

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Hana Krouská

HPLC STUDIE CHEMICKÝCH REAKCÍ

HPLC study of chemical reactions

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Anna Kubičková, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. srpna 2015.

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Anně Kubíčkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a čas, který mi věnovala v průběhu mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala doc. RNDr. Vojtovi Kubíčkoví a RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za pomoc při LC-MS měření.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za veškerou podporu během studia.

Abstrakt

V této práci byla studována hydrolyza fenylisothiokyanátu a následný samovolný rozpad difenylthiomočoviny. Pro sledování těchto reakcí byla vybrána metoda RP-HPLC s UV detekcí. Byla vyvinuta metoda isokratické eluce, kde bylo optimalizováno složení mobilní fáze a rychlost průtoku. Rozpad fenylisothiokyanátu ve vodném prostředí byl sledován v závislosti na pH a na teplotě reakce. Následný samovolný rozpad difenylthiomočoviny byl sledován při teplotě 80 °C a v závislosti na pH.

Abstract

In this work hydrolysis of phenylisothiocyanate and subsequent decomposition of diphenylthiourea were studied. RP-HPLC with UV detection was selected for monitoring of these reactions. The new method of isocratic elution was developed and mobile phase composition and flow rate were optimized. Hydrolysis of isothiocyanate was studied as a function of pH and reaction temperature. The subsequent decomposition of diphenylthiourea was carried out at 80 °C depending on the pH.

Klíčová slova

chemická kinetika

vysokoučinná kapalinová chromatografie

spojovací reakce

fenylisothiokyanát

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů.....	8
1 Úvod.....	9
2 Teoretická část.....	11
2.1 Cílená léčba (Targeted therapy).....	11
2.2 Isothiokyanáty a jejich reakce s aminy.....	13
2.2.1 Fenylisothiokyanát.....	14
2.3 Difenylthiomocovina (DPTU).....	15
2.4 Reaktivita ITC a hydrolýza fenylisothiokyanátu.....	16
2.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie a detekce.....	18
2.6 Separace a detekce isothiokyanátů pomocí HPLC-UV.....	18
2.7 Chemická kinetika.....	19
2.7.1 Reakce 1. řádu.....	20
2.7.2 Reakce pseudo-prvního řádu.....	21
2.7.3 Poločas rozpadu.....	21
3 Experimentální část.....	22
3.1 Přístrojové vybavení.....	22
3.2 Použité chemikálie.....	22
3.3 Příprava vzorků a pufrů.....	23
3.3.1 Příprava vzorků pro vývoj metody.....	23
3.3.2 Příprava pufrů a vzorků pro hydrolýzy PITC a rozpadu DPTU.....	23
3.3.3 Příprava vzorků pro kalibrační závislost.....	24
3.4 Experimentální podmínky a mobilní fáze.....	25
4 Výsledky a diskuse.....	26
4.1 Vývoj metody separace isokratickou elucí.....	26
4.2 Kalibrační závislosti.....	28

4.3	Studium hydrolýzy PITC	29
4.3.1	Výběr vhodných pufrů a rozpouštění PITC v dioxanu a pufru	29
4.3.2	Studium hydrolýzy v závislosti na teplotě a pH	29
4.3.2.1	Studium hydrolýzy PITC v závislosti na pH	30
4.3.2.2	Studium hydrolýzy PITC v závislosti na teplotě	34
4.3.3	Porovnání hydrolýzy PITC v závislosti na pH a v závislosti na teplotě.....	36
4.4	Studium rozpadu DPTU v závislosti na pH.....	37
5	Závěr	41
	Literatura	42

Seznam použitých zkratk a symbolů

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
C ₁₈	oktadecylová stacionární fáze
c_i	koncentrace látky i
DPTU	difenylthiomočovina
ESI	ionizace elektrosprejem
GS-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
ITC	isothiokyanáty
MOPS	(3-[N-morfolino]propansulfonová kyselina)
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
PITC	fenylisothiokyanát
R	postranní řetězec
R ²	korelační koeficient
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází
TEA	triethylamin
t	čas
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast záření
v/v	objemová procenta
v_i	stechiometrický koeficient látky i
v	reakční rychlost
V	objem
ζ	změna látkového množství látky

1 Úvod

V současné době zhoubná nádorová onemocnění představují závažný celosvětový problém. Do minulého století byla nádorová onemocnění pomíjena pro nedostatek informací o tomto onemocnění a medicína se soustředovala na léčbu především infekčních smrtících onemocnění. Do 20. let 20. století byla chirurgická léčba jedinou protinádorovou léčebnou metodou. Její možnosti byly značně omezené. Objev a využití rentgenových paprsků v medicíně představoval nový způsob léčby nádorů, vznikl tím nový medicínský obor radioterapie. Oba typy léčby se s postupem času zdokonalovaly. Onkologická chirurgie se stávala odvážnější a radikálnější a ozařovací technika postupně zaváděla nové zdroje ionizujícího záření. Radioterapie se zdokonalovala ve větší účinnosti zásahu na nádor a s menším zásahem poškození na normální tkáni. Ve 40. letech minulého století se začaly objevovat začátky nové léčebné metody tzv. chemoterapie, která byla brána jako doplňková metoda a postupně během 60. let se z ní stala jedna z hlavních léčebných metod. Chemoterapie nově umožňovala systémový léčebný účinek na rozdíl od chirurgické léčby a radioterapie.

Díky novým poznatkům o mechanismu kancerogeneze a patofyziologie nádorových onemocnění došlo k rozvoji vývoje a syntézy nových chemických sloučenin, které mají cíleně blokovat nitrobuněčné pochody nádorových buněk. Takto vznikla nová disciplína, tzv. cílená terapie a stala se součástí komplexní protinádorové léčby. Tato nová cílená terapie má za úkol zvýšit selektivitu vůči nádorovým buňkám a odstranit nežádoucí účinky léčby, které mají dosud známé aplikované metody léčby [1, 2].

Molekuly těchto tzv. cílených neboli chytrých léčiv obsahují terapeutickou část a složku, která se dokáže vázat na postiženou tkáň. Toto propojení probíhá přes tzv. spojovací reakce, kdy dochází k reakci reaktivních funkčních skupin přítomných v jednotlivých složkách [3].

Tato diplomová práce je zaměřena na vedlejší reakce spojovací techniky, která je jednou z nejběžněji používaných. Jedná se o spojovací techniku molekuly obsahující isothiokyanátovou skupinu s molekulou obsahující amino skupinu, což mohou být např. téměř všechny bílkoviny nebo peptidy a řada dalších makromolekul. Vedlejší reakce isothiokyanátů např. s vodou nebo alkoholy jsou nevýhody této reakce, kterých se není možno zcela vyvarovat. Vedlejší reakce s alkoholy byla studována v bakalářské

práci [4]. V rámci této práce je zkoumána hydrolýza isothiokyanátu a následný rozpad vzniklé R-thiomočoviny. Fenyliisothiokyanát byl zvolen jako zástupce isothiokyanátů pro podrobnější studování spojovací (konjugační) reakce. V této práci je studováno, jaký vliv má pH a teplota na hydrolýzu fenyliisothiokyanátu. Výše zmíněná reakce byla sledována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí (HPLC-UV).

2 Teoretická část

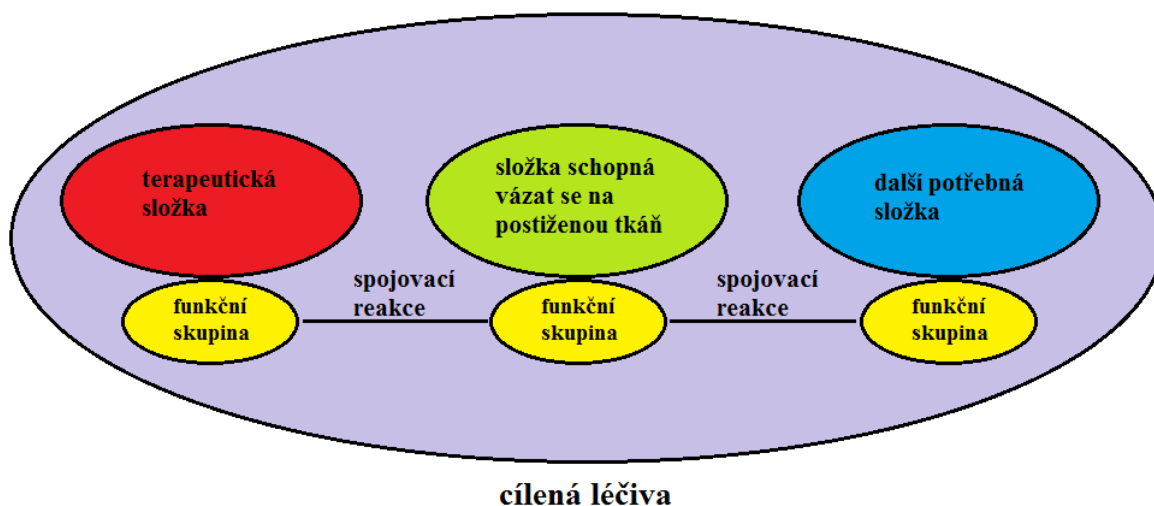
2.1 Cílená léčba (Targeted therapy)

Obor cílené terapie se začal rozvíjet na rozhraní makromolekulární chemie, farmakologie, biologie a medicíny. Zabývá se vývojem systémů a lékových forem, které umožňují cílený transport léčiv a jejich řízené uvolňování. Tyto systémy jsou založeny na využití makromolekulárních látek a to buď přírodních nebo častěji používaných syntetických polymerů [5].

Rozdíl mezi nádorovou a zdravou buňkou je velmi malý. Proto v současné době při dostupné léčbě dochází vedle působení na patologické tkáně také k zasažení zdravé tkáně. Cílené směřování léčiva, tzv. targeting, do postiženého místa umožňuje efektivnější léčbu, jak ve snížení nežádoucích účinků, tak i v prodloužení doby léčiva v krevním oběhu a delšího působení v těle člověka. Uvolnění léčiva v místě působení má výhodu i v tom, že stačí nižší koncentrace léčivé dávky, což znamená, že organismus je i toxicky méně zasažen. Oproti chemoterapii, kde je organismus velmi toxicky zasažen [3, 6-9].

Kompletní cílené léčivo by mělo splňovat tyto vlastnosti: rychlé vstřebávání v organismu, rychlý transport k postižené tkáni, pevnost vazby na plazmatické a tkáňové bílkoviny, schopnost léčiva nepodléhat biotransformačním přeměnám, snadné vylučování substance léčiva i metabolitů z organismu a vysoký terapeutický index, nebo-li vysoký léčebný účinek [8, 10].

Cílené léčivo se skládá z částí, které mají různé specifické vlastnosti, např. složku pro vyhledání a rozpoznání postiženého místa, terapeutickou složku, snadno detekovatelnou složku, která poskytuje informace o koncentraci léčiva v organismu a další potřebné složky pro danou léčbu (Obr. 1) [3, 6-8, 11]. Spojením jednotlivých složek vzniká nová sloučenina, která má kombinované vlastnosti jednotlivých částí [11].



Obr. 1: Schéma cíleného léčiva

Byla vyvinuta celá řada typů nosičů cílených léčiv, založených na rozpustných polymerech (mikročástice, dendrimery), liposomech, nanočásticích a polymerních micelách. Mezi perspektivní lékové formy patří také komplexy s polymery [8]. V současnosti jsou nejvíce vyvíjena cytostatická cílená léčiva, z důvodů častých výskytů rakoviny, málo účinné léčby a vysoké úmrtnosti [6-8, 10, 11]. Přes intenzivní výzkum prováděný v posledních letech je většina projektů ve stadiu laboratorních, předklinických a klinických zkoušek. Schválených cílených léčiv používaných v medicíně v současné době je jen několik. Např. léčiva Cremophor ELTM, CaelyxTM nebo TheraSphereTM jsou ve fázi klinických zkoušek [8].

K přípravě cíleného léčiva se využívá tzv. spojovacích reakcí nebo též konjugačních reakcí. Jednotlivé části cíleného léčiva jsou spojeny reakcí vhodných funkčních skupin, které jsou přítomné v jednotlivých složkách. K těmto reakcím může docházet u sloučenin, které obsahují reaktivní funkční skupinu např. aminovou, hydroxylovou, sulfanylovou, karbonylovou nebo karboxylovou.

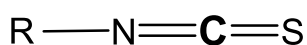
Správné zvolení a proběhnutí spojovací reakce je velmi důležité např. při vzniku vazby mezi terapeutickou a navigační složkou, která vyhledává postiženou tkáň. Tato spojovací reakce musí zajistit dostatečnou vazbu mezi jednotlivými složkami, nesmí porušit schopnost vazby navigační molekuly na její receptory a také nesmí dovést k uvolnění terapeutické složky z výsledného konjugátu před dosažením postižené tkáně [2]. Ideální spojovací reakce by měla poskytovat vysoký výtěžek bez vedlejších

produktů a měla by být rychlá. Znalost vlastností jednotlivých molekul či struktur přispívá ke vhodnému sestavení a přípravě cíleného léčiva [3].

2.2 Isothiokyanáty a jejich reakce s aminy

Isothiokyanáty (ITC), označované také triviálním názvem jako hořčičné oleje, mají charakteristickou skupinu $-N=C=S$ [12]. Tyto látky se vyskytují přirozeně a mají charakteristické chutě a pachy. Můžeme je nalézt buď ve volné formě nebo ve formě glukosinolátů v řadě vyšších rostlin a v brukvovité zelenině z čeledi Brassicaceae, jako je brokolice, zelí, křen, ředkvičky, řepa, řeřicha a růžičková kapusta. Lze je získat i volnou enzymatickou hydrolyzou nebo chemickou přeměnou z glukosinolátů [13, 14]. ITC jsou úspěšně používány v chemii bílkovin například pro stanovení primární struktury proteinů a peptidů, protože reagují s aminoskupinami těchto látek [15]. Tato skupina látek vykazuje řadu toxických a farmakologických aktivit, mezi které patří například antibakteriální, antimykotické a antiprotozoální schopnosti, goitrogenická činnost, cytotoxicita, indukční chromozomální abnormalita, blokování chemické karcinogeneze a schopnost přitahovat nebo odpuzovat hmyz. Jsou také zkoumány jako možní chemopreventivní zástupci pro konkrétní druhy lidské rakoviny, jelikož brání rozvoji nádorů [16].

Při reakci isothiokyanátu s aminem dochází k ataku nukleofilu na centrálním, elektrofilním uhlíku v isothiokyanátové skupině. Tento uhlík je znázorněn tučným písmem v obrázku 2.



Obr. 2: Elektrofilní uhlík v isothiokyanátové skupině

Dochází k výslednému elektronovému posunu a ztrátě protonu a tím vzniká substituovaná thiomocovina (schéma 1).

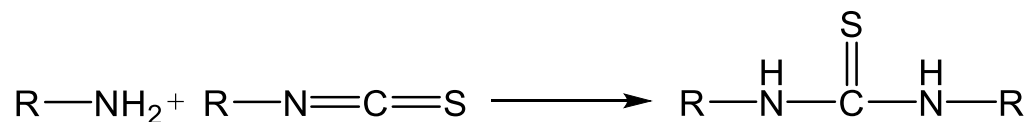
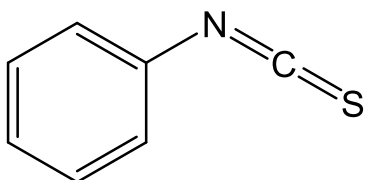


Schéma 1: Reakce aminu s isothiokyanátem

Isothiokyanáty jsou obecně málo stabilní ve vodném prostředí, proto je jejich skladování náročnější a musí se skladovat sušené v chladicím nebo mrazicím zařízení [3, 12, 17, 18].

2.2.1 Fenyliothiokyanát

Fenyliothiokyanát (PITC) má molekulární vzorec $\text{C}_6\text{H}_5\text{NCS}$ a je derivátem benzenu (Obr. 3). Jedná se o bezbarvou kapalinu dráždivého zápachu, kterou lze rozpustit v etheru nebo alkoholu. Ve vodě je omezeně rozpustný a snadno se odpařuje s vodní párou [19].

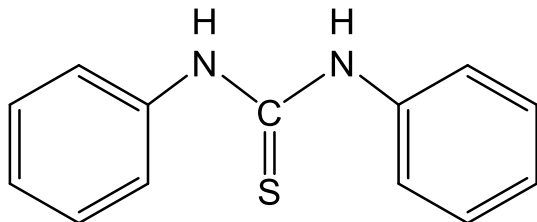


Obr. 3: Fenyliothiokyanát

V analytické chemii se fenyliothiokyanát často používá pro předkolonovou derivatizaci primárních nebo sekundárních aminů a aminokyselin. Tyto aminy a aminokyseliny se poté stanovují na reverzní fázi HPLC s UV detekcí jako deriváty fenylothiokarbamoylu aminokyselin [20, 21].

2.3 Difenylthiomočovina (DPTU)

Difenylthiomočovina (DPTU) neboli thiokarbamilid (obr. 4) je bílý až světle růžový prášek.



Obr. 4: Difenylthiomočovina

DPTU se používá jako urychlovač vulkanizace. DPTU je součástí pryžových a plastových výrobků, kde se používá jako stabilizátor při výrobě polyvinylchloridu (PVC) a jako urychlovač při výrobě neoprenu. Její rozsáhlé používání dokazují i zprávy z oblasti alergologie, jelikož může vyvolat kontaktní dermatitidu na DPTU, například z kontaktu lidské kůže s ortopedickou ortézou [22-25].

Připravuje se zahříváním anilinu se sirouhlíkem. V prvním kroku vzniká fenyldithiokarbaman anilínu. Po delším zahřívání karbamanu dojde k rozkladu na N,N'-difenylthiomočovinu a sirovodík. Thiomočovina se tepelným rozkladem může rozkládat na reaktivní isothiokyanát a vzniká také při hydrolýze isothiokyanátů.

DPTU se ve vodném prostředí hydrolyzuje na anilin a thiokarbamovou kyselinu, která se následně rozkládá na další anilin a thiouhličitan. Rozpadem DPTU vznikají dva aniliny a thiouhličitan (schéma 2) [26].

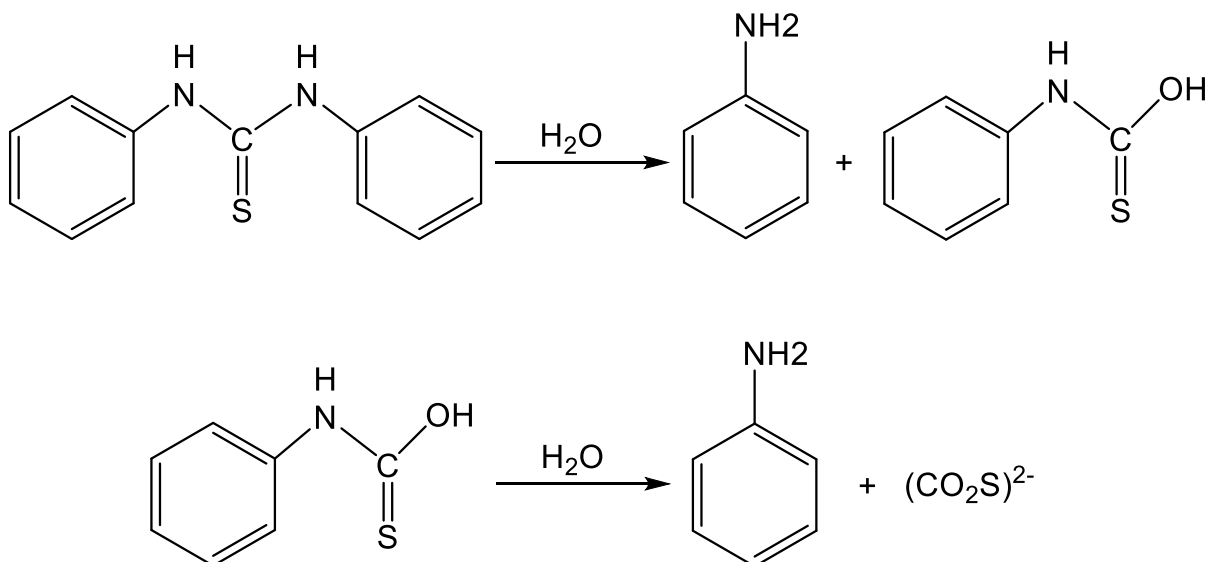


Schéma 2: Hydrolýza DPTU

2.4 Reaktivita ITC a hydrolýza fenyliothiokyanátu

Centrální elektrofilní atom uhlíku isothiokyanátů ve skupině – N=C=S reaguje rychle s nukleofilními skupinami obsahující síru, kyslík a dusík. Vznikají tak dithiokarbamáty, thiokarbamáty a thiomocovinové deriváty (schéma 3) [27].

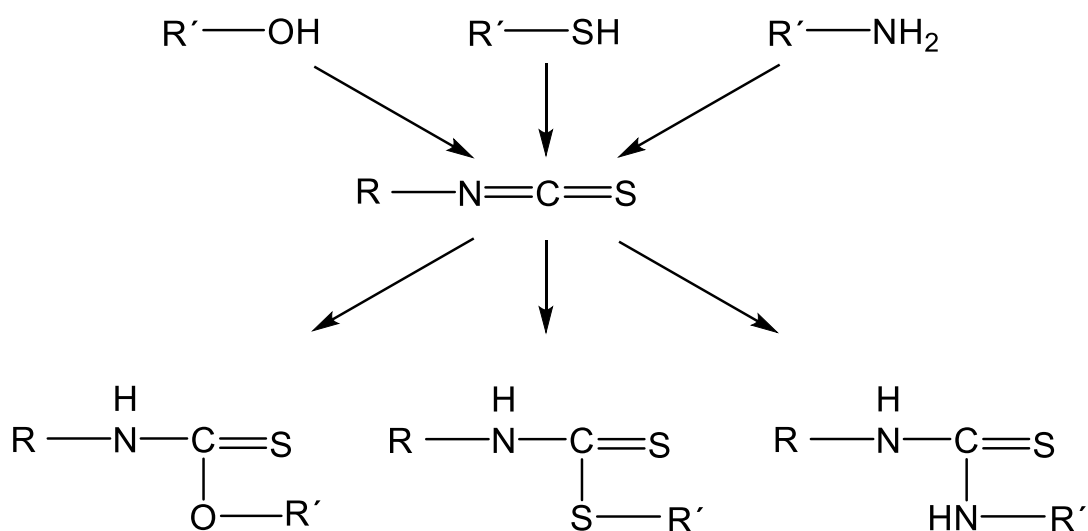


Schéma 3: Reakce isothiokyanátů

Rozpad isothiokyanátů může probíhat přes hydrolýzu vazby R – N=C=S nebo přes adiční reakci na – N=C=S. Isothiokyanátová skupina je poměrně nestabilní ve vodném prostředí a dochází k hydrolýze. Hydrolýza ve vodném prostředí probíhá adiční reakcí na isothiokyanátové skupině (schéma 4).

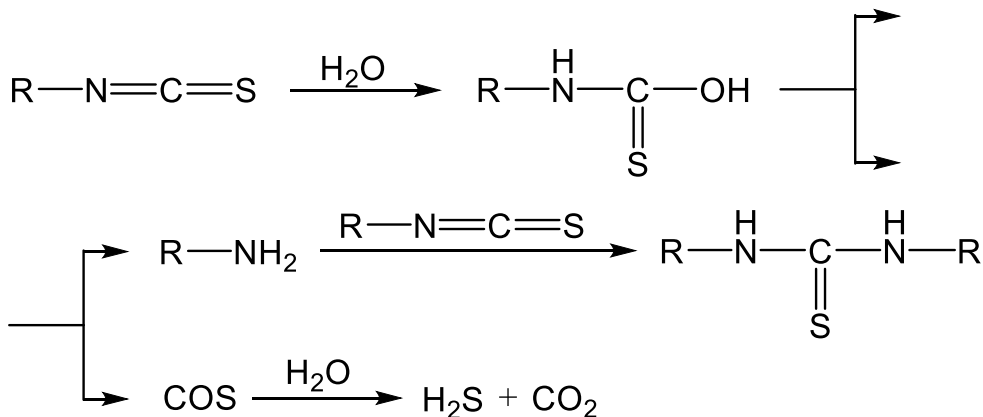


Schéma 4: Hydrolýza isothiokyanátů

PITC reaguje s molekulami vody za vzniku fenylothiokarbamové kyseliny. Tato kyselina spontánní reakcí poskytuje anilin, který přes nukleofilní atak reaguje se zbytkovým isothiokyanátem za vzniku difenylothiomočoviny (schéma 5) [28-30].

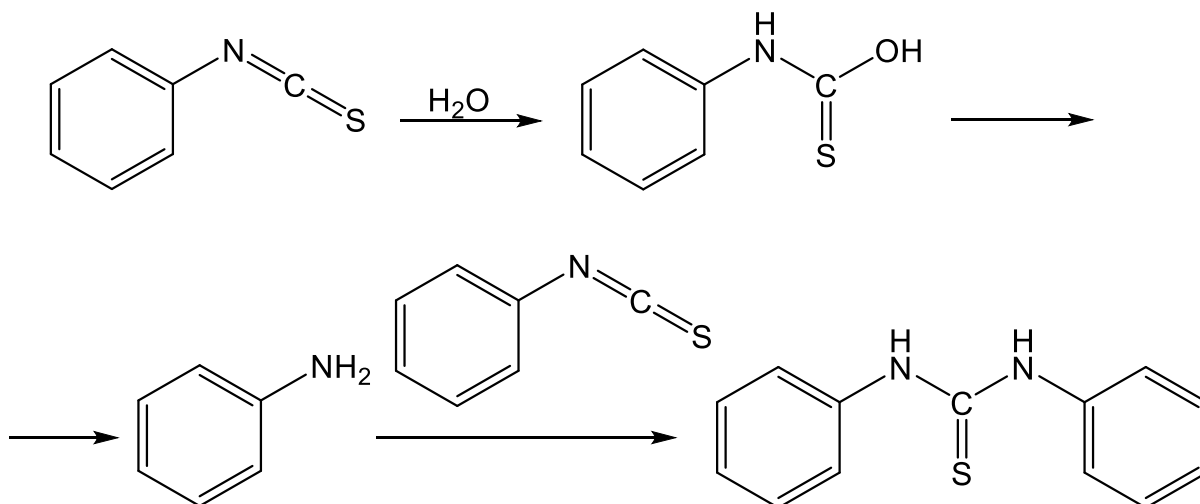


Schéma 5: Hydrolýza fenyliothiokyanátu

2.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie a detekce

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z běžně používaných analytických metod pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Používá se převážně v odvětví farmaceutickém, průmyslovém, forenzním, klinickém a v životním prostředí. Jedná se o univerzální separační metodu, pomocí které lze analyzovat širokou škálu látek polárních, nepolárních a iontových. Lze analyzovat látky od nízkomolekulárních až po látky vysokomolekulární [31]. Hlavní separační mechanismus spočívá v mnohonásobném rozdělení analytu mezi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fází. Jednotlivé analyty se dělí podle vlastností, typu stacionární fáze a složení mobilní fáze [32].

Hlavními výhodami HPLC je rychlost, selektivita a citlivost, nevýhodou je nákladnější provoz a instrumentace [31]. Současný vývoj této metody směřuje k využívání kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS) a k využívání velmi vysokých tlaků, tzv. UPLC, z anglického názvu ultra performance liquid chromatography.

Mezi nejběžněji používané HPLC detektory patří UV/VIS detektory, vodivostní, chemiluminiscenční, hmotnostní a elektrochemické. Detektor UV/VIS má výhodu univerzálnosti a využívá záření o vlnových délkách od 190 nm do 800 nm. Měření se provádí při takové vlnové délce, kdy má analyt maximální absorpční a mobilní fáze co nejmenší absorpční, jelikož při takové vlnové délce je detekce nejméně citlivější. Při měření v oblasti krátkých vlnových délek je třeba pečlivě volit organické rozpouštědlo s ohledem na jeho absorpční hranu [31, 33].

2.6 Separace a detekce isothiokyanátů pomocí HPLC-UV

Isothiokyanáty byly nejčastěji separovány pomocí RP-HPLC s gradientovou elucí. K separaci byla použita převážně kolona s oktadecylovou stacionární fází. Isothiokyanáty separované pomocí HPLC byly většinou detekovány spektrofotometricky při vlnové délce od 205 nm do 250 nm, jelikož skupina $-N=C=S$ vykazuje maximální absorpční UV záření při 240 nm. Další nejčastější detekce je pomocí hmotnostního spektrometru [34-37].

HPLC analýza PITS byla již v literatuře popsána, ale separace směsi PITS s anilinem a DPTU nebyla doposud publikována. E. A. Wilson s kolektivem autorů ve své publikaci popsal stanovení isothiokyanátů za použití RP-HPLC na oktadecylové stacionární fázi. Při separaci byla použita pro zrychlení analýz gradientová eluce s mobilní fází o složení acetonitril-voda s průtokovou rychlostí $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Y. Zhanga a kol. na rozdíl od E. A. Wilsona a kol. používal isokratickou eluci s mobilní fází o složení methanol/voda (80:20, v/v) s průtokovou rychlostí $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, pro zrychlení analýzy [38, 39].

2.7 Chemická kinetika

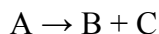
Chemická kinetika se zabývá rychlostí chemické reakce a jejími ovlivňujícími faktory. Faktory, které mohou ovlivnit rychlost reakce, jsou např. vlastnosti a koncentrace reaktantů, teplota reakce, tlak, katalyzátor nebo plocha, kde dochází ke kontaktu reaktantů. Chemické reakce se mohou dělit mnoha způsoby podle jednotlivých hledisek. Z hlediska reakční kinetiky se reakce dělí na elementární (izolované), kam patří reakce 1., 2. a 3. řádu. Druhým typem jsou reakce simultánní (současné), kde dochází k více elementárním reakcím současně. Simultánními reakcemi mohou být reakce bočné, kde z výchozí látky vzniká rozdílnou rychlostí více produktů. Dále tzv. zvrtné reakce, kde dochází ke dvěma elementárním reakcím v opačném směru nebo reakce následné, kde reakce probíhá přes meziprodukty. U komplexních simultánních reakcí pak dochází ke kombinaci přechodných typů reakcí.

Reakční rychlost je dána změnou počtu molů reaktantu v objemu za jednotku času nebo ji lze také popsat jako úbytek koncentrace výchozí látky v čase. Popisuje rovnice (1), kde v je reakční rychlost, V je objem, ζ je změna látkového množství látky i , t je čas, ν_i je stechiometrický koeficient látky i a c_i je koncentrace výchozí látky.

$$v = \frac{1}{V} \frac{d\zeta}{dt} = \frac{1}{\nu_i} \frac{dc_i}{dt} \quad (1)$$

2.7.1 Reakce 1. řádu

Jedním z nejběžnějších typů reakcí je rozklad látky na produkty. Tento typ reakce je označován jako reakce 1. řádu. Pro obecný popis slouží následující zápis chemické rovnice, kde A je výchozí látka a písmena B a C označují produkty reakce.



Dochází při něm k plynulému exponenciálnímu poklesu koncentrace reagující látky A. Z obecné rovnice platí pro reakční rychlost reakce rovnice (2), kde v je reakční rychlost, c_a koncentrace výchozí látky A, t čas, k rychlostní konstanta.

$$v = -\frac{dc_a}{dt} = k \cdot c_a \quad (2)$$

Po převedení obecné rovnice na integrální tvar dostáváme rovnici (3), kde v je reakční rychlost, t je čas, $c_{a,0}$ koncentrace výchozí látky A v počátku reakce, c_a koncentrace látky A v určitém (zvoleném) čase, k rychlostní konstanta.

$$\ln c_a = \ln c_{a,0} - k \cdot t \quad (3)$$

Po úpravě rovnice (3) můžeme dostat výraz popisující pokles koncentrace výchozí látky A v závislosti na čase (4), kde $c_{a,t}$ je koncentrace výchozí látky A v určitém čase, $c_{a,0}$ koncentrace výchozí látky A v počátku reakce, t čas a k rychlostní konstanta.

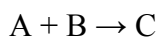
$$c_{a,t} = c_{a,0} \cdot \exp(-k \cdot t) \quad (4)$$

Pro reakce prvního řádu je typické, že reakční rychlost za dané teploty je přímo úměrná koncentraci.

Rychlostní konstanta, označována k , určuje vztah mezi rychlostí reakce a okamžitou koncentrací reagující látky, tzn. že rychlostní konstanta číselně udává, jak rychle reakce bude probíhat při jednotkové koncentraci všech výchozích látek v reakci. Rychlostní konstanta je závislá na mechanismu reagujících látek a na podmínkách reakce. Rychlostní konstantu lze určit ze směrnice závislosti (3).

2.7.2 *Reakce pseudo-prvního řádu*

Obecný zápis následující chemické rovnice odpovídá kinetické reakci 2. řádu, kde A a B jsou výchozími látkami a písmeno C označuje produkty reakce.



Pokud jedna z reagujících složek je ve velkém koncentračním přebytku, např. $c_{A,0} \gg c_{B,0}$, pak lze diferenciální rovnici 2. řádu (5) zjednodušit. V rovnici (5) znamená v reakční rychlost, c_a koncentraci výchozí látky A, c_b koncentraci výchozí látky B, t čas, k rychlostní konstantu.

$$v = -\frac{dc_a}{dt} = k \cdot c_a \cdot c_b \quad (5)$$

Formálně se tato diferenciální rovnice (5) zjednoduší na diferenciální rovnici 1. řádu (2). Těmto reakcím se říká reakce pseudo-prvního řádu. Jedná se o izolované bimolekulární reakce. Pokud by látka B všechna zreagovala, tak by úbytek látky A byl malý. Koncentrace látky A by se výrazně nezměnila a dalo by se ji považovat za konstantní. Poté je reakční rychlost přímo úměrná koncentraci látky B, která se výrazně mění.

2.7.3 *Poločas rozpadu*

Poločas rozpadu $t_{1/2}$, je čas, během kterého klesne koncentrace reaktantu na polovinu počátečního množství. Poločas je daný rovnicí (6), kde $t_{1/2}$ je poločas rozpadu, k rychlostní konstanta.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (6)$$

Z rovnice je možno vidět, že poločas rozpadu reakcí 1. řádu nezávisí na počáteční koncentraci, ale jen na rychlostní konstantě. Koncentrace reagující látky M klesne z jakékoliv hodnoty $[M]$ na $\frac{1}{2}[M]$ za stejnou dobu t jako z hodnoty $\frac{1}{2}[M]$ na $\frac{1}{4}[M]$ [40].

3 Experimentální část

3.1 Přístrojové vybavení

Vzorky byly váženy na analytických váhách typu XE-100A (Denver Instrument Company, USA) a dávkovány stříkačkou Microliter Syringes 25 μ l (Hamilton, Switzerland). Roztoky pufrů byly upravovány na požadované pH hodnoty pomocí pH-metru Orion modelu 370 (Orion, USA). Vzorky uchovávané za vyšších teplot než za laboratorní teploty byly skladovány v klimatizační komoře typu HCP 108 (Mettler, Německo). Analýzy byly prováděny na kapalinovém chromatografu, který byl složen z gradientního čerpadla Beta (Ecom, ČR), dávkovacího ventilu s dávkovací smyčkou 10 μ l (Ecom, ČR), vakuového odplyňovače pro mobilní fázi DG3014 (Ecom, ČR) a spektrofotometrického detektoru LCD 2084 (Ecom, ČR). Pro separaci látek byla použita kolona Purospherstar (C₁₈), 150 x 4,6 mm, 5 μ m (Merck, Německo). Data byla vyhodnocována v počítačovém programu Clarity verze 2.6.6.574. Ověřování analytů bylo prováděno na kapalinovém chromatografu Agilent serie 1200 (Agilent Technologies, Německo) s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 (Agilent Technologies, Německo). Data měřená na HPLC-MS byla vyhodnocena v počítačovém programu Mass Hunter Workstation software.

3.2 Použité chemikálie

Standardy pro vzorky byly fenylisothiokyanát (98%, Sigma Aldrich, Německo), anilin (p.a., Sigma Aldrich, Německo) a difenylthiomocovina (98%, Sigma Aldrich, Německo). Pro přípravu mobilních fází byl použit acetonitril (pro HPLC \geq 99,9%, Sigma Aldrich, Německo) a deionizovaná voda. Pro přípravu roztoků pufrů byly použity tyto chemikálie: kyselina boritá (p.a., Penta, ČR), kyselina octová (p.a., Lach:ner, ČR), kyselina fosforečná (p.a., Lach:ner, ČR), hydroxid sodný (p.a., Penta, ČR), MOPS (99,5%; Sigma Aldrich, Německo), tetraboritan sodný dekahydrát (p.a., Chem a spol Praha Czechoslovakia), triethylamin (p.a., Sigma Aldrich, Německo), kyselina chlorovodíková (p.a., Sigma Aldrich, Německo) a deionizovaná voda. K přípravě a ředění vzorků byl použit 1,4-dioxan (p.a., Sigma

Aldrich) a acetonitril (pro HPLC $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich, Německo). Deionizovaná voda byla připravena přístrojem Milli-Q (Millipore Corporation, USA) pracujícím na principu reverzní osmózy.

3.3 Příprava vzorků a pufrů

Standard anilinu a PITC byl skladován v lednici a DPTU, která má pevné skupenství, byla skladována za laboratorní teploty. Zásobní roztoky acetonitrilu, dioxanu a deionizované vody byly skladovány za laboratorní teploty. Veškeré připravené pufrů byly skladovány v lednici.

3.3.1 Příprava vzorků pro vývoj metody

Rozpuštěním nebo smísením odpovídajícího množství dané látky s acetonitrilem byly připraveny zásobní roztoky vzorků anilinu, DPTU a PITC o koncentraci $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Před analýzou byly tyto zásobní roztoky v případě PITC a anilinu stokrát zředěny acetonitrilem a u DPTU tisíckrát zředěny acetonitrilem. Ředěním bylo dosaženo vhodné koncentrace pro získání podobné odezvy detektoru pro všechny analyty. Smísením nebo rozpuštěním odpovídajícího množství dané látky v acetonitrilu byla připravena zásobní směs obsahující $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ anilinu, $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ DPTU a $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PITC. Tato směs analytů byla stokrát ředěna acetonitrilem před analýzou. Vzorky pro vývoj metody byly skladovány v lednici.

3.3.2 Příprava pufrů a vzorků pro hydrolýzy PITC a rozpady DPTU

Britton-Robinsonův pufr o pH hodnotách 5, 7, 9 a 11 a koncentraci $40 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven naředěním zásobního roztoku, obsahující adekvátní množství kyseliny borité, kyseliny octové a kyseliny fosforečné odpovídajícím množstvím deionizované vody. Poté byl tento zásobní roztok pro přípravu pufru vždy částečně neutralizován hydroxidem sodným o koncentraci $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ na požadované pH hodnoty. Acetátový pufr o pH 5 a koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven naředěním zásobního roztoku kyseliny octové odpovídajícím množstvím deionizované vody. Tento roztok zředěné kyseliny octové byl částečně zneutralizován hydroxidem sodným o koncentraci

$2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. MOPS pufr o pH 7 a koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství v deionizované vodě a poté upraven na hodnotu pH 7 pomocí $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného. Tetraboritanový pufr o pH 9 a koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství v deionizované vodě a poté kyselinou boritou o koncentraci $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ upraven na hodnotu pH 9. Triethylaminový pufr byl připraven naředěním zásobního roztoku triethylaminu (TEA) odpovídajícím množstvím deionizované vody a poté částečným zneutralizováním kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Smísením odpovídajícího množství standardu PITC s 1,4-dioxanem byl připraven zásobní roztok PITC o koncentraci $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tento zásobní roztok byl poté vždy stokrát ředěn jednotlivými pufrů pro hydrolyzu PITC. Pro hydrolyzu při pH 5 byl použit acetátový pufr, při pH 7 MOPS pufr, při pH 9 tetraboritanový pufr a při pH 11 TEA pufr. Vzorky pro hydrolyzu PITC byly skladovány za laboratorní teploty, při 50, 65 a 80 °C. Pro uchovávání vzorků při vyšší teplotě byla použita klimatizační komora.

Byl připraven zásobní roztok DPTU o koncentraci $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, rozpuštěním odpovídajícího množství DPTU v 1,4-dioxanu. Tento zásobní roztok byl vždy stokrát ředěn jednotlivými pufrů pro studium rozpadu DPTU.

3.3.3 Příprava vzorků pro kalibrační závislost

Rozpuštěním nebo smísením anilinu, DPTU a PITC s odpovídajícím množstvím acetonitrilu byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Poté byly zásobní roztoky anilinu, DPTU a PITC ředěny acetonitrem na požadovanou kalibrační koncentraci. Rozsah kalibrační koncentrace anilinu byl od $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, DPTU od $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a PITC od $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vzorky pro kalibrační závislost byly skladovány v lednici.

3.4 Experimentální podmínky a mobilní fáze

Veškeré analýzy na HPLC-UV byly měřeny za laboratorní teploty, isokratickou elucí a při průtoku mobilní fáze $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Složení mobilní fáze při vývoji metody separace je zřehledněno v tabulce 1. Samotné analýzy při studiu hydrolyz PITS byly prováděny v mobilní fázi acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v). Objem dávkovaných vzorků byl $10 \mu\text{l}$. Vlnová délka UV-VIS detektoru byla nastavena na hodnotu 250 nm.

Tabulka 1: Přehled použitých mobilních fází při vývoji metody separace

organická složka	vodná složka	% (v/v)	průtok ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)
acetonitril	deionizovaná voda	60:40	0,5
acetonitril	deionizovaná voda	70:30	0,5
acetonitril	deionizovaná voda	75:25	0,5
acetonitril	deionizovaná voda	80:20	0,5
acetonitril	deionizovaná voda	90:10	0,5

4 Výsledky a diskuse

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout metodu ke sledování hydrolyzy PITC pomocí HPLC a prostudovat hydrolyzu PITC v závislosti na pH a teplotě. HPLC byla vybrána pro svoji rychlost, přesnost, nenákladnou instrumentaci a pro jednoduché experimentální podmínky. Jako zástupce isothiokyanátů byl vybrán PITC pro svoji snadnou detekci v UV oblasti záření.

4.1 Vývoj metody separace isokratickou elucí

Vhodná metoda ke sledování hydrolyzy PITC musí umožnit jak sledování, tak kvantifikaci PITC a produktů hydrolyzy, což je anilin a DPTU. Na základě struktur studovaných látek bylo předpokládáno, že nejdříve bude eluovat anilin, poté PITC a v poslední řadě DPTU, jelikož obsahuje dvě aromatická jádra. Reálně bylo zjištěno, že v nejkratším retenčním čase eluuje anilin, poté DPTU a nakonec PITC. Retenční časy analytů byly potvrzeny tzv. spikováním. Identifikace píků DPTU a anilinu v reálných směsích byla pro jistotu ještě ověřena pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-ESI-MS). PITC nelze ionizovat pomocí elektrospreje (ESI) ani chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI), a proto nemohl být potvrzen pomocí HPLC-MS. Byl potvrzen plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC-MS), jelikož bylo potřeba použít tzv. electron impact, tvrdou ionizační techniku.

Nejprve bylo optimalizováno složení a následně průtoková rychlost mobilní fáze. Byly testovány mobilní fáze s podílem organické složky acetonitrilu od 60% do 90%. Při složení mobilní fáze acetonitril-deionizovaná voda (60:40, v/v) s průtokovou rychlostí $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ byly všechny analyty separovány, ale celková doba analýzy 24 minut byla příliš dlouhá. Podíl organické složky v mobilní fázi byl nadále zvyšován, aby se zkrátila doba analýzy, jelikož cílem této práce bylo vyvinout rychlou a přesnou metodu. Dále složení mobilní fáze bylo zvýšeno na acetonitril-deionizovaná voda (70:30, v/v) s průtokovou rychlostí $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Celková doba analýzy byla zkrácena na 15 minut. Jako optimální složení mobilní fáze byly zjištěny podmínky acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v) a průtoková rychlost $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Zvýšením organické složky v mobilní fázi o 5 % došlo ke zkrácení celkové doby analýzy na 12 minut. Při těchto podmínkách byly píky všech tří analytů (anilin, DPTU a PITC)

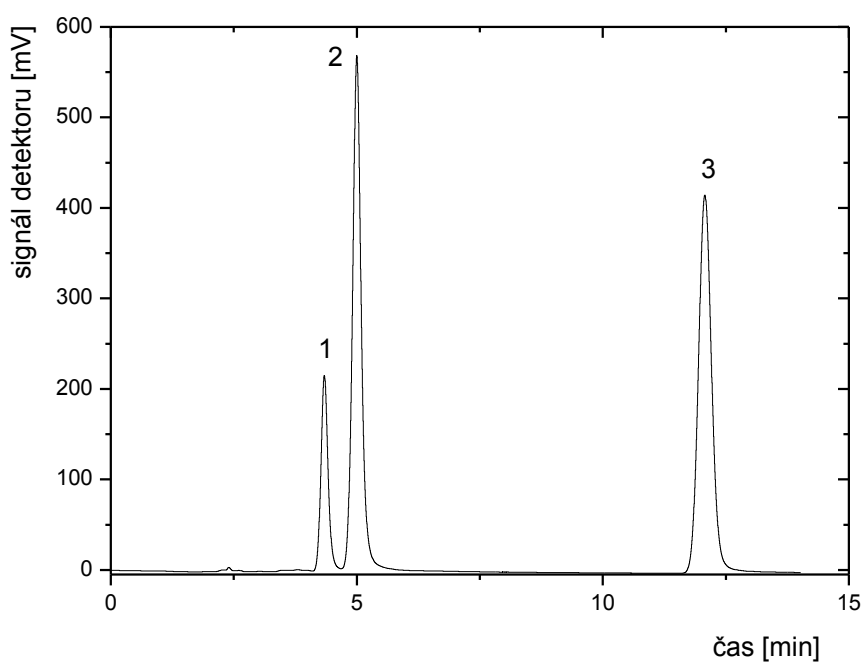
separovány až na základní linii. Celkové časy analýzy a rozlišení jednotlivých analytů je zpřehledněno v tabulce 2. Byly vyzkoušeny i mobilní fáze o složení acetonitril-deionizovaná voda (90:10, v/v), průtoková rychlost $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a acetonitril-deionizovaná voda (80:20, v/v), průtoková rychlost $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, ale zde u těchto složeních mobilní fáze už nedocházelo k dostatečné separaci analytů anilinu a DPTU.

Tabulka 2: Přehled rozlišení analytů a celkového času analýzy v závislosti na složení mobilní fáze

mobilní fáze	$R_{A,D}$	$R_{D,P}$	celkový čas analýzy [min]
60% ACN	5,76	22,19	23,89
70% ACN	3,06	18,27	14,88
75% ACN	2,16	17,20	11,96
80 % ACN	1,27	14,35	9,87
90 % ACN	0,22	9,34	7,09

$R_{A,D}$ - rozlišení píků anilin a DPTU; $R_{D,P}$ - rozlišení píků DPTU a PITC

Při optimalizaci průtoku mobilní fáze bylo vyzkoušeno zvýšení průtokové rychlosti z $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ na $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ při složení mobilní fáze acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v). Celková doba analýzy byla zkrácena o 3 minuty, ale nedocházelo k dostatečnému rozlišení analytů anilinu a DPTU, proto byla průtoková rychlost $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ zvolena jako nejvhodnější. Podmínky mobilní fáze o složení acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v) a průtoková rychlost $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ byly zvoleny jako optimální. Separace modelové směsi studovaných analytů je ukázána na Obr. 5.



Obr. 5: Separace analytů při složení mobilní fáze acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v) a průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Popis píků: 1 - anilin; 2 - DPTU; 3 - PITC.

4.2 Kalibrační závislosti

Byly proměřeny kalibrační závislosti jednotlivých analytů. Rozsah kalibračních koncentrací PITC byl od $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, DPTU od $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a anilinu byl od $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Každý bod kalibrační přímky byl měřený třikrát a pro sestavení křivky byl brán průměr těchto hodnot. Rovnice kalibrační přímek pro jednotlivé analyty jsou zřehledněny v tabulce 3.

Tabulka 3: Přehled kalibračních přímek

analyt	rovnice kalibrační přímky	korelační koeficient R^2
PITC	$y = 3,5 \cdot 10^7 x - 20,1$	0,9999
DPTU	$y = 1,2 \cdot 10^7 x - 0,1$	0,9999
anilin	$y = 6,1 \cdot 10^7 x - 10,2$	0,9999

4.3 Studium hydrolýzy PITC

PITC ve vodném prostředí hydrolyzuje na anilin, který s přebytkem PITC reaguje za vzniku DPTU (viz schéma 5, kapitola 2.4). Hydrolýza PITC byla sledována pomocí RP-HPLC v mobilní fázi o složení acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v) a průtoková rychlost $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. PITC je ve vodě omezeně rozpustný, proto byl zásobní roztok připraven v dioxanu. Dioxan je vhodným rozpouštědlem, protože je neomezeně mísitelný s vodou a nereaguje s PITC na jiné nežádoucí produkty jako např. methanol.

4.3.1 Výběr vhodných pufrů a rozpouštění PITC v dioxanu a pufru

Pro studium hydrolýzy PITC byly zvoleny hodnoty pH 5, 7, 9 a 11. Byl zvolen Britton-Robinsonův, který pokrývá celý požadovaný rozsah pH a neobsahuje amino a hydroxy skupiny, se kterými by PITC mohl reagovat. Nicméně při použití tohoto pufru o různých hodnotách pH docházelo ke srážení analytu PITC v pufru. Byla vyzkoušena koncentrace $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $40 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Britton-Robinsonova pufru, ale ke srážení docházelo u obou koncentrací. Při použití Britton-Robinsonova pufru pravděpodobně docházelo ke srážení z důvodu příliš vysoké iontové síly. Alternativně tedy byly použity následující pufrы, které neobsahovaly ani amino ani hydroxy skupinu.

Pro pH 5 byl zvolen acetátový pufr, pro pH 7 MOPS pufr, pro pH 9 tetraboritanový pufr, pro pH 11 TEA pufr. Pufrы byly připravované o koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Bylo zjištěno, že dioxan ovlivňuje výrazně konečné pH směsi. Aby vliv dioxanu na pH byl omezen ve výsledném roztoku, byl jeho podíl ve směsi cca 1%.

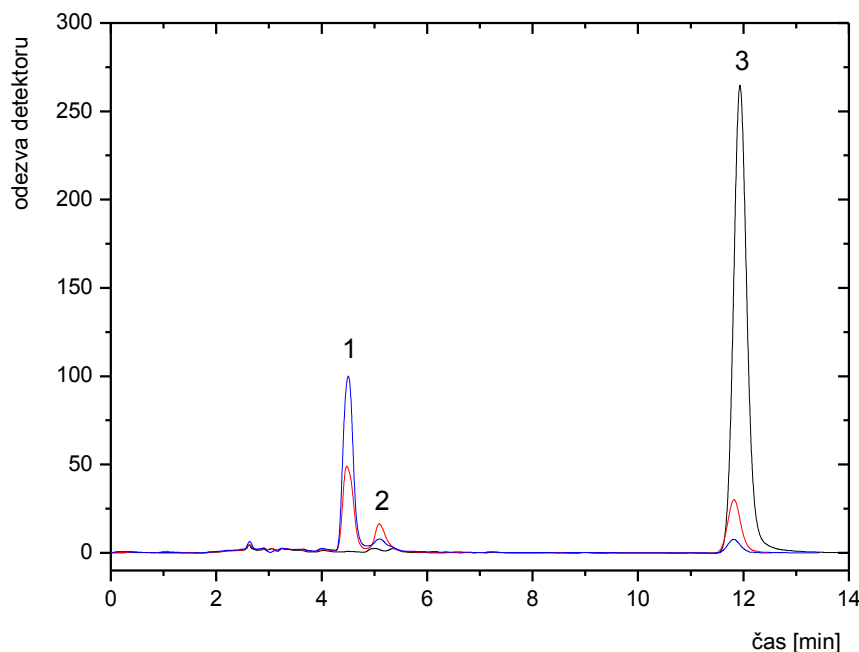
4.3.2 Studium hydrolýzy v závislosti na teplotě a pH

V této práci byl studován vliv pH a teploty na hydrolýzu PITC. Před vlastními měřeními hydrolýz byla vždy provedena orientační měření. Tato měření byla provedena pro zjištění přibližné rychlosti hydrolýzy PITC, aby bylo možné si sestavit přibližný plán měření. Při vlastním měření byly provedeny průměrně dvě série měření a všechna získaná data byla vyhodnocena společně. Počet sérii měření se lišil v závislosti na celkové době reakce a dostupnosti měření.

4.3.2.1 Studium hydrolyzy PITC v závislosti na pH

Pro studium hydrolyzy PITC v závislosti na pH byly vybrány čtyři hodnoty pH, aby pokryly škálu hodnot pH od kyselé po bazickou oblast. Pro kyselou část byla vybrána hodnota pH 5, dále neutrální pH 7 a pro bazickou část byly vybrány hodnoty pH 9 a 11. Bylo předpokládáno, že rychlost hydrolyzy PITC bude v kyselém prostředí velmi pomalá a poroste se vrůstajícím pH.

Na Obr. 6 jsou chromatogramy ukazující průběh hydrolyzy PITC. Pro diskusi ohledně mechanismu hydrolyzy PITC byla vybrána pro ukázkou hydrolyza při pH 7 a teplotě 80 °C. Chromatogram znázorněný na Obr. 6 černou barvou odpovídá odebrané frakci v čase 60 sec. Z chromatogramu vyplývá, že v detekovatelném množství je přítomen pouze analyt PITC. S rostoucí dobou hydrolyzy se množství PITC snižuje a množství anilinu a DPTU by se mělo zvyšovat, což potvrzuje chromatogram znázorněný červenou barvou. Na chromatogramu s modrou barvou je vidět, že množství anilinu se stále zvyšuje, ale množství DPTU se naopak snižuje. Počáteční předpoklad ze schématu hydrolyzy PITC (viz schéma 5, str. 17) byl takový, že množství DPTU se bude zvyšovat. Bylo zjištěno, že DPTU se dále rozpadá na anilin (viz schéma 2, str. 16). Pozorovaný vznikající anilin je produktem jak hydrolyzy PITC, tak rozpadu průběžně vznikající DPTU.

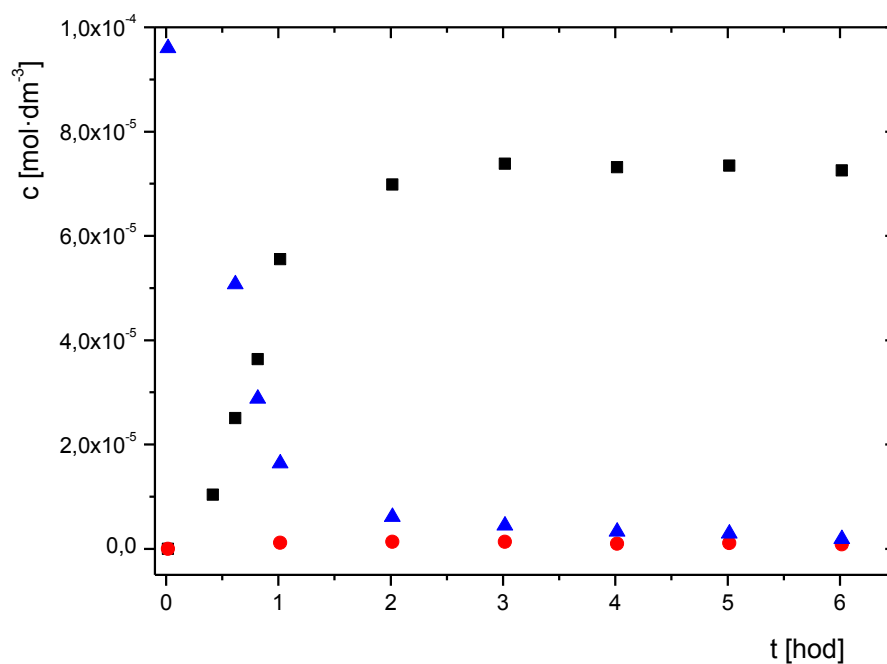


Obr. 6: Hydrolýza PITC při složení mobilní fáze acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v) při průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Černá - hydrolýza PITC v čase 60 sec; červená - hydrolýza PITC v čase 3 hod a 1 min; modrá - hydrolýza PITC v čase 22 hod 1 min. Popis píků: 1 - anilin; 2 - DPTU; 3 - PITC.

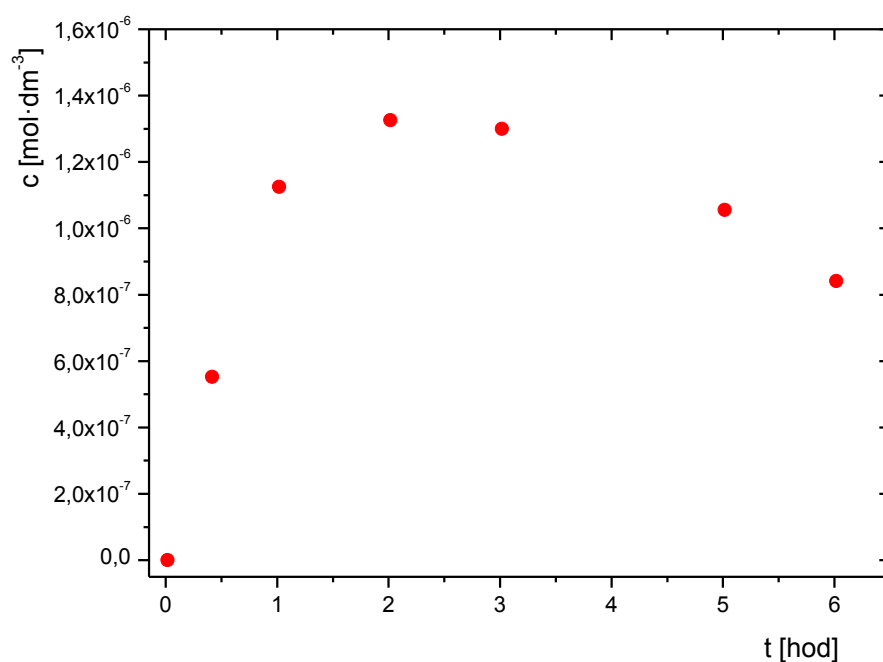
Celý průběh hydrolýzy PITC je ukázán na příkladu hydrolýzy PITC při pH 9 a teplotě $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (viz Obr. 7). Výsledné plochy píků byly pomocí kalibračních závislostí přepočítány na koncentrace a poté byly normalizovány na celkovou koncentraci. Celý proces hydrolýzy PITC je relativně složitý proces. Jedná se o komplexní reakce, kde dochází ke kombinaci bočné a následné reakce. Kompletní zpracování by vyžadovalo náročné matematické řešení. Proto byla pro přehlednost získaná data proložena křivkou kinetiky prvního řádu, ke které se velmi blíží. Z exponenciální závislosti (viz rovnice 4, str. 20) byla určena rychlostní konstanta reakce, která odpovídala směrnici této závislosti.

Na Obr. 7 vidět, jak množství anilinu exponenciálně roste a oproti tomu množství PITC exponenciálně klesá. Jediný analyt, jehož množství neroste exponenciálně je DPTU. Koncentrace DPTU roste a následně klesá, ačkoliv se na grafu (Obr. 7) vývoj

DPTU jeví jako konstantní. Proto závislost množství DPTU na čase je znázorněna samostatně na Obr. 8. Dochází zde k již zmíněnému rozpadu DPTU na anilin.

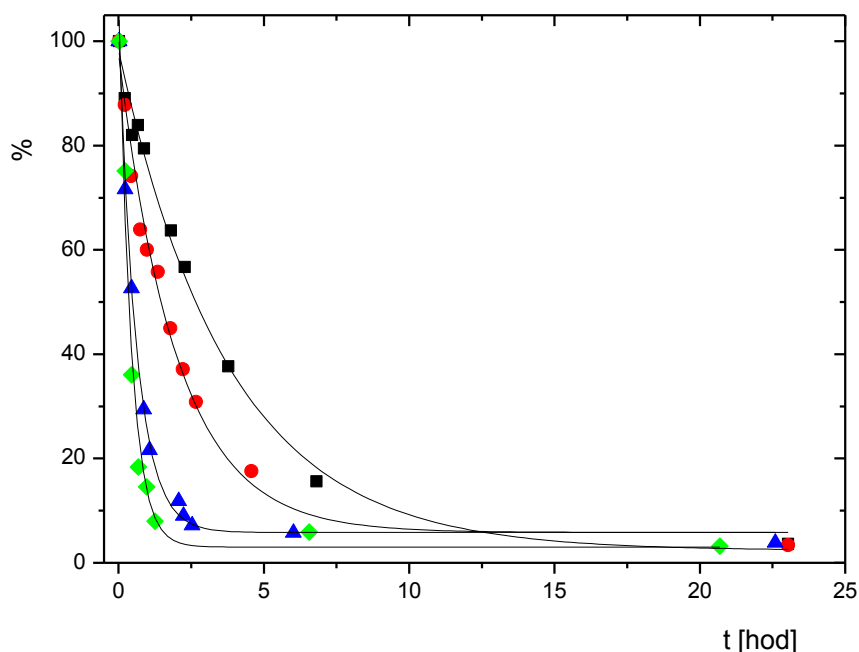


Obr. 7: Hydrolýza PITC při složení mobilní fáze acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v) při průtoku $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Hydrolýza PITC při pH 9 a teplotě $80 \text{ }^\circ\text{C}$. ■ anilin; ● DPTU; ▲ PITC



Obr. 8: Hydrolyza PITC při složení mobilní fáze acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v) při průtoku 0,5 ml·min⁻¹. Hydrolyza PITC při pH 9 a teplotě 80 °C:
 ● DPTU

Pro ukázkou rychlosti hydrolyz PITC v závislosti na pH byla zvolena hydrolyza při teplotě 65 °C. Na Obr. 9 je možno vidět rychlost hydrolyzy PITC v závislosti na pH. Hydrolyza znázorněna černými body je hydrolyza při pH 5 a množství PITC klesá nejpomaleji. Rychlejší pokles množství PITC je u hydrolyzy PITC znázorněné červenými body, která přísluší pH 7 a hydrolyzy PITC s modrými body, která byla provedena v prostředí o pH 9. K nejrychlejšímu úbytku PITC dochází při pH 11 znázorněné zelenými body. Rychlost hydrolyzy PITC dle očekávání roste s pH hodnotami 5, 7, 9 a 11.



Obr. 9: Hydrolyza PITC při složení mobilní fáze acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v) při průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Hydrolyza PITC při teplotě $65 \text{ }^\circ\text{C}$ a různém pH: ■ pH 5; ● pH 7; ▲ pH 9; ◆ pH 11.

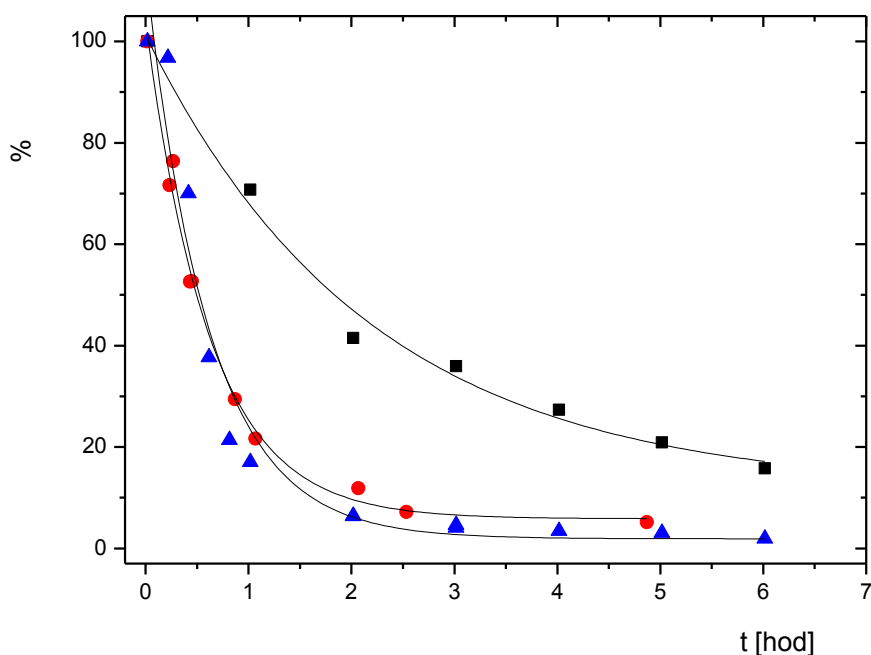
4.3.2.2 Studium hydrolyzy PITC v závislosti na teplotě

Hydrolyzu PITC bylo zapotřebí prostudovat i v závislosti na teplotě, jelikož teplota významně ovlivňuje kinetiku reakcí. Předpokládalo se, že s rostoucí teplotou rychlost reakce poroste, což se později potvrdilo. Byly vybrány teploty $50 \text{ }^\circ\text{C}$, $65 \text{ }^\circ\text{C}$, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ a laboratorní teplota.

Nejdříve byla hydrolyza PITC testována za laboratorní teploty. Zde byly od začátku očekávány nejméně spolehlivé výsledky, jelikož se laboratorní teplota během experimentů měnila v rozpětí $19 \text{ }^\circ\text{C}$ – $26 \text{ }^\circ\text{C}$ a nebyla tedy po celou dobu měření konstantní. Později se očekávání potvrdilo, výsledky byly obtížně reprodukovatelné. Systém navíc při laboratorní teplotě vykazoval anomální chování. Je možné, že zde mohla hrát roli rozpustnost a mohl se tvořit např. nepravý roztok. Výsledky získané za laboratorní teploty tedy v této práci dále nebudou srovnávány s ostatními teplotami.

Hydrolýza PITC byla dále měřena za teplot 50 °C, 65 °C a 80 °C. Jednotlivé výsledky byly vyhodnoceny stejně jako u hydrolýzy v závislosti na pH. Plochy píků byly pomocí kalibračních závislostí přepočítány na koncentrace, tyto koncentrace byly normalizované na celkovou koncentraci a data byla proložena exponenciální funkcí. Rychlostní konstanta reakce byla určena z této závislosti.

Pro podrobnější popis byla vybrána hydrolýza PITC při pH 9 v závislosti na teplotě. Z výsledků (Obr. 10) je patrné, že nejrychleji probíhá hydrolýza PITC za teploty 80 °C, pomaleji při 65 °C a nejpomaleji při 50 °C. Všechny tři křivky mají exponenciální průběh.



Obr. 10: Rychlost hydrolýzy PITC při pH 9 v závislosti na teplotě: ■ 50 °C; ● 65 °C; ▲ 80 °C.

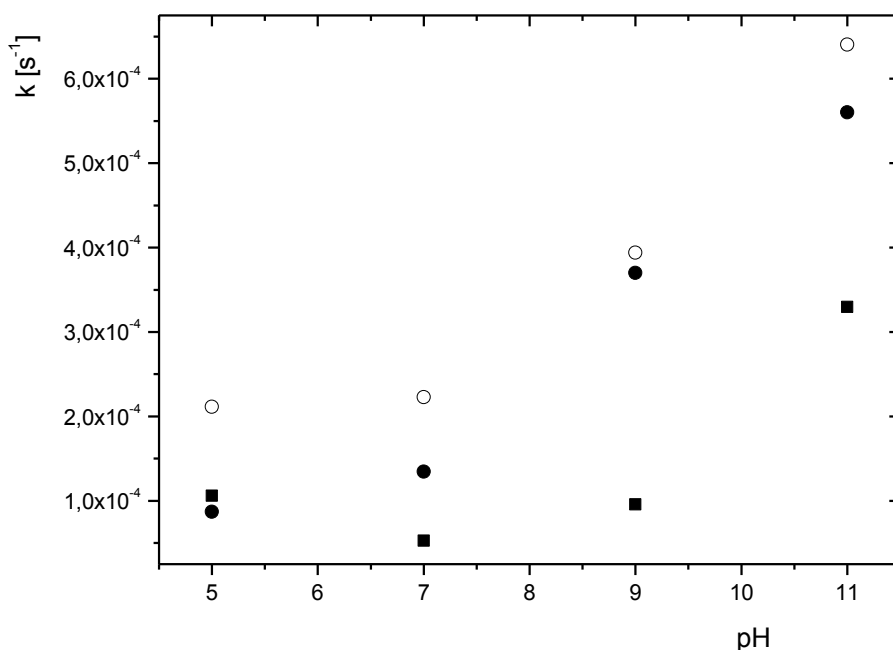
4.3.3 Porovnání hydrolýzy PITC v závislosti na pH a v závislosti na teplotě

V následující tabulce (tabulka 4) jsou zpřehledněny rychlostní konstanty hydrolýzy PITC naměřené při různém pH a při různé teplotě. Rychlostní konstanta hydrolýzy PITC odpovídá směrnicí exponenciální závislosti.

Tabulka 4: Přehled rychlostních konstant hydrolýz PITC v závislosti na pH a teplotě

pH	teplota [°C]	k [s ⁻¹]	standardní chyba
5	50	$1,06 \cdot 10^{-4}$	$4,94 \cdot 10^{-6}$
	65	$8,69 \cdot 10^{-5}$	$6,03 \cdot 10^{-6}$
	80	$2,11 \cdot 10^{-4}$	$1,16 \cdot 10^{-5}$
7	50	$5,27 \cdot 10^{-5}$	$4,84 \cdot 10^{-6}$
	65	$1,34 \cdot 10^{-4}$	$6,26 \cdot 10^{-6}$
	80	$2,23 \cdot 10^{-4}$	$9,44 \cdot 10^{-6}$
9	50	$9,58 \cdot 10^{-5}$	$4,64 \cdot 10^{-6}$
	65	$3,70 \cdot 10^{-4}$	$1,72 \cdot 10^{-5}$
	80	$3,94 \cdot 10^{-4}$	$3,61 \cdot 10^{-5}$
11	50	$3,30 \cdot 10^{-4}$	$4,80 \cdot 10^{-5}$
	65	$5,60 \cdot 10^{-4}$	$5,68 \cdot 10^{-5}$
	80	$6,40 \cdot 10^{-4}$	$5,22 \cdot 10^{-5}$

Graf na Obr. 11 znázorňuje závislost rychlostní konstanty hydrolýzy PITC na pH a na teplotě. Nejrychleji podle předpokladu probíhá hydrolýza PITC při pH 11 a teplotě 80°C. Bylo očekáváno, že nejpomaleji bude probíhat hydrolýza PITC při pH 5 a teplotě 50 °C, ale podle zjištěných výsledků nejpomaleji probíhala hydrolýza PITC při pH 7 a teplotě 50 °C. Hydrolýza PITC při pH 5 a teplotě 50°C probíhala mimo očekávání. Do budoucna by tuto skutečnost bylo potřeba ověřit dalšími měřeními. Není vyloučeno, že výsledky v roztoku o pH 5 jsou ovlivněny volbou pufru nebo se zde může uplatňovat jiný reakční mechanismus. Dále je možné, že zde hydrolýza probíhá natolik pomalu, že výsledky nejsou kvalitně reprodukovatelné.



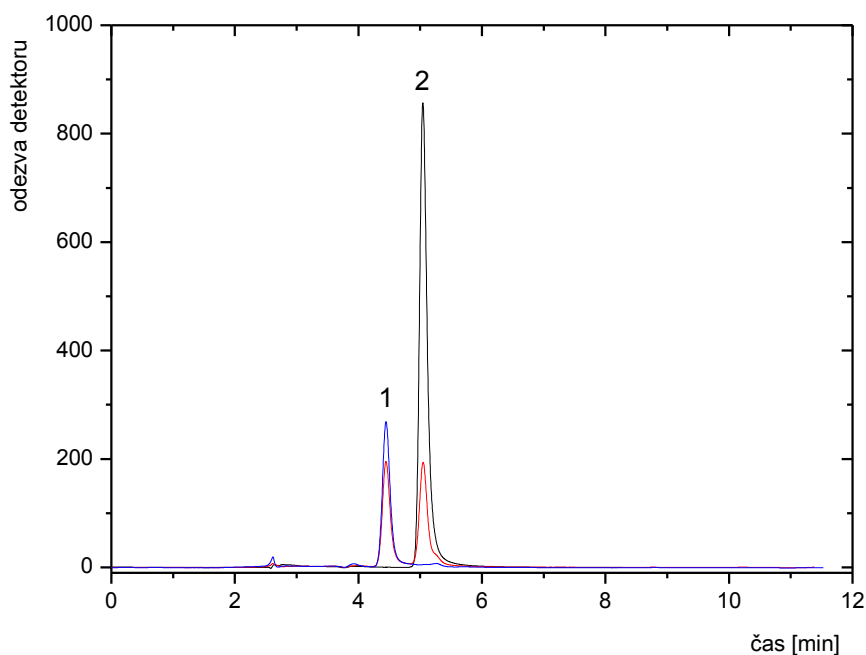
Obr. 11: Závislost rychlostní konstanty hydrolýzy PITC na pH: ■ 50 °C; ● 65 °C; ○ 80 °C.

4.4 Studium rozpadu DPTU v závislosti na pH

DPTU se rozkládá na anilin (viz kapitola 2.3). Rozpad DPTU byl sledován pomocí RP-HPLC v mobilní fázi o složení acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v) a průtoková rychlost byla $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Rozpad DPTU byl měřen při stejných hodnotách pH i ve stejných pufrch jako hydrolýza PITC. Acetátový pufr byl použit pro měření při pH 5, MOPS pufru pro pH 7, tetraboritanový pufr pro pH 9 a TEA pufr pro pH 11. Všechny pufrы měly koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro sledování rozpadu DPTU byla vybrána teplota 80 °C . Pro každé pH byly naměřeny tři série měření a výsledná data zpracována společně. Výsledné plochy píků byly přepočítány na koncentrace přes kalibrační závislost a poté byly tyto výsledky normalizovány na celkovou koncentraci. Dále byla data proložena exponenciální funkcí a byla určena rychlostní konstanta reakce. Rychlostní konstanta reakce odpovídala směrnici exponenciální funkce.

Na následujícím Obr. 12 jsou ukázány chromatogramy rozpadu DPTU. Pro popis hydrolýzy DPTU byl vybrán rozpad DPTU při pH 7 a teplotě 80 °C . První odebraná

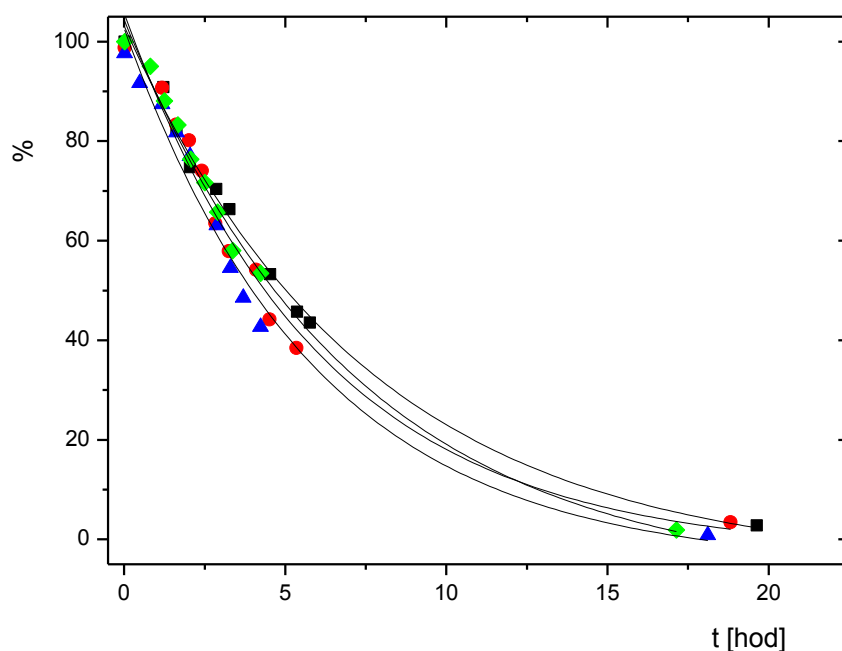
frakce z rozpadu DPTU v čase 1 min je znázorněna černou barvou, kde je možno vidět pouze DPTU v retenčním čase 5,04 min. Červenou barvou je znázorněn chromatogram frakce rozpadu DPTU odebrané v čase 6 hod a 18 min. Zde je přítomna jak DPTU, tak anilin s retenčním časem 4,45. Poslední odebraná frakce v tomto rozpadu DPTU byla odebrána v čase 76 hod 21 min. Na chromatogramu znázorněného modrou barvou je už pouze přítomen vzniklý anilin.



Obr. 12: Rozpad DPTU při složení mobilní fáze acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v) při průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Černá - rozpad DPTU v čase 60 sec; červená - rozpad DPTU v čase 6 hod a 18 min; modrá - rozpad DPTU v čase 76 hod 21 min. Popis píků: 1 - anilin; 2 - DPTU.

Na následujícím grafu (Obr. 13) je znázorněna závislost rychlosti rozpadu DPTU na hodnotě pH. Rychlost rozpadu DPTU nezávisí na pH prostředí tolik jako hydrolyza PITC, ale z grafů a následně z rychlostních konstant reakce je vidět, že částečně ano. Nejpomaleji probíhá rozpad DPTU při pH 5, který je znázorněn černou barvou. Rychleji probíhá rozpad DPTU při pH 7 znázorněný červenou barvou. Podle očekávání v závislosti na rychlosti hydrolyzy PITC by nejrychlejší rozpad DPTU měl být při pH 11 a druhým nejrychleším rozpadem by měl být rozpad DPTU při pH 9. V tomto grafu tomu tak není a nejrychlejší rozpad DPTU je při pH 9. Na rozpad DPTU při pH 11

může mít vliv zvolený pufr a mohou zde vznikat různé asociáty s pufrům. Do budoucna by hydrolýzu DPTU bylo vhodné ověřit v jiném pufru než TEA.

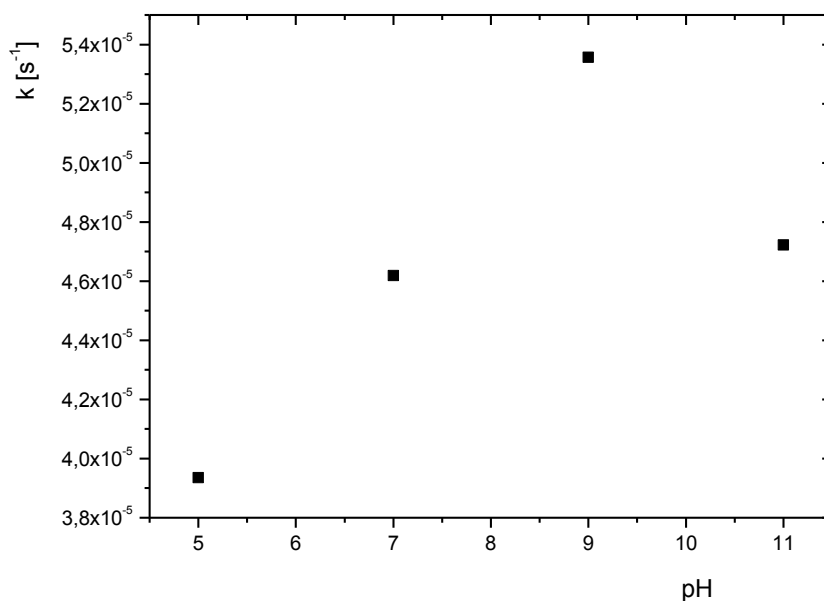


Obr. 13: Rozpad DPTU při složení mobilní fáze acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v) při průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Rozpad DPTU při teplotě $80 \text{ }^\circ\text{C}$ a různém pH: ■ pH 5; ● pH 7; ▲ pH 9; ◆ pH 11

Ze získaných rychlostních konstant (tabulka 5) je možné potvrdit dosavadní předpoklad, že rychlostní konstanta rozpadu DPTU roste s hodnotami pH 5, 7 a 9. Nižší hodnota rychlostní konstanty rozpadu DPTU při pH 11 než při pH 9 je překvapivá. Jak již bylo zmíněno, může docházet k interakci analytů s pufrům. Na Obr. 14 je znázorněna graficky závislost rychlostní konstanty rozpadu DPTU na pH.

Tabulka 5: Přehled rychlostních konstant rozpadu DPTU v závislosti na pH

pH	$k \text{ [s}^{-1}\text{]}$	standardní chyba
5	$3,94 \cdot 10^{-5}$	$1,14 \cdot 10^{-6}$
7	$4,62 \cdot 10^{-5}$	$1,89 \cdot 10^{-6}$
9	$5,36 \cdot 10^{-5}$	$2,76 \cdot 10^{-6}$
11	$4,27 \cdot 10^{-5}$	$2,92 \cdot 10^{-6}$



Obr. 14: Závislost rychlostní konstanty reakce rozpadu DPTU na pH

Porovnáním rychlostních konstant hydrolyzy PITC a hydrolyzy DPTU (viz tabulka 6) při teplotě 80 °C v závislosti na pH bylo zjištěno, že rychlostní konstanty hydrolyzy PITC jsou řádově větší než pro rozpad DPTU. Což znamená, že rychlost bočné reakce, kde dochází k hydrolyze PITC na anilin a DPTU je mnohem rychlejší než následná reakce, kde dochází k rozpadu DPTU. Vzhledem k tomu, že hydrolyza DPTU je řádově pomalejší než hydrolyza PITC, nízké zastoupení DPTU v průběhu hydrolyzy PITC dokládá, že rychlost hydrolyzy PITC je výrazně vyšší než rychlost jeho reakce s anilinem.

Tabulka 6: Přehled rychlostních konstant hydrolyzy PITC a hydrolyzy DPTU při teplotě 80 °C v závislosti na pH

pH	hydrolyza PITC	hydrolyza DPTU
	k [s ⁻¹]	k [s ⁻¹]
5	2,11 · 10 ⁻⁴	3,94 · 10 ⁻⁵
7	2,23 · 10 ⁻⁴	4,62 · 10 ⁻⁵
9	3,94 · 10 ⁻⁴	5,36 · 10 ⁻⁵
11	6,40 · 10 ⁻⁴	4,27 · 10 ⁻⁵

5 Závěr

Úkolem této práce bylo vyvinout vhodnou HPLC metodu pro sledování hydrolýzy PITC a následné studování této hydrolýzy v závislosti na pH a na teplotě. Optimální vyvinutá metoda isokratické eluce má složení mobilní fáze acetonitril-deionizovaná voda (75:25, v/v) a průtokovou rychlost $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Během studia hydrolýzy PITC bylo zjištěno, že jeden z konečných produktů, DPTU, se samovolně rozpadá na další produkty. Tento rozpad DPTU byl prostudován při teplotě $80 \text{ }^\circ\text{C}$ v závislosti na pH.

Nejrychleji probíhá hydrolýza PITC při pH 11 a teplotě $80 \text{ }^\circ\text{C}$ a nejpomaleji probíhá hydrolýza PITC při pH 7 a teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Rychlostní konstanta hydrolýzy PITC roste s rostoucím pH. Při pH 9 a 11 rychlostní konstanta hydrolýzy PITC roste s rostoucí teplotou reakce. Nejrychleji probíhá rozpad DPTU při $80 \text{ }^\circ\text{C}$ a pH 9 a nejpomaleji probíhá při $80 \text{ }^\circ\text{C}$ a pH 5. Rychlostní konstanta rozpadu DPTU roste s rostoucím pH k hodnotě pH 9 a při pH 11 dochází k poklesu rychlostní konstanty rozpadu DPTU. Hydrolýza PITC na anilin a DPTU probíhá při všech hodnotách pH řádově rychleji než hydrolýza DPTU na anilin.

Literatura

- [1] Klener, P.: Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Praha 7, Grada Publishing 2010.
- [2] Příbylová, M.; Dvořáková, M.; Vaněk, T.: *Chem. Listy* **104**, 1023 (2010).
- [3] Hermanson, G.: *Bioconjugate techniques*. 2nd ed. London, Elsevier 2008.
- [4] Krouská, H.: HPLC studie farmakologických spojovacích reakcí. Dostupné z URL: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/130106070> [cit. 15. 6. 2015].
- [5] Ulbrich, K.; Etrych, T.; Chytil, P.; Jelínková, M.; Říhová, B.: *J. Control. Release* **87**, 33 (2003).
- [6] Langer, R.: *Nature* **392**, 5 (1998).
- [7] Allen, T. M.; Moase, E. H.: *Advanced Drug Delivery Reviews* **21**, 117 (1996).
- [8] Hrubý, M.; Kučka, J.; Kozempel, J.; Lebeda, O.: *Chem. Listy* **100**, 10 (2006).
- [9] Kearney, A. S.: *Advanced Drug Delivery Reviews* **19**, 225 (1996).
- [10] Hampl, F.; Paleček, J.: *Farmakochemie*. 2 vyd. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 2007.
- [11] Hermanson, G.: *Bioconjugate Techniques*. 2nd ed. London, Elsevier 2008.
- [12] Zhang, Y. S.: *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen* **555**, 173 (2004).
- [13] Conaway, C. C.; Yang, Y. M.; Chung, F. L.: *Current Drug Metabolism* **3**, 233 (2002).
- [14] Delaquis, P. J.; Mazza, G.: *Food Technology* **49**, 73 (1995).
- [15] Drobnica, I.; Podhradský, D.; Gemeiner, P.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **40**, 3688 (1975).
- [16] Zhang, Y. S.; Talalay, P.: *Cancer Research* **54**, 1976 (1994).
- [17] Murthy, V.; Davies, H. M. L.; Hedley, S. J.; Childers, S. R.: *Biochemical Pharmacology* **74**, 336 (2007).
- [18] Rawel, H. M.; Kroll, J.; Schroder, I.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 5103 (1998).
- [19] Mani, P.; Umamaheswari, H.; Joshua, B. D.; Sundaraganesan, N.: *Theochem-J. Mol. Struct.* **863**, 44 (2008).
- [20] Sanchez-Machado, D. I.; Lopez-Cervantes, J.; Lopez-Hernandez, J.; Paseiro-Losada, P.; Simal-Lozano, J.: *Chromatographia* **58**, 159 (2003).

- [21] Bailey-Shaw, Y. A.; Golden, K. D.; Pearson, A. G. M.; Porter, R. B. R.: *Journal of Chromatographic Science* **47**, 674 (2009).
- [22] Boehncke, W. H.; Wessmann, D.; Zollner, T. M.; Hensel, O.: *Contact Dermatitis* **36**, 271 (1997).
- [23] Aplin, C. G.; Bower, C.; Finucane, K.; Sansom, J. E.: *Contact Dermatitis* **45**, 301 (2001).
- [24] Garcia-Morales, I.; Bravo, B. G.; Martinez, F. C.: *Contact Dermatitis* **49**, 172 (2003).
- [25] Meding, B.; Baum, H.; Bruze, M.; Roupe, G.; Trulsson, L.: *Contact Dermatitis* **22**, 8 (1990).
- [26] Wang, S.; Gao, Q. Y.; Wang, J. C.: *J. Phys. Chem. B.* **109**, 17281 (2005).
- [27] Saunders, J. H.; Slocombe, R. J.: *Chemical Reviews* **43**, 203 (1948).
- [28] Pecháček, R.; Velíšek, J.; Hrabcová, H.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 4584 (1997).
- [29] Kawakish.S; Namiki, M.: *Agricultural and Biological Chemistry* **33**, 452 (1969).
- [30] Bost, R. W.; Andrews, E. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **65**, 900 (1943).
- [31] Harvey, D.: *Modern Analytical Chemistry*. United States of America, McGraw-Hill 2000.
- [32] Mendez, A.; Bosch, E.; Roses, M.; Neue, U. D.: *Journal of Chromatography A* **986**, 33 (2003).
- [33] Holley, A. E.; Slater, T. F.: *Free Radical Research Communications* **15**, 51 (1991).
- [34] Liang, H.; Yuan, Q. P.; Dong, H. R.; Liu, Y. M.: *Journal of Food Composition and Analysis* **19**, 473 (2006).
- [35] Tsao, R.; Yu, Q.; Potter, J.; Chiba, M.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 4749 (2002).
- [36] Matthaus, B.; Fiebig, H. J.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 3894 (1996).
- [37] Svatek, E.; Zahradnik, R.; Kjaer, A.: *Acta Chemica Scandinavica* **13**, 442 (1959).
- [38] Zhang, Y. S.; Wade, K. L.; Prester, T.; Talalay, P.: *Analytical Biochemistry* **239**, 160 (1996).

- [39] Wilson, E. A.; Ennahar, S.; Marchioni, E.; Bergaentzle, M.; Bindler, F.: *J. Sep. Sci.* **35**, 2026 (2012).
- [40] Atkins, P., W.: *Physical Chemistry*. Oxford, Oxford University Press 1994.