

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

STUDIUM FLUORESCENČNÍCH SPEKTER BENZIMIDAZOLŮ

Diplomová práce

STUDY OF FLUORESCENCE SPECTRA OF BENZIMIDAZOLES

Diploma thesis

Vedoucí diplomové práce: Ing. Vladimír Kubíček, CSc

Hradec Králové, 2012

Jakub Filípek

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Jakub Filípek

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval Ing. Vladimíru Kubičkovi, CSc. za vedení, podporu, cenné rady a přátelský přístup při sestavování této práce.

Dále děkuji celé katedře za možnost využití jejich podmínek ke splnění diplomové práce.

OBSAH

1. Abstrakt	5
2. Abstract	6
3. Zadání diplomové práce	7
4. Teoretická část	8
4.1. ATC-klasifikace benzimidazolů	8
4.2. Anthelmintika	10
4.3. Benzimidazoly	11
4.3.1. Mechanismus účinku	12
4.3.2. Důležité fyzikální a chemické vlastnosti	12
4.3.3. Způsob podání a toxicita	13
4.3.4. Struktura a zástupci benzimidazolů	14
4.4. Spektrofotometrie v UV-VIS oblasti	18
4.5. Absorpční spektrofotometr	20
4.6. Molekulová luminiscenční spektra	22
4.7. Efekt molekulové struktury organických látek na luminiscenci	23
4.8. Základní vztahy	24
4.9. Instrumentace a spektrofluorimetr a jeho schéma	25
5. Experimentální část	27
5.1. Použité přístroje	27
5.2. Použité chemikálie	27
5.3. Postup a příprava 26 zásobních roztoků	28
5.4. Příprava borátového pufru	30
5.5. Příprava fosfátového pufru	30
5.6. Vlastní měření absorpčních a fluorescenčních spekter benzimidazolů	30
6. Výsledky 1. úlohy	31
7. Výsledky 2. úlohy	49
8. Diskuze	73
9. Závěr	76
10. Literatura	77

1. Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Jakub Filípek

Konzultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Název diplomové práce: Studium fluorescenčních spekter benzimidazolů

V práci jsou studována fluorescenční spektra řady vybraných benzimidazolů v roztocích. Jako rozpouštědla byly použity dvě organické látky (acetonitril a methanol) buď samotné nebo ve směsi s vodou, s fosfátovým pufrem (pH = 7,00) nebo s borátovým pufrem (pH = 9,95). Tato rozpouštědla představují běžně používané mobilní fáze v HPLC. Celkem bylo studováno 13 benzimidazolů.

Nejprve byla naměřena absorpční spektra a absorpční maxima byla posléze použita jako excitační vlnové délky při měření emisních spekter. S ohledem na předchozí výsledky byla zvláštní pozornost věnována oxfendazolu a fenbendazolu, u jejichž roztoků byl měřen Ramanův (Stokesův) posun, aby bylo možné zjistit, zda tyto benzimidazoly v uvedených prostředích fluoreskují, a zaznamenat příslušná spektrální maxima.

Získané výsledky jsou vodítkem při volbě detekčních podmínek u HPLC analýz benzimidazolů s fluorescenční detekcí. Mohly by se rovněž stát základem knihovny absorpčních a fluorescenčních spekter studovaných látek.

2. Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of biophysics and physical chemistry

Candidate: Jakub Filípek

Consultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Title of diploma thesis: Study of fluorescence spectra of benzimidazoles

In this diploma thesis fluorescence spectra of selected benzimidazoles are studied in solutions. The solutions were prepared using two organic compounds (acetonitrile and methanol) either alone or in combination with water or phosphate buffer (pH = 7.00) or borate buffer (pH = 9.95).

These solvents are commonly used in HPLC mobile phase. Thirteen benzimidazoles were studied all together. First the absorption spectra were measured and the obtained the absorption maxima were used as the excitation wavelengths for the emission spectra measurements. With regard of the previous results a particular attention was paid to oxfendazole and fenbendazole. In their solutions Raman (Stokes) shifts were found in order to determine whether these benzimidazoles can give fluorescence in the studied environments and to find the relevant spectral maxima.

The obtained results are a guide for the detection conditions during HPLC analysis of benzimidazoles with fluorescence detection. They could also become a basis for a library of absorption and fluorescence spectra of the studied compounds.

3. Zadání diplomové práce

Tato práce se zabývá spektrálními vlastnostmi vybraných benzimidazolů. Cílem této práce bylo naměřit a porovnat absorpční a fluorescenční spektra třinácti benzimidazolů v různých prostředích, která jsou běžně používána v roli mobilních fází v HPLC, z těchto spekter odečíst příslušná maxima a doporučit vhodné detekční podmínky pro fluorescenční detekci studovaných benzimidazolů při HPLC.

4. Teoretická část

4.1. ATC-klasifikace benzimidazolů

Anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace léčiv (ATC-klasifikace) je mezinárodní systém třídění léčiv, který spravuje spolupracující centrum Světové zdravotnické organizace pro metodologii statistiky léčiv. V ATC-klasifikaci jsou účinné látky rozděleny do různých skupin podle účinků na jednotlivé orgány nebo jejich soustavy. Na základě toho je jim přidělen sedmimístný kód a jsou rozříděny do skupin na pěti různých úrovních. První úroveň se značí jedním písmenem, odpovídajícím příslušné anatomické soustavě, na kterou daná léčiva působí. Na této úrovni je 14 hlavních skupin. V našem případě spadají benzimidazoly do jedné z nich pod písmeno P (antiparazitika). [11]

- P jedno písmeno - anatomická hlavní skupina
- 02 dvě číslice - hlavní terapeutická skupina
- C jedno písmeno - terapeuticko-farmakologická podskupina
- A jedno písmeno - chemicko-terapeuticko-farmakologická podskupina
- 01 dvě číslice - chemická účinná látka

P: Antiparazitika, insekticidy a repelenty

P02: Anthelmintika

P02BA: Deriváty chinolinu a příbuzné látky

P02BB: Organofosfátové sloučeniny

P02BX: Jiná antitreumatodika

P02CA: Benzimidazolové deriváty

P02CA01: Mebendazol

P02CA02: Thiabendazol

P02CA03: Albendazol

P02CA04: Cyklobendazol

P02CA05: Flubendazol

P02CA06: Fenbendazol

P02CA51: Mebendazol, kombinace

P02CB: Piperazin a deriváty

P02CC: Deriváty tetrahydropyrimidinu

P02CE: Deriváty imidazothiazolu

P02CF: Avermektiny

P02CX: Jiná antinematodika

P02DA: Deriváty kyseliny salicylové

4.2. Anthelmintika

Jsou to látky používané v léčbě helmintóz. Mezi helminty patří tasemnice, motolice a hlístice. Tato léčiva rozdělujeme do tří skupin anticestodika (působí proti tasemnicím), antinematodika (působí proti hlísticím), antitrematodika (působí proti motolicím), podle toho na jakou třídu působí.

Napadnou-li parazité člověka, mohou vyvolat různá onemocnění. Například enterobiózu způsobenou roupem dětským (*Enterobius vermicularis*), askariózu způsobenou škrkavkou dětskou (*Ascaris lumbricoides*), strongylózu, filariózu a trichinelózu. Hlístice se objevují hlavně u zvířat, které napadají různé orgány. U dospělců jsou lokalizovány hlavně v tenkém střevě, plicích, ostatních tkáních a orgánech. U přežvýkavců červivost zažívacího ústrojí způsobují vlasovka zaječí, vlasovka králičí a nejnebezpečnější parazit vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*). V dospělosti je vlasovka slézová přisátá na sliznici žaludku, a to ve slezu a tam dochází k závažným změnám na sliznici žaludku, které vedou k poruše trávení. Vlasovky rodu *Trichostrongylus* a hlístice z rodů *Nematodirus* a *Cooperia* parazitují v tenkém střevě. Při invazi dochází k silným průjmům a fyzickému oslabení zvířete. Hlístice z rodu *Capillaria* se vyskytuje u hrabavé pernaté zvěře v trávicím traktu. Dále může zažívací ústrojí napadnout roup kuří, roup králičí a vrtejší. Nebezpečná je červivost plic, což je invazní onemocnění dýchacích orgánů způsobené plicivkami. Mezi zástupce patří plicivka zaječí, plicivka kozí, plicivka jelení, plicivka prasečí a plicivka obecná (*Muellerius capillaris*). Muellerióza je onemocnění, které je charakteristické intersticiální pneumonií. Trichinelóza (svalovčitost) je způsobená svalovcem stočeným, který se vyskytuje u masožravců a všežravců včetně člověka. Zvláštním případem jsou vlasovci, kteří napadají srdce a velké cévy. Vektorem této infekce je komár, který přenáší infekční larvy při sání krve. Léčba helmintóz probíhá pomocí benzimidazolů, avermektinů, makrocyclických laktonů, imidazothiazolů a léčiv jiných chemických struktur. Benzimidazoly jsou léčiva s antitrematodní i anticestodní aktivitou, přičemž dominantní je aktivita antinematodní. [6,7,9]

4.3. Benzimidazoly

Benzimidazoly jsou používány od roku 1961. Benzimidazoly jsou léčiva široce používaná na prevenci a léčbu parazitárních infekcí u lidí i zvířat. Jejich výhodou je kompletní adulticidní, larvicidní u některých i ovocidní účinek. Nové studie potvrdily, že se dají využít také při terapii giardiózy. Z benzimidazolů je pro léčbu giardiózy psů registrován fenbendazol (PANACUR pasta).

Thiabendazol (TBZ) byl první benzimidazol, který byl uveden na trh před 50 lety. TBZ byl široce používán pro zvládnání gastrointestinálních hlístic, plicnivek a jako fungicidní prostředek, ale nemá anticestatodní a antitreumatodní účinky. Jeho účinek je poměrně krátkodobý, protože v organismu rychle metabolizuje na 5hydroxythiabendazol (TBZOH) a ve formě konjugátu s kyselinou glukuronovou se vylučuje.

Po jeho zavedení se počet alternativních benzimidazolů nabízejících podobnou aktivitu rozšířil o 5-substituované deriváty benzimidazolu. Přišel na trh parbendazol (PAR), cambendazol (CAM), mebendazol (MBZ) a oxibendazol (OXI). Následně byly zavedeny benzimidazoly vlastnicí sulfidovou a sulfoxidové funkční skupiny a nabízely širší spektrum působení a mnohem lepší účinnost. Prvními takovými byly albendazol (ABZ), fenbendazol (FBZ) a ofendazol (OFZ). Mezi benzimidazoly s účinkem antinematodním, anticestatodním i antitreumatodním patří ABZ, FBZ, febantel. Flubendazol (FLU), OXI a MBZ jsou bez antitreumatodního účinku, ale se zachovaným účinkem anticestatodním a antinematodním. Benzimidazol triklabendazol (TCB) byl později představen jako anthelmintický prostředek k léčbě všech stadií motolic, ale je neúčinný proti hlísticím. Luxbendazol (LUX) je další benzimidazol-sulfid používaný v léčbě zvířat určených k produkci potravin, ale není licencován pro použití v EU. Nízká rozpustnost benzimidazolových sulfidů a sulfoxidů vede k jejich nízké absorpci ze střeva, což dále vede k nízké biologické dostupnosti. Netobimin (NETO) a febantel (FEB) jsou proléčivky. Tato proléčivka mají větší rozpustnost ve vodě. To vede k lepšímu vstřebávání a vyšší biologické dostupnosti. V savčím organismu se postupně uzavírá benzimidazolový kruh, a tak je FEB metabolizován na několik metabolitů včetně FBZ a OFZ. Podobně benomyl (BEN) and thiophanát-methyl (TM) jsou prekurzory pro karbendazim (MBC) a našly široké uplatnění jako antifungicidní prostředky.

[3]

4.3.1. Mechanismus účinku

Existuje množství mechanismů účinků, které byly zjištěny u léčiv typu benzimidazolů. Bylo prokázáno, že blokují vychytávání glukózy v larválních a dospělých stádiích života parazitů tím, že vyčerpávají jejich zásobu glykogenu a snižují tvorbu ATP. Mechanismus účinku benzimidazolů spočívá v ireverzibilní inhibici absorpce glukózy a tím narušují její transport u parazita. [6]

Účinek je také založen na schopnosti specifické vazby k mikrotubulární proteinové podjednotce tubulinu. Změnou tvaru tubulinu nedochází k prodlužování mikrotubulů polymerací.

Mikrotubulinové struktury, které se nacházejí v celé buňce parazita, zprostředkovávají životně důležité funkce, jako je buněčné dělení, pohyb a transport. Úbytek cytoplazmatických mikrotubulů vede k poškození buněčné membrány, což se projevuje supresí trávení a absorpce živin s následnou redukcí glykogenu. Výsledkem je rozvrat energetického metabolismu a následná pomalá destrukce parazita. [6]

Později vědci ukázali, že některé benzimidazoly inhibují enzym fumaratreduktázu parazita, čímž bylo zamezeno vzniku fumarátu z kyseliny jantarové. [3]

4.3.2. Důležité fyzikální a chemické vlastnosti

Benzimidazoly jsou nejširší chemickou skupinou látek používaných k léčbě endoparazitických onemocnění u domácích zvířat. Tato skupina zahrnuje analogy thiabendazolu a benzimidazolkarbamáty. Nahrazením různých postranních řetězců na základním benzimidazolovém jádře vytváří jednotlivé z této rozsáhlé skupiny léčiv. Novější benzimidazolkarbamáty se vyznačují originálními substituenty na benzimidazolovém jádře a nahrazují thiazolový pětičlenný kruh methylkarbamátem.

Tyto změny vedou ke vzniku nové generace benzimidazolů s mnohem nižší rychlostí vylučování, vyšší účinností a širší aktivitou spektra. Všechny benzimidazoly jsou nerozpustné, nebo slabě rozpustné ve vodě. Je známo, že benzimidazoly obsahují imidazolový kruh, který má kyselý i zásaditý atom dusíku. Za vhodných podmínek může být molekula protonizována ($pK_a \sim 5-6$) nebo deprotonizována ($pK_a \sim 12$), proto mají amfotermní charakter. [3]

4.3.3. Způsob podání a toxicita

Benzimidazoly jsou považovány za širokospektrální endoparazitika s nízkou toxicitou, nízkým dávkováním a širokou účinností proti střevním parazitům. Jejich chemická povaha umožňuje jejich použití v celé řadě lékových forem. Hlavně se vyskytují v tabletách, suspenzích, pastách, peletách a prášku. Benzimidazoly lze bezpečně kombinovat s jinými anthelmintiky např. kombinovaný preparát raxofanidu a mebendazolu zajišťuje širokospektré působení na nejzávažnější helmintózy u spárkaté zvěře. Jedná se o velmi bezpečná anthelmintika. Benzimidazoly působí proti dospělčům škrkavek v tenkém střevě, dále mají efekt proti dospělčům malých a velkých strongylidů a roupům v tlustém střevě. Larvicidní účinek na migrující larvy malých i velkých strongylidů nastupuje po opakovaném podání vyšších dávek. [3,6,7]

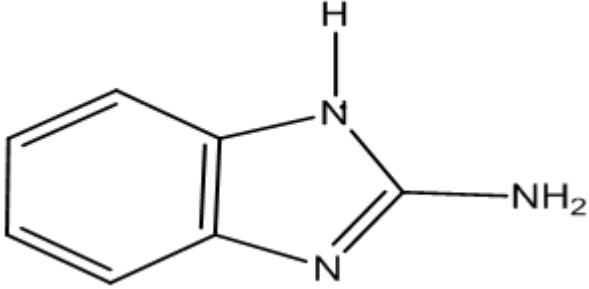
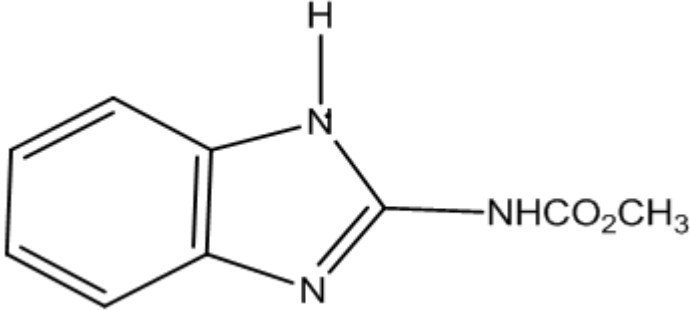
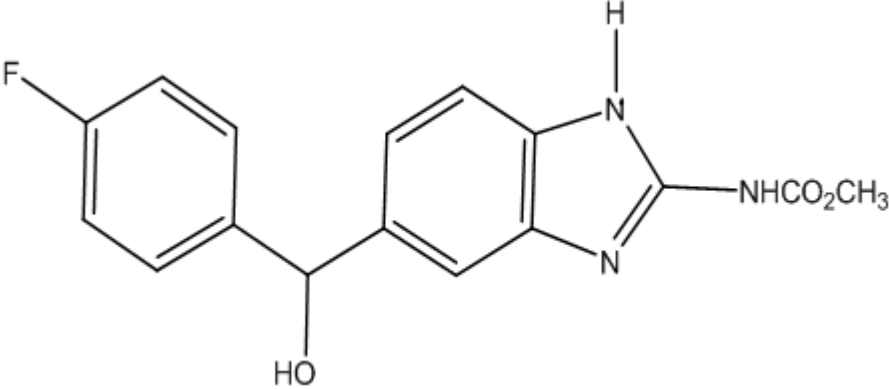
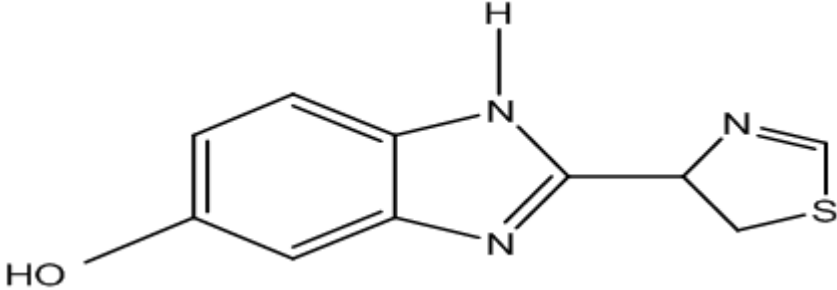
Benzimidazoly se obvykle podávají perorálně nebo intraruminalně v různých typech lékových forem. Biologická dostupnost benzimidazolů velmi závisí na způsobu aplikace a příslušném léčivu. Po podání intraruminálních dávek je lepší biologická dostupnost léčivé látky ve srovnání s perorální aplikací. Benzimidazoly jsou považovány za bezpečné až do 20 až 30-násobku doporučené dávky. Hlavní toxický účinek sloučenin benzimidazolů zahrnuje jejich podezřele teratogenní účinek, který byl poprvé zaznamenán u mebendazolu (MBZ). Vrozené vady vyplývající z podání benzimidazolových anthelmintik během těhotenství bahnic byly pozorovány při podání CAM, OFZ a ABZ, ale u FEB, FBZ, MBZ a OXI se nezdá být vyvinutý teratogenní účinek při podání ovcím na počátku těhotenství. Obecně platí, že pokud tyto léky je třeba použít na začátku březosti, musí být podány v opodstatněném důvodu a v nejnižší doporučené dávce. [3]

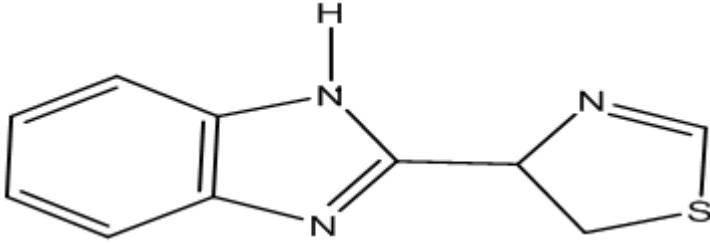
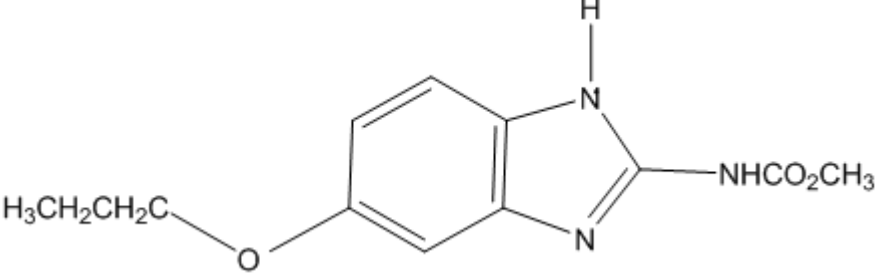
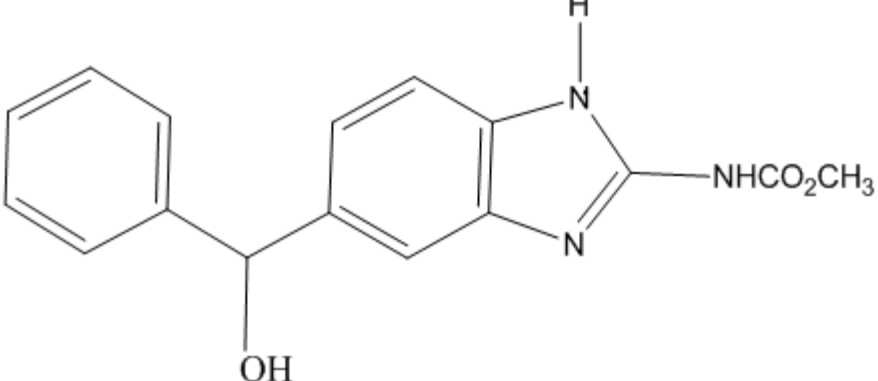
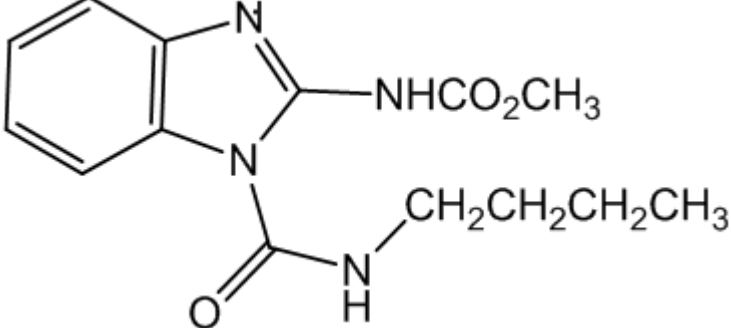
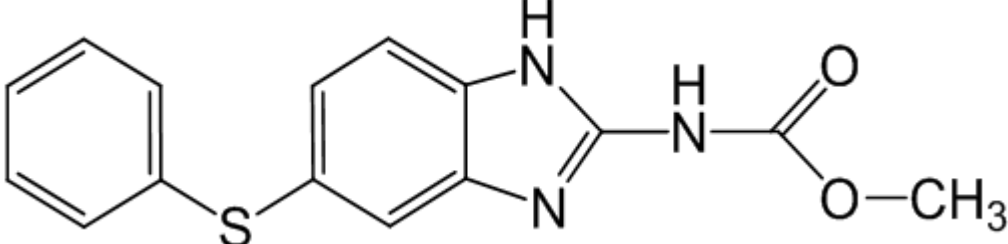
4.3.4. Struktura látek řady benzimidazolů

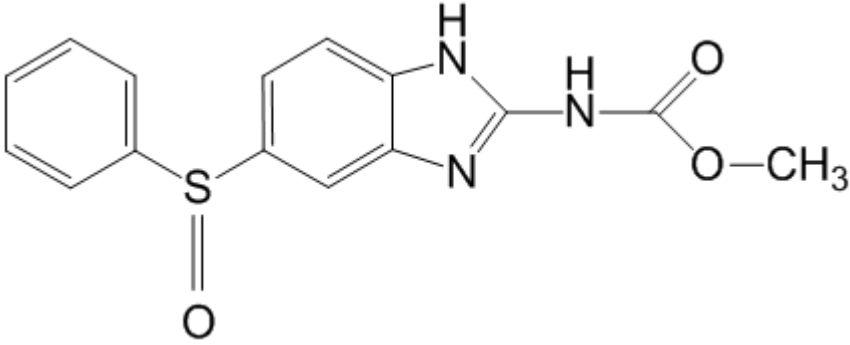
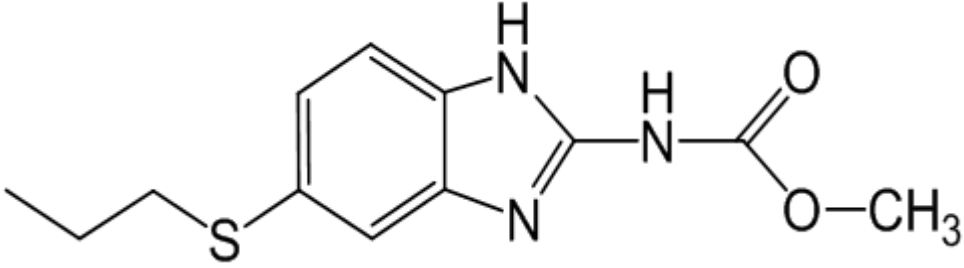
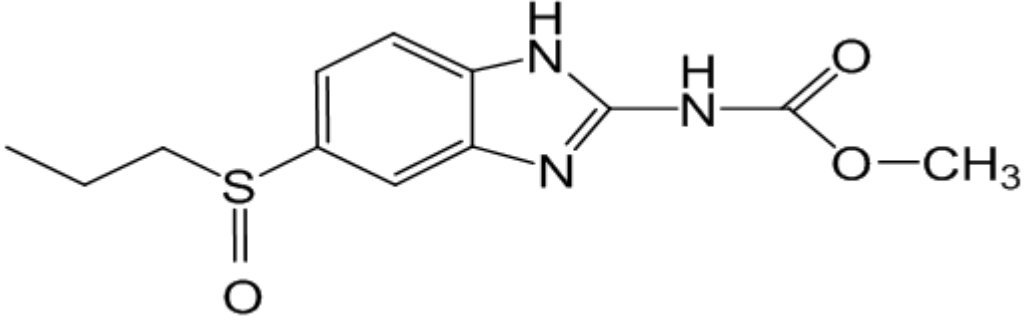
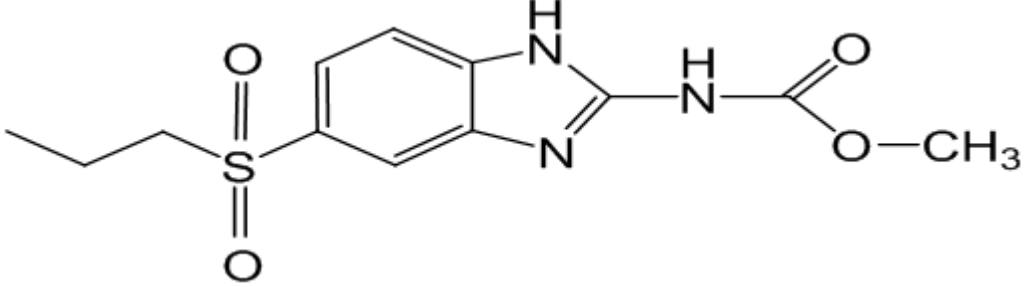
Tabulka 1: Názvy a zkratky studovaných benzimidazolů

zkratka	dodala firma	chemický název dle IUPAC	název
2-AB	Aldrich	2-(amino)-1H-benzimidazol	2-aminobenzimidazol
MBC	Riedel- de Haën	methyl- <i>N</i> -(1H-benzimidazol-2-yl) karbamát	karbendazim
FLU-R	Jansen Pharmaceutica	methyl- <i>N</i> -[(5-(4-fluorbenzoyl)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)] karbamát	redukovaný flubendazol
TBZ-OH	Fluka	5-hydroxy-2-(1,3-thiazol-4-yl)-1H-benzimidazol	redukovaný thiabendazol
TBZ	Riedel- de Haën	2-(1,3-thiazol-4-yl)-1H-benzimidazol	thiabendazol
OXI	Sigma	methyl- <i>N</i> -[(5-(propoxy)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)] karbamát	oxibendazol
MBZ-R	Jansen Pharmaceutica	methyl- <i>N</i> -[(5-benzoyl)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl] karbamát	redukovaný mebendazol
BEN	Aldrich	methyl-[(1-butylkarbamoyl)-benzimidazol-2-yl] karbamát	benomyl
FBZ	Sigma	methyl- <i>N</i> -[(5-(fenylsulfanyl)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)] karbamát	fenbendazol
OFZ	Toronto Research Chemical	methyl- <i>N</i> -[(5-(fenylsulfinyl)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)] karbamát	oxfendazol
ABZ	Sigma	methyl- <i>N</i> -[(5-(propylsulfanyl)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)] karbamát	albendazol
ABZSO	Toronto Research Chemical	methyl- <i>N</i> -[(5-(propylsulfinyl)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)] karbamát	albendazolsulfoxid
ABZSO2	Toronto Research Chemical	methyl- <i>N</i> -[(5-(propylsulfonyl)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)] karbamát	alebendazolsulfon

Tabulka 2: Strukturní vzorce studovaných benzimidazolů

zkratka	Strukturní vzorec
2-AB	
MBC	
FLU-R	
TBZ-OH	

TBZ	
OXI	
MBZ-R	
BEN	
FBZ	

OFZ	
ABZ	
ABZSO	
ABZSO2	

4.4. Spektrofotometrie v UV-VIS oblasti

Molekuly mají schopnost pohlcovat elektromagnetické záření. Příjem kvanta elektromagnetického záření přivede molekulu do vyššího (tzv. excitovaného) energetického stavu. Elektrony mohou nabývat pouze určitých diskrétních hodnot energie. Pohlcením fotonů záření z UV-VIS oblasti spektra přechází molekula do excitovaného stavu. Její setrvání v energeticky bohatším stavu je krátké a molekula přechází zářivými i nezářivými deexcitačními přechody zpět do základního stavu. Absorbovaná energie je rovna rozdílu energie stavu excitovaného E2 a energie stavu základního E1. Mezi energetickými hladinami E2 a E1 obou kvantových stavů platí vztah podle Planckovy rovnice,

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu = hc / \lambda \quad (1)$$

kde c je rychlost světla, ν je frekvence záření, λ je vlnová délka záření a h je Planckova konstanta $6,63 \times 10^{-34}$ Js. Přičemž za normálních podmínek se molekula nachází v základním elektronovém stavu E1 a je dána součtem základní elektronové Ee, vibrační Ev a rotační Er energie.

$$E_1 = E_e + E_v + E_r \quad (E_e > E_v > E_r) \quad (2)$$

Jak je vidět, vzdálenost těchto dvou energetických hladin, mezi kterými molekula přechází, přímo určuje vlnovou délku elektromagnetického záření, které molekula pohlcuje. Energeticky nejnáročnější jsou přechody mezi elektronovými energetickými přechody, které zapříčiňují absorpci ultrafialového (190 až 380 nm) a viditelného záření (380 až 770 nm). Látky, které absorbují viditelné světlo, jsou barevné. Absorpci záření lze měřit na přístrojích, které nazýváme absorpční spektrofotometry. UV-VIS spektroskopii pozorujeme, jak mnoho záření dané vlnové délky, respektive kolik energie bylo pohlceno studovaným systémem. [1,2,5]

Jednou z možností kvantitativního popisu absorpce záření je veličina transmitance T, což je poměr mezi tokem záření prošlým kyvetou s měřeným vzorkem Φ a zářením prošlým srovnávací kyvetou s čistým rozpouštědlem Φ_0 . Transmitance se často uvádí v procentech prošlého záření. [1,2,5]

$$T = \Phi / \Phi_0 \quad (3)$$

Absorbance A se vyjadřuje jako záporný dekadický logaritmus transmitance.

$$A = -\log T \quad (4)$$

Při studiu látek pomocí UV-VIS spektroskopie získáváme elektronová absorpční spektra, která popisují závislost absorbance na vlnové délce záření. Vztah mezi absorbancí měřeného roztoku (A) a koncentrací absorbující látky (c) vyjadřuje Lambertův-Beerův zákon,

$$A = cl\varepsilon \quad (5)$$

kde l je tloušťka absorbující vrstvy a ε je molární absorpční koeficient. Tato závislost absorbance na koncentraci platí pro monochromatické (jednobarevné) záření při nízkých koncentracích (řádově do $10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$). Při vyšších koncentracích můžeme pozorovat jisté odchylky od Lambertova-Beerova zákona. [1]

4.5. Absorpční spektrofotometr

Podle konstrukce rozdělujeme spektrofotometry na jednopaprskové a dvoupaprskové. U jednopaprskových spektrofotometrů jeden svazek světla prochází nejdříve srovnávacím a pak měřeným vzorkem. U dvoupaprskových spektrofotometrů jeden svazek světla prochází měřeným vzorkem a druhý srovnávacím vzorkem (blankem). Spektrofotometr vyhodnocuje podíl intenzity signálu měrného svazku po průchodu vzorkem a intenzity signálu téhož svazku po průchodu blankem. Výsledný podíl je přímo brán jako hodnota propustnosti vzorku. Absorpční spektrofotometr je tvořen čtyřmi základními částmi. Skládá se ze zdroje záření, monochromátoru, absorpčního prostředí a detekčního systému. [12]

Zdroj záření

Zdrojem spojitého elektromagnetického záření pro viditelnou oblast je wolframová lampa, pro UV oblast deuteriová výbojka. Jinou možností je použití xenonové výbojky, která pokrývá obě oblasti.

Monochromátor

Monochromátor je tvořen vstupní a výstupní štěrbinou, rozkladným prvkem a zrcadlovou nebo čočkovou soustavou. Rozkladným prvkem může být hranol nebo optická mřížka. V současnosti se u kvalitních spektrofotometrů používá výhradně optická mřížka. Natáčením rozkladného prvku se postupně zobrazují jednotlivé monochromatické obrazy vstupní štěrbinu na štěrbinu výstupní.

Absorpční prostředí

Absorpční prostředí tvoří kyveta s měrným a srovnávacím roztokem. Materiál kyvet se řídí měřenou oblastí spektra. Pro viditelnou oblast jsou okénka kyvety z optického skla. Pro měření v UV oblasti je nutné použít kyvety s okénky z křemenného skla.

Detekční systém

Detekční systém je složen z detektoru záření a elektronického zařízení na zpracování jeho odezvy. Detektor převádí zářivý tok na elektrický signál. Pro detekci záření se používají fotonásobiče nebo diodové pole. U detektoru s diodovým polem je světlo rozptylováno mřížkou na pole mnoha světlocitlivých diod a vzniká napětí, které je převedeno na digitální signál. Tyto detektory umožňují měřit současně celé spektrum, např. v rozsahu 200 až 700 nm. Svazek polychromatického záření vycházející ze zdroje dopadá na vstupní štěrbinu monochromátoru. Po rozkladu na optické mřížce nebo hranolu vychází z výstupní štěrbinou svazek přibližně monochromatického záření, které je charakterizováno intervalem vlnových délek, které projdou výstupní štěrbinou. Po průchodu absorpčním prostředím dopadá monochromatické záření na fotoelektrický prvek a vzniklý fotoproud je veden na analogový nebo digitální výstup. [12]

Spektrofotometrii v ultrafialové a viditelné oblasti lze tedy použít v kvalitativní organické analýze, kdy absorpce v této oblasti je důkazem konjugovaného systému dvojných vazeb nebo přítomnosti některých chromoforních skupin. Hlavní těžiště je ovšem v kvantitativní analýze, kdy z naměřené absorbance můžeme přímo zjistit rovnovážnou koncentraci určité složky. [10]

Spektrofotometr s reverzní optikou (Agilent 8453) se liší od klasického spektrofotometru uspořádáním jednotlivých částí. Světlo ze zdroje prochází nejdříve kyvetou se vzorkem a až v další kryté části je rozloženo optickou mřížkou a nasměrováno na diodové pole. I když okolní světlo může projít velmi úzkou štěrbinou, kterou prochází polychromatické světlo, nemůže ovlivnit dopad na detektor. Kyveta se vzorkem v tomto spektrofotometru nemusí být uzavřena krytem.

4.6. Molekulová luminiscenční spektra

Informaci o látce, která je schopná emitovat luminiscenční záření, můžeme získat z jejich excitačních a emisních spekter. Luminiscence je emise záření, které spontánně nastává při přechodu molekuly z excitovaného stavu do základního. Luminiscence se podle délky dosvitu mezi absorpcí a emisí záření dělí na fluorescenci nebo fosforescenci. Má-li dojít k luminiscenci, musí molekula absorbovat foton vhodné vlnové délky a přejít tak do elektronově excitovaného singletového stavu S_1 . Při měření fluorescence je excitační foton poskytován excitační částí spektrofluorimetru, tedy zdrojem světla a excitačním monochromátorem.

V případě, že je stav S_1 relativně stabilní, mohou excitované molekuly přecházet z vyšších vibračních hladin nezářivým přechodem na základní vibrační hladinu excitovaného stavu S_1 . Následně může dojít k fotonové emisi v UV-VIS oblasti spektra, kdy se elektrony vrací do různých vibračních podhladin stavu S_0 . Emisní spektrum je spojeno s přechodem molekuly ze stavu S_1 na základní hladinu S_0 . Emitované záření je ve spektrofluorimetru zpracováno emisním monochromátorem. Emisní spektrum se pak zaznamenává pomocí detekčního zařízení jako závislost intenzity luminiscence na emisní vlnové délce při konstantní excitační vlnové délce. Nejintenzivnější emise bude v případě, když ji vyvoláme excitací vlnovou délkou v oblasti maxima excitačního spektra. Jelikož se energie excitovaných elektronů zčásti přemění vibrační relaxací, posouvá se emisní spektrum k vyšším vlnovým délkám oproti excitačním vlnovým délkám. Ve většině případů odpovídá tvar emisního spektra zrcadlovému obrazu excitačního spektra. Rozdíl mezi maximem vlnové délky excitačního a emisního spektra se nazývá Stokesův posun. Fosforescenční emisní spektra jsou pozorována při přechodu z tripletového stavu T_1 do stavu S_0 a jsou posunuta k delším vlnovým délkám z důvodu menší energetické rozdílnosti hladin S_0 a T_1 . [1,2,4,5]

4.7. Efekt molekulové struktury organických látek na luminiscenci

Podmínkou pro vznik fotoluminiscence je odpovídající molekulová struktura látky, která je schopná absorbovat záření v ultrafialové (UV) nebo ve viditelné (VIS) oblasti. Čím více je látka schopná toto záření absorbovat, tím intenzivnější můžeme pozorovat fotoluminiscenci. Fotoluminiscenci organických látek je možné předpokládat u látek s planární, rigidní strukturou a rozsáhlým systémem konjugovaných dvojných vazeb. Skupiny v molekule odpovědné za absorpci a emisi se nazývají fluorofory. U některých látek se ukazuje i výrazný vliv pH roztoku na jejich fluorescenci. Totiž se změnou náboje iontu při disociaci dochází ke změně ve struktuře molekuly a tím k vymizení fluorescence. Změny teploty ovlivňují viskozitu rozpouštědla a tím i počet srážek molekul fluoroforu s molekulami rozpouštědla. Relativně malé změny hodnot pH někdy radikálně ovlivňují intenzitu i spektrální charakteristiky fluorescence. Absorpci primárního záření z UV-VIS oblasti dochází k přechodu vazebných či nevazebných elektronů v molekule do antivazebných molekulových orbitalů. Nejméně energeticky náročné a nejčastější přechody elektronů u látek schopných fotoluminiscence jsou z vazebného orbitalu π nebo nevazebného orbitalu n do antivazebného orbitalu π^* . U molekul s dvojnými a trojnými vazbami nacházíme přechod $\pi - \pi^*$. Čím je větší počet konjugovaných dvojných vazeb, tím je menší energetická náročnost přechodu mezi orbitaly a fotoluminiscenční spektra se posouvají k vyšším vlnovým délkám. Absorpční maximum vlnové délky dvojných vazeb je asi 170 nm a konjugace pěti dvojnými vazbami zapříčiní posun maxima vlnové délky k 340 nm. Elektronový přechod $n - \pi^*$ můžeme pozorovat u molekuly, která má dvojnou vazbu i atom nesoucí volný elektronový pár. Energie $n - \pi^*$ je menší než energie $\pi - \pi^*$ v téže molekule na téže funkční skupině. Jiné elektronové přechody vyžadují větší množství energie a fotoluminiscenci u nich převážně nepozorujeme. Jde o přechod $\sigma - \sigma^*$ pro jednoduché vazby díky orbitalům od jednoduchých vazeb (oblast absorpce při vlnových délkách menší než 200 nm) a přechod $n - \sigma^*$, který se objevuje u látek s jednoduchými vazbami, které tedy mají orbitaly s nevazebnými elektrony a heteroatomy nesoucí elektronový pár. Do oblasti absorpce pod 200 nm patří některá vhodná rozpouštědla pro běžnou UV-VIS spektrometrii, jako je například methanol CH_3OH ($\lambda_{\text{max}} = 184$ nm). Molekuly léčiv vykazují různá spektra v závislosti na složitosti struktury. [1,2,4,5]

4.8. Základní vztahy

Poměr emitované (E_{emit}) a absorbované (E_{abs}) energie v systému se označuje jako energetický výtěžek fotoluminiscence (φ_e) a je měřítkem pro hodnocení intenzity fotoluminiscence.

$$\varphi_e = E_{\text{emit}}/E_{\text{abs}} = h\nu_{\text{emit}}/h\nu_{\text{excit}} \quad (6)$$

Dalším parametrem pro hodnocení intenzity fotoluminiscence je kvantový výtěžek φ_F , který se rovná poměru počtu vyzářených kvant (N_{emit}) k celkovému počtu kvant absorbovaných soustavou (N_{abs}).

$$\varphi_F = N_{\text{emit}}/N_{\text{abs}} \quad (7)$$

Energetický výtěžek je roven kvantovému výtěžku, který je vynásoben poměrem absorbované (λ_{abs}) a emitované (λ_{emit}) vlnové délky. Energetický výtěžek roste s vlnovou délkou budícího záření, kvantový výtěžek do určité míry hodnoty vlnové délky budícího záření na její vlnové délce nezávisí.

$$\varphi_e = \lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{emit}} \times \varphi_F \quad (8)$$

Pokud je splněn předpoklad, že absorbuje i emituje jen jeden druh molekul, platí přímo úměrná závislost fluorescenčního zářivého toku (Φ_F) na absorbovaném zářivém toku (Φ_{abs}),

$$\Phi_F = k \times \Phi_{\text{abs}} \quad (9)$$

absorbovaný zářivý tok je rozdíl mezi tokem vstupujícího absorbovaného záření a tokem vystupujícím.

$$\Phi_{\text{abs}} = \Phi_{\text{vstup}} - \Phi_{\text{vystup}} \quad (10)$$

Lambertův-Beerův zákon popisuje vztah mezi těmito dvěma toky.

$$\Phi_{\text{vystup}} = \Phi_{\text{vstup}} \times 10^{-c \times l \times \varepsilon} \quad (11)$$

kde symbol c značí koncentraci aktivní látky, l značí délku absorbující vrstvy a ε je molární absorpční koeficient charakteristický pro danou látku. Úpravou předešlých vztahů získáme vztahy.

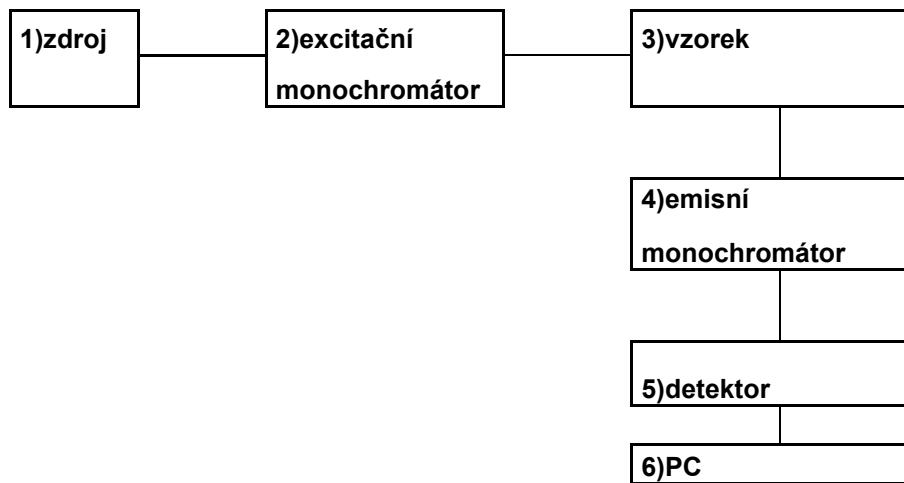
$$\Phi_F = k' \times \Phi_{\text{vstup}} (1 - 10^{-c \times l \times \varepsilon}) \quad (12)$$

$$\Phi_F \sim k' \times \Phi_{\text{vstup}} \times 2,3 \times c \times l \times \varepsilon \quad (13)$$

kde k' je konstanta zahrnující výtěžek fluorescence, která závisí na experimentálních podmínkách. [1]

4.9. Instrumentace a spektrofluorimetr a jeho schéma

Luminiscence molekul je pozorována na spektrofluorimetrech. Spektrofluorimetry jsou složeny ze základních prvků, jakými jsou zdroj excitačního záření, kyveta se vzorkem, detekční systém a pomocná optika pro vedení zářivého toku. Pro výběr vlnové délky jsou umístěny ve spektrofluorimetru před i za vzorkem monochromátory, v případě fluorimetrů slouží k výběru filtry. Monochromátory umožňují spektrofluorimetru zaznamenávat celá luminiscenční spektra. Zdrojem excitačního záření může být kontinuální vysokotlaká xenonová lampa. Jeho budící primární záření je polychromatické, po průchodu přes vstupní štěrbinu dopadá na monochromátor (mřížka, optický hranol) nebo filtr, kde je rozloženo na jednotlivé spektrální složky a výstupní štěrbinou prochází pouze záření o požadované vlnové délce. Při záznamu emisního spektra se mění plynule vlnová délka záření, vycházejícího z emisního monochromátoru, ale na excitačním monochromátoru se nastaví určitá konstantní vlnová délka. Izolované excitační záření dopadne na vzorek umístěný v kyvetě. Vzorek v kyvetě emituje luminiscenční záření, které se dále sleduje pod úhlem 90° vzhledem ke směru paprsku budícího záření. Emitované luminiscenční záření prochází přes monochromátor či filtr, kde dojde k výběru vhodné emisní vlnové délky záření a detekční systém převede zářivou energii na energii elektrickou, která se následně vyhodnotí. [2,8]



Obr. 1: Spektrofluorimetr a jeho schéma

5. Experimentální část

5.1. Použité přístroje

SPEKTROFLUORIMETR AMINCO – Bowman, Series 2 (Thermo Scientific)

UV-VIS SPEKTROFOTOMETR HP 8453 s diodovým polem (Hewlett-Packard, resp. Agilent Technologies)

pH-metr inoLab 720 s kombinovanou elektrodou Sentix 61 (WTW)

5.2. Použité chemikálie

hydroxid sodný p. a. - NaOH, (Penta)

acetonitril for gradient elution - CH₃CN (Aldrich)

methanol for gradient elution - CH₃OH (Aldrich)

hydrogenfosforečnan sodný p. a. - Na₂HPO₄ (Penta)

kyselina boritá p. a. - H₃BO₃ (Sigma)

deionizovaná voda čištěná reverzní osmózou

benzimidazoly – viz tabulka 1

5.3. Postup a příprava 26 zásobních roztoků

Tabulka 3: Navážky vzorků studovaných benzimidazolů pro přípravu jejich základních roztoků naředěných v ACN.

číslo vzorku v ACN	zkratka	navážka / g
1	BEN	0,0021
2	MBC	0,0022
3	2AB	0,0025
4	ABZ	0,0023
5	ABZSO	0,0018
6	TBZ	0,0020
7	FLU-R	0,0019
8	MBZ-R	0,0020
9	TBZOH	0,0014
10	OXI	0,0009
11	ABZSO2	0,0009
12	OFZ	0,0010
13	FBZ	0,0010

Tabulka 4: Navážky vzorků studovaných benzimidazolů pro přípravu jejich základních roztoků naředěných v MET.

číslo vzorku v MET	zkratka	navážka / g
1	BEN	0,0018
2	MBC	0,0024
3	2AB	0,0020
4	ABZ	0,0018
5	ABZSO	0,0025
6	TBZ	0,0023
7	FLU-R	0,0019
8	MBZ-R	0,0021
9	TBZOH	0,0010
10	OXI	0,0009
11	ABZSO2	0,0009
12	OFZ	0,0010
13	FBZ	0,0010

V první části měření jsme navážili přibližně přesně 0,002 g každého vzorku, rozpustili v malém množství acetonitrilu (v druhém případě v methanolu) a doplnili jsme po rysku na 50 ml. Těchto 22 roztoků jsme zkoumali pomocí absorpčního spektrofotometru v různých naředěních. Dále jsme si připravili dva pufrů viz kapitoly 5.4 a 5.5. Roztoky byly smíchány v poměrech 2,1 ml roztoku a 0,9 ml fosfátového nebo borátového pufru (7:3), 1,5 ml roztoku a 1,5 ml (1:1) a nakonec v poměru 0,9 ml roztoku a 2,1 ml (3:7), abychom zjistili excitační maxima v rozmezí 190 – 400nm. Poté jsme stejné vzorky proměřili na spektrofluorimetru a získali emisní spektra všech látek při konstantní excitační vlnové délce.

V druhé části jsme pracovali jen se dvěma vzorky FBZ a OFZ v prostředích acetonitrilu nebo methanolu, které jsme naředili ve čtyřech poměrech s borátovým pufrům nebo deionizovanou vodou. Roztoky byly smíchány takto: 0,6 ml roztoku benzimidazolu a 2,4 ml

pufu (poměr 1:4), 1,2 ml roztoku benzimidazolu a 1,8 ml pufu (poměr 2:3), 1,8 ml roztoku benzimidazolu a 1,2 ml pufu (poměr 3:2), 2,4 ml roztoku benzimidazolu a 0,6 ml pufu (poměr 4:1). Takto smíchané roztoky jsme přepipetovali do kyvet a následně proměřili na spektrofotometru.

5.4. Příprava borátového pufu o pH 9,95

Připravili jsme jej navážením 1,5687g H_3BO_3 , kterou jsme rozpustili přibližně v 950 ml deionizované vody. Pomocí předem nakalibrovaného pH-metru jsme upravili pH roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 0,2 mol/l na hodnotu 9,95. Roztok jsme převedli odměrné baňky o objemu 1000ml a doplnili deionizovanou vodou po rysku.

5.5. Příprava fosfátového pufu o pH 7,00

Připravili jsme ho navážením 5,37 g dodekahydrátu Na_2HPO_4 , který jsme rozpustili přibližně v 950 ml deionizované vody. Pomocí předem nakalibrovaného pH-metru jsme přidáním kyseliny fosforečné nastavili pH na 7,00. Roztok jsme převedli do tisícimilitrové odměrné baňky a doplnili deionizovanou vodou po rysku.

5.6. Vlastní měření absorpčních a fluorescenčních spekter benzimidazolů

Absorpční spektra všech studovaných benzimidazolů byla měřena na UV-VIS spektrofotometru s diodovým polem při pokojové teplotě v kyvetě o průměru 1 cm. Dále byla změřena emisní spektra jednotlivých benzimidazolů. Jako excitační vlnové délky byla použita absorpční maxima. Měření fluorescenčních spekter prováděné na přístroji Spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2 probíhalo za pokojové teploty v křemenné kyvetě o průměru 1 cm.

6. Výsledky 1. úlohy:

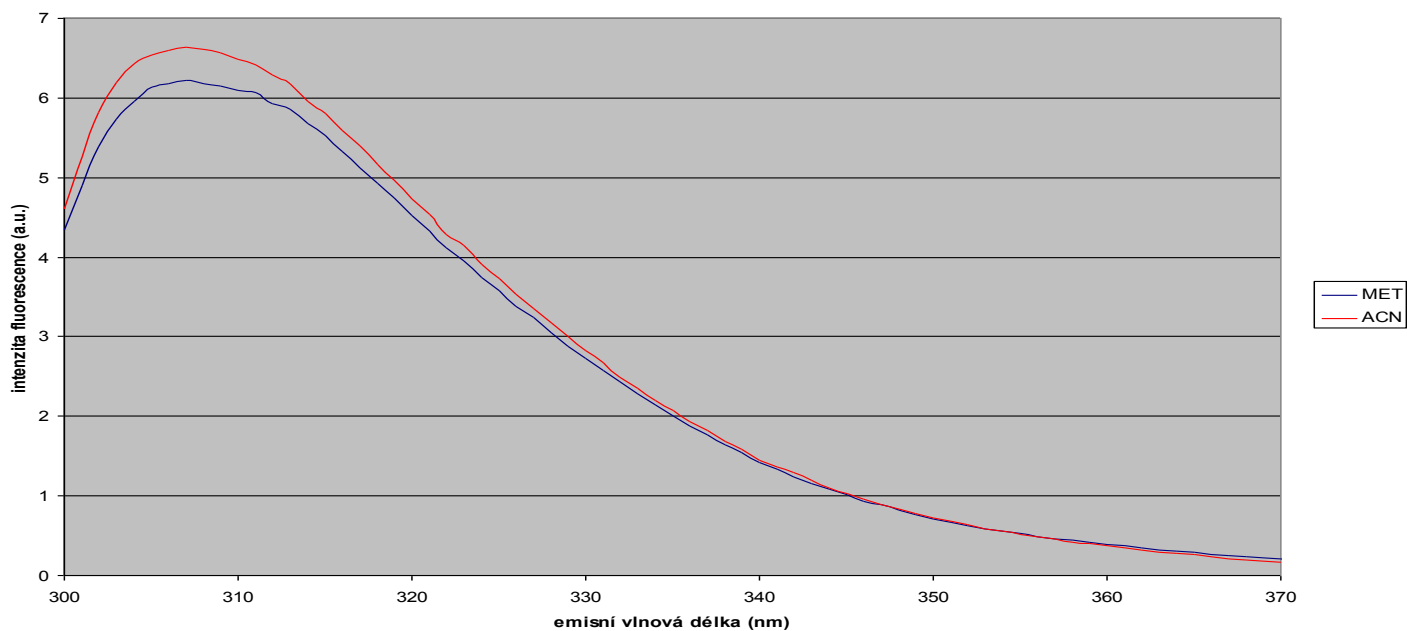
V první úloze byla naskenována excitační a emisní spektra 11 benzimidazolů ve dvou prostředích ACN a MET. Na obr. 2-12 jsou naměřená emisní spektra uvedena. Dále byly roztoky benzimidazolů v ACN a MET naředěny v poměrech 3:7, 1:1 a 7:3 dvěma pufrů o pH 7,00 a 9,95 a znovu naskenována excitační a emisní spektra. V grafech byla porovnávána emisní spektra ABZSO₂ ve směsích ACN (MET) s borátovým nebo fosfátovým pufrém (viz obr. 13, 14). Z naskenovaných excitačních a emisních spekter jsem odečetl hodnoty maxim, které jsem zaznamenal do tabulek (viz tab. 5-26).

Tabulka 5: Excitační a emisní vlnové délky BEN ve směsích ACN s borátovým pufrém o pH 9,95 a ve směsích ACN s fosfátovým pufrém o pH 7,00.

vzorek č. 1 BEN	rozpouštědlo	poměr ACN/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
BEN bez pufru	ACN	100/0	207	287	281	308
BEN/borátový pufr	ACN	70/30	208	287	294	325
BEN/borátový pufr	ACN	50/50	207	287	262	315
BEN/borátový pufr	ACN	30/70	207	287	358	315
BEN/fosfátový pufr	ACN	70/30	207	286	281	308
BEN/fosfátový pufr	ACN	50/50	206	286	242	308
BEN/fosfátový pufr	ACN	30/70	203	286	241	308

Tabulka 6: Excitační a emisní vlnové délky BEN ve směsích MET s borátovým pufrém o pH 9,95 a ve směsích MET s fosfátovým pufrém o pH 7,00.

vzorek č. 1 BEN	rozpouštědlo	poměr MET/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
BEN bez pufru	MET	100/0	207	287	282	309
BEN/borátový pufr	MET	70/30	206	286	280	311
BEN/borátový pufr	MET	50/50	207	286	239	313
BEN/borátový pufr	MET	30/70	200	286	280	315
BEN/fosfátový pufr	MET	70/30	206	286	280	309
BEN/fosfátový pufr	MET	50/50	207	286	280	308
BEN/fosfátový pufr	MET	30/70	205	286	280	309



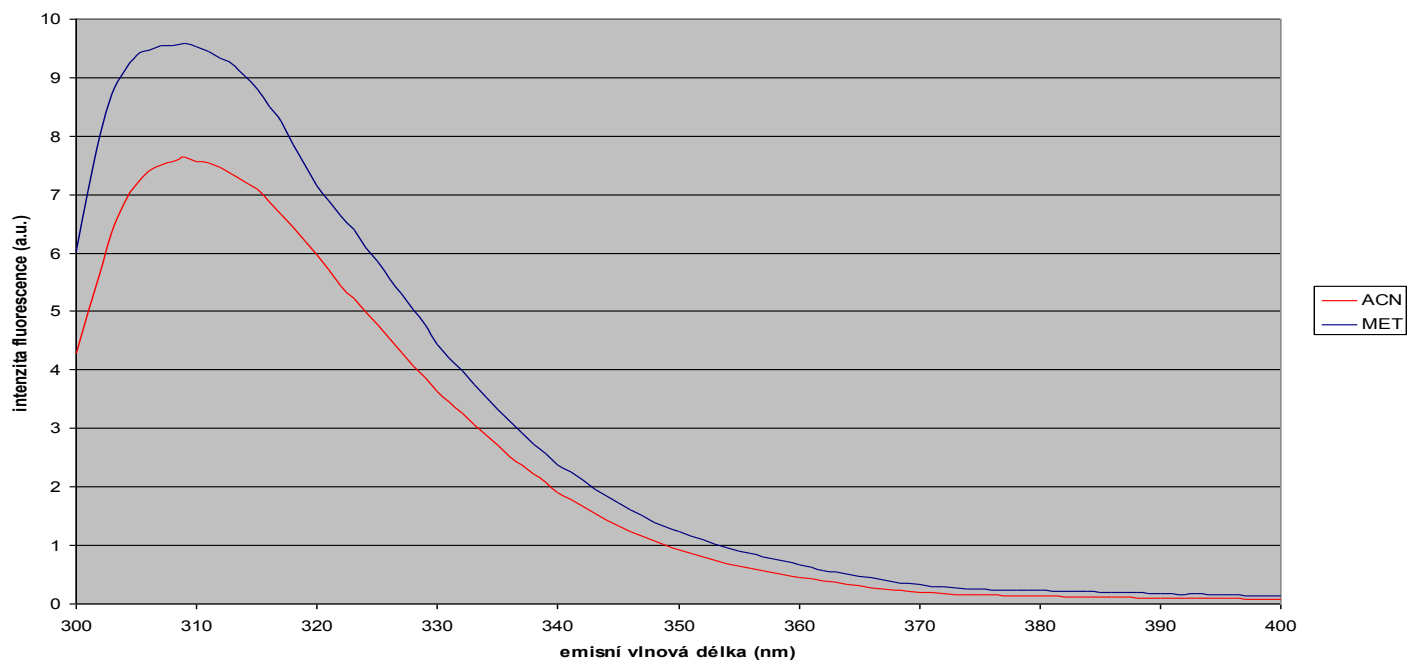
Obr. 2: Emisní spektrum vzorku BEN rozpuštěného v MET a ACN (vlnová délka excitace 287 nm).

Tabulka 7: Excitační a emisní vlnové délky MBC ve směsích ACN s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích ACN s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 2 MBC	rozpouštědlo	poměr ACN/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
MBC bez pufru	ACN	100/0	209	287	280	309
MBC/borátový pufr	ACN	70/30	204	287	360	315
MBC/borátový pufr	ACN	50/50	207	287	360	315
MBC/borátový pufr	ACN	30/70	207	287	360	317
MBC/fosfátový pufr	ACN	70/30	205	286	281	307
MBC/fosfátový pufr	ACN	50/50	207	286	281	308
MBC/fosfátový pufr	ACN	30/70	206	286	281	309

Tabulka 8: Excitační a emisní vlnové délky MBC ve směsích MET s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích MET s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 2 MBC	rozpouštědlo	poměr MET/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
MBC bez pufru	MET	100/0	206	287	281	309
MBC/borátový pufr	MET	70/30	206	286	280	311
MBC/borátový pufr	MET	50/50	205	286	281	312
MBC/borátový pufr	MET	30/70	206	286	280	312
MBC/fosfátový pufr	MET	70/30	207	286	280	307
MBC/fosfátový pufr	MET	50/50	206	286	280	309
MBC/fosfátový pufr	MET	30/70	207	286	280	309



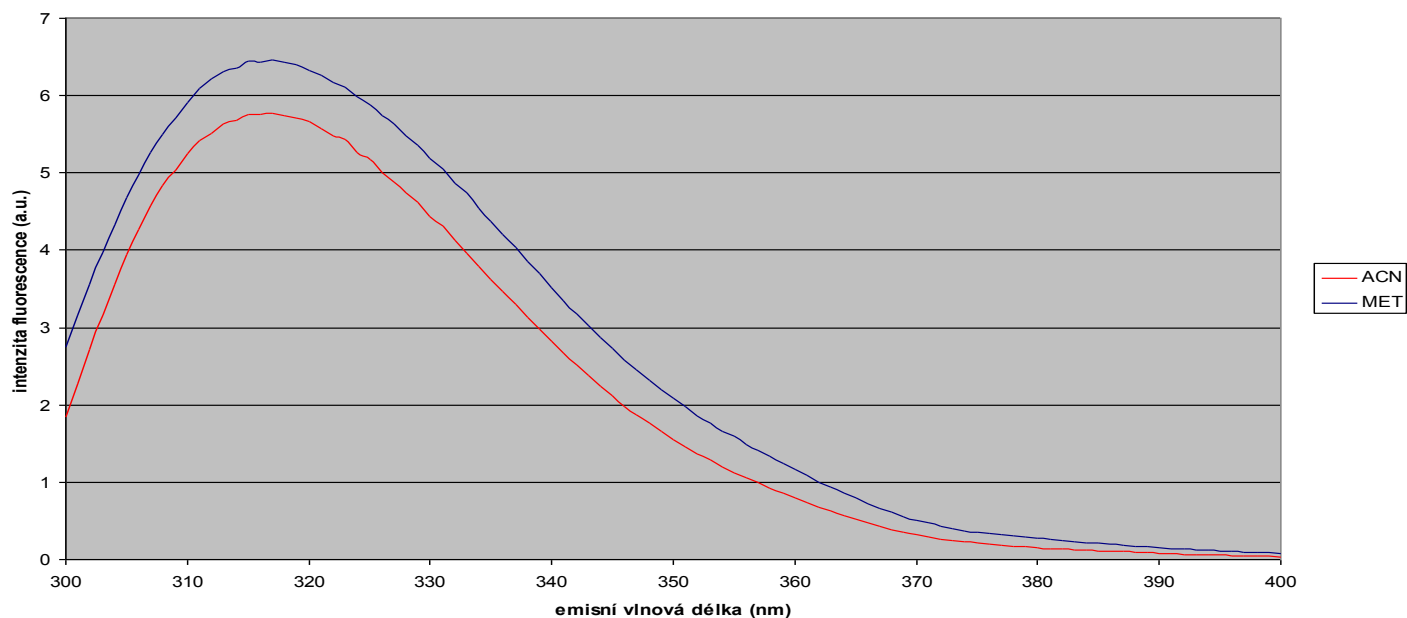
Obr. 3: Emisní spektrum vzorku MBC rozpuštěného v MET a ACN (vlnová délka excitace 287 nm).

Tabulka 9: Excitační a emisní vlnové délky 2AB ve směsích ACN s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích ACN s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 3 2AB	rozpouštědlo	poměr ACN/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
2AB bez pufru	ACN	100/0	209	243	282	318
2AB/borátový pufr	ACN	70/30	208	283	244	321
2AB/borátový pufr	ACN	50/50	208	242	283	321
2AB/borátový pufr	ACN	30/70	207	241	282	323
2AB/fosfátový pufr	ACN	70/30	282	245	489	319
2AB/fosfátový pufr	ACN	50/50	207	281	243	320
2AB/fosfátový pufr	ACN	30/70	205	281	358	319

Tabulka 10: Excitační a emisní vlnové délky 2AB ve směsích MET s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích MET s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 3 2AB	rozpouštědlo	poměr MET/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
2AB bez pufru	MET	100/0	209	248	284	318
2AB/borátový pufr	MET	70/30	208	282	242	322
2AB/borátový pufr	MET	50/50	207	282	241	323
2AB/borátový pufr	MET	30/70	207	282	240	325
2AB/fosfátový pufr	MET	70/30	207	282	242	320
2AB/fosfátový pufr	MET	50/50	207	281	241	322
2AB/fosfátový pufr	MET	30/70	205	280		319



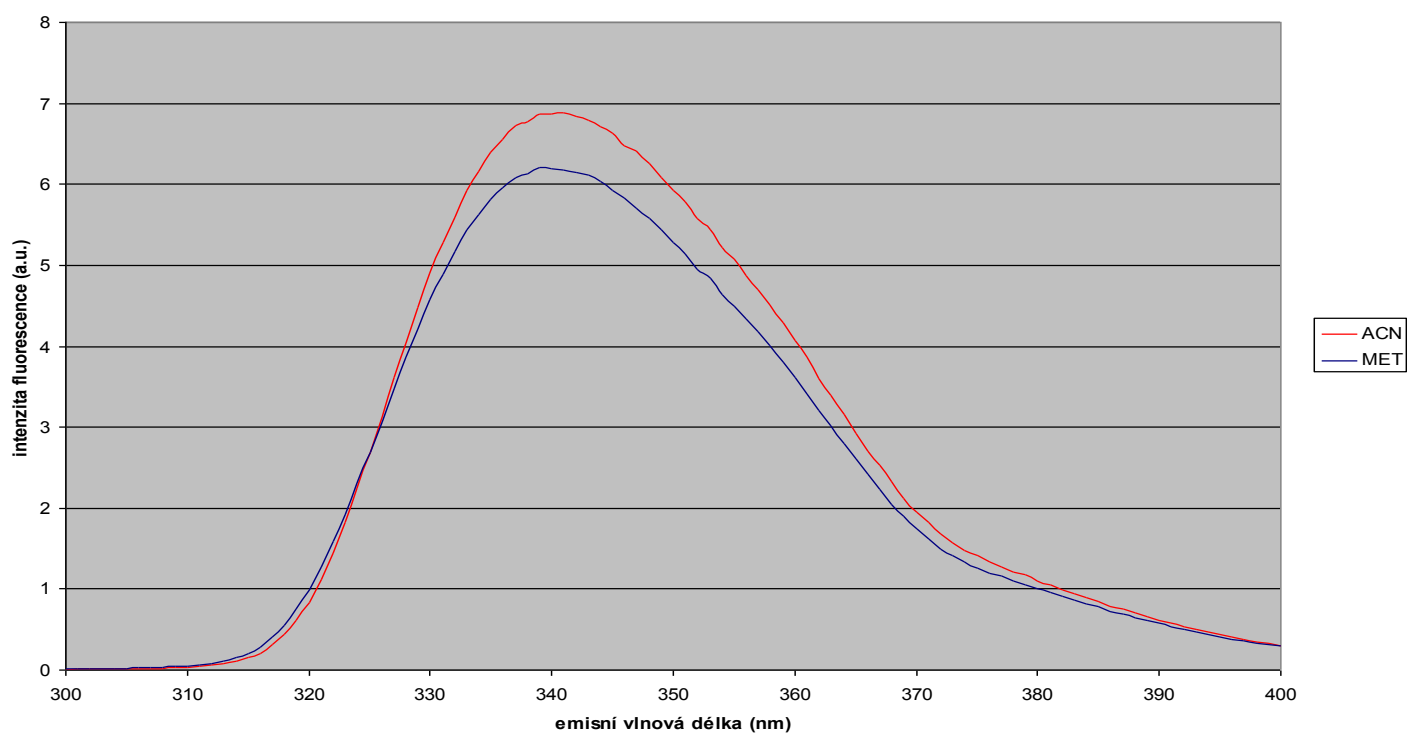
Obr. 4: Emisní spektrum vzorku 2AB rozpuštěného v MET a ACN (vlnová délka excitace 243 nm).

Tabulka 11: Excitační a emisní vlnové délky ABZ ve směsích ACN s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích ACN s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 4 ABZ	rozpuštědlo	poměr ACN/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
ABZ bez pufru	ACN	100/0	215	295	398	341
ABZ/borátový pufr	ACN	70/30	230	310	362	352
ABZ/borátový pufr	ACN	50/50	220	308	362	351
ABZ/borátový pufr	ACN	30/70	220	307	361	353
ABZ/fosfátový pufr	ACN	70/30	211	295	460	343
ABZ/fosfátový pufr	ACN	50/50	215	296	361	343
ABZ/fosfátový pufr	ACN	30/70	215	296	359	347

Tabulka 12: Excitační a emisní vlnové délky ABZ ve směsích MET s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích MET s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 4 ABZ	rozpouštědlo	poměr MET/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
ABZ bez pufru	MET	100/0	218	296	399	341
ABZ/borátový pufr	MET	70/30	218	296	363	345
ABZ/borátový pufr	MET	50/50	219	296	362	350
ABZ/borátový pufr	MET	30/70	217	296	362	349
ABZ/fosfátový pufr	MET	70/30	216	194	295	343
ABZ/fosfátový pufr	MET	50/50	217	295	363	346
ABZ/fosfátový pufr	MET	30/70	214	295		348



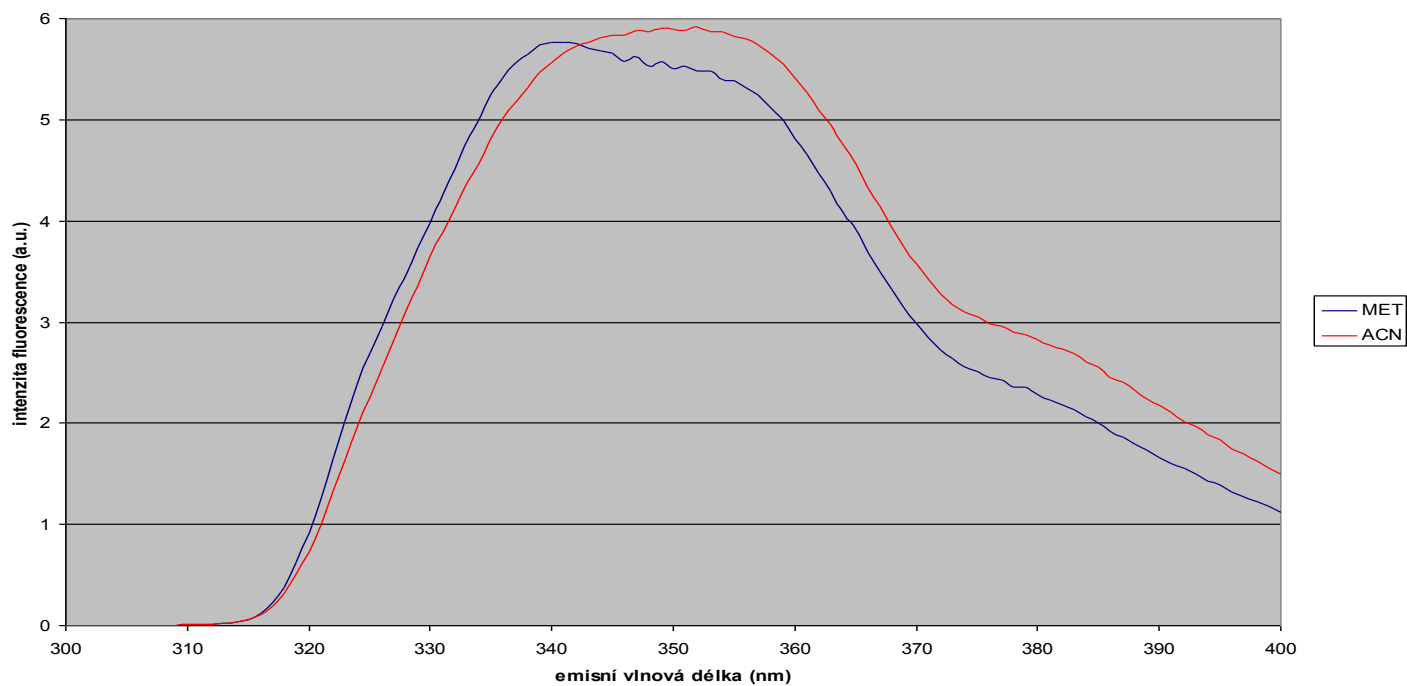
Obr. 5: Emisní spektrum vzorku ABZ rozpuštěného v MET a ACN (vlnová délka excitace 295 nm).

Tabulka 13: Excitační a emisní vlnové délky ABZSO ve směsích ACN s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích ACN s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 5 ABZSO	rozpouštědlo	poměr ACN/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
ABZSO bez pufru	ACN	100/0	222	294	256	318
ABZSO/borátový pufr	ACN	70/30	235	310	360	357
ABZSO/borátový pufr	ACN	50/50	234	308	360	357
ABZSO/borátový pufr	ACN	30/70	233	307	367	357
ABZSO/fosfátový pufr	ACN	70/30	222	294	413	323
ABZSO/fosfátový pufr	ACN	50/50	223	293	361	323
ABZSO/fosfátový pufr	ACN	30/70	223	293	358	325

Tabulka 14: Excitační a emisní vlnové délky ABZSO ve směsích MET s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích MET s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 5 ABZSO	rozpouštědlo	poměr MET/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
ABZSO bez pufru	MET	100/0	221	294	257	325
ABZSO/borátový pufr	MET	70/30	224	295		346
ABZSO/borátový pufr	MET	50/50	226	295	363	351
ABZSO/borátový pufr	MET	30/70	225	295	367	350
ABZSO/fosfátový pufr	MET	70/30	223	291	655	323
ABZSO/fosfátový pufr	MET	50/50	223	293	364	325
ABZSO/fosfátový pufr	MET	30/70	223	293	345	326



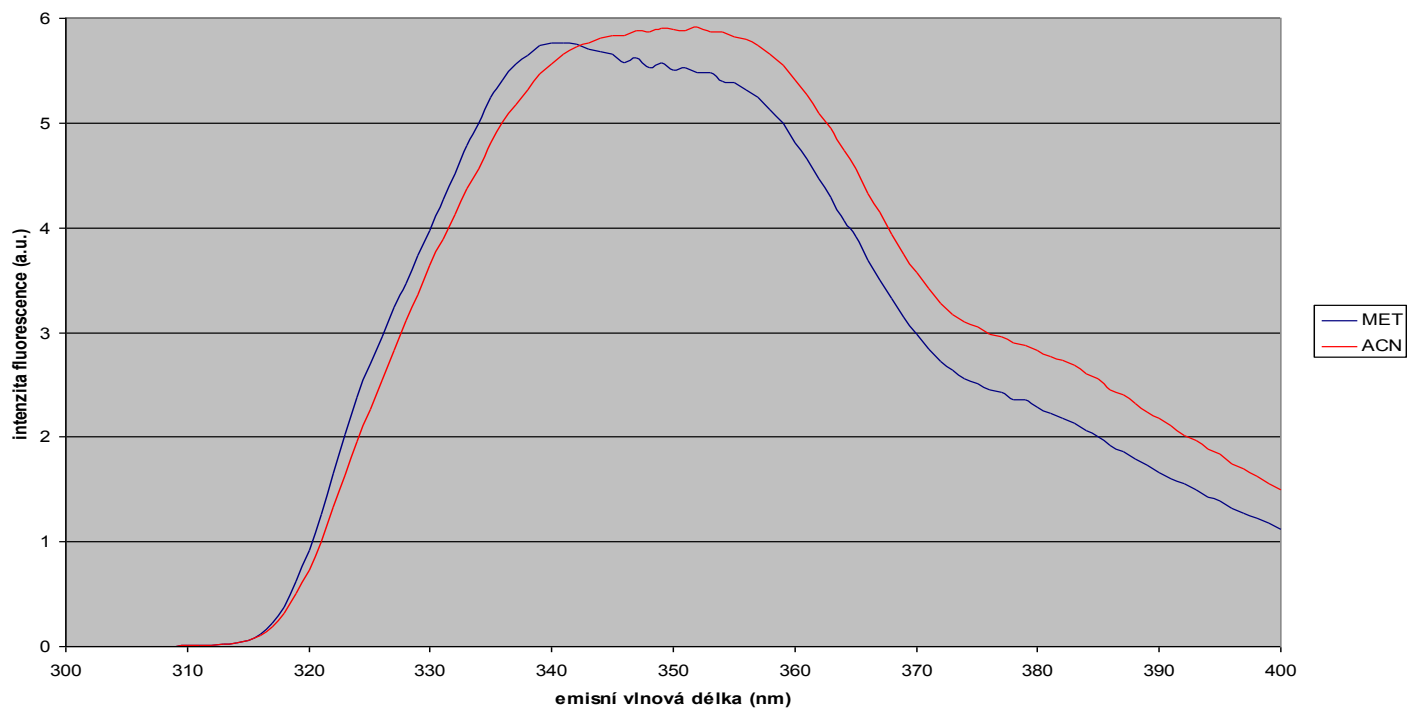
Obr. 6: Emisní spektrum vzorku ABZSO rozpuštěného v MET a ACN (vlnová délka excitace 294 nm).

Tabulka 15: Excitační a emisní vlnové délky TBZ ve směsích ACN s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích ACN s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 6 TBZ	rozpuštědlo	poměr ACN/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
TBZ bez pufru	ACN	100/0	207	299	312	352
TBZ/borátový pufr	ACN	70/30	206	299	243	356
TBZ/borátový pufr	ACN	50/50	204	299	243	355
TBZ/borátový pufr	ACN	30/70	204	299	235	355
TBZ/fosfátový pufr	ACN	70/30	205	299	235	353
TBZ/fosfátový pufr	ACN	50/50	205	299	243	355
TBZ/fosfátový pufr	ACN	30/70	203	299	235	355

Tabulka 16: Excitační a emisní vlnové délky TBZ ve směsích MET s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích MET s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 6 TBZ	rozpuštědlo	poměr MET/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
TBZ bez pufru	MET	100/0	206	299	311	342
TBZ/borátový pufr	MET	70/30	205	299	235	351
TBZ/borátový pufr	MET	50/50	205	299	235	355
TBZ/borátový pufr	MET	30/70	203	299	235	357
TBZ/fosfátový pufr	MET	70/30	204	291	243	346
TBZ/fosfátový pufr	MET	50/50	205	299	235	355
TBZ/fosfátový pufr	MET	30/70	204	299	235	355



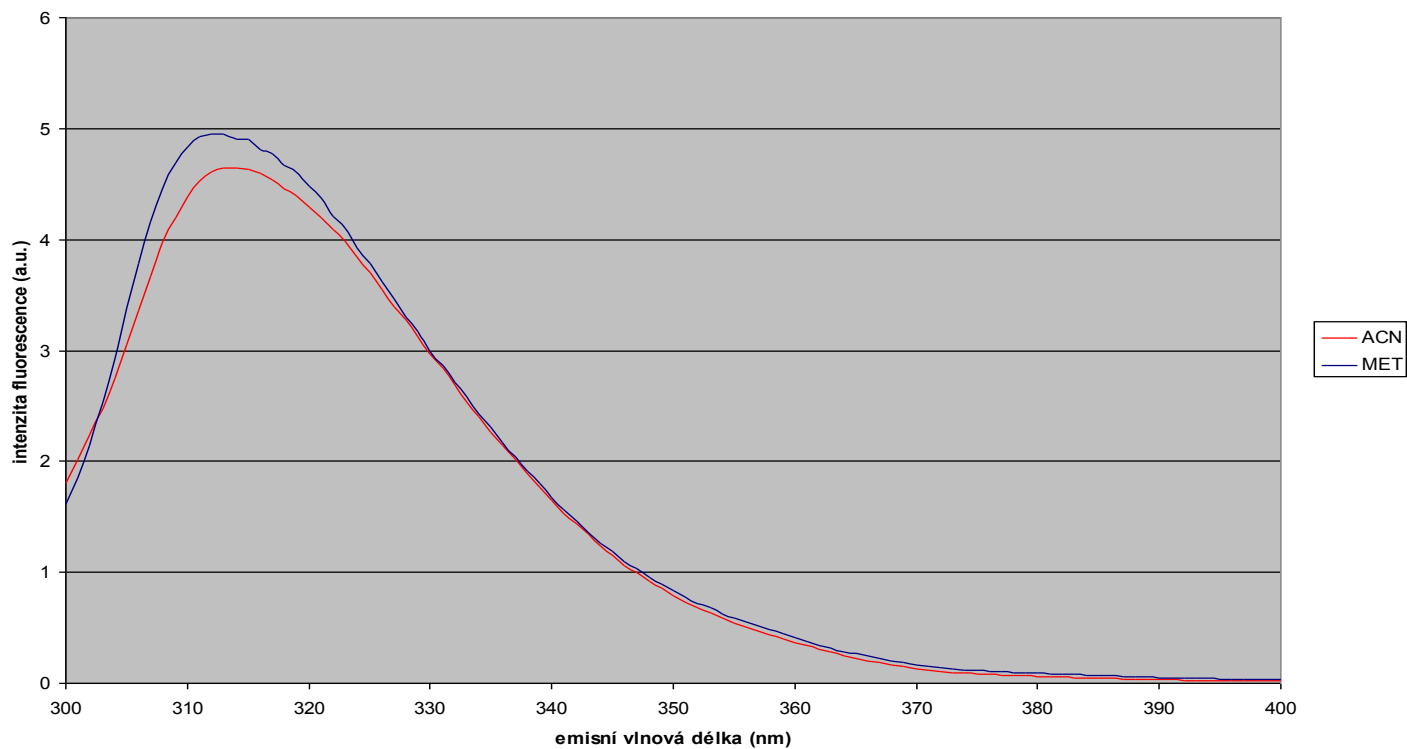
Obr. 7: Emisní spektrum vzorku TBZ rozpuštěného v MET a ACN (vlnová délka excitace 299 nm).

Tabulka 17: Excitační a emisní vlnové délky FLU-R ve směsích ACN s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích ACN s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 7 FLU-R	rozpouštědlo	poměr ACN/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
FLU-R bez pufru	ACN	100/0	247	292	286	316
FLU-R/borátový pufr	ACN	70/30	219	293	358	321
FLU-R/borátový pufr	ACN	50/50	218	292		320
FLU-R/borátový pufr	ACN	30/70	217	292		319
FLU-R/fosfátový pufr	ACN	70/30	211	292	431	313
FLU-R/fosfátový pufr	ACN	50/50	213	292	398	314
FLU-R/fosfátový pufr	ACN	30/70	211	291	358	313

Tabulka 18: Excitační a emisní vlnové délky FLU-R ve směsích MET s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích MET s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 7 FLU-R	rozpouštědlo	poměr MET/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
FLU-R bez pufru	MET	100/0	218	292	287	315
FLU-R/borátový pufr	MET	70/30	216	292		317
FLU-R/borátový pufr	MET	50/50	217	292	363	317
FLU-R/borátový pufr	MET	30/70	211	291	367	316
FLU-R/fosfátový pufr	MET	70/30	214	291	656	313
FLU-R/fosfátový pufr	MET	50/50	217	291	363	315
FLU-R/fosfátový pufr	MET	30/70	212	291	346	314



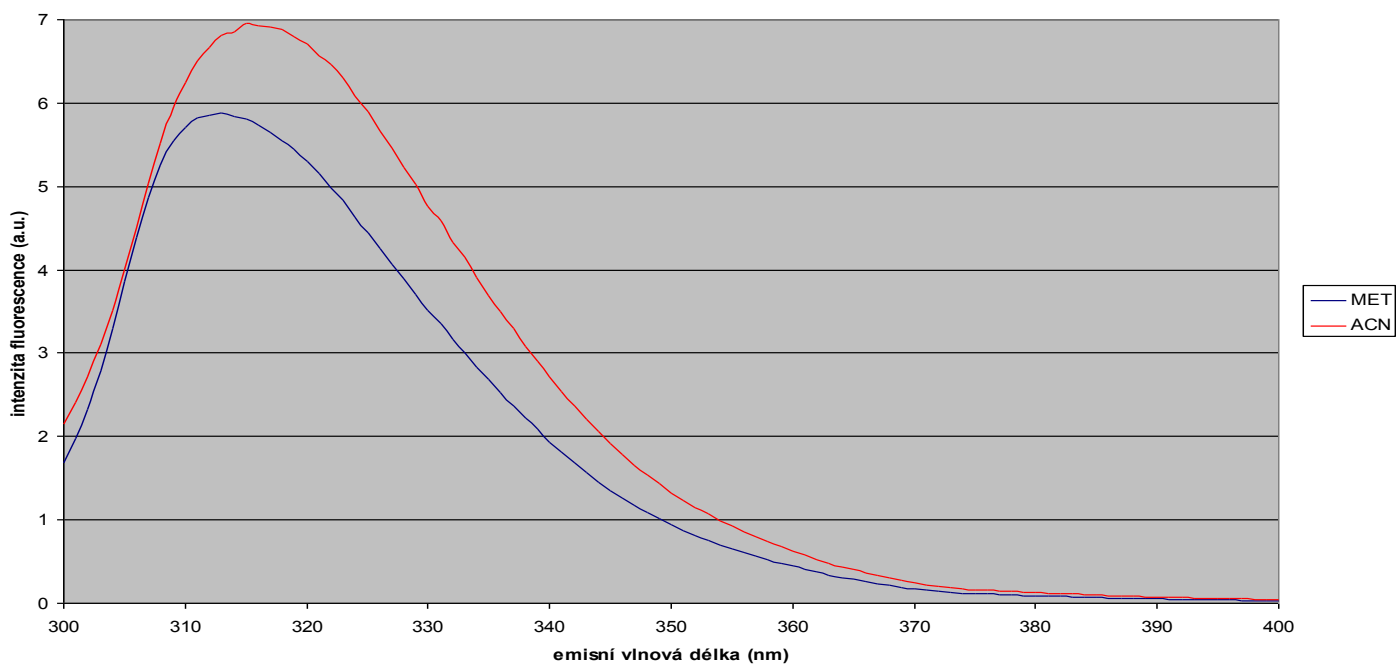
Obr. 8: Emisní spektrum vzorku FLU-R rozpuštěného v MET a ACN (vlnová délka excitace 292 nm).

Tabulka 19: Excitační a emisní vlnové délky MBZ-R ve směsích ACN s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích ACN s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 8 MBZ-R	rozpouštědlo	poměr ACN/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
MBZ-R bez pufru	ACN	100/0	213	292	286	317
MBZ-R/borátový pufr	ACN	70/30	194	218	293	321
MBZ-R/borátový pufr	ACN	50/50	213	292		321
MBZ-R/borátový pufr	ACN	30/70	214	292	360	319
MBZ-R/fosfátový pufr	ACN	70/30	212	292	488	313
MBZ-R/fosfátový pufr	ACN	50/50	213	292		315
MBZ-R/fosfátový pufr	ACN	30/70	212	291	324	315

Tabulka 20: Excitační a emisní vlnové délky MBZ-R ve směsích MET s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích MET s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 8 MBZ-R	rozpouštědlo	poměr MET/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
MBZ-R bez pufru	MET	100/0	216	292	287	314
MBZ-R/borátový pufr	MET	70/30	213	292		316
MBZ-R/borátový pufr	MET	50/50	213	292	363	315
MBZ-R/borátový pufr	MET	30/70	212	291	358	315
MBZ-R/fosfátový pufr	MET	70/30	213	291	547	313
MBZ-R/fosfátový pufr	MET	50/50	214	291	393	314
MBZ-R/fosfátový pufr	MET	30/70	212	291	394	315



Obr. 9: Emisní spektrum vzorku MBZ-R rozpuštěného v MET a ACN (vlnová délka excitace 292 nm).

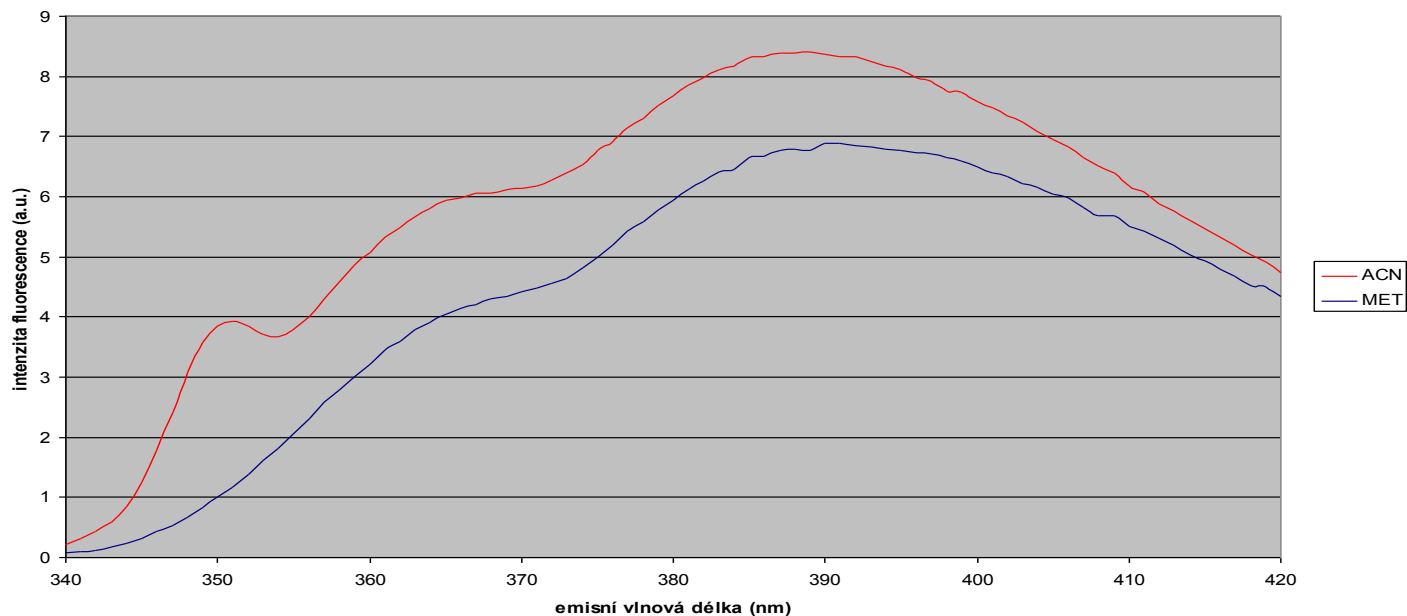
Tabulka 21: Excitační a emisní vlnové délky TBZOH ve směsích ACN s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích ACN s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 9 TBZOH	rozpouštědlo	poměr ACN/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
TBZOH bez pufru	ACN	100/0	249	317	398	391
TBZOH/borátový pufr	ACN	70/30	205	321		403
TBZOH/borátový pufr	ACN	50/50	206	322		403
TBZOH/borátový pufr	ACN	30/70	204	327		402
TBZOH/fosfátový pufr	ACN	70/30	204	317	248	400
TBZOH/fosfátový pufr	ACN	50/50	205	315	248	400
TBZOH/fosfátový pufr	ACN	30/70	204	314	247	400

Tabulka 22: Excitační a emisní vlnové délky TBZOH ve směsích MET s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích MET s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 9 TBZOH	rozpouštědlo	poměr MET/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
TBZOH bez pufru	MET	100/0	206	316	249	394
TBZOH/borátový pufr	MET	70/30	206	316		399
TBZOH/borátový pufr	MET	50/50	206	316		399
TBZOH/borátový pufr	MET	30/70	205	324		404
TBZOH/fosfátový pufr	MET	70/30	205	315	248	395
TBZOH/fosfátový pufr	MET	50/50	207	314	247	401
TBZOH/fosfátový pufr	MET	30/70	204	313	246	401

01



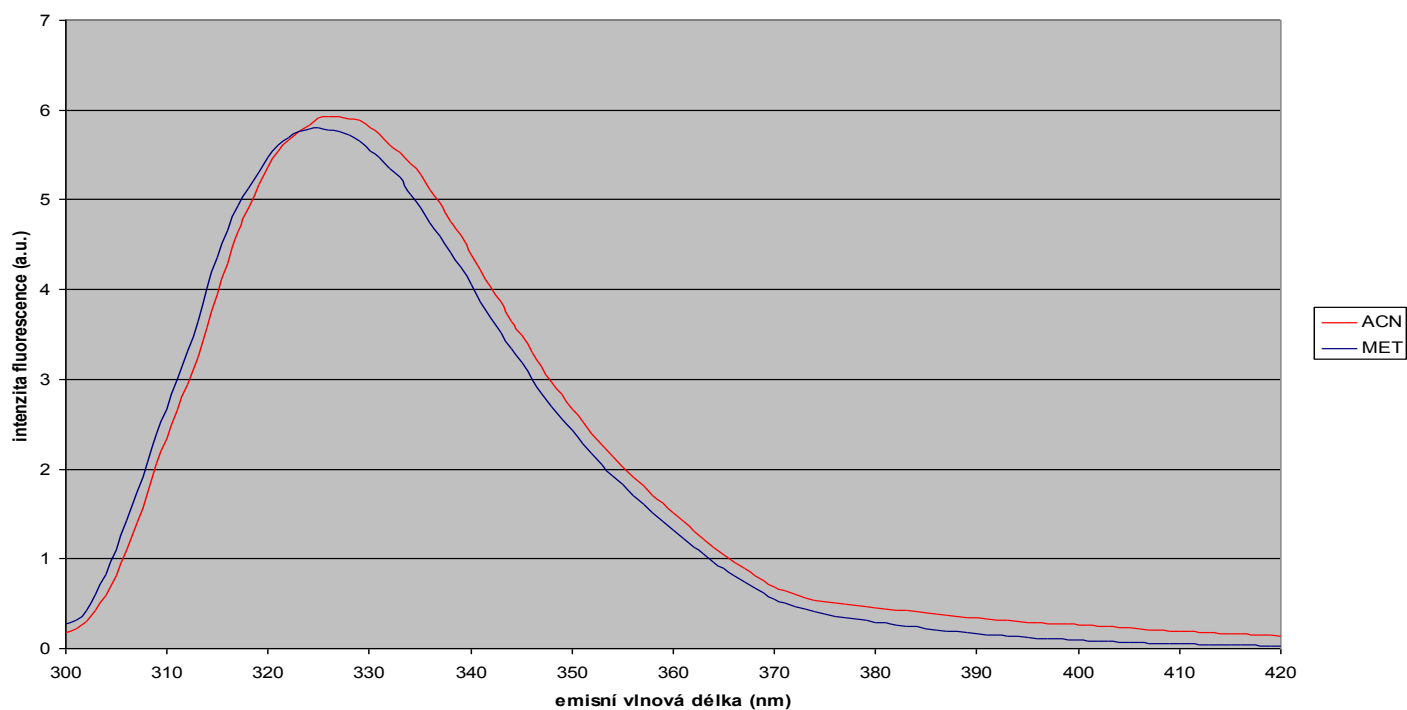
Obř. 10: Emisní spektrum vzorku TBZOH rozpuřtĚného v MET a ACN (vlnov dĚlka excitace 317 nm).

Tabulka 23: Excitační a emisní vlnov dĚlky OXI ve smĚsích ACN s borátovým puřrem o pH 9,95 a ve smĚsích ACN s fosfátovým puřrem o pH 7,00.

vzorek č. 10 OXI	rozpuřtĚdlo	pomĚř ACN/puřř	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
OXI bez puřřu	ACN	100/0	209	293	398	328
OXI/borátový puřř	ACN	70/30	204	300		332
OXI/borátový puřř	ACN	50/50	206	292		325
OXI/borátový puřř	ACN	30/70	207	293	398	332
OXI/fosfátový puřř	ACN	70/30	206	294	488	321
OXI/fosfátový puřř	ACN	50/50	207	293	357	319
OXI/fosfátový puřř	ACN	30/70	207	294	358	326

Tabulka 24: Excitační a emisní vlnové délky OXI ve směsích MET s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích MET s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

vzorek č. 10 OXI	rozpouštědlo	poměr MET/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
OXI bez pufru	MET	100/0	203	294	399	325
OXI/borátový pufr	MET	70/30	207	293		324
OXI/borátový pufr	MET	50/50	206	292	364	322
OXI/borátový pufr	MET	30/70	206	294		328
OXI/fosfátový pufr	MET	70/30	207	295	655	319
OXI/fosfátový pufr	MET	50/50	208	294	363	327
OXI/fosfátový pufr	MET	30/70	206	292	358	323



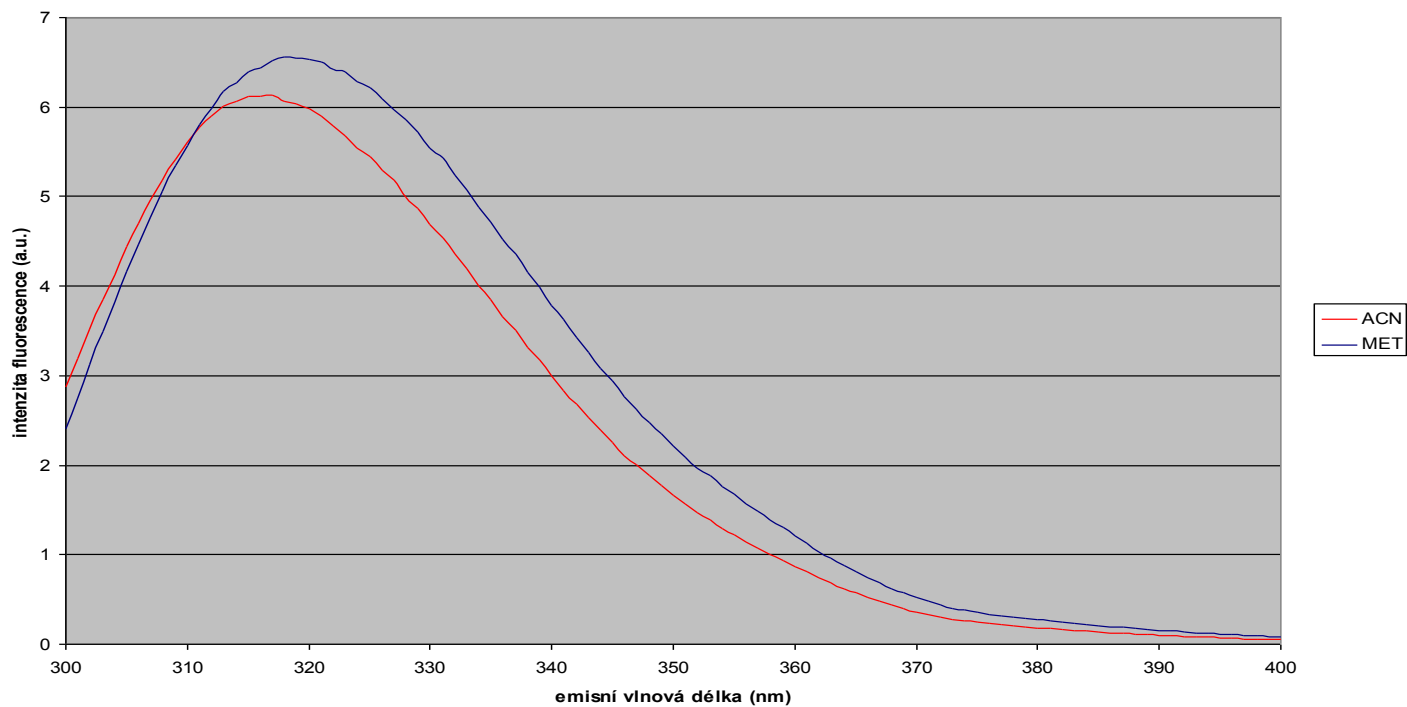
Obr. 11: Emisní spektrum vzorku OXI rozpuštěného v MET a ACN (vlnová délka excitace 294 nm).

Tabulka 25: Excitační a emisní vlnové délky ABZSO2 ve směsích ACN s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích ACN s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

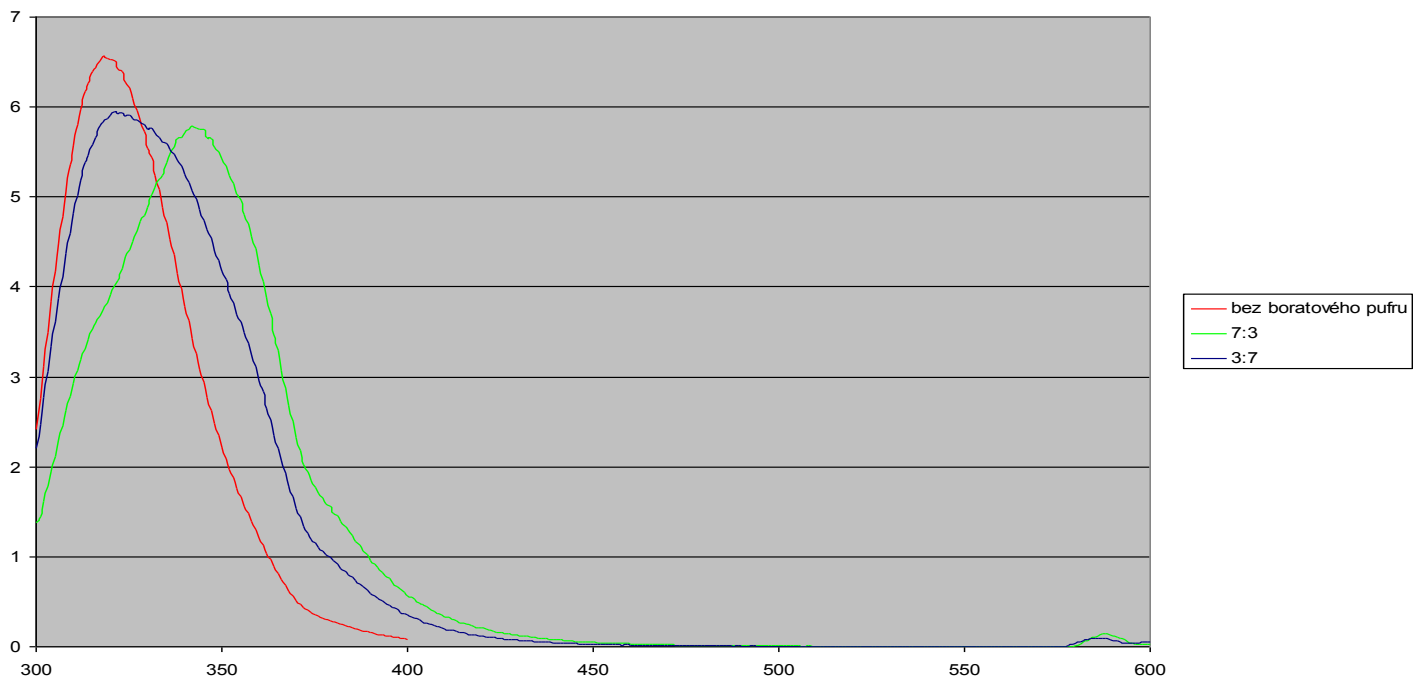
vzorek č. 11 ABZSO2	rozpouštědlo	poměr ACN/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
ABZSO2 bez pufru	ACN	100/0	209	292	258	317
ABZSO2/borátový pufr	ACN	70/30	198	207	308	353
ABZSO2/borátový pufr	ACN	50/50	196	208	306	358
ABZSO2/borátový pufr	ACN	30/70	195	208	305	352
ABZSO2/fosfátový pufr	ACN	70/30	204	287		320
ABZSO2/fosfátový pufr	ACN	50/50	208	292	357	320
ABZSO2/fosfátový pufr	ACN	30/70	207	293	254	323

Tabulka 26: Excitační a emisní vlnové délky ABZSO2 ve směsích MET s borátovým pufrům o pH 9,95 a ve směsích MET s fosfátovým pufrům o pH 7,00.

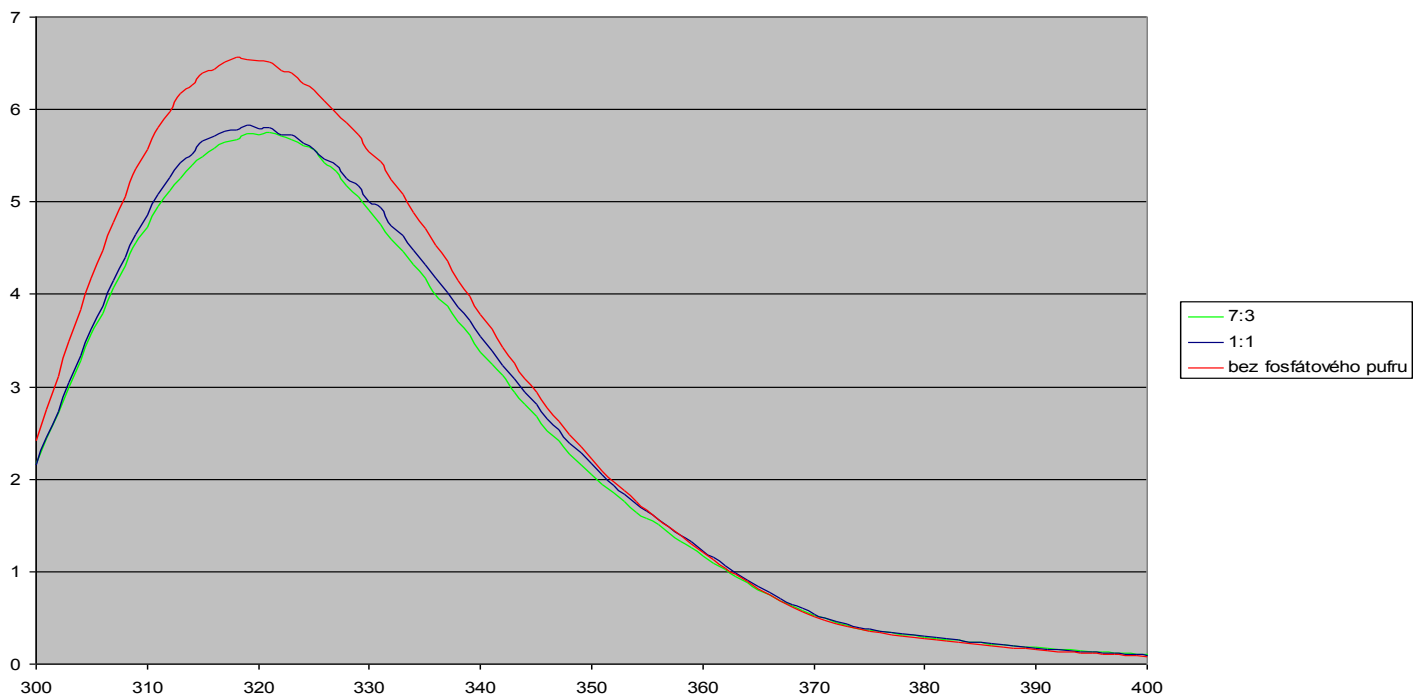
vzorek č. 11 ABZSO2	rozpouštědlo	poměr MET/pufr	λ_{ex1} [nm]	λ_{ex2} [nm]	λ_{ex3} [nm]	λ_{em} [nm]
ABZSO2 bez pufru	MET	100/0	292	286	260	319
ABZSO2/borátový pufr	MET	70/30	207	293	398	325
ABZSO2/borátový pufr	MET	50/50	208	281	397	328
ABZSO2/borátový pufr	MET	30/70	207	294	359	345
ABZSO2/fosfátový pufr	MET	70/30	207	293	433	325
ABZSO2/fosfátový pufr	MET	50/50	206	292	392	319
ABZSO2/fosfátový pufr	MET	30/70	207	292	358	322



Obr. 12: Emisní spektrum vzorku ABZSO2 rozpuštěného v MET a ACN (vlnová délka excitace 258 nm).



Obr. 13: Emisní spektrum vzorku ABZSO2 rozpuštěného v MET s rostoucím přidavkem borátového pufru o pH 9,95.



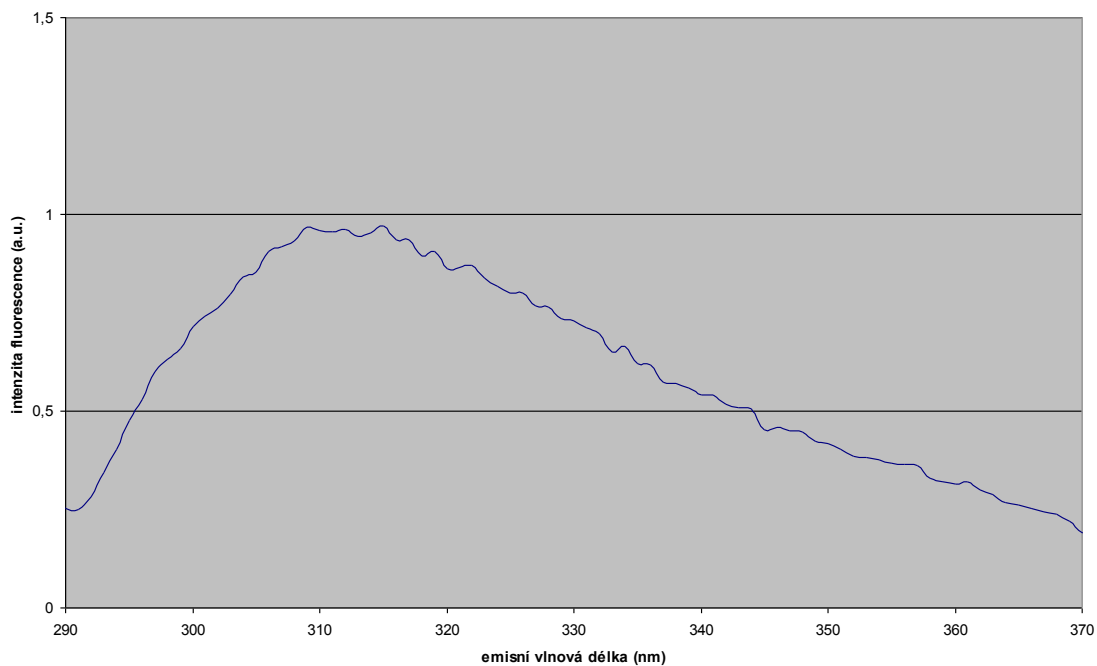
Obr. 14: Emisní spektrum vzorku ABZSO₂ rozpuštěného v MET s rostoucím přidavkem fosfátového pufru o pH 7,00.

7. Výsledky 2. úlohy:

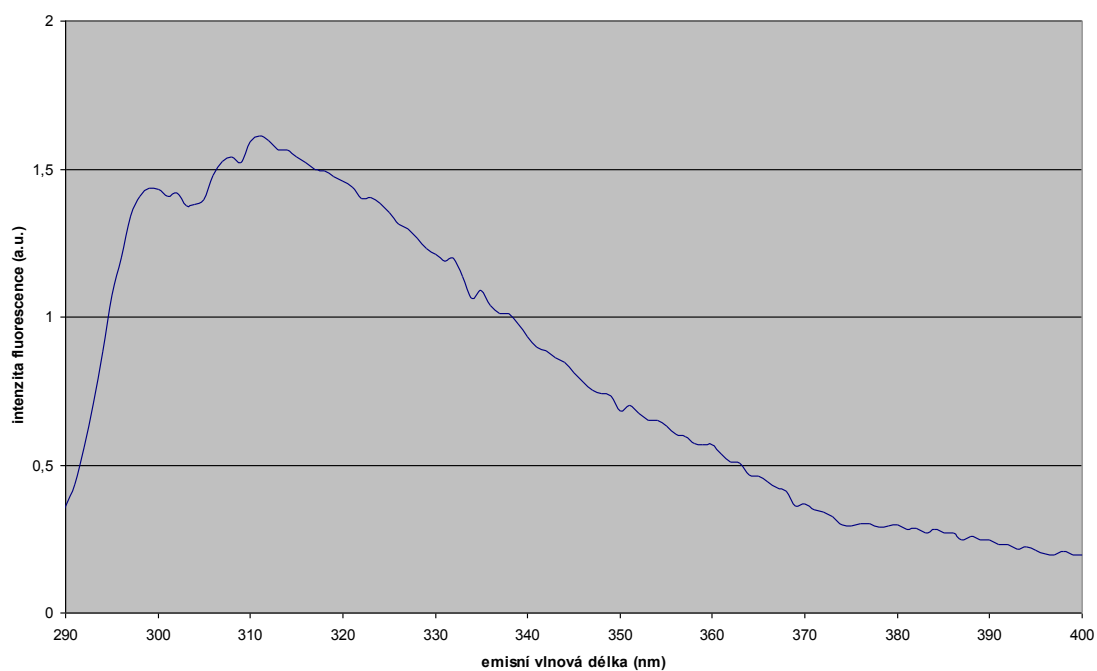
V druhé úloze jsme našli hodnoty emisních maxim dalších dvou benzimidazolů ve dvou prostředích ACN a MET při námi zvolených excitačních vlnových délkách 260 nm, 270 nm, 310 nm, 320 nm. Roztoky OFZ a FBZ jsme naředili v různých poměrech deionizovanou vodou nebo borátovým pufrům a studovali jejich fluorescenci. Zjistili jsme Ramanův posun a zaznamenali jej do tabulek 27-34. V těchto tabulkách jsme dále uvedli poměry naředění, hodnoty excitačních vlnových délek, hodnoty emisních vlnových délek a rozpouštědlo, v kterém byl benzimidazol rozpuštěn. V grafech (viz obr. 15-41) jsme vynesli závislost intenzity fluorescence na emisní vlnové délce.

Tabulka 27: Zjištění Ramanova posunu OFZ ve směsích MET (ACN) s deionizovanou vodou.

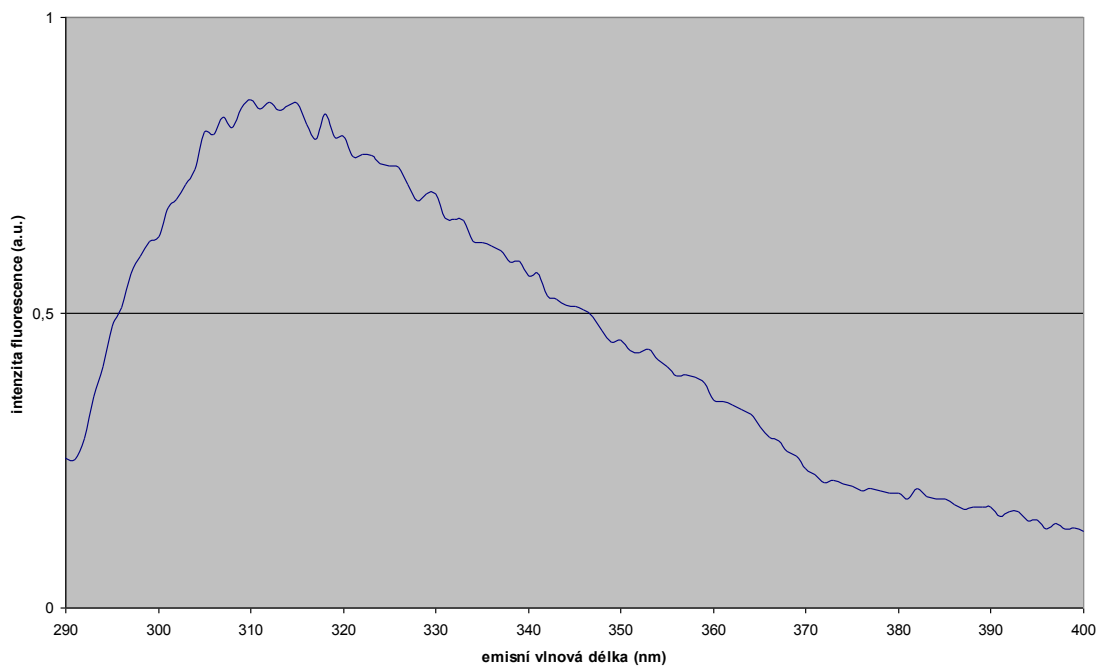
roztok OFZ/voda	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	$1/\lambda_{ex}-1/\lambda_{em}$ [nm ⁻¹]	rozpuštědlo
20/80	260	285	0,00034	ACN
20/80	270	297	0,00034	ACN
20/80	287	318	0,00034	ACN
20/80	310	347	0,00034	ACN
20/80	320	359	0,00034	ACN
20/80	260	312	0,00064	MET
20/80	260	287	0,00036	MET
20/80	270	313	0,00051	MET
20/80	270	300	0,00037	MET
20/80	295	315	0,00022	MET
20/80	295	328	0,00034	MET
20/80	310	347	0,00034	MET
20/80	320	360	0,00035	MET
40/60	260	285	0,00034	ACN
40/60	270	298	0,00035	ACN
40/60	298	331	0,00033	ACN
40/60	310	346	0,00034	ACN
40/60	320	359	0,00034	ACN
40/60	260	287	0,00036	MET
40/60	260	314	0,00066	MET
40/60	295	327	0,00033	MET
40/60	270	299	0,00036	MET
40/60	270	313	0,00051	MET
40/60	310	348	0,00035	MET
40/60	310	358	0,00043	MET
40/60	320	359	0,00034	MET



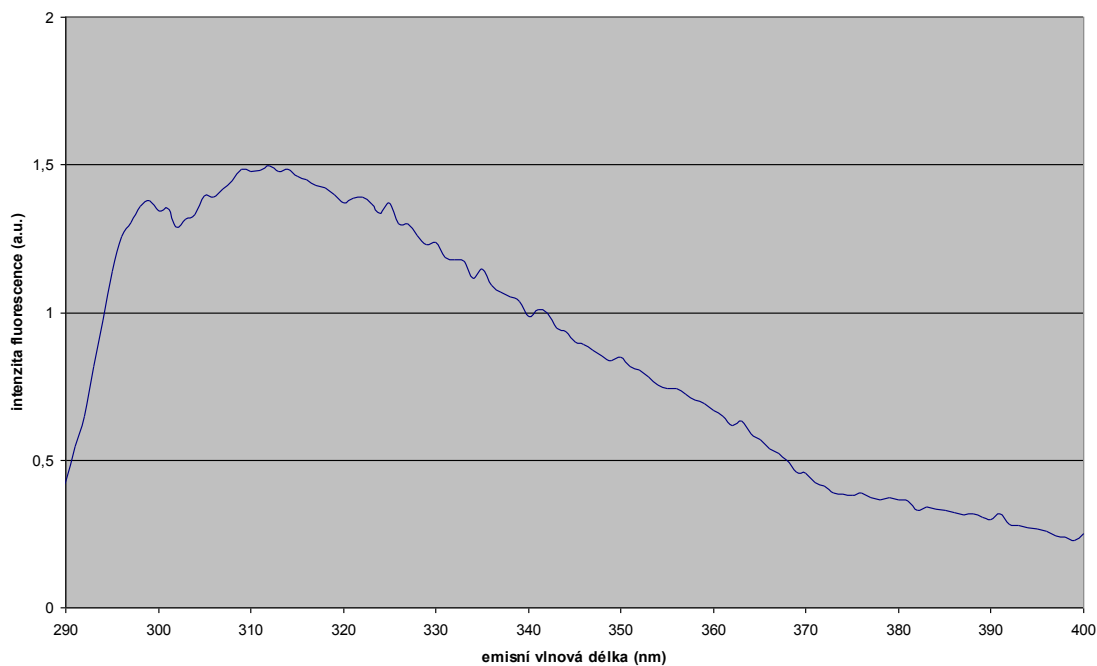
Obr. 15: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích MET s deionizovanou vodou v poměru naředění methanolický roztok OFZ/voda 20/80 (vlnová délka excitace 260 nm).



Obr. 16: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích MET s deionizovanou vodou v poměru naředění methanolický roztok OFZ/voda 20/80 (vlnová délka excitace 270 nm).



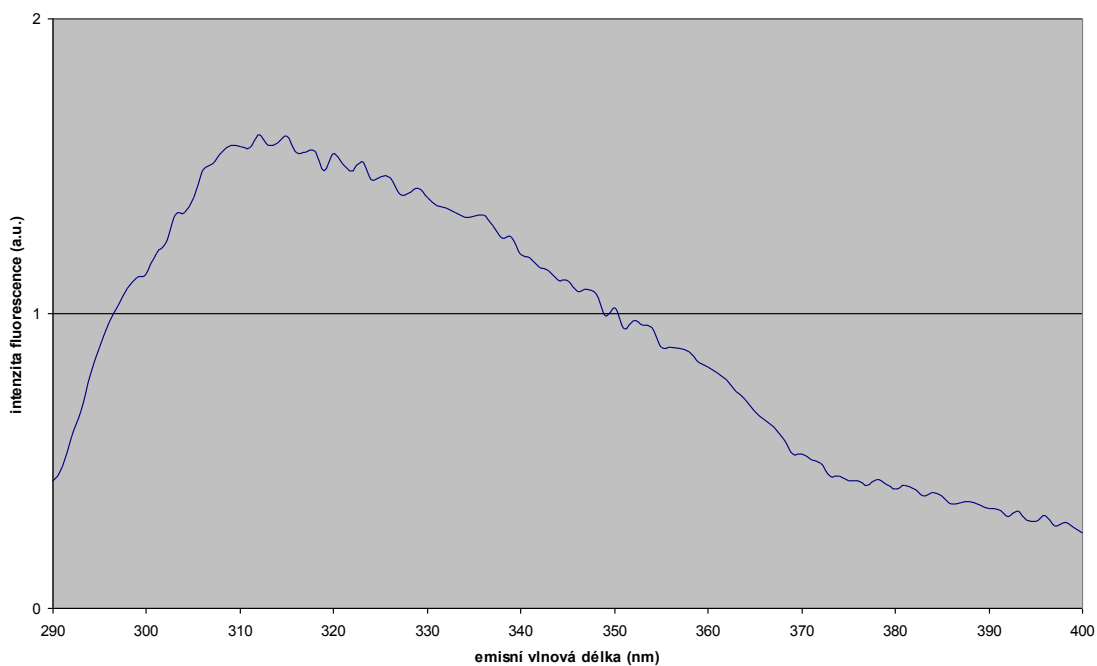
Obr. 17: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích MET s deionizovanou vodou v poměru naředění methanolický roztok OFZ/voda 40/60 (vlnová délka excitace 260 nm).



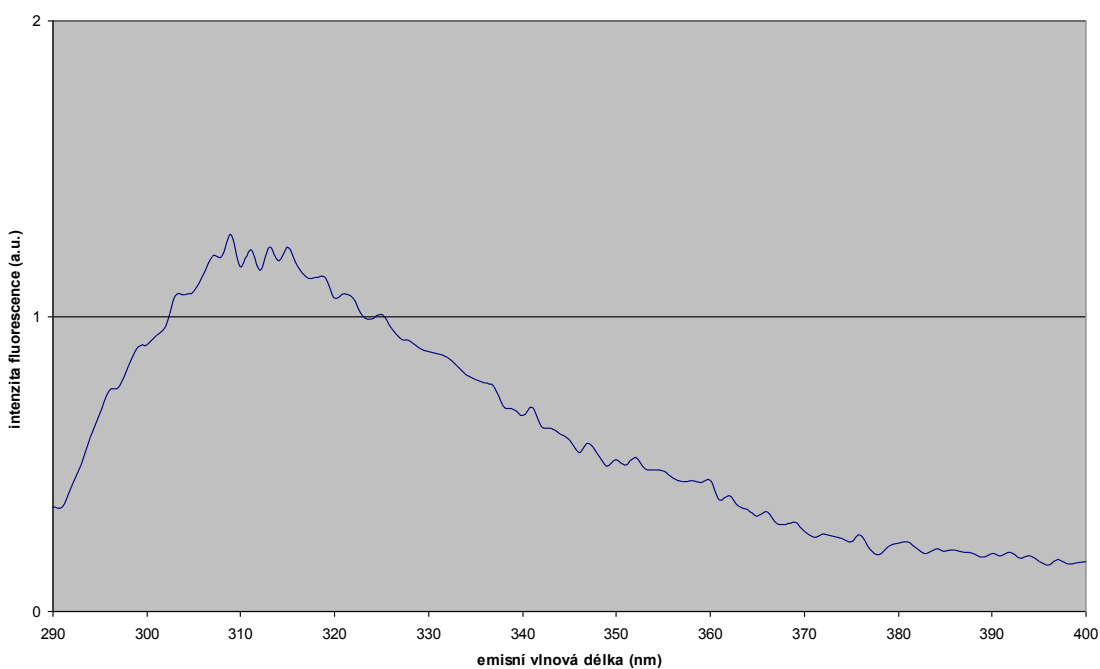
Obr. 18: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích MET s deionizovanou vodou v poměru naředění methanolický roztok OFZ/voda 40/60 (vlnová délka excitace 270 nm).

Tabulka 28: Zjištění Ramanova posunu OFZ ve směsích MET (ACN) s deionizovanou vodou.

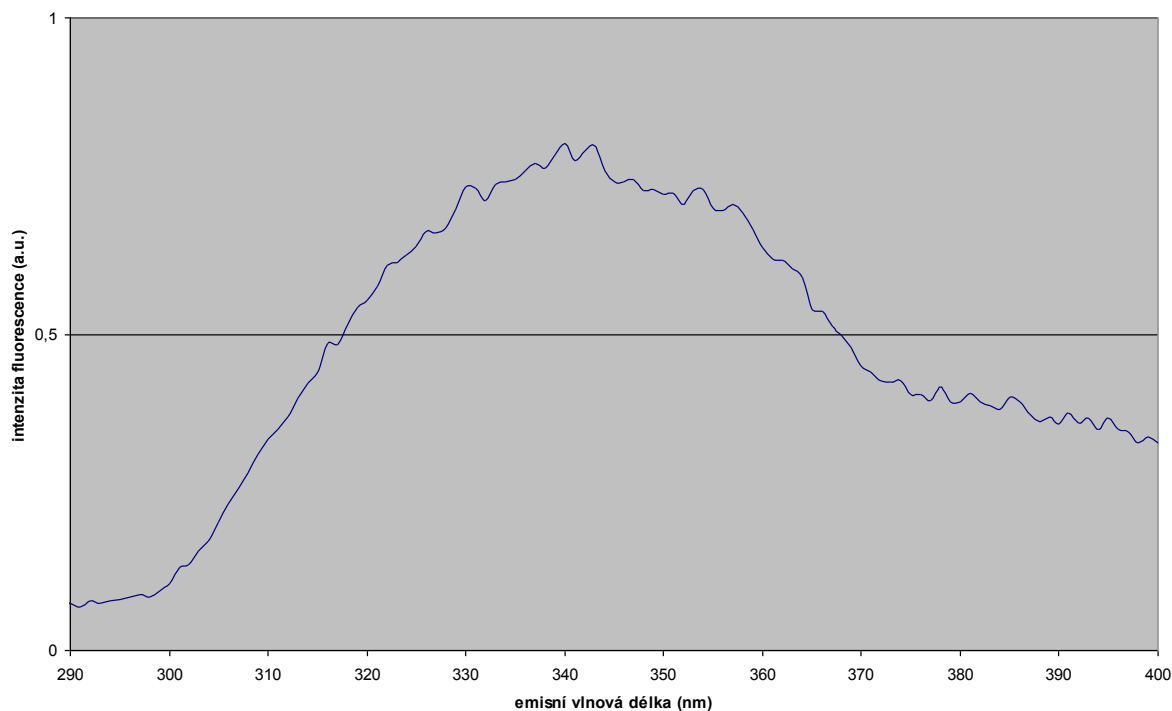
OFZ/voda	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	$1/\lambda_{ex}-1/\lambda_{em}$ [nm ⁻¹]	rozpouštědlo
60/40	270	297	0,00034	ACN
60/40	296	328	0,00033	ACN
60/40	310	345	0,00033	ACN
60/40	260	285	0,00034	MET
60/40	270	297	0,00034	MET
60/40	295	329	0,00035	MET
60/40	310	345	0,00033	MET
60/40	320	357	0,00032	MET
80/20	260	284	0,00033	ACN
80/20	260	310	0,00062	ACN
80/20	270	296	0,00033	ACN
80/20	270	310	0,00048	ACN
80/20	296	324	0,00029	ACN
80/20	310	342	0,00030	ACN
80/20	320	355	0,00031	ACN
80/20	260	285	0,00034	MET
80/20	260	314	0,00066	MET
80/20	296	325	0,00030	MET
80/20	270	299	0,00036	MET
80/20	270	314	0,00052	MET
100/0	260	283	0,00031	ACN
100/0	290	319	0,00031	ACN
100/0	310	342	0,00030	ACN
100/0	296	328	0,00033	MET
100/0	260	284	0,00033	MET
100/0	260	343	0,00093	MET



Obr. 19: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích MET s deionizovanou vodou v poměru naředění methanolický roztok OFZ/voda 80/20 (vlnová délka excitace 260 nm).



Obr. 20: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích ACN s deionizovanou vodou v poměru naředění acetonitrilový roztok OFZ/voda 80/20 (vlnová délka excitace 260 nm).

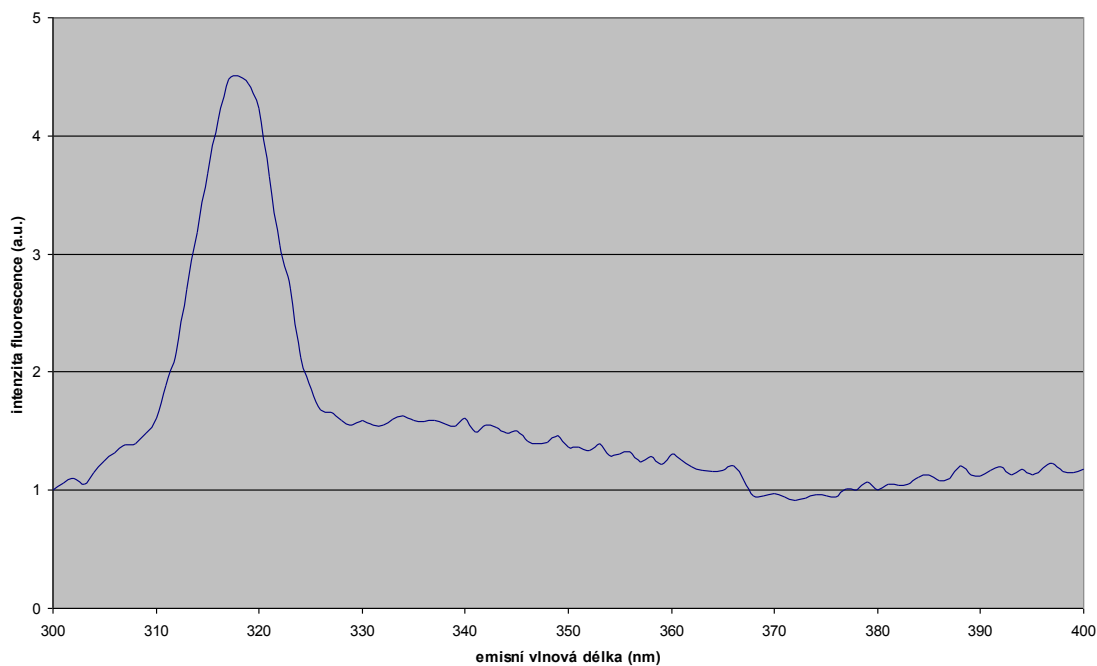


Obr. 21: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích MET s deionizovanou vodou v poměru naředění methanolickeho roztoku OFZ/voda 100/0 (vlnová délka excitace 260 nm).

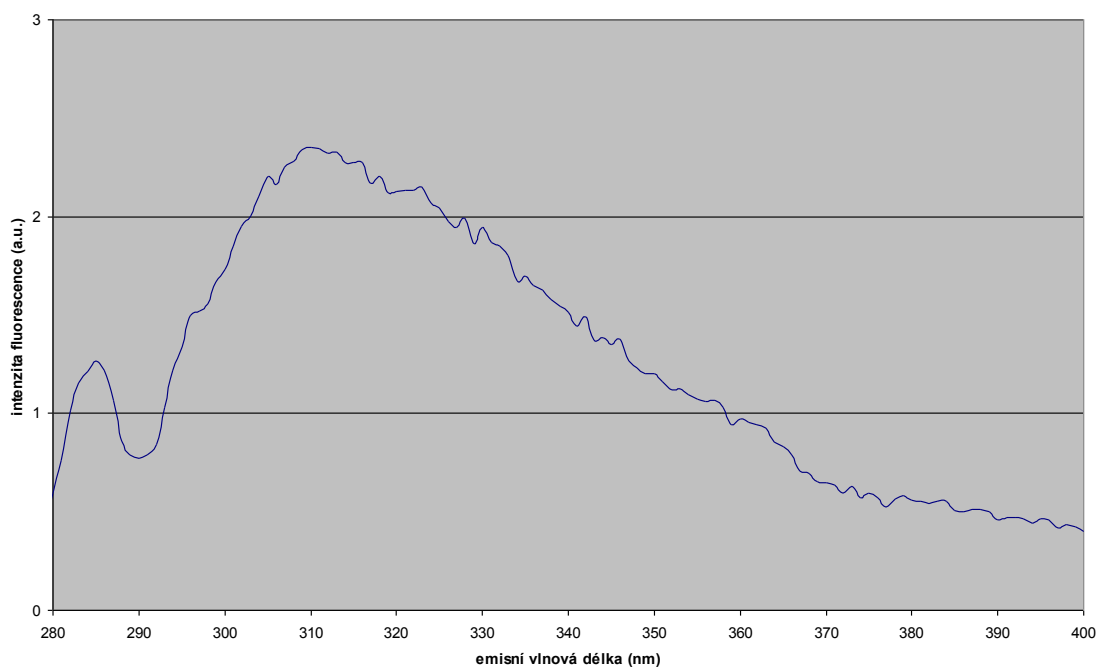
U OFZ rozpuštěného v MET jsme našli fluorescenci při emisní vlnové délce 313 nm v poměrech naředění methanolickeho roztoku OFZ/voda 20/80 (viz obr. 15,16), methanolickeho roztoku OFZ/voda 40/60 (viz obr. 17, 18) a 314 nm v poměru naředění methanolickeho roztoku OFZ/voda 80/20 (viz obr. 19). OFZ rozpuštěný v ACN vykazoval fluorescenci při emisní vlnové délce 310 nm jen v poměru naředění acetonitrilový roztok OFZ/voda 80/20 (viz obr. 20). Nenaředěný methanolickeho roztok OFZ vykazoval fluorescenci při emisní vlnové délce 343 nm (viz obr. 21).

Tabulka 29: Zjištění Ramanova posunu OFZ ve směsích MET (ACN) s borátovým pufrům o pH 9,95.

roztok OFZ/pufr	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	$1/\lambda_{ex}-1/\lambda_{em}$ [nm ⁻¹]	rozpouštědlo
20/80	260	285	0,00034	ACN
20/80	270	297	0,00034	ACN
20/80	297	318	0,00022	ACN
20/80	310	347	0,00034	ACN
20/80	320	359	0,00034	ACN
20/80	295	328	0,00034	MET
20/80	310	347	0,00034	MET
20/80	320	359	0,00034	MET
40/60	260	286	0,00035	ACN
40/60	270	297	0,00034	ACN
40/60	298	332	0,00034	ACN
40/60	310	346	0,00034	ACN
40/60	320	359	0,00034	ACN
40/60	260	286	0,00035	MET
40/60	260	313	0,00065	MET
40/60	270	299	0,00036	MET
40/60	270	312	0,00050	MET
40/60	295	327	0,00033	MET
40/60	295	313	0,00019	MET
40/60	310	347	0,00034	MET
40/60	320	358	0,00033	MET



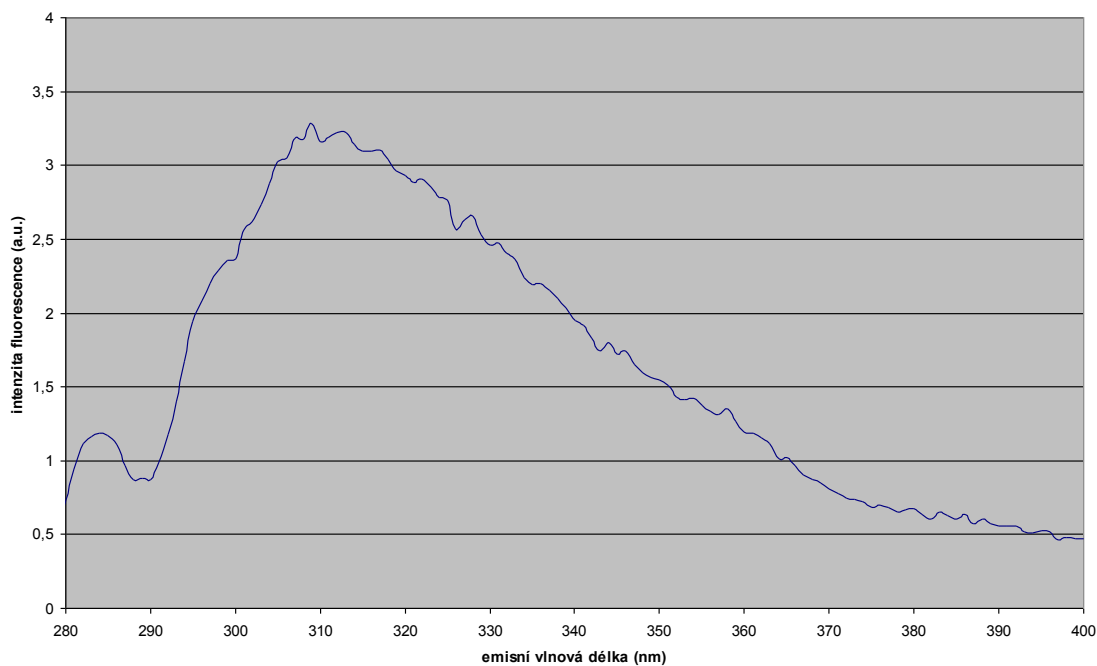
Obr. 22: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích ACN s borátovým pufrém o pH 9,95 v poměru naředění acetonitrilový roztok OFZ/pufr 20/80 (vlnová délka excitace 297 nm).



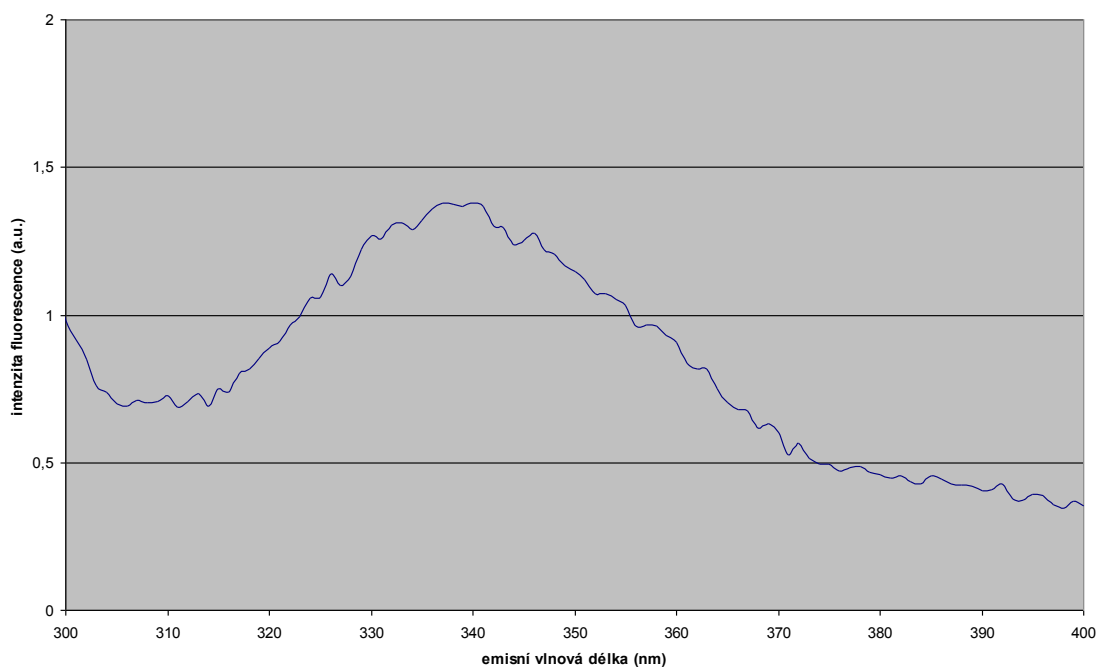
Obr. 23: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích MET s borátovým pufrém o pH 9,95 v poměru naředění methanolický roztok OFZ/pufr 40/60 (vlnová délka excitace 260 nm).

Tabulka 30: Zjištění Ramanova posunu OFZ ve směsích MET (ACN) s borátovým pufrům o pH 9,95.

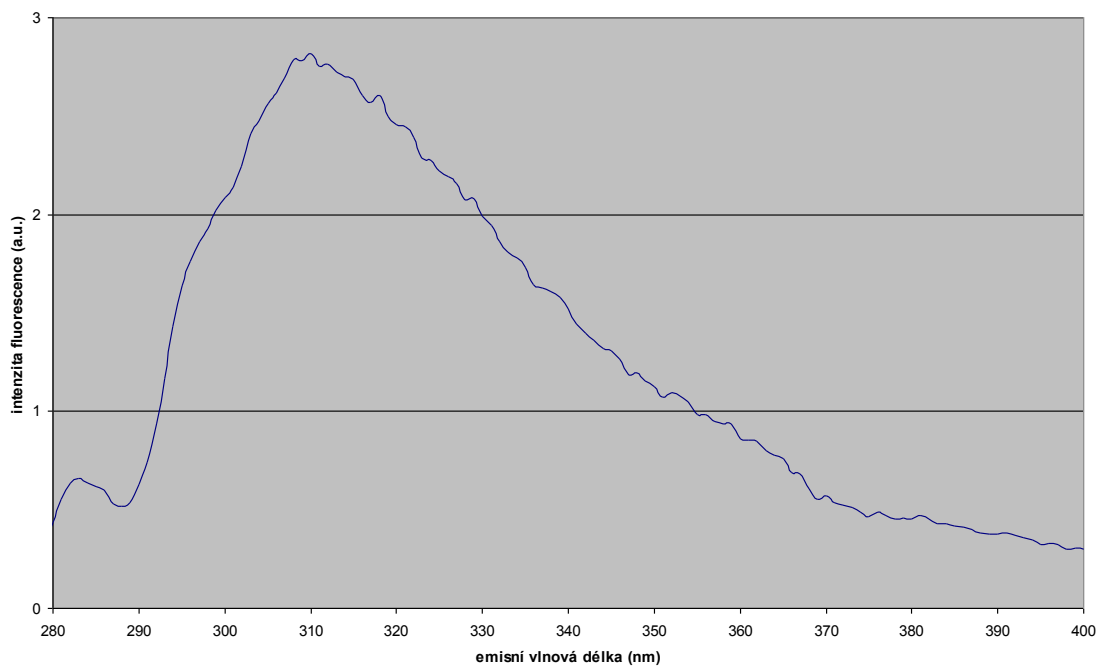
roztok OFZ/pufr	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	$1/\lambda_{ex}-1/\lambda_{em}$ [nm ⁻¹]	rozpouštědlo
60/40	260	285	0,00034	ACN
60/40	270	296	0,00033	ACN
60/40	296	330	0,00035	ACN
60/40	310	345	0,00033	ACN
60/40	320	357	0,00032	ACN
60/40	260	285	0,00034	MET
60/40	260	312	0,00064	MET
60/40	270	298	0,00035	MET
60/40	270	313	0,00051	MET
60/40	295	327	0,00033	MET
60/40	310	345	0,00033	MET
60/40	320	357	0,00032	MET
80/20	260	283	0,00031	ACN
80/20	270	295	0,00031	ACN
80/20	270	340	0,00076	ACN
80/20	287	315	0,00031	ACN
80/20	287	341	0,00055	ACN
80/20	320	345	0,00023	ACN
80/20	320	354	0,00030	ACN
80/20	260	284	0,00033	MET
80/20	260	312	0,00064	MET
80/20	270	299	0,00036	MET
80/20	270	312	0,00050	MET
80/20	296	326	0,00031	MET
80/20	310	344	0,00032	MET
80/20	320	355	0,00031	MET



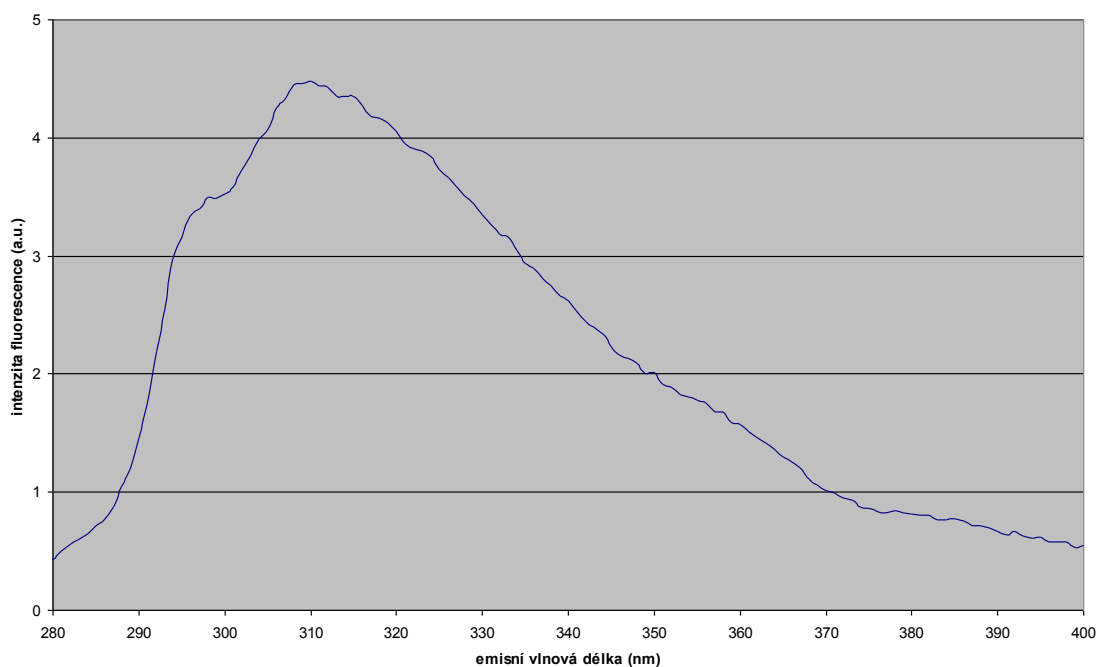
Obr. 24: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích MET s borátovým puřrem o pH 9,95 v poměru naředění methanolický roztok OFZ/puřr 60/40 (vlnová délka excitace 260 nm).



Obr. 25: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích ACN s borátovým puřrem o pH 9,95 v poměru naředění acetonitrilový roztok OFZ/puřr 80/20 (vlnová délka excitace 270 nm).



Obr. 26: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích MET s borátovým pufrém o pH 9,95 v poměru naředění methanolický roztok OFZ/pufr 80/20 (vlnová délka excitace 260 nm).

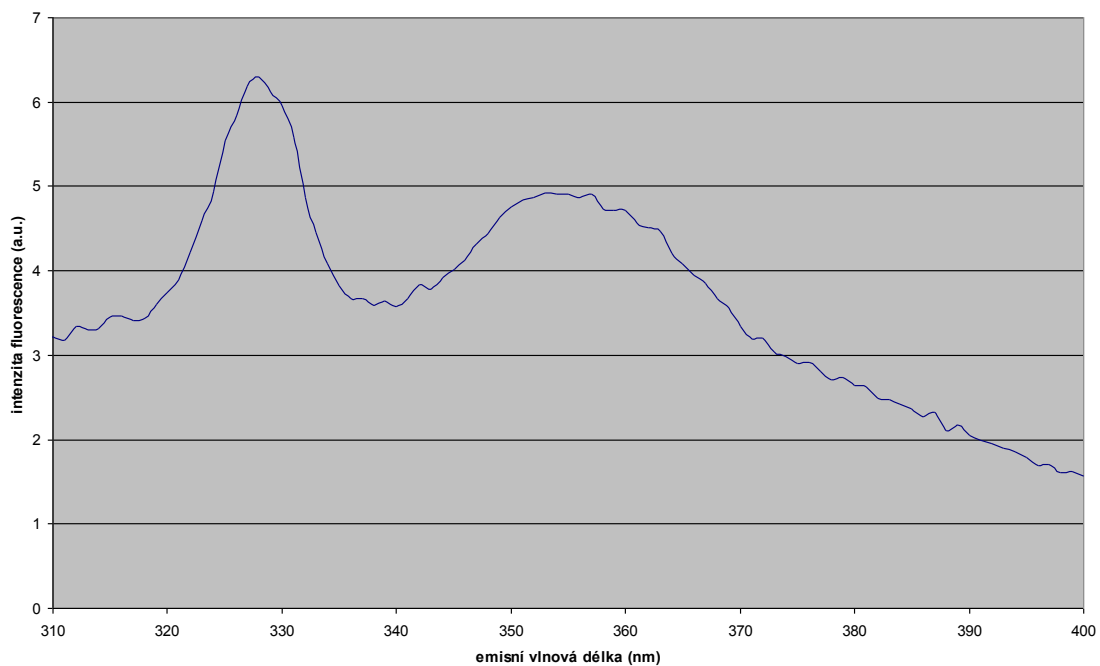


Obr. 27: Emisní spektrum vzorku OFZ ve směsích MET s borátovým pufrém o pH 9,95 v poměru naředění methanolický roztok OFZ/pufr 80/20 (vlnová délka excitace 270 nm).

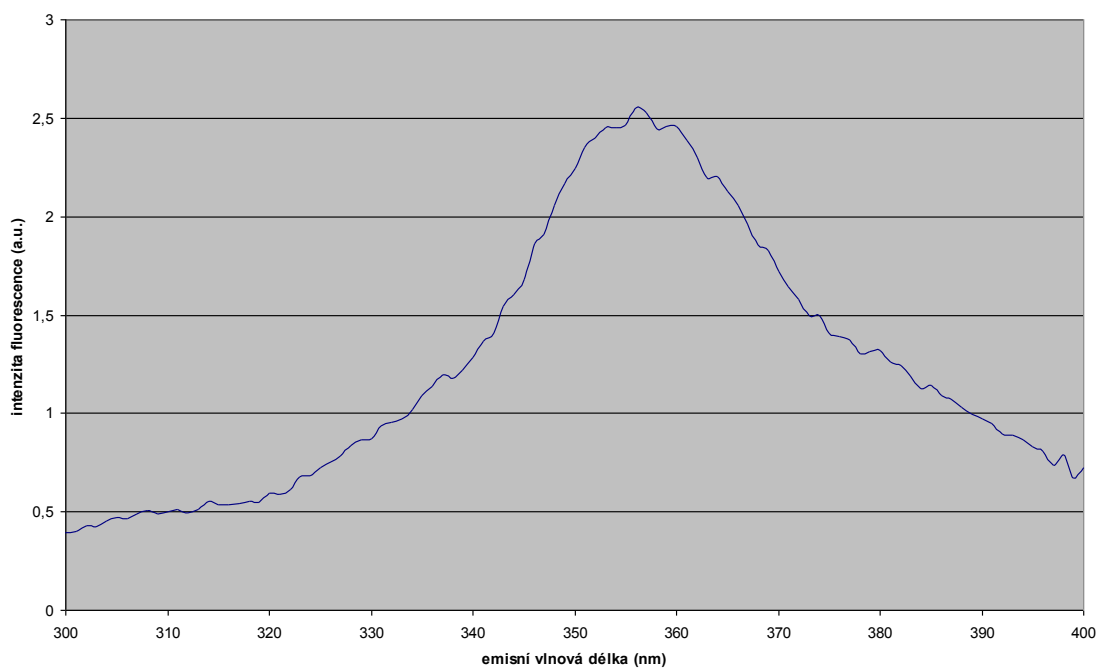
U OFZ rozpuštěného v MET jsme při různých naředěních borátovým pufrům našli fluorescenci při emisní vlnové délce 313 nm (viz obr. 23) a 312 nm (viz obr. 24, 26, 27). V prostředí ACN jsme pozorovali fluorescenci při emisní vlnové délce 318 nm při naředění v poměru acetonitrilový roztok OFZ/pufr 20/80 (viz obr. 22) a 340 nm při naředění v poměru acetonitrilový roztok OFZ/pufr 80/20 (viz obr. 25).

Tabulka 31: Zjištění Ramanova posunu FBZ ve směsích MET (ACN) s deionizovanou vodou.

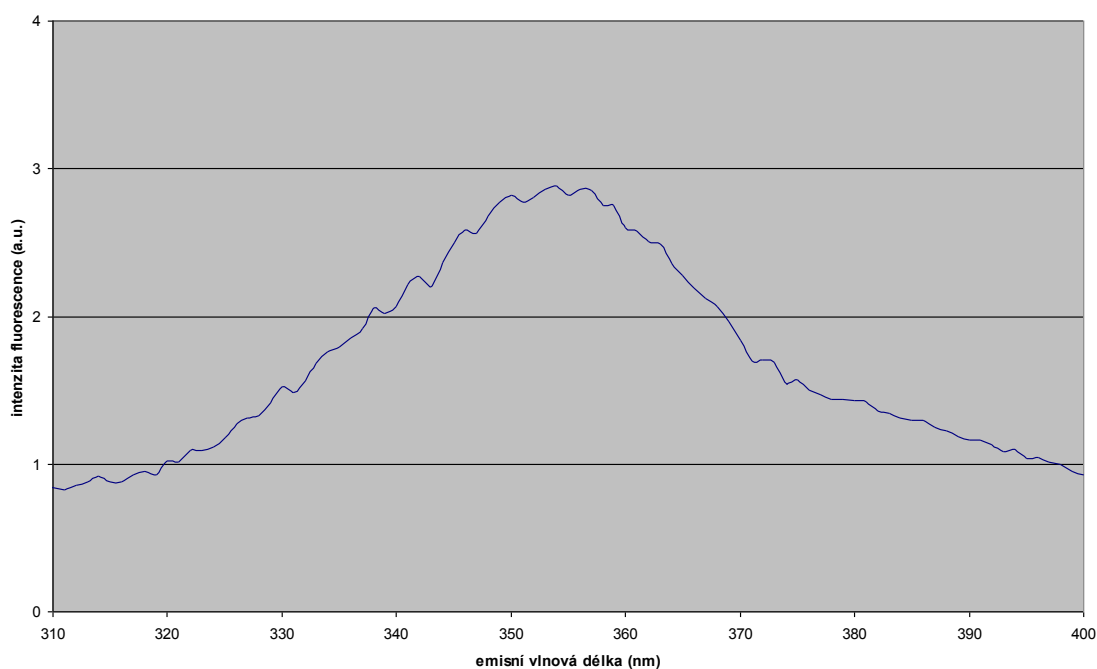
roztok FBZ/voda	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	$1/\lambda_{ex}-1/\lambda_{em}$ [nm ⁻¹]	rozpouštědlo
20/80	260	286	0,00035	ACN
20/80	260	357	0,00105	ACN
20/80	270	299	0,00036	ACN
20/80	270	357	0,00090	ACN
20/80	297	333	0,00036	ACN
20/80	297	357	0,00057	ACN
20/80	310	347	0,00034	ACN
20/80	310	357	0,00042	ACN
20/80	320	359	0,00034	ACN
20/80	260	286	0,00035	MET
20/80	260	357	0,00105	MET
20/80	270	298	0,00035	MET
20/80	270	358	0,00091	MET
20/80	295	328	0,00034	MET
20/80	295	358	0,00060	MET
20/80	310	347	0,00034	MET
20/80	320	359	0,00034	MET
40/60	260	286	0,00035	ACN
40/60	260	355	0,00103	ACN
40/60	270	298	0,00035	ACN
40/60	270	355	0,00089	ACN
40/60	295	331	0,00037	ACN
40/60	295	353	0,00056	ACN
40/60	310	349	0,00036	ACN
40/60	310	357	0,00042	ACN
40/60	260	285	0,00034	MET
40/60	260	354	0,00102	MET
40/60	270	298	0,00035	MET
40/60	270	355	0,00089	MET
40/60	295	328	0,00034	MET
40/60	295	354	0,00056	MET
40/60	320	359	0,00034	MET



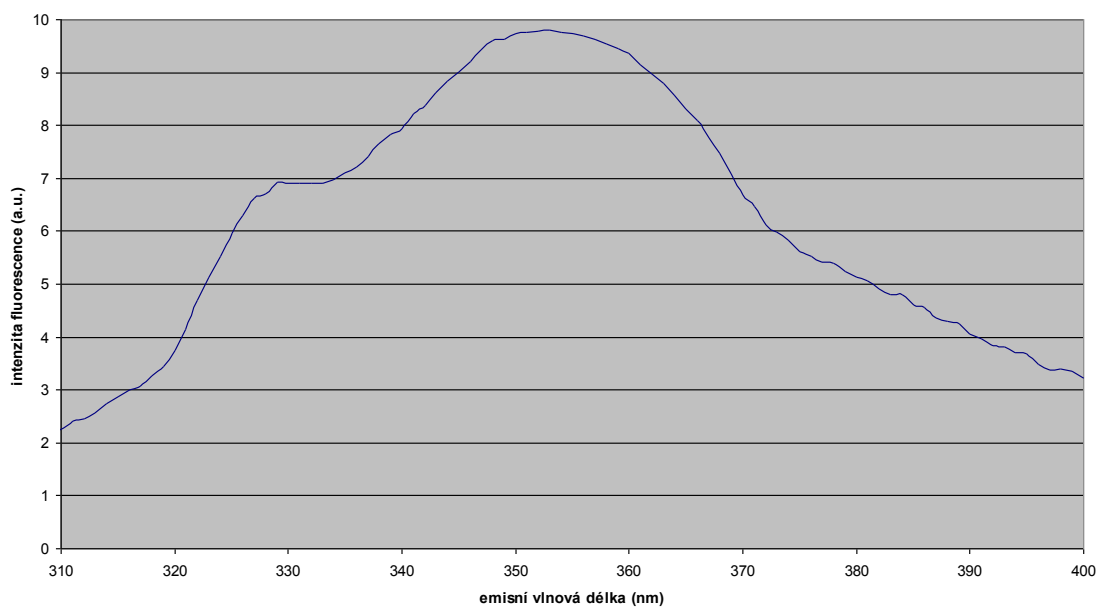
Obr. 28: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích MET s deionizovanou vodou v poměru naředění methanický roztok FBZ/voda 20/80 (vlnová délka excitace 295 nm).



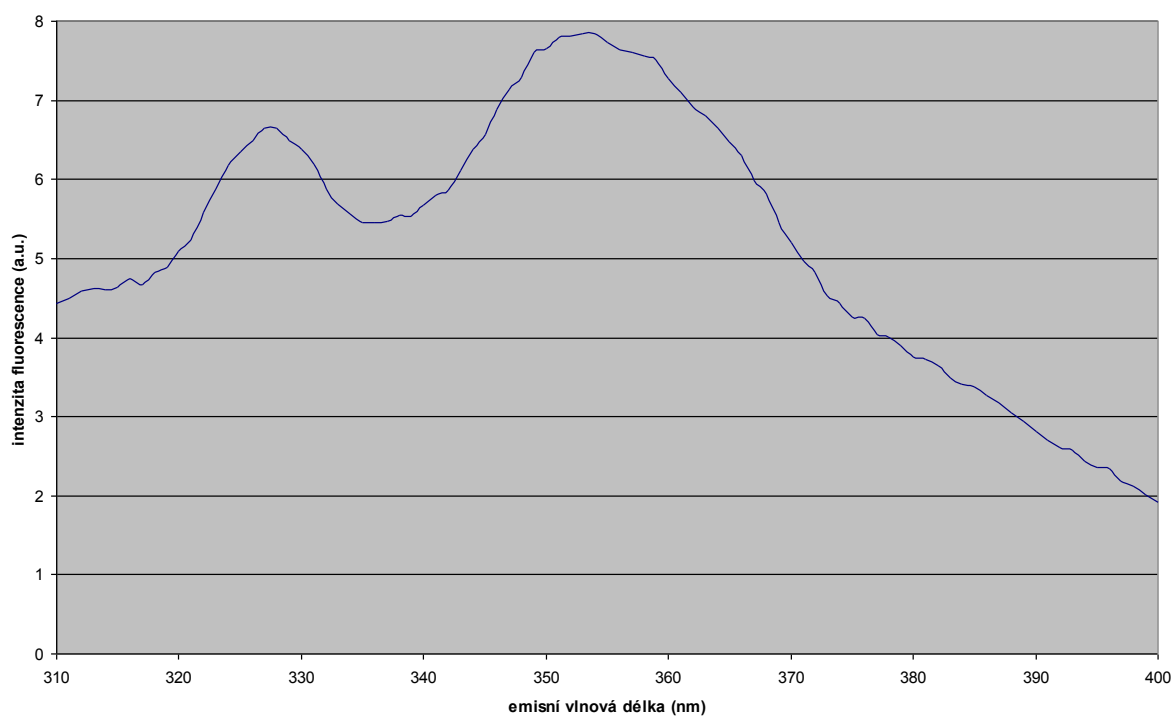
Obr. 29: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích ACN s deionizovanou vodou v poměru naředění acetonitrilový roztok FBZ/voda 20/80 (vlnová délka excitace 260 nm).



Obr. 30: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích ACN s deionizovanou vodou v poměru naředění acetonitrilový roztok FBZ/voda 40/60 (vlnová délka excitace 270 nm).



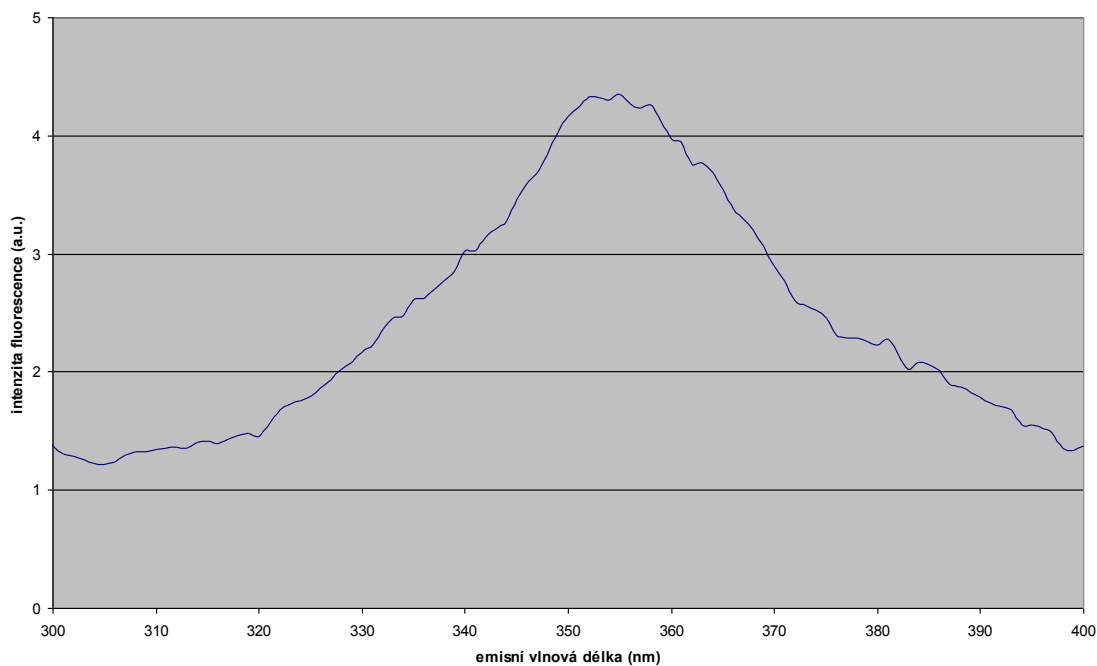
Obr. 31: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích ACN s deionizovanou vodou v poměru naředění acetonitrilový roztok FBZ/voda 40/60 (vlnová délka excitace 295 nm).



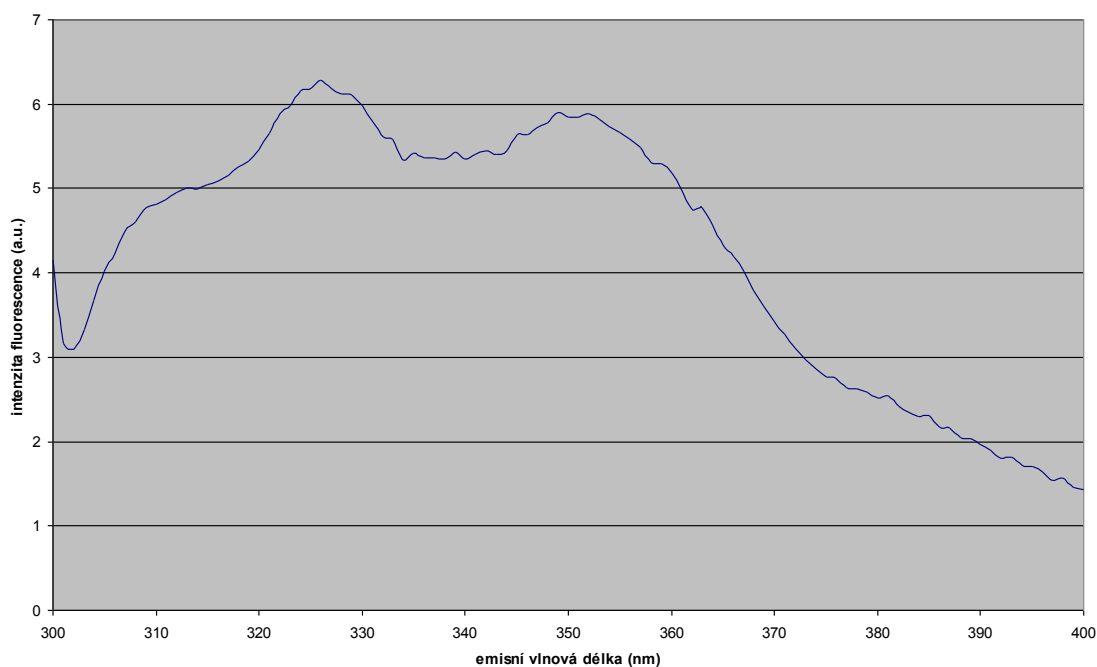
Obr. 32: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích MET s deionizovanou vodou v poměru naředění methanolický roztok OFZ/voda 40/60 (vlnová délka excitace 295 nm).

Tabulka 32: Zjištění Ramanova posunu OFZ ve směsích MET (ACN) s deionizovanou vodou.

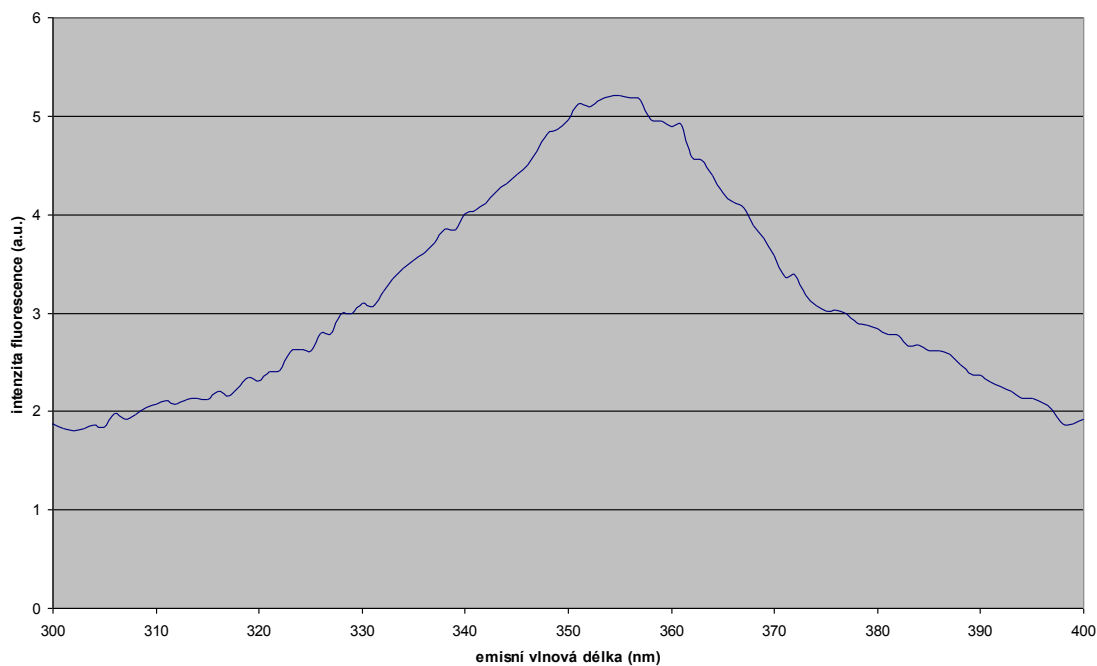
roztok FBZ/voda	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	$1/\lambda_{ex}-1/\lambda_{em}$ [nm ⁻¹]	rozpouštědlo
60/40	260	284	0,00033	ACN
60/40	260	355	0,00103	ACN
60/40	270	298	0,00035	ACN
60/40	270	355	0,00089	ACN
60/40	296	331	0,00036	ACN
60/40	296	355	0,00056	ACN
60/40	310	355	0,00041	ACN
60/40	270	354	0,00088	MET
60/40	270	298	0,00035	MET
60/40	295	327	0,00033	MET
60/40	295	352	0,00055	MET
60/40	310	347	0,00034	MET
60/40	320	357	0,00032	MET
80/20	270	297	0,00034	ACN
80/20	270	356	0,00089	ACN
80/20	295	324	0,00030	ACN
80/20	310	353	0,00039	ACN
80/20	296	351	0,00053	MET
80/20	296	329	0,00034	MET
80/20	260	285	0,00034	MET
80/20	260	352	0,00101	MET
80/20	270	298	0,00035	MET
80/20	270	352	0,00086	MET
80/20	310	346	0,00034	MET
80/20	320	354	0,00030	MET
100/0	260	284	0,00033	ACN
100/0	260	351	0,00100	ACN
100/0	270	295	0,00031	ACN
100/0	270	352	0,00086	ACN
100/0	310	346	0,00034	ACN
100/0	310	384	0,00062	ACN
100/0	260	342	0,00092	MET
100/0	296	341	0,00045	MET
100/0	310	343	0,00031	MET
100/0	320	345	0,00023	MET
100/0	320	353	0,00029	MET



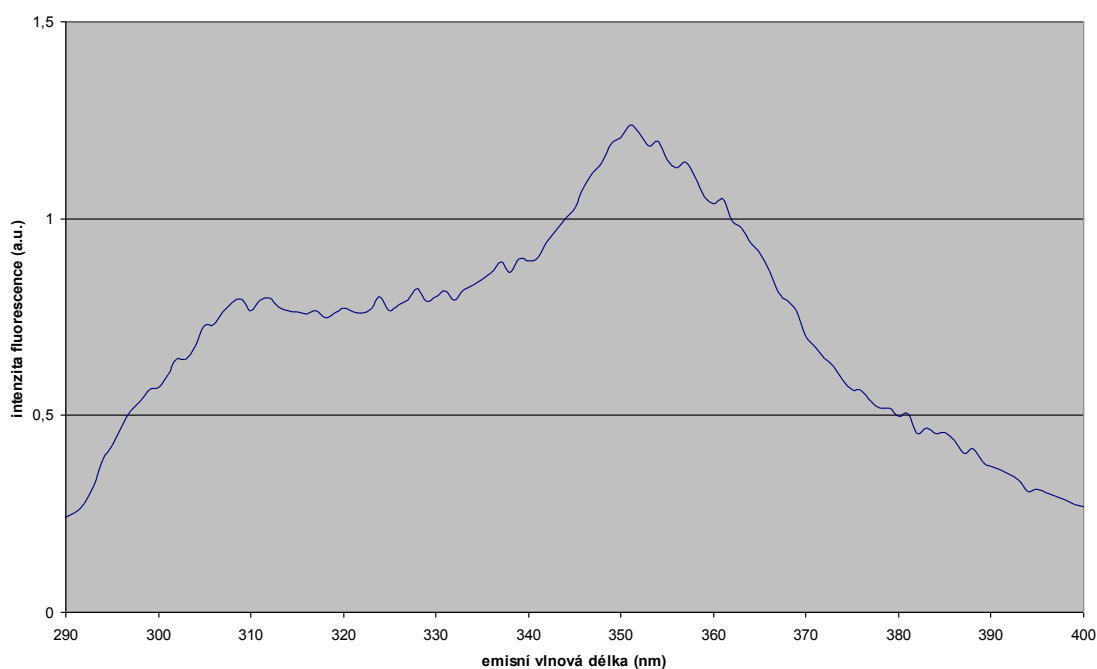
Obr. 33: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích ACN s deionizovanou vodou v poměru naředění acetonitrilový roztok FBZ/voda 60/40 (vlnová délka excitace 270 nm).



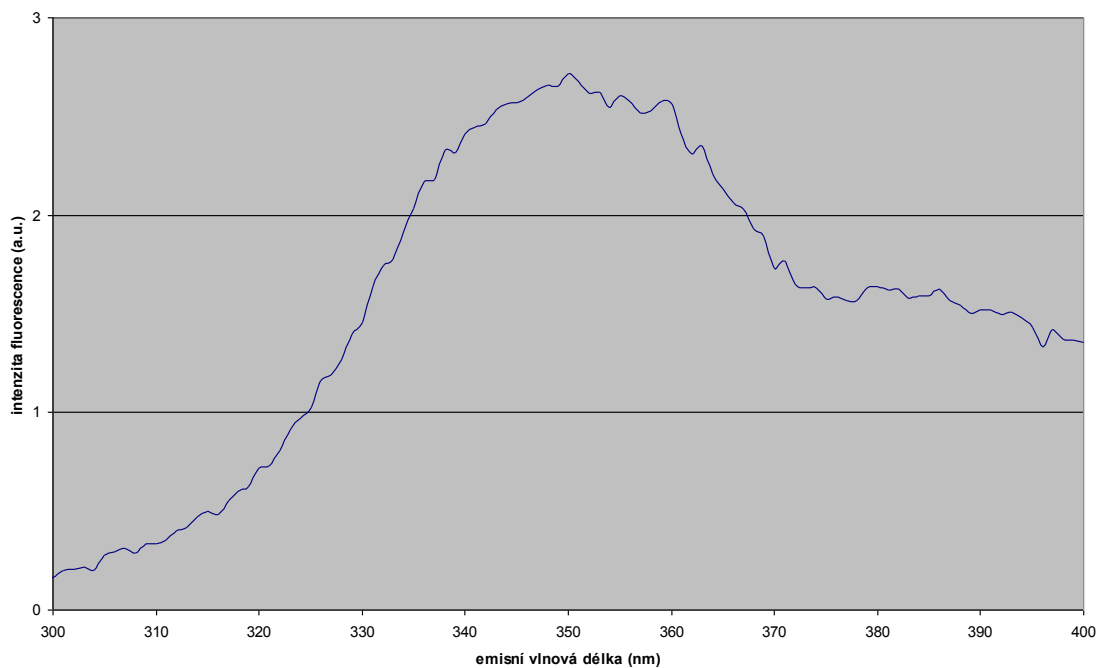
Obr. 34: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích MET s deionizovanou vodou v poměru naředění methanolický roztok FBZ/voda 60/40 (vlnová délka excitace 295 nm).



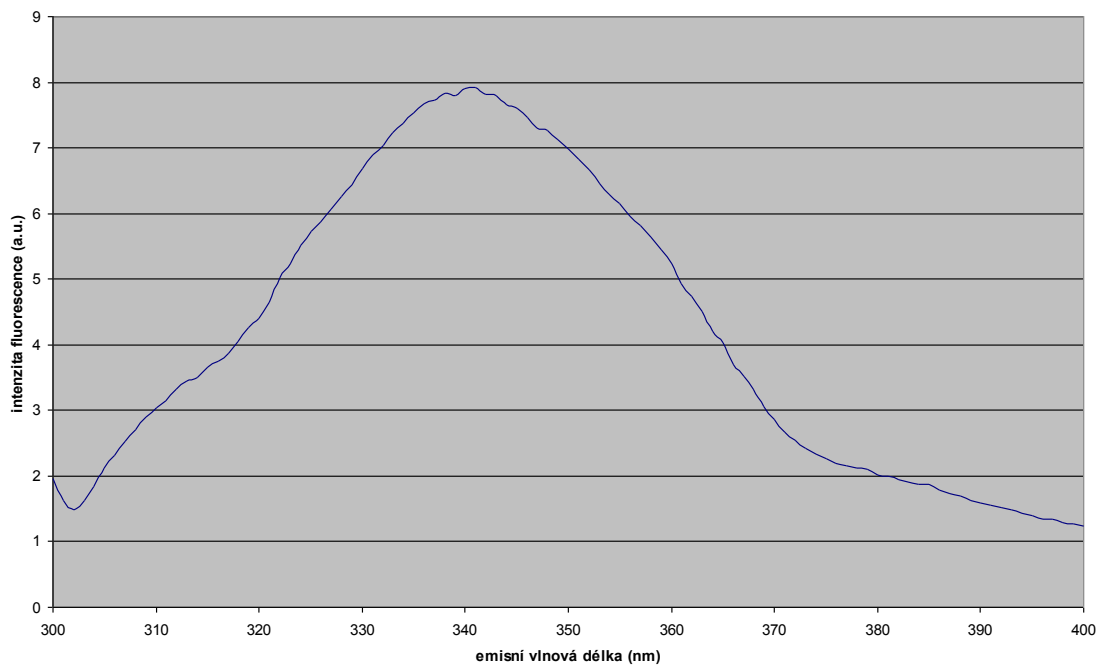
Obr. 35: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích ACN s deionizovanou vodou v poměru naředění acetonitrilový roztok FBZ/voda 80/20 (vlnová délka excitace 270 nm).



Obr. 36: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích MET s deionizovanou vodou v poměru naředění methanolický roztok FBZ/voda 80/20 (vlnová délka excitace 260 nm).



Obr. 37: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích ACN s deionizovanou vodou v poměru naředění acetonitrilový roztok FBZ/voda 100/0 (vlnová délka excitace 260 nm).

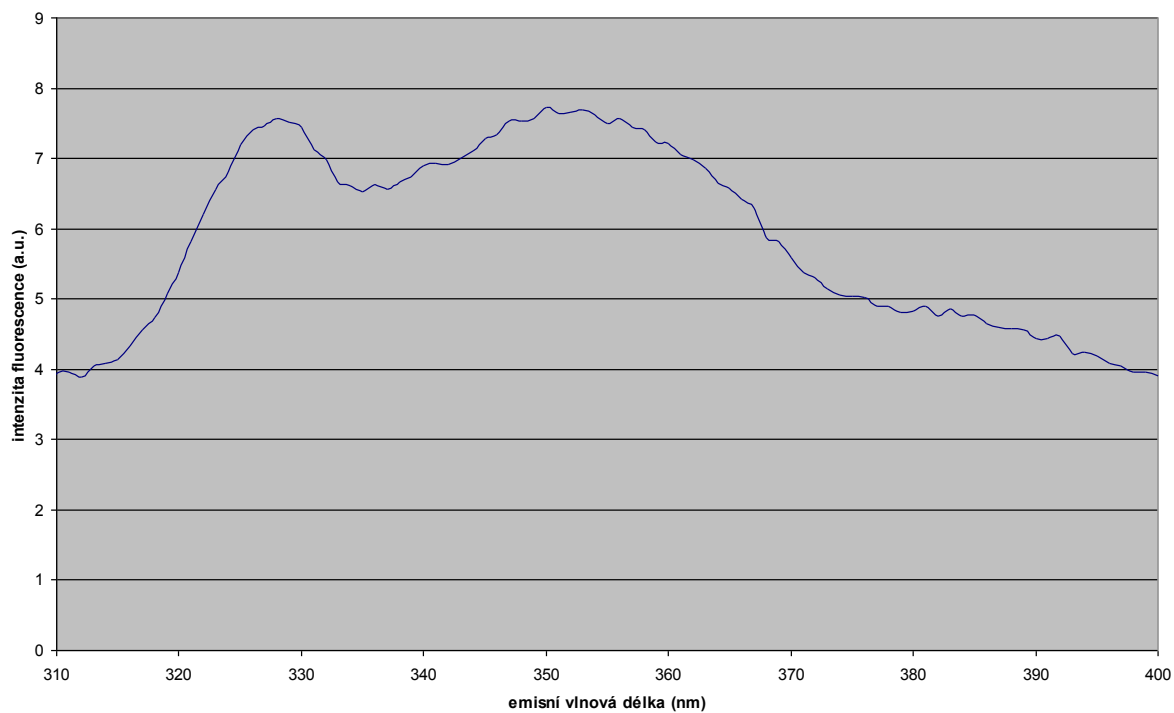


Obr. 38: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích MET s deionizovanou vodou v poměru naředění methanolický roztok FBZ/voda 100/0 (vlnová délka excitace 295 nm).

U FBZ ve směsi MET s deionizovanou vodou v poměru naředění methanolický roztok FBZ/voda 20/80 jsme našli fluorescenci při emisní vlnové délce 358 nm (viz obr. 28) a v poměru FBZ/voda 80/20 jsme změřili fluorescenci při emisní vlnové délce 352 nm (viz obr. 36). U naředění v poměru methanolický roztok FBZ/voda 40/60 a 60/40 jsme fluorescenci pozorovali při emisních vlnových délkách 355 nm a 353 nm. Ve směsi ACN s deionizovanou vodou naředěného v poměru acetonitrilový roztok FBZ/voda 20/80 jsme pozorovali fluorescenci při emisní vlnové délce 357 nm (viz obr. 29) a 355 nm v ostatních naředěních (viz obr. 30, 31, 33, 35). Nenaředěný roztok v MET vykazoval fluorescenci při emisní vlnové délce 341 nm (viz obr. 38) a v druhém rozpouštědle ACN jsme objevili fluorescenci při emisní vlnové délce 351 nm (viz obr. 37).

Tabulka 33: Zjištění Ramanova posunu FBZ ve směsích MET (ACN) s borátovým pufrům o pH 9,95.

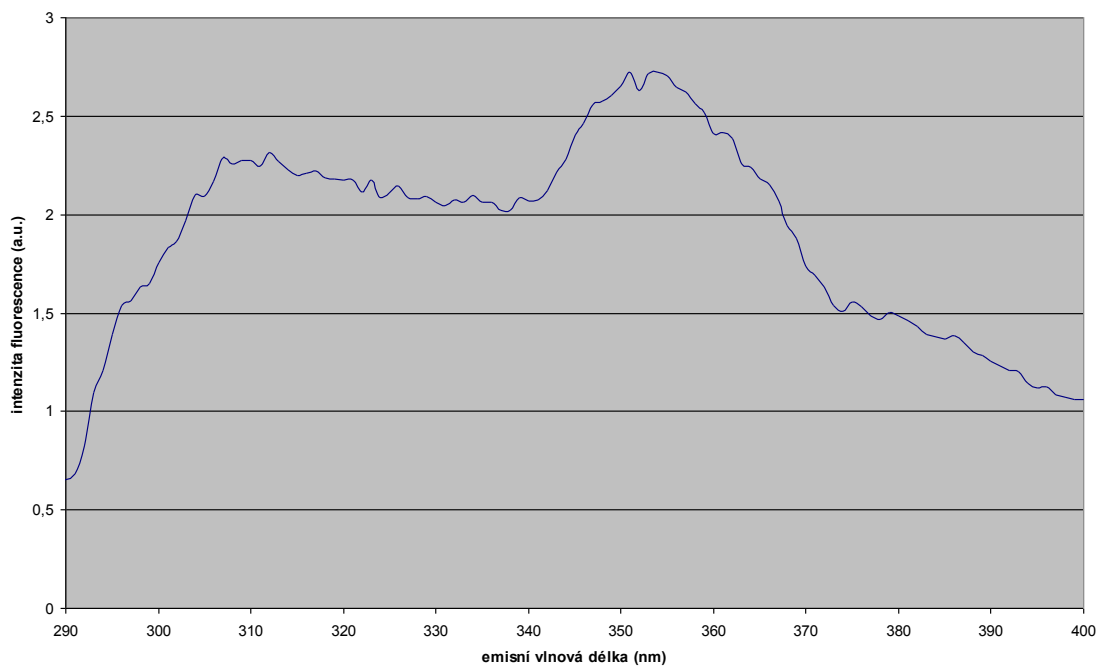
roztok FBZ/pufr	λ_{ex}/nm [nm]	λ_{em}/nm [nm]	$1/\lambda_{ex}-1/\lambda_{em}$ [nm ⁻¹]	rozpuštědlo
20/80	260	286	0,00035	ACN
20/80	270	297	0,00034	ACN
20/80	297	331	0,00035	ACN
20/80	310	347	0,00034	ACN
20/80	270	298	0,00035	MET
20/80	295	328	0,00034	MET
20/80	310	347	0,00034	MET
20/80	320	359	0,00034	MET
40/60	260	285	0,00034	ACN
40/60	270	297	0,00034	ACN
40/60	298	332	0,00034	ACN
40/60	310	346	0,00034	ACN
40/60	320	359	0,00034	ACN
40/60	270	298	0,00035	MET
40/60	270	354	0,00088	MET
40/60	295	328	0,00034	MET
40/60	295	353	0,00056	MET
40/60	310	348	0,00035	MET
40/60	320	359	0,00034	MET



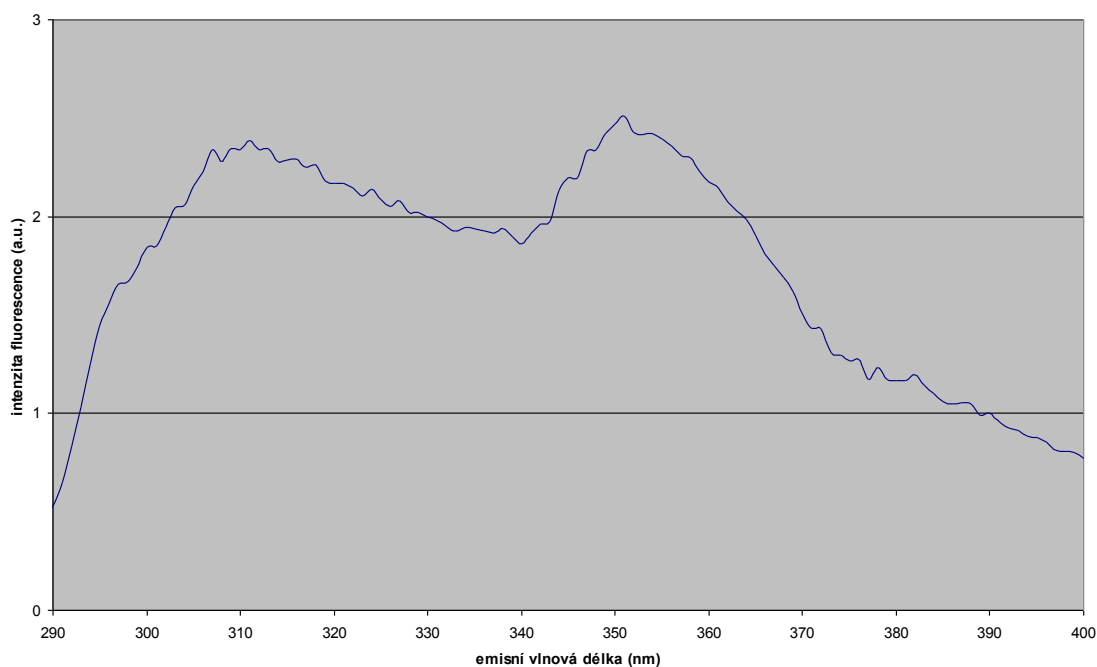
Obr. 39: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích MET s borátovým pufrém o pH 9,95 v poměru naředění methanolický roztok FBZ/pufr 40/60 (vlnová délka excitace 295 nm).

Tabulka 34: Zjištění Ramanova posunu FBZ ve směsích MET (ACN) s borátovým pufrům o pH 9,95.

roztok FBZ/pufr	λ_{ex}/nm [nm]	λ_{em}/nm [nm]	$1/\lambda_{ex}-1/\lambda_{em}$ [nm ⁻¹]	rozpuštědlo
60/40	260	285	0,00034	ACN
60/40	270	297	0,00034	ACN
60/40	295	329	0,00035	ACN
60/40	310	345	0,00033	ACN
60/40	320	357	0,00032	ACN
60/40	260	285	0,00034	MET
60/40	260	313	0,00065	MET
60/40	260	355	0,00103	MET
60/40	270	299	0,00036	MET
60/40	270	313	0,00051	MET
60/40	270	353	0,00087	MET
60/40	295	328	0,00034	MET
60/40	295	355	0,00057	MET
60/40	310	348	0,00035	MET
60/40	320	358	0,00033	MET
80/20	260	284	0,00033	ACN
80/20	270	295	0,00031	ACN
80/20	295	326	0,00032	ACN
80/20	310	343	0,00031	ACN
80/20	320	355	0,00031	ACN
80/20	260	313	0,00065	MET
80/20	260	351	0,00100	MET
80/20	270	299	0,00036	MET
80/20	270	312	0,00050	MET
80/20	270	353	0,00087	MET
80/20	296	328	0,00033	MET
80/20	296	354	0,00055	MET
80/20	310	350	0,00037	MET
80/20	320	357	0,00032	MET



Obr. 40: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích MET s borátovým pufrém o pH 9,95 v poměru naředění methanolický roztok FBZ/pufr 60/40 (vlnová délka excitace 295 nm).



Obr. 41: Emisní spektrum vzorku FBZ ve směsích MET s borátovým pufrém o pH 9,95 v poměru naředění methanolický roztok FBZ/pufr 80/20 (vlnová délka excitace 260 nm).

U FBZ ve směsi MET se zvyšujícím se podílem borátového pufru v poměrech methanolický roztok FBZ/pufr 40/60, 60/40 a 80/20 jsme našli fluorescenci při emisních vlnových délkách 353 nm (viz obr. 39), 355 nm (viz obr. 40) a 351 nm (viz obr. 41). FBZ ve směsi ACN s borátovým pufrem jsme fluorescenci nepozorovali. V tabulkách č. 27-34 tučně zvýrazněné hodnoty Ramanova posunu ukazují hodnoty excitačních a emisních vlnových délek fluorescence.

8. Diskuze

V této práci byl zjišťován vliv některých rozpouštědel, která jsou běžně používána jako mobilní fáze v kapalinové chromatografii, na fluorescenční spektra vybraných benzimidazolů. Práce tak navazuje na dřívější měření Lukešové [15], která zjišťovala chování benzimidazolů ve směsích MET (ACN) a kyselého fosfátového pufru (pH = 3,00). Byla naměřena excitační a emisní spektra roztoků jedenácti benzimidazolů rozpuštěných v ACN (MET) a ve směsích ACN (MET) s borátovým pufrem, fosfátovým pufrem a vodou. U zbývajících dvou benzimidazolů byla měření provedena v roztocích ACN (MET) a ve směsích ACN (MET) s vodou nebo borátovým pufrem. Z naměřených spekter byla odečtena excitační a emisní maxima. Hodnoty těchto maxim byly uspořádány do tabulek č. 5-34.

V první úloze bylo zjištěno, že u roztoků benzimidazolů byly naměřeny podobné hodnoty emisních vlnových délek, ať byly rozpuštěny v ACN nebo MET (viz obr. 2, 3, 4, 5, 8, 10). U ACN (MET) roztoků benzimidazolů byly naskenovány skoro totožné hodnoty excitačních maxim (viz. tab. 5-26). U čtyř látek ABZSO, TBZ, MBZ-R a OXI rozpuštěných v ACN byl pozorován malý posun k vyšším hodnotám maxima vlnové délky oproti roztokům rozpuštěným v MET (viz obr. 6, 7, 9, 11) a u roztoků ABZSO₂ tomu bylo naopak (viz obr. 12). Zde je třeba mít na paměti, že při skenování spekter byl používán krok 2 nm, proto jsou malé rozdíly v maximech (do 2 nm) nevýznamné. Celkově je příznivé, že zjištěné hodnoty emisních maxim se prakticky shodují s těmi, která zjistili Lukešová [15] a Kubiček [16]. Při porovnání hodnot emisních maxim ve směsích ACN (MET) a pufrů pozorujeme posun k vyšším hodnotám emisních maxim v prostředí borátového pufru oproti fosfátovému pufrem (viz tab. 5-26). Posun je způsoben acidobazickými vlastnostmi benzimidazolové struktury. Při bazičtějším pH 9,95 borátového pufru je dusík deprotonován. Tím dojde k ionizaci benzimidazolového jádra a k následnému bathochromnímu posunu [17].

V první úloze u všech 11 benzimidazolů rostla s přidavkem pufru hodnota emisních maxim v porovnání s metanolicými nebo acetonitrilovými roztoky bez přidavku pufru. S postupným naředováním pomocí borátového nebo fosfátového pufru se neposouvala emisní maxima s výjimkou methanolickeho roztoku ABZSO₂, u kterého se posunula emisní maxima k vyšším hodnotám s přidavkem borátového pufru o pH 9,95. Z obrázků č. 13, 14 je zřejmé, že s rostoucím přidavkem borátového pufru k roztoku ABZSO₂ se maximum emisní vlnové délky

posouvá k vyšším hodnotám. S rostoucím přídatkem fosfátového pufru k roztoku ABZSO₂ se emisní maximum vlnové délky nemění. Tento rozdíl je dost patrný z fluorescenčních spekter i z tabulek. To je zřejmě způsobeno interakcí volných elektronových párů substituentu (sulfonové skupiny) s aromatickým kruhem, což zesiluje bathochromní posun excitačních i emisních maxim [17].

Posun k vyšším hodnotám emisních délek byl lépe pozorován u látek, které obsahovaly v postranním řetězci atom síry v poloze 5 bezimidazolového jádra a tedy byly substituovány sulfanylovou, sulfinylovou a sulfonylovou skupinou. Tento bathochromní posun je dán konjugací dvojných vazeb aromatického cyklu se sulfinylovou skupinou a samozřejmě, jak bylo zmíněno interakcí volných elektronových párů substituentů [13], [14].

Z výsledků první úlohy vyplývá, že při fluorescenčních měřeních v prostředí směsi ACN (MET) a fosfátového pufru o pH 7,00 nemá změna poměru obou komponent rozpouštědla žádný výrazný vliv na hodnoty vlnových délek emisních maxim. Není proto třeba se obávat změny citlivosti fluorimetrického měření nebo detekce u HPLC při změnách zmíněného poměru složek rozpouštědla. Naopak při měření v prostředí směsi ACN (MET) a borátového pufru o pH 9,95 je třeba v takovém případě provést ověření vlnových délek emisních maxim.

V druhé úloze byl zjišťován Ramanův posun u OFZ a FBZ ve směsích ACN (MET) s vodou nebo borátovým pufrem, a to v poměrech roztoků OFZ (FBZ)/pufr 20/80, 40/60, 60/40, 80/20. Tato měření si vyžádaly předchozí zkušenosti s roztoky obou látek, kdy nebyly zejména u OFZ nalezeny vhodné podmínky pro fluorescenční detekci u HPLC. Vhodné podmínky byly určeny odečtením převrácených hodnot excitační a emisních maxim a z těchto hodnot Ramanova posunu jsme určili, zda se jedná o fluorescenci. Vychylující hodnoty od 0,0003 nm⁻¹ znamenaly možnost fluorescence jednotlivých benzimidazolů. Vhodné podmínky fluorescenční detekce lze odečíst z tabulek č. 27-34. Fluorescence se vyskytovala u methanolických roztoků OFZ při emisní vlnové délce 313nm s hodnotami Ramanova posunu okolo 0,0006 nm⁻¹ při excitační vlnové délce 260 nm a u methanolických roztoků FBZ při emisní vlnové délce 355 nm s hodnotami Ramanova posunu okolo 0,0009 nm⁻¹ při excitační vlnové délce 270 nm. Posun je způsoben acidobazickými vlastnostmi benzimidazolové struktury OFZ a FBZ. Při bazičtějším pH 9,95 dochází k ionizaci benzimidazolového jádra a k následnému bathochromnímu posunu. Sulfonová skupina u OFZ ovlivňuje bathochromní posun emisních maxim. Tento posun emisních maxim je dán interakcí volných elektronových párů sulfinylové skupiny a aromatického cyklu. Z výsledků druhé úlohy

vyplývá, že menší vliv na emisní vlnové délky má změna poměru obou komponent rozpouštědla v roztocích, které obsahují MET.

9. Závěr

Pomocí UV-VIS a fluorescenční spektroskopie bylo studováno třináct benzimidazolů (2-aminobenzimidazol, karbendazim, redukovaný flubendazol, redukovaný thiabendazol, thiabendazol, oxibendazol, redukovaný mebendazol, benomyl, fenbendazol, oxfendazol, albendazol, albendazolsulfoxid, albendazolsulfon). Byla porovnána absorpční a fluorescenční spektra jednotlivých benzimidazolů v různých prostředích a nalezena excitační a emisní maxima v těchto prostředích, která přicházejí v úvahu jako mobilní fáze v kapalinové chromatografii.

Výsledky dosažené v této práci mohou sloužit k porovnání emisních spekter studovaných benzimidazolů. Dále mohou být považovány za základ k sestavení spektrálních knihoven a přehledu excitačních a emisních maxim, ze kterých by bylo možné odhadnout vhodné detekční podmínky v kapalinové chromatografii benzimidazolů.

10. Literatura

- [1] Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: Spektrometrické analytické metody I, Karolinum - nakladatelství Univerzity Karlovy, Praha, 1997.
- [2] Valeur B.: Molecular Fluorescence, Principles and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 2001.
- [3] Danaher M., De Ruyck H., Crooks S.R.H., Dowling G., O’Keeffe M.: J. Chromatogr. B, 845 (2007) 1-37.
- [4] Káš J., Kodíček M., Valentová O.: Laboratorní techniky biochemie. VŠCHT, Praha, 2005.
- [5] Lakowicz J. P.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer Science Business Media LLC, New York, 2006.
- [6] Lamka J., Ducháček L.: Veterinární léčiva pro posluchače farmacie 2. vydání. Univerzita Karlova Praha, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 1998.
- [7] Lincová D., Farghali H.: Základní a aplikovaná farmakologie 2. doplněné a přepracované vydání. Galén, Praha, 2007.
- [8] Majer J. a kolektiv: Analytická chémie. Osveta, Slovensko, 1989.
- [9] Lochman J., Kotrlý A., Hromas J.: Dutorohá zvěř 1. vydání. SZN, Praha, 1979.
- [10] <http://www.chemweb.estranky.cz/clanky/ksicht---serial/spektrofotometrie-ve-viditelne-oblasti-spektra.html>
- [11] http://www.whocc.no/atc/structure_and_principles/

[12] <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>

[13] Gibault G. G. (ed): Practical Fluorescence. Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong 1990.

[14] Birks J. B.: Photophysics of Aromatic Molecules. Wiley-Interscience, London, New York, Sydney, Toronto, 1970.

[15] Lukešová M.: Diplomová práce, Univerzita Karlova Praha, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra biofyziky a fyzikální chemie, 2010.

[16] Kubíček V., Lukešová M., Uhlářová T., Skálová L., Szotáková B.: Porovnání fluorescenčních spekter vybraných benzimidazolů měřených v prostředí metanolu a acetonitrilu. Poster na 38. konferenci Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové, 14. – 16. 9. 2009.

[17] Kostrhounová R.: Disertační práce, VUT Brno, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, 2002.