

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

# **Spektrofotometrické stanovení disociačních konstant pyridinových derivátů**

Bakalářská práce

Autor: Veronika Florianová  
Studijní program: B1407 Chemie  
Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání  
Matematika se zaměřením na vzdělávání  
Vedoucí práce: doc. RNDr. Vlastimil Dohnal, Ph.D. et Ph.D.

Hradec Králové

srpen 2015



## Zadání bakalářské práce

<b>Autor:</b>	<b>Veronika Florianová</b>
Studium:	S12440
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Chemie se zaměřením na vzdělávání, Matematika se zaměřením na vzdělávání
<b>Název bakalářské práce:</b>	<b>Spektrofotometrické stanovení disociačních konstant pyridinových derivátů</b>
Název bakalářské práce AJ:	Spectroscopic determination of dissociation constants of pyridinium derivatives

### **Cíl, metody, literatura, předpoklady:**

Disociační konstanta je jednou z významných charakteristik chemických látek. Stanovení disociační konstanty pomocí spektrofotometrie je jednou z nejlépe proveditelných experimentálních metod a zároveň patří mezi nejpřesnější. Cílem práce je stanovit disociační konstanty vybraných derivátů pyridinu. Měření bude probíhat v roztocích při různých hodnotách pH. Získaná absorpční spektra budou chemometricky zpracována a vypočteny hodnoty pKa. U látek se známou hodnotou pKa bude provedeno srovnání s tabelovanými hodnotami.

Ando, H.Y., Heimbach, T. pKa determinations by using a HPLC equipped with DAD as a flow injection apparatus. *J. Pharm. Biomed. Analysis* 16 (1997) 31-37. Balderas-Hernández, P., Ramírez, M.T., Rojas-Hernández, A., Gutiérrez, A. Determination of pKa's for thymol blue in aqueous medium: evidence of dimer formation. *Talanta* 46 (1998) 1439-1452. Patterson, G.S. A Simplified Method for Finding the pKa of an Acid-Base Indicator by Spectrophotometry. *J. Chem. Ed.* 76 (3) (1999) 395-398. Meloun, M.; Militký, J. *Statistické zpracování experimentálních dat*; East Publishing Praha, 1998 Buček, P.: *Diplomová práce, Masarykova univerzita, Brno 2008* Buček, P.: *Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno 2006*

### **Anotace:**

Disociační konstanta je jednou z významných charakteristik chemických látek. Stanovení disociační konstanty pomocí spektrofotometrie je jednou z nejlépe proveditelných experimentálních metod a zároveň patří mezi nejpřesnější. Cílem práce je stanovit disociační konstanty vybraných derivátů pyridinu. Měření bude probíhat v roztocích při různých hodnotách pH. Získaná absorpční spektra budou chemometricky zpracována a vypočteny hodnoty pKa. U látek se známou hodnotou pKa bude provedeno srovnání s tabelovanými hodnotami.

Garantující pracoviště:	Katedra chemie, Přírodovědecká fakulta
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Vlastimil Dohnal, Ph.D. et Ph.D.
Oponent:	Ing. Karel Musil
Datum zadání závěrečné práce:	23.9.2014

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci na téma Spektrofotometrické stanovení disociačních konstant u pyridinových derivátů vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Vlastimila Dohnala, Ph.D. et Ph.D. a veškerou použitou literaturu a zdroje jsem uvedla v seznamu literatury.

V Hradci Králové dne

Veronika Florianová

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Vlastimilu Dohnalovi, Ph.D. et Ph.D. za odborné vedení a pomoc při vypracování této bakalářské práce.

Děkuji svým rodičům a příteli za podporu, kterou mi v průběhu studia poskytovali.

## **Anotace**

Disociační konstanta je jednou z významných charakteristik chemických látek. Stanovení disociační konstanty pomocí spektrofotometrie je jednou z nejlépe proveditelných experimentálních metod a zároveň patří mezi nejpřesnější. Cílem práce je stanovit disociační konstanty vybraných derivátů pyridinu. Měření bude probíhat v roztocích při různých hodnotách pH. Získaná absorpční spektra budou chemometricky zpracována a vypočteny hodnoty pKa. U látek se známou hodnotou pKa bude provedeno srovnání s tabelovanými hodnotami.

## **Klíčová slova**

Disociační konstanta, UV/Vis spektrofotometrie, průtoková vstřikovací analýza (FIA), oxim, acetylcholinesteráza, organofosfát.

## **Annotation**

Dissociation constant is one of the most important characteristics of chemical substances. Determination of dissociation constant by spectrophotometry is one of the best feasible experimental methods and it is also one of the most specific methods. The aim of the thesis is to determine the dissociation constants of selected pyridinium derivatives. Measurement will be performed in solutions during different pH values. The resulting absorption spectra will be processed by chemometric procedures and pKa values will be calculated. For substances with the known pKa value will be make comparison with tabulated values.

## **Keywords**

Dissociation constant, UV/Vis spectrophotometry, flow injection analysis (FIA), oxime, acetylcholinesterase, organophosphate.

# Obsah

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část.....	8
2.1. Teorie kyselin a zásad .....	8
2.1.1. Arrheniova teorie kyselin a zásad .....	8
2.1.2. Brønstedova teorie kyselin a zásad.....	8
2.1.3. Lewisova teorie kyselin a zásad.....	9
2.1.4. Usanovičova teorie kyselin a zásad.....	9
2.2. Disociační konstanta .....	10
2.3. Metody stanovení disociační konstanty .....	11
2.3.1 Potenciometrie .....	11
2.3.2 Konduktometrie .....	14
2.3.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	17
2.3.4. Průtoková vstříkovací analýza .....	19
2.3.5. Molekulová absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti .....	21
2.4. Vyhodnocování dat .....	24
2.4.1. Vícerozměrná analýza dat.....	25
3. Praktická část.....	26
3.1. Oximy .....	26
3.2. Přístrojové vybavení .....	28
3.3. Použité materiály a metody.....	29
4. Výsledky a diskuse .....	32
5. Závěr .....	34
Seznam literatury .....	35
Příloha 1	

# 1. Úvod

Oximy jsou produkty reakce aldehydu či ketonu s hydroxylaminem. Velký význam mají především jako reaktivátory acetylcholinesterázy inhibované organofosfáty, proto se používají jako organofosfátová antidota.

Cílem práce je určit disociační konstanty u deseti vybraných oximů. Měření bude probíhat v roztocích s různými hodnotami pH, čehož bude docíleno použitím tlumivých roztoků (pufrů). Budou použity a následně porovnány dvě metody měření – UV/Vis spektrofotometrie a průtoková vstřikovací analýza (FIA). Zpracování naměřených dat bude provedeno hard a soft modely. Vypočtené hodnoty  $pK_a$  budou srovnány s údaji uvedenými v literatuře.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Teorie kyselin a zásad

#### 2.1.1. Arrheniova teorie kyselin a zásad

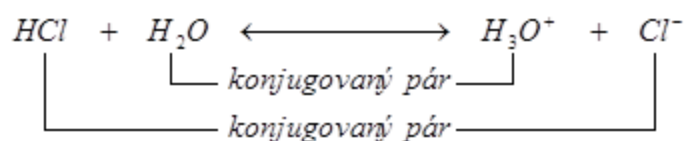
Podle Arrheniovy teorie je **kyselina** sloučeninou, která se ve vodném roztoku disociuje za vzniku vodíkových kationtů ( $H^+$ ), a **zásada** je sloučenina, která se disociuje za vzniku hydroxidových aniontů ( $OH^-$ ). Síla kyselin a zásad závisí na koncentraci vodíkových, resp. hydroxidových iontů v roztoku. Tedy čím více jsou kyseliny a zásady v roztoku disociované, tím jsou silnější. Při reakci vodných roztoků kyseliny a zásady dochází k neutralizaci, jedná se o sloučení vodíkových a hydroxidových iontů za vzniku molekul vody.

Arrheniova teorie ovšem neobjasňuje, proč jsou zásadami i některé sloučeniny, které neobsahují OH-skupinu [1, 3].

#### 2.1.2. Brønstedova teorie kyselin a zásad

Roku 1923 vypracoval dánský chemik Brønsted tzv. **protolytickou teorii** kyselin a zásad, která definuje **kyselinu** jako látku schopnou poskytnout proton a **zásadu** jako látku schopnou tento proton přijímat. Existují i látky, které se mohou chovat jako kyseliny (donory protonů) a zároveň jako zásady (akceptory protonů), označujeme je pojmem **amfoterní** látky (typickým příkladem je například  $H_2O$ ). Z Brønstedovy teorie je zřejmé, že kyselinami a zásadami mohou být nejen neutrální molekuly, ale také některé ionty.

Ke každé kyselině existuje i odpovídající konjugovaná zásada, dohromady tuto dvojici nazýváme tzv. **konjugovaný pár**. Pokud například plynný chlorovodík rozpouštíme ve vodě, dochází k acidobazické reakci, kdy HCl odštěpuje  $H^+$ , který voda přijímá za vzniku  $H_3O^+$  a  $Cl^-$ . Oxoniový kation tvoří konjugovanou kyselinu k  $H_2O$  (zásada) a chloridový anion je konjugovanou zásadou k HCl (kyselina) [1].





### 2.1.3. Lewisova teorie kyselin a zásad

Brönstedova teorie je do jisté míry omezená, nevztahuje se na tzv. aprotní látky, které nejsou schopné poskytnout ani přijmout proton. Americký chemik Lewis proto vymezil pojmy kyselina a zásada obecněji. **Kyselina** je podle jeho teorie každá látka schopná přijmout volný elektronový pár jiné látky (je akceptorem), a **zásada** je naopak látka schopná elektronový pár poskytnout (je donorem). Tento elektronový pár je sdílen kyselinou a zásadou ve formě kovalentní vazby.

Aby Lewisova kyselina mohla přijmout elektronový pár, musí ve své molekule obsahovat neobsazený orbital s nízkou energií nebo polární vazbu k atomu vodíku (může tak poskytnout  $H^+$ , který má neobsazený orbital  $1s$ ). Lewisovými kyselinami jsou například  $H_2O$ ,  $HCl$ ,  $CH_3CH_2OH$ ,  $CH_3COOH$ , některé kationty ( $Li^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Br^+$ ) nebo sloučeniny kovů ( $AlCl_3$ ,  $BF_3$ ,  $TiCl_4$ ,  $ZnCl_2$ ) [3].

Lewisova zásada je každá sloučenina s párem nevazebných elektronů, které zapojuje do vazby spolu s Lewisovou kyselinou. Jedná se například o alkoholy, aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny nebo aminy. Některé Lewisovy báze obsahují více atomů s volným elektronovým párem, mohou tedy reagovat na více místech. Zpravidla však proběhne pouze ta reakce, která dává vzniknout stabilnějšímu produktu [3].

### 2.1.4. Usanovičova teorie kyselin a zásad

Roku 1939 vyslovil ruský chemik Usanovič teorii kyselin a zásad, která byla ještě širší a obecnější než teorie Lewisova. Podle této teorie je **kyselina** látka schopná poskytnout proton nebo jakýkoliv jiný kationt a vázat elektrony nebo anionty. **Zásada** je látka schopná odevzdávat elektrony nebo aniont a vázat proton nebo jiný kationt.

Usanovičova teorie odstraňuje nedostatky Lewisovy teorie, podle níž by  $H_2SO_4$ ,  $HCl$  nebo  $HNO_3$  nebyly kyselinami, neboť nejsou schopny vázat volný elektronový pár.

Podle Brönsteda vzniká reakcí kyseliny a zásady nová konjugovaná kyselina a konjugovaná zásada. Podle Usanoviče je produktem reakce vždy sůl. Například u reakce  $H^+$  s  $OH^-$  vzniká voda, kterou podle této teorie považujeme za sůl, což je velmi nezvyklé. Jako sůl je nejčastěji chápán produkt reakce Arrheniovy kyseliny s Arrheniovou zásadou.

Přestože je Usanovičova teorie nejuniverzálnější, není příliš používanou. Chemie upřednostňuje teorie podle Brönsteda nebo Lewise [2].

## 2.2. Disociační konstanta

Jak již bylo řečeno, podle Brønstedovy teorie je kyselinou každá látka, která poskytuje proton,  $H^+$ . Jednotlivé kyseliny se ale v této schopnosti liší. Silné kyseliny reagují s vodou téměř úplně, zatímco slabé kyseliny jen velmi málo. Sílu kyseliny HA ve vodném roztoku udává tzv. **rovnovážná konstanta disociace kyseliny K**.



$$K = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA][H_2O]}$$

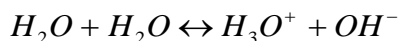
Protože se rovnovážné konstanty K měří zpravidla ve zředěných roztocích, zůstává koncentrace vody stále konstantní. Je tedy možné zavést novou veličinu, tzv. **disociační konstantu kyselosti  $K_a$** , která je součinem rovnovážné konstanty disociace kyseliny a rovnovážné aktivity vody.

$$K_a = K \cdot [H_2O] = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]}$$

Hodnoty  $K_a$  se pohybují v poměrně širokém rozmezí od  $10^{15}$  (u nejsilnějších kyselin) po  $10^{-60}$  (u nejslabších kyselin). Proto se v praxi síla kyselin popisuje hodnotami  $pK_a$ , což je záporný dekadický logaritmus disociační konstanty  $K_a$  [3].

$$pK_a = -\log K_a$$

Silnější kyseliny mají vyšší hodnotu  $K_a$  a nižší hodnotu  $pK_a$ , zatímco slabší kyseliny mají nižší hodnotu  $K_a$  a vyšší hodnotu  $pK_a$ . Pro vodu je hodnota  $pK_a$  při 25°C rovna 15,74, což je možné odvodit následujícími vztahy:



$$K = \frac{[H_3O^+][OH^-]}{[H_2O]^2} \quad \text{a} \quad K_a = K \cdot [H_2O] = \frac{[H_3O^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

Čítec  $[H_3O^+][OH^-]$  se nazývá **iontový součin vody**,  $K_w = 1,02 \cdot 10^{-14}$ , jmenovatel  $[H_2O]$  je při teplotě 25°C roven 55,6. Po dosazení těchto hodnot získáváme:

$$K_a = \frac{1,02 \cdot 10^{-14}}{55,6} = 1,83 \cdot 10^{-16} \quad \text{a} \quad pK_a = 15,74 \quad [3].$$

---

<sup>1</sup> Vzorce sloučenin v hranatých závorkách označují jejich rovnovážné aktivity.

Dánský chemik Sørensen zavedl roku 1909 pojem **vodíkový exponent**  $pH$ , který definoval jako záporný dekadický logaritmus rovnovážné aktivity oxoniových kationtů.

$$pH = -\log[H_3O^+]$$

Z rovnice pro iontový součin vody  $K_w = [H_3O^+][OH^-] = 1,02 \cdot 10^{-14}$  je zřejmé, že rovnovážné koncentrace iontů  $H^+$  a  $OH^-$  musí být takové, aby se jejich součin rovnal  $K_w$ .

V čisté vodě je hodnota  $[H_3O^+]$  rovna  $[OH^-]$ , z čehož lze získat vztah:

$$[H_3O^+] = [OH^-] = \sqrt{1,0 \cdot 10^{-14}} = 10^{-7}$$

$$pH = -\log[10^{-7}] = 7$$

Tedy při neutrální reakci je  $pH$  rovno 7. V případě, že platí  $[H_3O^+] > [OH^-]$ , je  $pH < 7$  a roztok reaguje kyselě. A naopak pokud je  $[H_3O^+] < [OH^-]$ , potom  $pH > 7$  a roztok reaguje zásaditě [1].

Podobně jako  $pH$  je možné definovat  $pOH$  (záporný dekadický logaritmus rovnovážné aktivity hydroxidových aniontů) a  $pK_w$  (záporný dekadický logaritmus iontového součinu vody).

$$pOH = -\log[OH^-]$$

$$pK_w = -\log K_w$$

Dosazením těchto vztahů do rovnice iontového součinu vody je získán vztah

$$pK_w = pH + pOH = 14,$$

ze kterého je jasně vidět, že  $pH$  zředěných roztoků může nabývat hodnoty od 0 do 14. Pokud je použito jiné rozpouštědlo než voda, bude mít stupnice  $pH$  podle hodnoty  $pK_r$ , kde  $K_r$  představuje disociační konstantu příslušného rozpouštědla, jiný rozsah. Potom je jako neutrální roztok chápán ten, jehož  $pH$  je rovno polovině hodnoty  $pK_r$  [1, 2].

## 2.3. Metody stanovení disociační konstanty

### 2.3.1 Potenciometrie

Potenciometrie je elektroanalytická metoda používaná k určování složení vzorku, přesněji ke zjištění koncentrace daného analytu ve vzorku. Metoda je založená na měření

rozdílu potenciálů dvou elektrod, které jsou ponořeny do zkoumaného roztoku vzorku, tzv. elektrolytu. Z tohoto rozdílu je potom možné přímo určit koncentraci dané látky [4].

První z elektrod označujeme jako **měrnou**, resp. indikační a volíme ji tak, aby byl její potenciál závislý na koncentraci měřené látky v elektrolytu. Druhá elektroda se nazývá **porovnávací**, resp. referentní a její potenciál musí být neměnný, nezávislý na měřeném roztoku.

Potenciál elektrod  $E$  lze popsat tzv. **Nernstovou rovnicí**

$$E = E^0 + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}},$$

kde  $E^0$  představuje standardní elektrodový potenciál elektrody,  $z$  je náboj iontů a  $a_{ox}$ , resp.  $a_{red}$  jsou aktivity oxidované, resp. redukované formy iontů v roztoku. Pokud jsou si aktivity oxidované a redukované formy iontů rovny, tzn.  $\frac{a_{ox}}{a_{red}} = 1$ , potom je standardní elektrodový potenciál přímo roven elektrodovému potenciálu  $E$  [4].

Jako indikační elektrodu lze použít elektrodu vodíkovou, stříbrnou nebo skleněnou. Referentními elektrodami jsou nejčastěji elektroda kalomelová nebo argentchloridová.

**Vodíková elektroda** je tvořena platinovým plíškem potaženým platinovou černí, který je zatavený do skleněného držáku. K elektrodě je připojen vodič, který potenciál elektrody odvádí do měřicího přístroje. Během měření je elektroda částečně ponořena do roztoku, který je probubláván plynným vodíkem pod určitým tlakem. Na platinové černi dochází k disociaci molekulárního vodíku na atomární.



Podle domluvy je standardní elektrodový potenciál vodíkové elektrody roven nule, proto nabývá Nernstova rovnice tvaru

$$E_{H_2} = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln a_{H^+} = 0,059 \cdot \ln a_{H^+} = -0,0059 \cdot pH \quad (\text{při teplotě } 25^\circ)$$

Vodíkovou elektrodu lze používat k měření pH, protože její potenciál klesá spolu s rostoucím pH roztoku. U této elektrody se však velmi obtížně ustavuje její potenciál a její funkce bývá narušena přítomností rušivých látek v měřeném roztoku (bílkoviny, katalytické jedy, apod.) [1, 4].

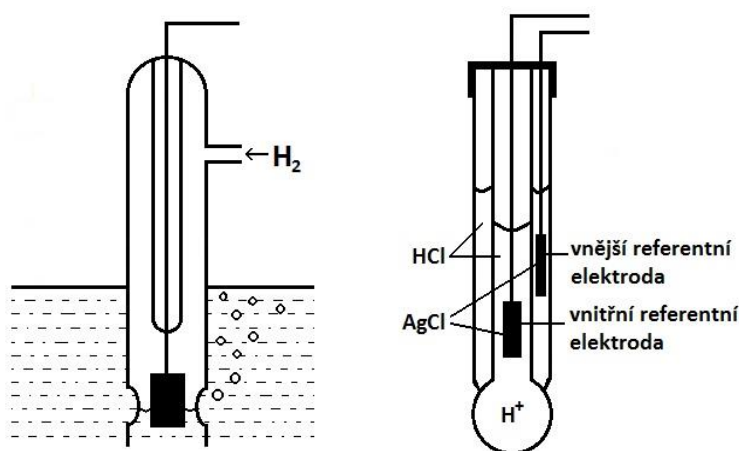
**Argentchloridovou elektrodu** tvoří stříbrný drátek nebo plíšek potažený vrstvičkou AgCl ponořený do roztoku obsahujícího ionty  $Cl^-$ , nejčastěji se jedná o KCl [4].

**Skleněná elektroda** je nejpoužívanější elektrodou pro měření pH. Jedná se o tzv. kombinovanou elektrodu (spojení indikační a referenční elektrody) tvořenou baničkou z tenkostěnného speciálního skla (polymerní křemičitan), která je naplněná roztokem kyseliny chlorovodíkové, do níž je ponořena argentchloridová elektroda (stříbrný drátek pokrytý vrstvou AgCl). Při měření se na vnitřním i vnějším povrchu baničky vyměňují kationty skla za kationty  $H^+$  z roztoku tak dlouho, dokud není dosaženo výměnné rovnováhy a vytvoří se elektrodotový potenciál. Vnitřní potenciál je konstantní (náplň má stálé pH), vnější lze popsat Nernstovou rovnicí

$$E_{skl} = konst + \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln a_{H^+} = konst - 0,059 \cdot pH \text{ (při teplotě } 25^\circ C)$$

Hodnota konstanty je nestálá, mění se spolu se stárnutím a používáním elektrody. Její hodnota se určuje experimentálně. Skleněná elektroda se před započítím měření kalibruje několika tlumivými roztoky o přesně známém pH.

Povrch baničky je měřením opotřebováván, dochází k postupnému vyluhování kationtů skla. Ke zničení elektrody může dojít mechanickým poškozením nebo při měření fluorovodíku či koncentrovaných roztoků hydroxidů [1, 4].



Obr. 1 Potenciometrické elektrody (zleva vodíková, skleněná)

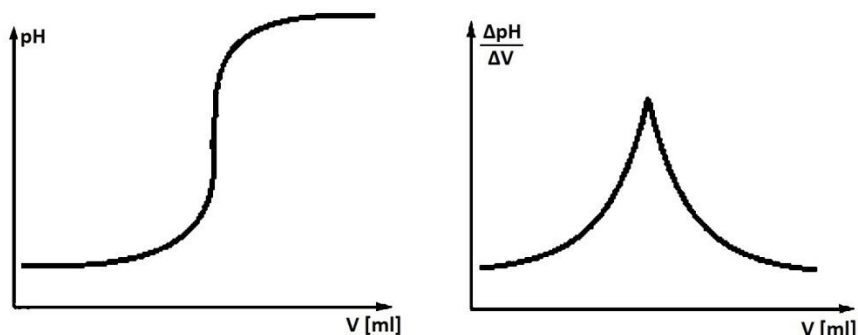
Potenciometrii lze v praxi využít ke sledování průběhu odměrné analýzy a k určení jejího bodu ekvivalence. Závislost potenciálu vhodně zvolené indikační elektrody<sup>2</sup> na množství přidaného odměrného roztoku je znázorněna pomocí **potenciometrické titrační**

<sup>2</sup> Indikační elektroda je volena podle typu reakce. U alkalimetrické titrace používáme indikační elektrodu citlivou na pH, u oxidačně-redukční titrace používáme elektrodu redoxní.

**křivky.** Ta má esovitý tvar a její inflexní bod<sup>3</sup> odpovídá bodu ekvivalence dané reakce. Tento bod lze určit odhadem (nejstrmější skok), graficky nebo výpočtem.

Grafické vyšetření bodu ekvivalence se provádí například metodou rovnoběžných tečen: Ke dvěma tečnám titrační křivky nalezneme přímku, která je s nimi rovnoběžná a leží uprostřed těchto tečen. Místo, kde protíná titrační křivku, je bodem ekvivalence. Tuto metodu je možné provádět, pouze za předpokladu, že je křivka souměrná.

Chceme-li bod ekvivalence získat výpočtem, použijeme první derivaci titrační křivky, kterou lze získat jako závislost  $\frac{\Delta E}{\Delta V}$ , resp.  $\frac{\Delta pH}{\Delta V}$  na spotřebě odměrného roztoku. Bod ekvivalence je potom roven maximu první derivace [4].



Obr. 2 Potenciometrická titrační křivka a její první derivace

Pro slabou kyselinu platí vztah  $K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$ , ze kterého lze úpravou dostat tzv.

**Hendersonovu-Hasselbalchovu rovnici:**

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Z této rovnice je zřejmé, že pokud se rovnovážné koncentrace disociované a nedisociované formy kyseliny rovnají, platí  $pH = pK_a$  [1].

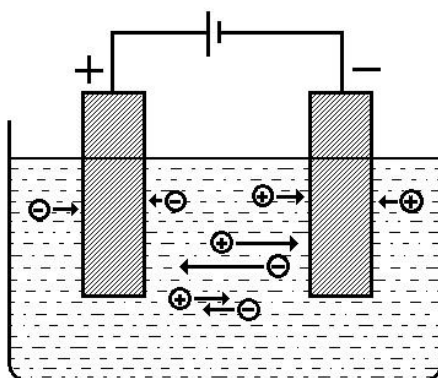
### 2.3.2 Konduktometrie

Konduktometrie je elektroanalytickou metodou založenou na měření elektrického odporu roztoku elektrolytu (vodiče II. třídy). Průchod elektrického proudu elektrolytem

<sup>3</sup> Inflexním bodem je takový bod, ve kterém se průběh funkce mění z konkávního na konvexní a naopak.

způsobuje jeho rozkládání na ionty, tento proces nazýváme **elektrolýza**. Pohybem iontů v elektrickém poli mezi elektrodami (vodiče I. třídy) je zprostředkován přenos elektrického proudu.

Elektrony jsou do elektrolytu přiváděny **katodou** (záporně nabitá elektroda) a jsou předávány iontům a molekulám roztoku, dochází k redukci. Elektrony jsou dále odevzdávány na **anodě** (kladně nabitá elektroda), kde dochází k oxidaci. Redukce a oxidace vždy probíhají současně a počet vyměněných elektronů v obou reakcích je stejný [1, 4].



Obr. 3 Elektrolýza

Schopnost elektrolytu vést elektrický proud vyjadřuje **konduktance**  $G$  (elektrická vodivost), která je převrácenou hodnotou **rezistance**  $R$  (elektrický odpor) a měří se pomocí dvou rovnoběžných plochých elektrod. Konduktance je přímo úměrná ploše elektrod  $S$  a nepřímo úměrná jejich vzdálenosti  $l$

$$G = \frac{1}{R} = \kappa \cdot \frac{S}{l} = \frac{\kappa}{K_r},$$

kde  $\kappa$  je tzv. **konduktivita** (měrná vodivost) a převrácená hodnota poměru  $S/l$  se označuje jako **odporová konstanta systému**  $K_r$ .

Konduktivita je závislá na teplotě a koncentraci elektrolytu, tzn. na množství iontů přenášejících elektrický proud a na rychlosti, s jakou se pohybují. Často se místo konduktivity roztoku o známé koncentraci  $c$  uvádí konduktivita roztoku o jednotkové koncentraci, tzv. **molární konduktivita** (molární vodivost)  $\Lambda$ .

$$\Lambda = \frac{\kappa}{c}$$

$\Lambda$  je nepřímo úměrná koncentraci roztoku, roste spolu s jeho ředěním. Největší hodnoty nabývá při nekonečném zředění roztoku, tuto hodnotu značíme  $\Lambda^0$  [1, 4].

U silných elektrolytů je závislost molárního konduktivity na koncentraci jen velmi malá. Oproti tomu u slabých elektrolytů je tato závislost výrazná. Při velkých koncentracích je slabý elektrolyt jen velmi málo disociován a jeho molární vodivost je proto velmi malá. Spolu s ředěním je elektrolyt stále více disociován a roste tedy i jeho molární vodivost, která největší hodnoty dosahuje při nekonečném zředění. Platí tzv. **Arrheniův vztah**

$$\Lambda = \alpha \cdot \Lambda^0,$$

kde  $\alpha$  je disociační stupeň [1].

Konduktometrii lze v praxi využít k určování disociační konstanty slabých jednosytných kyselin. Pokud je  $\alpha$  disociační stupeň a  $c$  koncentrace slabého elektrolytu HA, pak pro rovnovážné koncentrace platí  $[H^+] = [A^-] = c \cdot \alpha$  a  $[HA] = c \cdot (1 - \alpha)$ . Vztah pro disociační konstantu pak můžeme psát ve tvaru

$$K_a = \frac{c \cdot \alpha^2}{1 - \alpha}.$$

Dosažením Arrheniova vztahu tohoto výrazu získáme tzv. **Ostwaldův zředovací zákon**

$$K_a = \frac{c \cdot \frac{\Lambda^2}{(\Lambda^0)^2}}{1 - \frac{\Lambda}{\Lambda^0}},$$

který lze zapsat „lineárním“ tvaru

$$\frac{1}{\Lambda} = \frac{1}{K_a \cdot (\Lambda^0)^2} \cdot c \cdot \Lambda + \frac{1}{\Lambda^0}.$$

Disociační konstantu  $K_a$  lze určit ze směrnice přímky, která vyjadřuje závislost  $\frac{1}{\Lambda}$  na  $c \cdot \Lambda$  [1].

---

<sup>4</sup> Každou přímku lze zapsat v obecném tvaru  $y = p \cdot x + q$ . V tomto případě je  $y = \frac{1}{\Lambda}$ ,  $x = c \cdot \Lambda$  a pro směrnici platí  $p = \frac{1}{K_a \cdot (\Lambda^0)^2}$ .

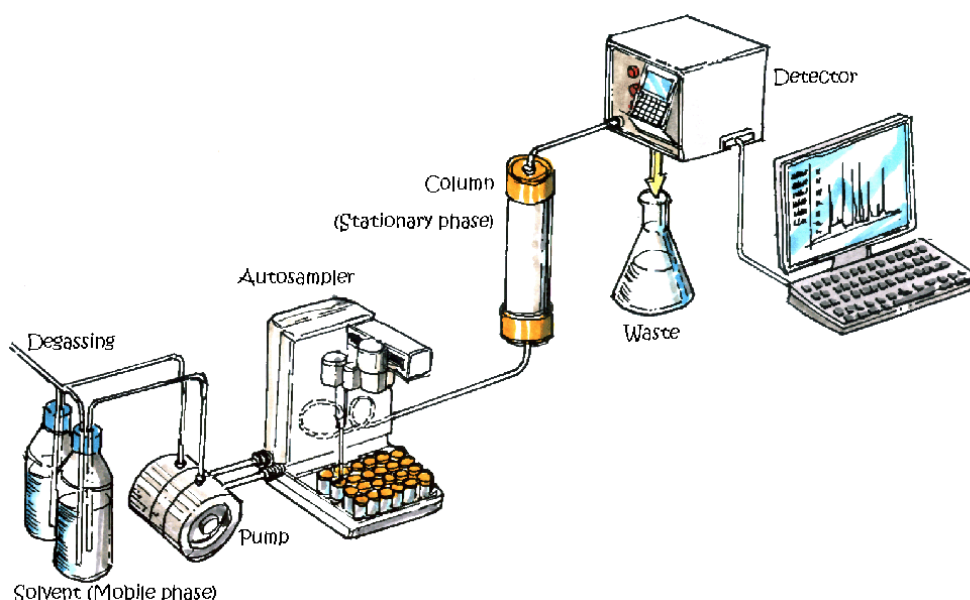


### 2.3.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je analytickou metodou, která umožňuje separaci a následnou detekci složek kapalné směsi látek.

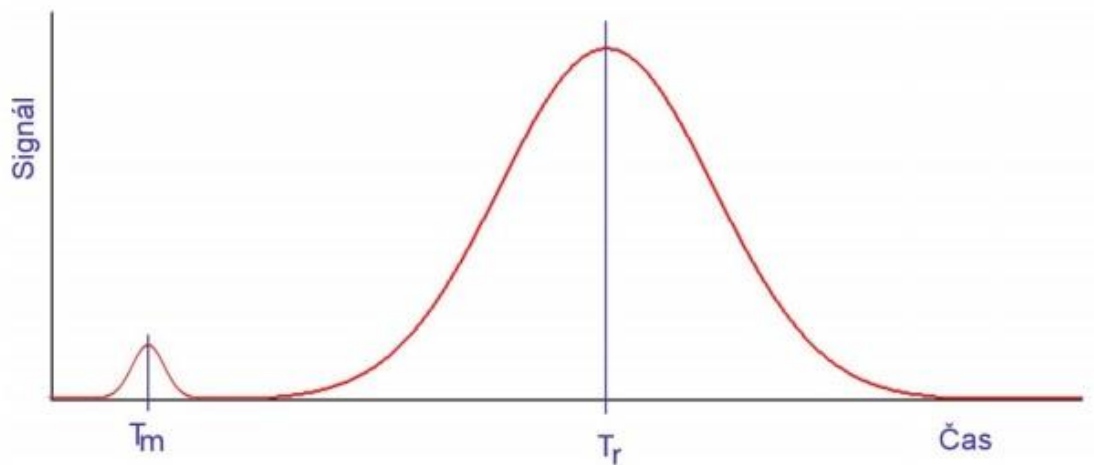
Kapalinový chromatograf je vybaven vysokotlakým čerpadlem, které zajišťuje kontinuální průtok a mísení **mobilních** (pohyblivých) **fází** v nastavitelném poměru. Vzorek analyzované látky se pomocí dávkovače mísí s mobilní fází, která jej vnáší na kolonu.

**Chromatografická kolona** bývá vyrobena ze skla nebo nerezy, má hladký povrch, musí být schopná odolávat vysokým tlakům a je naplněna **stacionární** (nepohyblivou) **fází**, kterou je nejčastěji silikagel. Dochází k rozdělení vzorku na jednotlivé jeho složky, které postupně vyházejí z kolony a jsou snímány průtokovým detektorem. Výsledek procesu je zaznamenán ve formě píků (migrační zóny) na časové ose **chromatogramu**. Píky představují jednotlivé složky látky a tloušťka píků jejich koncentraci [4, 5].



Obr. 4 Schéma HPLC (převzato z [11])

Dělení analyzované látky by mělo proběhnout v co nejkratším čase. U látek, jejichž složky mají blízké retenční časy (tj. doba, za kterou projdou kolonou) bývá použita mobilní fáze, jejíž složení se po dobu měření nemění. Tento způsob analýzy je tzv. **izokratická eluce**. Některé látky však obsahují složky s krátkými i dlouhými retenčními časy. Měření těchto látek by trvalo velmi dlouhou dobu a píky složek s dlouhými retenčními časy by byly rozšířené. Proto je výhodné použít tzv. **gradientovou eluci**, kdy je k mobilní fázi postupně přidáváno další rozpouštědlo, které urychluje postup pomalejších složek [4].



Obr. 5 Chromatogram (převzato z [6])

Měřenou látku lze identifikovat pomocí jejího **retenčního faktoru  $k$**

$$k = \frac{T_{r'}}{T_m} = \frac{T_r - T_m}{T_m},$$

kde  $T_m$  je tzv. mrtvý retenční čas (retenční čas mobilní fáze),  $T_r$  je retenční čas dané látky a  $T_{r'}$  je redukovaný retenční čas ( $T_{r'} = T_r - T_m$ ).

Retenční faktor jednosytné kyseliny lze zapsat rovnicí

$$k = x_{HA} \cdot k_{HA} + x_{A^-} \cdot k_{A^-},$$

kde  $x_{HA}$  je molární zlomek kyseliny,  $x_{A^-}$  molární zlomek anionty,  $k_{HA}$  retenční čas kyseliny a  $k_{A^-}$  retenční čas aniontu. Dále platí následující vztahy:

$$x_{HA} = \frac{10^{pK_a - pH}}{1 + 10^{pK_a - pH}}, \quad x_{A^-} = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

Rovnice pro určení retenčního faktoru jednosytné kyseliny potom nabývá tvaru:

$$k = \frac{k_{HA} \cdot 10^{-pH} + k_{A^-} \cdot 10^{-pK_a}}{10^{-pH} + 10^{-pK_a}}.$$

Disociační konstanta analyzované látky se stanoví ze změny retenčních faktorů v závislosti na pH mobilní fáze. HPLC se jako metody pro určování  $pK_a$  používá pouze u malého množství látek, její výhodou je, že látka nemusí být dokonale čistá, nečistoty jsou na koloně odděleny [6].

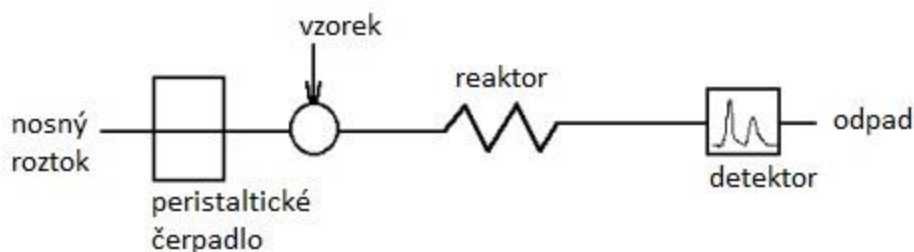
### 2.3.4. Průtoková vstřikovací analýza

Průtoková vstřikovací analýza (FIA) je analytická metoda založená na vstřikování vzorku do nosné kapaliny.



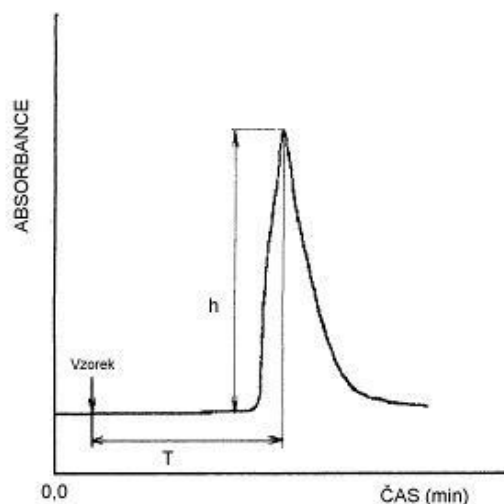
Obr. 6 Průběh FIA (převzato z [10])

Analyzátoři FIA analýzy se vyznačují jednoduchostí. **Peristaltické čerpadlo** čerpá nosnou kapalinu, do které je **vstřikovacím ventilem** nastříknut vzorek tak, aby proudění nosné kapaliny bylo co nejméně narušeno. Kromě vzorku je možné přidávat i potřebná činidla. Roztok prochází **reaktorem** (přímá trubice, reakční cívka, mísící komůrka, uzlový reaktor), kde probíhá míchání, případně dochází k reakci vzorku s činidlem. Promíchaný roztok vstupuje **průtokovou kvyetou** do **detektoru** (např. AAS, fotometrický, fluorimetrický). Všechny části přístroje jsou propojeny teflonovými, popř. polyethylenovými hadičkami s malým vnitřním průměrem. Výhodou malého průměru je nízká spotřeba vzorku a činidel, naopak nevýhodou je možné ucpání hadičky. Proto je nezbytné všechny použité chemikálie důkladně přefiltrovat a odvzdušnit vakuem, aby nedocházelo k tvorbě bublin [9, 10].



Obr. 7 Schéma FIA analyzátoru (převzato z [10])

Výsledkem analýzy je záznam popisující závislost absorbance na čase. V grafu jsou za sebou umístěné píky, jejichž výška  $h$  je mírou analytické koncentrace vzorku [10].



Obr. 8 Záznam FIA píku (převzato z [10])

Důležitou veličinou sloužící k popisu koncentračního gradientu je **kontrolovaná disperze  $D$** . Je dána poměrem počáteční koncentrace vzorku  $c_0$  a maximální koncentrace vzorku procházejícího detektorem  $c_{\max}$ . Lze ji rovněž zapsat pomocí měřené veličiny, kterou je absorbance při konstantní vlnové délce  $\lambda$ :

$$D = \frac{c_0}{c_{\max}} = \frac{A_0}{A_{\max}}$$

$A_0$  představuje počáteční absorbanci vzorku a  $A_{\max}$  je maximální absorbance vzorku po průchodu detektorem.

Hodnota disperze může být ovlivněna několika faktory. Například objemem vstříkovaného vzorku (při dané koncentraci spolu s objemem roste výška i šířka píku), rychlostí proudění (čím větší rychlost, tím menší disperze), délkou a tvarem reaktoru (s rostoucí délkou se pík rozšiřuje a klesá), atd.

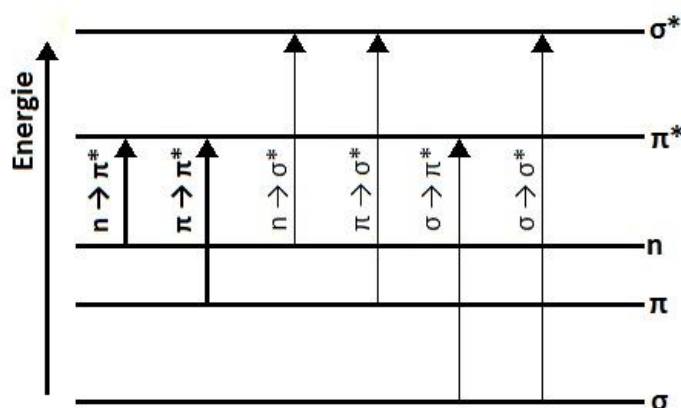
Podle velikosti disperze lze FIA systémy rozlišit na tři druhy:

1. Systémy s omezenou disperzí ( $D < 3$ ) – obvykle jde o případy, kdy v průběhu analýzy neprobíhá žádná chemická reakce, jedná se pouze o transport vzorku k detektoru.
2. Systémy se střední disperzí ( $3 < D < 10$ ) – jedná se o měření, u kterých při stanovování dochází k chemické reakci. Vyžadují menší rychlost proudění a delší reaktor.
3. Systémy s vysokou disperzí ( $D > 10$ ) – používají se u FIA titrací, vyžadují velmi dlouhé reaktory, k promíchání vzorku s činidlem jsou používány míchací komůrky [9, 10].

### 2.3.5. Molekulová absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

UV/Vis spektroskopie je analytická metoda založená na absorpci viditelného a ultrafialového záření (oblast 200 – 800 nm) roztoky měřených látek.

**Absorpce záření** způsobuje, že elektrony přecházejí ze základního do excitačního stavu, tzn. z nižší do vyšší energetické hladiny. Takovýchto přechodů existuje celkem šest, u UV/Vis záření jsou však možné pouze přechody  $n \rightarrow \pi^*$  a  $\pi \rightarrow \pi^*$ .



Obr. 9 Přechody elektronů mezi orbitaly

K přechodu  $\pi \rightarrow \pi^*$  dochází u sloučenin, které ve svých molekulách obsahují násobné vazby nebo aromatické jádro (C=C, C≡C). Přechod  $n \rightarrow \pi^*$  se vyskytuje u látek, které obsahují násobné vazby tvořené alespoň jedním atomem s volným elektronovým párem (C=O, C=S, N=N), a je nejméně energeticky náročný [4, 6].

Každá energetická hladina obsahuje **vibrační a rotační podhladiny**. Elektronový přechod je zpravidla doprovázen vibračními a rotačními přechody, jejichž energie se liší jen o velmi malé hodnoty. Výsledné spektrum má tedy charakter **absorpčního pásu**, jehož energie  $\Delta E$  je rovna rozdílu energií excitovaného a základního stavu elektronu

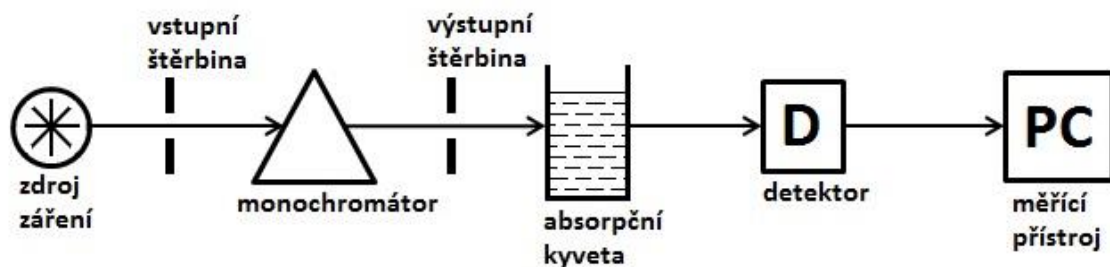
$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu,$$

kde  $E_2$  je energie elektronu v excitovaném stavu,  $E_1$  energie v základním stavu,  $h$  Planckova konstanta a  $\nu$  frekvence záření [6].

**Spektrofotometr**, přístroj určený k absorpční spektrální analýze v oblasti UV/Vis záření se skládá z emisního systému (zdroj záření), disperzního systému (monochromátor), absorpčního prostředí (kyvety s analyzovaným vzorkem a referenční kyveta) a detektoru záření.

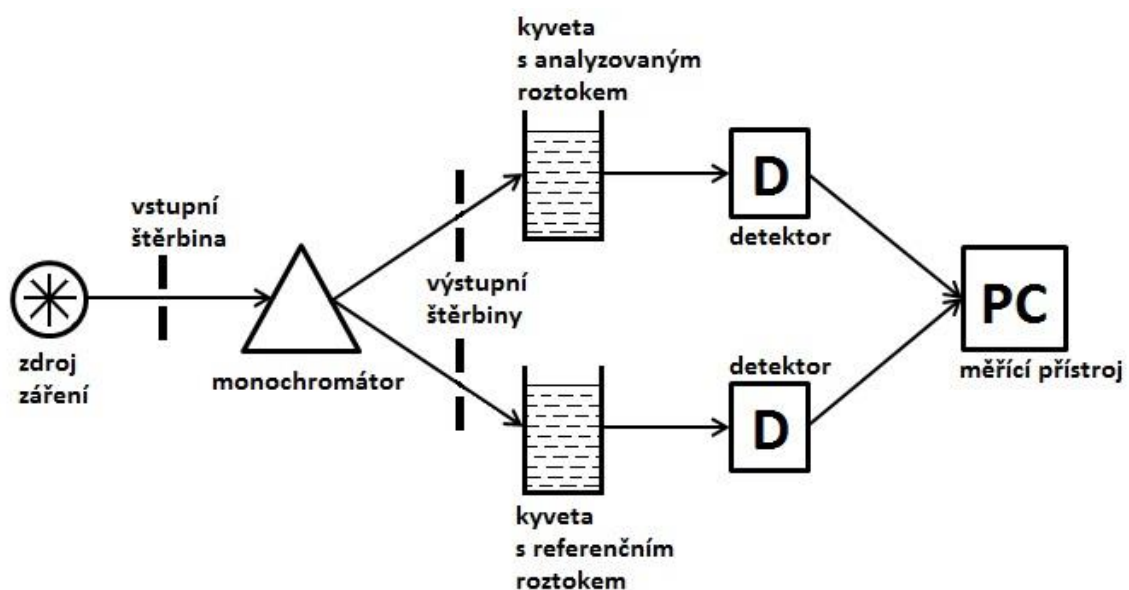
Jako **zdroj záření** se používá wolframová žárovka a deuteriová výbojka, které produkují spojité polychromatické záření v rozsahu 180 – 3 000 nm. Toto záření vstupuje do **monochromátoru** (sestava hranolů nebo mřížek, štěrbin a zrcadel), který slouží k výběru záření o konkrétní vlnové délce. Monochromatické záření prochází **absorpční kvyetou** vyrobenou ze skla (měření ve viditelné oblasti) nebo křemene (měření v UV oblasti) a prošlé neabsorbované záření dopadá na **detektor**, kterým je nejčastěji fotonásobič.

Obecně se rozlišují dva typy spektrofotometrů – jednopaprskové a dvoupaprskové. **Jednopaprskové přístroje** jsou jednodušší a levnější. Při analýze je nutné provést dvě měření – s referenčním a analyzovaným roztokem. Absorpční spektrum se sestavuje z hodnot absorpcí, které jsou postupně měřeny při různých vlnových délkách [4, 8, 11].



Obr. 10 Schéma jednopaprskového spektrofotometru

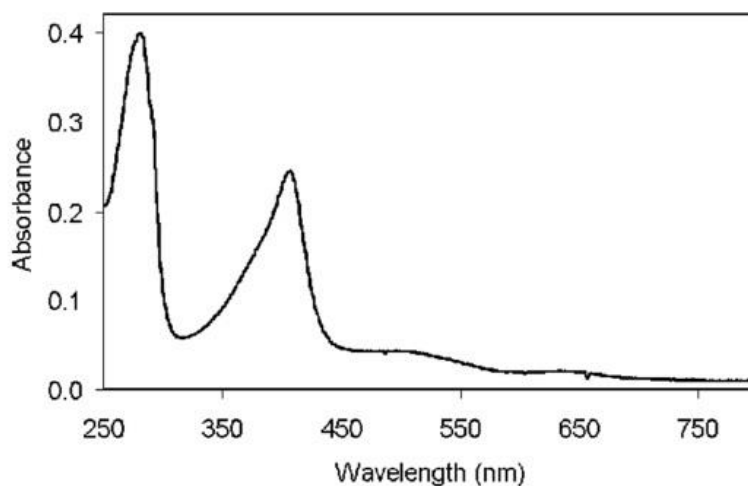
U **dvoupaprskových spektrofotometrů** dochází k rozdělení záření na dva paprsky, které procházejí kvyetami s analyzovaným a referenčním roztokem. Jsou automatické, umožňují naráz změřit celé absorpční spektrum [4, 8].



Obr. 11 Schéma dvoupaprskového spektrofotometru

UV/Vis spektrofotometrie je kvalitativní i kvantitativní metodou. Nejčastěji se používá k identifikaci, určování koncentrace a čistoty látek a k analýze směsí.

**Kvalitativní analýza** je založena na určování polohy absorpčního maxima v naměřeném absorpčním spektru.



Obr. 12 Příklad UV/Vis spektra (převzato z [11])

**Kvantitativní analýza** vychází z **Lambert-Beerova zákona** pro zředěné roztoky

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c,$$

kde  $A$  představuje absorbanci,  $\varepsilon_{\lambda}$  je molární absorpční koeficient,  $l$  délka kyvety a  $c$  koncentrace analyzované látky. Absorbanci lze rovněž určit pomocí transmitance  $T$

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad A = -\log T = \log \frac{\Phi_0}{\Phi},$$

kde  $\Phi_0$  je světelný tok vstupující do kyvety se vzorkem a  $\Phi$  světelný tok z kyvety vystupující [6, 8].

Koncentraci látky zjišťujeme při vlnové délce jejího absorpčního maxima; potom je podle Lambert-Beerova zákona absorbance lineárně závislá na koncentraci analyzované absorbující látky

$$A = f(c)^5.$$

Pokud je v analyzovaném roztoku přítomno více absorbujících látek, je celková absorbance rovna součtu absorbancí jednotlivých absorbujících složek

$$A = \sum_i A_i = \sum_i \varepsilon_i \cdot c_i.$$

<sup>5</sup> Molární absorpční koeficient je pro danou látku a příslušnou vlnovou délku konstantní. Konstantní je i délka kyvety [7].

Pro určení koncentrací  $n$  látek je nutné provést  $n$  měření při  $n$  různých vlnových délkách a vyřešit soustavu  $n$  lineárních rovnic o  $n$  neznámých. Nejprve změříme absorpční spektra čistých látek a u každého zjistíme vlnovou délku absorpčního maxima. Při těchto vlnových délkách potom provádíme analýzu směsi.

Pokud například analyzujeme směs dvou látek M, N a měření provádíme při vlnových délkách  $\lambda'$ ,  $\lambda''$ , dostáváme soustavu rovnic

$$A' = \varepsilon'_M \cdot l \cdot c_M + \varepsilon'_N \cdot l \cdot c_N$$

$$A'' = \varepsilon''_M \cdot l \cdot c_M + \varepsilon''_N \cdot l \cdot c_N,$$

ze které je možné odvodit vztahy pro výpočet obou koncentrací

$$c_M = \frac{A' \cdot \varepsilon''_N - A'' \cdot \varepsilon'_N}{l \cdot (\varepsilon'_M \cdot \varepsilon''_N - \varepsilon''_M \cdot \varepsilon'_N)}$$

$$c_N = \frac{A'' \cdot \varepsilon'_M - A' \cdot \varepsilon''_M}{l \cdot (\varepsilon'_M \cdot \varepsilon''_N - \varepsilon''_M \cdot \varepsilon'_N)}.$$

Mnohem jednodušší, ale nepřesnější metodou pro stanovení koncentrace ve směsi látek je měření absorpčního spektra při vlnové délce tzv. **isosbestického bodu**, což je bod, ve kterém se absorpční křivky všech látek protínají. V případě směsi dvou látek M, N mají rovnice pro výpočet koncentrací tvar

$$c_M = \frac{A_{IB}}{2 \cdot \varepsilon_M}$$

$$c_N = \frac{A_{IB}}{2 \cdot \varepsilon_N},$$

kde  $A_{IB}$  je absorbance isosbestického bodu a  $\varepsilon_M$ , resp.  $\varepsilon_N$  jsou molární absorpční koeficienty látek M, N [4, 7, 8].

## 2.4. Vyhodnocování dat

Vyhodnocování experimentálních dat lze provádět dvěma druhy metod:

1. **Hard modellingové metody** vyžadují znalost chemického modelu. Jsou vhodné v případech, kdy je možné chemický model stanovit, například ke studiu chemických rovnovah, kdy se model skládá ze stechiometrie zúčastněných složek a z hrubého odhadu rovnovážné konstanty.



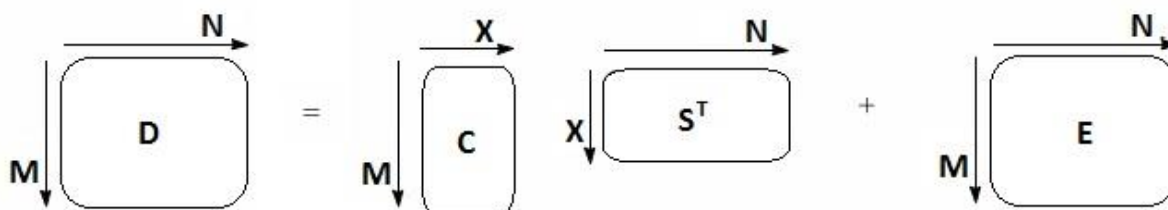
2. **Soft modellingové metody** pracují s naměřenými daty bez stanovení chemického modelu. Jsou obsáhlejší. Jejich výstupem jsou koncentrační profily a čistá spektra jednotlivých složek probíhající reakce, které jsou potřebné k určení chemického modelu a látkových bilancí. [13, 14]

### 2.4.1. Vícerozměrná analýza dat

Naměřená data se ukládají do matice  $D$  ( $M \times N$ ), kde  $M$  je počet řádků představující počet měřených hodnot (např. pH, t, ...) a  $N$  je počet sloupců, který odpovídá počtu vlnových délek, při kterých měření probíhalo. Hard a soft modellingové metody určují koncentrace a čistá spektra všech složek systému tak, že rozkládají matici  $D$  podle vztahu:

$$D = C \cdot S^T + E,$$

kde  $C$  je matice koncentrací,  $S^T$  matice čistých spekter jednotlivých složek systému a  $E$  je matice reziduí, které představují náhodné chyby měření [13, 14].



Obr. 13 Maticový vztah

Uvedený vztah lze vyřešit metodou střídajících se nejmenších čtverců, která se snaží nalézt hodnoty matic  $C$  a  $S^T$  tak, aby co nej přesněji odpovídaly datům v původní matici  $D$ . Předpokládá se, že hodnota matice  $E$  se blíží nule, pak výše uvedený vztah nabývá tvar:

$$D = C \cdot S^T.$$

Hodnoty matice  $C$  jsou předběžné koncentrace a hodnota  $S^T$  je odhadnuta. Následně je použita jedna z omezujících podmínek (např. absorbance, vždy kladné hodnoty koncentrace). Tyto hodnoty jsou dosazeny do matice  $S^T$  a hodnota matice  $C$  je dopočítána. Opakovaně jsou dosazovány omezující podmínky, čímž se navrhovaný chemický model stále více zdokonaluje.

## 3. Praktická část

### 3.1. Oximy

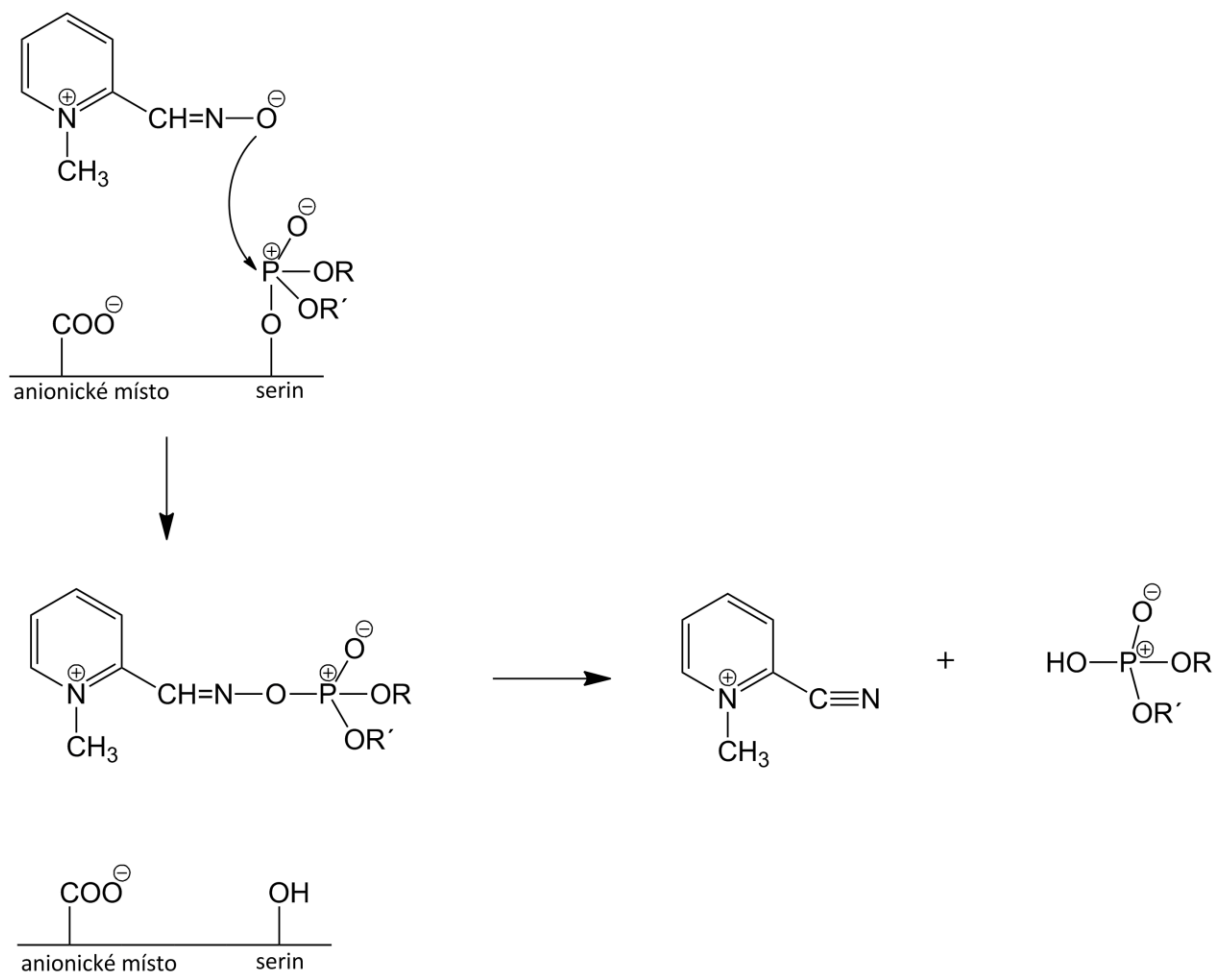
Oximy jsou **reaktivátory acetylcholinesterázy** používané jako protijedy při otravě organofosfáty, které se běžně používají jako pesticidy, herbicidy nebo chemické zbraně. Při intoxikaci organofosfátových sloučenin dochází k inhibici acetylcholinesterázy, což je enzym nezbytný pro správnou funkci centrální nervové soustavy savců, hydrolyzuje acetylcholin za vzniku cholinu a kyseliny octové [12].

**Organofosfáty** jsou elektrofilní molekuly se schopností fosforylovat hydroxylovou skupinu serinu, který se nachází v aktivním místě acetylcholinesterázy. Odstupující skupina organofosfátu je odštěpena a vytváří s acetylcholinesterázou **komplex enzym-inhibitor**. Tento komplex je velmi stabilní a jeho regenerace hydrolyzou probíhá velmi pomalu (v řádu dnů). Důsledkem je akumulace a hromadění acetylcholinu v synaptických štěrbinách, což vede k hyperstimulaci nikotinových a muskarinových receptorů a dochází tak k otravě endogenním acetylcholinem [12].

Oximy způsobují rychlou reaktivaci acetylcholinesterázy, proto se používají **organofosfátová antidota**. Reakční mechanismus účinku oximů je založen na odejmutí fosforové části ze serinu v aktivním místě acetylcholinesterázy, čímž dochází k její opětovné aktivaci. Jako meziprodukt vzniká **komplex enzym-inhibitor-reaktivátor**, jehož rozštěpením vzniká reaktivovaný enzym [12].

Tento proces probíhá pouze u čerstvě fosforylované acetylcholinesterázy, u starších komplexů enzym-inhibitor není možné enzym prostřednictvím oximů reaktivovat. Rychlost stárnutí závisí na druhu organofosfátové sloučeniny, tzn. inhibitoru.

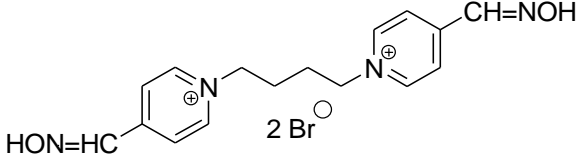
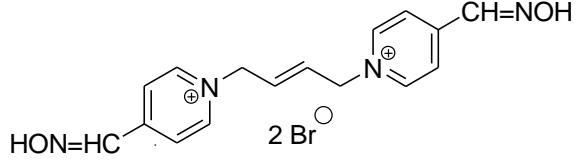
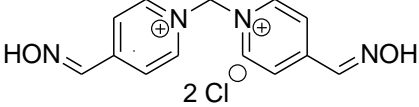
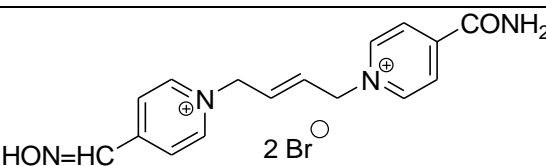
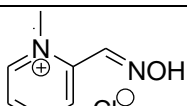
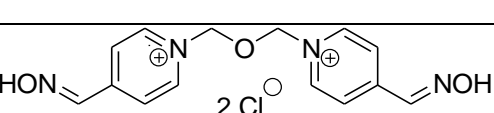
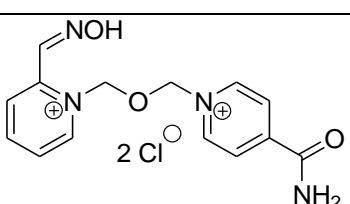
Prozatím neexistuje oxim, který by byl relativně účinný proti všem druhům organofosfátů, teda takový, který by měl univerzální antidotní účinek [12].



Obr. 14 Mechanismus reaktivace acetylcholinesterázy

V rámci této bakalářské práce byly měřeny hodnoty disociačních konstant u následujících bispyridinových oximů:

Vzorek	Název	Struktura
K018	trimedoxim	
K027	-	
K048	-	

K074	-	
K075	-	
K170	methoxim	
K203	-	
K244	pralidoxim	
K318	obidoxim	
K323	asoxim	

Tab. 1 Měřené bispyridinové oximy

### 3.2. Přístrojové vybavení

Pro spektrofotometrické měření byl použit dvoupráskový **UV/Vis spektrofotometr Lambda 25** značky Perkin Elmer (Waltham, MA, USA).



Obr. 15 Spektrofotometr Lambda 25

FIA analýza probíhala na **HPLC chromatogramu Infinity 1260** (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).



Obr. 16 HPLC chromatograf Infinity 1260

### 3.3. Použité materiály a metody

#### Použité chemikálie:

99 % kyselina fosforitá (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

oximové vzorky – K018, K027, K048, K074, K075, K170, K203, K244, K315, K325

demineralizovaná voda DEMIWA 5 rosa (WATEK, Ledec nad Sázavou, Česká republika)

Kyselina fosforitá a hydroxid sodný byly použity pro přípravu dvou zásobních pufrů s pH 6,00 (pufr1) a pH 8,50 (pufr2). Z těchto dvou pufrů bylo připraveno zbylých devět pufrů smícháním v následujících poměrech:

<b>pufr1/pufr2</b>	90/10	80/20	70/30	60/40	50/50	40/60	30/70	20/80	10/90
<b>pH</b>	6,28	6,46	6,61	6,77	6,89	7,06	7,25	7,40	7,72

Tab. 2 Poměry připravených pufrů

Iontová síla připravovaných pufrů byla nastavena tak, aby po smíchání s pracovními roztoky vzorků byla rovna 1.

Zásobní roztoky vzorků byly připraveny rozpuštěním 50 mg pevného vzorku v odměrných baňkách o objemu 50 ml, které byly po rysku doplněny demineralizovanou vodou. Roztoky byly uloženy v chladničce. Před analýzou byly pracovní roztoky připraveny ze zásobních roztoků jejich desetinásobným zředěním.

**Spektrofotometrické měření** bylo provedeno na spektrofotometru Lambda 25 značky Perkin Elmer v křemenných kyvetách SM/Q10 (Exacta + Optech, San Prospero, Itálie). Z pracovních roztoků byly připraveny sady směsí vzorků a pufrů v poměru 1:4. Absorpční spektrum bylo u všech vzorků měřeno v oblasti vlnových délek 210 – 640 nm. Výsledky byly zaznamenány UV WINLAB softwarem verze 2.85.04 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

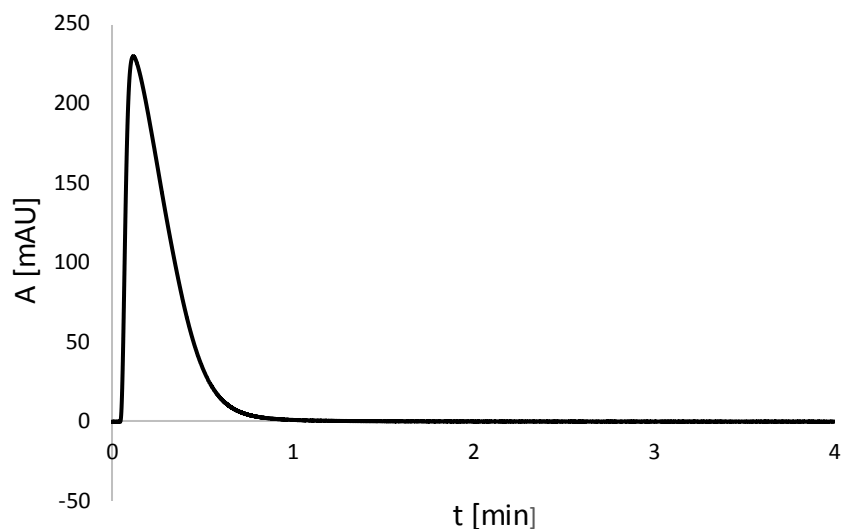
**FIA analýza** probíhala na HPLC chromatogramu Infinity 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s automatickým dávkovačem Infinity 1290 (G4226A), kvartérním čerpadlem Infinity 1260 (G1311B), termostatem kolony Infinity 1260 (G1316A) a detektorem s diodovým polem Infinity 1260 (G4212B). Na rozdíl od běžného uskupení HPLC chromatografu nebyla přítomna chromatografická kolona.

Mobilní fáze byla připravena smísením pufru s pH 6,00 (zásobník A), pufru s pH 8,50 (zásobník B) a demineralizované vody (zásobník C). Čerpadlo bylo nastaveno tak, aby získané mobilní fáze byly stejné jako pufrы používané u spektrofotometrické metody. Průtok byl nastaven na  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Po zaplnění celého HPLC systému mobilní fází nasál automatický dávkovač  $40 \mu\text{l}$  mobilní fáze a  $10 \mu\text{l}$  vzorku a desetkrát je promísil. Vzorek byl následně nastříknut do toku mobilní fáze a detektor změřil jeho absorpční spektrum v rozmezí 210 – 640 nm. Zaznamenávání výsledků probíhalo za použití Agilent OpenLab softwaru verze A.01.05 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA).

Po každém měření byla pomocí menšího množství aktuálně používané mobilní fáze zkontrolována hodnota pH.

Výsledný chromatogram nevypadal jako běžné chromatogramy kvůli chybějící chromatografické koloně, obsahoval pouze jednu oblast se signálem. Pro výpočet pak bylo vybráno absorpční spektrum ve vrcholu píku – místo s nejvyšší intenzitou a konzistencí.



Obr. 17 Chromatogram obidoximu získaný FIA analýzou

K vyhodnocování dat byl použit program **MatLab**<sup>®</sup> (MathWorks, Natick, MA) – hard modellingový nástroj **EQUISPEC** a soft modellingový nástroj **MCR-ALS**. Hard modellingové výpočty byly prováděny podle následujícího modelu: acidobazické titrace, jedna sloučenina ve dvou formách – jedna disociační konstanta, nezahrnuta žádná počáteční spektra. Pro soft modellingové výpočty byla použita tato omezení: směs dvou sloučenin, hodnoty absorbance a koncentrace dosahují vždy kladných hodnot.

## 4. Výsledky a diskuse

Všechny vzorky byly změřeny podle výše popsaného popisu. Naměřená spektra, grafy určující  $pK_a$  a vypočtená spektra všech oximů jsou umístěny v Příloze 1. Výsledné hodnoty  $pK_a$  jsou zaznamenány v následujících tabulkách:

UV/Vis spektrofotometrie							
	ALS (soft model)			EQUISPEC (hard model)			Literatura
	$pK_a$	směrodatná odchylka		$pK_a$	směrodatná odchylka		$pK_a$
<b>K018</b>	7,74	0,32	± 12,9 %	7,79	0,21	± 8,4 %	8,39 [15]; 9,40 [16]
<b>K027</b>	7,56	0,16	± 6,2 %	7,69	0,11	± 4,4 %	8,42 [15]
<b>K048</b>	7,83	0,14	± 5,6 %	7,96	0,16	± 6,4 %	-
<b>K074</b>	7,72	0,08	± 3,2 %	7,92	0,07	± 2,8 %	7,95 [17]
<b>K075</b>	7,72	0,14	± 5,7 %	7,91	0,13	± 5,2 %	7,95 [17]
<b>K170</b>	7,42	0,12	± 4,8 %	7,48	0,04	± 1,6 %	8,23 [16]
<b>K203</b>	7,66	0,23	± 9,3 %	7,21	0,16	± 6,4 %	-
<b>K244</b>	7,47	0,21	± 8,2 %	7,51	0,14	± 5,6 %	5,58 [16]
<b>K318</b>	7,69	0,06	± 2,2 %	7,35	0,30	± 8,4 %	8,28 [16]
<b>K323</b>	7,19	0,18	± 7,1 %	7,23	0,12	± 4,8 %	7,74 [15]; 3,87 [16]

Tab. 3 Hodnoty  $pK_a$  získané UV/Vis spektrofotometrií

FIA analýza							
	ALS (soft model)			EQUISPEC (hard model)			Literatura
	$pK_a$	směrodatná odchylka		$pK_a$	směrodatná odchylka		$pK_a$
<b>K018</b>	7,76	0,03	± 1,3 %	7,98	0,02	± 0,8 %	8,39 [15]; 9,40 [16]
<b>K027</b>	7,74	0,05	± 2,1 %	7,87	0,04	± 1,6 %	8,42 [15]
<b>K048</b>	7,82	0,06	± 2,3 %	8,08	0,06	± 2,4 %	-
<b>K074</b>	7,78	0,05	± 1,8 %	8,00	0,03	± 1,2 %	7,95 [17]
<b>K075</b>	7,80	0,04	± 1,5 %	8,02	0,03	± 1,2 %	7,95 [17]
<b>K170</b>	7,42	0,09	± 3,6 %	7,52	0,03	± 1,2 %	8,23 [16]
<b>K203</b>	7,82	0,11	± 4,5 %	8,09	0,10	± 4,0 %	-
<b>K244</b>	7,61	0,09	± 3,7 %	7,74	0,05	± 2,0 %	5,58 [16]
<b>K318</b>	7,67	0,07	± 2,7 %	7,82	0,03	± 6,4 %	8,28 [16]
<b>K323</b>	7,34	0,04	± 1,5 %	7,42	0,03	± 1,2 %	7,74 [15]; 3,87 [16]

Tab. 4 Hodnoty  $pK_a$  získané FIA analýzou



První známé oximové reaktivátory acetylcholinesterázy (K018, K170, K244, K318, K323) byly zavedeny bez hlubší analýzy jejich fyzikálně-chemických vlastností. Později byla vhodná hodnota jejich  $pK_a$  (vyhovující pro správný účinek v lidském organismu) určena mezi 7,5 a 9,5 [18]. Tyto hodnoty platí pro jednu oximovou skupinu v molekule. Některé oximové reaktivátory obsahují ve svých molekulách oximové skupiny dvě (K018, K074, K075, K170, K318) a mají tak dvě hodnoty  $pK_a$  ( $pK_{a1}$  a  $pK_{a2}$ ).  $pK_{a2}$  těchto oximů jsou uváděny kolem hodnoty 9 [15, 16]. Pro účinnou reaktivaci acetylcholinesterázy však nemají význam a nebyly proto této práci studovány.

V tabulkách 3 a 4 jsou uvedeny výsledné hodnoty  $pK_a$  stanovovaných oximů a pro srovnání hodnoty uváděné v literatuře. Porovnání naměřených dat s údaji v literatuře je velmi variabilní. U oximů K074 a K075 jsou naměřené a v literatuře uváděné hodnoty  $pK_a$  velmi blízké. Oproti tomu u oximů K018, K027, K170, K244, K318 a K323 se výsledky od literatury značně liší.

Při srovnání obou použitých metod je ze zřejmé, že FIA analýza vykazuje vyšší přesnost než UV/Vis analýza – směrodatné odchylky u FIA analýzy jsou menší než 5 %, v případě UV/Vis spektrofotometrie se blíží i k 10 %. Rozdíl je způsoben především lidským faktorem při přípravě pufrů u UV/Vis spektrofotometrie. Rozdíly mezi oběma metodami jsou však menší než rozdíly při porovnávání naměřených výsledků a údajů z literatury.

Výhodou FIA analýzy je úspora času i materiálu. Na rozdíl od UV/Vis spektrofotometrie, kde je nutné všechny pufrы smíchat jednotlivě, u FIA analýzy je umožněno automatické smíchání dvou pufrů v nastavitelném poměru.

Pro tento typ měření se ukázalo jako vhodnější používání hard-modellingu, který u obou metod vykazuje menší směrodatné odchylky.

## 5. Závěr

Bylo provedeno měření  $pK_a$  u deseti oximových vzorků dvěma metodami – UV/Vis spektrofotometricky a FIA analýzou. Naměřené výsledky byly porovnány s údaji z literatury. U některých látek byly obě hodnoty v dobré shodě, u jiných byly rozdílné.

Dále bylo porovnáním výsledků zjištěno, že obecně je FIA analýza výhodnější metodou než UV/Vis spektrofotometrie. Vykazovala menší směrodatné odchylky, vyžadovala kratší pracovní dobu a nižší spotřebu pufrů a vzorku. Díky automatizaci došlo navíc k minimalizaci chyb způsobených lidským faktorem a metoda se stala lépe reprodukovatelnou.

Naměřená data byla zpracována hard modellingovým programem EQUISPEC a soft modellingovým programem MCR-ALS. Výsledky se ukázaly přesnější v případě hard modellingu.

Jako nejvhodnější způsob měření se tedy ukázala FIA analýza spolu s použitím hard modellingu – tyto výsledky byly nejpresnější. Jedinou výjimkou byl obidoxim (K318), u kterého byl přesnější soft modelling.

# Seznam literatury

1. **GASPARIČ, Jiří.** *Úvod do fyzikální chemie a fyzikálně chemických metod.* Vyd. 1. Hradec Králové : Gaudeamus, 1998. ISBN 80-7041-602-5.
2. **GAŽO, Ján.** *Kyseliny a zásady. Všeobecná a anorganická chémia.* 2. upr. vyd. Bratislava : Alfa, vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1978, stránky 211-222.
3. **MCMURRY, John.** *Polární kovalentní vazby; kyseliny a báze. Organická chemie.* Vyd. 1. Brno : VUTIUM, 2007, stránky 26-53. ISBN 978-80-214-3291-8.
4. **MAJER, Jaroslav.** *Analytická chémia: Učebnica pre farmaceutické fakulty.* Vyd. 1. Martin : Osveta, 1989.
5. **ČUPACHIN, Michail Sergejevič a Miloslav PŘIBYL.** *Moderní metody analýzy čistých chemikálií.* Vyd. 1. Praha : SNTL- Nakladatelství technické literatury, 1989. Sv. 42.
6. **KOVÁŘ, Libor.** *Význam a metody stanovení disociačních konstant léčiv.* Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice. 2013. Bakalářská práce.
7. **KALINA, Jiří a Vladimír ŠPUNDA.** *Optická spektroskopie I.* Vyd. 1. Ostrava : Ostravská univerzita, 2004. ISBN 80-7368-000-9.
8. **MIERTUŠ, Stanislav.** *Atómová a molekulová spektroskopie.* Vyd. 1. Bratislava : Alfa, 1992. ISBN 80-05-00946-1.
9. **VOSMANSKÁ, Magda.** *Průtoková vstřikovací analýza. Ústav analytické chemie VŠCHT Praha.* [Online] [Citace: 22. červenec 2015.] <http://old.vscht.cz/anl/lach2/FIA.pdf>.
10. *Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze . Průtoková injekční analýza se spektrofotometrickou detekcí.* [Online] [Citace: 22. červenec 2015.] [http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/povinne/07\\_FIA.pdf](http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/povinne/07_FIA.pdf).
11. **MUSIL, Karel.** *Laboratorní cvičení z fyzikálně-chemických metod.* Hradec Králové, 2013.
12. **ŠVEHLOVÁ, Jana.** *Oximy jako léčiva.* Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Univerzita Karlova v Praze. Hradec Králové, 2009. Diplomová práce.
13. **BUČEK, Pavel.** *Použití pokročilých chemometrických technik pro výzkum struktury DNA.* Ústav chemie, Masarykova univerzita . Brno, 2008. Diplomová práce.
14. **VOJTYLOVÁ, Terézia.** *Štúdium interakcií polynukleotidov s vybranými ligandami spektroskopickými metodami.* Ústav chemie, Masarykova univerzita. Brno, 2008. Diplomová práce.
15. **ŠINKO, Goran, Maja Čalić a Zrinka Kovarik.** *para- and ortho-Pyridinium aldoximes in reaction with acetylcholine. FEBS Letters.* 2006, Sv. 580, 13, stránky 3167-3172.

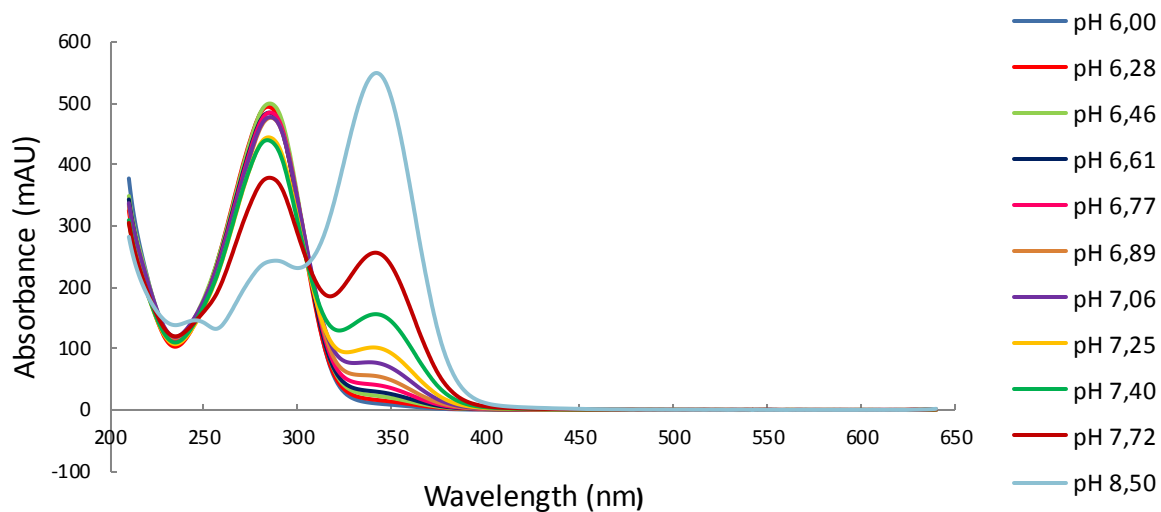
16. **ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, Jana, Petr Stodůlka a Kamil Kuča.** In vitro screening of blood-brain barrier penetration of clinically used acetylcholinesterase reactivators. *Journal of Applied Biomedicine*. 2010, Sv. 8, 1, stránky 35-40.

17. **PATOČKA, Jiří, J. Bielavský a F. Ornst.** Reactivating effect of  $\alpha,\omega$ -BIS-(4-pyridinealdoxime)-2-trans-butene dibromide on isopropyl-methylphosphonylated acetylcholinesterase. *FEBS Letters*. 1970, Sv. 10, 3, stránky 182-184.

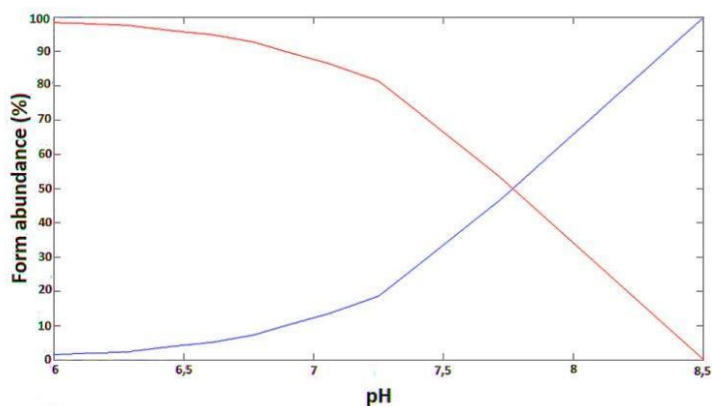
18. **GUPTA, Bhanushree, Namrata Singh, Rahul Sharma, Blaženka Foretić, Kamil Musílek, Kamil Kuča, Jyotiranjana Acharya, M.L. Satnami a Kallol K. Ghosh.** Assessment of antidotal efficacy of cholinesterase reactivators against paraoxon: In vitro reactivation kinetics and physicochemical properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 24, 2014, Sv. 19, stránky 4743-4748.

# Příloha 1

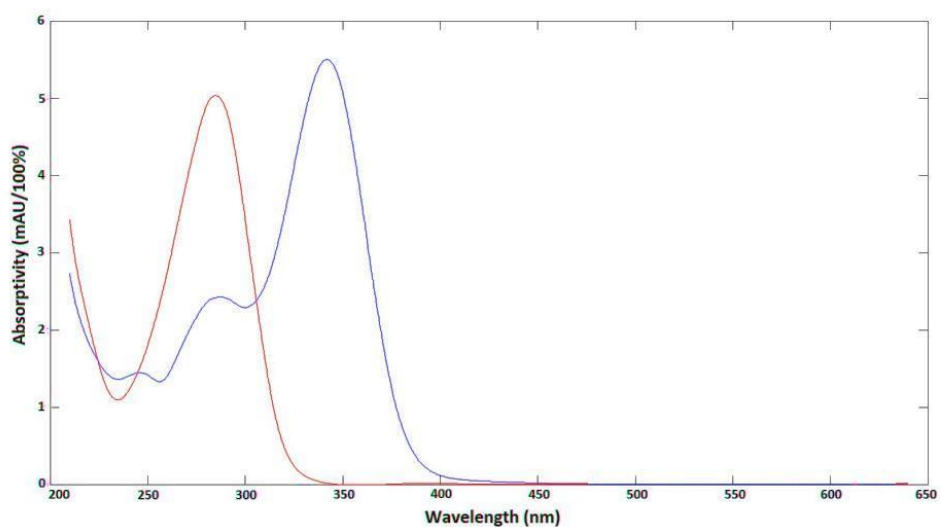
## K018



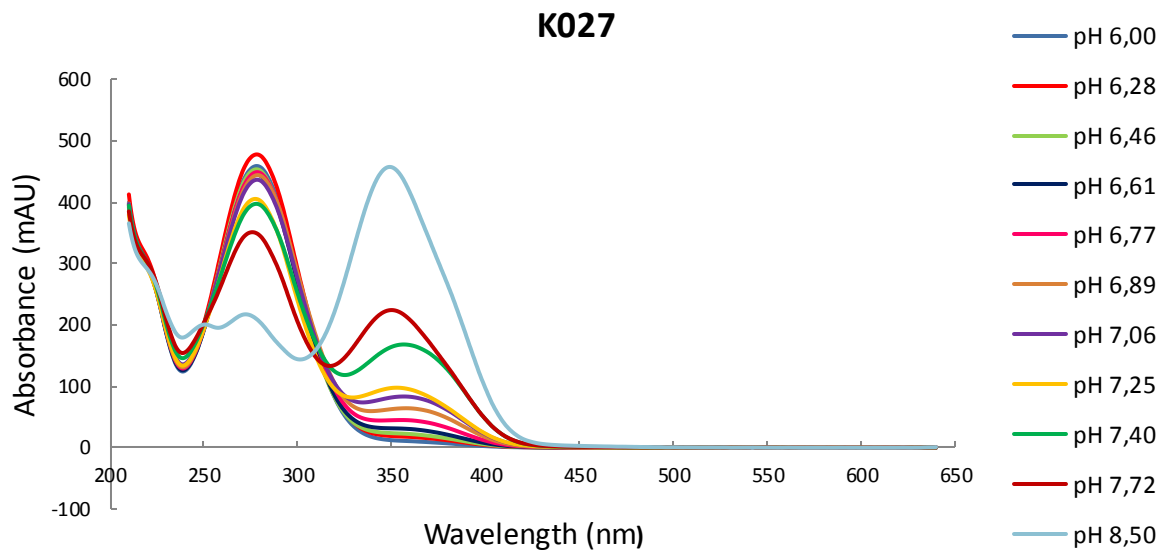
Obr. 1 Naměřené spektrum oximu K018



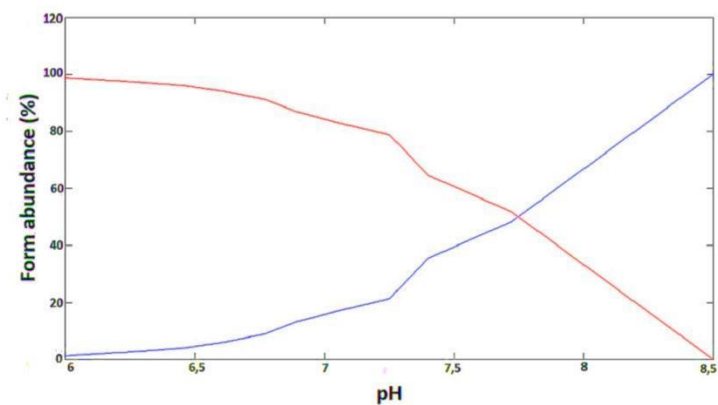
Obr. 2 Určení  $pK_a$  oximu K018 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



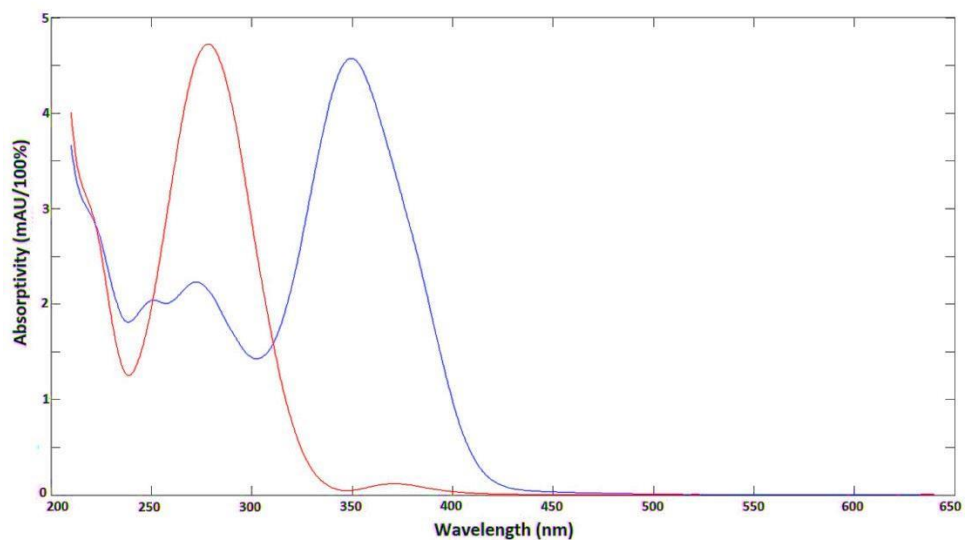
Obr. 3 Vypočtené spektrum oximu K018 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



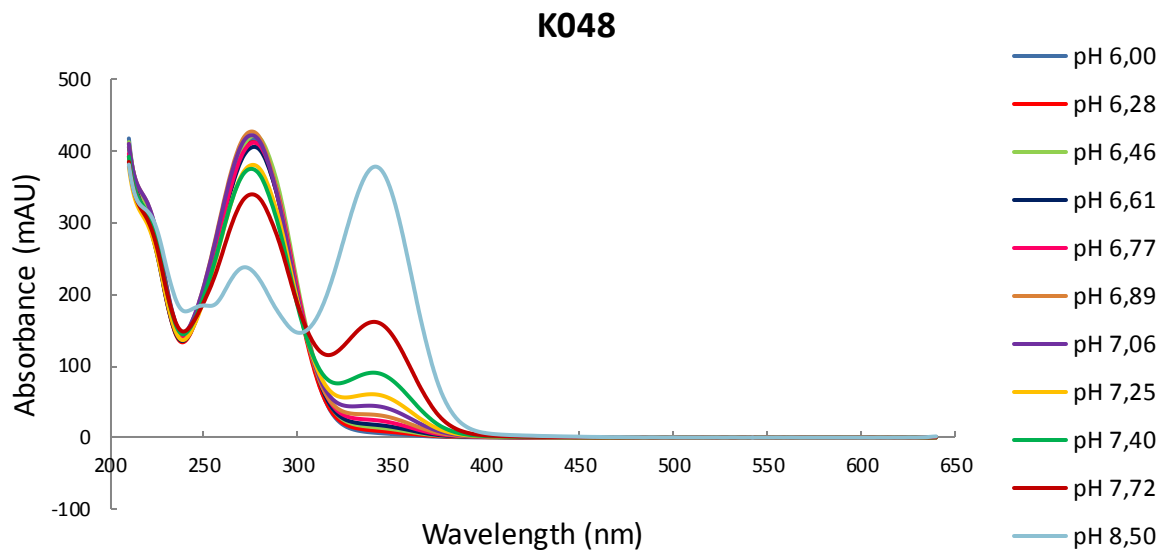
Obr. 4 Naměřené spektrum oximu K027



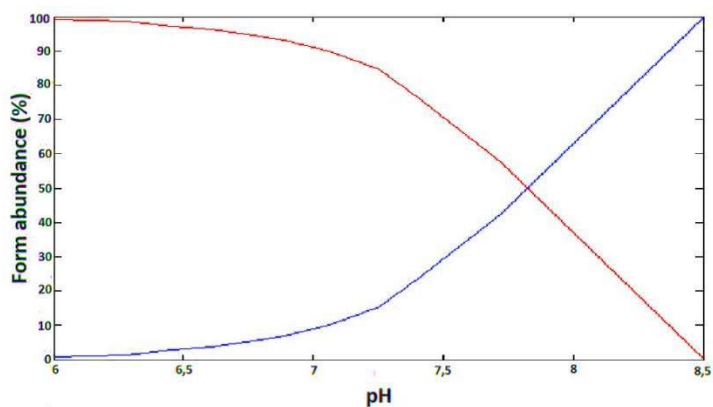
Obr. 5 Určení  $pK_a$  oximu K027 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



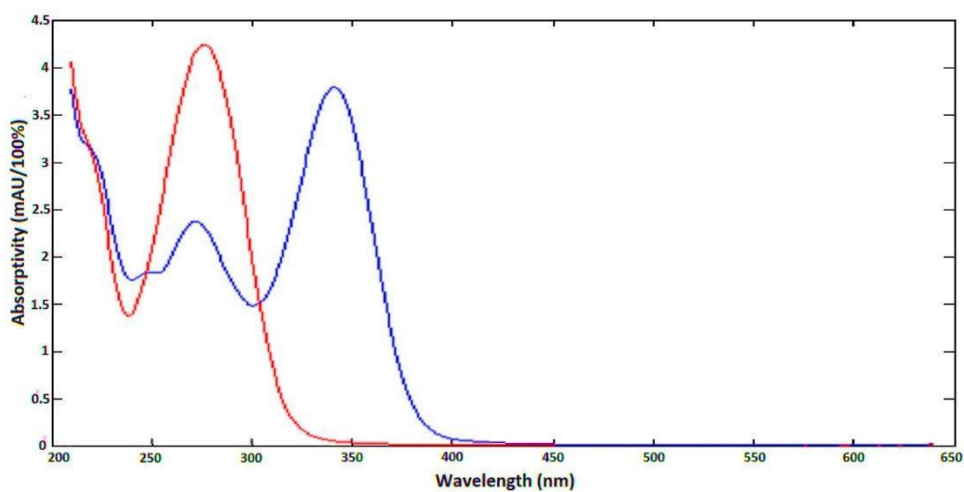
Obr. 6 Vypočtené spektrum oximu K027 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



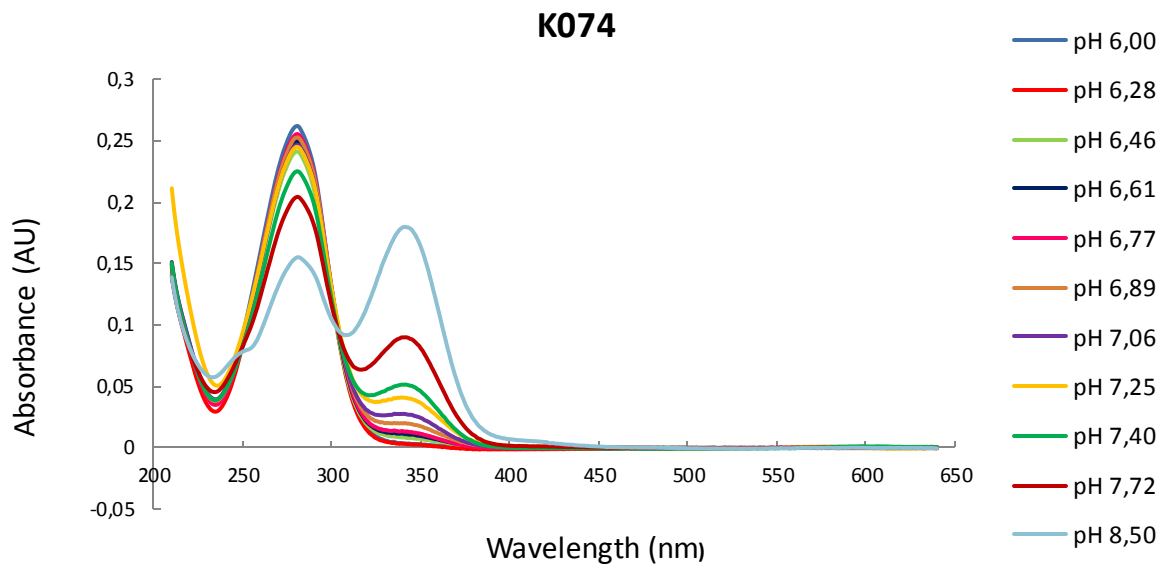
Obr. 7 Naměřené spektrum oximu K048



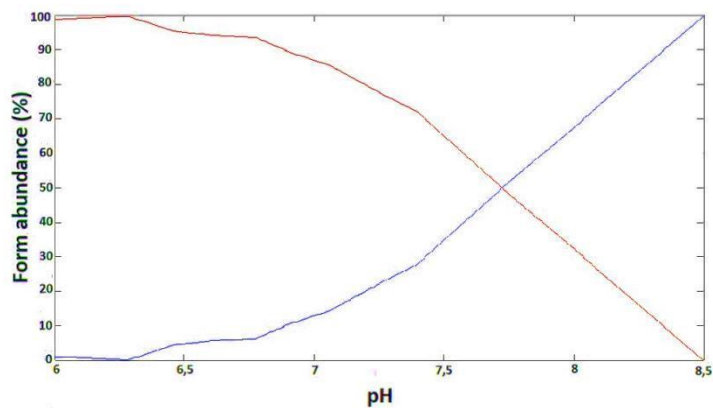
Obr. 8 Určení  $pK_a$  oximu K048 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



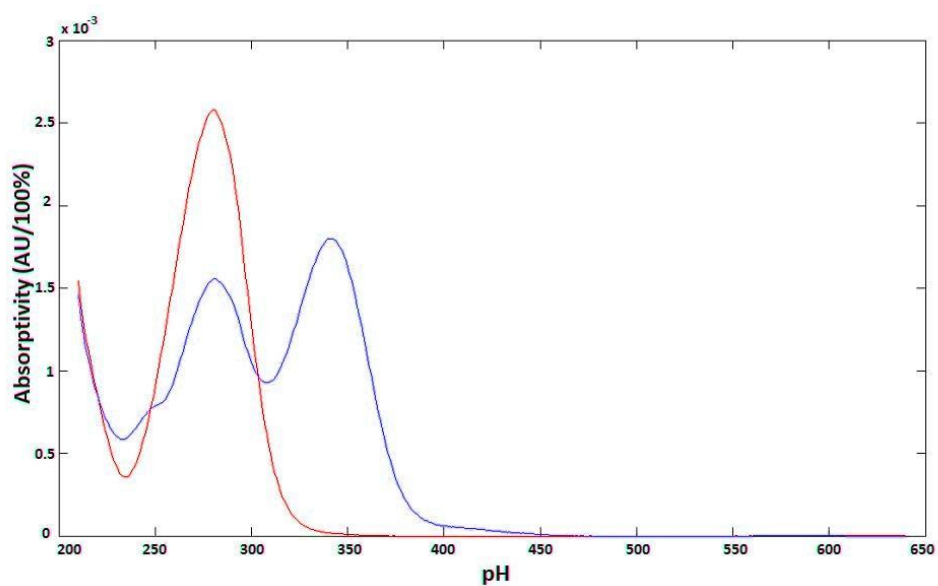
Obr. 9 Vypočtené spektrum oximu K048 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



Obr. 10 Naměřené spektrum oximu K074

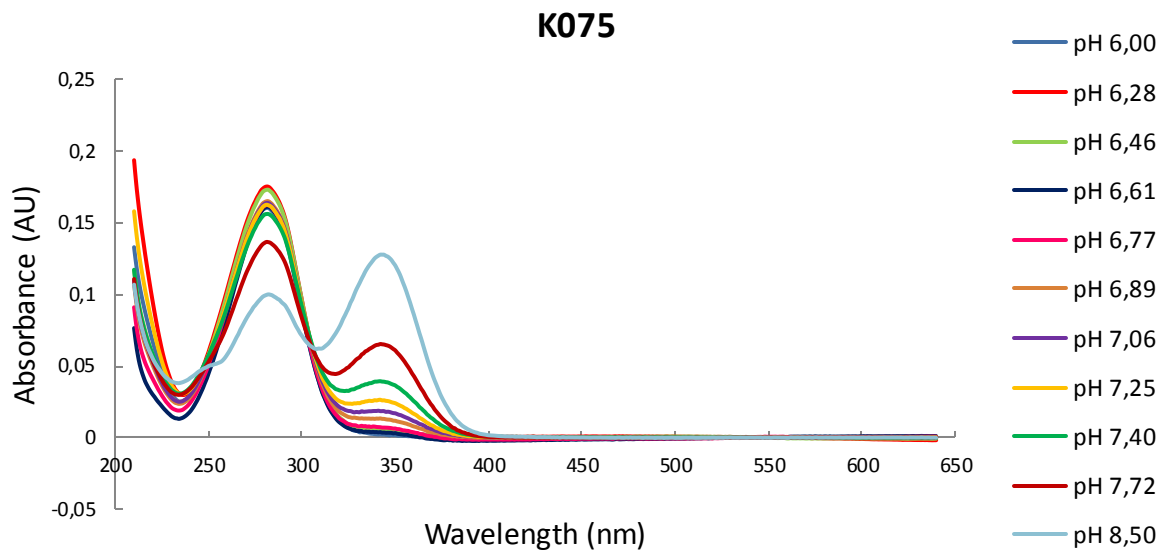


Obr. 11 Určení  $pK_a$  oximu K074 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)

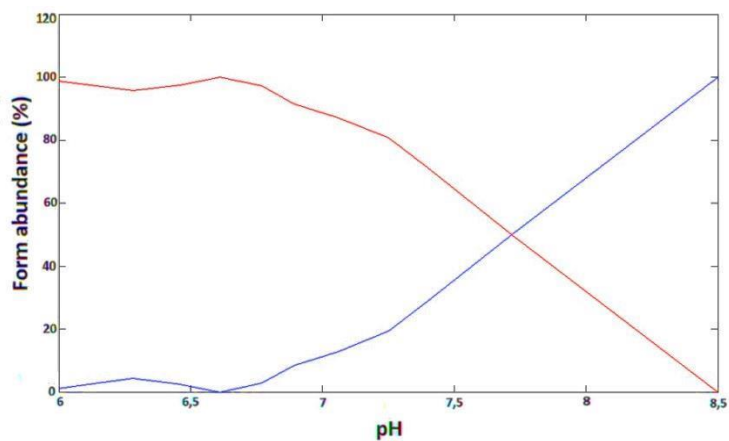


Obr. 12 Vypočtené spektrum oximu K074 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)

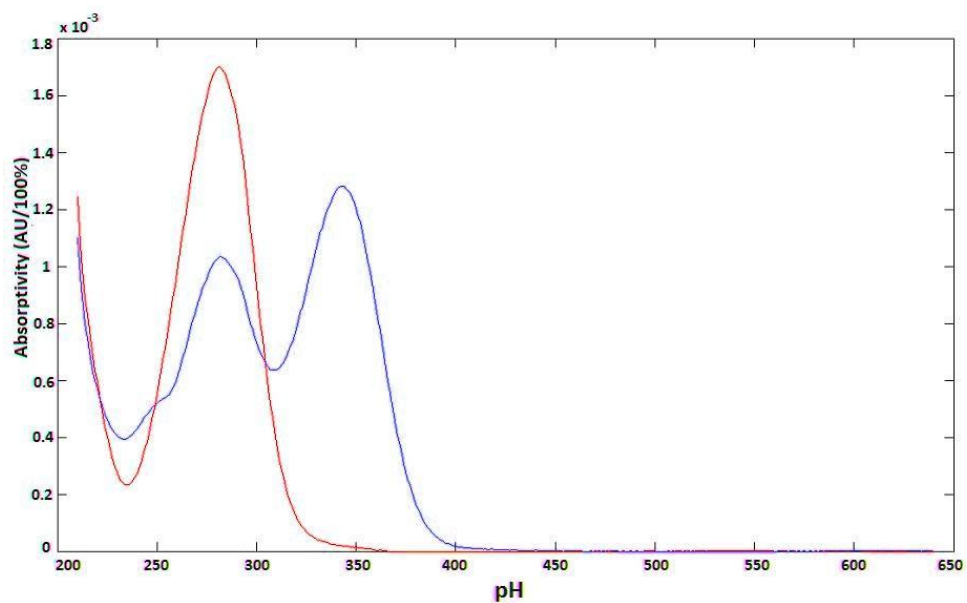




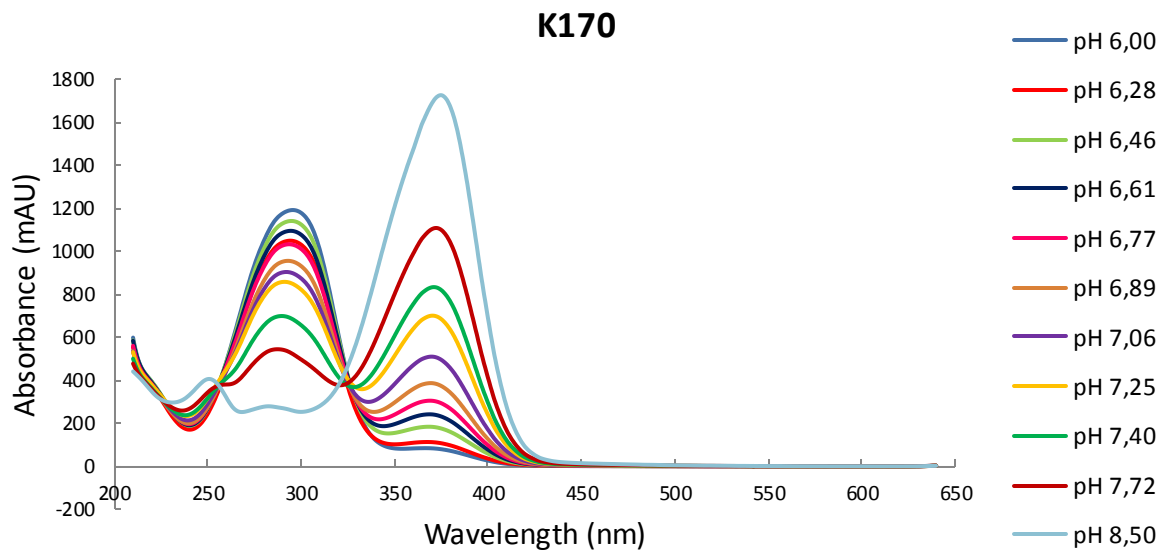
Obr. 13 Naměřené spektrum oximu K075



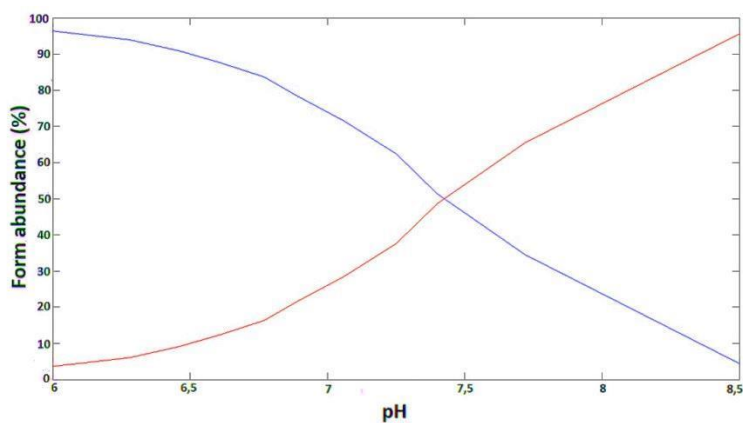
Obr. 14 Určení  $pK_a$  oximu K075 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



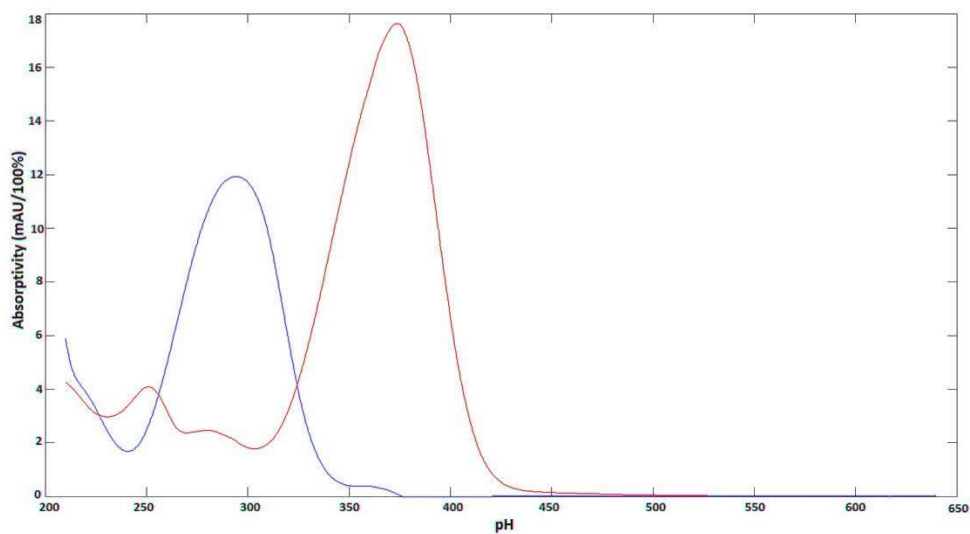
Obr. 15 Vypočtené spektrum oximu K075 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



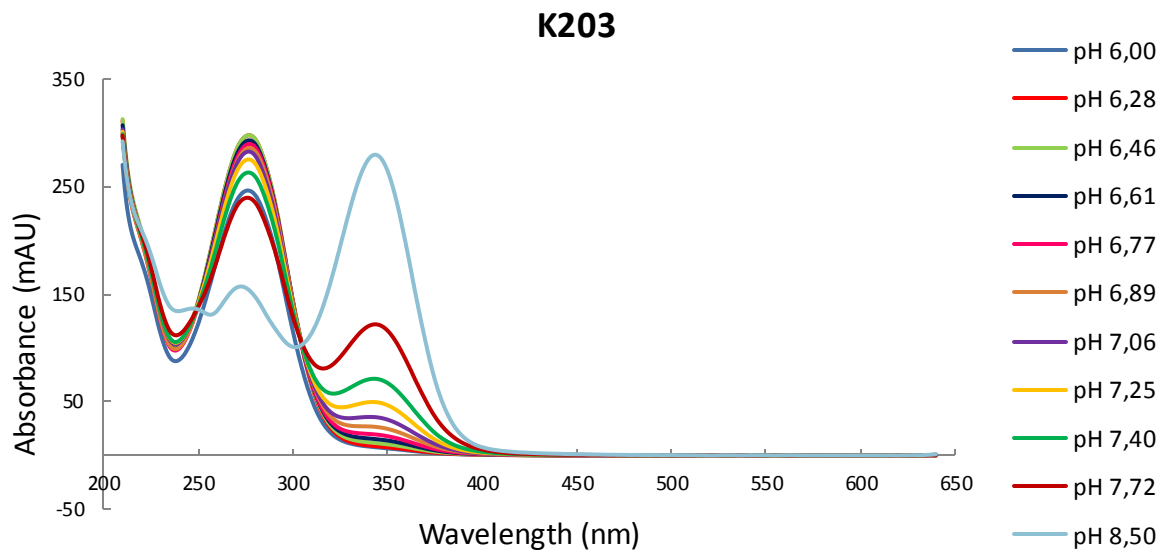
Obr. 16 Naměřené spektrum oximu K170



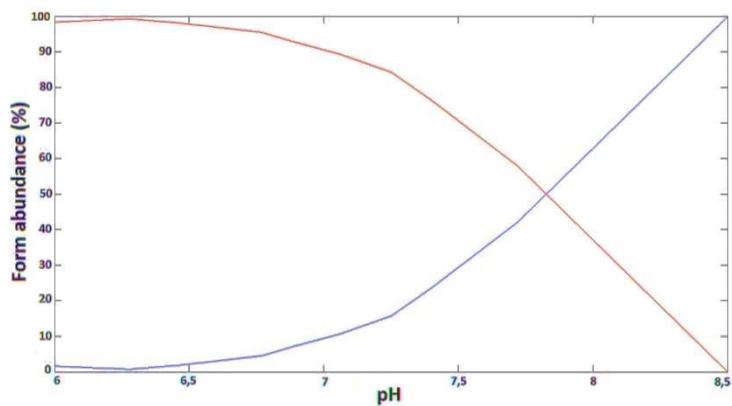
Obr. 17 Určení pK<sub>a</sub> oximu K170 (červená – disociovaná forma, modrá – nedisociovaná forma)



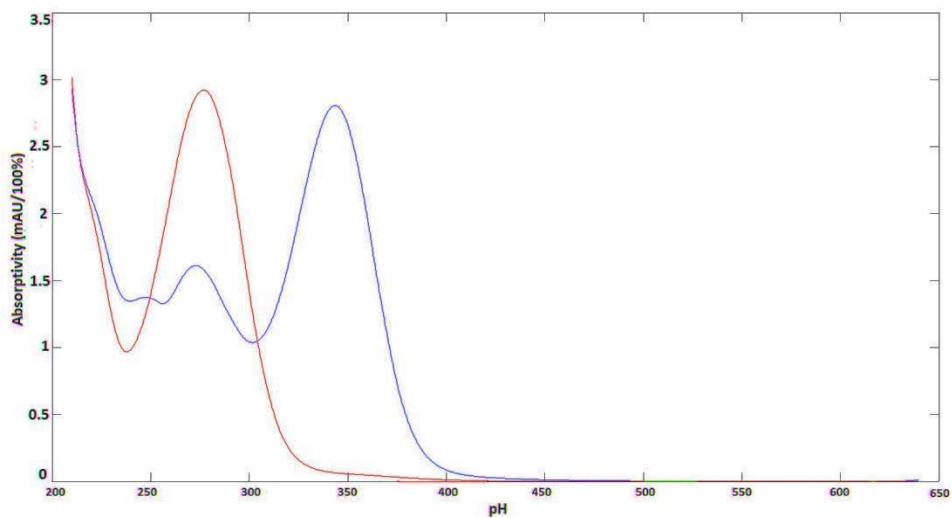
Obr. 18 Vypočtené spektrum oximu K170 (červená – disociovaná forma, modrá – nedisociovaná forma)



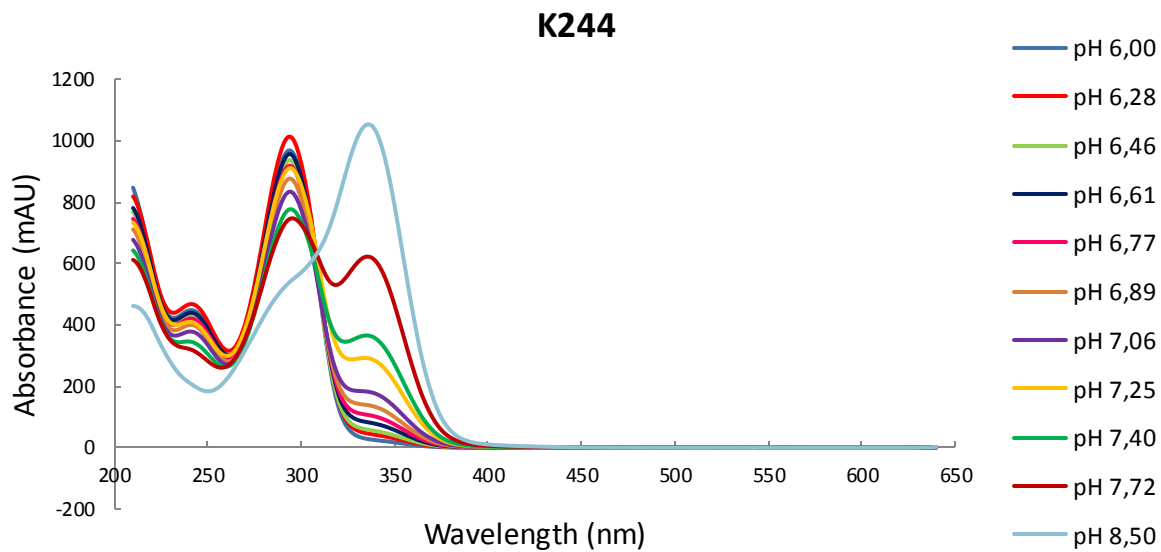
Obr. 19 Naměřené spektrum oximu K203



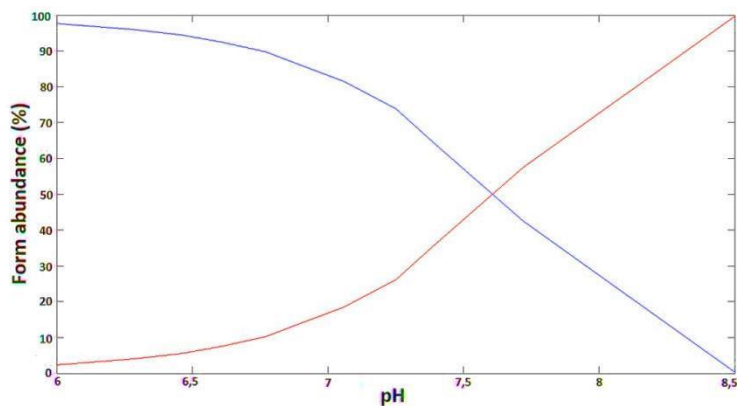
Obr. 20 Určení  $pK_a$  oximu K203 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



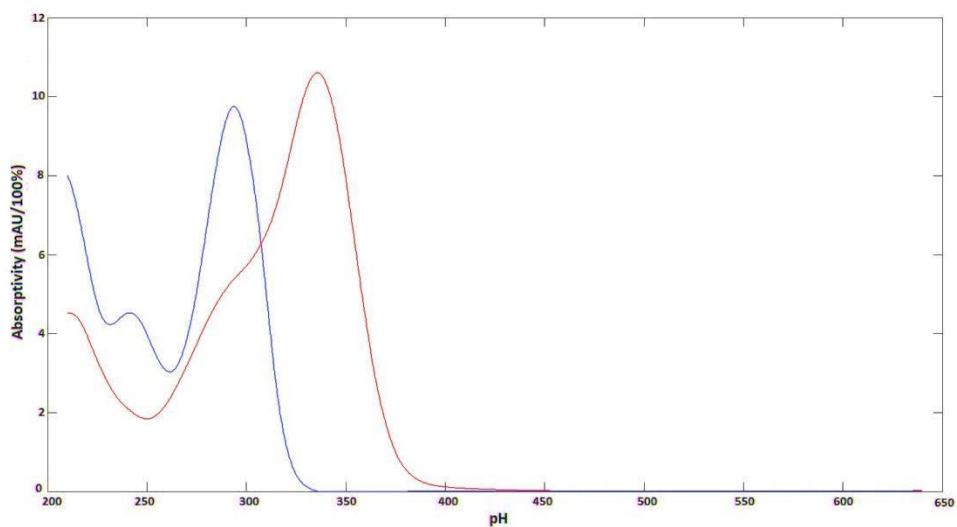
Obr. 21 Vypočtené spektrum oximu K203 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



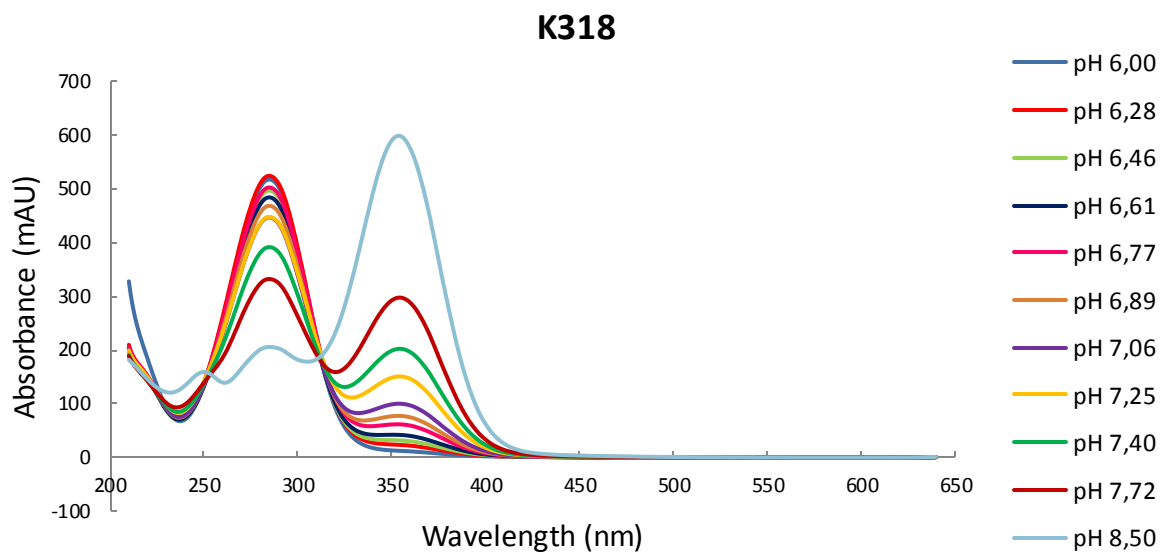
Obr. 22 Naměřené spektrum oximu K244



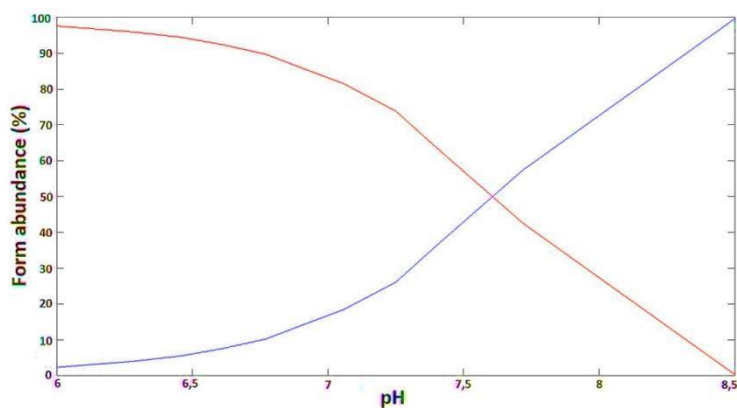
Obr. 23 Určení  $pK_a$  oximu K244 (červená – disociovaná forma, modrá – nedisociovaná forma)



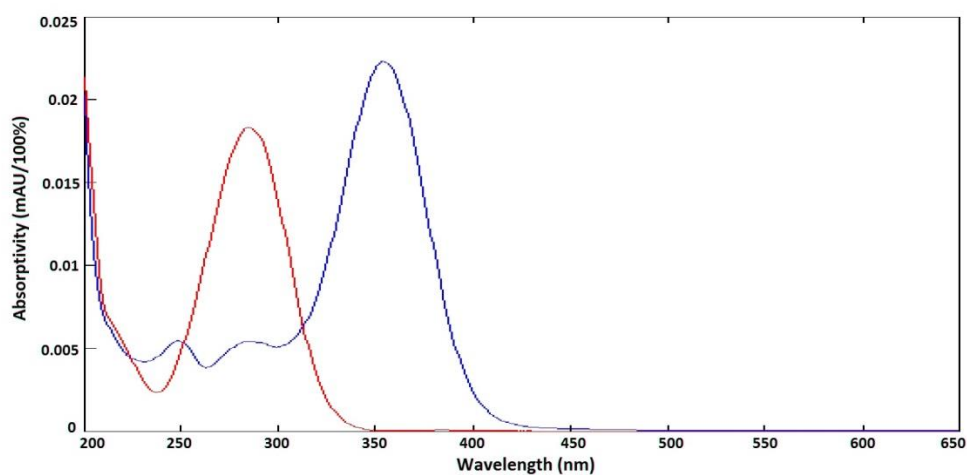
Obr. 24 Vypočtené spektrum oximu K244 (červená – disociovaná forma, modrá – nedisociovaná forma)



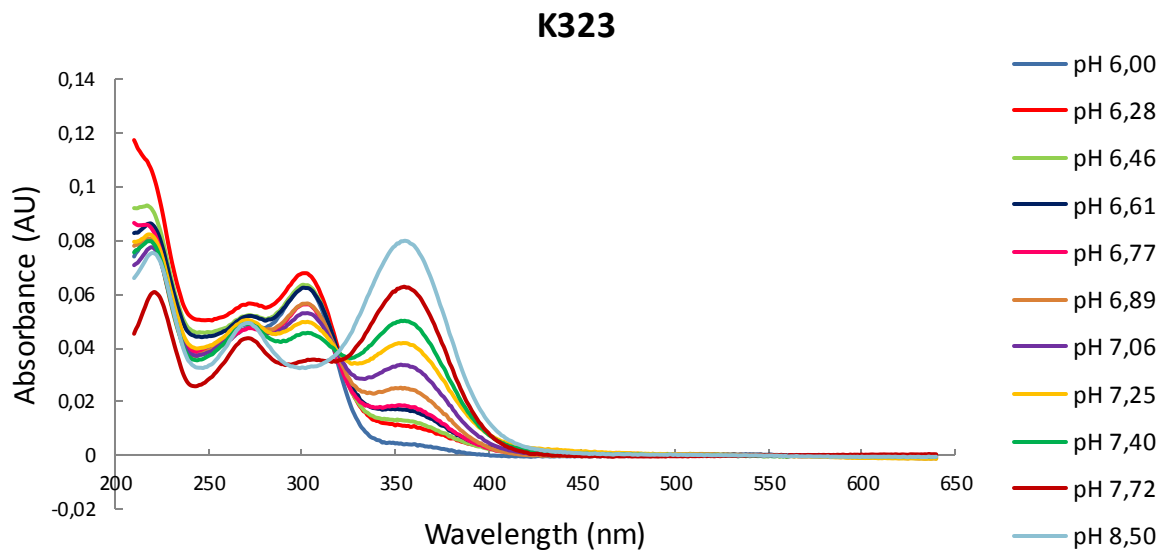
Obr. 25 Naměřené spektrum oximu K318



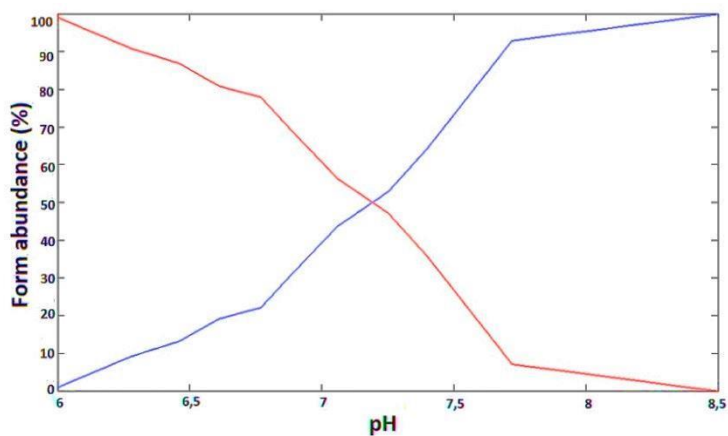
Obr. 26 Určení  $pK_a$  oximu K318 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



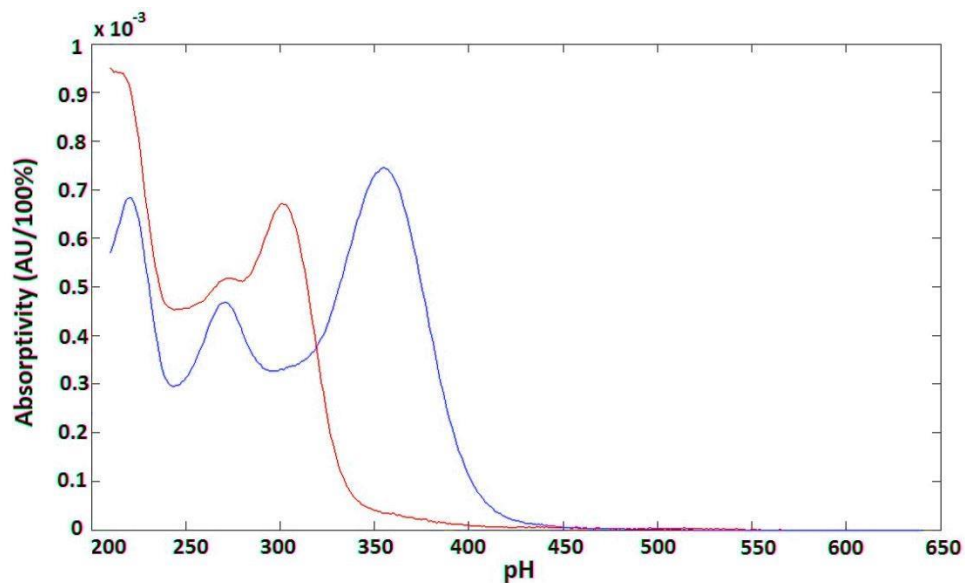
Obr. 27 Vypočtené spektrum oximu K318 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



Obr. 28 Naměřené spektrum oximu K323



Obr. 29 Určení  $pK_a$  oximu K323 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)



Obr. 30 Vypočtené spektrum oximu K244 (modrá – disociovaná forma, červená – nedisociovaná forma)