

SPEKTROFOTOMETRICKÉ A POTENCIOMETRICKÉ STANOVENÍ DISOCIAČNÍCH KONSTANT CYTOSTATIKA BOSUTINIBU REGRESNÍ ANALÝZOU

Bc. Veronika Nečasová

UNIVERZITA PARDUBICE, Studentská 95 532 10 Pardubice 2, telefon: 724 411 485, email:
necasovav@gmail.com.

Abstrakt

Kombinací potenciometrické a spektrofotometrické indikace při pH-titraci multiprotického cytostatika bosutinibu bylo stanovení disociačních konstant provedeno ve směsném vodně-metanolickém prostředí. Cytostatikum bosutinib slouží k léčbě pacientů trpících pozitivní chronickou myeloidní leukémií. Léčivo vykazuje čtyři protonovatelná místa v pH 2-11, kde dvě jsou dobře oddělené a vykazují $\Delta \log K > 3$ a další dvě jsou blízké disociační konstanty. Koncentrační disociační konstanty byly odhadnuty nelineární regresí absorbanční matice programy SPECFIT/32 a SQUAD(84). Po extrapolaci na nulový obsah metanolu vedly k hodnotám pro 25°C $pK_{c1}= 11,04(05)$, $pK_{c2}= 7,56(07)$, $pK_{c3}= 4,54(10)$ a $pK_{c4}= 3,43(12)$ a při 37°C $pK_{c1}= 10,92(06)$, $pK_{c2}= 7,33(05)$, $pK_{c3}= 5,03(08)$ a $pK_{c4}= 3,44(06)$. Z dat potenciometrické pH-titrace při 25°C byly programy ESAB a HYPERQAD vyčísleny čtyři koncentrační disociační konstanty, které byly extrapolovány na nulový obsah metanolu: pro ESAB $pK_{c1}= 11,05(03)$, $pK_{c2}= 7,97(02)$, $pK_{c3}= 4,37(02)$ a $pK_{c4}= 3,51(02)$, pro HYPERQUAD $pK_{c1}= 11,29(05)$, $pK_{c2}= 7,95(07)$, $pK_{c3}= 4,24(10)$ a $pK_{c4}= 3,29(12)$.

Klíčová slova: Disociační konstanty; bosutinib; spektrofotometrická titrace; potenciometrická titrace.

Úvod

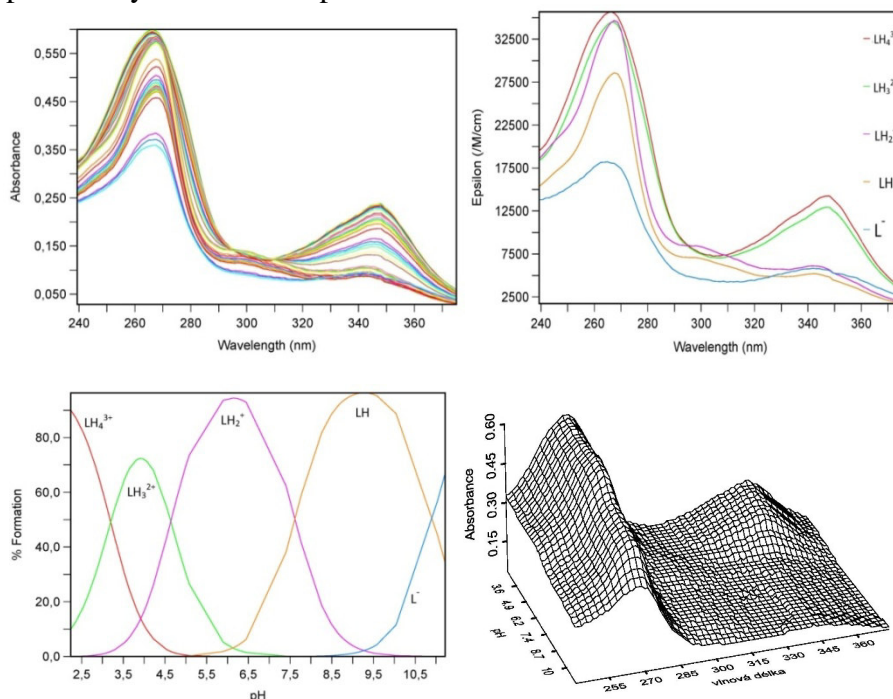
Acidobazické chování léčiv hraje klíčovou roli ve vývoji nových léčiv [1], protože určuje, zda je léčivo v organizmu v disociované iontové nebo neiontové formě, což má vliv na jeho rozpustnost a hlavně na rychlost rozpouštění v gastrointestinálním traktu [2]. Rovnovážné konstanty, vyjádřené buď jako disociační konstanty pK_a nebo protonační konstanty $\log K$, se číselně využívají k charakterizaci acidobazických vlastností sloučeniny. Potenciometrická pH-titrace je nejčastější metoda ke stanovení rovnovážných konstant ve vodném roztoku snadno rozpustné sloučeniny [3]. UV-spektrofotometrická pH-titrace je alternativní metodou vůči potenciometrické pH-titraci pro měření $\log K$ sloučenin, které vykazují vysoké hodnoty molárních absorpčních koeficientů při koncentracích okolo 1 mM či ještě nižších [4].

Materiály a metody

Bylo studováno léčivo bosutinib dodané firmou Zentiva Praha. Při potenciometrické titraci se vzorek titruje buď kyselinou nebo louhem za použití článku skleněné pH elektrody. Hodnota smíšené disociační konstanty pK_a je vypočtena z polovičního bodu ekvivalence titrační křivky. Metodou k zjištění bodu ekvivalence slouží především druhá derivace pH proti spotřebě titračního činidla. UV-spektrofotometrická pH-titrace je alternativní metodou vůči potenciometrické pH-titraci [5]. Měřenou veličinou je většinou absorbance. Aby byla disociační konstanta stanovitelná spektrofotometrickou titrací, musí sloučenina obsahovat blízko ionizačního centra UV-aktivní chromofor, který způsobí dostatečnou změnu absorpce světla při změně pH[6]. Protonovaná a deprotonovaná forma molekuly léčiva musí ke stanovení disociační konstanty vykazovat dostatečně velké rozdíly v absorpci světla ve spektru [7].

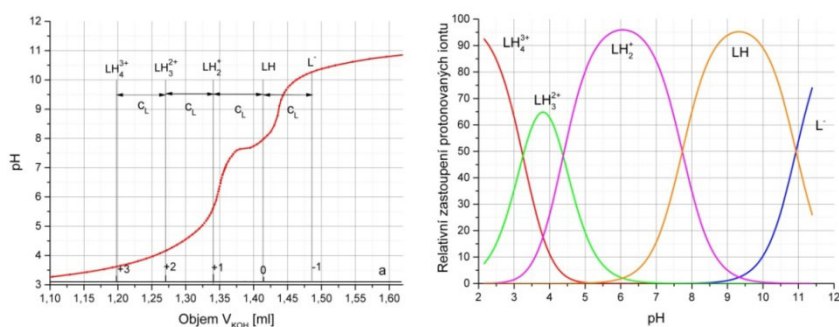
Výsledky a diskuze

Na obrázku 1. je 2D-spektrum měření, vpravo nahoře 2D-graf molárních absorpčních koeficientů rozličně protonovaných částic v závislosti na vlnové délce který ukazuje, že spektrum částic LH_4^{3+} a LH_3^{2+} se barevně jenom málo odlišuje a protonace chromoforu LH_3^{2+} na LH_4^{3+} má proto malý vliv na tvar spektra.



Obrázek 1 2D spektra, graf molárních absorpčních koeficientů, distribuční diagram relativního zastoupení rozličně protonovaných částic a 3D pH-absorbanční responzní plocha.

Stejný závěr platí pro protonaci chromoforu LH na LH_2^+ . Protonace chromoforu LH_2^+ na LH_3^{2+} více ovlivňuje chromofor molekuly bosutinibu a projev ve spektru je proto značný. Pro chemika důležitým výsledkem interpretace pH-absorbanční responzní plochy ve studiu protonačních rovnováh bosutinibu je především distribuční diagram relativního zastoupení rozličně protonovaných částic v závislosti na pH. Na obrázku 2 je znázorněno grafické vyjádření výsledků získaných regresivní analýzou. Potenciometrická titrační křivka směsi HCl a léčiva bosutinibu v 3% metanolu titrované roztokem KOH při 25 °C. Distribuční diagram, který vzájemně reprezentuje všechny protonované částice. Průniky obou křivek charakterizují hodnoty disociačních konstant na ose pH.



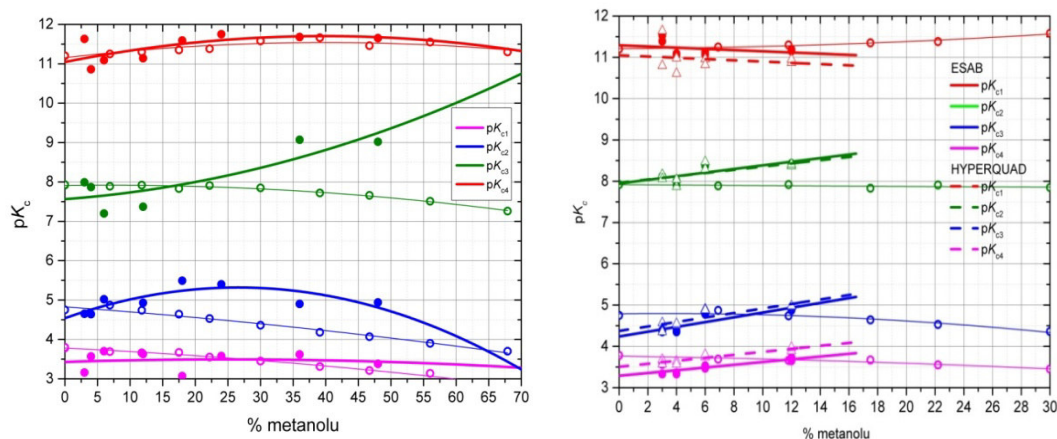
Obrázek 2 (a) Potenciometrická titrační křivka bosutinibu v 3% metanolu, (b) distribuční diagram rozličně protonovaných částic v závislosti na pH.

Závěr

Byla popsána kombinace potenciometrické a spektrofotometrické metody u titračního stanovení profilu acidobazických vlastností komplexního multiprotického cytostatika bosutinibu se čtyřmi protonovanými místy v molekule. Ve spektrofotometrické pH-titraci byly koncentrační disociační konstanty bosutinibu stanoveny regresní analýzou absorpční responsní plochy programy SPECFIT a SQUAD při 25°C a 37°C při iontové síle 0,1M KCl. Koncentrační disociační konstanty bosutinibu byly stanoveny rovněž regresní analýzou potenciometrické titrační křivky programy ESAB2M a HYPERQUAD při 25°C bez nastavené iontové síly. Mírou věrohodnosti vyčíslených odhadů protonačních konstant bosutinibu byla statistická analýza reziduí. Všechny nalezené hodnoty koncentračních disociačních konstant byly extrapolovány na nulový obsah metanolu. Přehled dosažených výsledků po extrapolaci na nulový obsah metanolu je shrnut v tabulce 1.

Tabulka 1 Přehled extrapolovaných odhadů koncentračních disociačních konstant bosutinibu na nulový obsah metanolu programy SPECFIT (spektrofotometrie) a ESAB a HYPERQUAD (potenciometrie)

	25°C	37°C	Box et al. [2]
pK_{c1}	11,04(02)	10,92(06)	11,20
pK_{c2}	7,56(02)	7,33(08)	7,92
pK_{c3}	4,54(06)	5,03(05)	4,75
pK_{c4}	3,43(08)	3,44(06)	3,78
	25°C (ESAB)	25°C (HYPERQUAD)	Box et al. [2]
pK_{c1}	11,05(03)	11,29(05)	11,20
pK_{c2}	7,97(02)	7,95(07)	7,92
pK_{c3}	4,37(02)	4,24(10)	4,75
pK_{c4}	3,51(02)	3,29(12)	3,78



Obrázek 3. Vlevo: Graf extrapolace na nulový obsah metanolu pro spektrofotometrickou pH-titraci. Vpravo: Graf extrapolace na nulový obsah metanolu pro potenciometrickou pH-titraci.

Prázdné kolečka jsou hodnoty nalezené v literatuře Box et al. a plná kolečka jsou hodnoty nalezené v této práci

Poděkování

Děkuji vedoucímu práce prof. RNDr. Milanu Melounovi, DrSc. za jeho odborné vedení, řadu cenných námětů, rad a připomínek, které mi byly důležitou pomocí při tvorbě této práce.

Literatura

- [1.] 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.* Spectrochimica acta, Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, 2012, roč. 86, s. 305-314.
- [2.] BOX, K. J., DONKOR, R. E., JUPP, P. A., LEADER, I. P., TREW, D. F., TURNER, C. H. *The chemistry of multi-protic drugs Part 1: a potentiometric, multi-wavelength UV and NMR pH titrimetric study of the micro-speciation of SKI-606.* Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2008, roč. 47, s. 303-311.
- [3.] BENET, L. Z., GOYAN, J. E. *Potentiometric determination of dissociation constants,* Journal of pharmaceutical sciences, 1967, roč. 56, s. 665-680.
- [4.] TAKÁCS-NOVÁK, K., BOX, K. J., AVDEEF, A. *Potentiometric pKa determination of water-insoluble compounds: validation study in methanol/water mixtures.* International Journal of Pharmaceutics, 1997, roč. 151, s. 235-248.
- [5.] ALLEN, R.I., BOX, K. J., COMER, J. E., PEAKE, C., TAM, K. Y. *Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants of ionizable drugs.* Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1998, roč. 17, s. 699-712.
- [6.] BABIC, S., HORVAT, A. J. M., PAVLOVIC, D. M., MACAN-KASTELAN, M. *Determination of pK(a) values of active pharmaceutical ingredients.* Trac-Trends in Analytical Chemistry, 1997, roč.26, s. 1043-1061.
- [7.] TAM, K. Y., HEDLEY, M., PATTERSON, W. *Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants Part IV. Water-insoluble pyridine derivatives.* Talanta, 1990, roč. 49, s. 539-546.

Abstract

A combination of potentiometric and spectrophotometric indication at pH-titration multiprotic cytostatics Bosutinib for determination of dissociation constants were performed in mixed aqueous-methanolic medium. Cytostatic Bosutinib treats patients with positive chronic myeloid leukemia. The medicament exhibits four protonatable sites in the pH range 2 to 11, where two of them are well separated, as they exhibit $\Delta \log K > 3$, while the other two are near dissociation constants. Dissociation constants by nonlinear regression programs SPECFIT/32 and SQUAD(84) were estimated, which after extrapolation to zero content of methanol led to following values for 25°C $pK_{c1} = 11.04(05)$, $pK_{c2} = 7.56(07)$, $pK_{c3} = 4.54(10)$ and $pK_{c4} = 3.43(12)$, and at 37°C $pK_{c1} = 10.92(06)$, $pK_{c2} = 7.33(05)$, $pK_{c3} = 5.03(08)$ and $pK_{c4} = 3.44(06)$. From the data of the potentiometric pH-titration at 25°C using the programs and ESAB and HYPERQUAD four concentration dissociation constants were calculated and after extrapolation to zero content of methanol they lead to the following values with ESAB $pK_{c1} = 11.05(03)$, $pK_{c2} = 7.97(02)$, $pK_{c3} = 4.37(02)$ and $pK_{c4} = 3.51(02)$ and with HYPERQUAD: $pK_{c1} = 11.29(05)$, $pK_{c2} = 7.95(07)$, $pK_{c3} = 4.24(10)$ and $pK_{c4} = 3.29(12)$.