

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Diplomová práce

2020

Bc. Daniela Cyrmonová

Univerzita Pardubice
Fakulta Chemicko-technologická

Stanovení disociačních konstant léčiva Bedaquilinu
Bc. Daniela Cyrmonová

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Determination of Dissociation Constants of the Drug Bedaquiline
Daniela Cyrmonová

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

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

Jméno a příjmení: **Bc. Daniela Cyrmonová**
Osobní číslo: **C18503**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Stanovení disociačních konstant léčiv Bedaquilinu**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. V literární části kriticky zhodnoťte význam disociačních konstant pro léčiva a doplňte rešerši o biochemických a farmaceutických vlastnostech léčiv Bedaquilinu 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., autorský zákon, 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 19. května 2020

Daniela Cyrmonová

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu diplomové práce prof. RNDr. Milanu Melounovi, DrSc. za jeho ochotu, trpělivost a dobré rady při zpracovávání této diplomové práce.

Anotace

V této diplomové práci jsem stanovovala smíšené disociační konstanty léčiva Bedaquilinu UV-VIS spektrofotometrickou titrací a potenciometrickou titrací při 15°C, 25°C, 37°C, 40°C a 50°C. Data byla vyhodnocena regresním programem REACTLAB, ESAB, SQUAD84 a faktorovou analýzou INDICES. Nelineární regresí smíšené disociační konstanty v závislosti na iontové síle byla vyčíslena termodynamická disociační konstanta pro všechny teploty a z naměřených disociačních konstant při 5 teplotách byla vyčíslena entropie a entalpie.

Klíčová slova

Disociační konstanty; Bedaquilin; pH-spektrofotometrická titrace; pH-titrace; REACTLAB; SQUAD84; ESAB; entalpie, entropie, termodynamické disociační konstanty, UV-spektrometrická analýza, pH-metrická analýza

Title

Determination of dissociation constants of the Bedaquiline medicine

Annotation

In this master thesis I determined the mixed dissociation constants of the Bedaquiline medicine by UV-VIS spectrophotometric titration and potentiometric titration at 15°C, 25°C, 37°C, 40°C and 50°C. Data were evaluated by regression program REACTLAB, ESAB, SQUAD84 and factor analysis INDICES. The thermodynamic dissociation constant for all temperatures was calculated by nonlinear regression of the mixed dissociation constant as a function of ionic strength, and the entropy and enthalpy were calculated from the measured dissociation constants at 5 temperatures.

Keywords

Dissociation constants; Bedaquiline; pH-spektrofotometrická titration; pH titration; REACTLAB; SQUAD84; ESAB; enthalpy, entropy, thermodynamic dissociation constants, UV - spectrometric analysis, pH - metric analysis

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Strukturní vzorec Bedaquilinu	12
Obrázek 2 – Teoretická predikce disociačních konstant Bedaquilinu	20
Obrázek 3 – Cattelův indexový graf vlastních čísel	22
Obrázek 4 – Testování nejlepší hypotézy hledaného protonačního modelu Bedaquilinu	23
Obrázek 5 – Hledání efektivního rozsahu vlnových délek k vyšetření polohy ionizovatelných skupin chromoforů Bedaquilinu	27
Obrázek 6 – Vyšetření vlivu změny pH, která způsobila rozdílné změny absorbance spektra Bedaquilinu	28
Obrázek 7 – Vyšetření velikosti změny absorbance Δ_{ij} v pH-absorbančních spektrech v titračně proměňovaném pH	30
Obrázek 8 – Dekonvoluce vybraného experimentálního spektra $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol. dm}^{-3}$ Bedaquilinu při $25 \text{ }^\circ\text{C}$	32
Obrázek 9 – Analýza pH-metrických dat Bjerrumovou funkcí	35
Obrázek 10 – Reprodukovatelnost odhadů čtyř disociačních konstant při čtyřech vybraných teplotách spektrofotometricky programem ReactLab	38
Obrázek 11 – Reprodukovatelnost odhadů tří disociačních konstant při čtyřech vybraných teplotách na titrační změnu pH potenciometricky programem ESAB	39
Obrázek 12 – Diagram závislosti tří disociačních konstant pK_a na pěti teplotách regresní analýzou spekter	41
Obrázek 13 – Diagram závislosti třech disociačních konstant pK_a na teplotě $pK_a = f(t^0\text{C})$	42
Obrázek 14 – Závislost tří disociačních konstant na teplotě $pK_a = f(t^0\text{C})$	44
Obrázek 15 – Protonační schéma Bedaquilinu	47

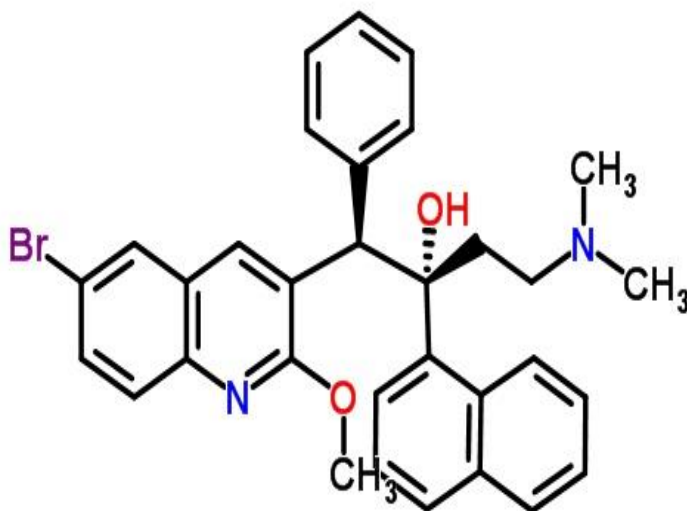
Seznam tabulek

Tabulka 1 – Reprodukovatelnost nejlepšího protonačního modelu Bedaquilinu v rozmezí pH od 2 do 13 pro tři disociační konstanty pK_{a1} , pK_{a2} , pK_{a3} , programem REACTLAB při 25 °C a 37 °C	24
Tabulka 2 – Regresní zpřesnění společných a skupinových parametrů programem ESAB pro pH-metrickou titraci alkalizovaného $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Bedaquilinu HC1.....	36

Obsah

Úvod.....	12
1 POČÍTAČOVÁ ANALÝZA DAT.....	15
2 EXPERIMENTALNÍ ČÁST.....	17
2.1 Chemikálie a roztoky.....	17
2.2 Přístroje.....	17
2.3 Software.....	18
3 VÝSLEDKY.....	19
3.1 UV-spektrometrická analýza.....	19
3.2 Analýza pH-metrických dat.....	34
4 DISKUSE.....	46
5 ZÁVĚR.....	48
Bibliografie.....	50

Úvod



Obrázek 1 – Strukturní vzorec Bedaquilinu

Bedaquilin, chemicky (1R, 2S)-1-(6-bromo-2-methoxy-3-quinolinyl)-4-(dimethylamino)-2-(1-naphthalenyl)-1-phenyl-2-butanol (2E)-but-2-enedioate salt (1:1), obchodním názvem *Sirturo*, je antibiotikum používané, společně s dalšími léky, k léčbě plicní tuberkulózy, která je rezistentní na jiná antibiotika. Léčivo bylo schváleno 28. prosince 2012 Americkou asociací pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) k léčbě multirezistentní tuberkulózy. Multirezistentní tuberkulóza je typ, který je rezistentní na Isoniazid a Rifampin, což jsou dva nejúčinnější antituberkulózní prvky první volby [1-4].

Bedaquilin je první člen nové třídy léčiv nazývaných diarylchinoliny. Bedaquilin blokuje protonovou pumpu ATP syntázy *Mycobacterium tuberculosis*. Existují dva mechanismy blokace pumpy Bedaquilinem u *Mycobacterium tuberculosis*. Prvním mechanismem je přímá vazba Bedaquilinu na podjednotku c ATP syntázy bakterie. Tím dojde k deaktivaci tohoto enzymu, který katalyzuje syntézu ATP. Druhý, nepřímý mechanismus zahrnuje Bedaquilinem indukovaný elektronový transport v elektronovém transportním řetězci na ATP syntáze. Tvorba ATP je nezbytná pro život buňky a její ztráta vede k inhibici růstu mykobakterií během několika hodin po podání Bedaquilinu [3, 5, 6].

Bedaquilin je primárně vystaven oxidačnímu metabolismu, což vede k tvorbě N-monodesmethyl metabolitu (M2). Má se za to, že M2 významně nepřispívá ke klinické účinnosti vzhledem k jeho nižší průměrné expozici u lidí a nižší antimykobakteriální aktivitě (čtyřikrát až šestkrát nižší) ve srovnání s původní sloučeninou [7].

Po jednorázovém perorálním podání Sirturo se maximální plazmatické koncentrace c_{\max} obvykle dosáhne přibližně 5 hodin po podání dávky. Hodnota maximální plazmatické koncentrace Bedaquilinu je 1,659 ng/ mL. Podávání léčiva se standardním jídlem obsahujícím přibližně 22 gramů tuku, zvýšilo relativní biologickou dostupnost přibližně dvojnásobně, ve srovnání s podáváním nalačno. Vazba Bedaquilinu na plazmatické proteiny je vyšší než 99,9 %. Tudíž je Bedaquilin transportován krví ve vazbě na proteiny. Po dosažení c_{\max} , koncentrace Bedaquilinu klesá třikrát exponenciálně. Průměrný terminální poločas eliminace Bedaquilinu a N-monodesmethyl metabolitu (M2) je přibližně 5,5 měsíce. Tato dlouhá terminální eliminační fáze pravděpodobně odráží pomalé uvolňování Bedaquilinu a M2 z periferních tkání. Zdá se však, že koncentrace M2 v plazmě koreluje s prodloužením QT [8].

Bedaquilin je metabolizován v játrech. Hlavním zapojeným enzymem je CYP3A4, který metabolizuje Bedaquilin na N-monodesmethyl metabolit (M2). Tento metabolit je 4 až 6krát méně aktivní, pokud jde o antimykobakteriální účinnost [8].

Jako každý lék má i Bedaquilin řadu nežádoucích účinků. Mezi časté nežádoucí účinky patří nevolnost, bolesti kloubů, hlavy a bolesti na hrudi. Dalšími nežádoucími účinky může být jaterní nedostatečnost, zvýšené jaterní enzymy, jako zvýšená sérová alaninaminotransferáza, zvýšená sérová aspartátaminotransferáza, zvýšená sérová transamináza, a anorexie [1, 5, 8].

Jednou z nejdůležitějších fyzikálně-chemických vlastností každého léku jsou hodnoty disociačních konstant pK_a . Protonační rovnováhy a ionizace léčiva jsou zvláště důležité pro predikci jejich chování za fyziologických podmínek, protože ionizační stav silně ovlivňuje rozpustnost v místě aplikace [9].

1. Disociační konstanty pK_{ai} kyseliny LH_j mohou být stanoveny regresní analýzou potenciometrických titračních dat, nazývaných také pH-metrická analýza, když jsou *společné parametry* (pK_{ai} , $i = 1, \dots, j$) a *skupinové parametry* (E^0 , L^0 , H^T) současně numericky regresně zjemňovány. Často bývá v literatuře provedeno

porovnání výsledků vyčíslených regresními programy potenciometrických pH-titračních dat, jako jsou ESAB [10], SUPERQUAD [11] a HYPERQUAD [12, 13].

2. Spektrofotometrická analýza UV-metrických spekter je zvláště vysoce citlivou a často používanou metodou stanovení disociačních konstant pK_a ve velmi zředěných vodných roztocích, protože vyžaduje relativně jednoduché zařízení a může pracovat s submikromolárními koncentracemi (asi 10^{-5} mol. dm^{-3} až 10^{-6} mol. dm^{-3}).
3. Přesnost teoretických kvantově-chemických predikcí odhadu disociačních konstant pK_a v protonačním modelu ze strukturního vzorce molekuly léčiva využitím tří prediktivních programů ACD/Percepta [14], Pallas [15] a MARVIN [16] byla potvrzena jako nejlepší ze všech devíti dostupných predikčních programů [13-15].

Cílem této studie byla regresní analýza pH-absorbanční matice při menších změnách absorbance ve spektrech rozličného pH léčiva Bedaquilin a také vyhodnocení alternativní pH-metrické potenciometrické titrační křivky protonačního modelu pro optimalizaci experimentálních podmínek ke stanovení všech blízkých disociačních konstant včetně výpočtu zajímavých termodynamických parametrů, jako je entalpie, entropie a Gibbsova volná energie disociačního procesu.

1 POČÍTAČOVÁ ANALÝZA DAT

Pro implementaci rovnovážného modelu u spektrofotometrických titračních dat musí analytik provést řadu rozhodnutí k vytyčení vhodné strategie analýzy instrumentálních dat, které mohou výjimečně také obsahovat negativní odhady hledaných parametrů, například, molárních absorpčních koeficientů. Postup pH-titrace UV/VIS-absorbančních spekter [17] zvaný UV-metrická spektrální analýza [18] a k ní alternativně použité pH-metrické analýzy byl již dříve popsán v tutoriálu o 10 krocích [19].

Koncept QSAR/QSPR [20] se používá k transformaci hledání sloučenin s požadovanými vlastnostmi pomocí chemické intuice kvantifikované do matematické formy. Protonační energii lze považovat za dobré měřítko síly vodíkových vazeb, protože je pravda, že čím vyšší je energie, tím silnější je vazba [21-24]. Vztahy mezi těmito odhadovanými termodynamickými parametry se pro mnoho reakcí nazývají „*extratermodynamické*“. Kompenzace entalpie-entropie je široce pozorovaným účinkem ve fyzikálních, biologických, chemických a biochemických procesech [25-27] a je dobře popsána Liu a Guo [28]. Pokud se změní určité podmínky, jako je pH, složení rozpouštědla, molekula reaktantu, aktivita vody, iontová hydratace, vodíková vazba atd.], Entalpie a entropie aktivace se odpovídajícím způsobem změní.

Kvantitativní vztah mezi strukturou a aktivitou QSAR [20] objasňuje důležitost různých strukturních interakcí mezi molekulou léčiva a protonem. Gibbsova volná energie ΔG^0 může být rozdělena do dvou členů, $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$, tj. entalpie ΔH^0 a entropie ΔS^0 .

Změna entalpie ΔH^0 představuje množství energie, která je přidána $\Delta H^0 > 0$ (*endotermická reakce*) nebo uvolněna $\Delta H^0 < 0$ (*exotermická reakce*). Ve farmakologických studiích je ΔH^0 obvykle interpretována jako odraz změn mezimolekulárních sil mezi vazbami léčiva a protonu nebo vodíku s van der Waalsovými interakcemi. Van 't Hoffova rovnice,

$$\frac{d \ln K_{ai}}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2}$$

kde R je ideální plynová konstanta, je často integrována v praxi mezi dvěma teplotami, za předpokladu, že entalpie reakce ΔH^0 (zde je to protonace) je konstantní. Data by měla ukazovat lineární vztah

$$\ln K = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

kde člen je $-\Delta H^0/R$ *směrnice* a člen $\Delta S^0/R$ je *úsek* přímky. Vyhodnocení směrnice a úseku z van 't Hoffovy rovnice umožní vyčíslení entalpie a entropie protonační reakce.

Změnu entropie ΔS^0 lze chápat jako měřítko nepředvídatelnosti molekulárních poloh, nejistoty, „poruch“, „náhodnosti“ nebo statisticky jako počet možných mikroskopických stavů nebo molekulárních konfigurací reverzibilní reakce. Ve farmakologických studiích je entropie často interpretována jako míra přeskupení molekul rozpouštědla (vody). Entropie může být vyjádřena vztahem $\Delta S^0 = 1/T (\Delta H^0 + RT \ln K)$.

Změna Gibbsovy volné energie ΔG^0 představuje množství práce, ale práce jiné než práce expanze. Modifikací definice Gibbsovy volné energie $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$, kde ΔS^0 je entropie systému, bude *izoterma Gibbsovy volné energie* vyjádřena vztahem $\Delta G^0 = -RT \ln K$. Chemické reakce (zde disociace) se nazývají *exergonické*, když $\Delta G^0 < 0$ a *endergonické*, když $\Delta G^0 > 0$. K disociaci dochází *spontánně* v psaném směru, pokud $\Delta G^0 < 0$, zatímco když ΔG^0 jsou pozitivní $\Delta G^0 > 0$, disociace *není spontánní*.

Extrathermodynamika disociace: Lineární vztah mezi *entalpickým členem ΔH^0* [kJ mol⁻¹] a *entropickým členem ΔS^0* [kJ·mol⁻¹] znamená, že změny entalpie jsou kompenzovány změnami entropie (nebo naopak), takže změna volné energie ΔG^0 [kJ·mol⁻¹] zůstává konstantní. V praxi může mít získaný lineární vztah tvar $\alpha = \Delta H^0 - \beta\Delta S^0$, kde β se nemusí nutně rovnat T . Pro tento kompenzační účinek se za kritérium použije *korelační koeficient* lineární závislosti s tím, že čím vyšší korelační koeficient, tím je kompenzace lepší.

2 EXPERIMENTALNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie a roztoky

Bedaquilin sponzorovaný firmou ZENTIVA k. s., (Praha) s deklarovanou čistotou kontrolovanou HPLC-metodou a alkalimetry byl vždy čistoty o obsahu > 99%. Toto léčivo bylo vždy naváženo přímo do reakční nádoby, což vedlo ke koncentraci okolo $1,0 \times 10^{-4}$ mol. dm⁻³. *Kyselina chlorovodíková*, 1 mol.dm⁻³, byla připravena zředěním koncentrované HCl (p.a., Lachema Brno) redestilovanou vodou a standardizací proti HgO a KI s reprodukovatelností lepší než 0,002 podle rovnice $\text{HgO} + 4 \text{KI} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow 2 \text{KOH} + \text{K}_2[\text{HgI}_4]$ a $\text{KOH} + \text{HCl} = \text{KCl} + \text{H}_2\text{O}$. Z přesné hmotnosti pelet byl připraven *hydroxid draselný*, 1 mol.dm⁻³ p. a., Aldrich Chemical Company s redestilovanou vodou bez oxidu uhličitého, která byla udržována po dobu 50 minut před tím v ultrazvukové lázni. Roztok byl skladován v polyethylenové láhvi v atmosféře argonu. Tento roztok byl standardizován potenciometricky proti roztoku hydrogen-ftalátu draselného vyhodnocením bodu ekvivalence derivační metodou s reprodukovatelností 0,001. *Oxid rtuťnatý*, *jodid draselný* a *chlorid draselný*, p. a. Lachema Brno nebyly navíc vyčištěny. Dvakrát redestilovaná voda byla udržována po dobu 50 minut před tím v sonografické lázni pro přípravu roztoků.

2.2 Přístroje

Použitý přístroj a oba titrační postupy byly podrobně popsány [19, 29-31]. Koncentrace volných vodíkových iontů [H⁺] byla měřena na digitálním voltmetru Hanna HI 3220 s přesností ± 0,002 pH s použitím kombinované skleněné elektrody Theta HC 103-VFR. Potenciometrické titrace léčiva s hydroxidem draselným byly prováděny s použitím měřítka aktivity vodíku.

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° C a 37° C, v závorkách.

Spektrofotometrická titrace s registrací absorbančního spektra při 300 vlnových délkách byla prováděna následujícím způsobem: vodný roztok 20,00 cm³ obsahující 10⁻⁵ mol.dm⁻³ léčiva, 0,100 mol.dm⁻³ kyseliny chlorovodíkové, 0,005 fosforečnanového pufru a 10 cm³ indiferentního 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 skleněném reaktůrku s pláštěm o dvojitě stěně, naplněným

termostatovanou vodou objemu 100 ml, a nádoba byla uzavřena teflonovou zátkou, obsahující elektrody, přívod argonu, teploměr, vrtulové míchadlo a vlasové kapilární ústí pístové mikrobyrety. Všechna měření pH byla prováděna při $25,0\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ a $37,0\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$. V průběhu titrace léku byl roztok probubláván proudem argonu za účelem dokonalého promíchání a udržení inertní atmosféry. Argon procházel vodným iontovým médiem předcházejícím průchodem přes jednu nebo dvě promývací nádoby, které také obsahovaly titrační médium před vstupem do odpovídajícího titrovaného roztoku-titrantu. Použité mikrobyrety byly objemu 1250 μL (META, Brno) s mikrometrickým šroubem 25,00 cm, [32]. Vlasové polyethylenové kapilární ústí pístové mikrobyrety bylo ponořeno do roztoku titrandu během přidávání titrantu KOH, ale po každém přidavku titrantu bylo ústí z titrandu vytaženo, aby se zabránilo samovolného úniku titrantu během odečtu pH. Mikrobyreta byla kalibrována desetinásobným stanovením celkového objemu dodané vody, zvážením její hmotnosti na vahách Sartorius 1712 MP8 a statisticky vyhodnoceným průměrem, který vedl k přesnosti přidavku $\pm 0,015\%$ přidávaného objemu v celém rozsahu titrace. Po přidavku byl roztok z reaktúrku transportován do kyvety peristaltickou pumpou, která byla součástí spektrofotometru Cintra 40 (GBC, Austrálie) a zaznamenáno spektrum při 300 vlnových délkách.

2.3 Software

Odhad disociačních konstant byl proveden nelineární regresní analýzou vějíře 80 pH-absorbančních spekter naměřených UV-metrickou spektrální metodou s využitím programů SQUAD84 [33], REACTLAB [34] a také vějíře potenciometrických pH-titračních křivek programem ESAB [10]. Spektrální interpretace hodnoty pH-absorbanční matice programem INDICES [35] určila počet světlo-absorbujících částic rovnovážné směsi. Grafy spekter byly kresleny programem ORIGIN 9.1 [36]. Programy ACD/Percepta [14, 37] a MARVIN [16] k predikci disociačních konstant pK_a vycházely ze strukturního vzorce sloučeniny Bedaquilinu.

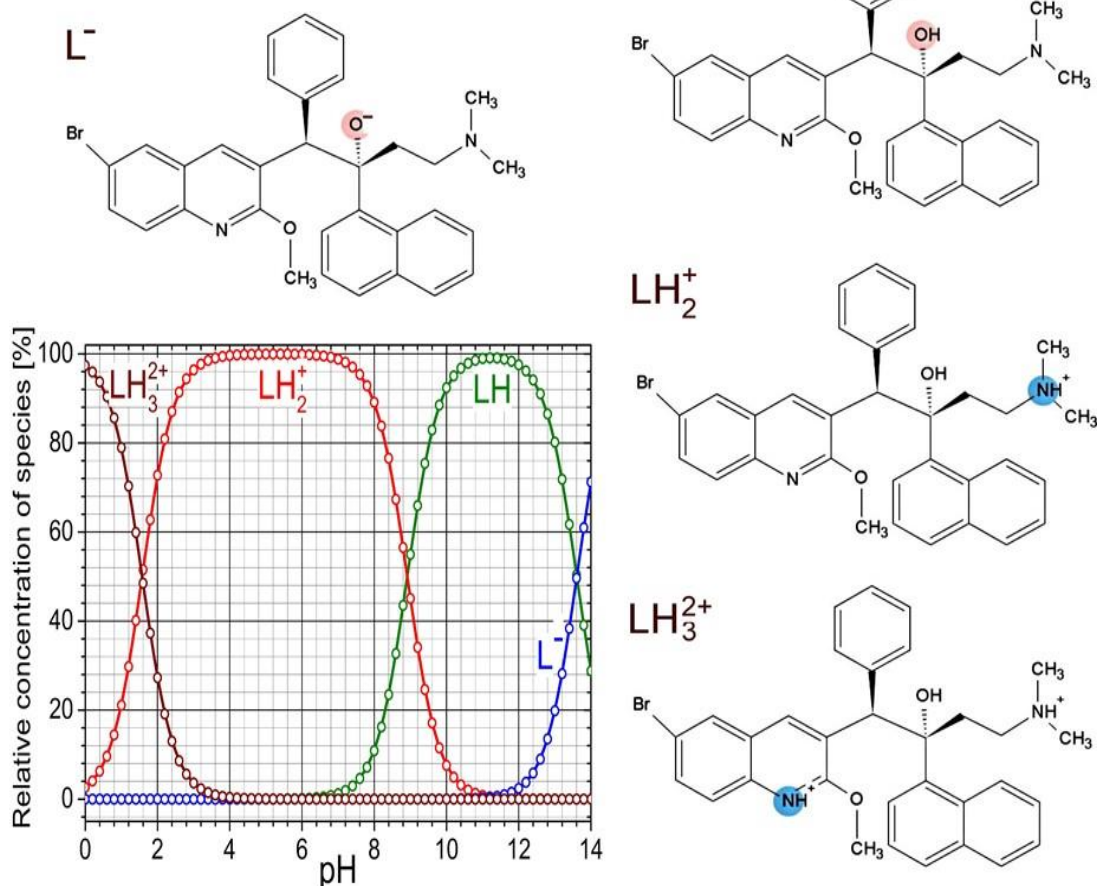
3 VÝSLEDKY

Metody numerické analýzy pH-spekter a potenciometrických křivek pH-titrace se ukázaly být nejlepšími instrumentálními metodami, protože spolehlivě určovaly i těsně po sobě následující disociační konstanty konsektivní rovnováhy, a to i v případě špatně rozpustných léčiv. pH-spektroskopická titrace (UV-spektrometrická analýza) byla použita jako alternativní metoda k potenciometrické pH titraci (pH-metrická analýza) disociačních konstant s velkými molárními absorpčními koeficienty díky své vysoké citlivosti na koncentraci látky, a to i při tak nízkých koncentracích jako byla $10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$.

3.1 UV-spektrometrická analýza

Experimentální postup a výpočetní strategie pro stanovení disociačních konstant analýzou pH-absorbanční matice byly popsány v 10 krocích v dříve publikovaném postupu Tutorial [19] a také na straně 226 v ref. [31]. Stanovení počtu protonizačních rovnováh, počtu různě protonovaných částic, jejich relativního koncentračního diagramu a grafu molárních absorpčních koeficientů všech částic v rozsahu měřených vlnových délek, statistických kritérií spolehlivosti a statistických testů zjištěného protonačního modelu byly obsahem tohoto výzkumu.

Bedaquiline



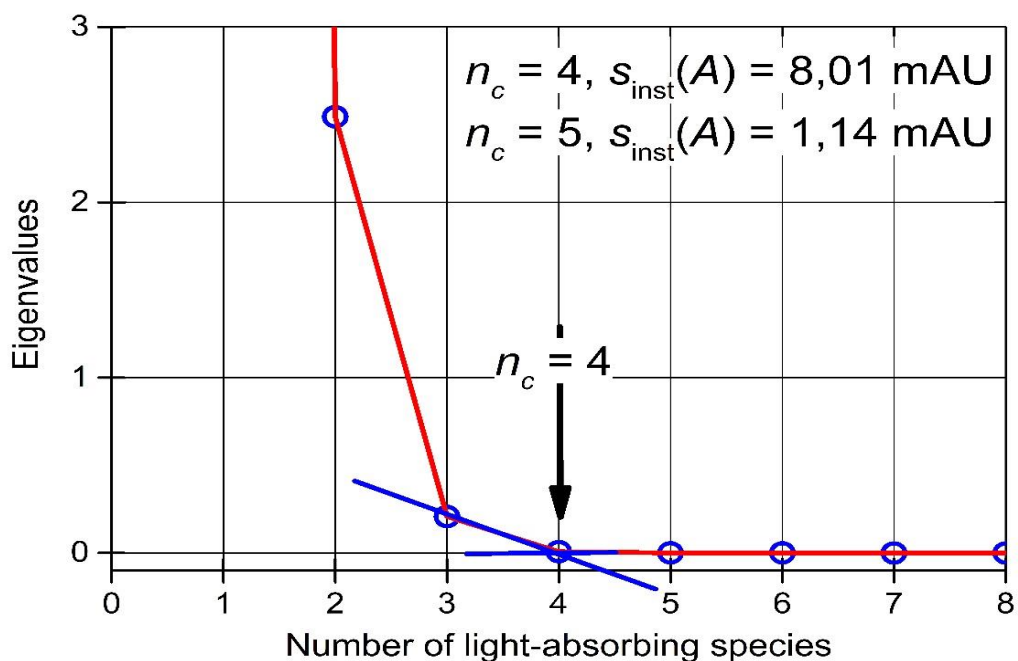
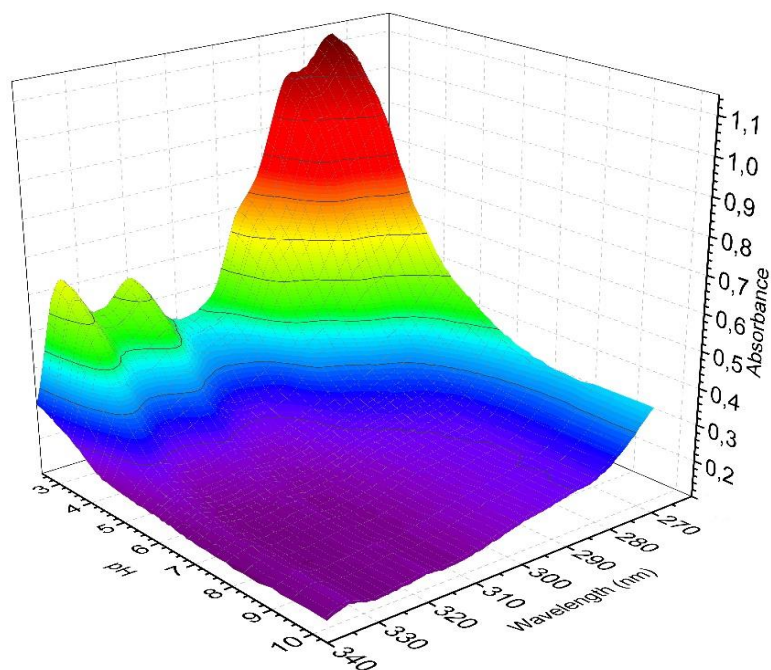
Obrázek 2 – Teoretická predikce disociačních konstant Bedaquilinu vychází ze strukturního vzorce a barevně vyznačuje protonační centra (kyselina červeně, base modře), ve kterých ukazuje predikované hodnoty disociačních konstant pK_a včetně distribučního diagramu relativních koncentrací rozličně protonovaných částic L^- , LH, LH_2^+ , LH_3^{2+} s využitím programů MARVIN a PALLAS.

Krok 1: Teoreticky predikovaná pK_a Bedaquilinu:

Prvním krokem analýzy dat byla predikce disociačních konstant, založená na kvantově-chemickém výpočtu a zabývající se strukturním vzorcem studované molekuly léčiva (Obr. 1). Program predikce MARVIN identifikoval čtyři protonizovatelná centra Bedaquilinu, která by mohla být teoreticky spojena se třemi predikovanými disociačními konstantami (Obr. 2). Programy predikce MARVIN, PALLAS a ACD/Percepta předpověděly disociační konstanty mírně odlišné, takže bylo zřejmé, že experimentální stanovení by mohlo nabídnout spolehlivější výsledky.

Krok 2: Počet druhů absorbujících světlo n_c :

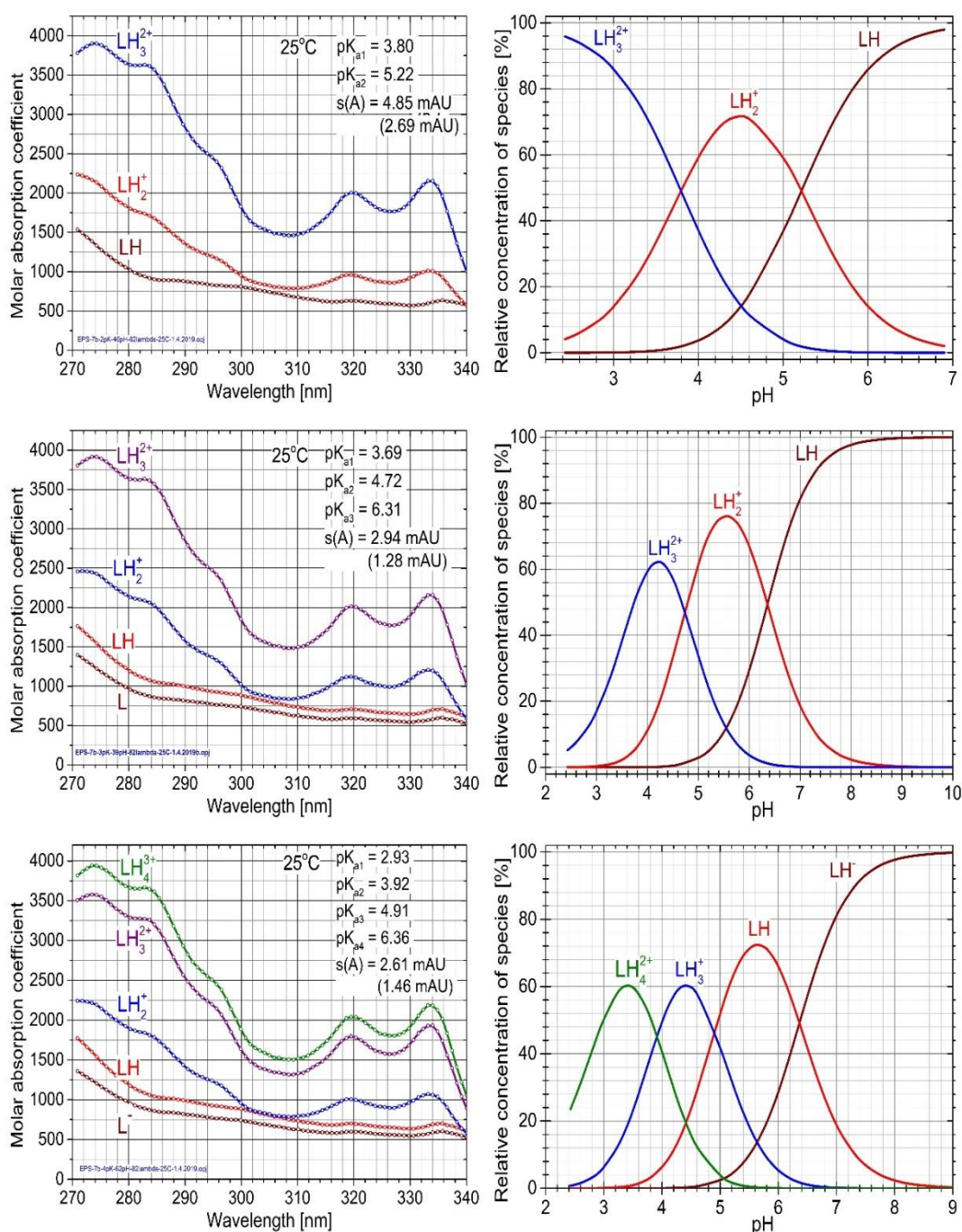
Před vlastní analýzou absorbančních spekter byla provedena filtrace singulárních hodnot (SVD) primárních dat [35, 38]. Tato technika je založena na faktu, že pokud se spektrální datový soubor sestává z r příspěvků absorbujících chemických částic, pak prvních r faktorů absorbanční matice obsahuje převážnou většinu chemické informace, získané experimentem. Hodnota r zde značila hodnost matice a obecně by měla být r menší nebo rovna m , kde m je počet chemických částic. Vyšetření vlastních hodnot matice dat ukázalo, že první faktory mají velký význam až do zlomu v Cattelově grafu, od kterého pak už měly zbylé faktory jenom zanedbatelný význam. Tyto zbylé faktory byly považovány principiálně za šum spektrometru, který matematicky přispíval do spektra. Odstraněním těchto zbylých faktorů z dat vykazoval tento model lépe chemickou informaci, která obsahovala chemickou rovnováhu, například Beerův zákon aditivity.



Obrázek 3 – Cattelův indexový graf vlastních čísel obsahuje zlom křivky závislosti vlastních čísel pH-absorbanční matice Bedaquilinu na faktorech, který odpovídá hodnotě matice $k^* = 3$ nebo 4 a počtu světlo-absorbujících částic $n_c = 3, 4$ nebo 5 s uvedením reziduálové směrodatné odchylky absorbance $s_k(A)$ (INDICES v S-PLUS) [35].

Cattelův indexový graf singulárních hodnot (obr. 3) ukázal, že celý vějíř spekter Bedaquilinu při vlnových délkách 260 - 340 nm byl schopen indikovat čtyři světlo-absorbující částice směsi $n_c = k^* = 4$ se zbytkovou směrodatnou odchylkou absorbance $s_{\text{inst}}(A) = 1 \text{ mAU}$; i když spektra molárních absorpčních koeficientů páru částic L⁻ a LH

byla značně podobná. Skutečný počet světlo-absorbujících částic, oddělených od spektrálního šumu, lze však spolehlivěji vyhodnotit nelineární regresní analýzou.



Obrázek 4 – Testování nejlepší hypotézy hledaného protonačního modelu Bedaquilinu: v rozmezí pH 2 až 10 ukazuje na tři nebo čtyři disociační konstanty pK_{a1} , pK_{a2} , pK_{a3} a pK_{a4} , spektrální analýzou $1,0 \times 10^{-4}$ mol. dm^{-3} Bedaquilinu při 25°C. *Vlevo*: Profily molárních absorpčních koeficientů rozličně protonovaných částic Bedaquilinu ϵ_L , ϵ_{LH} , ϵ_{LH_2} , ϵ_{LH_3} a ϵ_{LH_3} proti vlnové délce (nm), *Vpravo*: Distribuční diagram relativních koncentrací různě protonovaných částic v protonačním modelu v závislosti na pH (REACTLAB, ORIGIN 9).

Tabulka 1 – Reprodukovatelnost nejlepšího protonačního modelu Bedaquilinu v rozmezí pH od 2 do 13 pro tři disociační konstanty pK_{a1} , pK_{a2} , pK_{a3} , programem REACTLAB při 25 °C a 37 °C. Roztok o koncentraci 1.0×10^{-4} M Bedaquilinu 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. 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 $s(\hat{e})$ [mAU] a sigma $s(A)$ [mAU] z REACTLABu.

Teplota [C]	25 °C					37 °C				
Reprodukovatelnost	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 hodnoti absorbanční matice (INDICES)										
Počet naměřených spekter, n_s	34	22	38	44		34	35	34	31	
Počet vlnových délek, n_w	146	130	164	106		128	117	128	117	
Počet světlo-absorbujících částic, k^*	3	3	3	3		3	3	3	3	
Odhady disociačních konstant v hledaném protonačním modelu										
$pK_{a1}, LH_3^{2+} \rightleftharpoons H^+ + LH_2^+$	3.90	3.81	3.90	4.03	3.91	3.45	3.90	3.45	3.27	3.51
$pK_{a2}, LH_2^+ \rightleftharpoons H^+ + LH$	4.42	4.66	4.75	4.52	4.58	4.29	4.50	4.29	4.47	4.38
$pK_{a3}, LH \rightleftharpoons H^+ + L^-$	6.04	5.22	5.36	5.25	5.46	5.45	5.63	5.45	5.13	5.42
Test těsnosti proložení statistickou analýzou reziduí										
Směrodatná odchylka reziduí, $s(\hat{e})$, [mAU]	2.47	1.04	1.45	1.04		1.73	1.72	1.71	1.74	
Sigma z ReactLabu, [mAU]	3.17	3.87	3.45	2.61		2.24	2.16	2.15	2.09	

Krok 3: Výstavba a testování věrohodnosti protonačního modelu:

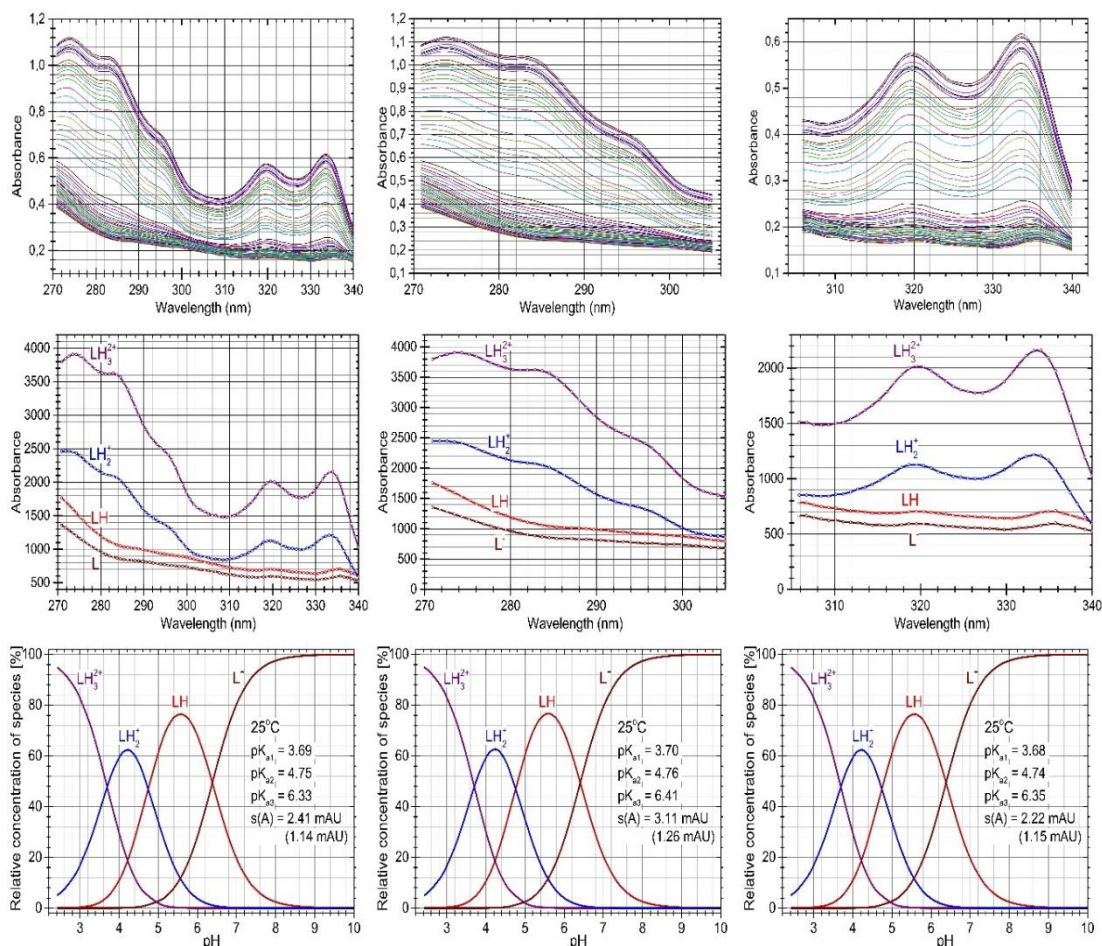
Programem REACTLAB byla nelineární regresní analýzou zpracována matice pH-absorbančních spekter, za využití metody regresního tripletu (kritika dat, kritika modelu a kritika metody) [39, 40]. Hledání nejlepší hypotézy protonačního modelu obsahujícího dvě, tři a čtyři disociační konstanty je znázorněno v grafech molárních absorpčních koeficientů (obr. 4a) a odpovídajících distribučních diagramů všech odlišně protonovaných částic (obr. 4b) pro testovaný protonační model. Za kritériem věrohodnosti hledaného protonačního modelu byla zde použita těsnost proložení vypočtených spekter experimentálními body statistickou analýzou reziduí, vyjádřená směrodatnou odchylkou absorbance $s(A)$ v jednotkách mAU.

Výstavba nejlepšího regresního modelu byla na základě těsnosti proložení, která tvořila rozhodčí kritérium pro přijetí vyčíslených odhadů neznámých parametrů, pK_{a_i} a ε_i , se svými statistickými diagnostikami pro navrženou hypotézu protonačního modelu. Ukázalo se, že výstavba protonačního modelu Bedaquilinu nebyla snadným úkolem, protože Bedaquilin vykazoval blízké postupné disociační konstanty ($|pK_{a_2} - pK_{a_1}| < 3$), stejně jako skutečnost, že nastavovaná hodnota pH jenom málo ovlivňovala změny absorbance chromoforů molekuly. Blízké disociační konstanty byly tím pádem špatně podmíněny v regresním modelu a jejich stanovení bylo proto méně citlivé a zatíženo určitou nejistotou.

Kritériem k nalezení nejlepší hypotézy protonačního modelu při výstavbě regresního modelu byl především test těsnosti proložení vypočtených spekter naměřenými experimentálními body pH-absorbanční matice, který byl kvantifikačně zjednodušen na velikost směrodatné odchylky absorbance $s(A)$ po terminaci minimalizace sumy čtverců reziduí U_{\min} v nelineární regresi, $s(A) = \sqrt{U_{\min}/(n - m)}$, kde n je počet experimentálních bodů spekter a m je počet odhadovaných parametrů.

Na obrázku 4 jsou vedle numerických odhadů disociačních konstant regresním programem REACTLAB a SQUAD také hodnoty aritmetického průměru reziduí $E(e)$ [mAU], směrodatné odchylky reziduí $s(e)$ [mAU] a průměrného rezidua $E(\bar{e})$, které ukázaly výtečnou těsnost vypočtených spekter experimentálními body pro protonační model se třemi disociačními konstantami. Spolehlivost vypočtených odhadů regresních parametrů lze výhodně posoudit a testovat následujícími regresními diagnostikami (Obr. 4), jak je vysvětleno na straně 226 v ref. [31]:

- a) *Fyzikální význam odhadů všech neznámých parametrů:* V levé části obr. 4a byla znázorněna spektra vyčíslených odhadů molárních absorpčních koeficientů rozličně protonovaných částic Bedaquilinu v závislosti na vlnové délce. Je-li dvojice těchto křivek ε blízká nebo téměř stejná, hypotéza protonačního modelu může být nejistá nebo chybná.
- b) *Fyzikální význam koncentrace částic:* Distribuční diagram relativních koncentrací všech rozličně protonovaných částic L^- , LH , LH_2^+ , LH_3^{2+} a LH_4^{3+} (obr. 4b) ukázal na protonační rovnováhu Bedaquilinu. Z grafu vyplynulo, že žádná z těchto částic nedosahovala příliš nízké, tzv. fyzikálně-chemicky nevýznamné koncentrace, všechny ionty navržené protonační rovnováhy měly proto fyzikální význam.
- c) *Regresní řešení dostatečně těsného proložení vypočtených spekter:* Statistická analýza reziduí ukázala, že po dosažení minima eliptického hyperparaboloidu objektivní reziduálové sumy čtverců RSC (Tabulka 1) bylo dosaženo dostatečně těsného proložení vypočtených spekter experimentálními body, protože hodnoty aritmetického průměru reziduí $E(e)$ [mAU], směrodatné odchylky reziduí $s(e)$ [mAU] a průměrného rezidua $E(\bar{e})$ dosáhly velmi nízkých hodnot menší než 2 mAU, což představuje méně než 0,2% naměřené hodnoty absorbance.

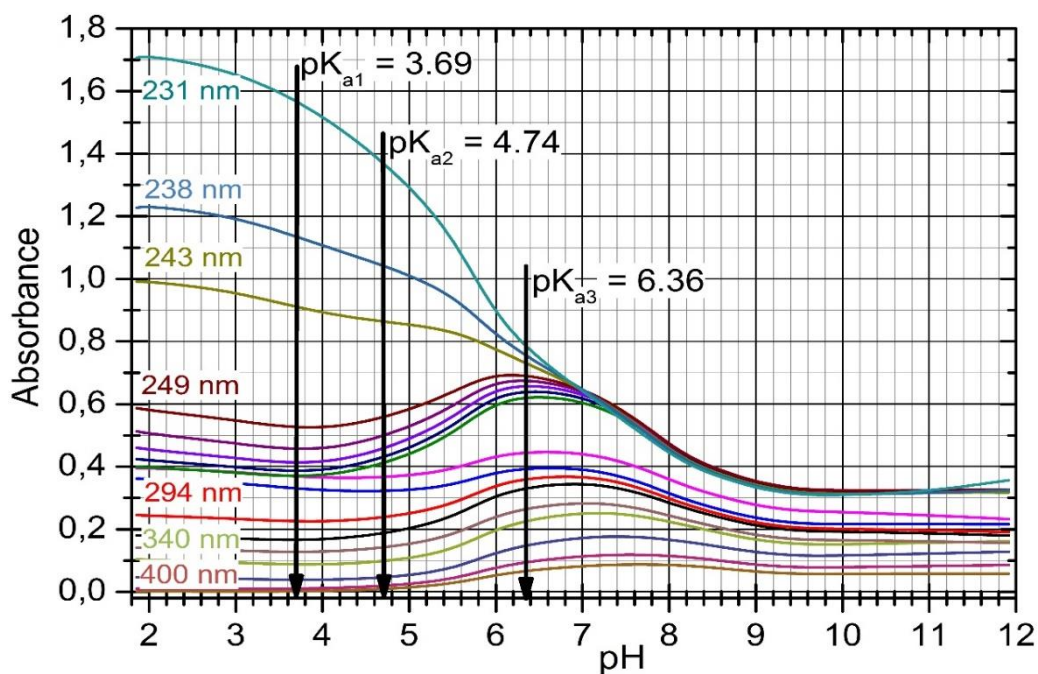
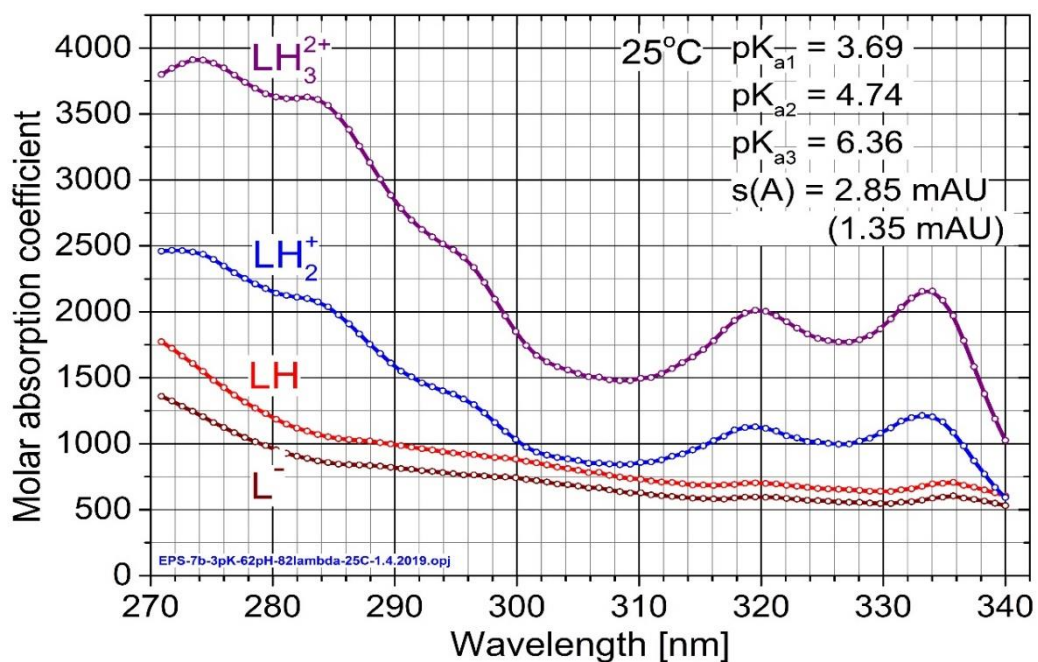


Obrázek 5 – Hledání efektivního rozsahu vlnových délek k vyšetření polohy ionizovatelných skupin chromoforů Bedaquilinu pro dostatečnou změnu absorbance spekter při proměňovaném pH vede ke spolehlivému stanovení všech disociačních konstant hledaného protonačního modelu. Protonační model tří disociačních konstant byl analyzován pomocí čtyř rozsahů absorpčních pásů. Nejvhodnější oblast vlnových délek byla v rozsahu 270 - 340 nm s $s(A) = 1,14$ mAU, i když odhady pK_a byly většinou podobné pro všechny testované rozsahy vlnových délek.

Krok 4: Efektivní rozsah vlnových délek:

Při hledání efektivního rozsahu vlnových délek byly vyšetřovány tři vybrané rozsahy vlnových délek analyzovaného spektra, a to (a) 270 - 340 nm, (b) 270 - 310 nm a (c) 300 - 340 nm, ve kterých byla regresně analyzována spektra. Obr. 5 ilustruje odhady tří disociačních konstant pK_{a1} , pK_{a2} a pK_{a3} , včetně těsnosti proložení křivky, vyjádřené směrodatnou odchylkou absorbance $s(A)$, která zde sloužila za kritérium spolehlivosti vypočtených odhadů parametrů. Nejtěsnějšího proložení křivek spekter s kritériem těsnosti proložení $s(A) = 1.15$ mAU bylo dosaženo v rozmezí vlnových délek 270 - 340 nm, i když odhady disociačních konstant si byly blízké ve všech třech testovaných

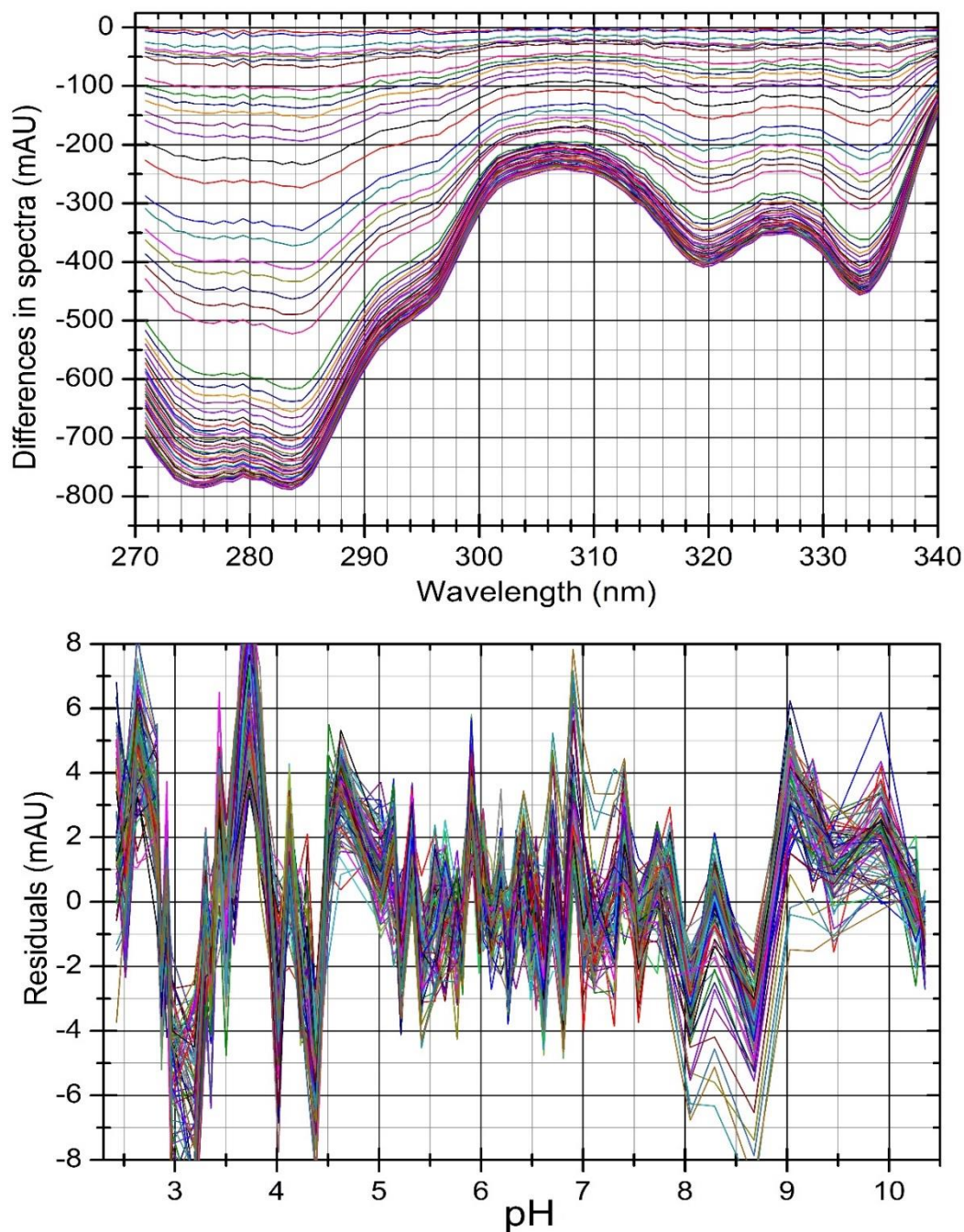
rozmezí vlnových délek. Podobně tři distribuční diagramy relativní koncentrace různě protonovaných částic na obr. 5 byly velmi podobné.



Obrázek 6 – Vyšetření vlivu změny pH, která způsobila rozdílné změny absorbance spektra Bedaquilinu protože některé chromofory byly změnou pH ovlivněny jen nepatrně: (a) Graf molárních absorpčních koeficientů všech rozličně protonovaných částic v závislosti na vlnové délce, (b) Výběr zvolených vlnových délek, při kterých byly sledovány změny absorbance na A-pH křivkách, kde šipkami jsou vyznačeny polohy disociačních konstant, (REACTLAB, ORIGIN 9).

Krok 5: Změna absorpce ve spektrech při titrační změně pH:

Titrační změna pH roztoku nezpůsobila významné změny ve všech částech spektra Bedaquilinu, protože některé chromofory byly méně ovlivněny změnou pH. Obr. 6a znázorňuje spektrum molárních absorpčních koeficientů v závislosti na vlnové délce pro vybrané vlnové délky, pro které byly na obr. 6b zobrazeny křivky A-pH. Byla vyšetřována citlivost chromoforů v molekule Bedaquilinu na pH právě formou zobrazených A-pH křivek. Maximální změna absorpce byla při změnách pH u vlnové délky 251,1 nm a u 266,5 nm. Graf ukázal odhady disociačních konstant a přítomnost převážně odlišně protonovaných částic. Z obou grafů obr. 6 bylo zřejmé, že dvě disociační konstanty pK_{a1} a pK_{a2} byly velmi blízké a jejich odhad byl proto obtížnější.

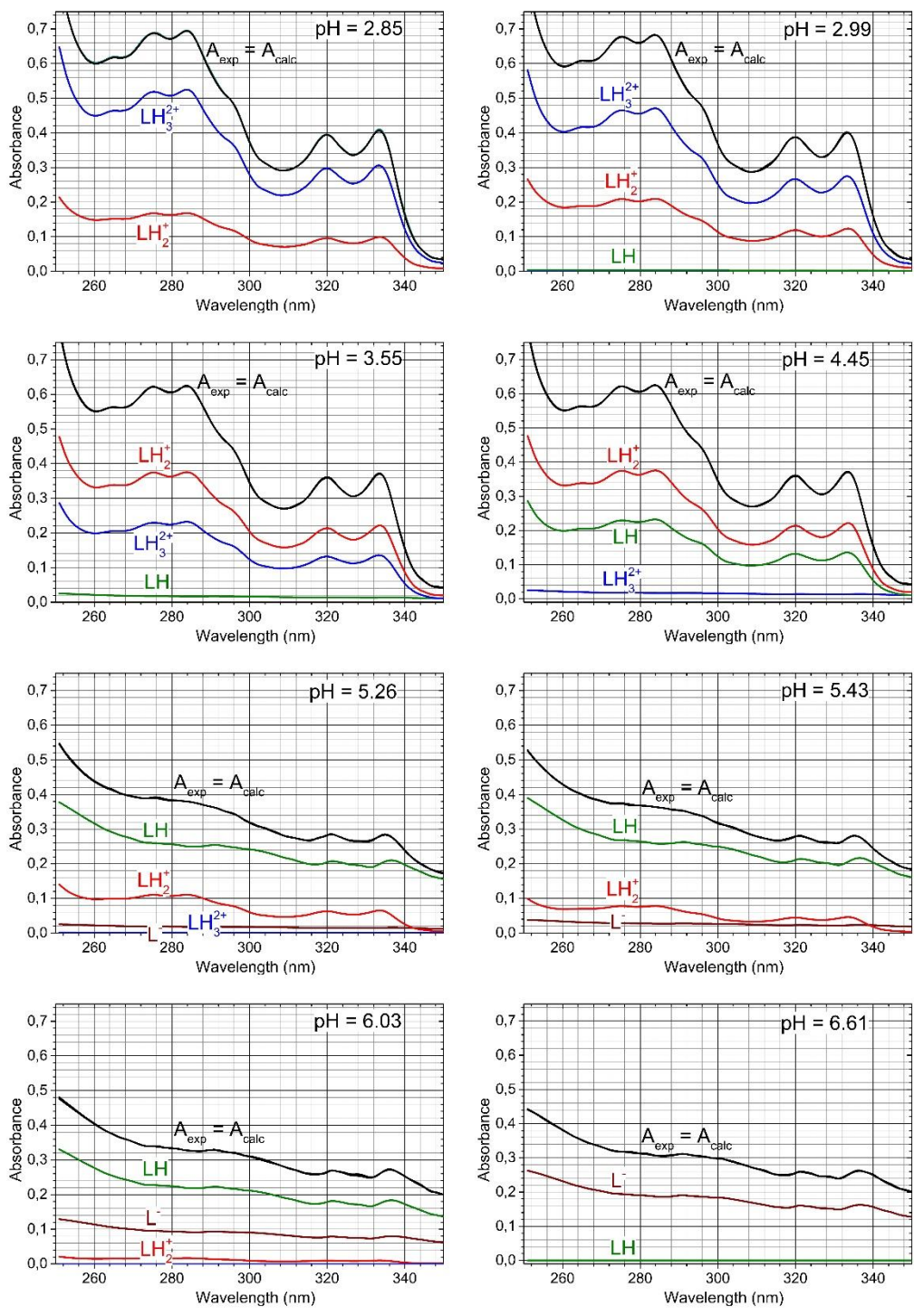


Obrázek 7 – Vyšetření velikosti změny absorpance Δ_{ij} v pH-absorbančních spektrech v titračně proměňovaném pH: (a) Graf sledované změny absorpance Δ_{ij} ve spektru Bedaquilinu při pH titraci dosahuje až -800 mAU, (b) Graf reziduí e [mAU] ukazuje, že rezidua měla daleko menší velikost než výše uvedené změny absorpance. Rezidua dosahovala velikosti náhodného přístrojového šumu měřené absorpance $s_{inst}(A) \approx 5 - 7$ mAU, (REACTLAB, ORIGIN 9).

Krok 6: Poměr signálu spektra k šumu při titrační změně pH:

Při spektrofotometrickém stanovení disociačních konstant pK_a Bedaquilinu bylo nutné také zjistit, zda titrační změna pH způsobila dostatečnou změnu absorbance ve vějíři spekter, která by umožnila regresní stanovení disociačních konstant. Z obr. 7a a 7b bylo zřejmé, že spektrální odezva chromoforu molekuly Bedaquilinu není všude stejná pro studium protonační rovnováhy, takže bylo třeba ověřit, zda bylo možné odhadnout tři disociační konstanty i při takových minimálních změnách absorbance. Změna absorbance u i -té vlnové délky v j -spektře byla vyjádřena vztahem rozdílu $\Delta_{ij} = A_{ij} - A_i$. Bylo vyšetřeno, zda malé změny absorbance A_{ij} ve spektrech byly dostatečné pro regresní analýzu, a hlavně větší než rezidua čili hodnota šumu absorbance $s_{\text{inst}}(A)$.

Změny rozdílu absorbance Δ_{ij} (mAU) ve spektrech byly vyneseny proti vlnové délce λ pro všechny prvky absorbanční matice (obr. 7a) a ukázaly, že změny absorbance byly sice malé, ale stále větší než rezidua či přístrojový šum měřené absorbance. Obr. 7b ukazuje, že zatímco rezidua e na obr. 7b byly převážně v rozmezí -2,5 až +2,5 mAU, změny absorbance na obr. 7a byly v rozmezí -800 mAU. Tyto změny absorbance Δ_{ij} (mAU) proto dostačovaly k regresnímu odhadu disociačních konstant hledaného regresního modelu.



Obrázek 8 – Dekonvoluce vybraného experimentálního spektra $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol. dm}^{-3}$ Bedaquilinu při 25°C do spekter jednotlivých rozličně protonovaných částic L^- , LH , LH_2^+ , LH_3^{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 Bedaquilinu (vpravo).

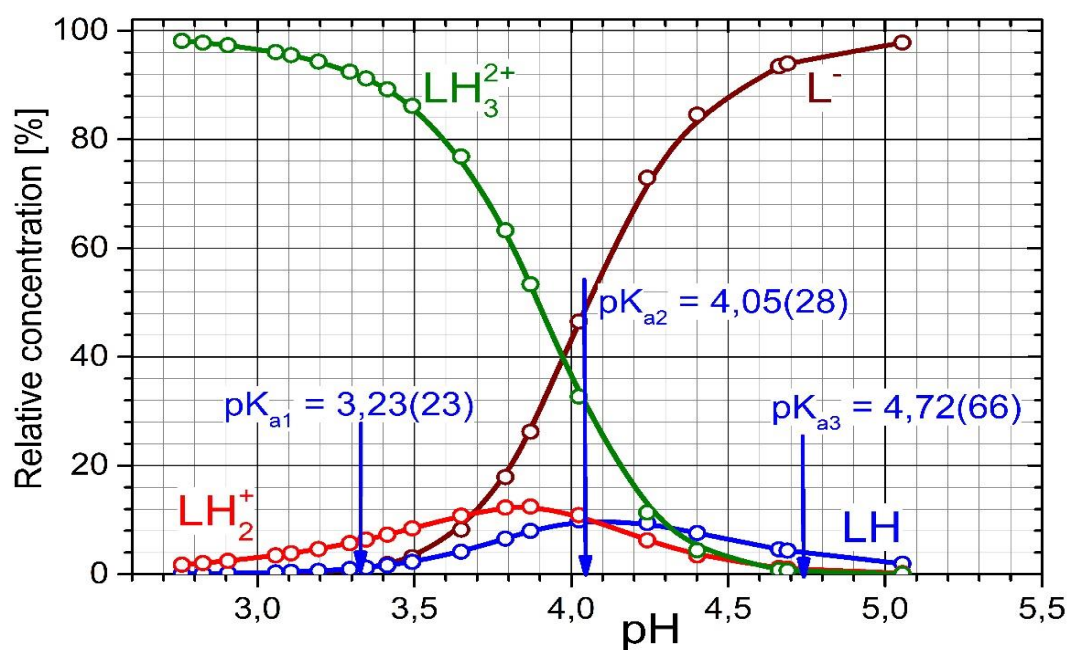
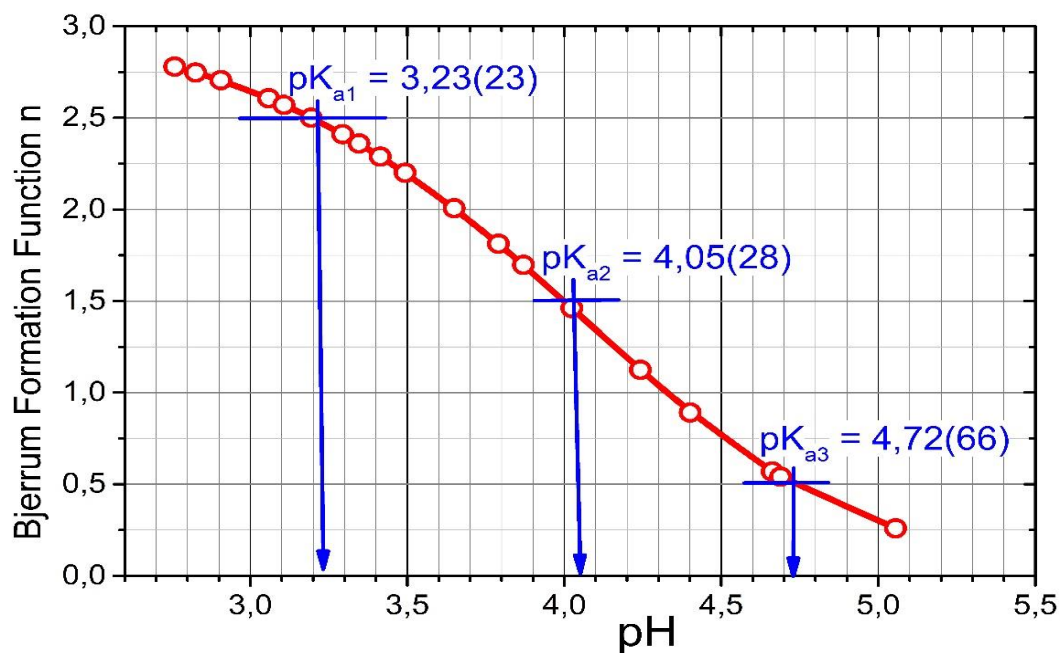
Krok 7: Dekonvoluce spektra:

Dekonvoluce každého naměřeného experimentálního spektra do absorpčních pásů jednotlivých rozdílně protonovaných částic [33] ukázala, zda byla hypotéza protonačního schéma správně navržena. Obr. 8 ilustruje dekonvoluci osmi vybraných experimentálních spekter do absorpčních pásů různě protonovaných částic Bedaquilinu, a to u pH = 2,85; 2,99; 3,55; 4,45; 5,26; 4,45; 5,26; 5,43; 6,03 a 6,61.

Při pH 2,85 a 2,99 absorpční pásy kationtů LH_3^{2+} v rovnováze s LH_2^+ ukázaly, že chromofor významně indikoval protonační rovnováhu při vlnových délkách 270 až 290 nm a také při 320 až 330 nm, kde bylo možné ve spektru indikovat maximum absorbance λ_{max} a ϵ_{max} . Indikace protonovaných kationtů pokračovala přes pH 3,55 až do pH 4,45 hlavně u maxim vlnových délek 320 až 330 nm. Zatímco od pH 2 do pH 4 dominovaly ve spektru dva kationty LH_3^{2+} v rovnováze s LH_2^+ , neutrální molekula se svým slabým absorpčním pásem v této oblasti pH neabsorbovala, protože byla přítomna ve velmi nízké koncentraci. Od pH 4,45 se začíná projevovat absorpční především u maxim 320 až 330 nm a slabší pás je u maxima 290 nm. Od pH = 5,26 se snižuje absorpční pás LH_2^+ až u pH 6 zcela vymizí a roste absorpční pás neutrální molekuly LH. Od pH 6 do pH 7 se objevuje absorbance aniontu L^- , která však není charakteristická absorpčním pásem s maximem u vybrané vlnové délky. Dekonvoluce spekter je význačnou pomůckou při diskusi protonačního schéma molekuly Bedaquilinu.

3.2 Analýza pH-metrických dat

Potenciometrická titrace okyseleného Bedaquilinu hydroxidem draselným byla prováděna při pěti teplotách, ale především při 25 °C a 37 °C (Tabulka 2) a upravené iontové síle. Při analýze pH-metrických dat byl odhad každé disociační konstanty Bedaquilinu vyčíslen programem ESAB [10].



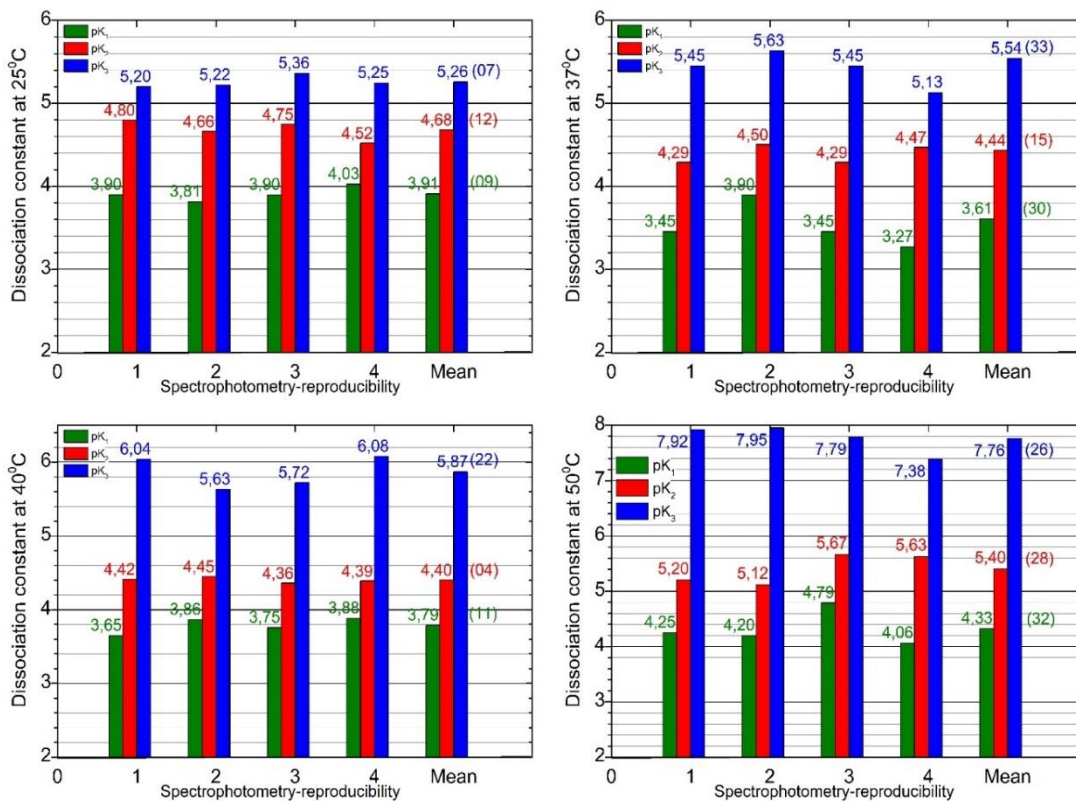
Obrázek 9 – Analýza pH-metrických dat Bjerrumovou funkcí: (a) pH-metrická data Bedaquilinu, analyzovaná Bjerrumovou tvornou funkcí při pH-titraci okyseleného Bedaquilinu k pH 2 hydroxidem draselným při 25 °C ukazují na tři disociační konstanty v oblasti pH 3 až 5,5. V závorce jsou uvedeny směrodatné odchylky odhadu pK na poslední platné místo odhadu. (b) Distribuční diagram relativních koncentrací rozličně protonovaných částic Bedaquilinu v % přináší také hodnoty tří disociačních konstant.

Tabulka 2 – Regresní zpřesnění společných a skupinových parametrů programem ESAB pro pH-metrickou titraci alkalizovaného $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Bedaquilinu HCl: odhady disociačních konstant pKa1, pKa2, pKa3 Bedaquilinu se směrodatnými odchylkami na poslední platnou číslici uvedenou v závorkách. Spolehlivost odhadu parametrů je prokázána statistickou analýzou reziduí: průměr reziduí $E(\hat{\epsilon})$ [μL], medián M [μL], průměr absolutní hodnoty reziduí, $E|\hat{\epsilon}|$ [μL], směrodatná odchylka reziduí $s(\hat{\epsilon})$ [μL], šikmost $g1(\hat{\epsilon})$ a špičatost $g2(\hat{\epsilon})$ prokazující Gaussovo rozdělení, Hamiltonův R-faktor relativní těsnosti [%] a Akaikovo informační kritérium AIC. Společné parametry upřesněny: pKa1, pKa2, pKa3. Zjemněné skupinové parametry H0, HT, L0. Konstanty: $t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $pK_w = 13,9799$, $s(V) = \text{sinst}(V) = 0,1 \text{ } \mu\text{L}$, I0 upraveno (titrant v nádobce), IT = 0,9470(0,9602) (titrant v byretě KOH).

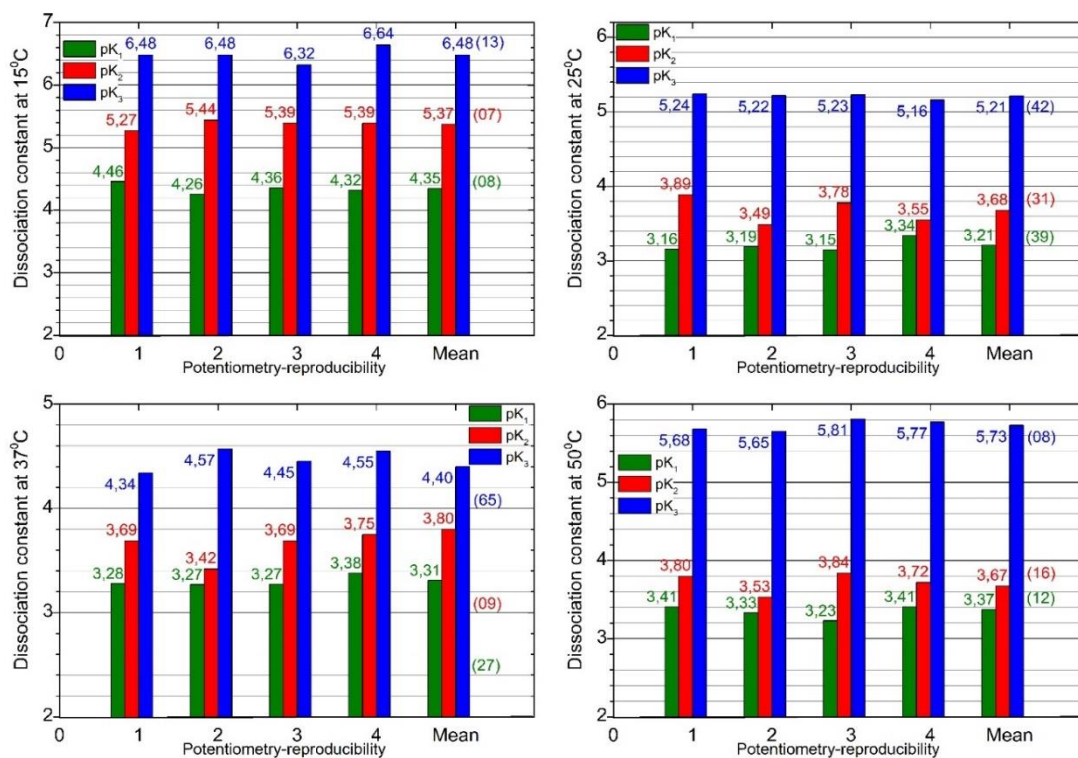
Teplota [$^\circ\text{C}$]	25 $^\circ\text{C}$					37 $^\circ\text{C}$				
Reprodukovatelnost	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	Průměr	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	Průměr
Odhady skupinových parametrů H0, HT a L0 v hledaném protonačním modelu										
$H_0 \times 1\text{E}+02$ [mol/L]	6.527	7.645	7.865	7.165		6.568	7.651	7.200	7.247	
$L_0 \times 1\text{E}+04$ [mol/L]	0.970	1.232	1.977	2.538		1.468	0.917	0.252	1.880	
Odhady společných parametrů disociačních konstant v hledaném protonačním modelu										
$\text{pK}_{a1}, \text{LH}_4^{2+} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{LH}_3^+$	3.16	3.19	3.15	3.34	3.21	3.28	3.27	3.274	3.38	3.30
$\text{pK}_{a2}, \text{LH}_3^+ \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{LH}_2$	3.89	3.49	3.78	3.55	3.68	3.69	3.65	4.11	3.76	3.80
$\text{pK}_{a3}, \text{LH}_2 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{LH}^-$	5.24	5.22	5.23	5.16	5.21	4.34	4.35	4.45	4.55	4.42
Test těsnosti proložení statistickou analýzou reziduí										
Průměr absolutních hodnot reziduí, $E \hat{\epsilon} $ [μL]	0.281	0.145	0.145	0.401		0.242	0.341	0.387	0.416	
Směrodatná odchylka reziduí, $s(\hat{\epsilon})$, [μL]	0.383	0.178	0.183	0.564		0.316	0.454	0.432	0.531	
Akaikovo informační kritérium, AIC	-293.0	-339.4	-305.8	-323.1		-332.5	-332.7	-257.4	-295.6	
Hamiltonův R-factor z ESABu [%]	0.0332	0.0132	0.0145	0.0443		0.0276	0.0335	0.0340	0.0416	

Krok 8: Analýza pH-metrických dat Bjerrumovou funkcí:

Bedaquilin vykazoval dvě nebo tři disociační konstanty a zjemnění jejich numerického odhadu bylo provedeno nelineární regresí pH-metrické titrační křivky programem ESAB. Nelineární regresní analýza byla aplikována na efektivní střední část pH-metrické titrační křivky protonovaného kationtu Bedaquilinu titrovaného hydroxidem draselným. Odhady disociačních konstant pK_{a1} , pK_{a2} a pK_{a3} byly vyhodnoceny na základě numerické analýzy Bjerrumovy tvorné křivky (obr. 9). Při vyšší koncentraci než $2 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ se v titrovaném roztoku Bedaquilinu tvořila sraženina. Rezidua byla v regresním programu ESAB definována rozdílem mezi experimentální a vypočtenou hodnotou přidávaného objemu titrantu KOH, $e_i = V_{\text{exp},i} - V_{\text{calc},i}$. Test spolehlivosti numericky zjemněných odhadů disociačních konstant byl proveden statistickou analýzou reziduí. Navíc zjemněním obou skupinových parametrů H_0 , L_0 se statistiky testu těsnosti proložení výrazně zlepšily. Za relativně citlivé kritérium spolehlivosti odhadů disociačních konstant byl považován také průměr absolutních hodnot reziduí $E | \bar{e} |$ v μL . Porovnání numerické hodnoty této statistiky s instrumentálním šumem, který zde představovala instrumentální směrodatná odchylka objemu titrantu KOH, $s_{\text{inst}}(V) = s(V) = 0,1 \mu\text{L}$ se velice osvědčilo, stejně jako i další statistiky analýzy reziduí o těsnosti proložení, jako jsou průměr reziduí $E | e |$ a směrodatná odchylka reziduí $s(V)$, které byly buď stejné nebo nižší než experimentální šum $s_{\text{inst}}(V)$. Hodnoty obou sledovaných statistik dosahovaly velikosti $0,1 \mu\text{L}$ což byly hodnoty podobné přístrojové chybě použitých mikrobyret $s(V) = 0,1 \mu\text{L}$. Kromě toho rezidua kolísala mezi dolní hranicí ($-0,2 \mu\text{L}$) a horní hranicí ($0,2 \mu\text{L}$) vnitřních Hoaglinových mezí a žádné reziduum nebylo vně těchto mezí (bližší viz strana 81, ref. [26]). Odhady zjemňovaných disociačních konstant programem ESAB se proto ukázaly jako dostatečně spolehlivé. Výstavba regresní křivky protonačního modelu byla dále vylepšena následným zjemněním obou skupinových parametrů, a to koncentrace léčiva Bedaquilin L_0 a počáteční koncentrace protonů H_0 v titrační nádobce.



Obrázek 10 – Reprodukovatelnost odhadů čtyř disociačních konstant při čtyřech vybraných teplotách spektrofotometricky programem ReactLab ukazuje na menší citlivost chromoforů molekuly Bedaquilinu na titrační změnu pH. Se stoupající teplotou se zvyšuje rozpustnost a zlepšuje se i reprodukovatelnost odhadů disociačních konstant. Ze čtyř opakovaných vějířů spekter při každé teplotě byly stanoveny disociační konstanty a vyčíslena jejich střední hodnota značená *Mean* spolu se směrodatnou odchylkou v závorce v posledních dvou významných číslicích.



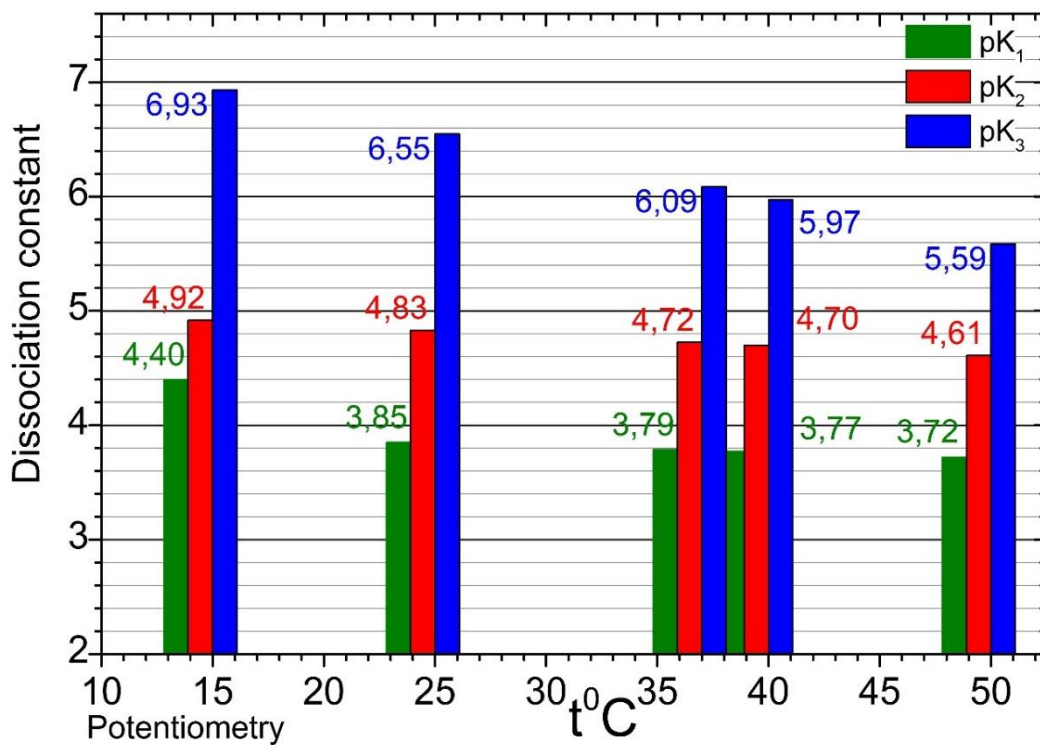
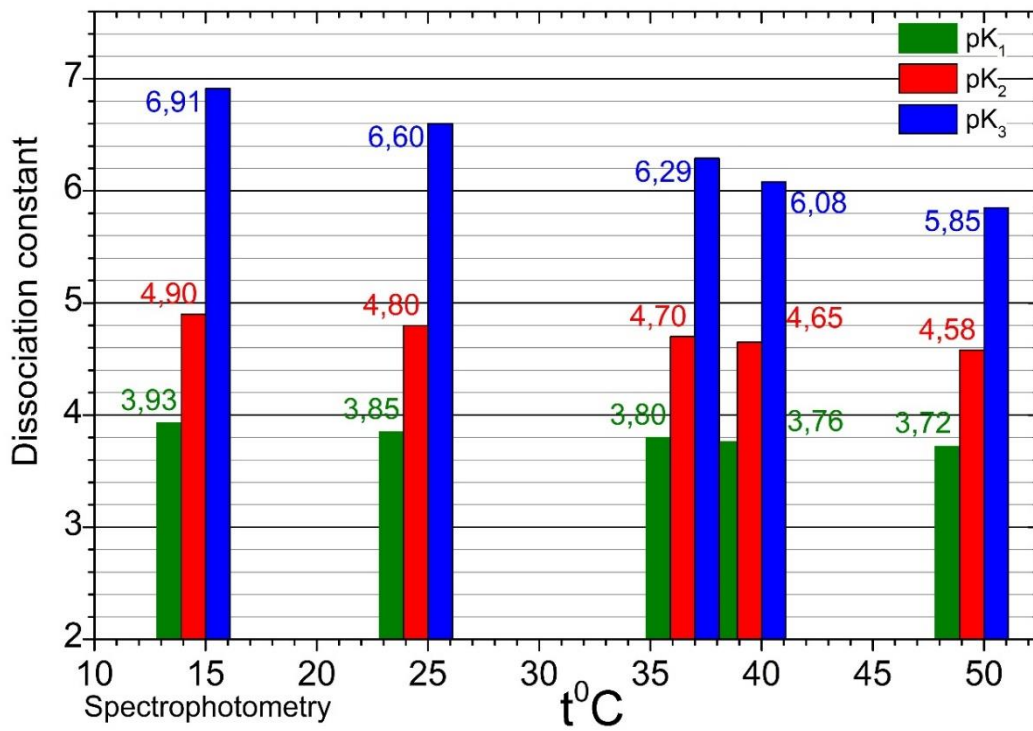
Obrázek 11 – Reprodukovatelnost odhadů tří disociačních konstant při čtyřech vybraných teplotách na titrační změnu pH potenciometricky programem ESAB ukazuje, že se stoupající teplotou se zvyšuje rozpustnost a zlepšuje se reprodukovatelnost odhadů disociačních konstant. Ze čtyř opakovaných titračních křivek při každé teplotě byly stanoveny disociační konstanty a vyčíslena jejich střední hodnota *Mean* spolu se směrodatnou odchylkou v závorce v posledních dvou významných číslicích

Krok 9: Nejistota pK_a v reprodukováných měřeních:

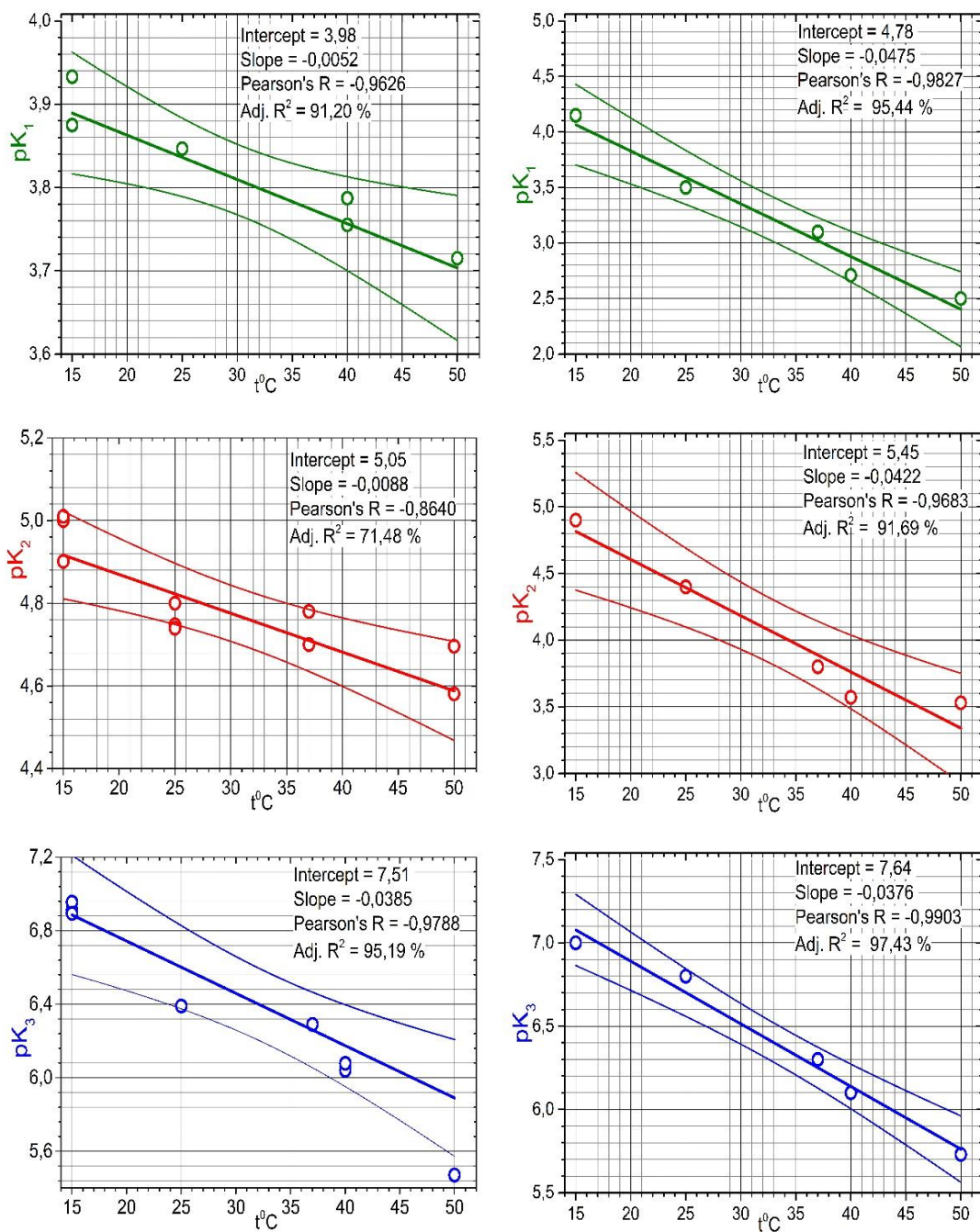
Reprodukovatelnost disociačních konstant vyhodnocených programem REACTLAB (obr. 10) nebo programem ESAB (obr. 11) ze čtyř reprodukováných měření byla shledána v dobré shodě. Interpretace byla následující:

- Odhad aritmetického průměru *Mean* se svou směrodatnou odchylkou na obr. 10 a 11 čtyř reprodukováných disociačních konstant zde sloužily k vyjádření míry nejistoty odhadu.
- Při 37 °C byly odhady disociační konstanty o něco kyselejší, tzn. měly nižší hodnoty pK_a než odhady při 25 °C (obr. 12).

- c) Velmi blízké hodnoty dvou po sobě následujících disociačních konstant pK_{a1} a pK_{a2} by mohly vést k určitým obtížím v minimalizačním procesu regrese nebo mohly způsobit přímo selhání numerického zjemnění v iteračním procesu. Důvodem by mohlo být vysvětlení, že intermediární částice nebyla přítomna v dostatečně vysoké koncentraci, jak je zřejmé na obr. 9b pro příliš blízké hodnoty pK_{a1} a pK_{a2} , nebo že pK_{a1} jedné částice vysoce korelovala s hodnotou pK_{a2} druhé částice a obě částice tím měly stejný vliv na výslednou hodnotu pH.
- d) Když normálové rovnice byly v nelineární regresi singulární, tzn. že jeden nebo více korelačních koeficientů parametrů pK_{a1} a pK_{a2} byl roven jedné nebo minus jedné, mohl být minimalizační proces regrese programem předčasně ukončen [40].



Obrázek 12 – Diagram závislosti tří disociačních konstant pK_a na pěti teplotách regresní analýzou spekter ukazuje mírný pokles pK_a se zvyšující se teplotou: *Nahoře*-spektrofotometricky UV/Vis-metrickou titrací, *dole*-potenciometricky pH-metrickou titrací.

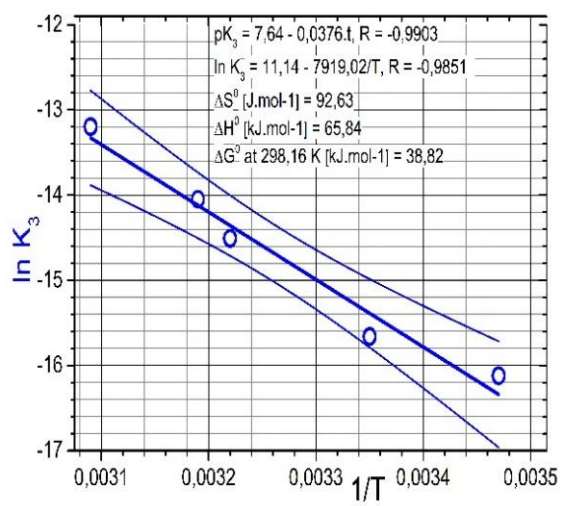
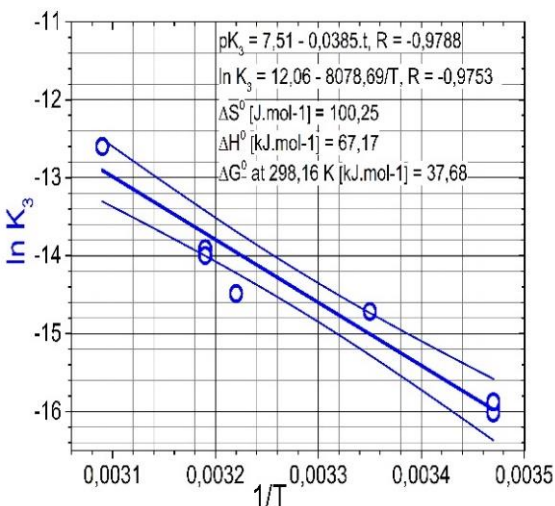
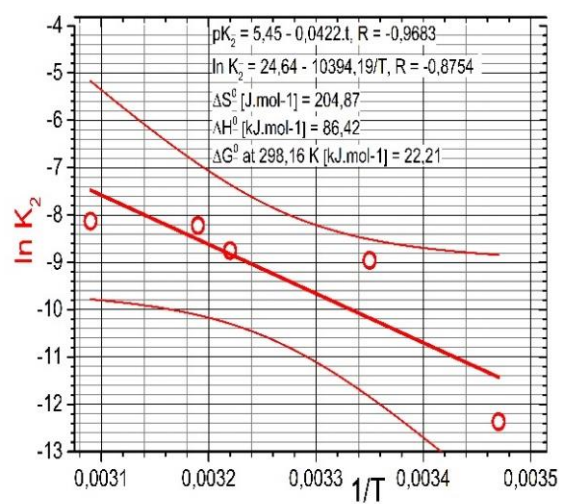
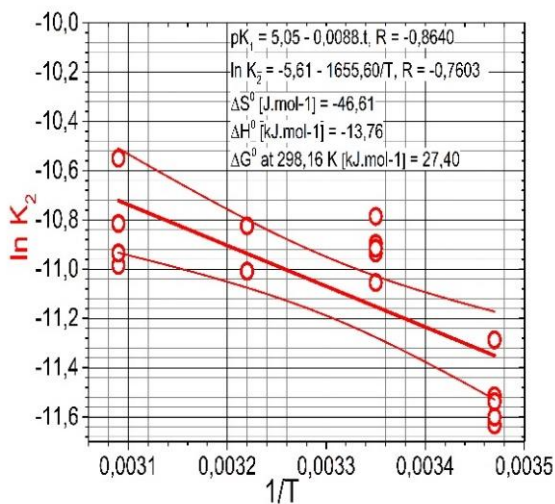
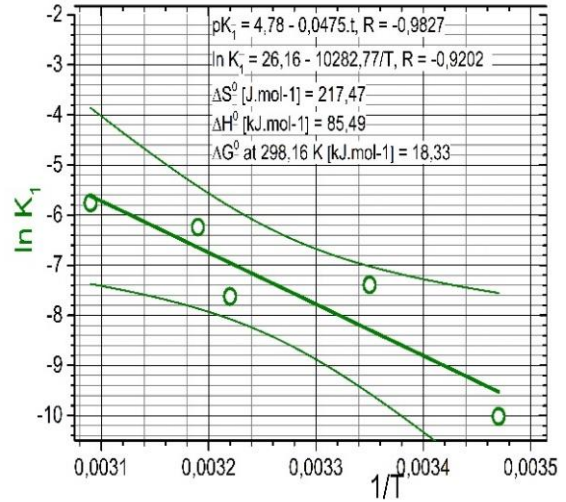
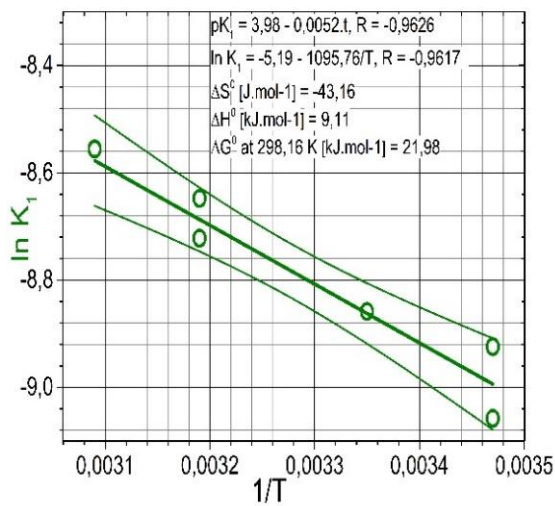


Obrázek 13 – Diagram závislosti třech disociačních konstant pK_a na teplotě $pK_a = f(t^{\circ}C)$ ukazuje přímkové závislosti vyhodnocené lineární regresní analýzou: *Vlevo* pH-absorbanční matice UV/VIS metrickou metodou, *Vpravo* pH-titrační křivky pH-metrickou metodou. U vyšší koncentrace Bedaquilinu v potenciometrii (0,3mM/L) než ve spektrofotometrii (0,01mM/L) se u $pH > 6$ Bedaquilin začal srážet.

Krok 10: Stanovení entalpie, entropie a Gibbsovy volné energie pro "extra-termodynamiku" disociace:

Změna entalpie ΔH^0 v procesu disociace byla vypočtena dle 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 dle vztahu $\Delta S^0 = (\Delta H^0 - \Delta G^0)/T$, kde R (ideální konstanta plynu) = 8,14 J.K⁻¹.mol⁻¹ a K je termodynamická disociační konstanta a T je absolutní teplota v Kelvinech.

Porovnání dvou diagramů závislosti tří disociačních konstant pK_a na pěti teplotách regresní analýzou spekter a regresní analýzou pH-titračních křivek vykazuje vždy mírný pokles disociačních konstant pK_a se zvyšující se teplotou (obr. 12). Přímkovou lineární závislost vykazující úsek, směrnici, korelační koeficient R a koeficient determinace R^2 v % (zvaný regresní rabat) pro spektrální a potenciometrická data přinesl obr. 13. Lepší korelační koeficient a linearitu vykazala potenciometrická data, protože korelační koeficient a regresní rabat dosáhly vyšších hodnot než spektrální data.



Obrázek 14 – Závislost tři disociačních konstant na teplotě $pK_a = f(t^\circ\text{C})$ byla transformována do souřadnic $\ln K = f(1/T)$ a z úseku a směrnice regresní přímky teplotní závislosti měřené spektrofotometricky (vlevo) a potenciometricky (vpravo) byla vypočtena molární entalpie ΔH° , molární entropie ΔS° a molární Gibbsova volná energie ΔG° .

Závislost $pK_a = f(t^{\circ}C)$ z obr. 13 byla transformována do nových souřadnic $\ln K = f(1/T)$ a z úseků a směrnic regresních přímek byly vyčísleny extratermodynamiky čili standardní entropie ΔS^0 , standardní entalpie ΔH^0 a standardní Gibbsova volná energie ΔG^0 ze spektrálních a potenciometrických dat (obr. 14):

- 1. Spektrální data:** Pro výpočet extratermodynamik byly použity odhady disociačních konstant z pH-absorbančních spektrálních dat. Pozitivní hodnoty entalpie $\Delta H^0(pK_{a1}) = 9,11 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^0(pK_{a2}) = 13,76 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^0(pK_{a3}) = 67,17 \text{ kJ.mol}^{-1}$ při $25^{\circ}C$ ukázaly, že disociační proces je endotermní a je doprovázen absorpcí tepla. Pozitivní hodnota Gibbsovy volné energie $\Delta G^0(pK_{a1}) = 21,98 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta G^0(pK_{a2}) = 27,40 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta G^0(pK_{a3}) = 37,68 \text{ kJ.mol}^{-1}$ při $25^{\circ}C$ ukázala, že disociační proces nebyl spontánní. Vzhledem k tomu, že hodnota entropie disociačního procesu ΔS^0 při $25^{\circ}C$ byla pro dvě disociační konstanty negativní, $\Delta S^0(pK_{a1}) = -43,16 \text{ J.mol}^{-1}$, $\Delta S^0(pK_{a2}) = -46,51 \text{ J.mol}^{-1}$ při $25^{\circ}C$ disociační proces byl reverzibilní, zatímco kladná hodnota $\Delta S^0(pK_{a3}) = 100,25 \text{ J.mol}^{-1}$ při $25^{\circ}C$ potvrdila irreverzibilní proces.
- 2. Potenciometrická data:** Pro výpočet extratermodynamik byly použity odhady disociačních konstant z pH-titračních dat. Pozitivní hodnoty entalpie $\Delta H^0(pK_{a1}) = 85,49 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^0(pK_{a2}) = 86,42 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^0(pK_{a3}) = 65,84 \text{ kJ.mol}^{-1}$ při $25^{\circ}C$ ukázaly, že disociační proces je endotermní a je doprovázen absorpcí tepla. Pozitivní hodnota Gibbsovy volné energie $\Delta G^0(pK_{a1}) = 18,33 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta G^0(pK_{a2}) = 22,21 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta G^0(pK_{a3}) = 38,82 \text{ kJ.mol}^{-1}$ při $25^{\circ}C$ ukázala, že disociační proces nebyl spontánní. Vzhledem k tomu, že hodnota entropie disociačního procesu ΔS^0 při $25^{\circ}C$ byla pro disociační konstanty pozitivní $\Delta S^0(pK_{a1}) = 217,47 \text{ J.mol}^{-1}$, $\Delta S^0(pK_{a2}) = 204,87 \text{ J.mol}^{-1}$, $\Delta S^0(pK_{a3}) = 92,63 \text{ J.mol}^{-1}$ při $25^{\circ}C$ byl disociační proces irreverzibilní.

4 DISKUSE

Regresní program REACTLAB analyzoval pH-absorbanční matici 1×10^{-4} mol. dm⁻³ Bedaquilinu a numerické odhady tří disociačních konstant byly vyčísleny dvěma různými numerickými přístupy. Výsledky zjemnění disociačních konstant mohou zahrnovat komplexní faktory, týkající se analýzy reziduálního součtu čtverců RSS za účelem vyčíslení odhadovaných parametrů, jejich směrodatných odchylek a jejich korelačních koeficientů, mapy reziduí a diagramu koncentrací všech rozličně protonovaných částic hledaného protonačního modelu. Výstavba regresního modelu [39] se týkala rozhodování, zda nalezené odhady disociačních konstant a molárních absorpčních koeficientů lze akceptovat jako věrohodné. V regresním procesu je obvykle třeba vzít v úvahu všechny uvedené komplexní faktory, protože žádný z nich sám o sobě nestačí být spolehlivým ukazatelem věrohodného odhadu.

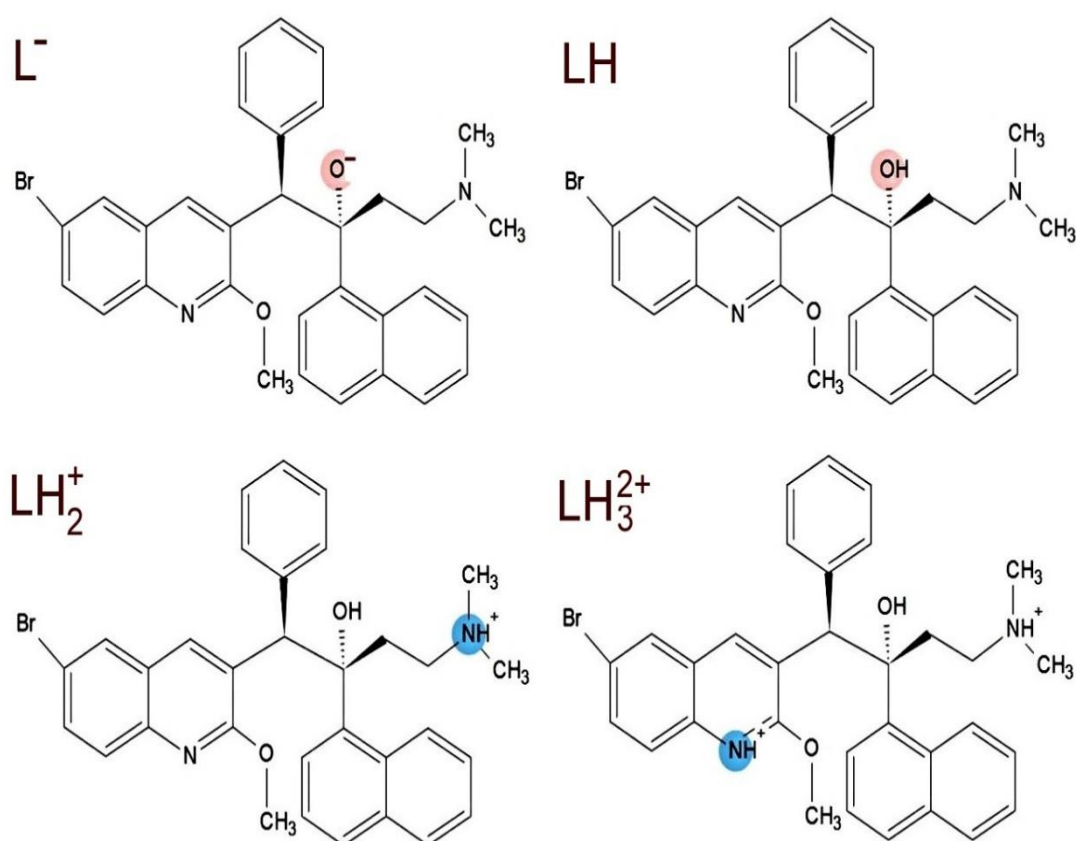
Program ESAB, minimalizující rezidua $e_i = V_{\text{exp},i} - V_{\text{calc},i}$ dosáhl hodnot reziduí 0,1 nebo 0,2 μL , což znamenalo, že vypočtené titrační křivky experimentálními body byly dostatečně těsně proloženy. Tím byla spolehlivost odhadů disociačních konstant Bedaquilinu prokázána, i když oba *skupinové parametry* L_0 , H_T byly v protonačním modelu nelineární regrese špatně podmíněny.

Nekonzistence experimentálně zjištěných odhadů pK_{ai} a jejich teoreticky předpovězených hodnot prognostickými programy mohla být způsobena složitou strukturou rezonance heterocyklického jádra a následně i různými elektronovými distribucemi, což by mohlo dále vést k různým predikovaným hodnotám pK_{ai} podle strukturního vzorce molekuly Bedaquilinu. V takových případech prognostické programy MARVIN, PALLAS a ACD/Percepta ve svých odhadech selhaly a disociační konstanty Bedaquilinu musely být, proto spolehlivěji určeny experimentálně. Vzhledem k tomu, že odhady disociačních konstant pK_{ai} jak z potenciometrických, tak spektrofotometrických dat byly podobné, lze je považovat za věrohodné.

1. Je-li pK_a pozitivní, je také standardní změna volné energie ΔG^0 pro disociační reakci pozitivní. 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 ΔG^0 , tak pro ΔS^0 v interakcích lék-proton. Vodíková vazba jako centrální interakce mezi lékem a protonem je také

mechanicky přitažlivá. Ve vodě tvoří vodíkové vazby síť spojitých řetězců, které se dynamicky mění (v určitém stavu).

2. Příspěvek entropie je v disociačních reakcích Bedaquilinu u spektrálních dat záporný ($\Delta S^0 < 0$), což ukazuje na reverzibilní proces. Ionty ve vodném roztoku mají tendenci orientovat okolní molekuly vody, které snižují entropii. Přínos iontu k entropii je částečná molární entropie, která je často negativní, zejména pro malé nebo vysoce nabité ionty. Ionizace kyseliny zahrnuje reverzibilní tvorbu dvou kationtů LH_2^+ a LH_3^{2+} , takže entropie klesá ($\Delta S^0 < 0$). U nižších koncentrací při měření spekter je látka většinou dobře rozpustná a v roztoku jsou na reverzibilní ionizaci dva kationty LH_2^+ a LH_3^{2+} , takže entropie opět klesá. U vyšších koncentrací v potenciometrické pH-titraci je rozpustnost omezená a disociace neutrální molekuly vykazuje kladnou entropii irreverzibilní disociace.



Obrázek 15 – Protonační schéma Bedaquilinu

5 ZÁVĚR

1. Spektrofotometrická a potenciometrická titrace pH umožnila měření dvou blízkých a jedné vzdálené disociačních konstant Bedaquilinu (Protonační schéma 1). Chromofory Bedaquilinu vykazovaly menší změny absorbance v UV/VIS-spektrech při titrační změně pH roztoku, a proto odhady disociačních konstant byly vystaveny větší nejistotě než u potenciometrického stanovení. Z tohoto důvodu se objevil spolehlivější odhad disociačních konstant získaných potenciometricky.
2. Bedaquilin označený LH byl schopen protonace v čisté vodě za vzniku rozpustných částic LH, LH₂⁺, LH₃²⁺ a LH₄³⁺. Graf molárních absorpčních koeficientů různě protonovaných částic ve vztahu k vlnové délce indikoval, že spektrum ϵ_L , a ϵ_{LH} bylo pro částice korelované a že hodnoty byly téměř stejné.
3. Bylo prokázáno, že v rozmezí pH 2 až 7 lze spolehlivě odhadnout tři disociační konstanty ze spektra, když koncentrace obtížně rozpustného Bedaquilinu byla $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ nebo méně. Ačkoli upravené pH méně ovlivnilo změny absorbance v chromoforu, spolehlivě byly stanoveny tři termodynamické disociační konstanty, přičemž program REACTLAB dosáhl hodnot $\text{pK}_{a1}^T = 3,91 (09)$, $\text{pK}_{a2}^T = 4,58 (12)$ a $\text{pK}_{a3}^T = 5,26 (07)$ při 25 °C a $\text{pK}_{a1}^T = 3,61 (30)$, $\text{pK}_{a2}^T = 4,44 (15)$ a $\text{pK}_{a3}^T = 5,54 (33)$ při 37 °C.
4. Tři termodynamické disociační konstanty Bedaquilinu byly stanoveny regresní analýzou potenciometrických křivek pH-titrace při koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ programem ESAB o hodnotách $\text{pK}_{a1}^T = 3,21 (39)$, $\text{pK}_{a2}^T = 3,68 (31)$ a $\text{pK}_{a3}^T = 5,21 (42)$ při 25 °C a $\text{pK}_{a1}^T = 3,31 (12)$, $\text{pK}_{a2}^T = 3,67 (15)$ a $\text{pK}_{a3}^T = 5,73 (08)$ při 37 °C.
5. "Extra-termodynamiky" disociace: Pro výpočet extratermodynamik u spektrálních dat byly pozitivní hodnoty entalpie $\Delta H^0(\text{pK}_{a1}) = 9,11 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta H^0(\text{pK}_{a2}) = 13,76 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta H^0(\text{pK}_{a3}) = 67,17 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ a ukázaly, že disociační proces je endotermní a je doprovázen absorpcí tepla. Pozitivní hodnota Gibbsovy volné energie $\Delta G^0(\text{pK}_{a1}) = 21,98 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta G^0(\text{pK}_{a2}) = 27,40 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,

$\Delta G^0(\text{pK}_{a3}) = 37,68 \text{ kJ.mol}^{-1}$ při 25 °C ukázala, že disociační proces nebyl spontánní. Vzhledem k tomu, že hodnota entropie disociačního procesu ΔS^0 při 25 °C byla pro dvě disociační konstanty negativní $\Delta S^0(\text{pK}_{a1}) = -43,16 \text{ J.mol}^{-1}$, $\Delta S^0(\text{pK}_{a2}) = -46,51 \text{ J.mol}^{-1}$ při 25 °C disociační proces byl reverzibilní, zatímco kladná hodnota $\Delta S^0(\text{pK}_{a3}) = 100,25 \text{ J.mol}^{-1}$ při 25 °C potvrdila irreverzibilní proces.

6. Pro výpočet extratermodynamik u potenciometrických dat byly pozitivní hodnoty entalpie $\Delta H^0(\text{pK}_{a1}) = 85,49 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^0(\text{pK}_{a2}) = 86,42 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^0(\text{pK}_{a3}) = 65,84 \text{ kJ.mol}^{-1}$ a ukázaly, že disociační proces je endotermní a je doprovázen absorpcí tepla. Pozitivní hodnota Gibbsovy volné energie $\Delta G^0(\text{pK}_{a1}) = 18,33 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta G^0(\text{pK}_{a2}) = 22,21 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta G^0(\text{pK}_{a3}) = 38,82 \text{ kJ.mol}^{-1}$ při 25 °C ukázala, že disociační proces nebyl spontánní. Vzhledem k tomu, že hodnota entropie disociačního procesu ΔS^0 při 25 °C byla pro disociační konstanty pozitivní $\Delta S^0(\text{pK}_{a1}) = 217,47 \text{ J.mol}^{-1}$, $\Delta S^0(\text{pK}_{a2}) = 204,87 \text{ J.mol}^{-1}$, $\Delta S^0(\text{pK}_{a3}) = 92,63 \text{ J.mol}^{-1}$ při 25 °C byl disociační proces irreverzibilní.

Bibliografie

- [1] C. Multum, "Bedaquiline," *Drugs.com*, Original vol. <https://www.drugs.com/mtm/Bedaquiline.html>, 10 Jan 2020 2020, Art no. <https://www.drugs.com/mtm/Bedaquiline.html>.
- [2] S. Prakash, "Pharmacovigilance in India," *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 39, no. 3, p. 1, 5 May 2020 2007, doi: 10.4103/0253-7613.33430.
- [3] J. P. Sarathy, G. Gruber, and T. Dick, "Re-Understanding the Mechanisms of Action of the Anti-Mycobacterial Drug Bedaquiline " *Antibiotics*, vol. 8, no. 4, p. 12, 2019, Art no. www.mdpi.com/journal/antibiotics, doi: 10.3390/antibiotics8040261.
- [4] Wikipedia, "Bedaquiline," *Wikipedia-* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bedaquiline>, Wikipedia 2013, Art no. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bedaquiline>.
- [5] "Sirturo-Drug description," <https://www.rxlist.com/sirturo-drug.htm#description>, 2020.
- [6] A. Koul *et al.*, "Delayed Bactericidal Response of Mycobacterium Tuberculosis to Bedaquiline Involves Remodelling of Bacterial Metabolism," *Nature Communications*, Open Access vol. 5, 26 Feb 2014 2014, Art no. 3369 (2014), doi: 10.1038/ncomms4369.
- [7] E. Segala, W. Sougakoff, A. Nevejans-Chauffour, V. Jarlier, and S. Petrella, "New Mutations in the Mycobacterial ATP Synthase: New Insights Into the Binding of the Diarylquinoline TMC207 to the ATP Synthase C-ring Structure," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 56, no. 5, pp. 2326-2334, May 2012 2012, doi: 10.1128/AAC.06154-11
- [8] A. Koul, N. Dendouga, and K. e. a. Vergauwen, "Diarylquinolines Target Subunit C of Mycobacterial ATP Synthase " *Nat Chem Biol.*, Original vol. 3, no. 6, pp. 323-324, 13 May 2007 2007, doi: 10.1038/nchembio884.
- [9] F. H and T. K., "Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride," *Proteins*, vol. 33, no. 2, pp. 159-166, 1998.
- [10] C. De Stefano, P. Princi, C. Rigano, and S. Sammartano, "Computer analysis of equilibrium data in solution ESAB2M: an improved version of the ESAB program," *Annali Di Chimica*, vol. 77, no. 7-8, pp. 643-675, 1987 1987.
- [11] P. Gans, A. Sabatini, and A. Vacca, "Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs," *Talanta*, vol. 43, no. 10, pp. 1739-53, Oct 1996, doi: 10.1016/0039-9140(96)01958-3.
- [12] P. Gans, A. Sabatini, and A. Vacca, "Hyperquad computer-program suite.," (in English), *Abstr Pap Am Chem S*, vol. 219, pp. U763-U763, Mar 26 2000.
- [13] P. Gans, A. Sabatini, and A. Vacca, "Simultaneous calculation of equilibrium constants and standard formation enthalpies from calorimetric data for systems with multiple equilibria in solution," (in English), *J Solution Chem*, vol. 37, no. 4, pp. 467-476, Apr 2008, doi: 10.1007/s10953-008-9246-6.
- [14] *ACD/Labs pKa Predictor 3.0.* (2007). Toronto, Canada. [Online]. Available: <http://www.acdlabs.com/products/percepta/predictors/pka/>
- [15] W. Krotz-Vogel and H. C. Hoppe, "The PALLAS parallel programming environment," (in English), *Lect Notes Comput Sc*, vol. 1332, pp. 257-266, 1997.
- [16] ChemAxon, "MARVIN Sketch 16.5.2.0.," Software 2013.
- [17] Babić S., Horvat A. J.M., Pavlović D.M, and K.-M. M., "Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients," *Trends in Analytical Chemistry*,, vol. 26, no. 11, 2007.
- [18] M. Meloun, L. Pilařová, F. Bureš, and T. Pekárek, "Multiple dissociation constants of the Interpirdine hydrochloride using regression of multiwavelength

- spectrophotometric pH-titration data," *Journal of Molecular Liquids*, Original vol. 261, pp. 480-491, 11.04.2018 2018, doi: 10.1016/j.molliq.2018.04.056.
- [19] M. Meloun, S. Bordovská, T. Syrový, and A. Vrána, "Tutorial on a chemical model building by least-squares non-linear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data," (in English), *Anal Chim Acta*, vol. 580, no. 1, pp. 107-121, Oct 27 2006, doi: 10.1016/j.aca.2006.07.043.
- [20] M. Meloun and Z. Ferenčíková, "Enthalpy-entropy compensation for some drugs dissociation in aqueous solutions," *Fluid Phase Equilibra*, Original vol. 328, pp. 31-41, 15.05.2012 2012, doi: 10.1016/j.fluid.2012.05.011.
- [21] A. K. Debnath, A. J. Shusterman, R. L. L. Decompadre, and C. Hansch, "The Importance of the Hydrophobic Interaction in the Mutagenicity of Organic-Compounds," (in English), *Mutat Res*, vol. 305, no. 1, pp. 63-72, Feb 1 1994.
- [22] C. Gruber and V. Buss, "Quantum Mechanically Calculated Properties for the Development of Quantitative Structure-Activity-Relationships (Qsars) - Pka Values of Phenols and Aromatic and Aliphatic Carboxylic-Acids," (in English), *Chemosphere*, vol. 19, no. 10-11, pp. 1595-1609, 1989.
- [23] A. J. Shusterman, "Predicting Mutagenicity - Use a Technique Thats Been Useful in Predicting Efficacy," (in English), *Chemtech*, vol. 21, no. 10, pp. 624-627, Oct 1991.
- [24] G. Trapani, A. Carotti, M. Franco, A. Latrofa, G. Genchi, and G. Liso, "Structure Affinity Relationships of Some Alkoxy-carbonyl-2h-Pyrimido[2,1-B]Benzothiazol-2-Ones or Alkoxy-carbonyl-4h-Pyrimido[2,1-B]Benzothiazol-4-Ones Benzodiazepine Receptor Ligands," (in English), *Eur J Med Chem*, vol. 28, no. 1, pp. 13-21, 1993.
- [25] R. J. Aguerre, C. Suarez, and P. E. Viollaz, "Enthalpy-Entropy Compensation in Sorption Phenomena - Application to the Prediction of the Effect of Temperature on Food Isotherms," (in English), *J Food Sci*, vol. 51, no. 6, pp. 1547-1549, Nov-Dec 1986.
- [26] A. L. Gabas, J. Telis-Romero, and F. C. Menegalli, "Thermodynamic models for water sorption by grape skin and pulp," (in English), *Dry Technol*, vol. 17, no. 4-5, pp. 961-974, 1999.
- [27] T. P. Labuza, "Enthalpy-Entropy Compensation in Food Reactions," (in English), *Food Technol-Chicago*, vol. 34, no. 2, pp. 67-77, 1980.
- [28] L. Liu and Q. X. Guo, "Isokinetic relationship, isoequilibrium relationship, and enthalpy-entropy compensation," (in English), *Chem Rev*, vol. 101, no. 3, pp. 673-695, Mar 2001.
- [29] M. Meloun, S. Bordovská, and T. Syrový, "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," (in English), *J Phys Org Chem*, Original vol. 20, no. 9, pp. 690-701, Sep 2007 2007, doi: 10.1002/poc.1235.
- [30] M. Meloun, Z. Ferenčíková, and M. Javůrek, "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*, vol. 86, pp. 305-14, Feb 2012, doi: 10.1016/j.saa.2011.10.041.
- [31] M. Meloun, J. Havel, and E. Högfeltd, *Computation of solution equilibria: A guide to methods in potentiometry, extraction, and spectrophotometry* (Ellis Horwood series in analytical chemistry). Chichester, England: Ellis Horwood 1988, pp. x, 297 p.
- [32] M. Meloun, V. Říha, and J. Žáček, "Piston Microburette for Dosing Aggressive Liquids," (in Czech), *Chem Listy*, vol. 82, no. 7, pp. 765-767, 1988.
- [33] D. J. Leggett and W. A. E. McBryde, "General computer program for the computation of stability constants from absorbance data," *Analytical Chemistry*, vol. 47, no. 7, pp. 1065-1070, 1975.
- [34] M. Maeder and P. King, "Analysis of Chemical Processes, Determination of the Reaction Mechanism and Fitting of Equilibrium and/or Rate Constants," (in English), 2012 2012.

- [35] M. Meloun, J. Čapek, P. Mikšík, and R. G. Brereton, "Critical comparison of methods predicting the number of components in spectroscopic data," (in English), *Analytica Chimica Acta*, vol. 423, no. 1, pp. 51-68, Oct 20 2000, doi: Doi 10.1016/S0003-2670(00)01100-4.
- [36] J. H. Hu, P. Zhuang, R. S. Lin, and Y. S. Xie, "Ionization Thermodynamics of Methylbenzoic Acids in Water-Dmf Mixtures," (in English), *Thermochim Acta*, vol. 262, pp. 227-231, Sep 15 1995.
- [37] X. G. Hu, S. Q. Li, R. S. Lin, and H. X. Zong, "Enthalpic and entropic contributions to substituent effects on the ionization of meta- and para-nitrobenzoic acids in EtOH-H₂O mixtures at 298.15 K," (in English), *Thermochim Acta*, vol. 319, no. 1-2, pp. 43-45, Oct 5 1998.
- [38] J. J. Kankare, "Computation of equilibrium constants for multicomponent systems from spectrophotometric data," *Analytical Chemistry*, vol. 42, no. 12, pp. 1322-1326, 1970/10/01 1970, doi: 10.1021/ac60294a012.
- [39] M. Meloun and J. Militký, *Statistical Data Analysis: A Practical Guide, Complete with 1250 exercises and answer key on CD*, First ed. New Delhi, Cambridge, Oxford, Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 80 High street Sawstone Cambridge, CB22 3HJ, UK, 2011, p. 775.
- [40] M. Meloun, J. Militký, and M. Forina, *Chemometrics for analytical chemistry, Volume 2: PC- aided regression and related methods* (Chemometrics for analytical chemistry). Chichester: Ellis Horwood, 1994, p. 400.