

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**NEPŘÍMÉ SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ
DERIVÁTŮ CYKLÉNU POMOCÍ
METHYLTHYMOLOVÉ MODŘI**

Bakalářská práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2008

Kateřina Vaňková

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Karla Nesměráka, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 30. května 2008

Kateřina Nantová

Obsah

	Seznam zkratk a symbolů	4
1	Úvod	5
1.1	Radiofarmaka	5
1.1.1	Radiofarmaka obsahující ^{90}Y	5
1.1.2	Radiofarmaka obsahující ^{111}In	6
1.2	Biofarmaceutika	6
1.3	Cyklény a jejich využití	8
1.4	Spektrofotometrické studium komplexů kovů ve viditelné oblasti	9
1.4.1	Spektrofotometrické metody pro stanovení yttria	10
1.4.2	Spektrofotometrické metody pro stanovení india	10
1.4.3	Methylthymolová modř	11
1.5	Nepřímé spektrofotometrické stanovení cyklénů	12
1.6	Cíl práce	12
2	Experimentální část	13
2.1	Studované látky	13
2.2	Použité chemikálie	13
2.3	Použité metody měření a zpracování dat	14
2.3.1	Molekulová absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti	14
2.3.2	Metody zpracování dat	14
3	Výsledky a diskuse	15
3.1	Ověření podmínek pro spektrofotometrické stanovení yttria a india pomocí methylthymolové modři	15
3.1.1	Výběr vhodné vlnové délky pro stanovení	15
3.1.2	Kalibrační přímky komplexů kov-barvivo	18
3.2	Nepřímé spektrofotometrické stanovení DO3A a ABP-DO3A	19
3.2.1	Rychlost komplexace cyklénů s kovy při nepřímém spektrofotometrickém stanovení	21
3.2.2	Vliv teploty při nepřímém spektrofotometrickém stanovení	22
3.2.3	Kalibrační přímky pro nepřímé spektrofotometrické stanovení cyklénů	22
3.2.3.1	Stanovení pomocí komplexu $\text{Y}^{3+}:\text{MTB}$	22
3.2.3.2	Stanovení pomocí komplexu $\text{In}^{3+}:\text{MTB}$	24
4	Závěr	26
	Literatura	27

Seznam zkratk a symbolů

<i>A</i>	absorbance
ABP-DO3A	1, 4, 7, 10-tetraazacyklododekan- <i>N</i> , <i>N'</i> , <i>N''</i> -trioctová kyselina
<i>a</i>	směrnice lineární regrese
<i>c</i>	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
DO3A	1, 4, 7, 10-tetraazacyklododekan- <i>N</i> , <i>N'</i> , <i>N''</i> -trioctová kyselina
DOTA	1, 4, 7, 10-tetraazacyklododekan- <i>N</i> , <i>N'</i> , <i>N''</i> , <i>N'''</i> -tetraoctová kyselina
<i>LOD</i>	limit detekce
<i>M</i>	molární hmotnost [g mol^{-1}]
MTB	methylothymolová modř
$s_{y/x}$	směrodatná odchylka lineární regrese
<i>t</i>	čas [s]
λ	vlnová délka [nm]

1 ÚVOD

Předkládaná bakalářská práce se zaměřuje na vývoj analytické metody pro stanovení derivátů cyklénu, perspektivních chelátorů pro cílenou radioterapii, pomocí nepřímé spektrofotometrické detekce jejich komplexace s yttritými a inditými kationty.

1.1 RADIOFARMAKA

Radiofarmaka jsou radioaktivní látky používané v medicíně k získání diagnostické informace nebo k terapeutickým účelům¹. Látka se v organismu metabolizuje podobně jako neradioaktivní. Díky detekčním aparaturám lze sledovat pohyb a rozložení radiofarmak v organismu.

Radiofarmaka obsahují účelně včleněný radionuklid, který je zdrojem ionizujícího záření. Je charakterizován poločasem rozpadu, druhem a energií záření. Obsah radionuklidu díky radioaktivnímu rozpadu exponenciálně klesá. Radiofarmaka se do organismu aplikují buď necíleně, nebo cíleně ve formě komplexů². Pro značení organických sloučenin se nejčastěji používají radioaktivní izotopy ^{131}I , ^{123}I , ^{109}Pd , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{90}Y , ^{67}Ga , ^{67}Cu , ^{57}Co . Aplikace radiofarmak je neinvazivní a umožňuje včasné zachycení onemocnění oproti ostatním dostupným metodám. Díky využití cílené distribuce radionuklidů jsou omezeny jejich nežádoucí účinky.

1.1.1 Radiofarmaka obsahující ^{90}Y

Radiofarmaka značená radioaktivním izotopem ^{90}Y jsou používána převážně pro terapeutické účely. Léčba zářením je založená na biologickém účinku záření, které poškozuje funkci a případně i život ozařovaných buněk. Snahou je ochránit zdravou tkáň a účinkům záření vystavit pouze nádorové buňky. Cílem terapeutické aplikace radionuklidů

je ozářit patologickou tkáň z minimální vzdálenosti a v přesném místě jejího nálezu. Izotop ^{90}Y má poločas rozpadu 64,06 hodin a vyzařuje čisté záření beta β^- . Toto záření na rozdíl od rentgenového gama záření neproniká hluboko do lidských tkání a je možné ho tak využít k cílené radioterapii. Takto značená radiofarmaka se nejčastěji používají pro terapii nádorů kostí a zánětlivým postižením kolenních kloubů.

1.1.2 Radiofarmaka obsahující ^{111}In

Radiofarmaka značená ^{111}In jsou nejčastěji využívána pro diagnostické účely. Radionuklid ^{111}In je nuklid přeměňující se elektronovým záchytem. Má poločas rozpadu 67,2 hodin. Přípravuje se na cyklotronu ozařováním ^{111}Cd protony. Diagnostické využití radiofarmak značených ^{111}In je velmi rozsáhlé, mezi nejpoužívanější patří scintigrafie likvorových prostor, zobrazení erytropoetické části dřeně, studium kinetiky leukocytů a krevních destiček, scintigrafie a průkaz žilní trombózy a diagnostika nádorů ledvin.

1.2 BIOFARMACEUTIKA

Biofarmaceutika jsou léčiva získaná jinou, než klasickou cestou syntetické chemie, včetně léčiv původně získaných izolací z rostlinného (biologického) materiálu^{3,4}. Mezi biofarmaceutika patří především:

- monoklonální protilátky;
- vakcíny;
- proteiny, včetně peptidických hormonů;
- enzymy;
- kombinace biofarmaceutik s jinými látkami a technologickými úpravami;
- různá jiná biofarmaceutika nezařaditelná přímo do předcházejících skupin.

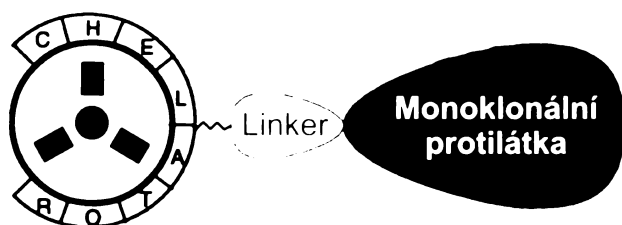
Produkce biofarmaceutik enormě vzrostla během posledních 25 let dokonce tak, že každý čtvrtý farmaceutický produkt obsahuje alespoň jeden biofarmaceutický. Převážná většina těchto materiálů je vyvíjena a produkována v buňkách savců (70 %),

v prokaryotních systémech (15 %) a v kvasinkách (5 %). Několik produktů pochází ze zvířecích buněčných kultur, avšak naprostým základem jsou biofarmaka z lidských genů.

Monoklonální protilátky zaujímají mezi biofarmaceutiky nejvýznamnější místo. V praxi je jich v současnosti schváleno asi třicet. Registrované přípravky se začínají používat k potlačení aloimunitních (transplantačních) a autoimunitních reakcí a také jako protinádorové a protivirové léky. Jejich výhodou je, že jsou produkty jediného klonu B lymfocytů, a proto jsou naprosto homogenní, ale zejména striktně specifické proti jedinému epitopu. To z monoklonálních protilátek tvoří mimořádně vhodný nástroj přesné diagnostiky a i přesně cílené léčby.

Mechanismus účinku monoklonálních protilátek se liší podle povahy zásahu, pro který jsou určeny. Jedním z možných mechanismů účinku je blokáda některého enzymu. Na protilátku může být rovněž navázána jiná účinná látka, např. radiofarmakum nebo chemoterapeutikum. V tomto případě monoklonální protilátka slouží jako nosič a na základě specifické vazby se dostane vlastní účinná látka přímo k místu svého účinku, v daném případě do nádorové buňky.

Již mnoho let je studována možnost využití monoklonálních protilátek pro cílenou léčbu nádorů, při níž se monoklonální protilátka uplatní jako nosič pro léčivou látku, kterou dopraví přímo do nádorové tkáně, jejíž buňky nesou znak odpovídající specifičnosti protilátky^{5, 6}. Protilátka kombinovaná s konvenční chemoterapií zlepšuje její účinnost, aniž by zvyšovala její toxicitu. Účinnost léčby pomocí takto upravených monoklonálních protilátek lze také posílit konjugací monoklonální protilátky s toxinem, cytostatikem a především s radionuklidem. Vazbou vhodného chelátoru na monoklonální protilátku tak vzniká nosič, který po zachycení radionuklidu „donese“ zářič k nádorové buňce nesoucí specifický antigen (obr. 1.1). Dosáhne se tak cíleného ozáření nádorových buněk.



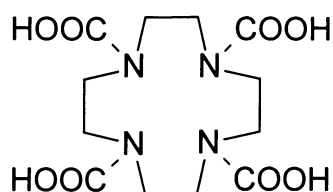
Obr. 1.1 Schéma cíleného radiofarmaceutika skládajícího se z bifunkčního chelátoru a monoklonální protilátky

1.3 CYKLÉNY A JEJICH VYUŽITÍ

Cyklény jsou makrocyclické ligandy, které obsahují kruhový systém skládající se z devíti a více členů (včetně heteroatomů), obsahující tři nebo více donorových atomů⁷. Tyto donorové atomy jsou obvykle umístěné tak, aby při koordinaci byly využity při vazbě chelátového prstence s kovovým iontem. Velikost makrocyclických dutin určuje počet atomů v makrocyclickém prstenu, hybridizace donorového atomu a další faktory.

Tyto ligandy jsou hojně využívány ve farmacii, kde se uplatňují především jako chelatační činidla. Schopnosti cíleně transportovat radionuklidy se využívá hlavně při diagnostice a léčbě nádorových onemocnění. Radiofarmaka si musí po dobu transportu a působení udržet svou biologickou a chemickou funkci. Z tohoto důvodu musí chelatační činidla tvořit s radionuklidy pevnou vazbu a vzniklé kovové cheláty musí být kineticky inertní a termodynamicky stabilní. Nastal obrovský rozvoj syntéz nových chelatačních činidel a snaha aplikovat tyto komplexy na lékařskou praxi s využitím na diagnózu a léčbu nádorových onemocnění.

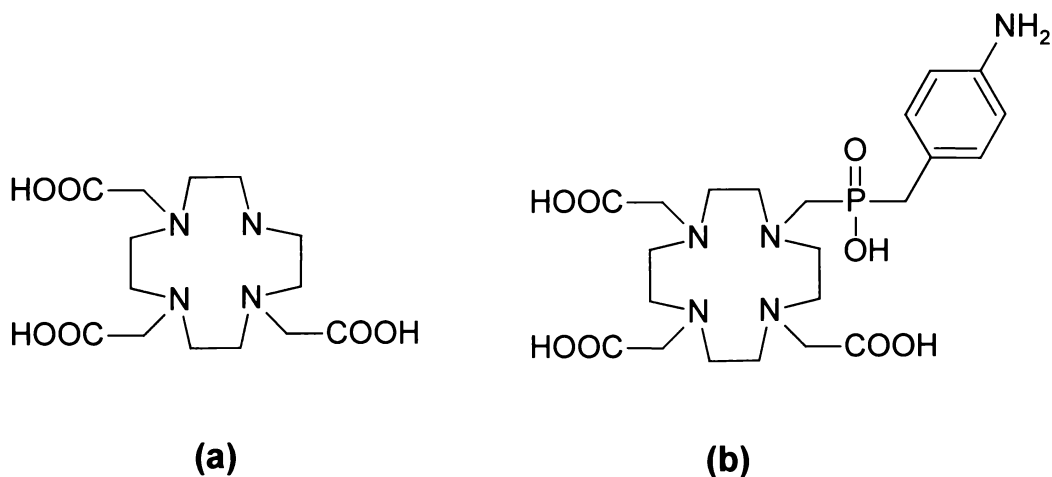
Základem těchto ligandů je 1, 4, 7, 10-tetraazocyclododekan-*N, N', N'', N'''*-tetrakarboxylová kyselina (DOTA), jejíž struktura je uvedena na obr. 1.2.



Obr. 1.2 Struktura 1, 4, 7, 10-tetraazocyclododekan-*N, N', N'', N'''*-tetrakarboxylové kyseliny

V této bakalářské práci jsou studovány dva deriváty cyklénu:

- 1, 4, 7, 10-tetraazocyclododekan-*N, N', N''*-trikarboxylová kyselina (DO3A), jejíž struktura je uvedena na obr. 1.3(a);
- 4-(4-(aminobenzyl)hydroxyfosfinoylmethyl)-1, 4, 7, 10-tetraazocyclododekan-*N, N', N''*-trikarboxylová kyselina (ABP-DO3A), jejíž struktura je uvedena na obr. 1.3(b).



Obr. 1.3 Struktura (a) 1, 4, 7, 10-tetraazacyklododekan-*N, N', N''*-trikarboxylové kyseliny,
 (b) 4-(4-(aminobenzyl)hydroxyfosfinoylmethyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyklododekan-
-N, N', N''-trikarboxylové kyseliny

1.4 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STUDIUM KOMPLEXŮ KOVŮ VE VIDITELNÉ OBLASTI

Molekulová absorpční spektrofotometrie patří mezi optické metody analýzy. Ve viditelné oblasti spektra je vhodná pro stanovení jak organických tak anorganických látek, různých kovů, kationtů či aniontů. Pro stanovení kovů se používají komplexotvorné reakce, protože absorpce samotných kovů je ve většině případech velmi slabá. Kationty se převedou na barevné komplexy, které lze stanovit snadněji.

Komplexy kovů poskytují elektronová spektra s charakteristickými absorpčními pásy, které se nějakým způsobem liší od spekter samotného kovu nebo ligandu. Ligandem v komplexu může být především aniont slabých organických kyselin nebo bazí, ale může jím být i aniont silných či slabých anorganických kyselin.

Ze spektrofotometrických reakcí tvoří největší a nejstudovanější skupinu reakce komplexotvorné⁸. Schopnost organických spektrofotometrických činidel tvořit definované a stabilní komplexy s ionty kovů závisí především na druhu, počtu a vzájemné poloze donorových atomů v jejich molekule a na sterických vlastnostech molekuly. Zvláště významné jsou chelátové komplexy, které mají vysoké konstanty stability a vysoké

hodnoty molárních absorpčních koeficientů. Ve většině případech jsou tato činidla vícevaznými ligandy a tvoří proto s kovy barevné pětičlenné nebo šestičlenné cheláty.

1.4.1 Spektrofotometrické metody pro stanovení yttria

Yttrium je šedý až stříbro-bílý lesklý kov, který se chemicky velmi podobá lanthanoidům. Vyskytuje se téměř ve všech ušlechtilých zemských nerostech, v uranových rudách a zřídka se také v přírodě vyskytuje jako volný element. V periodické soustavě patří do III. B skupiny prvků, atomové číslo má 36, atomová konfigurace je $[\text{Kr}] 4d^1 5s^2$, atomová hmotnost je $88,906 \text{ g mol}^{-1}$, teplota tání je $1526 \text{ }^\circ\text{C}$ a teplota varu se rovná $3336 \text{ }^\circ\text{C}$. Yttrium je poměrně stálé na vzduchu, v práškové formě však za vyšších teplot podléhá snáze spontánní oxidaci na vzdušném kyslíku. Je odolné vůči působení vody, snadno se rozpouští ve zředěných minerálních kyselinách (nejsnáze v kyselině chlorovodíkové). Běžný oxidační stav yttria, ve kterém se vyskytuje ve sloučeninách, je Y^{3+} .

Literatura⁹ udává několik činidel vhodných pro stanovení yttria. Arsenazo I (3-(2-arsonofenylazo)-4,5-dihydroxy-2,7-naftalendisulfonová kyselina) je vhodným činidlem pro fotometrické stanovení nejen yttria, ale i dalších lanthanoidů. Reakce je značně citlivá a probíhá v mírně alkalickém prostředí asi při $\text{pH} = 8$ v triethanolaminu, popř. pyridinu. Maximum absorpce příslušných komplexů je při 570 nm , kde má činidlo samo velmi malou absorpci. Reakci je nutné kombinovat s vhodnou přípravou vzorku, neboť reakce yttria s Arsenazo I není specifická.

Dalším vhodným činidlem pro stanovení yttria je methylthymolová modř^{10, 11}. S yttriem tvoří komplexy modré barvy (molární poměr složek $\text{Y}^{3+}:\text{MTB} = 1:1$), které nejlépe absorbují při 610 nm . Reakce nejlépe probíhá v prostředí acetátového pufru o $\text{pH} = 6,4-6,5$.

1.4.2 Spektrofotometrické metody pro stanovení india

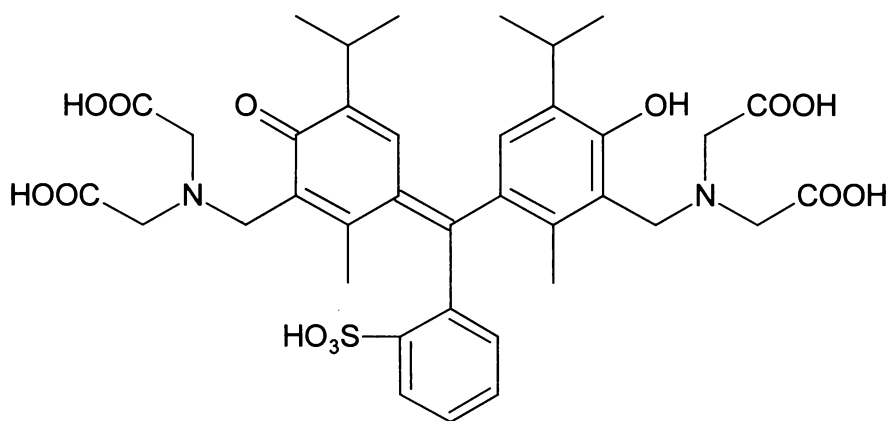
Indium je bílo-stříbrný lehce tavitelný, měkký a dobře tažný kov. Patří do III.A skupiny v periodické soustavě prvků, atomové číslo má 49, atomová konfigurace je $[\text{Kr}] 4d^{10} 5s^2 5p^1$, atomová hmotnost je $114,818 \text{ g mol}^{-1}$, teplota tání je $156,60 \text{ }^\circ\text{C}$ a teplota

varu se rovná 2072 °C. Indium se v přírodě vyskytuje pouze ve formě sloučenin, běžné je v mocenství In^{3+} , výjimečné a nestálé je In^{+1} .

Spektrofotometricky se indium dá stanovit pomocí většího počtu činidel, jako jsou např. oxin, dithizon, fenylnflor, xylenová oranž, aj. Velmi citlivou metodou je stanovení pomocí methylthymolové modři, která s inditými kationty při $\text{pH} = 3,4$ tvoří kovový chelát, který nejvíce absorbuje při 600 nm.

1.4.3 Methylthymolová modř

Methylthymolová modř (obr. 1.4), sumární vzorec $\text{C}_{37}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{S}$, molekulová hmotnost $761,86 \text{ g mol}^{-1}$, CASN [1945-77-3], je dostupná ve formách mono či disodné soli¹². Je to krystalický prášek fialové až černé barvy. Snadno se rozpouští ve vodě, vodný roztok má modrou barvu a velmi zředěné roztoky jsou zabarveny do žluta. Komerčně dostupné preparáty jsou dodávány ve formě směsi se semimethylthymolovou modří (až 50 % směsi) a thymolovou modří.



Obr. 1.4 Struktura methylthymolové modři

1.5 NEPŘÍMÉ SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ CYKLÉNU

Vzhledem ke skutečnosti, že kationty yttria a india a jejich komplexy s chelátory na bázi DOTA neabsorbují v UV/VIS oblasti, je možné komplexaci kovů s těmito chelátory studovat pouze nepřímo, např. sledováním úbytku absorbance komplexu kov-barvivo. To je možné za předpokladu, že konstanta stability komplexu kov-chelátor je mnohem vyšší než konstanta stability komplexu kov-barvivo. V literatuře bylo navrženo stanovení DOTA založené na použití Arsenazu III (cit.¹³).

1.6 CÍL PRÁCE

Předkládaná bakalářská práce se zabývá navržením metody pro kvantitativní stanovení vybraných derivátů cyklénu pomocí měření úbytku absorbance komplexu kov-methylthymolová modř (kde kov je yttrium nebo indium) při pH blízkém fyziologickému pH krve ($\text{pH}(\text{krev}) = 7,34\text{--}7,45$).

Bakalářská práce je rozdělena do dvou částí:

- 1) ověření podmínek pro spektrofotometrické stanovení yttria a india pomocí methylthymolové modři při pH blízkém fyziologickému pH krve;
- 2) stanovení DO3A a ABP-DO3A pomocí nepřímého spektrofotometrického stanovení z úbytku absorbance komplexu kov-methylthymolová modř.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 STUDOVANÉ LÁTKY

Studované deriváty cyklénu:

- 1, 4, 7, 10-tetraazocyclododekan-*N*, *N'*, *N''*-trikarboxylová kyselina (DO3A),
- 4-(4-(aminobenzyl)hydroxyfosfinomethyl)-1, 4, 7, 10-tetraazocyclododekan-*N*, *N'*, *N''*-trikarboxylová kyselina (ABP-DO3A),

byly syntetizovány RNDr. Ladislavem Drožem, Ph.D., z Pedagogické fakulty UK podle postupu¹⁴. Totožnost a čistota byla ověřena hmotnostní spektrometrií a kapalinovou chromatografií.

2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

K přípravě zásobních roztoků yttritých a inditých kationtů o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ bylo použito vhodného naředění certifikovaných referenčních materiálů ASTASOL[®] (Analytika, ČR) redestilovanou vodou. Certifikovaná hodnota a nejistota byla $1,000 \pm \pm 0,002 \text{ g l}^{-1} \text{ Y}_2\text{O}_3$ 99,999%, resp. In 99,999%.

Jako prostředí pro spektrofotometrická měření byly v příslušných případech použity následující roztoky:

- a) Acetátový pufr I o pH = 6,7 byl připraven titrací jednoho litru $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ octové kyseliny 2 mol dm^{-3} roztokem amoniaku do požadovaného pH;
- b) Acetátový pufr II o pH = 6,7 byl připraven titrací jednoho litru $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ octové kyseliny 2 mol dm^{-3} roztokem hydroxidu sodného do požadovaného pH;
- c) redestilovaná voda o pH = 6,40 (upraveno přidavkem 2 mol dm^{-3} roztoku hydroxidu sodného).

Ostatní použité chemikálie byly analytické čistoty: amoniak 25% (Lachema), hydroxid sodný (Lachema), methylthymolová modř (Lachema) a octová kyselina 99% (Lach-Ner).

2.3 POUŽITÉ METODY MĚŘENÍ A ZPRACOVÁNÍ DAT

2.3.1 Molekulová absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti

Molekulová absorpční spektra studovaných roztoků byla měřena ve viditelné a ultrafialové oblasti na spektrofotometru HP 8453 (Hewlett Packard) s diodovým polem a zpracována softwarem UV-Visible Chemstation, ver. A.09 (Hewlett Packard). Roztoky byly měřeny v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm při laboratorní teplotě 22 ± 1 °C.

2.3.2 Metody zpracování dat

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy¹⁵. Výsledky spektrofotometrických měření jsou mediány z nejméně tří měření (testovaných na odlehlost).

Lineární závislosti dvou proměnných byly zpracovány metodou lineární regrese s vyhodnocením příslušných odchylek a korelačních koeficientů. Statistický limit detekce (*LOD*) byl vypočítán podle vztahu:

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{x/y}}{a} \quad (2.1)$$

kde $s_{y/x}$ je směrodatná odchylka lineární regrese a a je směrnice lineární regrese. Výpočty byly realizovány pomocí softwarových programů Microsoft Excel XP a Microsoft Excel Vista (Microsoft Corporation, USA).

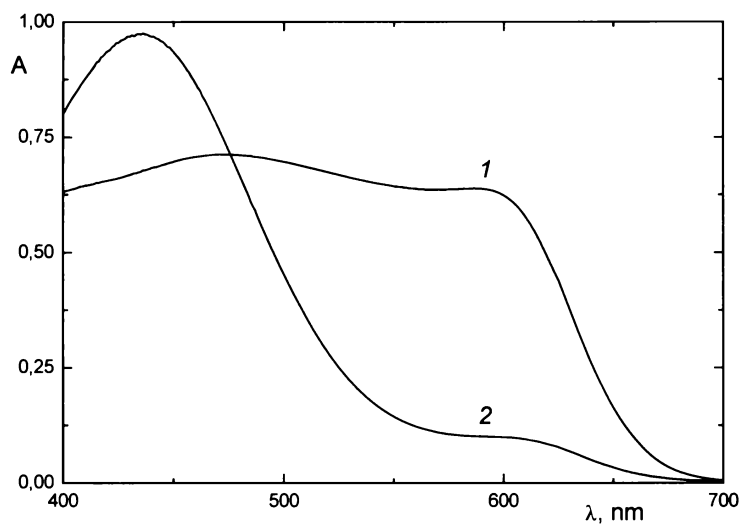
3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 OVĚŘENÍ PODMÍNEK PRO SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ YTTRIA A INDIA POMOCÍ METHYLTHYMOLOVÉ MODŘI

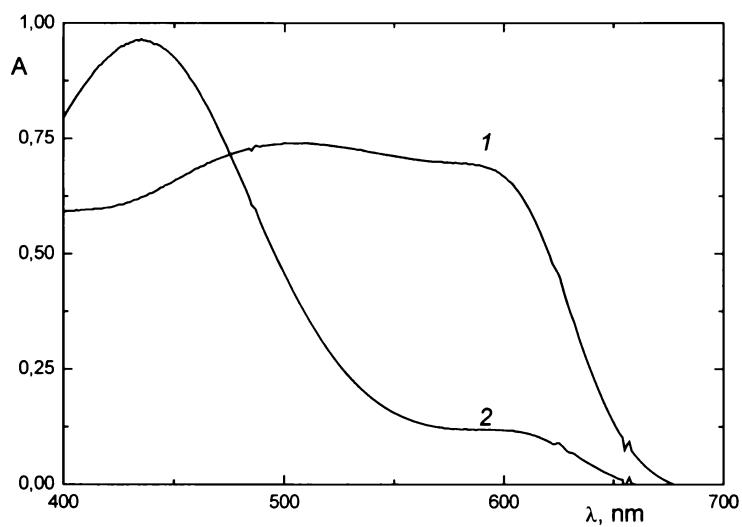
V kapitole 1.4 byly diskutovány literární údaje o podmínkách spektrofotometrického stanovení yttritých a inditých kationtů pomocí methylthymolové modři. Pro kvantitativní využití tohoto stanovení k nepřímému spektrofotometrickému studiu interakce kovů s cyklény bylo nutno provést ověření experimentálních podmínek vzniku komplexů kov-barvivo při pH blížším fyziologickému pH krve ($\text{pH} = 7,34\text{--}7,45$). Jako vhodné pH bylo zvoleno vzhledem k disociačním vlastnostem methylthymolové modři $\text{pH} = 6,9$. Byly sestrojeny příslušné kalibrační přímky. Byl studován vliv složení pufru (acetát-amonný iont, acetát-sodný iont) na regresní koeficienty kalibrační přímky.

3.1.1 Výběr vhodné vlnové délky pro stanovení

Bylo proměřeno absorpční spektrum methylthymolové modři a jejího komplexu s yttritými kationty v prostředí obou acetátových pufrech o $\text{pH} = 6,7$ (Obr. 3.1, 3.2). Vhodná vlnová délka pro analytické stanovení byla na základě maximálního rozdílu absorbancí MTB a komplexu $\text{Y}^{3+}:\text{MTB}$ stanovena 590 nm.

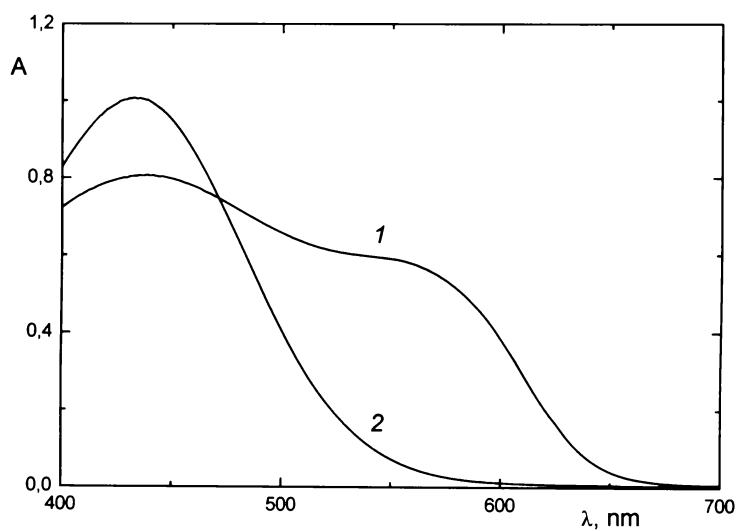


Obr. 3.1 Závislost absorbance MTB (křivka 2) a komplexu Y^{3+} :MTB (křivka 1) na vlnové délce v prostředí acetátového pufru I o pH = 6,7 při $c(\text{MTB}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(Y^{3+}) = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$



Obr. 3.2 Závislost absorbance MTB (křivka 2) a komplexu Y^{3+} :MTB (křivka 1) na vlnové délce v prostředí acetátového pufru II o pH = 6,7 při $c(\text{MTB}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(Y^{3+}) = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

Bylo proměřeno absorpční spektrum methylthymolové modři a jeho komplexu s inditými kationty v prostředí redestilované vody o pH = 6,5 (Obr. 3.3), vybraná vlnová délka pro analytické stanovení je 560 nm.



Obr. 3.3 Závislost absorbance MTB (křivka 2) a komplexu In³⁺:MTB (křivka 1) na vlnové délce v prostředí redestilované vody o pH = 6,5 při $c(\text{MTB}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{In}^{3+}) = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

3.1.2 Kalibrační přímky komplexů kov-barvivo

Kalibrační přímka komplexu Y^{3+} :MTB byla proměřena v prostředí acetátového pufru I (obr. 3.4) a acetátového pufru II (obr. 3.5) v koncentračním rozsahu yttritých kationtů $0,0-3,0 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} při konstantní koncentraci methylthymolové modři rovné $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} , aby byl zajištěn dostatečný přebytek činidla. Byly získány rovnice kalibrační přímky stanovení yttritých kationtů pomocí MTB v obou pufrch:

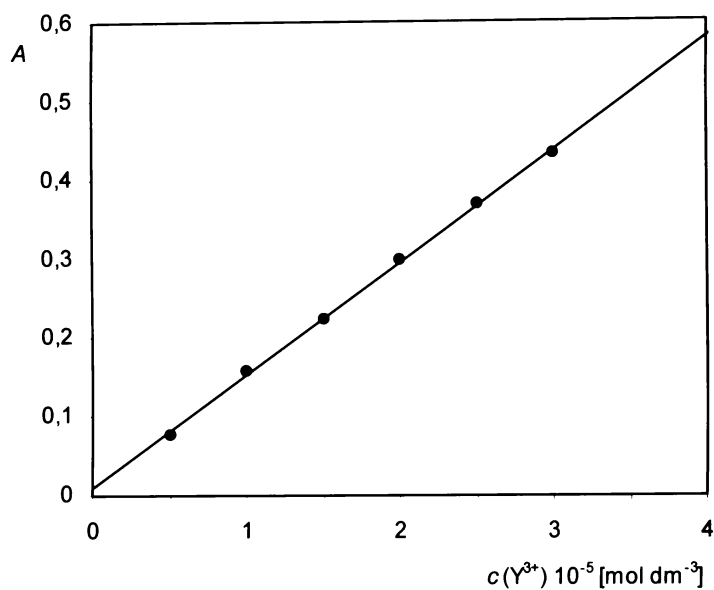
a) acetátový pufr I pH = 6,7 (acetát-amonný pufr):

$$\begin{aligned} A &= 14\,240\,c \text{ (mol dm}^{-3}\text{)} + 0,01 & (3.1) \\ \text{LOD} &= 9,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3} \\ r &= 0,9996 \end{aligned}$$

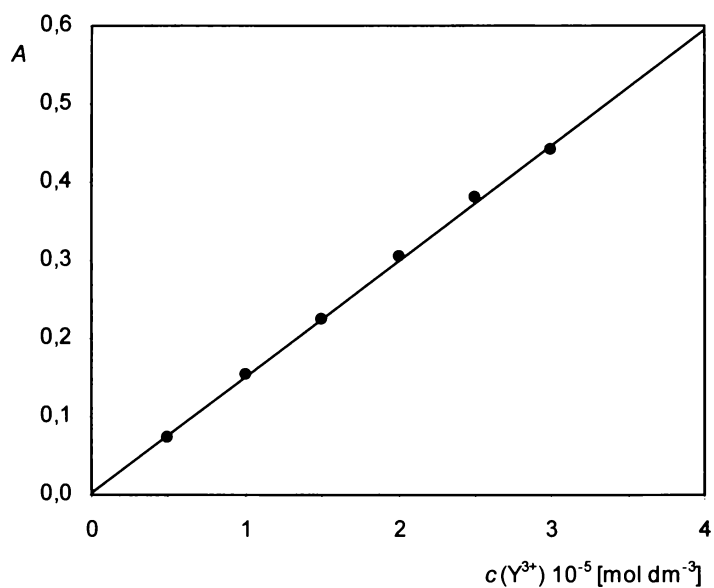
b) acetátový pufr II pH = 6,7 (acetát-sodný pufr):

$$\begin{aligned} A &= 14\,785\,c \text{ (mol dm}^{-3}\text{)} & (3.2) \\ \text{LOD} &= 1,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \\ r &= 0,9993 \end{aligned}$$

Z hodnot směrnic obou rovnic je patrné, že složení použitého pufru nemá na kalibrační přímku prakticky žádný vliv.



Obr. 3.4 Závislost absorbance komplexu $\text{Y}^{3+}:\text{MTB}$ na koncentraci yttritých kationtů v prostředí acetátového pufru I (acetát-amonný pufr) o $\text{pH} = 6,7$ při $c(\text{MTB}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ a vlnové délce $\lambda = 590 \text{ nm}$



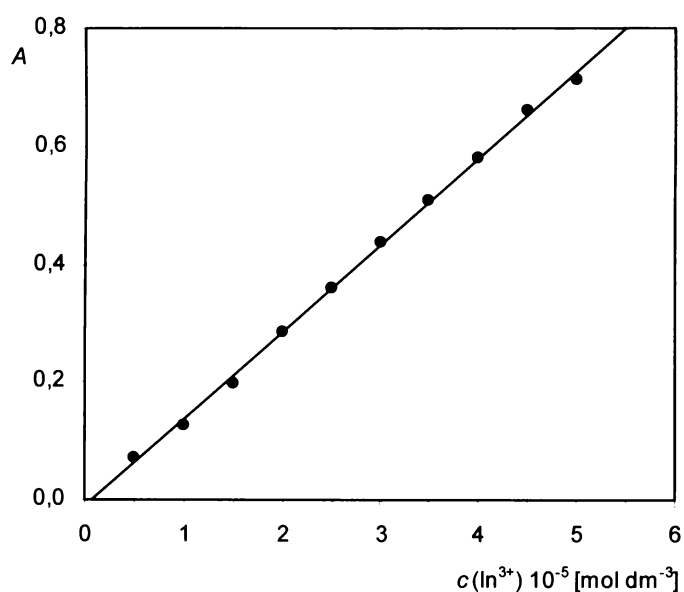
Obr. 3.5 Závislost absorbance komplexu $\text{Y}^{3+}:\text{MTB}$ na koncentraci yttritých kationtů v prostředí acetátového pufru II (acetát-sodný pufr) o $\text{pH} = 6,7$ při $c(\text{MTB}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ a vlnové délce $\lambda = 590 \text{ nm}$

Kalibrační přímka komplexu In^{3+} :MTB byla proměřena v prostředí redestilované vody o $\text{pH} = 6,5$ v koncentračním rozsahu yttritých kationtů $0,0\text{--}5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ při konstantní koncentraci methylthymolové modři rovné $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, aby byl zajištěn dostatečný přebytek činidla (obr. 3.6). Byla získána rovnice kalibrační přímky stanovení inditých kationtů pomocí MTB v prostředí redestilované vody o $\text{pH} = 6,5$:

$$A = 14\,767 c (\text{mol dm}^{-3}) - 0,01 \quad (3.3)$$

$$\text{LOD} = 1,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$r = 0,9993$$



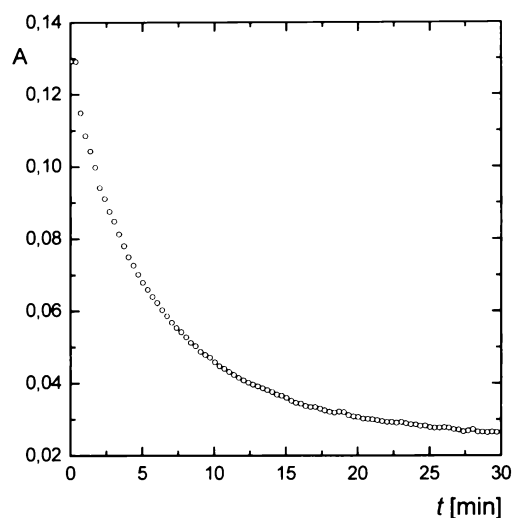
Obr. 3.6 Závislost absorbance komplexu In^{3+} :MTB na koncentraci yttritých kationtů v prostředí redestilované vody o $\text{pH} = 6,5$ při $c(\text{MTB}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ a vlnové délce $\lambda = 560 \text{ nm}$

3.2 NEPŘÍMÉ SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ DO3A A ABP-DO3A

Vzhledem ke skutečnosti, že kationty yttria a india a jejich komplexy s chelátory na bázi DOTA neabsorbují v UV/VIS oblasti je možné komplexaci kovů s těmito chelátory studovat pouze nepřímo, např. sledováním úbytku absorbance komplexu kov-barvivo. To je možné za předpokladu, že konstanta stability komplexu kov-chelátor je mnohem vyšší než konstanta stability komplexu kov-barvivo.

3.2.1 Rychlost komplexace cyklénů s kovy při nepřímém spektrofotometrickém stanovení

Byla proměřena kinetická křivka úbytku absorbance komplexu Y^{3+} :MTB v přítomnosti DO3A (obr. 3.7). Bylo zjištěno, že reakce mezi Y^{3+} a DO3A má poločas přibližně 8,5 minuty. Při nepřímém spektrofotometrickém stanovení je tedy nutné přesně dodržet čas od smíšení reagensů k odečtení úbytku absorbance.



Obr. 3.7 Kinetická křivka reakce DO3A s komplexem Y^{3+} :MTB.

Podmínky měření: $c(\text{DO3A}) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{MTB}) = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$,
 $c(Y^{3+}) = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, acetátový pufr I o pH = 6,7, $\lambda = 590 \text{ nm}$.

3.2.2 Vliv teploty při nepřímém spektrofotometrickém stanovení

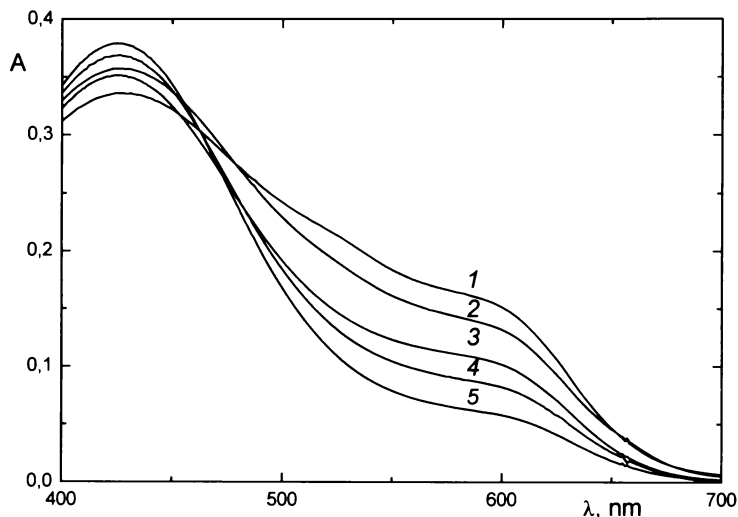
Byl studován vliv zvýšené teploty na kinetickou křivku reakce DO3A s komplexem Y^{3+} :MTB při teplotách 20 a 90 °C. Bylo zjištěno, že za teploty 90 °C jsou měření reprodukovatelnější, pravděpodobně v důsledku zrychlení komplexotvorné reakce mezi DO3A a Y^{3+} .

3.2.3 Kalibrační přímky pro nepřímé spektrofotometrické stanovení cyklénů

3.2.3.1 Stanovení pomocí komplexu Y^{3+} :MTB

Byla proměřena spektra komplexu Y^{3+} :MTB v přítomnosti zvyšující se koncentrace obou studovaných cyklénů DO3A a ABP-DO3A. Měření byla prováděna v prostředí

acetátového pufru I. Roztoky byly po smíchání inkubovány ve vodní lázni při 90 °C po dobu 9 minut, poté byl alikvotní podíl umístěn do kyvety a přesně 10 minut od smíchání byla odečtena absorbance při 590 nm. Pro oba cyklény bylo zjištěno, že se vzrůstající koncentrací dochází k vyvazování yttria z komplexu s MTB, což se projevuje poklesem absorbance komplexu při vlnové délce 590 nm. Příklad změny spektra je pro DO3A uveden na obr. 3.8.



Obr. 3.8 Spektra komplexu Y^{3+} :MTB v přítomnosti DO3A, koncentrace DO3A: (1) 0 mol dm^{-3} , (2) $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, (3) $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, (4) $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ a (5) $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$
Podmínky měření: $c(\text{MTB}) = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(Y^{3+}) = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, acetátový pufr I o pH = 6,7.

Závislost hodnoty absorbance absorpčního maxima komplexu Y^{3+} :MTB na koncentraci přidaného cyklénu je zachycena na obr. 3.9. Byly vypočítány rovnice příslušných kalibračních přímek:

a) pro DO3A

$$A = -12056 c (\text{mol dm}^{-3}) + 0,16 \quad (3.4)$$

$$\text{LOD} = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

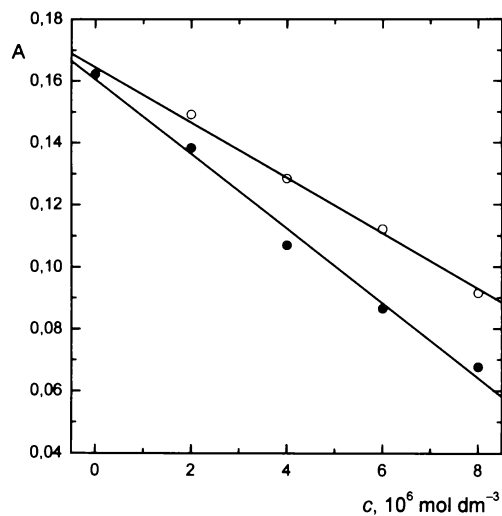
$$r = 0,9957$$

b) pro ABP-DO3A

$$A = -8932 c (\text{mol dm}^{-3}) + 0,16 \quad (3.5)$$

$$\text{LOD} = 7,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$r = 0,9976$$



Obr. 3.9 Závislost absorbance absorpčního maxima komplexu $Y^{3+}:MTB$ na koncentraci přidaného chelátoru: (●) DO3A, (○) ABP-DO3A. Podmínky měření: $c(MTB) = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(Y^{3+}) = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, acetátový pufr I o $pH = 6,7$, $\lambda = 590 \text{ nm}$.

3.2.3.2 Stanovení pomocí komplexu $In^{3+}:MTB$

Byla proměřena spektra komplexu $In^{3+}:MTB$ v přítomnosti zvyšující se koncentrace obou studovaných cyklénů DO3A a ABP-DO3A. Měření byla prováděna v prostředí acetátového pufru I. Roztoky byly po smíchání inkubovány na vodní lázni při $90 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 9 minut, poté byl alikvotní podíl umístěn do kyvety a přesně 10 minut od smíchání byla odečtena absorbance při 560 nm . Pro oba cyklény bylo zjištěno, že se vzrůstající koncentrací dochází k vyvazování india z komplexu s MTB, což se projevuje poklesem absorbance komplexu při vlnové délce 560 nm .

Závislost hodnoty absorbance absorpčního maxima komplexu $\text{In}^{3+}:\text{MTB}$ na koncentraci přidaného cyklénu je zachycena na obr. 3.10. Byly vypočítány rovnice příslušných kalibračních přímek:

a) pro DO3A

$$A = -3315 c (\text{mol dm}^{-3}) + 0,09 \quad (3.6)$$

$$\text{LOD} = 8,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$$

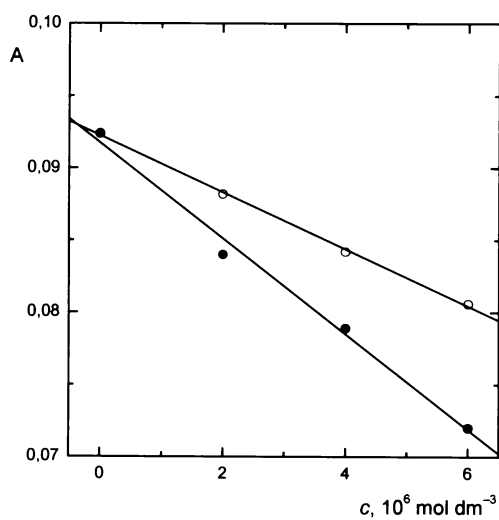
$$r = 0,9958$$

b) pro ABP-DO3A

$$A = -1970 c (\text{mol dm}^{-3}) + 0,09 \quad (3.7)$$

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$r = 0,9994$$



Obr. 3.10 Závislost absorbance absorpčního maxima komplexu $\text{In}^{3+}:\text{MTB}$ na koncentraci přidaného chelátoru: (●) DO3A, (○) ABP-DO3A. Podmínky měření: $c(\text{MTB}) = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{In}^{3+}) = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, redestilovaná voda o $\text{pH} = 6,4$, $\lambda = 560 \text{ nm}$.

4 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vypracování metody pro stanovení vybraných derivátů cyklénu nepřímým spektrofotometrickým měřením na základě sledování úbytku absorbance komplexu kov-methylthymolová modř (kde kov je yttrium nebo indium).

V první části práce byly ověřeny podmínky pro spektrofotometrické stanovení yttritých a inditých kationtů pomocí methylthymolové modři, proměřeny příslušné kalibrační přímky a zjištěno, že složení použitých pufrů nemá na kalibrační přímky žádný vliv.

V druhé části práce byly zjištěny podmínky pro využití komplexů kov-barvivo pro nepřímé spektrofotometrické stanovení cyklénů. Bylo zjištěno, že měření je nejlépe reprodukovatelné při inkubaci vzorku s činidlem při 90 °C po dobu 10 minut. Byly naměřeny kalibrační přímky pro stanovení DO3A a ABP-DO3A s využitím komplexů Y^{3+} :MTB a In^{3+} :MTB.

Literatura

1. Lázníček M., Komárek P.: *Základy radiofarmacie*. Praha, Karolinum 1998.
2. Reichert D. E., Lewis J. S., Anderson C. J.: Metal complexes as diagnostic tools. *Coordination Chemistry Reviews* **184**, 3–66 (1999).
3. Beneš L.: Biofarmaceutika (Bioléčiva). *Chemické Listy* **101**, 18–24 (2007).
4. Redwan el-E.M.: Cumulative updating of approved biopharmaceuticals. *Human Antibodies* **16**, 137–158 (2007).
5. Woods M., Sherry A. D.: Bifunctional chelators: An important tool in the development of inorganic pharmaceuticals. *Chimica Oggi-Chemistry Today* **23**, 31–34 (2005).
6. Liu S., Edwards D. S.: Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chemistry* **12**, 7–34 (2001).
7. Lewis M. R., Shively J. E.: Maleimidocysteineamido-DOTA derivatives: new reagents for radiometal chelate conjugation to antibody sulfhydryl groups undergo pH-dependent cleavage reactions. *Bioconjugate Chemistry* **9**, 72–86 (1998).
8. Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha, Karolinum 2004
9. Malát M.: *Absorpční anorganická fotometrie*. Praha, Academia 1973.
10. Serdyuk L. S., Smirnaya V. S.: Spectrophotometric study of the reactions of yttrium, lanthanum and cerium with methylthymol blue. *Zhurnal Analyticeskoj Chimii* **20**, 161–164 (1965).
11. Zielinski S., Lomozik L.: Determination of lanthanum, praseodymium, neodymium, samarium, gadolinium and yttrium using methylthymol blue as indicator. *Chemia Analytyczna* **23**, 815–819 (1978).
12. Cheng K. L.: *Handbook of Organic Analytical Reagents*. Boca Raton, CRC Press 1982.
13. Pippin C. G., Parker T. A., McMurry T. J., Brechbiel M. W.: Spectrophotometric method for the determination of bifunctional DTPA ligand in DTPA-monoclonal antibody conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **3**, 342–345 (1992).
14. WO 2006/045546 *Method of preparing or synthesizing polyazamacrocyclic derivatives*. Drož L., Cihelník S., Šrámek M.
15. Miller J. C., Miller J. N.: *Statistics for Analytical Chemistry*. 2nd edition. New York, Ellis Horwood 1992.

Poděkování

Na závěr své práce bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Karlovi Nesměrákovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a trpělivost při tvorbě bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala svým rodičům za podporu během doby studia, která mi umožnila vytvořit tuto práci.