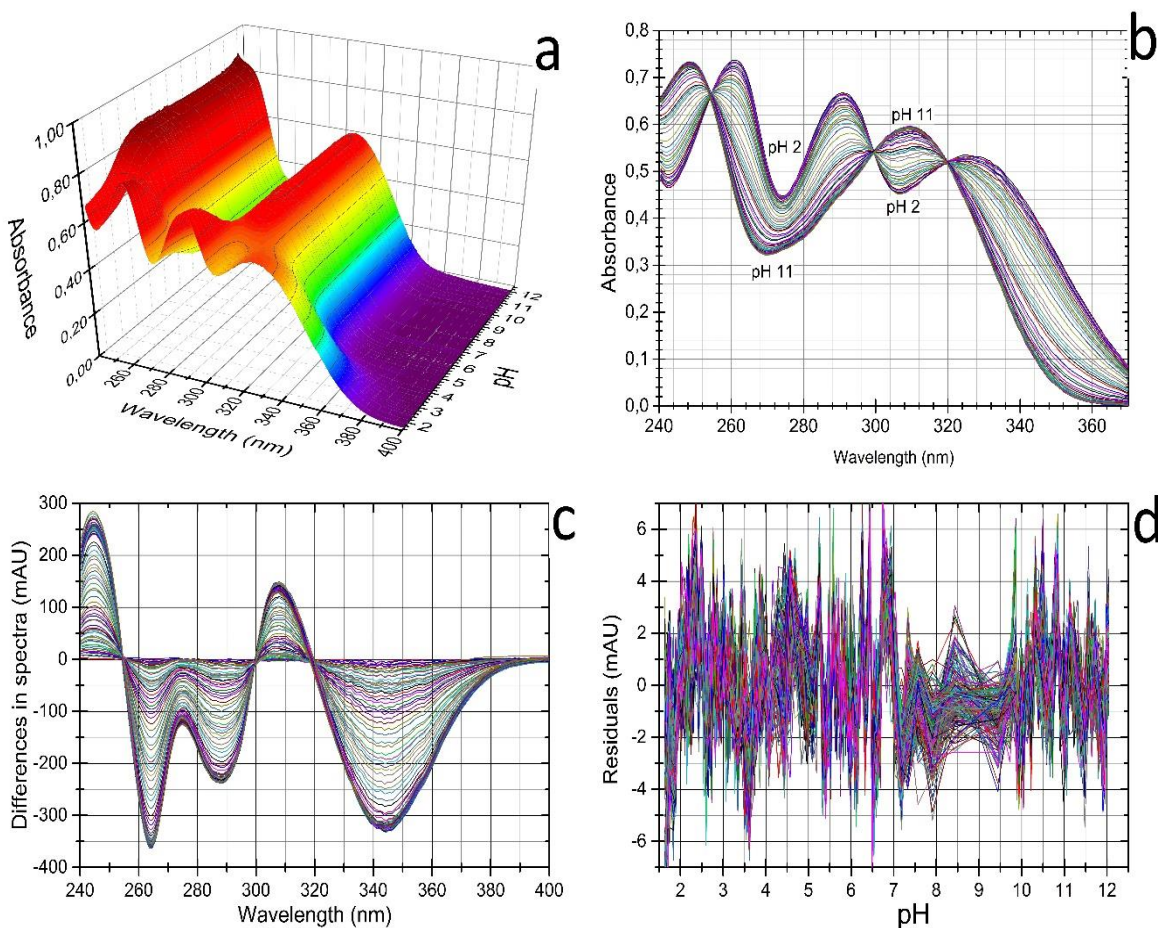
Obr. B8 Změna hodnoty pH nezpůsobila vždy stejnou změnu absorbance ve spektru Baricitinibu, protože některé chromofory byly změnou pH ovlivněny jen nepatrně: (a) Devět zvolených vlnových délek, při kterých byly sledovány změny absorbance na A-pH křivkách, (b) Sledování změny absorbance na A-pH křivkách, kde šipkami jsou vyznačeny polohy disociačních konstant, (c) Graf molárních absorpčních koeficientů všech rozdílně protonovaných částic v závislosti na vlnové délce, (d) Distribuční diagram relativních koncentrací rozdílně protonovaných částic v závislosti na pH (REACTLAB, ORIGIN 9).

2.1.1.6 Krok 6: Poměr signálu k šumu při spektrálních změnách:

Při spektrofotometrickém stanovení disociačních konstant Baricitinibu bylo třeba vyšetřit skrytou informaci ve spektrálních datech, zda totiž titrační změna pH způsobila dostatečnou

změnu v hodnotách absorbance spektra, a zda bylo možné z této změny absorbance (zde závisle proměnné) regresně odhadnout disociační konstanty a postavit protonační model. Z obr. B9 bylo zřejmé, že spektrální odezva chromoforu molekuly Baricitinibu (obr. B9a a B9b) není všude stejná pro všechny protonační rovnováhy, takže bylo třeba vyšetřit, zda je možné čtyři disociační konstanty odhadnout i při těchto minimálních změnách absorbance.

Změnu v i -tém spektru u j -absorbance lze vyjádřit veličinou rozdílu $\Delta_{ij} = A_{ij} - A_i$ a následně vyšetřit, zda tyto změny byly ve spektrech dostatečně velké, a hlavně zda byly větší než hodnota šumu monitorované absorbance ve spektru $s_{\text{inst}}(A)$. Změny rozdílu absorbance Δ_{ij} (mAU) ve spektrech byly proto vyneseny proti vlnové délce λ pro všechny prvky absorbanční matice (obr. B9c) a ukázalo se, že hodnoty Δ_{ij} v jednotkách mAU byly významně větší než přístrojový šum $s_{\text{inst}}(A) = 1$ až 2 mAU.



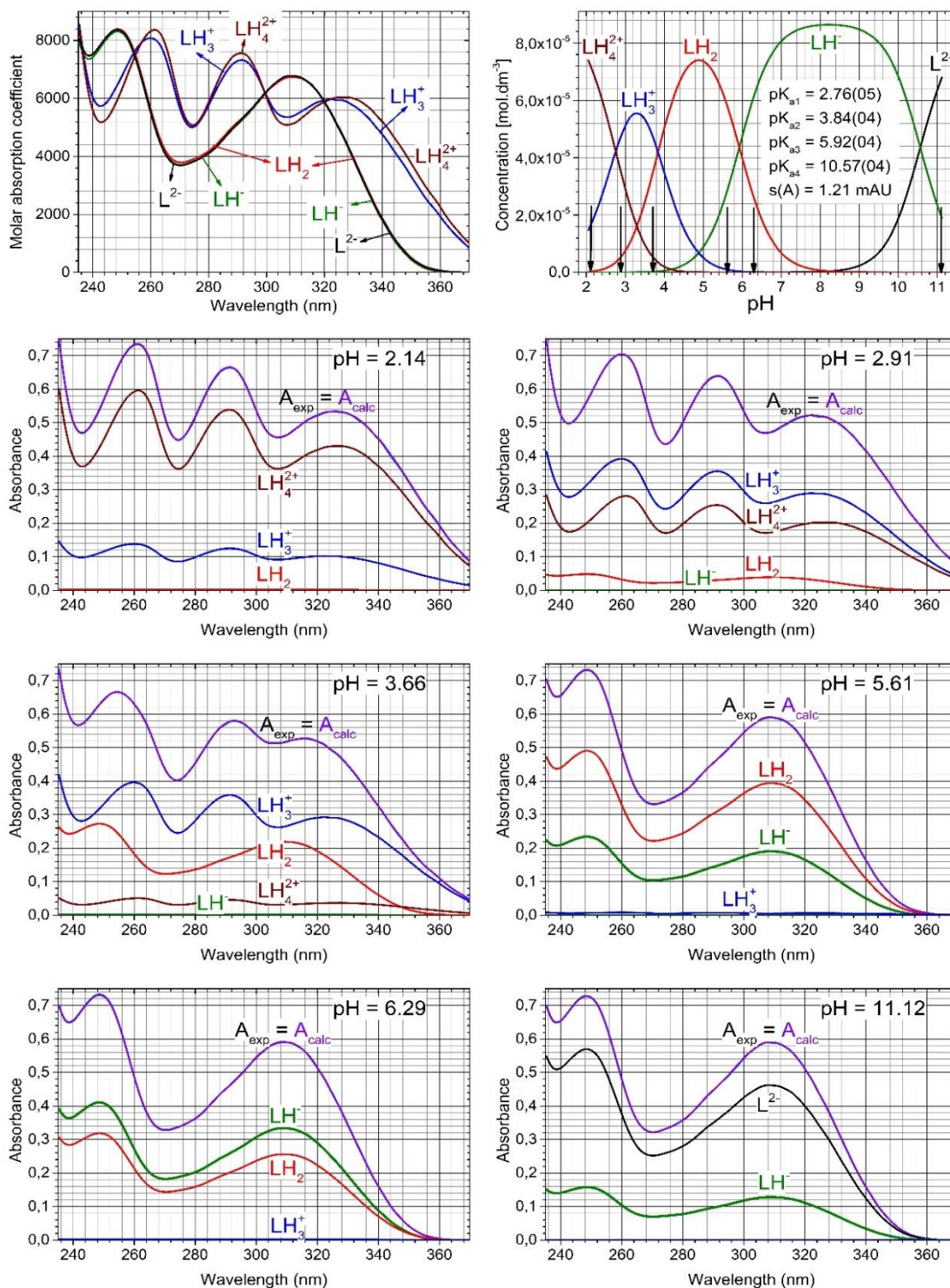
Obr. B9 Vyšetření velikosti změny absorbance Δ_{ij} v pH-absorpčních spektrech při proměňovaném pH: (a) 3D-graf absorbanční responzní plochy při pH-spektrofotometrické titraci, (b) 2D-graf absorbanční responzní plochy při pH-spektrofotometrické titraci, (c) Graf sledované změny absorbance Δ_{ij} ve spektru Baricitinibu při pH titraci, (d) Graf reziduí e [mAU] ukazuje, zda při dosažení minima sumy čtverců reziduí RSS byla rezidua stejné velikosti jako náhodný přístrojový šum měřené absorbance $s_{\text{inst}}(A) \approx 1$ –2 mAU, (REACTLAB, ORIGIN 9).

Obr. B9d potvrdil výtečnou těsnost proložení vypočtených regresních spekter experimentálními body, protože velikosti reziduí e se pohybovaly převážně v rozmezí -5 až +5 mAU, zatímco změny absorbance v pH-spektrální titraci na obr. B9b v přibližně 100x větším rozmezí, a to -350 až +350 mAU.

2.1.1.7 Krok 7: Dekonvoluce spektra:

Rozklad čili dekonvoluce každého experimentálně naměřeného spektra do absorpčních pásů jednotlivých rozličně protonovaných částic [34,37,51,39,50] ukázal, zda byla hypotéza protonačního modelu navržena efektivně a zda spektra dostatečně vypovídají o protonačních rovnováhách Baricitinibu. Navíc, dekonvoluce spektra se jeví při rozboru protonačních rovnováh užitečná zvláště pak v takových výjimečných případech, kdy změna pH roztoku vyvolává jenom slabou spektrální odezvu chromoforu a přináší proto jenom malou nebo nedostatečnou změnu ve spektrech. Křivky molárních absorpčních koeficientů čtyř rozličně protonovaných částic na obr. B10a ukázaly, že křivky částic LH_2 , LH^- a L^{2-} byly téměř totožné, zatímco mezi křivkami kationtů LH_4^{2+} a LH_3^+ a jednou neutrální molekulou LH_2 byl zřetelný rozdíl. Značně podobné téměř totožné byly také křivky dvou protonovaných kationtů LH_4^{2+} a LH_3^+ . Zvláštní péče v interpretaci dekonvoluce musela být proto věnována oblasti pH od 3 do 6, protože se v této oblasti nacházely v rovnováze čtyři částice LH_4^{2+} , LH_3^+ , LH_2 , LH^- se třemi blízkými disociačními konstantami $pK_{a1} = 2,76$, $pK_{a2} = 3,84$ a $pK_{a3} = 5,92$.

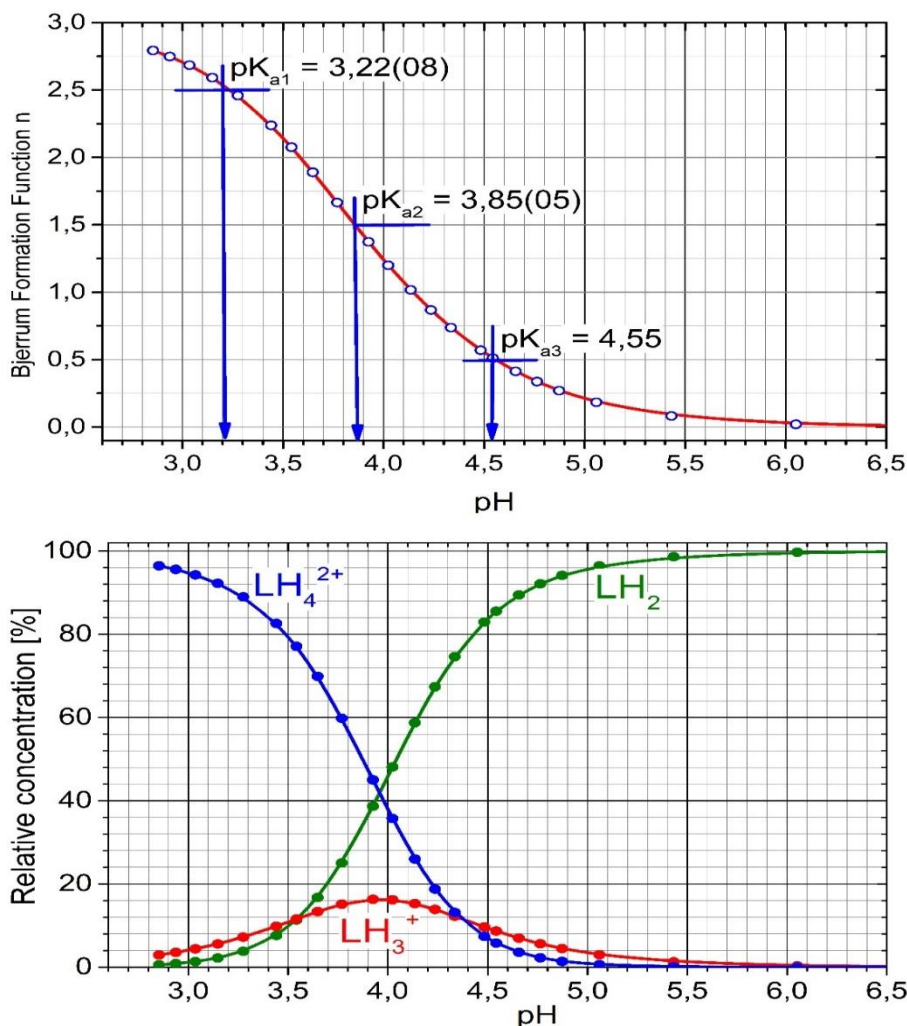
Obr. B10 ilustruje dekonvoluci experimentálních spekter při vybraných hodnotách pH, které jsou v distribučním diagramu obr. B10b vyznačené šipkami k ose pH, do absorpčních pásů různě protonovaných částic Baricitinibu. Při pH 2,14 dominuje absorpční pás kationtu LH_4^{2+} v rovnováze s kationtem LH_3^+ , který je stále ještě zřetelně odlišen. U pH 2,91 jsou spektra obou kationtů LH_4^{2+} a LH_3^+ tvarově velmi podobná, lišící se od sebe pouze mírným posunutím. Velmi důležité bylo rozmezí pH 3 až 5, protože zde byly v rovnováze dva kationty LH_4^{2+} , LH_3^+ s jednou neutrální molekulou LH_2 . Při pH 3,66 se objevuje spektrum neutrální částice LH_2 , které je tvarově odlišné od spekter obou předešlých kationtů. Při pH 5,61 se objevuje spektrum aniontu LH^- , které je však podobné spektru neutrální částice LH_2 , které se s pH zvyšovalo, zatímco pás aniontu LH^- se s pH snižoval a spektrum kationtu LH_3^+ téměř zmizelo. Od pH 6,29 se zvyšoval pás aniontu LH^- a pás neutrální molekuly LH_2 klesal. U pH 11,12 dominovalo spektrum aniontu L^{2-} a s pH se snižovalo spektrum aniontu LH^- .



Obr. B10 Dekonvoluce vybraného experimentálního spektra $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Baricitinibu při $I = 0,008$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ do spekter jednotlivých rozličně protonovaných částic L^{2-} , LH^- , LH_2 , LH_3^+ , LH_4^{2+} ve směsi pro $\text{pH} = 2,14, 2,91, 3,66, 5,61, 6,29$ a $11,12$ programem SQUAD84. První dva obrázky ukazují graf molárních absorpčních koeficientů (vlevo) a diagram relativních koncentrací rozličně protonovaných částic Baricitinibu (vpravo).

2.1.2 pH-metrická dat analýza

Potenciometrická titrace okyseleného Baricitinibu od pH = 2 hydroxidem draselným byla prováděna při 25 °C a 37 °C (Tabulka B2) a při upravené iontové síle (obr. B11). Při pH-potenciometrické titraci *pH-metrickou metodou* byl odhad každé disociační konstanty Baricitinibu vyčíslen regresním programem ESAB [14].



Obr. B11 (a) pH-metrická data analyzovaná Bjerrumovou tvornou funkcí při pH-potenciometrické titraci okyseleného Baricitinibu od pH = 2 hydroxidem draselným při 25 °C ukazují na tři disociační konstanty v oblasti pH 3 až 6. V závorce jsou uvedeny směrodatné odchylky odhadu pK na poslední platné místo odhadu. (b) Distribuční diagram relativních koncentrací rozličně protonovaných částic Baricitinibu v %.

2.1.2.1 Krok 8: pH-metrická data analyzovaná Bjerrumovou tvornou funkcí:

Pro potřebnou „potenciometrickou“ koncentraci, která je vždy vyšší než koncentrace pro spektrofotometrická měření, vykazoval Baricitinib pouze tři disociační konstanty v oblasti pH 3 až 6 a jejich zjemněné vyčíslení bylo provedeno nelineární regresí pH-metrické titrační křivky programem ESAB. Nelineární regresní analýza byla aplikována na střední část pH-metrické titrační křivky okyseleného Baricitinibu, titrovaného hydroxidem draselným.

Tabulka B2 Regresní zpřesnění společných a skupinových parametrů programem ESAB pro pH-metrickou titraci alkalizovaného $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Baricitinibu kyselinou chlorovodíkovou: odhady disociačních konstant pK_{a1} , pK_{a2} , pK_{a3} Baricitinibu. Spolehlivost odhadu parametrů je prokázána statistickou analýzou reziduí: průměr reziduí $E(\hat{e})$ [μL], medián M [μL], průměr absolutní hodnoty reziduí, $E|\hat{e}|$ [μL], směrodatná odchylka reziduí $s(\hat{e})$ [μL], šikmost $g_1(\hat{e})$ a špičatost $g_2(\hat{e})$ prokazují Gaussovo rozdělení, Hamiltonův R -faktor relativní těsnosti [%] a Akaikeho informační kritérium AIC . Uprášené společné parametry: pK_{a1} , pK_{a2} , pK_{a3} . Uprášené skupinové parametry H_0 , H_T , L_0 . Konstanty: $t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $pK_w = 13,9799$, $s(V) = s_{\text{min}}(V) = 0,1 \text{ } \mu\text{L}$, $\bar{I}_T = 0,9470$ (titrant v byretě KOH).

Teplota	25 $^\circ\text{C}$				37 $^\circ\text{C}$					
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	Průměr	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	Průměr
Odhady skupinových parametrů H_0, H_T a L_0 v hledaném protonačním modelu v ESAB										
Počet bodů n	21	29	28	27		24	26	26	28	
$H_0 \times 100$ [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	4,30	4,30	3,87	5,12		5,13	5,20	5,15	5,15	
H_T [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	0,9470	0,9470	0,9602	0,9602		0,9602	0,9602	0,9602	0,9602	
$L_0 \times 1000$ [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	0,34	0,37	0,99	0,36		0,28	0,29	0,29	0,28	
Odhady společných parametrů disociačních konstant v hledaném protonačním modelu v ESAB										
pK_{a1}	3,70	3,71	3,60	3,63	3,66	3,55	3,50	3,59	3,63	3,57
pK_{a2}	3,85	3,79	3,81	3,77	3,81	3,76	3,75	3,74	3,81	3,77
pK_{a3}	4,77	4,75	4,62	4,63	4,69	4,43	4,34	4,40	4,53	4,43
Test těsnosti proložení statistickou analýzou reziduí										
Průměr reziduí $E(\hat{e})$ [μL]	-4,54E-08	-4,19E-08	-2,33E-07	-6,14E-08		-7,58E-10	3,94E-09	-2,72E-09	-3,97E-08	
Medián M [μL]	-6,44E-06	1,12E-05	3,80E-07	2,06E-05		6,20E-06	-4,67E-06	7,16E-06	6,02E-06	
Průměr absolutních hodnot reziduí, $E \hat{e} $ [μL]	1,09E-04	1,11E-04	6,46E-05	8,83E-05		6,92E-05	7,92E-05	5,22E-05	9,43E-05	
Směrodatná odchylka reziduí, $s(\hat{e})$ [μL]	1,50E-04	1,51E-04	1,00E-04	1,14E-04		8,91E-05	9,81E-05	6,28E-05	1,17E-08	
Šikmost $g_1(\hat{e})$	-0,75	-0,86	-1,25	-0,77		-0,62	-0,50	0,19	-0,17	
Špičatost $g_2(\hat{e})$	4,03	4,17	6,45	3,25		3,40	3,63	2,41	3,14	
Akaikeovo informační kritérium, AIC	-363,80	-504,47	-509,54	-484,32		-441,7	-473,9	-497,7	-501,2	
Hamiltonův R -faktor, (%)	0,02	0,02	0,01	0,01		0,01	0,01	0,01	0,01	

Protonované kationty a anionty Baricitinibu jsou ve vodném prostředí rozpustné, zatímco neutrální molekula je nerozpustná u $\text{pH} > 7$. Odhady tří disociačních konstant $\text{p}K_{\text{a}1}$, $\text{p}K_{\text{a}2}$ a $\text{p}K_{\text{a}3}$ byly vyhodnoceny v grafu Bjerrumovy tvorné křivky (obr. B11a). Při vyšší hodnotě pH než 7 a pro vyšší koncentraci než $2 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ vznikala sraženina neutrální molekuly Baricitinibu.

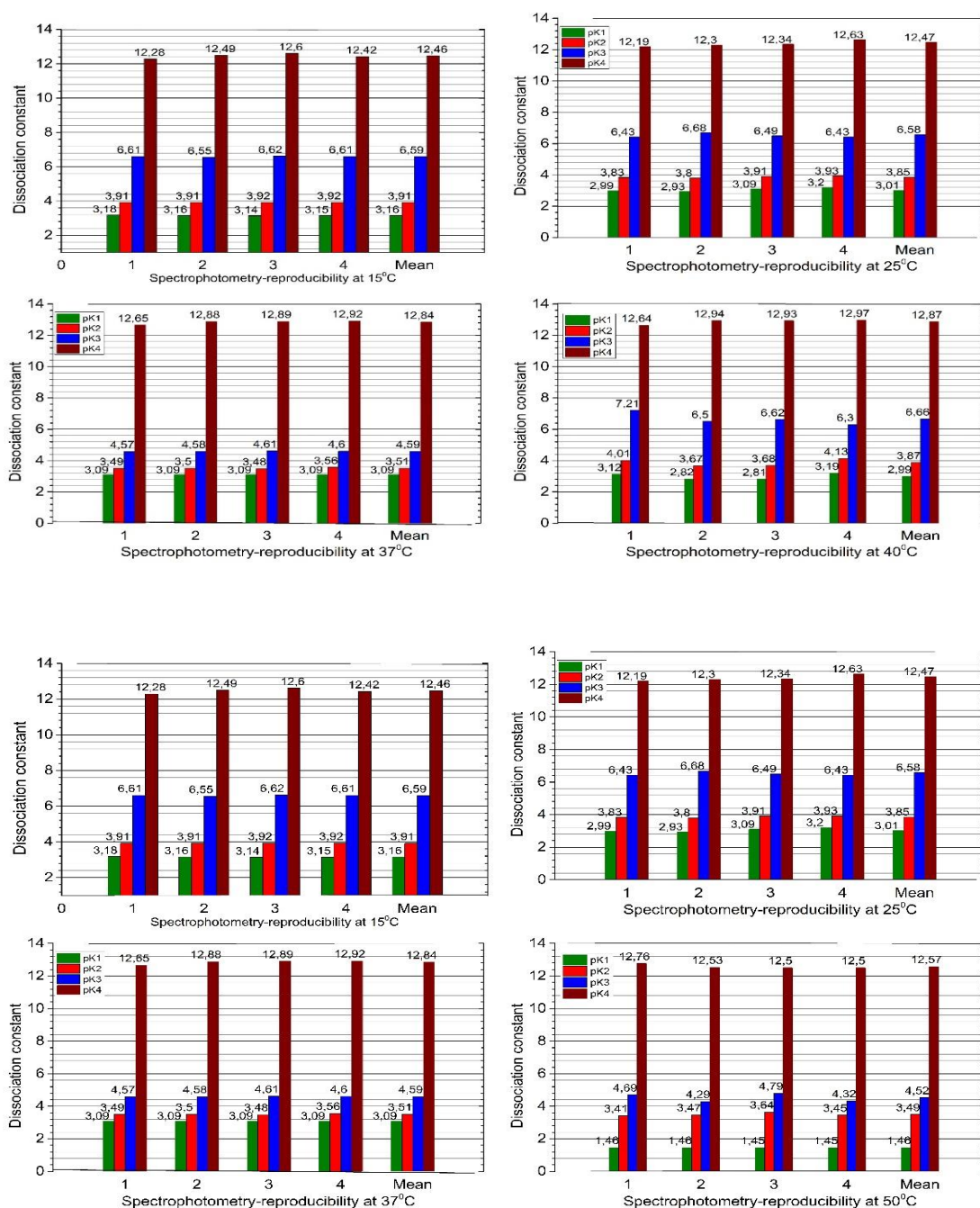
Rezidua byla v programu ESAB definována jako rozdíl mezi experimentálním a vypočteným objemem titrantu KOH, $e_i = V_{\text{exp},i} - V_{\text{calc},i}$. Test spolehlivosti vyčíslených odhadů disociačních konstant byl proveden statistickou analýzou reziduí testem těsnosti proložení. Vedle *společných parametrů*, tj. disociačních konstant $\text{p}K_{\text{a}1}$, $\text{p}K_{\text{a}2}$ a $\text{p}K_{\text{a}3}$ a následným zjemněním také *skupinových parametrů* H_0 , H_T , L_0 se statistiky testu těsnosti proložení výrazně zlepšily. Relativně citlivé kritérium spolehlivosti odhadovaných disociačních konstant představovala střední hodnota absolutních hodnot reziduí $E|\bar{e}|$ vyjádřená v μL . Porovnání numerické hodnoty této statistiky s instrumentálním šumem mikrobyrety, $s_{\text{inst}}(V) = s(V) = 0,1 \mu\text{L}$, se v testu osvědčilo jako rozhodčí kritérium při hledání regresního modelu, protože střední hodnota absolutních hodnot reziduí $E|\bar{e}|$ v μL a reziduálová směrodatná odchylka titrantu KOH $s(V)$ byly stejné velikosti nebo dokonce nižší než experimentální šum mikrobyrety, $s_{\text{inst}}(V)$. Hodnoty obou sledovaných statistik byly velikosti $0,1 \mu\text{L}$, což bylo blízké hodnotě přístrojové chyby použitých mikrobyret $s(V) = 0,1 \mu\text{L}$. Kromě toho rezidua kolísala mezi dolní mezí ($-0,2 \mu\text{L}$) a horní mezí ($+0,2 \mu\text{L}$) Hoaglinova intervalu a žádné reziduum neleželo mimo tyto Hoaglinovy meze (viz str. 29–34, ref. [58]). Odhady disociačních konstant programem ESAB byly proto považovány za dostatečně spolehlivé (Tabulka B2). Těsnost vypočtené titrační křivky mohla být zlepšena pouze dalším zjemněním skupinového parametru L_0 čili koncentrace léčiva Baricitinibu v titrační nádobě.

2.1.2.2 Krok 9: Nejistota $\text{p}K_{\text{a}i}$ v reprodukováných měřeních (obr. B12):

Reprodukovatelnost disociačních konstant vyhodnocených programem REACTLAB ze čtyř reprodukováných měření spekter, snímaných při různých hodnotách pH byla shledána v dobré shodě s odhadem programu SQUAD. Interpretace byla následující:

- (a) Odhad střední hodnoty $\text{p}K_{\text{a}}$ a její rozptyl ze čtyř reprodukováných disociačních konstant sloužil jako míra nejistoty pro každou následnou disociační konstantu.
- (b) Při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ byly odhady disociační konstanty o něco kyselější, tzn. nabývaly nižší hodnoty $\text{p}K_{\text{a}}$ než odhady při $25 \text{ }^\circ\text{C}$.
- (c) Blízké hodnoty dvou po sobě následujících disociačních konstant $\text{p}K_{\text{a}1}$ a $\text{p}K_{\text{a}2}$ by mohly vést k určitým obtížím při minimalizaci procesu nebo by mohly způsobit i selhání zjemnění jejich hodnot v iteracích regrese. Důvodem mohla být intermediární částice, která nebyla

přítomna v dostatečně vysoké koncentraci, nebo příliš blízké hodnoty pK_{a1} a pK_{a2} , a tím jedna částice vysoce korelovala svou hodnotou pK_a s jinou částicí a tyto částice současně vznikly při dotyčné změně pH.

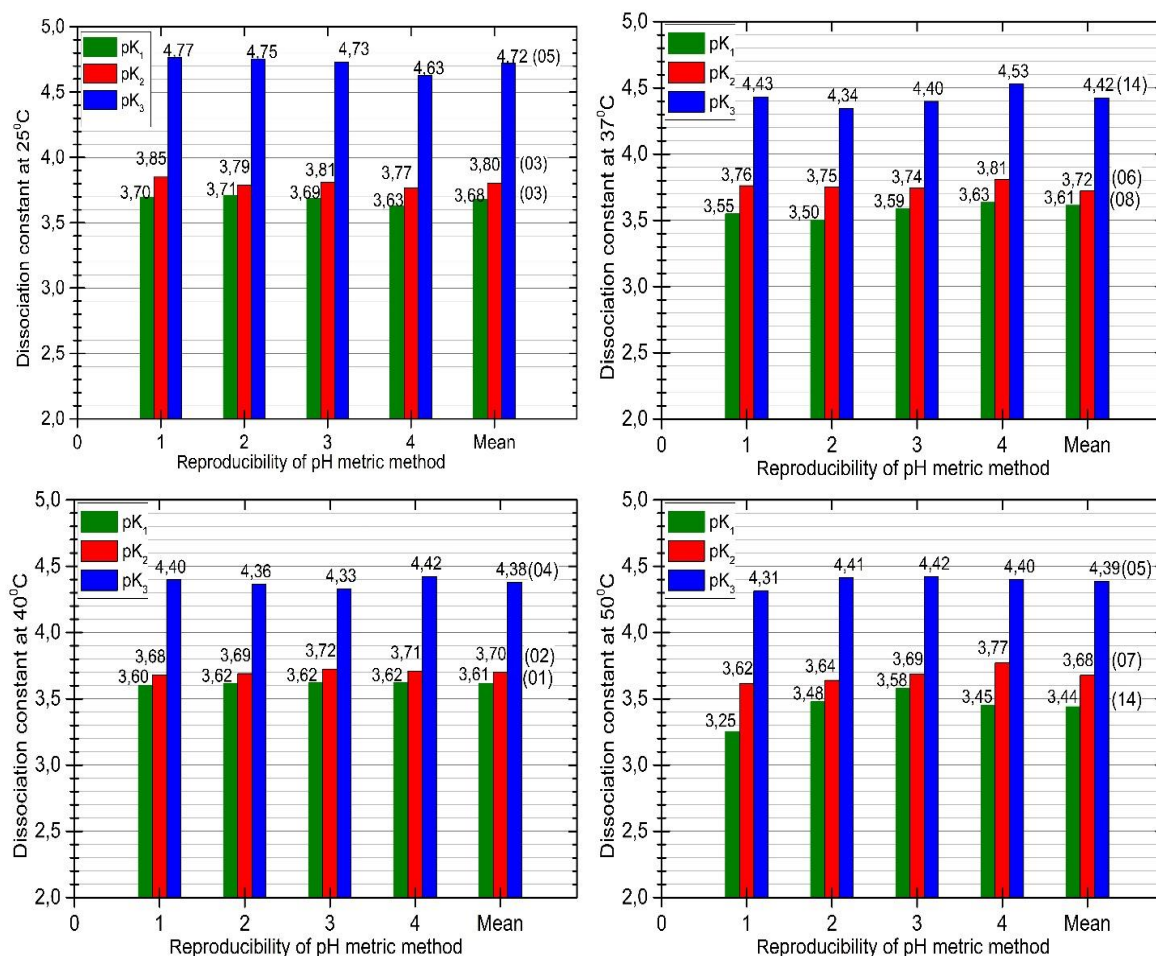


Obř. B12 Reprodukovatelnost odhadů čtyř disociačních konstant při čtyřech vybraných teplotách spektrofotometricky ukazuje na malou citlivost chromoforů molekuly Baricitinibu na titrační změnu pH. Se stoupající teplotou se zvyšuje rozpustnost a zlepřuje se reprodukovatelnost odhadů disociačních konstant. Ze čtyř opakovaných věřírů spekter při každé teplotě byly stanoveny disociační konstanty a vyčíslena jejich střední hodnota.

(d) Když normálové rovnice v regresní analýze byly singulární, jeden nebo více korelačních koeficientů mezi dvěma parametry pK_{a1} a pK_{a2} byly rovny hodnotě blízké +1

nebo -1, proces zjemnění odhadů mohl být v minimalizačním procesu programem předčasně ukončen [57,59].

Reprodukovatelnost odhadů disociačních konstant byla sledována také potenciometricky při čtyřech teplotách od 25 °C do 50 °C. Se stoupající teplotou klesaly hodnoty všech tří disociačních konstant a ze směrnice této lineární závislosti byly vyhodnoceny termodynamické parametry „extratermodynamik“. Ze čtyř opakovaných titračních křivek při každé teplotě byly stanoveny disociační konstanty a vyčíslena jejich střední hodnota (obr. B13).



Obr. B13 Reprodukovatelnost odhadů tří disociačních konstant při čtyřech vybraných teplotách na titrační změnu pH potenciometricky ukazuje, že se stoupající teplotou se zvyšuje rozpustnost a zlepšuje se reprodukovatelnost odhadů disociačních konstant. Ze čtyř opakovaných titračních křivek při každé teplotě byly stanoveny disociační konstanty a vyčíslena jejich střední hodnota spolu se směrodatnou odchylkou v závorce v posledních dvou významných číslicích.

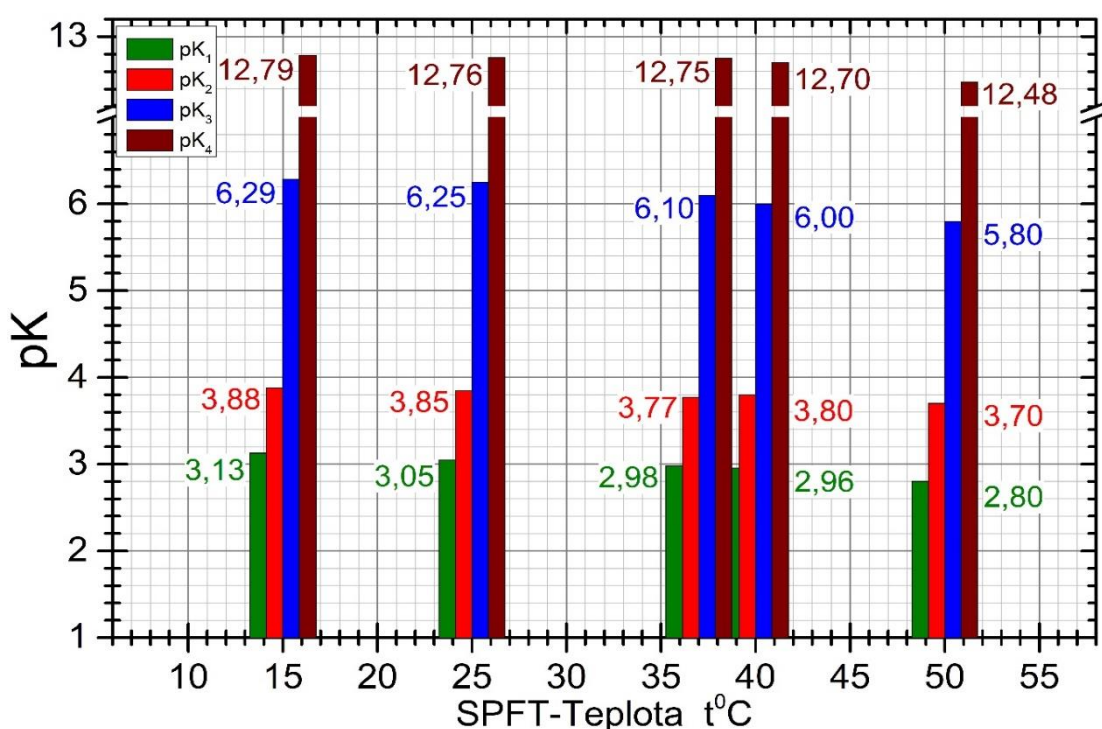
2.1.2.3 Krok 10: Termodynamické disociační konstanty:

Použitím Debye-Hückelovy rovnice na data z tabulky 1 a 2 byly neznámé parametry pK_{a1}^T , pK_{a2}^T , pK_{a3}^T a pK_{a4}^T odhadnuty při dvou teplotách 25 °C a 37 °C. Vzhledem k úzkému rozmezí hodnot iontové síly, upravené roztokem KCl, nemohly být vypočteny efektivní velikost iontu \tilde{a} a vysolovací koeficient C . **Spektrofotometrie** (ze smíšené pK_a korekcí na $I = 0,0020 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$):

$pK_{a1}^T = 3,07$, $pK_{a2}^T = 3,87$, $pK_{a3}^T = 6,27$, $pK_{a4}^T = 12,78$ při 25 °C a $pK_{a1}^T = 3,00$, $pK_{a2}^T = 3,79$, $pK_{a3}^T = 6,12$, $pK_{a4}^T = 12,75$ při 37 °C. **Potenciometrie** (ze smíšené pK_a korekcí na $I = 0,0001$ mol.dm⁻³): $pK_{a1}^T = 3,69$, $pK_{a2}^T = 3,81$, $pK_{a3}^T = 4,73$ při 25 °C a $pK_{a1}^T = 3,62$, $pK_{a2}^T = 3,73$, $pK_{a3}^T = 4,43$ při 37 °C.

2.1.2.4 Krok 11: Stanovení entalpie, entropie a Gibbsovy volné energie pro "extra-termodynamiku" disociace:

Změna entalpie ΔH^0 procesu disociace byla vypočtena z van't Hoffovy rovnice $\ln K/dT = \Delta H^0/RT^2$. Z hodnot Gibbsovy volné energie $\Delta G^0 = -RT \ln K$ a entalpie ΔH^0 lze vypočítat entropii $\Delta S^0 = (\Delta H^0 - \Delta G^0)/T$, kde R konstanta ideálního plynu) = 8,314 J·mol⁻¹·K⁻¹, K je termodynamická disociační konstanta a T je absolutní teplota [61].

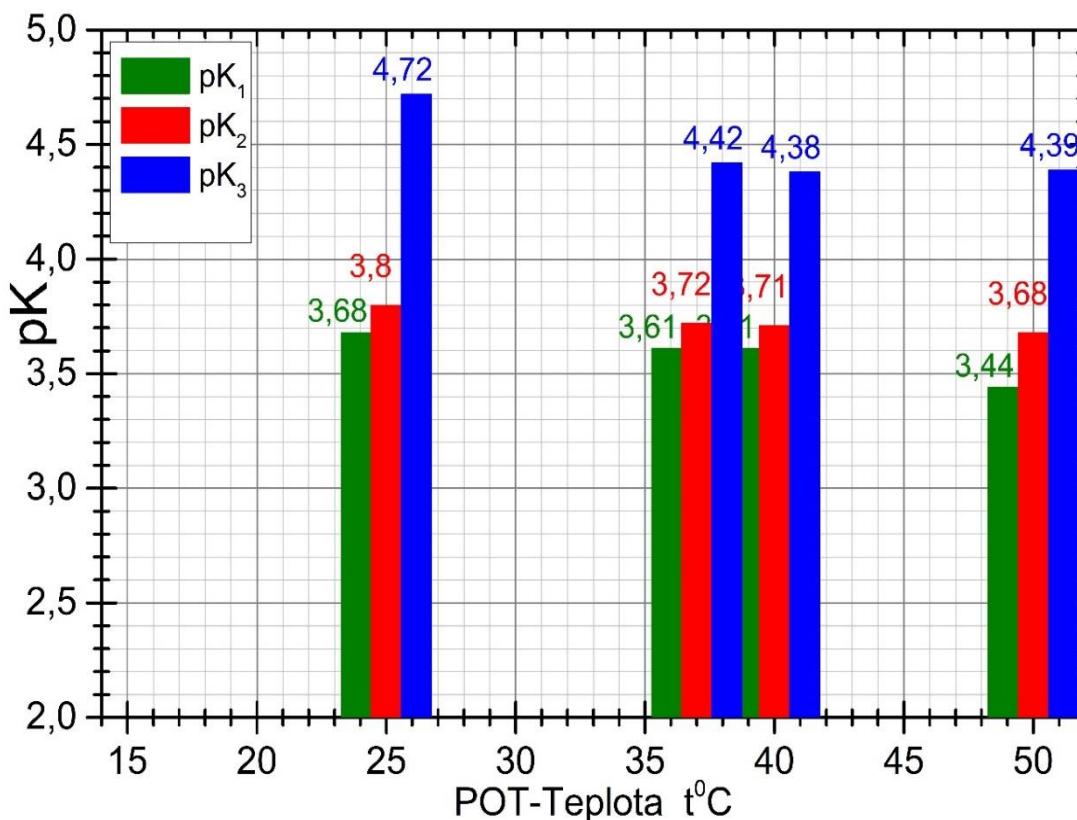


Obr. B14 Diagram závislosti čtyř disociačních konstant pK na pěti teplotách regresní analýzou spekter ukazuje mírný pokles pK se zvyšující se teplotou.

V literatuře [62] se uvádí, že karboxylové a anorganické kyseliny jsou nejméně ovlivněny změnami teploty, a to méně než $\pm 0,05$ jednotek pH na 10 K, což souvisí také s malými změnami molární entalpie disociace blízké 0. Byla publikována zřetelná korelace mezi disociační entalpií blízkou 0 a nižší citlivostí pK na zvýšení teploty u karboxykyselin [63]. Naopak, vysoké entalpické změny vykazují fenoly, aminy a aminokyseliny v rozmezí teplot 25–60 °C, a to o změnu -0,2 jednotek pH na 10 K [62]. Teplotní změna pK_a sloučeniny proto změní pH roztoku, což pak může ovlivnit rozpustnost a chemickou stabilitu produktu [13].

Diagram závislosti čtyř disociačních konstant pK na pěti teplotách regresní analýzou spekter ukazuje mírný pokles pK se zvyšující se teplotou (obr. B14).

Při vyšší koncentraci Baricitinibu docházelo od pH 7 a výše ke srážení léčiva, zprvu se objevila jenom mírná opalescence, která znemožnila potenciometrickou indikaci. Potenciometricky byly proto vyhodnoceny pouze první tři disociační konstanty v závislosti na teplotě (obr. B15)

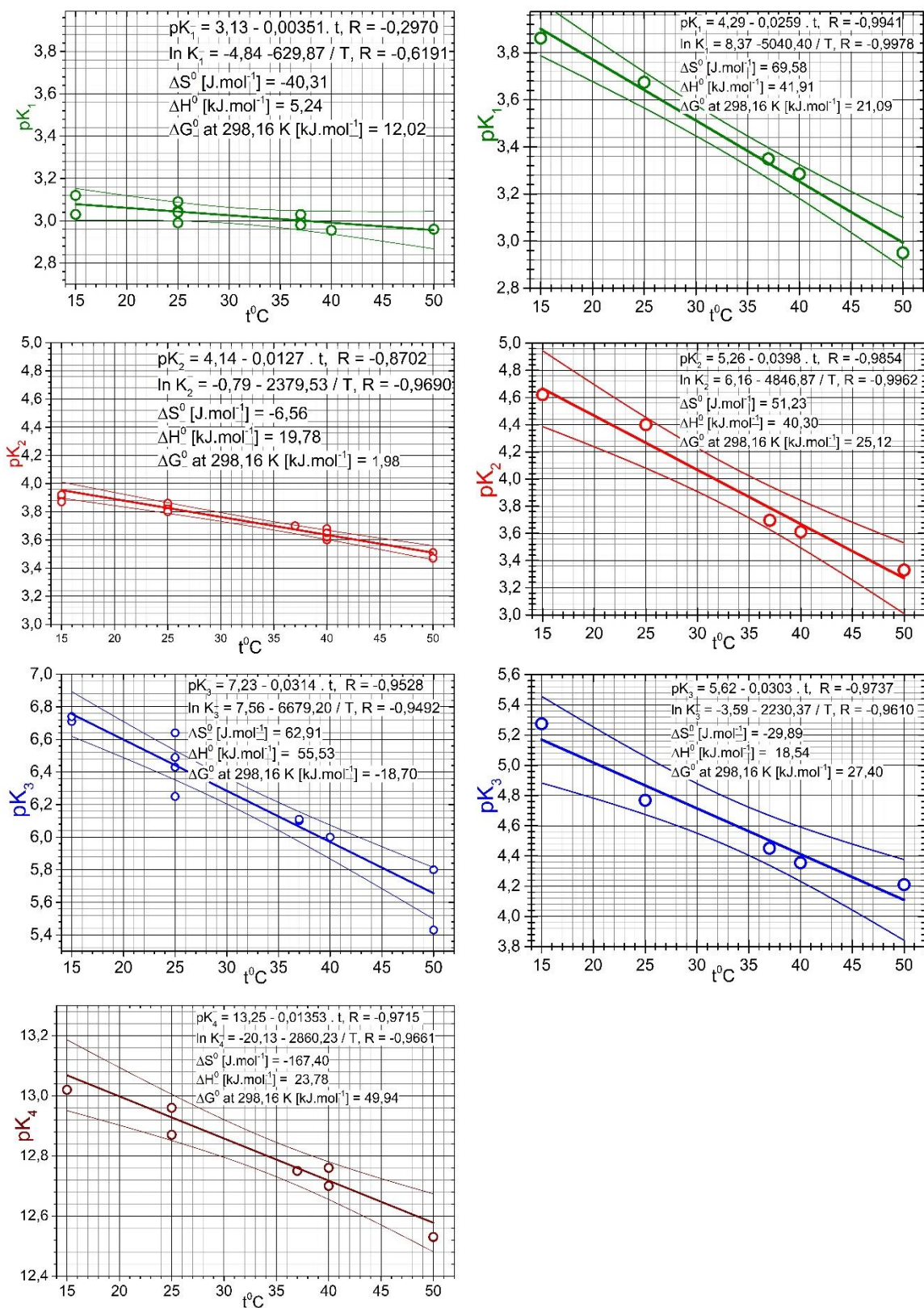


Obr. B15 Diagram závislosti třech disociačních konstant pK na pěti teplotách regresní analýzou pH-titračních křivek ukazuje mírný pokles pK se zvyšující se teplotou. U 15 °C je Baricitinib hůře rozpustný.

U Baricitinibu se se zvyšující teplotou v rozmezí od 15 °C do 50 °C dochází k poklesu hodnot všech čtyř disociačních konstant, stanovených spektrofotometricky (obr. B16 vlevo) a potenciometricky (obr. B16 vpravo). U potenciometrické pH-metrické metody pokleslo pK_1 o 0,91 jednotek pH s klesající přímkovou směrnicí o regresním rabatu $R^2 = 98,44 \%$, u pK_2 pokleslo o 1,29 jednotek pH s $R^2 = 96,14 \%$ a u pK_3 pokleslo o 1,07 jednotek pH s $R^2 = 93,12 \%$, zatímco u UV-metrické metody byl pokles odhadů disociačních konstant nižší, a proto i směrnicí teplotní lineární závislosti byla nižší.

Teplotní odezva všech tří disociačních konstant pK_1 , pK_2 a pK_3 byla u potenciometrické metody výraznější, korelační koeficienty závislosti disociační konstanty na teplotě byly výrazně vyšší než u spektrální metody. Numerické odhady disociačních konstant pK_1 a pK_2 stanovené

potenciometrickou metodou byly vyšší, čili alkaličtější než u odhadů spektrální metodou, zatímco u pK_3 tomu bylo naopak.



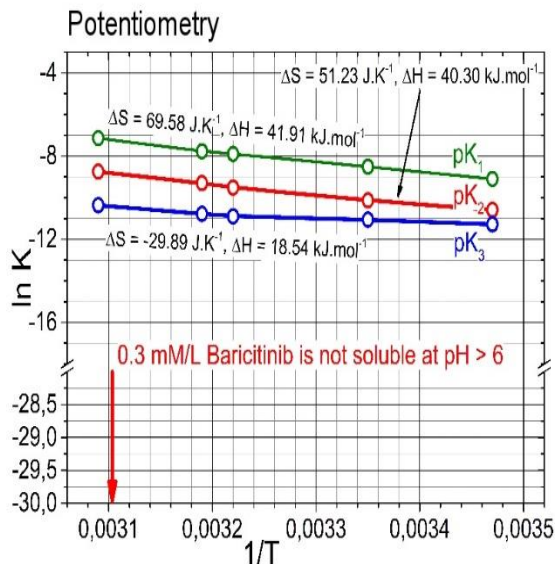
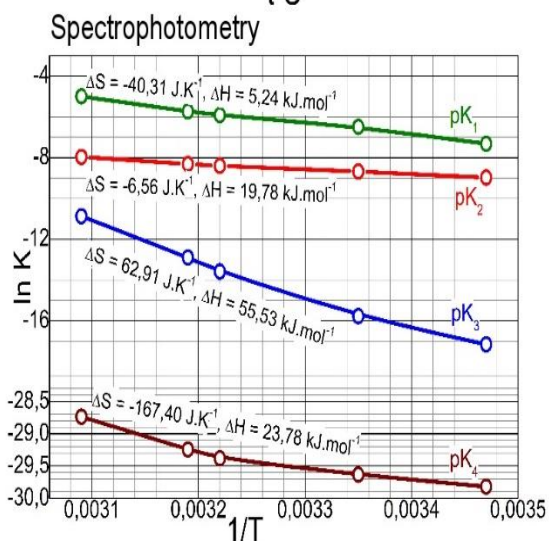
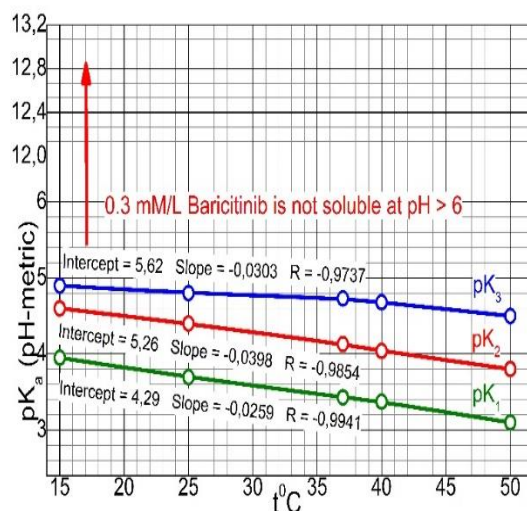
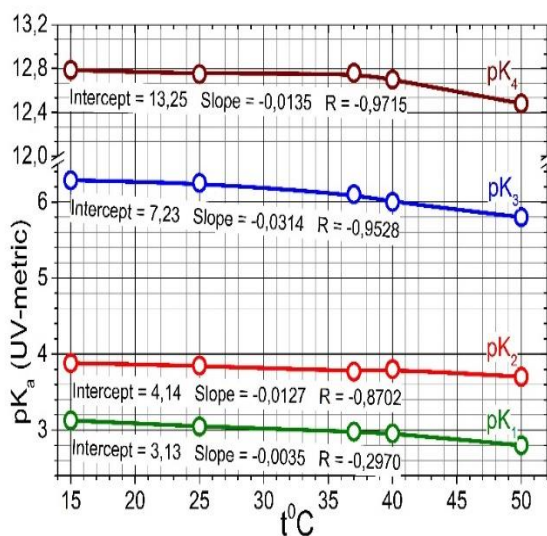
Obr. B16 Výpočet molární entalpie ΔH° , entropie ΔS° a Gibbsovy volné energie ΔG° z odhadu úseku a směrnice přímkové teplotní závislosti disociačních konstant, měřených spektrofotometricky (vlevo) a potenciometricky (vpravo). U vyšší koncentrace Baricitinibu v potenciometrii (0,3 mM/L) než ve spektrofotometrii (0,01 mM/L) se u $\text{pH} > 6$ Baricitinib začal srážet.

Odezva chromoforů v molekule Baricitinibu byla na titrační změny pH zatížena poněkud větší nejistotou, což se projevilo v horší reprodukovatelnosti odhadů disociačních konstant ze spekter. Z tohoto hlediska se jevíly odhady tří disociačních konstant pK_1 , pK_2 a pK_3 spolehlivějšími metodou pH-metrické titrace. Nejhůře byla indikována první disociační konstanta pK_1 spektrofotometricky, protože odhadovaný parametr pK_1 byl v regresním modelu velmi špatně podmíněn a jeho odhad byl proto zatížen větší nejistotou. Protože pH-potenciometrická titrace vyžadovala vyšší koncentrace než spektrální metoda, nebylo možné stanovit čtvrtou disociační konstant pK_4 , protože u vyššího pH než 7 se Baricitinib srážel. Z toho důvodu byla disociační konstanta pK_4 stanovena pouze spektrofotometricky pro 10x nižší koncentrace Baricitinibu.

Oba parametry lineární závislosti pK na T , tj. úsek a směrnice, sloužily k výpočtu termodynamických veličin entalpie, entropie a Gibbsovy volné energie (obr. B16 a B17). Spektrální metodou byly ze závislosti $\ln K$ na $1/T$ vyčísleny hodnoty molární entalpie ΔH^0 , entropie ΔS^0 a Gibbsovy volné energie ΔG^0 (obr. B16): pro pK_1 s hodnotami $\Delta H^0 = 5,24 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -40,31 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 12,02 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K, pro pK_2 s hodnotami $\Delta H^0 = 19,78 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -6,56 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 1,98 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K, pro pK_3 s hodnotami $\Delta H^0 = 55,53 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 62,91 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 18,70 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K a pro pK_4 s hodnotami $\Delta H^0 = 23,78 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -167,40 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 49,94 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K. Potenciometrickou titrací byly ze závislosti $\ln K$ na $1/T$ vyčísleny hodnoty molární entalpie ΔH^0 , entropie ΔS^0 a Gibbsovy volné energie ΔG^0 pro pK_1 s hodnotami $\Delta H^0 = 41,91 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 69,58 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 21,09 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K, pro pK_2 s hodnotami $\Delta H^0 = 40,30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 51,23 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 25,12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K, pro pK_3 s hodnotami $\Delta H^0 = 18,54 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -29,89 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 27,40 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K.

Z literatury je známo, že pozitivní hodnoty entalpie $\Delta H^0(pK_{a1})$, $\Delta H^0(pK_{a2})$, $\Delta H^0(pK_{a3})$ a $\Delta H^0(pK_{a4})$ zde ukázaly, že disociační proces je endotermní a je doprovázen absorpcí tepla. Kladné hodnoty Gibbsovy volné energie $\Delta G^0(pK_{a1})$, $\Delta G^0(pK_{a2})$, a $\Delta G^0(pK_{a4})$ kromě záporné hodnoty $\Delta G^0(pK_{a3})$ monitorované spektrofotometricky ukázaly, že disociační proces nebyl spontánní, zatímco potenciometricky byly všechny hodnoty ΔG^0 kladné. Vzhledem k tomu, že hodnota entropie disociačního procesu ΔS^0 (potenciometricky) byla u dvou pK pozitivní, a to $\Delta S^0(pK_{a1}) = 69,58 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta S^0(pK_{a2}) = 51,23 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a spektrofotometricky u jedné disociační konstanty $\Delta S^0(pK_{a3}) = 62,91 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, disociační proces s kladnou entropií byl indikován jako irreverzibilní. Entropie u ostatních tří disociačních konstant $\Delta S^0(pK_{a1}) = -40,31 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0(pK_{a2}) = -6,56 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0(pK_{a4}) = -167,40 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ (spektrofotometricky) a u třetí disociační

konstanty $\Delta S^0(\text{p}K_{a3}) = -29,89 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ (potenciometricky) byla negativní, což indikovalo reverzibilní disociační proces.



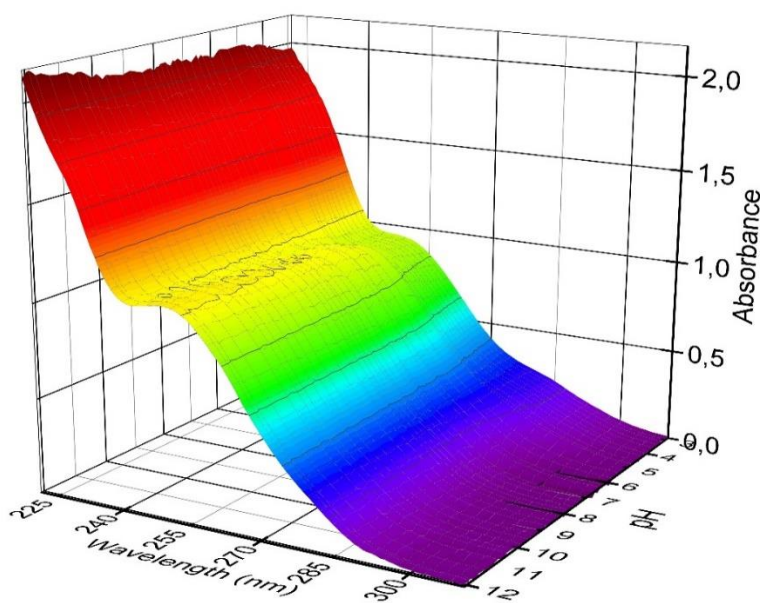
Obr. B17 Závislost disociačních konstant na teplotě $t^{\circ}\text{C}$ $\text{p}K_a = f(t^{\circ}\text{C})$ byla transformována do souřadnic $\ln K = f(1/T)$ a z úseku a směrnice regresní přímky teplotní závislosti disociačních konstant, měřených spektrofotometricky a potenciometricky byla vypočtena molární entalpie ΔH^0 , molární entropie ΔS^0 a molární Gibbsova volná energie ΔG^0 . U vyšší koncentrace Baricitinibu v potenciometrii (0,3mM/L) než ve spektrofotometrii (0,01mM/L) se u $\text{pH} > 6$ Baricitinib začal srážet.

2.2 Valsartan

2.2.1 UV-metrická spektrální analýza

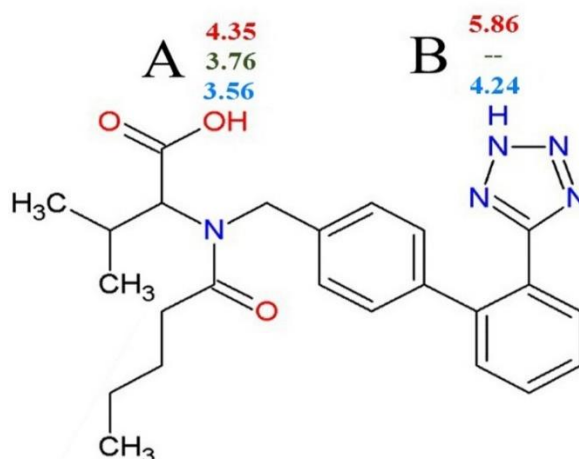
2.2.1.1 Krok 1: Teoretická predikce pK_a Valsartanu:

Prvním krokem analýzy dat byla predikce disociačních konstant, založená na kvantově-chemickém výpočtu a zaměřená na strukturu molekuly sledovaného léčiva. Valsartan je diprotická kyselina s karboxylovou skupinou a tetrazolovým kruhem (obr. V3).



Predicted pK_{pred} of Valsartan with

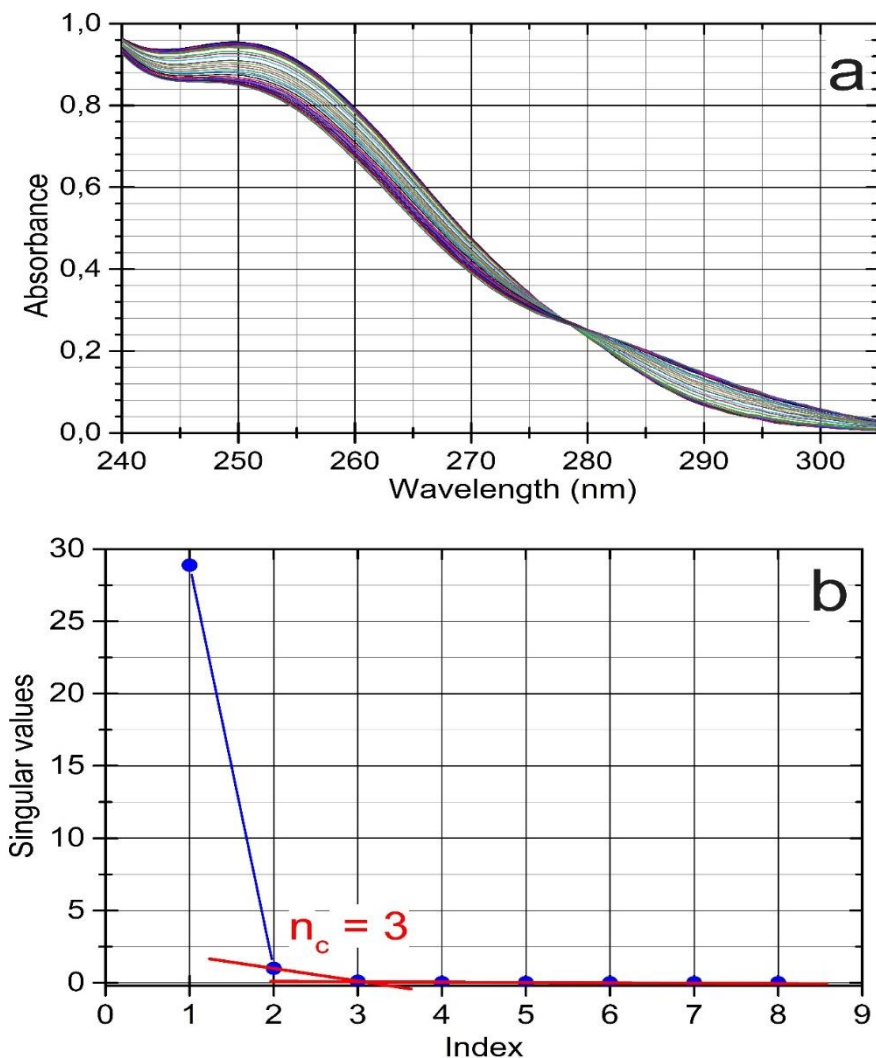
MARVIN, PALLAS, ACD



Obr. V3 Molekulární struktura Valsartanu se zvýrazněnými protonačními místy A a B a předpovídané hodnoty pak pomocí programů MARVIN, PALLAS a ACD / Percepta

Predikční program MARVIN identifikoval pro Valsartan dvě protonační centra A a B, která by mohla být teoreticky spojena až se dvěma předpovězenými disociačními konstantami

(obr. V3). Predikční programy MARVIN, PALLAS a ACD/Percepta předpovídaly disociační konstanty mírně odlišné, takže bylo zřejmé, že experimentální stanovení nabídne spolehlivější výsledky.



Obr. V4 Při použití Cattelova indexového grafu se směrodatnou odchylkou $s_k(A)$ je hodnota absorbanční matice $k^* = 3$ pro Valsartan čili počet světlo-absorbujících částic je roven $n_c = 3$ (INDIKACE v S-PLUS), [33]

Veličina r značí hodnotu druhého momentu absorbanční matice a obecně by měla být menší nebo rovna m , kde m je počet světlo-absorbujících částic. Nejjednodušší kontrola vlastních čísel datové matice často odhalí, že první faktory mají statistický význam až do zlomu v Cattelově grafu, od kterého již nemají faktory statistický význam. Tyto faktory mohou být proto zařazeny do šumu spektrofotometru, který numericky přispívá do spekter. Odstranění těchto zbytkových chyb z absorbančních dat může model přiblížit chemickým informacím se sníženým šumem. Cattelův indexový graf singulárních čísel (obr. V4) ukazuje, že celý soubor spekter Valsartanu při vlnových délkách 240–305 nm byl schopen indikovat tři světlo-absorbující částice při zlomu

$n_c = k^* = 3$ s experimentální hladinou šumu $s_{\text{inst}}(A) = 1,0$ mAU, i když molární absorpční koeficienty prvního páru částic LH^- a LH_2 si byly značně podobné. Skutečný počet částic absorbujících světlo oddělených od spektrálního šumu lze správně vyhodnotit pomocí nelineární regresní analýzy.

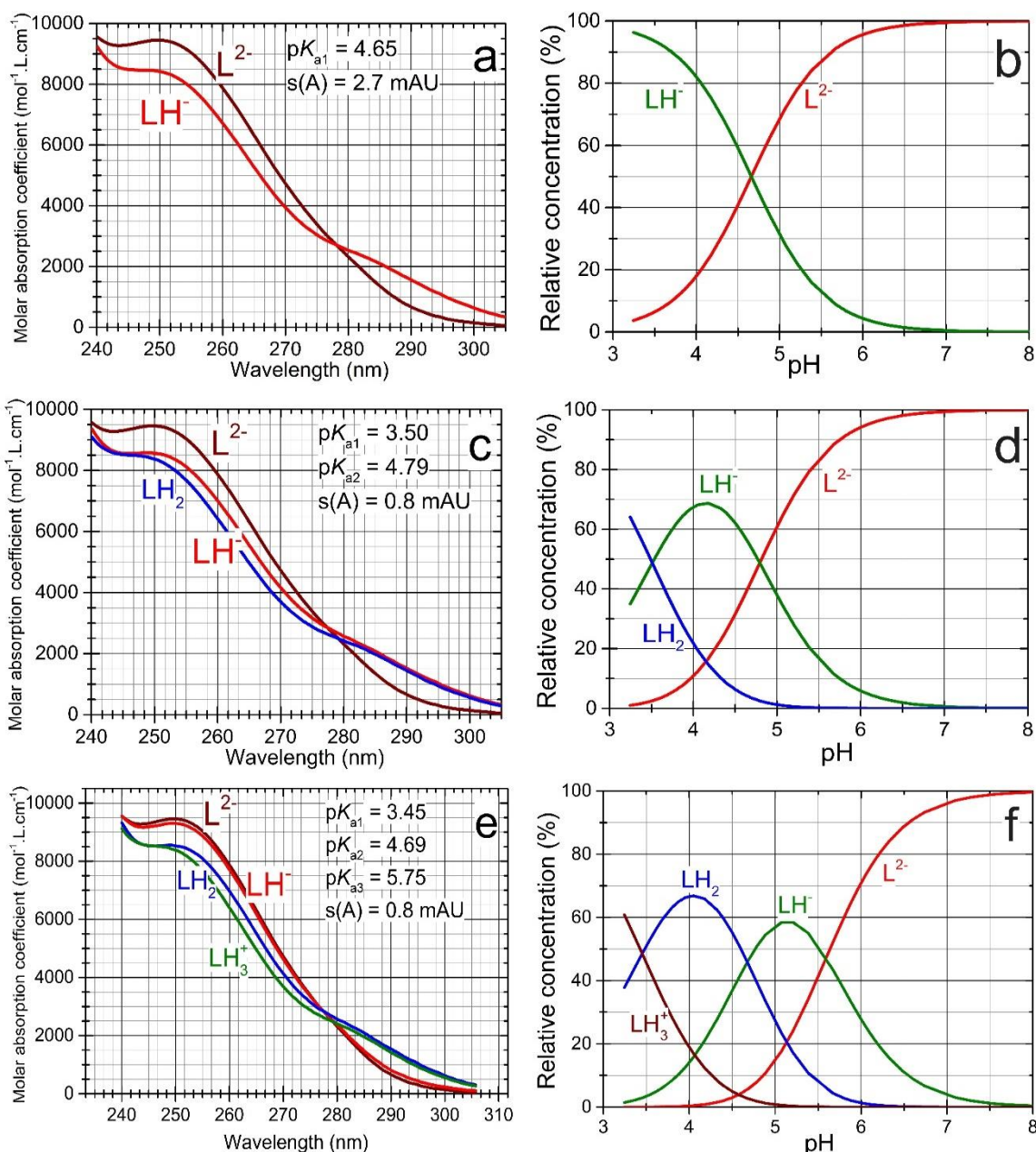
2.2.1.2 Krok 3: Výstavba protonačního modelu:

Pomocí programu REACTLAB byla k vyhodnocení pH-absorbanční matice použita nelineární regresní analýza, s technikou regresního tripletu (kritika dat, kritika modelu a kritika metody). Nalezení nejlepší hypotézy protonačního modelu, obsahujícího jednu, dvě nebo tři disociační konstanty je uvedeno v grafech molárních absorpčních koeficientů (obr. V5a) a distribučních diagramech všech různě protonovaných míst (obr. V5b) pro navrhovanou hypotézu protonačního modelu. Návrh a konstrukce protonačního modelu zahrnuje proces rozhodování pro přijetí vypočtených parametrů s vybranými statistickými diagnostikami pro navrhovanou hypotézu protonačního modelu. Ukázalo se, že výstavba protonačního modelu Valsartanu nebyla snadná, protože tento lék má dvě po sobě těsně jdoucí disociační konstanty, kdy platí $|\text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a1}| < 3$ a také skutečnost, že změna pH jenom mírně ovlivnila změny hodnot absorbance chromoforů. Obě disociační konstanty byly v regresním modelu špatně podmíněny, a proto bylo jejich matematické vyčíslení poněkud nejisté. Nejlepším kritériem k testování hypotézy při budování regresního modelu je test těsnosti proložení vypočtených spekter experimentálními body absorbanční matice, který lze po ukončení regresního procesu zjednodušit na vyčíslení směrodatné odchylky absorbanční matice $s(A) = \sqrt{\text{RSS}/(n - m)}$, kde n je počet experimentálních bodů a m je počet odhadovaných parametrů. V tabulce V1 jsou uvedeny číselné odhady disociačních konstant, vypočtené regresním programem REACTLAB: $E|e|$ [mAU] a směrodatná odchylka reziduí $s(e)$ [mAU] ukázaly dobrou těsnost vypočtených spekter experimentálními body všech spekter nalezeného protonačního modelu o dvou disociačních konstantách. Spolehlivost vypočtených odhadů regresních parametrů lze testovat pomocí následujících regresních diagnostik (tabulka V1 a obr. V5), jak bylo vysvětleno na straně 226 v ref. [60].

a) Fyzikální význam odhadů parametrů: V levé části obr. V5a jsou uvedena spektra molárních absorpčních koeficientů různě protonovaných částic, ϵ_{L} , ϵ_{LH} a ϵ_{LH_2} Valsartanu proti vlnovým délkám. Protože je dvojice křivek velmi podobná, hypotéza modelu může být tím pádem nejistá nebo nesprávná.

b) Fyzikální význam koncentrací částic: Distribuční diagram relativních koncentrací všech částic (obr. V5b) ukazuje protonační rovnováhy různě protonovaných částic L^{2-} , LH^- , LH_2 . Graf ukazuje, že žádná z částic nemá statisticky malý význam a všechny částice mají fyzikální smysl.

c) Test spolehlivosti: Statistická analýza všech reziduí ukázala, že bylo dosaženo eliptického hyperparaboloidu objektivní RSS funkce sumy čtverců reziduí (tabulka V1), protože průměr reziduí $E | \bar{\epsilon} |$ [mAU] a reziduálová směrodatná odchylka $s(\hat{\epsilon})$ [mAU] dosáhla velmi nízkých hodnot, < 2 mAU, což představuje $< 0,2$ % měřené absorbance.



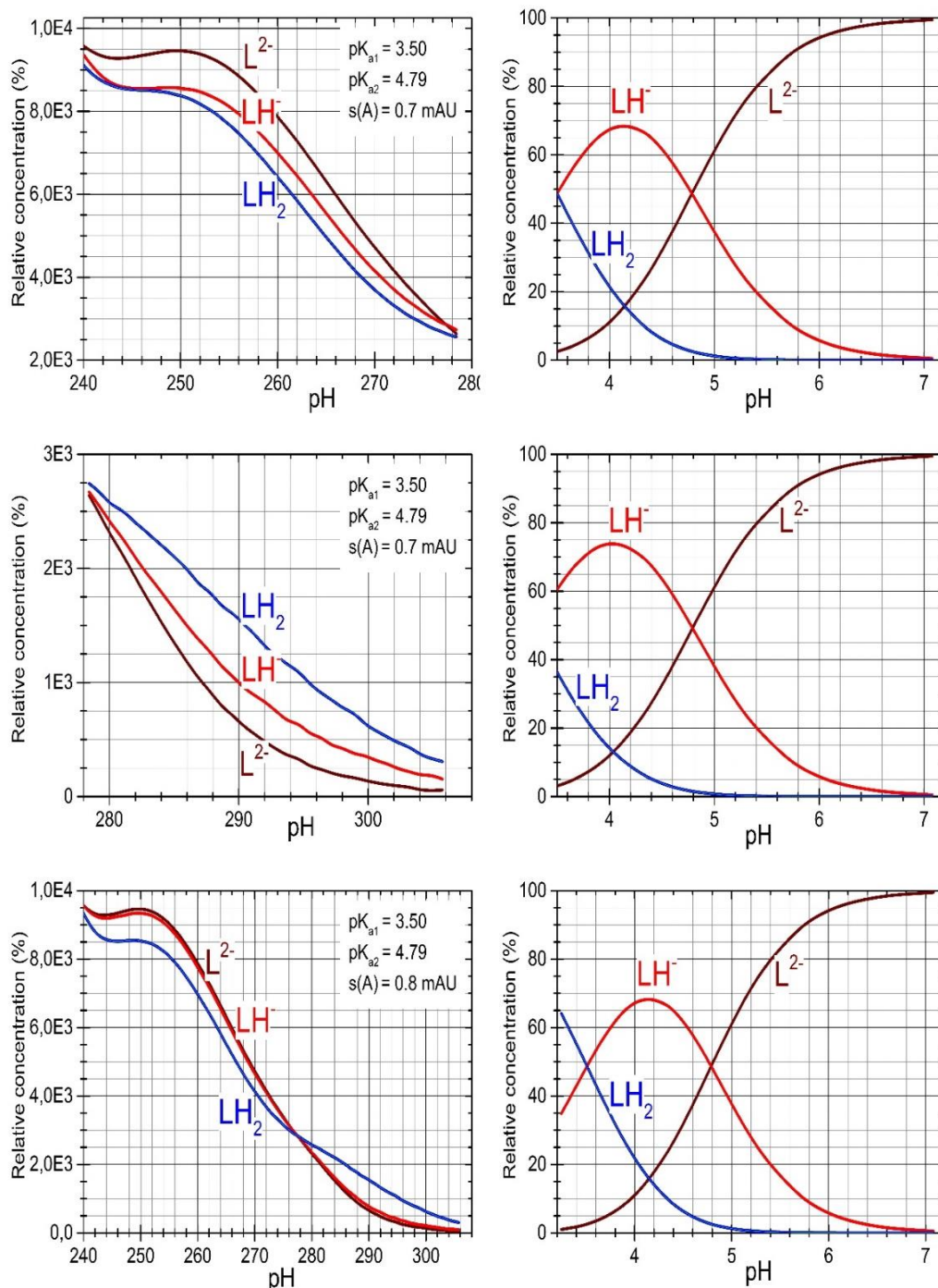
Obr. V5 Výstavba a testování nejlepšího protonačního modelu Valsartanu v rozmezí pH 3 až 8 pro dvě disociační konstanty pK_{a1} a pK_{a2} se spektrální analýzou $1,0 \times 10^{-4}$ mol·dm⁻³ Valsartanu při $I = 0,008$ mol·dm⁻³ a 25 °C. a) Čisté spektrální profily koeficientů molární absorpce versus vlnová délka pro tři různě protonované ionty Valsartanu. b) Distribuční diagram relativních koncentrací tří různě protonovaných částic v závislosti na pH (REACTLAB, ORIGIN 9)

Tabulka V1 Reprodukovatelnost nejlepšího protonačního modelu Valsartanu v rozmezí pH od 3 do 12 pro dvě disociační konstanty pK_{a1} , pK_{a2} programem REACTLAB při 25 °C a 37 °C. Roztok o koncentraci 1.0×10^{-4} M Valsartanu při $I = 0,008$, pro n_s -spektra měřená při n_w vlnových délkách pro $n_z = 2$ základní složky L a H tvoří různé protonované částice. Standardní odchylky odhadů parametrů jsou v posledních platných číslicích v závorkách. Kritérium rozlišení a spolehlivosti zjištěných odhadů parametrů jsou prokázány statistikami analýzy reziduí, jako jsou průměr reziduí $E | \bar{e} |$ [mAU], směrodatná odchylka absorbance po ukončení regresního procesu $s(\bar{e})$ [mAU], sigma $s(A)$ [mAU] z REACTLABu.

Teplota $t^{\circ}\text{C}$	Program	25 °C						37 °C					
		1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	Průměr	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	Průměr		
Cattelův indexový graf vlastních čísel k odhadu hodnoty absorbanční matice													
Počet naměřených spekter, n_s		39	29	36	35		34	37	32	39			
Počet vlnových délek, n_w		78	78	78	78		78	78	78	78			
Počet světlo-absorbujících částic, k^*		3	3	3	3		3	3	3	3			
Odhady disociačních konstant v hledaném protonačním modelu													
$pK_{a1}(s_1)$, $\text{LH}_2 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{LH}^-$	REACTLAB	3,77(00)	3,66(01)	3,66(01)	3,67(00)	3,71±0,05	3,61(01)	3,63(01)	3,51(00)	3,47(00)	3,55±0,08		
$pK_{a2}(s_2)$, $\text{LH}^- \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{LH}^{2-}$	REACTLAB	4,87(00)	4,84(00)	4,84(00)	4,79(00)	4,83±0,04	4,83(00)	4,80(00)	4,83(00)	4,74(00)	4,79±0,04		
Test těsnosti proložení statistickou analýzou reziduí													
Průměr abs. reziduí $E \bar{e} $, [mAU]	REACTLAB	0,90	0,70	0,66	0,58		0,64	0,65	0,78	0,89			
Směrodatná odchylka $s(\bar{e})$, [mAU]	REACTLAB	1,17	0,91	0,83	0,75		0,83	0,82	1,04	1,12			
Sigma z REACTLABu, [mAU]	REACTLAB	1,19	0,92	0,84	0,76		0,84	0,83	1,05	1,13			

2.2.1.3 Krok 4: efektivní rozsah vlnových délek:

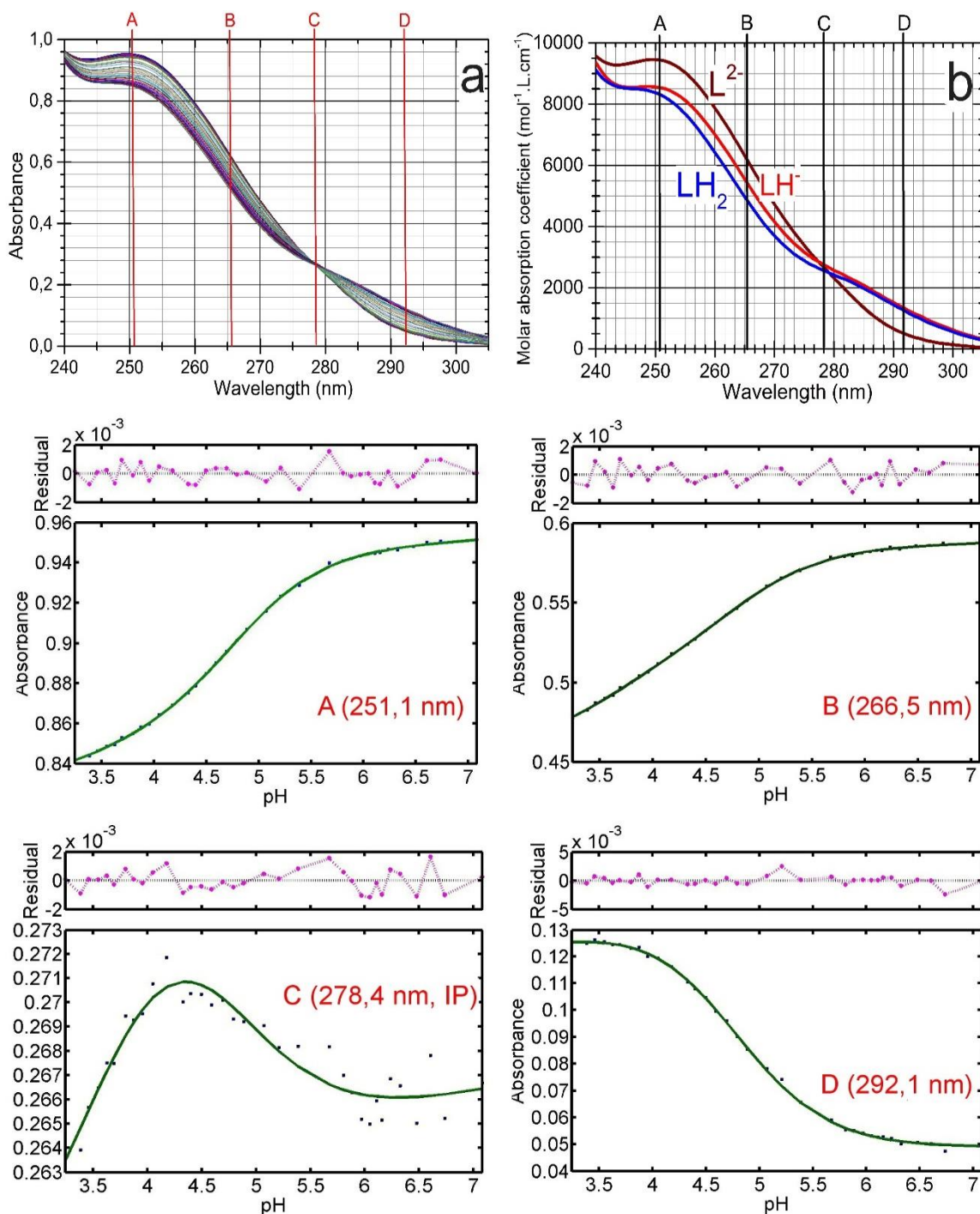
Byly vybrány tři rozsahy vlnových délek 240–278 nm, 278–308 nm a 240–308 nm a byla vyhodnocena spektra v těchto rozsazích vlnových délek. Obr. V6 ilustruje odhady dvou disociačních konstant, včetně směrodatné odchylky absorbance $s(A)$, která sloužila za kritérium spolehlivosti vypočtených odhadů parametrů.



Obr. V6 Hledání efektivního rozsahu vlnových délek, zkoumání poloh ionizovatelných skupin a chromoforů k nalezení dostatečné změny absorbance ve spektru pro nastavené pH umožňuje spolehlivé odhady disociačních konstant. Protonace léčiva o dvou disociačních konstantách byla analyzována pomocí dvou oddělených absorpčních pásů. Nejvhodnější spektrum bylo dosaženo v rozmezí 240–280 nm, ačkoliv odhady pK_a byly téměř stejné pro všechny rozsahy vlnových délek.

Nejllepší těsnosti proložení vypočtených spekter s hodnotou kritéria $s(A) = 0,7$ mAU bylo dosaženo v rozmezí vlnových délek 240–278 nm, ačkoliv odhady disociačních konstant si byly podobné ve všech třech testovaných rozsazích vlnových délek. Podobně byly také tři distribuční diagramy relativní koncentrace rozličně protonovaných částic na obr. V6 značně podobné.

2.2.1.4 Krok 5: Změna absorbance ve spektru při pH titraci:

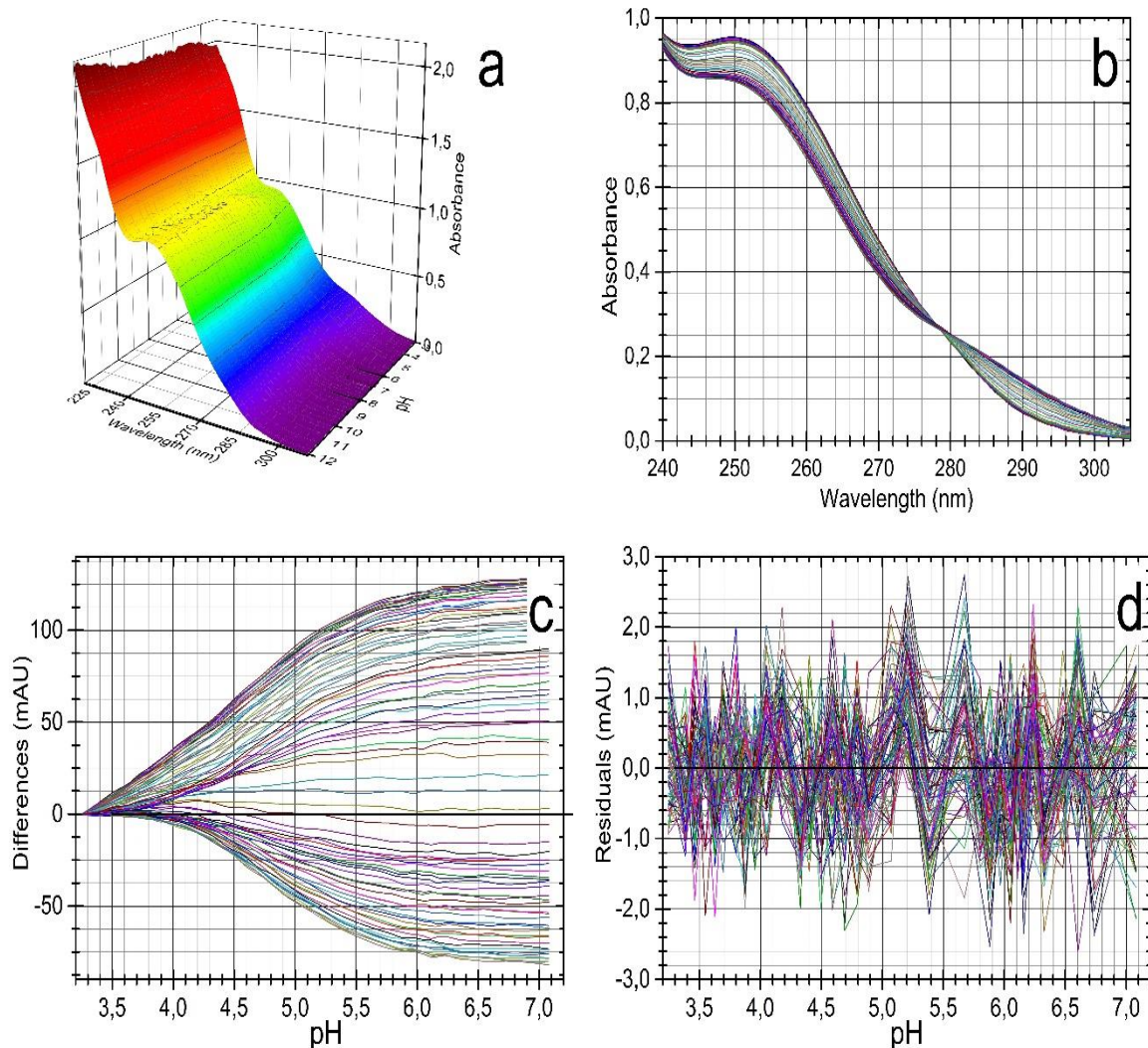


Obr. V7 Upravené pH nezpůsobilo stejnou změnu absorbance ve spektru Valsartanu, protože některé chromofory byly pH ovlivněny jen nepatrně: a spektrum molárního absorpčního koeficientu obsahuje polohy čtyř vlnových délek A až C, pro které byly analyzovány A-pH křivky b-d. Grafy A až C ukazují citlivost chromoforů v molekule Valsartanu na pH.

Titrační změna pH nezpůsobila významné změny v různých částech spektra Valsartanu, protože některé chromofory byly změnou pH ovlivněny jen nepatrně. Obr. V7a ukazuje spektrum závislosti molárních absorpčních koeficientů na vlnové délce pro tři vybrané vlnové délky A až C, pro které jsou zobrazeny A-pH křivky. Obr. V7b až V7d v grafech A až C ukazuje na citlivost chromoforů v molekule Valsartanu na změny pH, která zde byla monitorována formou křivek A-pH. K maximálním změnám absorbance dochází při změnách pH při 251,1 nm a 266,5 nm. Grafy ukazují odhady disociačních konstant a přítomnost různě protonovaných částic. Z těchto grafů je také zřejmé, že obě disociační konstanty byly numericky velmi blízké, a proto jejich regresní odhad byl obtížnější. Každý graf A až C na obr. V7 obsahuje rovněž graf reziduí. Kvalita reziduí odhaluje stupeň těsnosti proložení vypočtených A-pH křivek experimentálními body. Rezidua by měla oscilovat kolem nuly a jejich znaménko by se mělo často měnit. Rezidua by také měla vykazovat Gaussovské rozdělení se střední hodnotou rovnou nule. Pro nejtěsněji proložená spektra se očekává, že směrodatná odchylka $s(A)$ bude mít stejnou velikost jako instrumentální šum absorbance, $s_{inst}(A)$.

2.2.1.5 Krok 6: Poměr signál-chyba ve spektrálních změnách:

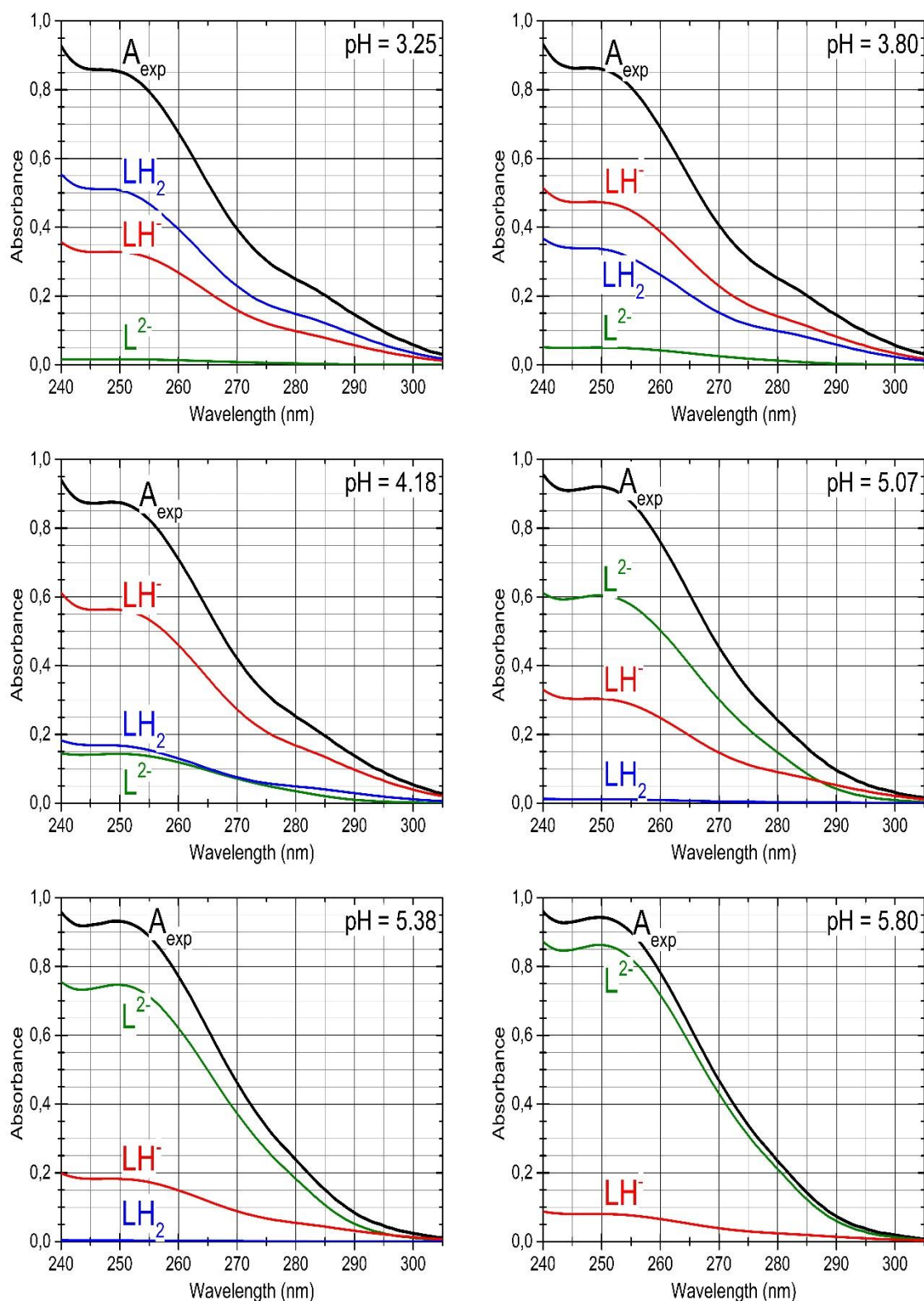
Ve spektrofotometrickém stanovení odhadů pK_a bylo nejprve třeba zjistit, zda změna pH způsobila dostatečnou změnu absorbance ve spektru. Z obr. V8a, b je zřejmé, že spektrální odezva molekuly Valsartanu není všude stejná a dostatečná pro numerický odhad obou disociačních konstant protonační rovnováhy, takže bylo nutné nejprve ověřit, zda lze obě disociační konstanty odhadnout i při naměřených menších změnách absorbance spekter. Změna i -tého spektra a absorbance j -spektra může být vyjádřena rozdílem $\Delta_{ij} = A_{ij} - A_i$. Bylo nezbytné prozkoumat, zda byly tyto malé změny absorbance Δ_{ij} ve spektrech dostatečně velké do numerické regresní analýzy a hlavně větší než hodnota šumu absorbance $s_{inst}(A)$. Změny absorbance Δ_{ij} (mAU) ve spektrech byly proto vyneseny proti pH pro všechny prvky absorbanční matice (obr. V8a) a ukázalo se, že hodnoty změny absorbance Δ_{ij} byly sice menší, ale stále větší než instrumentální šum $s_{inst}(A)$ v obr. V8b. Zatímco rezidua e na obr. V8b byly převážně v rozmezí -1,5 až 1,5 mAU, změny v rozdílu absorbance Δ_{ij} (mAU) na obr. V8a byly v rozmezí -80 až 120 mAU.



Obr. V8 Analýza změny Δ_{ij} v absorbančních spektrech při nastaveném pH: a) Graf rozdílu změny absorbance Δ_{ij} ve spektru Valsartanu během pH titrace, b) Rezidua e [mAU] ukazují, zda byly stejné velikosti jako instrumentální šum $s_{inst}(A)$, (REACTLAB, ORIGIN 9)

2.2.1.6 Krok 7: Dekonvoluce spektra

Dekonvoluce každého experimentálního spektra do absorpčních pásem jednotlivých částic ukázala, zda byla hypotéza protonace navržena efektivně. Obr. V9 znázorňuje dekonvoluci šesti vybraných experimentálních spekter na absorpční pásy týkající se různě protonovaných částic Valsartanu. Při pH 3,25 absorpční pás částice LH_2 , který byl v rovnováze s aniontem LH^- byl stále významný. Rozsah pH 3,80 až 5,07 byl velmi důležité, protože zde byly tři částice v rovnováze, a to LH_2 , LH^- a L^{2-} . Při pH 5,38 a 5,80, spektrální pásmo aniontu LH^- se zmenšovalo, zatímco pásmo L^{2-} se zvyšovalo.



Obr. V9 Znáznornění dekonvoluce šesti vybraných experimentálních spekter na absorpční pásy z různých protonovaných částic Valsartanu. Při $pH = 3,25$ byl absorpční pás částice LH_2 , který byl v rovnováze s aniontem LH^- stále významný. Rozsah pH 3,80 až 5,07 byl velmi důležitý, protože zde byly tři částice v rovnováze, jmenovitě LH_2 , LH^- , L^{2-} . Při $pH = 5,38$ a 5,80 se spektrální pás aniontu LH^- snížil, zatímco pás L^{2-} se zvýšil.

2.2.2 pH-metrická analýza dat

Potenciometrická titrace alkalizovaného Valsartanu kyselinou chlorovodíkovou byla prováděna při 25 °C a 37 °C (tabulka V2) a při upravené iontové síle (obr. V10). Při analýze pH-metrických dat byl počáteční grafický odhad každé disociační konstanty Valsartanu dále zpřesněn programem ESAB.

2.2.2.1 Krok 8: pH-metrická data analyzovaná Bjerrumovou tvornou funkcí

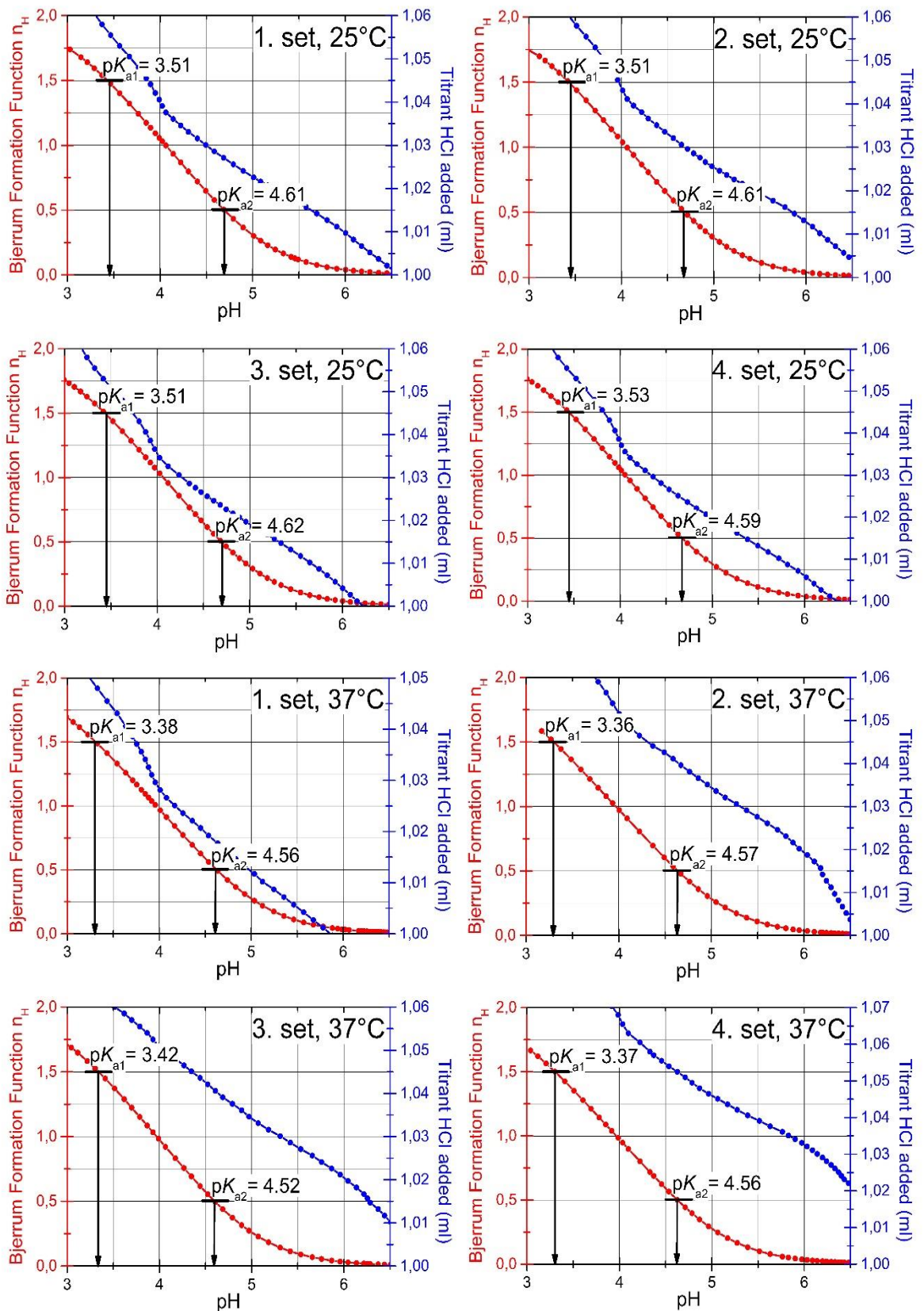
Valsartan má dvě disociační konstanty a jejich zpřesnění bylo provedeno nelineární regresí pH-metrické titrační křivky programem ESAB. Nelineární regresní analýza byla aplikována na střední část pH-metrické titrační křivky pro deprotonovaný anion alkalizovaného Valsartanu, který byl titrován kyselinou chlorovodíkovou (obr. V10). Odhady dvou disociačních konstant pK_{a1} a pK_{a2} byly vyhodnoceny v grafu Bjerrumovy tvorné funkce. U koncentrace vyšší než $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ se vytvořila sraženina Valsartanu. Rezidua byla definována jako rozdíl mezi experimentálním a vypočítaným objemem titrantu HCl, $e_i = V_{\text{exp},i} - V_{\text{calc},i}$. Test spolehlivosti odhadů obou disociačních konstant byl proveden statistickou analýzou reziduí. Zpřesněním také *skupinových parametrů* se statistiky testu správnosti výrazně zlepšily. Za citlivé kritérium spolehlivosti disociačních konstant byl užit průměr absolutních hodnot reziduí $E|e|$ [μL]. Porovnání numerické hodnoty této statistiky s instrumentálním šumem, reprezentovaným směrodatnou odchylkou titrantu HCl, $s_{\text{inst}}(V) = s(V) = 0,1 \mu\text{L}$, se ukázalo jako vynikající proložení křivky, protože střední reziduuum $E|\bar{e}|$ a reziduálová směrodatná odchylka titrantu HCl $s(V)$ byly stejné nebo nižší než experimentální šum, $s_{\text{inst}}(V)$. Hodnoty obou sledovaných statistik velikosti $0,1\mu\text{L}$ byly numericky podobné instrumentální chybě použitých mikrobyret $s(V) = 0,1 \mu\text{L}$. Kromě toho rezidua oscilovala mezi dolní ($-0,2 \mu\text{L}$) a horní mezí ($0,2 \mu\text{L}$) interních Hoaglinových mezí a mimo tyto meze nebyla nalezena žádné reziduuum (vysvětlení viz. str. 81, ref. [58]).

2.2.2.2 Krok 9: Nejistota pK_a v reprodukováných měřeních:

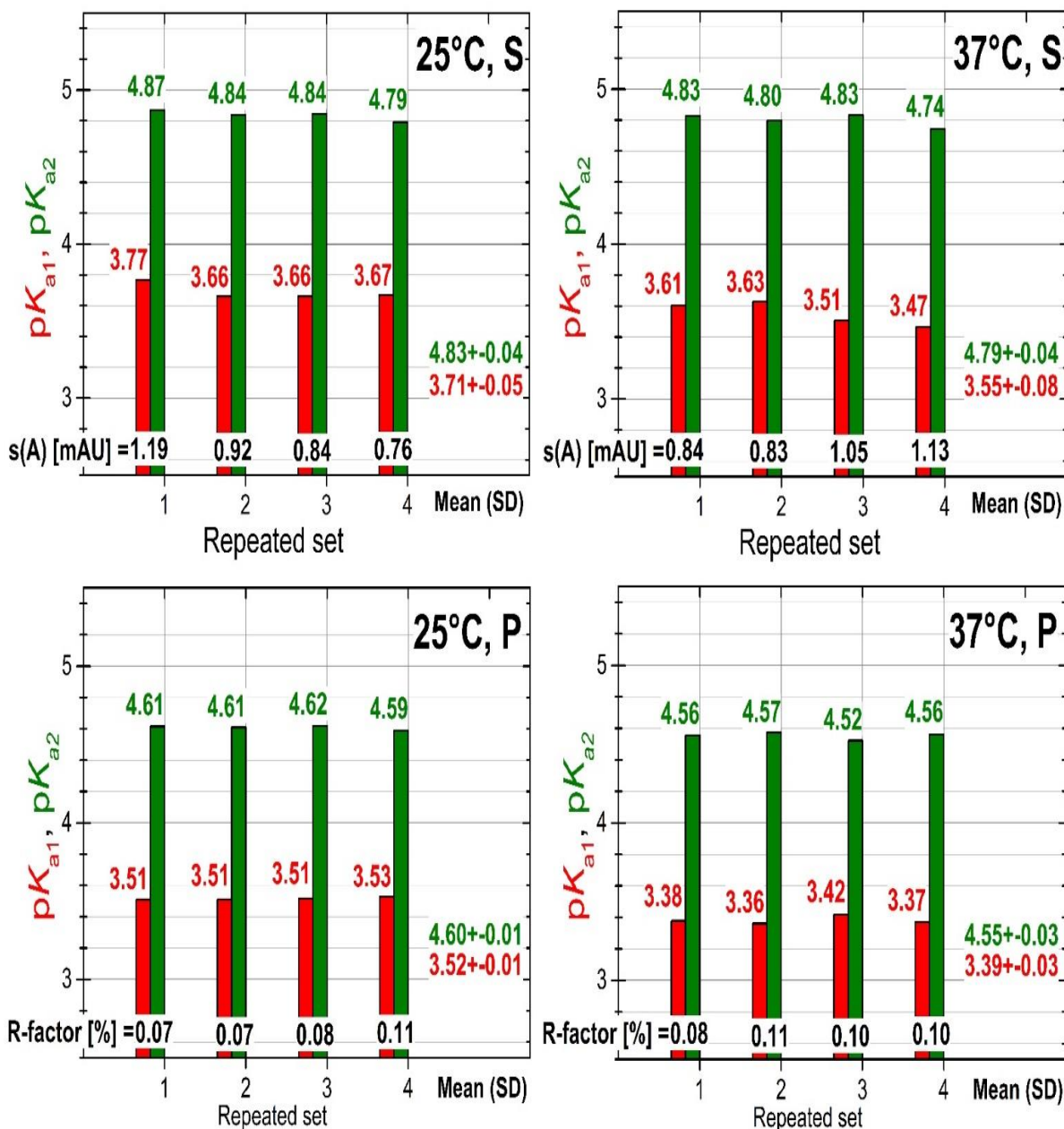
Odhady disociačních konstant zjmeněné programem ESAB se ukázaly jako dostatečně spolehlivé (Tabulka V2). Těsnost proložení vypočtené pH-křivky bylo možné zlepšit pouze dalším zlepšením parametru L_0 koncentrací léčiva Valsartanu v titrační nádobě.

Tabulka V2 Regresní zpřesnění společných a skupinových parametrů programem ESAB pro pH-metrickou titraci alkalizovaného $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Valsartanu HCl: odhady disociačních konstant pK_{a1} , pK_{a2} Valsartanu se směrodatnými odchylkami na poslední platnou číslici uvedenou v závorkách. Spolehlivost odhadu parametrů je prokázána statistickou analýzou reziduí: průměr reziduí $E(\hat{e})$ [μL], medián M [μL], průměr absolutní hodnoty reziduí, $E|\hat{e}|$ [μL], směrodatná odchylka reziduí $s(\hat{e})$ [μL], šikmost $g_1(\hat{e})$ a špičatost $g_2(\hat{e})$ prokazující Gaussovo rozdělení, Hamiltonův R -faktor relativní těsnosti [%] a Akaikeho informační kritérium AIC . Společné parametry upřesněny: pK_{a1} , pK_{a2} . Zjevněné skupinové parametry H_0 , H_T , L_0 . Konstanty: $t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $pK_w = 13,9799$, $s(V) = s_{\text{inst}}(V) = 0,1 \mu\text{L}$, I_0 upraveno (titrant v nádobce), $I_T = 1,04477$ (titrant v byretě HCl)

Teplota	25 °C				37 °C			
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření
Reprodukovatelnost								
Odhady skupinových parametrů H_0, H_T a L_0 v hledaném protonačním modelu v ESAB								
Počet bodů n	29	28	29	28	26	24	24	26
$H_0 \times 100 \text{ (mol} \cdot \text{dm}^{-3}\text{)}$	5,53(00)	5,55(00)	5,51(00)	5,53(00)	5,49(00)	5,61(00)	5,59(00)	5,72(00)
$H_T \text{ (mol} \cdot \text{dm}^{-3}\text{)}$	1,0441	1,0441	1,0441	1,0441	1,0441	1,0441	1,0441	1,0441
$L_0 \times 1000 \text{ (mol} \cdot \text{dm}^{-3}\text{)}$	1,18(00)	1,21(00)	1,15(00)	1,24(00)	1,23(00)	1,27(00)	1,26(00)	1,51(00)
Odhady společných parametrů disociačních konstant v hledaném protonačním modelu v ESAB								
pK_{a1}	3,51(01)	3,51(02)	3,51(02)	3,53(02)	3,38(02)	3,36(03)	3,42(02)	3,37(02)
pK_{a2}	4,61(01)	4,61(01)	4,62(01)	4,59(02)	4,46(01)	4,58(02)	4,52(02)	4,56(01)
Test těsnosti proložení statistickou analýzou reziduí								
Průměr reziduí $E(\hat{e})$ [μL]	1,72 E-02	1,07 E-02	1,38 E-02	1,43 E-02	3,85 E-02	-1,67 E-02	6,67 E-02	1,92 E-02
Medián M [μL]	0,70	0,50	0,60	0,90	0,80	1,00	0,60	0,70
Průměr absolutních hodnot reziduí, $E \hat{e} $ [μL]	0,71	0,69	0,74	0,98	0,79	0,70	0,85	0,86
Směrodatná odchylka reziduí, $s(\hat{e})$ [μL]	0,83	0,84	0,90	1,16	0,93	1,19	1,12	1,08
Šikmost $g_1(\hat{e})$	0,03	0,08	0,03	0,07	0,31	0,88	0,47	0,52
Špičatost $g_2(\hat{e})$	1,96	2,22	2,31	1,96	1,83	2,88	3,13	3,04
Akaikeovo informační kritérium, AIC	-407,95	-393,46	-403,73	-375,20	-359,77	-319,66	-323,71	-351,93
Hamiltonův R -faktor, (%)	0,07	0,07	0,08	0,11	0,08	0,11	0,10	0,10



Obr. V10 Reprodukovanost hledání protonačního modelu analýzou čtyř reprodukováných pH-titračních křivek při 25 °C a 37 °C. Alkalizovaný Valsartan byl titrován kyselinou chlorovodíkovou a Bjerrumova tvorná křivka byla vynesena do grafu pro dvě disociační konstanty, upřesněné programem ESAB.

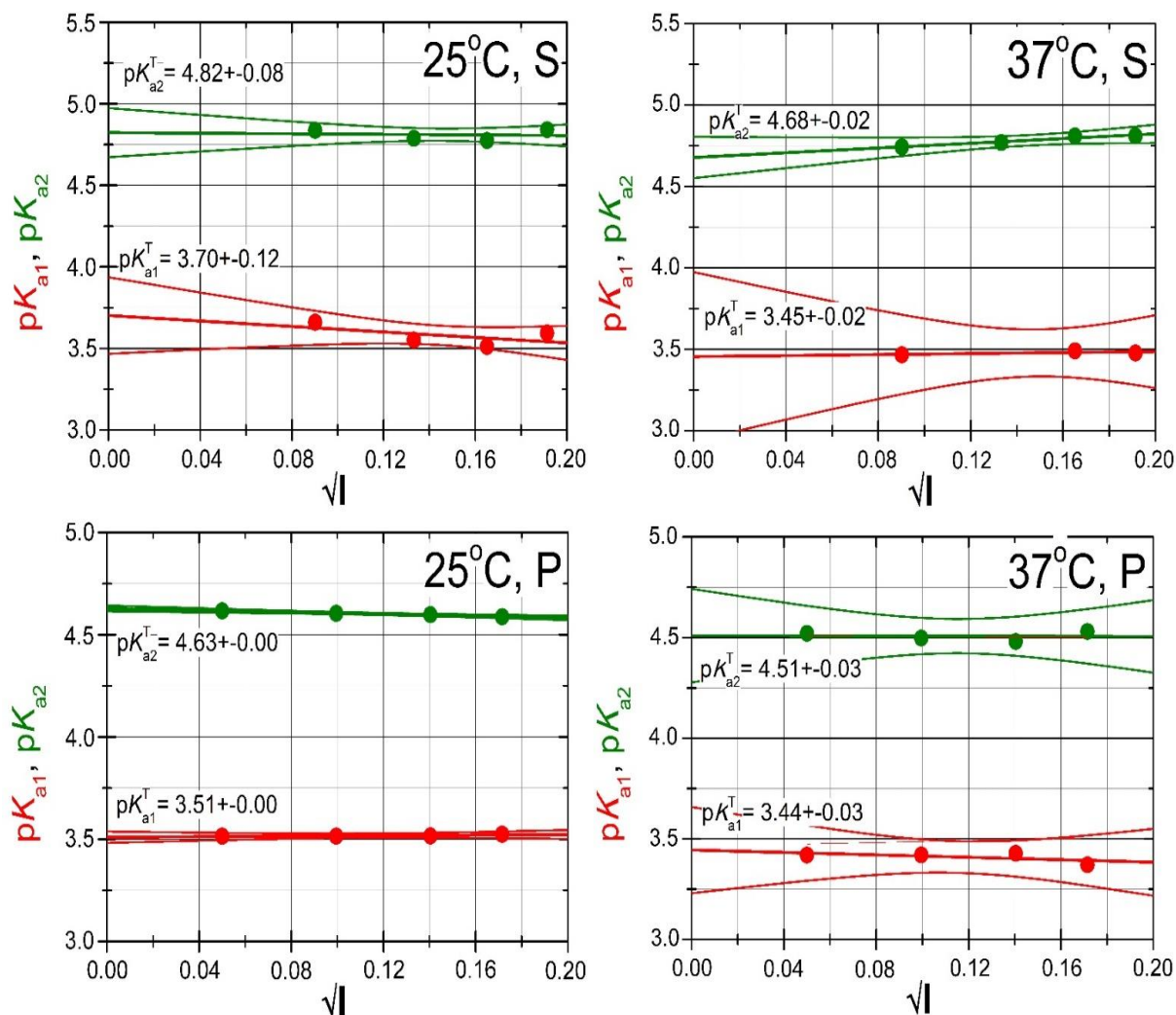


Obr. V11 Reprodukovatelnost disociačních konstant Valsartanu čtyř reprodukováných UV-metrických měření (S) a čtyř reprodukováných pH-metrických měření (P) při 25 °C a 37 °C byla ve shodě. Aritmetický průměr disociačních konstant s jejich směrodatnou odchylkou byl vyjádřen jako $s(A)$ a $s(V)$.

2.2.2.3 Krok 10: Termodynamické disociační konstanty:

Použitím Debye-Hückelovy rovnice na data z tabulek V1 a V2 byly termodynamické disociační konstanty pK_{a1}^T a pK_{a2}^T jako neznámé parametry odhadnuty při dvou teplotách 25 °C a 37 °C. Vzhledem k úzkému rozmezí nízkých hodnot iontové síly (KCl), nemohly být vypočteny dva parametry Debye-Hückelovy rovnice, jmenovitě parametr iontové velikosti \tilde{a} a vysolovací koeficient C . Obr. V12 přináší extrapolaci smíšených disociačních konstant na nulovou iontovou sílu podle Debye-Hückelova zákona pro protonační model dvou

disociačních konstant při 25 °C a 37 °C pomocí přímek s 95 % konfidenčními pásy Working-Hottelinga (vysvětlení na str. 474 v ref. [57]): $pK_{a1}^T = 3,70 \pm 0,12$, $pK_{a2}^T = 4,82 \pm 0,08$ při 25 °C a $pK_{a1}^T = 3,44 \pm 0,08$, $pK_{a2}^T = 4,67 \pm 0,02$ při 37 °C (spektrofotometrie) a $pK_{a1}^T = 3,51 \pm 0,00$, $pK_{a2}^T = 4,63 \pm 0,00$, při 25 °C a $pK_{a1}^T = 3,44 \pm 0,03$, $pK_{a2}^T = 4,51 \pm 0,03$ při 37 °C (potenciometrie).



Obr. V12 Závislost smíšených disociačních konstant Valsartanu na druhé odmocnině iontové síly pro dvě disociační konstanty vedoucí k termodynamickým disociačním konstantám pK_a^T při 25 °C a 37 °C pomocí UV-metrické (S) a pH-metrické techniky (P).

2.2.2.4 Krok 11: Stanovení entalpie, entropie a Gibbsovy energie:

Standardní entalpická změna ΔH^0 disociace byla vypočtena z van't Hoffovy rovnice $d \ln K / dT = \Delta H^0 / RT^2$. Z hodnot standardní Gibbsovy energie $\Delta G^0 = -RT \ln K$ a ΔH^0 lze vypočítat změnu entropie ve standardním stavu $\Delta S^0 = (\Delta H^0 - \Delta G^0) / T$, kde R (konstanta ideálního plynu) = $8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, K je termodynamická disociační konstanta a T je absolutní teplota.

Odhady disociačních konstant z pH-metrické metody byly použity pro výpočet extra-termodynamických hodnot. Pozitivní hodnoty entalpie $\Delta H^0(pK_{a1}) = 10,33 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta H^0(pK_{a2})$

= 17,70 kJ·mol⁻¹ ukázaly, že disociace je doprovázena absorpcí tepla. Pozitivní hodnoty energetických změn Gibbsovy energie byly $\Delta G^0(\text{p}K_{\text{a1}}) = 20,03 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G^0(\text{p}K_{\text{a2}}) = 26,43 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 25 °C. Změny entropie disociace ΔS^0 při 25 °C a 37 °C byly negativní $\Delta S^0(\text{p}K_{\text{a1}}) = -32,56 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0(\text{p}K_{\text{a2}}) = -29,26 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 25 °C a $\Delta S^0(\text{p}K_{\text{a1}}) = -30,01 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta S^0(\text{p}K_{\text{a2}}) = -25,92 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 37 °C.

3 DISKUSE

3.1 Baricitinib

Regresní program REACTLAB analyzoval pH-absorbanční matici $\text{pH } 1 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Baricitinibu a provedl vyčíslení odhadů čtyř disociačních konstant numerickými postupy. Výsledky zjemnění odhadů disociačních konstant vycházejí z minima účelové funkce čili reziduálového součtu čtverců RSS, dále obsahují odhadované parametry, směrodatné odchylky parametrů a korelačních koeficientů mezi nimi, mapu reziduí a také koncentrace všech rozličně protonovaných částic chemického modelu pro všechny body spekter. Při hledání chemického modelu je obvykle třeba důsledně vzít v úvahu všechny tyto uvedené faktory, protože žádný z nich sám o sobě samostatně nebyl spolehlivým ukazatelem úspěchu výstavby regresního modelu.

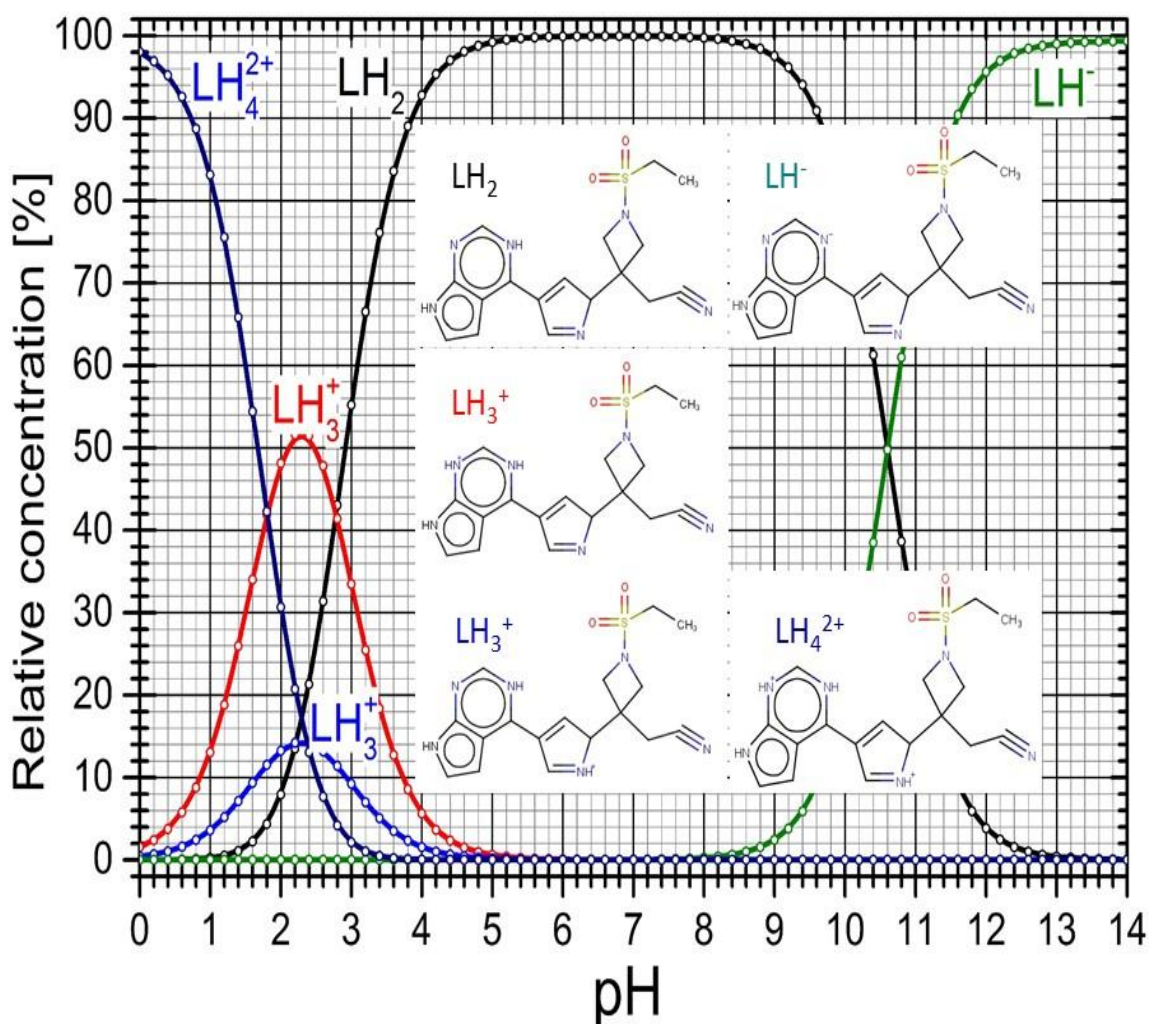
Program ESAB k vyhodnocení potenciometrické pH-titrace, minimalizující rezidua $e_i = V_{\text{exp},i} - V_{\text{calc},i}$, dosáhl hodnot reziduí 0,1 nebo 0,2 μl , což znamená, že bylo dosaženo vynikajícího proložení vypočtené titrační křivky experimentálními body. Lze konstatovat, že spolehlivost *společných parametrů*, tj. disociačních konstant Baricitinibu byla prokázána, i když *skupinové parametry* L_0 , H_T byly v regresním modelu špatně podmíněny. Dosažená těsnost proložení ukázala na dostatečnou spolehlivost odhadů všech tří disociačních konstant Baricitinibu při pěti rozdílných teplotách.

Nesouhlas experimentálně vyčíslených disociačních konstant $\text{p}K_{\text{ai}}$ s jejich teoreticky předpovězenými hodnotami ze struktury molekuly Baricitinibu by mohl být způsoben složitou strukturou rezonance heterocyklického jádra a následně i různými elektronovými distribucemi, což zřejmě vedlo k různým teoreticky predikovaným hodnotám $\text{p}K_{\text{ai}}$. V takových případech by prognostické programy MARVIN, PALLAS a ACD/Percepta poněkud selhávaly a disociační konstanty byly proto věrohodnější z experimentálního stanovení. Vzhledem k tomu, že odhady $\text{p}K_{\text{ai}}$ jak potenciometrickými, tak spektrofotometrickými metodami byly podobné a dále s přihlédnutím k věrohodnosti regresní analýzy dat, bylo možné učinit závěr, že získané experimentální výsledky jsou spolehlivé a potvrzují skutečné protonační rovnáhy Baricitinibu. Z termodynamického hlediska jsou pro protonační schéma uvedeny závěry (obr. B18):

- 1) Je-li $\text{p}K_{\text{a}}$ pozitivní, je také standardní změna volné energie ΔG^0 pro disociační reakci pozitivní.
- 2) Dále pozitivní hodnota ΔH^0 ukazuje, že disociační proces je endotermní a je doprovázen absorpcí tepla. Přeuspořádání vodíkových vazeb by pak mohlo být základem jak pro ΔH^0 , tak pro ΔS^0 v interakcích molekula léku-proton a vzájemný vztah mezi ΔH^0 a ΔS^0 se jeví jako věrohodný, skutečně pravděpodobný. Vodíková vazba jako

centrální interakce mezi molekulou léku a protonem je také mechanicky přitažlivá. Ve vodě tvoří totiž vodíkové vazby síť spojených řetězců, které se dynamicky mění v určitém stavu. Protože dipól vytvořený posunutím elektronu od protonu vodíku, tvoří tyto řetězce sled mono- a di-póly, které jsou citlivé na elektrostatický potenciál léčiva a molekul receptoru a poskytují mechanismus pro přenos informací na dálku, z léčiva na receptor.

- 3) Příspěvek entropie je v těchto reakcích většinou nepříznivý ($\Delta S^0 < 0$). Ionty ve vodném roztoku mají tendenci orientovat okolní molekuly vody, které orientují roztok a snižují entropii. Přínos iontu k entropii je částečná molární entropie, která je často negativní, zejména pro malé nebo vysoce nabitě ionty. Ionizace kyseliny zahrnuje reverzibilní tvorbu dvou iontů, takže entropie klesá ($\Delta S^0 < 0$).



Obr. B18. Protonační schéma s distribučním diagramem

3.2 Valsartan

Regresní program REACTLAB analyzoval pH-absorbanční matici $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Valsartanu a kvantifikoval odhady dvou disociačních konstant numerickými přístupy. Výsledky disociačních konstant zahrnují informace, týkající se dostatečné minimalizace funkce součtů čtverců reziduí RSS , vyčíslených odhadů parametrů, jejich směrodatných odchylek a korelačních koeficientů mezi nimi, mapa reziduí a koncentrace všech částic protonačního modelu pro všechny body dat. Při hledání modelu by se měly brát v úvahu všechny výše uvedené faktory, protože žádný z nich samostatně nebyl spolehlivým ukazatelem úspěchu.

Program ESAB minimalizující rezidua $e_i = V_{\text{exp},i} - V_{\text{calc},i}$ dosáhl hodnot reziduí asi 0,1 nebo 0,2 μL , což ukazuje na výborné proložení vypočtené titrační křivky experimentální body. Lze konstatovat, že tím byla spolehlivost disociačních konstant Valsartanu prokázána, i když *skupinové parametry* L_0 a H_T byly v nelineárním regresním modelu špatně podmíněny. Těsné proložení titrační křivky ukázalo tím na dostatečnou spolehlivost odhadů obou disociačních konstant Valsartanu při 25 a 37 °C.

Vzhledem k tomu, že odhady pK_{ai} z potenciometrických i spektrofotometrických metod jsou podobné a co je nejdůležitější, co se týče dosaženého přizpůsobení regresi dat, lze dospět k závěru, že získané experimentální výsledky jsou spolehlivé a ukazují skutečnou disociaci látky.

Když je pK_a pozitivní, standardní změna Gibbsovy energie ΔG^0 pro disociační reakci je také pozitivní. Pozitivní hodnota ΔH^0 znamená, že proces disociace je endotermický a je doprovázen absorpcí tepla. V těchto reakcích je příspěvek entropie většinou nežádoucí ($\Delta S^0 < 0$). Ionizace kyseliny zahrnuje reverzibilní tvorbu dvou iontů, takže entropie klesá ($\Delta S^0 < 0$).

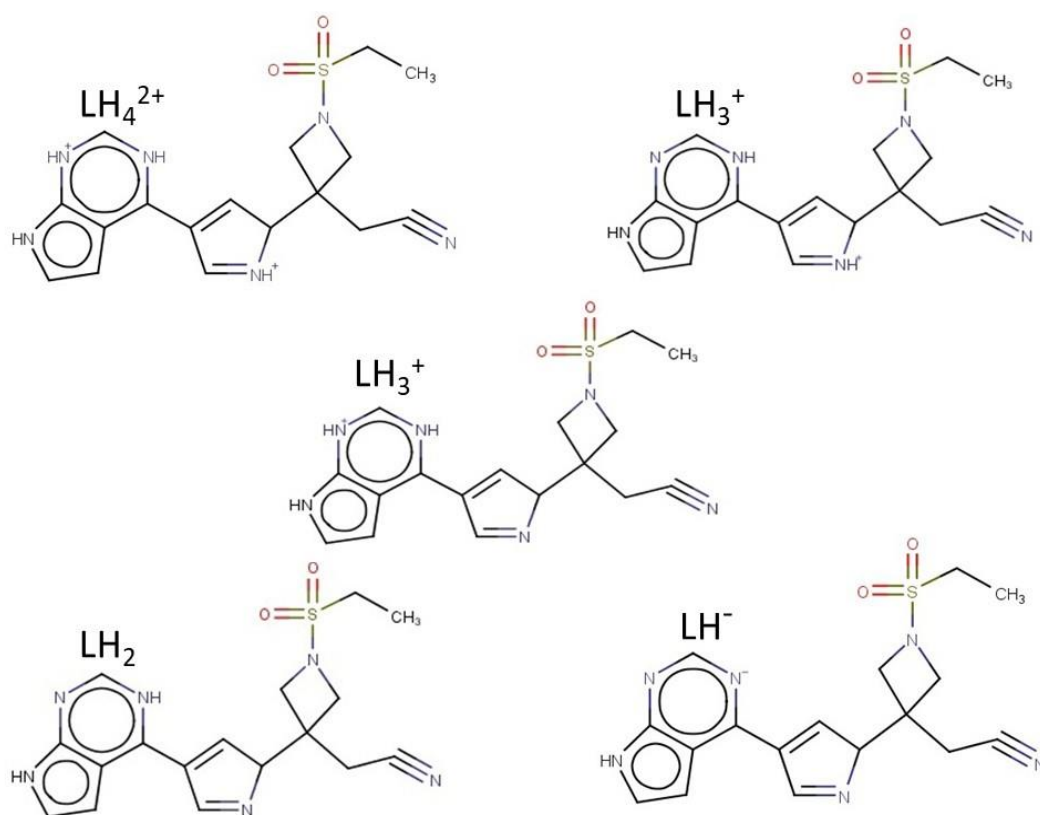
4 ZÁVĚR

4.1 Baricitinib

- (1) Spektrofotometrická a potenciometrická titrace pH umožnila měření až tří nebo čtyř postupných disociačních konstant Baricitinibu (obr. B18). Chromofory Baricitinibu vykazovaly poměrně malé změny absorbance v UV/VIS-spektrech při změně pH roztoku, a proto odhady disociačních konstant byly vystaveny větší nejistotě, než tomu bylo při potenciometrickém stanovení. Z tohoto důvodu se jevil spolehlivějším odhad disociačních konstant monitorovaný potenciometricky.
- (2) Baricitinib označený LH_2 byl schopen protonace na dva rozpustné kationty LH_4^{2+} , LH_3^+ , neutrální molekulu LH_2 , a disociace na dva rozpustné anionty LH^- a L^{2-} v čisté vodě. Graf molárních absorpčních koeficientů těchto různě protonovaných částic proti vlnové délce indikoval, že spektra ϵ_L , ϵ_{LH} , ϵ_{LH_2} byla pro částice podobná až stejná a dále spektra ϵ_{LH_4} a ϵ_{LH_3} si byla rovněž podobná.
- (3) Bylo prokázáno, že v rozmezí pH 2 až 13 lze spolehlivě odhadnout čtyři disociační konstanty ze spekter, a to pro koncentraci obtížně rozpustného Baricitinibu $1,0 \times 10^{-4}$ mol·dm⁻³. Ačkoli upravené pH méně ovlivnilo změny absorbance v chromoforu, spolehlivě byly stanoveny čtyři disociační konstanty programem REACTLAB při $I = 0,0020$ mol·dm⁻³: $pK_{a1} = 3,01 \pm 0,12$, $pK_{a2} = 3,85$, $pK_{a3} = 6,58 \pm 0,12$, $pK_{a4} = 12,47$ při 25 °C a $pK_{a1} = 3,09 \pm 0,12$, $pK_{a2} = 3,51$, $pK_{a3} = 4,59 \pm 0,12$, $pK_{a4} = 12,84$ při 37 °C.
- (4) Pouze tři disociační konstanty Baricitinibu byly stanoveny regresní analýzou potenciometrických křivek pH-titrace pro koncentraci 1×10^{-3} mol·dm⁻³ programem ESAB při $I = 0,0001$ mol·dm⁻³: $pK_{a1} = 3,68 \pm 0,03$, $pK_{a2} = 3,80 \pm 0,03$, $pK_{a3} = 4,72 \pm 0,05$ při 25 °C a $pK_{a1} = 3,61 \pm 0,08$, $pK_{a2} = 3,72 \pm 0,06$, $pK_{a3} = 4,42 \pm 0,14$ při 37 °C.
- (5) Predikce disociačních konstant Baricitinibu byla provedena programy MARVIN, PALLAS a ACD/Percepta především k určení protonačních míst (obr. B19) v molekule Baricitinibu. Při porovnání tří prediktivních a dvou experimentálních technik se prognostické programy někdy lišily v odhadu pK_a .
- (6) Termodynamické disociační konstanty Baricitinibu byly určeny spektrofotometricky, $pK_{a1}^T = 3,07$, $pK_{a2}^T = 3,87$, $pK_{a3}^T = 6,27$, $pK_{a4}^T = 12,78$ při 25 °C a $pK_{a1}^T = 3,00$, $pK_{a2}^T = 3,79$, $pK_{a3}^T = 6,12$, $pK_{a4}^T = 12,75$ při 37 °C a potenciometricky $pK_{a1}^T = 3,69$, $pK_{a2}^T = 3,81$, $pK_{a3}^T = 4,73$ při 25 °C a $pK_{a1}^T = 3,62$, $pK_{a2}^T = 3,73$, $pK_{a3}^T = 4,43$ při 37 °C.

Termodynamické parametry ΔH^0 a ΔG^0 byly vypočteny z teplotní změny disociačních konstant podle van't Hoffovy rovnice. Spektrální metodou byly ze závislosti $\ln K$ na $1/T$ vyčísleny hodnoty molární entalpie ΔH^0 , entropie ΔS^0 a Gibbsovy volné energie ΔG^0 (obr. B16):

pro pK_{a1} s hodnotami $\Delta H^0 = 5,24 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -40,31 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 12,02 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K, pro pK_{a2} s hodnotami $\Delta H^0 = 19,78 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -6,56 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 1,98 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K, pro pK_{a3} s hodnotami $\Delta H^0 = 55,53 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 62,91 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 18,70 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K a pro pK_{a4} s hodnotami $\Delta H^0 = 23,78 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -167,40 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 49,94 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K. Potenciometrickou titrací byly ze závislosti $\ln K$ na $1/T$ vyčísleny hodnoty molární entalpie ΔH^0 , entropie ΔS^0 a Gibbsovy volné energie ΔG^0 pro pK_{a1} s hodnotami $\Delta H^0 = 41,91 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 69,58 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 21,09 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K, pro pK_{a2} s hodnotami $\Delta H^0 = 40,30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 51,23 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 25,12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K, pro pK_{a3} s hodnotami $\Delta H^0 = 18,54 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -29,89 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\Delta G^0 = 27,40 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,16 K.

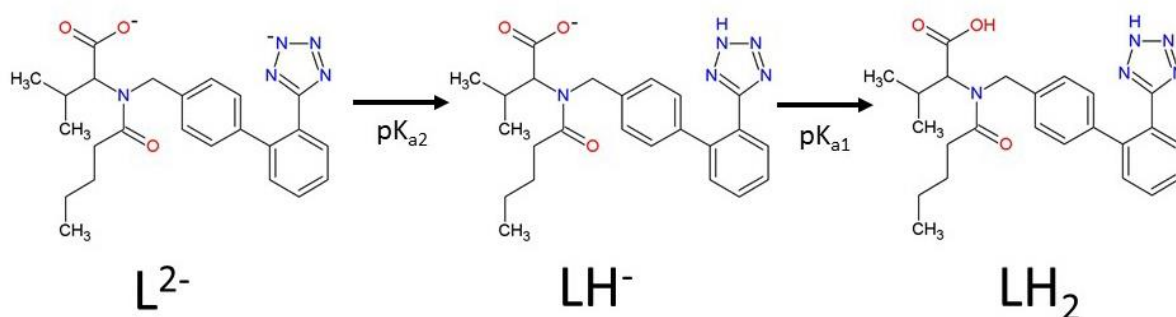


Obr. B19 Protonační schéma Baricitinibu

4.2 Valsartan

(1) Spektrofotometrická a potenciometrická titrace pH umožnily měření dvou blízkých disociačních konstant Valsartanu (obr. V13). Chromofory Valsartanu vykazovaly při úpravě pH roztoku menší změny absorbance v UV/Vis-spektrech, a proto odhady disociačních konstant byly vystaveny větší nejistotě než potenciometrickým stanovením. Z tohoto důvodu byl potenciometricky získán spolehlivější odhad disociačních konstant.

- (2) Anion Valsartanu označený L^{2-} byl schopen protonace v čisté vodě za vzniku rozpustných částic LH_2 , LH^- . Graf molárních absorpčních koeficientů různě protonovaných částic proti vlnové délce ukázal, že spektrum ϵ_L , ϵ_{LH} , ϵ_{LH_2} bylo pro částice korelované a že hodnoty v párech jsou značně podobné.
- (3) Bylo prokázáno, že v rozmezí $pH = 2-7$ lze ze spektra spolehlivě odhadnout dvě disociační konstanty, když koncentrace obtížně rozpustného Valsartanu byla $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ nebo méně. Přestože nastavená hodnota pH ovlivnila změny absorbance v chromoforu méně, byly spolehlivě stanoveny dvě termodynamické disociační konstanty, přičemž REACTLAB dosáhl hodnot $pK_{a1}^T = 3,70 \pm 0,12$, $pK_{a2}^T = 4,82 \pm 0,08$ při 25°C a $pK_{a1}^T = 3,44 \pm 0,08$, $pK_{a2}^T = 4,67 \pm 0,02$ při 37°C .
- (4) Programem ESAB byly stanoveny regresní analýzou potenciometrických křivek titrace pH dvě termodynamické disociační konstanty Valsartanu při koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $pK_{a1}^T = 3,51 \pm 0,00$, $pK_{a2}^T = 4,63 \pm 0,00$, při 25°C a $pK_{a1}^T = 3,44 \pm 0,03$, $pK_{a2}^T = 4,51 \pm 0,03$ při 37°C .
- (5) Predikce disociačních konstant Valsartanu byla provedena programy MARVIN, PALLAS, ACD/Percepta ke stanovení protonačních míst. Při porovnání tří prediktivních a dvou experimentálních technik se prognostické programy v odhadu pK_a někde mírně lišily.
- (6) Termodynamické parametry ΔH^0 a ΔG^0 byly vypočteny ze změny teploty disociačních konstant podle van't Hoffovy rovnice. Pozitivní hodnoty entalpie $\Delta H^0(pK_{a1}) = 10,33 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta H^0(pK_{a2}) = 17,70 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ukázaly, že disociační proces byl endotermický a je doprovázen absorpcí tepla. Pozitivní hodnoty Gibbsovy energie jsou $\Delta G^0(pK_{a1}) = 20,03 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G^0(pK_{a2}) = 26,43 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 25°C . Standardní entropie disociace ΔS^0 při 25°C a 37°C jsou negativní $\Delta S^0(pK_{a1}) = -32,56 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0(pK_{a2}) = -29,26 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 25°C a $\Delta S^0(pK_{a1}) = -30,01 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S^0(pK_{a2}) = -25,92 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 37°C .



Obr. V13 Protonační schéma Valsartanu

5 POUŽITÁ LITERATURA

1. Lilly and Incyte Announce Submission of NDA to FDA for Oral Once-Daily Baricitinib for Treatment of Moderate-to-Severe Rheumatoid Arthritis. Drugs.com (2016)
2. Genovese, MC, Kremer, J, Zamani, O, Ludivico, C, Krogulec, M, Xie L, Beattie, SD, Koch, AE, Cardillo, TE, Rooney, TP, Macias, WL, de Bono, S, Schlichting, DE, Smolen, JS: Baricitinib in Patients with Refractory Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* **374**(13), 1243-1252 (2016) doi:10.1056/NEJMoa1507247
3. FDA Briefing Document, Arthritis Advisory Committee Meeting. FDA AAC Brief NDA **207924 (2018)** (2018)
4. Ni, H, Moe, S, Myint, KT, Htet, A: Oral Janus Kinase Inhibitor for the Treatment of Rheumatoid Arthritis: Tofacitinib. *ISRN Rheumatol.* **2013**(ID 357904,), 1-9 (2013) doi:10.1155/2013/357904
5. Dougados, M., Fautrel, B. J., Van de Laar, Mafj, Kirkham, B., Alten, R., Cseuz, R., Smolen, J. S., Sanchez-Bursone, J., Bird, P., Scheinberg, M., Van den Bosch, F., Barry, J., Durand, F., Zhu, B. J., De Leonardis, F., Taylor, P. C.: SUMMARY OF BARICITINIB EFFECT ON PATIENT-REPORTED OUTCOMES (PROS) IN METHOTREXATE-INADEQUATE RESPONDER PATIENT POPULATION. *Rheumatology* **57** (2018)
6. Guttman-Yassky, E., Silverberg, J. I., Nemoto, O., Forman, S. B., Wilke, A., Prescilla, R., de la Pena, A., Nunes, F. P., Janes, J., Gamalo, M., Donley, D., Paik, J., DeLozier, A. M., Nickoloff, B. J., Simpson, E. L.: Baricitinib in adult patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: A phase 2 parallel, double-blinded, randomized placebo-controlled multiple-dose study. *Journal of the American Academy of Dermatology* **80**(4), 913-+ (2019) doi:10.1016/j.jaad.2018.01.018
7. Choy, E. H.: Effect of biologics and targeted synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs on fatigue in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **58**, 51-55 (2019) doi:10.1093/rheumatology/kez389
8. Choy, E. H.: Clinical significance of Janus Kinase inhibitor selectivity. *Rheumatology* **58**(6), 953-962 (2019) doi:10.1093/rheumatology/key339
9. Choy, E. H. S., Miceli-Richard, C., Gonzalez-Gay, M. A., Sinigaglia, L., Schlichting, D. E., Meszaros, G., de la Torre, I., Schulze-Koops, H.: The effect of JAK1/JAK2 inhibition in rheumatoid arthritis: efficacy and safety of baricitinib. *Clinical and Experimental Rheumatology* **37**(4), 694-704 (2019)
10. Josef, S., Maxime, D., Tsutomu, T., Mark, G., Boulos, H., Rena, K., Arthur, K., Ricardo, B. A., Jean, D., Peter, T., Peter, N., Cristiano, Z., Patrick, D., Georg, P., Subhashini, A.,

- Francesco, D., Ronald, V.: Durability, Maintenance and Effects of Dose Reduction Following Prolonged Treatment with Baricitinib. *Swiss Medical Weekly* **148**, 19S-19S (2018)
11. Babic' S., Horvat A. J.M., Pavlovic' D.M, M., Kastelan-Macan: Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends in Analytical Chemistry*, **26**(11) (2007)
12. Williams H. D, Trevaskis N. L, Charman S. A, Shankere R.M, Charman W.N, Pouton C.E, Porter C.J.H: Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol Rev.* **65**(1), 315-499 (2013)
13. Goldberg, R. N., Kishore, N., Lennen, R. M.: Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **31**(2), 231-370 (2002) doi:10.1063/1.1416902
14. De Stefano, C. , Princi, P. , Rigano, C. , Sammartano, S. : Computer analysis of equilibrium data in solution ESAB2M: an improved version of the ESAB program. *Annali Di Chimica* **77**(7-8), 643-675 (1987)
15. Al-Bedair, L. A.: Potentiometric Studies on the Binary and Mixed Ligand Complexes in Solution: Zn(II) - Amlodipine - Amino Acids Systems. *Orient J Chem* **32**(1), 609-615 (2016) doi:Doi 10.13005/Ojc/320169
16. Alderighi, L., Gans, P., Ienco, A., Peters, D., Sabatini, A., Vacca, A.: Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coordination Chemistry Reviews* **184**, 311-318 (1999) doi:Doi 10.1016/S0010-8545(98)00260-4
17. Alderighi, L, Gans, P, Ienco, A, Peters, D, Sabatini, A, Vacca A: Coordination Chemistry Reviews 184 (1999) 311 – 318 Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coordination Chemistry Reviews* **184**, 311-318 (1999)
18. Byrne, L. A., Hynes, M. J., Connolly, C. D., Murphy, R. A.: Analytical determination of apparent stability constants using a copper ion selective electrode. *J Inorg Biochem* **105**(12), 1656-1661 (2011) doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.07.016
19. Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A.: Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta* **43**(10), 1739-1753 (1996) doi:10.1016/0039-9140(96)01958-3
20. Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A.: Hyperquad computer-program suite. *Abstr Pap Am Chem S* **219**, U763-U763 (2000)
21. Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A.: Simultaneous calculation of equilibrium constants and standard formation enthalpies from calorimetric data for systems with multiple equilibria in solution. *J Solution Chem* **37**(4), 467-476 (2008) doi:10.1007/s10953-008-9246-6

22. Meloun, M., Ferenčíková, Z., Niesnerová, I., Pekárek, T.: Oligomers-model building in protonation equilibria of sitagliptin. *Cent Eur J Chem* **11**(11), 1799-1807 (2013) doi:10.2478/s11532-013-0304-6
23. Allen, R. I., Box, K. J., Comer, J. E. A., Peake, C., Tam, K. Y.: Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants of ionizable drugs. *J Pharmaceut Biomed* **17**(4-5), 699-712 (1998) doi:Doi 10.1016/S0731-7085(98)00010-7
24. Kim, H., Brooks, K. M., Tang, C. C., Wakim, P., Blake, M., Brooks, S. R., Sanchez, G. A. M., de Jesus, A. A., Huang, Y., Tsai, W. L., Gadina, M., Prakash, A., Janes, J. M., Zhang, X., Macias, W. L., Kumar, P., Goldbach-Mansky, R.: Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Proposed Dosing of the Oral JAK1 and JAK2 Inhibitor Baricitinib in Pediatric and Young Adult CANDLE and SAVI Patients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **104**(2), 364-373 (2018) doi:10.1002/cpt.936
25. Kim, H., Brooks, K. M., Wakim, P., Blake, M., Brooks, S. R., Sanchez, G. A. M., de Jesus, A. A., Huang, Y., Tsai, W. L., Gadina, M. G., Kumar, P., Goldbach-Mansky, R.: Pharmacokinetics (PK), Pharmacodynamics (PD), and Proposed Dosing of Oral Janus Kinase (JAK) 1 and JAK2 Inhibitor Baricitinib in Patients with IFN-Mediated Autoinflammatory Diseases (AIDs). *Arthritis & Rheumatology* **69** (2017)
26. Veeraraghavan, S., Thappali, S. R. S., Viswanadha, S., Vakkalanka, S., Rangaswamy, M.: Simultaneous Quantification of Baricitinib and Methotrexate in at Plasma by LC-MS/MS: Application to a Pharmacokinetic Study. *Scientia Pharmaceutica* **84**(2), 347-359 (2016) doi:10.3797/scipharm.1510-08
27. Wehler, E., Boytsov, N., Nicolay, C., Herrera-Restrepo, O., Kowal, S.: A Budget Impact and Cost Per Additional Responder Analysis for Baricitinib for the Treatment of Moderate-to-Severe Rheumatoid Arthritis in Patients with an Inadequate Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitors in the USA (August, 10.1007/S40273-019-00829-X, 2019). *Pharmacoeconomics*doi:10.1007/s40273-019-00857-7
28. ACD/Labs pKa Predictor 3.0. In: Inc., A.C.D. (ed.). Toronto, Canada, (2007)
29. ACD/Labs pKa Predictor 3.0. In: Inc., A.C.D. (ed.). Toronto, Canada, (2011)
30. Krotz-Vogel, W., Hoppe, H. C.: The PALLAS parallel programming environment. *Lect Notes Comput Sc* **1332**, 257-266 (1997)
31. Balogh, G. T., Gyarmati, B., Nagy, B., Molnar, L., Keseru, G. M.: Comparative Evaluation of in Silico pK(a) Prediction Tools on the Gold Standard Dataset. *Qsar Comb Sci* **28**(10), 1148-1155 (2009)
32. ChemAxon: MARVINSketch 16.5.2.0. (2013)

33. ChemAxon: MarvinSketch 16.5.2.0. In, vol. 16.5.2.0. ChemAxon, Budapest, Hungary, (2013)
34. Meloun, M., Bordovská, S., Syrový, T.: 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. *J Phys Org Chem* **20**(9), 690-701 (2007)
35. Manchester, J., Walkup, G., Rivin, O., You, Z. P.: Evaluation of pK(a) Estimation Methods on 211 Drug like Compounds. *J Chem Inf Model* **50**(4), 565-571 (2010)
36. ten Brink, T., Exner, T. E.: pK(a) based protonation states and microspecies for protein-ligand docking. *J Comput Aid Mol Des* **24**(11), 935-942 (2010)
37. Meloun, M., Bordovská, S., Syrový, T., Vrána, A.: Tutorial on a chemical model building by least-squares non-linear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data. *Anal Chim Acta* **580**(1), 107-121 (2006) doi:10.1016/j.aca.2006.07.043
38. Meloun, M., Bordovská, S.: Benchmarking and validating algorithms that estimate pK(a) values of drugs based on their molecular structures. *Anal Bioanal Chem* **389**(4), 1267-1281 (2007) doi:10.1007/s00216-007-1502-x
39. Meloun, M., Syrový, T., Bordovská, S., Vrána, A.: Reliability and uncertainty in the estimation of pK (a) by least squares nonlinear regression analysis of multiwavelength spectrophotometric pH titration data. *Anal Bioanal Chem* **387**(3), 941-955 (2007) doi:10.1007/s00216-006-0993-1
40. Grujić, M., Popović, G., Nikolic, K., Agbaba, D.: Protolytic equilibria of sartans in micellar solutions of differently charged surfactans. *J. Pharm. Sci.* **105**(8), 2444-2452 (2016) doi:10.1016/j.xphs.2016.06.007
41. Lemke, T.L., Williams, D.A., Roche, V.F., Zito, S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA (2013)
42. Doulton, T.W., He, F.J., MacGregor, G.A.: Systematic Review of Combined Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin Receptor Blockade in Hypertension. *Hypertension* **45**, 880-886 (2005) doi:10.1161/01.HYP.0000161880.59963.da
43. Brunton, L.L., Chabner, B., Knollmann, B.C.: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics McGraw-Hill, New York
44. Inzucchi, Silvio E., Bergenstal, Richard M., Buse, John B., Diamant, Michaela, Ferrannini, Ele., Nauck, Michael, Peters, Anne L., Tsapas, Apostolos, Wender, Richard: "Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2015: A Patient-Centered Approach: Update to a Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes". *Diabetologia* **55**(6), 1577-1596 (2015) doi:10.1007/s00125-012-2534-0

45. Katzung, B.G. , Masters, S.B., Trevor, A.J.: Basic & Clinical Pharmacology vol. Chapter 11. vol. 13 edition. McGraw-Hill Education, (2012)
46. Manallack, D.T. , Prankerd, R.J. , Nassta, G.C. , Ursu, O. , Oprea, T.I. , Chalmers, D.K.: A chemogenomic analysis of ionization constants--implications for drug discovery. *Chem. Med. Chem.* **8**, 242-255 (2013) doi:10.1002/cmdc.201200507
47. Meloun, M., Pilařová, L., Bureš, F., Pekárek, T.: Multiple dissociation constants of the Interpirdine hydrochloride using regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data. *Journal of Molecular Liquids* **261**, 480-491 (2018) doi:10.1016/j.molliq.2018.04.056
48. Meloun, M., Pilařová, L., Pekárek, T., Javůrek, M.: Overlapping pK(a) of the Multiprotic Hemostyptic Eltrombopag using UV-Vis Multiwavelength Spectroscopy and Potentiometry. *J Solution Chem* **46**(11), 2014-2037 (2017) doi:10.1007/s10953-017-0682-z
49. Meloun, M., Říha, V., Žáček, J.: Piston Microburette for Dosing Aggressive Liquids. *Chem Listy* **82**(7), 765-767 (1988)
50. Leggett, D. J., McBryde, W. A. E.: General computer program for the computation of stability constants from absorbance data. *Analytical Chemistry* **47**(7), 1065-1070 (1975)
51. Meloun, M., Ferenčíková, Z., Javůrek, M.: 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* **86**, 305-314 (2012) doi:10.1016/j.saa.2011.10.041
52. Maeder, M. , King, P. : Analysis of Chemical Processes, Determination of the Reaction Mechanism and Fitting of Equilibrium and/or Rate Constants. (2012)
53. Meloun, M., Čapek, J., Mikšík, P., Brereton, R. G.: Critical comparison of methods predicting the number of components in spectroscopic data. *Anal Chim Acta* **423**(1), 51-68 (2000) doi:Doi 10.1016/S0003-2670(00)01100-4
54. ORIGIN. In. OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Suite 303, Northampton, MA 01060, USA.,
55. Meloun, M., Havel, J., Högfeltdt, E.: Computation of solution equilibria: A guide to methods in potentiometry, extraction, and spectrophotometry. Ellis Horwood series in analytical chemistry. Ellis Horwood Chichester, England (1988)
56. Kankare, J. J.: Computation of equilibrium constants for multicomponent systems from spectrophotometric data. *Analytical Chemistry* **42**(12), 1322-1326 (1970) doi:10.1021/ac60294a012

57. Meloun, M., Militký, J.: *Statistical Data Analysis: A Practical Guide, Complete with 1250 exercises and answer key on CD*, First ed. Woodhead Publishing Limited, 80 High street Sawstone Cambridge, CB22 3HJ, UK, New Delhi, Cambridge, Oxford, Philadelphia (2011)
58. Meloun, M., Militký, J., Forina, M.: *Chemometrics for analytical chemistry, Volume 1: PC-Aided Statistical Data Analysis*. Chemometrics for analytical chemistry. Ellis Horwood, Chichester (1992)
59. Meloun, M., Militký, J., Forina, M.: *Chemometrics for analytical chemistry, Volume 2: PC-aided regression and related methods*. Chemometrics for analytical chemistry. Ellis Horwood, Chichester (1994)
60. Meloun, M., Militký, J., Forina, M.: *Chemometrics for analytical chemistry, Volume 2: PC-aided regression and related methods*. Chemometrics for analytical chemistry. Ellis Horwood, Chichester (1994)
61. Perrin, D. D.: The effect of temperature on pK values of organic bases. *Australian Journal of Chemistry* **17**(4), 484-488 (1964)
62. L, Samuelsen, r, Holma, a, Lathuile, Ch, Schönbeck: Buffer solutions in drug formulation and processing: How pKa values depend on temperature, pressure and ionic strength. *International Journal of Pharmaceutics* **560**, 357-364 (2019)
63. H, Fukada, K., Takahashi: Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins* **33**(2), 159-166 (1998)
64. Role of valsartan, amlodipine and hydrochlorothiazide fixed combination in blood pressure control: An update - Scientific Figure on ResearchGate. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-action-of-valsartan-Abbreviations-ACE-angiotensin-converting-enzyme-AT1_fig2_43227522 [cit. 5.5.2020]