

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza a využití 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzoimidazol-2-on
Diplomová práce

2024

Bc. Monika Böhmová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Böhmová**
Osobní číslo: **C22285**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **Analýza a využití 5,6-diamino-1,3-dihydro-2H-benzoimidazol-2-on**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. V dostupné literatuře proveďte rešerši týkající se výroby, analýzy a využití 5,6-diamino-1,3-dihydro-2H-benzoimidazol-2-onu.
2. Navrhněte chemické a instrumentální metody pro analýzu obsahu 5,6-diamino-1,3-dihydro-2H-benzoimidazol-2-onu a nečistot v předložených vzorcích.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Jan Fischer, CSc.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **Ing. Kateřina Vyňuchalová, Ph.D.**
Synthesia a.s.
Datum zadání diplomové práce: **7. února 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza a využití 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzoimidazol-2-on jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 7. května 2024

Bc. Monika Böhmová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji tímto vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Janu Fischerovi, CSc. a konzultantům Ing. Kateřině Vyňuchalové, Ph.D. a Ing. Janu Vyňuchalovi, Ph.D. ze společnosti Synthesia, a.s. za odborné vedení a vstřícnost při zpracování mé diplomové práce.

Poděkovat bych chtěla také mé rodině a příteli za trpělivost a podporu v průběhu studia.

ANOTACE

Diplomová práce je zaměřena na látku 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzoimidazol-2-on (DABIZ), který se používá jako barvářský meziprodukt při výrobě vysoce kvalitních pigmentů. Z tohoto důvodu je potřebné mít k dispozici vhodnou metodu pro kontrolu jeho čistoty. Práce se zabývá rešerší této látky. Dále je navržena vhodná analytická metoda na stanovení látky, včetně kvalitativní analýzy v technických vzorcích. Kromě hlavní komponenty (DABIZ) se práce zabývá také identifikací a stanovením vybraných nečistot v analyzovaných vzorcích.

KLÍČOVÁ SLOVA

Analýza, 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzoimidazol-2-on, UV/VIS, HPLC, HPLC/MS

TITLE

Analysis and use of 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*- benzoimidazol-2-one

ANNOTATION

Master thesis is focused on the substance 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzoimidazol-2-one (DABIZ) which is used as a dye intermediate in the production of high-quality pigments. For this reason, it is necessary to have a suitable method for checking its purity. This thesis deals with the research of this substance. Suitable analytical method for the determination of the substance is also proposed, qualitative analysis in technical samples included. In addition to the main component (DABIZ) the work also deals with the identification of selected impurities in the analyzed samples.

KEYWORDS

Analysis, 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzoimidazol-2-one, UV/VIS, HPLC, HPLC/MS

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM TABULEK	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
1. ÚVOD	13
2. TEORETICKÁ ČÁST	14
2.1. Synthesia, a.s.	14
2.2. Benzimidazoly	15
2.3. 5,6-diamino-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -benzoimidazol-2-on (DABIZ)	15
2.4. Syntéza	16
2.5. Využití DABIZ	17
2.5.1. Vysoce kvalitní organické pigmenty	18
2.5.2. Komplex s kovem ruthenia	19
2.5.3. Diazotační reakce	21
2.6. Kapalinová chromatografie (LC)	22
2.6.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	24
2.6.2. Instrumentace v HPLC	24
2.6.2.1. Detekce v HPLC	26
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1. Chemikálie	29
3.2. Použitá instrumentace	29
3.2.1. Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II	29
3.2.2. UV/VIS spektrometr SPECORD 50 plus	30
3.2.3. HPLC/MS	31
3.3. Ostatní přístroje a pomůcky	31
3.4. Analyzované vzorky	32
3.5. Pracovní postup	32
3.5.1. Příprava vzorků k analýze na HPLC	32
3.5.2. Příprava kalibračních roztoků	33
3.5.3. Příprava standardu a vzorků k analýze na UV/VIS	33
3.5.4. Postup pro gravimetrické stanovení bis-DABIZ	33
3.6. Software k vyhodnocení dat	34
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	35

4.1.	Problematika látky 5,6-diamino-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -benzoimidazol-2-on.....	35
4.2.	Výběr vhodného rozpouštědla	36
4.3.	UV/VIS Spektrofotometrická analýza vzorků a standardů pomocí UV/VIS	37
4.4.	Optimalizace analýzy vzorků DABIZ pomocí HPLC	43
4.4.1.	Kvantifikace látky DABIZ.....	45
4.4.2.	Analýza nečistot.....	47
4.5.	Gravimetrické stanovení bis-DABIZ.....	51
4.6.	HPLC/MS identifikace nečistot ve vzorcích DABIZ	52
	ZÁVĚR	58
	POUŽITÁ LITERATURA	59
	PŘÍLOHY	61

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. DABIZ	15
Obrázek 2. Syntéza 5,6-diaminobenzimidazol-2-onu	16
Obrázek 3. Syntéza DABIZ z 5,6-dichlorbenzimidazol-2-on	17
Obrázek 4. Kondenzační produkt kumarinu a DABIZ [15]	19
Obrázek 5. Komplex kovu ruthenia [19]	20
Obrázek 6. Příprava meziprojektu k syntéze komplexu s rutheniem [19]	20
Obrázek 7. Příprava soli z dekarbonylového DABIZ [20]	21
Obrázek 8. Příprava soli z dekarbonylovaného DABIZ [20]	22
Obrázek 9. Základní schéma instrumentace v HPLC [26]	26
Obrázek 10. Schéma detektoru diodového pole [27]	27
Obrázek 11. 3D graf závislosti absorpance na čase a vlnové délce [27]	27
Obrázek 12. Schéma fluorescenčního detektoru [27]	28
Obrázek 13. HPLC chromatograf Agilent 1260 Infinity II (vlastní ilustrace)	30
Obrázek 14. Spektrofotometr SPECORD 50 plus [31]	30
Obrázek 15. Vzorky DABIZ	32
Obrázek 16. Filtrační koláč DABIZ (vlevo) a bis-DABIZ (vpravo)- vlastní ilustrace	34
Obrázek 17. Změna barvy standardu DABIZ v rozpouštědlech	35
Obrázek 18. Nečistota "bis-DABIZ"	36
Obrázek 19. Absorpce rozpouštědel	37
Obrázek 20. Spektrum standardu v jednotlivých rozpouštědlech	38
Obrázek 21. Spektrum vzorků v DMSO	39
Obrázek 22. Spektrum vzorků v DMF	39
Obrázek 23. Spektrum vzorků v methanolu	40
Obrázek 24. Spektrum vzorků ve vodě	40
Obrázek 25. Spektrum bis-DABIZu v DMSO	41
Obrázek 26. Spektrum vzorku 2 v MeOH, vodě, DMSO a DMF	42
Obrázek 27. Chromatogram vzorku 0 v DMSO v mobilní fázi AcN/voda	44
Obrázek 28. Chromatogram vzorku 0 v DMSO s mobilní fází AcN/octan amonný (1 g/l) ve vodě, navážka 5 mg/10 ml, kolona Poroshell 120 (EC-C18, 2.7 mm, 3.0 x 150 mm – Agilent-USA), gradientová eluce viz tab. 7, nástřik 2 μ l, průtok 0.5 ml/min, detekce UV 320 nm, teplota 30 $^{\circ}$ C	44
Obrázek 29. Chromatogram vzorku 0 v DMSO s mobilní fází AcN/voda, navážka 5 mg/10 ml, kolona Poroshell 120 (EC-C18, 2.7 mm, 3.0 x 150 mm – Agilent – USA), gradientová eluce viz tab. 7, nástřik 2 μ l, průtok 0.5 ml/min, detekce UV 320 nm, teplota 30 $^{\circ}$ C	45
Obrázek 30. Kalibrační závislost DABIZ	46
Obrázek 31. Chromatogram bis-DABIZu, roztok 20 mg/100 ml, dále ředěn 2 ml/10 ml, UV detekce 400 nm, HPLC podmínky viz obr. 29)	49
Obrázek 32. Kalibrační závislost bis-DABIZ	50
Obrázek 33. Chromatogram vzorku 5 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, detekce UV 254 nm, další podmínky viz obr. 29	52
Obrázek 34. Hmotnostní spektrum píku $t_R \approx 2,1$ min (DABIZ), HPLC/MS podmínky viz kap. 3.2.3.	53
Obrázek 35. MS spektrum píku $t_R \approx 3$ min, HPLC/MS podmínky viz kap. 3.2.3.	53

Obrázek 36. HPLC/VIS spektrum píků $t_R \approx 2.1$ a 3 min, UV detekce při 254 nm, HPLC podmínky viz obr. 29	54
Obrázek 37. MS spektrum píku $t_R \approx 5.1$ min, HPLC/MS podmínky viz kap. 3.2.3.	54
Obrázek 38. Návrh struktury látky při $t_R \approx 5,1$ min	55
Obrázek 39. HPLC/VIS spektrum látky s $t_R \approx 5.1$ min, UV detekce při 254 nm, HPLC podmínky viz obr. 29	55
Obrázek 40. MS spektrum píku $t_R \approx 10.1$ min, HPLC/MS podmínky viz kap. 3.2.3.	56
Obrázek 41. MS spektrum bis-DABIZ s $t_R \approx 10.5$ min, HPLC/MS podmínky viz kap. 3.2.3.	57
Obrázek 42. Chromatogram vzorku 0 v MeOH s mobilní fází AcN/voda, navážka 7 mg/100 ml, kolona Poroshell 120 EC-C18, 2.7 mm, 3.0 x 150 mm – Agilent – USA, gradientová eluce viz tab. 7, nástřik 2 μ l, průtok 0.5 ml/min, detekce UV 320 nm, teplota 30 °C	62
Obrázek 43. Chromatogram vzorku 1 v MeOH, navážka 20 mg/100 ml, UV detekce 320 nm, další podmínky viz obr. 42	62
Obrázek 44. Chromatogram vzorku 2 v MeOH, navážka 20 mg/100 ml, UV detekce 320 nm, další podmínky viz obr. 42	63
Obrázek 45. Chromatogram vzorku 3 v MeOH, navážka 20 mg/100 ml, UV detekce 320 nm, další podmínky viz obr. 42	63
Obrázek 46. Chromatogram vzorku 4 v MeOH, navážka 7 mg/100 ml, UV detekce 320 nm, další podmínky viz obr. 42	64
Obrázek 47. Chromatogram vzorku 5 v MeOH, navážka 20 mg/100 ml, UV detekce 320 nm, další podmínky viz obr. 42	64
Obrázek 48. Chromatogram vzorku 0 v DMSO, navážka 10 mg/10 ml, UV detekce při 254 nm, další podmínky viz obr. 42	65
Obrázek 49. Chromatogram vzorku 1 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce při 254 nm, další podmínky viz obr. 42	65
Obrázek 50. Chromatogram vzorku 2 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce při 254 nm, další podmínky viz obr. 42	66
Obrázek 51. Chromatogram vzorku 3 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce při 254 nm, další podmínky viz obr. 42	66
Obrázek 52. Chromatogram vzorku 4 v DMSO, navážka 3 mg/10 ml, UV detekce při 254 nm, další podmínky viz obr. 42	67
Obrázek 53. Chromatogram vzorku 0 v DMSO, navážka 10 mg/10 ml, UV detekce 400 nm, další podmínky viz obr. 42	67
Obrázek 54. Chromatogram vzorku 1 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce 400 nm, další podmínky viz obr. 42	68
Obrázek 55. Chromatogram vzorku 2 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce 400 nm, další podmínky viz obr. 42	68
Obrázek 56. Chromatogram vzorku 3 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce 400 nm, další podmínky viz obr. 42	69
Obrázek 57. Chromatogram vzorku 4 v DMSO, navážka 3 mg/10 ml, UV detekce 400 nm, další podmínky viz obr. 42	69
Obrázek 58. Chromatogram vzorku 5 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce 400 nm, další podmínky viz obr. 42	70

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Minimální navážky v jednotlivých rozpouštědlech.....	36
Tabulka 2. Experimentálně určené cut off rozpouštědel	37
Tabulka 3. Hodnoty molárního absorpčního koeficientu bis-DABIZ.....	41
Tabulka 4. Vypočítaný molární absorpční koeficient DABIZu v DMSO a DMF	41
Tabulka 5. Vypočítaný molární absorpční koeficient ve vodě.....	42
Tabulka 6 Optimalizované podmínky gradientové eluce	43
Tabulka 7. Kalibrační řada standardu v methanolu.....	46
Tabulka 8. Kvantifikace DABIZ v methanolu	47
Tabulka 9. Přehled nečistot v DMSO.....	48
Tabulka 10. Kalibrační řada bis-DABIZ v DMSO	49
Tabulka 11. Kvantitativní stanovení bis-DABIZu v DMSO.....	50
Tabulka 12. Stanovení DABIZ a bis-DABIZ pomocí HPLC.....	51
Tabulka 13. Stanovení DABIZ a bis-DABIZ pomocí gravimetrie a HPLC	51

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

bis-DABIZ	7,9-dihydrodiimidazo[4,5- <i>b</i> :4',5'- <i>i</i>]fenazin-2,8(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-dion
DABIZ	5,6-diamino-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -benzoimidazol-2-on
DAD	detektor s diodovým polem
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
FLD	fluorescenční detektor
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
UV/VIS	spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti
ε	molární absorpční koeficient

1. ÚVOD

5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzimidazol-2-on patřící do skupiny benzimidazonů, představuje zajímavou organickou sloučeninu s potenciálními aplikacemi, hlavně v barvářském průmyslu při výrobě moderních pigmentů. Vzhledem k tomu, že se jedná o surovinu, resp. meziprodukt s poměrně úzkým spektrem využití, je o této látce z hlediska kvalitativní i kvantitativní analýzy málo dostupných údajů.

Cílem diplomové práce je stanovení 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzimidazol-2-onu ve vybraných vzorcích poskytnutých společností Synthesia. Stanovení látky by mělo být kvantitativně, tak i kvalitativně k získání celkové informace. Cílem je poskytnout komplexní pohled na strukturální vlastnosti této sloučeniny. K dispozici bylo 6 vzorků DABIZ, které byly separovány a kvantifikovány pomocí HPLC s DAD a FLD detektorem. Kvalitativní zaměření látky proběhlo pomocí spektrofotometrické metody UV/VIS. Kromě hlavní komponenty vzorků (DABIZ) byly sledovány také nečistoty. Významnou nečistotou látky je látka „bis-DABIZ“, která se vyskytuje ve všech vzorcích.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Synthesia, a.s.

Synthesia, se sídlem v Pardubicích-Semtíně, patří mezi významné chemické společnosti v České republice. Od svého založení v roce 1920, jako Československá akciová továrna na látky výbušné, prošla několika etapami rozvoje a rozšířila svou činnost na různé oblasti chemické výroby. V minulosti byla známá svou výrobou trinitrotoluenu (TNT) a výbušnin, v reakci na potřeby armády. Postupem času se však společnost zaměřila na širší spektrum chemických produktů. Závod v Semtíně, který vznikl roku 1928, se věnoval anorganickým produktům pro výrobu výbušnin. Jako další vznikl závod v Rybitví, který měl zaměření na výrobu léčiv a barviv. V současné době je Synthesie rozdělena do 4 sektorů (SBU)- Pigmenty a barviva, Nitrocelulóza, Organická chemie a Energetika. Mezi hlavní produkty patří anorganické chemikálie, organické pigmenty a barviva, nitrocelulóza, oxycelulóza, izokyanátové produkty a další meziproducty pro chemickou výrobu. Výrobní procesy jsou podrobeny přísným kontrolám kvality, což zajišťuje splnění standardů a požadavků klientů. Od února roku 2024 je společnost součástí KAPRAIN Group.

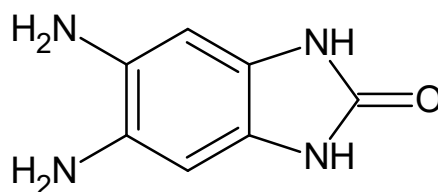
Společnost aktivně investuje do výzkumu a vývoje, spolupracuje s akademickými institucemi, výzkumnými centry a průmyslovými partnery s cílem objevovat nové technologie, vylepšovat stávající produkty a hledat ekologičtější a efektivnější výrobní procesy. Součástí společnosti Synthesia je dceřiná společnost VUOS, a.s. (Výzkumný ústav organických syntéz), která se zabývá výzkumem, vývojem, výrobou a analytickou kontrolou v oblasti chemie. [1]

2.2. Benzimidazoly

Benzimidazoly patří mezi heterocyklické sloučeniny, obsahující ve své struktuře benzenový a imidazolový kruh. Deriváty benzimidazolu se nejčastěji využívají ve farmaceutickém průmyslu, kde jsou důležité pro vytváření různých léčiv, jako jsou antiparazitika (anthelmintika), antifungální a protizánětlivá léčiva. [2,3] V oblasti chemie se benzimidazoly využívají jako pigmenty. Benzimidazonové pigmenty, jinak známé jako 5-aminokarbonylbenzimidazolinová skupina, se závislostí na struktuře pokrývají různé oblasti barevného spektra. Barva nazelenale žlutá po oranžovou se projeví kopulační reakcí na vazbu 5-acetoacetylaminobenzimidazon a vazba 5-(2'-hydroxy-3'-naftoylamino)-benzimidazon má typickou barvu od středně červené po karmínovou, bordó a hnědou. Tyto pigmenty jsou díky své vysoké stálosti používané automobilovým průmyslem při povrchových úpravách, barevných plastech a v kvalitních tiskařských barvách. [4]

2.3. 5,6-diamino-1,3-dihydro-2H-benzoimidazol-2-on (DABIZ)

5,6-diamino-1,3-dihydro-2H-benzoimidazol-2-on (zkráceně 5,6-diaminobenzimidazol-2-on, DABIZ, číslo CAS: 55621-49-3, obr. 1), je chemická sloučenina s molekulovým vzorcem $C_7H_8N_4O$, která se řadí do skupiny benzimidazonů.



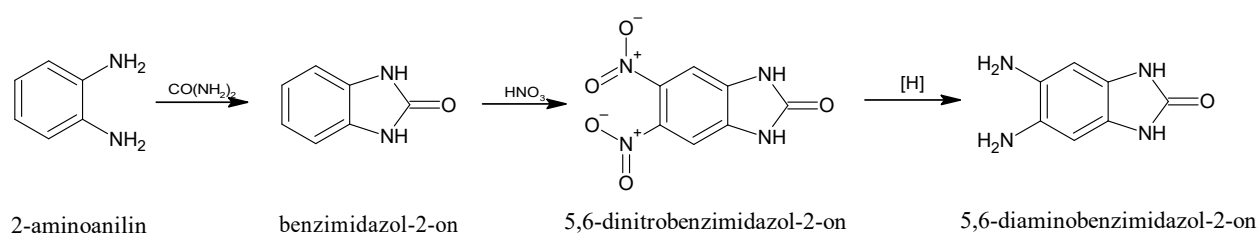
Obrázek 1. DABIZ

Jedná se o krystalickou látku žluté až hnědé barvy, která má slabě zásaditý charakter, je rozpustná v dimethylsulfoxidu (DMSO), dimethylformamidu (DMF) a dalších organických rozpouštědlech. Molekulová hmotnost látky je 164,16 g/mol, bod tání je vyšší než 300 °C, bod varu $258,6 \pm 33,0$ °C (při 760 mmHg) a index lomu 1,728. Není stabilní na světle, snadno oxiduje ihned po výrobě a zároveň je citlivý na vlhkost. Měl by se tedy skladovat na chladném a suchém místě. [5,6] Vyznačuje se piktogramem s vykřičníkem a hazardním kódem GHS07. V tabulce o prohlášení nebezpečí je pod kódem H319, která je v kategorii

nežádoucího účinku iritace, poškození očí. Součástí je i bezpečnostní prohlášení P305 + P351 + P338 s informací o vyplachování očí vodou v případě zasažení touto látkou. [7]

2.4. Syntéza

DABIZ lze syntetizovat ve vysoké čistotě a výtěžku. Průmyslově využívaná syntéza (obr. 2) vycházející z benzimidazol-2-onu zahrnuje 2 kroky. Prvním krokem je nitrace a druhým redukce. Nitrace má výchozí látku benzimidazol-2-on, který se získá cyklizací o-fenylendiaminu s močovinou (popř. fosgenem, dimethylkarbonátem, oxidem uhličitým). Benzimidazol-2-on se rozpustí v 1,2-dichloreтанu, který zde působí jako rozpouštědlo, v poměru 1:3 a přidá se kyselina dusičná v poměru 1:2,2. Dále se přidá 1 – 10 % oxidu fosforečného (popř. oxid vanadičný ve vločkách), jako katalyzátor, vztaženo na benzimidazol-2-on. Reakce se poté udržuje při teplotě 50–90 °C. Pomocí TLC se kontroluje průběh nitrace do vymizení původního substrátu. Reakční směs se ochladí na pokojovou teplotu, zakoncentruje, zfiltruje a promyje vodou. Vzniká meziproduct 5,6-dinitrobenzimidazol-2-on.

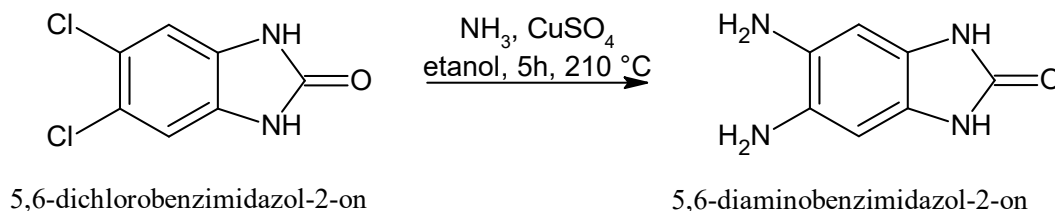


Obrázek 2. Syntéza 5,6-diaminobenzimidazol-2-onu

V druhé části syntézy se zahřeje voda, kyselina chlorovodíková a železný prach na 50–100 °C, přidá se meziproduct 5,6-dinitrobenzimidazol-2-on v malých dávkách, jako rozpouštědlo se používá voda. Reakční směs se zahřívá po dobu 1–5 hodin. Zfiltruje se za tepla, poté ochladí a krystalizací se získá výsledný produkt 5,6-diaminobenzimidazol-2-on světle žluté barvy. Výtěžek produktu je 91 % [8]. Výše uvedená syntéza vyřešila problém velkého množství odpadních kyselin, kdy se pro rozpouštění benzimidazol-2-onu při nitraci využívala, dle Yang et al. [9], 98% kyselina sírová.

Důvody využití železa při redukcí aromatických nitrosloúčenin, jsou jeho snadná dostupnost, nízká cena, jednoduchý proces, nízké požadavky na zařízení a vyspělé technologie. Ovšem do metody přináší nevýhodu vytvoření velkého množství kalu a obtížného čištění odpadní vody, což s sebou nese i negativum z pohledu životního prostředí a nespĺňuje požadavky moderní průmyslové výroby. Z tohoto důvodu se k redukcí nitroskupiny používá katalytická hydrogenace vodíkem. Tato metoda poskytuje vysoký výtěžek, dobrou kvalitu produktu a zároveň je šetrnější k životnímu prostředí. Jako katalyzátor se využívá paladium ve směsi s dalšími kovy (ruthenium, platina, kobalt, osmium nebo cer) zakotvené na uhlíku (nebo aktivním uhlí), popř. oxidu hlinitém jako nosiči [10].

Další možností syntézy DABIZ je záměna funkční skupiny v 5,6-dichlorbenzimidazol-2-onu, který se získá chlorací benzimidazol-2-onu. Tato výchozí látka reaguje s amoniakem (obr. 3) za přítomnosti síranu měďnatého při 210 °C po dobu 5 hodin. Výtěžek 5,6-diaminobenzimidazol-2-onu je okolo 87 % [11].



Obrázek 3. Syntéza DABIZ z 5,6-dichlorbenzimidazol-2-on

2.5. Využití DABIZ

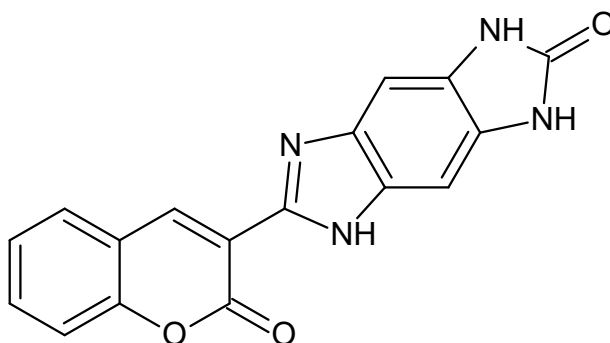
Nejčastějším využitím DABIZ je průmyslová výroba pigmentů (viz kapitola 2.5.1.). Dále je popsáno jeho použití při výrobě uhlíkových nanostruktur využívaných v moderních lithiových bateriích [12]. Využívá se jako síťovadlo pružných pryskyřičných kompozic k utěsnění mikrotrhlin v cementových pláštích, což je důležité například při stavbě ropných a plynových vrtů [13]. Jiné možné použití je při výrobě plastických hmot na bázi kopolymeru poly(karbonát-močovina) nebo poly(karbonát-močovina-ester), tyto kopolymery jsou vhodné v aplikacích vyžadujících zpomalování hoření (např. vnější kryty elektronických zařízení,

domácí spotřebiče apod.) a chemickou odolnost (např. automobilové dílny, kryty mobilních telefonů a lékařské zařízení) [14]. V molekulární biologii bylo popsáno jeho uplatnění jako meziprojektu pro syntézu koordinační sloučeniny s rutheniem (viz kapitola 2.5.2.), dále dekarbonylovaná forma DABIZ se používá pro diazotaci (kapitola 2.5.3).

2.5.1. Vysoce kvalitní organické pigmenty

Vysoce kvalitní organické pigmenty zahrnují ftalocyaninové pigmenty, chinakridony, azopigmenty, fenolické AS pigmenty, ftalocyaninová zeleň a antrachinony. Na tyto pigmenty jsou kladeny vysoké požadavky jako je vysoká tepelná odolnost, světlostálost, odolnost vůči vlivům počasí a odolnost proti migraci. Výhody těchto kvalitních pigmentů jsou výsledkem jejich dobré molekulární planarity a molekulární symetrie. Obsahují také specifické substituenty, které mění polaritu molekul a mohou tak vytvářet vodíkové vazby mezi molekulami, což zlepšuje právě jejich tepelnou stabilitu a odolnost vůči migraci. Tyto dobré vlastnosti je předurčují k použití v nátěrových hmotách a pro barvení plastů. Do této skupiny vysoce kvalitních pigmentů patří i pigmenty syntetizované na základě DABIZ [10].

V patentu [15] je popsáno využití reakce DABIZ a kumarinu pro syntézu color filter resistu využitelného při výrobě vysoce kvalitních inkoustů pro inkoustové tiskárny a při výrobě LCD displejů. K dosažení vyššího kontrastu v displejích z tekutých krystalů, miniaturizace obrazových senzorů a vysokého rozlišení tiskařských barev je nutno aplikovat jemnější pigmenty a vyšší koncentrace pigmentů v jejich aplikačních kompozicích. Ovšem čím více se částice pigmentů stávají jemnější a zvyšuje se koncentrace pigmentu, tím dochází k jejich agregaci a je obtížné získat stabilní rozptyl. Jedním z řešení tohoto problému je přidavek uvedeného kondenzačního produktu (obr. 4) kumarinu a DABIZ, resp. její soli.



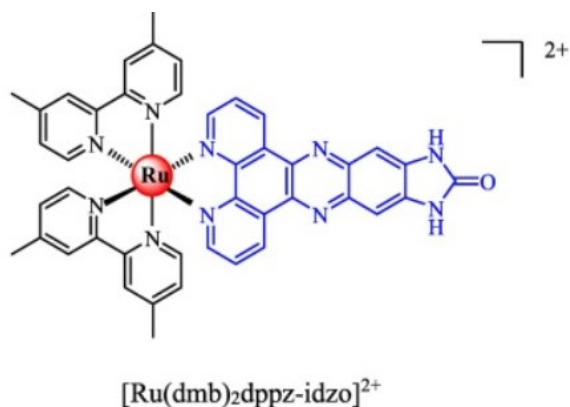
Obrázek 4. Kondenzační produkt kumarinu a DABIZ [15]

Součástí barviv, odvozené z látky DABIZ, jsou disazo methinová barviva, která nalézají své uplatnění při barvení plastických hmot. Tyto barviva jsou ideální pro použití s různými typy plastů a syntetických pryskyřic. Mohou být aplikovány v podobě olejových či vodnatých barev, pro lakování různých povrchů, spinového barvení textilních materiálů nebo pigmentace plastů jako je polyethylen, polystyren, polyvinylchlorid, pryže a syntetické kůže. Tato tiskařská barviva jsou využitelná i v grafickém průmyslu a pro barvení buničiny či potahování textilií [16]. V této široké škále aplikací hraje klíčovou roli benzimidazolový kruh látky DABIZ, který se dá také využít jako součást bisazo methinových rozpouštědlových barviv, jež mají schopnost komplexovat kovový nikl. Tato kombinace umožňuje vytvoření specifických barev s požadovanými vlastnostmi [17]. Dalšími významnými pigmenty syntetizovaných z látky DABIZ jsou odvozeny od perinonových sloučenin. Pigment se aplikuje jako čistý prášek nebo ve formě disperze v pryskyřici, s poskytnutím červeno-žlutého zabarvení s vynikající stálostí [18].

2.5.2. Komplex s kovem ruthenia

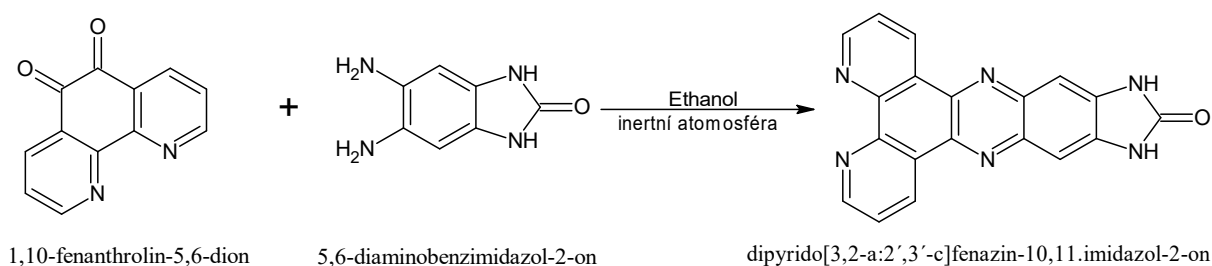
Látka DABIZ je klíčovým prekurzorem pro syntézu komplexu $[\text{Ru}(\text{dmb})_2\text{dppz-idzo}]^{2+}$ (obr. 5), kde dmb značí 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin, dppz je dipyrido[3,2-a:2',3'-c]fenazin a idzo reprezentuje imidazolon. Rutheninový polypyridylový komplex vzniká koordinací dvou molekul dmb a jedné molekuly dppz-idzo k centrálnímu atomu ruthenia (Ru). V dnešní době se těmto luminiscenčním rutheniovým komplexům věnuje větší pozornost, z důvodu vazby na RNA ve třech dimenzích, vysoké citlivosti a snadné nastavitelnosti fotofyzikálních vlastností, díky čemuž se lehce monitoruje vazebný proces a stanovuje relativní vazebná síla komplexu k RNA. Komplex $[\text{Ru}(\text{dmb})_2\text{dppz-idzo}]^{2+}$ se váže konkrétně na duplex

poly(A) · poly (U) a triplex poly(U) · poly(A) * poly(U). Tento duplex a triplex bází, poté díky navázanému komplexu vykazuje vlastnost tzv. „molekulárního spínače světla“ (anglicky „molecular light switch“), což je dáno intenzivní fluorescencí.



Obrázek 5. Komplex kovu ruthenia [19]

Příprava komplexu $[\text{Ru}(\text{dmb})_2\text{dppz-idzo}]^{2+}$ začíná získáním meziprojektu dipyrido[3,2-a:2',3'-c]fenazin-10,11-imidazol-2-on neboli dppz-idzo. Tento meziprojekt se připravuje reakcí 1,10-fenanthrolin-5,6-dionu, $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{dmb})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 5,6-diaminobenzimidazol-2-onu. 1,10-fenanthrolin-5,6-dion se rozpustí v ethanolu za míchání a k roztoku je dále po kapkách přidáván 5,6-diaminobenzimidazol-2-on za vzniku žluté sraženiny (obr. 6). Směs je refluxována 15 min a po filtraci a sušení je získán žlutý produkt ve výtěžku 82 %, který se dále použije pro přípravu shora uvedeného komplexu [19].

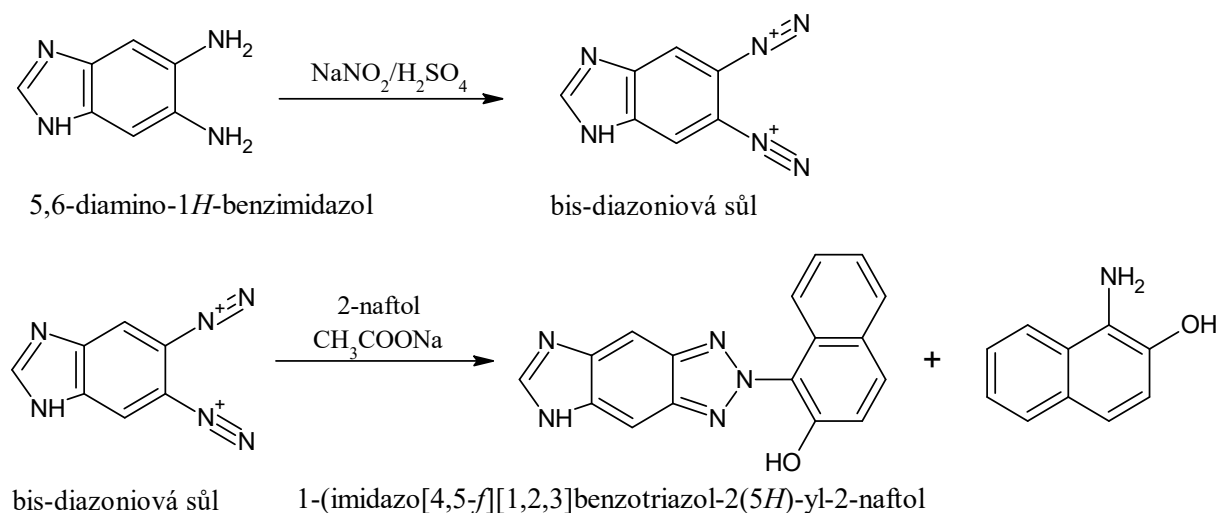


Obrázek 6. Příprava meziprojektu k syntéze komplexu s rutheniem [19]

2.5.3. Diazotační reakce

Diazotací dekarbonylovaného DABIZ, konkrétně 5,6-diamino-1*H*-benzimidazolu, lze připravit diazoniové soli, při diazotaci s nitrosylhydrogensulfátem v prostředí kyseliny sírové vzniká bis-diazoniová sůl, ve prostředí koncentrované kyseliny chlorovodíkové vzniká monodiazoniová sůl.

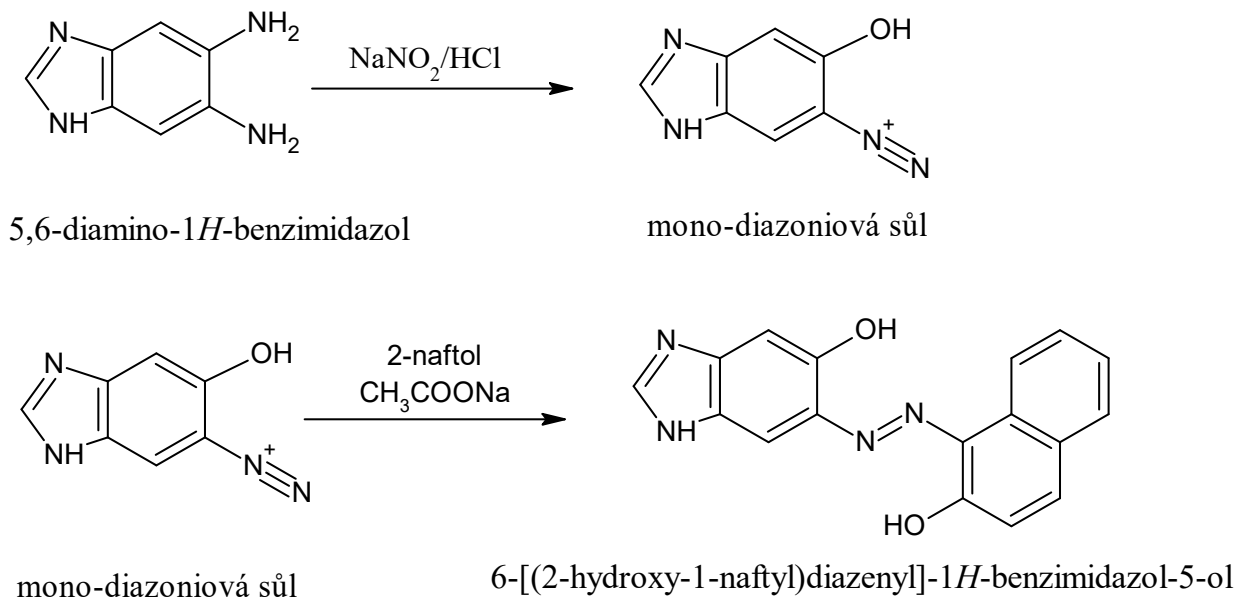
Následnou kopulací bis-diazoniové soli s 2-naftolem v prostředí hydroxidu sodného dojde k uzavření kruhu a vzniká v tomto případě 1-imidazo[4,5-*f*][1,2,3]benzotriazol-2(5*H*)-yl-2-naftol (obr. 7). Diazotační reakce je udržována při teplotě pod 5 °C, dalším krokem je kopulační reakce při teplotě 5-10 °C, a zároveň je udržováno pH mezi 5-6 vodným roztokem octanu sodného za vzniku sraženiny produktu.



Obrázek 7. Příprava soli z dekarbonylovaného DABIZ [20]

Pokud je diazotace prováděna v prostředí kyseliny chlorovodíkové je diazotována pouze jedna aminoskupina 5,6-diamino-1*H*-benzimidazolu, která následnou kopulací s 2-naftolem poskytne 6-[(2-hydroxy-1-naftyl)diazenyl]-1*H*-benzimidazol-5-ol. Syntéza (obr. 8) vychází opět z 5,6-diaminobenzimidazolu, který se rozpustí v koncentrované kyselině chlorovodíkové a zchladí na 0- 5 °C (po dobu 30 minut při 0- 5 °C). K roztoku se postupně přidá dusitan sodný v ledové vodě a směs se udržuje při teplotě 0-5 °C, následně se ukončí ochlazování a teplota reakce se nechá vystoupat na 40-45 °C, přičemž dochází k odhydrolyzování jedné diazoskupiny. Následuje při pH 6-7 kopulace s 2-naftolem v hydroxidu sodném za vzniku červené sraženiny 6-[(2-hydroxy-1-naftyl)diazenyl]-1*H*-benzimidazol-5-olu. Bis-diazoniové soli se používají pro barvení, potisk vláknitých materiálů

vyrobených z přírodní a regenerované celulózy. Tyto soli se využívají také v produkci modrotisku (kopie technického výtisku) metodou reprografie [20].



Obrázek 8. Příprava soli z dekarboxylovaného DABIZ [20]

2.6. Kapalinová chromatografie (LC)

Chromatografii lze definovat jako separační fyzikálně-chemickou metodu založenou na distribuci látek mezi stacionární (SF) a mobilní (MF) fází, které musí být vzájemně nemísitelné. Dle uspořádání se dělí na planární (papírová a tenkovrstvá chromatografie) a sloupcovou (kolonová a vysokoúčinná chromatografie). Ve sloupcové kapalinové chromatografii je stacionární fáze umístěná v chromatografické koloně, kterou protéká mobilní fáze. Stacionární fází je buď vlastní náplň kolony (např. částice silikagelu) nebo je vlastní stacionární fáze zakotvena na porézní matrici (např. silikagel, který by se ovšem v tomto případě neměl významně účastnit na separaci). Mobilní fáze je kapalina proudící chromatografickou kolonou a unášející analyty. Interakce analytu s oběma fázemi, stacionární i mobilní, určuje rychlost, s jakou analyty procházejí kolonou a způsob jejich dělení. Typ interakce závisí na vlastnostech analytů a stacionární fáze, včetně jejich polarity, velikosti molekul a chemického složení.

Z hlediska fyzikálně-chemického principu separace lze chromatografii rozdělit na různé typy (systémy) s převažujícími interakcemi mezi stacionární fází a separovanými látkami.

Hlavní typy interakcí jsou:

- Adsorpce
- Velikosti molekuly
- Polarita
- Interakce vlivem náboje
- Dipólové interakce
- Vodíkové vazby
- Afinitní interakce

Podle převažujícího typu interakcí lze dělit chromatografii do následujících módů:

- Systémy s obrácenými fázemi (RP-HPLC/RPLC)
- Systémy s normálními fázemi (NP-HPLC/NPLC)
- Hydrofobní interakční chromatografie (HIC)
- Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)
- Iontově párová chromatografie (IPC)
- Iontově výměnná chromatografie (IEC)
- Molekulová vylučovací chromatografie (SEC)
- Micelární kapalinová chromatografie (MLC)
- Afinitní a chirální chromatografie

Separční systém s normálními fázemi je charakterizován polární stacionární fází a nepolární mobilní fází. Retence v tomto systému je založena převážně na adsorpci. Tento systém nachází uplatnění u analytů s omezenou rozpustností ve vodném prostředí (např. lipofilní látky, izomery). Nevýhodou tohoto systému je, že vyžaduje práci s těkavými bezvodými organickými rozpouštědly. Oproti systému s normální fází dnes naprosto převažuje systém s obrácenými fázemi, především z důvodu použitelnosti na širší spektrum druhů vzorku a analytů. V systému s obrácenými fázemi je mobilní fáze polárnější oproti stacionární, která má charakter středně polární až nepolární. Mobilní fáze má vodně-organickou povahu, kdy organickou složku tvoří polární organické rozpouštědlo, které je

mísitelné s vodou (např. acetonitril, nízký alkohol). V mobilní fázi může být přítomen i přídavek pufru, kyseliny nebo báze pro zlepšení separačních vlastností. Systém s obrácenými fázemi se uplatňuje u analýz širokého spektra látek od malých molekul až po velké biomolekuly (proteomika) se širokým rozmezím acidobazických vlastností a polarit [21–23].

2.6.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie neboli HPLC (High Performance Liquid Chromatography), je významná technika kapalinové chromatografie. Její rozvoj nastal na počátku 70. let minulého století po úspěšném vyřešení problematiky přípravy a výroby moderních stacionárních fází a problematiky dávkování vzorků do kolony. Oproti klasické chromatografii je vhodná i pro separaci komplikovanějších směsí látek s vysokou citlivostí. HPLC má širokou škálu aplikací, zahrnující např. farmaceutický průmysl, potravinářství, životní prostředí a biotechnologie. Kolony pro HPLC jsou plněny stacionárními fázemi s malou velikostí částic (v současnosti sférické částice s průměrem 3-5 μm), čímž je dosaženo dostatečně vysoké účinnosti kolony. Na druhou stranu malá velikost částic vyvíjí vysoký odpor vůči proudění mobilní fáze kolonou. Aby se dosáhlo dostatečnému průtoku mobilní fáze, je nezbytné pracovat při vysokých tlacích (HPLC do 60 MPa, UHPLC až do 100-120 MPa), což je zajištěno vysokotlakými čerpadly. I další části chromatografu (spojovací kapiláry, dávkovací ventil, kolona) musí odolávat provoznímu tlaku v systému. Látky lze eluovat (vymývat z kolony) pomocí izokratické eluce (složení mobilní fáze je po dobu analýzy konstantní), gradientové eluce (pomocí programu se kontinuálně mění eluční síla) a vícestupňová eluce zahrnující výběr jiného rozpouštědla k němuž mají látky větší afinitu. K detekci a identifikaci separovaných látek lze HPLC spojit s vhodnou spektrální technikou poskytující potřebné informace o struktuře látky (nejčastěji hmotnostní spektrometrie) [21,24].

2.6.2. Instrumentace v HPLC

Základní systém pro HPLC nejčastěji zahrnuje: jedno nebo více vysokotlakých čerpadel pro tvorbu mobilní fáze, systém dávkování vzorku, kolonu a detektor (obr. 9).

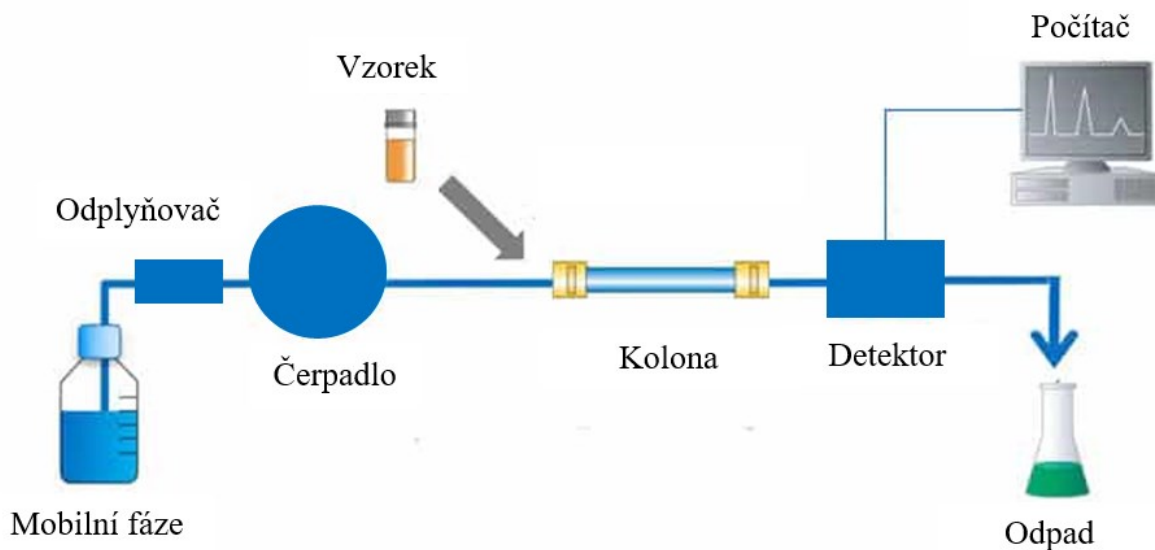
Systém vysokotlakých čerpadel zajišťuje přípravu a čerpání mobilní fáze s dostatečným tlakem odpovídajícím zvolenému průtoku (nejčastěji 0,1-5 ml/min s přesností do 1 %). Podle uspořádání může být složení mobilní fáze řízeno na nízkotlaké části čerpadla

(sání), v tomto případě je zapotřebí pouze jedno vysokotlaké čerpadlo nebo složení mobilní fáze je tvořeno programovým řízením čerpání dvou vysokotlakých čerpadel. Mobilní fáze do čerpadel je nasávána ze zásobníku přes odplyňovač zajišťující odstranění rozpuštěných plynů ze složek mobilní fáze.

Vzorek (analyt) je dávkován do toku mobilní fáze mezi čerpadlo a kolonu pomocí vícecestného (šesticestného) ventilu nebo autosampleru. Dávkování vzorku se pohybuje od 1 do 5 μl . Dávkování pomocí autosampleru umožňuje jednoduchou změnu dávkovaného objemu a v některých případech je možné v autosampleru provádět i jednoduché derivatizační reakce.

Po nadávkování je analyt unášen mobilní fází do kolony se stacionární fází, která je umístěna v termostatu. V současnosti používané kolony jsou nejčastěji vyrobeny z nerezové oceli případně dalších materiálů potřebných vlastností (např. titan při požadavku na biokompatibilitu) a musí odolávat tlakům v separačním systému. V současnosti jsou běžně používané rozměry kolon: délka 5-15 cm a vnitřní průměr 1,5-3 mm. Kolony jsou plněny porézními částicemi nejčastěji s chemicky vázanými stacionárními fázemi podle typu separačního systému. Velikost tohoto typu částic je pro HPLC 3-5 μm , pro UHPLC jsou k dispozici kolony s velikostí částic pod 2 μm . Vedle plně porézních částic stacionární fáze jsou k dispozici i tzv. povrchově porézní stacionární fáze tvořené pevným neporézním jádrem a tenkou povrchovou porézní vrstvou s navázanou vlastní stacionární fází, které kombinují výhody UHPLC (účinnost) a HPLC (nižší tlaky) systémů. Vedle kolon plněných diskretními částicemi existují i tzv. monolitické kolony, kdy náplň kolony je tvořena monoblokem polymeru (silikagel, organické polymery) s dostatečnou porézností zaručující průtok mobilní fáze.

Eluát z kolony s rozseparovanými látkami vstupuje do detektoru, který kontinuálně měří vybranou fyzikálně-chemickou vlastnost eluátu, jejíž grafickým záznamem je chromatogram, umožňující kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení analýzy [23,25].



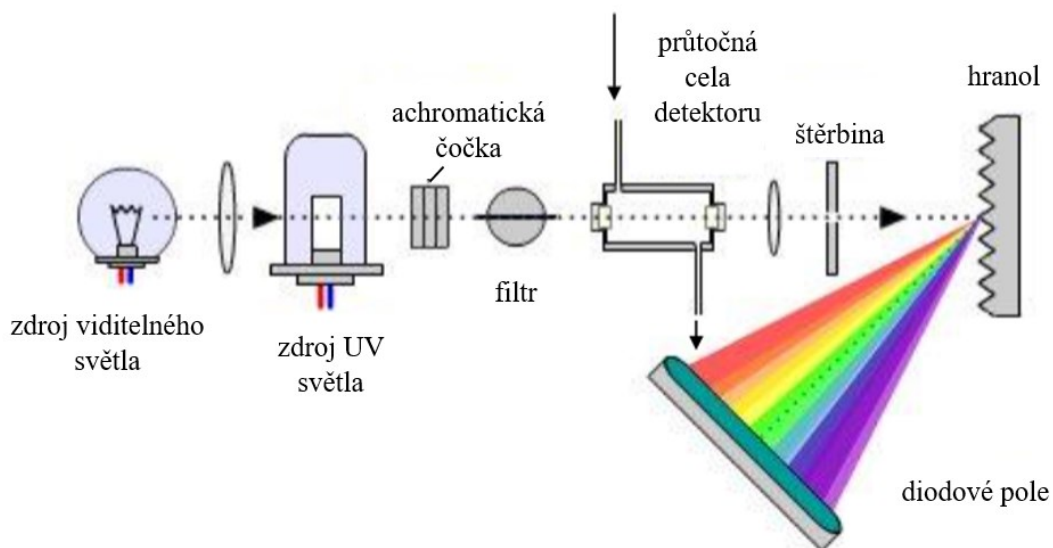
Obrázek 9. Základní schéma instrumentace v HPLC [26]

2.6.2.1. Detekce v HPLC

Detektory v HPLC jsou založeny na různých fyzikálně-chemických principech a mohou měřit buď odpovídající vlastnost eluátu (např. index lomu) nebo specifické vlastnosti analytu (např. UV absorpce). Proces detekce probíhá v malé průtokové cele, kterou prochází eluát. V HPLC se nejčastěji využívají detektory spektrofotometrické UV/VIS, fluorimetrické, refraktometrické, elektrochemické, vodivostní, případně další speciální typy pro vybrané aplikace. V současnosti je často využíván k detekci hmotnostní spektrometr v různém uspořádání, který na rozdíl od většiny předcházejících typů detektorů umožňuje i identifikaci separovaných látek na základě jejich hmotnostních spekter [22].

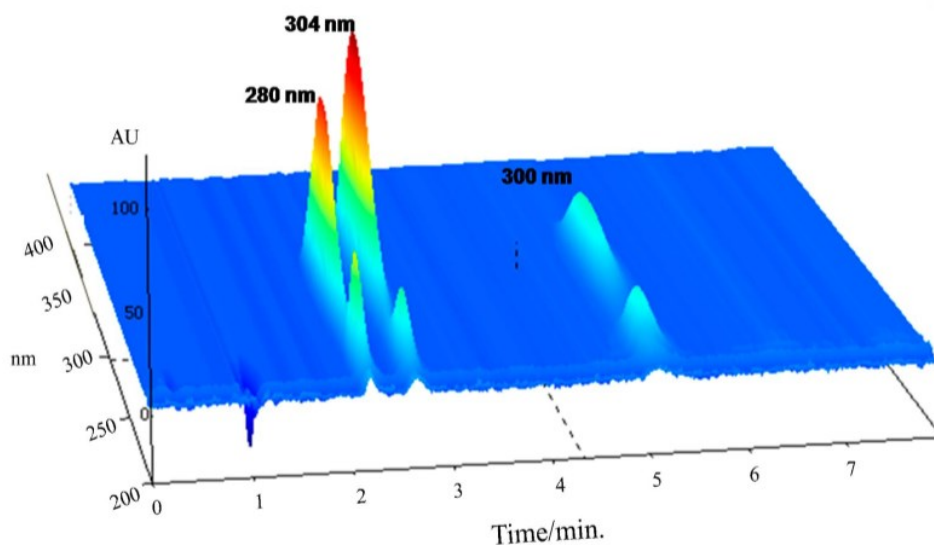
- **Detektor s diodovým polem (DAD)**

Detektor s diodovým polem je speciálním typem UV/VIS spektrofotometrického detektoru s inverzním uspořádáním cela-monochromátor, kde je výstupní štěrba monochromátoru nahrazena polem fotodiod (obr. 10).



Obrázek 10. Schéma detektoru diodového pole [27]

Spektrum vytvořené difrakční mřížkou je rozloženo po celé délce pole fotodiód a každá z nich funguje jako samostatný kanál pro záznam intenzity záření konkrétní vlnové délky ve spektru. Výběr vlnové délky k detekci nevyžaduje žádné mechanické pohyblivé části, což poskytuje dobrou krátkodobou i dlouhodobou opakovatelnost vlnových délek. V DAD detektoru probíhá měření všech vlnových délek současně, což poskytuje paralelní vícekanálovou detekci a celé spektrum lze zaznamenat rychle. Měřením získáme trojrozměrný graf závislosti absorpance na čase a vlnové délce (obr. 11).

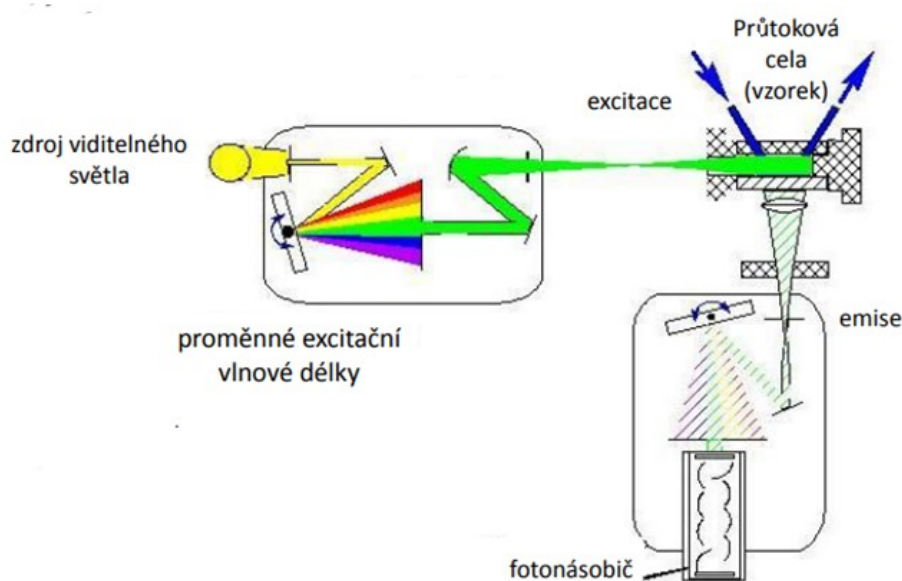


Obrázek 11. 3D graf závislosti absorpance na čase a vlnové délce [27]

Zaznamenávání trojrozměrných dat (absorbance, čas, vlnová délka) lze z výsledné matice dat extrahovat chromatogramy při konkrétních vlnových délkách nebo spektra pro konkrétní eluční časy. Nevýhodou DAD detektoru je vyšší hladina šumu, která je součástí procesu detekce fotodiod. Odezva (kvantová účinnost) diodového pole je také závislá na teplotě, což lze překonat teplotní stabilizací detekčního čipu [22].

- **Fluorescenční detektor (FLD)**

Fluorimetrický detektor (obr. 12) je založen na principu fluorescence, tj. emise sekundárního záření (emisního), které je vyvoláno absorpcí primárního elektromagnetického záření (excitačního) látkou. Jako zdroj excitačního záření slouží xenonová výbojka s monochromátorem pro výběr vhodné vlnové délky, která se volí na základě absorpčních vlastností sledovaných sloučenin. Eluát prochází průtokovou celou detektoru, kde se setkává s excitačním zářením. Sloučeniny schopné fluorescence obsahující fluorofor uvolní přebytečnou absorbovanou energii jako sekundární fluorescenční záření. Toto záření prochází druhým monochromátorem a je detekováno fotonásobičem. Pro optimální citlivost detekce je nutné pečlivě nastavit na detektoru vhodnou excitační a emisní vlnovou délku. Získaný chromatogram představuje intenzitu fluorescence ve vztahu ke koncentraci sloučeniny při různých konkrétních kombinacích excitační a emisní vlnové délky. Specifické vlastnosti fluorescence umožňují detektoru vysoce citlivou a selektivní detekci analytů [28].



Obrázek 12. Schéma fluorescenčního detektoru [27]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Chemikálie

V této práci byly použité následující chemikálie a standardy:

- Standard 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzoimidazol-2-on (čistota ≥ 95 %, Sigma Aldrich)
- Rozpouštědla:
 - Dimethyl sulfoxid pro HPLC (VWR chemicals)
 - Dimethylformamid (VWR chemicals)
 - Methanol pro HPLC ($\geq 99,7$ %), Sigma Aldrich
 - Acetonitril ($\geq 99,9$ %), Fischer Chemical
- Další:
 - Octan amonný bezvodý, p.a. (Lach-Ner, ČR)
 - Kyselina chlorovodíková 35 %, p.a. (Lach-Ner, ČR)
 - Hydroxid sodný pecky, p.a. (Lach-Ner, ČR)
 - Koncentrovaná kyselina octová 99,8 %, p.a. (Sigma Aldrich)
- Demineralizovaná voda upravena pomocí přístroje Goro Aqua Complet 200 + IWA 20 iol (Watek, ČR)

3.2. Použitá instrumentace

3.2.1. Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II

Vzorky byly separovány a kvantifikovány pomocí HPLC chromatografu Agilent 1260 Infinity II (obr. 13), který byl vyroben firmou Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Chromatograf je vybaven kvarterním čerpadlem poskytující tlaky až 600 barrů a s přístupem až ke čtyřem rozpouštědlům (mobilním fázím), dále vybavení tvoří autosampler (dávkovaný objem 0,1-100 μ l) a kolonový termostat s rozsahem ohřevu až 80 °C a detektor s diodovým polem (DAD) s nastavitelnou vlnovou délkou 190-640 nm se sběrem dat až při 8 vlnových délkách současně a fluorescenční detektor (FLD) s xenonovou lampou s možností časového programování a rozsahem s excitačních a emisních vlnových délek 200-1200 nm [29,30]. K analýzám byly použity kolony s povrchově porézní stacionární fází Poroshell 120 (EC-C18, 2.7 μ m, 3.0 x 150 mm- Agilent, USA) a Kinetex (C18 100 Å, 2,6 μ m, 150 x 3 mm- Phenomenex, USA).



Obrázek 13. HPLC chromatograf Agilent 1260 Infinity II (vlastní ilustrace)

3.2.2. UV/VIS spektrometr SPECORD 50 plus

Spektrometr SPECORD 50 plus (analytik Jena), vyrobený společností Jena v Německu, je dvoupraprskový fotometr s technologií děleného paprsku. Zařízení (obr. 14) je vybaveno monochromátorem s vysokým rozlišením (štěrbina 1,4 nm), který umožňuje v základní výbavě měření absorbance, spekter, automatickou konstrukci kalibračních křivek, měření barevnosti, kinetik, koncentrace pomocí faktoru a dalších. Instrument obsahuje optické prvky Zeiss a umožňuje rychlost měření spekter až 12 000 nm/min [31].



Obrázek 14. Spektrofotometr SPECORD 50 plus [31]

3.2.3. HPLC/MS

HPLC/MS analýzy byly realizovány na sestavě kapalinovém chromatografu Agilent 1260 Infinity II (Santa Clara, USA) spojeném s hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem QTRAP 4 500 (AB Sciex, USA). Chromatografické podmínky byly totožné s optimalizovanou separací pro HPLC/UV analýzy s výjimkou, kdy vodná složka eluentu obsahovala 1 mM octanu amonného z důvodu zvýšení míry ionizace.

MS podmínky:

- Ionizace: ESI+
- Hmotnostní rozsah: 50-500 Da
- Průtoky plynů podílejících se na rozprášení a sušení eluátu: „curtain gas“- 20 psi, „ion source gas 1“- 50 psi a „ion source gas 2“- 50 psi, collision gas-medium
- Teplota: 600 °C
- Napětí vložené na sprejovací kapiláru: -3 500 V
- Vstupní potenciál: -10 V
- Deklasterační potenciál: -90 V
- Výstupní potenciál kolizní cely: -14 V

3.3. Ostatní přístroje a pomůcky

- Laboratorní nádobí (Simax, ČR), Büchnerova filtrační sada (Simax, ČR)
- Analytická váha AE 200 (Mettler, USA)
- Horkovzdušná sušárna (Memmert, Německo)
- Ultrazvuková lázeň (Sonorex, Německo)
- Vakuová pumpa Laboport (KNF Neuberger, USA)
- Magnetická míchačka s teplotním senzorem MR Hei-End (Heidolph, Německo)
- Sada automatických pipet o různém objemu (Fischerbrand, Finsko)
- Vialky 2 ml (Agilent Technologies, USA)
- Plastové stříkačky Norm-Jet 3 ml (VWR chemicals, USA)
- PTFE membránové filtry 25 mm 0,22 µm (VWR chemicals, USA), nylonové syringe filtry 25 mm 0,22 µm (VWR chemicals, USA)
- Křemenná kyveta S/Q10 pro UV/VIS s optickou dráhou 1 cm (Thermo Fischer Scientific, ČR)

3.4. Analyzované vzorky

Společností Synthesia bylo poskytnuto 6 vzorků 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzoimidazol-2-onu s interním označením 0-5 (obr. 15). Vzorky látky byly v pevném skupenství a liší se dodavateli. Odlišnost v dodavateli má vliv i na barevnost vzorků, kdy se barva pohybuje od hnědé ve většině případech, po zelenou (vzorek 4) až černou (vzorek 5).



Obrázek 15. Vzorky DABIZ

3.5. Pracovní postup

3.5.1. Příprava vzorků k analýze na HPLC

Vzorky 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzoimidazol-2-onu byly k analýze připraveny v rozpouštědlech DMSO a methanolu. Pro účel kvantifikace DABIZ byly připraveny methanolicke roztoky, pro kvantifikaci bis-DABIZ byly připraveny roztoky v DMSO.

Pro analýzu obsahu hlavní složky ve vzorcích (DABIZ) bylo navažováno přesně okolo 7, resp. 20 mg vzorku do 100ml odměrných baněk (z důvodu omezené rozpustnosti některých vzorků), pro analýzu obsahu bis-DABIZ ve vzorcích byly připraveny roztoky navážením přesně okolo 5, resp. 3 a 10 mg do 10ml odměrných baněk, dle potřeby kalibrace. Plochy bis-DABIZ byly ve velkém rozmezí, a proto musel být upraven i nástřík pro jednotlivé vzorky.

3.5.2. Příprava kalibračních roztoků

Kvantifikace látky 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzoimidazol-2-on byla provedena v methanolu. Bylo rozpuštěno 20 mg standardu Sigma Aldrich ve 100ml odměrné baňce. Kalibrace byla měřena metodou změn nástřiku.

Při stanovení nečistoty bis-DABIZ ve vzorcích bylo naváženo 20 mg přečištěného bis-DABIZ (k dispozici od společnosti Synthesia, extrahovaný z látky DABIZ od dodavatele) do 100ml odměrné baňky. Z tohoto zásobního roztoku byl odpipetován 1 ml do 10ml odměrné baňky. Dále se postupovalo využitím změn nástřiků pro kalibraci.

3.5.3. Příprava standardu a vzorků k analýze na UV/VIS

V DMSO a DMF bylo naváženo 5 mg standardu, vzorků 0-5 a bis-DABIZ do 10ml odměrných baněk a z těchto roztoků bylo odpipetováno 150 μ l do 10ml odměrných baněk. V případě methanolu a vody byly naváženy 3 mg standardu, vzorků 0-5 a bis-DABIZ do 10ml odměrných baněk a z těchto zásobních roztoků bylo odpipetováno 100 μ l do 10ml odměrných baněk.

3.5.4. Postup pro gravimetrické stanovení bis-DABIZ

Využívá se zde principu nerozpustnosti této nečistoty v kyselině octové, zatímco majoritní složka DABIZ přechází do roztoku. Nečistota se zachytí na filtračním papíru (filtrační koláč) a po jeho promytí a vysušení se nerozpustný podíl váží.

Navážený vzorek (10 g) byl smíchán v kádince s 90 ml demineralizované vody a 25 ml koncentrované kyseliny octové. Směs byla vložena na magnetickou míchačku s teplotním senzorem (200 otáček, teplota udržována na 60 °C). Kádinka na míchačce byla přikryta hodinovým sklem a byla míchána s nastaveným vyhříváním 1 hodinu a 20 minut. Poté byla zfiltrována za tepla. Vzniká první filtrační koláč obsahující nerozpustný podíl bis-DABIZ (obr. 16). Ve filtrátu je obsažen rozpustný DABIZ, který je možno převést neutralizací roztokem NaOH na pH 5,5 na nerozpustnou formu, kterou je možné po 20minutovém míchání též gravimetricky stanovit (tento krok nebyl součástí diplomové práce).



Obrázek 16. Filtrační koláč DABIZ (vlevo) a bis-DABIZ (vpravo)- vlastní ilustrace

3.6. Software k vyhodnocení dat

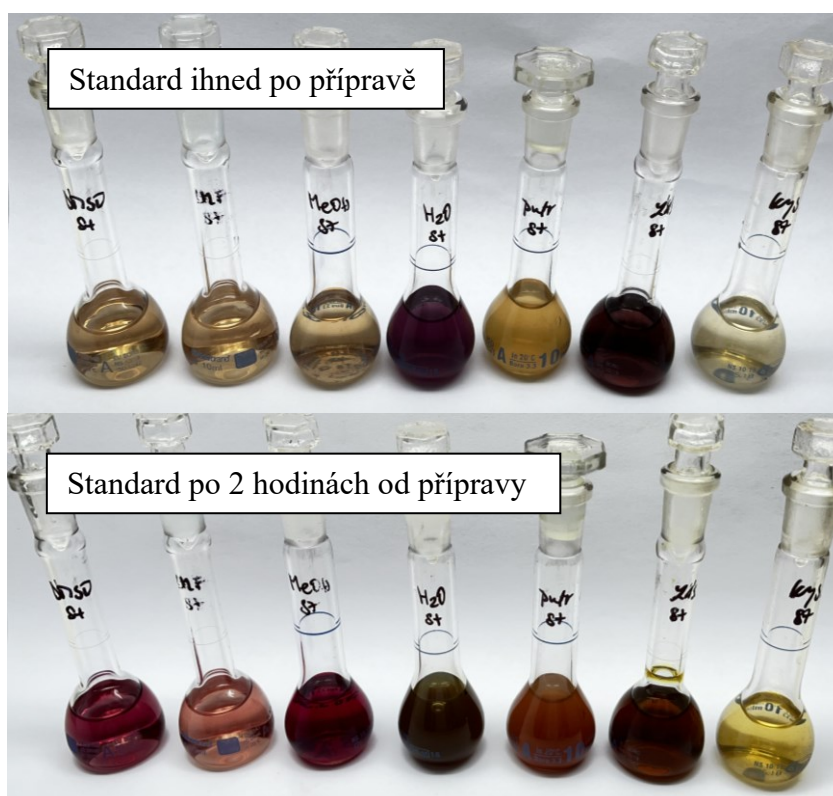
Pro vyhodnocení záznamů z HPLC byl využit software OpenLab CDS (Agilent Technologies, USA). Spektra byla vyhodnocena pomocí programu Aspect UV.

Chemické vzorce a rovnice v této diplomové práci byly vypracovány s pomocí programu ChemSketch, který je dostupný ve freeware verzi. Chemický název pro nečistotu „bis-DABIZ“ byl vygenerován pomocí programu ChemDraw.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

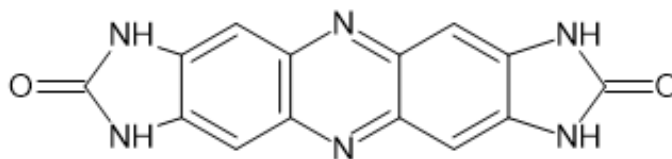
4.1. Problematika látky 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzoimidazol-2-on

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3., látka vykazuje nestabilitu při expozici světla a vlhkosti. Tato nestabilita může vést k nežádoucím reakcím a degradaci látky, což může ovlivnit kvalitu a účinnost produktů při syntéze. Z těchto důvodů je důležité s DABIZ správně manipulovat, skladovat a nevystavovat zbytečně světlu. Bylo zjištěno, že v pevném skupenství je DABIZ více stabilní než v roztocích. Roztoky mění barvu již do půl hodiny od přípravy (změna barvy po 2 hodinách viz obr. 17), a proto je důležité připravené vzorky zpracovat a zanalyzovat včas.



Obrázek 17. Změna barvy standardu DABIZ v rozpouštědlech

Dle dostupných materiálů ze společnosti Synthesia, a.s. je hlavní nečistotou ve vzorcích DABIZ nová, dosud nepopsaná látka (obr. 18). U sloučeniny byl vygenerován chemický název 7,9-dihydrodiimidazo[4,5-*b*:4',5'-*i*]fenazin-2,8(1*H*,3*H*)-dion. Je nutno podotknout, že tento název je pouze teoretický, jelikož sloučenina není evidována.



Obrázek 18. Nečistota "bis-DABIZ"

Výše uvedená sloučenina vzniká degradací látky 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzimidazol-2-onu (DABIZ). Při pohledu na strukturu molekuly je patrné, že ke vzniku této nečistoty vzniká spojením benzimidazolových kruhů, tedy zdvojením jedné molekuly DABIZ. Odtud je odvozeno označení „bis-DABIZ“ pro účely této diplomové práce.

4.2. Výběr vhodného rozpouštědla

Před zahájením vlastních analýz je nutné vybrat vhodné rozpouštědlo, ve kterém je látka DABIZ dostatečně rozpustná. Bylo testováno 8 rozpouštědel, zahrnující acetonitril (AcN), dimethylformamid (DMF), dimethylsulfoxid (DMSO), methanol (MeOH), octan amonný (1 g/l), vodu, 5 mM HCl a 5 mM NaOH. Rozpustnost ve zde uvedených rozpouštědlech je uvedena v tabulce č. 1. Bylo vyzkoušeno 2 koncentrační hladiny a to 10 mg/10 ml a 3 mg/10 ml. V DMSO, DMF a 5 mM NaOH byla potvrzena rozpustnost 10 mg/10 ml, zatímco ve zbylých testovaných rozpouštědlech bylo možné připravit roztok z koncentrací 3 mg/10 ml. V acetonitrilu nebylo možné připravit ani roztok s koncentrací 3 mg/10 ml.

Tabulka 1. Minimální navážky v jednotlivých rozpouštědlech

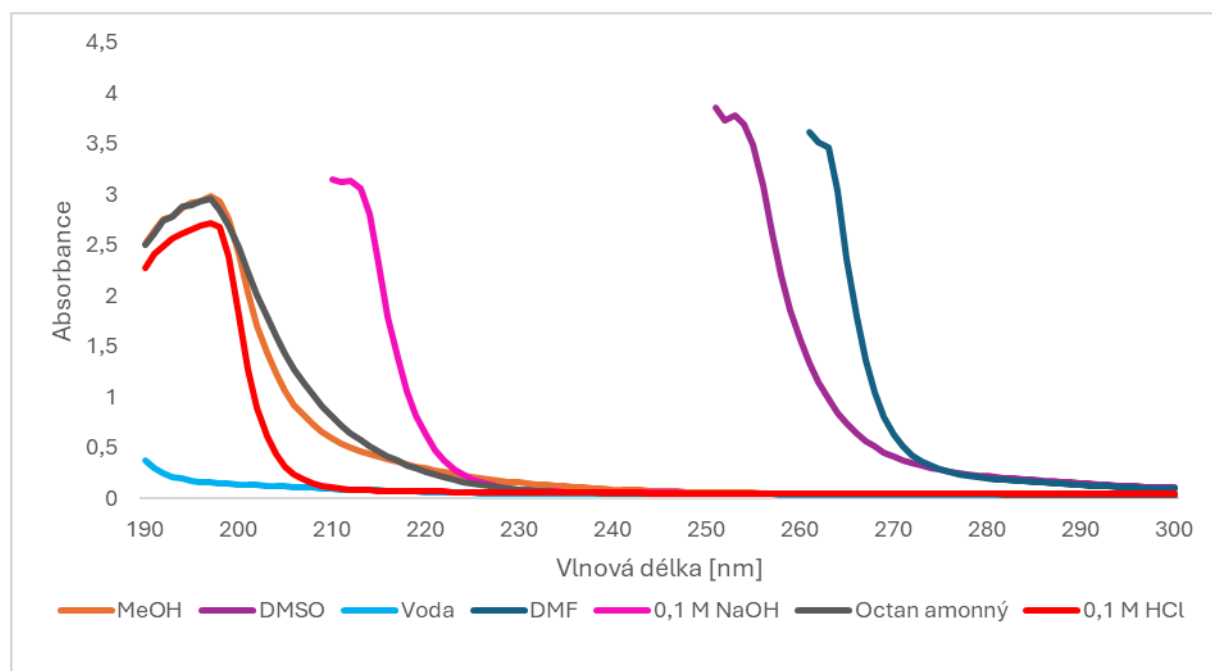
Rozpouštědlo	Max. rozpustná navážka [mg/10 ml]
ACN	-
DMSO	10
DMF	10
MeOH	3
Octan amonný	3
Voda	3
5 mM HCl	3
5 mM NaOH	10

4.3. UV/VIS Spektrofotometrická analýza vzorků a standardů pomocí UV/VIS

DABIZ byl kvalitativně stanoven spektrofotometricky. V závislosti na použitém rozpouštědle je sledován vliv absorpce samotného rozpouštědla. Experimentálně byly zjištěny hodnoty absorpce jednotlivých rozpouštědel (tzv. cut off, tabulka č. 2). Rozpouštědla DMSO a DMF absorbují až do vlnové délky 270 nm a proto je u nich viditelný pouze 1 absorpční pás látky DABIZ. Vhodné pro spektrofotometrickou analýzu DABIZ není ani NaOH (0,1 M), která absorbuje až do 220 nm. U ostatních rozpouštědel je absorpce nižší. Absorpce rozpouštědel je uvedena na obrázku 19.

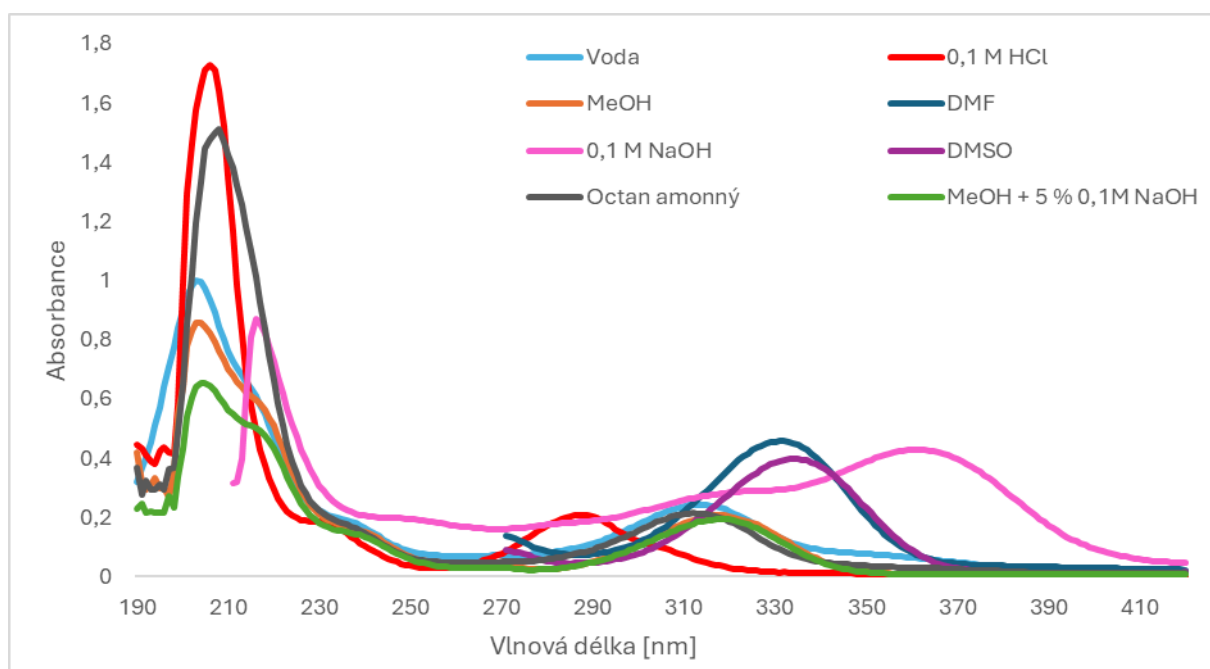
Tabulka 2. Experimentálně určené cut off rozpouštědel

Rozpouštědlo	Vlnová délka [nm]
MeOH	210
Voda	190
0,1M NaOH	220
Octan amonný	210
0,1M HCl	210
DMSO	260
DMF	270



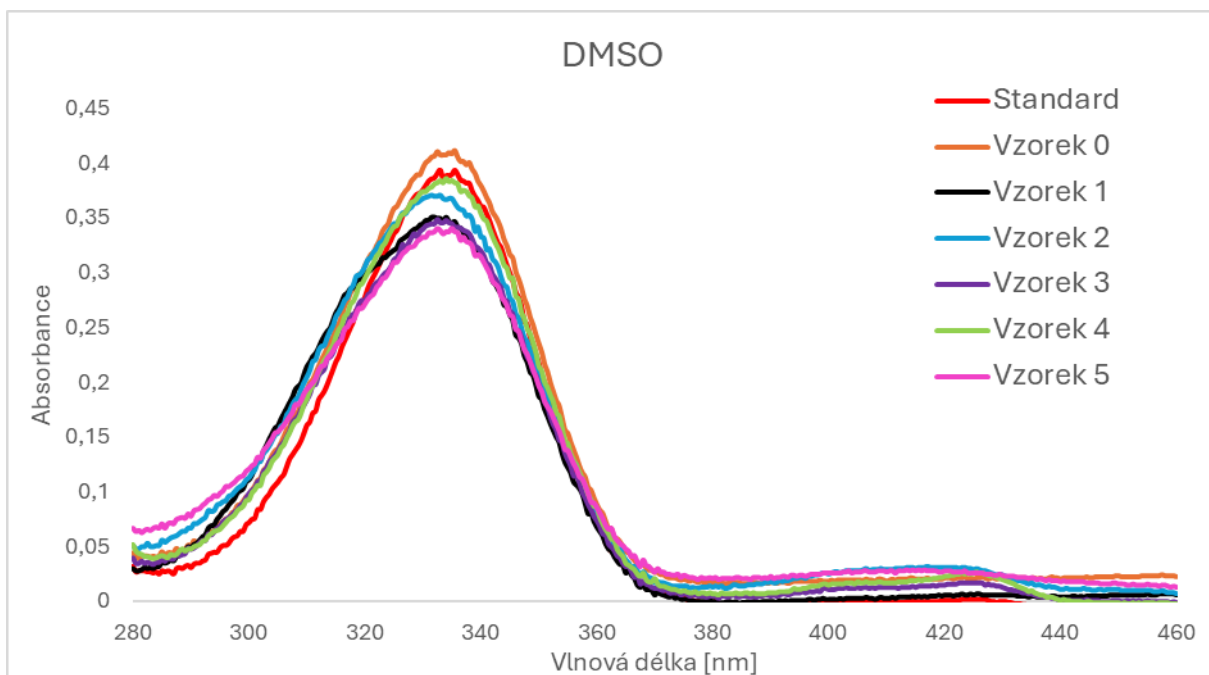
Obrázek 19. Absorpce rozpouštědel

Při měření zředěných roztoků standardu metodou UV/VIS v jednotlivých rozpouštědlech (obr. 20) byl viditelný rozdíl při použití 0,1 M NaOH. DABIZ v zásaditém prostředí rychle mění barvu, což značí degradaci látky. Z tohoto důvodu lze říci, že silná změna pH k vyšším hodnotám (alkalické prostředí) není pro látku vhodná, silně ji ovlivňuje. Při použití methanolickeho roztoku NaOH (5 mM) byla pozorována stejně rychlá změna barvy (degradace látky), jako u standardu s 0,1 M NaOH, proto není vhodná ani tato varianta přidavku NaOH do jiného rozpouštědla. Obdobný posun absorpčního maxima byl pozorován v případě roztoku DABIZu v 0,1 M HCl. Z těchto důvodů není výhodné pracovat v silně alkalickém, resp. kyselém prostředí. V rozpouštědlech bez významných acidobazických vlastností (voda, methanol, octan amonný, DMSO, DMF) je tvar spekter podobný.

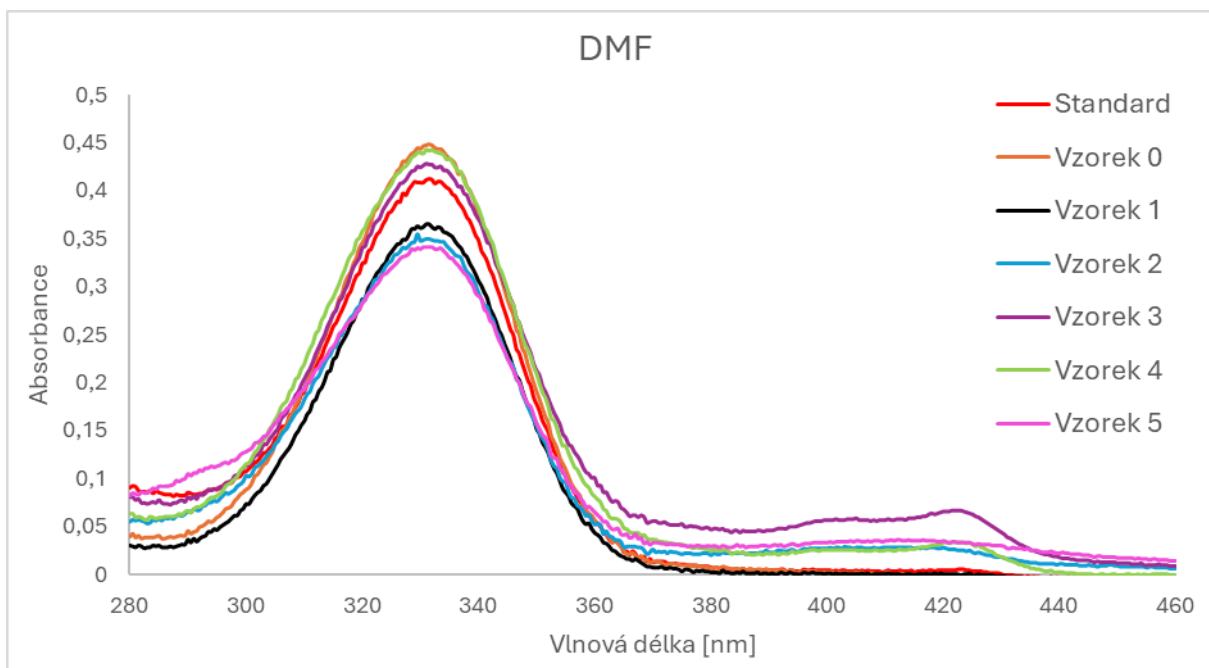


Obrázek 20. Spektrum standardu v jednotlivých rozpouštědlech

Vedle pásu v oblasti okolo 330-335 nm je u některých vzorků rozpuštěných v DMSO (obr. 21) a DMF (obr. 22) patrná i další absorpce při 420-430 nm. Bylo zjištěno, že tato absorpce je způsobena přítomností vyššího obsahu bis-DABIZ ve vzorku, což je potvrzeno i spektrem čistého bis-DABIZu v DMSO (viz obr. 25). Při použití dalších rozpouštědlech tento pás ve spektru nebyl, protože bis-DABIZ je nerozpustný.

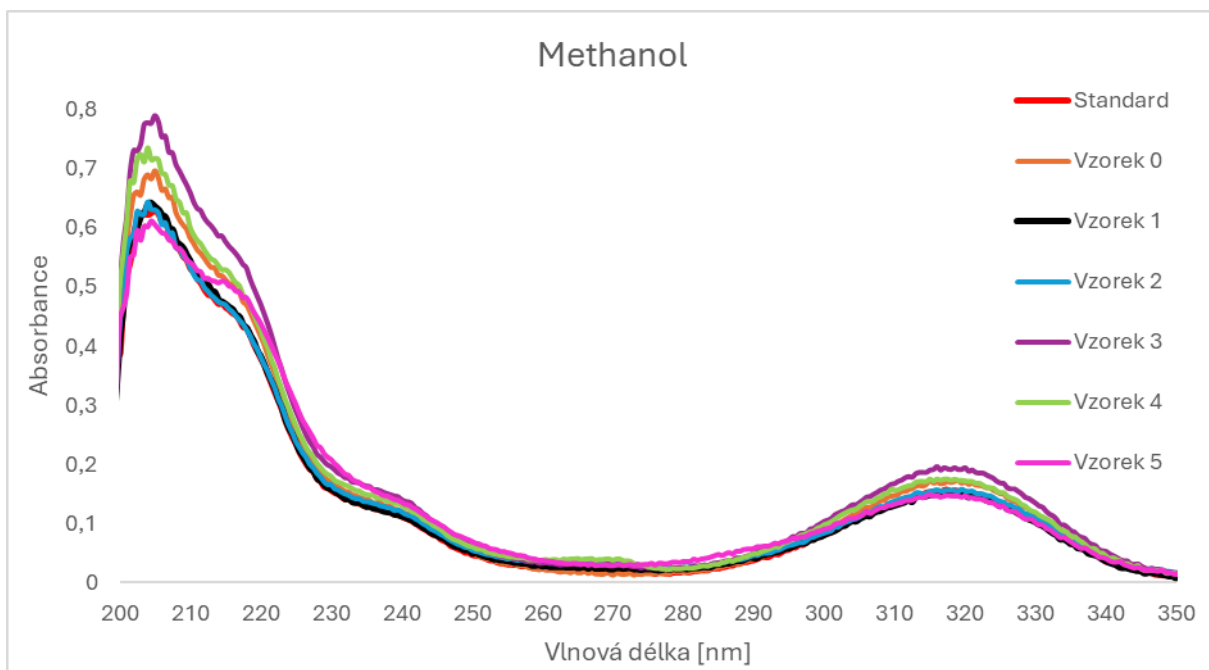


Obrázek 21. Spektrum vzorků v DMSO

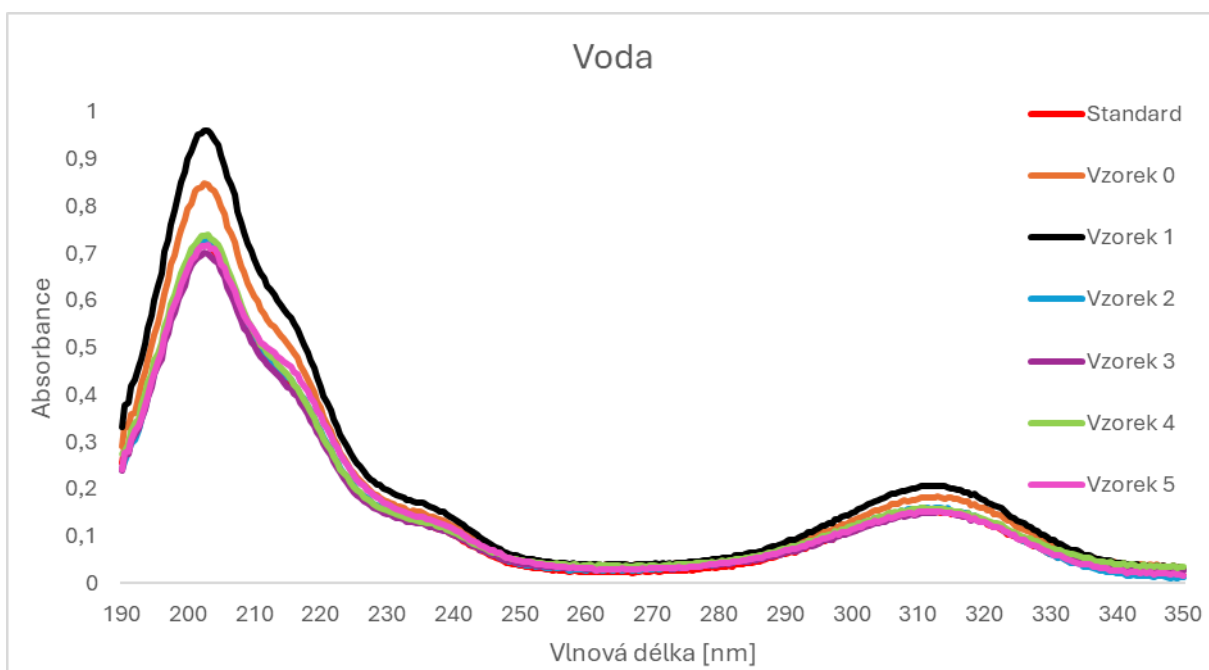


Obrázek 22. Spektrum vzorků v DMF

V methanolu (obr. 23) a ve vodě (obr. 24) je vedle absorpčního pásu 330-335 nm viditelný i další pás u oblasti pod 210 nm. V případě methanolu je nutné zohlednit, že tento pás je na hranici použitelnosti methanolu jako rozpouštědla (cut off okolo 210 nm).

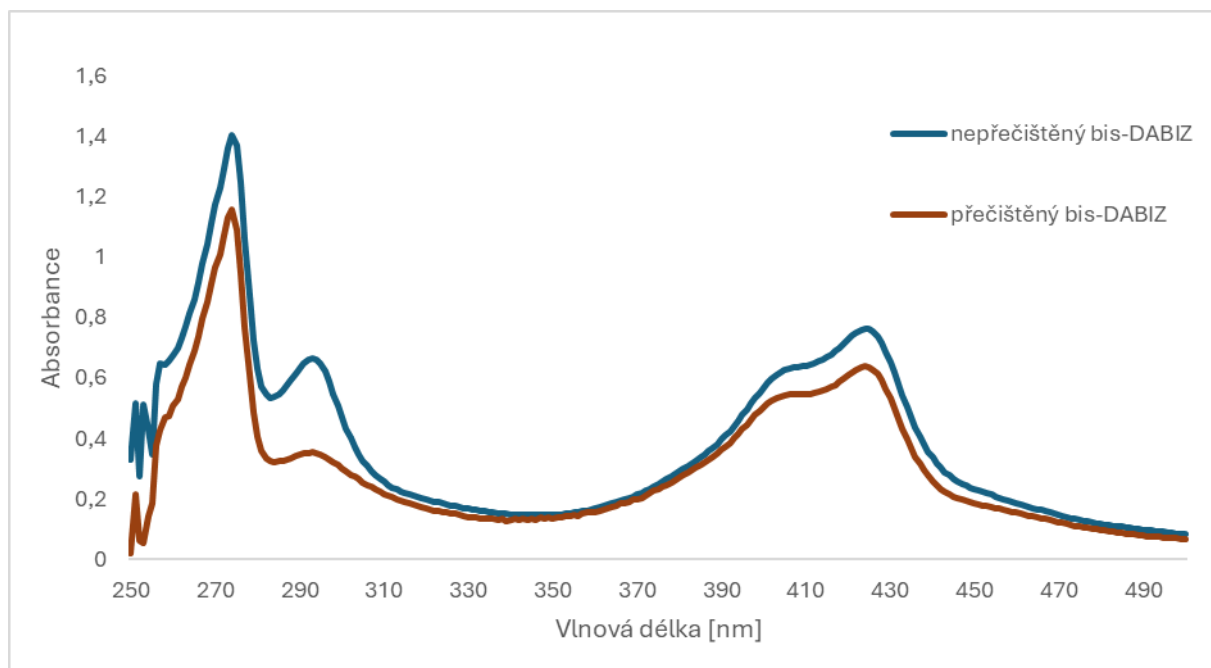


Obrázek 23. Spektrum vzorků v methanolu



Obrázek 24. Spektrum vzorků ve vodě

Na obr. 25 je spektrum nečistoty bis-DABIZ. Byla změřena jak spektra původní vyizolované nečistoty, tak i nečistoty po přečištění po rekrystalizaci kyselinou octovou. Z obrázku je viditelný relativní pokles absorpce při 290 nm po čistícím kroku. Profil UV spektra přečištěného i nepřečištěného bis-DABIZu je shodný. V tabulce č. 3 je vypočítán molární absorpční koeficient pro bis-DABIZ.



Obrázek 25. Spektrum bis-DABIZu v DMSO

Tabulka 3. Hodnoty molárního absorpčního koeficientu bis-DABIZ

	Nepřečištěný bis-DABIZ ϵ v DMSO [l/mol ⁻¹ · cm ⁻¹]		Přečištěný bis-DABIZ ϵ v DMSO [l/mol ⁻¹ · cm ⁻¹]	
	274 nm	425 nm	274 nm	425 nm
Bis-DABIZ	54 640	29 730	45 120	24 880

Pro všechny vzorky byl vypočítán molární absorpční koeficient ve vybraných rozpouštědlech (tabulka 4-5).

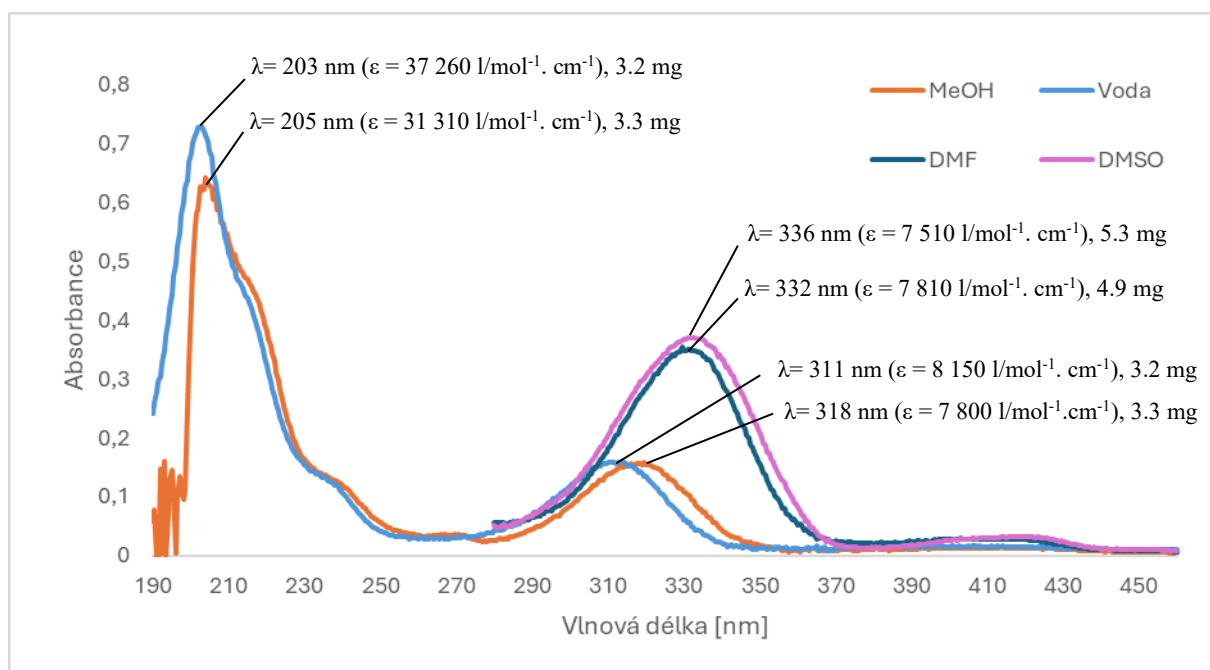
Tabulka 4. Vypočítaný molární absorpční koeficient DABIZu v DMSO a DMF

	ϵ v DMSO [l/mol ⁻¹ · cm ⁻¹] při 336 nm	ϵ v DMF [l/mol ⁻¹ · cm ⁻¹] při 332 nm	ϵ v MeOH [l/mol ⁻¹ · cm ⁻¹] při 318 nm
Standard	9 450	10 330	9 350
Vzorek 0	9 360	9 820	9 670
Vzorek 1	7 570	8 310	8 540
Vzorek 2	7 510	7 810	7 800
Vzorek 3	7 790	9 360	9 540
Vzorek 4	8 700	9 290	9 900
Vzorek 5	7 370	7 790	7 530

Tabulka 5. Vypočítaný molární absorpční koeficient ve vodě

	ϵ ve vodě [l/mol ⁻¹ · cm ⁻¹] při 203 nm	ϵ ve vodě [l/mol ⁻¹ · cm ⁻¹] při 311 nm
Standard	46 290	9 780
Vzorek 0	42 190	9 050
Vzorek 1	52 430	11 320
Vzorek 2	37 260	8 150
Vzorek 3	39 640	8 430
Vzorek 4	39 040	8 250
Vzorek 5	39 090	8 310

Přesná poloha absorpčního maxima v oblasti nad 300 nm je mírně ovlivněna použitým typem rozpouštědla. Jak je uvedeno na obrázku 26 v protických rozpouštědlech (voda, methanol) je absorpční maximum při nižších vlnových délkách (311 a 318 nm), zatímco u aprotických rozpouštědlech (DMSO, DMF) je absorpční maximum 332 a 336 nm.



Obrázek 26. Spektrum vzorku 2 v MeOH, vodě, DMSO a DMF

4.4. Optimalizace analýzy vzorků DABIZ pomocí HPLC

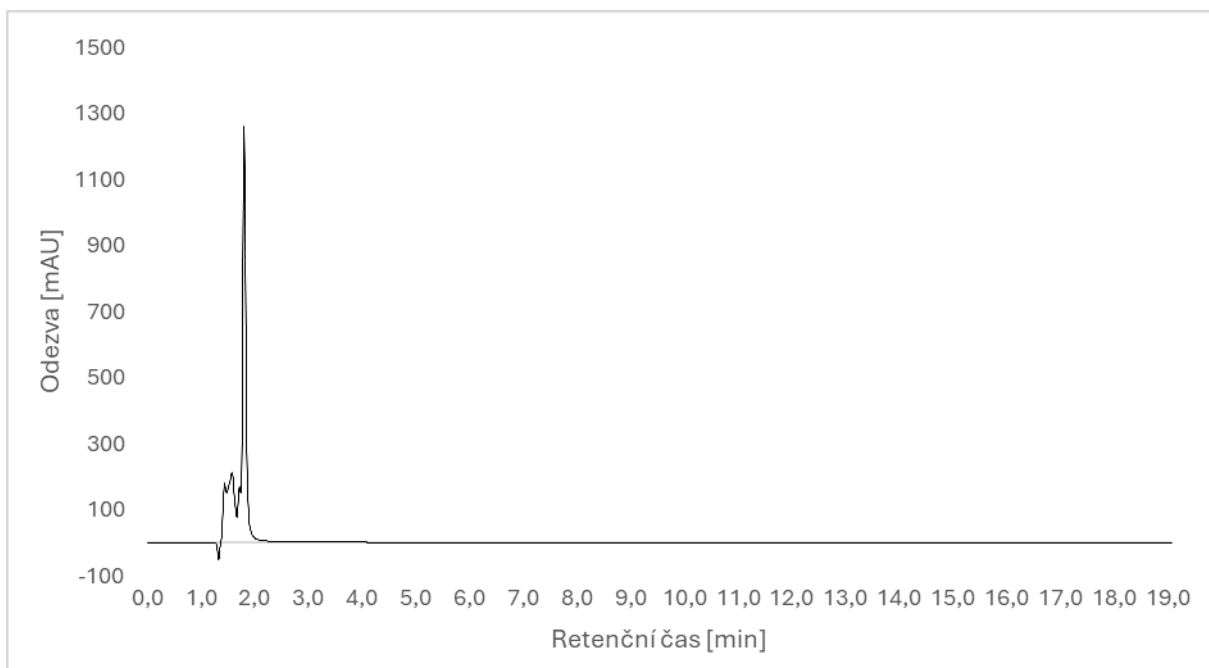
Pro optimalizaci analýzy pomocí HPLC byly vyzkoušeny dva typy kolon, konkrétně Poroshell 120 C18 a Kinetex C18 a dvě mobilní fáze AcN/voda a AcN/octan amonný (1 g/l). Při optimalizaci se vycházelo z požadavku separace polárního DABIZu a přítomných méně polárních nečistot v jedné analýze. Jako nejvhodnější z tohoto pohledu byla vybrána kombinace kolony Poroshell 120 a mobilní fáze AcN/voda a to z důvodu lepší symetrie píku DABIZ v mobilní fázi AcN/voda oproti mobilní fázi AcN/octan amonný.

Byly testovány různé gradientové podmínky separace (délka a strmost gradientu), přičemž dále používaný optimalizovaný průběh gradientu je uveden v tabulce 6. Celková doba analýzy včetně reekvilibrace kolony na počáteční podmínky je 22 minut. Retenční čas DABIZu za těchto podmínek je 2.1 minuty, potenciální nečistoty v jednotlivých vzorcích se eluují až do 16. minuty v závislosti na typu vzorku a použitém rozpouštědle pro přípravu vzorku k analýze.

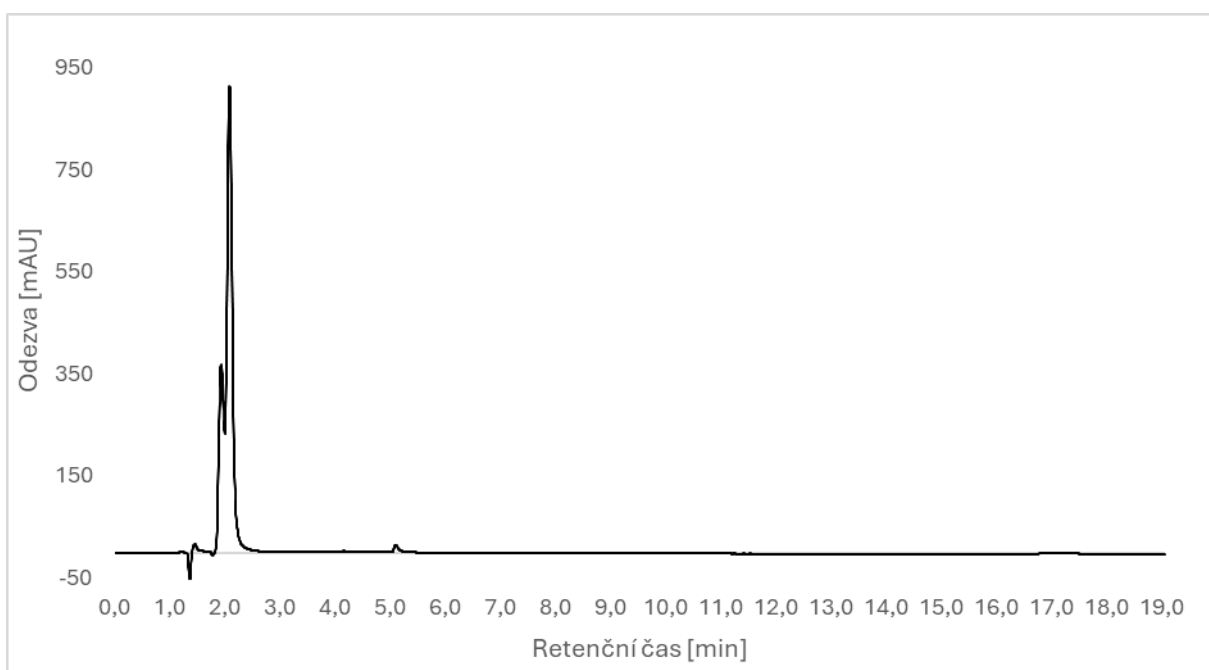
Tabulka 6 Optimalizované podmínky gradientové eluce

Čas [min]	AcN [%]	Voda [%]
0	2	98
10	20	80
15	90	10
17	90	10
17,5	2	98
22	2	98

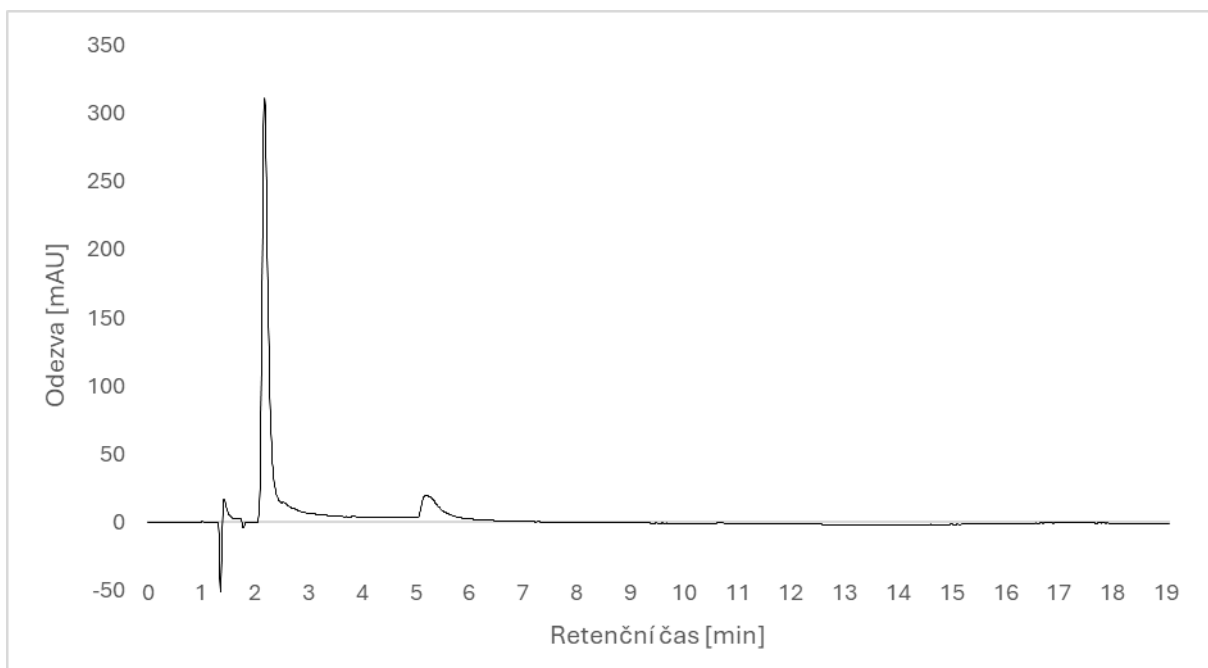
Na obrázku 27 je viditelný dvojitý pík látky DABIZ při měření na KINETEX koloně s mobilní fází AcN/voda a na obrázku 28 je opět dvojitý pík s mobilní fází AcN/octan amonný. Na chromatogramu na obr. 29 je analýza téhož vzorku na koloně Poroshell s mobilní fází AcN/voda, kde je již patrný ostrý symetrický pík DABIZu umožňující snadnou další kvantifikaci.



Obrázek 27. Chromatogram vzorku 0 v DMSO v mobilní fázi AcN/voda navážka 5 mg/10 ml, kolona Kinetex C18, 100 Å, 2.6 µm, 150 x 3 mm Phenomenex – USA, gradientová eluce viz tab. 7, nástřik 2 µl, průtok 0.5 ml/min, detekce UV 320 nm, teplota 30 °C



Obrázek 28. Chromatogram vzorku 0 v DMSO s mobilní fází AcN/octan amonný (1 g/l) ve vodě, navážka 5 mg/10 ml, kolona Poroshell 120 EC-C18, 2.7 mm, 3.0 x 150 mm – Agilent- USA, gradientová eluce viz tab. 7, nástřik 2 µl, průtok 0.5 ml/min, detekce UV 320 nm, teplota 30 °C



Obrázek 29. Chromatogram vzorku 0 v DMSO s mobilní fází AcN/voda, navážka 5 mg/10 ml, kolona Poroshell 120 EC-C18, 2.7 mm, 3.0 x 150 mm – Agilent – USA, gradientová eluce viz tab. 7, nástřik 2 μ l, průtok 0.5 ml/min, detekce UV 320 nm, teplota 30 $^{\circ}$ C

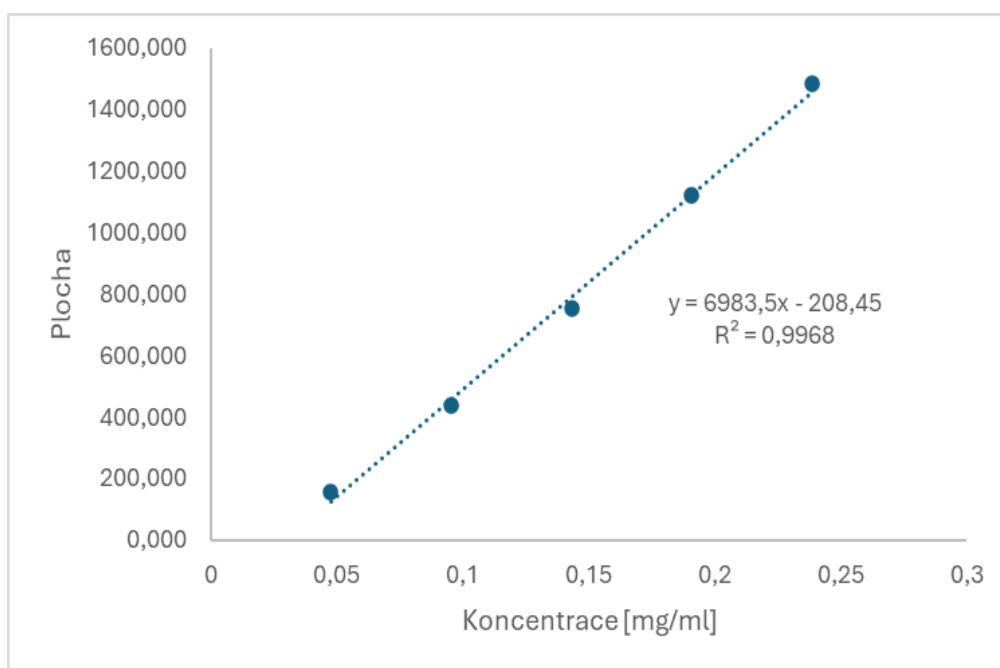
4.4.1. Kvantifikace látky DABIZ

Pro kvantifikaci byl připraven kalibrační roztok standardu DABIZ v methanolu. Kontrola jeho čistoty byla potvrzena elementární analýzou (teorie 51.21 % C, 4.91 % H, 34.13 % N, nalezeno 51.07 % C, 4.97 % H, 34.88 % N). Kvantifikace látky DABIZ proběhla při vlnové délce detekce 320 nm, která odpovídá maximu absorpčního pásu v této oblasti. Výsledky kalibračního měření jsou uvedeny v tabulce č. 7. Pomocí regresní analýzy dat v MS excel byl vypočítán limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ). Nalezený obsah DABIZu se ve vzorcích 1, 2, 3 a 5 se pohyboval nad limitem kvantifikace. Z důvodu omezené rozpustnosti vzorků 0 a 4 se podařilo připravit pouze roztoky s 3x nižší koncentrací než ve zbylých případech (7,1 mg/100 ml oproti 20 mg/100 ml), a proto nalezené obsahy DABIZ leží pod LOQ.

Tabulka 7. Kalibrační řada standardu v methanolu

Objem nástřiku [μ l]	c [mg/ml]	Plocha
0,5	0,048	158,5
1	0,096	440,2
1,5	0,143	753,5
2	0,191	1121,8
2,5	0,239	1484,5
LOD	0,038	
LOQ	0,116	

Při prvotním vyhodnocení výsledků kalibračních analýz byla zjištěna významná záporná hodnota úseku kalibrační závislosti, proto bylo měření vícekrát opakováno vždy s čerstvě připraveným roztokem standardu DABIZ, avšak získané kalibrační závislosti vykazovaly stejný trend (záporná hodnota úseku kalibrační závislosti). Tento problém byl konzultován s vedoucím diplomové práce i s konzultantkou a nebyla shledána chyba v přípravě vzorku k analýze, výpočtu či v instrumentaci. Výsledky kalibračních měření byly konfrontovány s metodou pro HPLC analýzu DABIZ dosud používanou v Synthesia a.s., přičemž bylo zjištěno, že obě sady kalibračních měření jsou zatíženy podobnou prozatím neznámou systematickou chybou. Vícenásobné opakování kalibračních měření nebylo možné z důvodu omezené stability DABIZu (viz kapitola 4.1.). Kompletní sada kalibračních měření trvá 2 hodiny, což je na hranici stability hlavní složky.



Obrázek 30. Kalibrační závislost DABIZ

Na obr. 30 je uvedena kalibrační závislost DABIZ. Kvantifikace DABIZ v jednotlivých vzorcích je uvedena v tabulce 8. Největší zastoupení DABIZ a nejčistější je vzorek 0 (98,1 %). Nejvíce nečistot obsahuje vzorek 5 s nejmenším zastoupením DABIZ. Ukázka separací viz přílohy obr. 42-47.

Tabulka 8. Kvantifikace DABIZ v methanolu

Vzorek	Navážka [mg]	Dávkování [μ l]	Plocha	Koncentrace [mg/ml]	Hm. %
Vzorek 0	7,1	2	265,5	0,0696	98,1
Vzorek 1	20,1	2	1020,5	0,1806	89,8
Vzorek 2	20,1	2	935,3	0,1681	83,6
Vzorek 3	20,4	2	1010,5	0,1791	87,8
Vzorek 4	7,1	2	220,5	0,0630	88,8
Vzorek 5	19,6	2	791,8	0,1470	75,0

Vedle lineární regrese bylo vyzkoušeno proložit kalibrační data polynomem 2. stupně, avšak ani toto nepřineslo podstatné zlepšení regresních parametrů (absolutní hodnota úseku).

4.4.2. Analýza nečistot

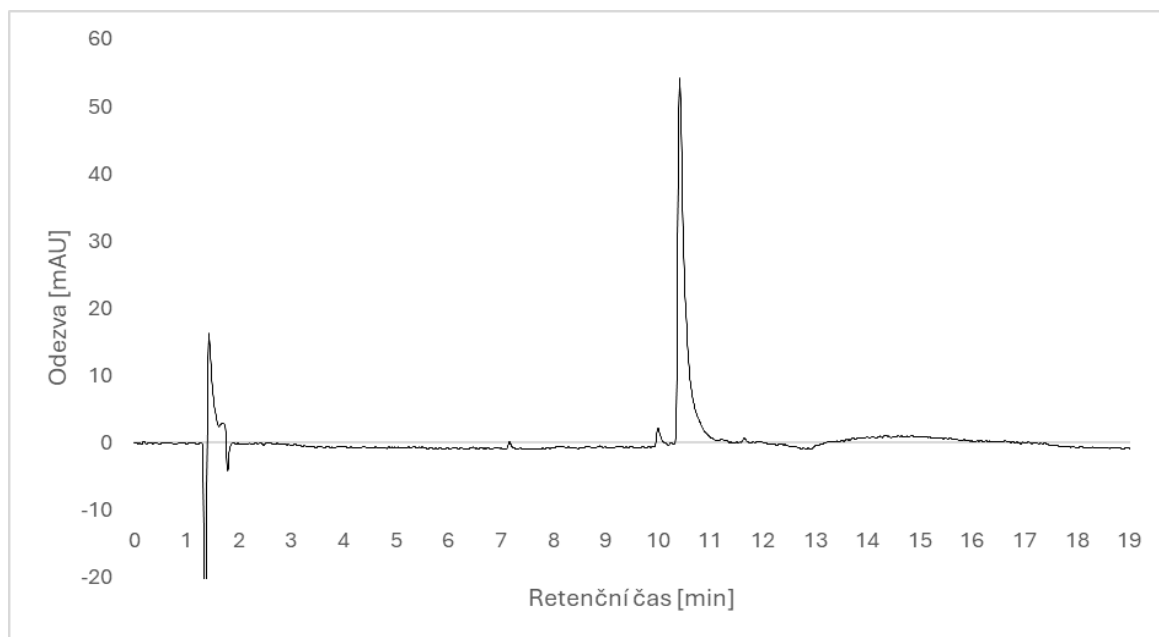
Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.1., látka DABIZ je v roztoku nestabilní a rychle podléhá degradaci za vzniku dalších barevných produktů. Toto je potvrzeno analýzou čerstvě připravených vzorků v DMSO a jejich opakovanou analýzou po 12 hodinách expozice na denním světle při laboratorní teplotě. Výsledky srovnávacích analýz při 254 nm jsou uvedeny v tabulce 9, z nichž vyplývá, že nejvíce dochází vedle vzrůstu obsahu nečistoty s $t_R \approx 5,1$ min k rapidnímu nárůstu obsahu nečistoty s $t_R \approx 10,5$ min, který odpovídá bis-DABIZ. Vzorek 0 a 5 obsahuje nečistoty, které se neprojevují u ostatních vzorků a jejichž obsah je nezávislý na délce skladování kapalného vzorku. Ukázka chromatogramů z 1. měření viz přílohy obr. 48-52.

Tabulka 9. Přehled nečistot v DMSO

1. měření					
DMSO	Plocha (3 min)	Plocha (5,1 min)	Plocha (10,1 min)	Plocha (10,5 min)	Plocha (16,3 min)
Vzorek 0	-	256,8	-	5,5	11,7
Vzorek 1	-	288,0	-	21,3	-
Vzorek 2	-	260,0	-	50,0	-
Vzorek 3	-	281,5	-	104,3	-
Vzorek 4	-	320,3	-	249,3	-
Vzorek 5	226,0	239,9	117,7	14,7	-
2. měření (stabilita po 12 hodinách)					
DMSO	Plocha (3 min)	Plocha (5,1 min)	Plocha (10,1 min)	Plocha (10,5 min)	Plocha (16,3 min)
Vzorek 0	-	367,1	-	59,7	12,7
Vzorek 1	-	461,6	-	35,9	-
Vzorek 2	-	300,3	-	280,9	-
Vzorek 3	-	402,0	-	139,5	-
Vzorek 4	-	415,2	-	271,7	-
Vzorek 5	239,2	243,0	118	67,8	-

4.4.3. Kvantifikace bis-DABIZ

Před použitím pro kalibrační měření byl vzorek bis-DABIZu, který byl použit jako standard, přečištěn rekrystalizací s kyselinou octovou stejnou metodou, která byla použita při gravimetrickém stanovení bis-DABIZu (viz experimentální část kap. 3.5.4.). Chromatogram takto přečištěného bis-DABIZu s detekcí při 400 nm je na obr. 31, kde je vidět, že žádné významné nečistoty se v záznamu nevyskytují.

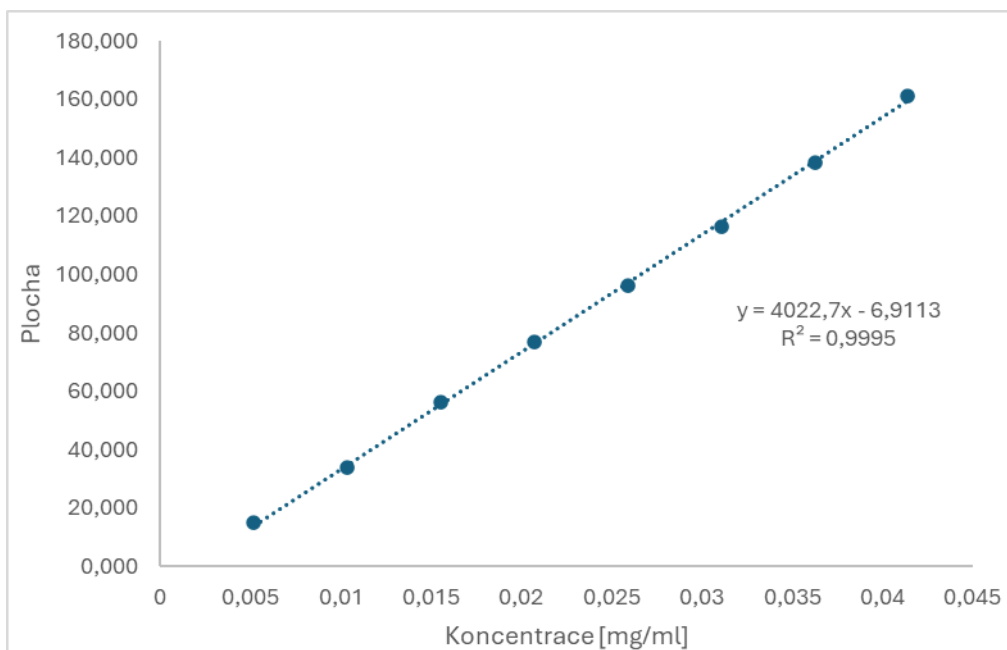


Obrázek 31. Chromatogram bis-DABIZu, roztok 20 mg/100 ml, dále ředěn 2 ml/10 ml, UV detekce 400 nm, HPLC podmínky viz obr. 29)

Takto přečištěný bis-DABIZ byl použit jako kalibrační standard ke kvantifikaci jeho obsahu v jednotlivých vzorcích DABIZu. Příslušná kalibrační data jsou uvedena v tabulce 10 a na obr. 32 je uvedena kalibrační závislost. Pomocí regresní analýzy dat v MS Excel byl vypočítán limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) pro kalibraci bis-DABIZ. Obsah bis-DABIZu byl vyšší u všech vzorků než limit kvantifikace. Ukázky separací viz přílohy obr. 53-58.

Tabulka 10. Kalibrační řada bis-DABIZ v DMSO

Objem nástřiku [μ l]	c [mg/ml]	Plocha
0,5	0,005	14,8
1	0,010	33,8
1,5	0,016	56,1
2	0,021	76,9
2,5	0,026	96,3
3	0,031	116,5
3,5	0,036	138,5
4	0,041	161,3
LOD	0,002	
LOQ	0,006	



Obrázek 32. Kalibrační závislost bis-DABIZ

Největší zastoupení nečistoty bis-DABIZ bylo ve vzorku 4 a nejméně ve vzorku 0 (tabulka 11).

Tabulka 11. Kvantitativní stanovení bis-DABIZu v DMSO

Vzorek	Navážka [mg]	Dávkování [μl]	Plocha	Koncentrace [mg/ml]	Hm. %
Vzorek 0	10,0	5	33,1	0,0095	0,4
Vzorek 1	5,5	2	19,4	0,0065	1,2
Vzorek 2	4,9	2	45,2	0,0129	2,6
Vzorek 3	4,7	2	118,3	0,0311	6,6
Vzorek 4	3,1	1,5	139,9	0,0365	8,8
Vzorek 5	5,0	5	61,4	0,0169	1,4

V tabulce č. 12 jsou uvedené souhrnné výsledky HPLC kvantifikace DABIZ a bis-DABIZ. Z výsledků vyplývá, že vzorky obsahují ještě další nečistoty. Pomocí HPLC/MS analýz uvedených v kapitole 4.6. byly zjištěny molekulové hmotnosti těchto nečistot a u některých navržena možná struktura.

Tabulka 12. Stanovení DABIZ a bis-DABIZ pomocí HPLC

Vzorek	HPLC DABIZ hm. %	Bis- DABIZ ve vzorku [%]	Σ DABIZ + bis-DABIZ
Vzorek 0	98,1	0,4	98,5
Vzorek 1	89,8	1,2	91,0
Vzorek 2	83,6	2,6	86,2
Vzorek 3	87,8	6,6	94,4
Vzorek 4	88,8	8,8	97,6
Vzorek 5	75,0	1,4	76,4

4.5. Gravimetrické stanovení bis-DABIZ

Vedle stanovení bis-DABIZu v jednotlivých vzorcích pomocí HPLC byla použita i gravimetrická metoda popsaná v kapitole 3.5.4. experimentální části. Tato metoda vychází z poznatku, že bis-DABIZ je nerozpustný v ledové kyselině octové a po odfiltrování a promytí nerozpustného podílu je možné jej gravimetricky stanovit.

Výsledky této metody jsou uvedeny v tabulce 13. Bylo zjištěno, že nejvíce bis-DABIZ obsahuje vzorek 3 (14,6 %), nejčistější ze všech vzorků je vzorek 1 (1,5 %).

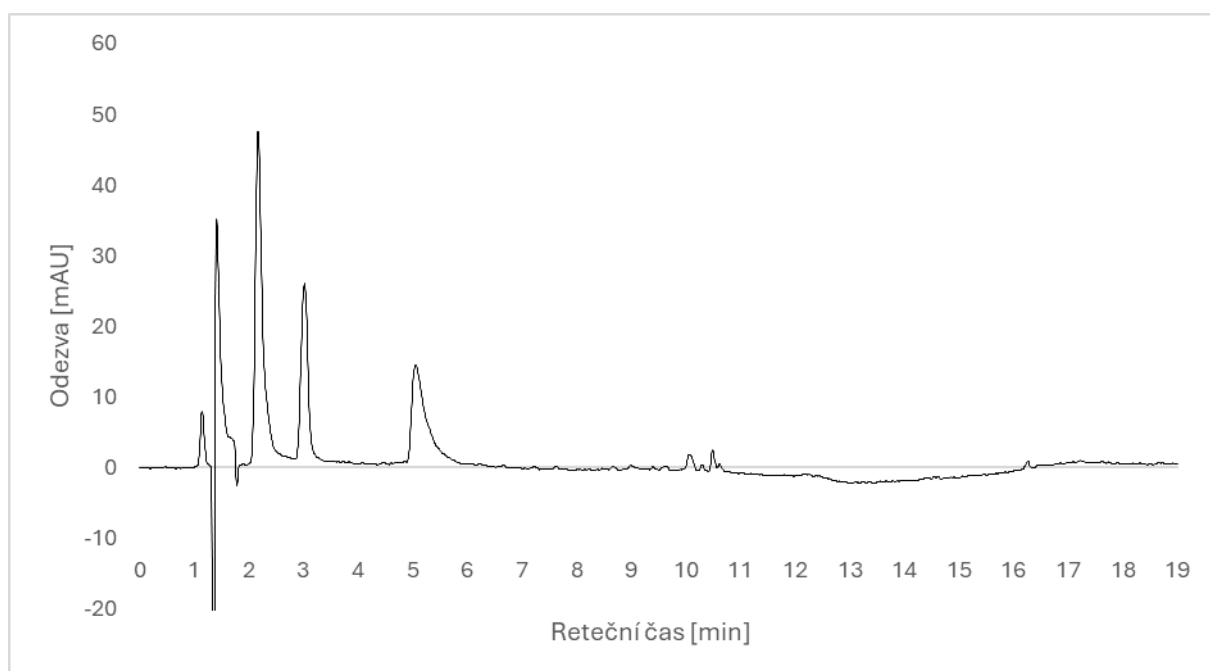
Tabulka 13. Stanovení DABIZ a bis-DABIZ pomocí gravimetrie a HPLC

Vzorek	HPLC DABIZ hm. %	Bis- DABIZ ve vzorku [%]	Σ DABIZ + bis-DABIZ
Vzorek 1	89,8	1,5	91,3
Vzorek 2	83,6	11,3	94,9
Vzorek 3	87,8	14,6	102,4
Vzorek 4	88,8	7,3	96,1
Vzorek 5	75,0	5,5	80,5

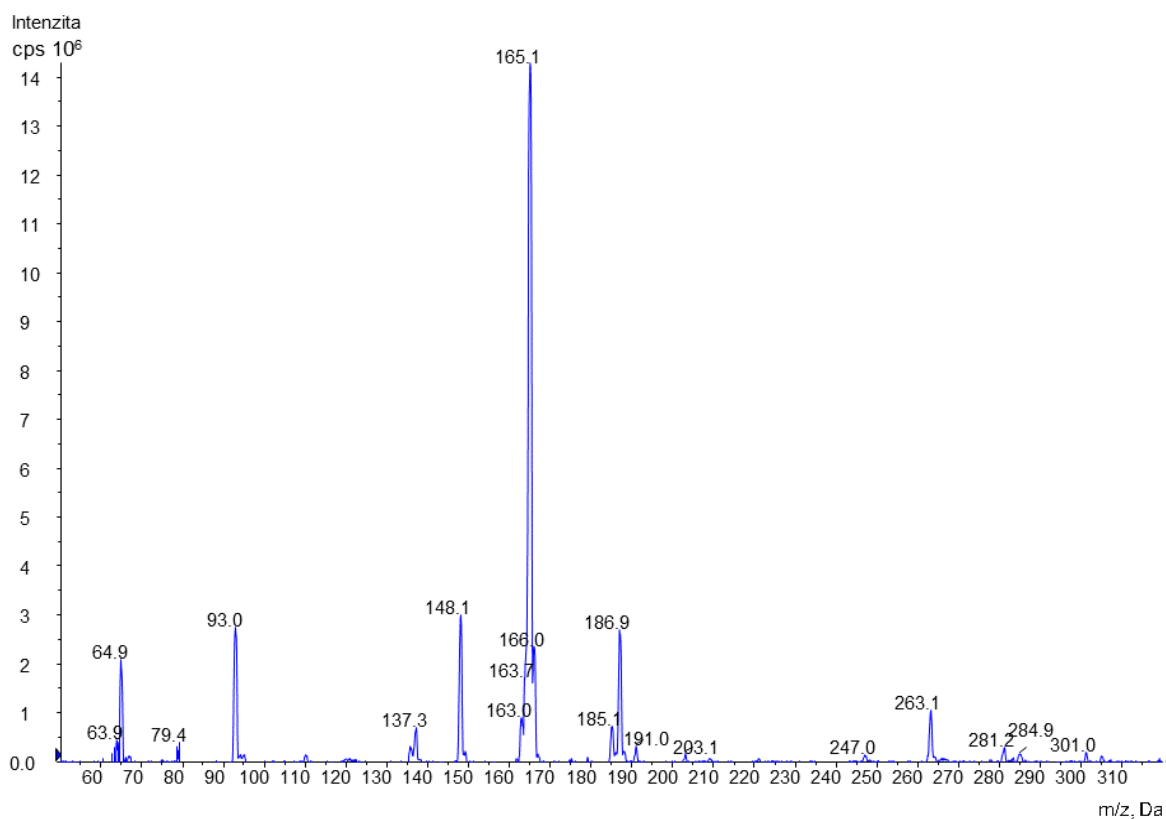
Při porovnání kvantifikace bis-DABIZ pomocí HPLC a gravimetrické metody je shoda u vzorků 1 a 4, zatímco výsledky gravimetrického stanovení u ostatních vzorků jsou ve srovnání s HPLC metodou vyšší. Tento nesoulad může být způsoben mimo jiné i tím, že při srážení kyselinou octovou se vedle bis-DABIZu vysrážejí i ostatní nečistoty, což vede k falešně pozitivním výsledkům a nadhodnocení obsahu bis-DABIZu v takovýchto vzorcích.

4.6. HPLC/MS identifikace nečistot ve vzorcích DABIZ

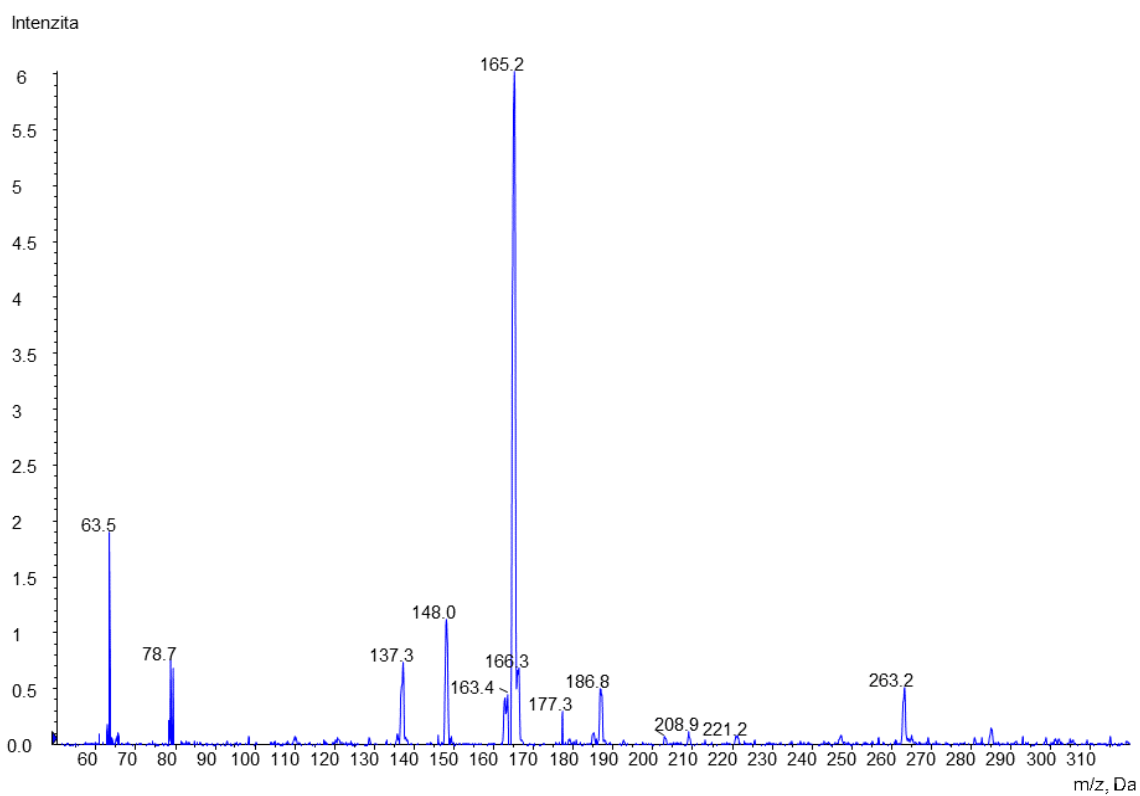
V kapitole 4.4.2. bylo konstatováno, že vedle hlavní složky DABIZ a potenciální známé nečistoty bis-DABIZ vzorky obsahují ještě další nečistoty v závislosti na konkrétním vzorku. Ze všech studovaných vzorků vykazoval nejvíce nečistot zjištěných pomocí HPLC/UV analýzy vzorek č. 5 (viz obr. 33). Proto tento vzorek byl analyzován s využitím hmotnostní detekce s kvadrupólovým analyzátozem. Z důvodu špatné ionizovatelnosti za optimalizovaných HPLC podmínek (eluze gradientem AcN/voda) bylo nutné do vodné složky mobilní fáze pro gradientovou eluci přidat octan amonný v koncentraci 1 mM. Za těchto podmínek byla ionizovatelnost analytů již dostatečná a bylo možno získat hmotnostní spektra jednotlivých píků. Na obrázku 33 je záznam HPLC analýzy vzorku 5 při vlnové délce detekce 254 nm. Na záznamu je pík hlavní složky DABIZ při $t_R \approx 2.1$ min a dalších látek s retenčními časy 3, 5.1, 10.1 a 10.5 min (podle tabulky 9). Odpovídající hmotnostní spektra pro jednotlivé píky jsou na obrázcích č. 34, 35, 37, 40 a 41.



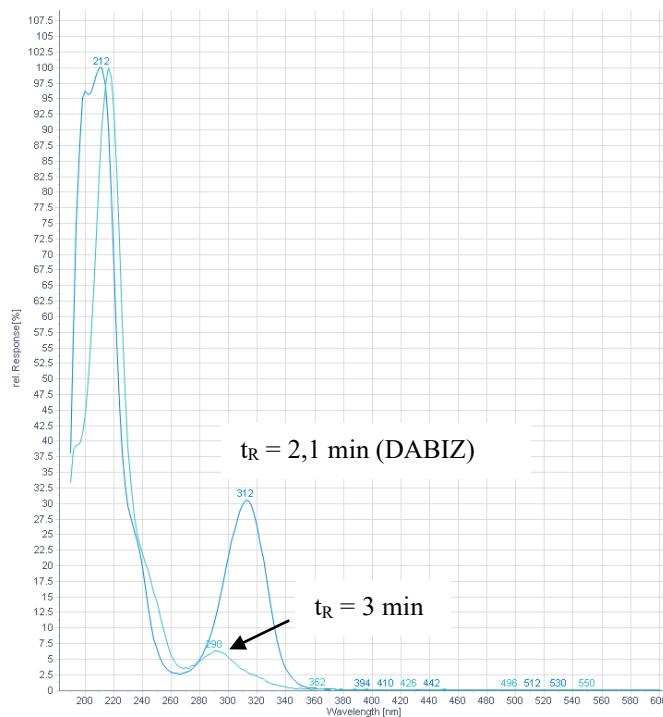
Obrázek 33. Chromatogram vzorku 5 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, detekce UV 254 nm, další podmínky viz obr. 29



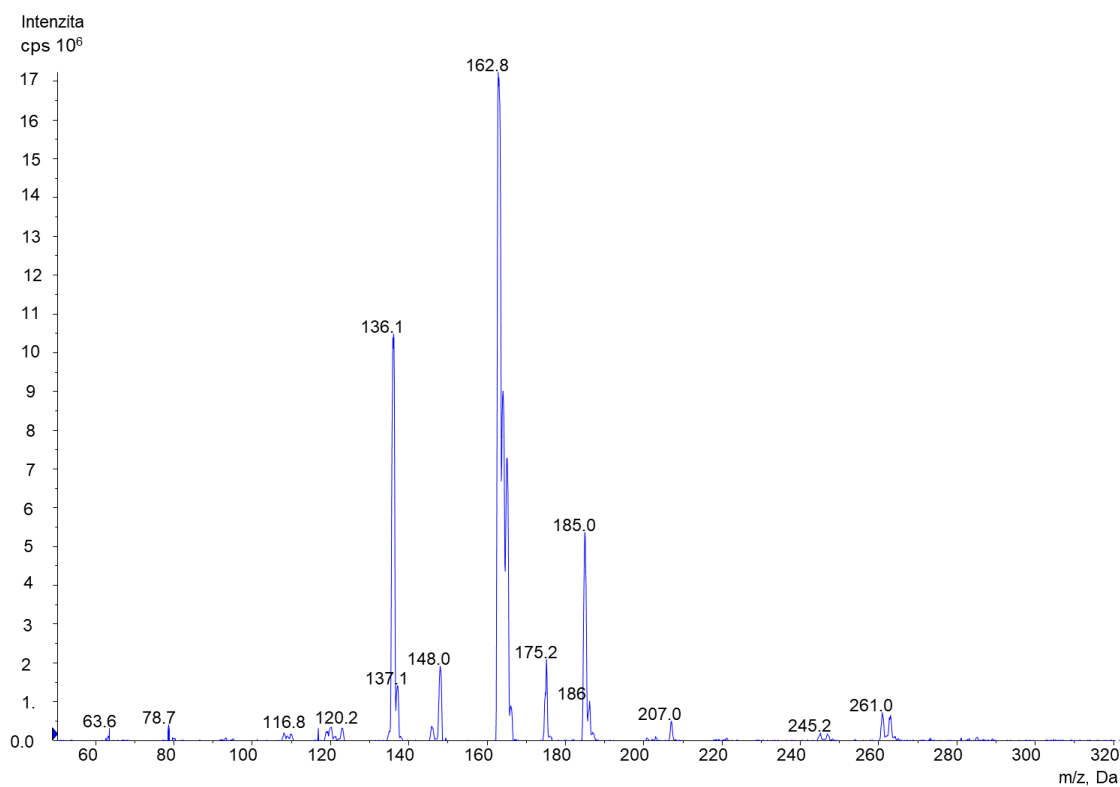
Obrázek 34. Hmotnostní spektrum píku $t_R \approx 2,1$ min (DABIZ), HPLC/MS podmínky viz kap. 3.2.3.



Obrázek 35. MS spektrum píku $t_R \approx 3$ min, HPLC/MS podmínky viz kap. 3.2.3.

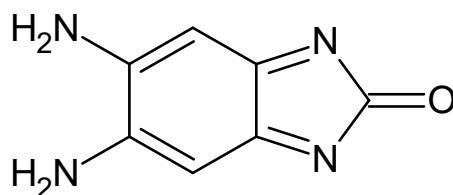


Obrázek 36. HPLC/VIS spektrum píkú $t_R \approx 2.1$ a 3 min, UV detekce při 254 nm, HPLC podmínky viz obr. 29

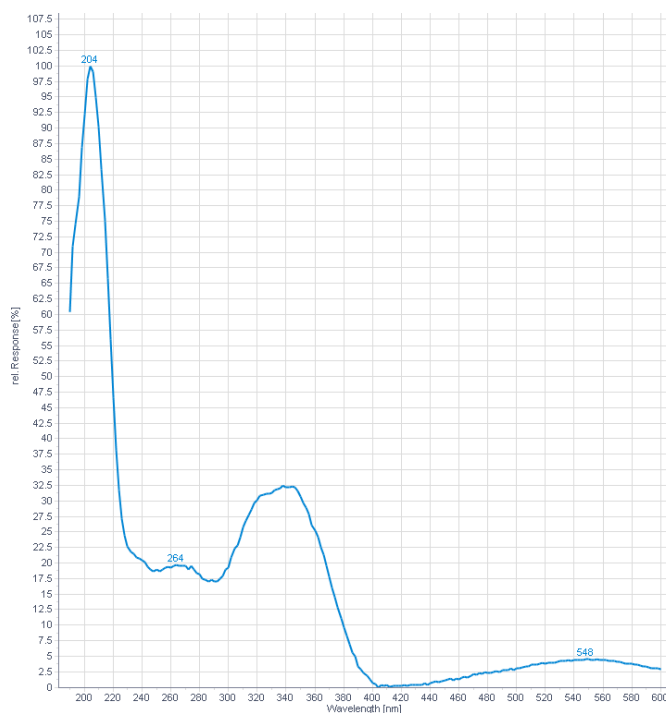


Obrázek 37. MS spektrum píkú $t_R \approx 5.1$ min, HPLC/MS podmínky viz kap. 3.2.3.

Ve hmotnostním spektru píku s $t_R \approx 2,1$ min (obr. 34) při záznamu kladných iontů je vidět protonovaný molekulový ion $[M+H]^+ = 165$, což odpovídá výchozí látce DABIZ. Stejný molekulový ion byl nalezen i v hmotnostním spektru píku s $t_R \approx 3$ min (obr. 35). Odpovídající UV spektra obou píků jsou na obrázku 36. Vzhledem k rozdílnosti v UV spekter a stejné molekulové hmotnosti se nejspíše jedná v případě látky s $t_R \approx 3$ min o polohový izomer DABIZu. Ve hmotnostním spektru nečistoty s $t_R \approx 5,1$ min (obr. 37) je vidět dominantní pík při $m/z = 165$, což odpovídá látce s molekulovou hmotností 164 a sudým počtem dusíků. Možná struktura této látky, která by korelovala s DABIZ, je na obrázku 38. Odpovídající UV spektrum tohoto píku je na obr. 39.

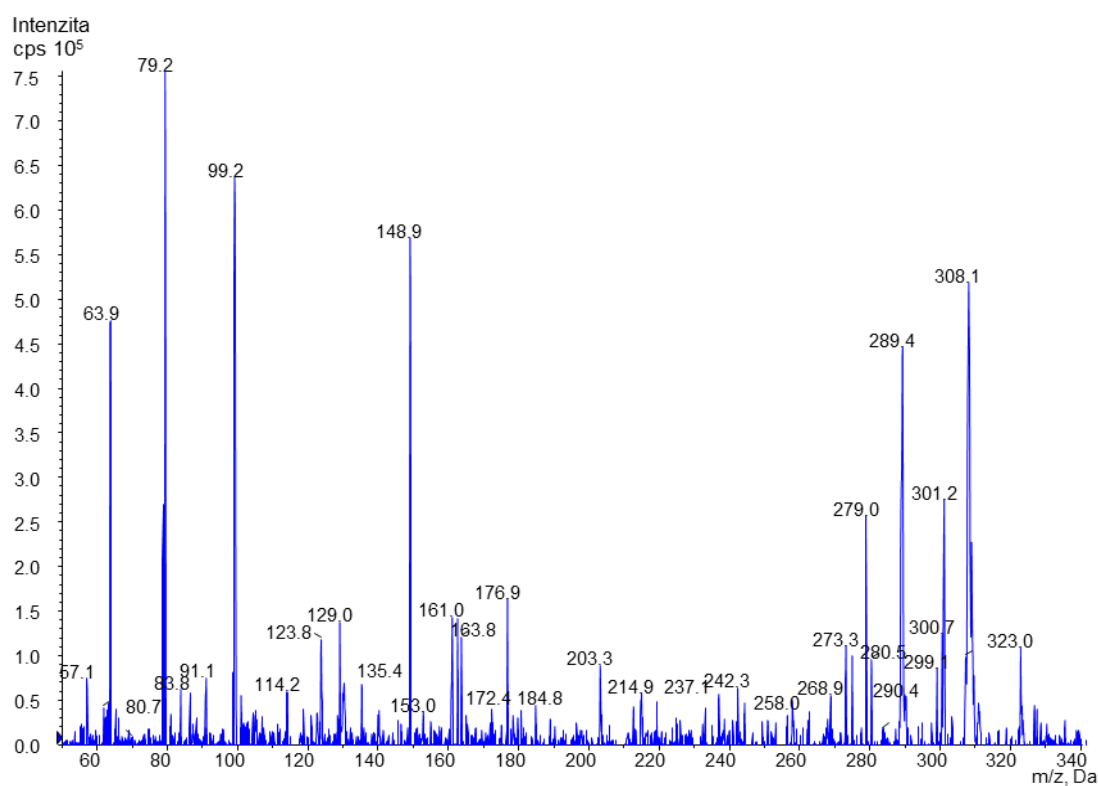


Obrázek 38. Návrh struktury látky při $t_R \approx 5,1$ min

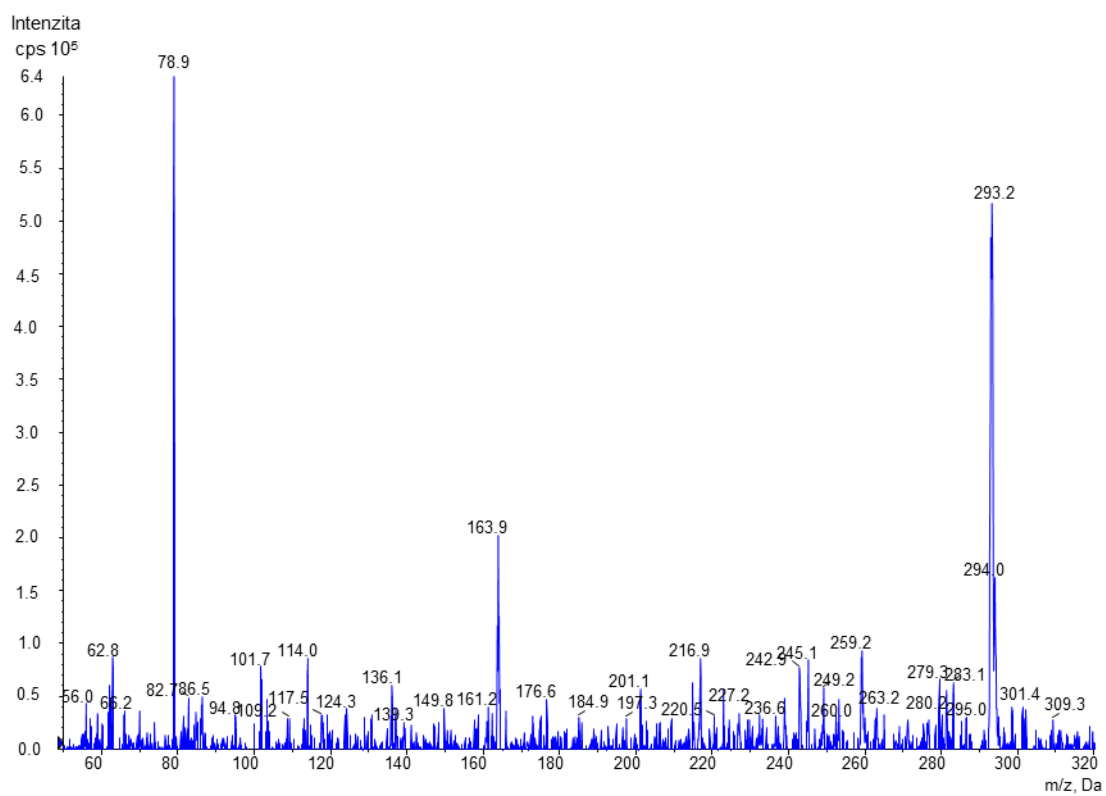


Obrázek 39. HPLC/VIS spektrum látky s $t_R \approx 5.1$ min, UV detekce při 254 nm, HPLC podmínky viz obr. 29

Ve hmotnostním spektru nečistoty s t_R 10,1 min (obr. 40) je vidět ion s $[M+H]^+ = 308$, což odpovídá výchozí látce s lichým počtem dusíků. Vzhledem k velice nízkému obsahu této nečistoty v analyzovaném vzorku je i hmotnostní spektrum značně zašuměné a nelze z něj vyvodit žádné závěry týkající se možné struktury. Na obrázku 41 (MS bis-DABIZ) je vidět molekulový ion $[M+H]^+ = 293$, což odpovídá molekulové hmotnosti $M = 292$ látky bis-DABIZ. Vedle potvrzení pomocí hmotnostní spektrometrie byla konformita tohoto píku a bis-DABIZu potvrzena i 1H -NMR spektrometrií realizovanou na externím pracovišti.



Obrázek 40. MS spektrum píku $t_R \approx 10.1$ min, HPLC/MS podmínky viz kap. 3.2.3.



Obrázek 41. MS spektrum bis-DABIZ s $t_R \approx 10.5$ min, HPLC/MS podmínky viz kap. 3.2.3.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo, mimo řešení na téma 5,6-diamino-1,3-dihydro-2*H*-benzoimidazol-2-onu (DABIZ), tuto látku také analyzovat a kvantifikovat. K dispozici bylo 6 vzorků poskytnutých společností Synthesia, a.s., které byly porovnávány mezi sebou. Na základě UV/VIS spekter změřených v různých typech rozpouštědel bylo zjištěno, že v rozpouštědlech se silnými acidobazickými vlastnostmi dochází k výrazným barevným změnám takto připravených roztoků. Pro další měření byly jako rozpouštědla zvoleny methanol (stanovení hlavní složky DABIZ) a DMSO (stanovení vybrané nečistoty).

DABIZ byl kvantifikován pomocí optimalizované HPLC metody. Za nejvíce čistý technický vzorek lze považovat vzorek č. 0 a nejvíce nečistot bylo zjištěno ve vzorku č. 5.

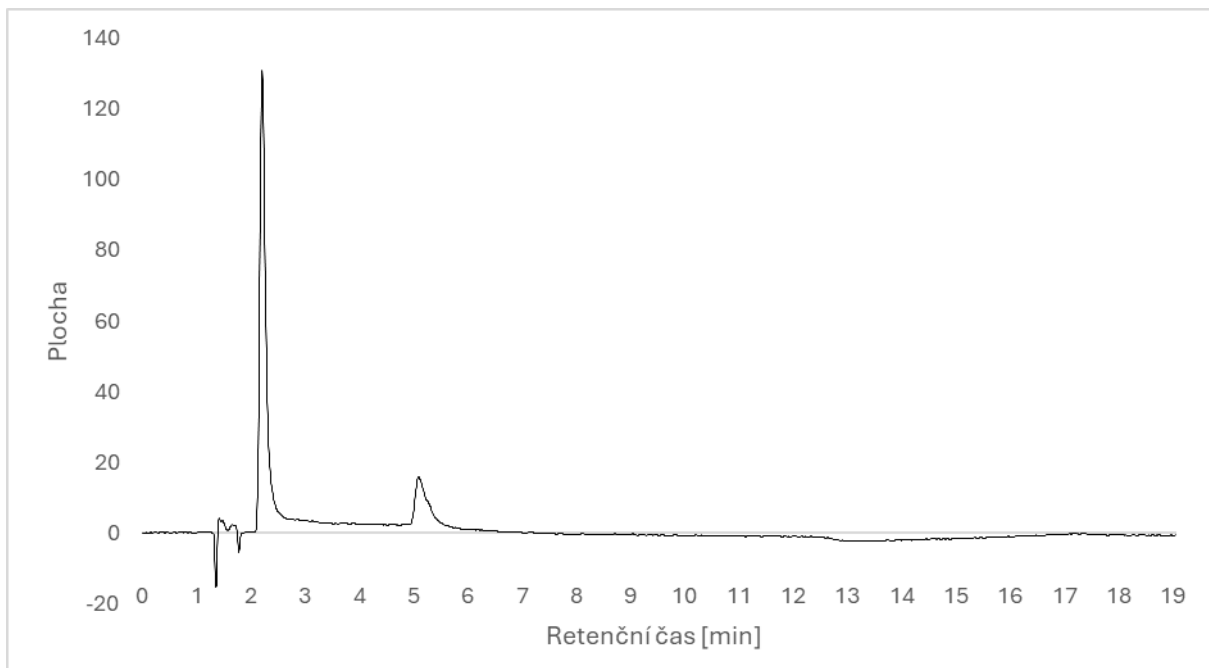
Kromě hlavní komponenty DABIZ byla ve vzorcích pozitivně identifikována a kvantifikována jako nečistota látka 7,9-dihydrodiimidazo[4,5-*b*:4',5'-*i*]fenazin-2,8(1*H*,3*H*)-dion (bis-DABIZ) vznikající s největší pravděpodobností kondenzací dvou molekul DABIZu. Návrh této struktury vychází z HPLC/MS analýzy a z NMR spektra této nečistoty. Bis-DABIZ byl takto identifikován a stanoven ve všech vzorcích. Vedle bis-DABIZu se vyskytovaly ve vzorcích i další nečistoty, které byly analyzovány pomocí HPLC/MS a v některých případech byla navržena i jejich možná struktura.

POUŽITÁ LITERATURA

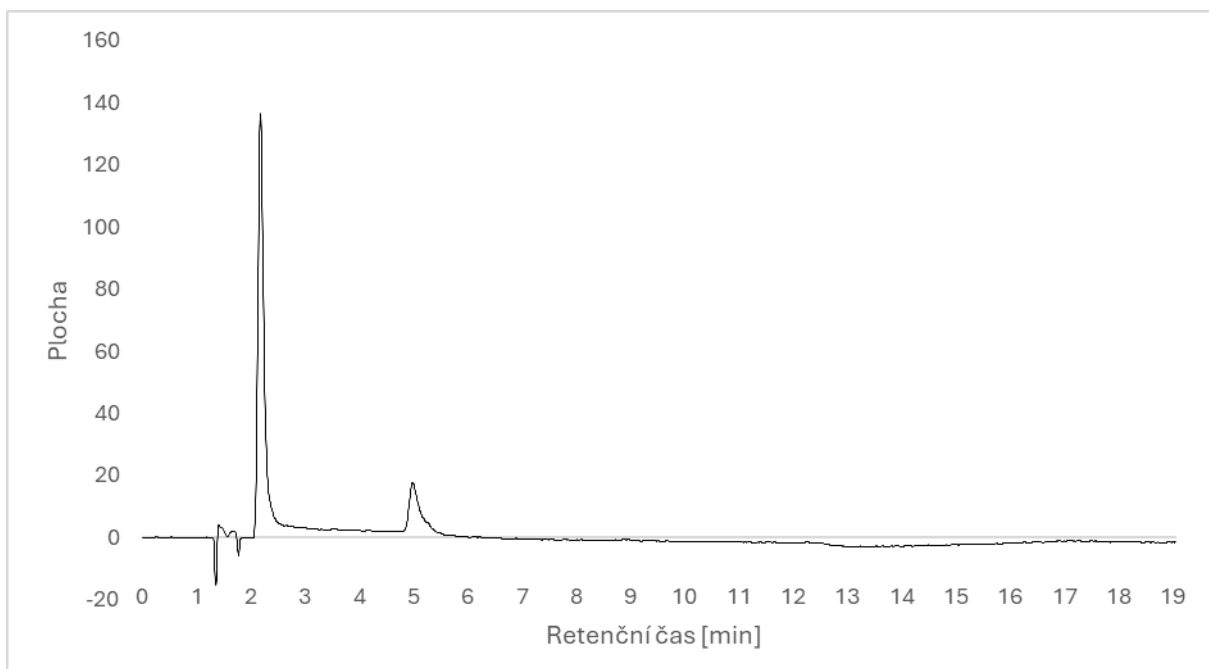
- [1] Synthesia - Chemie pro budoucnost [online], Synthesia a.s. ©2011. <https://www.synthesia.eu/cze> (accessed February 17, 2024).
- [2] M. Eagleson, Benzilic acid rearrangement to Benzoylation, in: Concise Encyclopedia Chemistry, De Gruyter, 1993: p. 121. https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpCEC0000B/cid:kt00TYDU7C/viewerType:khtml//root_slug:concise-encyclopedia/url_slug:benzilic-acid-rearrangement?b-content-type=encyclopedia&b-q=Benzimidazoles&include_synonyms=no&sort_on=default&view=collapsed&zoom=1&page=9&q=Benzimidazoles (accessed November 4, 2023).
- [3] P.J. Wanjari, N. Saha, G. Dubey, P.V. Bharatam, Metal-free methods for the generation of benzimidazoles and 2-aminobenzimidazoles, *Tetrahedron* 130 (2023) 133143. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2022.133143>.
- [4] W. Herbst, K. Hunger, *Industrial Organic Pigments: production, crystal structures, properties, applications*. Fourth, completely revised edition., Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2018.
- [5] 5,6-Diamino-1,3-dihydro-2H-benzoimidazol-2-one [online], Molbase ©2013-2022. <https://www.molbase.com/moldata/347347.html> (accessed November 18, 2023).
- [6] 5,6-Diamino-1H-benzimidazol-2-ol. https://www.chemsrc.com/en/cas/55621-49-3_583857.html (accessed February 17, 2024).
- [7] 5,6-Diamino-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one [online], Merck KGaA ©2024. <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/cbr00196> (accessed February 17, 2024).
- [8] Yang C., Li Z., Zhang N., Liu G., Preparation method for 5,6-diaminobenzimidazolone-2, CN102584713A, 2012. <https://patents.google.com/patent/CN102584713A/en?q=CN102584713A> (accessed March 18, 2024).
- [9] Z. Yang, J. Wang, L. Li, C. Ye, H. Liu, Synthesis and characteristic of 5,6-dinitro and 5,6-diaminobenzimidazolone-2, *Journal of Heterocyclic Chemistry* 46 (2009) 788–790. <https://doi.org/10.1002/jhet.104>.
- [10] X. Zhang, X. Wang, J. Wu, X. Meng, X. Mu, B. Zong, X. Shu, Supported catalyst and preparation method and application of supported catalyst and method for preparing 5,6-diamino benzimidazolone, CN104549243B, 2017. <https://patents.google.com/patent/CN104549243B/en> (accessed March 7, 2024).
- [11] G. Haiyan, Z. Tao, S. Liu, Research on the synthesis process of 5,6-diaminobenzimidazolones, *Chemical Production and Technology* (2010) 38-39,55. <https://doi.org/10.3969/j>.
- [12] T. Kaseyama, K. Odaka, H. Kato, T. Isaji, Battery material and electrode material, WO2020171074A1, 2020. <https://patents.google.com/patent/WO2020171074A1/en> (accessed March 7, 2024).
- [13] E. Contreras, Water-based resin with elasticity for applications in cementing and subterranean structures, US20220017811A1, 2022. <https://patents.google.com/patent/US20220017811A1/en> (accessed March 7, 2024).
- [14] J.H. Kamps, E. Kung, J.-P. Lens, Poly(carbonate-co-urea) copolymers and melt transesterification method of preparing these copolymers, US20080275206A1, 2008. <https://patents.google.com/patent/US20080275206A1/en> (accessed March 7, 2024).
- [15] K. Hiro, H. Kameya, Coumarin compound or salt thereof, and pigment composition containing the same, JP2018172619A, 2018. <https://patents.google.com/patent/JP2018172619A/en> (accessed March 7, 2024).

- [16] H. Bohler, R. Griesser, ORGANIC COMPOUNDS, DE2523175A1, 1975. <https://patents.google.com/patent/DE2523175A1/en> (accessed March 7, 2024).
- [17] X. Liu, H. Tang, A kind of Novel bisazo methine nickel complexing solvent dyestuff containing benzimidazolone ring and its preparation method and application, CN103436047B, 2015. <https://patents.google.com/patent/CN103436047B/en> (accessed March 7, 2024).
- [18] O. Fuchs, A. Kroh, T. Papenfuhs, Perinon compounds, the process for their manufacture and their use as colorant, DE2451049A1, 1976. <https://patents.google.com/patent/DE2451049A1/en> (accessed March 7, 2024).
- [19] H. Wang, X. Liu, L. Tan, Binding properties of a molecular “light switch” ruthenium(II) polypyridyl complex toward double- and triple-helical forms of RNA, *International Journal of Biological Macromolecules* 242 (2023) 124710. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124710>.
- [20] S. Dincer, Diazotisation of 5,6-diamino-1H-benzimidazole, *Heterocyclic Communications* 10 (2004) 193–196. <https://doi.org/10.1515/HC.2004.10.2-3.193>.
- [21] K. Štulík, *Analytické separační metody*, Praha: Karolinum, 2004, ISBN 80-246-0852-9.
- [22] High Performance Liquid Chromatography, in: *Analytical Techniques in the Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, 2000: pp. 141–158. <https://doi.org/10.1002/9780470511282.ch9>.
- [23] L. Nováková, M. Douša, P. Česla, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II-přepracované a rozšířené vydání*, Praha: Česká chromatografická škola, 2021, ISBN 978-80-270-8560-6.
- [24] J. Churáček, *Analytická separace látek*, Praha: Státní nakladatelství techniky literatury, 1990, ISBN 80-03-00569-8.
- [25] L. Nováková, M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, Hradec Králové: Nováková Lucie, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3.
- [26] HPLC principle and questions [online], Natural Raw Materials Supplier and Herbal Extract Manufacturer (2020). <https://luckherb.com/news/high-performance-liquid-chromatography-principle-and-questions/> (accessed March 20, 2024).
- [27] DETEKTORY pro kapalinovou chromatografii [online]. DocPlayer ©2024. <https://docplayer.cz/132024944-Detektory-pro-kapalinovou-chromatografii-izolacni-a-separacni-metody-2018.html> (accessed March 20, 2024).
- [28] HPLC Fluorescence Detector HPLC FLD [online] SCION Instruments ©2024. <https://scioninstruments.com/us/blog/hplc-fluorescence-detector/> (accessed March 20, 2024).
- [29] Superior HPLC analysis, 1260 Infinity II LC System [online], Agilent ©2024. <https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography/hplc-systems/analytical-hplc-systems/1260-infinity-ii-lc-system> (accessed April 1, 2024).
- [30] Detektory pro analytický systém Agilent 1260 Infinity II [online], Altium International s.r.o. ©1999-2023. <https://hpst.cz/kapalinova-chromatografie/agilent-1260-infinity-ii/detektory-pro-analytický-system-agilent-1260> (accessed April 1, 2024).
- [31] SPECORD PLUS – UV/Vis Spectrophotometer [online], Analytik Jena GmbH+Co. KG ©2024. <https://www.analytik-jena.com/products/chemical-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis/specord-plus-series/> (accessed April 1, 2024).

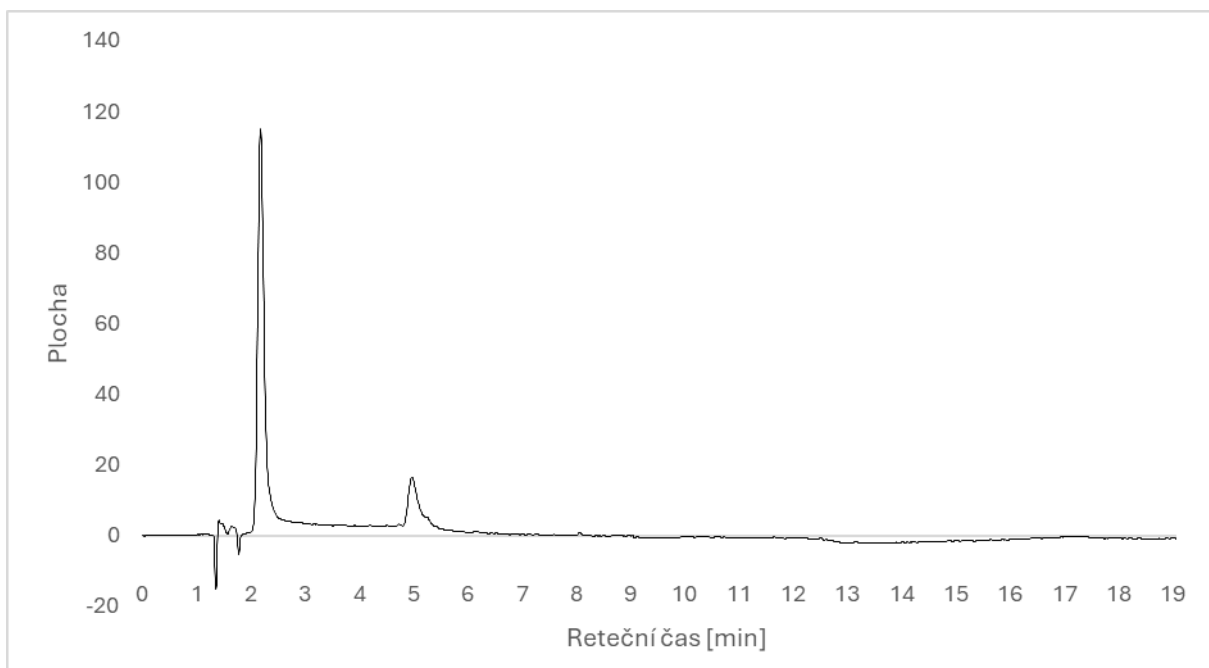
PŘÍLOHY



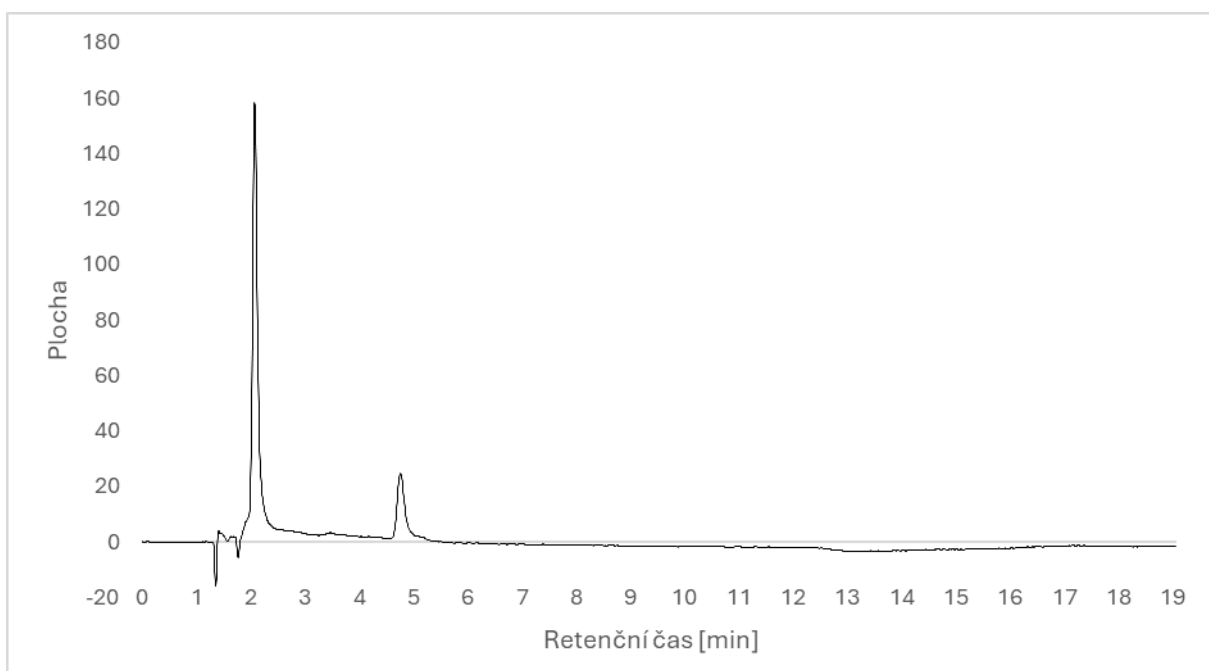
Obrázek 42. Chromatogram vzorku 0 v MeOH s mobilní fází AcN/voda, navážka 7 mg/100 ml, kolona Poroshell 120 EC-C18, 2.7 mm, 3.0 x 150 mm – Agilent – USA, gradientová eluce viz tab. 7, nástřik 2 μ l, průtok 0.5 ml/min, detekce UV 320 nm, teplota 30 °C



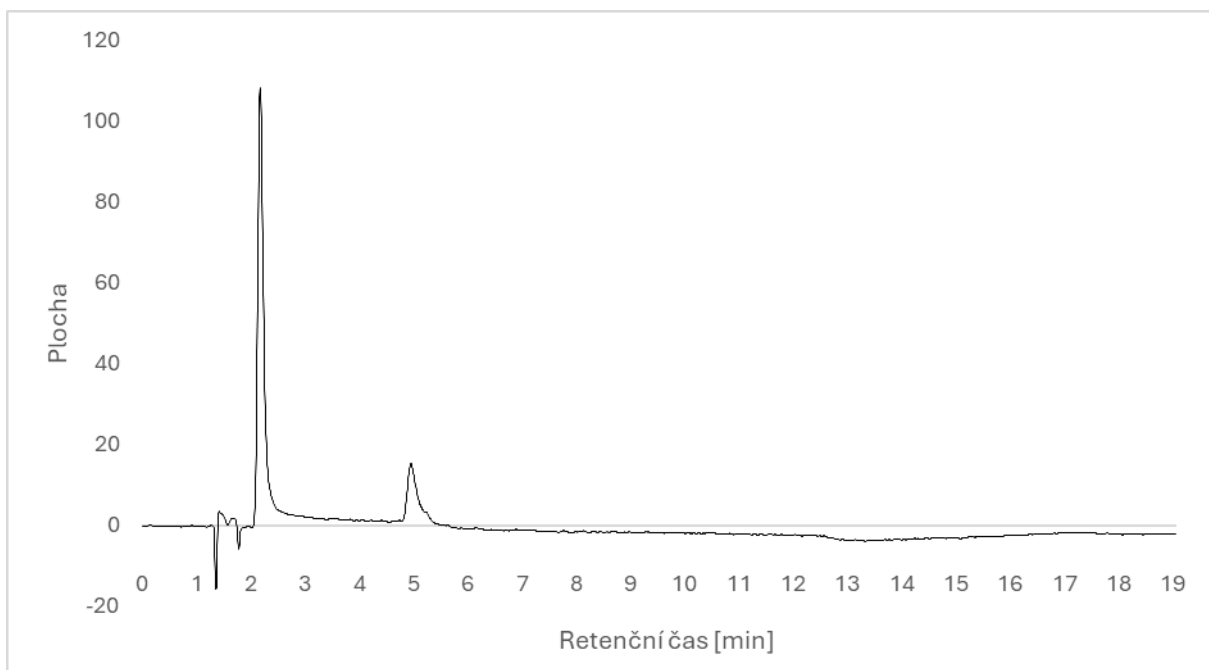
Obrázek 43. Chromatogram vzorku 1 v MeOH, navážka 20 mg/100 ml, UV detekce 320 nm, další podmínky viz obr. 42



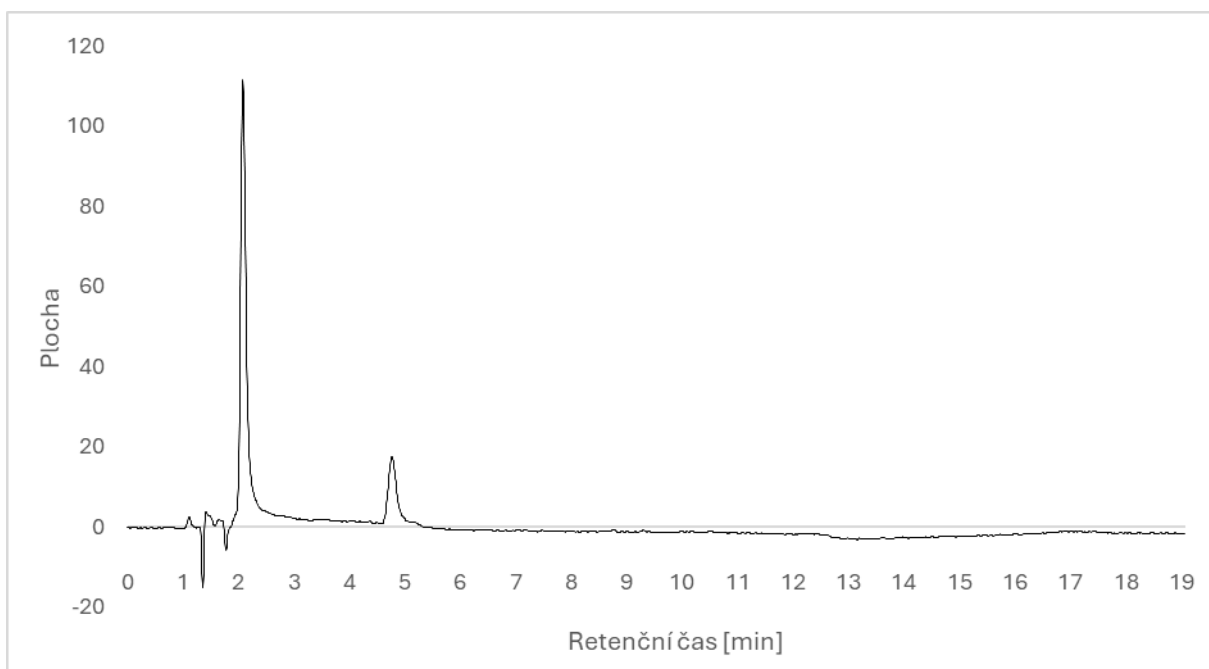
Obrázek 44. Chromatogram vzorku 2 v MeOH, navážka 20 mg/100 ml, UV detekce 320 nm, další podmínky viz obr. 42



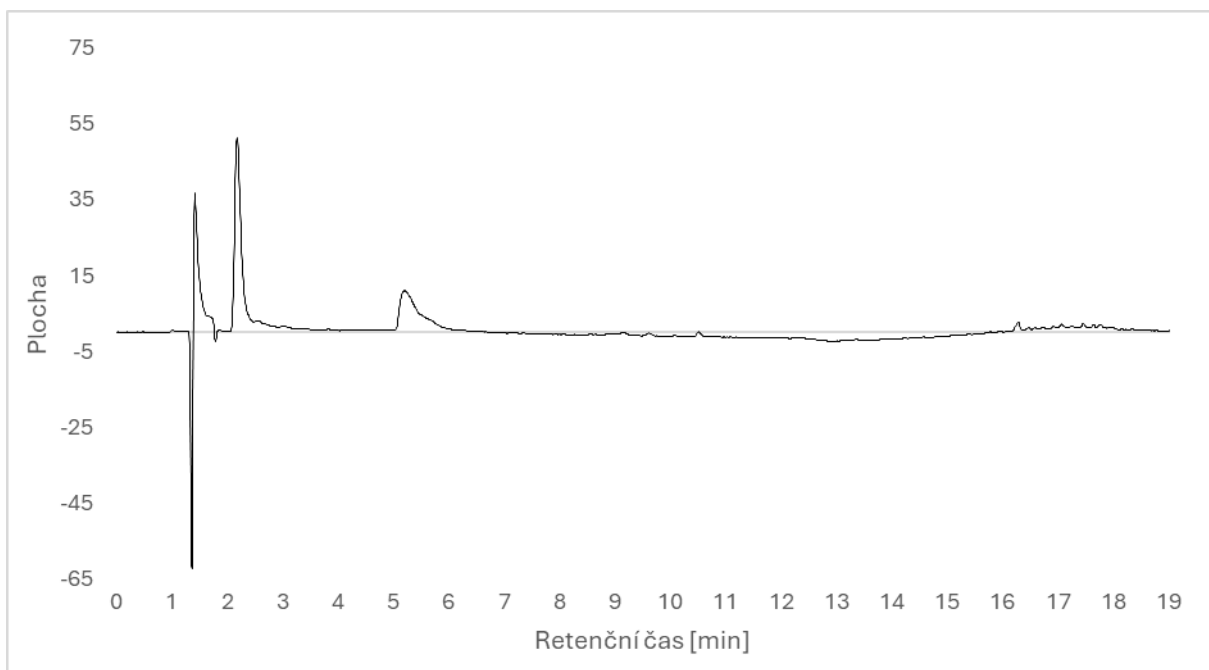
Obrázek 45. Chromatogram vzorku 3 v MeOH, navážka 20 mg/100 ml, UV detekce 320 nm, další podmínky viz obr. 42



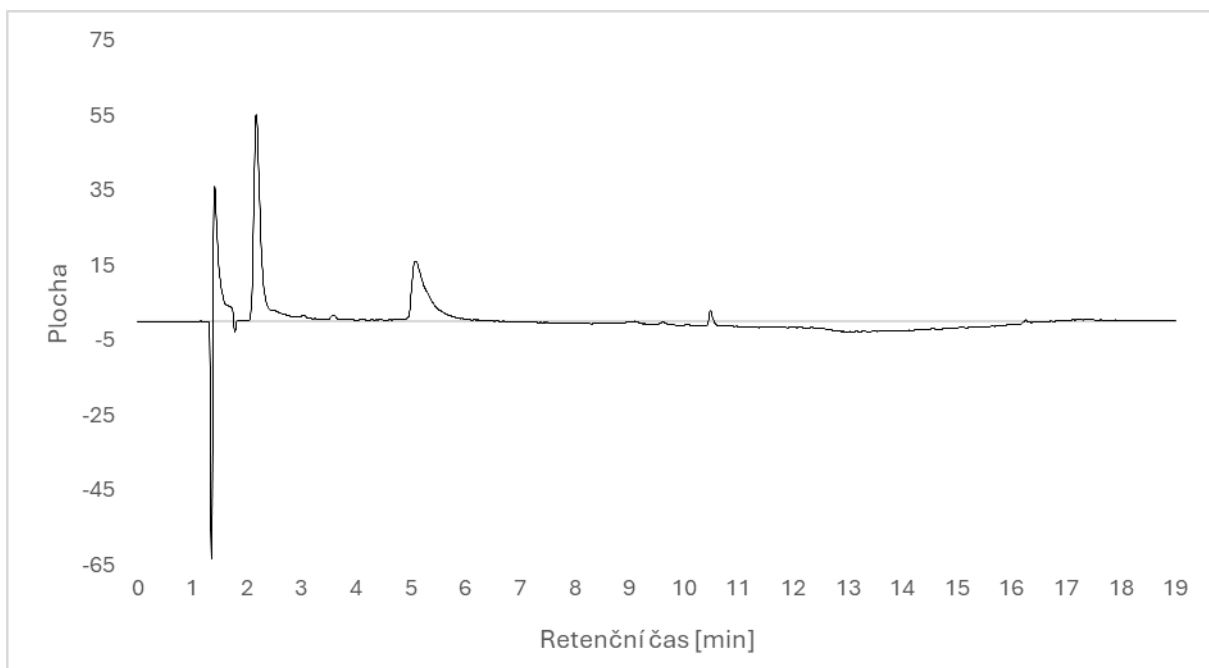
Obrázek 46. Chromatogram vzorku 4 v MeOH, navážka 7 mg/100 ml, UV detekce 320 nm, další podmínky viz obr. 42



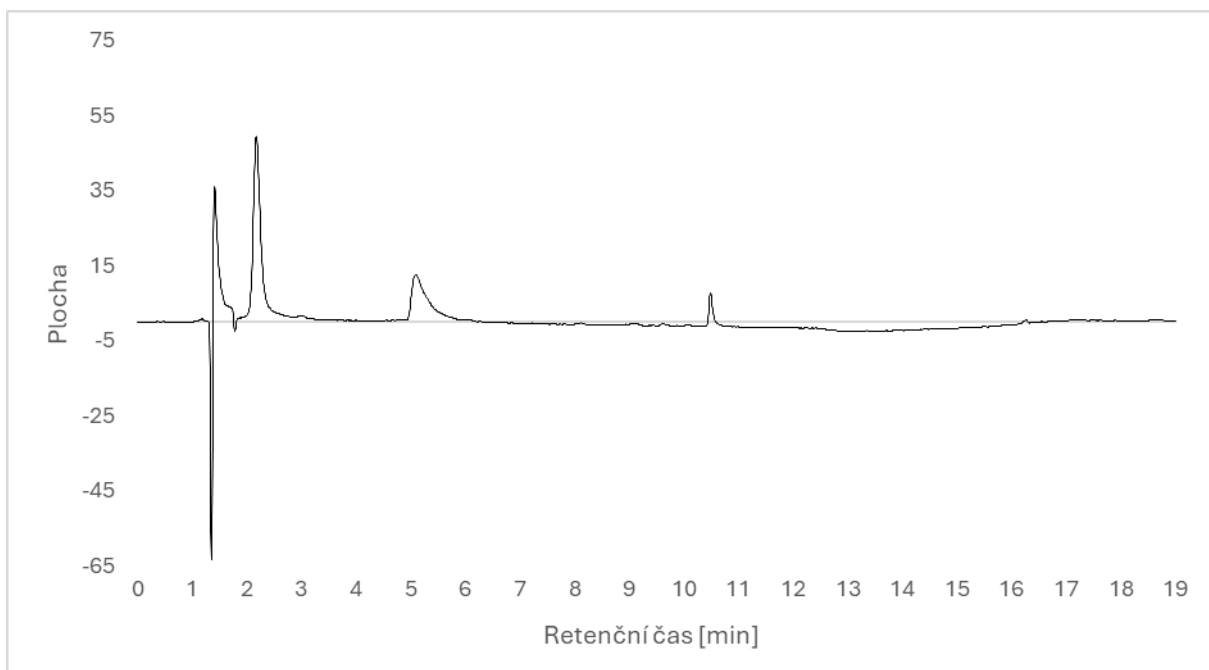
Obrázek 47. Chromatogram vzorku 5 v MeOH, navážka 20 mg/100 ml, UV detekce 320 nm, další podmínky viz obr. 42



Obrázek 48. Chromatogram vzorku 0 v DMSO, navážka 10 mg/10 ml, UV detekce při 254 nm, další podmínky viz obr. 42



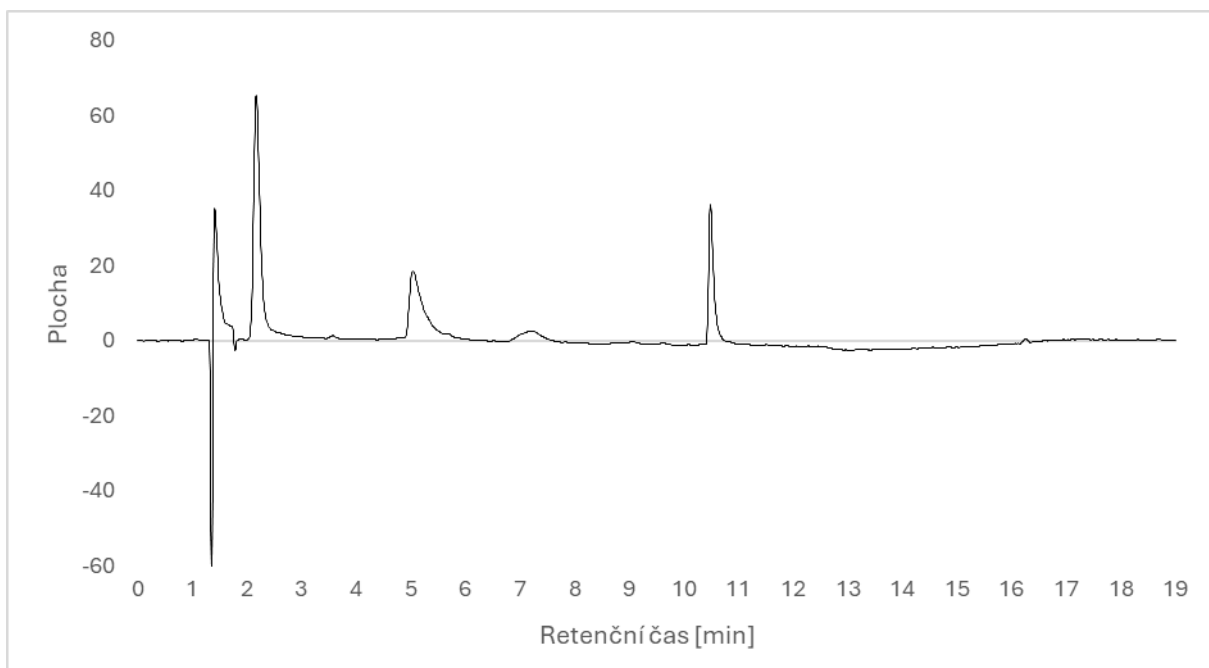
Obrázek 49. Chromatogram vzorku 1 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce při 254 nm, další podmínky viz obr. 42



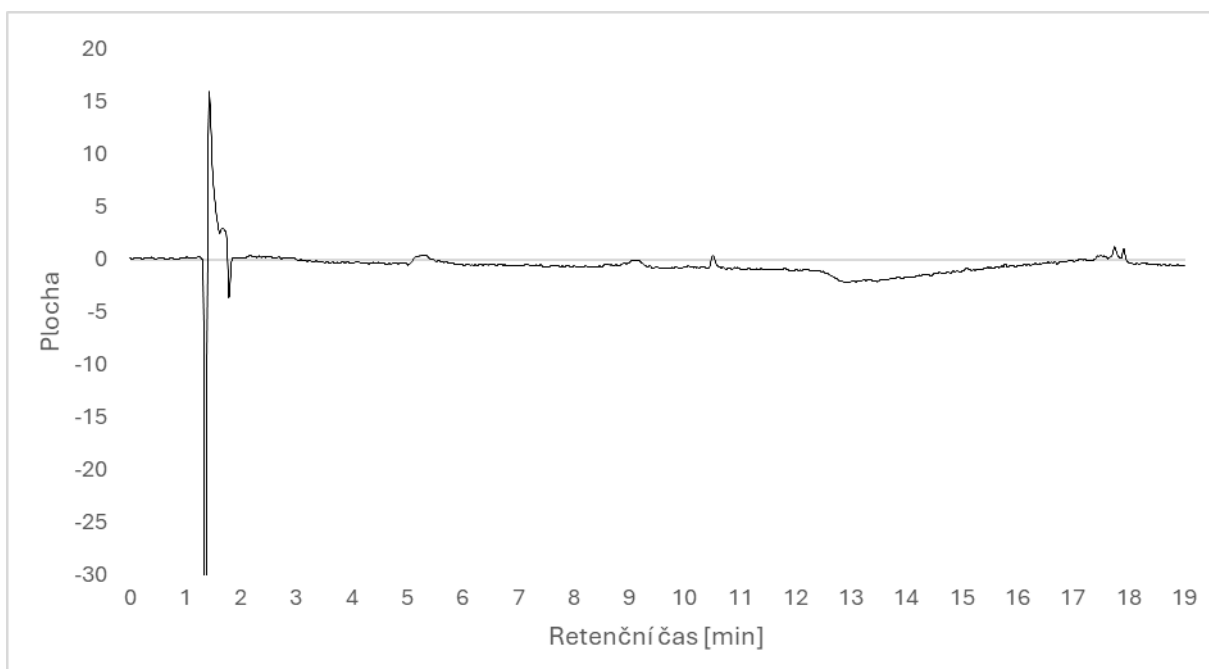
Obrázek 50. Chromatogram vzorku 2 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce při 254 nm, další podmínky viz obr. 42



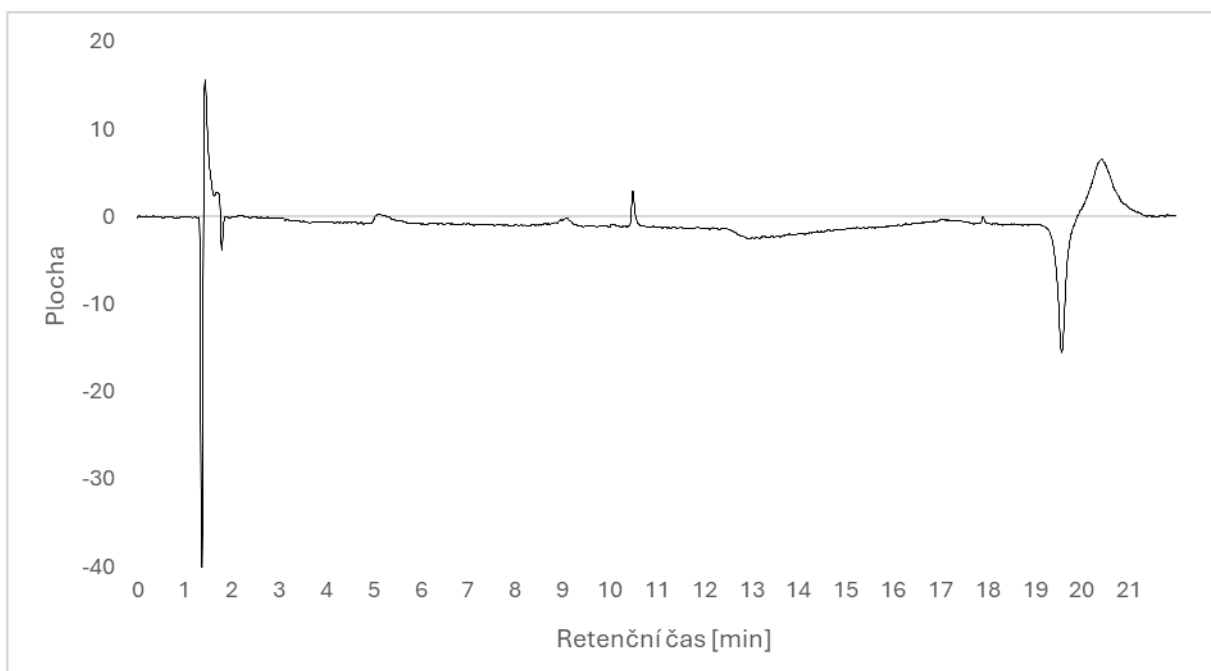
Obrázek 51. Chromatogram vzorku 3 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce při 254 nm, další podmínky viz obr. 42



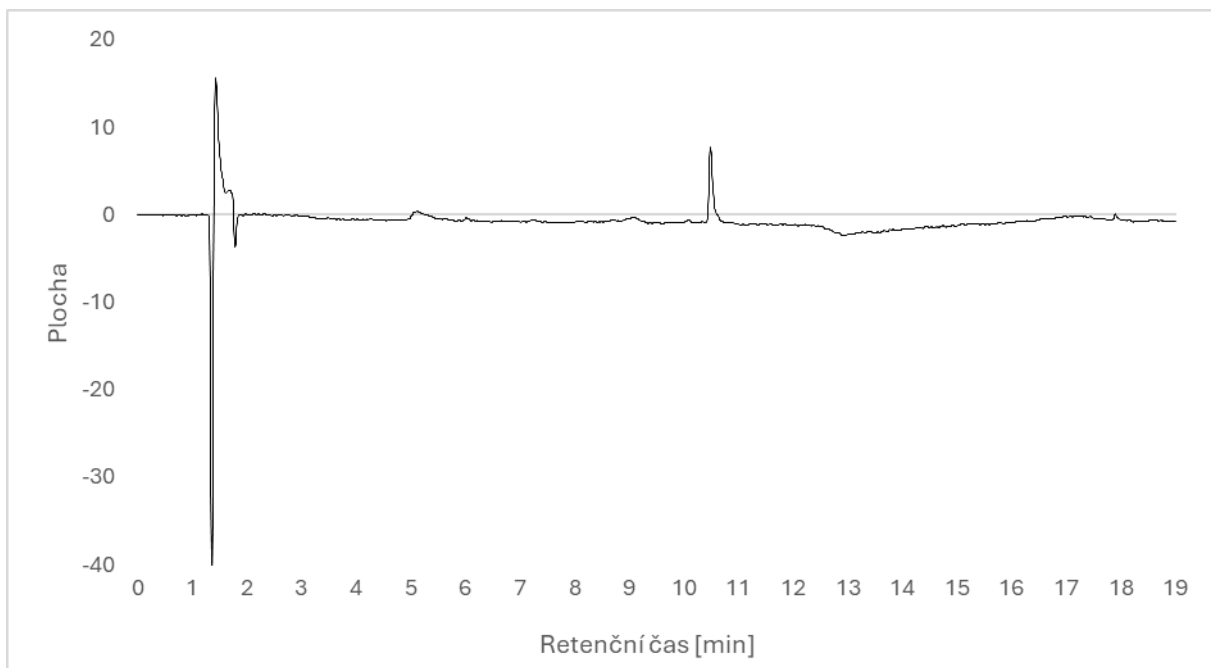
Obrázek 52. Chromatogram vzorku 4 v DMSO, navážka 3 mg/10 ml, UV detekce při 254 nm, další podmínky viz obr. 42



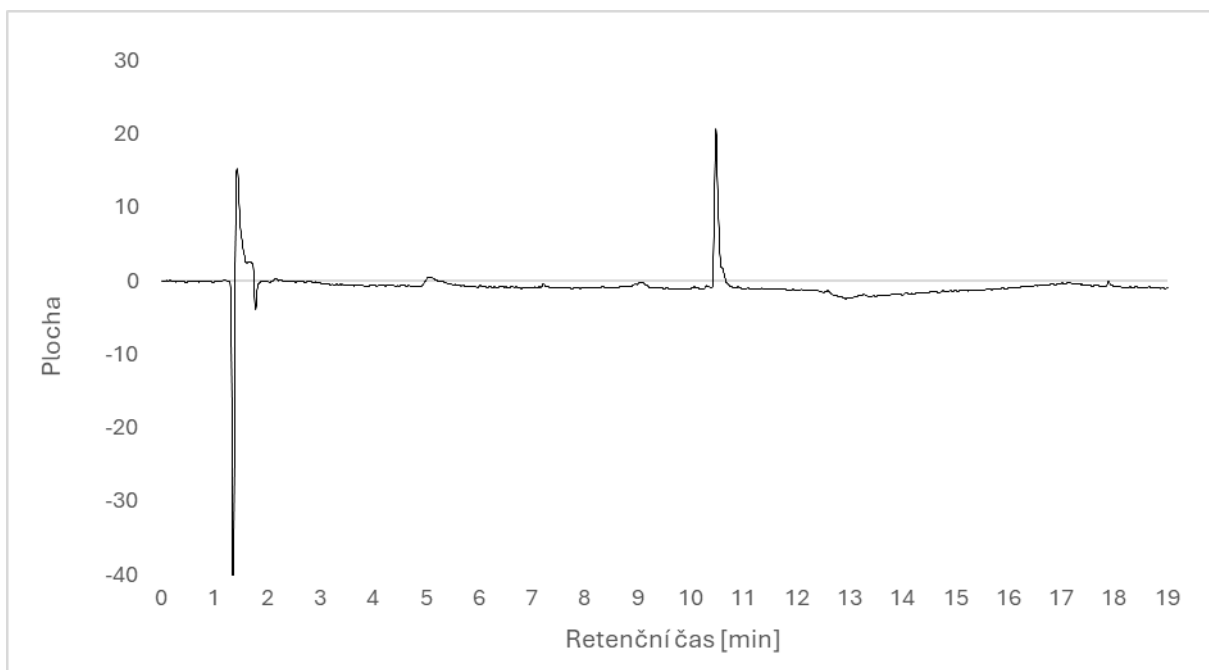
Obrázek 53. Chromatogram vzorku 0 v DMSO, navážka 10 mg/10 ml, UV detekce 400 nm, další podmínky viz obr. 42



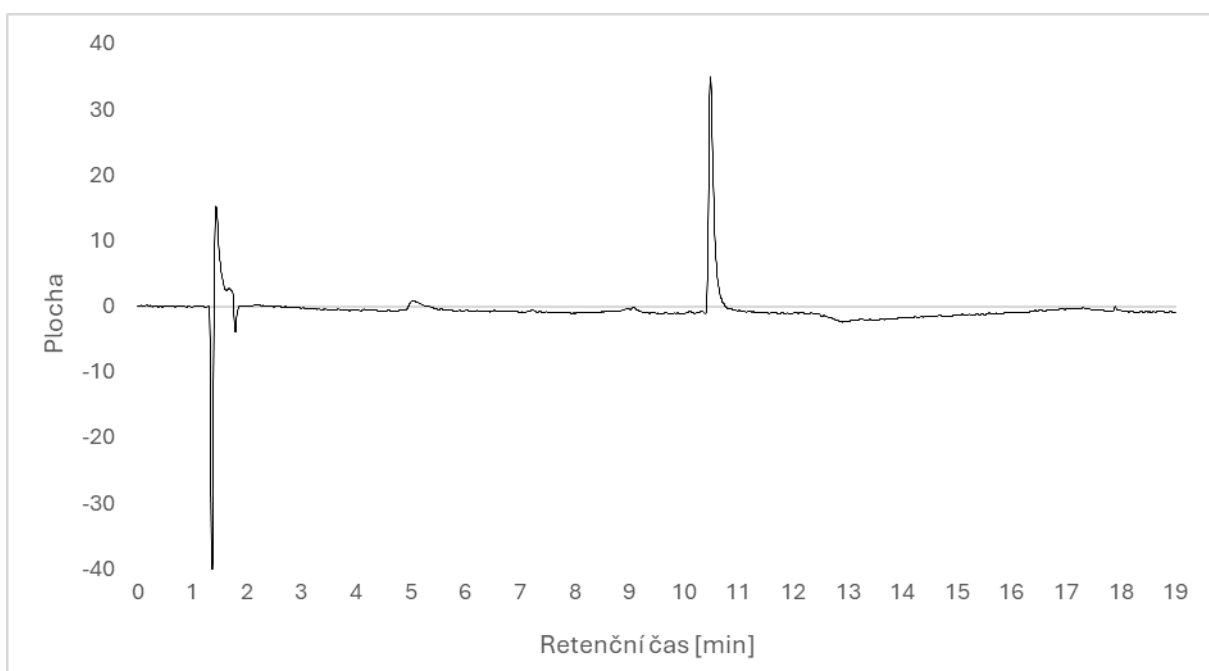
Obrázek 54. Chromatogram vzorku 1 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce 400 nm, další podmínky viz obr. 42



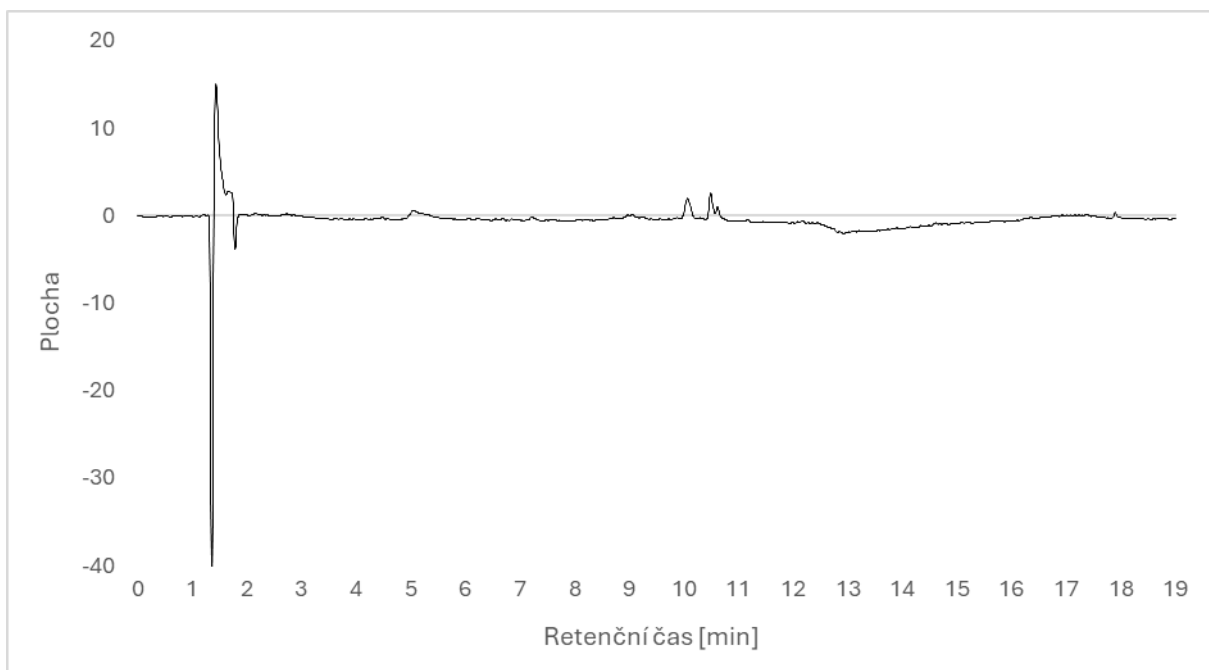
Obrázek 55. Chromatogram vzorku 2 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce 400 nm, další podmínky viz obr. 42



Obrázek 56. Chromatogram vzorku 3 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce 400 nm, další podmínky viz obr. 42



Obrázek 57. Chromatogram vzorku 4 v DMSO, navážka 3 mg/10 ml, UV detekce 400 nm, další podmínky viz obr. 42



Obrázek 58. Chromatogram vzorku 5 v DMSO, navážka 5 mg/10 ml, UV detekce 400 nm, další podmínky viz obr. 42