

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Studium derivatizační reakce bazických léčiv s NBD-Cl

Vedoucí diplomové práce: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové, 2008

Hedvika Svárovská

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a pramenů a v práci řádně citovány.

.....

datum

.....

podpis

Ráda bych poděkovala Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. za cenné rady a připomínky, které mi poskytl při vypracování mé diplomové práce.

OBSAH

Souhrn	1
Abstract	2
1 Úvod	3
2 Teoretická část	5
2.1 Absorpční spektrofotometrie v UV-VIS oblasti	6
2.2 Luminiscenční analýza	8
2.3 Využití 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolu (NBD-Cl) jako fluorescenčního činidla pro derivatizaci aminokyselin a aminů.....	13
2.4 Reakční mechanismus derivatizační reakce	14
3 Praktická část	16
3.1 Chemikálie	17
3.2 Použité přístroje	20
3.3 Použité roztoky	21
3.4 Nortriptylin	22
3.4.1 Fluorimetrie	22
3.5 Flubendazol.....	24
3.5.1 Absorpční spektrofotometrie.....	24
3.5.2 Fluorimetrie	25
4 Výsledky	28
4.1 Nortriptylin	29
4.1.1 Fluorimetrie	29
4.1.1.1 Stanovení optimálního pH	29
4.1.1.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu.....	30
4.1.1.3 Stanovení reprodukovatelnosti metody.....	31
4.1.1.4 Stanovení stechiometrie derivatizační reakce.....	32
4.2 Flubendazol.....	37
4.2.1 Absorpční spektrofotometrie.....	37
4.2.1.1 Stanovení závislosti absorbance na pH	37
4.2.2 Fluorimetrie	38
4.2.2.1 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci flubendazolu.....	38
4.2.2.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci NBD-Cl	40
4.2.2.3 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu.....	41
4.2.2.4 Stanovení kalibrační křivky	43

4.2.2.5	<i>Stanovení reprodukovatelnosti metody</i>	47
5	Diskuze	49
6	Závěr	53
	Seznam použité literatury a pramenů	55

Souhrn

Předmětem této diplomové práce je studium derivatizačních reakcí nortriptylinu a flubendazolu se 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolem (NBD-Cl) z hlediska využitelnosti tohoto postupu pro fluorescenční detekci zkoumaných látek při HPLC.

Podle výsledků této práce lze nortriptylin pomocí NBD-Cl úspěšně derivatizovat. Optimální podmínky derivatizační reakce jsou $\text{pH} = 9,0$ a doba reakce (třepání reakční směsi v termostatu při teplotě 70°C) pět minut, přičemž nortriptylin reaguje s NBD-Cl v ekvimolárním poměru. Reprodukovatelnost metody je za daných podmínek dobrá a rozsah fluorescenčního stanovení je lineární.

Reakce flubendazolu s NBD-Cl naopak pozitivní výsledky nepřinesla. Derivatizační reakce podle všeho neprobíhá kvantitativně, ačkoliv vznik určitého množství blíže neurčených fluoreskujících derivátů nelze na základě výsledků vyloučit. K definitivnímu řešení tohoto problému bude tedy třeba uplatnit jiné analytické metody.

Abstract

The subject of this thesis is the study of reactions based on a derivatization, specifically the derivatization of nortriptyline and flubendazole with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) concerning a potential use of this method in HPLC with fluorimetric detection of the examined substances.

According to the obtained results, nortriptyline with NBD-Cl can be successfully derivatized. The optimum conditions of derivatization are $\text{pH} = 9$ with the duration of the reaction (shaking the reaction mixture while heating at 70°C) of five minutes. Under these optimum conditions the molar reactivity of this reaction is 1:1, the reproducibility of the method is good and the range of fluorimetric assay is linear.

On the contrary, no positive results arose in the course of examining the reaction of flubendazole with NBD-Cl. However, the derivatization seems not to run quantitatively, the results show, that a formation of some undefined fluorescent derivatives cannot be excluded. Other analytical methods need to be applied to solve this problem then.

1 Úvod

Tato diplomová práce se zabývá studiem derivatizačních reakcí nortriptylinu a flubendazolu se 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolem, které převádějí tyto látky na fluoreskující sloučeniny, a možností jejich využití pro fluorescenční detekci daných látek.

O derivatizační reakci nortriptylinu s uvedeným činidlem pojednává diplomová práce Hudzieczkové¹⁶⁾, avšak s neuspokojivými výsledky. Proto na ni tato práce navazuje s cílem danou metodu pro detekci této konkrétní látky znovu prověřit a posoudit možnost jejího objektivního použití.

Problematika derivatizace flubendazolu byla zkoumána pro účely biochemického výzkumu s cílem uplatnit fluorescenční detekci benzimidazolů v rámci HPLC analýzy. Flubendazol je momentálně předmětem výzkumu na katedře biochemických věd naší fakulty a je studována rezistence některých parazitů na tuto látku. Při tom je třeba chromatograficky stanovovat samotný flubendazol i jeho metabolity. U jednoho z metabolitů bude nutná derivatizační reakce pro účely fluorescenční detekce. Úkolem této diplomové práce bylo zjistit, nakolik je možné očekávat zároveň vznik případného derivátu samotného flubendazolu.

2 Teoretická část

2.1 Absorpční spektrofotometrie v UV-VIS oblasti

UV-VIS spektrofotometrie patří mezi optické instrumentální metody, jejichž mechanismus je založen na interakci hmoty a záření. Roztok umístěný v kyvetě absorbuje elektromagnetické záření z ultrafialové (UV; 200-400 nm) a viditelné (VIS; 400-800 nm) oblasti spektra. Počáteční intenzita záření definované vlnové délky se však při průchodu vzorkem zeslabuje o podíl, který je tímto prostředím absorbován a měří se intenzita záření, které kyvetou prochází. Absorpcí záření se zvýší energie molekuly nebo atomu, čímž se dostávají ze svého základního stavu o nejmenší energii do stavu excitovaného o energii vyšší.¹⁾

V kvantitativní analýze je nejdůležitější určovanou veličinou absorbance. Závislost absorbance na koncentraci zkoumané látky při konstantní hodnotě vlnové délky vyjadřuje kalibrační křivka. Absorpční spektrum (absorpční křivka) představuje závislost absorpce na vlnové délce a podává základní informace o absorbující látce.¹⁾ Během měření spektra se vlnová délka monochromatického paprsku plynule mění, takže je spektrum registrováno jako spojitá křivka.²⁾ Jednotlivé oblasti absorpce ve spektru se nazývají absorpční pásy.¹⁾ Jeden pás ve spektru odpovídá jednomu typu přechodu elektronů v molekule do excitovaného stavu.⁴⁾

Spektrofotometrie v UV (event. VIS) oblasti má široké využití jak při důkazu léčiv, tak i v kvantitativní analýze. Používá se k ověření identity a čistoty látek (kvalitativní analýza) nebo ke stanovení jejich obsahu (kvantitativní analýza). Poloha a intenzita elektronových absorpčních pásů ve spektru (tj. maxima a minima při určitých vlnových délkách) je závislá na struktuře analyzovaného léčiva, především na typu a počtu chromoforů v molekule. Je-li v molekule několik konjugovaných vazeb, posunuje se absorpce do oblastí vyšších vlnových délek, tedy do viditelné oblasti spektra.²⁾

Pro důkaz totožnosti se musí shodovat hodnoty odečtené z UV spektra analyzovaného léčiva s hodnotami uvedenými v příslušném lékopisném článku, tedy s hodnotami standardu. Je proto nutné proměřovat UV spektrum vzorku analyzovaného léčiva za podmínek předepsaných v lékopise, protože za týchž podmínek bylo proměřeno UV spektrum standardu. Porovnáványi hodnotami jsou polohy absorpčních maxim a minim udané příslušnými vlnovými délkami. Jejich poloha je navíc doplněna údajem specifické absorbance (zpravidla pro výrazné maximum ve

spektru) a údajem poměru absorbancí při dvou vybraných vlnových délkách.²⁾ Jestliže počet a poloha absorpčních maxim standardu a neznámé látky souhlasí, můžeme pokládat obě látky za identické. V mnohých případech mohou i stopy znečištěnin silně ovlivnit absorpční spektrum analyzované látky.¹⁾

Kvantitativní analýza je založena na platnosti Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde je:

A	absorbance měřeného roztoku
ε	molární absorpční koeficient [$l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
c	molární koncentrace absorbující látky [$\text{mol} \cdot l^{-1}$]
l	tloušťka měřené vrstvy [cm].

Lambert-Beerův zákon však platí pouze pro monochromatické záření, které je možné získat pomocí monochromátoru nebo spektrálními filtry. Uvedený vztah platí v případě, že je přítomna pouze jedna absorbující složka; za přítomnosti více složek je výsledná absorbance dána součtem absorbancí jednotlivých složek. Zpravidla se měří při vlnové délce maxima absorpčního pásu, kdy je měření nejcitlivější. Stanovit lze sloučeniny na základě jejich vlastní absorpce v UV nebo VIS oblasti a sloučeniny, které vlastní absorpci nevykazují, je možné vhodnou chemickou reakcí s činidlem derivatizovat, tj. převést na sloučeniny, jež absorbují.¹⁾

Výpočet obsahu léčiv v analyzovaných vzorcích se provádí podle vzorce odvozeného z Lambert-Beerova zákona; hodnota specifické absorbance je zpravidla uvedena u příslušného lékopisného článku (lze ji též snadno zjistit experimentálně). Pro analýzu série vzorků se používá metoda kalibrační křivky, která je obzvláště výhodná pro vymezení lineární závislosti absorbance na koncentraci stanovovaného léčiva.³⁾

UV-VIS spektrofotometrie má pro svou selektivnost, citlivost a jednoduchost provedení velmi široké využití.

2.2 Luminiscenční analýza

Luminiscenční analýza patří mezi optické instrumentální metody a je založena na schopnosti některých látek emitovat světelné záření, fotoluminiscenci, po předchozí excitaci elektromagnetickým vlněním. Základní dělení fotoluminiscence je na fluorescenci a fosforescenci, přičemž v praxi se nejčastěji používají metody fluorescenční.

Fotoluminiscenční záření vysílají molekuly excitované ultrafialovým nebo viditelným zářením při přechodu elektronu z vyšší energetické hladiny do nižší. Látka tedy nejdříve absorbuje elektromagnetické záření (primární záření), molekuly se dostanou do excitovaného stavu a při přechodu do stabilnějšího stavu o nižší energii uvolňují energii ve formě emise záření (sekundární záření).⁵⁾ Intenzita emitovaného světla je přitom přímo úměrná koncentraci fluoreskující sloučeniny, čehož se využívá ke stanovení některých látek. Při návratu do základního stavu se část energie vyzáří také ve formě tepla.⁶⁾ Z tohoto důvodu je vlnová délka emitovaného záření fluoreskujících sloučenin větší nebo rovna vlnové délce excitačního záření (tj. energie luminiscenční emise je menší nebo rovna energii excitačního záření). Toto pravidlo definuje Stokesův zákon ($\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$).

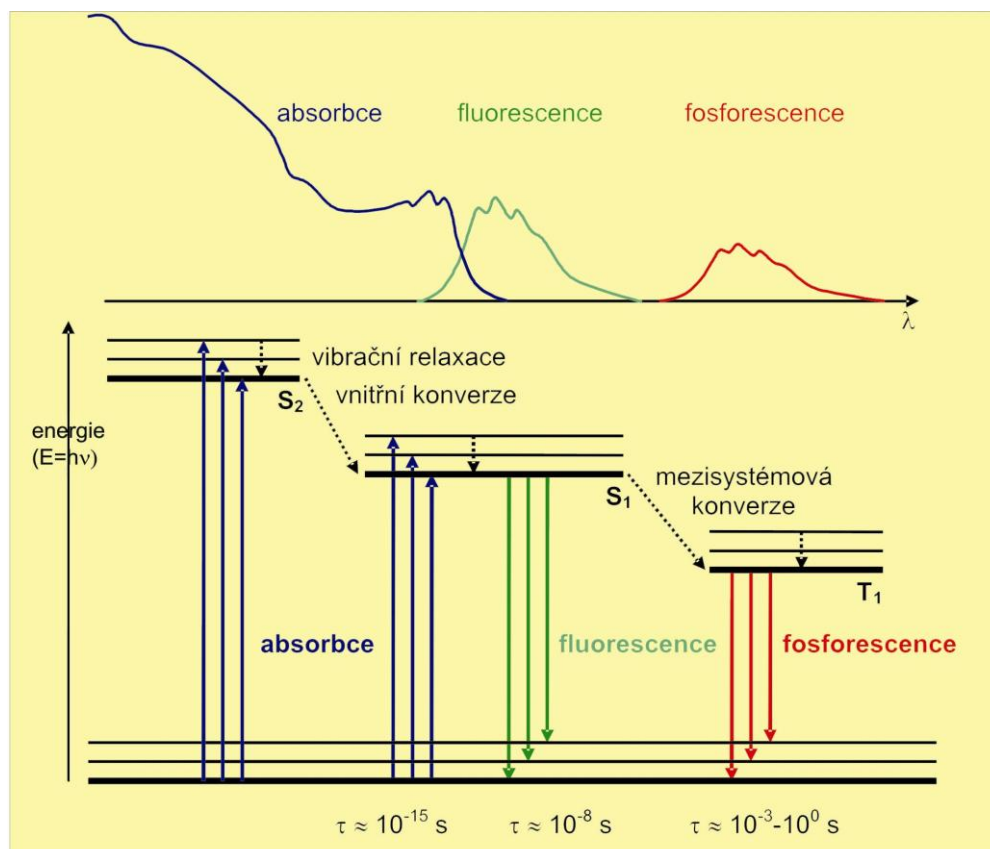
Prakticky pozorovatelným rozdílem mezi fluorescencí a fosforescencí je doba dohasínání (doba života excitovaného stavu τ). Tato doba je určena průměrným časem, který molekula stráví v excitovaném stavu před návratem do stavu základního.⁷⁾ Při fluorescenci jsme schopni emitované záření pozorovat pouze během buzení a po odeznění excitace fluorescence prakticky ihned mizí, doba dohasínání je obvykle řádově 10^{-8} s. Fosforescence má dobu dohasínání delší ($\gg 10^{-8}$) a látka emituje záření po dobu delší než je samotná excitace. Fosforescenci však nelze obvykle pozorovat v roztocích při pokojové teplotě.

Princip vzniku sekundárního záření demonstrativně ukazuje obr. 1. Jedná se o zjednodušené schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly, jež je doplněno tvarem absorpčních a emisních spekter.

Po absorpci světelného kvanta budícího záření (viz modré šipky) přechází elektrony ze singletního stavu S_0 do excitovaných singletních stavů S_1, S_2, \dots a tripletních stavů T_1, T_2, \dots . Molekula obvykle přejde z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_0 do některé z vibračních hladin excitovaných stavů. K deexcitaci molekuly dochází buď zářivými přechody (luminiscence; viz zelené a červené šipky) nebo nezářivými přechody (vnitřní konverze, mezisystémová konverze, vibrační relaxace; viz černé tečkované šipky). Doba trvání τ jednotlivých procesů je pro absorpci řádově 10^{-15} s, pro fluorescenci 10^{-8} s, pro fosforescenci je mnohem delší než 10^{-8} s (obvykle milisekundy až sekundy), pro vibrační relaxaci 10^{-12} - 10^{-13} s, pro vnitřní konverzi 10^{-6} - 10^{-12} s, pro mezisystémovou konverzi 10^{-4} - 10^{12} s.⁷⁾

Celý proces určuje tzv. Kashovo pravidlo, které říká, že před vlastní emisí fluorescenčního kvanta dochází obvykle nejprve k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 . To je rovněž z obr. 1 patrné.

Obrázek 1: Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly (forma Jablonského diagramu)⁷⁾



Fluorescence je definována dvěma spektry, excitačním a emisním. Excitační spektrum vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu či frekvenci) budícího záření při konstantní vlnové délce emitovaného záření. Emisní spektrum vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu či frekvenci) emitovaného záření při konstantní vlnové délce budícího záření.^{5),7)}

Většina složitých organických molekul nefluoreskuje. Intenzivní fluorescenci vykazují cyklické nebo heterocyklické sloučeniny s volnými π elektrony, zejména pak sloučeniny s konjugovaným systémem dvojných vazeb a symetrickou molekulou, která umožňuje izomerii či tautomerii a sloučeniny schopné tvořit ortochinoidní a parachinoidní cykly, popř. vodíkové můstky. Intenzivní fluorescenci symetrických molekul s konjugovaným systémem a rigidní strukturou vysvětluje skutečnost, že absorbující část molekuly těchto sloučenin je dostatečně chráněna a elektrony jsou pevně vázány, což znesnadňuje vznik fotochemické reakce a rychlý přechod elektronů na vyšší energetickou hladinu.⁴⁾ Intenzivně fluoreskující sloučeniny nazýváme fluorofory nebo fluorescenční barviva.⁷⁾

Tyto sloučeniny jsou velmi citlivé na změnu pH, polarity a na přítomnost oxidačních činidel či zhasedel fluorescence.⁶⁾ V roztocích dochází vlivem elektrostatických interakcí mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla k solvataci fluoreskujících molekul. Jelikož mají molekuly v základním a v excitovaném stavu různé dipólové momenty a polarizovatelnost, dochází při měření fluorescence v roztocích ke změnám v optických spektrech vlivem různé solvatace molekul. K emisi záření dochází z rovnovážné konfigurace v excitovaném stavu. Energie emitovaného fluorescenčního záření je však menší, než by odpovídalo čistě elektronovému přechodu, protože část absorbované energie se spotřebuje na relaxaci molekul rozpouštědla kolem molekuly fluoroforu v excitovaném i v základním stavu.⁷⁾

Vysoká citlivost fluorescenčních metod vyplývá ze schopnosti fluoroforu být opakovaně excitován a emitovat fluorescenční záření. Kvantitativním vyjádřením fluorescence je její kvantový výtěžek a intenzita. Kvantový výtěžek definujeme jako poměr pozorované střední doby dohasínání fluorescence (τ) a vnitřní (též radiační, přirozené) doby života excitovaného stavu bez zhasécích mechanismů (τ_0). Intenzita fluorescence je poté úměrná intenzitě absorpce násobené kvantovým výtěžkem. Při použití citlivých fotonásobičů pro detekci záření a při buzení intenzivním světlem lze

detekovat koncentrace rozpuštěných látek až 10^{-12} mol/l, což je alespoň o čtyři řády vyšší citlivost než pro absorpční měření. Vavilovův zákon navíc říká, že kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření. Z toho vyplývá, že excitační spektrum fluorescence zředěných roztoků je replikou jejich absorpčního spektra a lze tak spektrofotometricky získat absorpční spektrum fluoreskující látky při daleko nižších koncentracích než při přímém měření absorpce na spektrofotometru.⁷⁾

Pro velké množství organických molekul platí zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem. Symetrie je způsobena tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu, přičemž vibrační struktura základního i excitovaného stavu je stejná. Rozdíl mezi maximy absorpčního a emisního pásu se nazývá Stokesův posuv. Výjimky z pravidla zrcadlové symetrie jsou obvykle důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném a základním stavu.⁷⁾

Problémem fluorescenční spektroskopie je zhášení fluorescence a fotovybělování. Pod pojmem zhášení fluorescence rozumíme proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence beze změny fluorescenčního emisního spektra. Příčin může být několik. Pokud je fluorofor v excitovaném stavu deaktivován (tj. vrací se nezářivě do základního stavu) srážkou s molekulou zhášedla, mluvíme o srážkovém (dynamickém) zhášení. Jinou příčinou je tvorba nefluorescenčního komplexu po kontaktu fluoroforu a zhášedla, jež se nazývá statické zhášení. Molekuly jsou při tomto procesu navíc i chemicky změněny. Třetím typem zhášení je samozhášení, což je zhášení fluoroforu jím samotným. Tento typ nastává při vysokých koncentracích fluoroforu nebo při vysoké denzitě značení. Nejčastějším zhášedlem je molekulární kyslík (O_2), dále pak atomy halogenů jako je bróm a jód. Závažným problémem je již výše zmíněné fotovybělování (photobleaching). Při tomto jevu dochází k nevratné destrukci excitovaného fluoroforu a proces fluorescence tak není cyklický, protože tentýž fluorofor nemůže být znovu excitován.⁷⁾

Kvantitativní analýza pomocí fluorescenční spektroskopie vychází ze závislosti intenzity fluorescence na koncentraci stanovované látky. Koncentraci dané fluoreskující látky stanovujeme metodou kalibrační křivky. Závislost intenzity fluorescence na koncentraci fluoreskující látky popisuje následující vztah:

$$F = k \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde je:

F	intenzita fluorescence
k	konstanta zahrnující kvantový výtěžek fluorescence
I_0	intenzita záření dopadajícího na vzorek
ε	molární absorpční koeficient
c	molární koncentrace fluoreskující látky
l	tloušťka vrstvy roztoku, kvvety.

Fluorimetrie je vysoce citlivá a selektivní metoda. Selektivnost vyplývá ze skutečnosti, že pouze omezený počet látek vykazuje fluorescenci, avšak z důvodu vysoké citlivosti metody, která umožňuje detekci velmi nízkých koncentrací, byla vyvinuta řada derivatizačních postupů pro převedení nefluoreskujících látek na jejich fluoreskující deriváty.^{4),5)}

2.3 Využití 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolu (NBD-Cl) jako fluorescenčního činidla pro derivatizaci aminokyselin a aminů

Roku 1968 v průběhu zkoumání derivátů 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolu pro jejich potenciální antileukemickou aktivitu zjistili Gosh a Whitehouse⁸⁾ skutečnost, že mnohé 7-amino deriváty této sloučeniny vykazují po excitaci viditelným světlem ($\lambda = 464 \text{ nm}$) ve slabě polárním rozpouštědle vysokou fluorescenci v případě, že aminoskupina je odvozena od alifatických aminů. Reakci s NBD-Cl v roli fluorescenčního činidla tak uplatnili pro důkaz i stanovení aminokyselin a peptidů, přičemž předpokládali, že silná fluorescence těchto sloučenin vzniká právě vlivem aminoskupiny navázané na tuto molekulu. Ukázalo se, že substituce aminoskupiny zkoumaných látek omezuje její konjugaci s NBD-Cl a způsobí tak dramatickou ztrátu fluorescence. Naproti tomu fluorescenci vykazují i ty NBD-Cl deriváty, jež nesou v pozici sedm jinou elektrondonorovou skupinu (např. -OR; -SR), ale její intenzita je mnohem menší než u 7-amino derivátů. Předností NBD-Cl jako fluorescenčního činidla je jeho chemická stabilita (např. vůči vlhkosti) a dobrá rozpustnost ve vodných roztocích, což předurčuje výhodnost jeho použití pro důkaz a stanovení nízkých koncentrací primárních a sekundárních aminů a aminokyselin prostřednictvím derivatizace.

Derivatizační reakci se 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolem využili například El-Elmam, Hansen, Moustafa, El-Ashry a El-Sherbiny ke kvantitativnímu stanovení lisinoprilu pomocí absorpční spektrofotometrie a HPLC⁹⁾, přičemž určili stechiometrii derivatizační reakce podle J. Rose.¹⁰⁾

2.4 Reakční mechanismus derivatizační reakce

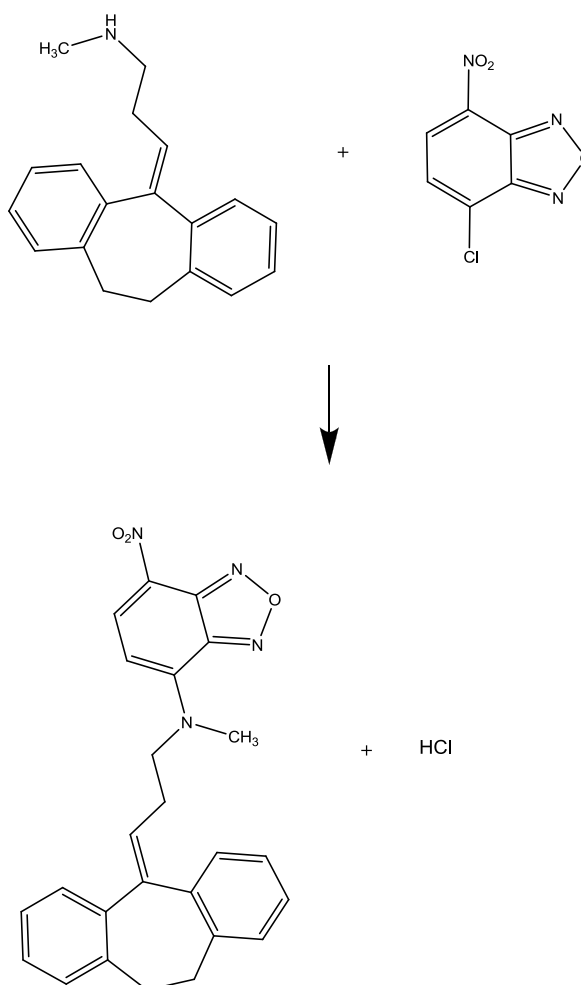
Reakční mechanismus derivatizace NBD-Cl odpovídá aromatické nukleofilní substituci. Při nukleofilní aromatické substituční reakci je substituent vázaný na aromatickém jádře nahrazen i se svým vazebným elektronovým párem nukleofilním činidlem.¹¹⁾ Činidlem v rámci nukleofilní substituce bývá malá molekula s volným elektronovým párem, která má díky tomu schopnost interagovat s molekulou mající v některé své části nedostatek elektronů. Substrátem je molekula, jež obsahuje skupiny, které polarizací vazby vytvářejí vhodné podmínky pro nukleofilní atak. Vzhledem k povaze aromatických systémů, které se vyznačují značnou stabilitou, probíhají tyto reakce zpravidla obtížněji, za drsnějších podmínek. Je-li však nahrazovaná skupina aktivována substituentem s $-I$ a $-M$ efekty, pak mohou tyto reakce probíhat překvapivě snadno. Rovněž záleží na povaze nahrazované skupiny. Odstupující skupina se vždy vyznačuje menší bazicitou, tedy menší nukleofilitou než má nukleofilní činidlo.¹²⁾ Nahrazovaným substituentem u NBD-Cl je halogen – chlór, který lze nahradit snadno, jelikož je navíc aktivován přítomnou nitroskupinou žádoucími zápornými efekty.

Obecně může být mechanismus nukleofilních substitucí monomolekulární či bimolekulární v závislosti na tom, kolik molekul se účastní přechodového (tranzitního) stavu. Vzniká-li reaktivní meziproduct z jediné molekuly (vzniká karbokation), je daná reakce monomolekulární, účastní-li se přechodového stavu obě reagující molekuly (nevzniká karbokation), jedná se o reakce bimolekulární.¹²⁾ Podle elementárních reakčních stupňů, přes něž se tato přeměna uskutečňuje, rozdělují se nukleofilní aromatické substituce do tří typů.¹¹⁾ A to na nukleofilní aromatické substituce monomolekulární, nukleofilní aromatické substituce bimolekulární s mechanismem adičně-eliminačním a nukleofilní aromatické substituce bimolekulární s mechanismem eliminačně-adičním.¹²⁾

Mechanismus reakce NBD-Cl s látkami studovanými v této diplomové práci je bimolekulární adičně-eliminační, přičemž NBD-Cl vystupuje jako substrát a příslušný amin jako nukleofilní činidlo. Uhlík nesoucí substituovanou skupinu, tedy atom chlóru, přechází působením nukleofilního ataku z planární hybridizace sp^2 na tetraedrickou hybridizaci sp^3 . Tím se dočasně ruší dokonalá konjugace aromatického jádra a elektrony jsou koncentrovány hlavně do poloh ortho a para. Jelikož je u NBD-Cl v poloze para navázána nitroskupina, přebytek elektronů je odváděn a atak nukleofilního činidla se

usnadní a urychlí. Přítomností deaktivující nitroskupiny klesá energetická náročnost reakce.¹²⁾ Na rychlost nukleofilní aromatické substituce má vliv i odstupující skupina. Celková reakce je dvoustupňová. Vliv odstupující skupiny na rychlost prvního stupně závisí především na tom, jak svým polárním efektem sníží elektronovou hustotu na aromatickém uhlíku, na který je vázána. Čím bude toto snížení elektronové hustoty větší, tím ochotněji bude uhlík reagovat s nukleofilem a tím bude tento stupeň rychlejší. Pro rychlost druhého stupně, tj. rozpadu intermediátu, bude rozhodující množství energie potřebné k polárnímu štěpení vazby mezi aromatickým uhlíkem a odstupující skupinou.¹¹⁾ Čím více odstupující skupina sníží elektronovou hustotu na aromatickém uhlíku, na který je vázána, tím snazší bude přístup a navázání nukleofilu v prvním stupni, avšak tím obtížnější bude polární štěpení vazby mezi aromatickým uhlíkem a odstupující skupinou ve stupni druhém.

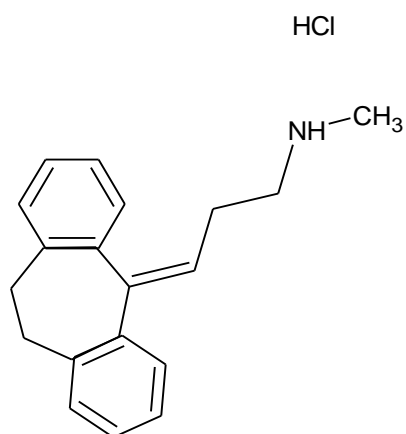
Obrázek 2: Schéma reakce nortriptylinu s NBD-Cl



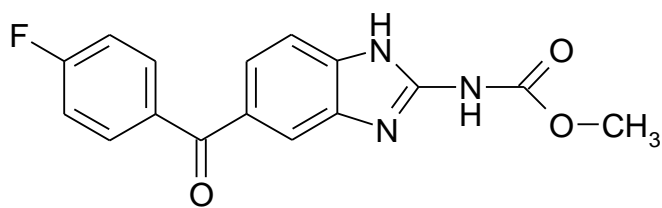
3 Praktická část

3.1 Chemikálie

3.1.1 Sledovaná léčiva

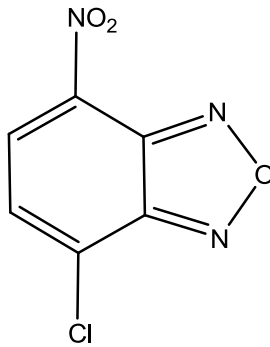


Nortriptylin - hydrochlorid (NTP) - Sigma



Flubendazol (FLU) - Jansen Pharmaceutica, Belgium

3.1.2 Derivatizační činidlo pro absorpční spektrofotometrii a fluorimetrii



7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) - Fluka

3.1.3 Další chemikálie

Methanol (CH_3OH) – Lach-Ner. s.r.o., Neratovice

Kyselina boritá (H_3BO_3 krystalická) – Lachema n.p. Brno

Chlorid draselný (KCl) – Lachema n.p. Brno, o.z. Neratovice

Hydroxid sodný (NaOH) – Lachema n.p. Brno, o.z. Neratovice

Kyselina chlorovodíková (HCl) – Lachema

Dimethylsulfoxid (DMSO) – Fluka

Deionizovaná voda připravená reverzní osmózou

3.2 Použité přístroje

Spektrofotometr HP 8453 (Hewlett Packard)

Spektrofluorimetr AMINCO – Bowman Series 2 (Thermo Electron Corporation)

pH-metr inoLab 720 (WTW) s pH elektrodou Theta typ 103

Ultratermostat U15 (Prüfgeräte-Werk Medingen)

Digitální analytické váhy (Satorius)

3.3 Použité roztoky

Methanolické roztoky NBD-Cl různých koncentrací

Zásobní a zředěné methanolické roztoky FLU

Zásobní a zředěné methanolické roztoky NTP

Borátový pufr příslušných hodnot pH

3.3.1 Příprava zásobního methanolického roztoku FLU

Zásobní roztok FLU ($c = 250 \text{ mg/l}$) jsem připravila rozpuštěním $2,5 \times 10^{-3} \text{ g}$ FLU v takovém množství DMSO, že se FLU právě rozpustil. Poté jsem roztok kvantitativně převedla do 10 ml odměrné baňky a doplnila methanolem. Ostatní roztoky jsem připravila příslušným ředěním methanolem.

3.3.2 Příprava zásobního methanolického roztoku NTP

Zásobní roztok NTP ($c = 260 \text{ mg/l}$) jsem připravila rozpuštěním $6,5 \times 10^{-3} \text{ g}$ NTP v methanolu v 25 ml odměrné baňce. Ostatní roztoky jsem připravila příslušným ředěním methanolem.

3.3.3 Příprava borátového pufru

Zásobní roztok borátového pufru jsem připravila rozpuštěním 0,620 g H_3BO_3 a 0,750 g KCl na 100 ml deionizovanou vodou. pH pufru jsem upravila pomocí roztoku NaOH ($c = 0,2 \text{ mol/l}$).

3.4 Nortriptylin

3.4.1 Fluorimetrie

3.4.1.1 Stanovení optimálního pH

Do 10 ml odměrných baněk jsem napipetovala 1 ml zásobního roztoku NTP ($c = 260 \text{ mg/l}$), 4 ml borátového pufru o $\text{pH} = 9,0$ a poté o $\text{pH} = 10,0$. Nakonec jsem přidala 2 ml 0,3% roztoku NBD-Cl. Ve slepých vzorcích byl NTP nahrazen stejným množstvím methanolu.

Takto připravené a zakryté roztoky jsem za stálého třepání zahřívala v termostatu při teplotě 70°C po dobu 30 minut. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem na 10 ml.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při emisní vlnové délce 545 nm a při excitační vlnové délce 470 nm.

3.4.1.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu

Provedení pokusů bylo shodné s postupem uvedeným v 3.4.1.1, pouze jsem změnila dobu třepání reakční směsi v termostatu a pH borátového pufru bylo 9,0.

3.4.1.3 Stanovení reprodukovatelnosti metody

Do šesti 10 ml odměrných baněk jsem napipetovala 1 ml zásobního roztoku NTP ($c = 260 \text{ mg/l}$), 4 ml borátového pufru ($\text{pH} = 9,0$) a 2 ml 0,3% roztoku NBD-Cl.

Takto připravené a zakryté roztoky jsem za stálého třepání zahřívala v termostatu při teplotě 70°C po dobu 5 minut. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem na 10 ml.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při emisní vlnové délce 545 nm a při excitační vlnové délce 470 nm.

3.4.1.4 Stanovení stechiometrie derivatizační reakce

3.4.1.4.1 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci NTP při konstantní koncentraci NBD-Cl

Do 10 ml odměrných baněk jsem napipetovala 1 ml roztoku NTP určité koncentrace v rozmezí 10–2 mg/l, 4 ml borátového pufru (pH = 9,0) a 2 ml 0,3% roztoku NBD-Cl.

Takto připravené a zakryté roztoky jsem za stálého třepání zahřívala v termostatu při teplotě 70°C po dobu 5 minut. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem na 10 ml.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při emisní vlnové délce 545 nm a při excitační vlnové délce 470 nm.

3.4.1.4.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci NBD-Cl při konstantní koncentraci NTP

Do 10 ml odměrných baněk jsem napipetovala 1 ml roztoku NTP ($c = 5 \text{ mg/l}$), 4 ml borátového pufru (pH = 9,0) a 2 ml 0,2–0,5% roztoku NBD-Cl.

Takto připravené a zakryté roztoky jsem za stálého třepání zahřívala v termostatu při teplotě 70°C po dobu 5 minut. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem na 10 ml.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při emisní vlnové délce 545 nm a při excitační vlnové délce 470 nm.

3.5 Flubendazol

3.5.1 Absorpční spektrofotometrie

3.5.1.1 Stanovení závislosti absorpance na pH

Do čtyř 10 ml odměrných baněk jsem napipetovala 0,2 ml roztoku FLU ($c = 25 \text{ mg/l}$), 4,6 ml borátového pufru o příslušném pH a 0,2 ml 0,3% roztoku NBD-Cl.

Takto připravené a zakryté roztoky jsem za stálého třepání zahřívala v termostatu při teplotě 70°C po dobu 30 minut. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem na 10 ml.

Absorbanci jsem měřila proti slepému vzorku, v němž byl FLU nahrazen stejným množstvím methanolu, při vlnové délce 470 nm.

3.5.2 Fluorimetrie

3.5.2.1 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci FLU

Do 10 ml odměrných baněk jsem napipetovala roztok FLU. Nejprve 0,2 ml roztoku FLU určité koncentrace v rozmezí 20–5 mg/l a 9–1 mg/l, poté 0,2–0,8 ml roztoku FLU ($c = 0,150$ mg/l) a nakonec 0,2–0,8 ml roztoku FLU ($c = 0,250$ mg/l). K roztoku FLU jsem napipetovala 4,6 ml borátového pufru ($\text{pH} = 10,0$) a 0,2 ml 0,3% roztoku NBD-Cl, poté 0,2 ml roztoku NBD-Cl ($c = 59,87$ mg/l).

Takto připravené a zakryté roztoky jsem za stálého třepání zahřívala v termostatu při teplotě 70°C po dobu 30 minut. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem na 10 ml.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při emisní vlnové délce 545 nm a při excitační vlnové délce 470 nm.

3.5.2.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci NBD-Cl

Do 10 ml odměrných baněk jsem napipetovala 0,8 ml roztoku FLU ($c = 25$ mg/l), 4,6 ml borátového pufru ($\text{pH} = 10,0$) a 0,2 ml roztoku NBD-Cl, nejprve o koncentraci 59,87 mg/l, poté o koncentraci 598,7 mg/l. Ve slepých vzorcích byl FLU nahrazen stejným množstvím vody.

Takto připravené a zakryté roztoky jsem za stálého třepání zahřívala v termostatu při teplotě 70°C po dobu 5 minut. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem na 10 ml.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při emisní vlnové délce 545 nm a při excitační vlnové délce 470 nm.

3.5.2.3 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu

Do 10 ml odměrných baněk jsem napipetovala 0,8 ml roztoku FLU ($c = 25 \text{ mg/l}$), 4,6 ml borátového pufru ($\text{pH} = 10,0$) a 0,2 ml roztoku NBD-Cl ($c = 598,7 \text{ mg/l}$), poté 0,2 ml 0,3% roztoku NBD-Cl. Ve slepých vzorcích byl FLU nahrazen stejným množstvím vody.

Takto připravené a zakryté roztoky jsem za stálého třepání zahřívala v termostatu při teplotě 70°C po dobu 5 a 10 minut. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem na 10 ml.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při emisní vlnové délce 545 nm a při excitační vlnové délce 470 nm.

3.5.2.4 Stanovení kalibrační křivky

Do 10 ml odměrných baněk jsem napipetovala 0,8 ml roztoku FLU určité koncentrace v rozmezí 20–4 mg/l, poté 10–2 mg/l a nakonec 1–0,2 mg/l. K roztoku FLU jsem napipetovala 4,6 ml borátového pufru ($\text{pH} = 10,0$) a 0,2 ml roztoku NBD-Cl ($c = 598,7 \text{ mg/l}$), poté 0,2 ml 0,3% roztoku NBD-Cl. Ve slepých vzorcích byl FLU nahrazen stejným množstvím vody nebo methanolu.

Takto připravené a zakryté roztoky jsem za stálého třepání zahřívala v termostatu při teplotě 70°C po dobu 5 a 30 minut. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem na 10 ml.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při emisní vlnové délce 545 nm a při excitační vlnové délce 470 nm.

3.5.2.5 Stanovení reprodukovatelnosti metody

Do čtyř 10 ml odměrných baněk jsem napipetovala 0,8 ml roztoku FLU ($c = 10 \text{ mg/l}$), 4,6 ml borátového pufru ($\text{pH} = 10,0$) a 0,2 ml 0,3% roztoku NBD-Cl.

Takto připravené a zakryté roztoky jsem za stálého třepání zahřívala v termostatu při teplotě 70°C po dobu 5 minut. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem na 10 ml.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při emisní vlnové délce 545 nm a při excitační vlnové délce 470 nm.

4 Výsledky

4.1 Nortriptylin

4.1.1 Fluorimetrie

4.1.1.1 Stanovení optimálního pH

Měřila jsem dva vzorky s různou hodnotou pH borátového pufru. Stanovení optimálního pH probíhalo za následujících podmínek:

$$c_{\text{NTP}} = 260 \text{ mg/l}; c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$$

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu 30 minut

$$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$$

Naměřené hodnoty uvádí tabulka 1.

Tabulka 1: Vliv pH na intenzitu fluorescence

Typ vzorku	pH	Intenzita fluorescence
1	9,0	6,3034
slepý vz. 1		5,8197
2	10,0	1,1832
slepý vz. 2		1,3593

4.1.1.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu

Stanovení závislosti intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu probíhalo za následujících podmínek:

$c_{\text{NTP}} = 260 \text{ mg/l}$; $c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$; $\text{pH} = 9,0$

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po stanovenou dobu

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty uvádí tabulka 2.

Tabulka 2: Závislost intenzity fluorescence na době třepání

Typ vzorku	Doba třepání (min)	Intenzita fluorescence
1	30	6,3034
slepý vz. 1		5,8197
2	20	9,8465
slepý vz. 2		9,40
3	10	6,3260
slepý vz. 3		3,3218
4	5	6,1276
slepý vz. 4		2,7570

4.1.1.3 Stanovení reprodukovatelnosti metody

Měřila jsem šest totožných vzorků za následujících podmínek:

$$c_{\text{NTP}} = 260 \text{ mg/l}; c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}; \text{pH} = 9,0$$

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu 5 minut

$$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$$

Naměřené hodnoty uvádí tabulka 3.

Tabulka 3: Hodnoty intenzity fluorescence u šesti totožných vzorků NTP

Číslo vzorku	Intenzita fluorescence
1	6,2366
2	5,4962
3	5,3052
4	5,7791
5	6,3898
6	6,5070

Z těchto naměřených hodnot byla určena opakovatelnost stanovení fluorescence s následujícím výsledkem:

průměrná hodnota stanovení	5,9523
směrodatná odchylka	0,2030

4.1.1.4 Stanovení stechiometrie derivatizační reakce

4.1.1.4.1 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci NTP při konstantní koncentraci NBD-Cl

Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci NTP při konstantní koncentraci NBD-Cl probíhalo za následujících podmínek:

NTP dané koncentrace; $c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$; $\text{pH} = 9,0$

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu 5 minut

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

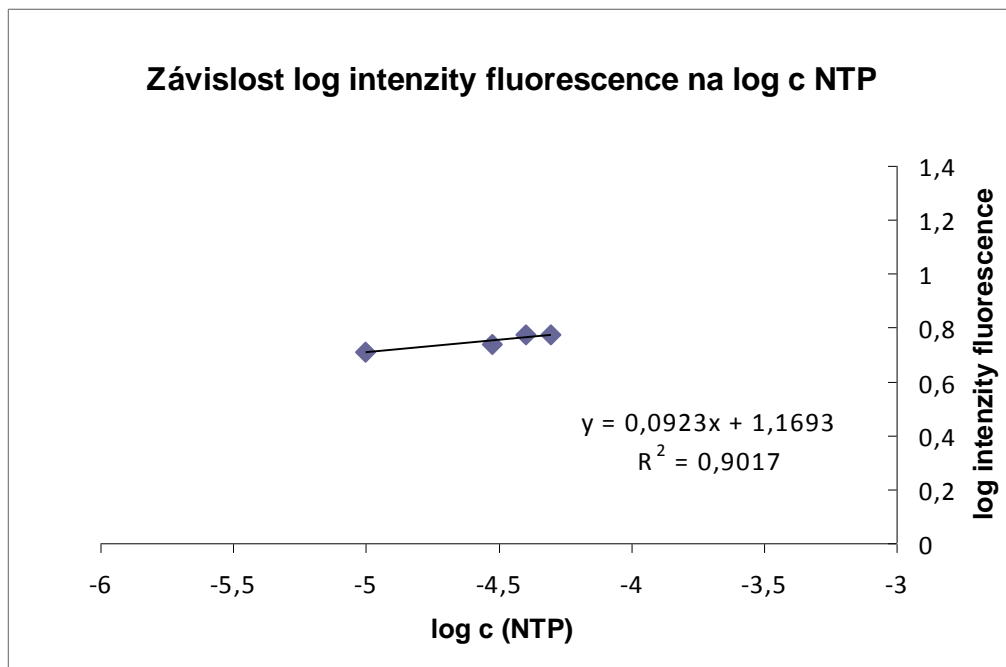
Naměřené hodnoty uvádí tabulka 4.

Tabulka 4: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci NTP při konstantní koncentraci NBD-Cl

$c_{\text{NTP}} \text{ (mg/l)}$	$c_{\text{NTP}} \text{ (mol/l)}$	Intenzita fluorescence	$\log c_{\text{NTP}} \text{ (mol/l)}$	\log intenzity fluorescence
2	0,00001	5,1346	-5,0	0,7105
6	0,00003	5,480	-4,5229	0,7388
8	0,00004	5,9271	-4,3979	0,7728
10	0,00005	5,9274	-4,3010	0,7729

Závislost log intenzity fluorescence na log koncentrace NTP uvádí graf 1.

Graf 1: Závislost log intenzity fluorescence na log koncentrace NTP



Hodnota směrnice přímky je 0,0923.

4.1.1.4.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci NBD-Cl při konstantní koncentraci NTP

Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci NBD-Cl při konstantní koncentraci NTP probíhalo za následujících podmínek:

$c_{\text{NTP}} = 5 \text{ mg/l}$; NBD-Cl dané koncentrace; $\text{pH} = 9,0$

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu 5 minut

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

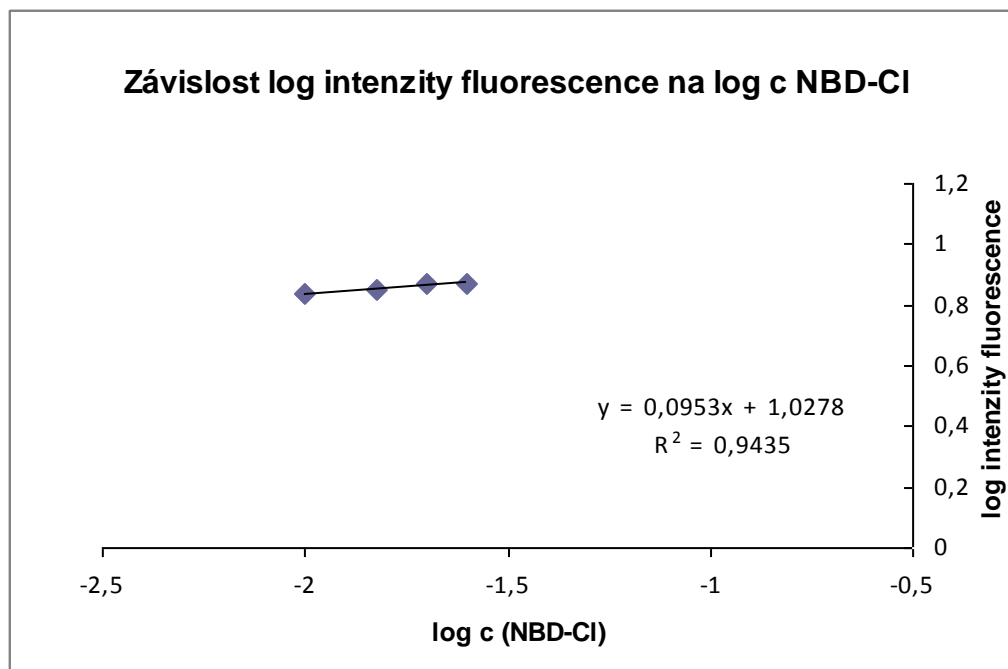
Naměřené hodnoty uvádí tabulka 5.

Tabulka 5: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci NBD-Cl při konstantní koncentraci NTP

$c_{\text{NBD-Cl}} \text{ (g/l)}$	$c_{\text{NBD-Cl}} \text{ (mol/l)}$	Intenzita fluorescence	$\log c_{\text{NBD-Cl}}$	\log intenzity fluorescence
2	0,010	6,8744	-2,0	0,8372
3	0,015	7,1030	-1,8239	0,8514
4	0,020	7,4393	-1,6990	0,8715
5	0,025	7,4469	-1,6021	0,8720

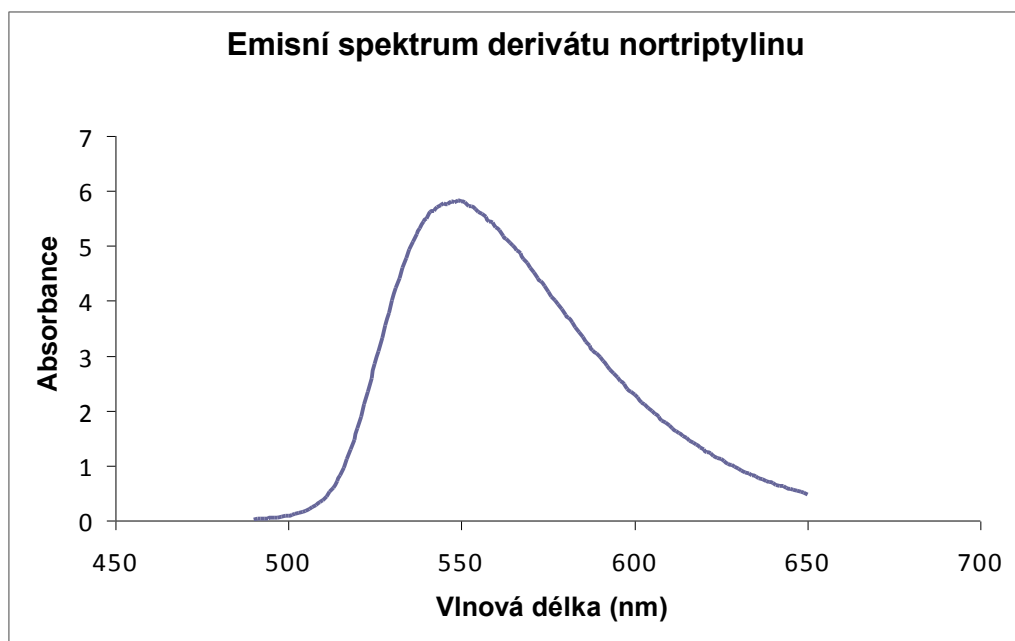
Závislost log intenzity fluorescence na log koncentrace NBD-Cl uvádí graf 2.

Graf 2: Závislost log intenzity fluorescence na log koncentrace NBD-Cl



Hodnota směrnice přímky je 0,0953.

Graf 3: Vzorové emisní spektrum derivátu nortriptylinu



4.2 Flubendazol

4.2.1 Absorpční spektrofotometrie

4.2.1.1 Stanovení závislosti absorbance na pH

Měřila jsem čtyři vzorky s různou hodnotou pH borátového pufru. Stanovení závislosti absorbance na pH probíhalo za následujících podmínek:

$$c_{\text{FLU}} = 25 \text{ mg/l}; c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$$

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu 30 minut

$$\lambda = 470 \text{ nm}$$

Naměřené hodnoty uvádí tabulka 6.

Tabulka 6: Závislost absorbance na pH

Číslo vzorku	pH	A
1	8,0	$-3,316 * 10^{-3}$
2	9,0	$-9,933 * 10^{-3}$
3	10,0	$-6,384 * 10^{-2}$
4	11,0	$-6,299 * 10^{-4}$

4.2.2 Fluorimetrie

4.2.2.1 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci FLU

Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci FLU probíhalo za následujících podmínek:

0,2 ml FLU dané koncentrace; $c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$; **pH = 10,0**

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu **30 minut**

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty uvádí tabulky 7 a 8.

Tabulka 7: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci FLU

Číslo vzorku	c_{FLU} (mg/l)	Intenzita fluorescence
1	20	5,691
2	10	5,673
3	5	6,209

Tabulka 8: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci FLU

Číslo vzorku	c_{FLU} (mg/l)	Intenzita fluorescence
1	9	5,938
2	5	5,841
3	1	5,609

$c_{\text{FLU}} = 0,150 \text{ mg/l}$; $c_{\text{NBD-Cl}} = 59,87 \text{ mg/l}$; $\text{pH} = 10,0$

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu **30 minut**

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty uvádí tabulka 9.

Tabulka 9: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci FLU

Číslo vzorku	V_{FLU} (ml)	m_{FLU} (μg)	c_{FLU} (mol/l)	Intenzita fluorescence
1	0,2	30,0	$9,58 * 10^{-6}$	6,5567
2	0,4	60,0	$1,92 * 10^{-5}$	5,9766
3	0,6	90,0	$2,87 * 10^{-5}$	6,1435
4	0,8	120,0	$3,83 * 10^{-5}$	6,1093

$c_{\text{FLU}} = 0,250 \text{ mg/l}$; $c_{\text{NBD-Cl}} = 59,87 \text{ mg/l}$; $\text{pH} = 10,0$

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu **30 minut**

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty uvádí tabulka 10.

Tabulka 10: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci FLU

Číslo vzorku	V_{FLU} (ml)	m_{FLU} (μg)	c_{FLU} (mol/l)	Intenzita fluorescence
1	0,2	50,0	$1,60 * 10^{-5}$	-177,777
2	0,4	100,0	$3,19 * 10^{-5}$	-176,831
3	0,6	150,0	$4,79 * 10^{-5}$	-177,133
4	0,8	200,0	$6,39 * 10^{-5}$	-177,525

4.2.2.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci NBD-Cl

Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci NBD-Cl probíhalo za následujících podmínek:

0,8 ml FLU o $c_{\text{FLU}} = 25 \text{ mg/l}$; NBD-Cl dané koncentrace; pH = 10,0
zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu **5 minut**

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty uvádí tabulka 11.

Tabulka 11: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci NBD-Cl

Typ vzorku	$c_{\text{NBD-Cl}}$ (mg/l)	Intenzita fluorescence
1	59,87	4,1721
slepý vz. 1		3,3090
2	598,7	8,8077
slepý vz. 2		6,7032

4.2.2.3 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu

Stanovení závislosti intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu probíhalo za následujících podmínek:

0,8 ml FLU o $c_{\text{FLU}} = 25 \text{ mg/l}$; $c_{\text{NBD-Cl}} = 598,7 \text{ mg/l}$; pH = 10,0

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po stanovenou dobu

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty uvádí tabulka 12.

Tabulka 12: Závislost intenzity fluorescence na době třepání

Typ vzorku	Doba třepání (min)	Intenzita fluorescence
1	5	8,8077
slepý vz. 1		6,7032
2	10	9,8132
slepý vz. 2		8,8156

0,8 ml FLU o $c_{\text{FLU}} = 25 \text{ mg/l}$; $c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$; pH = 10,0

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po stanovenou dobu

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty uvádí tabulka 13.

Tabulka 13: Závislost intenzity fluorescence na době třepání

Typ vzorku	Doba třepání (min)	Intenzita fluorescence
1	5	31,6837
slepý vz. 1		21,1920
2	10	33,2216
slepý vz. 2		21,2972

4.2.2.4 Stanovení kalibrační křivky

Měřila jsem vždy šest vzorků, z nichž jeden (číslo vzorku 6) byl slepý vzorek. Stanovení kalibrační křivky probíhalo za následujících podmínek:

FLU dané koncentrace; $c_{\text{NBD-Cl}} = 598,7 \text{ mg/l}$; pH = 10,0

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu **5 minut**

vodný slepý vzorek

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty uvádí tabulky 14 a 15.

Tabulka 14: Kalibrační závislost intenzity fluorescence na koncentraci FLU při konstantním množství NBD-Cl ($c = 598,7 \text{ mg/l}$)

Číslo vzorku	c_{FLU} (mg/l)	Intenzita fluorescence
1	20	9,0613
2	16	8,8309
3	12	9,2224
4	8	9,31
5	4	8,9874
6	0	7,4304

Tabulka 15: Kalibrační závislost intenzity fluorescence na koncentraci FLU při konstantním množství NBD-Cl ($c = 598,7 \text{ mg/l}$)

Číslo vzorku	c_{FLU} (mg/l)	Intenzita fluorescence
1	10	7,2614
2	8	6,7261
3	6	5,8136
4	4	6,4902
5	2	7,8861
6	0	6,3138

FLU dané koncentrace; $c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$; pH = 10,0

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu **5 minut**

vodný slepý vzorek

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty uvádí tabulka 16.

Tabulka 16: Kalibrační závislost intenzity fluorescence na koncentraci FLU při konstantním množství 0,3% roztoku NBD-Cl; doba třepání 5 minut; vodný slepý vzorek

Číslo vzorku	c_{FLU} (mg/l)	Intenzita fluorescence
1	10	21,6224
2	8	19,5404
3	6	23,287
4	4	23,8512
5	2	30,5914
6	0	13,5014

FLU dané koncentrace; $c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$; $\text{pH} = 10,0$

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu **5 minut**

methanolický slepý vzorek

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty uvádí tabulky 17 a 18.

Tabulka 17: Kalibrační závislost intenzity fluorescence na koncentraci FLU při konstantním množství 0,3% roztoku NBD-Cl; doba třepání 5 minut; methanolický slepý vzorek

Číslo vzorku	c_{FLU} (mg/l)	Intenzita fluorescence
1	10	6,0330
2	8	6,1206
3	6	6,0162
4	4	6,8311
5	2	7,0105
6	0	6,9577

Tabulka 18: Kalibrační závislost intenzity fluorescence na koncentraci FLU při konstantním množství 0,3% roztoku NBD-Cl; doba třepání 5 minut; methanolický slepý vzorek

Číslo vzorku	c_{FLU} (mg/l)	Intenzita fluorescence
1	1	6,0590
2	0,8	6,3342
3	0,6	6,6928
4	0,4	7,9581
5	0,2	7,1835
6	0	6,1704

FLU dané koncentrace; $c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$; $\text{pH} = 10,0$

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu **30 minut**

methanolický slepý vzorek

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty uvádí tabulka 19.

Tabulka 19: Kalibrační závislost intenzity fluorescence na koncentraci FLU při konstantním množství 0,3% roztoku NBD-Cl; doba třepání 30 minut; methanolický slepý vzorek

Číslo vzorku	c_{FLU} (mg/l)	Intenzita fluorescence
1	1	5,8136
2	0,8	5,9781
3	0,6	5,5515
4	0,4	5,8603
5	0,2	6,1276
6	0	5,9161

4.2.2.5 Stanovení reprodukovatelnosti metody

Měřila jsem čtyři totožné vzorky za následujících podmínek:

$c_{\text{FLU}} = 10 \text{ mg/l}$; $c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$; $\text{pH} = 10,0$

zahřívání za stálého třepání v termostatu při teplotě 70°C po dobu 5 minut

$\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty uvádí tabulka 20.

Tabulka 20: Hodnoty intenzity fluorescence u čtyř totožných vzorků FLU

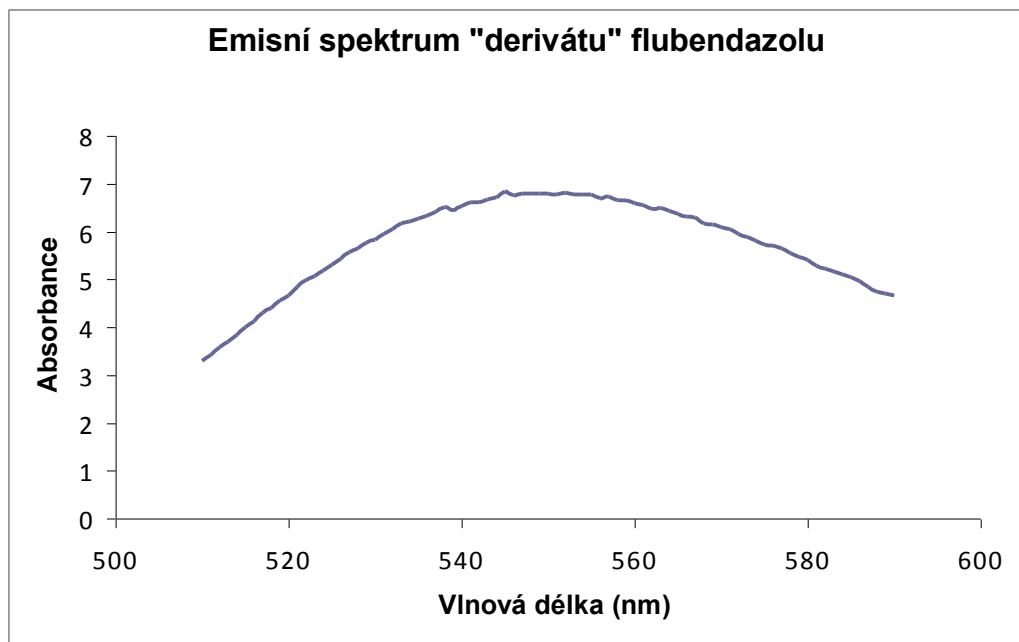
Číslo vzorku	Intenzita fluorescence
1	5,9332
2	6,2436
3	8,1180
4	6,1322

Z těchto naměřených hodnot byla určena opakovatelnost stanovení fluorescence s následujícím výsledkem:

průměrná hodnota stanovení 6,6068

směrodatná odchylka 0,5078

Graf 4: Vzorové emisní spektrum "derivátu" flubendazolu



5 Diskuze

Náplní této diplomové práce je studium reakcí nortriptylinu a flubendazolu s derivatizačním činidlem 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolem (NBD-Cl) za účelem stanovení těchto látek.

Nejprve jsem zkoumala derivatizační reakci nortriptylinu s NBD-Cl, čímž jsem navázala na diplomovou práci Hudzieczkové¹⁶⁾, ve které se ale tato metoda pro fluorescenční stanovení nortriptylinu neosvědčila. Z výsledků mé práce ale zřetelně vyplývá, že nortriptylin lze úspěšně s tímto činidlem derivatizovat. Při stanovení optimálního pH studované reakce jsem vycházela z výše uvedené diplomové práce, která uvádí, že při pH = 8,0 daná reakce neprobíhá, při pH = 9,0 je podle naměřených absorbancí výtěžek nejlepší a při pH = 10,0 je jen o málo (o cca 15%) horší než při pH = 9,0. Závěr, že při pH = 8,0 reakce prakticky neprobíhá, je zcela ve shodě s řadou dalších experimentů uskutečněných na katedře biofyziky a fyzikální chemie, proto jsem provedla stanovení optimálního pH při hodnotách pH = 9,0 a při pH = 10,0. Z mých výsledků uvedených v tabulce 1 na str. 29 jednoznačně vyplývá, že reakce probíhá nejlépe při pH = 9,0, neboť intenzita fluorescence při tomto pH je několikanásobně vyšší než při pH = 10,0 a navíc intenzita fluorescence vlastního vzorku je znatelně vyšší než intenzita fluorescence vzorku slepého. V dalším kroku jsem zkoumala závislost intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu, tedy na době reakce. Výsledky těchto experimentů jsou shrnuty v tabulce 2 na str. 30. Z hodnot v této tabulce je vidět, že nejvhodnější délkou třepání je pět minut. Delší reakční doba již nijak významně nezvyšuje intenzitu fluorescence vzorku, ale způsobuje markantní zvýšení intenzity fluorescence slepého vzorku, což je nežádoucí jev. To platí i o době reakce dvacet minut, kdy bylo dosaženo znatelně vyšší intenzity fluorescence vzorku, ale toto zvýšení je znehodnoceno srovnatelným zvýšením intenzity fluorescence vzorku slepého. Tuto skutečnost je možné vysvětlit tím, že samotná derivatizační reakce proběhne velmi rychle, během několika minut, a dále již za podmínek derivatizace (pH, teplota) dochází k hydrolýze nadbytku derivatizačního činidla za vzniku NBD-OH, který rovněž fluoreskuje. Vznik NBD-OH během derivatizace s NBD-Cl byl již dříve potvrzen^{13),14)}. Z těchto výsledků vyplývá, že pravděpodobnou příčinou neúspěchu Hudzieczkové¹⁶⁾ při derivatizaci nortriptylinu byla příliš dlouhá doba reakce. V literatuře¹⁵⁾ je možno nalézt doporučení provádět derivatizační reakci v případě sekundárních aminů kratší dobu než v případě aminů primárních. Vzhledem k tomu, že nortriptylin je sekundární amin, potvrzují mé výsledky doporučení z literatury. S nově

nastavenými podmínkami reakce (ověřené optimální pH, změněná doba reakce – pět minut a teplota přejatá od Hudzieczkové¹⁶⁾) byla zjištěna opakovatelnost fluorescenčního stanovení nortriptylinu na šesti modelových vzorcích. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3 na str. 31. Opakovatelnost je možné považovat za dobrou. Stechiometrické poměry reakce jsem ověřila metodou popsanou v literatuře.¹⁰⁾ Výsledek odpovídá předpokladu, že nortriptylin reaguje s NBD-Cl v molárním poměru přibližně 1:1. Postup tohoto ověření vyplývá z kapitoly 3.4.1.4 a molární poměr reagujících složek při reakci se stanoví jako poměr směrnic přímek v grafu 1 a grafu 2. Hodnoty koncentrací nortriptylinu v prvním sloupci tabulky 4 na str. 32 zároveň udávají ověřený lineární rozsah fluorescenčního stanovení.

Druhou zkoumanou látkou byl flubendazol. Tato látka není svou strukturou vhodná pro derivatizaci s NBD-Cl, neboť ji není možné považovat za dostatečně silný nukleofil pro tuto reakci. Pro účely HPLC benzimidazolů však bylo nutné tento předpoklad ověřit. Molekula flubendazolu totiž obsahuje ve své struktuře jeden atom dusíku, na který není vázán vodík a který je bazický. Proto vznikla domněnka, že by na tomto dusíku, byť je součástí aromatického systému, mohlo docházet za obvyklých podmínek k derivatizaci. Proti této úvaze stál fakt, že zkoumaná reakce je doporučována pro derivatizaci alifatických aminů a také sterické důvody. Nicméně i kdyby derivatizace proběhla jen ve velmi malé míře, mělo by to pro vývoj metody HPLC stanovení velký význam. Z výsledků absorpční spektrofotometrie vyplývá, že stanovení závislosti absorbance na pH je neměřitelné, jelikož rozdíl absorbancí zkoumaných vzorků a slepých vzorků je zanedbatelný (viz tabulka 6 na str. 37). Dále jsem provedla četná fluorescenční měření, při nichž jsem se pokusila stanovit závislost intenzity fluorescence na koncentraci flubendazolu a NBD-Cl, na době třepání reakční směsi v termostatu a nalézt tak optimální podmínky pro získání kalibrační závislosti. Tyto experimenty byly prováděny pouze při pH = 10,0, které bylo určeno jako vhodné pro derivatizaci nefluoreskujícího derivátu flubendazolu. Naměřené hodnoty intenzit fluorescence jsou uvedeny ve výsledkové části v tabulkách na stranách 38–48. Závislosti intenzity fluorescence po derivatizační reakci na koncentraci flubendazolu nevykazují žádný jasný trend. Z mých výsledků lze soudit, že derivatizační reakce na flubendazolu pravděpodobně kvantitativně neprobíhá. Měřitelné hodnoty intenzit fluorescence je možné vysvětlit tvorbou NBD-OH. Lze uvažovat o několika různých faktorech způsobujících vyšší hodnoty intenzit fluorescence u vzorků v porovnání se

slepými vzorky v tabulkách 11, 12 a 13. Jednak je to alternativa vzniku určitého malého množství nějakého derivátu flubendazolu. Proti této hypotéze hovoří nemožnost naměření kalibrační křivky. Druhou alternativou je reakce nějaké nečistoty v substanci flubendazolu, která je schopna reakce s NBD-Cl. I zde by ovšem bylo logické předpokládat zjištění určité kalibrační závislosti. Třetí možností je katalytické působení flubendazolu při vzniku NBD-OH.

6 Závěr

V této diplomové práci byly nalezeny optimální podmínky pro derivatizaci nortriptylinu s NBD-Cl pro HPLC s fluorescenční detekcí. Výhodou nalezených reakčních podmínek je velmi krátká doba reakce. Dalším krokem nutným pro úspěšné uplatnění této derivatizace při HPLC bude převedení nalezeného postupu do menších objemů, neboť při biochemických experimentech bývá k dispozici jen omezené množství vzorku.

Studium reakce NBD-Cl s flubendazolem nevedlo ke zjištění, že derivatizační reakce probíhá v kvantitativní míře, ale vznik určitého množství blíže neurčených fluoreskujících derivátů nelze vyloučit. K definitivnímu řešení tohoto problému bude třeba uplatnit jiné analytické metody, zejména samotnou HPLC, případně IR spektroskopii a NMR.

Seznam použité literatury a pramenů

1. Karlíček R. a kolektiv: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1998, str. 225-236.
2. Klimeš J. a kolektiv: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002, str. 9, 10.
3. Klimeš J. a kolektiv: Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha 2004, str. 70.
4. Vrága I.: Diplomová práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2004.
5. Internetové stránky Univerzity Karlovy v Praze Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, studijní materiály katedry analytické chemie, dostupné z <http://www.faf.cuni.cz/studium/Materialy/Katedra%20analytické%20chemie/Zdravotnická%20bioanalytika/Speciální%20instrumentální%20metody/Fluorimetrie.doc>
6. Štern P.: Základy instrumentální analýzy v klinické biochemii, Optické metody (1.5 Fluorimetrie), dostupné z <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>
7. Fišar Z.: Principy fluorescenční spektroskopie, Psychiatrická klinika, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, dostupné z <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
8. Ghosh P. B., Whitehouse M. W.: Biochem. J. 108 (1968), 155-156.
9. El-Elmam Ali A., Hansen S. H., Moustafa M. A., El-Ashry S. M., El-Sherbiny D. T.: J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004), 35-44.
10. Rose J.: Advanced Physico-Chemical Experiments, Pitman, London 1964, 67.
11. Panchartek J., Štěřba V., Večeřa M.: Reakční mechanismy v organické chemii, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1981, str. 194, 198, 199.
12. Hrabálek A. a kolektiv: Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2002, str. 3, 18, 19.
13. Palmerini C. A., Fini C., Floridi A., Morelli A., Vedovelli A.: J. Chromatogr., Biomed. Applications 339 (1985), 285-292.
14. Soukupová M., Kubiček V., Janovský M.: Determination of Micromolar Concentrations of Neurotransmitter Amino Acid Glycine by Fluorescence Detection in Rat Microdialysis Perfusates. Přednáška na 57. Farmakologických dnech 12.–14.9.2007, Olomouc, Česká republika.

15. Bartos J., Pesez M.: Talanta 19 (1972), 93-124.
16. Hudzieczková R.: Diplomová práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2006.