

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

SPEKTROSKOPICKÉ STUDIUM
BAREVNÝCH DERIVÁTŮ
NORTRIPTYLINU

Diplomová práce

Hradec Králové 2006

Renata Hudzieczková

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a uvedla veškeré použité prameny a použitou literaturu.

Datum:

podpis:

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Ing. Vladimíru Kubíčkoví za cenné rady a připomínky při zpracování mé diplomové práce.

OBSAH

1. SOUHRN	5
2. ÚVOD.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1. NORTRIPTYLIN.....	10
3.2. DERIVATIZACE NORTRIPTYLINU.....	13
3.3. ROZDĚLOVACÍ ROVNOVÁHY.....	16
3.4. IONTOVÉ ASOCIÁTY	18
3.5. EXTRAKČNĚ-SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ LÉČIV	20
3.6. PRINCIPY MĚŘENÍ MOLEKULOVÝCH SPEKTER V UV A VIS OBLASTI	25
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	30
4.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	30
4.3. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	31
4.4. PRACOVNÍ POSTUP.....	33
5. VÝSLEDKY	36
5.1. EXTRAKČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE.....	37
5.2. DERIVATIZACE NORTRIPTYLINU.....	51
6. DISKUSE.....	56
6.1. EXTRAKČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE.....	57
6.2. DERIVATIZACE NORTRIPTYLINU.....	61
7. ZÁVĚR.....	63
8. LITERATURA	65
9. SEZNAM ZKRATEK.....	68

1. SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá studiem reakcí mezi nortriptylinem a organickými barvivy. Zkoumané reakce mohou být využity pro jeho spektrofotometrické stanovení. V práci jsou testovány tři látky v roli protiiontů při iontové párové extrakční spektrofotometrii nortriptylinu a jedno derivatizační činidlo pro UV-VIS absorpční spektrofotometrii. Dosažené výsledky ukazují na reálnou možnost využití některých z nich při konkrétních stanoveních.

2. ÚVOD

V rámci systematického studia principů barevných reakcí organických sloučenin se na katedře biofyziky a fyzikální chemie UK v Hradci Králové studují také extrakčně-spektrofotometrické a UV-VIS postupy, které nalézají uplatnění při konkrétních stanoveních léčiv.

Při iontově párové extrakční spektrofotometrii jsou využity jako protiionty anionty organických barviv, které s kationty slabě bazických léčiv vytváří asociáty, extrahovatelné do organického rozpouštědla. Tímto způsobem jsou barevné asociáty odděleny od přebytku organického barviva a hodnota absorpance organické fáze odpovídá množství analytu ve vzorku.

V této diplomové práci jsem sledovala derivatizaci nortriptylinu s organickým barvivem (NBD-Cl) prostřednictvím UV-VIS spektrofotometrie. Dále jsem se zaměřila na problematiku využití vybraných barviv (oranž II, bromfenolová modř a kyselina pikrová) ke stanovení nortriptylinu extrakční spektrofotometrií.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. NORTRIPTYLIN

Nortriptylin (obr.1) patří do skupiny léčiv označovaných jako tricyklická antidepresiva (thymoleptika I. generace). Antidepresiva se dělí na thymoleptika, inhibitory aminoxidáz (thymoeretika) a anxiolytika. Indikace antidepresiv vyplývají z jejich mechanismu účinku a z dnešních poznatků o patofyziologii duševních poruch. K terapii depresí se používají thymoleptika a inhibitory aminoxidáz. Patologická úzkost se léčí anxiolytiky (v případě generalizované úzkostné poruchy) nebo thymoleptiky či inhibitory monoaminoxidázy (v případě panické úzkostné poruchy).

Deprese je závažné onemocnění, které bezprostředně ohrožuje život pacienta sebevraždou. Pro depresi je charakteristická patologicky pokleslá nálada, anhedonie (neschopnost prožít radost), pesimismus, tendence svalovat vinu za všechno zlé na sebe, beznaděj, neschopnost rozhodovat se, porucha spánku (nejčastěji nespavost charakterizovaná probouzením brzo k ránu a neschopností znovu usnout) a porucha chuti k jídlu (nejčastěji nechutenství). Intelektuální výkon bývá zpomalený a snížený. Přibližně polovina depresivních nemocných si také stěžuje na pocity napětí a úzkosti, mívá neadekvátní strach o své blízké, o své zdraví a majetek. Pokud někdo onemocní depresí, existuje přibližně 80% pravděpodobnost, že k depresi bude docházet opakovaně, periodicky.

Léčba epizody deprese má trvat 4-6 měsíců a poté se doporučuje pokračovat profylaxí. Při monopolárním průběhu (periodicky se opakují pouze depresivní epizody a nedochází k mániím) se dnes často pokračuje v profylaxi shodným antidepresivem, které vedlo k remisi. Antidepresivní terapie zásadním způsobem zkracuje epizodu deprese.

Jestliže terapie antidepresivy v dostatečných dávkách (včetně injekční aplikace) trvající dostatečně dlouhou dobu selhává, je zpravidla indikována elektrokonvulzivní terapie, k níž se přistupuje i při nesnadno kontrolovatelných suicidálních tendencích či při odmítání potravy a tekutin, které vede k exhausci a k metabolickým poruchám.

Anxiozita (pocit strachu, úzkosti, napětí) je velmi častý příznak provázející mnohá onemocnění, který subjektivně velmi obtěžuje pacienta a za určitých situací mu brání

v normálním zařazení do života. Anxiozita je všedním zážitkem a není vždy patologická. Nebývá snadné rozhodnout, kdy už je třeba ji léčit medikamentózně, kdy lze postiženého ponechat bez terapie a kdy je nejvýhodnější psychoterapie. Psychoterapie by ovšem měla provázet každou farmakoterapii anxiozity. K farmakoterapii se zpravidla přistupuje, jestliže úzkost nemocného výrazně snižuje kvalitu jeho života a vede k somatickým příznakům (palpitace, průjem, pocení atd.). Farmakoterapie by měla být pokud možno krátkodobá a mělo by se k ní přistupovat v případech jasné bezprostřední psychogenní příčiny, kdy je třeba překlenout akutní životní krizi provázené úzkostí. Jednorázové podání anxiolytika je indikováno u úzkostných nemocných před nepříjemnými lékařskými zákroky (např. stomatologickými) nebo u lidí s trémou před vystoupením na veřejnosti. Zde je však třeba ověřit si toleranci podáním anxiolytika několik dnů před vystoupením a přesvědčit se, že nedochází k nežádoucímu útlumu. Patologická úzkost může mít dvojí příčinu: buď jde o deficit neurotransmiser GABA, nebo o deficit neurotransmiser serotoninu v CNS. Benzodiazepinová anxiolytika působí agonisticky na GABA-receptorech, thymoleptika ze skupiny selektivních inhibitorů reuptake serotoninu (SSRI) pak zvyšují dostupnost serotoninu v CNS.

Nedostatečná neurotransmiser GABA je hlavním článkem patogeneze generalizované úzkostné poruchy. Jde o snížený práh pro vznik úzkosti provázející nemocného prakticky po celý život, přičemž výskyt příznaků kolísá podle aktuální situace. Zpravidla se jedná o hereditárně podmíněnou poruchu, na které se může podílet i učení - dítě se naučí reagovat úzkostně od svých rodičů. Zde je indikována dlouhodobá terapie benzodiazepinovými anxiolytiky, jejichž dávky si často nemocný volí sám. U správně diagnostikované generalizované úzkostné poruchy zpravidla nehrozí vznik závislosti. Často bývá naopak těžké přesvědčit úzkostného nemocného, aby léky užíval, protože je to on, kdo se bojí, že z něho bude toxikoman.

Nedostatečná neurotransmiser serotoninu též souvisí s panickou úzkostnou poruchou. Jedná se o onemocnění, které postihuje 4-6 % populace a projevuje se epizodicky se objevujícími, těžce subjektivně prožívanými somatickými obtížemi simulujícími např. anginu pectoris, kolikovitě břišní bolesti, prudké bolesti hlavy, pocity závratí nebo mdloby. Tyto somatické příznaky jsou provázeny panickou úzkostí a často i strachem ze smrti, o kterých však nemocný zpravidla nemluví spontánně, a svěří se s nimi teprve po taktních dotazech lékaře. Epizody panické úzkostné poruchy mohou

vznikat i sporadicky, třeba jen dvakrát za měsíc nebo ještě méně často, v mezidobích však nemocný trpí anticipační úzkostí, strachem, že panická úzkost přijde. Panická úzkostná porucha bývá provázena fobiemi a nemocný se pak vyhýbá situacím, ve kterých ho postihla panická úzkost. Někdy dochází k fobiím bez zjistitelných epizod panické úzkosti. Jde především o sociální fobii (nemocný se bojí kontaktu s cizími lidmi a nechce opouštět domov).

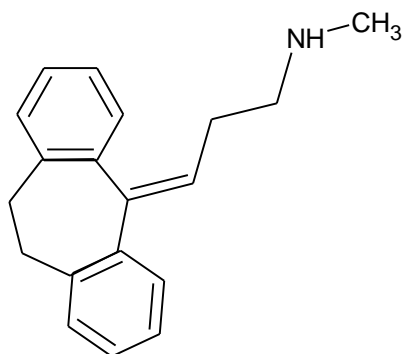
Se serotoninovým deficitem je spojena také obsedantně kompulzivní porucha, u níž se těžká úzkost objevuje, když se nemocný brání patologickému nutkání vyhovět. Vedle antidepresiv se u těchto onemocnění dobře osvědčuje kognitivně behaviorální psychoterapie(1).

Nortriptylin je léčivo, které se používá v několika zemích od 60. let 20. století. Patří k TCA, které působí nepříliš selektivně na zpětné vychytávání noradrenalinu, dopaminu a serotoninu a kromě toho má účinek anticholinergní.

Nortriptylin zlepšuje patologicky utlumenou náladu. Nejlepšího účinku se dosahuje při léčbě endogenních depresí, ale úspěchu lze dosáhnout i u jiných typů depresí. Vzhledem ke stimulačnímu účinku nortriptylinu ho lze s výhodou užít zejména při léčbě takových depresí, kde je v popředí útlum, apatie a nedostatek zájmu. Antidepresivní účinek obvykle nastupuje po 2-4 týdnech léčby, přičemž útlum obvykle mizí poněkud rychleji.

Některá antidepresiva se používají v léčbě nikotinové závislosti. Kromě buprionu, jediného antidepresiva schváleného americkou FDA (Food and Drug Administration) pro tento účel, se v poslední době hovoří také o nortriptylinu a jeho roli v léčbě abstinčních příznaků pacientů závislých na nikotinu. Z literatury (2) je známo, že nortriptylin na rozdíl od ostatních TCA má řadu terapeutických výhod: nízký výskyt nežádoucích anticholinergních účinků, nízká incidence záchvatu a ortostatické hypotenze, možnost podávání pacientům s kardiovaskulárním onemocněním a dobrá snášenlivost u starších pacientů.

HCl



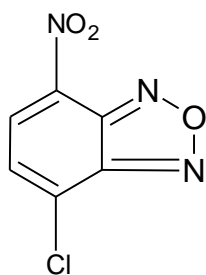
3-(10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d][7]annulen-5-yliden)-
N-methylpropan-1-amin-hydrochlorid

Obr.1. Vzorec nortriptylin-hydrochloridu (Mr=299,8)

3.2. DERIVATIZACE NORTRIPTYLINU

V odborné literatuře je nejčastěji používanou analytickou metodou na stanovení nortriptylinu a jeho metabolitů HPLC s UV detekcí nebo ve spojení s hmotnostní spektrometrií. V literatuře byly publikovány i další metody na analýzu nortriptylinu, z nich uvedu stanovení po derivatizaci s různými derivatizačními činidly (Chrome Azurol S, tetrabromosulfonfluorescein, NBD-Cl). Český lékopis předpisuje na stanovení obsahu nortriptylinu titraci za potenciometrického stanovení.

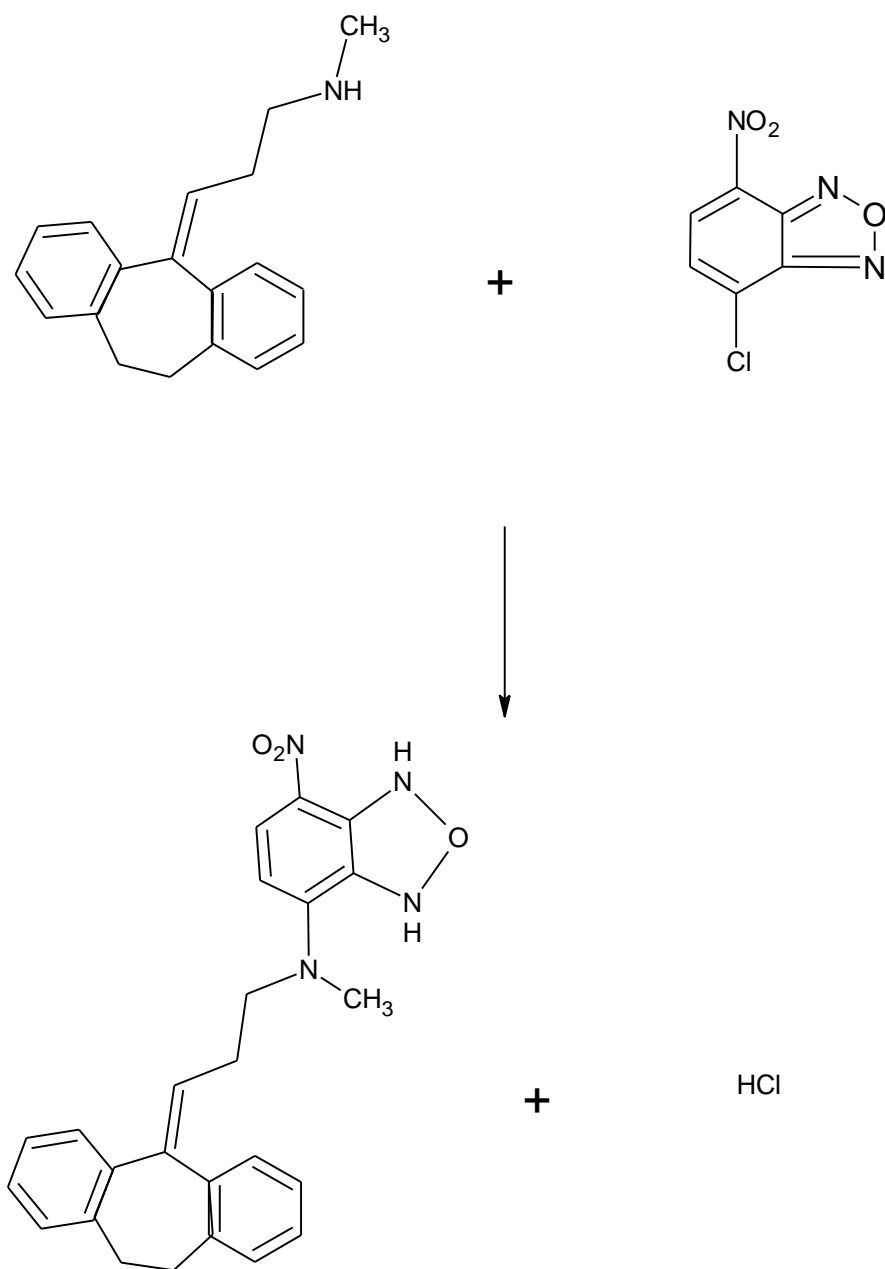
NBD-Cl (obr.2) patří k derivatizačním činidlům, která se uplatňují v analýze sloučenin obsahující ve své molekule aminovou skupinu. NBD-Cl se poprvé bylo použito jako fluorescenční činidlo pro detekci aminů, aminokyselin, později jako specifické činidlo pro analýzu aminokyselin pro jejich zvýšenou reaktivitu se sekundárními aminy (3). Později toto barvivo bylo použito jen příležitostně pro detekci aminokyselin, zejm. prolinu a hydroxyprolinu. I když NBD-Cl je stabilní a umožňuje citlivou detekci aminokyselin, reaguje s některými aminy pomaleji, a proto nenašlo uplatnění jako běžné analytické činidlo pro aminokyseliny (4).



7-chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol

Obr.2. Vzorec NBD-Cl (Mr=199,55)

Nortriptylin-hydrochlorid je bílý nebo téměř bílý prášek, mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu. Methanolický roztok nortriptylinu vykazuje absorpční maximum při 239 nm (5). Nortriptylin obsahuje sekundární aminovou skupinu, která reaguje s NBD-Cl v alkalickém prostředí za vzniku fluoreskujícího produktu 4-dialkyl-amino-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolu. Z literatury (3) je známo, že reakce probíhá následovně (viz Obr.3).



Obr.3. Předpokládaný průběh reakce mezi nortriptylinem a NBD-Cl.

3.3. ROZDĚLOVACÍ ROVNOVÁHY

Při extrakci z kapaliny do kapaliny se uplatňuje rozdělovací rovnováha. Látka se rozděluje mezi dvě fáze – vodnou a organickou, tvořenou rozpouštědlem nemísitelným s vodou. Jen elektroneutrální složky mají schopnost procházet fázovým rozhraním z vodné do organické fáze. Tato distribuce mezi obě fáze se děje na základě působení disperzních sil, vzájemného působení dipólů, tvorby vodíkových vazeb apod.

Rovnováha soustavy je za konstantní teploty dána rovností chemického potenciálu (μ) extrahované látky v obou fázích (dolní indexy označují fáze 1 a 2):

$$\mu_1 = \mu_2 ,$$

kam lze dosadit $\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln a_i$, kde a_i je aktivita, potom:

$$\mu_1^0 + RT \ln a_1 = \mu_2^0 + RT \ln a_2 ,$$

kde:

$\mu_1^0, \mu_2^0 \dots$ standardní chemický potenciál

T...absolutní teplota

R...univerzální plynová konstanta

Další úpravou lze získat vztah mezi rozdělovací konstantou (K_D) a aktivitami rozdělované látky (a):

$$K_D = \frac{a_1}{a_2} .$$

Je-li rozdělovaná složka v obou fázích ve stejné formě, ustavuje se při extrakci rovnováha podle Nernstova rozdělovacího zákona, kdy poměr aktivit látky v obou fázích je při stejné teplotě konstantní. Tento poměr aktivit určuje termodynamická rozdělovací konstanta K_D^0 :

$$K_D^0 = \frac{a_{org.}}{a_{vod.}} .$$

Místo aktivit se pro analytické účely používá rovnovážná molární koncentrace $[A]$ a tzv. koncentrační konstanta (K_D). Platí vztah:

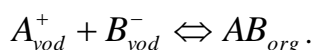
$$K_D = \frac{[A]_{org.}}{[A]_{vod.}} ,$$

za předpokladu, že rozdělovaná látka nepodléhá ani v jedné z obou fází disociaci, asociaci, polymeraci, ionizaci atd. Pokud však k těmto dějům dochází, je nutno počítat s analytickou koncentrací c rozdělované složky a místo rozdělovací konstanty zavést další veličinu, tzv. rozdělovací poměr D_c , stechiometrický poměr koncentrací extrahované látky v obou fázích (připouštějí se zde všechny formy extrahované látky):

$$D_c = \frac{c_{org.}}{c_{vod.}} .$$

Pokud rozdělovaná látka nereaguje se žádnou složkou v obou fázích, má rozdělovací poměr D_c stejnou hodnotu jako rozdělovací konstanta.

Děje probíhající obecně při extrakci kationtu léčiva A^+ provázaného ekvivalentním množstvím aniontu B^- (barviva) do organické fáze lze znázornit jednoduchou rovnicí:

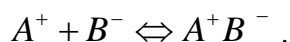


Kvantitativní charakteristiku extrakční rovnováhy rozdělované látky v organické a vodné fázi poskytuje extrakční konstanta K_{ex} , která je poměrem koncentrace elektroneutrálního útvaru (chelát, acociát) extrahovaného do organické fáze a součinu koncentrací složek (ve vodné fázi) tvořících tento útvar:

$$K_{ex} = \frac{[AB]_{org}}{[A_v^+] \cdot [B_v^-]} (6).$$

3.4. IONTOVÉ ASOCIÁTY

Iontové asociáty jsou elektroneutrální částice, které vznikají asociací opačně nabitých iontů ve formě iontových párů nebo shluků vyššího řádu a lze je extrahovat do málo polárního rozpouštědla. Tvorbu iontového páru z iontů A^+ a B^- lze znázornit schématem:



Příslušnou rovnováhu charakterizuje rovnovážná konstanta stability iontového páru:

$$K = \frac{[A^+ B^-]}{[A^+][B^-]} .$$

Fyzikální podstatou asociace opačně nabitých iontů je jejich vzájemné elektrostatické přitahování.

Existenci a chování těchto komplexů předpověděl N.Bjerrum. Bjerrumova teorie udává vztah mezi konstantou stability iontového páru a mezi permitivitou rozpouštědla, teplotou a velikostí reagujících iontů. Platí následující vztahy:

$$K = \frac{4\pi N e^2}{1000 \epsilon_r k T} \cdot Q_{(b)},$$

$$b = \frac{e^2}{a \epsilon_r k T} ,$$

kde:

N...Avogadrovo číslo

e...elementární náboj

T...absolutní teplota

a...vzdálenost středů párových iontů při jejich minimální vzájemné vzdálenosti

$Q_{(b)}$...výpočetem zjistitelná funkce zahrnující sterické vlivy

k...Boltzmanova konstanta

ϵ_r ...relativní permitivita rozpouštědla

Organická rozpouštědla používaná pro extrakci mají relativní permitivitu menší než 40, proto je asociace iontů v těchto rozpouštědlech značná. Vliv teploty na hodnotu konstanty K závisí na teplotních změnách relativní permitivity. V polárnějších rozpouštědlech se ϵ_r zmenšuje s teplotou a to tak, že hodnoty $\epsilon_r \cdot T$ klesají se vzrůstající teplotou. V těchto rozpouštědlech tedy vzrůstá asociace iontů se vzestupem teploty. V nepolárních rozpouštědlech hodnota $\epsilon_r \cdot T$ s teplotou vzrůstá, neboť hodnota ϵ_r se příliš nemění, a proto se v rozpouštědlech tohoto typu zvyšováním teploty se asociace iontů snižuje.

3.5. EXTRAKČNĚ-SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ LÉČIV

Extrakčně – spektrofotometrické metody představují důležitou metodiku pro stanovení nízkých koncentrací léčiv. Stanovení organických kationtů (aniontů) jsou založena na tvorbě jejich asociátů s anionty (kationty) vhodně zvolených kyselých (bazických) barviv ve vodném prostředí. Takto vzniklé asociáty se z vodné fáze při optimálním pH izolují vytřepáním do organického rozpouštědla nemísitelného s fází vodnou, např. do chloroformu, benzenu, dichlormethanu apod. Za vhodných podmínek přejde do organické fáze jen množství barevného protioiontu úměrné stanovenému léčivu, proto lze takto fotometricky nepřímou stanovit koncentraci tohoto léčiva.

Vlastní spektrofotometrická měření se mohou nejčastěji provést některým z následujících postupů: a) měřením absorbance oddělené organické fáze, b) měřením absorbance oddělených a spojených opakovaných výtřepků v případě, že iontový asociát nelze převést do organické fáze jednorázovým vytřepáním, c) měřením absorbance organické fáze po přidání vhodného činidla upravujícího barevnou formu použitého barviva, má-li indikátorové vlastnosti, d) měřením absorbance roztoku barviva získaného reextrakcí z organické fáze vodou. Pro extrakční spektrofotometrii se používají barviva z řady sulfoftaleinů, azobarviv apod.(6)(7).

Měření absorbance je založeno na platnosti Lambertova – Beerova zákona:

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

kde:

A...absorbance

ε ...molární absorpční koeficient

c...molární koncentrace stanovované látky

l...tloušťka absorbující vrstvy.

Lambertův - Beerův zákon platí pouze v omezeném rozsahu (je zákonem limitním). Platí pouze za následujících podmínek:

- záření musí být monochromatické
- roztoky musejí být velmi zředěné ($c < 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$)
- absorbující prostředí nesmí podléhat žádným změnám
- v roztoku musí být jen jedna absorbující složka (pokud je v roztoku přítomno více složek je absorbance sumou absorbancí jednotlivých složek)

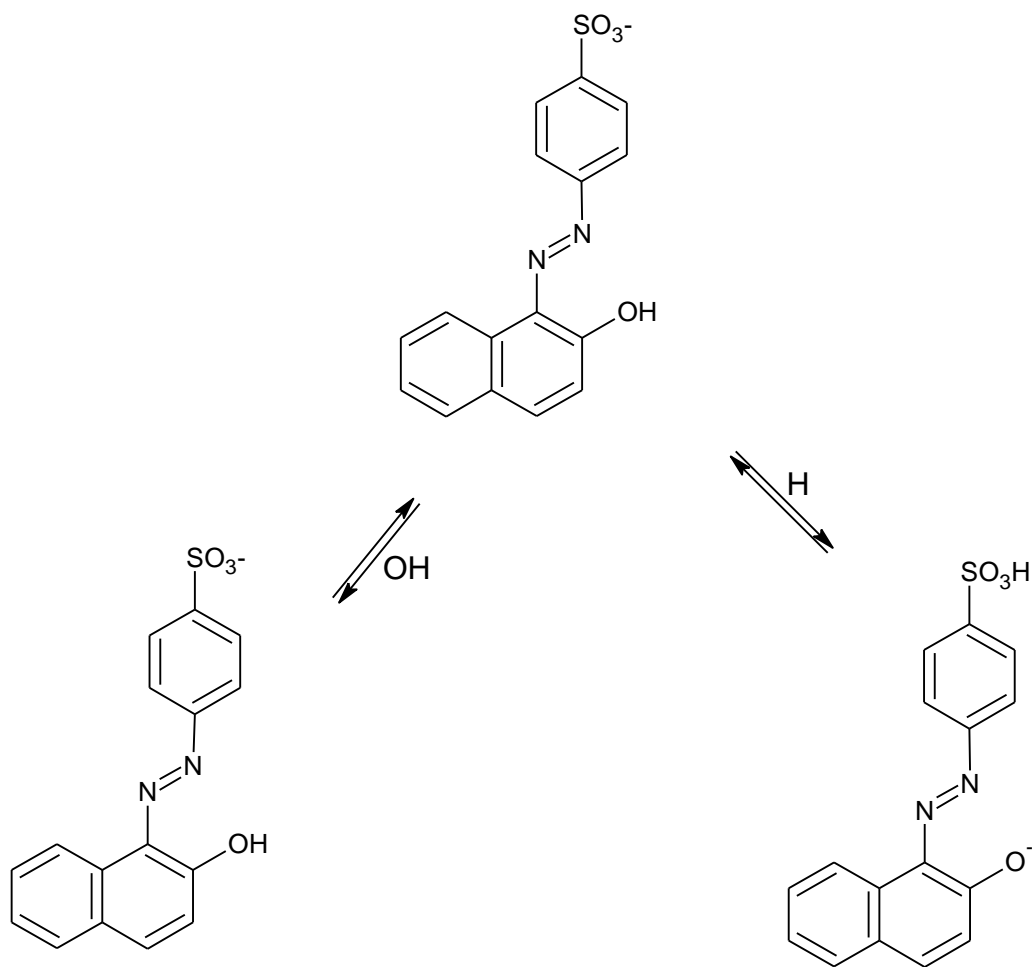
Výsledná hodnota absorbance se určí odečtením hodnoty slepého pokusu provedeného stejným způsobem. Podstatou kvantitativního vyhodnocení je potom lineární závislost vztahu absorbance – koncentrace sledovaného roztoku.

Měření se provádí při takové vlnové délce, kdy odpovídající absorpční křivka vykazuje maximum absorbance. Při měření ve viditelné oblasti světelného záření leží toto maximum v rozmezí vlnových délek 380 až 780 nm.

3.5.1. Použití oranže II v extrakční spektrofotometrii

Oranž II je sodnou solí kyseliny 1-(2-hydroxylnaftyl)azobenzen-4-sulfonové. Jde o červenohnědou krystalickou látku rozpustnou ve vodě a v alkoholu. Pro svůj nejasný funkční přechod (7,4 – 8,9) se oranž II nepoužívá jako acidobazický indikátor. Literatura (8) uvádí, že velkou výhodou oranže II v roli protiiontu při iontově párové extrakční spektrofotometrii je její dostatečná disociace, a tudíž použitelnost v širokém rozmezí pH (2-10). Při vyšších hodnotách pH (nad 10) již dochází k disociaci hydroxyskupiny ($pK_A = 11,4$) a vzniku divalentního iontu, což může při iontově párové extrakční spektrofotometrii způsobovat určité nesnáze, přinejmenším výrazné snížení citlivosti.

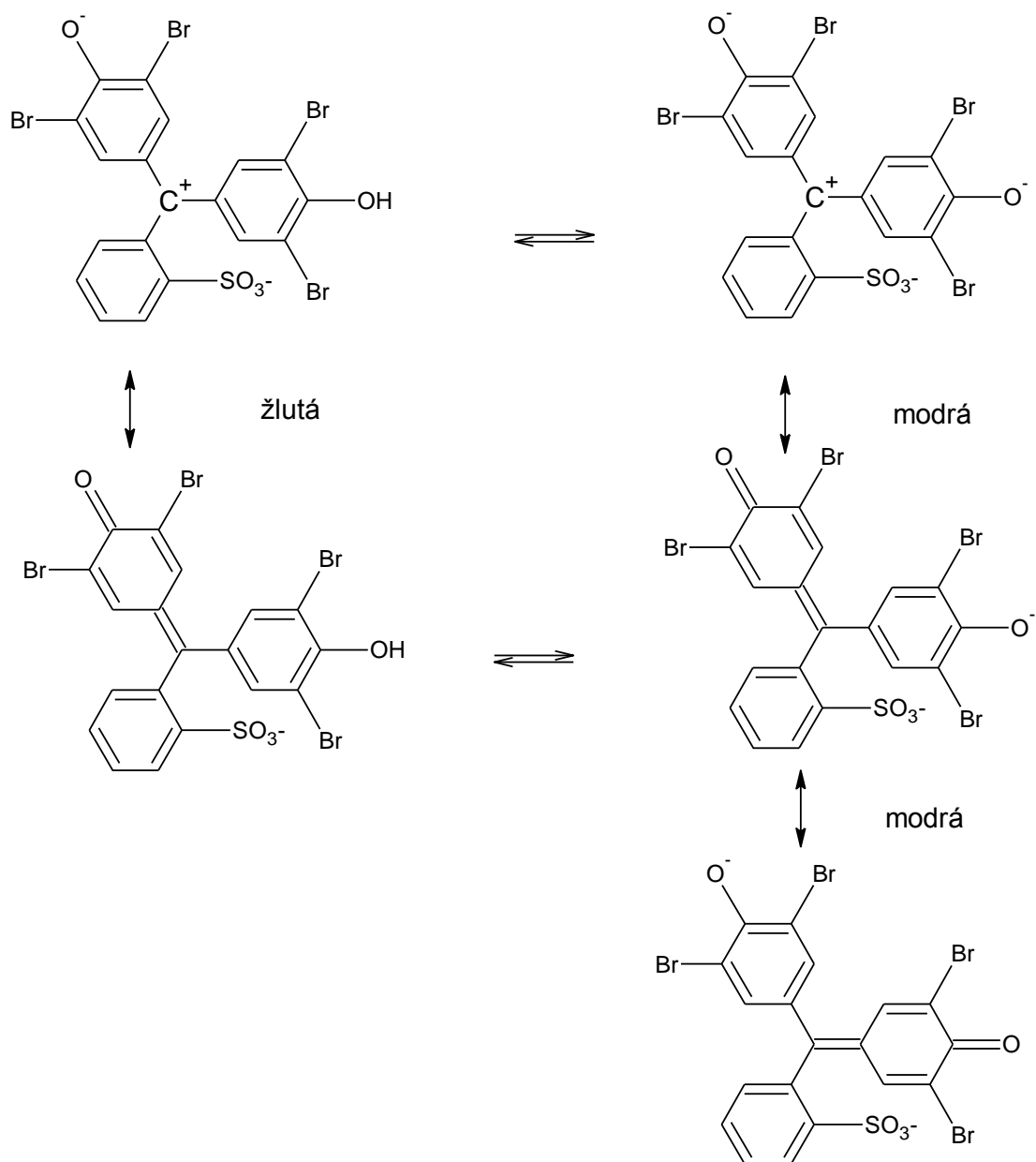
Podle literatury (9) se absorpční spektrum oranže II nemění v rozmezí pH od 0,73 – 8,05, kdy chromofory zůstávají v podstatě ve stejné formě, tzn. sulfonová skupina je úplně disociována a fenolická skupina nedisociována. Nad pH 8,05 nastává pokles hodnoty absorbance a posun absorpčního maxima z 488 nm na cca 460 nm jako důsledek disociace fenolické skupiny oranže II (viz obr.4).



Obr.4. Disociace oranže II

3.5.2. Použití bromfenolové modře v extrakční spektrofotometrii

Bromfenolová modř patří k sulfoftaleinovým barvivům, její chemický název je 3,3',5,5'-tetrabromofenolftalein. Jde o bledě oranžový, event. nahnědlý krystalický prášek, který je mírně rozpustný ve vodě a etheru, ale dobře rozpustný v ethanolu nebo zředěném alkalickém roztoku. Bromfenolová modř přechází (10) v rozmezí pH 3 až 4,6 ze žluté do modré (obr.5). Pro práci ve vodném prostředí se používá ve formě sodné soli, která je ve vodě dobře rozpustná.

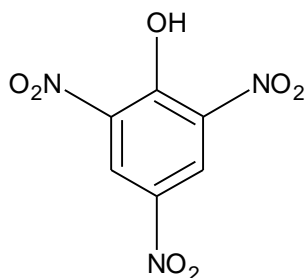


Obr.5. Barevný přechod bromfenolové modře

3.5.3. Použití kyseliny pikrové v extrakční spektrofotometrii

Kyselina pikrová (obr.6) resp. její anion, tvoří ve vodných roztocích s kationty primárních, sekundárních a terciárních amoniových solí a s heterocyklickými dusíkatými bázemi sraženiny příslušných pikrátů. Tyto lze oddělit filtrací a vyčistit krystalizací na analyticky čisté látky s charakteristickými teplotami tání. Elementární analýza ukázala, že se jedná o definované deriváty, mající v případě jednomocných kationtů složení amin : kyselina pikrová 1:1. Zatímco např. u pikrátu tetrabutylamonia předpokládáme výslovně interakci ion-ion, vyplynulo z infračervených spekter pikrátů

chlorpromazinu, že v krystalickém stavu dochází k silné interakci OH skupin kyseliny pikrové s alifatickým dusíkem chlorpromazinu. Obě složky jsou v tomto případě do komplexu vázány jednak touto silně polární vazbou, která je výsledkem parciálního přesunu protonu OH skupiny kyseliny pikrové k dusíku aminoskupiny fenothiazinové baze, jednak vlivem přechodu náboje n-elektronů dusíku aminoskupiny do volného π^* -orbitalu NO_2 skupiny kyseliny pikrové.



2,4,6-trinitrofenol

Obr.6. Vzorec kyseliny pikrové ($M_r = 229,11$)

Pro analytické účely se tvorby pikrátů využívá jednak k charakterizaci aminů a dusíkatých bází, protože se snadno připravují, dobře krystalizují a mají charakteristické body tání. Použití pikrátů v kvantitativní analýze má několik variant. Sraženinu pikrátu vzniklou ve vodném prostředí lze izolovat filtrací, vysušit a zvážit, nebo lze stanovit přebytek kyseliny pikrové ve filtrátu. Také lze izolovanou sraženinu rozpustit ve vhodném rozpouštědle, např. v ethanolu, acetonu či dimetylformamidu a spektrofotometricky stanovovat. Pikráty bazických léčiv je možno také přímo připravit v aprotických rozpouštědlech, jejichž prostředí podporuje vznik asociátů a jejich tvorbu využít ke spektrofotometrickému stanovení.

Volba vhodného rozpouštědla pro extrakci asociátů je velmi důležitá. Nejvhodnějším činidlem pro asociáty s kyselinou pikrovou je podle některých autorů dichlormetan, protože v širokém, rozmezí pH ($\text{pH} > 2$) prakticky nevytřepává činidlo. Nejčastěji se však v praxi používá chloroform. Extrakcí při dvou různých pH lze v některých případech provést stanovení dvou bází vedle sebe. Vyšší alkoholy a ostatní rozpouštědla mající dielektrickou konstantu vyšší než dichlormetan rovněž dobře rozpouštějí asociáty, nelze jich však použít prakticky pro extrakční fotometrii, protože silně vytřepávají činidlo (vysoké hodnoty slepého pokusu)(6).

3.6. PRINCIPY MĚŘENÍ MOLEKULOVÝCH SPEKTER V UV A VIS OBLASTI

Molekulová spektra v UV a VIS oblasti vznikají přechody elektronů mezi molekulovými orbitaly o různé energii. Proto jsou někdy označována jako elektronová molekulová spektra. Tato spektra se získají jako spektra absorpční a jsou obvykle vyjádřena ve formě závislosti absorbance na vlnové délce světla procházejícího vzorkem. Molekulová elektronová spektra nacházejí široké uplatnění v kvantitativní analýze (díky platnosti Lambertova-Beerova zákona), při studiu struktury molekul, v průtočných analytických systémech (HPLC detektory) i při zkoumání procesů a struktur v kapalných směsích.

Měřit molekulové spektrum v UV a VIS oblasti tudíž znamená najít pro daný vzorek závislost absorbance na vlnové délce. UV-VIS spektrofotometry zaznamenaly během posledních let výrazný technický pokrok. V současnosti lze spektrofotometry rozdělit podle principu měření na tzv. klasické přístroje a přístroje s tzv. reverzní optikou (diodovým polem).

U klasických přístrojů (např. UNICAM UV-300) přichází světlo emitované vhodným zdrojem nejprve do monochromátoru, který z něho vyčlení pouze úzké rozmezí vlnových délek a ty nechá dopadnout na kyvetu se vzorkem. Po průchodu vzorkem je intenzita prošlého světla dané vlnové délky vyhodnocena fotočlánkem a porovnáním s intenzitou světla, které prošlo slepým vzorkem, je získána hodnota absorbance. V průběhu měření monochromátor postupně mění vlnovou délku propouštěného světla a tím je krok po kroku proměřeno spektrum ve zvoleném rozsahu vlnových délek.

Přístroje s reverzní optikou (např. HP 8453) nemají monochromátor a na vzorek v kyvetě dopadá polychromatické světlo emitované zdrojem. Po průchodu vzorkem je intenzita světla jednotlivých vlnových délek vyhodnocena tzv. diodovým polem. Diodové pole je soustava polovodičových diod, z nichž každá je citlivá na intenzitu světla určitého úzkého rozmezí vlnových délek. Jednotlivé diody snímají intenzitu světla určité vlnové délky, které prošlo měřeným vzorkem, a porovnáním s intenzitou světla prošlého při dané vlnové délce slepým vzorkem je získána hodnota absorbance pro tuto vlnovou délku. Proložením spojitě čáry všemi takto naměřenými hodnotami absorbance se vytvoří příslušné spektrum vzorku.

Výhodou přístrojů s diodovým polem je bezesporu rychlost snímání spekter a absence mechanicky a opticky náročného konstrukčního prvku – monochromátoru. Výhodou přístrojů klasické konstrukce je větší fotometrický rozsah a lepší rozlišení (možnost jemnějšího dělení ve snímaném rozsahu vlnových délek).

3.6.1. Měřicí systém spektrofotometru HP 8453

Spektrofotometr HP 8453 má dva zdroje světelného záření. Jedná se o deuteriovou lampu, která slouží jako zdroj ultrafialového světla, a o wolframovou lampu (zdroj viditelného světla). Za zdroji záření je řazena clona, která se skládá ze dvou částí. První slouží jako vypínač a druhou částí je filtr, užívaný k snížení rozptylu světla v ultrafialové oblasti. Po průchodu clonou prochází polychromatické světlo křemennou kyvetou naplněnou měřeným roztokem.

HP 8453 je spektrofotometr s diodovým polem (diode-array) řízený počítačem a snímající celé absorpční spektrum vzorku. Detektorem HP 8453 je 1024-prvkové diodové pole, které je tvořeno sérií křemíkových fotodiod, citlivých na světlo. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, který je v konstantních intervalech znovu nabíjen řídicí elektronikou. Jakmile světlo dopadne na fotodiodu, její odpor se změní úměrně k intenzitě dopadajícího světla a připojený kondenzátor je úměrně vybit. Množství elektrické energie potřebné k opětovnému nabití kondenzátoru je pak mírou intenzity dopadajícího světla. Výstupem je analogový signál, který se prostřednictvím konvertoru mění na digitální.

3.6.2. Korekce proudu za temna

Přestože je clona uzavřena a žádné světlo nedopadá na diodové pole, dochází ke vzniku velmi nízkého signálu, který je způsobený samovolným vybíjením kondenzátoru. Tento proud bývá označován jako proud za temna. Signál proudu za temna je nepřetržitě měřen a ukládán řídicí elektronikou. Poté je vždy automaticky odečten od signálu získaného v případě, kdy clona není uzavřena a světelné záření dopadá na diodové pole.

3.6.3. Korekce rozptylu světla

Spektra jsou měřena jednak bez filtru rozptylu světla a potom s tímto filtrem umístěným v dráze světelného paprsku. Bez přítomnosti filtru v dráze světelného paprsku je spektrum měřeno přes celou používanou oblast vlnové délky, tj. od 190 nm do 1100 nm. Pokud je příslušný filtr nastaven, představuje každé světlo, naměřené při vlnové délce pod 400 nm, světlo rozptýlené. Intenzita tohoto rozptýleného světla se pak odečítá od intenzit ve spektru získaném bez použití filtru. Výsledkem je spektrum s korekcí rozptylu světla.

3.6.4. Hodnocení spekter

HP 8453 je jednopaprskový spektrofotometr. K vyhodnocení absorpčního spektra vzorku musí být proto provedeny dva kroky. Nejdříve se získá referenční spektrum při měření slepého vzorku. Potom se kyveta se slepým vzorkem vymění za kyvetu se vzorkem. Po změření příslušného vzorku jsou jednotlivé absorbance vyhodnoceny podle vztahu:

$$A = -\log \left[\frac{(I - I_{sd} - I_{ss})}{(I_o - I_{od} - I_{os})} \right] ,$$

kde:

A ...absorbance,

I_s ...je intenzita záření, které prošlo měřeným vzorkem,

I_{sd} ...je intenzita signálu proudu za temna měřená bezprostředně před měřením vzorku,

I_{ss} ...je intenzita záření, které prošlo měřeným vzorkem při nastavení filtru rozptylu světla,

I_o ...je intenzita záření, které prošlo slepým vzorkem,

I_{od} ...je intenzita signálu proudu za temna měřená bezprostředně před měřením slepého vzorku,

I_{os} ...je intenzita záření, které prošlo slepým vzorkem při nastavení filtru rozptylu světla.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Při svých pokusech jsem používala následující chemikálie:

- Bromfenolová modř – Aldrich
- Hydroxid sodný – Lachema s.p. Brno, o.z. Neratovice
- Chloroform – Lachema a.s. Neratovice
- Chlorid draselný – Lachema n.p.Brno, o.z. Neratovice
- Kyselina boritá – Lachema n.p.Brno (krystalická)
- Kyselin fosforečná – Lachema n.p. Brno, o.z. Neratovice
- Kyselina chlorovodíková – Lachema n.p.Brno, o.z. Neratovice
- Kyselina octová – Lach-Ner. s.r.o., Neratovice
- Kyselina pikrová – 2,4,6-trinitrofenol, Polskie odczynniki chemiczne Gliwice (Polsko)
- Methanol – Lach-Ner. s.r.o., Neratovice
- NBD-Cl – Fluka
- Nortriptylin – hydrochlorid - Sigma
- Oranž II – Lachema n.p. Brno, o.z. Neratovice
- Ultračistá voda – připravená reverzní osmózou

4.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Během své práce jsem používala tyto přístroje:

- Digitální analytické váhy (Sartorius)
- Mechanická laboratorní třepačka LT-2 (Kavalier Sázava)
- pH-metr PerpHect 350 (ORION)

- Spektrofotometr HP 8453 (Hewlett-Packard)
- Spektrofotometr Specol (Carl Zeiss, Jena) se speciálním nástavcem ER1
- Termostat UH 16 (Prüfgerate-Werk Medingen)

4.3. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

4.3.1. Příprava zásobního roztoku oranže II

Zásobní roztok oranže II o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ jsem připravila rozpuštěním $0,0876 \text{ g}$ substance v ultračisté vodě v odměrné baňce a doplněním ultračistou vodou na objem 25 ml . Ředěním zásobního roztoku jsem získala roztok o koncentraci $0,001 \text{ mol.l}^{-1}$.

4.3.2. Příprava zásobního roztoku bromfenolové modře

Navážením $0,1730 \text{ g}$ bromfenolové modře, rozpuštěním navážky v ultračisté vodě v odměrné baňce a doplněním ultračistou vodou na objem 25 ml jsem získala zásobní roztok bromfenolové modře o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$. Ředěním zásobního roztoku jsem připravila ostatní roztoky bromfenolové modře.

4.3.3. Příprava zásobního roztoku kyseliny pikrové

Zásobní roztok o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ jsem získala navážením $0,0780 \text{ g}$ kyseliny pikrové, rozpuštěním ve ultračisté vodě v odměrné baňce a doplněním ultračistou vodou na objem 25 ml . Zředěním zásobního roztoku jsem získala roztok o koncentraci $0,001 \text{ mol.l}^{-1}$. Při přípravě roztoků bylo nutné brát v úvahu, že použitá kyselina pikrová obsahovala $26,4 \%$ vlhkosti kvůli bezpečné manipulaci a skladování.

4.3.4. Příprava methanolového roztoku NBD-Cl

Zásobní roztok NBD-Cl o koncentraci $0,3\%$ jsem získala rozpuštěním $0,0750 \text{ g}$ substance v methanolu v odměrné baňce a doplněním methanolem na objem 25 ml .

4.3.5. Příprava roztoků nortriptylinu

4.3.5.1. Příprava zásobního roztoku nortriptylinu pro derivatizaci

Pro přípravu zásobního roztoku nortriptylinu o koncentraci $868 \mu\text{mol.l}^{-1}$ jsem navážila 0,0065 g substance na analytických vahách. Navážku jsem rozpustila v 2 ml methanolu v odměrné baňce a doplnila ultračistou vodou na objem 25 ml. Ze zásobního roztoku jsem připravila ředěním další roztoky nortriptylinu o koncentraci od 8 – 434 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

4.3.5.2. Příprava zásobního roztoku nortriptylinu pro extrakční spektrofotometrii

Na analytických vahách jsem navážila 0,0749 g nortriptylinu, navážku rozpustila v 2 ml methanolu v odměrné baňce a doplnila ultračistou vodou na objem 25 ml. Takto jsem získala roztok nortriptylinu o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$. Ze zásobního roztoku jsem připravovala ředěním ostatní roztoky nortriptylinu.

4.3.6. Příprava tlumivých roztoků

4.3.6.1. Příprava borátového pufru

K přípravě borátového pufru jsem použila 0,620 g kyseliny borité a 0,750 g chloridu draselného. Navážky jsem rozpustila v malém množství ultračisté vody v odměrné baňce a doplnila ultračistou vodou na objem 100 ml. Poté jsem upravila pH roztoku pomocí $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ roztoku hydroxidu sodného.

4.3.6.2. Příprava univerzálního pufru podle H.T.S. Brittona R.A. Robinsona

Brittonův-Robinsonův pufr jsem připravila podle tabulek (11) smísením dvou roztoků v určitém poměru. Ke 100 ml roztoku, který obsahoval $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ kyseliny borité, $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ kyseliny octové a $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ kyseliny fosforečné jsem přidala potřebné množství hydroxidu sodného o koncentraci $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$. Různým přidavkem roztoku hydroxidu sodného jsem získala pufrů o rozdílném pH (viz tab.1).

Tab.1: Příprava univerzálního pufru podle H.T.S. Brittona a R.A. Robinsona

pH pufru	4,10	5,02	6,09	7,00	7,96
Objem $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH (ml)	25,0	35,0	42,5	52,5	60,0

Hodnoty pH všech připravených pufrů byly kontrolovány pH-metrem. V případě potřeby bylo pH upraveno.

4.4. PRACOVNÍ POSTUP

4.4.1. Extrakční spektrofotometrie

4.4.1.1. Obecný pracovní postup

Do vybraných a vymytých zkumavek jsem odpipetovala 1 ml barviva o koncentraci $0,001 \text{ mol.l}^{-1}$, 1 ml vodného roztoku nortriptylinu o příslušné koncentraci a doplnila BR pufrům o zvoleném pH na objem 5 ml vodné fáze. Nakonec jsem do zkumavky přidala z byrety 5 ml chloroformu a následně jsem uzavřela zkumavky parafilmem. Vzorky jsem nechala třepat určitou dobu na laboratorní třepače. Po desetiminutovém stání vzorků ve svislé poloze jsem změřila absorbanci proti slepému vzorku při zvolené vlnové délce. Slepý vzorek jsem připravila stejným způsobem jako měřený vzorek, pouze nortriptylin jsem nahradila stejným množstvím ultračisté vody. Při teplotě pod 23°C může dojít k zakalení chloroformové vrstvy, proto je třeba teplotu udržovat nad touto hranicí během celého měření.

4.4.1.2. Stanovení pH

Pro stanovení optimálního pH reakce jsem postupovala dle obecného pracovního postupu s tím, že jsem použila u jednotlivých vzorků a jim příslušných slepých pokusů roztoky BR pufrů o rozdílném pH v rozmezí od 4 do 8. Vzorky jsem nechala třepat 20 min.

4.4.1.3. Stanovení doby třepání

Stanovení doby třepání probíhalo při optimálním pH zjištěném z předchozího měření. V desetiminutových intervalech jsem odebírala jednotlivé zkumavky (s měřeným vzorkem a se slepým pokusem) k měření absorbancí.

4.4.1.4. Měření absorpční křivky

Absorpční křivku jsem získala proměřováním absorbance při postupně měněné vlnové délce za použití jednoho vzorku a jemu příslušného slepého pokusu.

4.4.1.5. Určení opakovatelnosti stanovení

Pro určení opakovatelnosti stanovení změřila pět vzorků o stejné koncentraci nortriptylinu při optimálních podmínkách zjištěných z předchozích měření.

4.4.1.6. Kalibrační křivka

Pomocí série roztoků nortriptylinu o různé koncentraci byla zhotovena kalibrační křivka. Měření probíhalo při zjištěném optimálním pH a optimální době třepání. Absorbanci jsem měřila při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximumu absorpční křivky daného iontového asociátu.

4.4.2. Derivatizace nortriptylinu

Reakcí nortriptylinu a NBD-Cl v prostředí borátového pufru o pH 9,0 vznikne žlutý produkt, který vykazuje maximum absorbance při 515 nm. Zaměřila jsem se na parametry, které ovlivňují průběh reakce, tzn. sledovala jsem hodnotu absorbance při změně pH reakce, vliv délky třepání na absorbance, dále jsem ověřovala opakovatelnost stanovení a zhotovila kalibrační křivku.

4.4.2.1. Obecný pracovní postup

Do odměrných baněk o objemu 10 ml jsem odpipetovala 1 ml vzorku o zvolené koncentraci (případně 1 ml ultračisté vody pro slepý pokus), 2 ml 0,3 % NBD-Cl a 4 ml borátového pufru o zvoleném pH. Roztoky byly zahřívány na vodní lázni o teplotě 70°C za současného třepání po stanovenou dobu, následně ochlazené pod studenou tekoucí vodou. Po ochlazení jsem přidala do baněk 0,2 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a doplnila ultračistou vodou na objem 10 ml. Absorbance byla měřena na spektrofotometru HP 8453 při vlnové délce 515 nm proti slepému pokusu.

4.4.2.2. Optimalizace podmínek reakce

Pro zjištění vhodného pH reakce jsem proměřila vzorky a příslušné slepé pokusy při pH od 7 do 10 postupem uvedeným výše (kap.4.4.2.1.). Stanovení doby reakce probíhalo při pH zjištěném z předchozího měření. V desetiminutových intervalech jsem odebírala jednotlivé odměrné baňky (s měřeným vzorkem a se slepým pokusem) k měření absorbance. Zároveň bylo ověřeno absorpční maximum při 515 nm.

4.4.2.3. Určení opakovatelnosti stanovení

Pro určení opakovatelnosti stanovení jsem změřila pět vzorků o stejné koncentraci nortriptylinu při optimálních podmínkách zjištěných z předchozích měření.

4.4.2.4. Kalibrační křivka

Proměřením série roztoků nortriptylinu o koncentraci 8 – 434 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ jsem získala kalibrační křivku. Měření probíhalo podle obecného pracovního postupu (viz kap.4.4.2.1.) za optimálních podmínek zjištěných z předchozích měření.

5. VÝSLEDKY

5.1. EXTRAKČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE

5.1.1. Oranž II

Výsledky stanovení nortriptylinu oranží II jsou uvedeny v kapitolách 5.1.1.1. až 5.1.1.5.

5.1.1.1. Vliv pH na absorbanci (A – pH křivka)

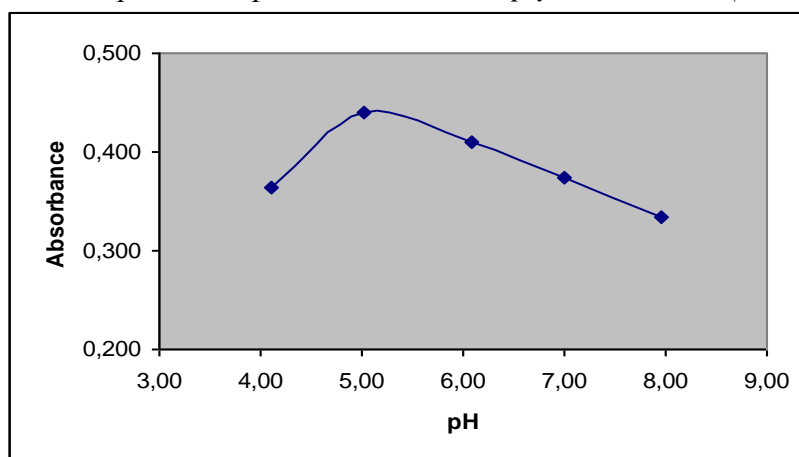
Tab.2. Podmínky stanovení A-pH křivky s oranží II

c (oranž II)	c (nortriptylin)	Doba třepání	λ
0,001 mol.l ⁻¹	0,0001 mol.l ⁻¹	20 min	480nm

Tab.3. A-pH křivka pro stanovení nortriptylinu oranží II ($\lambda=480$ nm)

pH	A
4,10	0,365
5,02	0,440
6,09	0,410
7,00	0,375
7,96	0,335

Obr.7. A-pH křivka pro stanovení nortriptylinu oranží II ($\lambda=480$ nm)



5.1.1.2. Závíslost absorbance na době třepání

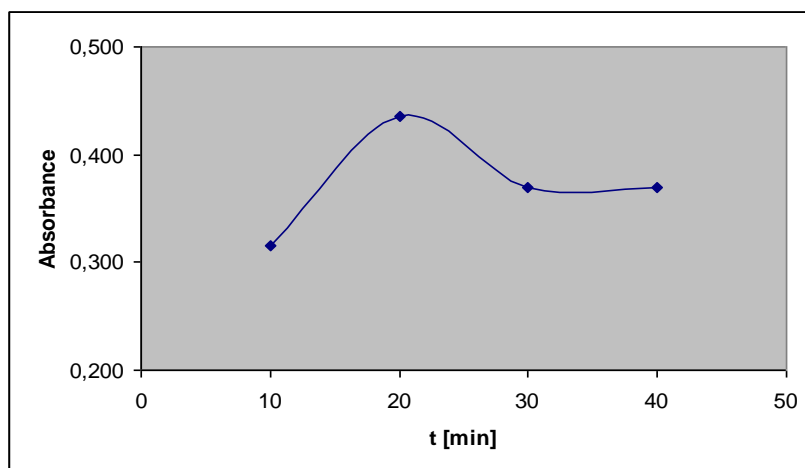
Tab.4. Podmínky stanovení doby třepání s oranží II

c (oranž II)	c (nortriptylin)	pH	λ [nm]
0,001 mol.l ⁻¹	0,0001 mol.l ⁻¹	5,02	480 nm

Tab.5. Závíslost absorbance na době třepání s oranží II

t [min]	A
10	0,315
20	0,435
30	0,370
40	0,370

Obr. 8. Závíslost absorbance na době třepání s oranží II



5.1.1.3. Absorpční křivka

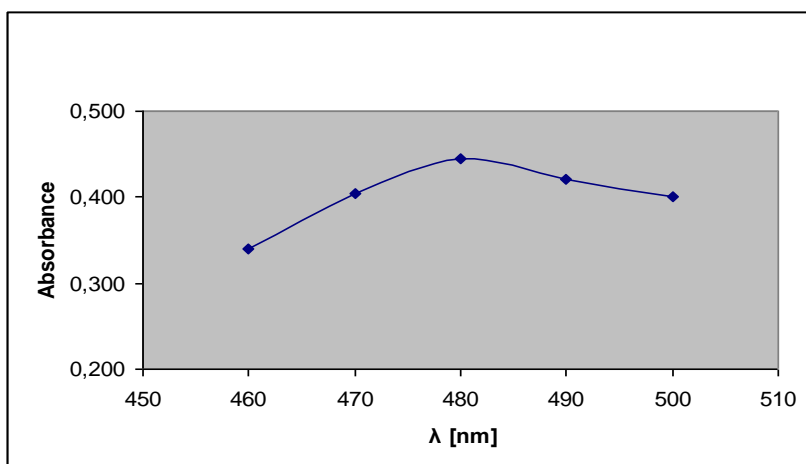
Tab.6. Podmínky stanovení absorpční křivky s oranží II

c (oranž II)	c (nortriptylin)	Doba třepání	pH
0,001 mol.l ⁻¹	0,0001 mol.l ⁻¹	20min	5,02

Tab.7. Absorpční křivka pro stanovení nortriptylinu s oranží II

λ [nm]	A
460	0,340
470	0,405
480	0,445
490	0,420
500	0,400

Obr.9. Absorpční křivka pro stanovení nortriptylinu s oranží II



5.1.1.4. Opakovatelnost stanovení

Tab.8. Podmínky pro opakovatelnost stanovení nortriptylinu s oranží II

c (oranž II)	c (nortriptylin)	Doba třepání	pH	λ [nm]
0,001 mol.l ⁻¹	0,00015 mol.l ⁻¹	20 min	5,02	480

Tab.9. Opakovatelnost stanovení nortriptylinu s oranží II

Číslo	A
1	0,710
2	0,700
3	0,700
4	0,680
5	0,700
Průměr	0,698
SD	0,010
RSD (%)	1,404

5.1.1.5. Kalibrační křivka

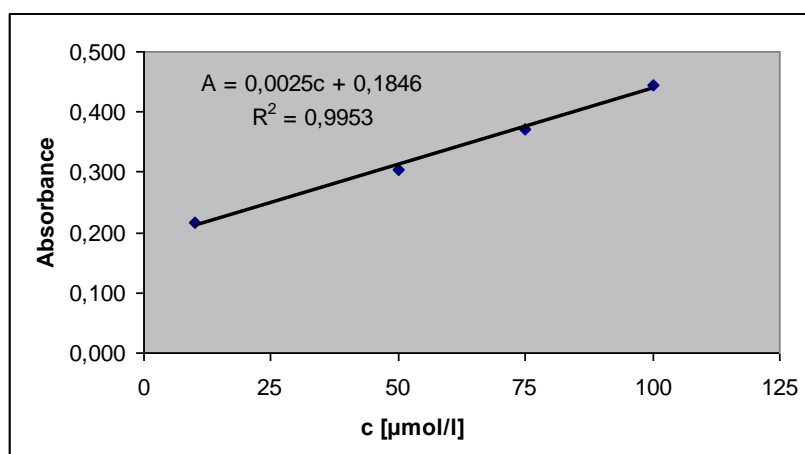
Tab.10. Podmínky stanovení kalibrační křivky s oranží II

c (oranž II)	pH	Doba třepání	λ [nm]
0,001 mol.l ⁻¹	5,02	20 min	480

Tab.11. Kalibrační křivka pro stanovení nortriptylinu oranží II ($\lambda=480$ nm)

c (nortriptylin) [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	A
10	0,215
50	0,305
75	0,370
100	0,445

Obr.10. Kalibrační křivka pro stanovení nortriptylinu oranží II ($\lambda=480$ nm)



5.1.2. Bromfenolová modř

Výsledky stanovení nortriptylinu bromfenolovou modří jsou uvedeny v kapitolách 5.1.2.1. až 5.1.2.5.

5.1.2.1. Vliv pH na absorbanci (A-pH křivka)

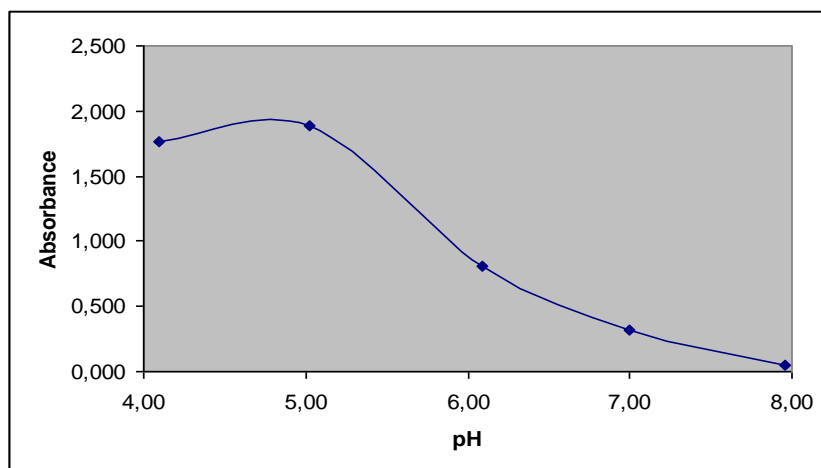
Tab.12. Podmínky stanovení A-pH křivky s bromfenolovou modří

c (bromfenolová modř)	c (nortriptylin)	Doba třepání
0,001 mol.l ⁻¹	0,0005 mol.l ⁻¹	20 min

Tab.13. A-pH křivka pro stanovení nortriptylinu bromfenolovou modří při 420 nm a 610 nm

pH	A ($\lambda = 420\text{nm}$)	A ($\lambda = 610\text{nm}$)
4,10	1,760	0,025
5,02	1,890	0,045
6,09	0,810	0,005
7,00	0,315	0,020
7,96	0,050	0,005

Obr.11. A-pH křivka pro stanovení nortriptylinu bromfenolovou modří ($\lambda = 420\text{ nm}$)



5.1.2.2. Závislost absorbance na době třepání

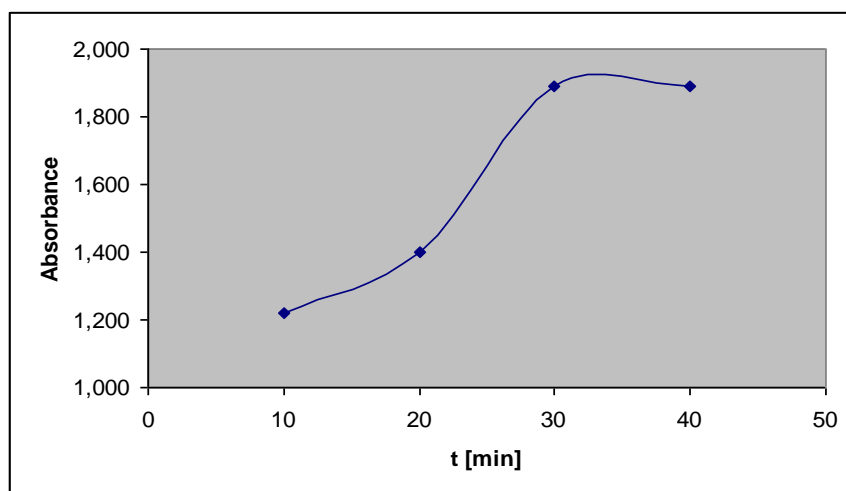
Tab.14. Podmínky stanovení doby třepání s bromfenolovou modří

c (bromfenolová modř)	c (nortriptylin)	λ [nm]	pH
0,001 mol.l ⁻¹	0,0005 mol.l ⁻¹	420	5,02

Tab.15. Závislost absorbance na době třepání s bromfenolovou modří ($\lambda=420$ nm)

t [min]	A
10	1,220
20	1,400
30	1,890
40	1,890

Obr.12. Závislost absorbance na době třepání s bromfenolovou modří ($\lambda=420$ nm)



5.1.2.3. Absorpční křivka

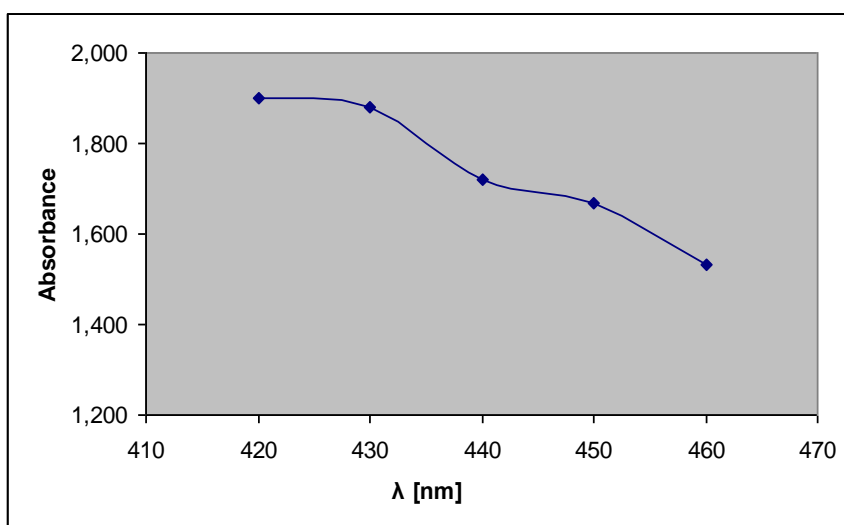
Tab.16. Podmínky stanovení absorpční křivky s bromfenolovou modří

c (bromfenolová modř)	c (nortriptylin)	Doba třepání	pH
0,001 mol.l ⁻¹	0,0005 mol.l ⁻¹	30 min	5,02

Tab.17. Absorpční křivka pro stanovení nortriptylinu bromfenolovou modří

λ [nm]	A
420	1,900
430	1,880
440	1,720
450	1,670
460	1,530

Obr.13. Absorpční křivka pro stanovení nortriptylinu bromfenolovou modří



5.1.2.4. Opakovatelnost stanovení

Tab.18. Podmínky pro opakovatelnost stanovení nortriptylinu s bromfenolovou modří

c (bromfenolová modř)	c (nortriptylin)*	Doba třepání	pH	λ [nm]
0,001 mol.l ⁻¹	0,00005 mol.l ⁻¹	30 min	5,02	420

*Naměřené hodnoty absorbance při koncentraci 0,0005 mol.l⁻¹ nortriptylinu v předchozích měřeních přesahovaly rozsah přístroje, proto bylo třeba zvolit řadově nižší koncentrace.

Tab.19. Opakovatelnost stanovení nortriptylinu s bromfenolovou modří

Číslo	A
1	0,280
2	0,275
3	0,290
4	0,275
5	0,265
Průměr	0,277
SD	0,008
RSD (%)	2,933

5.1.2.5. Kalibrační křivka

Tab.20. Podmínky stanovení kalibrační křivky s bromfenolovou modří

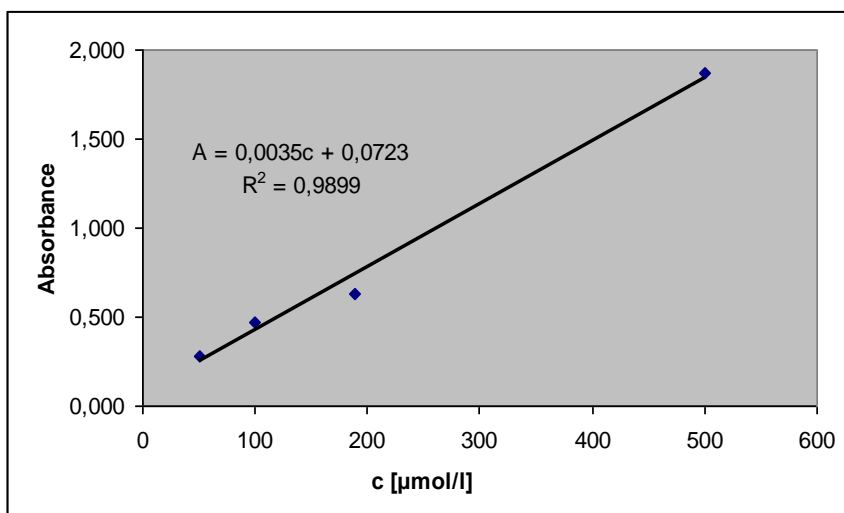
c (bromfenolová modř)	λ [nm]	Doba třepání	pH
0,001 mol.l ⁻¹	420	30 min	5,02

Tab.21. Kalibrační křivka pro stanovení nortriptylinu bromfenolovou modří ($\lambda=420$ nm)

c (nortriptylin) [μ mol.l ⁻¹]	A
50	0,285
100	0,470
188	0,630
250	0,700*
500	1,870

*V průběhu měření se tvořily zákal chloroformové vrstvy, proto nemůžeme s naměřenou hodnotou počítat.

Obr.14. Kalibrační křivka pro stanovení nortriptylinu bromfenolovou modří ($\lambda=420\text{ nm}$)



5.1.3. Kyselina pikrová

Výsledky stanovení nortriptylinu kyselinou pikrovou jsou uvedeny v kapitolách 5.1.3.1. až 5.1.3.5.

5.1.3.1. Vliv pH na absorbanci (A- pH křivka)

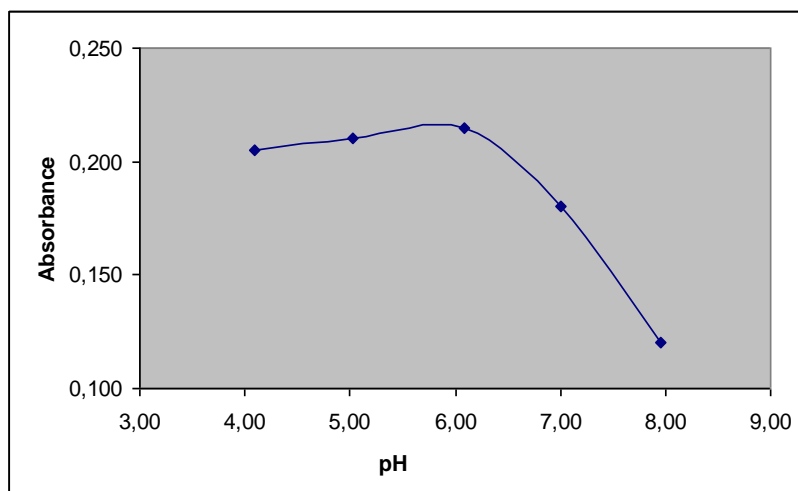
Tab.22 Podmínky stanovení A-pH křivky s kyselinou pikrovou ($\lambda=410$ nm).

c (kyselina pikrová)	c (nortriptylin)	Doba třepání	λ
0,001 mol.l ⁻¹	0,0001 mol.l ⁻¹	20 min	410 nm

Tab.23. A-pH křivka pro stanovení nortriptylinu kyselinou pikrovou ($\lambda=410$ nm).

pH	A
4,10	0,205
5,02	0,210
6,09	0,215
7,00	0,180
7,96	0,120

Obr.15. A-pH křivka pro stanovení nortriptylinu kyselinou pikrovou ($\lambda=410$ nm).



5.1.3.2. Závislost absorbance na době třepání

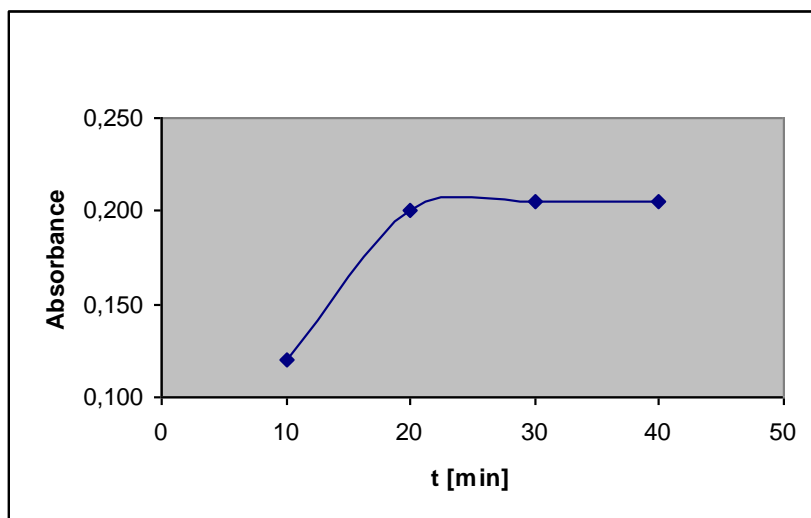
Tab.24. Podmínky stanovení doby třepání s kyselinou pikrovou ($\lambda=410\text{ nm}$)

c (kyselina pikrová)	c (nortriptylin)	pH	λ [nm]
0,001 mol.l ⁻¹	0,0001 mol.l ⁻¹	6,09	410

Tab.25. Závislost absorbance na době třepání s kyselinou pikrovou ($\lambda=410\text{ nm}$)

t [min]	A
10	0,120
20	0,200
30	0,205
40	0,205

Obr.16. Závislost absorbance na době třepání s kyselinou pikrovou ($\lambda=410\text{ nm}$)



5.1.3.3. Absorpční křivka

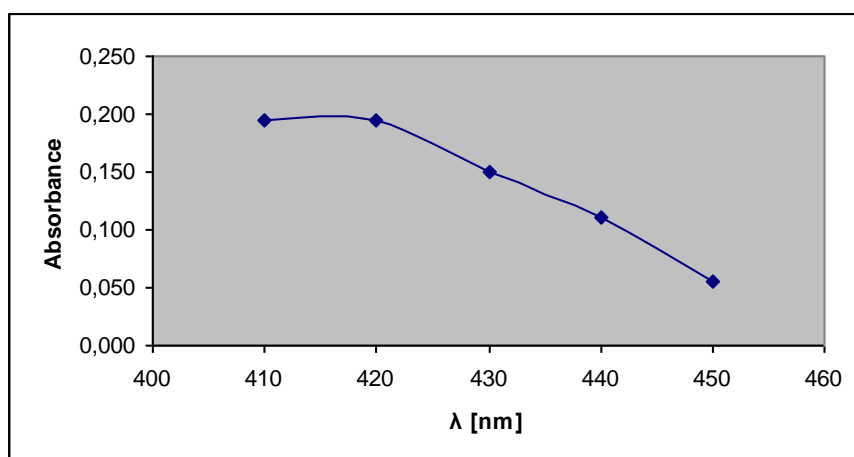
Tab.26. Podmínky stanovení absorpční křivky s kyselinou pikrovou

c (kyselina pikrová)	c (nortriptylin)	Doba třepání	pH
0,001 mol.l ⁻¹	0,0001 mol.l ⁻¹	30 min	6,09

Tab.27. Absorpční křivka pro stanovení nortriptylinu kyselinou pikrovou

λ [nm]	A
410	0,195
420	0,195
430	0,150
440	0,110
450	0,055

Obr.17. Absorpční křivka pro stanovení nortriptylinu kyselinou pikrovou



5.1.3.4. Opakovatelnost stanovení

Tab.28. Podmínky pro opakovatelnost stanovení nortriptylinu s kyselinou pikrovou ($\lambda=420$ nm)

c (kyselina pikrová)	c (nortriptylin)*	Doba třepání	pH	λ [nm]
0,001 mol.l ⁻¹	0,0005 mol.l ⁻¹	30 min	6,09	420

*Naměřené hodnoty absorbance při původně zvolené koncentraci 0,0001 mol.l⁻¹ byly nízké, proto jsem měřila při vyšší koncentraci nortriptylinu.

Tab.29. Opakovatelnost stanovení nortriptylinu s kyselinou pikrovou ($\lambda=420$ nm)

Číslo	A
1	0,865
2	0,870
3	0,875
4	0,870
5	0,865
Průměr	0,869
SD	0,003
RSD (%)	0,393

5.1.3.5. Kalibrační křivka

Tab.30. Podmínky stanovení kalibrační křivky s kyselinou pikrovou ($\lambda= 420$ nm)

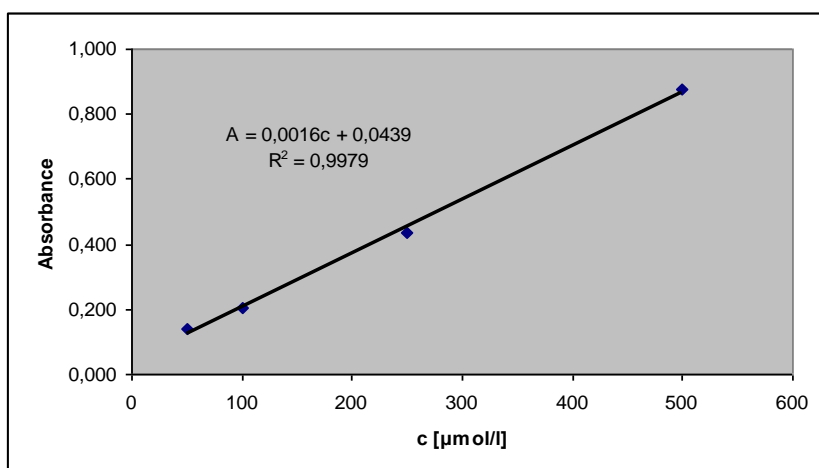
c (kyselina pikrová)	Doba třepání	pH	λ [nm]
0,001 mol.l ⁻¹	30 min	6,09	420

Tab.31. Kalibrační křivka pro stanovení nortriptylinu kyselinou pikrovou ($\lambda= 420$ nm)

c (nortriptylinu) [μ mol.l ⁻¹]	A
50	0,140
100	0,205
250	0,435
500	0,875
750	1,600*

*Tuto hodnotu absorbance nelze považovat za spolehlivou vzhledem k tvorbě zákalu v obou vrstvách. Není proto zahrnuto do kalibrační křivky.

Obr.18. Kalibrační křivka pro stanovení nortriptylinu kyselinou pikrovou ($\lambda = 420 \text{ nm}$)



5.2. DERIVATIZACE NORTRIPTYLINU

Výsledky derivatizace nortriptylinu NBD-Cl jsou uvedeny v kapitolách 5.2.1. až 5.2.5.

5.2.1. Vliv pH na absorbanci (A-pH křivka)

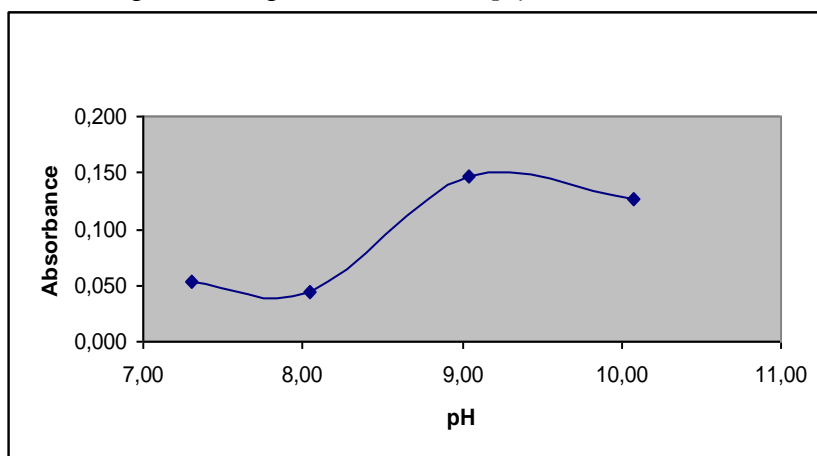
Tab.32. Podmínky stanovení A-pH křivky

c (nortriptylin)	c (NBD-Cl)	Vlnová délka	Doba třepání
86 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,3%	515 nm	30 min

Tab.33. A-pH křivka pro reakci nortriptylinu s NBD-Cl

pH	A
7,30	0,053
8,05	0,044
9,04	0,147
10,08	0,126

Obr.19. A-pH křivka pro reakci nortriptylinu s NBD-Cl



5.2.2. Závislost absorbance na době reakce

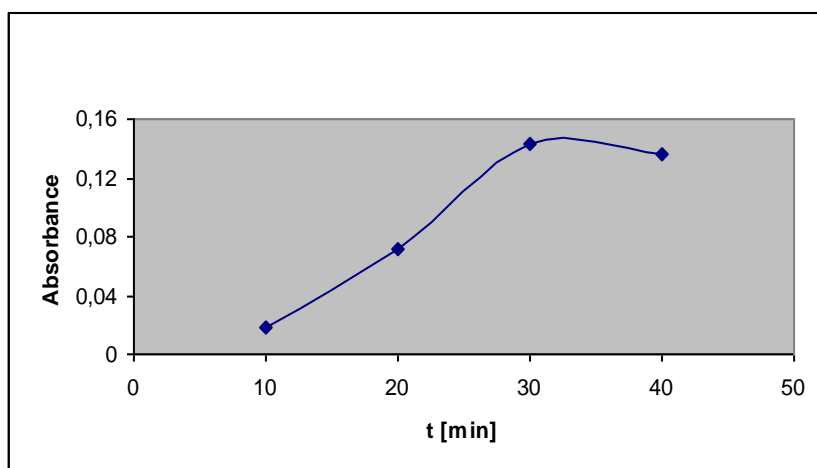
Tab.34. Podmínky stanovení doby reakce

c (nortriptylin)	c (NBD-Cl)	Vlnová délka	pH
86 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,3%	515 nm	9,04

Tab.35. Závislost absorbance na době reakce

t [min]	A
10	0,018
20	0,071
30	0,143
40	0,136

Obr.20. Závislost absorbance na době reakce

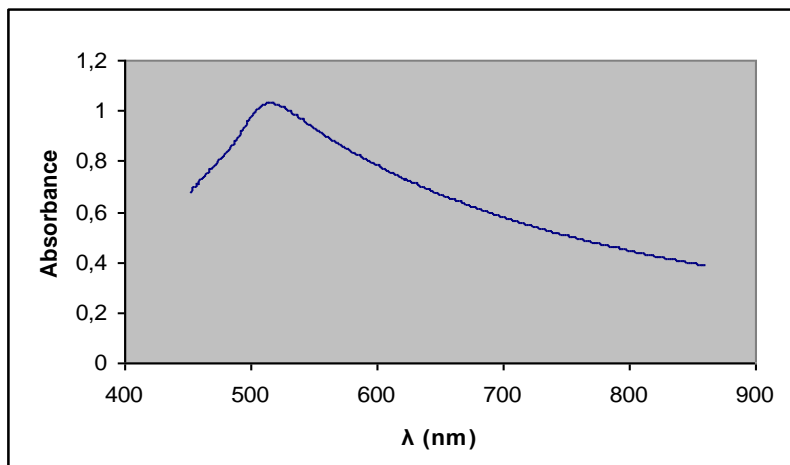


5.2.3. Absorpční křivka

Tab.34. Podmínky stanovení absorpční křivky

c (nortriptylin)	c (NBD-Cl)	pH	Doba třepání
868 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,3%	9,04	30 min

Obr.21. Absorpční křivka pro reakci nortriptylinu s NBD-Cl



5.2.4. Opakovatelnost stanovení

Tab.35. Podmínky pro opakovatelnost stanovení

c (nortriptylin)	c NBD-Cl)	Vlnová délka	pH	Doba třepání
260 $\mu\text{g/ml}$	0,3%	515 nm	9,04	30 min

Tab.36. Opakovatelnost stanovení nortriptylinu s NBD-Cl

Číslo	A
1	0,835
2	0,757
3	0,748
4	0,830
5	0,916
Průměr	0,817
SD	0,061
RSD (%)	7,474

5.2.5. Kalibrační křivka

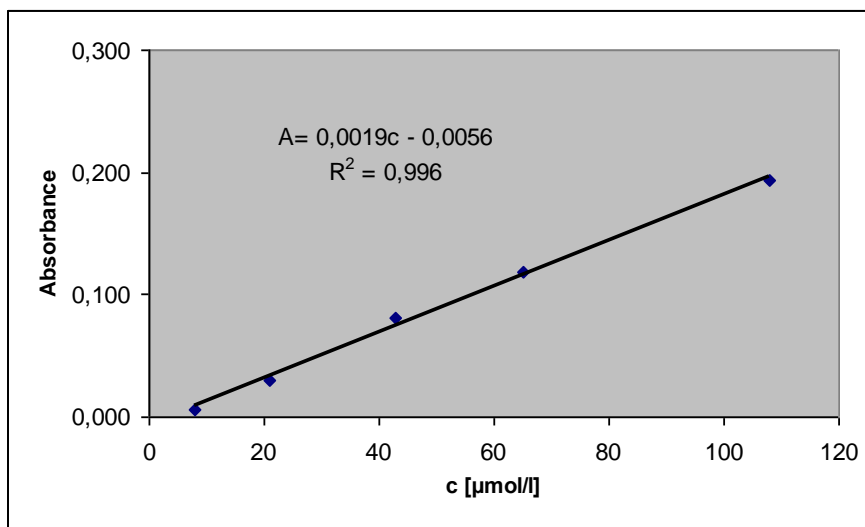
Tab.37. Podmínky stanovení kalibrační křivky

c(NBD-Cl)	Vlnová délka	pH	Doba třepání
0,3%	515 nm	9,04	30 min

Tab.38. Kalibrační křivka (konc. rozmezí 8 – 108 $\mu\text{mol/l}$) pro stanovení nortriptylinu s NBD-Cl

c (nortriptylin)[$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	A
8	0,0063
21	0,0308
43	0,0816
65	0,1192
108	0,1928

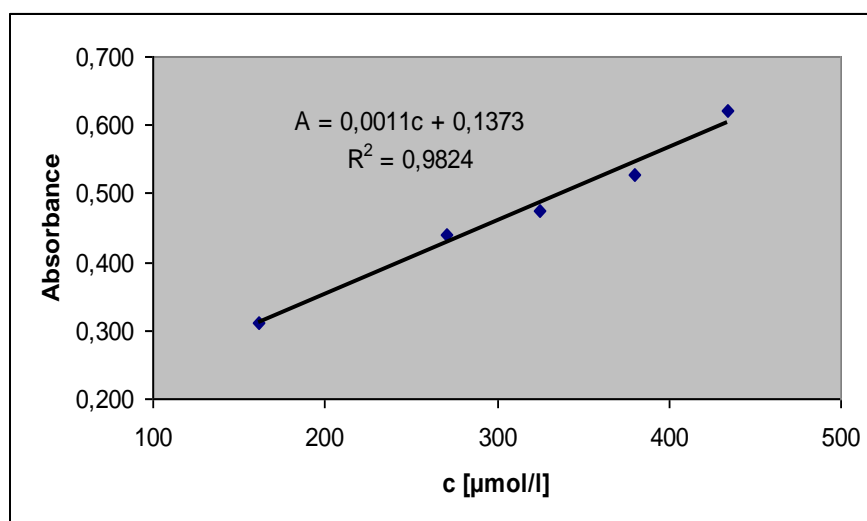
Obr.22. Kalibrační křivka (koncentrační rozmezí 8 – 108 $\mu\text{mol/l}$) pro stanovení nortriptylinu s NBD-Cl



Tab.39. Kalibrační křivka (koncentrační rozmezí 162-434 $\mu\text{mol/l}$) pro stanovení nortriptylinu s NBD-Cl

c (nortriptylin) [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	A
162	0,3121
271	0,4405
325	0,4751
380	0,5267
434	0,6202

Obr.23. Kalibrační křivka (konc. rozmezí 162 – 434 $\mu\text{mol/l}$) pro stanovení nortriptylinu s NBD-Cl



6. DISKUSE

6.1. EXTRAKČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE

6.1.1. Vliv pH na absorbanci (A-pH křivka)

Podle kap. 5.1.1.1, 5.1.2.1 a 5.1.3.1., kde jsou uvedeny výsledky sledování vlivu pH na absorbanci, lze usoudit, že při použití pufrů o různém pH se mění disociační poměry a tím schopnost interakce mezi nortriptylin a činidlem. Z A-pH křivek (obr.7, obr.11 a obr.15) vyplývá, že optimální pH pro reakci léčiva s oranží II a bromfenolovou modří je 5,02, zato optimální hodnota pH pro iontové asociáty s kyselinou pikrovou je 6,09.

Z porovnání všech tří A-pH křivek plyne, že nejvýraznější maximum se nachází na obr. 7 pro stanovení nortriptylinu s oranží II. V dalších dvou případech A-pH křivka nejprve se zvyšujícím se pH jen nevýrazně stoupá a za svým maximem rychle klesá. Nejvýraznější pokles při vyšších hodnotách pH byl zaznamenán u A-pH křivky bromfenolové modří při $\lambda = 420$ nm. To lze vysvětlit spolupůsobením dvou faktorů: především se stoupajícím pH klesá ionizace nortriptylinu. Druhým faktorem je, že postupně dochází k disociaci bromfenolové modří na anion se dvěma zápornými náboji, který výrazně obtížněji vytváří za daných podmínek iontové asociáty a zároveň obtížněji následně přechází do chloroformové vrstvy.

6.1.2. Stanovení doby třepání

Při sledování vlivu doby třepání na absorbanci iontového páru (viz kap.5.1.1.2, 5.1.2.2. a 5.1.3.2) jsem zjistila, že dostatečná doba třepání pro reakci nortriptylinu s bromfenolovou modří a kyselinu pikrovou je 30 min. Pak již hodnoty absorbance v těchto případech nestoupají. Pouze u iontového asociátu léčivo – oranž II se růst absorbance ustálil již po 20 min třepání.

Velmi zajímavou situaci lze pozorovat na obr. 8. V tomto případě je absorbance po 20 minutách nejvyšší, při delším třepání dochází k jejímu poklesu. Přitom nejde o náhodný jev, neboť se objevuje i v případě opakování pokusu a byl zjištěn již dříve u jiných dvojic analyt-barvivo (12). Autorovi práce (12), ani nám se však nepodařilo tento jev uspokojivě vysvětlit. Snad by mohl souviset se změnami na fázovém rozhraní během třepání.

6.1.3. Absorpční křivka pro stanovení nortriptylinu

Absorpční maxima jednotlivých iontových asociátů byla zjištěna při vlnové délce (viz kap. 5.1.1.3, 5.1.2.3. a 5.1.3.3): léčivo – oranž II 480 nm, léčivo – bromfenolová modř 420 nm, léčivo – kyselina pikrová 420 nm.

Zde je třeba konstatovat, že skutečným maximem je pouze 480 nm, vlnová délka absorpčního maxima pro iontový pár léčivo – oranž II. V dalších dvou případech jde sice o vlnové délky, při nichž byly zjištěny nejvyšší hodnoty absorbancí, aniž by ovšem byly ověřovány absorbance při vlnových délkách nižších. Tato skutečnost je dána omezenými možnostmi přístroje. Přístroj Spekol, použitý k měření, jehož stáří je 33 let, již není schopen spolehlivého měření absorbancí pod 410 nm.

V případě stanovení nortriptylinu s kyselinou pikrovou byly úvodní pokusy (stanovení A-pH křivky a stanovení optimální doby třepání) provedeny při 410 nm, což je vlnová délka odhadnutá původně jako absorpční maximum. Odhad byl proveden na základě předchozích zkušeností s kyselinou pikrovou v iontově párové extrakční spektrofotometrii (6). Po změření absorpční křivky iontového páru nortriptylin-kyselina pikrová v chloroformu (viz obr.17) se ukázalo, že tento iontový pár absorbuje při 420 nm stejně. V dalších pokusech byla pak použita vlnová délka 420 nm, při níž byla očekávána větší spolehlivost přístroje Spekol.

6.1.4. Opakovatelnost stanovení

6.1.4.1. Oranž II

Při pěti měřeních absorbance byla ve zkumavkách při průměrné hodnotě absorbance 0,698 nalezena směrodatná odchylka 0,010 a relativní směrodatná odchylka 1,404 % (viz kap.5.1.1.4.).

6.1.4.2. Bromfenolová modř

Při pěti měřeních absorbance byla ve zkumavkách při průměrné hodnotě absorbance 0,277 nalezena směrodatná odchylka 0,008 a relativní směrodatná odchylka 2,933 % (viz kap.5.1.2.4.)

6.1.4.3. Kyselina pikrová

Při pěti měřeních absorbance byla ve zkumavkách při průměrné hodnotě absorbance 0,869 nalezena směrodatná odchylka 0,003 a relativní směrodatná odchylka 0,393 % (viz kap.5.1.3.4.)

Z těchto výsledků vyplývá, že opakovatelnost stanovení je ve všech případech velmi dobrá, opakovatelnost stanovení s kyselinou pikrovou lze dokonce označit za výbornou.

6.1.5. Kalibrační křivka

6.1.5.1. Oranž II

Absorbanci jsem měřila při vlnové délce 480 nm proti slepému pokusu. Kalibrační křivka je lineární do koncentrace cca $1 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹. Příslušná regresní rovnice je $A = 0,0025c + 0,1846$ a čtverec korelačního koeficientu (koeficient determinace) je $R^2 = 0,9953$ (obr.10).

6.1.5.2. Bromfenolová modř

Absorbanci jsem měřila při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu absorpční křivky daného iontového asociátu. Kalibrační křivka je lineární do koncentrace cca $5 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹, přičemž během měření se tvořily zákaly chloroformové vrstvy, proto jsem s jednou hodnotou absorbance nemohla počítat. Regresní rovnice má v tomto případě tvar $A = 0,0035c + 0,0723$ a čtverec korelačního koeficientu (koeficient determinace) je $R^2 = 0,9899$ (obr.14).

6.1.5.3. Kyselina pikrová

Absorbanci jsem měřila při vlnové délce 420 nm proti slepému pokusu. Kalibrační křivka je lineární do koncentrace cca $5 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹. Jedna hodnota absorbance nebyla zahrnuta do kalibrační křivky, protože se během měření tvořily zákaly v obou vrstvách. Regresní rovnice je $A = 0,0016c + 0,0439$ a čtverec korelačního koeficientu (koeficient determinace) nabývá hodnoty $R^2 = 0,9979$ (obr.18).

Všechny tři kalibrační křivky jsou lineární v poměrně širokém rozsahu koncentrací. Zdanlivé molární absorpční koeficienty jsou dostatečně vysoké, zvláště u iontového páru nortriptylin-bromfenolová modř, kdy tento koeficient dosahuje přibližně dvojnásobku v porovnání s hodnotou pro iontový pár nortriptylin-kyselina pikrová. To

není nikterak překvapující závěr, neboť relativně nízké hodnoty molárních absorpčních koeficientů iontových párů s pikrátovým aniontem jsou známou slabinou při použití kyseliny pikrové v roli iontově párového činidla v extrakční spektrofotometrii (13).

U analytických rovnic kalibračních křivek (přesněji přímek) si zaslouží pozornost poměrně vysoké hodnoty absolutních členů. To je možné interpretovat tak, že kalibrační křivky jsou lineární v rozsazích koncentrací nortriptylinu, které byly experimentálně ověřeny, avšak při koncentracích nižších již není možné lineární průběh kalibračních přímek automaticky předpokládat. V případě potřeby bude nutné při konkrétních stanoveních u nízkých koncentrací linearitu kalibrační křivky ověřovat, popřípadě stanovit mez, po kterou je kalibrační přímka lineární.

6.2. DERIVATIZACE NORTRIPTYLINU

Z A-pH křivky pro stanovení reakce nortriptylinu s NBD-Cl (obr.19) je patrné, že optimální pH reakce je 9,06. Podle kap.5.2.2., kde jsou uvedeny výsledky sledování závislosti absorbance na době reakce, lze usoudit, že pro reakci postačí 30 min. Absorpční maximum iontového asociátu léčivo – NBD-Cl bylo zjištěno při 515 nm (obr.21). Při průměrné hodnotě absorbance 0,817 (5 měření) byla nalezena směrodatná odchylka 0,061 a relativní směrodatná odchylka 7,474 % (tab.36). Kalibrační křivka byla měřena do cca 434 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Ukázalo se, že tento celý koncentrační rozsah je vhodné rozdělit na dvě kalibrační křivky s lineárním průběhem. Na základě této skutečnosti se lze domnívat, že průběh reakce, vyjádřený její stechiometrií, závisí na molárním poměru analyt-činitel. Přitom lepší linearity dosahuje kalibrační křivka v rozmezí 8 – 108 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Z toho lze soudit, že nad koncentrací nortriptylinu 108 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ začíná docházet ke změně reakčního mechanismu a tato oblast již není vhodná k účelům kvantitativní analýzy.

Použití NBD-Cl jako derivatizačního činidla pro primární a sekundární aminy je v literatuře popisováno ke zvýšení citlivosti stanovení v UV-VIS oblasti nebo k získání fluoreskujícího produktu. Derivatizaci nortriptylinu jako vnitřního standardu tímto činidlem při fluorimetrické detekci amlodipinu popisuje literatura (14). Derivatizační reakci amlodipinu NBD-Cl se snažil podle (14) reprodukovat Vrága (15), který zjistil zásadní nedostatky v popisovaném postupu, a musel tento postup modifikovat. Podobně se v této diplomové práci nepodařilo postupem podle (14) nalézt fluoreskující derivát. To lze patrně vysvětlit sterickými důvody. Nortriptylin je sekundární amin. Methylová skupina na dusíku aminoskupiny je volně otáčivá a s ohledem na svou velikost může zabraňovat NBD-Cl v přístupu k reakčnímu místu zvláště, je-li reakce prováděna za vyšší teploty. Snížení reakční teploty by ovšem vedlo podle Arrheniovy rovnice k neúnosnému vzrůstu reakční doby nebo výraznému poklesu citlivosti. Z mých i dřívějších (15) zjištění vyplývá, že k výsledkům práce (14) je třeba přistupovat velmi obezřetně.

Při zkoumání příčin selhání zkoumané reakce byla uvažována také alternativa, že derivát nortriptylinu s NBD-Cl vznikne, ale sám zhasí fluorescenci díky značným možnostem rotace vzniklé molekuly jako celku i rotaci fluoroforu. Tato alternativa se

však jeví jako málo pravděpodobná, neboť v případě její platnosti by se musel obdobný jev uplatnit u fluoreskujícího derivátu lisinoprilu podle (3).

7. ZÁVĚR

V práci jsou testovány tři látky v roli protiiontů při iontově párové extrakční spektrofotometrii nortriptylinu a jedno derivatizační činidlo pro UV-VIS absorpční spektrofotometrii.

V zásadě je možné konstatovat, že všechny testované postupy přinesly poznatky využitelné ke stanovení nortriptylinu v reálných vzorcích. Při volbě konkrétního barevného protiiontu při iontově párové extrakční spektrofotometrii je výhodou bromfenolové modři vysoký zdánlivý molární absorpční koeficient, proto je možné bromfenolovou modř doporučit pro stanovování nižších koncentrací nortriptylinu. Při vývoji metodiky stanovení s tímto barvivem je ovšem mít neustále na paměti možnost tvorby anionů se dvěma náboji v závislosti na podmínkách stanovení a na vlastnostech matrice vzorku. Extrakčně spektrofotometrické stanovení nortriptylinu s oranží II je podle výsledků této diplomové práce rovněž možné. Použití kyseliny pikrové k tomuto účelu lze také doporučit. Jedinou nevýhodou tohoto činidla je relativně nízký zdánlivý molární absorpční koeficient příslušného iontového páru. Tato nevýhoda by ovšem byla při konkrétních stanoveních patrně kompenzována lineárním průběhem kalibrační křivky do velmi nízkých koncentrací. Tento fakt a vynikající opakovatelnost stanovení kyselinu pikrovou mírně favorizují oproti předchozím dvěma činidlům.

Derivatizace nortriptylinu s NBD-Cl je experimentálně náročnější a pracnější v porovnání s extrakční spektrofotometrií. Největší výhodou tohoto postupu oproti extrakční spektrofotometrii je dosažení vysoké citlivosti stanovení. Na druhou stranu byla u tohoto stanovení zjištěna výrazně horší opakovatelnost.

Celkově lze říci, že iontově párová extrakční spektrofotometrie poskytuje spolehlivé výsledky stanovení nortriptylinu na vyšších hladinách koncentrací a je jí možné použít například ke stanovení obsahu nortriptylinu v léčivých přípravcích. Metoda derivatizace nortriptylinu s NBD-Cl se uplatní tam, kde je nutné stanovovat nižší koncentrace. Oba zmíněné postupy jsou použitelné i při analýze složitějších vzorků, neboť jde o postupy do jisté míry selektivní. V případě analýz konkrétních vzorků bude ovšem třeba selektivitu stanovení ověřit a stanovit meze detekce.

8. LITERATURA

- (1) Kolektiv autorů: Remedia Kompendium, třetí vydání, Panax, Praha 1999.
- (2) Prochazka A.V., Weaver M.J., Keller R.T. et al: Randomized trial of nortriptyline for smoking cessation, Arch Intern Med 158 (1998), 2035-2039.
- (3) El-Emam A.A. et al: Determination of Lisinopril in Dosage Forms and Spiked Human Plasma through Derivatization with 7-chlor-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) Followed by Spectrophotometry or HPLC with Fluorimetric Detection, J.Pharm.Biomed.Anal 34 (2004), 35-44..
- (4) Pesez M., Batros J.: Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compounds and Drugs, Dekker, New York (1974), 170
- (5) Český lékopis 2002, GRADA Publishing, Praha 2003.
- (6) Gasparič J., Šubert J., Čižmárik J.: Extrakčně – fotometrická stanovení léčiv za použití 2,4,6-trinitrofenolu I., Československá farmacie, 39 /10/(1990), 458-461.
- (7) Gasparič J., Baruchová A., Horká I.: Zjednodušený postup pro extrakčně – fotometrická stanovení organických látek, Chem. Listy 80, 1214 /1986/.
- (8) Koula V., Kučová D., Gasparič J.: Determination of Organic Bases by Ion-pair Extraction Polarography Using Orange II as Counter Ion. Collect. Czech. Chem. Commun. 57 (1992), 2272 – 2278.
- (9) Zografí G., Patel R.P., Werner N.D. : Interaction Between Orange II and Selected Long Chain Quaternary Ammonium Salts, J. Pharm. Sci. 53 (1964), 544 - 549
- (10) Banyai E.: Acid-base Indicators v knize Bishop E. Indicators Pergamon Press Oxford, New York, Toronto 1972
- (11) Sýkora V.: Chemicko-analytické tabulky. SNTL, Praha 1976
- (12) Augustin M.: Diplomová práce, UK Praha, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra biofyziky a fyzikální chemie, 2001.
- (13) Voděrka J.: Diplomová práce, UK Praha, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra biofyziky a fyzikální chemie, 1999.
- (14) Tatar S., Atmaca S.: Determination of Amlodipine in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, J. Chromatogr. B 758 (2001), 305-310.

(15) Vrága I.: Diplomová práce, UK Praha, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra biofyziky a fyzikální chemie, 2004.

9. SEZNAM ZKRATEK

<i>BR pufr</i>	Brittonův-Robinsonův pufr
<i>GABA</i>	kyselina γ -aminomáselná
<i>NBD-Cl</i>	7-chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
<i>RSD</i>	relativní směrodatná odchylka
<i>SD</i>	směrodatná odchylka
<i>TCA</i>	tricyklická antidepresiva