

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Spektrální vlastnosti benzimidazolů

(diplomová práce)

Spectral Properties of Benzimidazoles

(diploma thesis)

Hradec Králové 2010

Marie Lukešová

Čestné prohlášení

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

Marie Lukešová

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. za odborné vedení a poskytnutí cenných informací při zpracování zadaného tématu diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Tereze Uhlářové za spolupráci a rodičům za podporu nejen při psaní této práce, ale během celého studia.

Abstrakt:

Tato diplomová práce se zabývá studiem spektrálních vlastností benzimidazolů. Většinou se jedná o benzimidazolová anthelminticky působící léčiva, používaná převážně ve veterinární medicíně. Některé látky se používají jako fungicidy.

Hlavním cílem této práce bylo objasnění vlivu rozpouštědla na absorpční spektra a zejména na fluorescenci benzimidazolů. Byl zkoumán vliv aprotického a protogenního rozpouštědla, vliv polaritativity a pH rozpouštědla.

Práce má dvě části, teoretickou a praktickou. V teoretické části jsou shrnuty fyzikálně-chemické vlastnosti benzimidazolů, možnosti detekce benzimidazolů, UV-VIS a fluorescenční spektrofotometrie. V praktické části jsou výsledky měření zpracovány do tabulek a grafů. Bylo zjištěno, že vliv rozpouštědla závisí na struktuře látky. Proto je potřeba každou látku zvlášť proměřit.

Abstract:

This diploma thesis deals with the spectral properties of benzimidazoles. Most of benzimidazoles are anthelmintic active drug, used primarily in veterinary medicine. Some substances are used as fungicides.

The main aim of this study was to clarify the influence of solvents on the absorption spectra and especially on the fluorescence of benzimidazoles. The influence of aprotic and protic solvent, the influence of polarity of solvent and the influence of pH of solvents were studied.

The thesis includes two parts: theoretical and practical. In the theoretical part physicochemical properties of benzimidazoles, benzimidazoles possibility of detection, UV-VIS and fluorescence spectrophotometry are summarized. In the practical part results of the measurement are processed into tables and graphs. It was found that the influence of solvent depends on the structure of the substance. Therefore it is necessary to check each substance separately.

OBSAH

Seznam použitých zkratk.....	7
1. ÚVOD.....	8
1.1. <u>CÍLE PRÁCE</u>	9
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1. <u>BENZIMIDAZOLOVÁ LÉČIVA</u>	11
2.1.1. INDIKACE BENZIMIDAZOLOVÝCH LÉČIV.....	11
2.1.1.1. Nematodózy.....	11
2.1.1.2. Trematodózy.....	12
2.1.1.3. Cestodózy.....	12
2.1.2. MECHANISMUS ÚČINKU BENZIMIDAZOLŮ.....	13
2.1.3. TOXICITA A NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY.....	14
2.1.4. CHEMICKÁ STRUKTURA A VLASTNOSTI.....	14
2.1.5. FARMAKOKINETICKÉ VLASTNOSTI BENZIMIDAZOLŮ.....	16
2.1.5.1. Faktory ovlivňující farmakokinetické vlastnosti.....	16
2.1.5.1.1. Způsob podání.....	16
2.1.5.1.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti léku.....	16
2.1.5.1.3. Živočišný druh.....	16
2.1.5.2. Absorpce.....	16
2.1.5.3. Distribuce.....	17
2.1.5.4. Metabolismus.....	17
2.1.5.5. Eliminace.....	18
2.1.6. ZPŮSOB DETEKCE BENZIMIDAZOLOVÝCH REZIDUÍ.....	18
2.1.6.1. Biotesty.....	18
2.1.6.2. Přímá spektrofotometrická detekce.....	19
2.1.6.3. Tenkovrstvá chromatografie.....	19
2.1.6.4. Imunochemické metody.....	19
2.1.6.5. Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	19
2.1.6.6. Plynová chromatografie.....	20
2.2. <u>SPEKTROFOTOMETRIE V ULTRAFIALOVÉ A VIDITELNÉ OBLASTI</u>	21
2.3. <u>FLUORESCENČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE</u>	24
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
3.1. <u>POUŽITÉ CHEMIKÁLIE</u>	27
3.2. <u>POUŽITÉ PŘÍSTROJE</u>	29

3.3. <u>PRACOVNÍ POSTUP</u>	30
3.3.1. <u>Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v methanolu a acetonitrilu</u>	30
3.3.1.1. Příprava roztoků.....	30
3.3.1.2. Měření absorbance.....	31
3.3.1.3. Měření fluorescence.....	31
3.3.2. <u>Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v závislosti na pH</u>	31
3.3.3. <u>Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v závislosti na polaritě prostředí</u>	31
3.3.4. <u>Určení optimální šířky štěrbin</u>	32
3.3.5. <u>Porovnání spektrálních vlastností redukovaného mebendazolu připraveného na FaF a redukovaného mebendazolu od firmy Jansen Pharmaceutica</u> ...	32
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	33
4.1. <u>Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v methanolu a acetonitrilu</u>	34
4.1.1. UV-spektrofotometrie.....	34
4.1.2. Fluorescenční spektrofotometrie.....	35
4.2. <u>Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v závislosti na pH</u>	40
4.2.1. UV spektrofotometrie.....	40
4.2.2. Fluorescenční spektrofotometrie.....	41
4.3. <u>Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v závislosti na polaritě prostředí</u>	44
4.4. <u>Určení optimální šířky štěrbin</u>	47
4.5. <u>Porovnání spektrálních vlastností redukovaného mebendazolu připraveného na FaF a redukovaného mebendazolu od firmy Jansen Pharmaceutica</u>	49
5. ZÁVĚR	52
6. LITERATURA	54

Seznam použitých zkratk:

2-AB: 2-aminoimidazol

ABZ: albendazol

ABZ-SO₂: albendazolsulfoxid

ABZ-SO: albendazosulfon

ABZ-NH₂-SO₂: 2-aminoalbendazolsulfoxid

BEN: benomyl

FLU-OH: redukovaný flubendazol

MBC: carbendazim

MBZ: mebendazol

MBZ-OH: redukovaný mebendazol

MBZ-FAF: redukovaný mebendazol připravený na farmaceutické fakultě v HK

MBZ-NH₂: 2-aminomebendazol

OXI: oxibendazol

5-OH-TBZ: 5-hydroxythiabendazol

TBZ: thiabendazol

MeOH: methanol

ACN: acetonitril

1. ÚVOD

V dnešní době je pro účely farmaceutického výzkumu nezbytné u každého léčiva znát způsob detekce, pomocí kterého můžeme léčivo v biologickém materiálu kvalitativně i kvantitativně analyzovat. Ne jinak je tomu i u benzimidazolů. Ty se často stanovují pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV-VIS nebo fluorescenční detekcí. Benzimidazoly a zejména jejich metabolity se v živých organismech vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, proto je potřeba zvolit co nejvýhodnější podmínky, aby daná metoda byla co nejpřesnější a vysoce citlivá.

Je známo, že výrazný vliv na detekci má volba mobilní fáze. Pokud sloučenina obsahuje benzenové jádro, intenzivněji fluoreskuje v aprotickém acetonitrilu než v protogenním methanolu. Pokud obsahuje ve své struktuře dusíkatý heterocykl, je tomu naopak, fluorescence je intenzivnější v methanolu (1). Logicky vyvstává otázka, jak je tomu u sloučenin, které mají ve své struktuře benzen i imidazol, tedy u benzimidazolů. Proto byl v této práci porovnán vliv aprotického a protogenního rozpouštědla na spektrální vlastnosti u jedenácti různých benzimidazolů. V experimentální části je pak dále pozorován vliv polaritativity a pH rozpouštědla a vliv spektrální pološířky spektrofluorimetru na fluorescenci benzimidazolů. Na závěr jsem spektrální vlastnosti využila ke kontrole léčiva. Dostala jsem vzorek na Farmaceutické fakultě UK syntetizovaného mebendazolu a pomocí UV-VIS a fluorescenční spektrofotometrie jsem ověřila jeho totožnost.

V teoretické části jsou popsány UV-VIS a fluorescenční spektrofotometrie, jakožto základní metody, které jsem používala. Možností detekce je však více, proto jsem zde nastínila i další fyzikálně-chemické i biochemické metody. Důležitost detekce je dána používáním benzimidazolů jako léčiv humánních, ale také veterinárních. Analýza slouží hlavně ke stanovení farmakokinetických vlastností léčiv. U potravinových zvířat má ještě další význam. Na základě analýz je stanovena tzv. ochranná lhůta, což je doba od podání léčiva, po kterou se nesmí potraviny ze zvířete požívat, neboť musí být zajištěna nezávadnost potravin. Benzimidazoly se vyskytují také v půdě a plodinách, protože se zde používají jako fungicidní látky. I zde je samozřejmě důležitá jejich detekce.

Tato práce si klade za cíl proměřit spektra benzimidazolů v prostředích, která se používají jako mobilní fáze v kapalinové chromatografii a poskytnout tím vodítko při volbě optimálních podmínek pro jejich UV-VIS a fluorescenční detekci.

1.1. CÍLE PRÁCE:

- 1) Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v methanolu a acetonitrilu
- 2) Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v závislosti na pH
- 3) Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v závislosti na polaritě prostředí
- 4) Určení optimální šířky štěrbin
- 5) Porovnání spektrálních vlastností redukováného mebendazolu připraveného na FaF a redukováného mebendazolu od firmy Jansen Pharmaceutica

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. BENZIMIDAZOLOVÁ LÉČIVA

2.1.1. INDIKACE BENZIMIDAZOLOVÝCH LÉČIV

Benzimidazolová léčiva se používají především jako anthelmintika. Anthelmintika slouží k léčbě helmintóz, což jsou onemocnění způsobená parazitickými červy.

Helmintózy se dělí na nematodózy (nemoci vyvolané hlísticemi), trematodózy (nemoci vyvolané motolicemi) a cestodózy (nemoci vyvolané tasemnicemi). Ve vyspělých zemích, jako je Česká republika, helmintóz postupně ubývá, vyskytuje se zde jen několik druhů hlístů parazitujících na člověku. Další sem však mohou být importovány z rozvojových států, kde jsou helmintózy dodnes obrovským problémem. Ve vyspělejších státech jsou častější helmintózy zvířat, proto se s benzimidazolovými léčivy setkáme více ve veterinární medicíně. Z humánních léčivých přípravků je dnes na českém trhu k dispozici jediný. Jedná se o přípravek Vermox, který obsahuje mebendazol (2). Kromě helmintóz se benzimidazolové léčivo thiabendazol využívá ještě jako antimykotikum (3).

Některé benzimidazoly se hojně využívají jako fungicidní látky i v zemědělství. Nejvýznamnější je benomyl a thiabendazol.

2.1.1.1. Nematodózy

V České republice se ze skupiny oblých červů neboli hlístic setkáváme především s roupem dětským a škrkavkou dětskou.

Roup dětský (*Enterobius vermicularis*) je hlíst, který parazituje ve střevě člověka. Téměř každý se s ním během svého života setká. Člověk je jediným jeho hostitelem. Vajíčka se dostávají do trávicího traktu většinou z rukou nebo vzduchem. Ve střevě se během několika týdnů (2-7) z vajíčka vyvine dospělý jedinec. Samičky jsou větší než samečci (měří asi 1,2 cm) a v noci kladou vajíčka v oblasti análního otvoru, což způsobuje svědění. Zvláště u dětí je proto častá reinfekce. Lékem první volby je benzimidazolové léčivo mebendazol, které je účinné jak na vajíčka, tak na dospělé červy. Z benzimidazolů se dále může použít i albendazol nebo thiabendazol. Z jiných skupin léčiv se používá pyrantel, piperazin nebo pyrvinium.

Škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*) je 10-30cm dlouhá hlístice a způsobuje onemocnění zvané askaridóza. Infekční vajíčko se dostává ústy do tenkého střeva, kde se z něho stává larva. Ta prostupuje střevní stěnou do krevního oběhu, kterým se přes srdce dostane do plic. Z plic se dostává skrz průdušnici a hrtan do hltanu a je znovu

spolknutá. Tak se opět dostává do tenkého střeva, kde se z ní stane dospělí jedinec. Samičky kladou velký počet vajíček, která se se stolicí dostávají ven z těla. Ve vnějším prostředí se ve vajíčku vylíhne larva a tím se stane infekčním (4). Projevy askariózy jsou různé, záleží na stadiu škrkavky. Larvální stadium se projevuje především zvýšenou teplotou a vykašláváním krvavého hlenu a eozinofilii. Migrující larvy mohou také napadnout mozek, oko, ledviny nebo i další orgány. Dospělí jedinci způsobují koliky a další střevní obtíže. K léčbě se z benzimidazolů používá opět mebendazol, thiabendazol nebo albendazol. Mezi další léčiva jiné chemické struktury patří pyrantel a piperazin.

V jiných zemích, hlavně v tropech a subtropích, se můžeme setkat s dalšími onemocněními vyvolanými hlísticemi. Patří mezi ně nekatoróza a ankylostomóza vyvolané měchovcem, trichinóza, filarióza nebo onchocerkóza. I zde se hojně používají benzimidazolová léčiva (5).

Nematodózy postihují také všechny druhy chovaných zvířat. K léčbě se využívá makrocyclických laktonů, imidazothiazolů, ale především opět benzimidazolů. U koček a psů se využívá febantel, fenbendazol, flubendazol a oxibendazol. U skotu a ovcí se přednostně využívá albendazol. U koní se nematodózy léčí mebendazolem a fenbendazolem a u drůbeže flubendazolem. Není to takto striktní, často se využívají i jiná léčiva, vždy je ale potřeba dávku přizpůsobit danému druhu zvířete a druhu onemocnění (3).

2.1.1.2. Trematodózy

Motolice parazitující na člověku se vyskytují pouze v subtropických a tropických oblastech. Velmi častým a nebezpečným onemocněním jsou schistosomózy. Lékem první volby je prazikvantel. S benzimidazolů se může použít triklabendazol. Ten se častěji využívá ve veterinární praxi.

Trematodózy jsou časté u hospodářských a volně žijících přežvýkavých býložravců. Z benzimidazolů se kromě triklabendazolu užívají širokospektrá anthelmintika albendazol, fenbendazol a febantel (5).

2.1.1.3. Cestodózy

Cestodózy jsou onemocnění způsobená tasemnicemi. Tasemnice jsou segmentovaní, hermafroditní červi. Z těch, které parazitují na člověku, se u nás vyskytuje tasemnice bezbranná a tasemnice dlouhočlenná.

Tasemnice bezbranná (*Taenia saginata*) je dlouhá až deset metrů. Parazituje v tenkém střevě, kde se udrží pomocí přísavek na hlavičce (skolex). Po hlavičce následuje krk. V tomto místě tasemnice roste. Pak následuje velké množství článků, které obsahují samčí i samičí reprodukční systém. Když jsou vajíčka oplodněná, článek se uvolní a odchází společně s výkaly ven. Mezihostitelem je skot, který vajíčko pozře na pastvině. V tenkém střevě krav se z vajíčka vylíhne embryo, které putuje pomocí krevního řečiště do svalů, kde se z něho asi po deseti týdnech stává boubel neboli cysticercus. Hovězí maso je pak zdrojem nákazy člověka. Příznaky onemocnění nejsou výrazné. Většinou dochází jen ke gastrointestinálním problémům nebo k anorexii. K léčbě tenióz se používají látky niklosamid a prazikvantel. Z benzimidazolů to je albendazol a mebendazol.

Tasemnice dlouhočlenná (*Taenia solium*) má podobný životní cyklus jako tasemnice bezbranná, jen mezihostitelem bývají nejčastěji prasata. Někdy může být mezihostitelem i člověk, pak jsou projevy nákazy závažnější. Pokud se boubel vytvoří v mozku, může dojít k úmrtí nemocného. Tasemnice dlouhočlenná měří dva metry a na skolexu má kromě přísavek ještě rostellum s háčky. Léčba je stejná jako u tasemnice bezbranné (4).

Především ve Skandinávii se vyskytuje škulovec široký (*Diphyllobothrium latum*), který má několik mezihostitelů. Člověk se může nakazit z rybího masa. V tropických oblastech se vyskytuje poslední druh tasemnice parazitující na člověku a to tasemnice dětská (*Hymenolepis nana*), která měří pouze pár centimetrů (5).

U zvířat cestodózy nejsou tak časté, postihují především domácí masožravce, býložravce a také ryby. Z benzimidazolů se uplatňují albendazol, mebendazol, oxibendazol, fenbendazol, flubendazol a febantel (3).

2.1.2. MECHANISMUS ÚČINKU BENZIMIDAZOLŮ

Přestože se jedná o látky strukturou podobné, mechanismus účinku není u všech stejný.

Nejčastějším a hlavním mechanismem působení benzimidazolů je jejich navázání se na tubulin, což inhibuje vznik mikrotubulů. Mikrotubuly mají v buňce nezastupitelnou roli. Jednak slouží k tvorbě mitotického vřeténka během buněčného dělení, udržují tvar buňky a jsou také důležité pro vstřebávání živin a jejich intracelulární přísun. Proto inhibice tvorby mikrotubulů vede nakonec k smrti buňky a později celého parazita (5). Není zcela vysvětleno, proč se benzimidazoly váží přednostně na tubulin parazitů a ne na tubulin hostitele. Jsou vědecky dokázané dvě příčiny, proč benzimidazoly neničí buňky

hostitelů. Prvním důvodem je specifická vazba benzimidazolu na tubulin parazita. FLB a MBZ se váží až 400x více na tubulin hlístů než savců. Druhou vědecky ověřenou příčinou je rozdílná farmakokinetika benzimidazolů u parazita a hostitele. U hostitele je velice rychle metabolizován, takže téměř nepůsobí.

Další možný mechanismus účinku se vyskytuje například u albendazolu. Albendazol blokuje uptake glukózy, takže dochází ke spotřebování glykogenu. Přestává se tvořit ATP a parazit umírá na nedostatek energie. Albendazol je jediný benzimidazol účinný na všechna vývojová stadia hlísta. Působí na vajíčka, larvy i dospělé jedince (5).

Další možností účinku je inhibice příjmu glukózy přes inhibici fumarát reduktázy. Fumarát reduktáza je enzym, který slouží k přeměně fumarátu na sukcinát. Tím dochází k narušení cyklu dikarboxylové kyseliny, který za normálních okolností slouží k výrobě ATP. Proto parazit opět umírá z nedostatku energie. Takto působí thiabendazol (3).

Oxibendazol díky své chemické struktuře podobné purinové bázi, zasahuje do metabolismu nukleotidů a procesu syntézy ATP (6).

2.1.3. TOXICITA A NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY

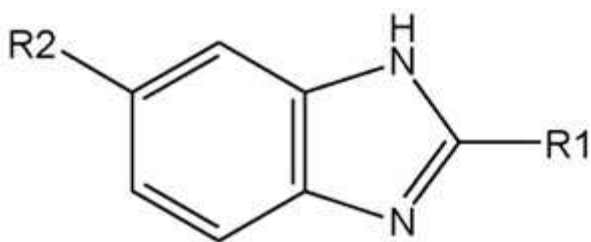
Benzimidazolová léčiva jsou léčiva bezpečná, terapeutický index je vysoký. Toxické množství je až 30x vyšší než běžně používaná terapeutická dávka. Největší nebezpečí představuje teratogenita. Přestože u savců teratogenita mebendazolu nebyla zjištěna, nedoporučuje se užívat v těhotenství, zvláště v prvním trimestru. Další jeho nežádoucí účinky nejsou závažné, může se objevit průjem nebo bolest břicha (2).

Další benzimidazoly se u nás používají pouze ve veterinární medicíně. U některých se vyskytuje teratogenita, proto se nedoporučuje podávat samicím v březí. Stejně jako u mebendazolu se i po aplikaci ostatních benzimidazolů může objevit průjem. Pro potravinová zvířata je dána ochranná lhůta, která se pohybuje od třech až po desítky dní. V ochranné lhůtě se nesmí konzumovat potraviny z těchto zvířat (mléko, vejce, maso) (3).

2.1.4. CHEMICKÁ STRUKTURA A VLASTNOSTI

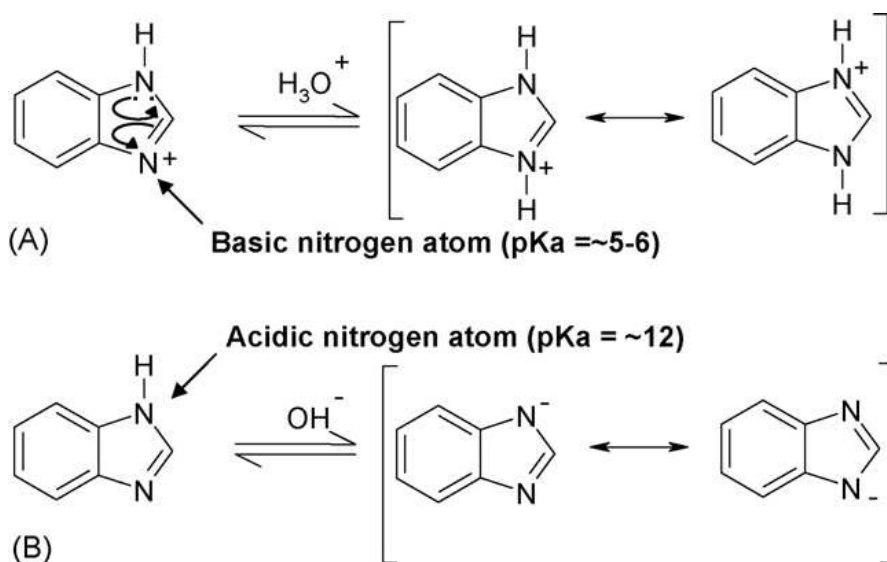
Jak už název „benzimidazoly“ napovídá, mají tyto sloučeniny společný základ tvořený benzimidazolovou strukturou (Obrázek 1.). Pokud jsou substituované v poloze 2 (-R₁) jako je thiabendazol, jsou rychle metabolizovány a účinek je krátký. Proto se postupně začaly připravovat 5- substituované deriváty (-R₂), což vedlo k prodloužení účinku (mebendazol, flubendazol, albendazol,...). Pro anthelmintickou aktivitu je ve struktuře důležitá

amidinová skupina v imidazolovém kruhu. Tuto skupinu obsahují i další jinak strukturou odlišná anthelminticky působící léčiva, jako je pyrantel nebo oxantel (7).



Obrázek 1: Obecná struktura benzimidazolů

Další významnou vlastností benzimidazolů je jejich schopnost působit jako kyseliny i jako zásady, protože imidazolový kruh obsahuje jak kyselý tak bazický dusík. (obrázek č. 2) Proto pH prostředí velice ovlivní jejich vlastnosti. S pH se mění rozpustnost a ionizace léčiv, což významně ovlivňuje vstřebávání a další farmakokinetické vlastnosti. Některé sloučeniny mají ještě další ionizovatelné skupiny. Na příklad 5-hydroxythiabendazol obsahuje kyselou OH skupinu. pKa je proto velice důležitou charakteristikou. Další důležitou hodnotou charakterizující látku je rozdělovací koeficient v soustavě oktanol-voda. Ten dává informaci o rozpustnosti. Benzimidazoly mají tento rozdělovací koeficient v rozmezí 0,8-3,3. Nejlipofilnější je flubendazol a triclabendazol. Je to dáno jejich lipofilními substituenty (8).



Obrázek 2: Acidobazické vlastnosti benzimidazolového základu.

2.1.5. FARMAKOKINETICKÉ VLASTNOSTI BENZIMIDAZOLŮ

2.1.5.1. Faktory ovlivňující farmakokinetické vlastnosti

2.1.5.1.1. Způsob podání

Benzimidazoly jsou většinou podány perorálně. Ve veterinární praxi je také časté intraruminální podání, při kterém bývá biologická dostupnost větší než při podání perorálním. Při parenterální aplikaci dochází k rychlému metabolismu a následně ke krátkému účinku.

2.1.5.1.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti léku

Pro farmakokinetiku léčiva je důležitá molekulová hmotnost, rozpustnost léčiva ve vodě a tucích a ionizovatelnost léčiva. Účinek lipofilnějších léčiv nastupuje později a přetrvává déle. Jako příklad uvedu fenbendazol, který dosahuje maximální plazmatické koncentrace za 24h po podání a jeho zbytky se v těle nachází ještě za 30 dní. Hydrofilnější thiabendazol dosahuje maximální plazmatické koncentrace za 4h a z těla se vyloučí močí mnohem rychleji.

2.1.5.1.3. Živočišný druh

Každý živočišný druh má trochu jinou stavbu těla, rozdílné složení trávicích šťáv a tak není divu, že se při podání stejného množství léčiva více druhům zvířat hodnoty plazmatických hladin liší. Odlišnosti nejsou jenom mezi druhy, ale i jednotlivci. Farmakokinetické vlastnosti ovlivňuje pohlaví, stáří, rychlost metabolismu, ale také třeba složení stravy. Naštěstí benzimidazoly mají vysoký terapeutický index, takže se na tyto faktory nemusí významně brát v potaz (8).

2.1.5.2. Absorpce

Absorpce je ovlivněna výše zmíněnými faktory. Nikdy nedochází k úplné absorpci, často je také výrazný first pass efekt, takže systémové cirkulace dosáhne jen zlomek léčiva. U humánního mebendazolu se do krevního řečiště dostane jen 20%. Maximální plazmatické koncentrace je dosaženo za 2-4 hodiny po podání. Pokud se mebendazol užívá s tučným jídlem, absorpce se zvyšuje (2).

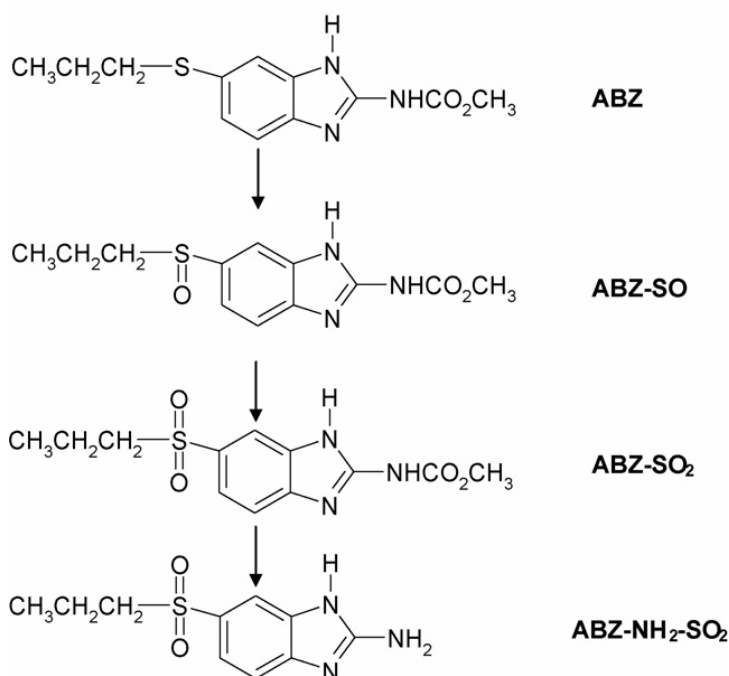
2.1.5.3. Distribuce

Vazebnost na plazmatické bílkoviny je vysoká. U mebendazolu dosahuje až 95%. Benzimidazoly penetrují do mimocévního prostoru, kde se v tkáni ukládají. Čím jsou lipofilnější, tím se v tkáních vyskytují delší dobu a ve větším množství.

2.1.5.4. Metabolismus

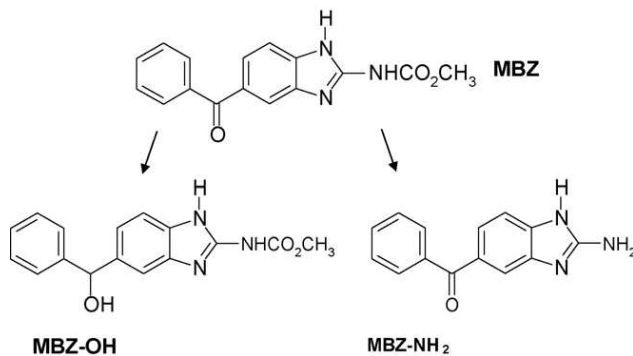
Metabolismus těchto léčiv je složitý. Pro každou látku existuje hned několik metabolitů. Metabolity závisí na druhu léčiva, živočišném druhu a tkáni, ve které se léčivo nachází.

Léčiva s SH skupinou se snadno oxidují, na sulfoxid a sulfon. Takto metabolismus probíhá například u albendazolu nebo fenbendazolu. (Obr.č.3)



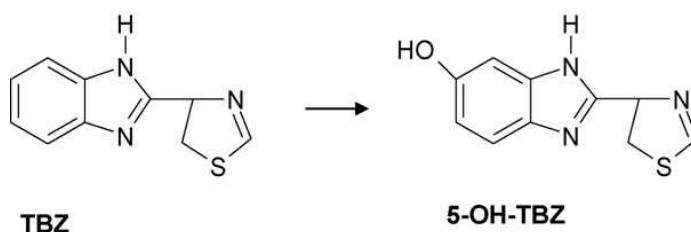
Obrázek 3: Schéma metabolismu albendazolu (8)

Mebendazol a flubendazol mají karbonylovou skupinu, která se může redukovat na hydroxylovou skupinu. Tyto dvě sloučeniny mají ještě karbamátovou skupinu, která se metabolizuje na amino skupinu. Karbamátovou skupinu má i albendazol a fenbendazol.



Obrázek 4: Metabolismus mebendazolu (8)

Thiabendazol se v těle oxiduje na 5-hydroxythiabendazol.(obr.č.5)



Obrázek 5: Metabolismus thiabendazolu (8)

2.1.5.5. Eliminace

Eliminace léčiva a jeho metabolitů z jednotlivých tkání a tělních tekutin trvá různou dobu. U potravinových zvířat je potřeba sledovat čas, za který se dané léčivo vyloučí ven z těla, aby se mohla stanovit ochranná lhůta. Sleduje se doba eliminace z mléka, masa, tuku, vajec, jater, ledvin a samozřejmě z plazmy a jiných tělních tekutin (3). Protože se léčivo v těle vyskytuje ve velice nízkých dávkách, je potřeba najít dostatečně citlivý způsob detekce.

2.1.6. ZPŮSOBY ANALÝZY BENZIMIDAZOLOVÝCH REZIDUÍ

Existuje mnoho možností jak stanovovat benzimidazoly z biologického materiálu. Důležité je, aby při metodě šlo jednoznačně určit benzimidazol včetně jeho metabolitů, aby detekce byla dostatečně citlivá i pro malé koncentrace látky, aby byla rychle a jednoduše proveditelná a také finančně dostupná. V dnešní době se standardně využívá HPLC s UV detekcí. V případech, kdy je to možné, je aplikována fluorescenční detekce díky své výborné citlivosti. Přesto je potřeba zmínit i ostatní možnosti měření.

2.1.6.1. Biotesty

Biotesty se mohou používat k zjištění reziduí v potravinách, ale mnohem častěji se využívají ke zjišťování anthelmintického účinku léčiv. Detekce se provádí pomocí TLC.

Upravený biologický materiál se nanese na desku a nechá se vyvíjet. Detekce se provede postřikem živnou půdou s organismy citlivými na léčivo. Pokud ve vzorku byla benzimidazolová rezidua, dojde v tomto místě k inhibici růstu organismu. Velikost zóny inhibice se rovná koncentraci zbytků benzimidazolů. Tato metoda je relativně citlivá. Problémem však může být odlišná citlivost jednotlivých zkušebních organismů, což může vést ke zkreslení hodnot.

2.1.6.2. Přímá spektrofotometrická detekce

Přímo se spektrofotometrická detekce využívá jen výjimečně, protože by benzimidazoly musely být v potravinách ve vysoké koncentraci. Proto se většinou před změřením vyžaduje chromatografická separace, případně zakoncentrování.

2.1.6.3. Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie se používá především k detekci benzimidazolů z plodin. Důležité je správně zvolit mobilní fázi, aby došlo k separaci benzimidazolových reziduí. Detekce se většinou provádí fluorescenčně. Výhodou této metody je dostupnost, ale přesto se upřednostňuje HPLC, protože je citlivější.

2.1.6.4. Imunochemické metody

V posledních letech technologie ELISA našla uplatnění i při zjišťování benzimidazolů v potravinách. Důležitá je příprava monoklonální protilátky, která by se byla schopna vázat zároveň na více benzimidazolů. Podařilo se připravit myší monoklonální protilátku, která se váže na 11 benzimidazolkarbamátových reziduí, včetně metabolitů MBZ, ABZ, OXI nebo FLU. Nyní se někdy využívá těchto metod k detekci některých benzimidazolů v séru, v mléce nebo v ovocných šťávách. Nevýhodou je, že se jedná pouze o kvantitativní metodu. Jelikož protilátka se váže na více druhů benzimidazolů, nelze zjistit, o jaké látky jde a jaký je poměr v zastoupení mezi nimi. Zjistíme pouze celkové množství benzimidazolů (8).

2.1.6.5. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Benzimidazolová léčiva a jejich metabolity se liší svými fyzikálně chemickými vlastnostmi. Proto je někdy náročné zvolit takové podmínky, aby výsledné spektrum obsahovalo ostré píky v rozumném retenčním čase. Je proto důležité zvolit správnou kolonu, mobilní fázi a následně typ detekce. K detekci pro stanovení benzimidazolů se

používá UV, fluorescenční nebo hmotnostní spektrofotometrie, nebo metoda elektrochemická, při které se měří změny potenciálu mezi elektrodami. K těmto změnám dochází vlivem oxidovatelnosti a redukovatelnosti benzimidazolů. Častěji se však využívají spektrální detektory, protože benzimidazoly mají silné chromofory, takže jsou schopné pohlcovat záření. Nejčastěji se používá UV detektor. Bylo však zjištěno, že některé benzimidazoly mohou fluoreskovat, čehož se využívá při fluorescenční detekci. Ta má oproti UV o dva až tři řády vyšší citlivost a je selektivnější. Některé benzimidazoly však schopnost fluorescence nemají, takže se nedá použít u všech. Například flubendazol nefluoreskuje, ale redukovaný flubendazol už tuto schopnost má (9). Ztráta fluorescence se vysvětluje přítomností ketonické skupiny. Podobně se chová mebendazol. Mebendazol nefluoreskuje, ale redukovaný mebendazol ano (10).

Hmotnostní spektrofotometrie je dnes také hojně využívána, má podobnou citlivost jako fluorescenční spektrofotometrie, její nevýhodou je však finanční náročnost.

2.1.6.6. Plynová chromatografie

Tato metoda se nevyužívá často, protože většina benzimidazolů jsou látky poměrně stálé, takže se musí před měřením ještě derivatizovat. Avšak například thiabendazol je těkavý dostatečně. Přesto se plynová chromatografie při aplikaci na analýzu benzimidazolů nyní nachází ve stínu kapalinové (8).

2.2. SPEKTROFOTOMETRIE V ULTRAFIALOVÉ A VIDITELNÉ OBLASTI

Jedná se o optickou instrumentální metodu, při které dochází k absorpci záření. Vlivem absorpce dochází k přechodu molekuly z nižšího elektronového stavu do vyššího. Při tom přecházejí valenční elektrony ze základních orbitalů do orbitalů excitovaných. Zároveň však dochází ke změnám ve vibračních a rotačních stavech molekuly a proto absorpční pásy jsou širší (11).

Části molekul, které způsobují absorpci záření v oblasti UV (200-400nm) nebo ve viditelné oblasti (400-760nm) se nazývají chromofory. V UV oblasti absorbují léčiva, která v molekule obsahují dvojně nebo trojně vazby, protože excitaci podléhají především π elektrony. Pokud je v molekule několik konjugovaných vazeb, posunuje se absorpce do oblasti vyšších vlnových délek, protože se snižuje energie přechodu (12).

Posun absorpce k vyšším vlnovým délkám se nazývá bathochromní (červený) posun. Podobný účinek mají skupiny s volným elektronovým párem (–OH, –NH₂), které se označují jako auxochromy. Posun absorpčního pásu k nižším vlnovým délkám se nazývá hypsochromní (modrý) posun. K němu dochází s rostoucí polaritou substituentů vázaných na chromofory.

Zvýšení intenzity světelné absorpce se nazývá hyperchromní efekt, snížení intenzity absorpce je hypochromní efekt (13).

Každou látku vystihuje absorpční spektrum, což je závislost absorpce na vlnové délce (vlnočtu) procházejícího záření. Průběh absorpčního spektra je tedy ovlivněn chemickou strukturou látky, její koncentrací, dále použitým rozpouštědlem a šířkou vrstvy, kterou světlo prochází. Nejčastěji se používají 1centimetrové křemenné kyvety. Měření se provádí proti použitému rozpouštědлу nebo směsi rozpouštědel.

Český lékopis 2009 využívá spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti k analýze léčiva při zkouškách totožnosti, při zkouškách na čistotu a při stanovení obsahu léčiv. Pro důkazy totožnosti léčiv na základě UV spekter se využívají polohy maxim a minim udaných příslušnou vlnovou délkou. Hodnota maxim a minim se může lišit o 2 nm z důvodu měření na různých typech UV spektrometrů a i samotné měření může být zatíženo určitou chybou. Současně se většinou udává specifická absorbance, zpravidla pro nejvýraznější maximum. Specifická absorbance ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) vyjadřuje absorbanci roztoku látky o koncentraci 10 g/l měřenou v 1cm vrstvě při určité vlnové délce.

$$A_{1\text{cm}}^{1\%} = (10 \cdot \epsilon) / M_r$$

Kde: ε – molární absorpční koeficient (absorbance roztoku látky 1 mol/l, měřená v 10mm vrstvě při určité vlnové délce)

M_r – relativní molekulová hmotnost

Vztah pro výpočet specifické absorbance je tedy:

$$A_{1\text{cm}}^{1\%} = A / (c \cdot l)$$

Dále může být v lékopise poloha maxim a minim navíc doplněna údajem poměru absorbancí při dvou vybraných vlnových délkách.

Kvantitativní analýza vychází z Lambertova-Beerova zákona. Zpravidla se měří při vlnové délce maxima absorpčního pásu, kdy je měření nejcitlivější.

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

Kde: A-absorbance měřeného roztoku

ε – molární absorpční koeficient (absorbance roztoku látky 1 mol/l, měřená v 10mm vrstvě při určité vlnové délce)

c- koncentrace absorbující látky v mol/l

l - síla měřené vrstvy v cm

Pro kvantitativní analýzu je důležitá tzv. spektrální pološířka, běžně nazývaná šířka štěrbin. Šířka štěrbin by měla být malá ve srovnání s polovinou šířky absorpčního pásu, ale současně co největší, aby byla získána vysoká hodnota absorbance (14).

K měření absorpčních spekter se používají spektrofotometry. Ty se skládají ze zdroje záření, monochromátoru nebo filtru, kyvety se vzorkem, detektoru záření a měrného zařízení.

Jako zdroj ultrafialového záření se nejčastěji používá vodíková nebo deuteriová lampa. Zdroj viditelného záření bývá žárovka s wolframovým vláknem. Toto záření je polychromatické, proto ve spektrofotometru dále musí být monochromátor (nebo monochromatický filtr), který paprsek zredukuje na jednu vlnovou délku. Měření v UV oblasti probíhá v křemenné kyvetě o šířce vrstvy nejčastěji 1cm. Rozpouštědlo musí být v co nejčistším stavu, aby nedocházelo k absorpci světla případnými nečistotami. Jako

rozpouštědla se používají většinou sloučeniny s jednoduchými vazbami, které neabsorbují záření v oblasti nad 200nm. Jako slepý roztok se používá samotné rozpouštědlo.

Detektory měří intenzitu světla, které prošlo vzorkem. Světelná energie se mění na energii elektrickou a po zesílení se měří intenzita proudu. V dnešní době jsou naměřené hodnoty proudu elektronicky zaznamenány a tento záznam je uložen na vhodné médium (hard disk, flash disk, CD) a případně dále zpracováván. (11).

2.3. FLUORESCENČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE

Fluorescenční spektrofotometrie je optická instrumentální metoda, při které dochází nejprve k excitaci molekuly s následnou emisí záření (12). Této vlastnosti se říká fotoluminiscence. Rozlišujeme dva typy fotoluminiscence a to fluorescenci a fosforescenci. Doba životnosti excitovaného stavu při fluorescenci je na rozdíl od fosforescence velmi krátká, asi 10^{-5} - 10^{-9} s. V této době dochází k přechodu elektronů z energeticky bohatší hladiny S1 do základního stavu S0. Nadbytek energie je uvolněn jako foton. Fluorescenční přechod může skončit na různých vibračních podhladinách S0, proto vzniká pásové spektrum.

Rozeznáváme 2 typy fluorescenčních spekter. Excitační a emisní. U excitačního se mění excitační vlnová délka (λ) a vlnová délka emitovaného záření je konstantní. Tato spektra většinou slouží k určení účinné λ pro vyvolání fluorescence. U emisních spekter zůstává excitační vlnová délka stejná a mění se vlnová délka emisní. (13).

Většina složitých organických molekul nefluoreskuje. Intenzivní fluorescenci vykazují některé aromatické sloučeniny nazývané fluorofory. Fluorescence je ovlivněna substituenty na aromatickém jádře. Substituenty $-\text{NO}_2$, $-\text{OH}$ fluorescenci zvyšují, naopak halogenové substituenty fluorescenci snižují.

Kromě struktury je fluorescence ovlivněna teplotou a vlastnostmi rozpouštědla. V roztocích dochází vlivem elektrostatických sil k solvataci fluoreskujících molekul. Molekuly v základním a excitovaném stavu mají různé dipólové momenty, dochází tedy vlivem různé solvatace ke změnám v optických spektrech. Proto má na fluorescenci vliv rozpouštědlo, jeho pH a polarita. Jev, kdy vlnová délka excitačního nebo emisního maxima závisí na vlastnostech rozpouštědla, zejména na jeho polaritě, se nazývá solvatochromní efekt, někdy krátce solvatochromismus.

Doba trvání excitovaného stavu nezávisí na vlnové délce budícího záření. (Vavilovův zákon).

Podle Stokesova zákon musí být emisní vlnová délka vyšší nebo rovna vlnové délce excitačního světla.

Mezi hlavní charakteristiky fluorescence patří spektrální složení a intenzita fluorescence. Intenzita je dána počtem fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času. Intenzita fluorescence je úměrná intenzitě absorpce násobené kvantovým výtěžkem fluorescence. Fluorescenční spektrometrií lze detekovat koncentrace

rozpuštěných látek až 10^{-12} mol/l, což je alespoň o 4 řády vyšší citlivost, než pro absorpční měření. Fluorescenční spektrum bývá zrcadlem absorpčního. Fluorescence se objevuje u vyšších λ než absorpce. Rozdíl v energii mezi maximem absorpčního a emisního pásu se nazývá Stokesův posuv. Výjimky z pravidla zrcadlové symetrie jsou dány rozdílem geometrickým uspořádání atomových jader v excitovaném stavu oproti stavu základnímu.

Spektrofluorimetrie se využívá ke kvalitativní i ke kvantitativní analýze, většinou pro složitější organické sloučeniny a komplexy s kovy.

K měření fluorescence se využívají spektrofluorimetry. Budící záření bývá v oblasti UV-VIS, jeho zdrojem je nejčastěji vysokotlaká výbojka nebo pulzní laser. Paprsek prochází přes mřížkové excitační monochromátory a dopadá na křemennou kyvetu s roztokem analyzovaného vzorku. Rozpouštědla by neměla fluoreskovat. Ve směru kolmém k budícímu paprsku se detektorem měří emitované fluorescenční záření, které prochází emisním monochromátorem.

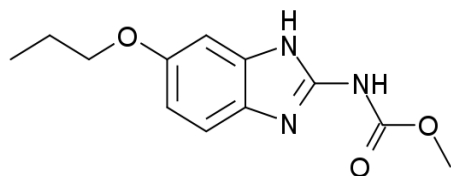
Při měření emisních spekter fluorescence je excitační monochromátor nastaven na pevnou vlnovou délku budícího záření a při měření excitačních spekter je pevně nastavena vlnová délka na emisním monochromátoru. Kromě vlnových délek excitace a emise se běžně nastavují také šířky štěrbin obou monochromátorů, které ovlivňují citlivost a spektrální rozlišení daného měření (15).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

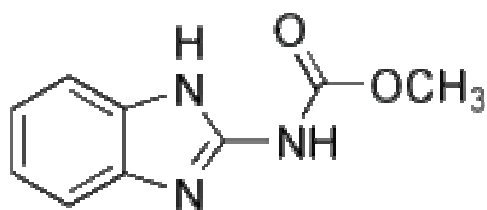
3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Při měření jsem použila tyto chemikálie

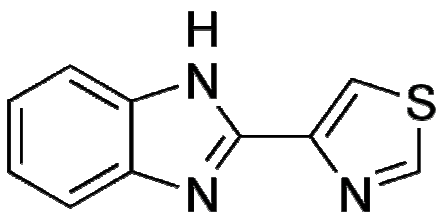
- Methanol for gradient elution, Aldrich
- Acetonitril for gradient elution, Aldrich
- Oxibendazol Sigma (vzorec č. 1)
- Carbendazim Riedel- de Haën (vzorec č. 2)
- Thiabendazol Riedel- de Haën (vzorec č. 3)
- 5-hydroxythiabendazol Fluka(vzorec č. 4)
- Mebendazol redukovaný Jansen Pharmaceutica (vzorec č. 5)
- Mebendazol redukovaný připraven na FaF UK
- Flubendazol redukovaný Jansen Pharmaceutica (vzorec č. 6)
- Benomyl Aldrich(vzorec č. 7)
- Albendazol Sigma(vzorec č. 8)
- Albendazolsulfoxid Toronto Research Chemical (vzorec č. 9)
- Albendazolsulfon Toronto Research Chemical(vzorec č. 10)
- 2-aminobenzimidazol Aldrich(vzorec č. 11)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p. a., Lachema Brno
- Ultračistá voda připravená reverzní osmózou- FaF UK
- Hydroxid sodný p. a., Lach-Ner, s. r. o.
- Kyselina boritá 99% Sigma
- Kyselina octová 99% p. a. Lach-Ner, s. r. o.
- Kyselina fosforečná 85% p. a. Lachema Brno



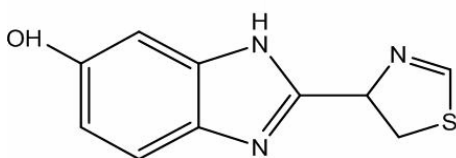
vzorec č. 1: **OXIBEDAZOL**



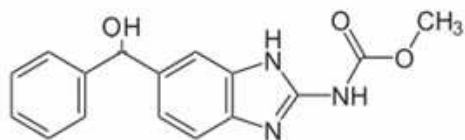
vzorec č. 2: CARBENDAZIM



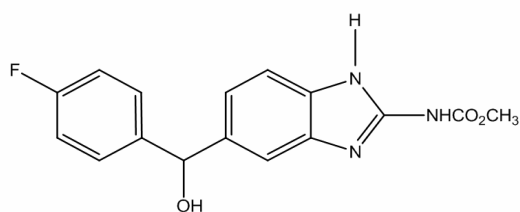
vzorec č. 3: THIABENDAZOL



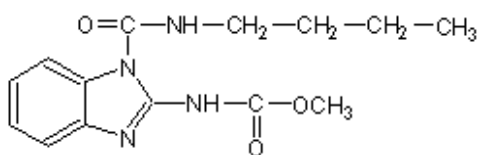
vzorec č. 4:
5-HYDROXYTHIABENDAZOL



vzorec č. 5:
REDUKOVANÝ MEBENDAZOL



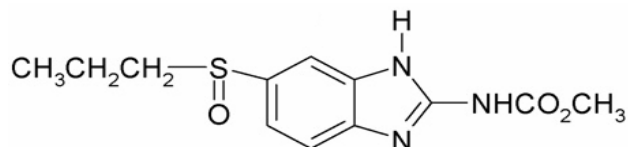
vzorec č. 6:
REDUKOVANÝ FLUBENDAZOL



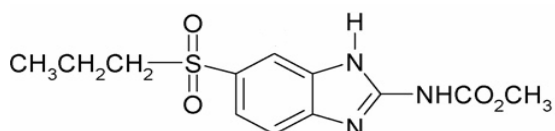
vzorec č. 7: BENOMYL



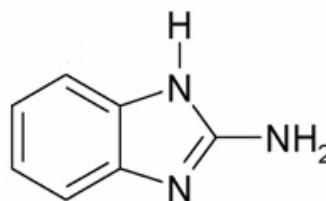
vzorec č. 8: ALBENDAZOL



vzorec č. 9 ALBENDAZOLSULFOXID



vzorec č. 10 ALBENDAZOLSULFON



vzorec č.11 2-AMINOBENZIMIDAZOL

3.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE

- Analytické váhy - Sartorius
- HP 8453 diode array spektrofotometr – Hewlet-Packard
- Spektrofotometr Helios β - Unicam
- Spektrofluorimetr AMINCO- Bowman Series 2 – Thermo Spectronic
- pH-metr inoLab 720 s pH elektrodou Sentix 61 - WTW
- Ultrazvuková lázeň Sonorex 31 – Bandelin

3.3. PRACOVNÍ POSTUP

3.3.1. Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v methanolu a acetonitrilu

3.3.1.1. Příprava roztoků

Na digitálních analytických vahách jsem navážila m gramů léčivé látky. Navážené množství jsem předala do odměrné baňky o objemu V (viz tabulka č. 1) a rozpustila ho v určitém množství methanolu. Po rozpuštění jsem doplnila odměrnou baňku methanolem po rysku. Poté jsem navážila stejné množství látky do druhé odměrné baňky a léčivou látku jsem rozpustila v acetonitrilu. Takto jsem připravila výchozí roztoky všech benzimidazolů, které jsem měla k dispozici.

Někdy bylo potřeba rozpouštění méně rozpustných látek urychlit. Využila jsem míchání, zahřívání nebo jsem odměrnou baňku s benzimidazolem a rozpouštědlem vložila do ultrazvukové lázně. Někdy jsem musela benzimidazol předrozpustit v malém množství (cca 200 μ l) organického rozpouštědla dimethylsulfoxidu (oxibendazol a carbendazim by se v acetonitrilu nerozpustil).

Tabulka č. 1: Příprava roztoků benzimidazolů

	Methanol		Acetonitril	
	m [g]	V [ml]	m [g]	V [ml]
OXIBENDAZOL	0,0020	50	0,0021	50
CARBENDAZIM	0,0023	50	0,0022	50
THIABENDAZOL	0,0020	50	0,0020	50
5-HYDROXYTHIABENDAZOL	0,0015	50	0,0015	50
REDUKOVANÝ FLUBENDAZOL	0,0008	25	0,0007	25
BENOMYL	0,0021	50	0,0020	50
2-AMINO BENZIMIDAZOL	0,0020	50	0,0020	50
ALBENDAZOL	0,0020	50	0,0020	50
ALBENDAZOLSULFOXID	0,0022	50	0,0019	50
ALBENDAZOLSULFON	0,0010	25	0,0009	25

3.3.1.2. Měření absorpance

Spektrofotometrem jsem změřila spektra roztoků vzorků proti příslušným rozpouštědlům (proti acetonitrilu, methanolu). Absorpční maxima jsem zaznamenala, abych s nimi mohla dále pracovat. Měření jsem prováděla v křemenných kyvetách s optickou dráhou 1 cm.

3.3.1.3. Měření fluorescence

Fluorescenční spektra jsem změřila pro jednotlivé benzimidazoly v metanolu a v acetonitrilu. Jako excitační vlnovou délku jsem použila vlnovou délku absorpčního maxima. U všech látek jsem fluorescenční spektra měřila pro všechny hodnoty vlnových délek absorpčních maxim. K měření jsem používala 1cm křemenné kyvety. Citlivost jsem nastavila vždy na roztok, u kterého byla nejvyšší intenzita fluorescence, aby všechna výsledná spektra byla dobře prokreslená a dala se porovnávat.

3.3.2. Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v závislosti na pH

Použila jsem roztoky léčivých látek z předchozího úkolu. Připravila jsem si dihydrogenfosforečnanový pufr o pH 3 a Brittonovy-Robinsonovy pufrы o hodnotách pH 7,64 a 11,67.

Fosforečnanový pufr jsem připravila rozpuštěním 3,4 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 990ml ultračisté vody. Pomocí kyseliny fosforečné jsem upravila pH na 3 a doplnila ultračistou vodou na 1000 ml.

Na další pufrы jsem si musela nejprve připravit základní Brittonův-Robinsonův roztok. K přípravě jsem použila 2,73 ml 85% kyseliny fosforečné, 2,31 ml 98% kyseliny octové a 2,744 g HBO_3 na 1000 ml roztoku (použila jsem superčistou vodu). K 50 ml základního roztoku jsem přidala 29 ml hydroxidu sodného pro pufr o pH 7,64 a 46 ml pro pufr o pH 11,67. pH roztoku jsem změřila pH-metrem. Smíchala jsem roztok léčivých látek a pufr v poměru 1:1 a změřila spektrální vlastnosti podle postupu z předchozí úlohy. (16).

3.3.3. Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v závislosti na polaritě rozpouštědla

Vzala jsem hydrogenfosforečnanový pufr o pH 3 z předešlého úkolu a roztoky léčiv v methanolu a acetonitrilu a proměřila jsem spektra jejich směsí s pufrem v poměrech 3:7, 1:1, 7:3 proti odpovídajícím slepým vzorkům.

3.3.4. Určení optimální šířky štěrby

Měřila jsem fluorescenci hodnoty šířky štěrby (spektrální pološířky) 4; 2; 1 a 0,5 nm pro thiabendazol a 5-hydroxythiabendazol.

3.3.5. Porovnání spektrálních vlastností redukováného mebendazolu připraveného na FaF a redukováného mebendazolu od firmy Jansen Pharmaceutica

Dostala jsem dva vzorky redukováného mebendazolu. Jeden byl syntetizován na fakultě, druhý byl zakoupen. Připravila jsem jejich roztoky podle tab. č. 2 a proměřila jejich absorpční a fluorescenční spektra

Tabulka č. 2: Příprava roztoků redukováných mebendazolů

	Methanol		Acetonitril	
	m [g]	V [ml]	m [g]	V [ml]
MBZ-FAF	0,0018	100	0,0018	100
MBZ-OH	0,0013	100	0,0018	100

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v methanolu a acetonitrilu

4.1.1. UV-SPEKTROFOTOMETRIE

Pro jednotlivé látky jsem změřila absorbanci jednak v methanolu, jednak v acetonitrilu. Vlnové délky absorpčních maxim jsou zaznamenány v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Vlnové délky absorpčních maxim (nm) jednotlivých benzimidazolů.

	methanol	acetonitril
OXIBENDAZOL	207 247 296	209 249 296
CARBENDAZIM	207 244 281 287	202 245 281 287
THIABENDAZOL	209 243 299	209 299 311
5-HYDROXYTHIABENDAZOL	219 248 308	215 246 305
REDUKOVANÝ FLUBENDAZOL	227 290	221 291
BENOMYL	210 244 281 287	207 253 287 294
2-AMINOENZIMIDAZOL	211 243 283	200 247 284
ALBENDAZOL	229 295	224 296
ALBENDAZOLSULFOXID	231 256 289	224 290 323
ALBENDAZOLSULFON	221 286	219 234 285

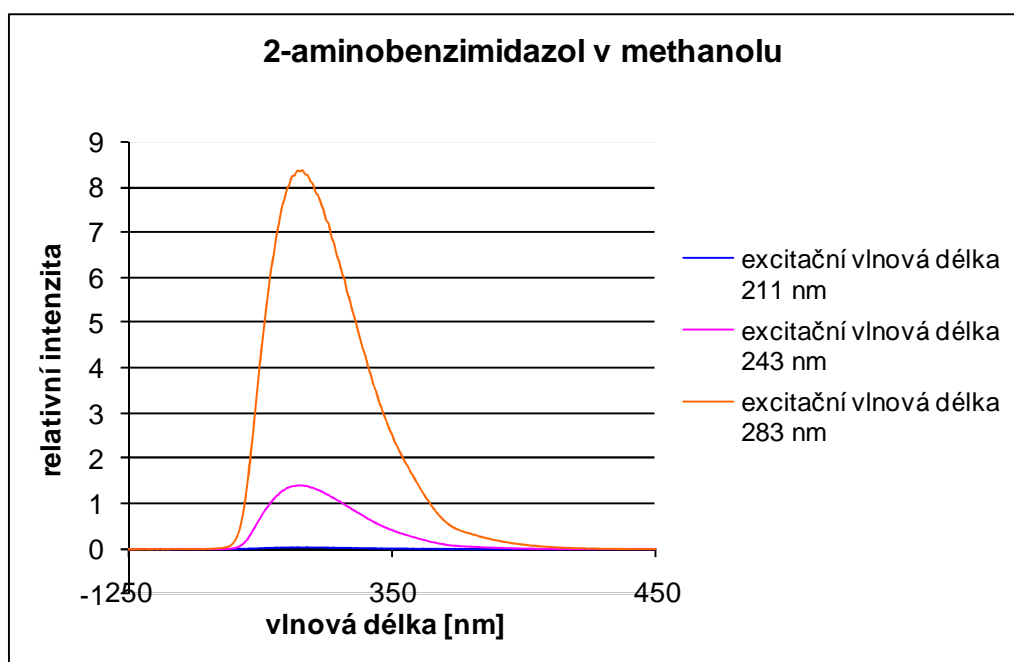
Z naměřených hodnot vlnových délek je patrné, že vliv rozpouštědla není velký. Těžko se hledá v malých rozdílech nějaké pravidlo. Jednou více pohlcuje záření látka při

vyšší vlnové délce v methanolu, jindy zas v acetonitrilu. Někdy je v některém rozpouštědle oproti druhému absorpční maximum navíc. Vždy se ale v těchto případech jednalo o nevýrazné maximum, které v druhém rozpouštědle spektrofotometr už jako maximum nevyhodnotil. Mohu říci, že aprotické rozpouštědlo acetonitril ani protogenní rozpouštědlo methanol □ max významně neovlivňují.

4.1.2. FLUORESCENČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE

Pro každou látku jsem změřila emisní spektra, kdy byly postupně použity všechny zjištěné □ max absorpčních maxim v roli excitačních vlnových délek. Zjistila jsem, že vlnová délka emisního maxima vždy zůstává stejná bez ohledu na hodnotu nastavené excitační vlnové délky. Ovšem s klesající hodnotou vlnové délky excitačního maxima dochází k hypochromnímu posunu. Tento jev je běžný, jeho vysvětlení poskytuje Jablonskiho diagram (17). V našem případě může hodnota emisního maxima sloužit jako kvalitativní analytický parametr s využitím libovolné excitační vlnové délky. Pokud však použijeme nejvyšší □ ex, intenzita emisního záření bude největší, čímž se zvýší citlivost detekce, např. u HPLC. Jako příklad uvádím spektra 2-aminobenzimidazolu v methanolu (graf č. 1). Z tohoto grafu není již patrné žádné fluorescenční spektrum při □ ex 211nm. Je to tím, že intenzita tohoto záření je asi 1400x menší než při nastavení na 283nm. Hodnota maximální emisní vlnové délky je však stejná.

Graf č. 1: Fluorescenční spektra 2-aminobenzimidazolu v methanolu



Protože hodnoty emisního maxima nezávisí podle předpokladu na excitační vlnové délce, pracovala jsem dále jen s nejvyšším excitačním maximem. Hodnoty vlnových délek jsou v tabulce č. 4. Relativní intenzita fluorescence v daném excitačním maximu je uvedena v závorce.

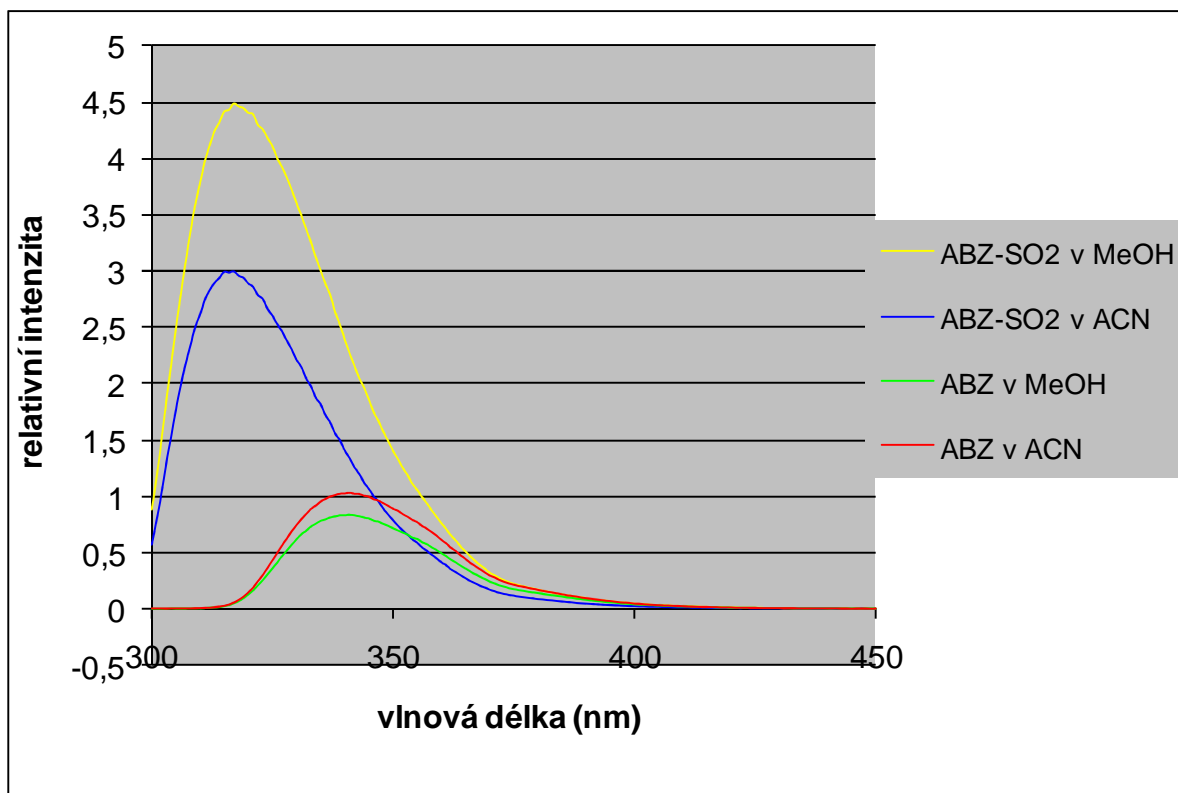
Tabulka č. 4: Vlnové délky emisních maxim (nm) pro studované benzimidazoly v čistém methanolu a v čistém acetonitrilu.

	methanol	acetonitril
OXIBENDAZOL	325 (0,64)	326 (1,90)
CARBENDAZIM	307 (0,35)	307 (0,75)
THIABENDAZOL	341 (0,15)	351 (0,40)
5-HYDROXYTHIABENDAZOL	393 (0,13)	388 (0,20)
REDUKOVANÝ FLUBENDAZOL	311 (1,75)	313 (4,73)
BENOMYL	306 (0,56)	312 (0,86)
2-AMINO BENZIMIDAZOL	316 (4,86)	315 (4,23)
ALBENDAZOL	341 (0,83)	341 (1,02)
ALBENDAZOLSULFOXID	321 (0,16)	329 (1,04)
ALBENDAZOLSULFON	317 (4,48)	317 (2,98)

Z tabulky č. 4 je patrné, že hodnoty emisního maxima většiny studovaných látek v methanolu a v acetonitrilu se poněkud liší. Obvykle dojde při záměně methanolu za acetonitril ke slabému bathochromnímu posunu. Opačně se chová 5-hydroxythiabendazol a 2-aminobenzimidazol. Zde dochází k posunu hypsochromnímu. U 2-aminobenzimidazolu je tento posun pouze o 1nm. Vzhledem k tomu, že rozlišení spektrofluorimetru při nastavených šířkách štěrbin obou monochromátorů je s touto hodnotou srovnatelné a spektra byla skenována s krokem 1 nm, je otázkou, zda se vůbec jedná o posun. Pokud se snažíme posoudit intenzitu fluorescence (což v našem případě můžeme, protože koncentrace látek jsou prakticky stejné), většina látek se chová jako sloučeniny, které obsahují ve své struktuře benzenové jádro (1). Intenzita fluorescence je větší pro látku

v acetonitrilu. Výjimkou jsou látky 2-aminobenzimidazol a albendazolsulfon, které více fluoreskují v methanolu. Chovají se jako sloučeniny obsahující ve struktuře azaren. U 2-aminobenzimidazolu nic nebrání orientaci aminoskupiny do roviny imidazokového jádra, což umožňuje začlenění orbitalu volného elektronového páru dusíku do aromatického π -elektronového systému. To zřejmě významnou měrou zesiluje příklon této látky k charakteru azarenů, pokud jde o poměr intenzity fluorescence v methanolu a v acetonitrilu. V grafu č. 2 jsou zobrazena emisní spektra albendazolu, který intenzivněji fluoreskuje v acetonitrilu, a albendazolsulfonu, který naopak vykazuje vyšší fluorescenci v methanolu.

Graf č. 2: Porovnání intenzity fluorescence v emisním maximu u albendazolsulfonu a albendazolu v jednotlivých rozpouštědlech.

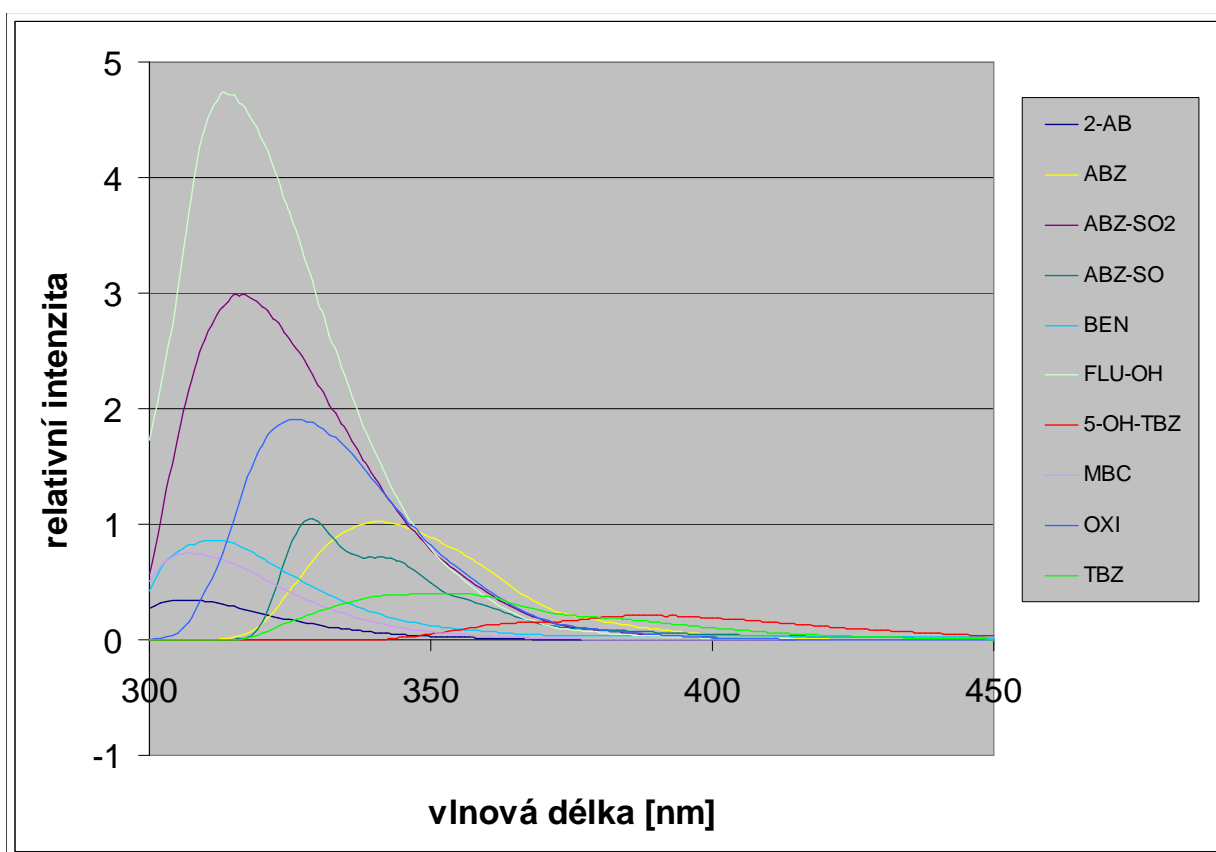


Tabulka č. 4 umožňuje porovnávat emisní maxima látek mezi sebou. Hodnota emisní vlnové délky je nejvyšší u 5-hydroxythiabendazolu. Ze srovnání vlnových

dělek emisních maxim 5- hydroxythiabendazolu a thiabendazolu vyplývá, že vstupem hydroxylové skupiny do polohy 5 na aromatickém kruhu dochází k razantnímu bathochromnímu posunu emisního maxima. Hydroxyl zde účinkuje jako významný auxochrom, tedy substituent na fluoroforu, který způsobuje posun maxima ve spektru. Postupná oxidace na atomu síry v případě albendazolu a jeho metabolitů vede naproti tomu ke zdatnému hypsochromnímu posunu.

V grafu č. 3 jsou emisní spektra studovaných látek v acetonitrilu.

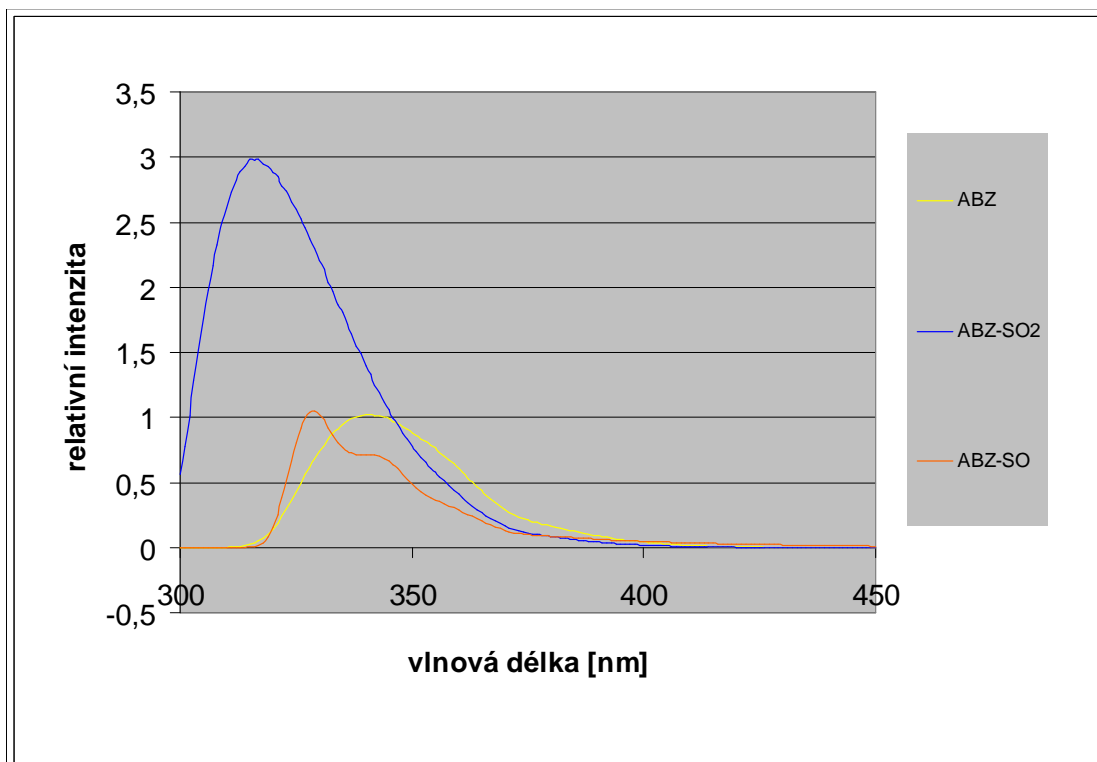
Graf č. 3: Fluorescenční spektra studovaných benzimidazolů v acetonitrilu.



Na grafu č. 4 je velice zajímavé spektrum albendazolsulfoxidu. Chová se jako by v sobě měl dva rozdílné fluorofory. V jeho spektru jsou patrné dva překrývající se emisní pásy. Albendazolsulfoxid vzniká metabolizací albendazolu. Oxidace dále pokračuje a albendazolsulfoxid se přeměňuje na albendazolsulfon (viz. 2.1.5.4.). Pokud si prohlédneme emisní spektra těchto tří látek, působí spektrum albendazolsulfoxidu jako mezistupeň. Tyto tři látky se liší mírou oxidace na atomu síry. Touto postupnou oxidací

dochází ke změně polariry a dipólového momentu molekuly, což má významný vliv na emisní spektrum.

Graf č.4: Emisní spektra albendazolu a jeho metabolitů v acetonitrilu.



Když vezmu v úvahu vliv rozpouštědel methanolu a acetonitrilu na emisní spektra, není většinou nijak výrazný, pokud jde o λ emisního maxima, ani jde-li o intenzitu fluorescence. Nemůže se však zcela zanedbat a pro každou látku je potřeba dané vlastnosti změřit. Ke změnám může docházet nejen vlivem rozdílné viskozity rozpouštědel, ale také z důvodu interakcí mezi rozpouštědlem a léčivou látkou, což souvisí se strukturou fluoreskující látky.

4.2. Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v závislosti na pH.

4.2.1. UV- SPEKTROFOTOMETRIE

Benzimidazolové sloučeniny mohou reagovat jako kyseliny i jako zásady, protože obsahují bazický i kyselý dusíkový atom. Tudíž změna pH může ovlivnit i spektrální vlastnosti, protože dochází k protonizaci, případně deprotonizaci a následně ke změně polaritě fluoreskujících částic. Když se podíváme na tabulku č. 5, je patrné, že absorpční maximum s rostoucím pH roste. U většiny látek je hlavně vysoká absorpance pro pH 11,67. Je to tím, že léčivo při tomto pH odštěpí vodík a vyskytuje se v ionizované formě. Tato forma vykazuje oproti neionizované bathochromní posun. Bathochromní posun je výraznější u benzimidazolů, které obsahují auxochromní skupiny v poloze 5. Je to způsobeno interakcí volného elektronového páru s π elektronovým systémem aromatického kruhu (18).

Tabulka č. 5: Vlnové délky absorpčních maxim (nm) jednotlivých benzimidazolů v závislosti na pH.

	methanol			acetonitril		
	pH 3,00	pH 7,64	pH 11,67	pH 3,00	pH 7,64	pH 11,67
OXIBENDAZOL	199 293	211 245 294	214 302	197 209 294	222 246 296	224 255 304
CARBENDAZIM	200 221 282	211 241 285	215 251 288	194 208 282	221 242 285	223 253 294
THIABENDAZOL	204 242 300	211 235 241 299	213 235 299	198 243 300	210 235 242 299	212 235 241 299
5-HYDROXYTHIABENDAZOL	205 251 317	211 247 313	214 232 260 341	203 251 318	212 248 314	214 233 343
REDUKOVANÝ FLUBENDAZOL	219 287	223 290	225 256 298	217 287	221 291	224 258 304
BENOMYL	217 282	222 285	223 252	217 281	222 285	224 253

	293		292	293		294
2-AMINO BENZIMIDAZOL	206	212	214	205	214	215
	274	241	242	275	243	243
	280	281	282		282	282
ALBENDA ZOL	219	222	222	219	222	222
	295	295	308	296	296	268 310
ALBENDA ZOLSULFOXID	220	225	226	219	224	225
	291	292	306	291	292	308
ALBENDA ZOLSULFON	216	221	225	213	221	224
	290	291	305	290	291	306

4.2.2. FLUORESCENČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE

Při porovnání fluorescenčních spekter měřených roztoků je patrné, že emisní maxima rostou se zvyšujícím se pH (tab. č. 6). Opět to může být dáno změnou poměru ionizované a neionizované formy a také interakcí volného elektronového páru ze substituentu benzenového kruhu s π elektrony benzenového kruhu. Z velké části je posun λ_{em} dán rozdílnými λ_{ex} . Když toto zohledníme, dochází k slabému bathochromnímu posunu při stoupajícím pH. Největší bathochromní posun je právě u těch benzimidazolů, které mají auxochromní substituenty.

Razantní zvýšení emisní vlnové délky u 2-aminobenzimidazolu při změně pH z 3,00 na 7,64 lze patrně přičíst na vrub protonizaci/deprotonizaci aminoskupiny čímž se výrazně mění struktura fluoroforu, polarita a dipólový moment molekuly.

Objektivně je třeba říci, že kvalitativní chemické složení se shoduje pouze u pufrů o pH 7,64 a 11,67 (Brittonovy-Robinsonovy pufrů), zatímco pro pH = 3 byl použit pufr fosfátový. Důvodem je, že fosfátový pufr o pH = 3 je často používán při HPLC analýzách.

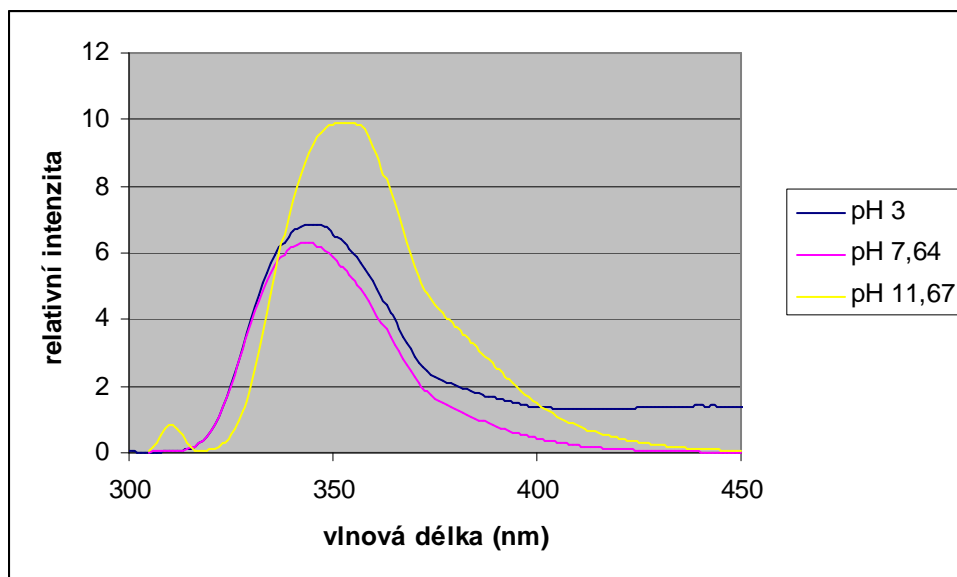
Při posuzování vlivu pufrů o různém pH je třeba mít na paměti, že zde mohou hrát roli dva faktory. Jedním je samotný elektrostatický vliv rozpouštědla, který je dán jeho iontovou silou, což v našem případě znamená, že tento vliv sílí se stoupajícím pH, neboť iontová síla použitých pufrů se s pH zvyšuje. Druhým faktorem je samotná hodnota pH, která ovlivňuje míru protonizace molekul. K tomu ještě přistupuje schopnost metanolu vytvářet vodíkové můstky s atomy dusíku na heterocyklech. Vzhledem k tomu, že podle tab. 6 nejsou zásadní rozdíly v naměřených hodnotách emisních vlnových délek látek v roztocích, které obsahují methanol a v roztocích, které obsahují acetonitril, je zřejmě vliv tvorby vodíkových můstků metanolem výrazně potlačen. To, jaký vliv bude mít zvýšení polarity prostředí na fluorescenční spektra, závisí na tom, zda dochází k vyzáření přechodem elektronu z antivazebného π orbitalu do nevazebného orbitalu ($\pi^* \rightarrow n$ přechod)

nebo z antivazebného π orbitalu do π vazebného orbitalu ($\pi^* \rightarrow \pi$ přechod). V prvním případě dochází při zvýšení polaritý rozpouštědla k hypsochromnímu posunu, v druhém případě k posunu bathochromnímu. Podle tab. 6 jde tedy většinou u studovaných látek o přechody $\pi^* \rightarrow \pi$. To jsou přechody charakteristické pro aromatické uhlovodíky, ovšem i u heterocyklických uhlovodíků je možné je pozorovat tehdy, dojde-li působením polaritý prostředí k energetickému zvýhodnění těchto přechodů (1). Z naznačeného trendu se vymykají oxibendazol, 5-hydroxythiabendazol, benomyl a albendazol, kdy při pH 7,64 je emisní maximum nižší než při pH 3. Jako příklad uvádím emisní spektrum albendazolu v ACN (graf č. 5). To je možné vysvětlit zřejmě významnou protonizací těchto molekul při nízkém pH.

Tabulka č. 6: Vlnové délky emisních maxim (nm) jednotlivých benzimidazolů v závislosti na pH

	methanol			acetonitril		
	pH 3,00	pH 7,64	pH 11,67	pH 3,00	pH 7,64	pH 11,67
OXIBENDAZOL	328	325	339	327	327	339
CARBENDAZIM	303	307	323	304	306	329
THIABENDAZOL	349	355	353	347	355	353
5-HYDROXYTHIABENDAZOL	403	396	432	406	398	408
REDUKOVANÝ FLUBENDAZOL	309	311	328	309	313	329
BENOMYL	309	305	327	310	307	329
2-AMINOBENZIMIDAZOL	296	319	319	298	317	317
ALBENDAZOL	347	345	355	345	343	353
ALBENDAZOLSULFOXID	323	323	355	321	321	356
ALBENDAZOLSULFON	317	319	349	317	319	350

Graf č. 5: Závislost fluorescence na pH u albendazolu v ACN.



4.3. Porovnání absorpčních a emisních spekter různých benzimidazolů v závislosti na polaritě prostředí

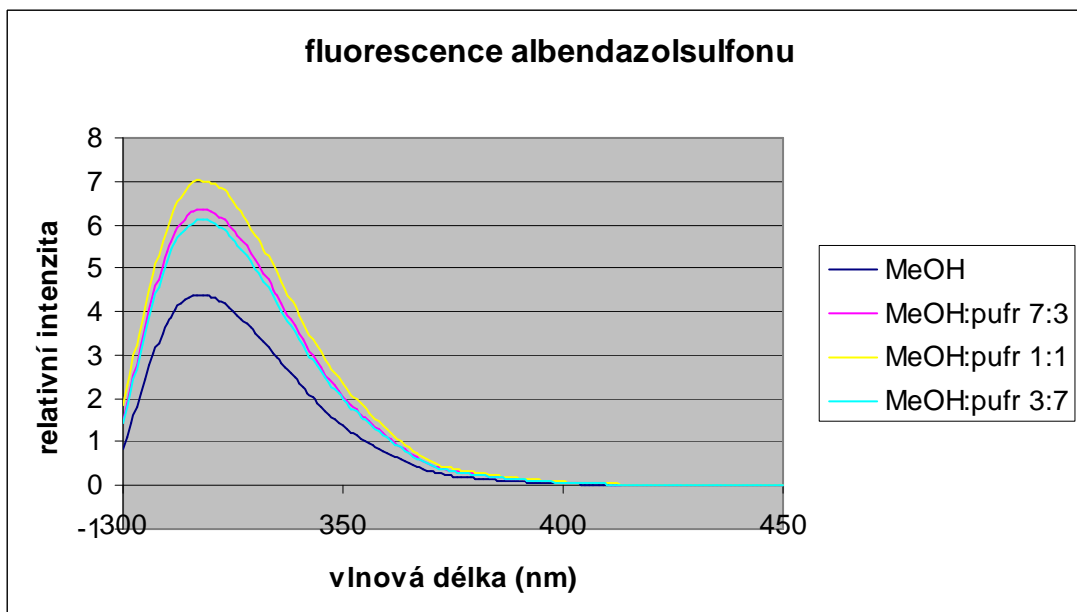
Zjištěné hodnoty absorpčních a emisních maxim jsou shrnuty v tabulce č. 7. Podle vlivu polárního rozpouštědla na vlnové délky emisních maxim bychom látky mohli rozdělit do dvou skupin. V první skupině je vliv polárního rozpouštědla malý, dochází jen k slabému hypsochromnímu posunu. Vlnové délky absorpčních a fluorescenčních maxim se významně nemění. Významně však roste intenzita fluorescence. Graf č. 6 zobrazuje vliv polárního rozpouštědla na fluorescenci albendazolsulfonu. Intenzita fluorescence vzorků se zvyšujícím se obsahem pufru roste, přestože koncentrace benzimidazolu v daném vzorku se zvyšujícím se obsahem pufru klesá. Mezi takto se chovající se látky patří carbendazim, redukovaný flubendazol, 2-aminobenzimidazol, albendazolsulfoxid a albendazosulfon. Toto chování je nejednoznačné. Hypsochromní posun ukazuje na preferenci $\pi^* \rightarrow n$ přechodu při emisi, ale vzestup intenzity fluorescence tomu neodpovídá. Oba jevy však řadí tuto skupinu látek spíše ke sloučeninám azarenového typu.

V druhé skupině dochází vlivem rostoucí polaritoy k bathochromnímu posunu ve spektrech emisních a často i v spektrech excitačních. Takto se chovají sloučeniny azarenového typu, u nichž je vlivem prostředí energeticky výhodnější přechod $\pi^* \rightarrow \pi$ než přechod $\pi^* \rightarrow n$. U oxibendazolu, albendazolu benomyly a 5-hydroxythiabendazolu dochází dokonce vlivem polárního prostředí ke vzniku nového emisního pásu (vlnová délka maxima tohoto pásu je uvedena v tabulce v závorce), u kterého s rostoucí polaritou roste i intenzita záření. Nejvíce je to patrné u 5-hydroxythiabendazolu (graf č. 7). Vznik nového emisního pásu může svědčit o změně struktury excitovaného stavu v závislosti na změně polaritoy prostředí.

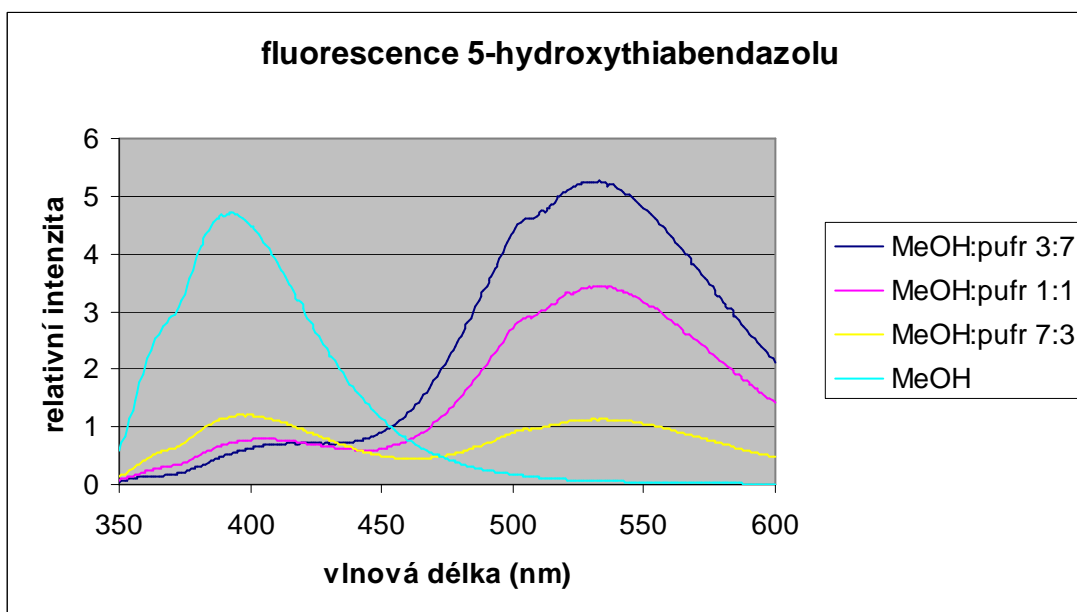
Tabulka č. 7: Excitačních vlnové délky a vlnové délky emisních maxim (nm) v závislosti na obsahu polárního a nepolárního rozpouštědla.

		MeOH	MeOH:pufir 7:3	MeOH:pufir 1:1	MeOH:pufir 3:7	ACN	ACN:pufir 7:3	ACN:pufir 1:1	ACN:pufir 3:7
OXIBENDAZOL	λ_{ex} (nm)	296	294	293	292	296	296	294	292
	λ_{em} (nm)	325	325 (400)	328 (405)	328 (412)	326	326 (402)	327 (406)	329 (409)
CARBENDAZIM	λ_{ex} (nm)	287	282	282	282	287	282	282	282
	λ_{em} (nm)	307	305	303	297	307	307	304	297
THIABENDAZOL	λ_{ex} (nm)	299	298	300	302	311	299	300	302
	λ_{em} (nm)	341	347	349	347	351	347	347	347
5-HYDROXYTHIABENDAZOL	λ_{ex} (nm)	308	315	317	319	305	313	318	319
	λ_{em} (nm)	393	399 (535)	403 (535)	533	389	399 (545)	406 (539)	413 (533)
REDUKOVANÝ FLUBENDAZOL	λ_{ex} (nm)	290	288	287	286	291	287	287	286
	λ_{em} (nm)	311	311	309	304	313	312	309	306
BENOMYL	λ_{ex} (nm)	281	221	293	264	287	283	293	262
	λ_{em} (nm)	306	296	309 (402)	309 (415)	312	306	310	310 (406)
2-AMINO BENZIMIDAZOL	λ_{ex} (nm)	283	280	280	274	284	275	275	274
	λ_{em} (nm)	316	296	296	300	315	296	298	298
ALBENDAZOL	λ_{ex} (nm)	295	295	295	295	296	296	296	297
	λ_{em} (nm)	341	343	347 (447)	353 (452)	341	343	345	349
ALBENDAZOLSULFOXID	λ_{ex} (nm)	289	292	291	289	290	292	291	290
	λ_{em} (nm)	321	321	323	321	328	321	321	320
ALBENDAZOLSULFON	λ_{ex} (nm)	286	290	290	290	285	286	290	286
	λ_{em} (nm)	317	319	317	319	317	317	319	317

Graf č. 6: Závislost fluorescence na polaritě rozpouštědla u albendazolsulfonu.



Graf č. 7: Závislost fluorescence na polaritě rozpouštědla u 5-hydroxythiabendazolu.



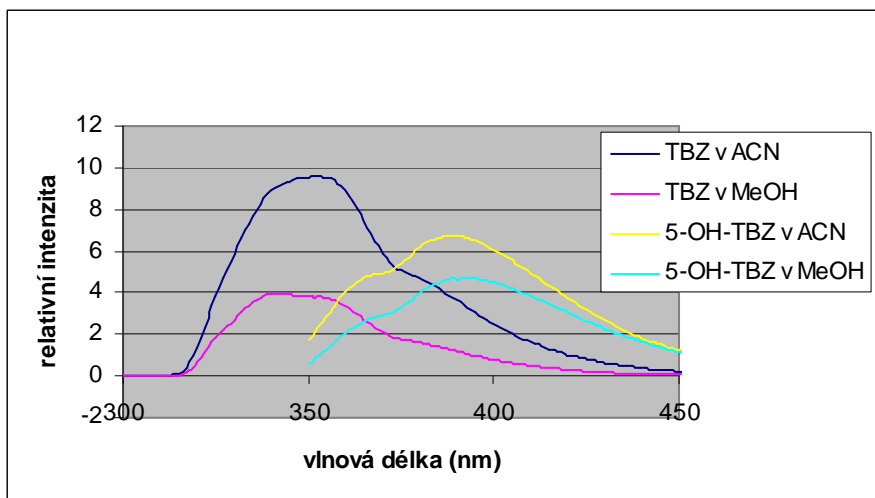
4.4. Určení optimální šířky štěrbin

Při zmenšování šířky štěrbin dochází k přesnějšímu prokreslení spekter, ale na úkor intenzity. Proto je důležité zvolit kompromis. Správně by měla být šířka štěrbin malá ve srovnání s polovinou šířky absorpčního pásu, ale současně co největší, aby bylo získáno spektrum s co nejvyšší intenzitou, s co nejlepším tvarem emisních pásů.

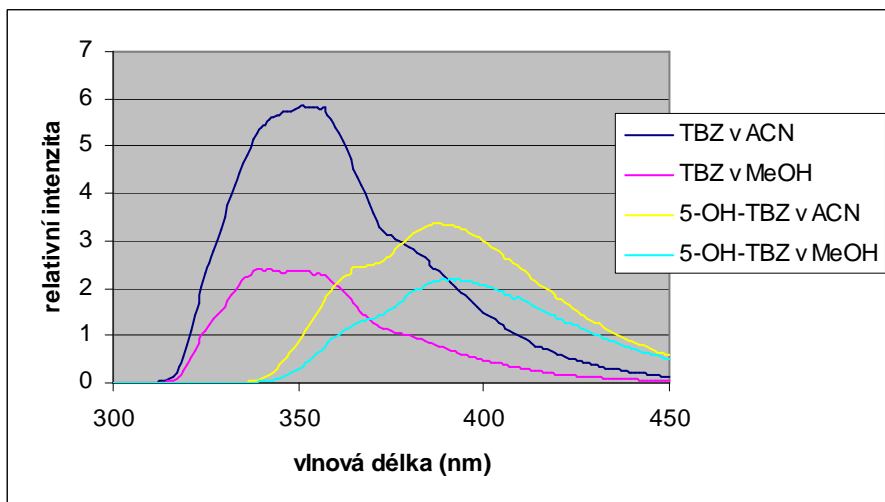
Orientačním měřením jsem zjistila, že emisní spektra získaná s nastavenou šířkou štěrbin 0,5 a 1 nm jsou natolik nevýrazná, že je nelze použít. Další měření bylo proto směřováno k šířkám štěrbin 2 a 4 nm.

Porovnávala jsem fluorescenci thiabendazolu a 5-hydroxythiabendazolu při různé šířce štěrbin, abych zjistila, která šířka je pro měření výhodnější. Důležité je sledovat, zda při změně šířky štěrbin nedochází ke změně tvaru spektra. To může nastat například při zmenšování šířky štěrbin, kdy se může jediný emisní pás rozdělit na několik menších pásů, které charakterizují vibrace fluoroforu. Podle požadavků na spektrální měření je třeba volit vhodnou kvalitu prokreslení spektra a dostatečnou intenzitu emisního záření. Když porovnáme fluorescenci na grafu č. 8, kde proběhlo měření při šířce štěrbin 4, a fluorescenci na grafu č. 9, kde byla šířka štěrbin 2, vidím, že pro benzimidazoly je vhodné měřit při šířce štěrbin 4 nm, protože zúžením štěrbin už nedošlo k posunu vlnové délky a emisní záření je intenzivnější, spektra jsou hladká a dobře prokreslená.

Graf č. 8: Fluorescence TBZ a 5-OH-TBZ při šířce štěrbin 4 nm.



Graf č.9: Fluorescence TBZ a 5-OH-TBZ při šířce štěrbině 2 nm.



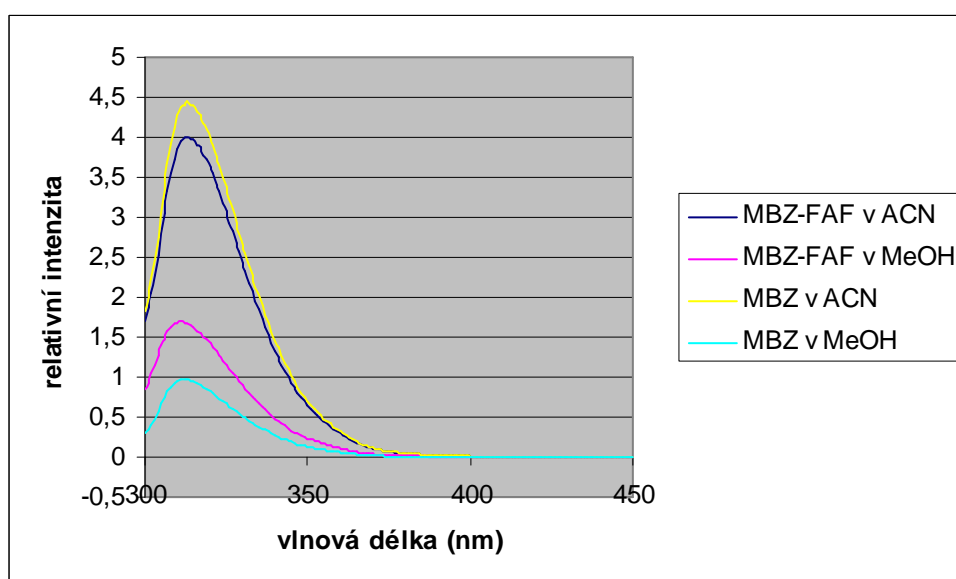
4.5. Porovnání spektrálních vlastností redukováného mebendazolu připraveného na FaF a redukováného mebendazolu od firmy Jansen Pharmaceutica.

Při porovnání spekter edukovaného mebendazolů z obou zdrojů (tab. č. 8), je vidět, že se maximální hodnoty excitační i emisní vlnové délky shodují. Trochu se liší pro další
 absorpčních maxima, což může být dáno malým znečištěním. em se téměř shodují, intenzita fluorescence se poněkud liší, což je dáno ne zcela stejnou koncentrací léčiva ve vzorcích (graf č. 10).

Tabulka č. 8 : Vlnové délky absorpčních a emisní maxim (nm) pro redukováný mebendazol.

	Methanol		Acetonitril	
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
Redukovaný mebendazol syntetizovaný na fakultě	226	311	217	313
	246			
	290			
Redukovaný mebendazol	221	312	218	313
	290			
	291			

Graf č. 10 : Fluorescence redukováného mebendazolu

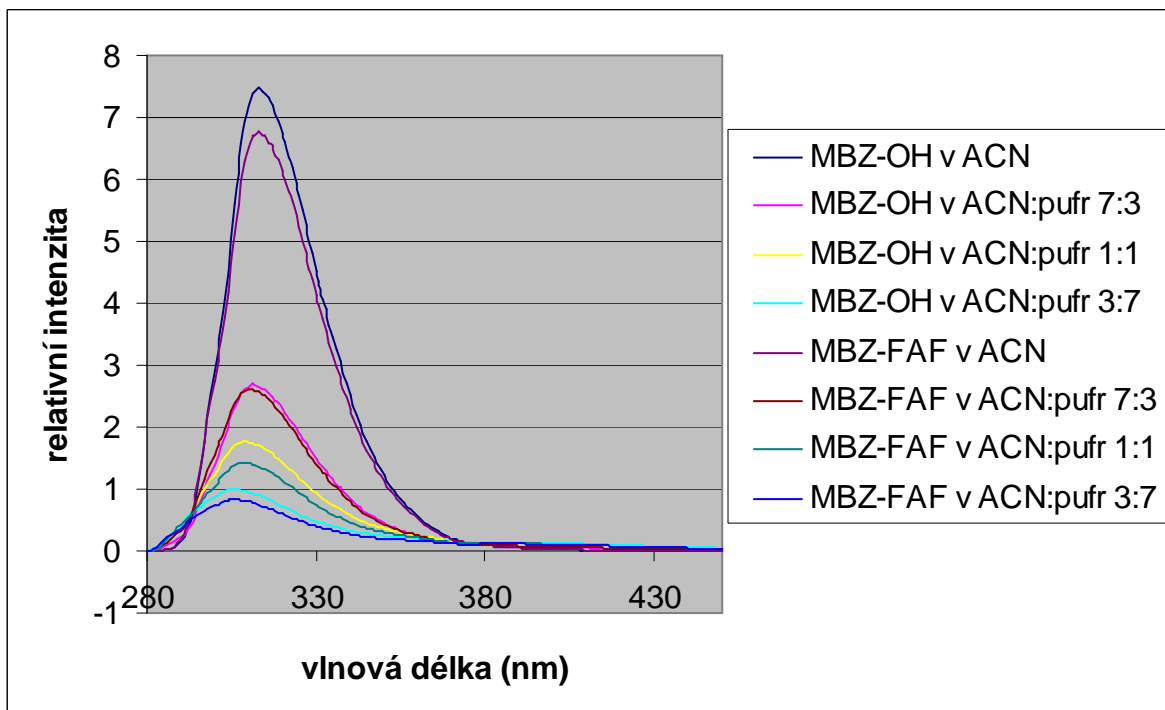


Redukovaný mebendazol má podobné vlastnosti jako redukovaný flubendazol. Ve struktuře se liší jen atomem fluoru, který má však na spektrální vlastnosti malý vliv. Redukovaný mebendazol jsem ještě proměřila stejným způsobem jako ostatní látky v úkolu č. 3, abych zjistila, jestli redukovaný mebendazol má vlastnosti aromatických uhlovodíků nebo azarenů. Z grafu č. 11 vyplívá, že se jedná o sloučeninu typu azarenů, protože se zvyšující polaritou rozpouštědla se snižuje hodnota maximální emisní vlnové délky a je tedy třeba uvažovat o přechodech typu $\pi^* \rightarrow n$ při fluorescenci. Tento fakt opět dokazuje podobnost s redukovaným flubendazolem. Hodnoty emisních maxim látky připravené na fakultě se ve všech směsích rozpouštědla s pufrům shodují s hodnotami emisních maxim zakoupeného redukovaného mebendazolu (tab. č. 9).

Tab. č. 9: Excitační vlnová délka a vlnové délky emisních maxim (nm) u mebendazolu

		MeOH	MeOH:pufr 7:3	MeOH:pufr 1:1	MeOH:pufr 3:7	ACN	ACN:pufr 7:3	ACN:pufr 1:1	ACN:pufr 3:7
REDUKOVANÝ MEBENDAZOL	λ_{ex} (nm)	290	288	287	286	291	287	287	286
	λ_{em} (nm)	312	311	305	305	313	311	309	305
REDUKOVANÝ MEBENDAZOL-FAF	λ_{ex} (nm)	290	288	287	286	291	287	287	286
	λ_{em} (nm)	311	309	307	304	313	311	309	304
REDUKOVANÝ FLUBENDAZOL (FLB)	λ_{ex} (nm)	290	288	287	286	291	287	287	286
	λ_{em} (nm)	311	311	309	304	313	312	309	306

Graf č. 11: Fluorescenční spektra redukovaného mebendazolu v závislosti na polaritě prostředí.



5. ZÁVĚR

V této diplomové práci byly zkoumány spektrální vlastnosti benzimidazolů. Bylo proměřeno deset různých látek se společným benzimidazolovým základem, ale rozdílnými substituenty. Samotná struktura má na absorpční a emisní maxima významný vliv. Absorpční a fluorescenční spektra jednotlivých látek jsou většinou od sebe tak odlišná, že se spektrální data mohou být zohledněna při identifikaci. Bylo zajímavé pozorovat, které substituenty mají na absorpenci a fluorescenci bathochromní a které hypsochromní vliv. Nejvyšší hodnota emisní vlnové délky je u 5-hydroxythiobendazolu. Ten má přímo na benzenovém jádře vázanou -OH skupinu, která je téměř koplánární s aromatickým kruhem a zřejmě zásadně ovlivňuje spektrální chování této látky. Na opačné straně, s maximem výrazně posunutým k nižším vlnovým délkám, se nachází karbendazim, redukovaný flubendazol a redukovaný mebendazol. Pokud by flubendazol a mebendazol nebyly redukovány, nevykazovaly by žádnou fluorescenci. To je dáno pravděpodobně přítomností ketoskupiny.

Spektrální vlastnosti jsou významně ovlivněny rozpouštědlem. Bylo zajímavé pozorovat, které benzimidazoly mají intenzivnější fluorescenci v protogenním methanolu, a které v aprotickém acetonitrilu. Většina se chová jako látky obsahující benzenovou strukturu, tedy intenzivnější emisi záření vykazují v acetonitrilu. Jako sloučeniny obsahující dusíkatý heterocykl se chovají 2-aminobenzimidazol a albendazolsulfon, které více fluoreskují v methanolu. Záměnou těchto dvou rozpouštědel nedochází však k takovým změnám jako při změně pH nebo polaritu prostředí.

Benzimidazoly se mohou chovat jako kyseliny i jako zásady, proto jejich vlastnosti jsou velice ovlivněny pH prostředí. Při zvyšování pH dochází většinou k bathochromnímu efektu. Někdy je při pH 7 vlnová délka maxima nižší než při pH 3, což ovlivňují acidobazické vlastnostmi látky. Je to dáno poměrem ionizované a neionizované formy při daném pH.

Pokud zvyšujeme polaritu prostředí, benzimidazoly reagují dvěma způsoby. První skupina je polaritou ovlivněna jen málo. S rostoucí polaritou dochází k slabému hypsochromnímu efektu a vzestupu intenzity fluorescence. Avšak i zde lze usuzovat na nezanedbatelné působení heterocyklické části molekuly. Zajímavější je pozorovat vliv polaritu na spektrální vlastnosti druhé skupiny benzimidazolů. Zvýšení polaritu přidavkem pufru vede k bathochromnímu efektu. U některých (5-hydroxythiabendazol, oxibendazol, benomyl a albendazol) dochází ke vzniku dalšího emisního pásu při vyšší vlnové délce. Při

zvýšení polarita roste intenzita fluorescence tohoto pásu. To jsou zanky chování sloučenin azarenového typu.

Spektrální vlastnosti benzimidazolů se mohou využít k analýze léčiv. V této diplomové práci jsem je využila ke kontrole vzorku, který obsahoval redukovaný mebendazol. Porovnáním jeho spektrálních vlastností s vlastnostmi redukovaného mebendazolu výrobní firmou Jansen Pharmaceutica jsem mohla konstatovat, že se opravdu jednalo o redukovaný mebendazol.

V praxi je však často potřeba analyzovat vzorky obsahující benzimidazoly v mnohem menší koncentraci. Často se využívá HPLC, kde nejprve dojde k separaci látky na koloně. Poznatky z této práce se mohou uplatnit při volbě vhodných detekčních podmínek na UV detektorech nebo na fluorescenčních detektorech. Zároveň se ukazuje, že pečlivé testování a vhodná volba detekčních podmínek mohou významně zvýšit citlivost použitých metod. Je ještě vhodné poznamenat, že při posuzování, zda se spektrální vlastnosti studovaných látek blíží spíše aromatickým uhlovodíkům nebo sloučeninám heterocyklickým (azarenům), byla větší pozornost věnována spektrům emisním. Podle literatury (1) totiž vstup heteroatomu do aromatické struktury má relativně malý efekt na absorpční spektrum, ale výrazný vliv na emisní spektrum.

6. LITERATURA

- (1) LAKOWICZ, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Springer Science Business Media LLC, 2006
GIBAULT, G. G. *Practical Fluorescence*, New York: Marcel Dekker, 1990
- (2) Mikro-verze AISLP – ČR. Verze 2010.1 pro MS Windows
- (3) LAMKA, J.; DUCHÁČEK, L. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. 3. vydání. Praha: Karolinum, 2008
- (4) HORÁK, P. *Biologie helmintů*. Praha: Karolinum, 1998
- (5) FENDRICH, Z. *Anthelmintika-přednáška z farmakologie*. 2008
- (6) Příbalový leták VITAMINTHE ORAL PASTA. [cit. 25. 4. 2010]. Přístup z <http://www.virbac.cz/vitaminthe.html>
- (7) HARTL, J.; DOLEŽAL, M.; MILETÍN, M.; OPLETALOVÁ V.; ZIMČÍK, P. *Farmaceutická chemie IV*. Praha: Karolinum, 2006
- (8) DANAHER, M.; RUYCKB, H.; CROOKS, S.; DOWLING, G.; O'KEEFFE, M. *Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices*. Journal of Chromatography B, 845 (2007), str.1-37
- (9) KUBÍČEK, V.; SOUKUPOVÁ, M.; NOBILIS M.; KRÍŽOVÁ, V.; SZOTÁKOVÁ, B., SKÁLOVÁ, L. *LC with Fluorimetric Detection for Sensitive Analysis of Reduced Flubendazole in Biological Samples*. Chromatographia 68 (2008), str. 865-867
- (10) KUBÍČEK, V.; LUKEŠOVÁ, M.; UHLÁŘOVÁ, T.; SKÁLOVÁ, L.; SZOTÁKOVÁ, B. *Porovnání fluorescenčních spekter vybraných benzimidazolů měřených v prostředí methanolu a acetonitrilu*. 2009
- (11) KARLÍČEK, R. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2005
- (12) KLIMEŠ, J. *Kontrola léčiv I*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2009
- (13) MILDE, D. *Absorpční a luminiscenční spektrofotometrie v UV-Vis oblasti spektra* [cit. 25. 4. 2010]. Přístup z <http://aix-lin.upol.cz/~milde/IM-UV-Vis.pdf>
- (14) MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. *Český lékopis 2009*. Praha: Grada publishing A. S. 2009
- (15) FIŠAR, Z. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*. [cit. 29. 4. 2010]. Přístup z <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/Default.htm>
- (16) ČÍHALÍK, J.; DVOŘÁK, J.; SUK. *Příručka měření pH*. Praha: SNTL, 1975
- (17) MOORE, W.J. *Fyzikální chemie*. 4. vydání. Praha: SNTL, 1979

- (18) KOSTRHOUNOVÁ, R. *Stanovení fenolu a chlorfenolů ve vodách s použitím spektrofotometre UV/VIS a HPLC po předchozím zkoncentrování na pevné sorbety*. Vědecké spisy Vysokého učení technického v Brně. Edice PhD Thesis, sv. 164, 2002