

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**POLAROGRAFICKÉ STANOVENÍ
PRO TINÁDOROVÝCH LÉČIV**

Bakalářská práce

Praha 2006

Jitka Hladíková

Prohlášení

Tato bakalářská práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2005 – 2006, pod vedením školitele Prof. RNDr. Jiřího Barka, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem veškerou použitou literaturu řádně citovala.

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

V Praze dne 5. května 2006

.....*Jitka Hrdličková*.....

podpis

Předmětová hesla: protinádorová léčiva
polarografie
rtuťová elektroda

Klíčová slova: chinazolin
DC tast polarografie
diferenční pulsní polarografie
rtuťová kapková elektroda

Úvodem bych chtěla poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a všem členům Katedry analytické chemie za odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

Současně bych ráda poděkovala i Mgr. Vlastimilu Vyskočilovi a Mgr. Karolině Peckové za vřelý přístup a ochotu, se kterou mi poskytovali pomoc.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, celé rodině i přátelům za podporu.

Obsah

1. Úvod	7
1.1 Biologické účinky, využití a stanovení protinádorových léčiv	7
1.2 Použitá pracovní elektroda	9
1.3 Cíl práce	10
2. Experimentální část	11
2.1 Reagencie	11
2.2 Studovaná látka	12
2.3 Aparatura	13
2.4 Použitá pracovní elektroda	13
2.5 Pracovní postupy	15
2.6 Stálost zásobního roztoku chinazolinu	16
3. Polarografické stanovení chinazolinu na klasické rtuťové kapkové elektrodě	18
3.1 DC tast polarografie chinazolinu	18
3.2 Diferenční pulsní polarografie chinazolinu	27
4. Závěr a diskuse	38

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	absorbance [AU]
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
c	molární koncentrace [mol.L^{-1}]
C.A.S.	Chemical Abstract Service
CNS	centrální nervová soustava
DCTP	tast polarografie
DME	klasická rtuťová kapková elektroda
DPP	diferenční pulsní polarografie
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál [mV]
E_p	potenciál píku [mV]
h	výška rtuťového sloupce [cm]
I_{lim}	limitní proud [nA]
I_p	proud píku [nA]
L_Q	mez stanovitelnosti [mol.L^{-1}]
m	průtoková rychlost rtuti [mg.s^{-1}]
M_r	relativní molekulová hmotnost
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
t	čas [s]
t_k	doba kapky DME [s]
ε	molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$]
λ	vlnová délka [nm]
λ_{max}	vlnová délka absorpčního maxima [nm]

1. Úvod

1.1 Biologické účinky, využití a stanovení protinádorových léčiv

Mezi nově syntetizovaná protinádorová léčiva patří substituované 1,2,4-triazolo[4,3-c]chinazoliny. Nejefektivnějšími deriváty, které mají triazolochinazolinový skelet, jsou deriváty substituované farmakologicky aktivními chromofory – morfolin, chlor, nitro skupina. Nejširší mikrobiální aktivita byla nalezena u 5-morfolin-4-yl-3-(5-nitrothien-2-yl)[1,2,4]triazolo[4,3-c]chinazolinu.¹

Základní strukturální látkou těchto nově syntetizovaných léčiv je chinazolin. Právě chemie chinazolinů je v posledních letech významná z hlediska výzkumu pro jejich široké spektrum biologické aktivity. Vývoj chemie chinazolinových derivátů umožnil získání více než jednoho tisíce derivátů, což bylo způsobeno farmaceutickým využitím některých alkaloidů majících chinazolinový skelet, které se nalézají volně v přírodě.²

Chinazolin je víceúčelové činidlo, jehož různé deriváty vykazují antimikrobiální, antifungicidní, herbicidní, protizánětlivé, diuretické, protikřečové, antialergické, antihypertensní, antiparkinsonové a protirakovinné efekty. Některé chinazoliny interagují s cytoskeletem, vzbuzují apoptózu a mutagenní aktivitu a jsou známé jako CNS sedativa.²⁻⁵ Chinazolin je syntetizován z alkaloidů rostlin, např. z rostliny *Adhatoda vasica*, která je používána v medicíně přes 2000 let na léčbu respiračních onemocnění.⁶

Mnoho chinazolinových derivátů je používáno v lékařství, farmaceutickém průmyslu a zemědělství. Chinazolinové deriváty jsou využívány k výrobě nových léků, např. Tomudex, Doxazosin, Tolterodin, Gefitinib.³ Tomudex je nové cytostatikum v léčbě pokročilého kolorektálního karcinomu. Je specifickým inhibitorem thymidilát syntetázy, z 93% se váže na plazmatické bílkoviny.⁷ Doxazosin a Tolterodin vyvolávají zlepšení v léčbě benigní hyperplazie prostaty, Tolterodin je anticholinergikum s vyváženým selektivním muskarinovým účinkem.^{8,9} Gefitinib je anilinochinazolinový derivát, který je schopen blokovat signální kaskádu epidermálního růstového faktoru na úrovni tyrosinkinázové domény. Tato blokáda

může mít u řady nádorů následek zpomalení nádorového růstu, nebo dokonce zmenšení nádoru.¹⁰

Chinazolin je polarograficky redukovatelná látka, jejíž elektrochemická aktivita je ve vodném prostředí závislá na pH. Polarografické chování azinů, kam patří i chinazolin, bylo dosud prostudováno pouze v prostředí dimethylformamidu, které umožňuje sledování redukce heterocyklického kruhu. Ze získaných výsledků vyplývá, že dochází k reversibilní jednoelektronové redukci. V některých případech však byly pozorované i ireversibilní dvouelektronové procesy. Jsou zde pochybnosti jak v počtu vyměňovaných elektronů, tak v reversibilitě redukcí.¹¹

Stanovení protinádorových léčiv majících chinazolinovou strukturu lze díky elektrochemické aktivitě chinazolinu provádět polarografickými metodami. Právě farmaceutická analýza představuje snad největší skupinu aplikací polarografických metod.¹²

1.2 Použitá pracovní elektroda

Pro studium polarografického chování chinazolinu byla používána rtuťová kapková elektroda (DME).^{13,14} Rychlost, jakou rtuť vytéká z kapiláry, je dána vnitřním průměrem kapiláry a její délkou. Volí se kapiláry, které mají průtokovou rychlost m (tj. hmotnost rtuti proteklé kapilárou za jednotku času) 1,5 až 4,0 mg.s⁻¹. Doba kapky (t_k) a průtoková rychlost jsou charakteristické veličiny pro použitou kapiláru, tzv. konstanty kapiláry. Doba kapky závisí na prostředí, do něhož rtuť vytéká a na potenciálu.

Rtuťová kapková elektroda má proti ostatním elektrodám tyto výhody:

1. Zcela rovnoměrné odkapávání čisté rtuti zajišťuje, že elektrochemický proces probíhá na stále novém, čistém povrchu, prakticky nezávislém na předchozí polarizaci, takže výsledky jsou dokonale reprodukovatelné.
2. Rtuť se vyznačuje největším přepětím vodíku, takže z neutrálních roztoků mohou být vyloučeny dokonce alkalické kovy snadněji než vodík.
3. Při elektrolýze se vylučuje jen nepatrné množství analytu, takže polarografické křivky mohou být libovolně opakovány, aniž se podstatně mění složení roztoku.
4. Rtuťová kapková elektroda slouží také jako neporušitelná oxidačně-redukční elektroda při studiu redukčních a oxidačních procesů, přičemž vlivem stále obnovovaného povrchu nepodléhá jevům pasivity jako tuhé elektrody při voltametii.
5. Pro své malé rozměry umožňuje měření i ve velmi malých objemech (0,01 až 0,005 mL), což má velký význam pro mikroanalýzu.

Nevýhodou rtuťové kapkové elektrody je omezené použití v anodické oblasti (díky oxidaci rtuti) a její toxicita.

1.3 Cíl práce

Předkládaná bakalářská práce byla vypracována v rámci širšího projektu, který je řešen na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty University Karlovy a je věnována studiu elektrochemického chování biologicky aktivních látek, které mají ekologický a toxikologický význam. Právě mezi ty patří i 1,2,4-triazolo[4,3-c]chinazolinové deriváty, které jsou součástí nově syntetizovaných protinádorových léčiv.

Tato práce se zabývá studiem elektrochemického chování těchto protinádorových léčiv, jejichž základní strukturní látkou je chinazolin, s využitím moderních polarografických metod. Právě chinazolin byl použit jako modelová látka pro tuto práci.

Cílem práce je nalezení vhodných podmínek pro stanovení chinazolinu na klasické rtuťové kapkové elektrodě (DME) s co nejnižší mezí stanovitelnosti. Za tímto účelem byla použita technika DC tast polarografie (DCTP) a diferenční pulsní polarografie (DPP).

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Studovaná látka: chinazolin (99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Zásobní roztok chinazolinu v deionizované vodě o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,01305 g látky ve 100 mL tohoto rozpouštědla.

Roztoky o nižších molaritách byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku látky deionizovanou vodou. Všechny roztoky byly uchovávány ve tmě v chladničce.

Další použité chemikálie: kyselina boritá, octová kyselina (99%), kyselina fosforečná (85%), hydroxid sodný.

Brittonovy-Robinsonovy tlumivé roztoky¹⁵ o příslušném pH byly připraveny smísením $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ NaOH s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou, každou o koncentraci $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$. Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). pH-metr byl kalibrován standardními vodnými pufrů za laboratorní teploty.

Pro přípravu všech roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore Milli-Q plus systém, Millipore, USA). Používané roztoky byly uchovávány ve skleněných nádobách.

2.2 Studovaná látka

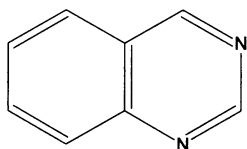
Chinazolin je jemně krystalická žlutá látka. Velmi dobře se rozpouští ve vodě, je rozpustný v ethanolu a organických rozpouštědlech.^{16,17} Chemické, fyzikální a toxikologické vlastnosti nebyly úplně prozkoumány.¹⁸

C.A.S. Name: quinazoline

C.A.S. Registry Number: 253-82-7

Sumární vzorec: C₈H₆N₂

Strukturní vzorec:



Molekulová hmotnost: 130,15 g.mol⁻¹

Bod varu: 243 °C

Bod tání: 46 °C

Bod vzplanutí: 106 °C

2.3 Aparatura

Při polarografických technikách byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1, firma Polaro-Sensors, Praha, ČR. Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corp.).

Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení. Jako referentní elektroda byla použita argentochloridová elektroda ($1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KCl}$) typu RAE 113, Monokrystaly, Turnov. Jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda. Použitá pracovní elektroda je charakterizována níže.

Při technice DPP byly na elektrody vkládány pulsy o šířce 80 ms a modulační amplitudě -50 mV.

Spektrofotometrické měření bylo prováděno na přístroji HP – Hewlett-Packard 8453 Diode-Array Spectrophotometer (Nizozemí) v křemenných kyvetách měrné tloušťky 0,1 cm.

2.4 Rtuťová kapková elektroda

Při práci s klasickou rtuťovou kapkovou elektrodou DME byla použita rychlost polarizace 4 mV.s^{-1} , elektronicky řízená doba kapky 1 s a výška rezervoáru 49 cm.

Doba kapky (t_k) při zvolené výšce rezervoáru (h) byla měřena při vloženém nulovém napětí proti argentochloridové elektrodě ($1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KCl}$). Kapilára byla ponořena do roztoku $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KCl}$. Průtoková rychlost rtuti (m) byla stanovena ponořením ústí kapiláry do předem zvážené nádobky s malým množstvím rtuti po dobu 300 s při dané výšce rezervoáru. Po uplynutí této doby byla nádobka se rtutí znovu zvážena a z rozdílu hmotností byla vypočtena váha rtuti prošlé za 1 s.¹³ Konstanty použité rtuťové kapkové elektrody jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1

Konstanty klasické rtuťové kapkové elektrody DME, h je výška rezervoáru, t_k doba 1 kapky a m průtoková rychlost Hg při zvolené výšce rezervoáru.

h [cm]	25	36	49	64	81
t_k [s]	5,45	3,75	2,61	2,07	1,62
m [mg.s ⁻¹]	0,492	0,778	1,176	1,733	2,186

2.5 Pracovní postupy

Při měření polarografických křivek bylo postupováno, pokud není uvedeno jinak, následujícím způsobem: do odměrné baňky na 10 mL bylo odpipetováno příslušné množství roztoku chinazolinu o potřebné koncentraci v deionizované vodě a doplněno BR pufrem na 10 mL. Takto připravený roztok byl po promíchání převeden do polarografické nádoby a zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Před vstupem dusíku do nádoby byla zařazena promývačka obsahující deionizovanou vodu. Poté byl proveden záznam polarografické křivky. Všechny křivky byly měřeny třikrát. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

Mez stanovitelnosti (L_D) byla počítána pomocí programu ADSTAT, který ji počítá jako nejmenší hodnotu signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního grafu dostatečně malá, rovná hodnotě 0,1.¹⁹

2.6 Stálost zásobního roztoku chinazolinu

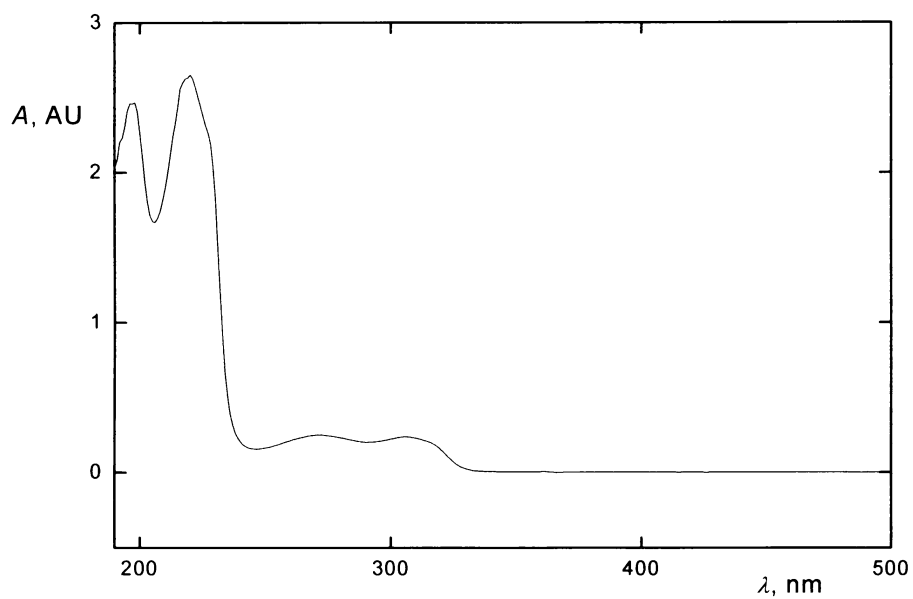
Stálost zásobního roztoku studované látky o koncentraci 1.10^{-3} mol.L⁻¹ v deionizované vodě byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 0,1 cm. Referentní kyveta byla naplněna deionizovanou vodou. Absorbance zásobního roztoku byla měřena při vlnové délce λ_{max} (220 nm), kde studovaná látka vykazovala absorpční maximum. Absorpční spektrum studované látky je uvedeno na Obr. 1. Hodnota molárního absorpčního koeficientu (ϵ) při této vlnové délce činila $2,638.10^4$ mol⁻¹.L.cm⁻¹. Výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou shrnuty v Tab. 2.

Z výsledků uvedených v Tab. 2 vyplývá, že v zásobním roztoku chinazolinu v deionizované vodě, uchovávaném za nepřístupu světla v chladničce, nedošlo k významnému poklesu koncentrace studované látky. Je tedy patrné, že zásobní roztok je při uchovávání za těchto podmínek dostatečně stálý.

Tab. 2

Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku chinazolinu o koncentraci 1.10^{-3} mol.L⁻¹ v deionizované vodě. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu absorbance v % proti hodnotě absorbance čerstvě připraveného roztoku ($\lambda_{max} = 220$ nm), měrná tloušťka kyvety 0,1 cm.

Dny	1	2	3	7	10	20	31	42
A_{220}	2,638	2,604	2,653	2,541	2,564	2,560	2,569	2,586
[%]	100,0	98,7	100,6	96,3	97,2	97,0	97,4	98,0



Obr. 1

*Absorpční spektrum roztoku chinazolinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) v deionizované vodě.
Měřeno proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 0,1 cm.*

3. Polarografické stanovení chinazolinu na rtuťové kapkové elektrodě

3.1 DC tast polarografie chinazolinu

Vliv pH na chování chinazolinu při DCTP na DME byl sledován v prostředí BR pufru o příslušném pH (2 – 13). Koncentrace látky byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Zaznamenané polarografické křivky ukazuje Obr. 2. Zjištěné závislosti I_{lim} a $E_{1/2}$ na pH jsou zaznamenány v Tab. 3. Graficky je závislost $E_{1/2}$ na pH roztoku znázorněna na Obr. 3.

Na změřených polarogramech lze pozorovat 1 – 3 dobře vyvinuté ireversibilní vlny. Při pH 2 a 3 lze rozlišit 3 vlny, při pH 4 – 12 lze rozlišit 2 vlny a při pH 13 lze pozorovat pouze 1 vlnu. Půlvalnový potenciál všech vln se s rostoucím pH posouvá k zápornějším hodnotám. Výška vln roste od pH 2 do pH 5, dále se již nemění.

Metodou lineární regrese byl pro závislost půlvalnového potenciálu vlny, jejíž hodnoty půlvalnových potenciálů $^{\alpha}$ odpovídají třetí vlně při pH 2 a 3 (viz Tab. 3) a hodnoty půlvalnových potenciálů $^{\beta}$ odpovídají druhé vlně v rozmezí pH 4 – 6 (viz Tab. 3), vypočten vztah:

$$E_{1/2}^3 [\text{mV}] = - 36,3 \text{ pH} - 892,6 \quad (\text{korel. koef. } -0,9884)$$

Pro závislost půlvalnového potenciálu první vlny v rozmezí pH 4 – 13 byl vypočten vztah:

$$E_{1/2}^4 [\text{mV}] = - 64,9 \text{ pH} - 453,3 \quad (\text{korel. koef. } -0,9988)$$

Pro závislost půlvalnového potenciálu druhé vlny v rozmezí pH 7 – 12 byl vypočten vztah:

$$E_{1/2}^5 [\text{mV}] = - 40,9 \text{ pH} - 1240,4 \quad (\text{korel. koef. } -0,9614)$$

Vzhledem k rozdílnému polarografickému chování chinazolinu v prostředích o různém pH byla pro měření koncentrační závislosti vybrána dvě prostředí, prostředí BR pufru o pH 6 a 10.

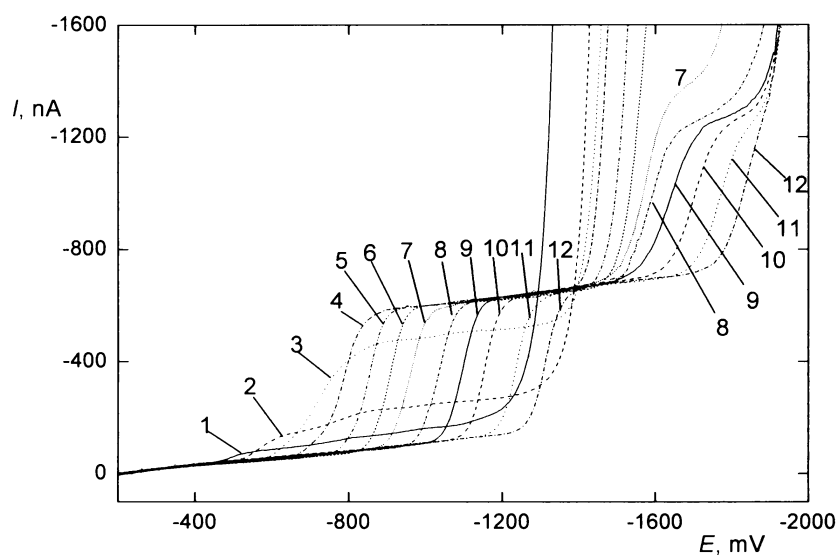
Prisouzení jednotlivých pozorovaných vln redukci určitých vazeb v molekule bude vyžadovat další podrobnější studium elektrochemického chování této látky

(cyklická voltametrie, potenciostatické coulometrie). Této problematice bude věnována pozornost při plánovaném pokračování v této práci.

Koncentrační závislosti byly proměřeny pro pH 6 v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (viz Obr. 4, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 5) a v rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (viz Obr. 6, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 7). Pro koncentraci nižší než $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ již nebylo možno získané polarogramy vyhodnotit.

Dále byly proměřeny koncentrační závislosti pro pH 10 v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (viz Obr. 8, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 9) a v rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (viz Obr. 10, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 11). Při tomto pH nebylo možno získané polarogramy vyhodnotit pro koncentraci nižší než $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ pro první vlnu a koncentraci nižší než $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ pro druhou vlnu. Z obr. 11 je patrný velký úsek kalibrační závislosti zejména v případě 2. vlny, který zřejmě souvisí s jejím obtížným vyhodnocováním vzhledem ke koincidenci s proudem rozkladu základního elektrolytu.

Parametry kalibračních přímek pro stanovení chinazolinu v prostředí BR pufru pH 6 jsou uvedeny v Tab. 4 a pro stanovení chinazolinu v prostředí BR pufru pH 10 jsou uvedeny v Tab. 5.



Obr. 2

Polarogramy chinazolinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) měřené technikou DCTP na DME v prostředí BR pufru o výsledném pH 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (10); 12,0 (11); 13,0 (12).

Tab. 3

Vliv pH na DCT polarogramy chinazolinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), měřeno v prostředí BR pufry.

pH	$-E_{1/2}^1$ [mV]	$-I_{lim}^1$ [nA]	$-E_{1/2}^2$ [mV]	$-I_{lim}^2$ [nA]	$-E_{1/2}^3$ [mV]	$-I_{lim}^3$ [nA]	$-E_{1/2}^4$ [mV]	$-I_{lim}^4$ [nA]	$-E_{1/2}^5$ [mV]	$-I_{lim}^5$ [nA]
2,0	504	22	752	11	955 ^α	9 ^α	-	-	-	-
3,0	576	68	803	35	1015 ^α	8 ^α	-	-	-	-
4,0	-	-	-	-	1040 ^β	12 ^β	724	382	-	-
5,0	-	-	-	-	1070 ^β	10 ^β	779	493	-	-
6,0	-	-	-	-	1109 ^β	8 ^β	848	475	-	-
7,0	-	-	-	-	-	-	904	517	1551	1072
8,0	-	-	-	-	-	-	958	474	1569	528
9,0	-	-	-	-	-	-	1033	501	1579	464
10,0	-	-	-	-	-	-	1097	497	1629	484
11,0	-	-	-	-	-	-	1155	476	1691	444
12,0	-	-	-	-	-	-	1239	466	1754	342
13,0	-	-	-	-	-	-	1313	494	-	-

$E_{1/2}^1$ – půlvalnový potenciál první vlny při pH 2 a 3,

I_{lim}^1 – limitní proud první vlny při pH 2 a 3,

$E_{1/2}^2$ – půlvalnový potenciál druhé vlny při pH 2 a 3,

I_{lim}^2 – limitní proud druhé vlny při pH 2 a 3,

$E_{1/2}^3$ – půlvalnový potenciál vlny při pH 2 a 3 (^α – hodnoty půlvalnových potenciálů odpovídají třetí vlně při pH 2 a 3), půlvalnový potenciál vlny při pH 4 – 6 (^β – hodnoty půlvalnových potenciálů odpovídají druhé vlně při pH 4 – 6),

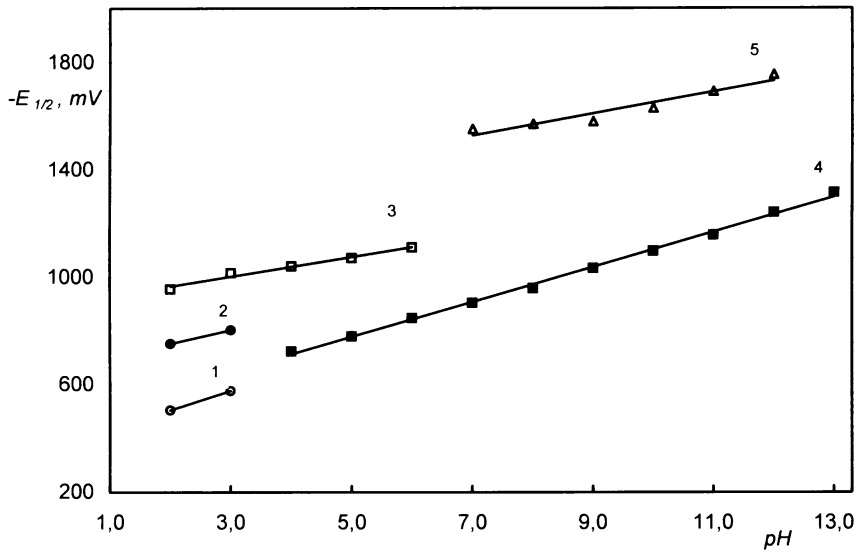
I_{lim}^3 – limitní proud vlny při pH 2 a 3 (^α – hodnoty limitních proudů odpovídají třetí vlně při pH 2 a 3), limitní proud vlny při pH 4 – 6 (^β – hodnoty limitních proudů odpovídají druhé vlně při pH 4 – 6),

$E_{1/2}^4$ – půlvalnový potenciál první vlny při pH 4 – 13,

I_{lim}^4 – limitní proud první vlny při pH 4 – 13,

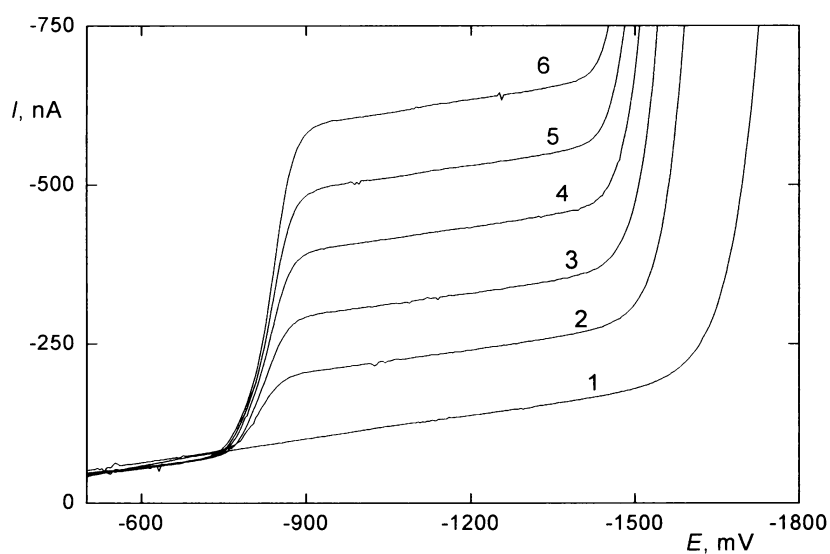
$E_{1/2}^5$ – půlvalnový potenciál druhé vlny při pH 7 – 12,

I_{lim}^5 – limitní proud druhé vlny při pH 7 – 12.



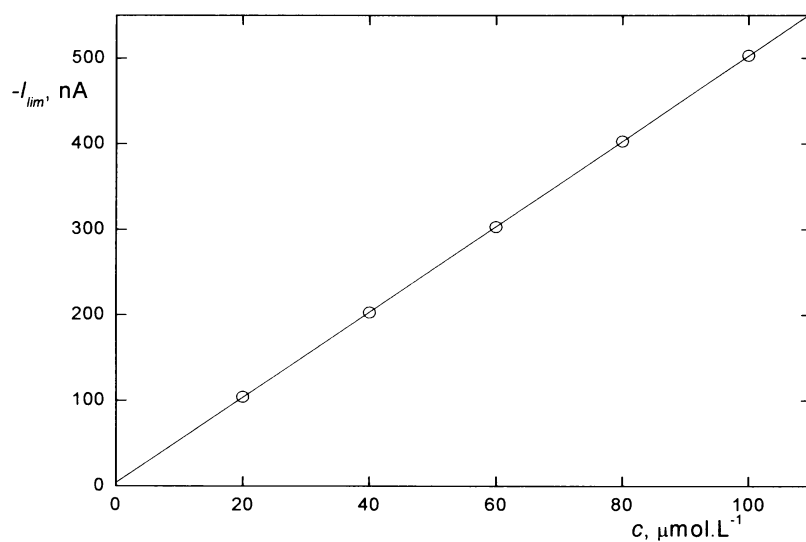
Obr. 3

Závislost půlvlnového potenciálu $E_{1/2}$ polarografických vln chinazolinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DCTP na DME v prostředí BR pufru. 1 – první vlna (pH 2 a 3); 2 – druhá vlna (pH 2 a 3); 3 – třetí vlna (pH 2 a 3), současně druhá vlna (pH 4 – 8); 4 – první vlna (pH 4 – 13); 5 – druhá vlna (pH 7 – 12).



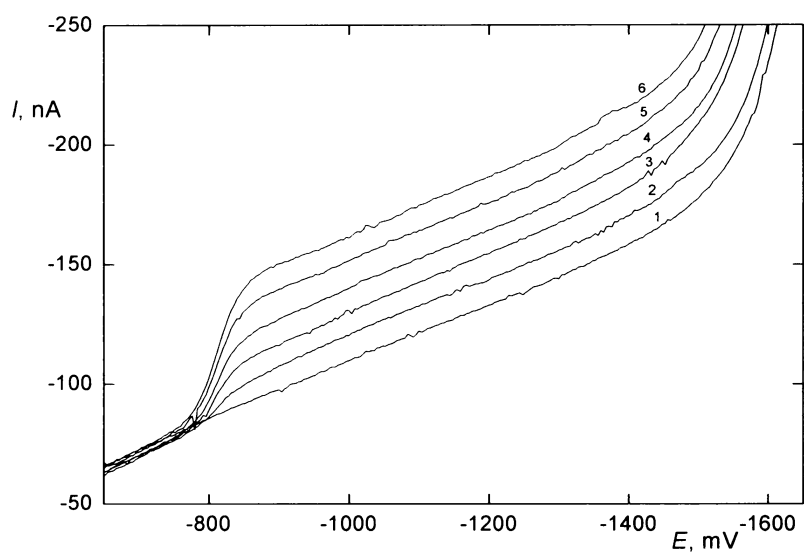
Obr. 4

Polarogramy chinazolinu měřené technikou DCTP na DME v prostředí BR pufru o pH 6. $c(\text{chinazolin}) = 0$ (1), $2 \cdot 10^{-5}$ (2), $4 \cdot 10^{-5}$ (3), $6 \cdot 10^{-5}$ (4), $8 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-4}$ (6) mol.L^{-1} .



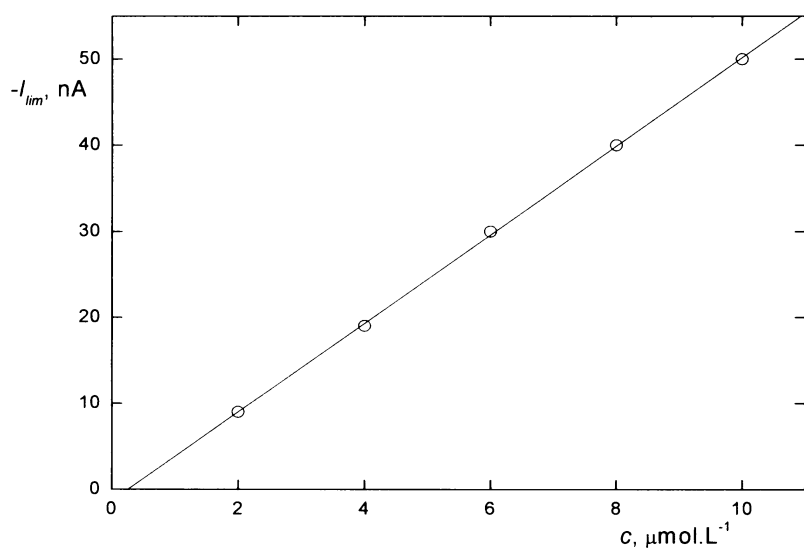
Obr. 5

Závislost proudu I_{lim} na koncentraci chinazolinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Měřeno technikou DCTP na DME v prostředí BR pufru o pH 6.



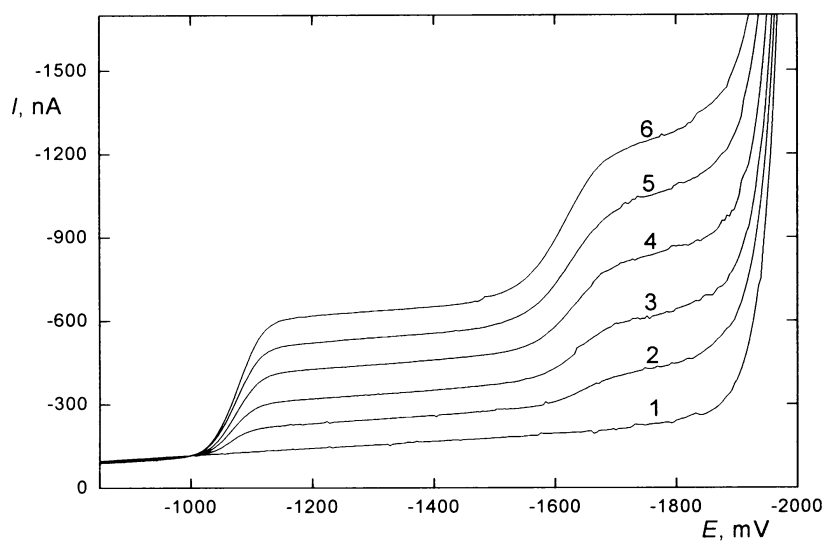
Obr. 6

Polarogramy chinazolinu měřené technikou DCTP na DME v prostředí BR pufru o pH 6 v nejnižším dosaženém koncentračním rozmezí. $c(\text{chinazolin}) = 0$ (1), $2 \cdot 10^{-6}$ (2), $4 \cdot 10^{-6}$ (3), $6 \cdot 10^{-6}$ (4), $8 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-5}$ (6) $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.



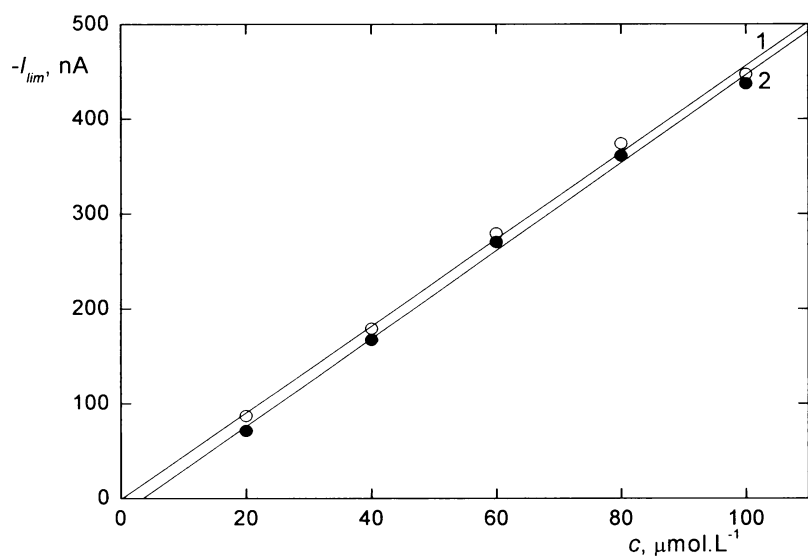
Obr. 7

Závislost proudu I_{lim} na koncentraci chinazolinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Měřeno technikou DCTP na DME v prostředí BR pufru o pH 6.



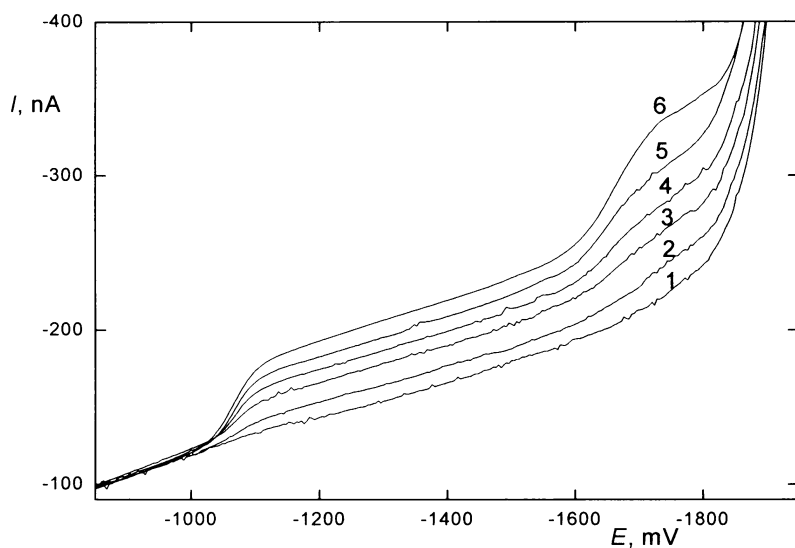
Obr. 8

Polarogramy chinazolinu měřené technikou DCTP na DME v prostředí BR pufru o pH 10. $c(\text{chinazolin}) = 0$ (1), $2 \cdot 10^{-5}$ (2), $4 \cdot 10^{-5}$ (3), $6 \cdot 10^{-5}$ (4), $8 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-4}$ (6) mol.L⁻¹.



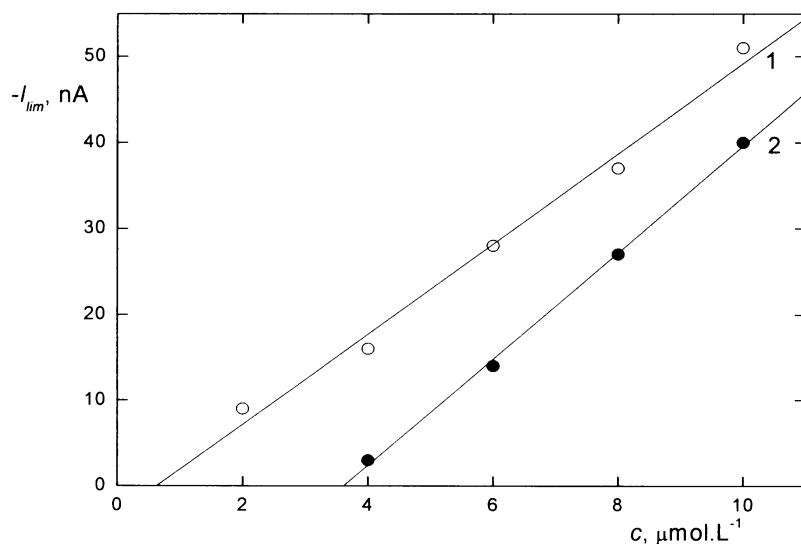
Obr. 9

Závislost proudu I_{lim} na koncentraci chinazolinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹. Měřeno technikou DCTP na DME v prostředí BR pufru o pH 10, 1 – 1. vlna, 2 – 2. vlna.



Obr. 10

Polarogramy chinazolinu měřené technikou DCTP na DME v prostředí BR pufru o pH 10 v nejnižším dosaženém koncentračním rozmezí. $c(\text{chinazolin}) = 0$ (1), $2 \cdot 10^{-6}$ (2), $4 \cdot 10^{-6}$ (3), $6 \cdot 10^{-6}$ (4), $8 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-5}$ (6) $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.



Obr. 11

Závislost proudu I_{lim} na koncentraci chinazolinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Měřeno technikou DCTP na DME v prostředí BR pufru o pH 10, 1 – 1. vlna, 2 – 2. vlna.

Tab. 4

Parametry kalibračních přímek pro stanovení chinazolinu metodou DCTP na DME v prostředí BR pufru o pH 6.

c [mol.L ⁻¹]	směrnice [nA.mol ⁻¹ .L]	úsek [nA]	korelační koeficient	L _Q [mol.L ⁻¹]
(2 - 10).10 ⁻⁵	4,99.10 ⁶	3,8	1,0000	—
(2 - 10).10 ⁻⁶	5,15.10 ⁶	-1,3	0,9999	1.10 ⁻⁶

Tab. 5

Parametry kalibračních přímek pro stanovení chinazolinu metodou DCTP na DME v prostředí BR pufru o pH 10.

c [mol.L ⁻¹]	směrnice [nA.mol ⁻¹ .L]	úsek [nA]	korelační koeficient	L _Q [mol.L ⁻¹]
1. vlna				
(2 - 10).10 ⁻⁵	4,58.10 ⁶	-1,3	0,9987	—
(2 - 10).10 ⁻⁶	5,25.10 ⁶	-3,3	0,9945	1.10 ⁻⁶
2. vlna				
(2 - 10).10 ⁻⁵	4,63.10 ⁶	-16,6	0,9986	—
(2 - 10).10 ⁻⁶	6,20.10 ⁶	-22,4	0,9992	4.10 ⁻⁶

3.2 Diferenční pulsní polarografie chinazolinu

Vliv pH na chování chinazolinu při DP polarografii na DME byl studován v prostředí BR pufru o příslušném pH (2 – 13). Koncentrace látky byla $1 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹. Zaznamenané polarografické křivky ukazuje Obr. 12. Zjištěné závislosti I_p a E_p na pH jsou zaznamenány v Tab. 6. Graficky je závislost E_p na pH roztoku znázorněna na Obr. 13.

Látka poskytuje v oblasti pH 2 – 13 2 – 3 píky. Při pH 2, 3 a 8 látka poskytuje 3 píky, v oblasti pH 4 – 7 2 píky a při pH 13 pouze 1 pík. Potenciál všech píků se s rostoucím pH posouvá k zápornějším hodnotám. Výška píků roste od pH 2 do pH 6, dále se již nemění.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku, jehož hodnoty potenciálů^α odpovídají třetímu píku při pH 2 a 3 (viz Tab. 6) a hodnoty potenciálů^β odpovídají druhému píku v rozmezí pH 4 – 8 (viz Tab. 6), vypočten vztah:

$$E_p^3 [\text{mV}] = - 37,1 \text{ pH} - 867,6 \quad (\text{korel. koef. } -0,9994)$$

Pro závislost potenciálu prvního píku v rozmezí pH 4 – 13 byl vypočten vztah:

$$E_p^4 [\text{mV}] = - 67,3 \text{ pH} - 415,7 \quad (\text{korel. koef. } -0,9987)$$

Pro závislost potenciálu píku, jehož hodnoty potenciálů^γ odpovídají třetímu píku při pH 8 (viz Tab. 6) a hodnoty potenciálů^δ odpovídají druhému píku v rozmezí pH 9 – 12 (viz Tab. 6), vypočten vztah:

$$E_p^5 [\text{mV}] = - 49,0 \text{ pH} - 1158,2 \quad (\text{korel. koef. } -0,9828)$$

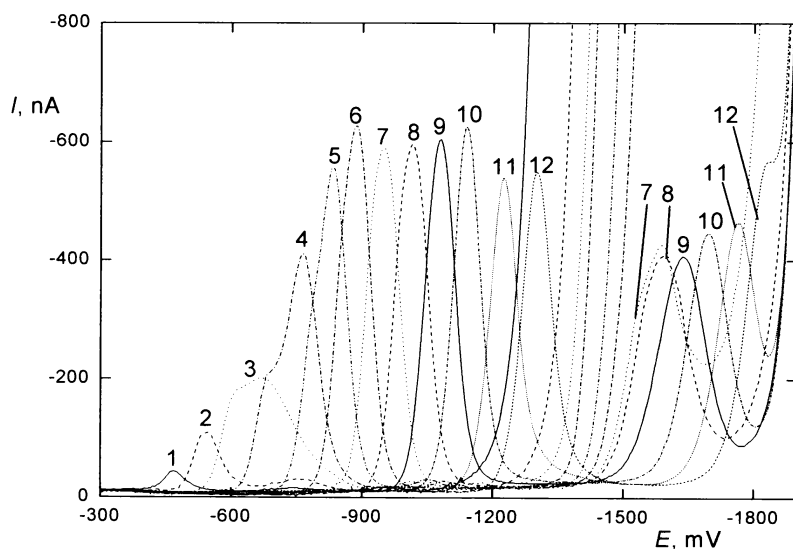
Pro měření koncentrační závislosti, stejně jako u DCTP, byla vybrána dvě prostředí, prostředí BR pufru o pH 6 a 10.

Koncentrační závislosti pro pH 6 byly proměřeny v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ (viz Obr. 14, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 15). Kalibrační závislost na Obr. 15 neprochází počátkem zřejmě vzhledem ke změnám tvaru píku při vyšších koncentracích chinazolinu. Tento jev zřejmě souvisí s poměrně vysokou koncentrací chinazolinu a s jeho možnou omezenou rozpustností či adsorpcí na pracovní elektrodě. Dále bylo pro pH 6 proměřeno koncentrační rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ (viz Obr. 16, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 17) a $(2 - 10) \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ (viz Obr. 18,

příslušná kalibrační závislost viz Obr.19). Získané polarogramy pro pH 6 při koncentraci nižší než $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ nebylo možno vyhodnotit.

Koncentrační závislosti pro pH 10 byly proměřeny v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (viz Obr. 20, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 21) a v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (viz Obr. 22, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 23). Dále bylo pro pH 10 proměřeno koncentrační rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ (viz Obr. 24, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 25). Při takto nízkých koncentracích pro zvolené pH 10 již není metoda DPP použitelná.

Parametry kalibračních přímek pro stanovení chinazolinu v prostředí BR pufru pH 6 jsou uvedeny v Tab. 7 a pro stanovení chinazolinu v prostředí BR pufru pH 10 jsou uvedeny v Tab. 8.



Obr. 12

Polarogramy chinazolinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) měřené technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o výsledném pH 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (10); 12,0 (11); 13,0 (12).

Tab. 6

Vliv pH na DP polarogramy chinazolinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) na DME, měřeno v prostředí BR pufry.

pH	$-E_p^1$ [mV]	$-I_p^1$ [nA]	$-E_p^2$ [mV]	$-I_p^2$ [nA]	$-E_p^3$ [mV]	$-I_p^3$ [nA]	$-E_p^4$ [mV]	$-I_p^4$ [nA]	$-E_p^5$ [mV]	$-I_p^5$ [nA]
2,0	470	32	738	6	946 ^α	5 ^α	-	-	-	-
3,0	543	97	764	15	976 ^α	8 ^α	-	-	-	-
4,0	-	-	-	-	1016 ^β	12 ^β	672	189	-	-
5,0	-	-	-	-	1051 ^β	13 ^β	763	396	-	-
6,0	-	-	-	-	1090 ^β	9 ^β	832	543	-	-
7,0	-	-	-	-	1126 ^β	7 ^β	888	616	-	-
8,0	-	-	-	-	1168 ^β	8 ^β	948	572	1568 ^γ	360 ^γ
9,0	-	-	-	-	-	-	1014	584	1585 ^δ	342 ^δ
10,0	-	-	-	-	-	-	1080	590	1636 ^δ	345 ^δ
11,0	-	-	-	-	-	-	1140	608	1693 ^δ	361 ^δ
12,0	-	-	-	-	-	-	1225	527	1759 ^δ	296 ^δ
13,0	-	-	-	-	-	-	1301	535	-	-

E_p^1 – potenciál prvního píku při pH 2 a 3, I_p^1 – proud prvního píku při pH 2 a 3,

E_p^2 – potenciál druhého píku při pH 2 a 3, I_p^2 – proud druhého píku při pH 2 a 3,

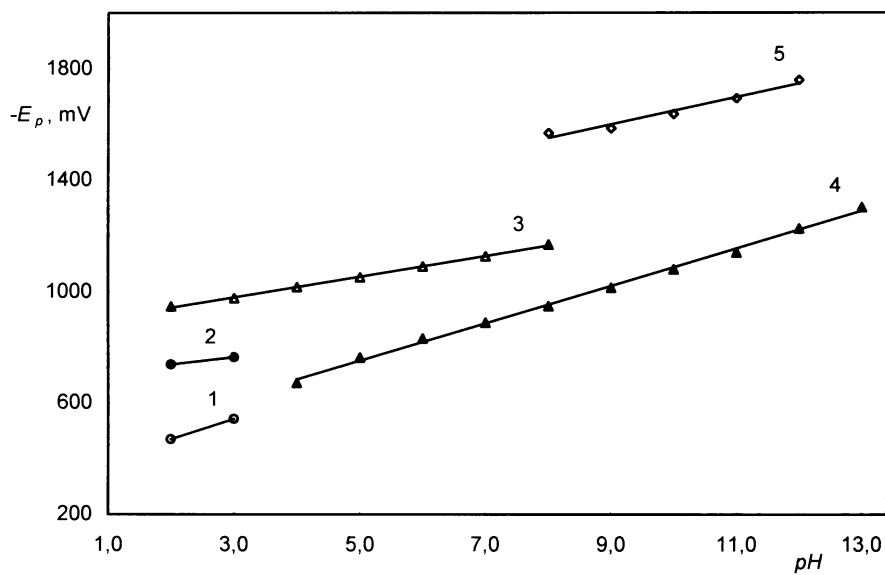
E_p^3 – potenciál píku při pH 2 a 3 (^α – hodnoty potenciálů odpovídají třetímu píku při pH 2 a 3), potenciál píku při pH 4 – 8 (^β – hodnoty potenciálů odpovídají druhému píku při pH 4 – 8),

I_p^3 – proud píku při pH 2 a 3 (^α – hodnoty proudů odpovídají třetímu píku při pH 2 a 3), proud píku při pH 4 – 8 (^β – hodnoty proudů odpovídají druhému píku při pH 4 – 8),

E_p^4 – potenciál prvního píku při pH 4 – 13, I_p^4 – proud prvního píku při pH 4 – 13,

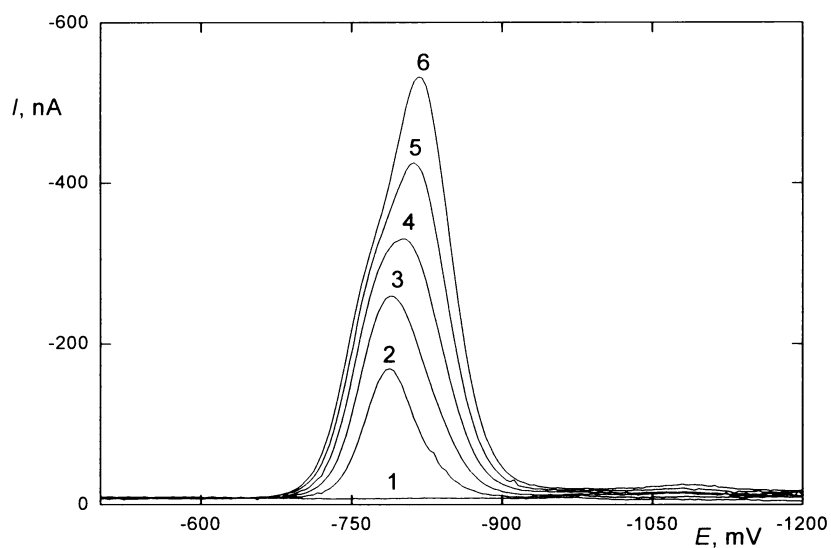
E_p^5 – potenciál píku při pH 8 (^γ – hodnota potenciálu odpovídá třetímu píku při pH 8), potenciál píku při pH 9 – 12 (^δ - hodnoty potenciálů odpovídají druhému píku při pH 9 – 12),

I_p^5 – proud píku při pH 8 (^γ – hodnota proudu odpovídá třetímu píku při pH 8), proud píku při pH 9 – 12 (^δ - hodnoty proudů odpovídají druhému píku při pH 9 – 12).



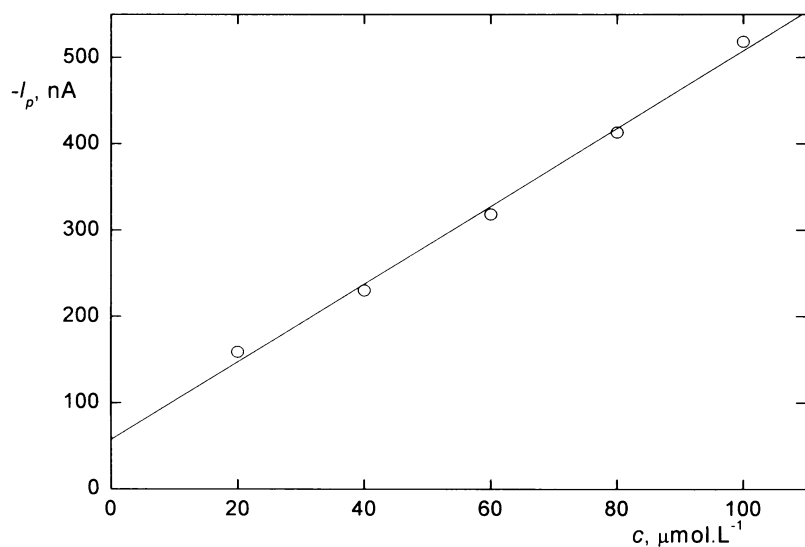
Obr. 13

Závislost potenciálu píku E_p chinazolinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DPP na DME v prostředí BR pufru. 1- první pik (pH 2 a 3); 2 – druhý pik (pH 2 a 3); 3 – třetí pik (pH 2 a 3), současně druhý pik (pH 4 – 8); 4 – první pik (pH 4 – 13); 5 – třetí pik (pH 8), současně odpovídá druhému píku (pH 9 – pH 12).



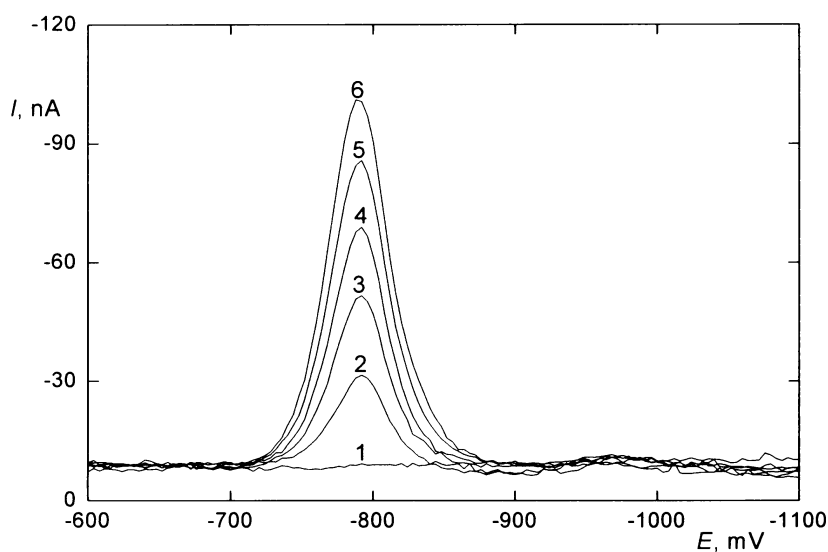
Obr. 14

Polarogramy chinazolinu měřené technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 6. $c(\text{chinazolin}) = 0$ (1), $2 \cdot 10^{-5}$ (2), $4 \cdot 10^{-5}$ (3), $6 \cdot 10^{-5}$ (4), $8 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-4}$ (6) mol.L⁻¹.



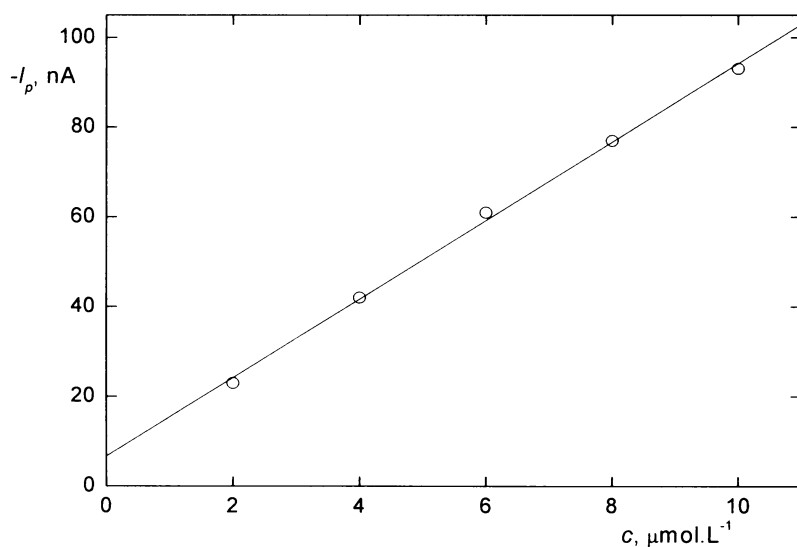
Obr. 15

Závislost proudu píku I_p na koncentraci chinazolinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹. Měřeno technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 6.



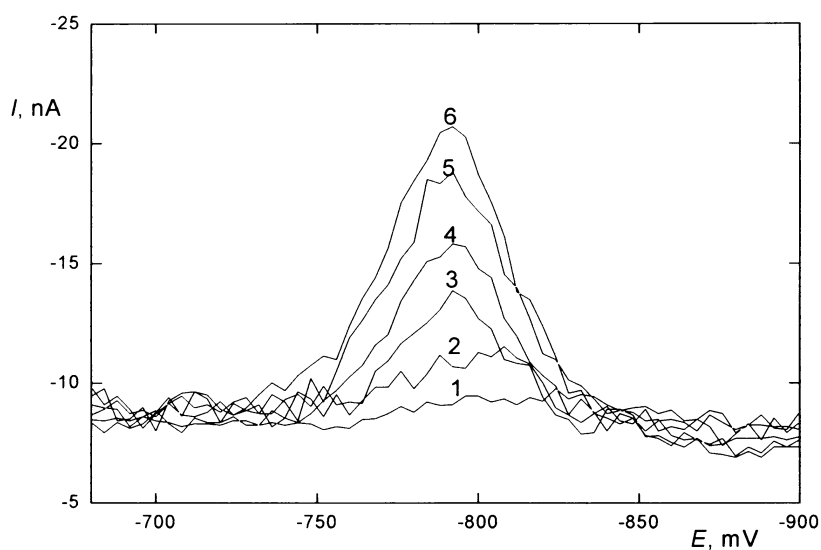
Obr. 16

Polarogramy chinazolinu měřené technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 6. $c(\text{chinazolin}) = 0$ (1), $2 \cdot 10^{-6}$ (2), $4 \cdot 10^{-6}$ (3), $6 \cdot 10^{-6}$ (4), $8 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-5}$ (6) $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.



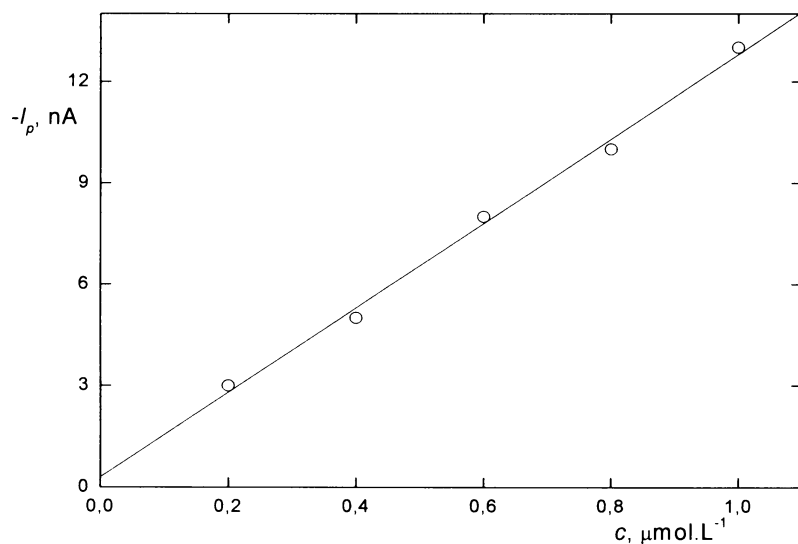
Obr. 17

Závislost proudu píku I_p na koncentraci chinazolinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Měřeno technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 6.



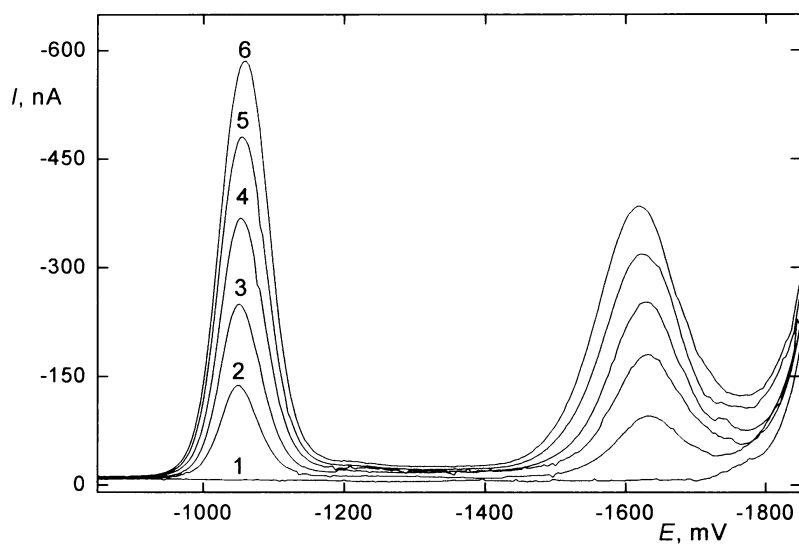
Obr. 18

Polarogramy chinazolinu měřené technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 6 v nejnižším dosaženém koncentračním rozmezí. $c(\text{chinazolin}) = 0$ (1), $2 \cdot 10^{-7}$ (2), $4 \cdot 10^{-7}$ (3), $6 \cdot 10^{-7}$ (4), $8 \cdot 10^{-7}$ (5), $1 \cdot 10^{-6}$ (6) $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.



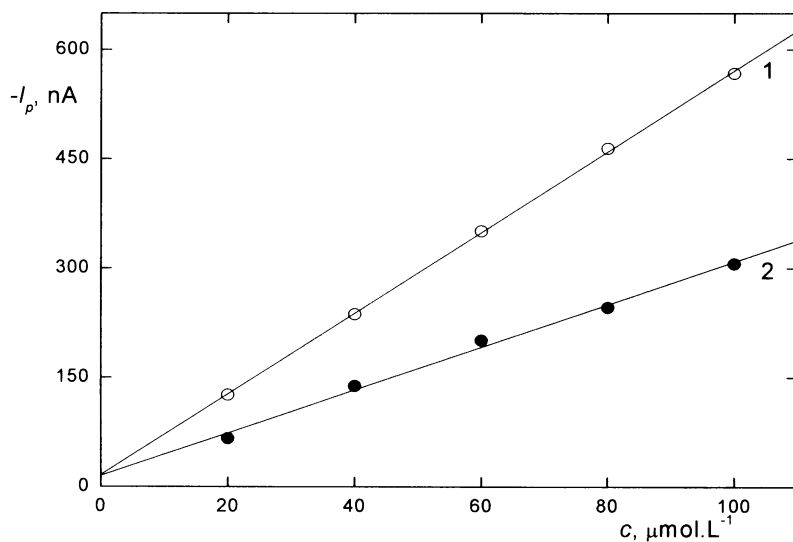
Obr. 19

Závislost proudu píku I_p na koncentraci chinazolinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Měřeno technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 6.



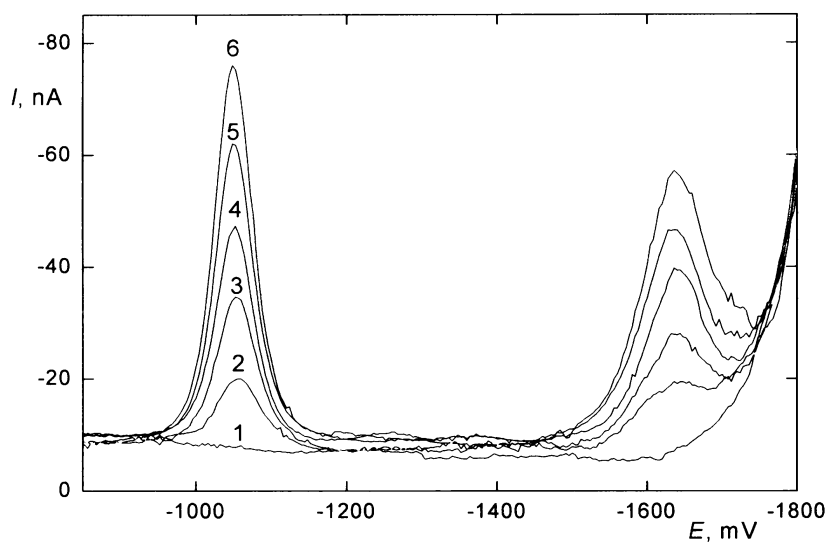
Obr. 20

Polarogramy chinazolinu měřené technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 10. $c(\text{chinazolin}) = 0$ (1), $2 \cdot 10^{-5}$ (2), $4 \cdot 10^{-5}$ (3), $6 \cdot 10^{-5}$ (4), $8 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-4}$ (6) mol.L⁻¹.



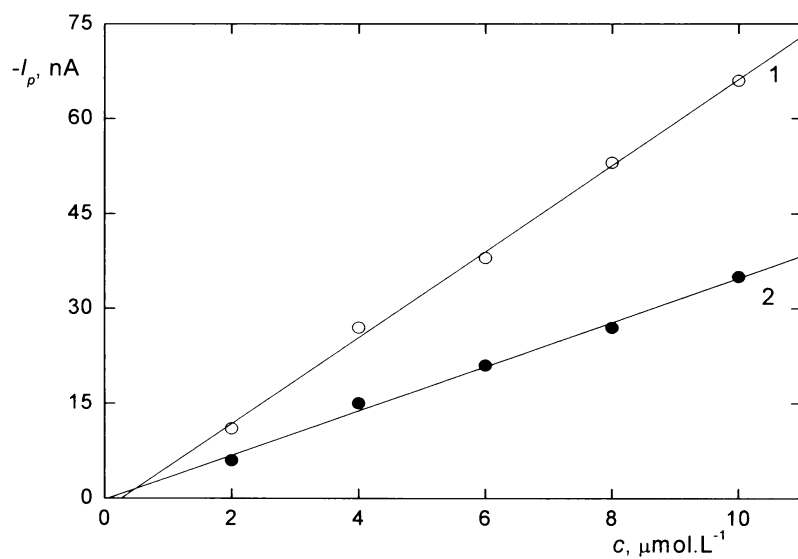
Obr. 21

Závislost proudu pík I_p na koncentraci chinazolinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹. Měřeno technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 10, 1 – 1. pík, 2 – 2. pík.



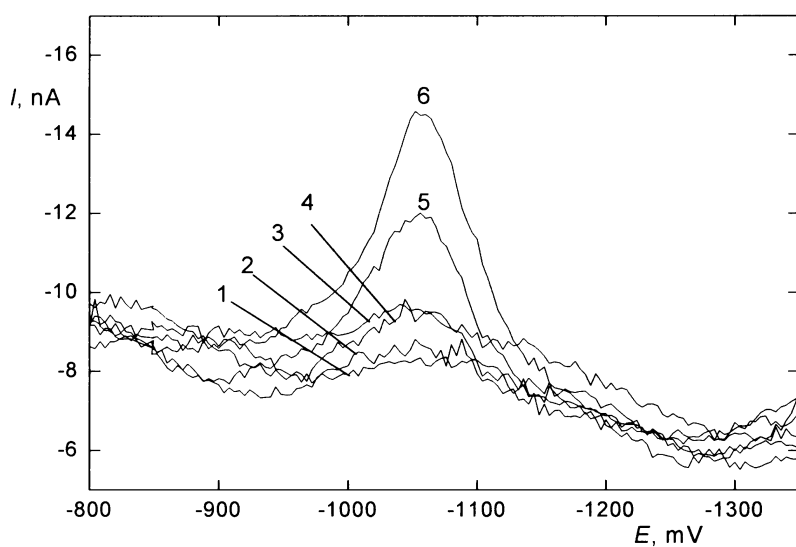
Obr. 22

Polarogramy chinazolinu měřené technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 10. $c(\text{chinazolin}) = 0$ (1), $2 \cdot 10^{-6}$ (2), $4 \cdot 10^{-6}$ (3), $6 \cdot 10^{-6}$ (4), $8 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-5}$ (6) mol.L⁻¹.



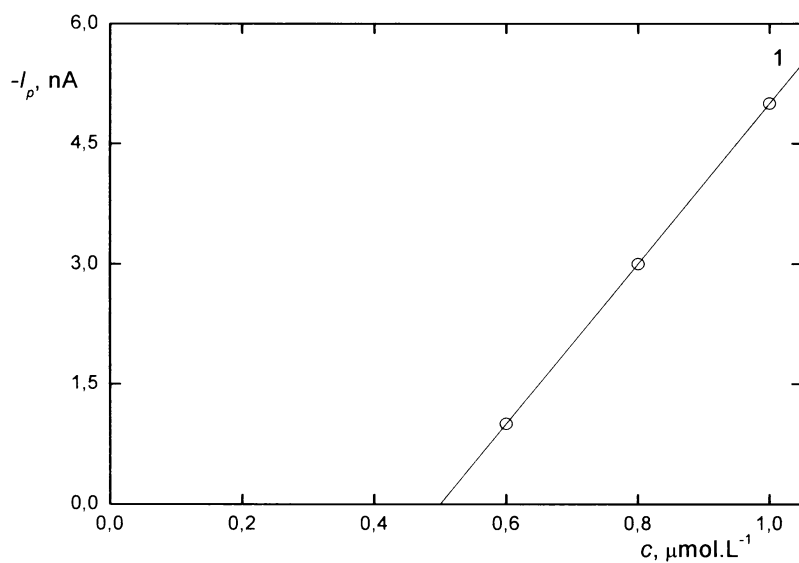
Obr. 23

Závislost proudu pík I_p na koncentraci chinazolinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹. Měřeno technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 10, 1 – 1. pík, 2 – 2. pík.



Obr. 24

Polarogramy chinazolinu měřené technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 10. $c(\text{chinazolin}) = 0$ (1), $2 \cdot 10^{-7}$ (2), $4 \cdot 10^{-7}$ (3), $6 \cdot 10^{-7}$ (4), $8 \cdot 10^{-7}$ (5), $1 \cdot 10^{-6}$ (6) mol.L⁻¹.



Obr. 25

Závislost proudu píku I_p na koncentraci chinazolinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Měřeno technikou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 10, 1 – 1. pík.

Tab. 7

Parametry kalibračních přímek pro stanovení chinazolinu metodou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 6.

c [mol.L ⁻¹]	směrnice [nA.mol ⁻¹ .L]	úsek [nA]	korelační koeficient	L _Q [mol.L ⁻¹]
(2 - 10).10 ⁻⁵	4,51.10 ⁶	57,3	0,9975	—
(2 - 10).10 ⁻⁶	8,75.10 ⁶	6,7	0,9990	—
(2 - 10).10 ⁻⁷	1,25.10 ⁷	0,3	0,9976	2.10 ⁻⁷

Tab. 8

Parametry kalibračních přímek pro stanovení chinazolinu metodou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 10.

c [mol.L ⁻¹]	směrnice [nA.mol ⁻¹ .L]	úsek [nA]	korelační koeficient	L _Q [mol.L ⁻¹]
1. pík				
(2 - 10).10 ⁻⁵	5,55.10 ⁶	16,3	0,9998	—
(2 - 10).10 ⁻⁶	6,80.10 ⁶	-1,8	0,9988	—
(2 - 10).10 ⁻⁷	1,00.10 ⁷	-5,0	1,0000	2.10 ⁻⁶
2. pík				
(2 - 10).10 ⁻⁵	2,94.10 ⁶	15,0	0,9970	—
(2 - 10).10 ⁻⁶	3,50.10 ⁶	-0,2	0,9972	2.10 ⁻⁶

4. Závěr a diskuse

Při stanovení chinazolinu pomocí DCTP a DPP bylo zjištěno, že látka poskytuje v prostředí BR pufru až 3 vlny či píky, jejichž poloha a výška závisí na pH použitého pufru.

Cílem práce bylo optimalizace podmínek stanovení a dosažení co nejnižších mezí stanovitelnosti na použité rtuťové elektrodě.

Jako citlivější metoda se ukázala technika DPP na DME.

Tab. 9

Srovnání použitých technik a dosažených výsledků pro stanovení chinazolinu na rtuťové kapkové elektrodě.

Elektroda / technika	prostředí	L_Q [mol.L ⁻¹]
DME / DCTP	BR pufr; pH 6	$1 \cdot 10^{-6}$
DME / DCTP	BR pufr; pH 10	$1 \cdot 10^{-6}$
DME / DPP	BR pufr; pH 6	$2 \cdot 10^{-7}$
DME / DPP	BR pufr; pH 10	$2 \cdot 10^{-6}$

Literatura

1. Jantová, S.; Ovádeková, R.; Letašiová, S.; Špírková, K.; Stankovský, Š.: Antimicrobial Activity of Some Substituted Triazoloquinazolines. *Folia Microbiologica* **50**, 90-94 (2005).
2. Jantová, S.; Letašiová, S.; Repický, A.; Ovádeková, R.; Lakatoš, B.: The Effect of 3-(5-Nitro-2-thienyl)-9-chloro-5-morpholin-4-yl[1,2,4]triazolo[4,3-c] Quinazoline on Cell Growth, Cell Cycle, Induction of DNA Fragmentation and Activity of Caspase 3 in Murine Leukemia L1210 Cells and Fibroblast NIH-3T3 Cells. *Cell Biochemistry and Function*. Přijato k otištění.
3. Ovádeková, R.; Jantová, S.; Labuda, J.: Detection of the Effective DNA Protection by Quinazolines Using a DNA – based Electrochemical Biosensor. *Analytical Letters* **38**, 2625-2638 (2005).
4. Špírková, K.; Stankovský, Š.: Amidinoyl Isothiocyanates in the Synthesis of Condensed Quinazolines. Preparation of 3-Aryl-5,9-disubstituted s-tiazolo[4,3-c]quinazolines. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **56**, 1749-1724 (1991).
5. Špírková, K.; Horňaček, J.; Stankovský, Š.: Amidinoyl Isothiocyanates in the Synthesis of Condensed Quinazolines. Preparation of 3-Aryl-9-chloro-5-morpholino[1,2,4]triazolo[4,3-c]quinazolines and their [1,5-c] Isomers. *Chemical Papers* **42**, 382-385 (1993).
6. Cleason, U. P.; Malmfors, T.; Wikman, G.; Bruhn, J. G.: Adhatoda Vasica: a Critical Review of Ethnopharmacological and Toxicological Data. *Journal of Ethnopharmacology* **72**, 1-20 (2000).
7. Fínek, J.; Holubec, L.; Elgrová L.: Chemoterapie kolorektálního karcinomu. *Farmakoterapie* **1**, supp. 81-86 (2005).

8. Kirby, R. S.: Morning versus Evening Dosing with Doxazosin in Benign Prostatic Hyperplasia: Pharmacokinetics, Efficacy and Safety. *International Journal of Clinical Practice* **52**, 75-77 (1998).
9. Verner, P.: Tolterodin. *Farmakoterapie* **1**, 464-469 (2005).
10. Pešek, M.: Gefitinib. *Farmakoterapie* **1**, 13-14 (2005).
11. Wiberg, K. B.; Lewis, T.P.: Polarographic Reduction of the Azines. *Journal of the American Chemical Society* **92**, 7154-7160 (1970).
12. Barek, J.; Fogg, A. G.; Muck, A.; Zima, J.: Polarography and Voltammetry at Mercury Electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31**, 291-309 (2001).
13. Heyrovský, J.; Kůta, J.: *Základy polarografie*. Praha, SNTL 1967.
14. Zýka, J.; a kol.: *Analytická příručka*, Díl 1. 3. přeprac. a rozšířené vyd. Praha, SNTL/ALFA 1979, s. 468.
15. Sýkora, V.; Zátka, V.: *Příruční tabulky pro chemiky*. Praha, SNTL 1967.
16. Večeřa, M.; Gasparič, J.; Churáček, J.; Borecký, J.: *Chemické tabulky organických sloučenin*. Praha, SNTL 1975.
17. Červinka, O.: *Chemie organických sloučenin*. Díl 2. Praha, SNTL/Alfa 1987.
18. Anonymus: *Bezpečnostní list quinazolinu (revize 13.3.2004, verze 1.2)*. Praha, Sigma – Aldrich 2006. Dostupné z URL: <<http://www.sigmaaldrich.com>> [cit. 1.3.2006].
19. Pecková, K.: *Diplomová práce*. Praha, PřFUK 2001.

Souhlasím se zapůjčením své bakalářské práce ke studijním účelům. Prosím, aby byla vedena evidence vypůjčovatelů a aby byli upozorněni na to, že pramen převzatých údajů musí řádně citovat.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum	Poznámka