

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

STUDIUM STABILITY DERIVÁTU GLYCINU S NBD-CI

Diplomová práce

STUDY OF GLYCINE-NBDCI DERIVATE STABILITY

Diploma thesis

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. Obrázky jsou použity se svolením autorů. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. za vedení, podporu, cenné rady a podněty při vypracování této práce.

Dále děkuji své rodině za finanční a morální podporu, kterou mi během celého mého studia prokazovala.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Lenka Koudelková

Konzultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Název diplomové práce: Studium stability derivátu glycinu s NBD-Cl

V práci je studována stabilita derivátu glycinu s NBD-Cl pomocí HPLC a fluorescenční detekce za třech různých podmínek (teplo světlo, teplo tma, tma zima). Po stabilizaci derivátu kyselinou chlorovodíkovou bylo dosaženo lepší stability derivátů NBD-Gly, avšak koncentrace derivátu zjištěné v průběhu několika týdnů vykazují velký rozptyl. Dále byly navrženy alternativní chromatografické podmínky pro příslušnou analýzu. Acetonitril s hydrogenfosforečnanovým pufrům (pH 7,0) v poměru 70:30 na koloně Atlantis poskytl symetrické píky s krátkým elučním časem.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of biophysics and physical chemistry

Candidate: Lenka Koudelková

Consultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Title of Thesis: Study of glycine-NBDCl derivate stability

In this thesis the stability of glycine-NBDCl derivative under three different conditions (heat+light, heat+dark, cool+dark) is studied by HPLC with fluorimetric detection. After being stabilized by hydrochloric acid the derivatives exhibit a better stability, but the concentrations found during several weeks are too scattered. In addition an alternative chromatographic conditions were proposed for the HPLC analysis. Acetonitrile with hydrogen phosphate buffer (pH 7,0) in ratio 70:30 on an Atlantis column gave symmetric peaks with a short time of elution.

Obsah

1.	Zadání práce	6
2.	Teoretická část	7
	2.1 Glycin	7
	2.2 Neurotransmitery	7
	2.3 NBD-Cl	8
	2.4 Princip reakce	8
	2.5 Příklad optimalizace reakčních podmínek	10
	2.6 Derivatizační činidla (sondy)	10
3.	Experimentální část	12
	3.1 Příprava reakční směsi	12
	3.2 Příprava fosfátového pufru	13
	3.3 Vlastní měření	14
	3.4 Schéma chromatografické sestavy	15
	3.5 Fluorescenční HPLC detektor	16
4.	Výsledky a diskuse	19
5.	Závěr	41
6.	Literatura	42

1 Zadání práce

Glycin je aminokyselina účastnící se mnoha biochemických dějů v lidském organismu. Tato práce pojednává o studiu stability derivátu glycinu s NBD-Cl, což je derivatizační činidlo umožňující fluorescenční detekci pomocí HPLC. Cílem práce je určit, zda existují vhodné podmínky pro uchovávání derivatizovaných biologických vzorků po stabilizaci kyselinou chlorovodíkovou po dostatečně dlouhou časovou periodu. Tím tato práce navazuje na diplomovou práci Uhlářové (1), v níž byla zkoumána stabilita stejných derivátů za stejných podmínek ovšem bez stabilizace kyselinou chlorovodíkovou po derivatizaci. Z uvedené diplomové práce vyplývá, že stabilizace je nutným krokem. Má diplomová práce sloužit k ověření, že tento závěr Uhlářové byl správný.

2 Teoretická část

2.1 Glycin



Glycin je aminokyselina běžně se vyskytující v našem těle. Je nejjednodušší ze základních jedenadvaceti aminokyselin. Účastní se mnoha syntéz: kreatininu, glutathionu, porfyrínů, hemu, purínů, hippurátu, konjugátů žlučových kyselin a léčiv. Vzniká ze serinu specifickou hydroxymetyltransferázou (2). Fyziologicky působí jako inhibiční neurotransmitter v CNS (mícha, thalamická jádra, periaqueduktální šed') obdobně jako GABA (kyselina gama-aminomáselná) nebo acetylcholin. Specifické glycinové receptory jsou ionotropní. Glycin zvyšuje na subsynaptické membráně vodivost pro chloridové anionty. Membrány se tak hyperpolarizují a vzniká inhibiční postsynaptický potenciál. Po vyplavení je zpětně vychytáván. Strychnin, známý křečový jed, působí jako jeho inhibitor (3). Studium stability derivátů glycinu je proto důležité z hlediska proteinové determinace pro pochopení fyziologických funkcí v těle, případně při studiu patologických jevů a při farmakologické léčbě (4).

2.2 Neurotransmitery

Neurotransmitter je fyziologicky aktivní látka, která přenáší informace na synapsích. Uvolňuje se z presynaptické nervové buňky, difunduje synapsí k postsynaptickému neuronu a aktivuje tak receptory k rychlé odpovědi. Aktivace postsynaptických receptorů má za následek změnu elektrické aktivity v neuronu. Dojde-li ke snížení polarity membrány postsynaptického neuronu, vzniká excitační postsynaptický potenciál a vzruch může být veden k dalším synapsím. Pokud je výsledkem hyperpolarizace, vznikne inhibiční postsynaptický potenciál, který snižuje aktivitu postsynaptického neuronu.

Neurotransmitery jsou z presynaptického neuronu uvolňovány ze zásobních granulí exocytózou poté, co akční potenciál zprostředkuje membránu pro ionty sodíku a vápníku. Zvýšená koncentrace volných iontů kalcia indukuje uvolňování neuropřenašeče. Uvolňování se ukončí inaktivací napěťově řízených kalciových kanálů. Přenos je reverzibilní, neboť neurotransmitter je enzymaticky degradován, případně zpětně vychytáván. (3)

Dle chemické podstaty klasifikujeme neurotransmitery na:

-*aminokyseliny*: excitační: glutamát, aspartát

inhibiční: glycin, GABA

-*katecholaminy*: dopamin, noradrenalin, adrenalin

-*peptidy*: vasopresin, cholecystokinin, neuropeptid Y, oxytocin, somatostatin, tachykinin, opioidní peptidy

-*ostatní*: acetylcholin, histamin, puriny, serotonin, melatonin, oxid dusnatý

2.3 NBD-Cl

7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, $M_r = 199,6$

Stabilní světle žlutá pevná látka, $t_f = 97^\circ\text{C}$.

Připravuje se nitrací 4-chlorobenzofuranu získaného z 2,6-dichloranilinu přes dichlornitrobenzen. NBD-Cl je odolný vůči vlhkosti, rozpustný ve vodných roztocích a výhodný pro detekci a determinaci malých množství aminů a aminokyselin v podobě fluorescenčního derivátu. (5) Nitroskupina prokazatelně zintenzivňuje nejen fluorescenci, ale posunuje absorpční a emisní frekvence, což je poněkud neobvyklé.

2.4 Princip reakce

Reakce, která probíhá mezi glycinem a NBD-Cl, je bimolekulární nukleofilní substituce. (6)

Bimolekulární nukleofilní substituce je vedle substituce elektrofilní mechanismus typický pro aromáty. Určujícím krokem je vznik meziprojektu, případně jeho rozpad. Reakce nukleofilu s polarizovatelnými dvojnými vazbami alifatických systémů probíhá ve srovnání s aromatickými systémy ochotněji a rychleji.

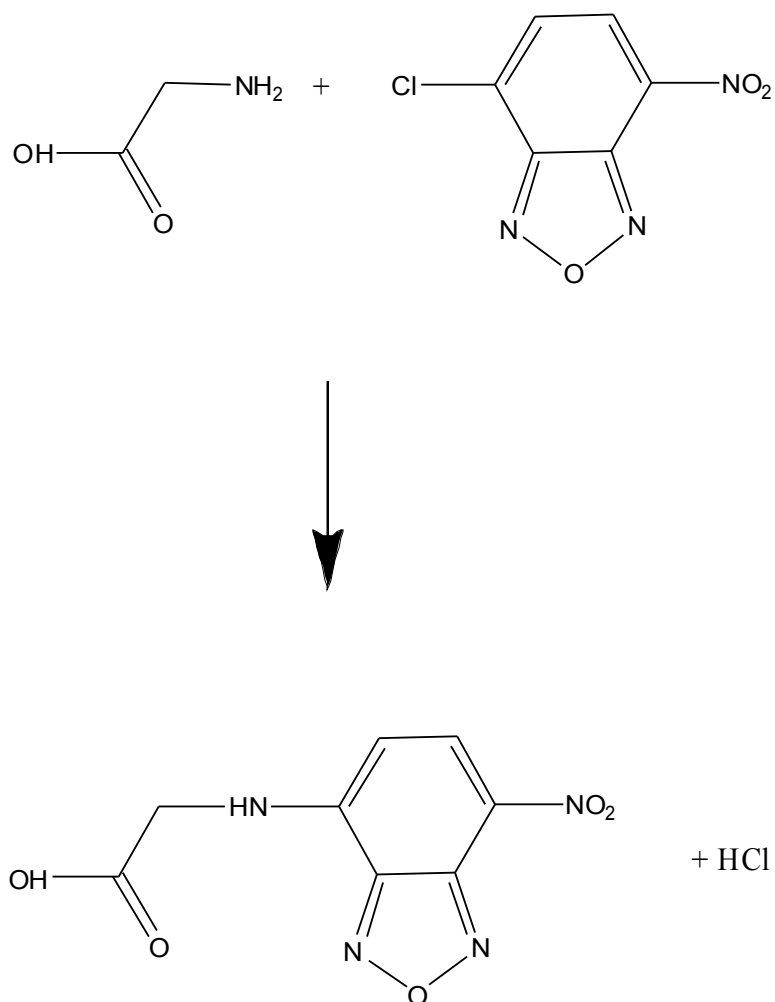
Substituce nukleofilní je čtyřelektronová záležitost. V prvním stupni se porušuje aromatický systém, kdy je nutná dostatečná polarizace aromatického systému, aby mohla reakce proběhnout potřebnou rychlostí. Méně bazická skupina je nahrazována skupinou bazičtější, například -Cl skupina je nahrazována skupinou -ArNH.

Prostředí je též významným faktorem z hlediska funkčních skupin. V aprotickém prostředí jsou malá záporně nabitá nukleofilní činidla mnohem reaktivnější oproti protickému, zatímco reaktivitu neutrálních činidel ovlivňuje prostředí poměrně málo.

Substituenty ovlivňují rychlost reakce. Lze to vyjádřit i kvantitativně. Na centrálním jádře je obvykle přítomno více substituentů, mezi kterými dochází k polární, popřípadě i sterické interakci, což ovlivňuje reakční centrum. Substituenty se záporným mezomerním efektem stabilizují intermediát přímou rezonancí s reakčním centrem.

Nukleofilní aromatická substituce je dvoustupňová reakce. Rychlost prvního stupně závisí na tom, zda odstupující skupina sníží elektronovou hustotu na aromatickém uhlíku, na kterém je vázána. Čím je snížení elektronové hustoty větší, tím ochotněji bude uhlík reagovat s nukleofilem a reakce bude v tomto stupni probíhat rychleji.

Množství energie potřebné k polárnímu štěpení vazby mezi aromatickým uhlíkem a odstupující skupinou (rozpadu intermediátu) je určující pro rychlost druhého stupně.



2.5 Příklad optimalizace reakčních podmínek

Na základě studia reakcí mezi lisinopilem (ACE inhibitor) a NBD-Cl byly navrženy standardní podmínky derivatizační reakce (7). Reaktanty poskytují žlutě zbarvený produkt s maximem absorpce na 470 nm. Odlišné experimentální parametry ovlivňují intenzitu zbarvení. Jejich studium umožnilo navržení optimálních reakčních podmínek.

1) *pH*: pH bylo měřeno v rozmezí 7,0-10,0 za použití borátového pufru. Maximum absorpce bylo při pH 9,0. NBD-Cl se v alkalickém prostředí hydrolyzuje a vzniká NBD-OH, který má maximum absorpce při 462 nm.

2) *Okyselení*: Před měřením bylo nutné okyselit reakční směs na pH 2,0 přidáním 0,2 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Za tohoto pH slepý pokus neukazuje žádné signifikantní absorpční pásy v rozmezí 420–500 nm.

3) *Teplota*: Vliv teploty byl studován v rozmezí 50–100°C pro různé časové periody. Bylo zjištěno, že zahřívání při relativně nižší teplotě po delší čas, dává reprodukovatelné výsledky. Zahřívání po dobu dvaceti minut při 60 °C poskytovalo adukt stabilní přibližně jeden a půl hodiny. Poté pomalu slábla intenzita jeho zbarvení (8).

4) *Koncentrace NBD-Cl*: Koncentrace NBD-Cl byla zkoumána v rozmezí 0,1 – 0,4%. Jako ideální bylo určeno $1,6 \pm 0,2$ ml NBD-Cl roztoku.

2.6 Derivatizační činidla (sondy)

Fluorescence, zvláště v kombinaci s HPLC je jednou z nejcitlivějších metod proteinové detekce.(9) Fluorescenční derivatizační činidla reagují s proteiny na N-konci řetězce. Proteiny mají nejméně dvě funkční skupiny, kde by se mohla uskutečnit derivatizace, tj. aminoskupinu a karboxylovou skupinu. Karboxylová skupina je méně aktivní a musí být před derivatizací nejprve aktivována. Je tudíž jen velmi vzácně užívána pro proteinové značení. Naproti tomu aminoskupina na N-konci je snadno derivatizovatelná.

Proteiny jsou trojrozměrné struktury, což činí některé aminoskupiny obtížně dosažitelné pro reagenty. Pouze primární nebo sekundární aminoskupiny mohou být snadno označeny. Žádná jiná spektroskopická technika není tak rozšířená mezi peptidy a proteiny

jako fluorescenční detekce proteinů separovaných za pomoci HPLC. V porovnání s jinými druhy spektrální detekce (UV) je evidentní vyšší citlivost. V poslední době však začíná fluorescenční detekci významně konkurovat MS detekce.

Při fluorescenční detekci jsou důležité dvě vlnové délky, a to sice excitační a emisní vlnová délka. Obě charakteristicky závisí na chemické struktuře fluorescenčního činidla.

Přestože fluorescence vydávaná z nativních proteinů může být intenzivní, ne všechny proteiny vydávají vhodný fluorescenční signál. Důraz se klade na správné označení proteinů. Při vhodném výběru reagentů (sond) mohou derivatizované proteiny emitovat intenzivnější fluorescence než aromatické skupiny proteinů.

NBD-Cl patří mezi činidla přednostně reagující se sekundární aminoskupinou oproti skupině primární. Na základě úspěchů s NBD-F 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazolu se otevřela cesta pro studium aktivity peptidů, potažmo proteinů na N-konci řetězce. (9)

Příklady dalších derivatizačních činidel pro aminoskupinu:

- 4-fenylspiro-[furan-2(3*H*),1-ftalan]-3,3'-dion (Floram)
- 5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonyl chlorid (Dansylchlorid)
- 1,2-naftochinon-4-sulfonová kyselina
- fluorenylmetylkarboxychlorid (Fmoc)

3. Experimentální část

Pro vlastní zkoumání studia stability derivátů glycinu s NBD-Cl za různých podmínek bylo nutné připravit si reakční směs. Směs sestává z těchto komponent:

1) glycin:

Zásobní roztok 2 mmol/l:

Navážili jsme 0,0154 g glycinu, rozpustili v destilované vodě, doplnili na 100 ml a z tohoto zásobního roztoku jsme připravili koncentrace 5 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 25 $\mu\text{mol/l}$.

2) 0,3% roztok NBD-Cl :

0,0298 g NBD-Cl jsme rozpustili v malém množství methanolu a doplnili po rysku 10 ml odměrné baňky.

3) Borátový pufr: Navážili jsme 0,6204 g H_3BO_3 , rozpustili jsme toto množství v destilované vodě a pH jsme upravili na předem nakalibrovaném pH-metru pomocí roztoku NaOH na 9,0. Odměrnou baňku jsme doplnili do objemu 100 ml.

3.1 Příprava reakční směsi

Do čtyř odměrných desetimililitrových baněk jsme napipetovali:

slepý vzorek: 2,5 ml vody

2,5 ml borátového pufru o pH 9,0

0,5 ml 0,3% roztoku NBD-Cl

vzorek o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ glycinu: 2,5 ml 5 $\mu\text{mol/l}$ roztoku glycinu
2,5 ml borátového pufru o pH 9,0
0,5 ml 0,3% roztoku NBD-Cl

vzorek o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ glycinu: 2,5 ml 10 $\mu\text{mol/l}$ roztoku glycinu
2,5 ml borátového pufru o pH 9,0
0,5 ml 0,3% roztoku NBD-Cl

vzorek o koncentraci 25 $\mu\text{mol/l}$ glycinu: 2,5 ml 25 $\mu\text{mol/l}$ roztoku glycinu
2,5 ml borátového pufru o pH 9,0
0,5 ml 0,3% roztoku NBD-Cl

Reakční směsi v odměrných baňkách jsme důkladně promíchali a vložili do 60°C teplé vodní lázně, kde jsme je protřepávali tři minuty. Poté jsme je vložili do ledové lázně a reakci jsme zastavili přidáním 20 μl koncentrované kyseliny chlorovodíkové.

Po zchladnutí jsme vzorky rozdělili do dvanácti vialek dle koncentrace a dle podmínek, za kterých jsme vzorky skladovali.

TS = teplo + světlo	(bílé vialky skladované za laboratorní teploty)
TT = teplo + tma	(vialky zabalené do alobalu skladované za laboratorní teploty)
TZ = zima + tma	(vialky zabalené do alobalu, skladované v chladicím boxu NS 600.3 VV Frigera při 2°C)

3.2 Příprava fosfátového pufru

Fosfátový pufr společně s acetonitrilem tvořil mobilní fázi. Připravili jsme jej navážením 3,40 g KH_2PO_4 , který jsme rozpustili přibližně v 950 ml superčisté vody. Pomocí předem nakalibrovaného pH-metru inoLab 720 s pH elektrodou Sentix 61 (WTW) jsme upravili kyselinou fosforečnou pH na 2,5. Kalibraci pH metru jsme provedli s využitím kalibračních pufrů TEP Trace (WTW) o hodnotách pH 4,01 a 7,00.

Roztok jsme převedli do tisícimililitrové odměrné baňky a doplnili superčistou vodou po rysku. Tento roztok jsme přefiltrovali pomocí filtračního zařízení (Supelco) s filtrem Nylon66 s póry o velikosti 0,45 μm (Supelco) za pomoci membránové vývěvy KNF, typu N810 fy KNF Neuberger. a převedli do neprůhledné litrové zásobní lahve.

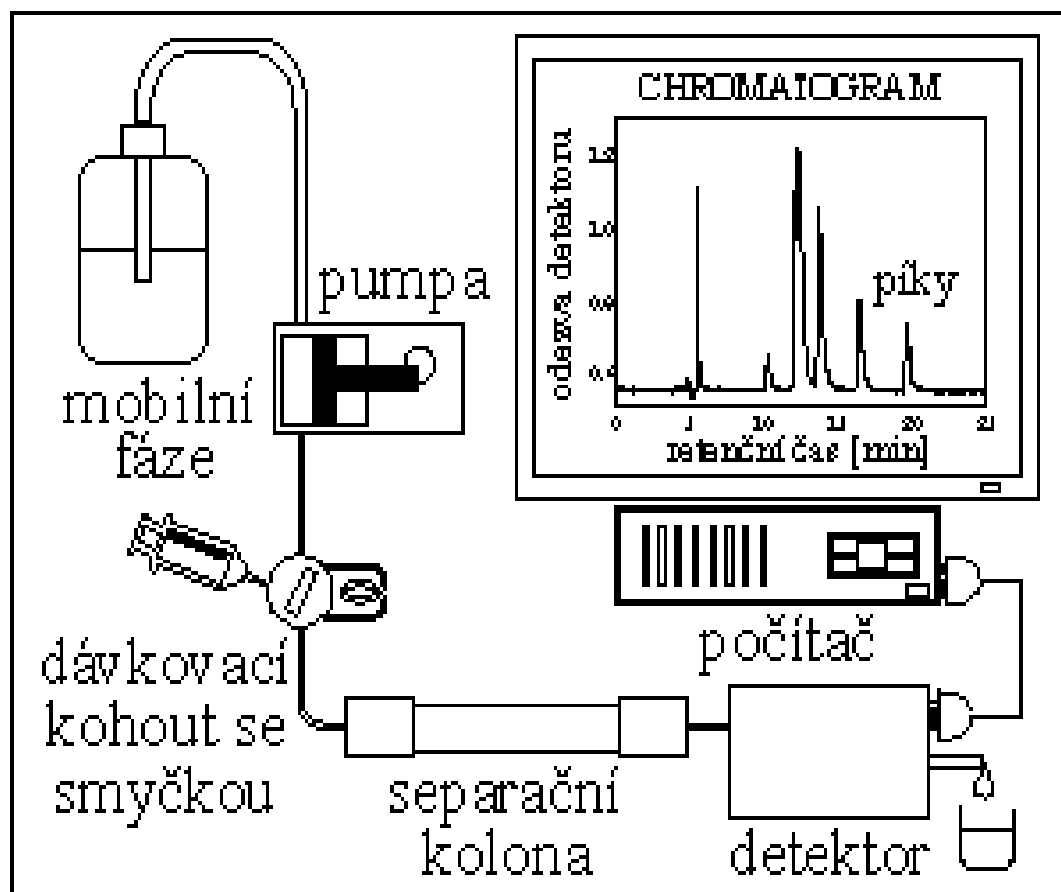
3.3 Vlastní měření

Jednotlivé vzorky jsem měřila na HPLC Shimadzu za pomoci fluorescenčního detektoru. Chromatograf sestával z těchto komponent:

- *Zásobníky mobilní fáze:* acetonitril, voda, methanol, pufr. Měřili jsme za následujících podmínek: mobilní fáze = fosfátový pufr +acetonitril 75:25 při průtoku 1 ml/min.
- *Čerpadlo:* kvaternární čerpadlo LC-10 ADVP vybavené mísičem mobilní fáze FCV 10-ALVP
- *Dávkovací zařízení:* manuální šesticestný ventil RHEODYNE 7125 s nástřikovou smyčkou 20 μ l. Používali jsme 50 μ l injekční stříkačku Hamilton.
- *Kolona:* Zorbax SB C18, 150x4,6 mm, zrnitost 5 μ m (Agilent Technologies)
- *Detektor:* fluorescenční RF-10-Axl, excitační vlnová délka 470 nm, emisní vlnová délka 535 nm
- *Vyhodnocovací zařízení:* Data stanice CSW 1,7 (Data Apex) pro sběr a vyhodnocování dat.

3.4 Schéma chromatografické sestavy

Obrázek 1: Schéma chromatografické sestavy (10)

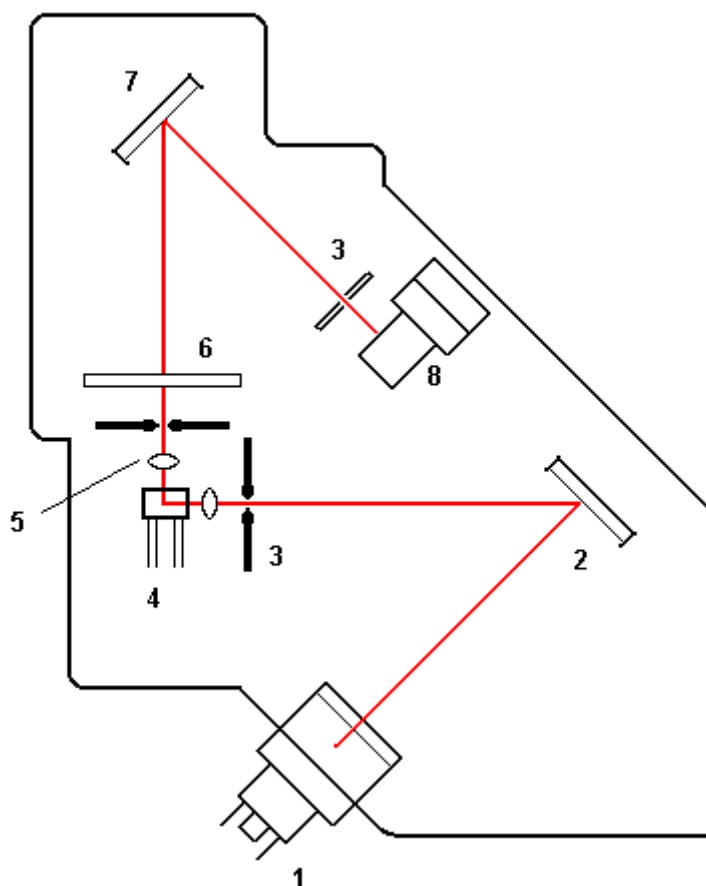


<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/images/obr21.gif>

3.5 Fluorescenční HPLC detektor

Fluorimetrické detektory pracují na principu fluorescence. Měří sekundární záření (emisní), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitační). Fotoluminiscence trvá obvykle 10^{-8} až 10^{-5} sekundy. Molekuly zkoumaných látek přecházejí pohlcením elektromagnetického záření ze základního stavu do vyšších vibračních hladin. S absorbovanou energií může excitovaná molekula naložit různým způsobem. Může ji opět vyzářit jako fluorescenci, přeměnit ji na energii vibrační nebo ji předat jiným molekulám. Tím se vrací molekula do základního vibračního stavu a následně emituje fluorescenční záření o stejné vlnové délce jako absorbované záření (rezonanční fluorescence) nebo častěji o větší vlnové délce emitovaného záření v důsledku vibrační relaxace.

[Obrázek 2: Schéma fluorescenčního detektoru](#)



http://www.hplc.cz/Teorie/Figure/FL_Detector.gif

1. výbojka (rtuťová nebo xenonová)
2. excitační mřížka (monochromátor)
3. štěrbina
4. průtoková cela
5. mikročočky
6. cut-off filtr
7. emisní mřížka (monochromátor)
8. fotonásobič

Fluorimetrické detektory jsou zkonstruovány tak, aby zachytily maximálního množství fluorescenčního záření vznikajícího v cele detektoru násobičem. Čidlo musí být chráněno před dopadem excitačního záření pomocí interferenčních filtrů a tím, že je násobič umístěn kolmo ke zdroji excitačního záření. Rozlišujeme fluorimetrické detektory jednoduché konstrukce. Ty jsou kombinací rtuťové výbojky a interferenčního filtru jako zdroje monochromatického excitačního záření a detekují fluorescenční záření současně při všech vlnových délkách po oddělení zbytku rozptýleného excitačního záření, a -fluorimetrické detektory moderní konstrukce, které umožňují nastavit délku excitačního i emitovaného záření použitím monochromátoru, současně lze programovat tyto vlnové délky v průběhu eluce k dosažení maximální citlivosti pro každou separovanou látku.

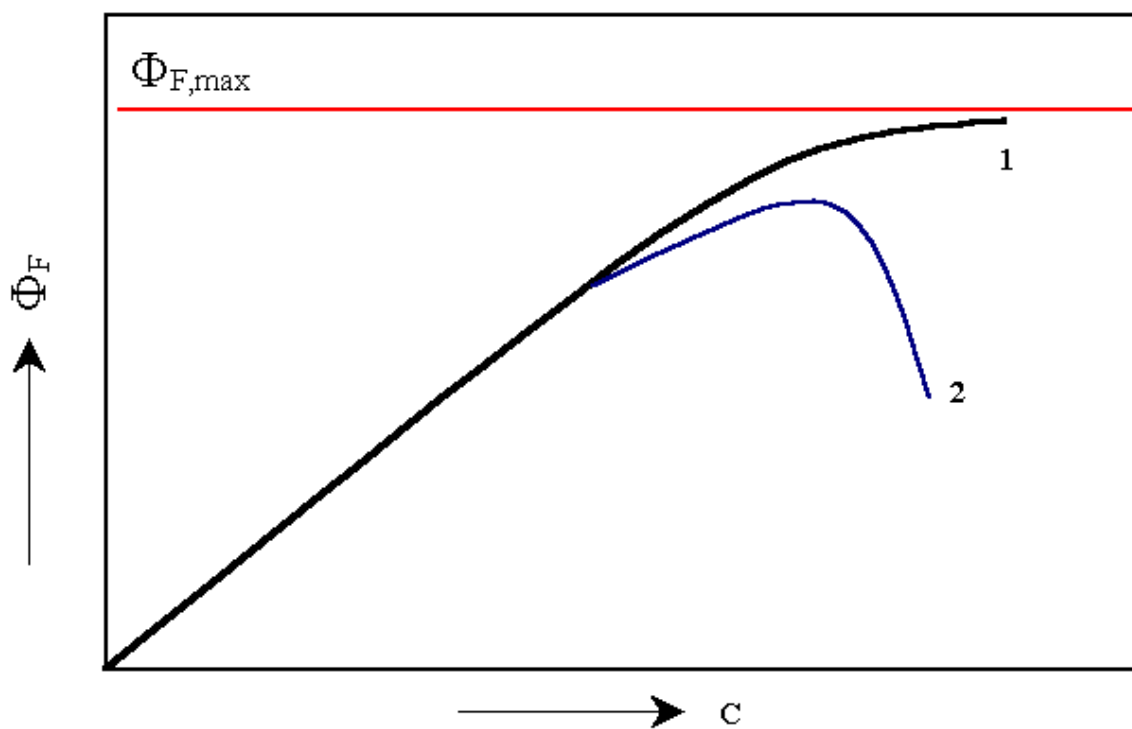
Fluorimetrické detektory umožňují měřit v průtokové kyvetě detektoru excitační fluorescenční spektra při konstantní vlnové délce emitovaného fluorescenčního záření, nebo emisní fluorescenční spektra při nastavené vlnové délce excitačního záření. Měření spekter se uskutečňuje buď v systému "stop-flow" nebo u některých detektorů i bez zastavení toku mobilní fáze a jsou pak obdobou detektorů s diodovým polem (11).

Závislost mezi intenzitou fluorescence a koncentrací fluoreskující látky vystihuje přibližný vztah:

$$\Phi_F \approx k\Phi_0 \cdot 2,3\epsilon_\lambda cl$$

Platí pro nízké koncentrace fluoreskující látky a tehdy, je-li vrstva roztoku (l) dostatečně tenká. Závislost mezi fluorescenčním tokem FF a koncentrací fluoreskující látky popisuje následující graf. Z něho je patrné, že křivka je lineární pouze v nízkých oblastech koncentrace c, se zvětšující se koncentrací c se asymptoticky blíží hodnota fluorescenčního toku hodnotě FF_{\max} .

Obrázek 3: Závislost fluorescence na koncentraci fluoreskující látky



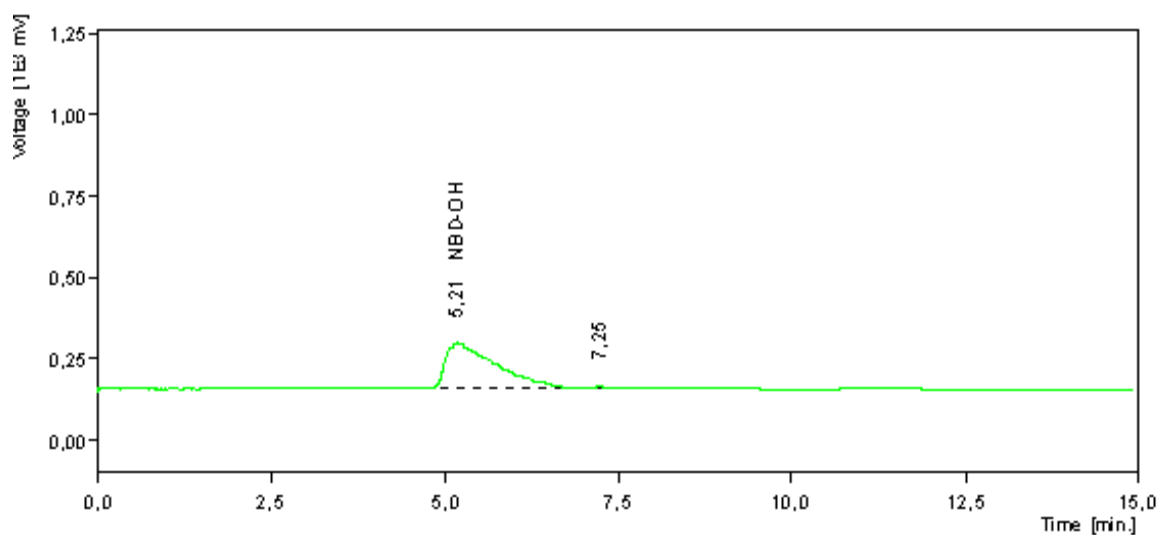
http://www.hplc.cz/Teorie/Figure/FL_fluorescence.gif

4. Výsledky a diskuse

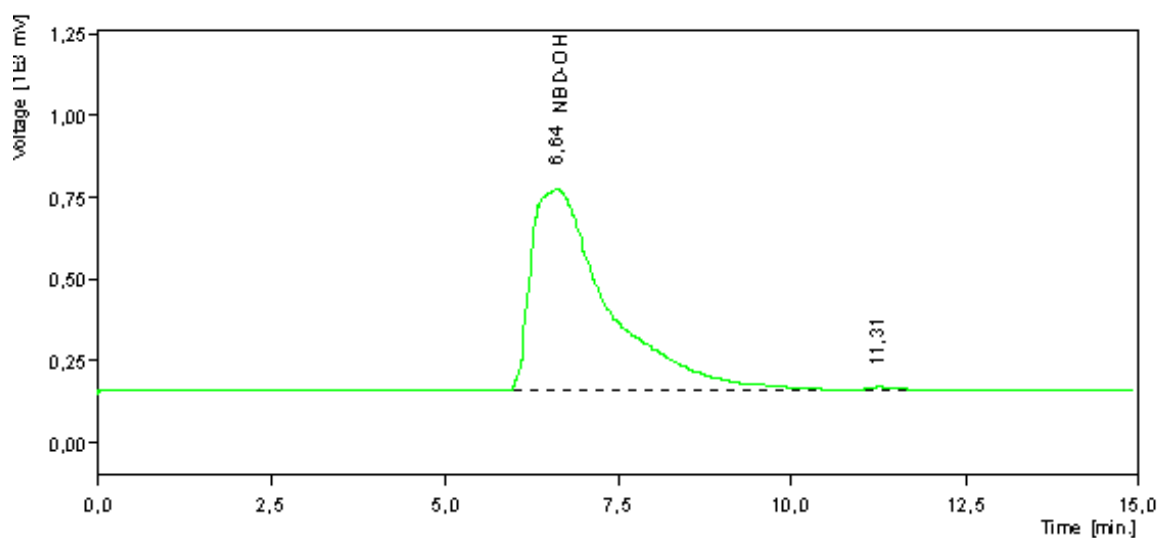
Chromatografická měření jsme prováděli u každého vzorku za zadaných podmínek (teplo a světlo, teplo a tma, tma a chlad) celkem devětkrát. Odstup mezi měřeními byl vždy jeden týden.

Následující chromatogramy jsou reprezentativním vzorkem z početného množství získaných dat, na základě kterých jsme vyvodili závěry týkající se studia stability derivátů glycinu s NBD-Cl.

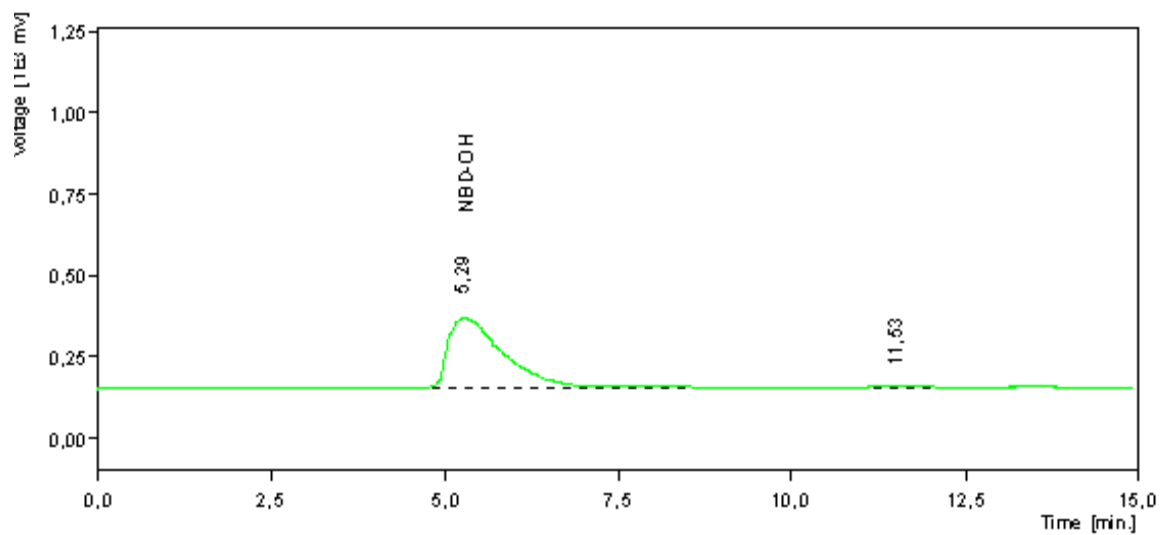
Obrázek 4: slepý pokus, teplo světlo, 1. týden



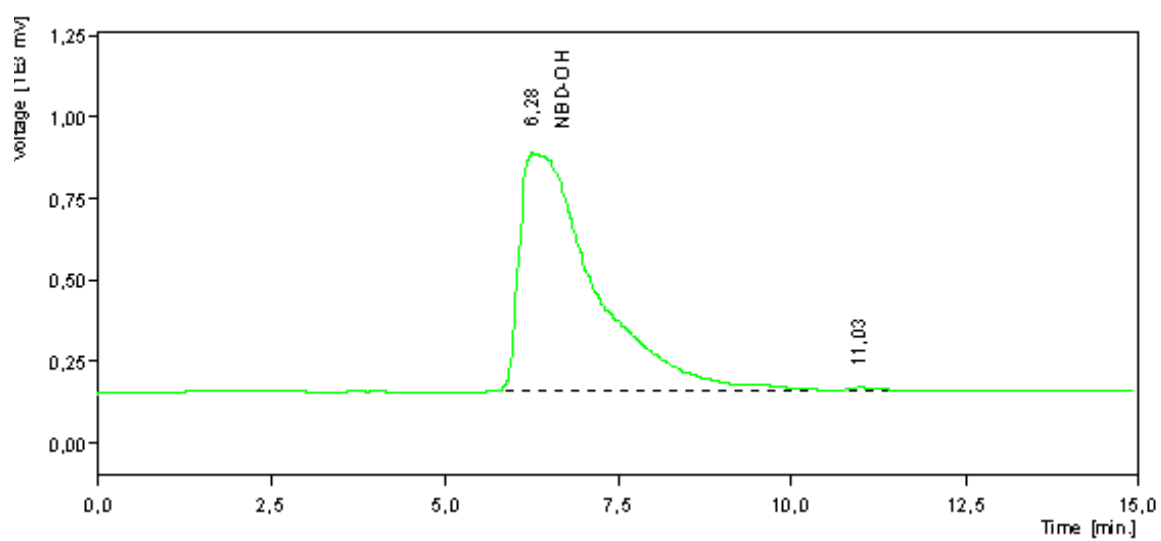
Obrázek 5: slepý pokus, teplo světlo, 9. týden



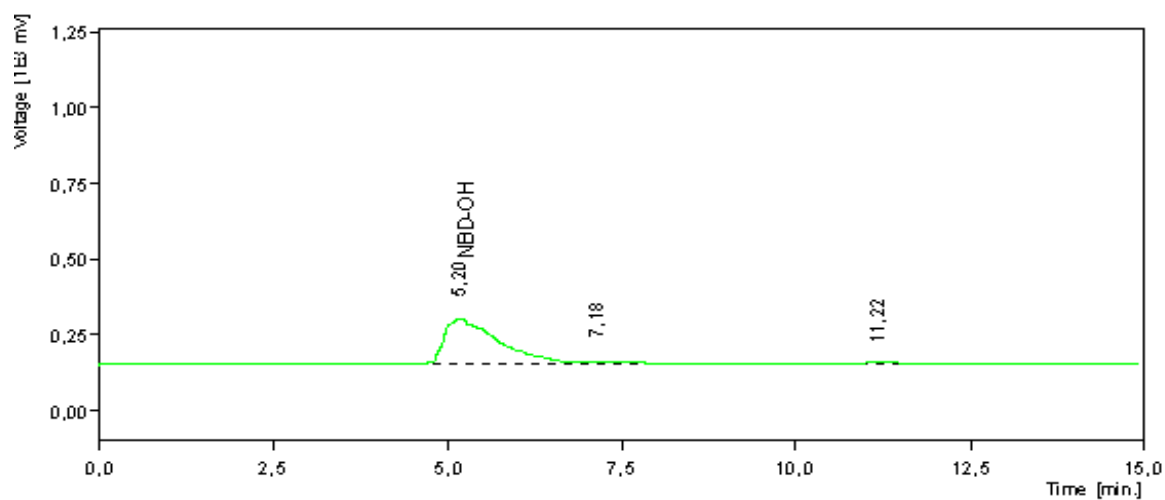
Obrázek 6: slepý pokus, teplo tma, 1.týden



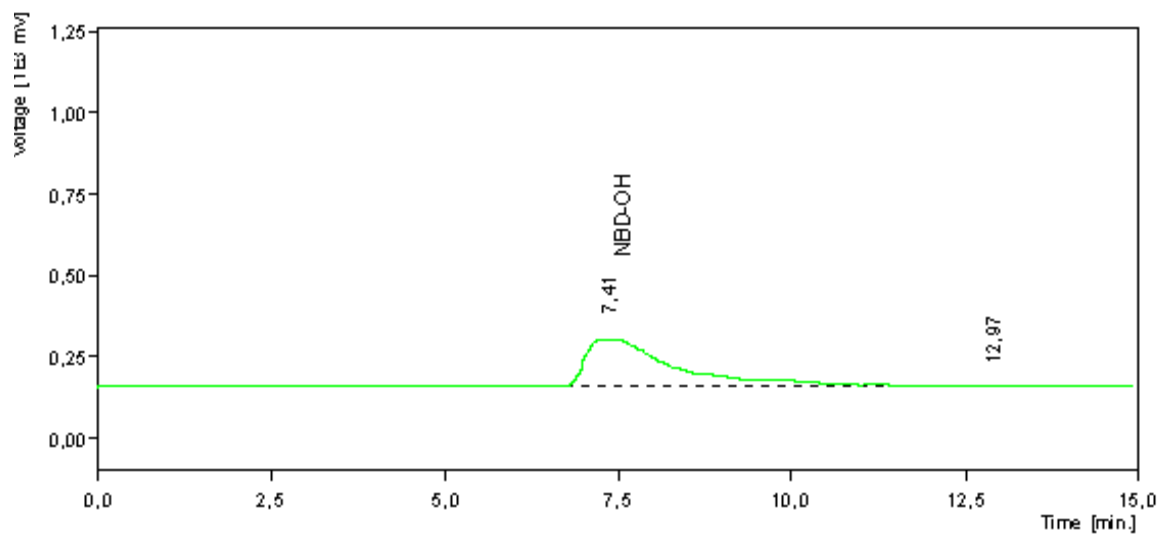
Obrázek 7: slepý pokus, teplo tma, 9.týden



Obrázek 8: slepý pokus, tma zima, 1.týden

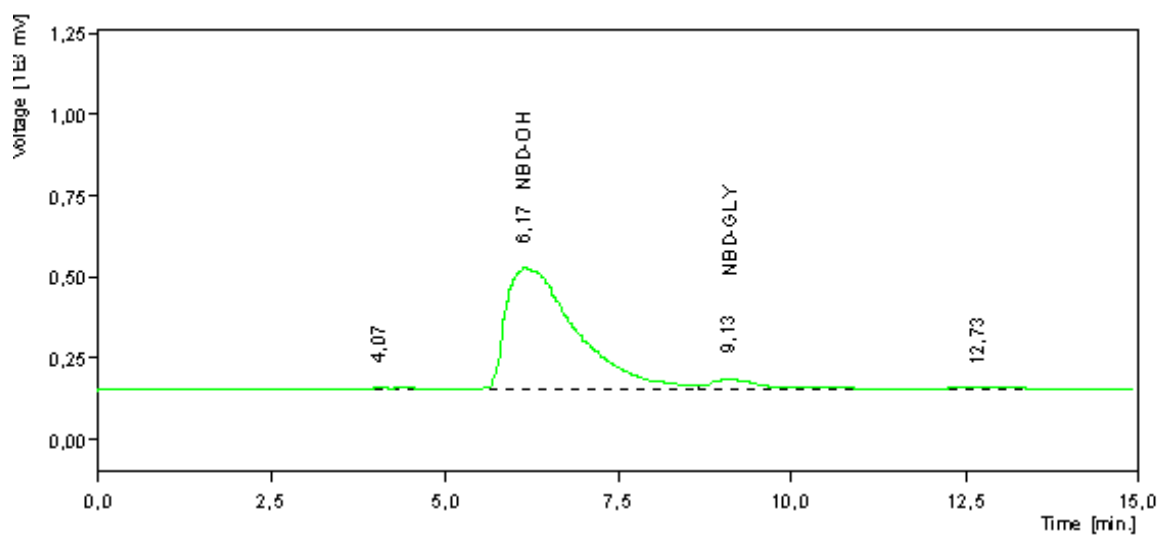


Obrázek 9: slepý pokus, tma zima, 9. týden

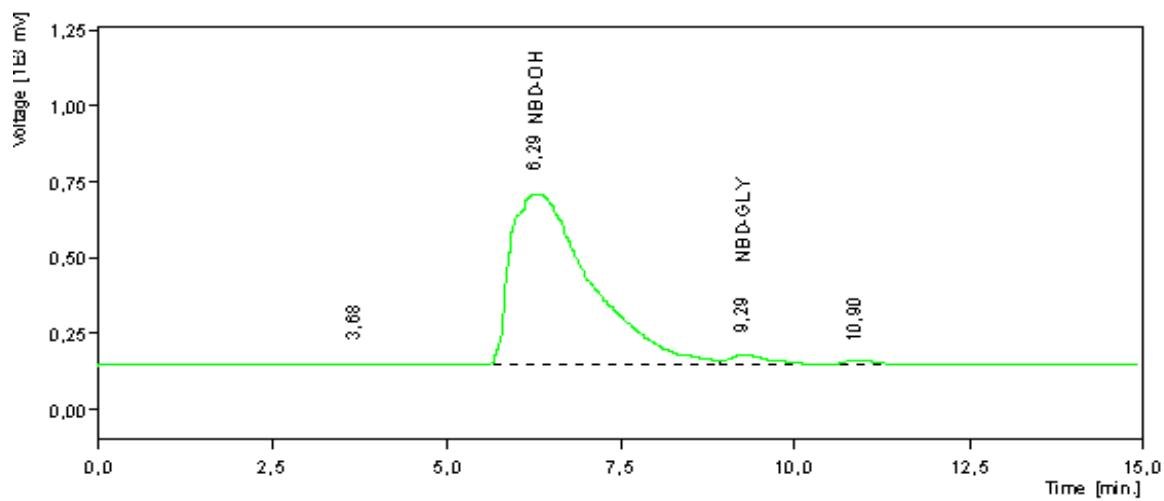


Chromatogramy vzorků skladovaných za laboratorní teploty bez přístupu světla

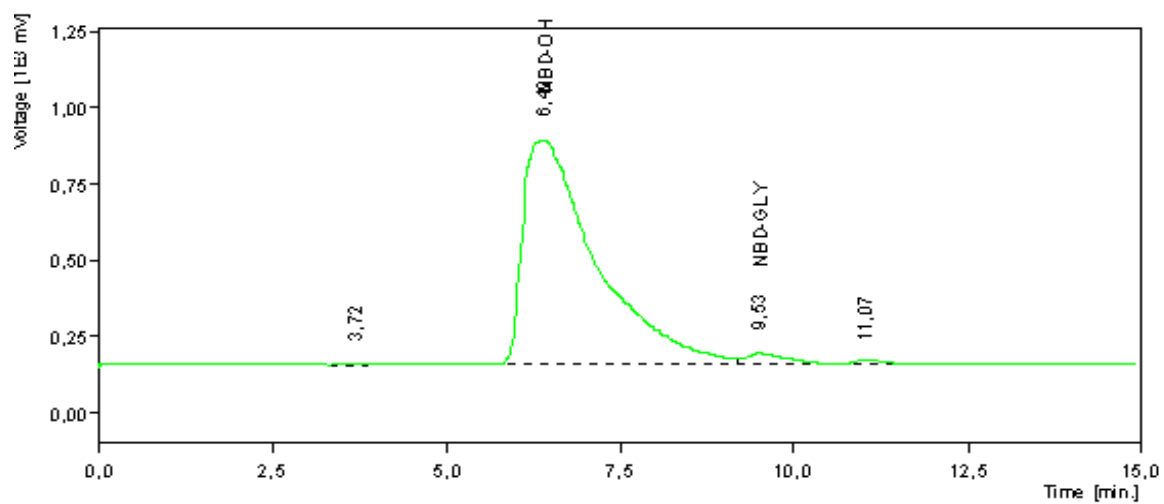
Obrázek 10: teplo tma, koncentrace 5 $\mu\text{g/l}$, 2. týden



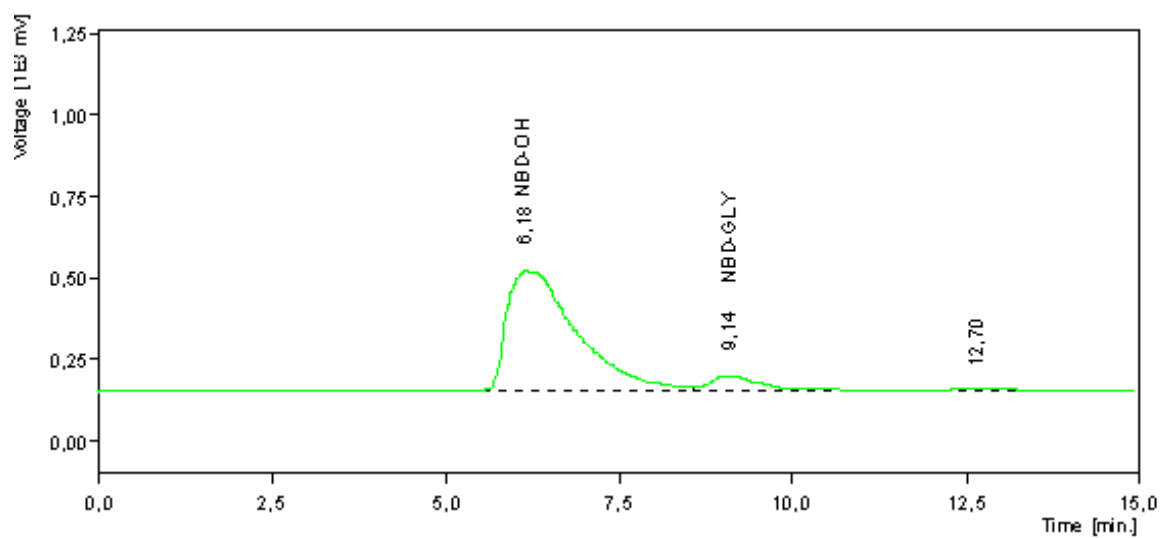
Obrázek 11 : teplo tma, koncentrace 5 $\mu\text{g/l}$, 6. týden



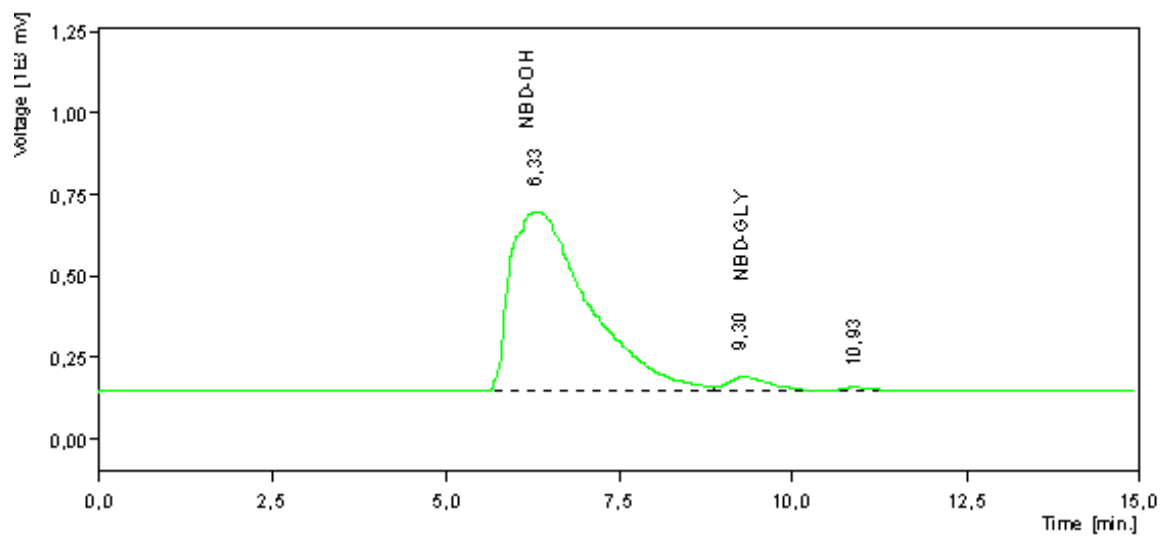
Obrázek 12: teplo tma, koncentrace 5 $\mu\text{g/l}$, 8.týden



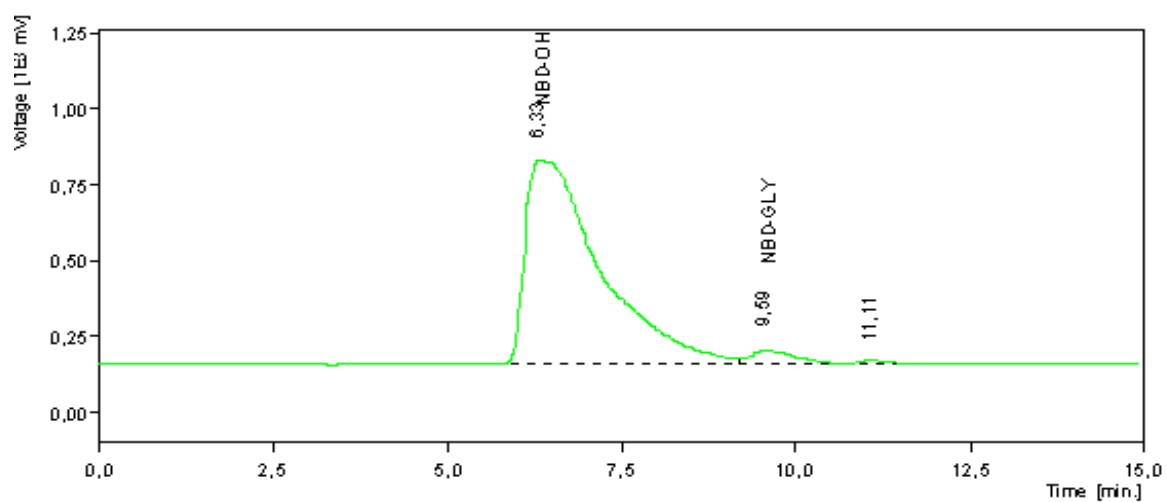
Obrázek 13: teplo tma, koncentrace 10 $\mu\text{g/l}$, 2. týden



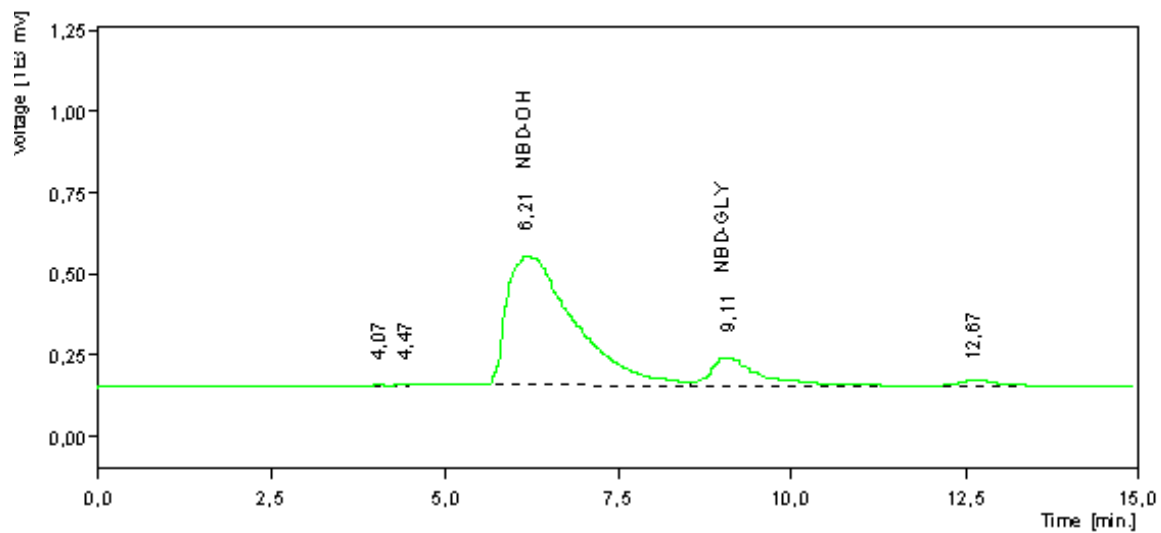
Obrázek 14: teplo tma, koncentrace 10 µg/l, 6. týden



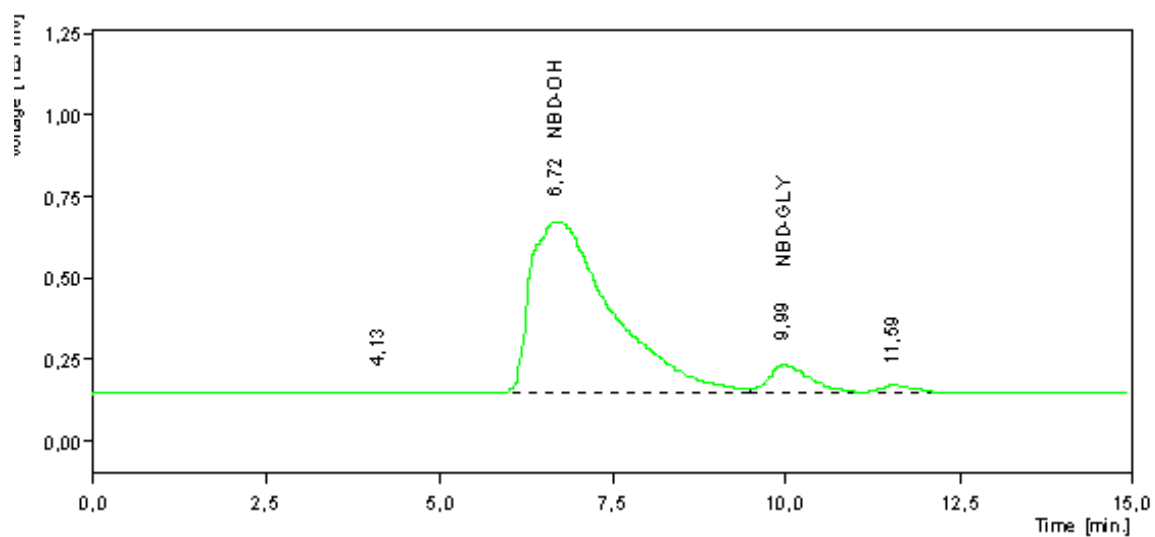
Obrázek 15: teplo tma, koncentrace 10 µg/l, 8. týden



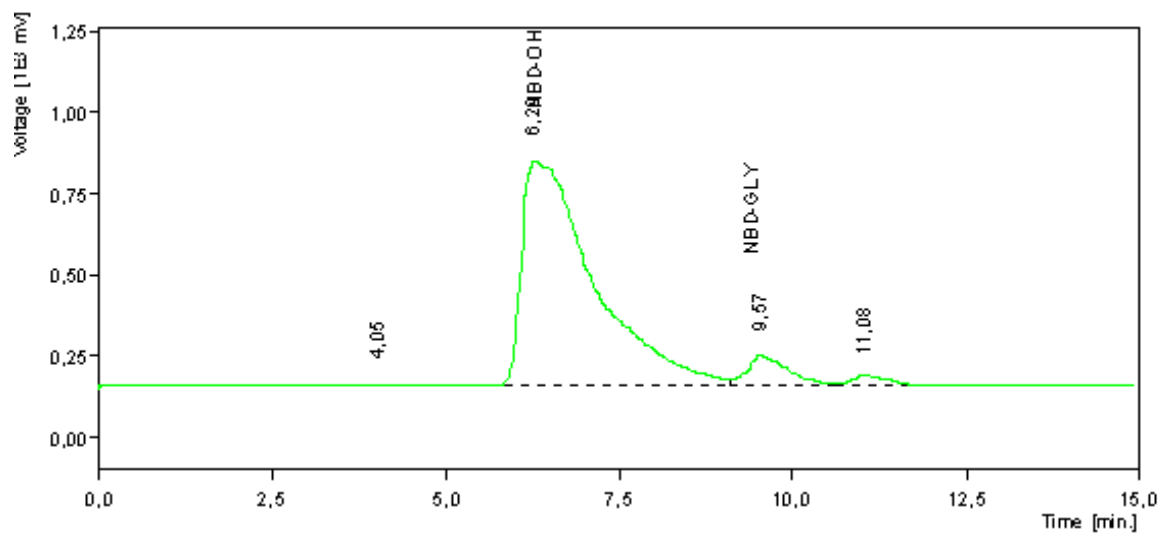
Obrázek 16: teplo tma, koncentrace 25 µg/l, 2.tyden



Obrázek 17: teplo tma, koncentrace 25 µg/l, 6. týden

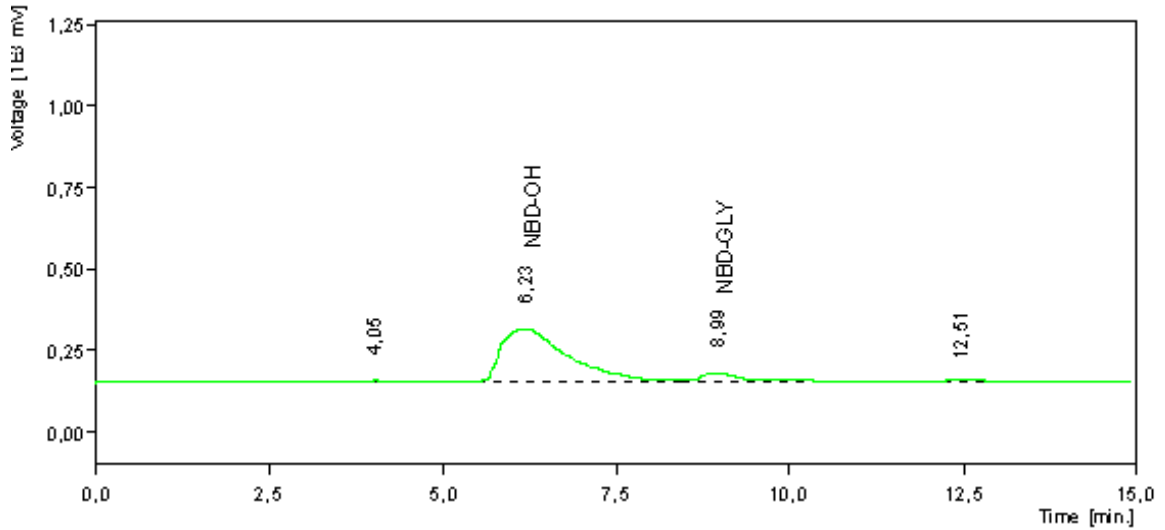


Obrázek 18: teplo tma, koncentrace 25 µg/l, 8. týden

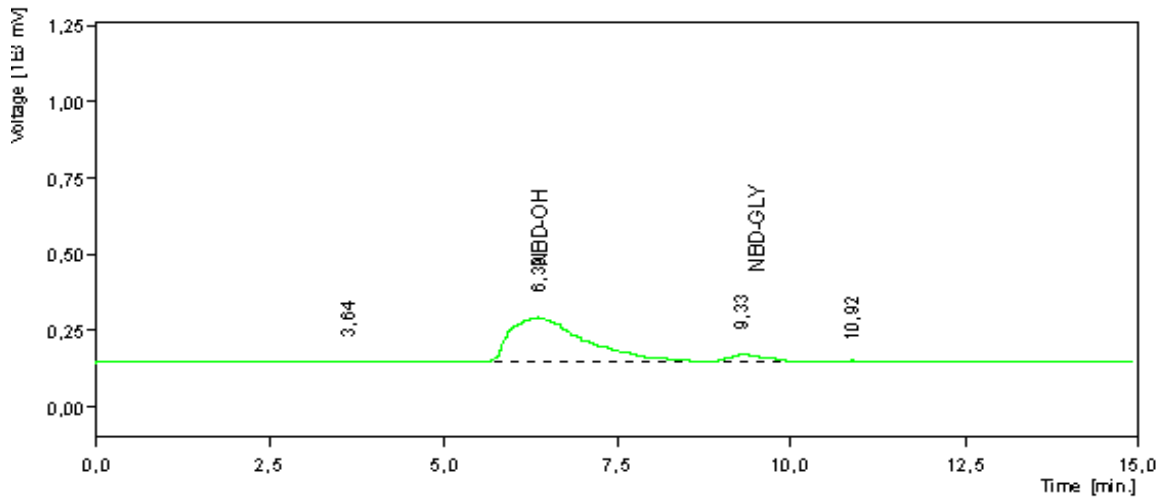


Chromatogramy vzorků skladovaných za snížené teploty bez přístupu světla

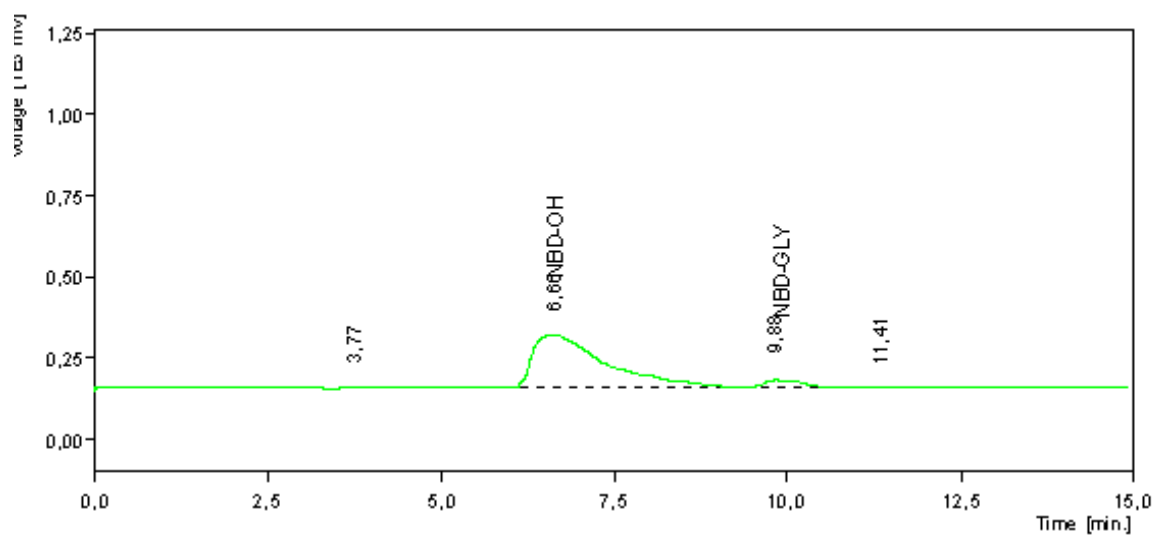
Obrázek 19: tma zima, koncentrace 5 µg/l, 2.týden



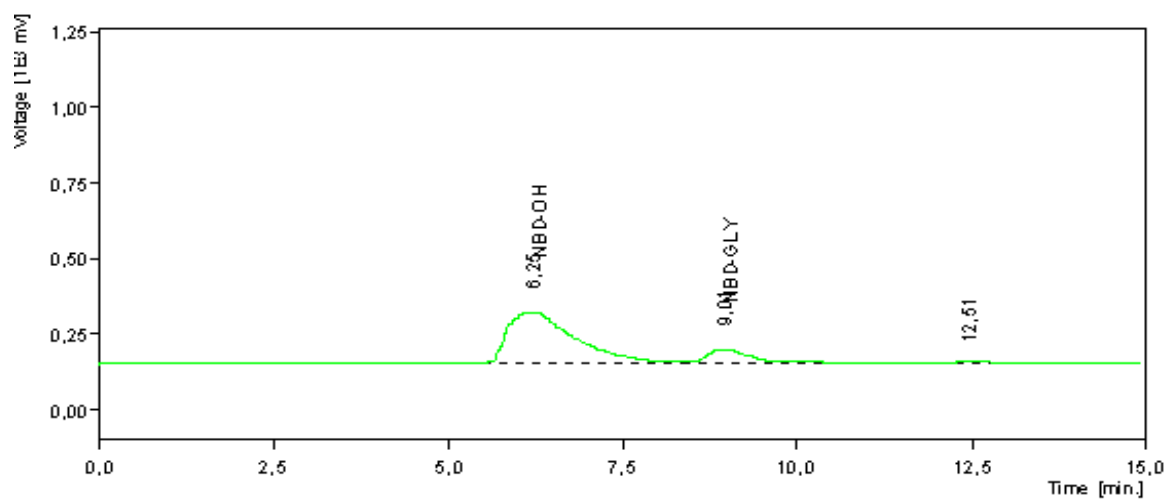
Obrázek 20: tma zima, koncentrace 5 µg/l, 6.týden



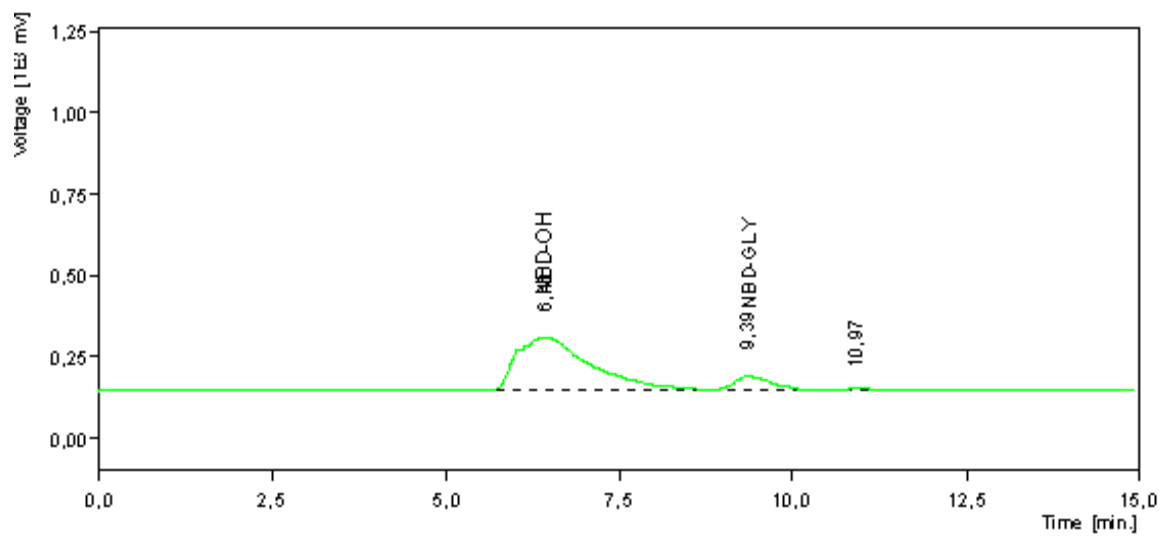
Obrázek 21: tma zima, koncentrace 5 µg/l, 8.týden



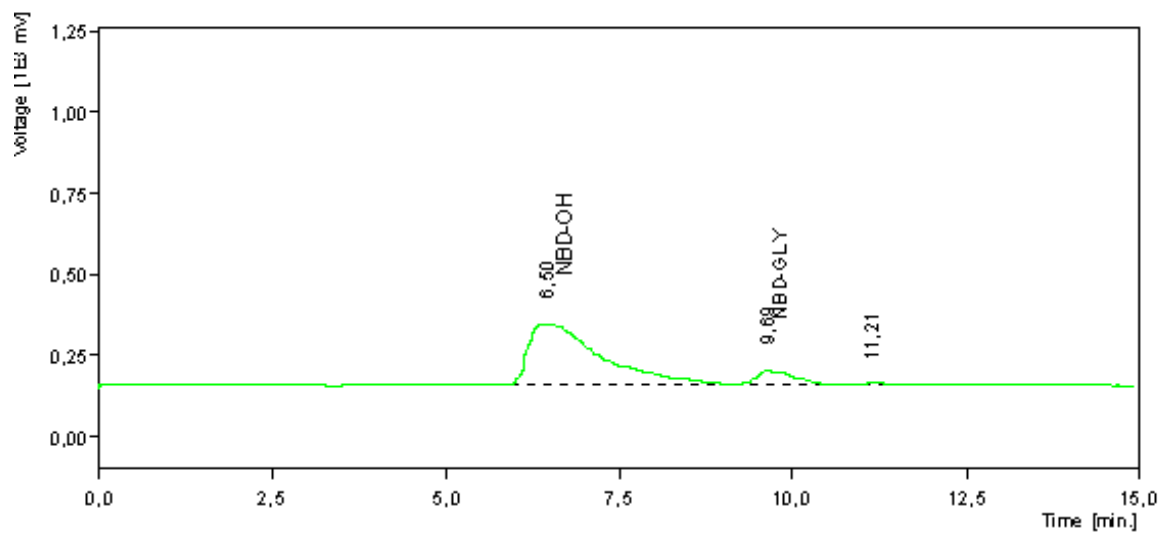
Obrázek 22: tma zima, koncentrace 10 µg/l, 2.týden



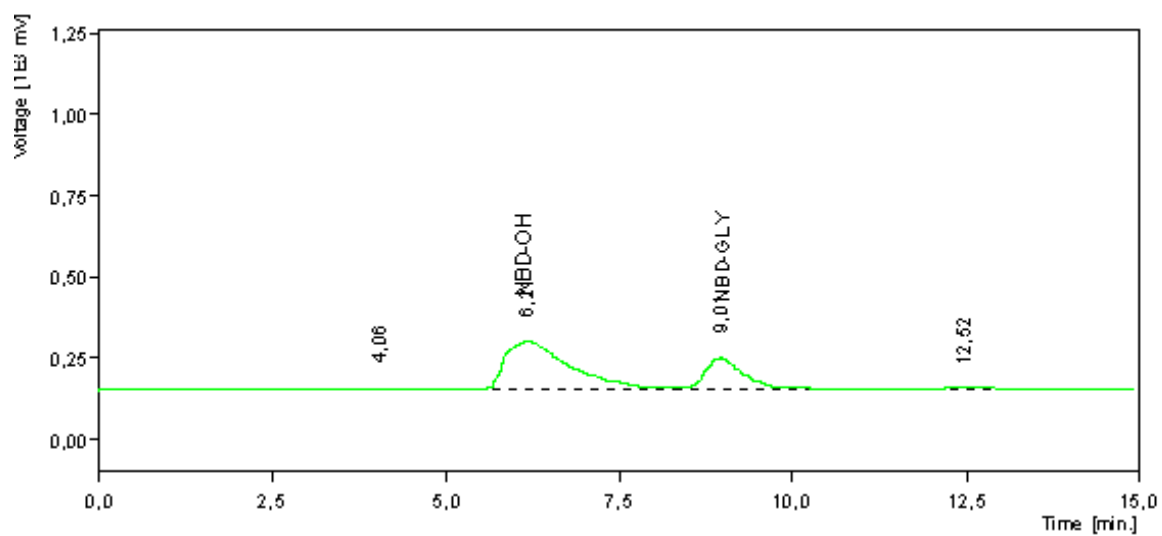
Obrázek 23: tma zima, koncentrace 10 µg/l, 6. týden



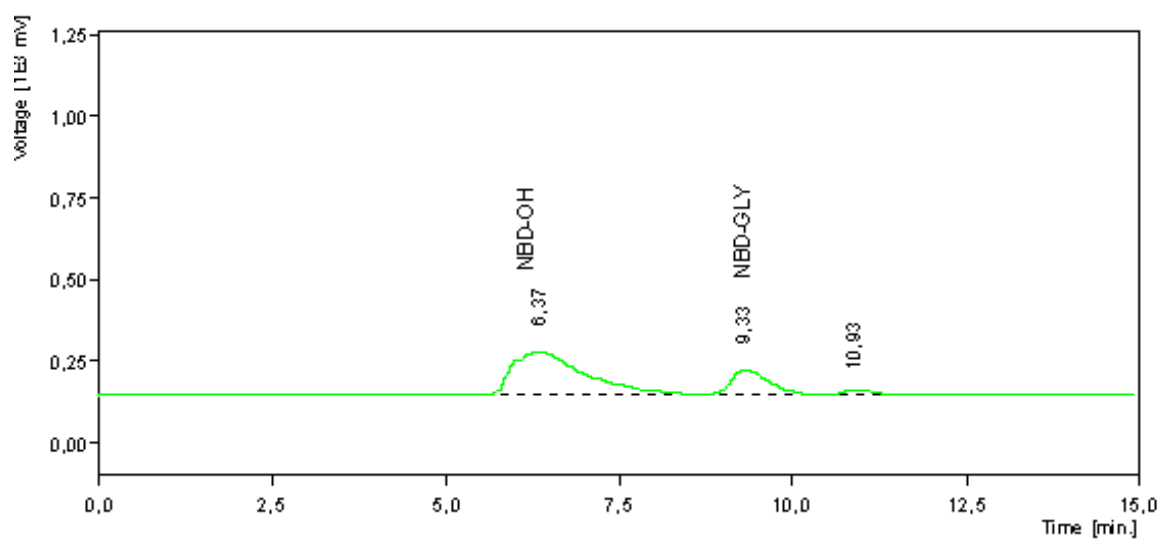
Obrázek 24: tma zima, koncentrace 10 µg/l, 8. týden



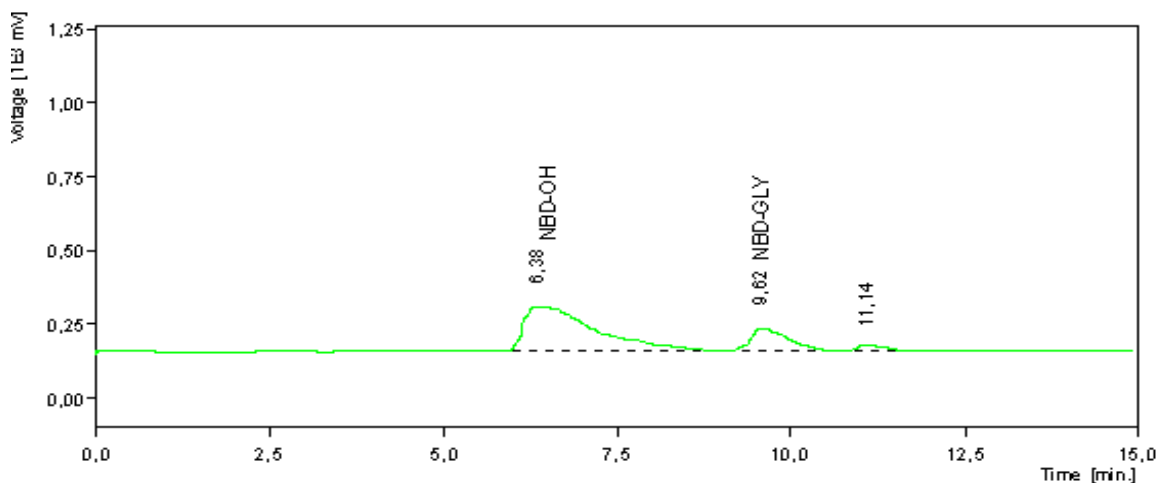
Obrázek 25: tma zima, koncentrace 25 µg/l, 2.týden



Obrázek 26: tma zima, koncentrace 25 µg/l, 6.týden



Obrázek 27: tma zima, koncentrace 25 µg/l, 8.týden



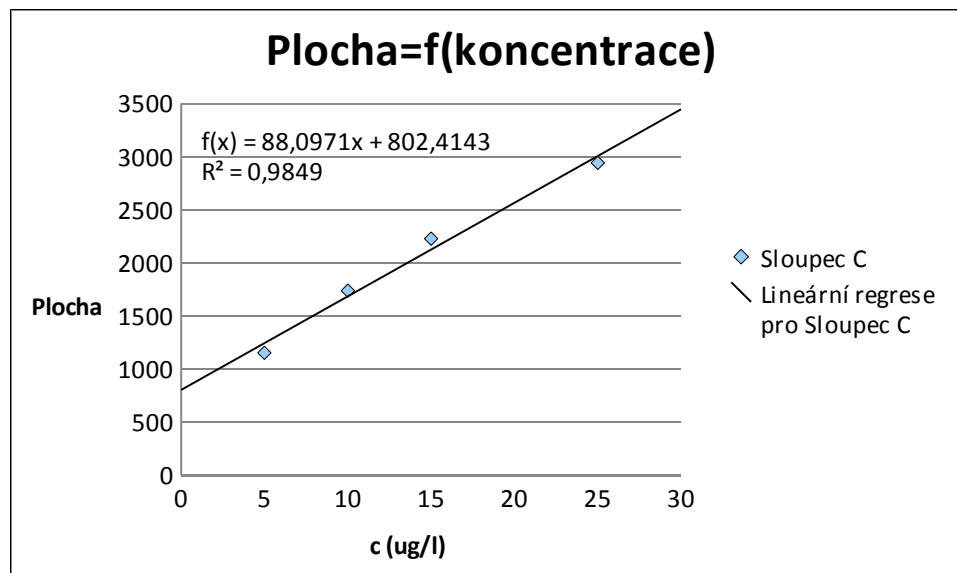
Obrázky 4-9 zachycují chromatogramy slepých vzorků dle jednotlivých podmínek vždy v prvním a devátém týdnu. Na každém chromatogramu je patrný pík NBD-OH.

Obrázky 10-18 zachycují chromatogramy vzorků sledovaných za laboratorní teploty bez přístupu světla vždy v druhém, šestém a osmém týdnu u každé ze tří sledovaných koncentrací.

Obdobně obrázky 19-27 znázorňují chromatogramy vzorků sledovaných při teplotě 2 °C bez přístupu světla opět u každé z měřených koncentrací vždy v druhém, šestém a osmém týdnu.

Z chromatogramů jsme odečetli hodnoty ploch píků. Na základě kalibrační křivky (obr. 28) jsme dosazením do vzorce spočítali koncentrace jednotlivých vzorků v průběhu měření. Kalibrační křivku jsme sestavili na základě průměrných hodnot dvou měření.

Obrázek 28 : Kalibrační přímka



Tabulka 1: Naměřené koncentrace u vzorků, které měly původní koncentraci 5 µg/l

5 µg/l	1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	5. týden	6. týden	7. týden	8. týden	9. týden
teplo, světlo	1,6	0,8	4,3	3,5	4,5	4,1	2,3	2,5	1,3
teplo, tma	5,2	9,1	9,5	10,1	11,3	7,7	9,5	10,6	12,6
tma, zima	5,0	5,7	7,9	7,2	6,5	3,7	3,4	4,4	5,2

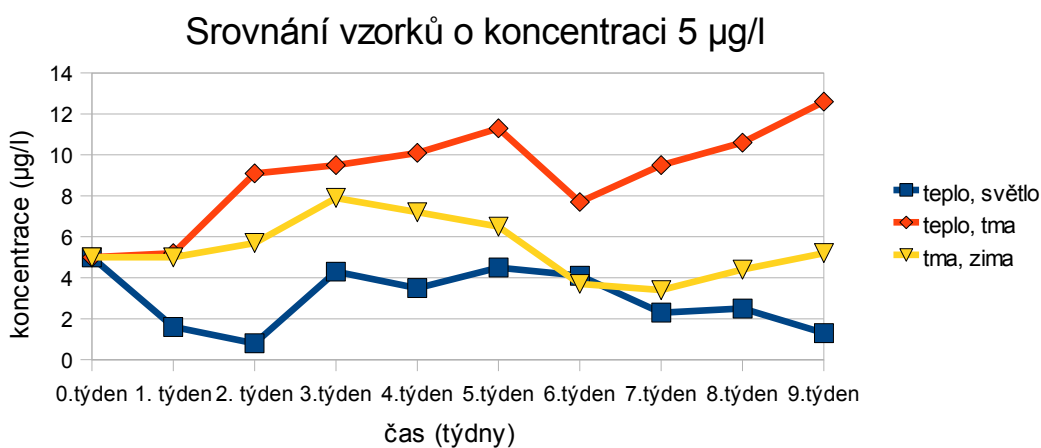
Tabulka 2: Naměřené koncentrace u vzorků, které měly původní koncentraci 10 µg/l

10 µg/l	1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	5. týden	6. týden	7. týden	8. týden	9. týden
teplo, světlo	5,3	6,2	8,4	8,0	6,9	6,2	5,1	5,1	3,3
teplo, tma	12,3	18,9	19,9	20,9	14,5	14,4	15,8	16,1	18,4
tma, zima	14,3	17,1	19,7	19,7	21,4	12,1	11,3	13,9	17,2

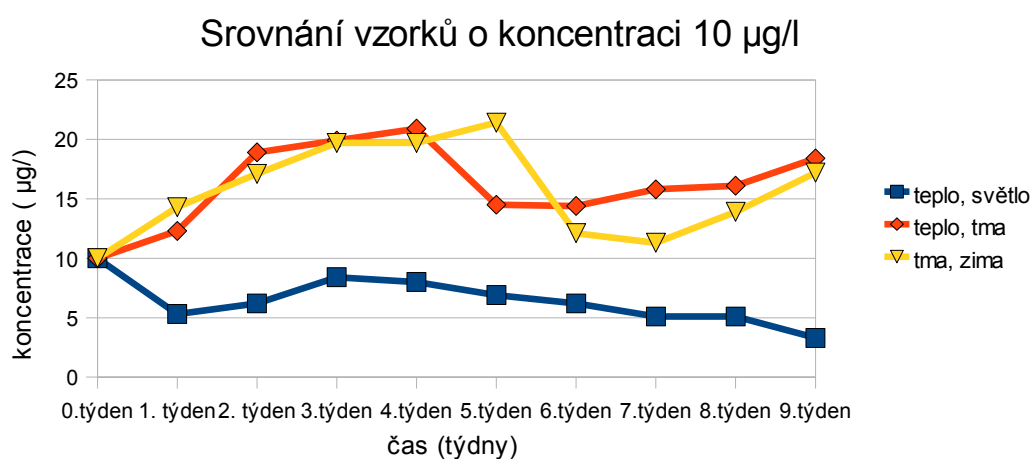
Tabulka 3: Naměřené koncentrace u vzorků, které měly původní koncentraci 25 µg/l

25 µg/l	1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	5. týden	6. týden	7. týden	8. týden	9. týden
teplo, světlo	19,8	17,0	22,8	17,3	15,9	17,3	15,8	19,8	22,0
teplo, tma	29,5	39,5	43,4	40,0	32,5	32,8	32,0	35,8	44,4
tma, zima	30,6	36,2	36,6	37,6	40,6	25,8	23,8	27,4	27,5

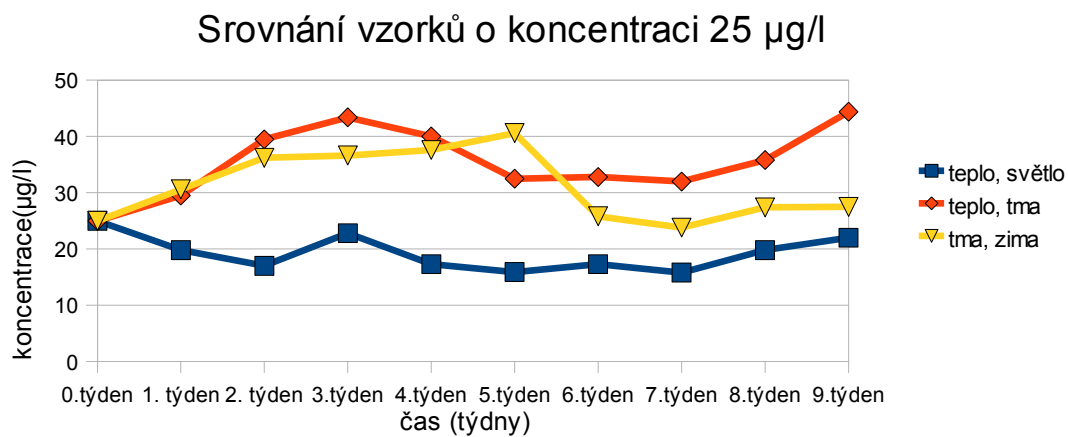
Obrázek 29: Srovnání vzorků o koncentraci 5µg/l



Obrázek 30: Srovnání vzorků o koncentraci 10µg/l



Obrázek 31: Srovnání vzorků o koncentraci 25 $\mu\text{g/l}$



Grafy zobrazují změnu počáteční koncentrace, která byla pro všechny vzorky stejná a kterou jsme chromatograficky ověřili dle sledovaných podmínek.

Z tabulek 1–3 a následně grafů je patrné, že vzorky skladované na světle za laboratorní teploty vykazují oproti oběma sériím vzorků skladovaných za odlišných podmínek zřetelně nižší koncentrace.

Série vzorků skladovaných bez přístupu světla a to za laboratorní teploty respektive při 2 °C vykazují podobné koncentrace, přičemž se zdá, že vzorky skladované za laboratorní teploty bez přístupu světelných paprsků vykazují nepatrně vyšší koncentrace.

Je vidět, že paradoxně nejstabilněji, pokud jde o udržení stále koncentrace, se chovaly vzorky uchovávané na světle a v teple, nicméně zjištěné koncentrace jsou nižší. Je to dáno tím, že světlo rozkládá NBD-Gly. Je však neočekávané, že rozkladné působení světla se dominantně projevilo v prvním týdnu. Pak je již tento vliv sporný.

U vzorků uchovávaných ve tmě koncentrace nejprve stoupala, poté klesla, ale pak začala opět pozvolna stoupat. Degradace NBD-Gly nastala u vzorků, kterým se nedostávalo světla, později, což se projevilo poklesem koncentrace zhruba v šestém týdnu. Vzestup koncentrací NBD-Gly během prvních cca pěti týdnů měření je překvapující skutečností. Vysvětlení této skutečnosti je obtížné, protože vzorky byly stabilizovány kyselinou chlorovodíkovou, která měla zastavit derivatizační reakci. Je možné se domnívat, že v reakční směsi došlo k tvorbě nějakých fluoreskujících látek, které při HPLC analýze eluovaly společně s NBD-Gly nebo byla použita stabilizace z nějakého důvodu nedostatečná.

Z chromatogramů je rovněž patrné, že píky nesplňují ideální představy o své podobě. Rozlišení je dobré, avšak faktor symetrie není optimální. Proto jsme zkusili modelové vzorky zanalyzovat i za jiných podmínek chromatografické analýzy.

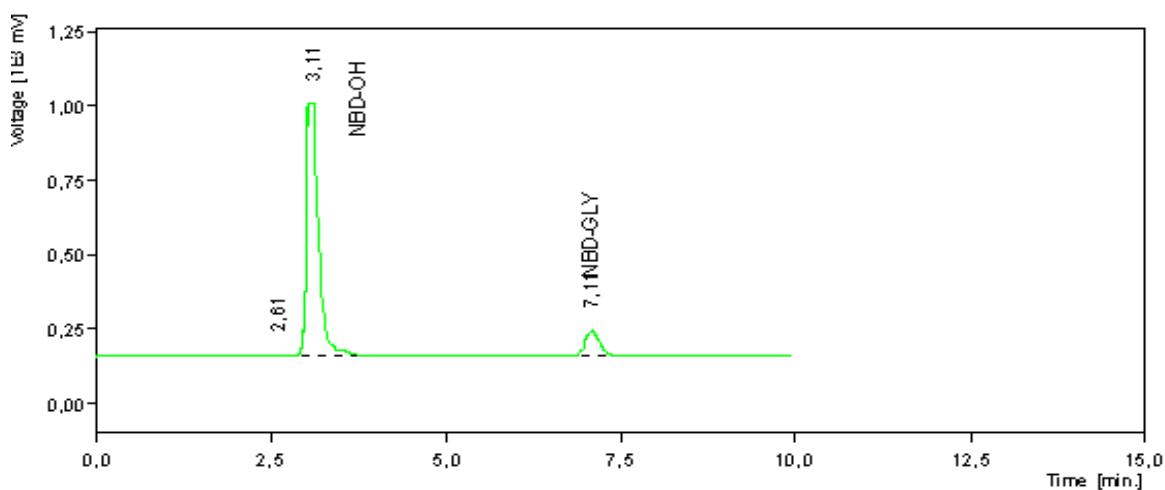
Kromě dihydrogenfosforečnanového pufru (pH 2,5) jsme vyzkoušeli i hydrogenfosforečnanový pufr (pH 7,0) a to v kombinaci jak s acetonitrilem, tak s methanolem v poměru 75:25. Pro zjednodušení jsme použili vzorky skladované při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Acetonitril poskytl pěkné symetrické píky NBD-OH, avšak retenční čas NBD-Gly byl příliš dlouhý. Methanol se neosvědčil.

V druhé fázi jsme změnili kolonu-Atlantis T3 (Waters) o rozměrech 4,6x150 mm plněnou sférickými částicemi o velikosti 5µm a opět jsme sledovali vzorky v kombinaci acetonitril, methanol, difosforečnanový (pH 3,0) a hydrogenfosforečnanový pufr (pH 7,0), tentokrát v poměru 70:30. Kolona Zorbax, kterou jsme používali během našeho měření je

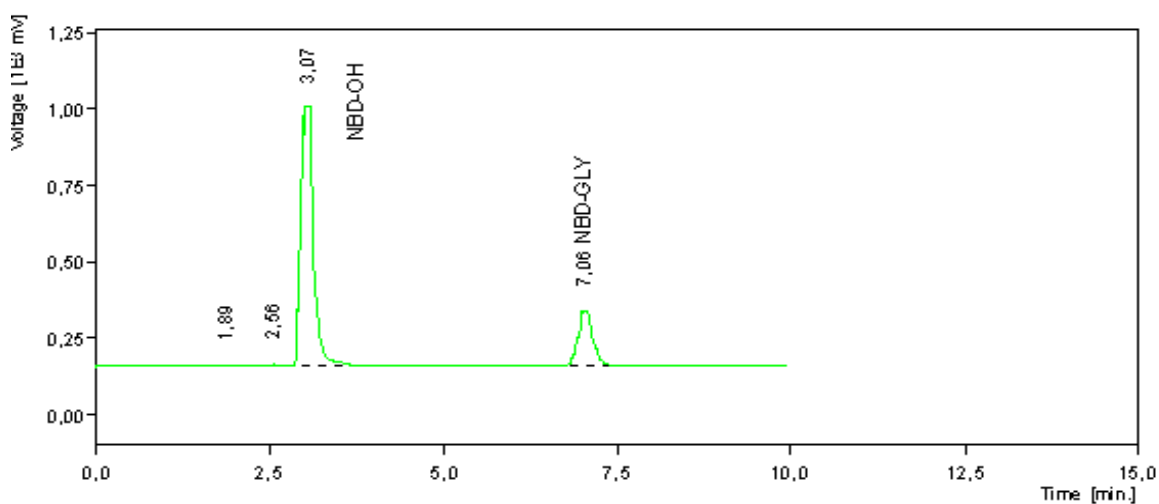
vhodná pro měření i za značně kyselého pH (pod 2,0), avšak píky vykazují zřetelný chvost.

Acetonitril s hydrogenfosforečnanovým pufr (pH 7,0) poskytly chromatogramy s krátkým elučním časem, krátce po třetí minutě NBD-OH a NDB-Gly krátce po sedmé minutě. (obr. 32–34).

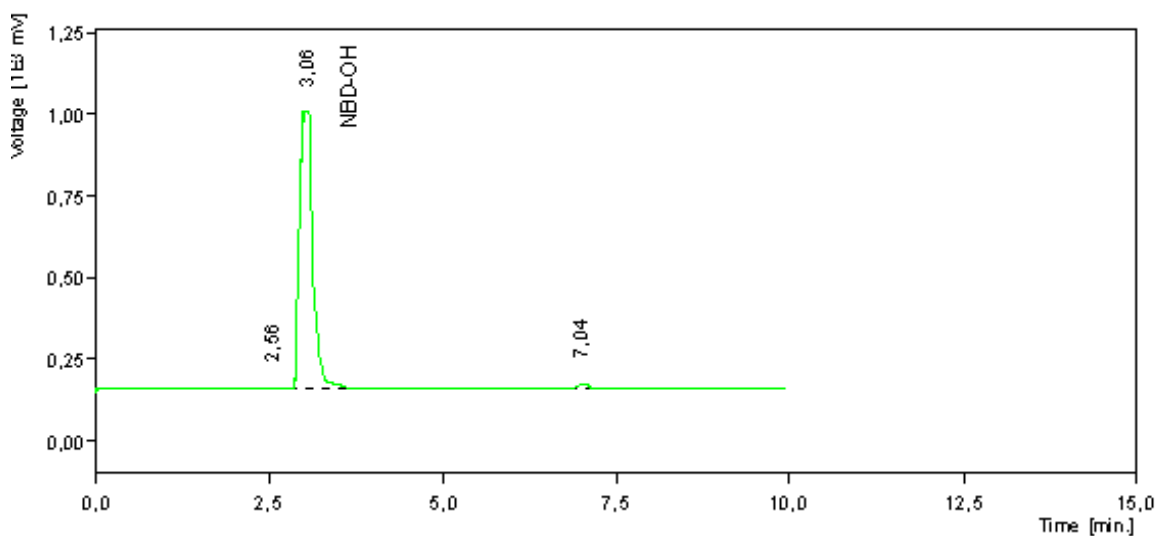
Obrázek 32: Chromatogram vzorku měřeného na koloně Atlantis, mobilní fáze hydrogenfosforečnanový pufr (pH 7,0) s acetonitrilem 70:30, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$



Obrázek 33 :Chromatogram vzorku měřeného na koloně Atlantis, mobilní fáze hydrogenfosforečnanový pufr (pH7,0) s acetonitrilem 70:30, koncentrace 25 $\mu\text{mol/l}$

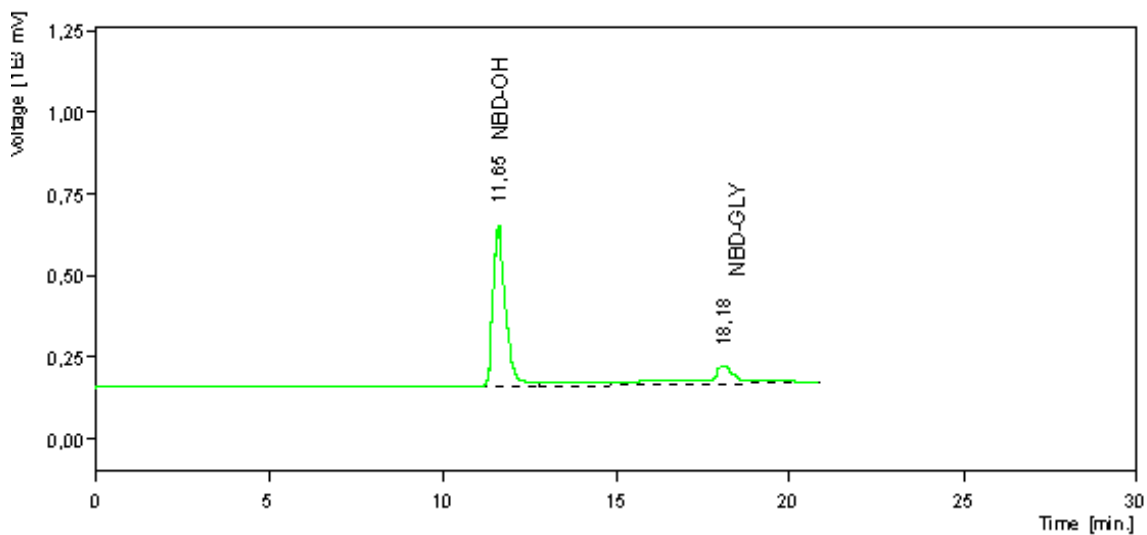


Obrázek 34: Chromatogram vzorku měřeného na koloně Atlantis, mobilní fáze hydrogenfosforečnanový pufr (pH 7,0) s acetonitrilem 70:30, slepý pokus



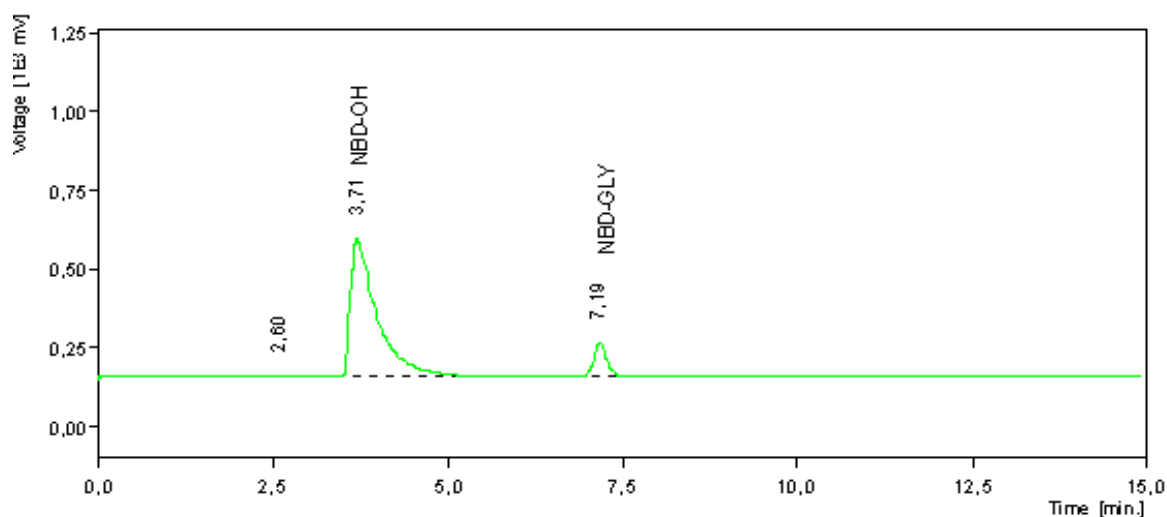
Methanol poskytoval s hydrogenfosforečnanovým pufrém symetrické píky. Retenční čas NBD-OH byl však v jedenácté minutě, NBD-Gly dokonce v 18. minutě.

Obrázek 35 :Chromatogram vzorku měřeného na koloně Atlantis, mobilní fáze hydrogenfosforečnanový pufr (pH 7,0) s methanolem 70:30, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$.

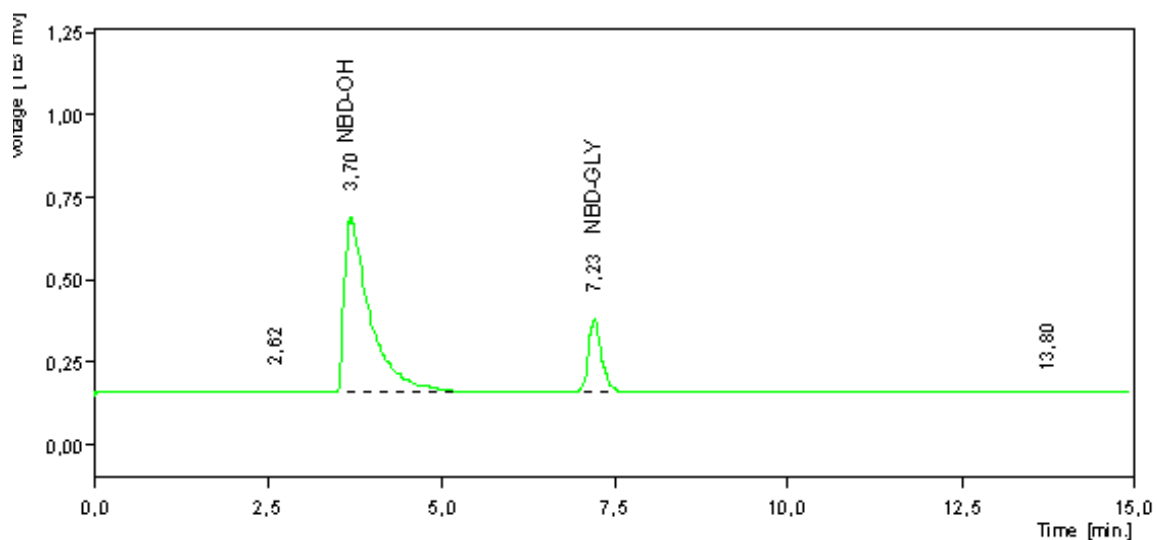


Acetonitril s dihydrogenfosforečnanovým pufr (pH 3,0) poskytuje chromatogramy, kde se NBD-OH eluuje kolem čtvrté minuty, NBD-Gly v sedmé minutě. Nedostatkem chromatogramů je nedokonalá symetričnost píků.

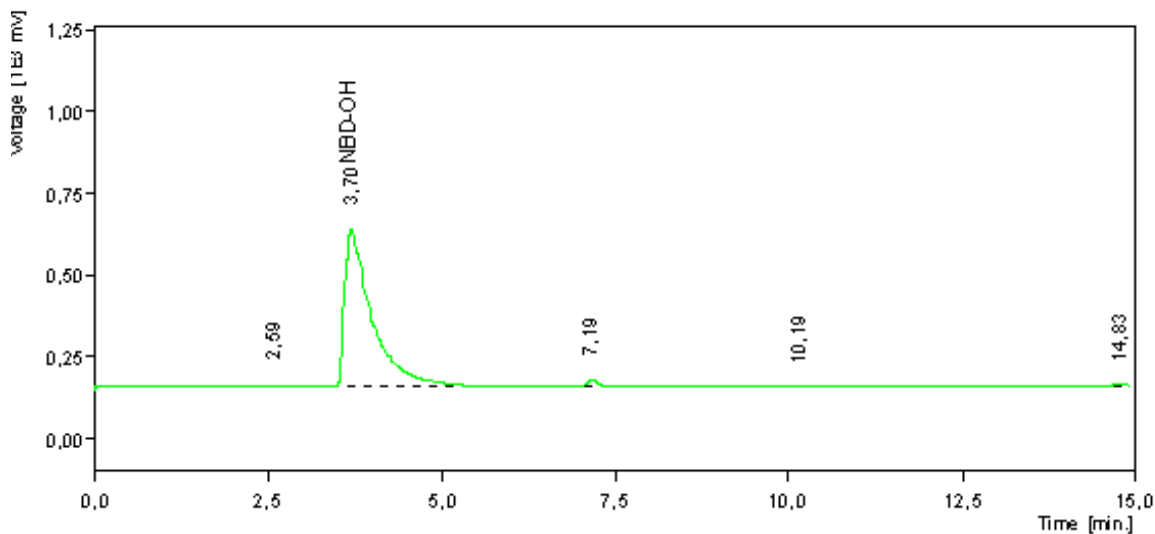
Obrázek 36: Chromatogram vzorku měřeného na koloně Atlantis, mobilní fáze dihydrogenfosforečnanový pufr (pH 3,0) s acetonitrilem 70:30, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$



Obrázek 37: Chromatogram vzorku měřeného na koloně Atlantis, mobilní fáze dihydrogenfosforečnanový pufr (pH 3,0) s acetonitrilem 70:30, koncentrace 25 $\mu\text{mol/l}$

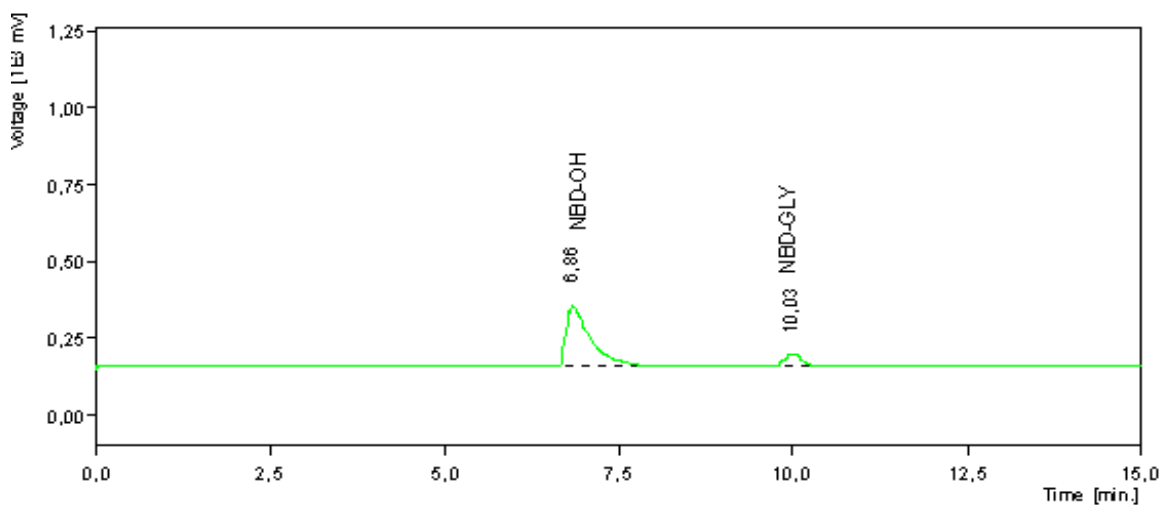


Obrázek 38: Chromatogram vzorku měřeného na koloně Atlantis, mobilní fáze dihydrogenfosforečnanový pufr (pH 3,0) s acetonitrilem 70:30, slepý pokus



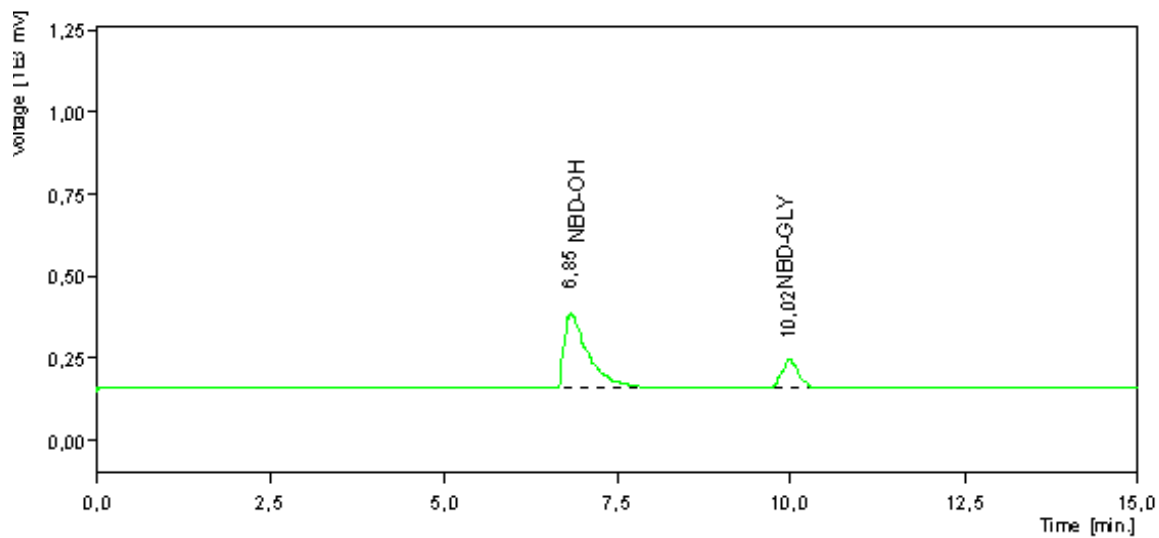
Methanol s dihydrogenfosforečnanovým pufr (pH 3,0) poskytl chromatogramy s píky, jejichž retenční časy jsou v šesté (NBD-OH), respektive v desáté (NBD-Gly) minutě, s patrným chvostem.

Obrázek 39: Chromatogram vzorku měřeného na koloně Atlantis, mobilní fáze dihydrogenfosforečnanový pufr (pH 3,0) s methanolem 70:30, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$

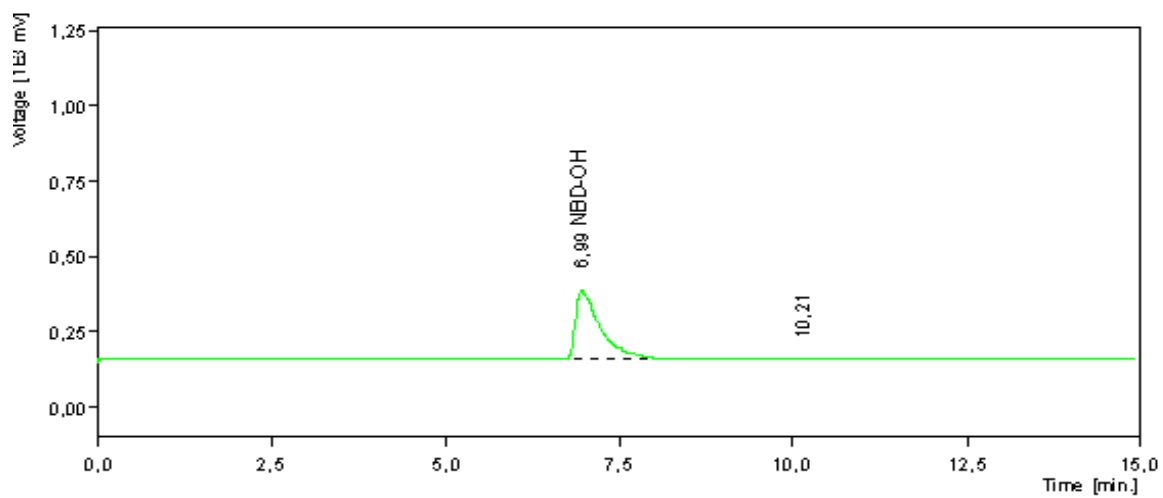


Obrázek 40: Chromatogram vzorku měřeného na koloně Atlantis, mobilní fáze

dihydrogenfosforečnanový pufr (pH 3,0) s methanolem 70:30, koncentrace 25 $\mu\text{mol/l}$



Obrázek 41: Chromatogram vzorku měřeného na koloně Atlantis, mobilní fáze dihydrogenfosforečnanový pufr (pH 3,0) s methanolem 70:30, slepý pokus



5. Závěr

Sledovali jsme stabilitu NBD-Gly v sérii třech vzorků za odlišných podmínek, to jest za laboratorní teploty a přístupu světla, za laboratorní teploty bez přístupu světla a za teploty 2 °C za nepřístupu světla.

Nejstabilněji se chovaly vzorky skladované na světle a teple, ačkoli zjištěné koncentrace byly oproti dalším seriím nižší.

Stabilita NBD-Gly je ve všech případech výrazně lepší v porovnání se zjištěními Uhlářové (1). Avšak správnost zjištěných koncentrací po skladování derivatizovaných vzorků po delší dobu, tj v řádu týdnů, je velmi špatná.

Píky nebyly z hlediska symetrie optimální a vykazovaly zřetelný chvost, tudíž jsme navrhli jiné podmínky-kolonu a mobilní fázi. Z výsledků nejlépe vyšly vzorky měřené na koloně Atlantis s mobilní fází hydrogenfosforečnanový pufr (pH 7,0) a acetonitril v poměru 70:30. Eluční čas byl rovněž příznivý, a to krátce po sedmé minutě pro NBD-Gly.

6. Literatura

1. Uhlářová T. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra biofyziky a fyzikální chemie, 2010.
2. Ledvina, M.; Stoklasová, A.; Cerman, J.: *Biochemie pro studující medicíny I. díl*, 2. dotisk 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2006. ISBN 80-246-0849-9.
3. Lincová, D.; Farghali, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
4. Soukupová, M.; Kubíček, V.; Janovský, M.: Determination of micromolar concentrations of neurotransmitter amino acid glycine by fluorescence detection in rat microdialysis perfusates. *Biomed Pub Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Republic*, 2007, 151, s. 92–93.
5. Ghosh, P. B.; Whitehouse, M. W.: 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole: A New Fluorogenic Reagent for Amino Acids and other Amines. *Biochem. J.* 1968, 108, s. 155-156
6. Panchartek, J.; Štěrbá, V.; Večeřa, M.: *Reakční mechanismy v organické chemii*, 1. vydání. Praha: SNTL, 1981.
7. El-Emam; Ali A.; Hansen, S. H.; Moustafa, M. A.; El-Ashry, S. M.; El-Sherbiny; D. T.: Determination of lisinopril in dosage forms and spiked human plasma through derivatization with 7-chloro-4-nitro-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) followed by spectrophotometry or HPLC with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, roč. 34, s. 35-44.
8. El-Shabrawy, Y.; Belal, F.; Sharaf El-Din, M.; Shalan, Sh.: Spectrophotometric determination of fenoterol hydrobromide in pure form and dosage forms. *Elsevier*, 2003, 58, s. 1033–1038.
9. Sun, Ch.; Yang, J.; Li, L.; Wu, X.; Liu, Y.; Liu, S.: Advances in the study of luminescence probes for proteins. *Journal of chromatography*, 2003, 803, s. 173–190.

10. Coufal, P.: *High Performace Liquid Chromatography, HPLC*[online]. Poslední revize 28. 7. 2004 [cit.2011-4-27] Dostupné z <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.

11. Douša, M.: *Teorie HPLC/ Základy HPLC* [online]. Poslední revize 3.6 2010 [cit.2011-4-27]. Dostupné z <http://www.hplc.cz/>.