

Jména:
Datum:

Studium komplexace β -cyklodextrinu s diclofenacem s využitím NMR spektroskopie

Cílem laboratorního cvičení je prozkoumat interakce léčiva diclofenac s β -cyklodextrinem v D₂O při tvorbě komplexu za pomoci ¹H NMR spektroskopie.

Cyklodextriny jsou látky složené z 6 a více glukopyranosových jednotek. Glukopyranosové jednotky spojené α -1,4 glykosidickou vazbou vytváří kavitu ve tvaru kónusu, jejíž velikost se odvíjí od počtu propojených jednotek. α -cyklodextrin se skládá ze šesti jednotek, β -cyklodextrin (CD) ze sedmi a γ -cyklodextrin z osmi jednotek. Kavity cyklodextrinů mají dostatečnou velikost pro vazbu specifických molekul a tedy tvorbu inkluzních komplexů. Stabilita takových komplexů je ovlivněna mnoha faktory, mezi něž patří míra hydrofobních/hydrofilních vlastností molekuly, kavity a vnějšího prostředí (rozpouštědla) a vhodná velikost kavity pro zkoumanou molekulu. Mezi nejběžnější farmaceutické aplikace cyklodextrinů patří zvýšení rozpustnosti, stability a dostupnosti léčiv v lidském těle. Dále se cyklodextriny využívají jako chirální selektory nebo jako receptory pro různorodé molekuly.

Diclofenac (sodná sůl kyseliny 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyloctové – DCF) je jedním z nejužívanějších protizánětlivých léčiv. V organismu pomáhá tlumit účinky enzymu cyklooxygenázy, který stojí za tvorbou sloučenin způsobující zánětlivé reakce, látek zvyšující tělesnou teplotu a vyvolávajících pocit bolesti. Používá se zejména k léčbě bolesti kloubů, šlach, zubů či hlavy.

Na základě specifických interakcí mezi CD a DCF mohou být optimalizovány fyzikálněchemické a farmaceutické vlastnosti léčiv, ve kterých je diclofenac účinnou složkou a kde se CD používá pro zvýšení rozpustnosti DCF v lidském těle. Pro návrh takového léčiva je důležité znát nejen strukturu komplexu, ale také jeho konstantu stability. V této úloze s využitím NMR spektroskopie zjistíte, v jakém poměru vzniká komplex CD – DCF, jak struktura takového komplexu vypadá a jaká je jeho konstanta stability.

Předlaboratorní příprava:

1. Přiřadte signály β -cyklodextrinu (CD) v ¹H a ¹³C NMR spektru (využijte ¹H, ¹³C, APT, COSY, HSQC a HMBC spektrum)
2. Přiřadte signály diclofenacu (DCF) v ¹H a ¹³C NMR spektru (využijte ¹H, ¹³C, APT, COSY, HSQC a HMBC spektrum)
3. Doplňte odpovědi na zadané otázky k CD, DCF a vyjádřete vztah pro konstantu stability K_a

Naměřená NMR spektra potřebná k přiřazení jednotlivých signálů molekulám jsou nahrána v souborech LabNMR-DCF.pdf a LabNMR-CD.pdf

Úkoly:

1. Naměřte ¹H NMR spektra titračního experimentu roztoků CD a DCF ve vodě
2. Určete stechiometrii komplexu CD-DCF (sestrojte z naměřených dat Job plot)
3. Vypočtete konstantu stability komplexu CD-DCF
4. Z naměřených dat určete pravděpodobnou strukturu komplexu

Postup:

1. Do Eppendorfy si připravte roztok CD v D₂O (c = 2 mmol/L, V = 2,1 mL, M (CD) = 1134,98 g/mol, ρ (D₂O) = 1,107 g/mL). Míchejte na Vortexu do rozpuštění. *Roztok nemusí mít přesně zadanou koncentraci, ale pro další výpočty je nutné připravenou koncentraci znát přesně, proto je potřeba zvážit látku i přidané rozpouštědlo.*

$$m(\text{CD}) = \text{_____ mg} \quad m(\text{D}_2\text{O}) = \text{_____ g} \quad V(\text{D}_2\text{O}) = \text{_____ mL}$$

$$c(\text{CD}) = \text{_____ mg/mg} \quad c(\text{CD}) = \text{_____ mol/L}$$

2. Do Eppendorfy si navažte diclofenac (c = 20 mmol/L, V = 1 mL, M(DCF) = 318,13 g/mol). Místo čisté D₂O použijte k rozpuštění roztok CD z bodu 1 a pečlivě promíchejte na Vortexu. *Tímto je zajištěno, že koncentrace CD je v obou roztocích shodná, tj. nebude se jejich mísením měnit.*

$$m(\text{DCF}) = \text{_____ mg} \quad m(\text{roztok CD}) = \text{_____ g} \quad V(\text{roztok CD}) = \text{_____ mL}$$

$$c(\text{DCF}) = \text{_____ mg/mg} \quad c(\text{DCF}) = \text{_____ mol/L}$$

3. NMR kyvetu č.1 zvažte včetně uzávěru, napipetujte do ní 0,5 mL roztoku CD a opět kyvetu zvažte, abyste znali množství roztoku CD. Vzorek označte jako **b0**, měřte a zpracujte ¹H NMR spektrum, proveďte korekci chemických posunů.
4. Proveďte postupně 5 přídavek roztoku DCF: V₁ = 25 μL, V₂ = 50 μL, V₃ = 50 μL, V₄ = 125 μL, V₅ = 200 μL. Po každém přídávku zvažte kyvetu, uložte postupně jako vzorky **b1** až **b5**, změřte ¹H NMR spektrum, proveďte korekci posunů a odečtěte chemické posuny signálů CD.
5. Do NMR kyvetu č.2 napipetujte 0,5 mL roztoku DCF a kyvetu zvažte. Změřte ¹H NMR spektrum, uložte **b6**, proveďte korekci posunů a odečtěte posuny signálů CD a DCF.
6. Proveďte postupně 3 přídávky roztoku CD: V₇ = 100 μL, V₈ = 150 μL, V₉ = 175 μL. Po každém přídávku kyvetu zvažte, změřte ¹H NMR spektrum a uložte **b7**, **b8**, **b9**. Proveďte korekci posunů a odečtěte chemické posuny signálů CD.
7. Data zpracujte v tabulkovém procesoru MS Excel a vypočtěte konstantu stability komplexu.
8. Z naměřených spekter Job plotu A – K odečtěte chemické posuny δ [ppm] vždy dvou signálů CD a dvou signálů DCF. Sestrojte Job plot a určete z něj stechiometrii daného komplexu. (*Graf Job plot: Osa x – molární zlomek látky ve vzorku, osa y – součin molárního zlomku látky ve vzorku a změny chemického posunu signálu*). *Tabulky a grafy vypracujte v souboru Excel Lab_NMR_DCF_CD na listu Job plot.*

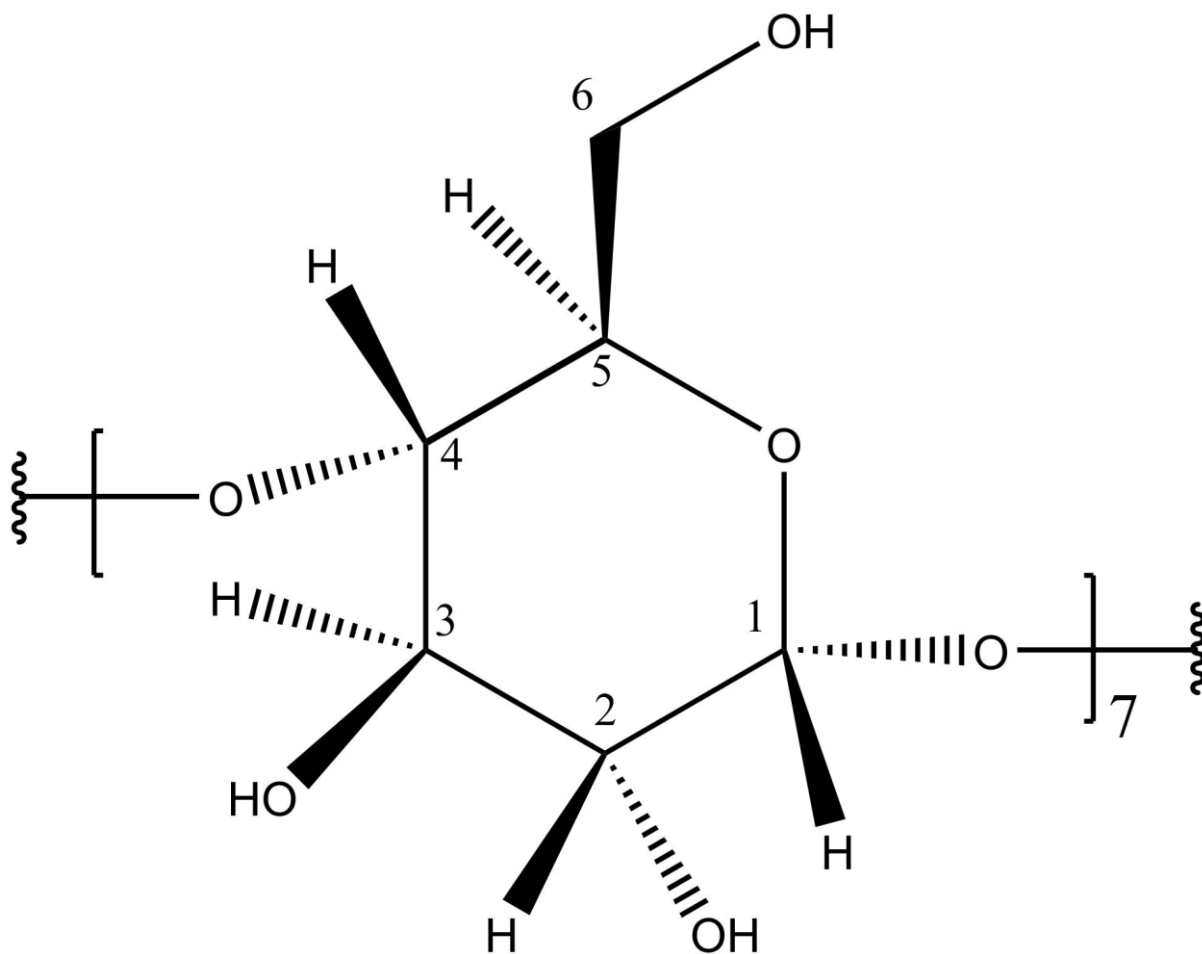
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
CD	0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
DCF	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%	0%

9. Z naměřeného ROESY spektra určete přibližnou strukturu komplexu β-cyklohextrinu s diclofenacem.

Tento sešit budete odevzdávat jako váš protokol, proto piště přímo do něj.

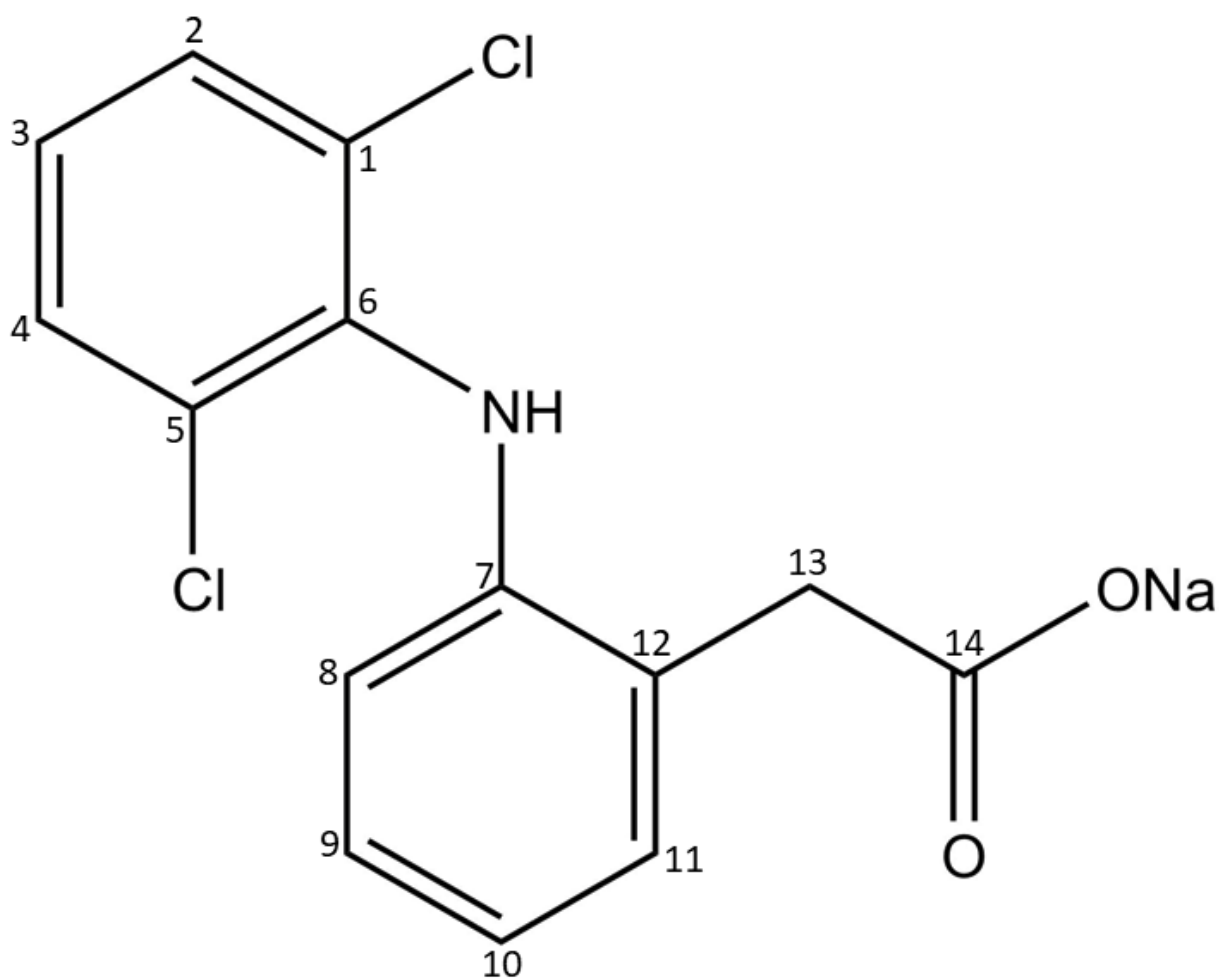
β -cyklodextrin (CD)

1. Kolik bude mít CD signálů v ^1H NMR spektru připraveného vzorku? Proč lze signály protonů hydroxylových skupin zcela opomenout? Který z protonů bude mít nejvyšší chemický posun?
2. Do struktury molekuly vepište multiplicity jednotlivých signálů protonů. Bude se některá z interakčních konstant výrazně od ostatních lišit? Vezměte v úvahu vztah velikosti interakční konstanty a dihedrálního úhlu (Karplusova rovnice).
3. Z naměřených NMR spekter přiřadte signály molekule CD. Uveďte jejich chemický posun [ppm], multiplicitu a velikost interakčních konstant [Hz].



Diclofenac (DCF)

- Uvedte počet signálů DCF a jejich multiplicitu v ^1H NMR spektru.
- Do struktury molekuly vepište chemický posun signálů protonů [ppm], jejich multiplicitu a velikost interakčních konstant [Hz].



Doplňte chemické posuny [ppm] a změny chemických posunů [Hz] pro příslušné signály molekuly CD. Doplňte vypočítané koncentrace CD a DCF jednotlivých roztoků.

	$m(\text{kyveta}) \text{ b0 - b5 [g]}$			$\delta(\text{H1}) \text{ [ppm]}$	$\delta(\text{H2}) \text{ [ppm]}$	$\delta(\text{H3}) \text{ [ppm]}$	$\delta(\text{H4}) \text{ [ppm]}$	$\delta(\text{H5}) \text{ [ppm]}$
	$m(\text{kyveta}) \text{ b6 - b9 [g]}$							
roztok	$c \text{ (CD)}$ [mmol/l]	$c \text{ (DCF)}$ [mmol/l]	hmotnost roztoku [g]	$\delta(\text{H1}) \text{ [Hz]}$ ($\Delta\delta \text{ k } \mathbf{b0}$)	$\delta(\text{H2}) \text{ [Hz]}$ ($\Delta\delta \text{ k } \mathbf{b0}$)	$\delta(\text{H3}) \text{ [Hz]}$ ($\Delta\delta \text{ k } \mathbf{b0}$)	$\delta(\text{H4}) \text{ [Hz]}$ ($\Delta\delta \text{ k } \mathbf{b0}$)	$\delta(\text{H5}) \text{ [Hz]}$ ($\Delta\delta \text{ k } \mathbf{b0}$)
b0								
b1								
b2								
b3								
b4								
b5								
b6								
b7								
b8								
b9								

Konstanta stability K_a

6. Vyjádřete vztah pro asociační konstantu (konstantu stability) K_a .

7. Vyjádřete vztah pro výpočet koncentrace komplexu v rovnováze (vyjděte z rovnovážné konstanty a látkové bilance interagujících složek).

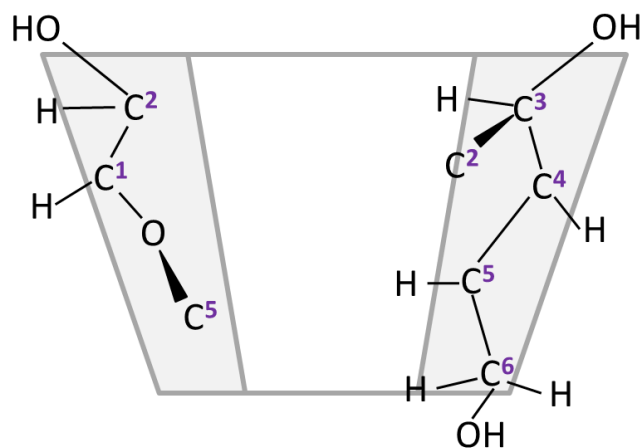
8. K výpočtům využijte soubor Excel s názvem *Lab_NMR_DCF_CD*, který vyhodnotíte jako součást vašeho protokolu.

Do listu *Záznam titračního experimentu* zapište chemické posuny signálů β -cyklodextrinu a ostatní experimentální hodnoty.

Do listu *Výpočet konstanty stability* vyberte signály takových protonů, které mají největší změnu chemických posunů při komplexaci a vypočtěte pomocí funkce Řešitel konstantu stability komplexu.

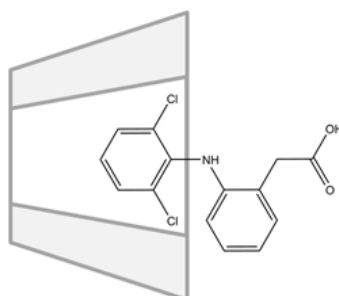
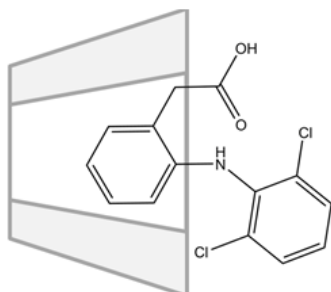
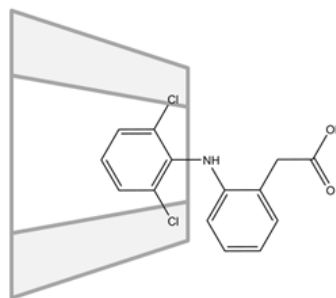
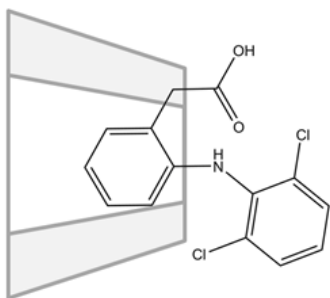
Vypočítaná hodnota konstanty stability K_a :

9. Do schématické struktury molekuly CD vyznačte, kde dochází při tvorbě komplexu k vazbě.



10. Z následujících schématických znázornění struktur komplexu vyberte (na základě ROESY spektra komplexu) nejpravděpodobnější.

1:1 (DCF:CD)



1:2 (DCF:CD)

